



**Die Bedeutung von Ceramiden für die Reorganisation
des Zytoskeletts in T-Zellen, die Ausbildung einer
immunologischen Synapse und die T-Zell-Aktivierung**

**Impact of ceramide accumulation on
T lymphocyte cytoskeletal reorganisation,
immune synapse formation and activation**

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Klasse: Infection and Immunity

vorgelegt von

Evelyn Gassert

aus Gießen

Würzburg 2011

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

2. Betreuer: Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle

3. Betreuer: Dr. Rik L. de Swart

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled "Impact of ceramide accumulation on T lymphocyte cytoskeletal reorganisation, immune synapse formation and activation" is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I verify that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical or similar form.

Würzburg,

Date

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Bedeutung von Ceramiden für die Reorganisation des Zytoskeletts in T-Zellen, die Ausbildung einer immunologischen Synapse und die T-Zell-Aktivierung“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Würzburg,

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Masernvirus	1
1.1.1	Epidemiologie, Klinik und Pathogenese.....	1
1.1.2	Taxonomie	2
1.1.3	Morphologie und Struktur	3
1.1.4	Transkription und Replikation	5
1.1.5	Zelluläre Rezeptoren	7
1.1.6	MV-induzierte Immunsuppression	8
1.2	Ceramide.....	11
1.2.1	Synthese von Sphingolipiden	11
1.2.2	Struktur und Funktion ceramidreicher Membranplattformen.....	14
1.2.3	Die Rolle ceramidreicher Membranplattformen bei Infektionen	16
1.3	T-Zell-Polarisierung und -Migration	17
1.4	Die Immunologische Synapse	20
1.5	Ziele der Arbeit.....	23
2	Material	24
2.1	Zellen	24
2.1.1	Zelllinien	24
2.1.2	Primäre Zellen	24
2.2	Mausstämme.....	24
2.3	Viren.....	25
2.4	Plasmide	25

2.5	Medien und Zusätze.....	26
2.6	Puffer und Lösungen.....	26
2.7	Antikörper.....	29
2.7.1	Unmodifizierte Primärantikörper.....	29
2.7.2	Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	30
2.7.3	Sekundärantikörper.....	31
2.7.4	Antikörper für die T-Zell-Stimulation.....	31
2.8	Zytokine und Chemokine.....	32
2.9	Kits.....	32
2.10	Chemikalien.....	32
2.11	Plastikwaren und Verbrauchsmaterial.....	33
2.12	Geräte.....	35
2.13	Software.....	36
3	Methoden.....	37
3.1	Zellkultur.....	37
3.1.1	Zellkultur von Suspensionszellen.....	37
3.1.2	Zellkultur adhärenter Zelllinien.....	37
3.1.3	Kryokonservierung der Zellen.....	37
3.1.4	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	38
3.1.5	Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes.....	38
3.1.6	Generierung humaner dendritischer Zellen (DC) aus Monozyten.....	39
3.1.7	Anreicherung primärer T-Zellen mittels Nylonwolle.....	40
3.2	Virologische Methoden.....	42

3.2.1	Herstellung von Virusstocks	42
3.2.2	Bestimmung des Virustiters TCID ₅₀	42
3.2.3	Virusaufreinigung durch Ultrazentrifugation	43
3.2.4	Virusbindung an T-Zellen.....	45
3.3	Zellbiologische Methoden.....	46
3.3.1	Inkubation von T-Zellen mit bakterieller Sphingomyelinase (bSMase) und C ₁₆ -Ceramid.....	46
3.3.2	Adhärenzassay	46
3.3.3	Chemotaxisassay	47
3.3.4	<i>Under agarose assay</i>	48
3.3.5	T-Zell-Polarisierung auf Fibronectin.....	49
3.3.6	DC/T-Zell-Konjugate	50
3.3.7	T-Zell-Stimulation mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen ..	50
3.3.8	Immunfluoreszenzfärbung	51
3.3.9	Direkte Markierung von Primärantikörpern mittels Zenon Labeling Kit ..	52
3.3.10	Transfektion primärer Zellen	52
3.3.11	T-Zell-Proliferation	53
3.4	Durchflusszytometrie.....	54
3.4.1	Oberflächenfärbungen	54
3.4.2	Intrazelluläre Färbungen	55
3.4.3	Quantitative Durchflusszytometrie	55
3.4.4	Messung von DC/T-Zell-Konjugaten im Durchflusszytometer	56
3.4.5	Messung des Calcium-Influx.....	58
3.5	Proteinbiochemische Methoden	59
3.5.1	Analyse von phosphorylierten Proteinen	59
3.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	60

3.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	60
3.5.4	Western Blot	61
3.6	Tierexperimentelle Methoden	62
3.6.1	Maussektion der Tiere	62
3.6.2	Herstellung einer Milzzellsuspension	63
3.6.3	Isolierung muriner Knochenmarkzellen	63
4	Ergebnisse	65
4.1	Akkumulation von Ceramiden <i>in vitro</i>	65
4.2	Einfluss von Ceramiden auf die T-Zell-Polarisierung	67
4.3	Ceramide beeinträchtigen die Adhärenz von T-Zellen an Fibronectin und ICAM-1	69
4.4	Analyse der T-Zell-Chemotaxis	72
4.4.1	Untersuchungen zur T-Zell-Chemotaxis nach Akkumulation von Ceramiden	72
4.4.2	Analyse der T-Zell-Chemotaxis nach MV-Kontakt	74
4.5	Untersuchungen zur DC-Chemotaxis nach Inkubation mit bSMase	76
4.6	Untersuchungen zur T-Zell-Migration in einem zweidimensionalen System (<i>under agarose assay</i>)	77
4.6.1	Die Akkumulation von Ceramiden beeinflusst die T-Zell-Migration	78
4.6.2	Die reduzierte T-Zell-Motilität nach MV-Kontakt wird durch die Aktivierung von ASM vermittelt	80
4.6.3	Untersuchungen zur Expression und Verteilung des Chemokinrezeptors CXCR4	82
4.7	Die Akkumulation von Ceramiden führt zur einer abweichenden Verteilung intrazellulärer Proteine in T-Zellen	85

4.8	Ceramide beeinflussen die Phosphorylierung von Akt und Membranlinkerproteinen.....	87
4.9	Analyse von DC/T-Zell-Konjugaten	91
4.9.1	Verteilung von Ceramiden in DC/T-Zell-Konjugaten	92
4.9.2	Lokalisation von ASM in DC/T-Zell-Konjugaten	93
4.9.3	Die Translokation von CD3 und des MTOC zur Synapse ist nach Induktion von Ceramiden nicht gestört	94
4.9.4	Die Generierung von Ceramiden beeinflusst nicht die Konjugat-Frequenz	96
4.9.5	Analyse der Konjugatbildung nach Inhibierung von ASM und NSM in T-Zellen.....	98
4.9.6	Untersuchungen zur Konjugatbildung ASM-defizienter Zellen.....	99
4.10	Einfluss von Ceramiden auf Calcium-Influx in T-Zellen.....	100
4.10.1	Lokalisation von Orai1 und Stim1 in DC/T-Zell-Konjugaten.....	100
4.10.2	Ceramide beeinflussen den Calcium-Influx in T-Zellen.....	102
4.11	Analysen zur T-Zell-Proliferation	104
4.11.1	Reduzierte T-Zell-Proliferation nach Akkumulation von Ceramiden.....	105
4.11.2	Einfluss der ASM- bzw. NSM-Aktivität auf die T-Zell-Proliferation	106
4.11.3	ASM-defiziente DCs zeigen eine reduzierte stimulatorische Aktivität ..	107
5	Diskussion	109
5.1	Einfluss von Ceramiden auf die Zytoskelettdynamik von T-Zellen	109
5.2	Rolle von Ceramiden für Aktivierung und Proliferation von T-Zellen	119
6	Zusammenfassung	124
7	Summary	126

8	Literaturverzeichnis.....	127
9	Abkürzungsverzeichnis.....	147
10	Veröffentlichungen.....	152
10.2	Publikationen.....	152
10.3	Vorträge	152
10.4	Poster.....	153

1 Einleitung

1.1 Das Masernvirus

1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Pathogenese

Der Erreger der akuten Masern beim Menschen ist das Masernvirus (MV). Das MV ist ein ausschließlich humanpathogenes Virus mit weltweiter Verbreitung. Trotz der Verfügbarkeit eines wirksamen Lebendimpfstoffes gehören Masern noch immer zu den zehn häufigsten Infektionskrankheiten in Entwicklungsländern und sind eine der häufigsten Todesursachen bei Kindern unter fünf Jahren. Derzeit werden jährlich mehr als 20 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert. In 2008 waren 164000 Todesfälle in Folge einer MV-Infektion zu verzeichnen, wobei der Anteil der tödlichen Verläufe in Entwicklungsländern, vor allem in Afrika, besonders hoch ist (WHO, 2009). Auch in Deutschland kommt es immer wieder zu regional und zeitlich begrenzten Ausbrüchen, wobei die Zahl der infizierten Personen seit 2003 (bis auf das Jahr 2006) unter 1000 Erkrankungsfällen lag (RKI, 2010).

Masern ist eine höchst ansteckende Krankheit, welche durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Die Infektion erfolgt über den respiratorischen Trakt, wobei CD150-positive Makrophagen oder dendritische Zellen (DC) die ersten infizierten Zellen darstellen (de Swart et al, 2007; de Witte et al, 2008). Vom respiratorischen Trakt gelangt das Virus in die lokalen lymphatischen Organe. Dort kommt es zu einer verstärkten Virusreplikation und -vermehrung, woraufhin die Ausbreitung des Virus über den Blutstrom in das retikuloendotheliale System und den respiratorischen Trakt erfolgt (primäre Virämie). Die Verbreitung erfolgt dabei zumeist Zell-assoziiert durch infizierte Monozyten und Lymphozyten (Esolen et al, 1993; Schneider-Schaulies et al, 1991). In einer zweiten Virämie kommt es dann zur Infektion von Epi- und Endothelzellen der Haut sowie einer Reihe anderer Organe.

Die ersten Anzeichen einer Erkrankung treten etwa zehn Tage nach Infektion auf, typische Symptome sind Fieber, Schnupfen, Husten und Bindehautentzündung. Pathognomonisch sind die oft nachweisbaren Koplikschen Flecken in der

Mundschleimhaut, ein charakteristisches Masern-Enanthem. 3-7 Tage nach Auftreten der initialen Symptome entsteht das charakteristische makulopapulöse Masernexanthem, welches durch die Zerstörung infizierter Epithelzellen der Haut hervorgerufen wird. Es beginnt im Gesicht und hinter den Ohren und breitet sich innerhalb von zwei bis drei Tagen über den gesamten Körper aus.

Die MV-Infektion löst eine Immunantwort aus, durch die das Virus rasch eliminiert wird und welche zu einer lebenslangen Immunität führt. Gleichzeitig wird in Patienten eine über mehrere Wochen andauernde Immunsuppression beobachtet (Abschnitt 1.1.6). Diese gilt als Hauptursache für die hohe Sterblichkeitsrate, vor allem in wenig entwickelten Ländern, da sie bakterielle Superinfektionen begünstigt. Dort tragen zudem mangelnde Ernährung und unzureichende medizinische Versorgung zu schweren Verlaufsformen bei. In Industrienationen sind häufige Komplikationen, die mit einer MV-Infektion beobachtet werden Otitis media, Bronchitis, Pneumonie und Diarrhöen. Weitere, seltene Komplikationen einer MV-Infektion sind die akute postinfektiöse Masernenzephalitis (APME), die Einschlusskörperchen Enzephalitis (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE), sowie die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Die APME tritt während der Erkrankung in 1/1000 bis 1/5000 Fällen auf und endet in 20 % bis 40 % der Fälle tödlich. Im Gegensatz zu MIBE und SSPE, konnte bei der APME keine Virusreplikation im Gehirn nachgewiesen werden. MIBE und SSPE stellen persistierende Infektionen des Gehirns dar und verlaufen tödlich. Die MIBE entwickelt sich in immunsupprimierten Patienten oder Patienten mit zellulären Immundefekten und tritt innerhalb weniger Wochen bis Monate nach der Infektion auf, wohingegen sich die SSPE erst Jahre nach der Infektion in 1/10000 Fällen entwickelt (Bellini et al, 2005; Takasu et al, 2003).

1.1.2 Taxonomie

MV besitzt ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes Genom mit Minus-Strang-Polarität und gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*, welche in vier Familien unterteilt wird: *Borna-*, *Rhabdo-*, *Filo-* und *Paramyxoviridae*. Innerhalb der *Paramyxoviridae* wird das MV in die Unterfamilie der *Paramyxovirinae* eingeteilt und bildet aufgrund fehlender Neuraminidase-Aktivität zusammen mit anderen Viren die

Gattung *Morbillivirus*. MV stellt den einzigen humanpathogenen Vertreter der Morbilliviren dar, im Tier sind Morbilliviren u.a. durch das Rinderpestvirus (RPV), das Hundestaupavirus (CDV), das Peste-des-Petits-Ruminants-Virus (PPRV) sowie das Seehundstaupavirus (PDV) vertreten. Evolutionsgeschichtlich könnte sich das MV aus dem eng verwandten Rinderpestvirus in einem Umfeld, in dem Mensch und Rinder in räumlicher Nähe zueinander lebten, entwickelt haben.

Familie *Paramyxoviridae*

Unterfamilie *Paramyxovirinae*

- Genus** *Paramyxovirus* (humanes Parainfluenzavirus 1/3, Sendavirus)
Rubulavirus (Mumps, humanes Parainfluenzavirus 2/4)
Morbillivirus (**Masern**, Hundestaupavirus, Rinderpestvirus)
Henipavirus (Hendra- und Nipahvirus)
Avulavirus (Newcastle-Disease-Virus, Vogelparainfluenzaviren 2-9)

Unterfamilie *Pneumovirinae*

- Genus** *Pneumovirus* (Respiratorisches Syncytialvirus)
Metapneumovirus (humanes Metapneumovirus)

Abb. 1.1: Übersicht und einige charakteristische Vertreter der Familie der *Paramyxoviridae*.

1.1.3 Morphologie und Struktur

Das MV ist ein pleomorphes, umhülltes Virus mit einer durchschnittlichen Größe von 120-250 nm. Es besteht aus den sechs Strukturproteinen H (Hämagglutinin)-Protein, F (Fusions)-Protein, M (Matrix)-Protein, N (Nukleokapsid)-Protein, P (Phospho)-Protein und L (Large)-Protein. Die Lipidhülle umgibt den viralen Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der aus dem viralen Genom, dem N-Protein und dem Polymerase-Komplex besteht. Das virale RNA-Genom hat eine Länge von 15894 Basenpaaren und liegt in dichter Packung mit dem N-Protein vor. Jedes N-Protein bedeckt dabei sechs Basen und schützt somit die genomische RNA vor dem Abbau durch zelluläre RNasen. Daran assoziiert ist der virale Polymerase-Komplex,

bestehend aus dem P- und dem L-Protein. Das L-Protein stellt die katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase dar, wohingegen das P-Protein als regulatorischer Co-Faktor der Polymerase fungiert (Horikami & Moyer, 1995).

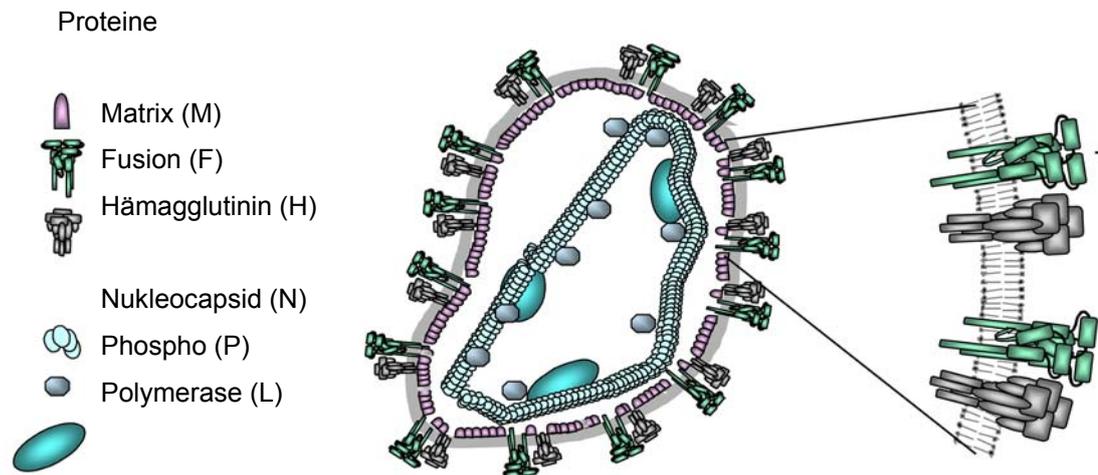


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines MV-Partikels.

In die virale Hülle sind die Glykoproteine H und F integriert, welche den Eintritt des Virus in die Wirtszelle vermitteln. Das H-Protein ist ein Typ-II-Glykoprotein und liegt als Tetramer, bestehend aus zwei Homodimeren, auf der Oberfläche der Virionen vor. Das H-Protein vermittelt die Interaktion mit den zellulären Rezeptoren. Dabei wurden bereits mehrere Aminosäuren in der Ektodomäne des H-Proteins ermittelt, welche für die Rezeptorbindung und -spezifität von Bedeutung sind (Hashiguchi et al, 2007; Hashiguchi et al, 2011; Masse et al, 2004; Tahara et al, 2007a; Vongpunsawad et al, 2004). Neben der Bindung an den zellulären Rezeptor unterstützt das H-Protein zudem die F-Protein-vermittelte Fusion mit der Wirtszellmembran (Nussbaum et al, 1995).

Das F-Protein ist ein Typ-I-Glykoprotein und für die Fusion der Virusmembran mit der Wirtszellmembran verantwortlich. Es wird zunächst als inaktives F_0 -Vorläuferprotein synthetisiert, welches anschließend im Golgi Apparat durch die zelluläre Protease Furin in die funktionellen Untereinheiten F_1 und F_2 proteolytisch gespalten wird. F_1

bildet dabei die transmembrane Untereinheit, die über eine Disulfid-Brücke kovalent mit der F₂-Untereinheit verbunden ist. Das F-Protein liegt als Trimer auf der Oberfläche der Virionen vor und bildet zusammen mit dem H-Protein funktionelle F/H-Komplexe (Wild et al, 1994; Wild et al, 1991). Die fusogene Aktivität der F/H-Komplexe wird zum einen durch die Stärke der Interaktion zwischen F und H, zum anderen durch die Interaktion der zytoplasmatischen Domänen mit dem M-Protein reguliert (Cathomen et al, 1998a; Cathomen et al, 1998b; Plemper et al, 2002; Tahara et al, 2007b).

Das M-Protein ist mit der inneren Seite der Lipidhülle assoziiert und interagiert sowohl mit der zytoplasmatischen Domäne der Glykoproteine als auch dem RNP-Komplex (Bellini et al, 1994; Griffin & Bellini, 1996; Moll et al, 2002; Naim et al, 2000; Runkler et al, 2007). Das M-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung und Freisetzung viraler Partikel (Salditt et al, 2010). Des Weiteren wirkt das M-Protein als negativer Regulator der Transkription, wenn es an den RNP-Komplex gebunden ist (Iwasaki et al, 2009; Reuter et al, 2006; Suryanarayana et al, 1994).

Neben den Strukturproteinen werden auch die Nicht-Strukturproteine C und V exprimiert. Beide Proteine werden von der mRNA des P-Proteins translatiert, wobei das C-Protein in einem anderen Leserahmen codiert ist und das V-Protein durch mRNA-Editierung entsteht (Bellini et al, 1985; Cattaneo et al, 1989). Dabei fügt die virale Polymerase co-transkriptionell an einer definierten Stelle ein zusätzliches Nukleotid (G) ein. Funktionell sind beide Proteine vermutlich an der Regulation von Transkription und Replikation beteiligt (Bankamp et al, 2008; Bankamp et al, 2005; Escoffier et al, 1999; Tober et al, 1998; Witko et al, 2006). Des Weiteren interferieren sie mit der zellulären Antwort nach MV-Infektion, indem sie die Produktion von Interferonen und/oder die Signalleitung von Interferonrezeptoren beeinflussen (Fontana et al, 2008; Naniche et al, 2000; Palosaari et al, 2003; Shaffer et al, 2003; Shingai et al, 2007; Takeuchi et al, 2003a).

1.1.4 Transkription und Replikation

Transkription und Replikation des viralen Genoms finden im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Das virale Genom kodiert für sechs kontinuierliche

Transkriptionseinheiten, die, abgesehen von dem Bereich zwischen dem M- und F-Gen, durch kurze intergenische Sequenzen voneinander getrennt sind, welche Signale für Transkriptionstermination, Polyadenylierung und Transkriptionsinitiation enthalten (Bellini et al, 1994).

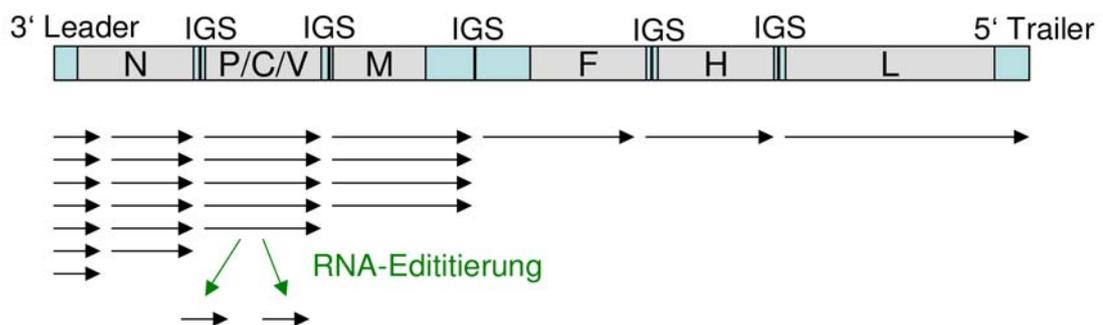


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des MV-Genoms.

Das Genom wird am 3'-Ende und am 5'-Ende von nicht-codierenden Sequenzen flankiert. Diese als Leader und Trailer bezeichneten Regionen enthalten die Promotoren für Transkription (Leader) bzw. Replikation (Trailer) sowie Erkennungssequenzen für die Enkapsidierung (Horikami & Moyer, 1995; Parks et al, 2001). Nach Eintritt in die Zelle bindet die virale RNA-abhängige Polymerase zunächst an die Promotorregion in der 3'-Leadersequenz und beginnt mit der Transkription des N-Gens. Beim Erreichen der intergenischen Sequenzen kommt es zum Transkriptionsstopp, die gebildete mRNA erhält eine Capstruktur und wird polyadenyliert. Anschließend wird die Transkription des P-Gens an der nächsten Initiationssequenz gestartet. Durch denselben Stopp/Start-Mechanismus werden nachfolgend auch die mRNAs für M, F, H und L gebildet. Beim Überspringen der intergenischen Sequenzen kann es jedoch zum Abfallen des Polymerasekomplexes kommen, infolgedessen entsteht im Verlauf der Transkription ein Gradient der gebildeten mRNAs sowie der translatierten Proteine (Cattaneo et al, 1987; Harder & Osterhaus, 1997; Schneider-Schaulies et al, 1989). Das N-Protein wird demnach am häufigsten gebildet, wohingegen nur geringe Mengen an L-Protein translatiert werden.

Zum Wechsel von Transkription zur Replikation kommt es vermutlich beim Vorliegen ausreichender Mengen an N-Protein. Die Stoppsignale in den intergenischen

Sequenzen werden von der Polymerase überlesen, was zur Entstehung vollständiger Positivstränge führt (Banerjee, 1987; Blumberg & Kolakofsky, 1981; Lamb, 1996). Diese dienen wiederum als Matrize für die Synthese negativsträngiger RNA-Genome. Die neu gebildeten RNP-Komplexe assoziieren mit dem M-Protein, welches wiederum mit den in der Zellmembran eingelagerten Glykoproteinen wechselwirkt. Die Freisetzung neuer Viruspartikel erfolgt vorzugsweise an sogenannten *lipid rafts* (Manie et al, 2000; Salditt et al, 2010; Vincent et al, 2000).

1.1.5 Zelluläre Rezeptoren

Der Eintritt des Virus in die Zielzelle wird durch die Interaktion des H-Proteins mit bestimmten zellulären Rezeptoren vermittelt. Bisher wurden zwei Rezeptoren identifiziert, die von MV als Eintrittsrezeptor benutzt werden: der Komplementbindungsrezeptor CD46 (*membrane cofactor protein*, MCP) (Dorig et al, 1993; Nanche et al, 1993) und CD150 (*signalling lymphocyte activation molecule*, SLAM) (Tatsuo et al, 2000; Yanagi et al, 2006). CD46 wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, der Rezeptor kann jedoch nur von MV-Impfstämmen als Eintrittsrezeptor verwendet werden. CD150 wird auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen, Gedächtniszellen, Makrophagen und reifen dendritischen Zellen exprimiert (Yanagi et al, 2006) und wird *in vivo* sowohl von Impfstämmen als auch von Wildtypisolaten als Eintrittsrezeptor verwendet (de Vries et al, 2010). Die eingeschränkte Expression von CD150 auf Zellen des Immunsystems erklärt zwar den Lymphtropismus von MV, nicht aber die Infektion epithelialer, endothelialer sowie neuronaler Zellen. Daher wird das Vorhandensein mindestens eines weiteren Rezeptors (Rezeptor X) angenommen (Andres et al, 2003; Leonard et al, 2008; Ludlow et al, 2010; Takeuchi et al, 2003b). Nach Infektion oder Kontakt mit MV ist sowohl die Expression von CD150 als auch von CD46 auf der Oberfläche der Zellen verringert (Erlenhoefer et al, 2001; Schneider-Schaulies et al, 1995; Schnorr et al, 1995; Welstead et al, 2004). Neben den bekannten Rezeptoren konnte auch für das *C-type lectin* DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*) gezeigt werden, dass es eine wichtige Rolle bei der MV-Infektion von DCs spielt. DC-SIGN dient zwar nicht als Eintrittsrezeptor für MV, jedoch wird durch die Bindung an DC-SIGN die *cis*-Infektion unreifer DCs verstärkt (de Witte et al, 2006).

1.1.6 MV-induzierte Immunsuppression

Eine MV-Infektion ist durch zwei widersprüchliche Reaktionen gekennzeichnet. Zum einen kommt es zu einer virusspezifischen Immunantwort, die zu einer lebenslangen Immunität führt, zum anderen sind Patienten nach einer MV-Infektion für mehrere Wochen immunsupprimiert, wodurch eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen besteht. Mit Beginn des Masernexanthems werden Antikörper gegen die meisten viralen Proteine gebildet (Griffin, 1995). Erhöhte Plasmawerte von IFN- γ , Neopterin sowie des Interleukin-2-Rezeptors können vor Auftreten des Exanthems nachgewiesen werden. Mit Auftreten des Exanthems sind zudem die Werte für IL-2 sowie lösliches CD4 und CD8 erhöht. Dies steht in Einklang mit einer Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen und einer Th1-Antwort von CD4⁺ T-Zellen. Nach Abklingen des Exanthems werden verstärkt die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 gebildet, welche eine Th2-Antwort von CD4⁺ T-Helferzellen kennzeichnen (Griffin, 1995; Griffin, 2010; Griffin & Ward, 1993).

MV ist das erste Virus, für das eine immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde. Bereits 1908 beschrieb von Pirquet das Ausbleiben einer Tuberkulinreaktion nach MV-Infektion, was auf eine Störung der zellulären Immunantwort hindeutet. Die MV-induzierte Immunsuppression ist durch eine reduzierte Anzahl an B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Lymphopenie) (Okada et al, 2000; Okada et al, 2001; Ryon et al, 2002) sowie eine verlängerte Th2-Antwort gekennzeichnet (Griffin & Ward, 1993). Während sich die Anzahl der T-Lymphozyten nach Abklingen des Exanthems rasch normalisiert, ist die Immunsuppression noch Wochen nach der Erkrankung zu beobachten (Okada et al, 2001). Ein weiteres Charakteristikum der MV-induzierten Immunsuppression besteht darin, dass die Proliferation aus Patientenblut isolierter Lymphozyten nach Stimulation mit Mitogenen inhibiert ist (Schneider-Schaulies et al, 2002; Schneider-Schaulies & Dittmer, 2006). Aufgrund der geringen Anzahl infizierter PBMCs (< 2 %) (de Swart et al, 2007; Forthal et al, 1992; Schneider-Schaulies et al, 1991) scheint eine direkte Infektion der Zellen jedoch nicht der grundlegende Mechanismus für die Proliferationshemmung zu sein. Vielmehr könnte die MV-Infektion antigenpräsentierender Zellen, insbesondere DCs, die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen (de Swart et al, 2007). *In vitro* generierte DCs sind mit MV infizierbar und die Infektion führt zu deren phänotypischer Ausreifung und somit zu

einer erhöhten Expression von Reifungsmarkern, wie CD80, CD83, CD86 und MHCII (Klagge et al, 2000; Schnorr et al, 1997b; Servet-Delprat et al, 2000). MV-infizierte DCs ähneln weiterhin bezüglich ihrer morphologischen und adhäsiven Eigenschaften LPS-ausgereiften DCs (Shishkova et al, 2007), allerdings konnte eine verminderte Produktion von IL-12 nach CD40-Ligation beobachtet werden (Servet-Delprat et al, 2000). Im Verlauf des Reifungsprozesses von DCs wird zudem die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 hochreguliert, wohingegen die Expression von CCR5 vermindert wird. CCR7 vermittelt die Wanderung von DCs aus der Peripherie in die sekundären lymphatischen Organe. Eine Induktion von CCR7 konnte nach MV-Infektion jedoch nicht beobachtet werden, wodurch die Wanderung infizierter DCs in die sekundären lymphatischen Organe gestört sein könnte (Abt et al, 2009).

Die Kokultur MV-infizierter DCs mit T-Zellen hat gezeigt, dass infizierte DCs nicht in der Lage sind die Proliferation von naiven T-Zellen zu stimulieren (Fugier-Vivier et al, 1997; Grosjean et al, 1997; Klagge et al, 2000; Schnorr et al, 1997b; Steineur et al, 1998). Für die Aktivierung von T-Zellen ist die Ausbildung einer stimulatorischen Kontaktfläche, der immunologischen Synapse (IS), zwischen DCs und T-Zellen essentiell (Abschnitt 1.3.2). In fixierten Konjugaten ist die Organisation der IS zwischen MV-infizierten DCs und T-Zellen im Vergleich zur IS zwischen LPS-ausgereiften DCs und T-Zellen allerdings nicht verändert, da in immunhistochemischen Untersuchungen eine normale Verteilung von CD3, LFA-1 (*lymphocyte-function associated molecule 1*) und Talin beobachtet wurde. *Live-cell-imaging* von Konjugaten zwischen infizierten DCs und T-Zellen hat jedoch gezeigt, dass die gebildeten Konjugate nicht stabil sind und ein lang-anhaltender Calcium-Einstrom in T-Zellen nicht aufrechterhalten werden kann, wodurch eine effiziente T-Zell-Aktivierung unterbunden wird (Shishkova et al, 2007). Die Expression beider MV-Glykoproteine auf der Oberfläche infizierter DCs ist dabei von enormer Bedeutung. Die Infektion von DCs mit MGV, einem rekombinanten Virus, dessen MV-Glykoproteine durch die Glykoproteine des Vesikular-Stomatitis-Virus (VSV) ersetzt wurden, hatte keinen Einfluss auf die stimulatorischen Eigenschaften der DCs (Klagge et al, 2000; Schnorr et al, 1997b). In Übereinstimmung damit, konnte auch die Synapsenstabilität nach MGV-Infektion von DCs zumindest partiell wiederhergestellt werden (Shishkova et al, 2007).

In *in vitro* Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass bereits der Kontakt von Lymphozyten mit MV oder transfizierten Zellen, die F und H auf ihrer Oberfläche exprimieren, ausreichend ist, um einen Proliferationsarrest hervorzurufen (Niewiesk et al, 1997; Schlender et al, 1996). Dabei führt der Kontakt von Lymphozyten mit den viralen Glykoproteinen weder zur Apoptose der Zellen, noch sind Abweichungen in der Expression von Aktivierungsmarkern oder der Zytokinproduktion zu beobachten. Durch den Kontakt mit dem Glykoproteinkomplex werden die Zellen jedoch in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert, wobei die proteolytische Spaltung des F-Proteins für die Inhibierung der Proliferation absolut notwendig ist, nicht jedoch seine fusogene Aktivität (Avota et al, 2001; Engelking et al, 1999; Niewiesk et al, 1997; Niewiesk et al, 1999; Schlender et al, 1996; Schnorr et al, 1997a; Weidmann et al, 2000a; Weidmann et al, 2000b). Des Weiteren wird die Proliferationshemmung unabhängig von den beiden bisher bekannten MV-Rezeptoren CD150 und CD46 induziert, da auch Zellen, die diese Rezeptoren nicht exprimieren, empfänglich für die MV-induzierte Proliferationshemmung sind. Zudem konnte die kontaktvermittelte Proliferationshemmung in Gegenwart blockierender Antikörper gegen CD46 und CD150 nicht aufgehoben werden (Erlenhofer et al, 2001; Erlenhofer et al, 2002; Schneider-Schaulies & Dittmer, 2006).

Auf molekularer Ebene ist der Zellzyklusarrest auf eine Inhibierung des PI3K/Akt-Signalweges zurückzuführen. In MV-kontaktierten T-Zellen konnte eine verminderte Phosphorylierung der Akt-Kinase infolge der IL2-Rezeptor- bzw. CD3/CD28-Stimulation nachgewiesen werden (Avota et al, 2001). Durch den Kontakt mit MV wird die Degradation der E3-Ligase Cbl-b gestört, wodurch die Assoziation der regulatorischen Untereinheit der PI3K (p85) mit *lipid rafts* und die nachfolgende Generierung von Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-trisphosphat (PIP3) unterbunden wird (Avota et al, 2004). Die Generierung von PIP3 dient der Rekrutierung und Aktivierung von PH (*pleckstrin homology*)-Domänen enthaltenden Proteinen wie Akt. Durch die Überexpression einer membrangebundenen, aktiven Form von Akt konnte daher der Proliferationsarrest nach MV-Kontakt verhindert werden (Avota et al, 2001).

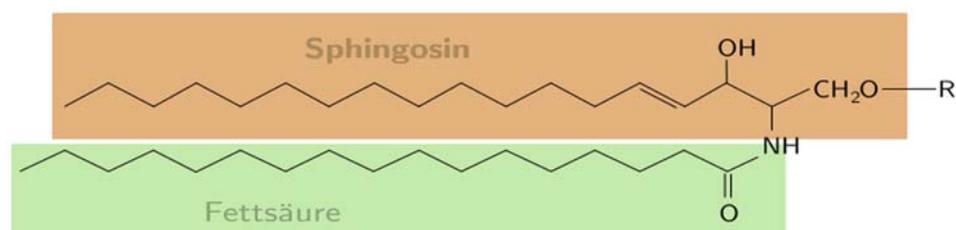
Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass MV mit der Zytoskelettdynamik in T-Zellen interferiert, was auf einer veränderten Regulation von GTPasen und aktinbindender Proteine beruht. So wurde in MV-kontaktierten T-Zellen eine verminderte Aktivierung der GTPasen Rac und Cdc42 sowie den Linker-Proteinen

Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine) beobachtet, wohingegen eine Aktivierung von RhoA und Cofilin nachgewiesen werden konnte (Müller et al, 2006). Infolgedessen war die Ausbildung von Lamellipodien und Filopodien sowie die Adhärenz der Zellen an Fibronektin gestört. Zudem waren MV-kontaktierte T-Zellen nur eingeschränkt in der Lage CD3 und das MTOC zur Kontaktstelle mit DCs zu relokalisieren.

1.2 Ceramide

1.2.1 Synthese von Sphingolipiden

Ceramide gehören zur Familie der Sphingolipide, welche neben Cholesterol und Glycerophospholipiden strukturelle Bestandteile eukaryotischer Membranen darstellen. Sphingolipide setzen sich chemisch aus dem langkettigen Aminoalkohol Sphingosin, einer polaren Kopfgruppe und einer Fettsäure, die über eine Amid-Bindung mit dem C2-Atom des Sphingosins verbunden ist, zusammen (Barenholz & Thompson, 1980).



Kopfgruppe R	Sphingolipid
H	Ceramid
Phosphocholin	Sphingomyelin
Zucker	Glykosphingolipid

Abbildung 1.4: Chemische Struktur von Sphingolipiden.

Es gibt drei Haupttypen von Sphingolipiden: Ceramide und die daraus abgeleiteten Sphingomyeline (SM) und Glykosphingolipide. Ceramide können zum einen *de novo* synthetisiert werden, zum anderen entstehen sie durch die Hydrolyse komplexerer Sphingolipide, meist durch die Hydrolyse von SM, welche durch sogenannte Sphingomyelinasen (SMase) katalysiert wird (Marchesini & Hannun, 2004). Ceramide werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert, während die Bildung komplexerer Sphingolipide, wie SM oder Glukosylceramid im Golgi Apparat erfolgt (Jeckel et al, 1990; Lannert et al, 1998; Michel & van Echten-Deckert, 1997). Die Sphingolipide werden nachfolgend mittels Vesikeln zur Plasmamembran transportiert.

Die *de novo* Synthese von Ceramiden beginnt mit der Kondensation von Palmitoyl-CoA und Serin zu 3-Ketosphinganin (3-Ketodihydrosphingosin) durch die Serin-Palmitoyltransferase (Mandon et al, 1992). Anschließend erfolgt die NADH-abhängige Reduktion von 3-Ketosphinganin zu Sphinganin (Dihydrosphingosin). An dieses wird mit Hilfe der Dihydroceramid-Synthase eine Fettsäure angeknüpft und es entsteht Dihydroceramid. Die Länge der Fettsäure ist variabel, wobei die meisten Ceramide Fettsäuren mit 16-26 C-Atomen enthalten. Ceramid wird schlussendlich in einer FAD-abhängigen Reaktion durch die Einführung einer Doppelbindung in Dihydroceramid gebildet (Bartke & Hannun, 2009).

Ceramide sind die einfachste Gruppe der Sphingolipide, da bei ihnen die Kopfgruppe nur aus einem Wasserstoffatom besteht. Ferner stellen Ceramide die Basis für die Synthese komplexerer Sphingolipide dar. Durch die Bindung von Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin an die 1-Hydroxylgruppe eines Ceramids entsteht SM (Tafesse et al, 2006). Glykosphingolipide sind Ceramide mit einem oder mehreren Zuckerresten, die durch eine β -Glykosidbindung an die 1-Hydroxylgruppe gebunden sind. Cerebroside sind Glykosphingolipide, die eine Hexose am C1-Atom als Restgruppe haben, Ganglioside sind komplexe Glykosphingolipide, deren Restgruppe aus Oligo- oder Polysacchariden und mindestens einem Sialinsäurerest besteht. Des Weiteren kann Sphingosin durch die Abspaltung der N-acylierten Fettsäure aus Ceramiden gebildet werden, eine Reaktion, die durch Ceramidasen katalysiert wird. Durch die Aktivität von Sphingosin- und Ceramid-Kinasen entstehen Sphingosin- bzw. Ceramid-1-Phosphat, welche neben Sphingosin und Ceramid zu den biologisch aktiven Verbindungen gehören (Bartke & Hannun, 2009).

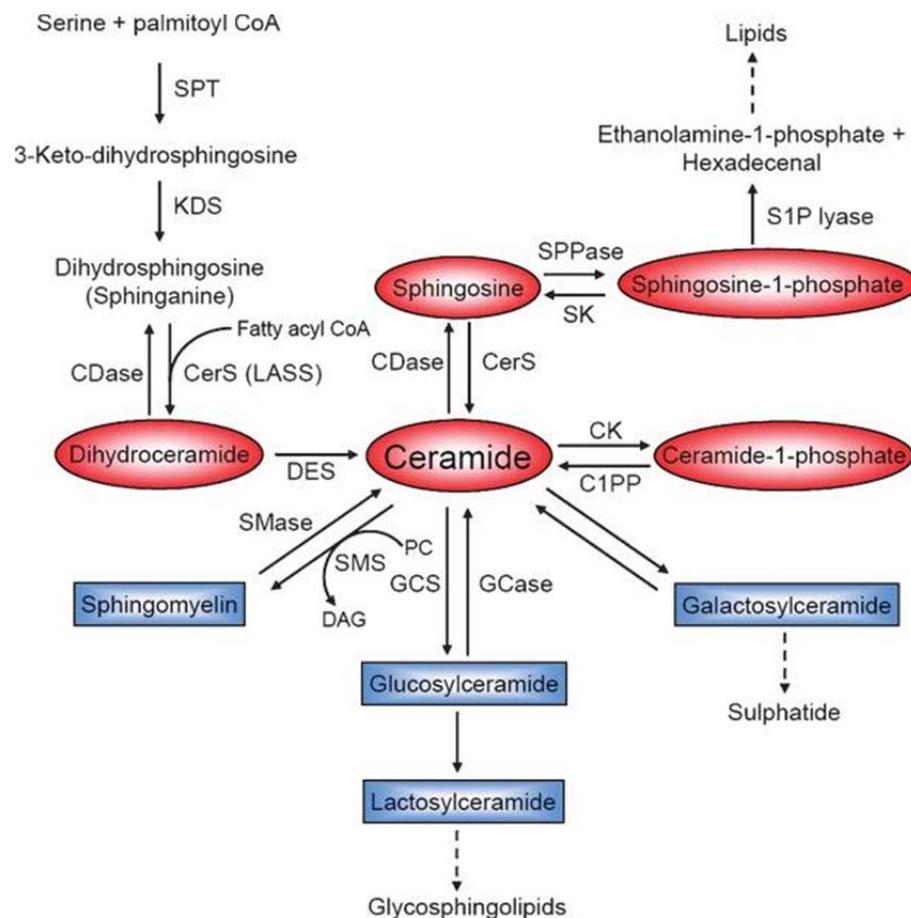


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Sphingolipidstoffwechsels und der beteiligten Enzyme (Bartke & Hannun, 2009). SPT, Serin-Palmitoyltransferase; KDS, 3-Ketodihydrosphingosin-Reduktase; CerS, Ceramid-Synthase; CDase, Ceramidase; DES, Dihydroceramid-Desaturase; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; SPPase, S1P-Phosphatase; SK, Sphingosin-Kinase; C1P, Ceramid-1-Phosphat; C1PP, C1P-Phosphatase; CK, Ceramid-Kinase; DAG, Diacylglycerol; PC, Phosphocholin; SMS, SM-Synthase; GCS, Glucosylceramid-Synthase; GCase, Glucosylceramidase.

Neben der *de novo* Synthese entstehen Ceramide durch die Hydrolyse komplexerer Sphingolipide. SMasen hydrolysieren SM zu Ceramid und Phosphocholin. Bisher wurden drei SMasen identifiziert, die aufgrund ihres pH-Optimums und der intrazellulären Lokalisation unterschieden werden: saure SMase (*acid sphingomyelinase*, ASM), neutrale SMase (*neutral sphingomyelinase*, NSM) und alkalische SMase (Cremesti et al, 2002; Marchesini & Hannun, 2004; Milhas et al, 2010). ASM, deren pH-Optimum zwischen 4,5 und 5 liegt, ist in lysosomalen Vesikeln lokalisiert. Zudem existiert eine sekretierte Form der ASM, deren Aktivität von dem

Vorhandensein von Zink-Ionen abhängig ist (Schissel et al, 1998; Schissel et al, 1996). NSM ist an der inneren Seite der Plasmamembran lokalisiert und hydrolysiert SM bei einem pH-Wert von 7,4. Genetische Defekte im Sphingolipidstoffwechsel sind die Ursache für eine Vielzahl von erblich bedingten Krankheiten. Mutationen im ASM-Gen (*SMPD1*) sind die Ursache der Niemann-Pick-Krankheit (*Niemann-Pick disease*, NPD) des Typs A und B. Durch Defekte im ASM-Gen häufen sich Sphingomyelin und sekundär auch Glykosphingolipide und Cholesterol in den Lysosomen an. Typ A führt zu schweren neurologischen Störungen und Organomegalien, was schon im frühen Kindesalter zum Tod führt. Typ B NPD-Patienten weisen keine neurologischen Störungen auf und erreichen oft das Erwachsenenalter, jedoch sind auch bei ihnen Abnormalitäten der Organe zu beobachten (Schuchman, 2007). Die unterschiedliche Symptomatik zwischen Typ A und Typ B ist möglicherweise auf eine unterschiedliche Restaktivität des Enzyms zurückzuführen.

1.2.2 Struktur und Funktion ceramidreicher Membranplattformen

Ceramide sind biologisch aktive Sphingolipide, die bei verschiedenen zellulären Prozessen eine Rolle spielen. So haben Ceramide eine Funktion bei der Induktion von Apoptose, der Hemmung des Zellzyklus sowie bei zellulären Stress-Antworten (Bollinger et al, 2005; Hannun & Luberto, 2000). Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben, können Ceramide *de novo* synthetisiert werden oder aus komplexeren Sphingolipiden entstehen, wie durch die Hydrolyse von SM durch SMasen. SM ist das am häufigsten vorkommende Sphingolipid in biologischen Membranen, wobei es vorwiegend in der äußeren Schicht der Plasmamembran lokalisiert ist (Daleke, 2008; Ikeda et al, 2006). Sphingolipide und Cholesterol bilden innerhalb der Membran Mikrodomänen, die sogenannten *rafts* (Brown & London, 1998; Harder & Simons, 1997; Simons & Ikonen, 1997; Singer & Nicolson, 1972). ASM ist in lysosomalen Vesikeln lokalisiert und wird durch diverse Stimuli zur Zelloberfläche transloziert, woraufhin das Enzym die Hydrolyse von SM zu Ceramid in der äußeren Schicht der Plasmamembran katalysiert. Dazu gehören u.a. die Stimulation von CD95 (Cremesti et al, 2001; Grassme et al, 2003a; Grassme et al, 2001a; Grassme et al, 2001b), CD40 (Grassme et al, 2002) oder des Fc γ RII (Abdel Shakor et al, 2004), die Infektion mit verschiedenen Pathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* (Grassme et al,

2003b) und *Rhinovirus* (Grassme et al, 2005) oder auch zellulärer Stress, ausgelöst durch ultraviolette Strahlung (Charruyer et al, 2005; Kashkar et al, 2005; Rotolo et al, 2005; Zhang et al, 2001) oder Chemotherapeutika (Lacour et al, 2004). Aufgrund ihrer biophysikalischen Eigenschaften kondensieren Ceramide innerhalb der Lipiddoppelschicht zu dicht gepackten ceramidreichen Membranplattformen, welche *in vitro*, im Gegensatz zu *rafts*, kein Cholesterol mehr enthalten (Holopainen et al, 1998; Kolesnick et al, 2000; Megha & London, 2004; Nurminen et al, 2002). Da äußerst unterschiedliche Signale die Generierung ceramidreicher Membranplattformen induzieren, sind diese Plattformen vermutlich nicht Teil eines spezifischen Signalwegs innerhalb der Zelle. Vielmehr üben diese eine eher allgemeine Funktion aus, indem sie die Akkumulation von Rezeptoren und assoziierten Signalmolekülen erleichtern. Somit kann das durch einen Stimulus induzierte Signal effizient in die Zelle weitergeleitet werden.

Die molekularen Grundlagen, die zu einer ASM-Aktivierung führen, sind derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es konnte gezeigt werden, dass für die ASM-Aktivierung nach Stimulation von CD95 die Aktivierung von Caspase 8 notwendig ist (Grassme et al, 2003a). Des Weiteren könnten auch Phosphatidyl-Inositol-Phosphate oder *reactive oxygen species* (ROS) eine Rolle bei der ASM-Aktivierung spielen (Bilderback et al, 2001; Bionda et al, 2007; Charruyer et al, 2005; Dumitru & Gulbins, 2006; Kolzer et al, 2003; Qiu et al, 2003). Eine neuere Studie hat zudem gezeigt, dass die Phosphorylierung eines Serin-Rests (S508) durch PKC δ für die ASM-Aktivierung nach UV- oder Cisplatin-Behandlung notwendig ist (Zeidan & Hannun, 2007; Zeidan et al, 2008).

Infolge der Generierung ceramidreicher Membranplattformen werden eine Reihe von Proteinkinasen und -phosphatasen aktiviert. Dazu gehören u.a. KSR (*kinase suppressor of Ras*) (Zhang et al, 1997), Phospholipase A₂ (Huwiler et al, 2001), c-Raf (Huwiler et al, 1996), PKC ζ (Bourbon et al, 2002) PP2A und PP1 (Chalfant et al, 1999; Dobrowsky et al, 1993; Galadari et al, 1998). Der molekulare Mechanismus, welcher zu einer Aktivierung dieser Moleküle führt, ist größtenteils noch nicht geklärt, eine direkte Bindung an Ceramide konnte u.a. für KSR und Phospholipase A₂ gezeigt werden (Huwiler et al, 2001; Yin et al, 2009). Darüber hinaus wurde infolge der Akkumulation von Ceramiden die Aktivierung der GTPase RhoA (Gupta et al, 2001) sowie die Dephosphorylierung und damit Inaktivierung von Ezrin beobachtet (Zeidan

et al, 2008). Ceramide sind somit in der Lage die Zytoskelettdynamik von Zellen zu beeinflussen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ceramide mit der Aktivität von *calcium-release-activated-calcium* (CRAC)–Kanälen in der Plasmamembran von T-Zellen interferieren. CRAC-Kanäle regulieren die intrazelluläre Calcium-Konzentration und sind somit für verschiedene Signalwege innerhalb der Zelle von Bedeutung (siehe Abschnitt 1.3.2). Die Generierung von Ceramiden infolge der CD95- bzw. TNF-Rezeptor-Stimulation führte zu einer Inhibierung der CRAC-Kanäle und somit zu einem verminderten Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum (Church et al, 2005; Lepple-Wienhues et al, 1999).

1.2.3 Die Rolle ceramidreicher Membranplattformen bei Infektionen

Neben der bereits beschriebenen Rolle von Ceramiden bei der Induktion von Apoptose und zellulären Stress-Antworten wird zudem die Infektion von Zellen mit verschiedenen Pathogenen durch die Generierung ceramidreicher Membranplattformen beeinflusst. So wird z.B. die Aufnahme von Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Staphylococcus aureus* durch die Generierung ceramidreicher Membranplattformen begünstigt (Esen et al, 2001; Grassme et al, 1997; Grassme et al, 2003b; Hauck et al, 2000). Die Bedeutung der ASM-abhängigen Generierung ceramidreicher Membranplattformen bei Infektionen mit *P. aeruginosa* wird in ASM-defizienten Mäusen deutlich. In diesen Tieren ist nicht nur die Aufnahme der Bakterien beeinflusst, sondern auch die Induktion von Apoptose in infizierten Zellen. Des Weiteren konnte eine gesteigerte Zytokinproduktion in diesen Tieren beobachtet werden, weshalb ASM-defiziente Mäuse sehr anfällig gegenüber einer Infektion mit *P. aeruginosa* sind und innerhalb weniger Tage sterben.

Eine ASM-Aktivierung scheint auch für die Kontrolle intrazellulärer Bakterien von Bedeutung zu sein, da ASM-defiziente Mäuse eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber der Infektion mit *Listeria monocytogenes* aufwiesen (Utermohlen et al, 2003). Das Wachstum der Bakterien konnte durch ASM-defiziente Makrophagen nicht unterbunden werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass Ceramide die Reifung von Phagosomen zu Phagolysosomen beeinträchtigen (Anes et al, 2003).

Neben bakteriellen Infektionen können auch Virusinfektion durch ceramidreiche Membrandomänen beeinflusst werden. Die Aktivierung von ASM und die nachfolgende Generierung von Ceramiden begünstigt die endozytotische Aufnahme von Rhinoviren (Grassme et al, 2005). Eine ASM-Aktivierung ist ferner für die Induktion von Apoptose nach Infektion von Neuronen mit Sindbisvirus von Bedeutung (Ng et al, 2008; Ng & Griffin, 2006). Im Gegensatz dazu wird die fusionsabhängige Infektion von Lymphozyten mit HIV durch die Generierung ceramidreicher Plattformen vermindert. Die Fusion von HIV mit der Wirtszellmembran bedarf der Interaktion des Glykoproteins gp120 mit dem zellulären Rezeptor CD4. Ceramide scheinen dabei die laterale Beweglichkeit von CD4 zu verhindern, wodurch, statt der Fusion des Virus mit der Zelle, eine endozytotische Aufnahme des Virus erfolgt und dieses anschließend in den lysosomalen Kompartimenten der Zelle degradiert wird (Finnegan & Blumenthal, 2006; Finnegan et al, 2007; Finnegan et al, 2004).

1.3 T-Zell-Polarisierung und -Migration

T-Zellen sind sehr motile Zellen, die im Verlauf ihrer Lebensdauer permanent durch den Organismus wandern. Auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen zirkulieren naive T-Zellen zwischen dem Blutstrom und sekundären lymphatischen Organen, als Effektorzellen wandern sie in periphere, inflammatorische Gewebe ein. Die Bewegung der Zellen ist somit maßgebend für ein funktionelles Immunsystem. Voraussetzung für die Migration der Zellen ist die Ausbildung eines „handspiegelförmigen“, polarisierten Phänotyps, der durch unterschiedliche Bereiche gekennzeichnet ist. Dem sogenannten *leading edge*, welches die Vorderseite darstellt und in Richtung der Bewegung orientiert ist, folgen der Zellkörper, der den Zellkern enthält und ein distaler Bereich, der als Uropod bezeichnet wird. Die morphologische Polarisierung der Zelle beinhaltet die asymmetrische Verteilung von Oberflächenmolekülen, intrazellulärer Bestandteile wie dem Zytoskelett sowie einen gerichteten Membranverkehr (Watanabe et al, 2005). Im Bereich des *leading edge* akkumulieren u.a. Chemokinrezeptoren, F-Aktin und LFA-1 (Friedl et al, 1998; Nieto et al, 1997; Samstag et al, 2003), der Uropod hingegen ist durch die Anreicherung von ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-1, -2, -3, CD43, CD44, β 1-Integrinen

sowie den Linker-Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin (ERM-Proteine) gekennzeichnet (del Pozo et al, 1998; Friedl & Brocker, 2000; Serrador et al, 1997). ERM-Proteine stellen das Bindeglied zwischen Membranproteinen und dem kortikalen Aktinzytoskelett dar und sind somit für die Morphologie der Zellen von Bedeutung (Charrin & Alcover, 2006). Die Proteine existieren in zwei unterschiedlichen Konformationen. In der geschlossenen, inaktiven Konformation werden durch die intramolekulare Interaktion der N-terminalen FERM-Domäne mit dem C-Terminus die Bindestellen für F-Aktin und Membranproteine verdeckt (Bretscher et al, 2002; Li et al, 2007a; Pearson et al, 2000). Die Aktivierung der Proteine erfolgt durch die Bindung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und die Phosphorylierung konservierter Threonin-Reste innerhalb der C-terminalen, aktinbindenden Domäne (T567 in Ezrin, T564 in Radixin und T558 in Moesin). Infolgedessen wird die intramolekulare Interaktion aufgelöst, wodurch die Bindung an F-Aktin bzw. Membranproteine ermöglicht wird (Fievet et al, 2004; Hirao et al, 1996; Matsui et al, 1998).

Leukozyten folgen dem Prinzip der „amöboiden Bewegung“, welche durch schnelle, zyklische Wiederholungen aus Expansion und Kontraktion sowie kurze, schwache Kontakte mit dem Substrat gekennzeichnet ist. Der Mechanismus der Bewegung kann durch wiederholte Abfolge folgender Schritte beschrieben werden (Friedl & Brocker, 2000; Friedl & Weigelin, 2008):

- 1.: An der Vorderseite führt die Polymerisation von Aktin zur Ausbildung von Membranausläufern wie Lamellipodien und Filopodien
- 2.: Die neu gebildeten Membranfortsätze werden über Integrine mit dem Substrat verbunden
- 3.: Infolge der Wechselwirkung zwischen Myosin II und dem Aktinzytoskelett kommt es zur Kontraktion des Zellkörpers
- 4.: Im distalen Bereich der Zelle werden Zell-Matrix-Interaktionen aufgelöst und das hintere Ende wird „nachgezogen“

Im Verlauf der Zirkulation durch den Körper bewegen sich Leukozyten sowohl auf zweidimensionalen Oberflächen, z.B. entlang von Gefäßendothelzellen, als auch innerhalb dreidimensionaler Gewebe. Abhängig von der Umgebung, in der die Zellen migrieren, wechseln diese zwischen einem adhärennten und nicht-adhärennten

Migrationsmodus. Während die Migration von Leukozyten auf 2D-Oberflächen der integrinvermittelten Anbindung an das Substrat bedarf, verwenden Leukozyten in Geweben einen Migrationsmechanismus, der unter dem vollständigen Verzicht auf integrinvermittelte Adhäsion abläuft (Friedl et al, 1998; Lammermann et al, 2008; Lammermann & Sixt, 2009; Ley et al, 2007). Die Vorwärtsbewegung der Zellen in 3D wird im Wesentlichen durch die Polymerisation von Aktinfilamenten angetrieben, das Fehlen von Fokalkontakten ermöglicht zudem, dass sich die Zellen mit sehr hohen Geschwindigkeiten (bis zu 25 $\mu\text{m}/\text{min}$) fortbewegen (Friedl & Weigelin, 2008). Im Gegensatz zur „mesenchymalen“ Migration, z.B. von Fibroblasten, verwenden Leukozyten *in vitro* Protease-unabhängige Mechanismen, um die physikalischen Barrieren der extrazellulären Matrix zu überwinden (Wolf et al, 2003). Die hohe Deformierbarkeit der Zellen erlaubt es diesen, sich ständig an die vorgegebenen Matrixstrukturen anzupassen und dem Weg des geringsten Widerstandes zu folgen, ein Prozess, der als *contact guidance* bezeichnet wird (Friedl, 2004; Wolf et al, 2003). Aktin/Myosin-vermittelte Kontraktionen des Zellkörpers ermöglichen zudem den „starren“ Zellkern durch enge Lücken der extrazellulären Matrix hindurchdurchzuzwängen (Lammermann et al, 2008).

Polarisierung und Migration der Zellen werden durch Chemokine induziert. Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), woraufhin unterschiedliche Signalkaskaden in den Zellen aktiviert werden, was in der Polarisierung der Zellen und der Migration in Richtung des Chemokingradienten resultiert. Beide Prozesse bedürfen einer enormen Reorganisation des Aktinzytoskeletts, weshalb die Regulation von GTPasen und aktinbindender Proteine eine wichtige Rolle einnimmt (Samstag et al, 2003; Thelen & Stein, 2008). Beispielsweise führt GPCR-vermittelte Aktivierung des Nukleotid-Austauschfaktors DOCK-2 zur nachfolgenden Aktivierung der GTPase Rac, wodurch die Polymerisation von Aktinfilamenten durch WAVE und den Arp2/3-Komplex induziert wird (Ibarra et al, 2005; Machesky et al, 1999; Nombela-Arrieta et al, 2004). Rac kontrolliert die Ausbildung von Lamellipodien im Bereich des *leading edge* und ist somit für die Migration der Zellen von zentraler Bedeutung. Zudem erfolgt durch die Bindung von Chemokinen an GPCRs die Aktivierung der PI3K und die nachfolgende Generierung von PIP₃, wodurch unterschiedliche Effektorproteine reguliert werden, die Aktinreorganisation und Migration beeinflussen (Ward, 2006; Ward & Marelli-Berg, 2009).

1.4 Die Immunologische Synapse

Die Aktivierung von T-Zellen erfordert den direkten Kontakt zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC), welche prozessierte Antigene über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentieren. DCs sind die effektivsten APC, da sie in der Lage sind naive T-Zellen zu aktivieren (Banchereau & Steinman, 1998). Durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit spezifischen Peptid-MHC-Komplexen kommt es zur Ausbildung einer spezialisierten Kontaktzone, die als immunologische Synapse (IS) bezeichnet wird. Die Ausbildung der IS benötigt die aktinabhängigen Relokalisation von Rezeptormolekülen sowie die Rekrutierung von Signalmolekülen zur Kontaktfläche. Die dabei entstehenden hoch organisierten Strukturen werden als *supramolecular activation cluster* (SMAC) bezeichnet. Eine reife, monozentrische IS besteht aus einem zentralen SMAC (*central SMAC*, cSMAC), in dem TCR, CD3, CD28 und assoziierte Signalmoleküle wie PKC- θ akkumulieren. Umgeben ist der cSMAC von einem peripheren Ring (*peripheral SMAC*, pSMAC) bestehend aus LFA-1 und Talin (Bromley et al, 2001; Fooksman et al, 2010; Monks et al, 1998). LFA-1 interagiert mit ICAM-1 auf der DC, wodurch der Kontakt stabilisiert wird. Zudem wurde ein aktinreicher, distaler Bereich charakterisiert (*distal SMAC*, dSMAC), der u.a. die Phosphatase CD45 enthält (Freiberg et al, 2002). Studien an planaren Lipiddoppelschichten haben gezeigt, dass der cSMAC durch die Fusion von TCR-Mikroclustern (10-20 TCRs) entsteht, welche kontinuierlich im dSMAC gebildet werden (Varma et al, 2006). Der zentripetale Transport dieser TCR-Mikrocluster ist abhängig von einem funktionellen Aktinzytoskelett sowie dem Motorprotein Myosin II (Ilani et al, 2009). Darüber hinaus gelten TCR-Mikrocluster als Ort der Signalweiterleitung, wohingegen im cSMAC das Signal terminiert wird und die Degradation von TCR-Molekülen erfolgt (Varma et al, 2006). Eine langanhaltende Signalweiterleitung, welche letztendlich in der Aktivierung der T-Zelle resultiert, bedarf demnach der kontinuierlichen Neubildung von TCR-Mikroclustern in der Peripherie.

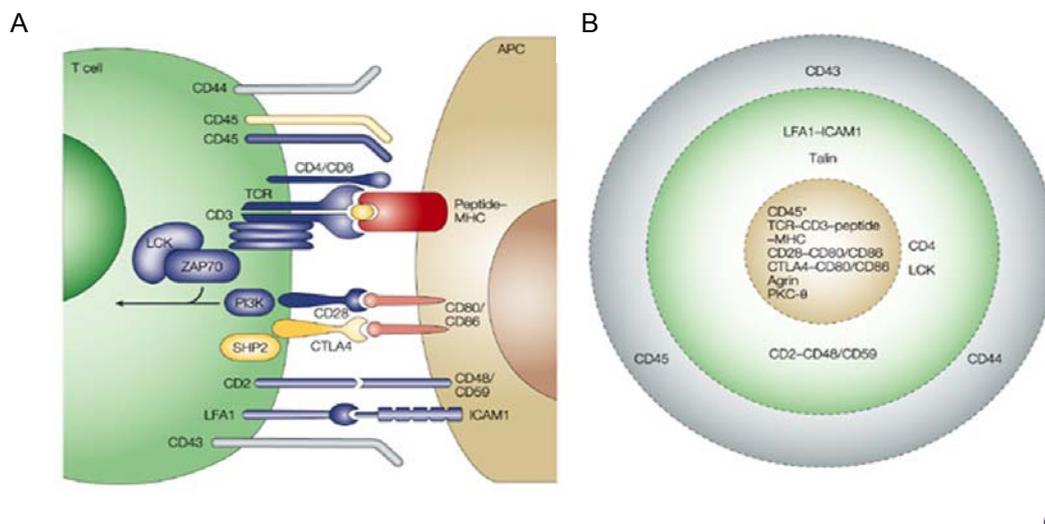


Abb.1.6: Schematische Darstellung der immunologischen Synapse. Seitenansicht (A) und Ansicht von oben, in der die Organisation der SMACs dargestellt ist. cSMAC (braun), pSMAC (grün) und dSMAC (blau) (B) (Huppa & Davis, 2003).

Neben der monozentrischen Synapse konnten weitere Varianten der IS beschrieben werden (Friedl et al, 2005). In der multifokalen Synapse sind cSMAC und pSMAC nicht eindeutig getrennt, sondern es entstehen mehrere Cluster aus TCR und CD3, die von Adhäsionsmolekülen umgeben sind. Eine multifokale Synapse wurde z.B. für die Interaktion zwischen DC und T-Zelle beschrieben (Brossard et al, 2005). Die Dauer eines Kontaktes zwischen APC und T-Zelle variiert von Minuten bis zu mehreren Stunden, wobei die Art des Kontaktes von der APC, dem Aktivierungsstatus der T-Zelle, dem Antigen sowie dem Milieu bestimmt wird (Friedl et al, 2005). Neben einzelnen, langlebigen Kontakten (Iezzi et al, 1998) wurden auch mehrere, kurzlebige (3-20 min) Kontakte beschrieben, die ebenfalls in einer Aktivierung der T-Zelle resultierten (Gunzer et al, 2000; Mempel et al, 2004; Miller et al, 2004). Während diesen kurzlebigen, dynamischen Kontakten behalten T-Zellen den polarisierten, migratorischen Phänotyp aufrecht. Im *serial-encounter model* wurde daher postuliert, dass infolge serieller Kontakte mit ein und derselben bzw. benachbarten DCs das in den T-Zellen induzierte Signal akkumuliert, was gleichsam eines kontinuierlichen Signals, in der Aktivierung der T-Zelle resultiert (Friedl & Gunzer, 2001).

Für eine vollständige T-Zell-Aktivierung wird zudem ein lang-anhaltender Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran benötigt. Infolge der TCR-vermittelten Produktion von IP_3 werden Ca^{2+} -Ionen aus dem ER freigesetzt, was zu einem transienten Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt. Daraufhin kommt es zum Öffnen sogenannter CRAC (*calcium release-activated calcium*)-Kanäle in der Plasmamembran der Zellen, wodurch ein kontinuierlicher Ca^{2+} -Einstrom aus dem Extrazellularraum erfolgt, ein Prozess, der als *store-operated calcium entry* bezeichnet wird (Smith-Garvin et al, 2009). Bisher wurden zwei molekulare Komponenten ermittelt, die für den Ca^{2+} -Einstrom in T-Zellen von Bedeutung sind. Orai1 stellt die Untereinheit des Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran dar, Stim1 ist im ER lokalisiert und dient als Sensor der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Infolge der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER vermittelt Stim1 das Öffnen der Kanäle in der Plasmamembran (Feske, 2007; Oh-hora & Rao, 2008). Für T-Zellen konnte gezeigt werden, dass Orai1 und Stim1 zur Synapse rekrutiert werden und dort einen lokalen Ca^{2+} -Eintritt vermitteln (Lioudyno et al, 2008). Die Translokation von Mitochondrien zur Synapse beeinflusst zudem die Intensität des Ca^{2+} -Eintritts an der Kontaktstelle. Mitochondrien puffern die lokale Ca^{2+} -Konzentration und verhindern somit die Inaktivierung der CRAC-Kanäle, wodurch der Ca^{2+} -Einstrom von außen aufrechterhalten wird (Quintana et al, 2007; Schwindling et al, 2010).

1.5 Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Kontakt von T-Zellen mit MV zur Aktivierung von ASMase bzw. NSMase und der nachfolgenden Ceramidgenerierung auf der Oberfläche der Zellen führt (Gassert et al, 2009). Obwohl Ceramide eine Funktion bei der Regulation des Zellzyklus einnehmen, konnte eine Bedeutung von Ceramiden für den MV-induzierten Proliferationsarrest nicht substantiiert werden, da der Arrest durch eine Inhibierung der ASM- oder NSM-Aktivität nicht aufgehoben werden konnte. Hingegen wird die Unfähigkeit MV-kontakter T-Zellen einen polarisierten Phänotyp auszubilden durch die MV-induzierte Aktivierung von SMasen und die anschließende Generierung von Ceramiden vermittelt (Gassert et al, 2009). Die Induktion von Ceramiden stellt somit einen möglichen Mechanismus dar, die Funktion von T-Zellen zu beeinflussen. In der vorliegenden Arbeit sollte daher der generelle Einfluss von Ceramiden auf Zytoskelettdynamik und Aktivierung von T-Zellen untersucht werden.

Im Speziellen galt es dabei die Bedeutung von Ceramiden für die morphologische Polarisierung, Adhäsion, Chemotaxis und Motilität von T-Zellen zu untersuchen, Prozesse, die einer enormen Reorganisation des Zytoskeletts bedürfen. Neben der morphologischen Polarisierung sollte zudem die Polarisierung von Oberflächenproteinen und intrazellulären Molekülen analysiert werden sowie deren Aktivierungsstatus. Dabei galt das Interesse Proteinen, die für die Zytoskelettdynamik bzw. die T-Zell-Aktivierung von Bedeutung sind.

Darüber hinaus sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Ceramiden auf die Ausbildung einer IS untersucht werden. Neben der generellen Verteilung von Ceramiden und ASM in DC/T-Zell-Konjugaten sollte zudem aufgeklärt werden, inwiefern die Modulation des Ceramidlevels auf T-Zellen oder DCs Konjugatfrequenz, Architektur und Funktionalität der Konjugate beeinflusst.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien standen am Institut für Virologie Würzburg zur Verfügung.

Tabelle 2.1: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
BJAB	Lymphoblastoide B-Zelllinie	human
B95a	EBV-transformierte B-Zelllinie	Krallenaaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)

2.1.2 Primäre Zellen

Primäre Zellen wurden aus Leukozytendepletionsfiltern isoliert (siehe Abschnitt 3.1.5 bis 3.1.7), die von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg bereitgestellt wurden.

2.2 Mäusestämme

Der Wildtyp-Stamm C57BL/6 (J-Stamm) stammt aus der Eigenzucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg. Ursprünglich wurde dieser Mausstamm 1921 von C. C. Little gezüchtet. Alle in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mausstämme beruhen auf C57BL/6-Hintergrund.

Die $ASM^{-/-}$ -Mäuse (Horinouchi et al, 1995) wurden von Erich Gulbins zur Verfügung gestellt. Eine Neomycin-Expressions-kassette wurde in Exon 2 des ASM-Gens eingefügt, wodurch die kodierende Sequenz zerstört wurde. Heterozygote Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten, wohingegen homozygote $ASM^{-/-}$ -Tiere ab dem Alter von ca. 8 Wochen erste Krankheitszeichen aufweisen und im Alter von 6 bis 8 Monaten sterben. Aufgrund dessen wurden für die Tierversuche homozygote Tiere im Alter von 6-8 Wochen verwendet.

2.3 Viren

Das verwendete Wildtyp-Virus (Wildtyp Fleckenstein, WTF) war im Institut für Virologie Würzburg vorhanden und wurde wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben in BJAB-Zellen vermehrt.

2.4 Plasmide

Das ASM-HA-Gen wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen Xba I und Sal I in den eukaryotischen Expressionsvektor pCG kloniert.

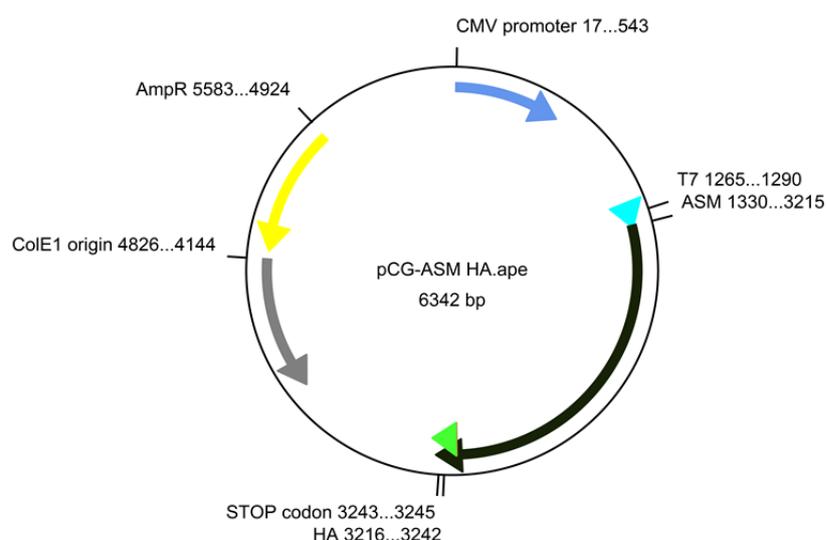


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des ASM-HA-Plasmids.

2.5 Medien und Zusätze

Alle Zellkulturmedien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Medienküche des Instituts für Virologie bezogen.

Medien:

RPMI 1640

RPMI 1640 (L-Glutamin, ohne Phenolrot) PAA

LSM 1077 (*Lymphocyte Separation Medium*) PAA

Zusätze:

Ciprofloxacin Bayer

FKS Invitrogen

5,4 % Natriumhydrogencarbonat

Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ml)

2.6 Puffer und Lösungen

Die Chemikalien für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden von den Firmen AppliChem, Ferak, Fluka, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

Tab. 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % (w/v) in aqua dest.
Anodenpuffer 30 mM	3,6 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l aqua dest., pH 10,4

Anodenpuffer 300 mM	36 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l aqua dest., pH 10,4
ATV (Medienküche des Instituts f. Virologie)	8 g NaCl 0,4 g KCl 1 g D(+)-Glucose 0,58 g NaHCO ₃ 0,5 g Trypsin 0,2 g Versene ad 1 l aqua dest., pH 7,4
Einfriermedium	FKS 20 % (v/v) DMSO
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
FACS-Puffer	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei) 0,5 % (w/v) BSA 0,02 % (w/v) NaN ₃
HANKS (-Phenolrot, -CaCl₂, -MgCl₂) (Medienküche des Instituts f. Virologie)	8 g NaCl 0,4 g KCl 0,06 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 1 g D(+)-Glucose 0,06 g KH ₂ PO ₄ 0,1 g Penicillin 0,1 g Streptomycin ad 1 l aqua dest.
Kathodenpuffer	5,2 g Hexansäure 3 g Tris 20 % (v/v) Methanol ad 1 l aqua dest., pH 9,4
Lysepuffer	120 mM NaCl 50 mM Hepes, pH 7,4 40 mM β-Glycerophosphat 10 mM NaF 1 mM EDTA 1 % (v/v) Triton-X-100 Proteaseinhibitor (1 Tabl./10 ml)

Milchpuffer	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei) 5 % (w/v) Magermilchpulver 0,05 % (v/v) Tween-20
NTE-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris 1 mM EDTA pH 7,4
4 % Paraformaldehyd	4 g Paraformaldehyd ad 100 ml PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l aqua dest.
Proteingelpuffer	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH 8,7
Saccharoselösungen	25 % (w/v) Saccharose in NTE 30 % (w/v) Saccharose in NTE 54 % (w/v) Saccharose in NTE 60 % (w/v) Saccharose in NTE
Saponin-Puffer	FACS-Puffer 0,33 % (v/v) Saponin
SDS Probenpuffer (6 x)	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS 6 ml Glycerol 0,6 ml β-Mercaptoethanol 2,4 mg Bromphenolblau ad 20 ml aqua dest.
Stripping Puffer	2 % (w/v) SDS 100 mM β-Mercaptoethanol 62,5 mM Tris-HCL pH 6,7 ad 25 ml aqua dest.
Trypanblau	0,25 % (w/v) in PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei)

TSM-Puffer für Adhärenzassay	20mM Tris 150mM NaCl 1mM CaCl ₂ 2mM MgCl ₂ pH 8,0
Versene (Medienküche des Instituts f. Virologie)	0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,572 g Na ₂ HPO ₄ 8,2 g NaCl 0,2 g Versene
Waschpuffer für Western Blot	PBS (Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei) 0,05 % (v/v) Tween-20

2.7 Antikörper

2.7.1 Unmodifizierte Primärantikörper

Tab. 2.3: Unmodifizierte Primärantikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
Akt-1 (C-20)	polyklonal	Ziege-IgG	Santa Cruz	1:500 (WB) Milchpuffer
Phospho-Akt (Ser473)	D9E	Kaninchen-IgG	Cell Signaling	1:50 (IF) 1:1000 (WB; üN, 5 % BSA/PBS)
ASM (H-181)	polyklonal	Kaninchen-IgG	Santa Cruz	1:50 (IF)
CD3 ζ-chain	6B10.2	Maus-IgG ₁	Santa Cruz	1:100 (IF)
CD11a (LFA-1)	G43-25B	Maus-IgG _{2a}	Becton Dickinson	1:50 (FACS)
CD43	DF-T1	Maus-IgG ₁	Santa Cruz	1:100 (IF)
Ceramide	MID15B4	Maus-IgM	Enzo life science (Biomol)	1:30 (IF) 1:30 (FACS)
CXCR4	12G5	Maus-IgG _{2a}	Santa Cruz	1:50 (IF) 1:50 (FACS)
Phospho-ERM	41A3	Kaninchen	Cell Signaling	1:200 (IF) 1:1000 (WB; üN, 5 % BSA/PBS)

HA-Probe	F-7	Maus-IgG _{2a}	Santa Cruz	1:100 (IF) 1:50 (FACS)
MV-H	H45	Kaninchen-IgG	Virologie, Würzburg	1:500 (WB) Milchpuffer
Orai1	polyklonal	Kaninchen-IgG	ProSci Inc.	1:100 (IF)
PI3K p85 subunit alpha	EP380Y	Kaninchen-IgG	Epitomics	1:100 (IF)
SHIP-1	P1C1	Maus-IgG ₁	Santa Cruz	1:100 (IF)
Stim1	CDN3H4	Maus-IgG ₁	Acris Antibodies	1:100 (IF)
Tubulin	DM1A	Maus-IgG ₁	Sigma-Aldrich	1:200 (IF)

2.7.2 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 2.4: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
CD3	PE	UCHT1	Maus-IgG ₁ , κ	Becton Dickinson	1:50
CD11c	PE	B-ly6	Maus-IgG ₁ , κ	Becton Dickinson	1:50
CD14	FITC	MφP9	Maus-IgG _{2b} , κ	Becton Dickinson	1:50
CD19	FITC	HIB19	Maus-IgG ₁ , κ	Becton Dickinson	1:50
CD28	Cy-5 PE	CD28.2	Maus-IgG ₁ , κ	Becton Dickinson	1:25
CD29	Alexa647	4B7R	Maus-IgG ₁	AbD Serotec	1:50
CD56	PE	B159	Maus-IgG ₁ , κ	Becton Dickinson	1:50

2.7.3 Sekundärantikörper

Tab. 2.5: Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
Kaninchen-IgG	Alexa 488	Invitrogen	1:100 (IF)
Maus-IgG	Alexa 488	Invitrogen	1:100 (FACS) 1:100 (IF)
Ziege-IgG	Alexa 488	Invitrogen	1:100 (IF)
Kaninchen-IgG	Alexa 594	Invitrogen	1:100 (IF)
Maus-IgG	Alexa 594	Invitrogen	1:100 (IF)
Ziege-IgG	Alexa 594	Invitrogen	1:100 (IF)
Maus-IgM	Alexa 488	Invitrogen	1:100 (FACS) 1:200 (IF)
Kaninchen-IgG	HRP	Dianova	1:2000 (WB)
Maus-IgG	HRP	Dianova	1:7000 (WB)
Ziege-IgG	HRP	Dianova	1:5000 (WB)

2.7.4 Antikörper für die T-Zell-Stimulation

Tab. 2.6: Antikörper für die T-Zell-Stimulation

Spezifität	Hersteller	Klon	Isotyp
Ziege anti-Maus IgG	Dianova	polyclonal	
Maus anti-Human CD3	Becton Dickinson	UCHT1	Maus IgG ₁ , κ
Maus anti-Human CD28	Becton Dickinson	CD28.2	Maus-IgG ₁ , κ

2.8 Zytokine und Chemokine

Tab. 2.7: Zytokine und Chemokine

Bezeichnung	Hersteller
Rekombinantes, humanes SDF-1 α	PeptoTech
Rekombinantes, humanes CCL-21	PeptoTech
GM-CSF	Berlex
humanes IL-4	Miltenyi Biotec

2.9 Kits

Kit	Hersteller
Zeon® Mouse IgG Labeling Kit	Invitrogen
Human T cell Nucleofactor® Kit	Lonza

2.10 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
7-AAD Staining Solution	Becton Dickinson
Acrylamid-4K-Lösung	AppliChem
Amitriptyline hydrochloride	Sigma-Aldrich
BCA-Lösung	Sigma-Aldrich
C ₁₆ -Ceramid (N-Palmitoylsphingosine)	Biomol
C ₁₆ -Dihydroceramid (N-16:0 Sphinganine)	Avanti Polar Lipids
Calcein AM	Invitrogen
Complete, EDTA-free, Protease Inhibitor Cocktail	Roche
CSFE	Invitrogen

Ethanol	AppliChem
Fibronektin	Sigma-Aldrich
Fluo-4	Invitrogen
Fluoromount-G	Biozol
Fusionsinhibitorisches Peptid (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
GW 4869	Sigma-Aldrich
Hanks Balanced Salts (HBSS, ohne Phenolrot)	Sigma-Aldrich
Human Serum (off the clot)	PAA
(rekombinantes) ICAM-1/Fc Chimera	R&D Systems
Kupfer(II)-Sulfat-Lösung	Sigma-Aldrich
LPS	Sigma-Aldrich
Page Ruler™ prestained protein ladder	Fermentas
Phalloidin 488/594	Invitrogen
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Proteinstandardlösung (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich
R18	Invitrogen
Sphingomyelinase von <i>Bacillus cereus</i>	Sigma-Aldrich
Staphylococcal Enterotoxin A von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich
Staphylococcal Enterotoxin B von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich
TEMED	AppliChem
[methyl-3H] Thymidine	GE Healthcare
WGA-FITC	Invitrogen

2.11 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Bakterienplatten	Sarstedt

BD Trucount™ Tubes	Becton Dickinson
Dynabeads® Human T-Activator CD3/CD28	Invitrogen
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Einmalküvetten	Roth
Entwickler und Fixierer	Kodak
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Filtermatten	Perkin Elmer
Kryokonservierungsröhrchen	Greiner Bio One
LabTekII™ chamber slides	Nunc
μ-Slide VI ibiTreat	ibidi
μ-Slide VI uncoated	ibidi
Nitrozellulosetransfermembran Protan®	Schleicher & Schuell
Nylonwolle	G. Kisker GbR
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml)	Greiner bio-one
Polycarbonatfilter (5 μm Porengröße)	Costar Corning
PVC-Schlauch	Hartenstein
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Röntgenfilm	Fuji Foto Film
Roti®-Plast Paraffin Pastillen	Roth
Spritzen (50 ml)	Dispomed
UltraPure™ Agarose	Invitrogen
UZ-Röhrchen	Beckman
Vaseline	Molyduval
Wasser für die HPLC	AppliChem
Whatman-Papier Typ GB002	Schleicher & Schuell

Zellkulturflaschen (50 ml, 250 ml, 550 ml)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (6-, 12-, 24-Well)	Greiner bio-one
Zellkulturplatten (96 Well)	Becton Dickinson
Zellkulturplatten (96 Well, half area)	Costar Corning
Zellkulturplatten schwarz (96 Well, non-treated)	Nunc
Zellkulturschalen (35 mm)	Nunc
Zellschaber	Hartenstein
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one

2.12 Geräte

Brutschrank	Nuaire
Elektroblotkammer	Institutswerkstatt
FACScan Calibur™	Becton Dickinson
Fluoreszenzreader Safire ² ™	Tecan
Gelelektrophoresekammer	Istitutswerkstatt
Harvester 96®	Tomtec
Konfokales Mikroskop LSM510 Meta	Zeiss
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz
Mehrkanalpipetten	Abimed
Mikropipetten	Abimed, Eppendorf
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf
Schüttler	Bühler
Spannungsquelle	Pharmacia
Sterilwerkbank	Nuaire
Szintillationszähler MicroBeta ² ™	Perkin Elmer

Tischzentrifuge	Heraeus, Sepatech
Vortexer	GLW
Wasserbad	GFL
Zählkammer nach Neubauer	Hartenstein
Zentrifugen	Hettich, Sorvall, Eppendorf

2.13 Software

Image J	NIH
Prism	GraphPad
Cell Quest Pro	Becton Dickinson
LSM Image Browser	Carl Zeiss
AIDA	Raytest

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C, in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die verwendeten Medien wurden mit jeweils 15 ml NaHCO₃ gepuffert und den Antibiotika Penicillin und Streptomycin versetzt. Des Weiteren wurde den Medien hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FKS) hinzugefügt. Zur Hitzeinaktivierung wurde das Serum für 1 h bei 56°C inkubiert.

3.1.1 Zellkultur von Suspensionszellen

Die humane B-Zelllinie BJAB wurde in RPMI 1640 mit 10 % FKS kultiviert. Zum Splitten der Zellen wurden diese abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.2 Zellkultur adhärenter Zelllinien

Die semiadhärente Zelllinie B95a wurde in RPMI 1640 mit 5 % FKS kultiviert. Nach der Ausbildung eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen einmal mit ATV gewaschen und anschließend mit 1 ml bis 2 ml ATV bei 37°C abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Für eine längerfristige Lagerung der Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dafür wurden 1×10^7 (adhärente Zellen) bis 2×10^7 Zellen

(Suspensionszellen) in 1 ml FKS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen an Einfriermedium gemischt. Die Zellen wurden anschließend zunächst für 1 h bei -20°C gelagert und dann über Nacht bei -80°C eingefroren. Daraufhin wurden die Aliquots in den flüssigen Stickstoff überführt.

Zur erneuten Kultivierung der Zellen wurden diese zügig bei 37°C aufgetaut, mit einem Überschuss an vorgewärmtem Medium zweimal gewaschen und in dem entsprechenden Medium bei 37°C kultiviert.

3.1.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalitätsfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dabei wurden die Zellen 1:5 bis 1:10 in der Trypanblau-Lösung verdünnt und zur anschließenden Zählung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen daher im Lichtmikroskop blau. Daraufhin wurden die lebenden Zellen in mindestens vier Großquadranten gezählt und die Zellzahl pro Milliliter bestimmt.

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert aus vier Großquadranten} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

Formel 3.1: Berechnung der Lebendzellzahl.

3.1.5 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Als mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) bezeichnet man einkernige Blutzellen wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Zur Isolierung der PBMCs wurde Blut aus sogenannten Leukozytendepletionsfiltern verwendet, welche von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurde das Blut (ca. 10 ml) zunächst 1:5 mit Versene verdünnt und nachfolgend auf einen Ficoll-Paque geschichtet (30 ml verdünntes Blut pro 9 ml Ficoll-Paque). Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (30 min, 2 min

Anlauf, 2 min Auslauf, 1200 rpm, RT) wurden die enthaltenden zellulären Bestandteile entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die entstandene Interphase wurde abgenommen, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT). Die PBMCs wurden anschließend in einer Zelldichte von 5×10^6 /ml in 10 % RPMI resuspendiert und für die nachfolgende Isolierung von Monozyten und T-Zellen verwendet.

3.1.6 Generierung humaner dendritischer Zellen (DC) aus Monozyten

Humane DCs können durch die Kultur mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten generiert werden. Dafür wurden die Monozyten zunächst durch Plastikadhärenz aus der PBMC-Kultur isoliert, indem die PBMC-Suspension liegend, in großen Zellkulturflaschen (75 cm^2) für 2 h im Brutschrank inkubiert wurde (ca. 25 ml PBMC-Suspension/ Zellkulturflasche). Anschließend wurde die nicht-adhärenente Fraktion abgenommen und die T-Zellen, wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, daraus aufgereinigt. Die Monozyten-Fraktion wurde zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen und in 10 % RPMI über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die Monozyten befinden sich daraufhin im Medium bzw. können leicht von der Platte abgelöst werden, wohingegen kontaminierende Zellen auf der Platte adhären. Im Folgenden wurden die Monozyten in einer Zellkonzentration von 5×10^5 /ml in 6-Well-Platten ausgesät und 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 dem Medium hinzugefügt. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert und die Zellen mit frischen Zytokinen versehen. Nach einer dreitägigen Kultur mit GM-CSF und IL-4 verlieren die Monozyten den Oberflächenmarker CD14 und exprimieren die typischen Oberflächenmarker unreifer DCs (CD1a, CD11c, CD80^{niedrig}, CD86^{niedrig}, HLA-DR^{niedrig}). Um reife DCs zu erhalten wurde dem Kulturmedium ab Tag drei der Kultur 100 ng/ml LPS zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden zeigten die DCs den typischen Phänotyp reifer DCs. Reifungsmarker wie CD83 werden nun exprimiert sowie CD80, CD86 und HLA-DR hochreguliert.

3.1.7 Anreicherung primärer T-Zellen mittels Nylonwolle

Bei der T-Zell Anreicherung mittels Nylonwolle werden die unterschiedlichen Bindungseigenschaften mononukleärer Zellen an Nylon ausgenutzt. Da B-Zellen mit höherer Affinität an Nylon binden als T-Zellen, können letztere leicht durch eine Passage über Nylonwolle angereichert werden. Dabei sind Temperatur und FKS-Gehalt des Mediums von Bedeutung.

Zur Herstellung der Säulen wurden zunächst 50 ml Spritzen mit 2 g Nylonwolle gefüllt und anschließend autoklaviert. Vor Gebrauch der Säule wurde an das untere Ende ein Plastikschlauch angebracht, der mit einer Metallklemme verschlossen wurde. Anschließend wurde die Säule mit 25-50 ml warmem 5 % RPMI befüllt und die Nylonwolle mit einer sterilen Pipette leicht zusammen gedrückt, um mögliche Luftblasen zu entfernen. Der Überstand über der Nylonwolle wurde daraufhin vollständig abgelassen und die PBMC-Fraktion auf die Säule gegeben (2×10^8 PBMCs in 7 ml 5 % RPMI). Danach wurde nochmals so viel Medium abgelassen, bis sich die Zellsuspension gänzlich in der Nylonwolle befindet. Anschließend wurden erneut wenige Milliliter 5 % RPMI auf die Säule gegeben, um ein Austrocknen der Nylonwolle zu verhindern und die Säule für 45 min bei 37°C inkubiert. Die nicht-adhärenenten T-Zellen wurden im Folgenden mit 25 ml warmem 5 % RPMI eluiert und das ablaufende Medium in einem 50 ml-Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT) und in 10 % RPMI in einer Zellkonzentration zwischen $2-5 \times 10^6$ /ml resuspendiert.

Die erfolgreiche Anreicherung der T-Zellen kann mittels Durchflusszytometrie, wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, überprüft werden (Abbildung 3.1).

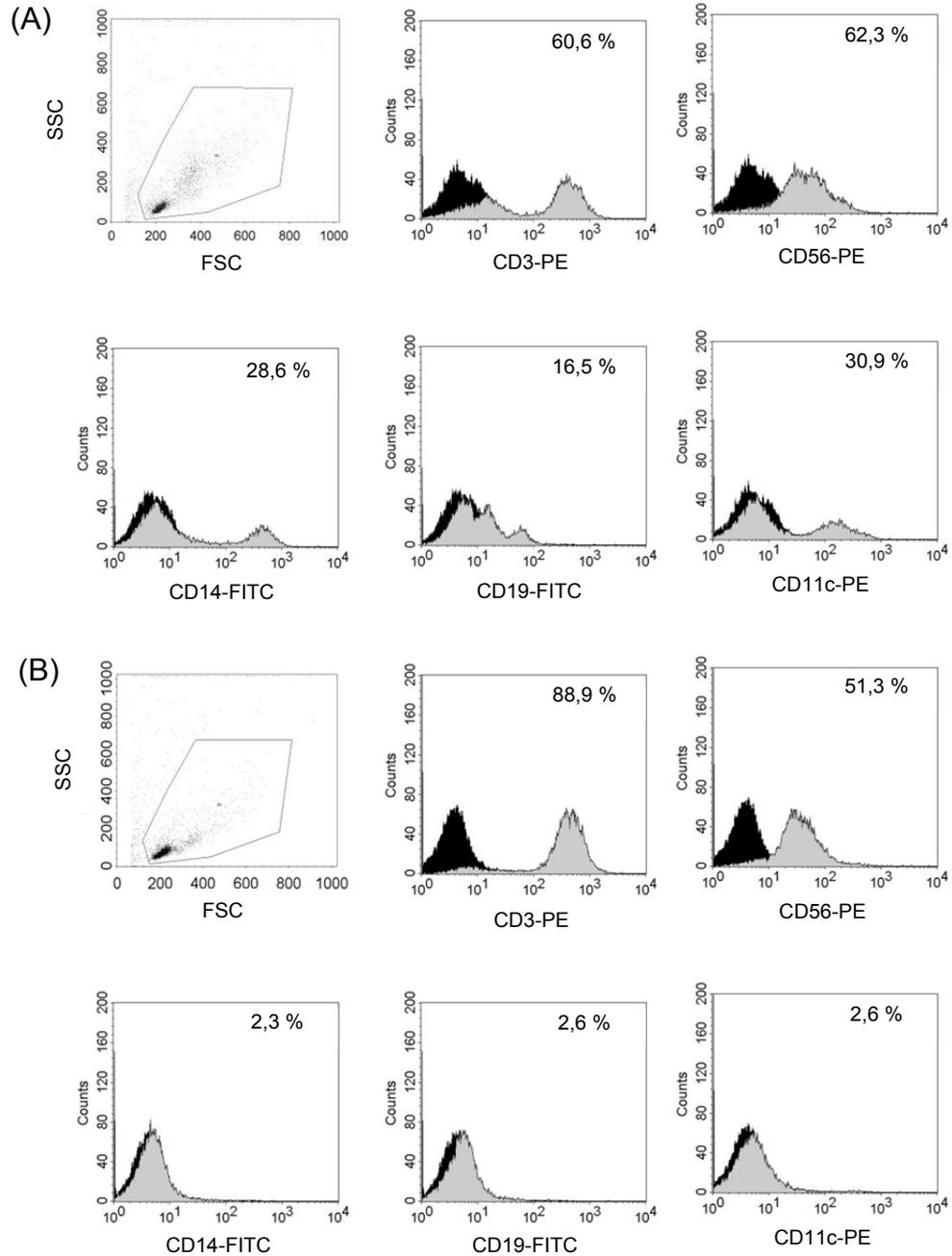


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellpopulation vor (A) und nach der Passage über Nylon (B). Durch die Passage über Nylonwolle wird der prozentuale Anteil der T-Zellen (CD3-positiv) in der Zellpopulation von 61 % auf 89 % erhöht. Der Anteil von Monozyten (CD14-positiv), B-Zellen (CD19-positiv) und myeloiden Zellen (CD11c-positiv) wird hingegen verringert. Der Prozentsatz von natürlichen Killerzellen (CD56-positiv) bleibt annähernd konstant (schwarz gefülltes Histogramm: Isotypkontrolle).

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Herstellung von Virusstocks

Die Zucht des Wildtypstammes WTF wurde auf BJAB-Zellen durchgeführt. Für die Präinfektion wurden 5×10^7 BJAB-Zellen abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), in 7 ml RPMI ohne FKS resuspendiert und mit einer MOI von 0,01 infiziert. Nach Inkubation der Virus-Zell-Suspension für 1-2 h bei 37°C wurden die Zellen erneut pelletiert, in 100 ml 10 % RPMI aufgenommen und für 2-3 Tage bis zur Ausprägung eines zytopathischen Effektes (CPE) bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden je 10 ml dieser Präinfektion zu 10 großen Zellkulturflaschen BJAB-Kultur hinzugefügt und die Infektion bis zur Ausprägung eines CPE für weitere 2-3 Tage durchgeführt. Die infizierten BJAB-Zellen wurden daraufhin abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), die Pellets in je 1 ml PBS resuspendiert und über Nacht bei -80°C eingefroren. Daraufhin wurden die Zellen bei 4°C aufgetaut und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (15 min, 3000 rpm, 4°C) abgetrennt. Der gewonnene Überstand wurde auf Eis gestellt, in Einfrierröhrchen aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Parallel zur Anzucht der Viren wurden nicht-infizierte BJAB-Zellen kultiviert und wie zuvor beschrieben präpariert. Diese Präparationen dienten als Mock-Kontrolle.

3.2.2 Bestimmung des Virustiters TCID50

Bei der TCID50-Bestimmung (*tissue culture infectious dosis 50*) wird die Virusverdünnung ermittelt, bei der noch die Hälfte der beimpften Kulturen infiziert wird. Dafür wurden zunächst B95a-Zellen (5×10^4 /Well) in 5 % RPMI in einer 96-Well-Platte ausgesät. Am folgenden Tag wurde eine Virusverdünnungsreihe in RPMI ohne FKS von 10^{-1} bis 10^{-8} hergestellt. Jeweils 8 Wells der Platte wurden mit je 100 µl einer Verdünnungsstufe versehen und die Infektion der Zellen für 1 h im Brutschrank durchgeführt. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und jeweils 200 µl 5 % RPMI zu den Zellen gegeben. Die Ausbildung eines zytopathischen Effektes wurde nach 3-5 Tagen im Lichtmikroskop bestimmt und der Virustiter mit Hilfe der Formel nach Spearman und Kärber berechnet.

$$\log TCID50 = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Formel 3.2: Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration. $x_{p=1}$: dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist, d : dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors, p : Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe, $\sum p$: Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID50 = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

Formel 3.3: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50. d : dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, p : Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe, n : für die Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe.

3.2.3 Virusaufreinigung durch Ultrazentrifugation

Um eine höhere Reinheit und Anreicherung der Viruspräparation zu erzielen, wurde diese durch Ultrazentrifugation aufgereinigt. Dafür wurde zunächst die Viruspräparation bei 4°C aufgetaut und für 15 min bei 3000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde gesammelt und das Zellpellet erneut in 5 ml des Überstandes resuspendiert. Daraufhin wurde das Zellpellet durch 10 x *Douncen* homogenisiert und anschließend die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (15 min, 3000 rpm, 4°C). Der gewonnene Überstand wurde mit dem vorher gesammelten Überstand vereinigt. Je 5 ml 25 %-ige Saccharoselösung wurde in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit je 5 ml Überstand vorsichtig überschichtet. Das durch Ultrazentrifugation (1,5 h,

25 000 rpm, 4°C) erhaltene Viruspellet wurde in je 2 ml NTE-Puffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden ein Saccharosegradient, wie in Abbildung 3.2 illustriert, gegossen, mit 2 ml Viruslösung überschichtet und ultrazentrifugiert (2 h, 25 000 rpm, 4°C). Zum Austarieren der Röhrcchen wurden diese mit NTE-Puffer aufgefüllt.

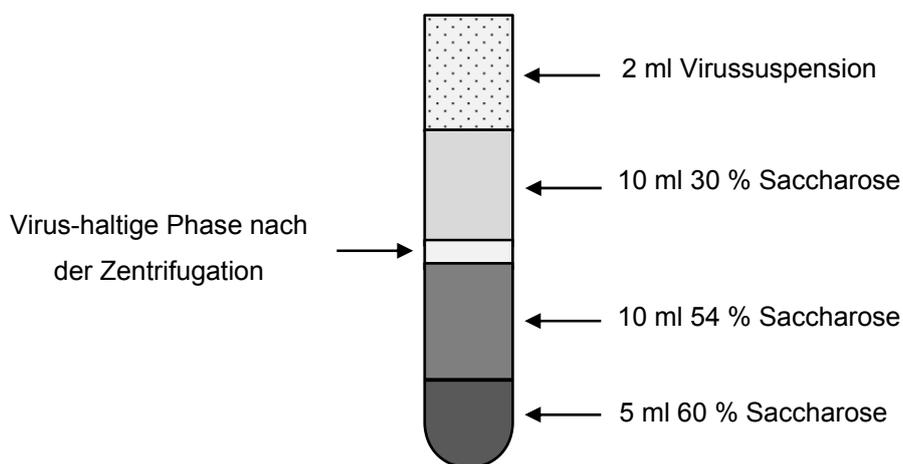


Abbildung 3.2: Saccharosegradient zur Gewinnung gereinigter Viruspartikel.

Die Viruspartikel sammeln sich als weiße Bande in der Phase zwischen 30 % und 54 % Saccharose. Der Saccharosegradient wurde mit einer langen Kanüle durchstoßen, die virushaltige Phase vorsichtig abgesaugt und in neue Zentrifugenröhrchen übertragen. Die Zentrifugenröhrchen wurden mit NTE-Puffer aufgefüllt und das Virus durch Ultrazentrifugation pelletiert (90 min, 25 000 rpm, 4°C). Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in PBS resuspendiert (insgesamt 1-1,5 ml) und bei -80°C aufbewahrt. Parallel zur Aufreinigung der Viruspräparation wurde gleichermaßen eine Mock-Kontrolle durch Ultrazentrifugation gereinigt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Virusmenge bzw. zur Abschätzung des Gehalts an Glykoproteinen wurden unterschiedliche Mengen des gereinigten Virus über ein 12 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α -H-Antikörper detektiert. Die Menge an Glykoproteinen nach Virusreinigung wurde mit der Menge an Glykoproteinen einer Viruspräparation bekannten Titers verglichen.



Abbildung 3.3. SDS-PAGE zur Abschätzung des Glykoproteingehalts des gereinigten Virus. 5 µg, 2,5 µg und 1,25 µg des gereinigten Virus bzw. einer Viruspräparation bekannten Titers wurden auf einem 12 % SDS-Gel aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem α -H-Antikörper detektiert. Ø: Mock-Kontrolle.

3.2.4 Virusbindung an T-Zellen

Zur Bindung von WTF an T-Zellen wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (1 min, 8000 rpm, RT) und anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Durch Ultrazentrifugation gereinigtes Virus (Abschnitt 3.2.3) wurde auf Eis aufgetaut und ebenfalls für 1-2 min bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Virus wurde anschließend in einer MOI von 1 vorsichtig mit den Zellen gemischt und der Ansatz für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert, um eine gleichmäßige Durchmischung von Virus und Zellen zu gewährleisten. Um die Aufnahme viraler Partikel zu verhindern, wurde zusätzlich FIP in einer Endkonzentration von 200 µM zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1 min, 8000 rpm, 4°C) und nichtgebundene Viruspartikel durch einen Waschschrift mit PBS entfernt. Abschließend wurden die Zellen in einer geeigneten Zellkonzentration in Medium oder Puffer aufgenommen und für die weiteren Experimente verwendet.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Inkubation von T-Zellen mit bakterieller Sphingomyelinase (bSMase) und C₁₆-Ceramid

Zur Generierung von Ceramiden durch bSMase wurden, falls nicht anders vermerkt, 2×10^6 T-Zellen/ml in 10 % RPMI mit 12,5mU/ml bSMase für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation der Zellen mit C₁₆-Ceramid (C₁₆) erfolgte in 10 % RPMI für 2 h bei 37°C. C₁₆ wurde, wenn nicht anders angegeben, in einer Konzentration von 50 µM zu den Zellen gegeben. Als Kontrolle diente biologisch inaktives C₁₆-Dihydroceramid (dC₁₆), welches ebenfalls in einer Konzentration von 50 µM dem Medium hinzugefügt wurde.

3.3.2 Adhärenzassay

Um die Adhärenz von T-Zellen zu bestimmen, wurden 20 µg/ml Fibronectin (FN) bzw. 10 µg/ml rekombinantes ICAM-1/Fc in 100 µl PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺)/Well in einer 96-Well-Platte über Nacht bei 4°C immobilisiert. Daraufhin wurden die Wells dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 100 µl 2,5 % BSA/PBS für 1-2 h bei 37°C geblockt. Abschließend wurde erneut dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. Zur Bestimmung der integrinunabhängigen Adhärenz wurden bei den Adhärenztests an FN jeweils drei Wells nur mit 2,5 % BSA/PBS geblockt bzw. bei der Bindung an ICAM-1/Fc mit 10 µg/ml humanem IgG-Antikörper beschichtet. Die T-Zellen wurden zweimal durch Zentrifugation (5 min, 1200 rpm, RT) mit PBS gewaschen und in einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml in RPMI (ohne FKS, ohne Phenolrot) resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Calcein AM/ml (1 mM in DMSO) wurden die T-Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend zweimal mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Im Folgenden wurden die gefärbten Zellen mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ behandelt, danach in Assaypuffer in einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml aufgenommen und zur Integrinaktivierung mit 2 mM MnCl₂ für 15 min bei 37°C inkubiert. Für die T-Zell-Adhärenz an ICAM-1/Fc erfolgte die Aktivierung der Integrine durch Stimulation von CD3/CD28. Dabei wurden die T-Zellen in

Assaypuffer auf Eis mit α -CD3- und α -CD28-Antikörpern (je 10 $\mu\text{g/ml}$) für 20 min vorinkubiert. Im Anschluss an einen weiteren Waschschrift wurden die Zellen dann durch Zugabe von Ziege-anti-Maus-IgG (10 $\mu\text{g/ml}$) für 15 min bei 37°C stimuliert. Nach erfolgter Integrinaktivierung wurden jeweils 100 μl der Zellsuspension in die Wells gegeben und die Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenzintensität der Zellen mit einem Fluoreszenzreader bei 520 nm bestimmt. Nicht-adhärente Zellen wurden im Folgenden durch dreimaliges Waschen mit 200 μl PBS entfernt und erneut die Fluoreszenzintensität bei 520 nm gemessen. Der Prozentsatz adhärenter Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\% \text{ adhärente Zellen} = \frac{\text{Fluoreszenz adhärente Zellen}}{\text{gesamte Fluoreszenz}} \times 100$$

Formel 3.4: Berechnung der Prozentzahl adhärenter Zellen.

3.3.3 Chemotaxisassay

Zur Analyse der T-Zell- bzw. DC-Chemotaxis wurde ein Zellkultursystem verwendet, bei dem die Wells einer 24-Well-Platte durch einen Polycarbonatfilter mit definierter Porengröße (5 μm) in ein oberes und unteres Kompartiment geteilt wurden.

Chemotaxisassay mit T-Zellen

Für Chemotaxisassays mit T-Zellen wurden die Polycarbonatfilter zunächst in 0,5 % BSA/RPMI für 30 min im Brutschrank äquilibriert. Die T-Zellen wurden währenddessen mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ in 0,5 % BSA/RPMI inkubiert. Für Experimente mit Virus erfolgte die Virusbindung an T-Zellen, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. In das untere Kompartiment wurde anschließend jeweils 500 μl Migrationsmedium vorgelegt (0,5 % BSA/RPMI, 1 $\mu\text{g/ml}$ SDF-1 α). 1×10^6 T-Zellen wurden in 100 μl 0,5 % BSA/RPMI resuspendiert und in das obere Kompartiment

gegeben. Daraufhin folgte eine Inkubationszeit von 3 h bei 37°C. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Filter aus der Platte entfernt und der Boden der Filter dreimal mit Medium aus dem unteren Kompartiment gespült, um Zellen von der Unterseite des Filters zu entfernen. Daraufhin wurde das Medium aus dem oberen und unteren Kompartiment in TruCount Tubes überführt, um die Zellzahl mittels quantitativer Durchflusszytometrie (Abschnitt 3.4.3) zu bestimmen.

Chemotaxisassay mit DCs

Die Chemotaxisassays mit DCs wurden analog zu den Chemotaxisassays mit T-Zellen durchgeführt. Im Gegensatz zu den Experimenten mit T-Zellen wurde als Migrationsmedium 1 % BSA/ 1 % HS/RPMI mit 5 µg/ml CCL-21 verwendet. In das obere Kompartiment wurden 2×10^5 LPS-ausgereifte DCs gegeben, die zuvor mit 25 mU/ml bSMase für 30 min bei 37°C behandelt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C wurde die Zellzahl des oberen und unteren Kompartiments mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt.

3.3.4 Under agarose assay

Zur Analyse der Zellmotilität wurde ein *under agarose assay* verwendet. Dieser Assay dient dazu das Migrationsverhalten der Zellen in einem zweidimensionalen System zu untersuchen, da die Zellen sich unter einer Agaroseschicht fortbewegen müssen. Zu Beginn des Experiments wurden daher die Agarosegele gegossen. Dafür wurde ein Kunststoffring mit einem Durchmesser von 17 mm in einer 35 mm Zellkulturschale durch ein Vaseline/Paraffin-Gemisch (1:2) fixiert. Anschließend wurden 10 ml 2x HBSS (Sigma) mit 20 ml 20 % RPMI gemischt und im Wasserbad erwärmt (65°C-70°C). In einem weiteren 50 ml-Röhrchen wurden 0,25 g UltraPure™ Agarose mit 10 ml HPLC-Wasser gemischt und anschließend in der Mikrowelle aufgekocht bis die Agarose vollständig gelöst ist. Der HBSS/RPMI-Mix wurde im Folgenden mit der Agarose gemischt und 500 µl der Agarose-Lösung sofort in den Ring gegossen. Bei Experimenten mit bSMase, C₁₆ und dC₁₆ wurden die Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen dem Agarose/Medium-Mix hinzugefügt.

Nach dem Aushärten der Gele bei Raumtemperatur wurden diese vor Beginn der videomikroskopischen Analyse noch im Inkubator für 30 min äquilibriert. 2×10^6 T-Zellen wurden inzwischen mit bSMase, C_{16} bzw. dC_{16} in 0,1 % BSA/RPMI inkubiert. Bei Experimenten mit Virus erfolgte die Virusbindung wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben. Die Zellen wurden im Anschluss für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und in 100 μ l 0,1 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α resuspendiert. 1 μ l der Zellsuspension wurde danach unter die Agarose injiziert, woraufhin die videomikroskopische Analyse der migrierenden T-Zellen mit einem inversen Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung erfolgte. Die Umgebungstemperatur wurde mit Hilfe einer Thermostat-geregelten Rotlichtlampe konstant auf 37°C gehalten und mit der angeschlossenen Kamera über einen Zeitraum von 1 h alle 10 sec ein Bild aufgenommen. Die Auswertung der T-Zell Migration erfolgte durch manuelles Zelltracking mittels ImageJ. Die statistische Analyse der Daten wurde mittels GraphPad Prism durchgeführt.

3.3.5 T-Zell-Polarisierung auf Fibronektin

Für immunhistochemische Untersuchungen der T-Zell-Polarisierung wurden die Objektträger (*μ -Slide VI, uncoated*) zunächst mit 20 μ g/ml FN in 100 μ l PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) über Nacht bei 4°C beschichtet. Danach wurden die Kanäle des Objektträgers dreimal mit 100 μ l PBS gewaschen und anschließend mit 100 μ l 2,5 % BSA/PBS für 1 h bei 37°C geblockt. Abschließend wurde erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die T-Zellen wurden währenddessen mit bSMase, C_{16} und dC_{16} in 0,5 % BSA/RPMI inkubiert, anschließend für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und in 0,5 % BSA/RPMI mit 100 ng/ml SDF-1 α in einer Zellkonzentration von 2×10^7 /ml resuspendiert. Jeweils 50 μ l der Zellsuspension wurden daraufhin in die Kanäle des Objektträgers gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 100 μ l 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei RT fixiert und die Proteine wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben für die Immunfluoreszenz gefärbt.

3.3.6 DC/T-Zell-Konjugate

Für Immunfluoreszenzfärbungen von DC/T-Zell-Konjugaten wurden die Kammerobjektträger (*LabTekII™ chamber slides*) zunächst für 10 min mit 150 μ l Poly-L-Lysin (0,01 % in aqua dest.) bei RT inkubiert. Daraufhin wurde der Objektträger dreimal mit 150 μ l PBS gewaschen und bei RT getrocknet. 5×10^4 LPS-ausgereifte DCs wurden anschließend in 10 % RPMI mit je 1 μ g/ml SEA und SEB zum Adhären in die Kammer gegeben und für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die T-Zellen wurden inzwischen mit bSMase inkubiert, danach für 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und in einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml in 10 % RPMI resuspendiert. Anschließend wurden 50 μ l der T-Zell-Suspension zu den DCs gegeben und die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert (DC/T-Verhältnis 1:5). Nach erfolgter Konjugat-Bildung wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert und anschließend wie in Abschnitt 3.3.8 beschrieben gefärbt.

3.3.7 T-Zell-Stimulation mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen

Für Immunfärbungen von T-Zellen nach Stimulation mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen wurden die Objektträger (*μ -Slide VI, ibiTreat*) zunächst, wie in Abschnitt 3.3.6 beschrieben, mit Poly-L-Lysin beschichtet und anschließend getrocknet. 1×10^6 T-Zellen/Kanal wurden in einem Endvolumen von 100 μ l 10 % RPMI mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen im Verhältnis 2:1 stimuliert. Zuvor wurde die T-Zellen für 30 min in 10 % RPMI mit bSMase bei 37°C inkubiert. Die Mikrokügelchen wurden vor der Zugabe zu den Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 10 % RPMI zu den T-Zellen gegeben, woraufhin die Stimulation der Zellen für 30 min bei 37°C erfolgte. Daraufhin wurden die Zellen in die Kanäle des Objektträgers pipettiert und zum Adhären für 20-30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 μ l 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert und wie in Abschnitt 3.3.8 für die Mikroskopie gefärbt.

3.3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Nachdem die Zellen wie in Abschnitt 3.3.5 bis 3.3.7 beschrieben vorbereitet und fixiert wurden, erfolgte die Immunfärbung der Proteine. Dabei wurde zunächst überschüssiges PFA dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend mit 100 µl bis 150 µl 0.1 % Triton-X-100 für 5 min auf Eis permeabilisiert. Danach wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mit 2,5 % BSA/PBS für 20 min bei RT geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper (verdünnt in 1 % BSA/PBS) für 1 h bei 4°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch drei weitere Waschschriffe mit PBS entfernt, woraufhin die Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden, fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper (verdünnt in 1 % BSA/PBS) für eine Stunde bei 4°C erfolgte. Die Zellen wurden anschließend erneut dreimal mit PBS gewaschen und im Falle einer Doppelfärbung mit Phalloidin nochmals für 45 min bei 4°C mit Phalloidin-488 bzw. Phalloidin-594 (jeweils 1:100 in 1 % BSA/PBS) inkubiert. Die Färbungen wurden abschließend dreimal mit PBS gewaschen und einmal mit aqua dest. für 5 min bei RT inkubiert, um mögliche PBS-Kristalle zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit Fluoromount eingedeckt und mikroskopisch analysiert. Im Falle einer Färbung der Zellen mit WGA-FITC, wurden die Zellen nach der Fixierung zunächst für 1 h bei 4°C mit WGA-FITC (1:100 in 1 % BSA/PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, permeabilisiert und die Proteine wie zuvor beschrieben gefärbt.

Die Analyse der Immunfärbungen erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie. Die konfokale Mikroskopie wurde mit Zeiss LSM510 Meta durchgeführt (Software Version 3.2 SP2), ausgestattet mit einem Axiovert 200 Mikroskop und einem 63 x Öl-Immersionsobjektiv (Numerische Aperatur 1.4 Plan Apochromat). Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit den 488 nm- oder 564 nm-Laserkennlinien (Argon/Helium-Neon-Laser).

3.3.9 Direkte Markierung von Primärantikörpern mittels Zenon Labeling Kit

Unmarkierte Antikörper wurden mit Hilfe des Zenon Mouse IgG Labeling Kits direkt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 gekoppelt. Dafür wurde 1 µg des Primärantikörpers (monoklonal Maus, Isotyp IgG₁) in 50 µl PBS verdünnt und mit 5 µl Labeling Reagenz für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Antikörper nochmals für 5 min bei RT mit dem Blocking Reagenz behandelt. Nach der Markierung des Antikörpers wurde dieser innerhalb von 30 min für die Immunfärbung eingesetzt.

3.3.10 Transfektion primärer Zellen

Zur Transfektion primärer Zellen wurde das Amaxa *Nucleofector*® Kit nach dem empfohlenen Protokoll des Herstellers verwendet. Zur Vorbereitung wurden alle Lösungen auf Raumtemperatur und das Medium auf 37°C erwärmt. In eine 12-Well-Platte wurde zudem 1,5 ml 10 % RPMI vorgelegt und die Platte ebenfalls im Brutschrank erwärmt. 1×10^7 T-Zellen wurden danach abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm, RT), das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen in 100 µl *Nucleofector*-Lösung resuspendiert. Die zu transfizierende Plasmid-DNA (15 µg) wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und die Zellen anschließend mit der DNA gemischt. Die Zellen wurden daraufhin luftblasenfrei in eine von Amaxa zertifizierte Küvette überführt und die Zellen mit dem Programm U-14 elektroporiert. Anschließend wurden 500 µl vorgewärmtes Medium in die Küvette gegeben und die Zellen mit Hilfe einer Plastikpipette in die Zellkulturplatte überführt. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für die Experimente eingesetzt und die Transfektionsrate mittels Durchflusszytometrie (Abschnitt 3.4) bestimmt.

3.3.11 T-Zell-Proliferation

MLR (*mixed lymphocyte reaction*)

Bei einer MLR handelt es sich um die Kokultur von APCs und T-Zellen unterschiedlicher Herkunft. Die präsentierten MHC-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche der APC werden von den T-Zellen als fremd erkannt, was zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen führt. Um das Maß der T-Zell-Proliferation in einer MLR zu messen, wurden reife dendritische Zellen verwendet, da sie verstärkt die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimieren. Im Einzelnen wurden 2×10^4 DCs im Verhältnis 1:10 mit den T-Zellen gemischt und für fünf Tage kokultiviert. Am Tag vier wurde der Kokultur radioaktiv markiertes Thymidin ($[^3\text{H}]$ Thymidin, $0,5 \mu\text{Ci/Well}$) zugesetzt und das Maß der Proliferation am Tag fünf über den Einbau an radioaktiv markiertem Thymidin im Szintillationszähler bestimmt. Zur Analyse der Proliferation von Zellen murinen Ursprungs, wurden die DCs vor der Kokultur mit PBMCs noch für 30 min mit je $1 \mu\text{g/ml}$ SEA und SEB inkubiert, da es sich bei den Tieren um genetisch identische Tiere handelte und somit die präsentierten MHC-Peptid-Komplexe nicht als fremd erkannt werden.

T-Zell-Proliferation mittels CD3/CD28-Stimulation

Um das Maß der T-Zell Proliferation nach CD3/CD28-Stimulation zu messen, wurden zunächst die Wells einer 96-Well-Platte mit $10 \mu\text{g/ml}$ Ziege-anti-Maus in $100 \mu\text{l}$ Tris-HCl (pH 9,0) für 1 h bei 37°C beschichtet. Die T-Zellen wurden mit bSMase, C_{16} und dC_{16} inkubiert und anschließend auf Eis mit $10 \mu\text{g/ml}$ α -CD3- und α -CD28-Antikörpern inkubiert. Nach der Antikörperbindung wurde überschüssiger Antikörper mit 1 ml PBS entfernt und die Zellen in einer Zellkonzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in 10 % RPMI resuspendiert. Jeweils $200 \mu\text{l}$ der T-Zell-Suspension wurde anschließend in die Wells der 96-Well-Platte gegeben und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. 24 h vor der Messung der Zellproliferation wurde ebenfalls radioaktiv markiertes Thymidin ($0,5 \mu\text{Ci/Well}$) zu der Kokultur gegeben und das Maß der

Proliferation über den Einbau an radioaktiv markiertem Thymidin im Szintillationszähler bestimmt.

3.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen in einem laminaren Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet. Neben Größe (FSC, *forward scatter*) und Granularität (SSC, *sideward scatter*) können auch spezifische Fluoreszenzen und deren Intensität gemessen werden, was somit die weitere Charakterisierung der Zellen ermöglicht. Dies setzt die Markierung von Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern voraus, wobei, je nach Färbung, sowohl Proteine auf der Oberfläche der Zellen als auch intrazelluläre Proteine mit den spezifischen Antikörpern detektiert werden können.

Sämtliche im Folgenden beschriebenen Anwendungen wurden in einem Drei- bzw. Vierfarben-Durchflusszytometer gemessen (FACScan Calibur™; Becton Dickenson) und mit Hilfe der CellQuestPro Software ausgewertet. Das Gerät verfügt über zwei Laser (488 nm und 635 nm Anregungswellenlänge), mit denen Fluorochrome verschiedener Wellenlängen detektiert werden können.

3.4.1 Oberflächenfärbungen

Für Oberflächenfärbungen von Proteinen wurden pro Färbung 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen eingesetzt, die zunächst mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen wurden (5 min, 1200 rpm, 4° C). Anschließend wurden die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit einer entsprechenden Antikörperverdünnung resuspendiert und für 30 min bei 4° C inkubiert. Im Anschluss daran wurde jede Probe erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Wurden unmarkierte Primärantikörper verwendet, folgte eine weitere 30-minütige Inkubation bei 4° C mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper. Bei Mehrfachfärbungen wurde nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer eine Färbung mit einem direktmarkierten monoklonalen Antikörper angeschlossen (30 min, 4° C). Abschließend wurden die Zellen nochmals mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Bei einigen Färbungen wurde zur Analyse der Zellvitalität 7-AAD

verwendet ($0,5 \mu\text{l}/1 \times 10^5$ Zellen). Da tote Zellen den Farbstoff aufnehmen, kann somit zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Zur Kontrolle des unspezifischen Hintergrunds sowie zur Überprüfung der Kompensation wurden entsprechende Isotyp-, Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

3.4.2 Intrazelluläre Färbungen

Für die Färbung intrazellulärer Proteine wurden ebenfalls 5×10^4 bis 1×10^5 Zellen zunächst mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1200 rpm, 4°C) und anschließend mit $200 \mu\text{l}$ 4 % PFA für 20 min auf Eis fixiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer wurden die Zellen in 1 ml Saponinpuffer für 10 min bei RT permeabilisiert. Nach dem Pelletieren der Zellen wurde der Saponinpuffer vorsichtig abgesaugt, die Zellen in $50 \mu\text{l}$ Saponinpuffer mit einer entsprechenden Antikörperverdünnung resuspendiert und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 1 ml Saponinpuffer gewaschen und unmarkierte Primärantikörper wurden mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper detektiert (30 min, RT, dunkel). Nichtgebundener Antikörper wurde daraufhin durch einen weiteren Waschschrift mit Saponinpuffer entfernt. Abschließend wurden die Zellen nochmals mit FACS-Puffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.4.3 Quantitative Durchflusszytometrie

Zur direkten Bestimmung der Zellzahl in einer Probe wurden die Zellen in TruCount Tubes überführt, die eine definierte Anzahl an fluoreszenzmarkierten Mikrokügelchen enthalten, und anschließend im Durchflusszytometer gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden verschiedene Regionen definiert (Abbildung 3.5): eine Region definierte Größe und Granularität der Zellen (Region 1), die zweite Region definierte die Morphologie der Mikrokügelchen. Die Einstellungen des Durchflusszytometers wurden weiterhin so gewählt, dass die Messung nach 5000 gemessenen Ereignissen in der Region 2 abgebrochen wurde. Über die Anzahl der gemessenen Ereignisse in der Region 1 (Zellen) und die Zahl der gemessenen Ereignisse in der Region 2

(Mikrokügelchen) sowie die definierte Anzahl der Mikrokügelchen in der Lösung, konnte die absolute Zahl der Zellen pro Mikroliter nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl}/\mu\text{l} = \frac{\text{Anzahl der Ereignisse in R1}}{\text{Anzahl der Ereignisse in R2}} \times \frac{\text{Anzahl der Mikrokügelchen}}{\text{Gesamtvolumen}}$$

Formel 3.5: Berechnung der absoluten Zellzahl pro Mikroliter.

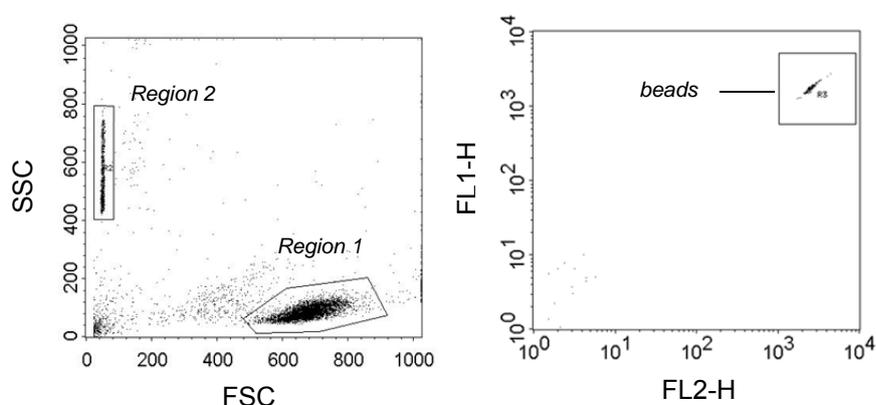


Abbildung 3.4: Quantitative Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die für die Berechnung der Zellzahl definierten Regionen. Die fluoreszierenden Mikrokügelchen können im FSC/SSC-Plot und im FL1-H/FL2-H-Plot klar definiert werden.

3.4.4 Messung von DC/T-Zell-Konjugaten im Durchflusszytometer

Um die Anzahl gebildeter DC/T-Zell-Konjugate quantitativ im Durchflusszytometer zu bestimmen, wurden DCs und T-Zellen zunächst mit unterschiedlichen, fluoreszierenden Farbstoffen markiert. Die DCs wurden mit 10 μM R18 (stock: 10 mM in Ethanol) in 10 % RPMI für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 10 % RPMI gewaschen und in einer Zellkonzentration von $1 \times 10^6/\text{ml}$ in 10 % RPMI resuspendiert. Die T-Zellen wurden währenddessen einmal mit PBS/5 % FKS gewaschen und in einer Zellkonzentration von 5×10^6 bis $1 \times 10^7/\text{ml}$ in PBS/5 % FKS aufgenommen. Der CFSE-Farbstoff (stock: 5 mM in DMSO) wurde 1:2000 in PBS verdünnt und die T-Zellen anschließend mit dem gleichen Volumen an

CSFE-Lösung gemischt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei RT inkubiert, anschließend dreimal mit dem 10-fachen Volumen an PBS/5 % FKS gewaschen (5 min, 1200 rpm, RT) und in einer Zellkonzentration von 1×10^7 /ml in 10 % RPMI resuspendiert. Zur Konjugat-Bildung wurden 100 μ l der DC-Suspension in FACS-Röhrchen überführt und anschließend 50 μ l der T-Zell-Suspension hinzugegeben. Bei allogenen Reaktionen erfolgte die Konjugat-Bildung ohne die Zugabe von Superantigenen. Bei autologen Reaktionen wurden die DCs zuvor mit je 1 μ g/ml SEA und SEB in 10 % RPMI für 20-30 min bei 37°C inkubiert. Die Konjugat-Bildung erfolgte für 30 min bei 37°C (Wasserbad). Daraufhin wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen an 4 % PFA für 15 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (3min, 300rpm, 4°C), der Überstand vorsichtig abgesaugt und die Konjugate leicht mit einer abgeschnittenen blauen Spitze resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Analyse der Konjugat-Menge im Durchflusszytometer. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass 1×10^4 DCs gezählt wurden. Die Menge an gebildeten Konjugaten wurde anhand der Prozentzahl doppelt positiver Zellen in der DC-Population bestimmt.

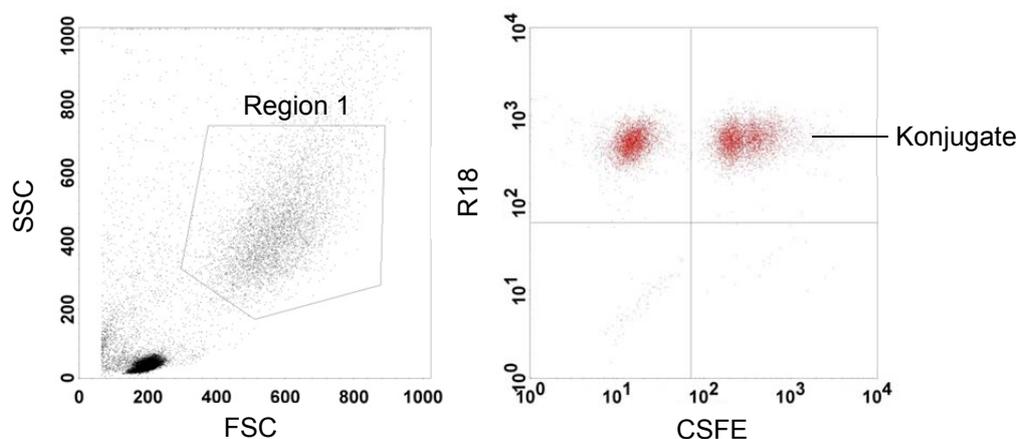


Abb. 3.5: Analyse von DC/T-Zell-Konjugaten im Durchflusszytometer. Der CSFE/R18-Plot zeigt die doppelt positiven Zellen innerhalb der DC-Population (Region 1).

3.4.5 Messung des Calcium-Influx

Zur Messung des Calcium-Einstroms in T-Zellen wurden diese mit dem Calciumindikator Fluo-4 markiert. Bei einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration steigt auch die Intensität des Farbstoffs an. Für die Färbung der Zellen mit Fluo-4 wurden die T-Zellen zunächst einmal mit 10 mM Hepes/HANKS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) pH 7,5 gewaschen und in einer Zellkonzentration von 5x10⁶/ml in 10 mM Hepes/HANKS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) resuspendiert. Nach der Zugabe von 1 µl Fluo-4/ml (stock: 1 mM in DMSO) wurde die Zellsuspension für 30 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit PBS (-Ca²⁺/-Mg²⁺) gewaschen, in 10 mM Hepes/HANKS resuspendiert (Zellkonzentration: 5x10⁶/ml) und erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss an die Markierung der Zellen mit Fluo-4 wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen bSMase inkubiert, danach einmal mit 10 % RPMI gewaschen und in einer Zellkonzentration von 1x10⁷/ml in 10 % RPMI resuspendiert. 1x10⁵ DCs in 100 µl 10 % RPMI wurden im Folgenden mit 50 µl T-Zellen gemischt und die Konjugatbildung für 30 min bei 37°C durchgeführt. Die Messung der Fluo-4-positiven Konjugate wurde anschließend, wie in Abschnitt 3.4.4 beschrieben, im Durchflusszytometer durchgeführt.

Um den Calcium-Einstrom infolge der Stimulation mit DCs über die Zeit zu bestimmen, wurden die T-Zellen, wie zuvor beschrieben, mit Fluo-4 markiert und die Fluo-4-Intensität nach unterschiedlichen Zeitpunkten in einem Fluoreszenzreader bestimmt. Dafür wurde eine 96-Well-Platte mit Poly-L-Lysin (0,01 % in aqua dest.) für 10 min bei RT beschichtet. Anschließend wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen und bei RT getrocknet. 1x10⁵ reife DCs wurden im Folgenden in 100 µl 10 % RPMI in die Wells gegeben und mit je 5x10⁵ T-Zellen (in 100 µl 10 % RPMI) gemischt. Die Platte wurde daraufhin für 3 min bei 300 g und RT zentrifugiert und die Messung der Fluo-4-Intensität über einen Zeitraum von 60 min durchgeführt. Dabei wurden die Einstellungen so gewählt, dass alle 2 Minuten die Fluoreszenzintensität jedes Wells bestimmt wurde. Die Messungen wurden jeweils im Dreifachansatz durchgeführt. Zur Bestimmung des Basisniveaus dienten Fluo-4-markierte T-Zellen, die nicht mit DCs kokultiviert wurden.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Analyse von phosphorylierten Proteinen

Um den Phosphorylierungsstatus von Akt zu untersuchen wurden die T-Zellen zunächst für mindestens 2 h in 0,5 % BSA/RPMI bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig wurden ein Teil der Zellen mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert. Anschließend wurden jeweils 1x10⁷ Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte mit SDF-1 α (100 ng/ml) oder α -CD3 und α -CD28-Antikörpern stimuliert. Die Stimulation der Zellen mit SDF-1 α erfolgte in Suspension, wohingegen die Stimulation von CD3 und CD28 in einer 12-Well-Platte erfolgte. Dafür wurden die Wells der Platte zunächst mit Ziege-anti-Maus-Antikörper (10 μ g/ml in Tris-HCL, pH 9,0) für 1 h bei 37°C beschichtet und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Die T-Zellen wurden währenddessen für 20 min auf Eis mit je 10 μ g/ml α -CD3- und α -CD28-Antikörpern inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wurde anschließend durch einen Waschschriff mit PBS entfernt (1 min, 8000 rpm, 4°C) entfernt und die Zellen im Folgenden für unterschiedliche Zeitpunkte in der Platte bei 37°C stimuliert (500 μ l Zellen/Well). Die Stimulation wurde durch die Zugabe von 1 ml kaltem PBS auf Eis gestoppt und die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst. Nach zwei weiteren Waschschriffen mit jeweils 1 ml kaltem PBS (1 min, 8000 rpm, 4°C) wurden die Zellen in 100 μ l Lyse-Puffer für 15 min auf Eis lysiert. Der Zelldebris wurde im Anschluss durch erneute Zentrifugation (5 min, 13000 rpm, 4°C) entfernt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinmenge des Überstands wurde wie in Abschnitt 3.5.2 beschrieben bestimmt und die Menge an phosphorylierten Proteinen im Western Blot (Abschnitt 3.5.3 und 3.5.4) analysiert. Bei der Stimulation der T-Zellen mit SDF-1 α wurden diese ebenfalls für unterschiedliche Zeitpunkte mit 100 ng/ml SDF-1 α bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 8000 rpm, 4°C), wie zuvor beschrieben auf Eis lysiert und die Phosphorylierung der Proteine im Western Blot analysiert.

Zur Analyse des Phosphorylierungsstatus von ERM-Proteinen nach Induktion von Ceramiden wurden die Zellen wie zuvor beschrieben mit bSMase und C₁₆ inkubiert, anschließend lysiert und die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen im Western Blot detektiert.

3.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels BCA (*Bicinchoninic Acid*)-Test bestimmt. Dafür wurde zunächst Kupfer(II)Sulfat 1:50 in BCA verdünnt. 995 μl der Verdünnung wurden anschließend mit 5 μl der zu messenden Probe bzw. des Proteinstandards (1 mg/ml BSA) versetzt und die Proben für 15 min bei 60°C in den Heizblock gestellt. Proteine bilden in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} -Ionen einen Komplex, wobei die Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduziert werden, die mit Bicinchonininsäure einen violetten Farbkomplex bilden. Die Proben wurden daraufhin in Küvetten überführt und der Proteingehalt im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

3.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurde ein 12 %-iges Trenngel benutzt. Die Lösungen für das Trenngel wurden gemischt und sofort in eine vorbereitete SDS-Gelelektrophoresekammer gefüllt.

Zusammensetzung Trenngel	
1,5 M Tris/HCL pH 8,7	8 ml
Wasser	10,8 ml
Acrylamid-4K-Lösung (30%)	12,8 ml
20 % SDS	160 μl
10 % APS	280 μl
TEMED	10 μl

Nach der Polymerisierung wurde das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm für die Probenaschen eingefügt. Das Sammelgel wurde wie folgt zusammengesetzt:

Zusammensetzung Sammelgel	
1,5 M Tris/HCL pH 8,7	1,25 ml
Wasser	6 ml
Acrylamid-4K-Lösung (30%)	1,3 ml
20 % SDS	50 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	10 µl

Die Gelelektrophoresekammer wurde mit 1 x Proteingelpuffer gefüllt und der Kamm entfernt. Die Proteinproben wurden mit einer geeigneten Menge 6 x SDS-Gelladepuffer versetzt, 5 min bei 100°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in die Taschen des polymerisierten Gels aufgetragen. Pro Spur wurden zwischen 30 µg und 40 µg Protein aufgetragen. Zum Abschätzen des Molekulargewichtes der zu untersuchenden Proteine wurde zusätzlich 10 µl eines Proteinstandards aufgetragen. Die Proteintrennung erfolgte über Nacht bei 7 mA.

3.5.4 Western Blot

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Elektrobplot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran und das Whatman-Papier wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulosemembran wurde für circa 10 min in 30 mM Anodenpuffer eingeweicht und das SDS-Gel in Kathodenpuffer äquilibriert. Die Blotkammer wurde daraufhin wie folgt aufgebaut (beginnend bei der Kathodenplatte):

1. 2 x Whatman-Papier getränkt in Kathodenpuffer
2. SDS-Gel
3. Nitrozellulosemembran
4. 2 x Whatman-Papier getränkt in 30 mM Anodenpuffer
5. 2 x Whatman-Papier getränkt in 300 mM Anodenpuffer

Die Proteine wurden für 1 h bei 110 mA auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran einmal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT in 5% Milchpuffer geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper (verdünnt in 5 % BSA/PBS oder 5 % Milchpuffer) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran dreimal für mind. 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in 5 % Milchpuffer) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Abschließend wurde erneut dreimal für mind. 5 min mit Waschpuffer gewaschen, woraufhin die Membran für 1 min bei RT mit der ECL-Substratlösung inkubiert wurde. Durch die Umsetzung des Substrates werden durch die Peroxidase Chemilumineszenzsignale erzeugt, welche durch Exposition eines Röntgenfilms und anschließender Entwicklung des Films sichtbar gemacht wurden. Die quantitative Auswertung des Films erfolgte mit der AIDA-Software von Raytest.

3.6 Tierexperimentelle Methoden

3.6.1 Mausektion der Tiere

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension diverser Organe wurden die Tiere direkt durch zervikale Dislokation (Genickbruch) getötet. Nach anschließender Fixierung in Rückenlage, wurde die Bauchhöhle entlang der Linea alba geöffnet und Entlastungsschnitte an der seitlichen Brustwand sowie vor den Hinterbeinen gesetzt. Danach wurden die Organe freipräpariert und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS gelagert. Zur späteren Isolierung von Knochenmarkzellen wurden zudem die Hinterbeine bis zum Hüftgelenk komplett freipräpariert und ebenfalls bis zur weiteren Verarbeitung in PBS gelagert.

3.6.2 Herstellung einer Milzzellsuspension

Zur Herstellung einer Milzzellsuspension wurde die Milz in 10 ml PBS durch ein steriles Stahlsieb gerieben. Das Stahlsieb wurde anschließend nochmals mit 10 ml PBS gespült. Die Einzelzellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 10 min bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1-2 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für ca. 5 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit 10 % RPMI gewaschen (1200 rpm, 5 min, RT) und anschließend in einer Zellkonzentration von 5×10^6 /ml in 10 % RPMI aufgenommen.

3.6.3 Isolierung muriner Knochenmarkzellen

Zur Isolierung der Knochenmarkzellen wurden Oberschenkelknochen und Schienbein an den Gelenkenden geöffnet und das Knochenmark mit ca. 10 ml PBS unter sterilen Bedingungen herausgespült. Danach wurde die Zellsuspension für 10 min bei 400 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellkonzentration von 3×10^6 /ml in 10 % RPMI resuspendiert und in Bakterienplatten ausgesät. Zur Generierung von DCs wurde dem Medium murines GM-CSF hinzugefügt, welches aus dem Überstand von transfizierten Myelomzellen (Ag8653) gewonnen wurde (1ml GM-CSF-Überstand/10 ml Medium) (Zal et al, 1994). Das Medium wurde alle 3 Tage erneuert und die Zellen mit frischem GM-CSF versehen. Nach 10 Tagen der Kultur zeigten etwa 90 % der Zellen den Phänotyp dendritischer Zellen (Abbildung 3.5). Um reife murine DCs zu erhalten wurde dem Medium ab Tag 10 der Kultur 100 ng/ml LPS hinzugefügt und die Zellen für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

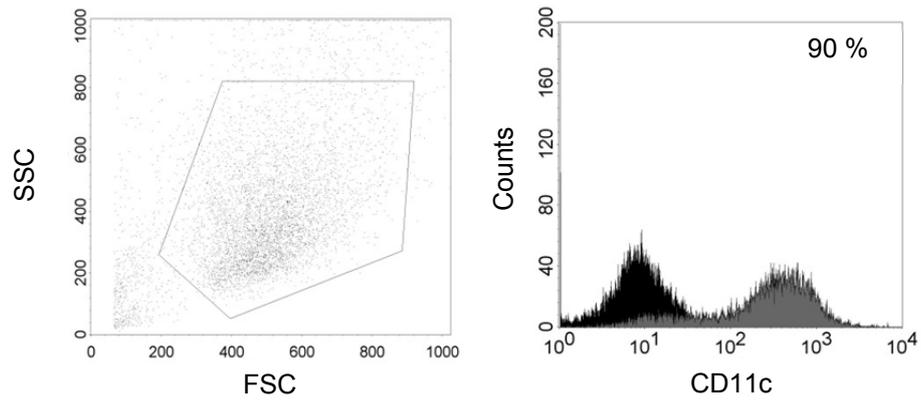


Abbildung 3.6: Durchflusszytometrische Analyse der Zellpopulation. Nach der 10-tägigen Kultur von murinen Knochenmarkszellen mit GM-CSF konnten etwa 90 % CD11c-positive Zellen in der Kultur detektiert werden (schwarz gefülltes Histogramm: Isotyp, grau gefülltes Histogramm: CD11c).

4 Ergebnisse

4.1 Akkumulation von Ceramiden *in vitro*

Um den Einfluss von Ceramiden auf verschiedene zelluläre Prozesse *in vitro* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit langkettige Ceramide (C₁₆) bzw. bSMase verwendet. bSMase hydrolysiert bei neutralem pH-Wert SM zu Ceramid und Phosphocholin, wodurch die Inkubation von Zellen mit bSMase in einer Anreicherung von Ceramiden auf der Zelloberfläche resultiert. Um zu überprüfen, über welchen Zeitraum die generierten Ceramide auf der Zelloberfläche detektiert werden können, wurden T-Zellen für 30 min mit unterschiedlichen bSMase-Konzentrationen (12,5 mU/ml-50 mU/ml) inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und für 15 min, 30 min bzw. 60 min bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin mit PFA (Endkonzentration 1 %) für 20 min auf Eis fixiert und die Ceramide für die durchflusszytometrische Analyse mit einem ceramidspezifischen Antikörper angefärbt. Die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper erfolgte in FACS-Puffer für 1 h bei 37°C, woraufhin sich die Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für 30 min bei 4°C anschloss.

Wie in der Abbildung 4.1 dargestellt ist, führt die Inkubation von T-Zellen mit bSMase, unabhängig von der verwendeten Konzentration, zu einem deutlichen Anstieg der Ceramidmenge auf der Oberfläche der Zellen. Dargestellt sind die MFI-Werte (*mean fluorescence intensity*), die für Kontroll- bzw. bSMase-behandelte Zellen ermittelt wurden. Die detektierte Menge an Ceramiden nimmt über die Zeit wieder ab, 1 h nachdem die Zellen mit bSMase inkubiert wurden ist das Basisniveau wieder annähernd hergestellt.

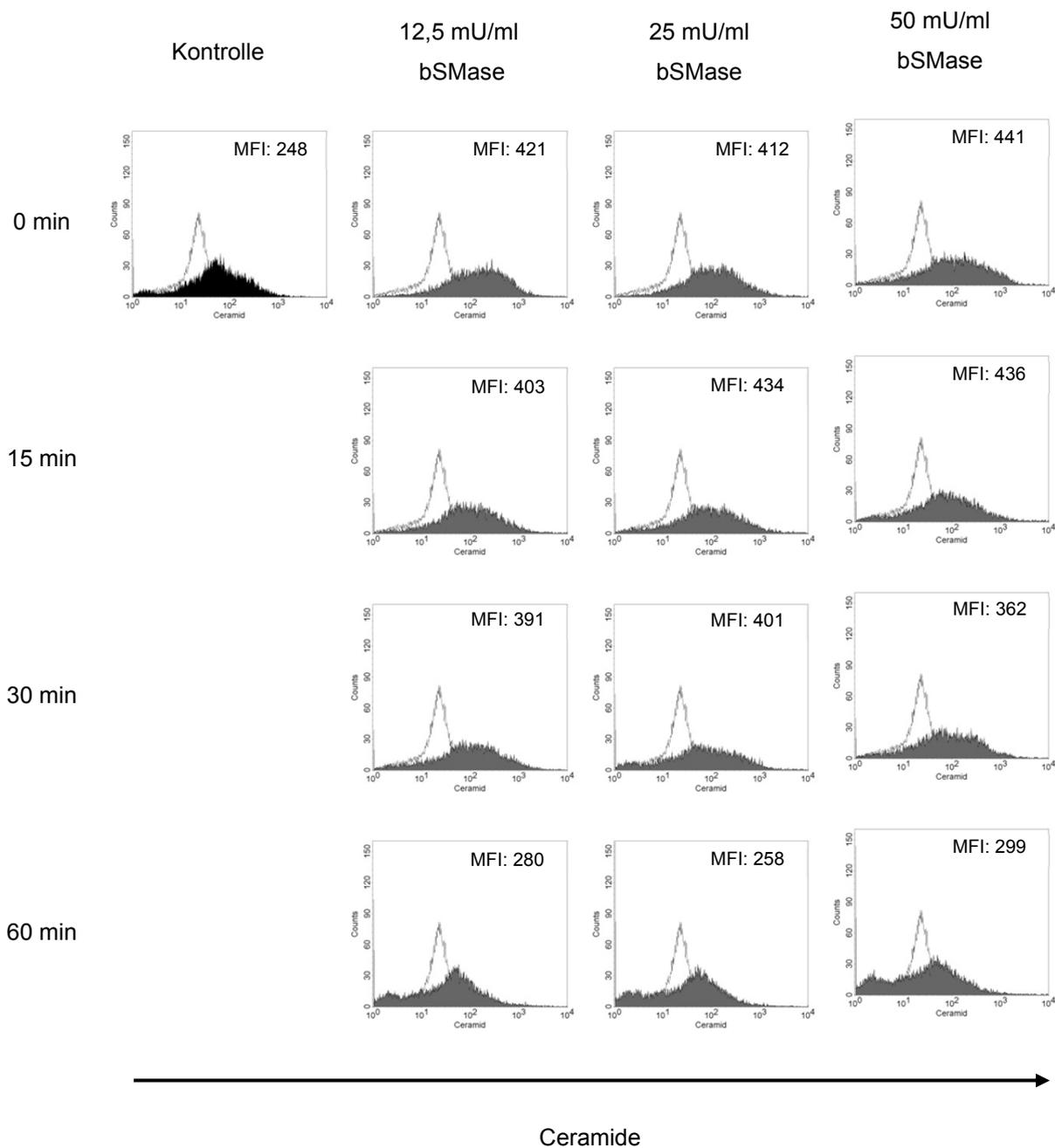


Abbildung 4.1: Durchflusszytometrische Analyse der Ceramidmenge auf T-Zellen nach Inkubation mit bSMase. T-Zellen wurden mit unterschiedlichen bSMase-Konzentrationen für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend dreimal mit PBS gewaschen und für die angegebenen Zeitpunkte bei 37°C kultiviert. Daraufhin wurden die Zellen fixiert und die Ceramidmenge auf der Oberfläche der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt (offenes Histogramm: Isotyp, gefülltes Histogramm: Ceramide).

Da Ceramide die Apoptose von Zellen induzieren können, wurde darüber hinaus die Vitalität der Zellen nach Inkubation mit bSMase bzw. C₁₆ oder dC₁₆ (biologisch inaktives Dihydroceramid) mittels 7-AAD-Färbungen im Durchflusszytometer analysiert. In Abbildung 4.2 ist gezeigt, dass der prozentuale Anteil 7-AAD-negativer

Zellen nach Inkubation mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert ist. Basierend auf diesen Daten wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente bSMase-Konzentration bis zu 50 mU/ml verwendet. C₁₆ bzw. dC₁₆ wurden in einer Konzentration von 50 µM dem Medium hinzugefügt.

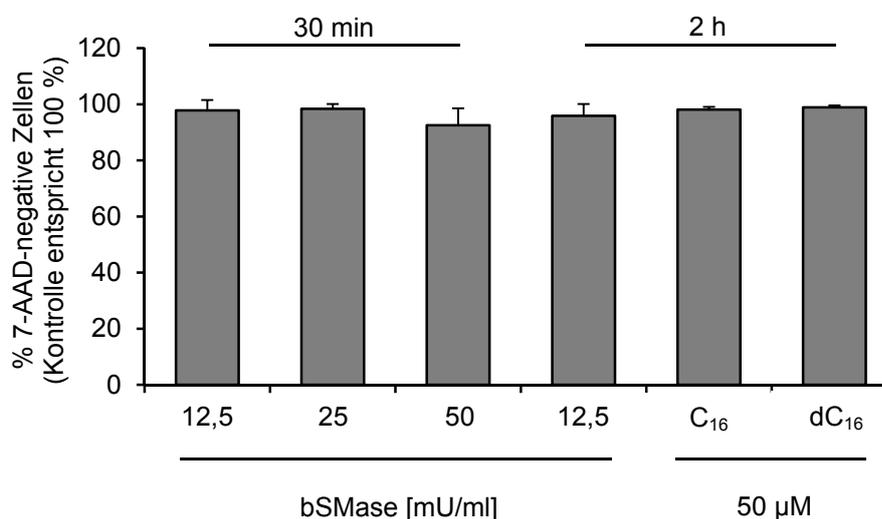


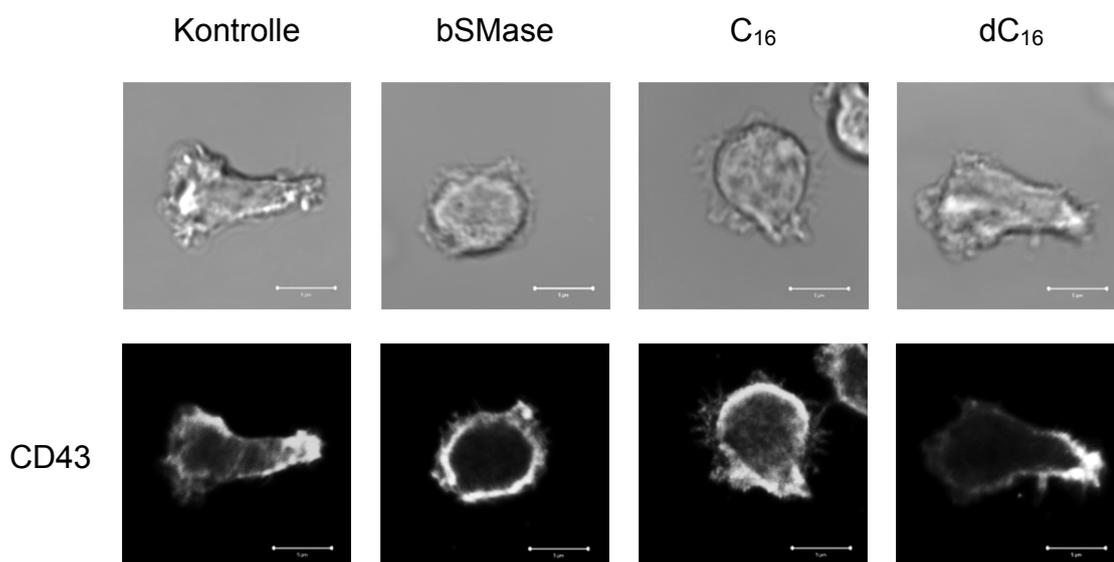
Abbildung 4.2: Die Inkubation von T-Zellen mit bSMase oder langkettigen Ceramiden beeinflusst nicht deren Vitalität. T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ für 30 min bzw. 2 h inkubiert, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und nach Zugabe von 7-AAD im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.2 Einfluss von Ceramiden auf die T-Zell-Polarisierung

Bereits in vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der durch MV induzierte Verlust der T-Zell-Polarisierung auf die Aktivierung von ASM und NSM zurückzuführen ist (Gassert et al, 2009). Da die Aktivierung von ASM und NSM zur Generierung ceramidreicher Membranplattformen führt, wurde im Folgenden der generelle Einfluss von Ceramiden auf die T-Zell-Polarisierung untersucht. Dafür wurden T-Zellen zunächst mit bSMase bzw. C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert und anschließend in 0,5 % BSA/RPMI mit 100 ng/ml SDF-1 α auf Fibronectin (FN)-beschichtete Objektträger gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert und die Lokalisation von CD43 mikroskopisch analysiert. Wie anhand der Kontrollkulturen in Abbildung 4.3 (A) zu sehen ist, führt die Stimulation mit SDF-1 α zur morphologischen Polarisierung der Zellen, welche durch ein aktinreiches *leading*

edge und die Akkumulation von CD43 im Uropod der Zelle gekennzeichnet ist. Die Inkubation der Zellen mit bSMase bzw. C₁₆ führte hingegen zu einer drastischen Veränderung der Zellmorphologie. Wie die Quantifizierung in Abbildung 4.3 (B) zeigt, ist die morphologische Polarisierung der Zellen auf FN nach Akkumulation von Ceramiden im Vergleich zur Kontrolle um etwa 60 % reduziert. C₁₆- bzw. bSMase-behandelte Zellen zeigten einen eher runden Phänotyp, der weder ein klar erkennbares *leading edge*, noch die Ausbildung eines Uropods aufweist. Neben der veränderten Zellmorphologie ist zudem eine gleichmäßige Verteilung von CD43 zu beobachten. Somit ist nach exogener Akkumulation von Ceramiden die chemokininduzierte Reorganisation des Zytoskeletts und die damit verbundene Polarisierung von T-Zellen gestört.

A



B

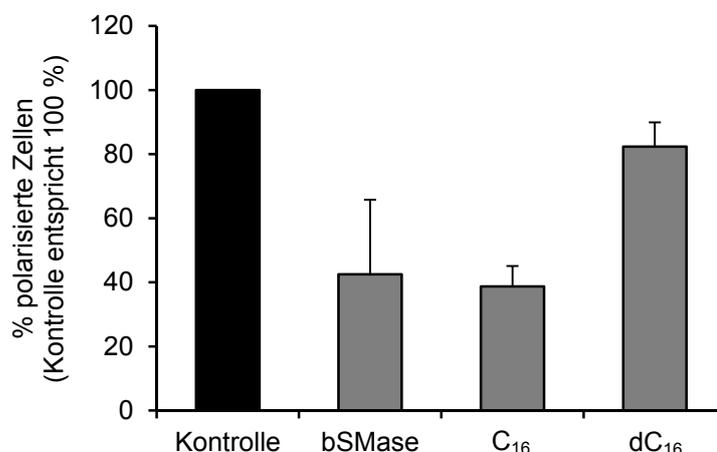


Abbildung 4.3: Ceramide interferieren mit der T-Zell-Polarisierung auf FN. (A) T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ behandelt, in 0,5 % BSA/RPMI mit 100 ng/ml SDF-1 α resuspendiert und anschließend auf FN-beschichteten Objektträgern gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und CD43 angefärbt (Größenmarker: 5 μ m). (B) Quantifizierung der T-Zell-Polarisierung. Für die Quantifizierung wurden pro Ansatz jeweils 100 Zellen betrachtet. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.3 Ceramide beeinträchtigen die Adhärenz von T-Zellen an Fibronectin und ICAM-1

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, sind T-Zellen nach Akkumulation von Ceramiden nur eingeschränkt in der Lage einen polarisierten Phänotyp auf FN auszubilden. Die unvollständige Reorganisation des Aktinzytoskeletts könnte demnach auch eine verminderte Adhärenz von T-Zellen an dieses Substrat zur Folge haben. Die Bindung von Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix wird durch β 1-Integrine vermittelt. β 2-Integrine, wie LFA-1, sind hingegen für die Stabilisierung von Zell-Zell-Interaktionen von Bedeutung. LFA-1 interagiert mit ICAM-1, weshalb im Folgenden der Einfluss von Ceramiden auf die Adhärenz der Zellen an FN bzw. ICAM-1 untersucht wurde. Zur Bestimmung der Adhärenz an das jeweilige Substrat wurden die T-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein gefärbt und anschließend mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ inkubiert. Die Aktivierung der Integrine erfolgte durch Zugabe von Mn²⁺ oder Stimulation der Zellen mit CD3/CD28-spezifischen Antikörpern. Im Anschluss an die Integrinaktivierung wurden die Zellen

in die Näpfe einer mit FN bzw. ICAM-1/Fc beschichteten 96-Loch-Platte gegeben und für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C inkubiert. Nicht-adhärente Zellen wurden anschließend durch mehrmaliges Waschen entfernt und der Prozentsatz adhärenter Zellen durch Messung der Fluoreszenzintensität bei 520 nm bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 (A) und 4.5 (A) dargestellt.

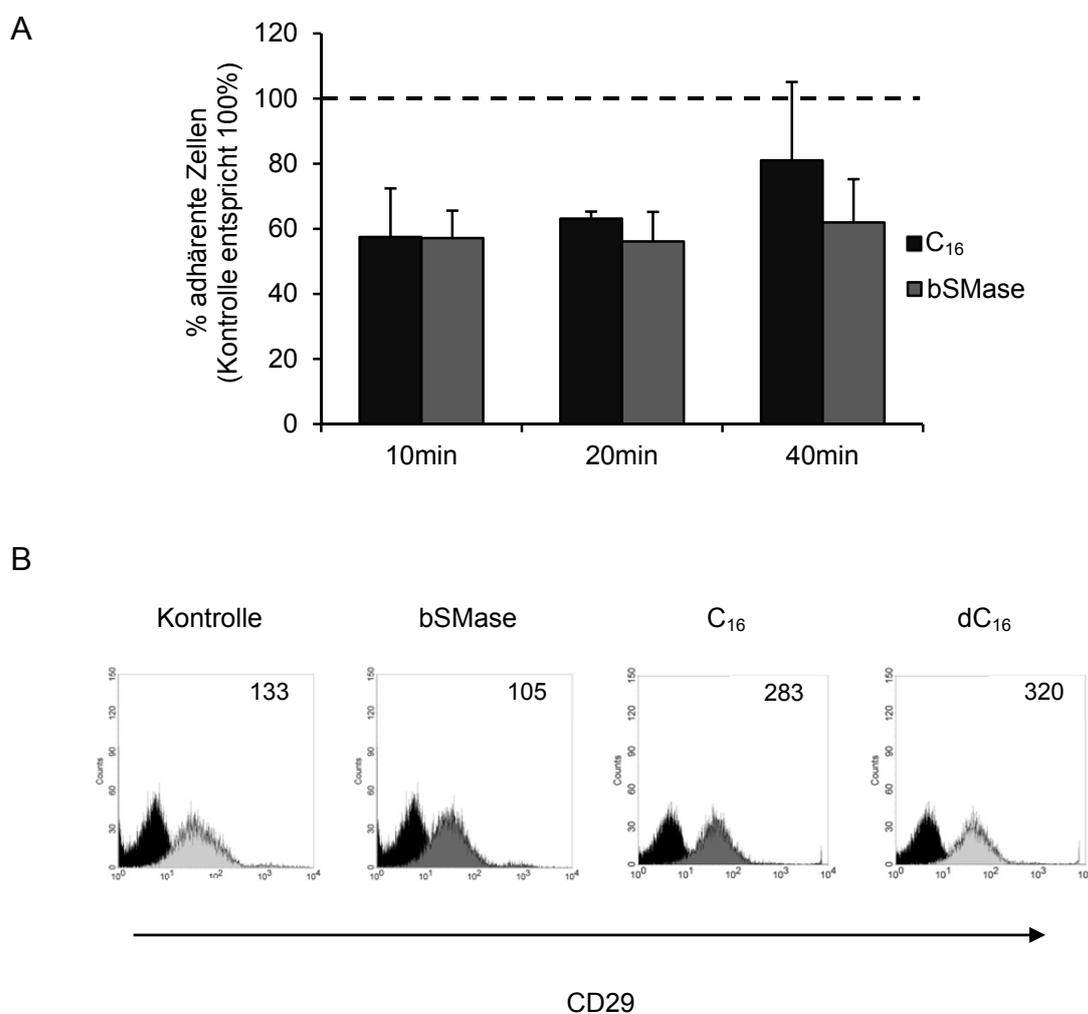


Abbildung 4.4: Verminderte Adhärenz von T-Zellen an FN nach Akkumulation von Ceramiden.

(A) T-Zellen wurden mit Calcein gefärbt, anschließend mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ behandelt und die Integrine durch MnCl₂ aktiviert. Im Folgenden wurden die Zellen in die Näpfe einer FN-beschichteten 96-Loch-Platte gegeben und die Adhärenz an FN nach unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Nicht-adhärente Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und der Prozentsatz adhärenter Zellen mittels Fluoreszenzmessung bei 520 nm ermittelt. Dargestellt ist das Ergebnis aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Adhärenz unbehandelter bzw. dC₁₆-behandelter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (gestrichelte Linie). (B) T-Zellen wurden im Anschluss an die Inkubation mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ einmal mit FACS-Puffer gewaschen, fixiert und die β 1-Integrine mit einem α -CD29-Antikörper angefärbt. Die Oberflächenexpression der β 1-Integrine wurde nachfolgend im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind repräsentative MFI-Werte eines aus drei unabhängigen Experimenten (schwarz gefülltes Histogramm: Isotyp, grau gefülltes Histogramm: CD29).

Wie in Abbildung 4.4 (A) zu sehen ist, wurde nach bSMase-Behandlung für alle Zeitpunkte eine um 40 % reduzierte Adhärenz der Zellen an FN detektiert. Die Inkubation der Zellen mit C₁₆ führte ebenfalls zu einer verminderten Bindung der T-Zellen an FN. Dieser Effekt ist jedoch nur nach 10 min und 20 min deutlich ausgeprägt. Nach 40 min wurde nur noch eine um etwa 20 % verringerte Adhärenz an FN ermittelt. Neben der Bindung an FN ist zudem die Adhärenz der Zellen an ICAM-1/Fc nach Generierung von Ceramiden durch bSMase um etwa 50 % reduziert (Abbildung 4.5 (A)). Um zu untersuchen, ob die verminderte Adhärenz ceramidmodifizierter Zellen auf eine veränderte Oberflächenexpression von β 1-Integrinen bzw. LFA-1 zurückzuführen ist, wurde die Expression von β 1-Integrinen und LFA-1 im Durchflusszytometer analysiert. Die in Abbildung 4.4 (B) und 4.5 (B) dargestellten MFI-Werte zeigen, dass die Expression von β 1-Integrinen bzw. LFA-1 nach Inkubation mit bSMase oder C₁₆ gegenüber den Kontrollzellen nicht verändert ist. Somit beeinflusst die Akkumulation von Ceramiden neben der T-Zell-Polarisierung auch die β 1- und β 2-Integrin-abhängige Adhärenz von T-Zellen an FN bzw. ICAM-1, die Oberflächenexpression von β 1-Integrinen bzw. LFA-1 ist infolge der Akkumulation von Ceramiden jedoch nicht verändert.

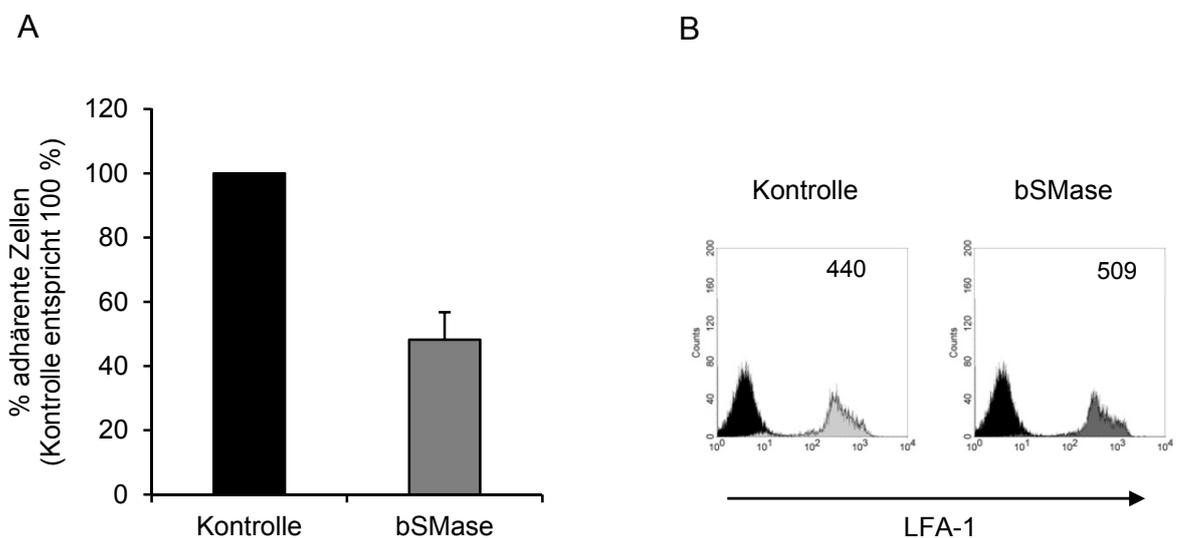


Abbildung 4.5: Adhärenz von T-Zellen an ICAM-1/Fc. (A) T-Zellen wurden mit Calcein gefärbt, anschließend mit bSMase behandelt und die Integrine durch CD3/CD28-Stimulation aktiviert. Die Adhärenz an ICAM-1/Fc wurde nach 30 min bei 37°C mittels Fluoreszenzmessung bei 520 nm bestimmt. Dargestellt ist das Resultat aus drei unabhängigen Experimenten. Die Adhärenz un behandelter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt. (B) T-Zellen wurden mit bSMase behandelt, fixiert und die Oberflächenexpression von LFA-1 im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind repräsentative MFI-Werte eines aus drei unabhängigen Experimenten (schwarz gefülltes Histogramm: Isotyp, grau gefülltes Histogramm: LFA-1).

4.4 Analyse der T-Zell-Chemotaxis

4.4.1 Untersuchungen zur T-Zell-Chemotaxis nach Akkumulation von Ceramiden

Die Ausbildung eines polarisierten Phänotyps ist eine entscheidende Voraussetzung für die gerichtete Bewegung von T-Zellen. Da die Akkumulation von Ceramiden mit der chemokininduzierten Polarisierung von T-Zellen interferiert, wurde nachfolgend untersucht, ob Ceramide zudem die Bewegung von T-Zellen in Richtung eines Chemokingradienten beeinflussen. Um dies zu analysieren wurde ein Polycarbonatfilter (Porengröße: 5 µm) verwendet, der die Näpfe einer Zellkulturplatte in ein oberes und unteres Kompartiment trennt. In das untere Kompartiment wurde das Migrationsmedium (0,5 % BSA/RPMI mit 1 µg/ml SDF-1 α) vorgelegt, die Zellen wurden anschließend in das obere Kompartiment gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei 37°C wurde dann die Zellzahl im unteren Kompartiment mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt.

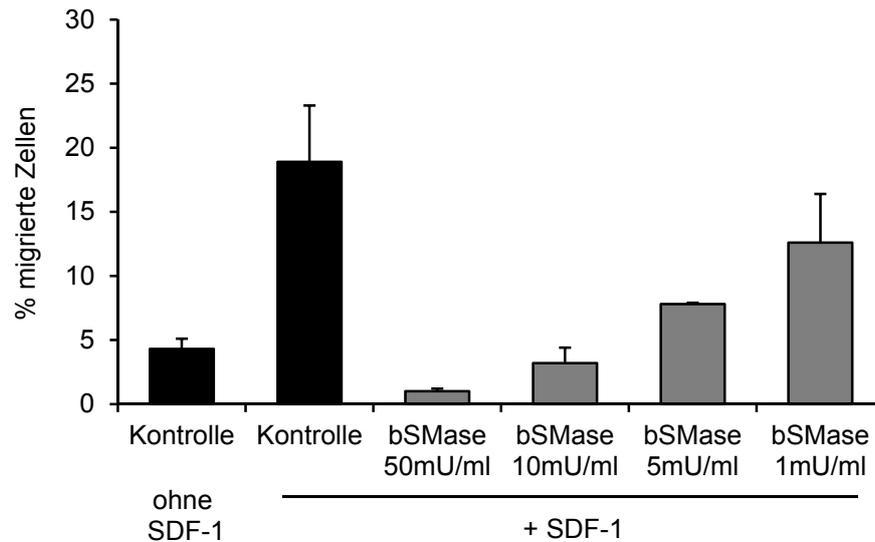


Abbildung 4.6: T-Zell-Chemotaxis nach Induktion von Ceramiden in Antwort auf SDF-1 α : T-Zellen wurden mit unterschiedlichen bSMase-Konzentrationen behandelt und in das obere Kompartiment eines Filtersystems eingesetzt. In das untere Kompartiment wurde das Migrationsmedium (0,5 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α) vorgelegt und nach 3 h der Prozentsatz migrierter Zellen mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle wurden Zellen in ein Filtersystem ohne Chemokin eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis eines von drei unabhängigen Experimenten.

Wie in der Abbildung 4.6 dargestellt ist, führt die Generierung von Ceramiden durch bSMase zu einer verminderten Migration der T-Zellen in Richtung von SDF-1 α . Dieser Effekt korreliert dabei mit der verwendeten bSMase-Dosis, wobei eine bSMase-Konzentration von 12,5 mU/ml die T-Zell-Chemotaxis im Durchschnitt um 40 % reduzierte (Abbildung 4.7). Die Inkubation der Zellen mit C₁₆ führte gleichermaßen zu einer Reduktion der T-Zell-Chemotaxis um etwa 50 %. In Übereinstimmung mit dem Unvermögen der Zellen nach Akkumulation von Ceramiden einen polarisierten Phänotyp auszubilden beeinflussen Ceramide zudem die gerichtete Bewegung der Zellen in Antwort auf SDF-1 α . Somit wird durch die Akkumulation von Ceramiden eine entscheidende Fähigkeit von T-Zellen gestört, da die chemotaktische Bewegung der Zellen für deren Zirkulation in sekundäre lymphatische Organe sowie die Auswanderung in periphere Gewebe essentiell ist.

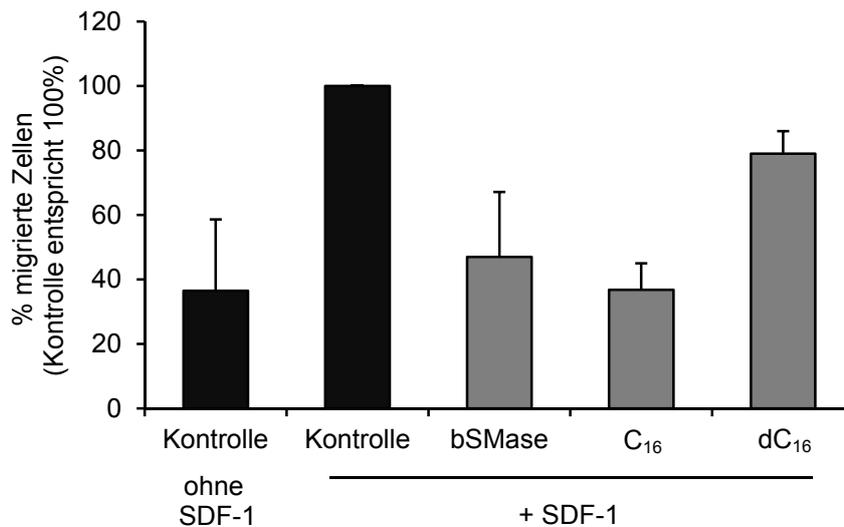


Abbildung 4.7: T-Zell-Chemotaxis in Antwort auf SDF-1 α . T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ behandelt und anschließend in das obere Kompartiment eines Filtersystems eingesetzt. In das untere Kompartiment wurde das Migrationsmedium (0,5 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α) vorgelegt und die Anzahl migrierter Zellen nach 3 h mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Negativkontrolle wurden Zellen in ein Filtersystem ohne Chemokin eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten. Der Prozentsatz migrierter Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt.

4.4.2 Analyse der T-Zell-Chemotaxis nach MV-Kontakt

Wie bereits zuvor beschrieben führt der Kontakt von T-Zellen mit MV zu einer Aktivierung von SMasen und der anschließenden Akkumulation von Ceramiden auf der Zelloberfläche. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob die MV-induzierte Generierung von Ceramiden ebenfalls die chemotaktische Bewegung der Zellen beeinflusst. Um dies zu analysieren, wurden die T-Zellen mit einer Virus- (MOI 1) bzw. Mockpräparation für 2 h bei 4°C in Anwesenheit eines fusionsinhibitorischen Peptids (FIP, Endkonzentration: 200 μ M) inkubiert und anschließend in das obere Kompartiment des Filtersystems eingesetzt. In das untere Kompartiment wurde wiederum das Migrationsmedium (0,5 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α) vorgelegt und die Anzahl migrierter Zellen nach 3 h bei 37°C mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde zudem mit dem ASM-Inhibitor Amitriptyline (10 μ M) für 2 h bei 37°C vorbehandelt, um den Einfluss der

ASM-Aktivierung nach MV-Kontakt auf die T-Zell-Chemotaxis zu untersuchen. Wie in der Abbildung 4.8 zu sehen ist, war der prozentuale Anteil Virus- und Mock-behandelter Zellen, die in Richtung des Chemokingradienten gewandert sind, in etwa gleich. Im Gegensatz zu dem in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Ergebnis scheint die Ceramid-Induktion durch MV-Kontakt die T-Zell-Chemotaxis nicht zu beeinflussen. Gleichermaßen führte auch die Inhibierung der ASM-Aktivität zu keiner veränderten T-Zell-Migration in Antwort auf SDF-1 α , da auch nach Inkubation der Zellen mit Amitriptyline annähernd identische Zellzahlen im unteren Kompartiment detektiert wurden.

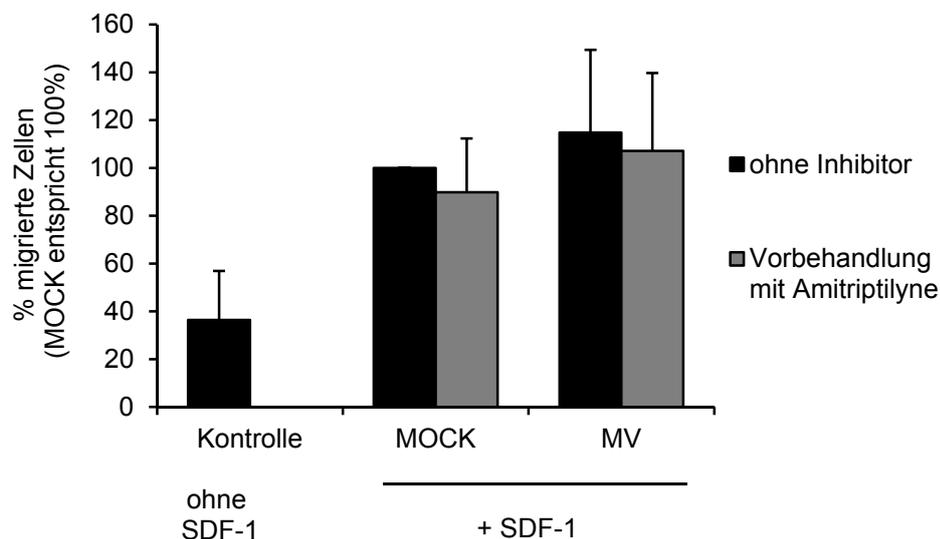


Abbildung 4.8: T-Zell-Chemotaxis nach MV-Kontakt in Antwort auf SDF-1 α . T-Zellen wurden mit einer Virus- bzw. Mockpräparation für 2 h bei 4°C in Anwesenheit von FIP (200 μ M) behandelt und anschließend in das obere Kompartiment eines Filtersystems eingesetzt. In das untere Kompartiment wurde das Migrationsmedium (0,5 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α) vorgelegt und nach 3 h bei 37°C die Anzahl migrierter Zellen mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Ein Teil der Zellen wurde zudem mit Amitriptyline (10 μ M) für 2 h bei 37°C vorbehandelt und anschließend mit der Virus- bzw. Mockpräparation inkubiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.5 Untersuchungen zur DC-Chemotaxis nach Inkubation mit bSMase

Für die Funktion von DCs ist die Fähigkeit auf einen Chemokingradienten zu reagieren von entscheidender Bedeutung. Man unterscheidet zwei Aktivierungsstadien von DCs: unreife DCs in der Peripherie nehmen Fremdartigene auf, woraufhin ein Reifungsprozess einsetzt, der zu einem veränderten Expressionsprofil verschiedener Moleküle auf der Oberfläche der Zellen führt. Unter anderem wird dabei die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 hochreguliert, wodurch die Zellen in Antwort auf CCL-21 in die lokalen Lymphknoten wandern.

Der Kontakt von DCs mit MV führt, wie auch bei T-Zellen beobachtet, zu einer Akkumulation von Ceramiden auf der Zell-Oberfläche, wobei die Induktion der Ceramide durch das *C-type lectin* DC-SIGN vermittelt wird (Avota et al, 2011).

Um zu untersuchen, ob die exogene Generierung von Ceramiden auf DCs auch zu einer veränderten Chemotaxis in Richtung CCL-21 führt, wurden Chemotaxisassays analog zu dem für T-Zellen beschriebenen Assay durchgeführt. Dabei wurden die DCs zunächst für 24 h mit LPS (100 ng/ml) ausgereift und im Folgenden für 30 min mit 25 mU/ml bSMase inkubiert. Nach 3 h bei 37°C wurde die Migration in Richtung CCL-21 mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Als Migrationsmedium diente hierbei 1 % BSA/ 1% HS/ RPMI mit 5 µg/ml CCL-21.

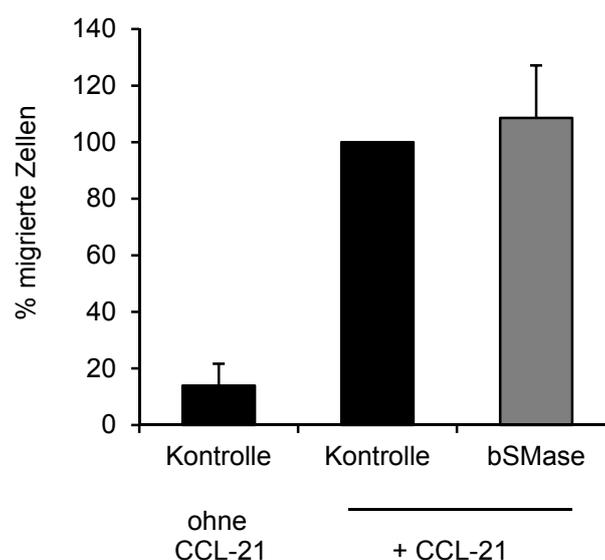


Abbildung 4.9: DC-Chemotaxis in Richtung CCL-21. 2×10^5 reife DCs wurden für 30 min mit 25 mU/ml bSMase behandelt und anschließend in das obere Kompartiment eines Filtersystems gegeben. In das untere Kompartiment wurde das Migrationsmedium (1 % BSA/1 % HS/RPMI mit 5 µg/ml CCL-21) vorgelegt und die Anzahl migrierter Zellen nach 3 h bei 37°C mittels quantitativer Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, führt die Induktion von Ceramiden auf DCs im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.4.1 beschriebenen Ergebnissen zu keiner veränderten Chemotaxis in Richtung von CCL-21. Der prozentuale Anteil von Zellen, der im unteren Kompartiment detektiert wurde, war nach Induktion von Ceramiden durch bSMase im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert.

4.6 Untersuchungen zur T-Zell-Migration in einem zweidimensionalen System (*under agarose assay*)

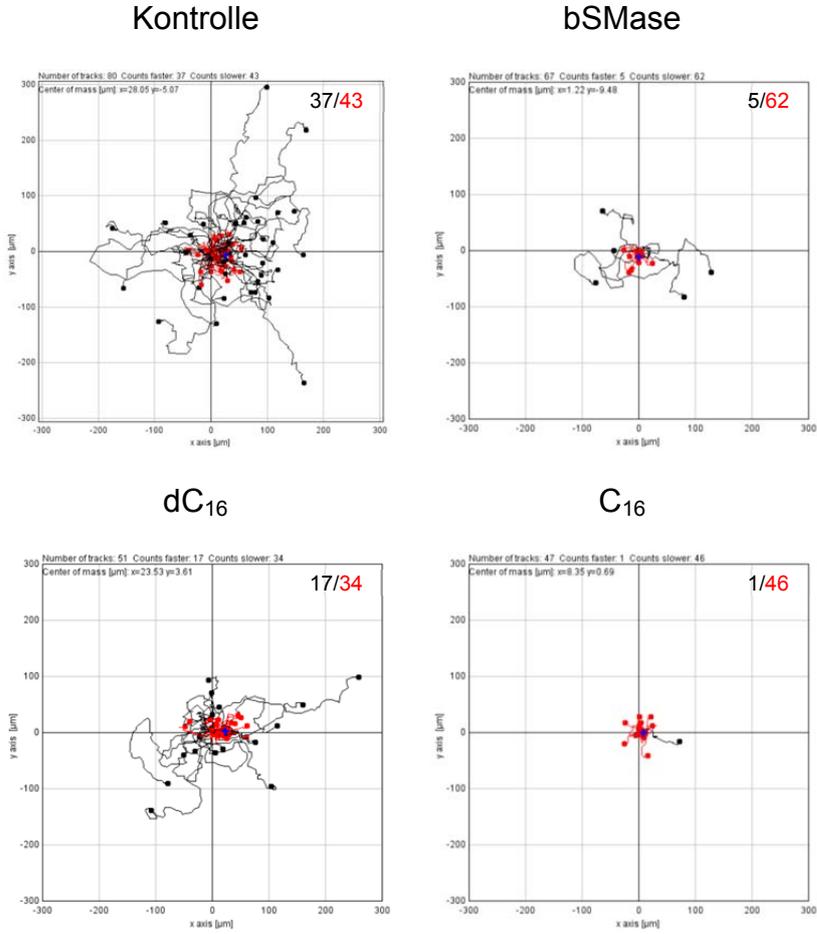
Um die T-Zell-Migration in einem 2D-System zu untersuchen, wurde ein sogenannter *under agarose assay* verwendet. Die Zellen wurden dabei nach Stimulation mit SDF-1 α unter eine Agaroseschicht injiziert, woraufhin die T-Zell-Migration videomikroskopisch verfolgt wurde. Dieser Assay gibt Aufschluss über die von den Zellen zurückgelegten Strecken, wodurch die Geschwindigkeit der Zellen ermittelt werden kann. Wie zuvor beschrieben interferieren Ceramide der Zytoskelett-abhängigen Polarisierung der Zellen sowie der gerichteten Bewegung in Antwort auf einen Chemokingradienten. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die exogene Akkumulation von Ceramiden sowie die Induktion von Ceramiden durch MV-Kontakt zudem die T-Zell-Motilität in 2D beeinflusst.

4.6.1 Die Akkumulation von Ceramiden beeinflusst die T-Zell-Migration

Um den Einfluss von Ceramiden auf die Motilität der Zellen in 2D zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ behandelt und anschließend in einer Zellkonzentration von 1×10^7 /ml in 0,1 % BSA/RPMI mit 1 µg/ml SDF-1α resuspendiert. 1 µl der Zellsuspension wurde unter die Agaroseschicht injiziert, woraufhin die videomikroskopische Aufnahme der T-Zell-Migration erfolgte. Über einen Zeitraum von 1 h wurde alle 10 sec ein Bild aufgenommen, wobei die Umgebungstemperatur konstant auf 37°C gehalten wurde. Die von den Zellen zurückgelegten Strecken und die daraus resultierende Geschwindigkeit wurden anschließend durch manuelles Zelltracking mittels ImageJ berechnet.

In Abbildung 4.10 (A) sind jeweils repräsentative Beispiele für die von Einzelzellen zurückgelegten Strecken dargestellt. Schwarze Strecken repräsentieren Zellen, die sich mit einer mittleren Geschwindigkeit $> 2 \mu\text{m}/\text{min}$ fortbewegt haben. Rote Strecken entsprechen Zellen, deren mittlere Geschwindigkeit $< 2 \mu\text{m}/\text{min}$ war. Abbildung 4.10 (B) zeigt die quantitative Analyse aller verfolgten Zellen. Wie anhand der Abbildungen zu sehen ist, legen T-Zellen nach Akkumulation von Ceramiden kürzere Strecken zurück, was folglich auch in einer reduzierten Geschwindigkeit der Zellen resultiert. Die Kontrollzellen bewegten sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $2,2 \mu\text{m}/\text{min}$ (unbehandelt) bzw. $2,9 \mu\text{m}/\text{min}$ (dC₁₆) fort, wohingegen die Induktion von Ceramiden durch bSMase bzw. die Inkubation der Zellen mit C₁₆ die durchschnittliche Geschwindigkeit auf $0,9 \mu\text{m}/\text{min}$ bzw. $0,7 \mu\text{m}/\text{min}$ reduzierte. In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Ceramid-Effekten ist somit auch die Motilität der Zellen in einem 2D-System beeinträchtigt.

A



B

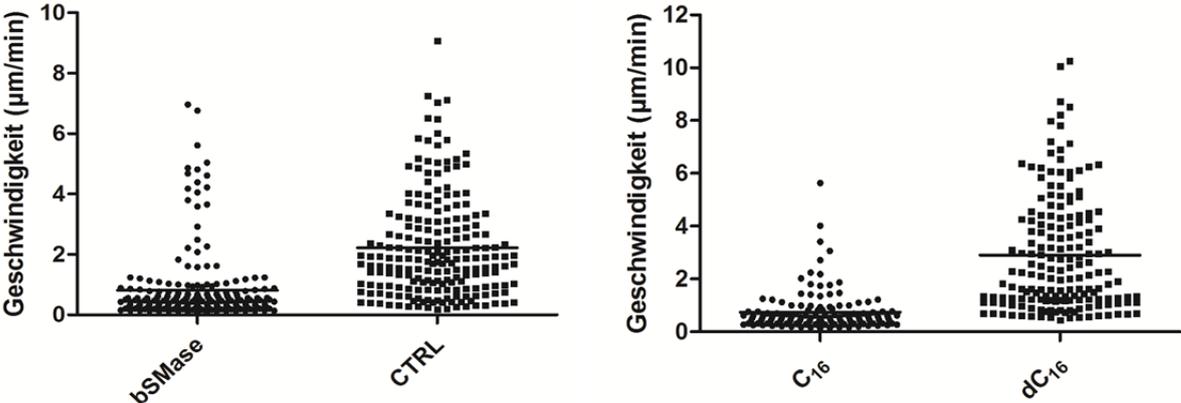


Abbildung 4.10: Analyse der T-Zell-Migration in 2D. (A) T-Zellen wurden zunächst mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert und anschließend in einer Zellkonzentration von 1×10^7 /ml in 0,1 % BSA/RPMI mit 1 μ g/ml SDF-1 α resuspendiert. 1 μ l der Zellsuspension wurde unter die Agaroseschicht injiziert und die T-Zell-Migration daraufhin über einen Zeitraum von 1 h videomikroskopisch verfolgt. Die abgebildeten Plots zeigen die von den Zellen zurückgelegten Strecken. Schwarze Strecken repräsentieren Zellen, deren mittlere Geschwindigkeit $> 2 \mu$ m/min lag. Rote Strecken stellen Zellen dar, die sich mit einer mittleren Geschwindigkeit $< 2 \mu$ m/min fortbewegt haben. Dargestellt sind repräsentative Plots aus einem von drei unabhängigen Experimenten. (B) Quantitative Analyse der T-Zell-Migration. Dargestellt ist die mittlere Geschwindigkeit aller verfolgten Zellen. Jeder Punkt entspricht dabei der durchschnittlichen Geschwindigkeit einer einzelnen Zelle. Insgesamt wurden pro Ansatz zwischen 130 und 215 Zellen analysiert.

4.6.2 Die reduzierte T-Zell-Motilität nach MV-Kontakt wird durch die Aktivierung von ASM vermittelt

Analog zu den in 4.6.1 beschriebenen Analysen wurde untersucht, ob die Akkumulation von Ceramiden nach MV-Kontakt ebenfalls die Motilität der Zellen beeinflusst. Die T-Zellen wurden dabei mit einer Virus- (MOI 1) bzw. Mockpräparation für 2 h bei 4°C in Anwesenheit eines fusionsinhibitorischen Peptids (FIP, Endkonzentration: 200 μ M) inkubiert und die Migration anschließend, wie in 4.6.1 beschrieben, analysiert. Ein Teil der Zellen wurde zudem mit dem ASM-Inhibitor Amitriptyline (10 μ M) für 2 h bei 37°C vorbehandelt, um den Einfluss der durch ASM generierten Ceramide nach MV-Kontakt zu analysieren.

Wie in der Abbildung 4.11 (A) dargestellt ist, legen T-Zellen nach MV-Kontakt wesentlich kürzere Strecken zurück als Mock-behandelte Zellen. Die mittlere Geschwindigkeit Virus-behandelter Zellen betrug 1 μ m/min und ist im Gegensatz zu Mock-behandelten Zellen um 60 % reduziert. Die mittlere Geschwindigkeit Mock-behandelter Zellen lag bei 2,4 μ m/min (Abbildung 4.11 (B)). Zellen, die vor MV-Kontakt mit Amitriptyline behandelt wurden, bewegten sich mit einer mittleren Geschwindigkeit von 1,9 μ m/min fort. Somit konnte die verminderte Beweglichkeit MV-kontaktierter Zellen durch die Inhibierung der ASM-Aktivität wieder aufgehoben werden. Im Gegensatz zu den in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Ergebnissen zur T-Zell-Chemotaxis nach MV-Kontakt, ist die Beweglichkeit der Zellen in 2D nach Virusbindung reduziert. Die verminderte Beweglichkeit der Zellen in 2D wird durch die Aktivierung von ASM und nachfolgende Ceramid-Generierung vermittelt, da durch die Inhibierung der ASM-Aktivität die MV-induzierten Effekte verhindert werden konnten.

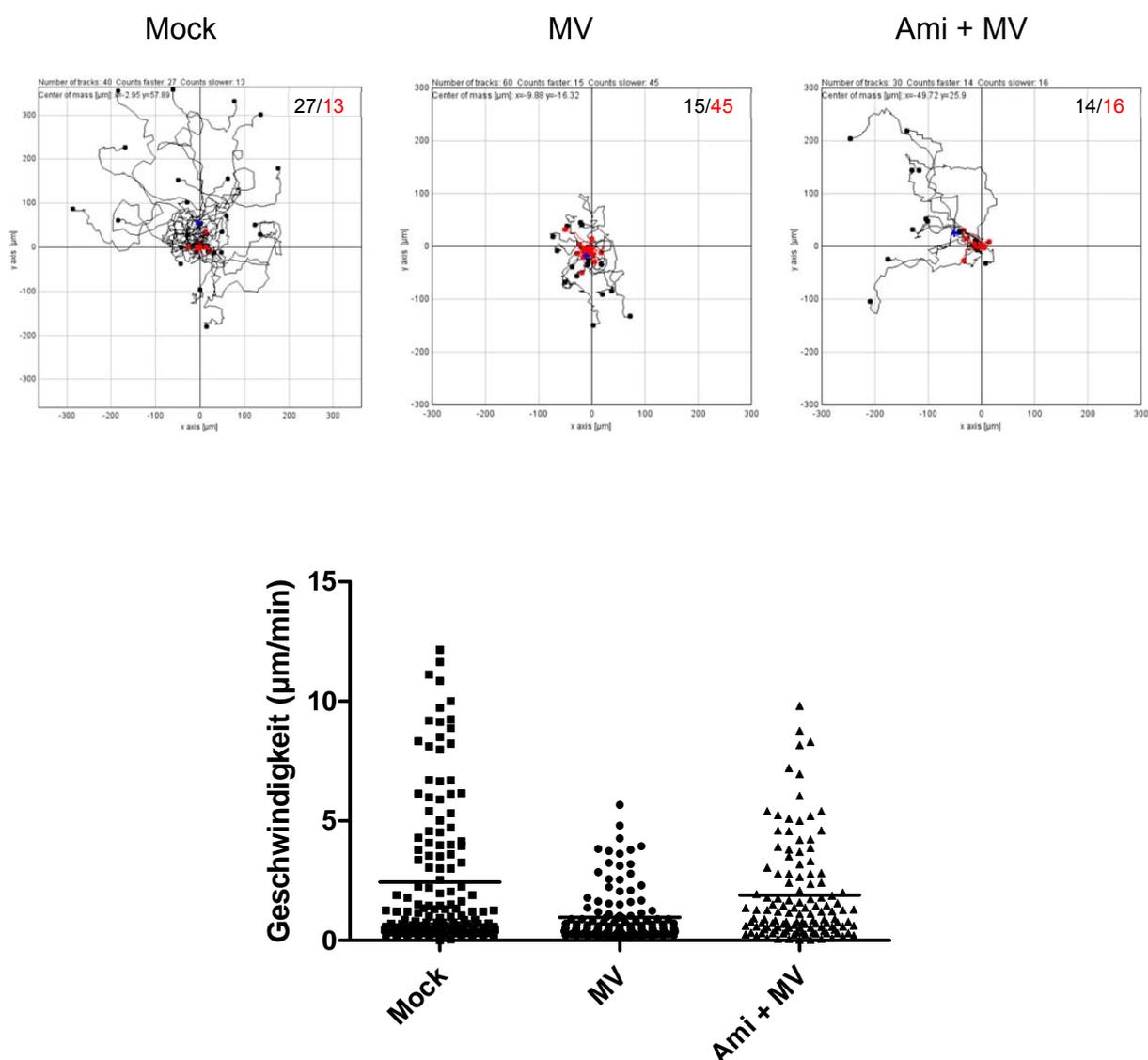


Abbildung 4.11: Analyse der T-Zell-Migration in 2D nach MV-Kontakt. (A) T-Zellen wurden mit einer Virus- oder Mockpräparation für 2 h bei 4°C in der Anwesenheit von FIP (200 μM) inkubiert und anschließend die T-Zell-Migration wie in Abschnitt 4.6.1 beschrieben analysiert. Die abgebildeten Plots zeigen die von den Zellen zurückgelegten Strecken. Schwarze Strecken repräsentieren Zellen, deren mittlere Geschwindigkeit > 1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ lag. Rote Strecken stellen Zellen dar, die sich mit einer mittleren Geschwindigkeit < 1,5 $\mu\text{m}/\text{min}$ fortbewegt haben. Dargestellt sind repräsentative Plots aus einem von 3 unabhängigen Experimenten. (B) Quantitative Analyse der T-Zell-Migration. Dargestellt ist die mittlere Geschwindigkeit aller verfolgten Zellen. Jeder Punkt entspricht dabei der durchschnittlichen Geschwindigkeit einer einzelnen Zelle. Insgesamt wurden pro Ansatz mindestens 120 Zellen analysiert.

4.6.3 Untersuchungen zur Expression und Verteilung des Chemokinrezeptors CXCR4

Chemokine binden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Der Rezeptor für SDF-1 α (CXCL12) ist CXCR4. Durch die Bindung von SDF-1 α an den Rezeptor werden in der Zelle Signale ausgelöst, welche für Polarisierung, Integrinaktivierung und Migration der Zelle eine wichtige Rolle spielen. Um auszuschließen, dass die zuvor beschriebenen Effekte auf eine veränderte Expression des Chemokinrezeptors nach Akkumulation von Ceramiden bzw. Virus-Exposition zurückzuführen sind, wurde die Expression des Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen überprüft. Die Zellen wurden dafür mit bSMase, C₁₆, oder dC₁₆ bzw. einer Virus- (MOI 1) oder Mockpräparation inkubiert. Anschließend wurde mittels einer Oberflächenfärbung die CXCR4-Expression im Durchflusszytometer analysiert. Die in Abbildung 4.12 dargestellten MFI-Werte zeigen, dass die Expression des CXCR4-Rezeptors nach Inkubation mit bSMase, C₁₆ bzw. Virus gegenüber den Kontrollzellen nicht verändert ist. Somit scheint eine Bindung von SDF-1 α an den Rezeptor prinzipiell möglich, für eine gerichtete Bewegung ist jedoch die Rekrutierung des Rezeptors an das *leading edge* der Zellen von Bedeutung. Im Folgenden wurde daher die zelluläre Verteilung des CXCR4-Rezeptors in ceramidmodifizierten Zellen untersucht. Dafür wurden die Zellen mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ bzw. mit einer Virus- oder Mockpräparation inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 % BSA/RPMI mit 100 ng/ml SDF-1 α resuspendiert und auf FN-beschichtete Objektträger gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert und CXCR4 für die anschließende mikroskopische Analyse angefärbt.

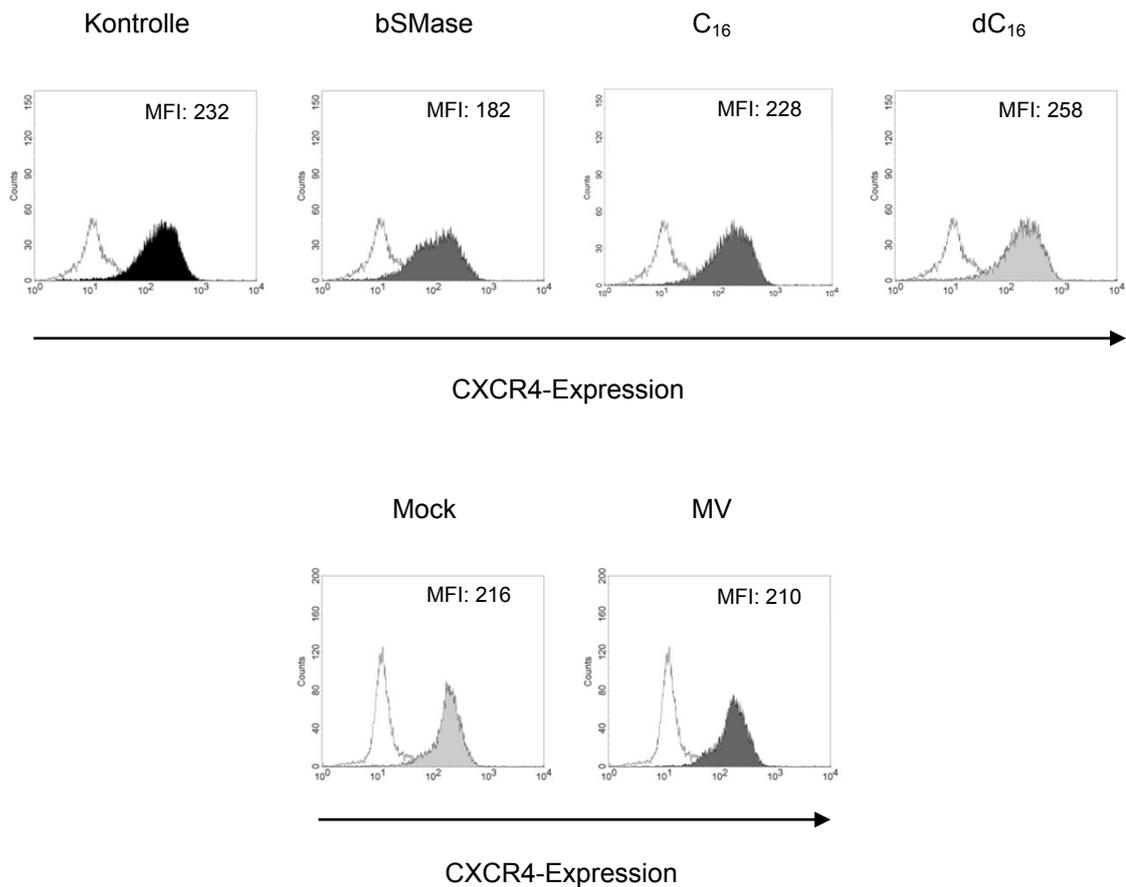


Abbildung 4.12: Expression des CXCR4-Rezeptors auf der Oberfläche von T-Zellen. T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ bzw. einer Virus (MOI 1)-oder Mockpräparation inkubiert. Anschließend wurde eine Oberflächenfärbung des Rezeptors durchgeführt und die Menge an CXCR4 im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind repräsentative MFI-Werte eines aus drei unabhängigen Experimenten (offenes Histogramm: Isotyp; gefülltes Histogramm: CXCR4).

Wie anhand der Bilder in Abbildung 4.13 zu sehen ist, zeigten die Kontrollzellen einen polarisierten Phänotyp mit Akkumulationen von CXCR4 am *leading edge*. In Analogie zu den in 4.2 beschriebenen Ergebnissen wiesen bSMase-, C₁₆- bzw. Virus-behandelte Zellen erneut keinen polarisierten Phänotyp auf. Neben den Effekten auf die morphologische Polarisierung konnte auch keine Relokalisation von CXCR4 in bestimmte Bereiche der Zellen beobachtet werden, die Zellen wiesen eine eher gleichförmige Verteilung des Rezeptors auf. Zellen, in denen die ASM-Aktivität vor Virus-Kontakt pharmakologisch gehemmt wurde, waren wiederum in der Lage morphologisch zu polarisieren und CXCR4 an das *leading edge* zu rekrutieren. Das Unvermögen Virus-kontakter Zellen einen polarisierten Phänotyp auszubilden sowie den CXCR4-Rezeptor zu relokalisieren ist somit direkt auf die durch das Virus bedingte ASM-Aktivierung zurückzuführen.

Die Akkumulation von Ceramiden auf T-Zellen ändert somit zwar nicht die Expression des CXCR4-Rezeptors auf der Zelloberfläche, die Zellen sind jedoch nicht in der Lage den Rezeptor in bestimmte Bereiche der Zelle zu relokalisieren.

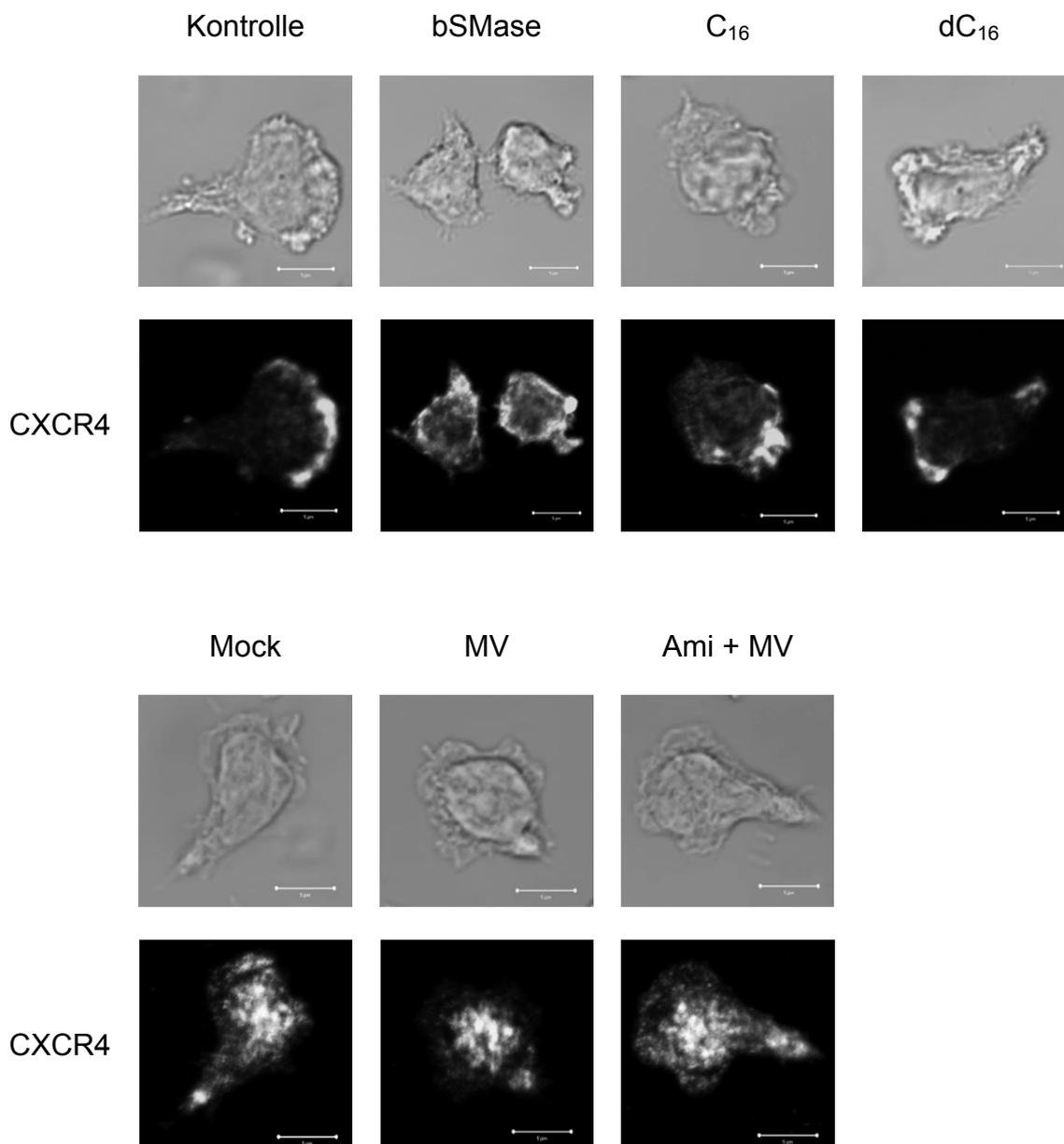
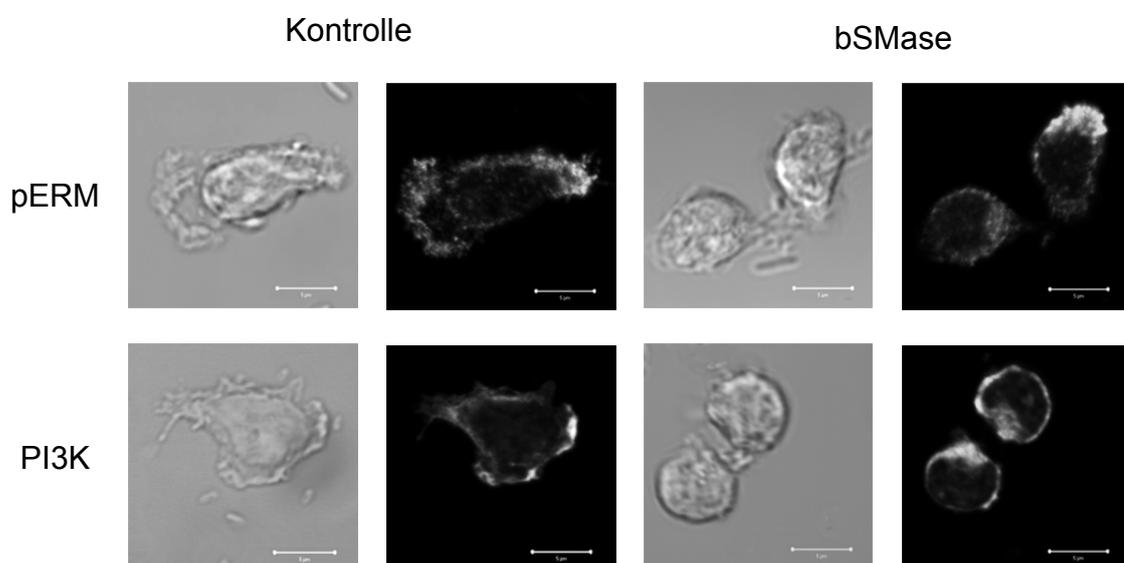


Abbildung 4.13: Zelluläre Verteilung von CXCR4 nach Induktion von Ceramiden. T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ bzw. mit einer Virus (MOI 1)- oder Mockpräparation inkubiert, anschließend in 0,5 % BSA/RPMI mit 0,1 µg/ml SDF-1 α resuspendiert und auf FN-beschichtete Objektträger gegeben. Ein Teil der Zellen wurde vor Viruskontakt für 2 h bei 37°C mit dem ASM-Inhibitor Amitriptyline (10 µM) inkubiert. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und CXCR4 angefärbt (Größenmarker: 5 µm).

4.7 Die Akkumulation von Ceramiden führt zur einer abweichenden Verteilung intrazellulärer Proteine in T-Zellen

Neben der Verteilung von Oberflächenproteinen, wurde zudem die chemokininduzierte Relokalisation intrazellulärer Proteine nach Akkumulation von Ceramiden analysiert. Dabei wurde die Verteilung von Signalmolekülen untersucht, die für die Aktivierung und Polarisierung der Zellen von Bedeutung sind. Die Zellen wurden dafür zunächst analog zu den in 4.6.3 beschriebenen Experimenten mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert und anschließend auf FN-beschichtete Objektträger gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert und pERM, pAkt, PI3K und SHIP für die mikroskopische Analyse angefärbt.

In Kontrollzellen akkumulieren phosphorylierte ERM-Proteine hauptsächlich im Uropod der Zelle, wohingegen pAkt, PI3K und SHIP vermehrt in den Lamellipodien am *leading edge* lokalisiert sind. Kleinere Mengen dieser Moleküle können jedoch auch im Uropod der Zellen detektiert werden. In Analogie zu den in 4.6.3 beschriebenen Ergebnissen zeigen T-Zellen infolge der Akkumulation von Ceramiden keinen polarisierten Phänotyp und sind nicht in der Lage die Proteine in distinkte Bereiche der Zelle zu relokalisieren (Abbildung 4.14). Es ist eine eher uniforme Verteilung der Proteine zu beobachten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Akkumulation von Ceramiden sowohl die Verteilung von Oberflächenproteinen als auch die Lokalisation intrazellulärer Proteine beeinflusst.



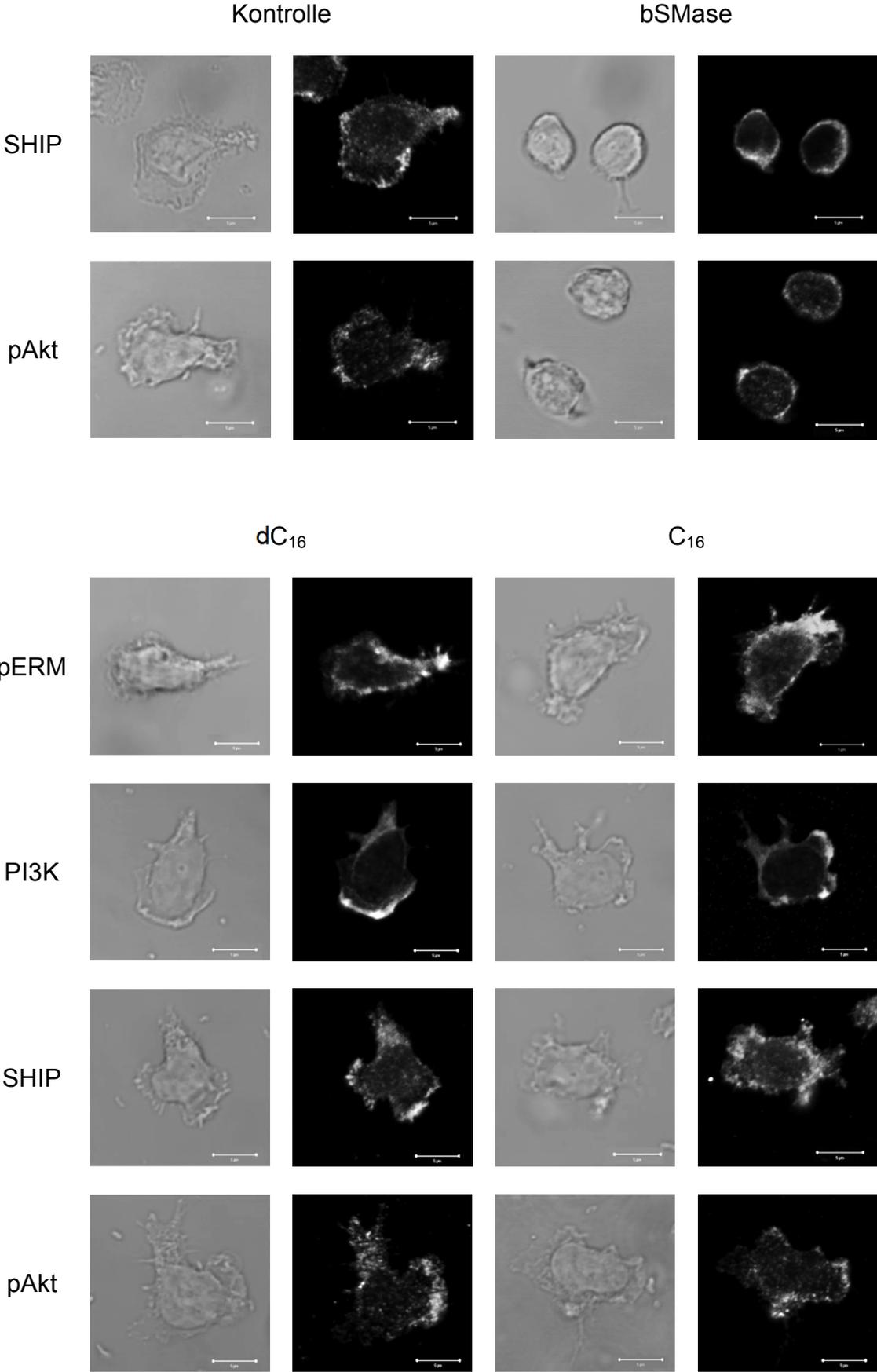


Abbildung 4.14: Lokalisation intrazellulärer Signalmolekülen nach Akkumulation von Ceramiden. T-Zellen wurden mit bSMase (A), C₁₆ oder dC₁₆ (B) behandelt und anschließend in 0,5 % BSA/RPMI mit 100 ng/ml SDF-1 α auf FN-beschichtete Objektträger gegeben. Nach 30 min wurden die Zellen fixiert und mit pERM-, pAkt-, PI3K- und SHIP-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Verteilung der Proteine wurde anschließend mikroskopisch analysiert (Größenmarker: 5 μ m).

4.8 Ceramide beeinflussen die Phosphorylierung von Akt und Membranlinkerproteinen

Da Ceramide die Lokalisation intrazellulärer Signalmoleküle beeinflussen, wurde im Folgenden untersucht, ob die Akkumulation von Ceramiden zudem die Aktivierung der Proteine beeinträchtigt. Dafür wurden die T-Zellen mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert und anschließend die Phosphorylierung von ERM-Proteinen und Akt im Western Blot analysiert. ERM-Proteine (*Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*) verbinden Transmembranproteine mit dem kortikalen Aktinzytoskelett der Zelle und sind daher für die Morphologie, die Ausbildung von Filopodien sowie die Migration der Zelle von Bedeutung. Die Aktivierung von ERM-Proteinen erfolgt durch die Phosphorylierung konservierter Threonin-Reste innerhalb der C-terminalen Domäne (*Ezrin* T567, *Radixin* T564, *Moesin* T558). In MCF-7-Zellen führte Induktion von Ceramiden zu einer verminderten *Ezrin*-Phosphorylierung, was in einem Verlust Mikro villi-ähnlicher Strukturen resultierte (Zeidan et al, 2008). Wie die Abbildung 4.15 zeigt, konnte auch in T-Zellen eine um 80 % (bSMase) bzw. 90 % (C₁₆) reduzierte *Ezrin*-Phosphorylierung nach Akkumulation von Ceramiden beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde ein geringerer Einfluss von Ceramiden auf die Phosphorylierung von *Moesin* beobachtet, die infolge der Inkubation mit bSMase um etwa 50 % und nach C₁₆-Exposition um etwa 25 % reduziert war.

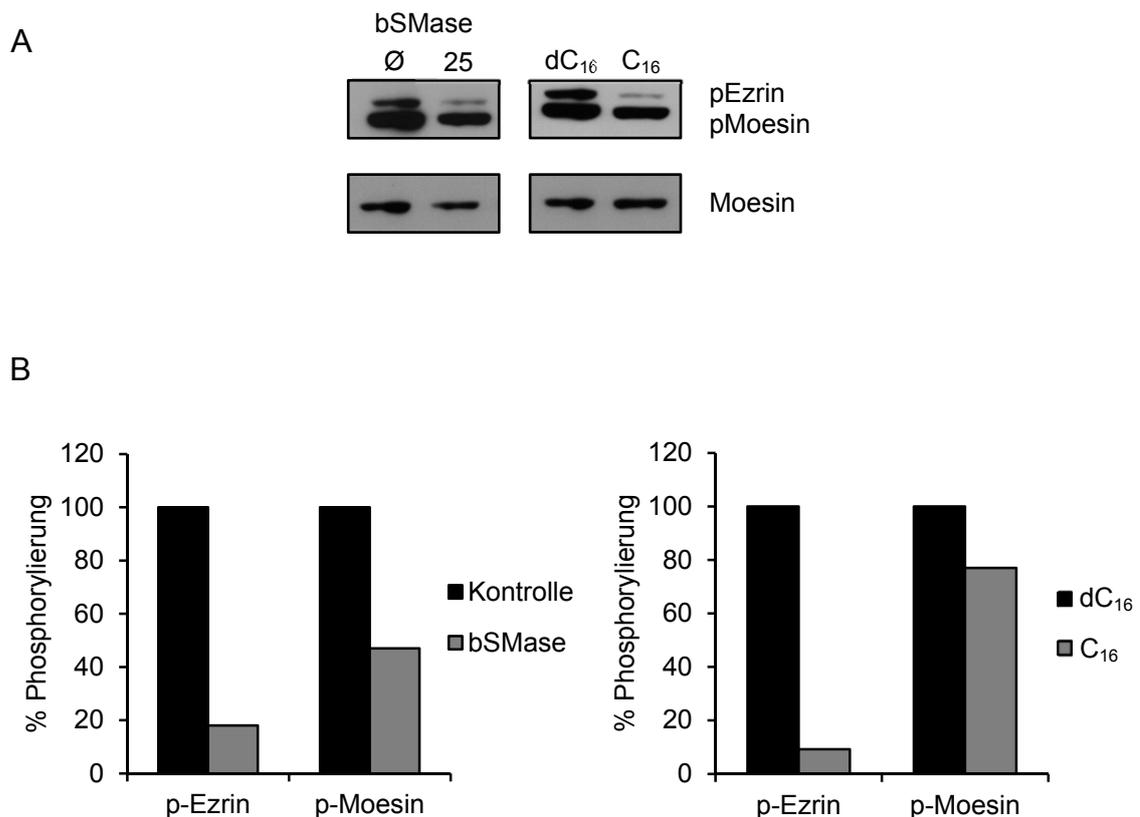
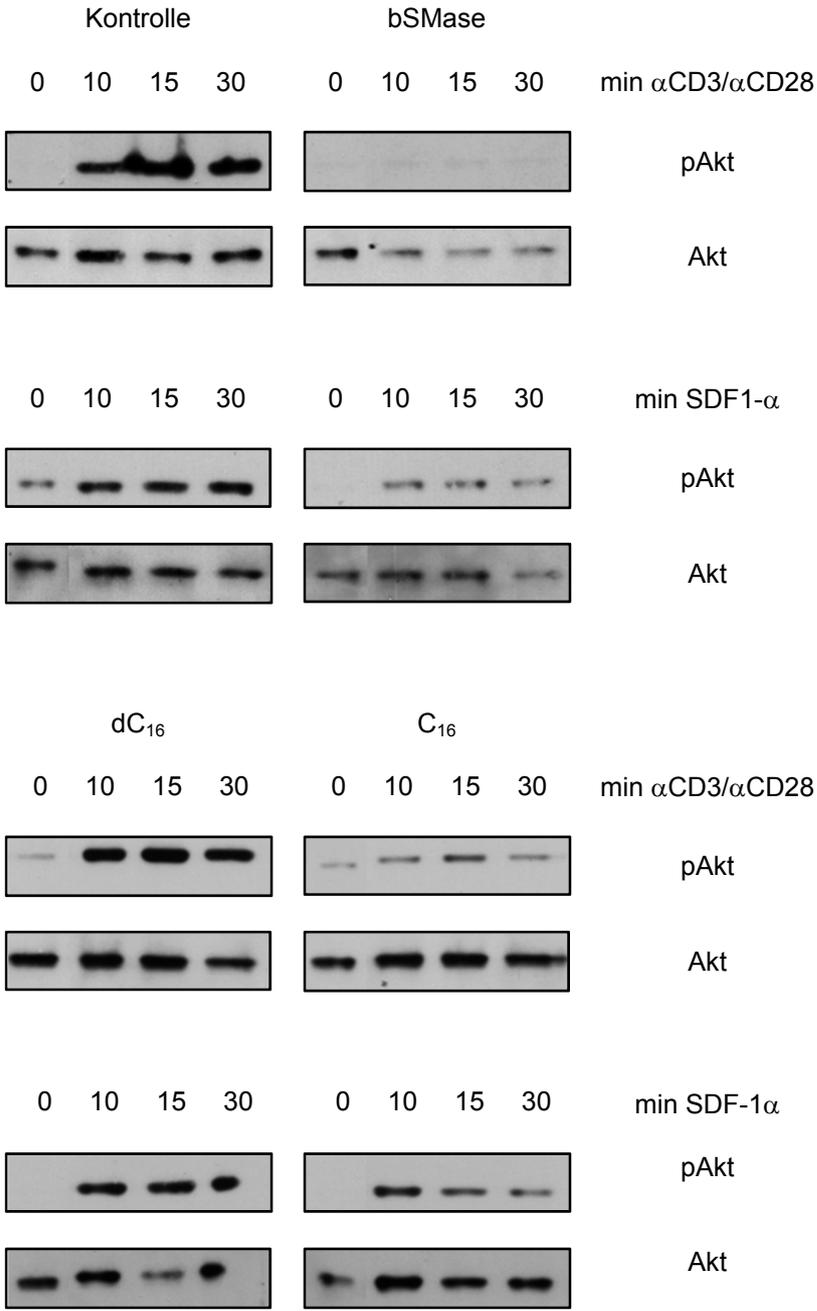


Abbildung 4.15: Reduzierte Phosphorylierung von Ezrin und Moesin nach Akkumulation von Ceramiden. T-Zellen wurden mit 25 μ M bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ inkubiert, lysiert und die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen im Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (A) und die dazugehörige densitometrische Auswertung (B). Die Menge an phosphorylierten ERM-Proteinen in den Kontrollzellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Neben der Phosphorylierung von ERM-Proteinen wurde auch die Aktivierung von Akt untersucht. Der PI3K/Akt-Signalweg ist für die Zytoskelettdynamik und die Proliferation von T-Zellen von Bedeutung. Um den Einfluss von Ceramiden auf den Phosphorylierungsstatus von Akt zu untersuchen, wurden die Zellen mit bSMase, C₁₆ oder dC₁₆ behandelt und für unterschiedliche Zeitpunkte mit α -CD3/ α -CD28-Antikörpern bzw. SDF-1 α stimuliert. Die Zelllysate wurden auf ein 12%-iges SDS-Gel aufgetragen und die Akt-Phosphorylierung im Western Blot analysiert. Die Detektion von Akt diente als Ladekontrolle.

A



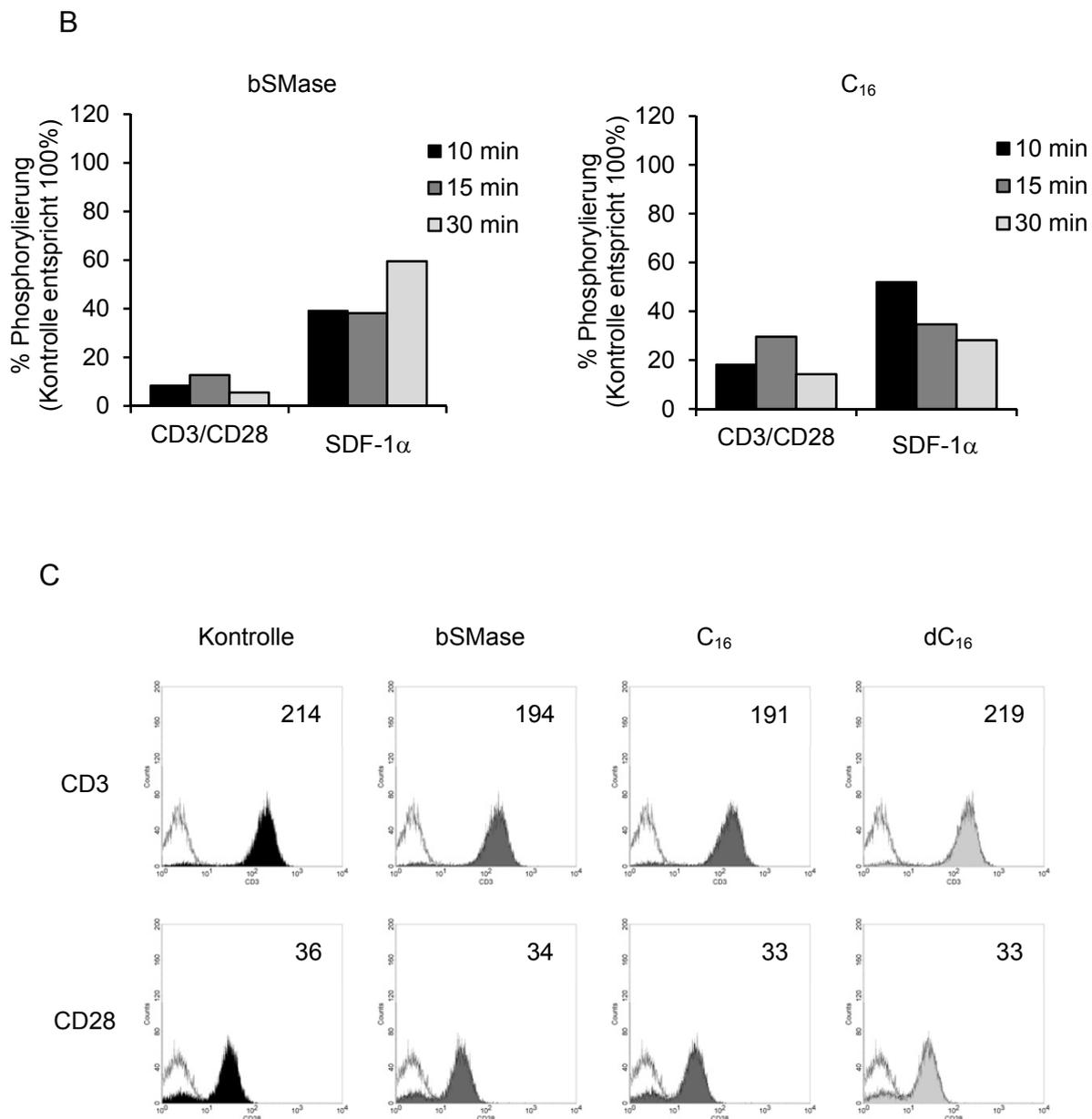


Abbildung 4.16: Reduzierte Phosphorylierung von Akt nach Akkumulation von Ceramiden. T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ inkubiert, für unterschiedliche Zeitpunkte mit α CD3/ α CD28-Antikörpern bzw. SDF-1 α stimuliert und die Menge an phosphoryliertem Akt wurde im Western Blot analysiert. Dargestellt sind repräsentative Western Blots (A) und die dazugehörige densitometrische Auswertung. Die Menge an pAkt in unbehandelten bzw. dC₁₆-behandelten Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (B). Im Anschluss an die Inkubation mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ wurde die Oberflächenexpression von CD3 und CD28 durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind die MFI-Werte, die für Kontrollzellen bzw. ceramidmodifizierte T-Zellen ermittelt wurden (C).

Die in Abbildung 4.16 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sowohl nach α CD3/ α CD28- als auch nach SDF-1 α -Stimulation eine verminderte Akt-

Phosphorylierung infolge der Akkumulation von Ceramiden detektiert wurde. Neben der Expression des CXCR4-Rezeptors (Abschnitt 4.6.3) ist auch die Oberflächenexpression von CD3 und CD28 nach Akkumulation von Ceramiden nicht verändert (Abbildung 4.16. (C)). Das Maximum der Akt-Phosphorylierung wurde in den Kontrollzellen etwa 15 min nach Stimulation erreicht. Die quantitative Analyse zeigt, dass nach Stimulation mit SDF-1 α die Akt-Phosphorylierung zwischen 40 % und 70 % reduziert war. Nach α CD3/ α CD28-Stimulation ist der Effekt noch deutlicher ausgeprägt, da eine zwischen 70 % und 90 % verringerte Menge an pAkt ermittelt wurde.

Folglich verändern Ceramide nicht nur die Lokalisation intrazellulärer Signalmoleküle, sondern auch deren Aktivierungsstatus. Dadurch nehmen Ceramide Einfluss auf Signalwege in der Zelle, die für die Zytoskelettdynamik und eine effiziente T-Zell-Aktivierung von Bedeutung sind.

4.9 Analyse von DC/T-Zell-Konjugaten

Um eine effiziente T-Zell-Aktivierung zu vermitteln, bedarf es Zell-Zell-Interaktionen zwischen antigenpräsentierenden Zellen (APC), insbesondere dendritischen Zellen (DC), und T-Zellen. Durch die spezifische Bindung des T-Zell-Rezeptors kommt es zur Ausbildung einer spezialisierten Kontaktfläche, der immunologischen Synapse (IS), welche mit der Relokalisation von Rezeptor- und Signalmolekülen sowie der Polarisierung des Zytoskeletts zur Kontaktstelle einhergeht. Dabei werden die Moleküle in bestimmte Domänen rekrutiert, welche als cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) und pSMAC (*peripheral SMAC*) bezeichnet werden. T-Zell-Rezeptor und CD28 akkumulieren im cSMAC, wohingegen Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 im pSMAC lokalisiert sind. Im Folgenden wurde der Einfluss von Ceramiden auf Bildung und Funktion der IS untersucht.

4.9.1 Verteilung von Ceramiden in DC/T-Zell-Konjugaten

Bevor der Einfluss von Ceramiden auf die IS-Architektur analysiert wurde, wurde zunächst die generelle Verteilung von Ceramiden in DC/T-Zell-Konjugaten untersucht. Dafür wurden reife, Superantigen (SA)-beladene DCs mit allogenen T-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte kokultiviert, anschließend fixiert, permeabilisiert und die Ceramide für die mikroskopische Analyse angefärbt.

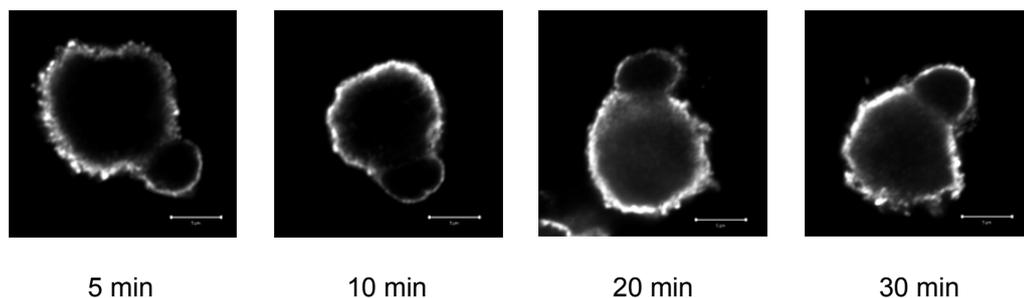


Abbildung 4.17: Lokalisation von Ceramiden in DC/T-Zell-Konjugaten. LPS-ausgereifte, SA-beladene DCs wurden mit allogenen T-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C kokultiviert. Die gebildeten Konjugate wurden anschließend fixiert, permeabilisiert und die Ceramide angefärbt. Dargestellt sind repräsentative DC/T-Zell-Konjugate eines aus drei unabhängigen Experimenten (Größenmarker: 5 µm).

Abbildung 4.17 zeigt, dass zu allen Zeitpunkten eine ausgeprägte Ceramidfärbung auf der Oberfläche der DC/T-Zell-Konjugate nachgewiesen werden konnte. Es scheint jedoch, dass größere Ceramidplattformen aus der Kontaktstelle ausgeschlossen werden. Um die Verteilung der Ceramide ausschließlich in der T-Zelle zu analysieren, wurden diese mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C stimuliert und die Ceramide anschließend angefärbt. Wie in Abbildung 4.18 zu sehen ist, wurden auch in diesem Ansatz Ceramide weitgehend aus der Kontaktstelle ausgeschlossen, wobei unterschiedliche Phänotypen beobachtet werden konnten. Neben einer eher gleichmäßigen Verteilung der Ceramide (5 min), wurden Ceramidanhäufungen seitlich oder am distalen Pol der Zelle beobachtet.

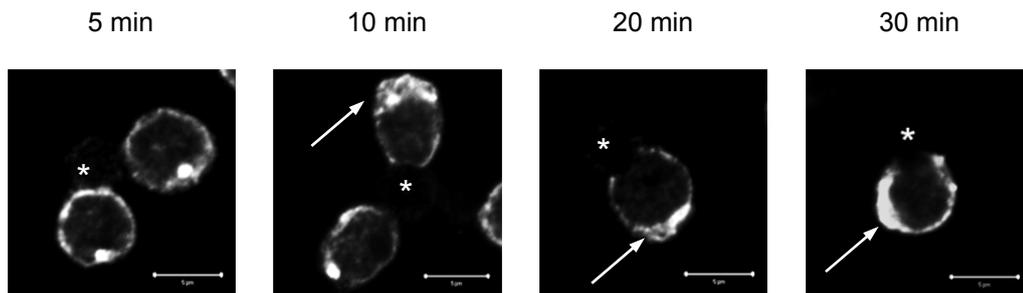


Abbildung 4.18: Lokalisation von Ceramiden in T-Zellen nach Stimulation mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen. Die T-Zellen wurden für unterschiedliche Zeitpunkte mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Ceramide für die mikroskopische Analyse angefärbt. Die Sterne kennzeichnen die *beads*, die Pfeile kennzeichnen die Ceramidakkumulationen, die seitlich oder am distalen Pol der Zellen beobachtet wurden. Größenmarker 5 μ m.

4.9.2 Lokalisation von ASM in DC/T-Zell-Konjugaten

Neben der Verteilung von Ceramiden wurde zudem die Lokalisation von ASM in Konjugaten zwischen reifen, SA-beladenen DCs und T-Zellen analysiert. Im Anschluss an die Kokultur der Zellen wurden diese fixiert, permeabilisiert und mit einem ASM-spezifischen Antikörper angefärbt. Während der Bildung der IS kommt es zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts, wobei Aktin- und Mikrotubulstrukturen, das MTOC und assoziierte vesikuläre Kompartimente an die Kontaktstelle zwischen DCs und T-Zellen polarisieren. Wie in der Abbildung 4.19 zu sehen ist, finden sich Akkumulationen von ASM in der Nähe der Kontaktstelle, die möglicherweise ASM-enthaltende Kompartimente repräsentieren. Um zu untersuchen, ob diese mit der Plasmamembran fusionieren, wurde die Plasmamembran der DC/T-Zell-Konjugate nach der Fixierung zunächst mit WGA-FITC bei 4°C angefärbt. Anschließend wurde die Konjugate permeabilisiert und zusätzlich ASM angefärbt. Abbildung 4.19 zeigt, dass keine Kollokalisierung von ASM und WGA detektiert werden konnte, was darauf hindeutet, dass eine Translokation der ASM zur Oberfläche nicht beobachtet werden kann. Die gleiche Verteilung von ASM wurde auch in T-Zellen gefunden, in denen ASM als HA-getaggetes Konstrukt überexprimiert wurde. Auch in diesem Ansatz wurden Akkumulationen von ASM in der Nähe der Kontaktstelle detektiert, eine Kollokalisierung zwischen ASM und WGA

konnte jedoch nicht detektiert werden. In Übereinstimmung damit konnten auch, wie in Abbildung 4.17 und 4.18 dargestellt, keine Ceramidplattformen in der IS nachgewiesen werden.

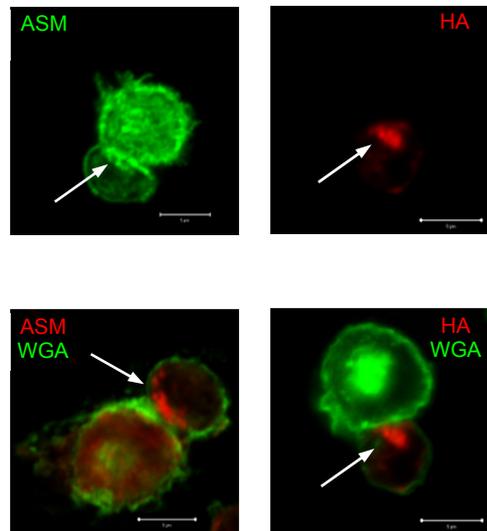
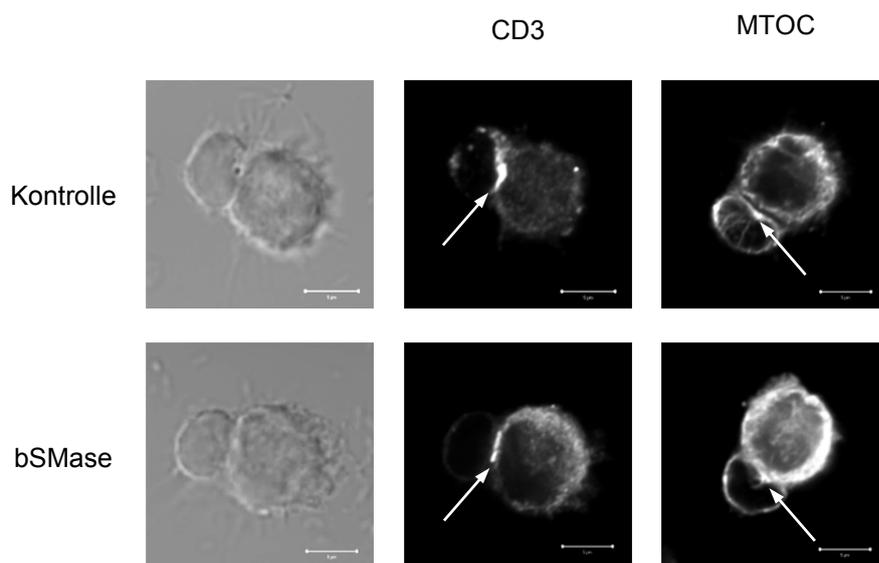


Abbildung 4.19: Lokalisation von ASM in DC/T-Zell-Konjugaten. LPS-ausgereifte, SA-beladene DCs wurden mit allogenen T-Zellen für 30 min bei 37°C kokultiviert. Danach wurden die Konjugate fixiert, permeabilisiert und ASM für die Mikroskopie angefärbt. Für die Doppelfärbung mit WGA-FITC wurden die Zellen nach der Fixierung zunächst für 30 min bei 4°C mit WGA-FITC inkubiert, anschließend permeabilisiert und zusätzlich mit einem ASM-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Pfeile kennzeichnen die Polarisierung ASM-enhaltender Vesikel zur Kontaktstelle (Größenmarker: 5 µm).

4.9.3 Die Translokation von CD3 und des MTOC zur Synapse ist nach Induktion von Ceramiden nicht gestört

Um dem Einfluss von Ceramiden auf Struktur und Funktion der IS zu untersuchen, wurden zunächst Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um die Lokalisation von CD3 und des MTOC in DC/T-Zell-Konjugaten nach Induktion von Ceramiden auf T-Zellen zu untersuchen. Dafür wurden die T-Zellen zunächst mit bSMase für 30 min inkubiert und anschließend mit LPS-ausgereiften, SA-beladenen DCs für 30 min bei 37°C kokultiviert. Im Folgenden wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und CD3 bzw. Tubulin angefärbt.

A



B

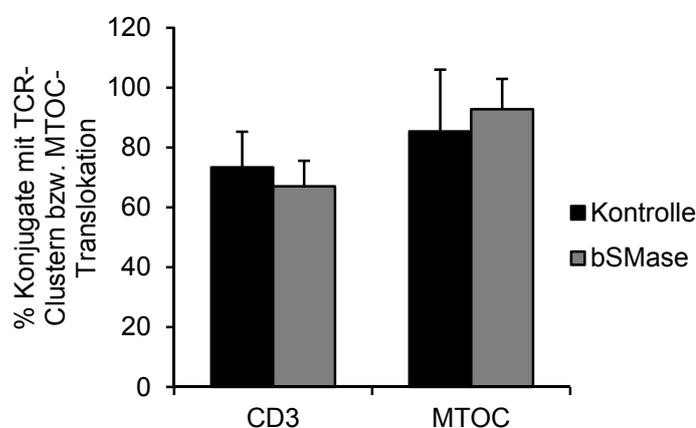


Abbildung 4.20: Die Induktion von Ceramiden auf T-Zellen beeinflusst nicht die Translokation von CD3 oder des MTOC zur Synapse. (A) T-Zellen wurden mit bSMase inkubiert und anschließend für 30 min bei 37°C mit SA-beladenen, allogenen DCs kokultiviert. Daraufhin wurden die Konjugate fixiert und mit einem α -CD3- bzw. α -tubulin-spezifischen Antikörper gefärbt. Die Pfeile kennzeichnen TCR-Akkumulationen an der DC/T-Kontaktstelle bzw. die Polarisation des MTOC zur Synapse (Größenmarker: 5 μ m). (B) Quantitative Auswertung der Konjugate mit TCR-Clustern an der Kontaktstelle bzw. MTOC-Reorientierung. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Insgesamt wurden mindestens 35 Konjugate pro Ansatz betrachtet.

Eine reife IS ist durch die Translokation von CD3 und des MTOC zur Kontaktfläche zwischen DC und T-Zelle gekennzeichnet. Wie anhand der Abbildung 4.20 (B) zu sehen ist, konnte in 70 % bis 80 % der Konjugate zwischen DCs und T-Zellen eine typische Verteilung von CD3 und des MTOC beobachtet werden. Die Vorbehandlung der T-Zellen mit bSMase hatte keine direkten Auswirkungen auf die Lokalisation von CD3 und des MTOC (Abbildung 4.20 (A)). Die Translokation von CD3 und des MTOC zur Synapse erfolgte gleichermaßen effizient in bSMase-behandelten Zellen, so dass die Struktur der IS nach Induktion von Ceramiden auf T-Zellen nicht gestört zu sein scheint.

4.9.4 Die Generierung von Ceramiden beeinflusst nicht die Konjugat-Frequenz

Neben immunhistochemischen Analysen der DC/T-Zell-Konjugate wurde zudem der Einfluss von Ceramiden auf die Konjugatmenge im Durchflusszytometer analysiert. Dafür wurden DCs und T-Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (R18 bzw. CFSE) markiert (siehe 3.4.4 Material & Methoden) und anschließend im Verhältnis 1:5 gemischt. Nach 30 min der Kokultur wurden die Zellen fixiert und die Menge an gebildeten Konjugaten durchflusszytometrisch bestimmt. Um die Bedeutung der Ceramidgenerierung genauer zu analysieren, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: zum einen wurden DCs bzw. T-Zellen mit unterschiedlichen bSMase-Konzentrationen für 30 min vorinkubiert, zum anderen wurde das Enzym in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium während der Kokultur hinzugefügt. Im ersten Ansatz wurden folglich Ceramide ausschließlich auf der DC bzw. T-Zelle generiert, wohingegen im zweiten Ansatz Ceramide sowohl auf der DC als auch auf der T-Zelle induziert wurden.

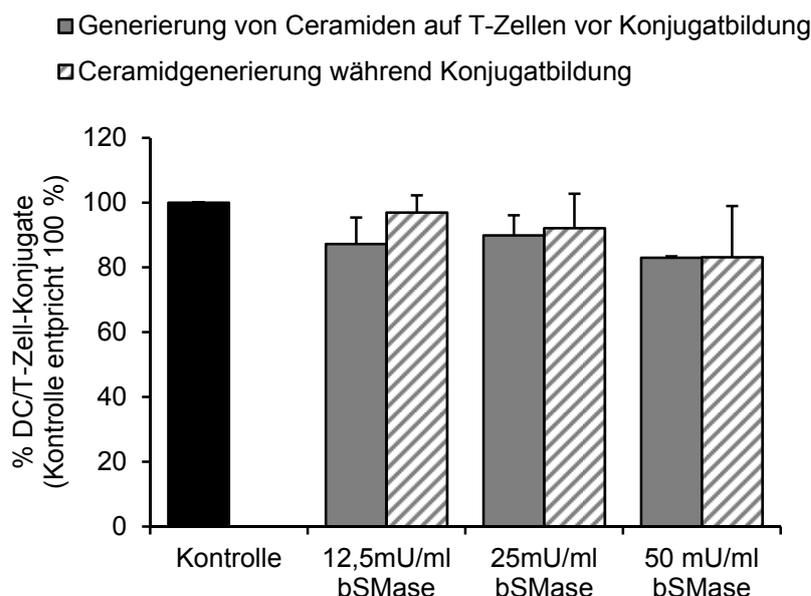


Abbildung 4.21: Einfluss von Ceramiden auf die Ausbildung von DC/T-Zell-Konjugaten. R18-markierte reife DCs wurden mit allogenen, CFSE-markierten T-Zellen gemischt und anschließend für 30 min bei 37°C kokultiviert. Nach erfolgter Konjugatbildung wurden die Zellen fixiert und die Menge an gebildeten Konjugaten im Durchflusszytometer bestimmt. Zur Generierung von Ceramiden wurden die CFSE-markierten T-Zellen entweder mit bSMase für 30 min vorinkubiert oder bSMase wurde während der Kokultur dem Medium hinzugefügt, so dass die Ceramidinduktion erst während der Konjugatbildung erfolgte. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Menge an gebildeten Konjugaten zwischen DCs und unbehandelten T-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Wie anhand der Abbildung 4.21 zu sehen ist, hat die Induktion von Ceramiden keinen drastischen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten DC/T-Zell-Konjugate. Obwohl, wie in Abschnitt 4.9.1 gezeigt, Ceramide von der Kontaktstelle ausgeschlossen werden, beeinflusst weder die Induktion von Ceramiden auf T-Zellen noch die Generierung von Ceramiden während der Kokultur die Frequenz gebildeter DC/T-Zell-Konjugate. Im Vergleich zur Kontrolle ist bei einer bSMase-Konzentration von 50 mU/ml die Menge an gebildeten Konjugate nur um 17 % verringert. Die Akkumulation von Ceramiden auf Seiten der DC hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Konjugate (Abbildung 4.22). Im Vergleich zur Kontrolle wurden nach Induktion von Ceramiden auf DCs annähernd identische Mengen an DC/T-Zell-Konjugaten in der Kokultur detektiert. Somit scheint die Generierung von Ceramiden, sowohl auf Seiten der T-Zelle als auch auf Seiten der DC, die Frequenz von DC/T-Zell-Konjugaten nicht zu beeinträchtigen.

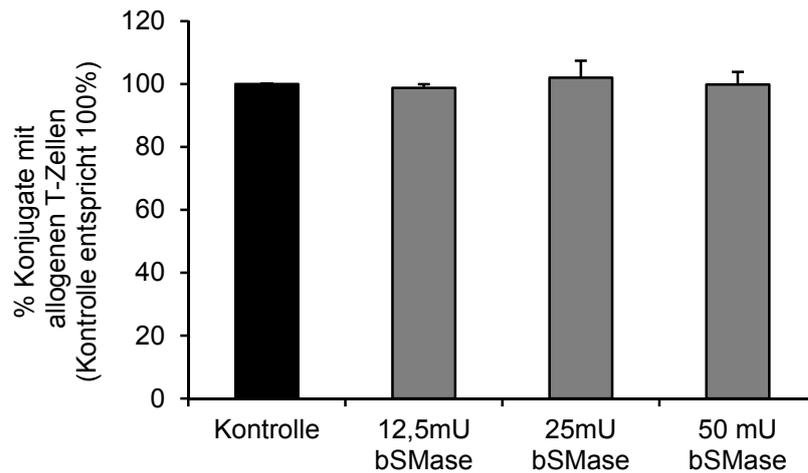


Abbildung 4.22: Die Induktion von Ceramiden auf DCs beeinflusst nicht die Menge an DC/T-Zell-Konjugaten. R18-markierte reife DCs wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an bSMase für 30 min vorinkubiert und anschließend mit CFSE-markierten T-Zellen gemischt. Nach 30 min bei 37°C wurden die Konjugate fixiert und die Anzahl gebildeter Konjugate im Durchflusszytometer ermittelt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Anzahl gebildeter Konjugate zwischen DCs und unbehandelten T-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

4.9.5 Analyse der Konjugatbildung nach Inhibierung von ASM und NSM in T-Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Inhibierung der ASM- bzw. NSM-Aktivität in T-Zellen die Konjugatbildung beeinflusst. Dafür wurden CFSE-markierte T-Zellen zunächst für 2 h mit den entsprechenden Inhibitoren bei 37°C behandelt und anschließend mit R18-markierten, reifen DCs gemischt. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert und der Prozentsatz an DC/T-Zell-Konjugaten in der Kokultur im Durchflusszytometer bestimmt.

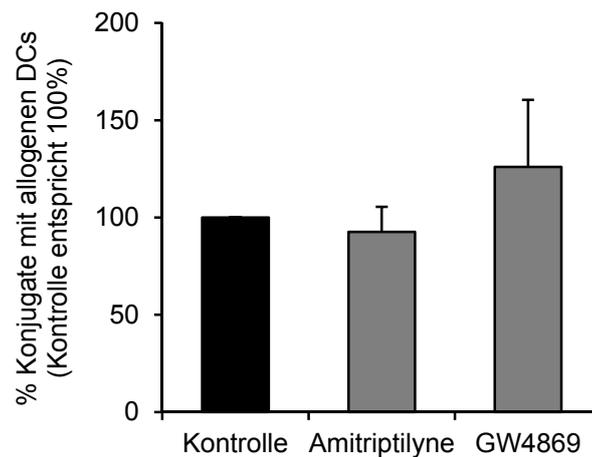


Abbildung 4.23: Analyse der DC/T-Zell-Konjugatmenge nach Inhibierung der ASM- bzw. NSM-Aktivität in T-Zellen. CSFE-markierte T-Zellen wurden mit dem entsprechenden Inhibitor für 2 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit R18-markierten, reifen DCs gemischt. Nach 30 min bei 37°C wurden die Zellen fixiert und die Konjugatmenge im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Anzahl gebildeter Konjugate zwischen DCs und unbehandelten T-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Wie in der Abbildung 4.23 dargestellt ist, führt die Hemmung von ASM durch Amitriptyline (10 μ M) zu keiner veränderten Anzahl an DC/T-Zell-Konjugaten in der Kokultur. Infolge der Hemmung von NSM durch GW4869 (1,3 μ M) ist diese leicht, jedoch nicht signifikant erhöht. Eine Inhibierung der ASM bzw. NSM-Aktivität in T-Zellen führt somit ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen der Konjugat-Frequenz.

4.9.6 Untersuchungen zur Konjugatbildung ASM-defizienter Zellen

Um die Bedeutung der ASM-Expression für die Konjugatbildung zu untersuchen, wurde im Folgenden die Konjugatfrequenz zwischen ASM-defizienten DCs und T-Zellen analysiert. Dafür wurden reife DCs aus Wildtyp- bzw. ASM^{-/-}-Mäusen mit R18 markiert und anschließend für 30 min mit 1 μ g/ml SEA/SEB bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit CSFE-markierten PBMCs aus Wildtyp- bzw. ASM^{-/-}-Mäusen im Verhältnis 1:5 gemischt, für 30 min kokultiviert und die Konjugatmenge durchflusszytometrisch analysiert.

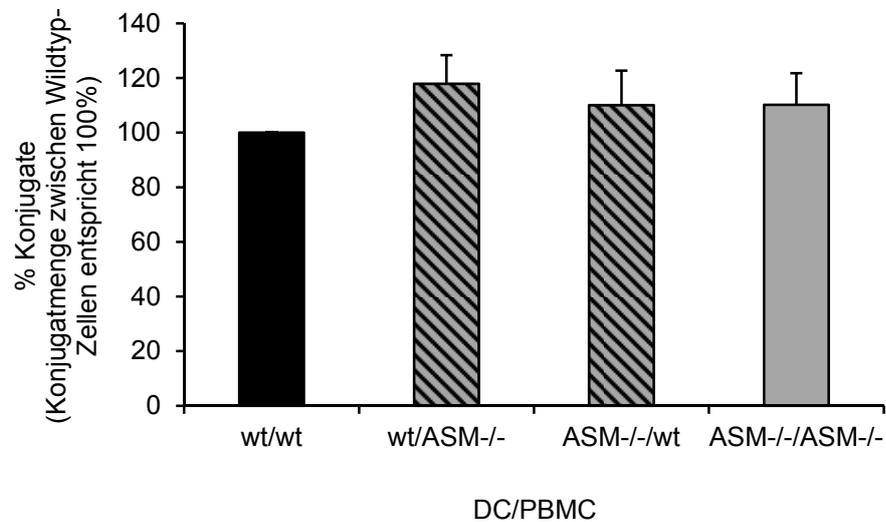


Abbildung 4.24: DC/T-Zell-Konjugate mit Zellen aus ASM^{-/-}-Mäusen. CSFE-markierte PBMCs aus Wildtyp- oder ASM^{-/-}-Mäusen wurden mit SA-beladenen, R18-markierten DCs aus Wildtyp- oder ASM^{-/-}-Mäusen gemischt und für 30 min bei 37°C kokultiviert. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die Konjugatmenge im Durchflusszytometer analysiert. Die Konjugatmenge zwischen Wildtyp-Zellen wurde gleich 100 % gesetzt (n = 4).

Abbildung 4.24 zeigt, dass die Konjugatfrequenz zwischen Zellen aus ASM^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Konjugatmenge zwischen Wildtypzellen nicht verändert ist. Des Weiteren konnte kein Einfluss auf die Konjugatmenge beobachtet werden, wenn DCs oder PBMCs aus ASM^{-/-}-Mäusen mit Wildtyp-Zellen kokultiviert wurden. Das Fehlen von ASM sowohl auf Seiten der DC als auch auf Seiten der T-Zelle verändert somit nicht die Anzahl der gebildeten DC/T-Zell-Konjugate.

4.10 Einfluss von Ceramiden auf Calcium-Influx in T-Zellen

4.10.1 Lokalisation von Orai1 und Stim1 in DC/T-Zell-Konjugaten

Da die Induktion von Ceramiden die Frequenz an DC/T-Zell-Konjugaten nicht beeinflusst, wurde im Folgenden die Funktionalität der Konjugate nach Akkumulation von Ceramiden untersucht. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle wird ein

lang-anhaltender Calcium-Einstrom aus dem Extrazellularraum benötigt, der durch sogenannte CRAC (*calcium release-activated calcium*)-Kanäle vermittelt wird. Bisher konnten zwei molekulare Komponenten identifiziert werden, die für den Calcium-Einstrom in T-Zellen von Bedeutung sind. Orai1 ist die Untereinheit des Calcium-Kanals in der Plasmamembran, Stim1 ist im ER lokalisiert und dient als Sensor der intrazellulären Calcium-Konzentration. Infolge der Stimulation des T-Zell-Rezeptors werden Ca^{2+} -Ionen aus dem ER freigesetzt, was zu einem transienten Anstieg der zytoplasmatischen Calcium-Konzentration führt. Stim1 aktiviert daraufhin die Calcium-Kanäle in der Plasmamembran, wodurch ein lang-anhaltender Calcium-Einstrom von außen erfolgen kann. Sowohl für Orai1 als auch für Stim1 konnte gezeigt werden, dass die Proteine zur IS orientiert sind und somit einen erhöhten Calcium-Einstrom an der Kontaktstelle vermitteln (Lioudyno et al, 2008). Daher wurde zunächst die Lokalisation von Orai1 und Stim1 in bSMase-behandelten T-Zellen nach Stimulation mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen untersucht. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie.

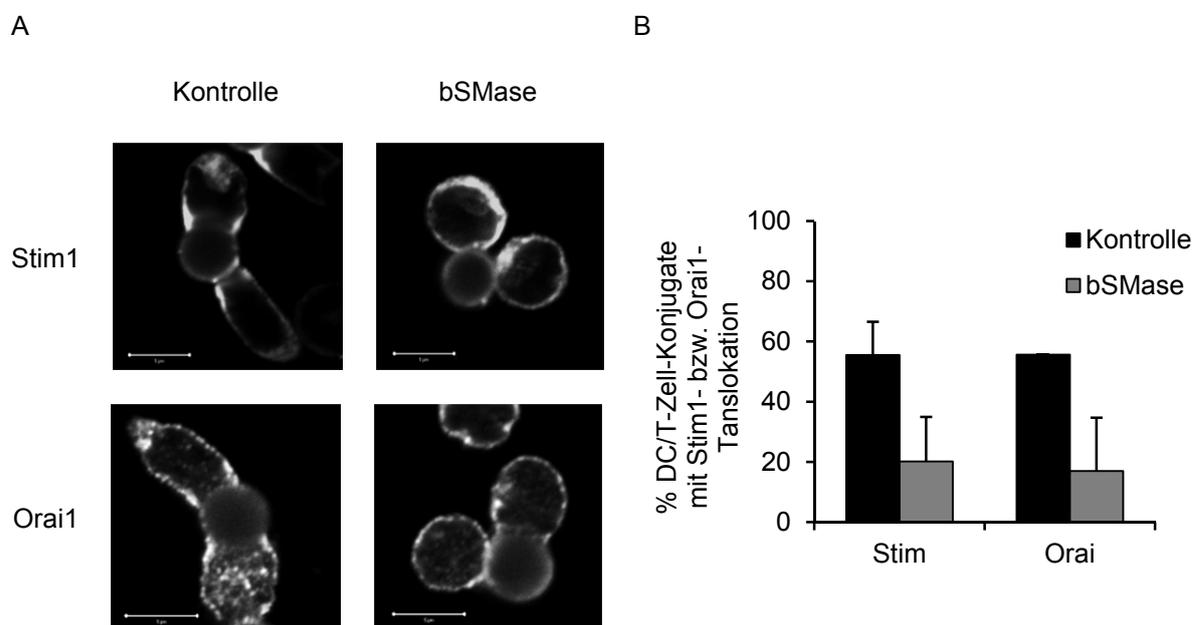


Abbildung 4.25: Translokation von Orai1 und Stim1 zur Synapse. (A) T-Zellen wurden zunächst mit bSMase inkubiert und anschließend für 30 min bei 37°C mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen stimuliert. Daraufhin wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und Orai1 bzw. Stim1 für die mikroskopische Analyse angefärbt (Größenmarker: 5 µm). (B) Quantitative Analyse der Translokation von Orai1 und Stim1 zur Synapse. Dargestellt ist der Mittelwert aus 2 unabhängigen Experimenten. Pro Ansatz wurden mindestens 70 Konjugate betrachtet.

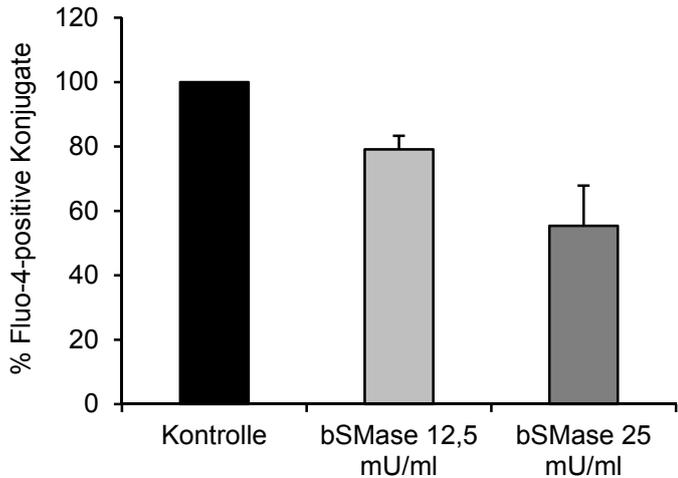
Abbildung 4.25 (A) zeigt, dass in Kontrollzellen eine Akkumulation von Stim1 und Orai1 an der Kontaktstelle mit den stimulatorischen Mikrokügelchen detektiert werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde nach bSMase-Behandlung in der überwiegenden Anzahl der Kontakte eine homogene Verteilung der Proteine beobachtet, teilweise konnten auch größere Mengen der Proteine seitlich oder am distalen Pol der Zelle detektiert werden. Die quantitative Analyse in Abbildung 4.25 (B) zeigt, dass im Vergleich zur Kontrolle die Translokation von Orai1 bzw. Stim1 zur Synapse um 70 % bzw. 65 % reduziert war. Die Induktion von Ceramiden auf T-Zellen beeinflusst somit die Translokation von Orai1 und Stim1 zur Kontaktstelle.

4.10.2 Ceramide beeinflussen den Calcium-Influx in T-Zellen

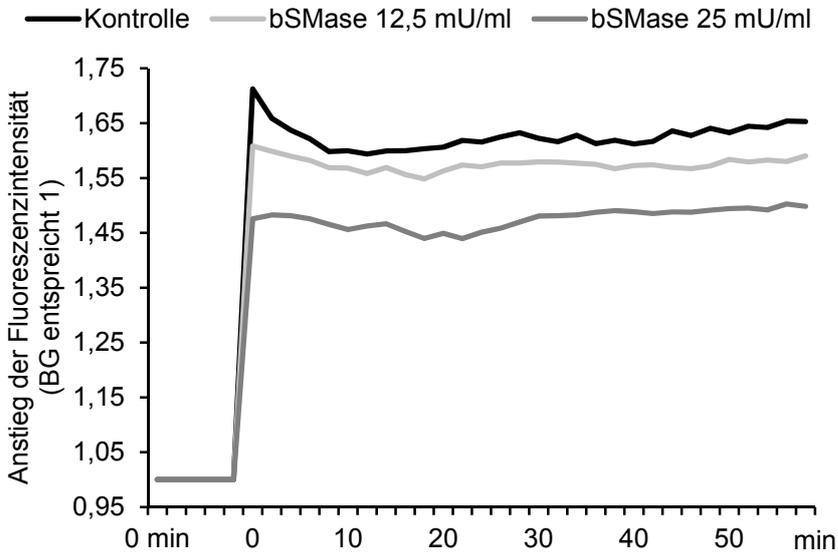
Da die Generierung von Ceramiden, wie in Abschnitt 4.10.1 dargestellt, die Rekrutierung von Orai1 und Stim1 zur Synapse vermindert, wurde im Folgenden untersucht, ob der Calcium-Einstrom in T-Zellen nach Kontakt mit DCs ebenfalls beeinträchtigt ist. Dafür wurden die T-Zellen mit Fluo-4 markiert (einem Farbstoff, dessen Intensität mit dem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration zunimmt) und anschließend für 30 min mit unterschiedlichen bSMase-Konzentrationen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit allogenen, reifen DCs gemischt und nach 30 min die Anzahl Fluo-4-positiver DC/T-Zell-Konjugate im Durchflusszytometer bestimmt.

Des Weiteren wurde die Fluoreszenzintensität der T-Zellen infolge der Stimulation mit DCs über einen Zeitraum von 60 min im Fluoreszenzreader gemessen. Dabei wurden die Fluo-4-markierten T-Zellen entweder mit bSMase vorinkubiert oder das Enzym wurde vor der Messung direkt zur Kokultur gegeben.

A



B



C

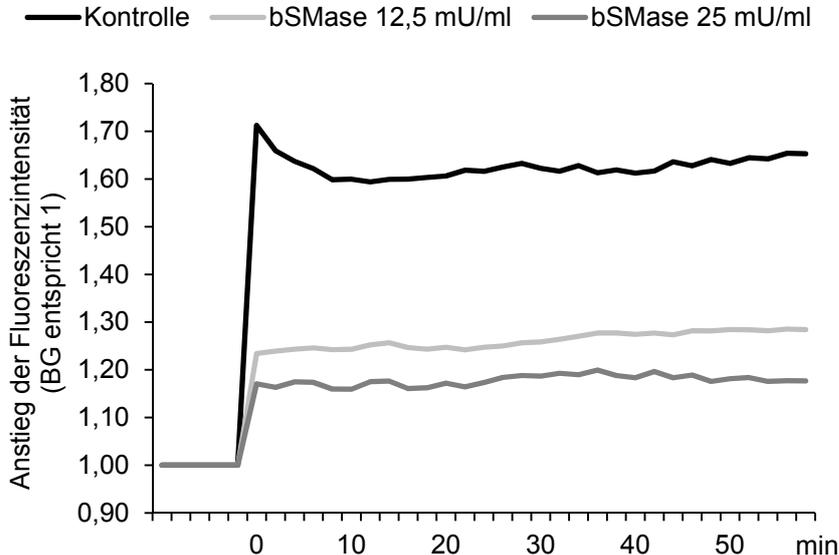


Abbildung 4.26: Calcium-Einstrom in DC/T-Zell-Konjugaten. (A) Die T-Zellen wurden zunächst mit Fluo-4 markiert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen bSMase für 30 min inkubiert. Danach wurden die T-Zellen mit allogenen, reifen DCs gemischt und nach 30 min der Prozentsatz Fluo-4-positiver DC/T-Zell-Konjugate im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Fluoreszenzintensität der T-Zellen nach Stimulation mit DCs wurde über einen Zeitraum von 60 min im Fluoreszenzreader gemessen. Dargestellt ist das Ergebnis eines von drei unabhängigen Experimenten. (C) Wie in (B) mit dem Unterschied, dass die angegebenen bSMase-Konzentrationen vor der Messung direkt zur Kokultur gegeben wurden.

Wie anhand der Abbildung 4.26 (A) zu sehen ist, konnte nach Induktion von Ceramiden eine reduzierte Anzahl an Fluo-4-positiven DC/T-Zell-Konjugaten im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Dieser Effekt ist Dosis-abhängig, da eine bSMase-Konzentration von 12,5 mU/ml die Anzahl der Fluo-4-positiven DC/T-Zell-Konjugate um 20 % reduzierte, bei einer bSMase-Konzentration von 25 mU/ml war die Anzahl der Fluo-4-positiven DC/T-Zell-Konjugate um 40 % verringert. In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnte ebenfalls über einen Zeitraum von 60 min ein verminderter Calcium-Einstrom in ceramidmodifizierten T-Zellen detektiert werden 4.26 (B). Dieser Effekt war noch deutlicher ausgeprägt, wenn das Enzym vor der Messung direkt zur Kokultur gegeben wurde 4.26 (C). Somit wird durch die Akkumulation von Ceramiden sowohl die Verteilung von Orai1 und Stim1 als auch der Calciumeinstrom in T-Zellen beeinträchtigt.

4.11 Analysen zur T-Zell-Proliferation

In den vorherigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von Ceramiden auf T-Zellen die Frequenz von DC/T-Zell-Konjugaten zwar nicht beeinträchtigt, diese jedoch nur eingeschränkt funktionell sind, da ein verminderter Calcium-Einstrom in T-Zellen beobachtet wurde. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Akkumulation von Ceramiden die T-Zell-Proliferation beeinträchtigt. Zur Analyse der T-Zell-Proliferation wurden *mixed lymphocyte reactions* (MLR) durchgeführt, wobei es in Folge einer Fremderkennung zur Proliferation der T-Zellen kommt. Zudem wurde die Proliferation der T-Zellen nach Stimulation von CD3 und CD28 untersucht.

4.11.1 Reduzierte T-Zell-Proliferation nach Akkumulation von Ceramiden

Um den Einfluss von Ceramiden auf die Proliferation von T-Zellen zu untersuchen, wurden die T-Zellen mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ behandelt und anschließend mit α -CD3/ α -CD28-Antikörpern stimuliert. Das Maß der Proliferation wurde nach 48 h und 72 h durch den Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt.

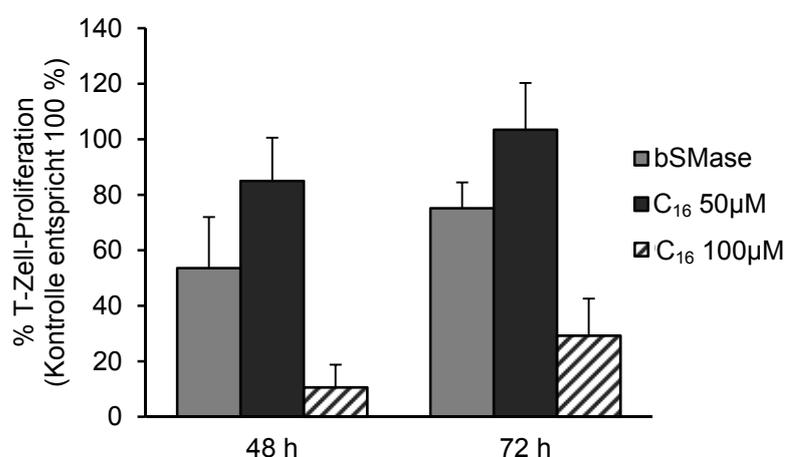


Abbildung 4.27: T-Zell-Proliferation nach Akkumulation von Ceramiden. T-Zellen wurden mit bSMase, C₁₆ bzw. dC₁₆ behandelt und anschließend mit α -CD3/ α -CD28-Antikörpern stimuliert. Das Maß der T-Zell-Proliferation wurde nach 48 h und 72 h durch den Einbau von radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die Proliferation unbehandelter bzw. dC₁₆-behandelter Zellen entspricht 100 %.

Wie in der Abbildung 4.27 dargestellt ist, führt die Induktion von Ceramiden durch bSMase zu einer verminderten Proliferation von T-Zellen. Insbesondere nach 48 h konnte eine um 50 % verringerte Proliferation im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden, wohingegen die Proliferation nach 72 h nur noch um 25 % geringer war. Die Inkubation der Zellen mit 100 µM C₁₆ resultierte ebenfalls in einer drastischen Reduktion der T-Zell-Proliferation (zwischen 70 % und 90 % im Vergleich zu dC₁₆-behandelten Zellen), wohingegen eine C₁₆-Konzentration von 50 µM nur geringe Auswirkungen auf die T-Zell-Proliferation hatte (15 % nach 48 h). Die Proliferation von T-Zellen wird somit durch die Akkumulation von Ceramiden verringert.

4.11.2 Einfluss der ASM- bzw. NSM-Aktivität auf die T-Zell-Proliferation

Um die Bedeutung der ASM- bzw. NSM-Aktivität auf die Proliferation von T-Zellen zu untersuchen, wurden diese zum einen mit den entsprechenden Inhibitoren für 2 h bei 37°C vorinkubiert und anschließend mit reifen, SA-beladenen DCs kokultiviert, zum anderen wurden die Inhibitoren zu Beginn der Kokultur dem Medium hinzugefügt. An Tag 4 der Kultur wurde dem Medium radioaktiv-markiertes Thymidin hinzugefügt und das Maß der Proliferation an Tag 5 über den Einbau an radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt.

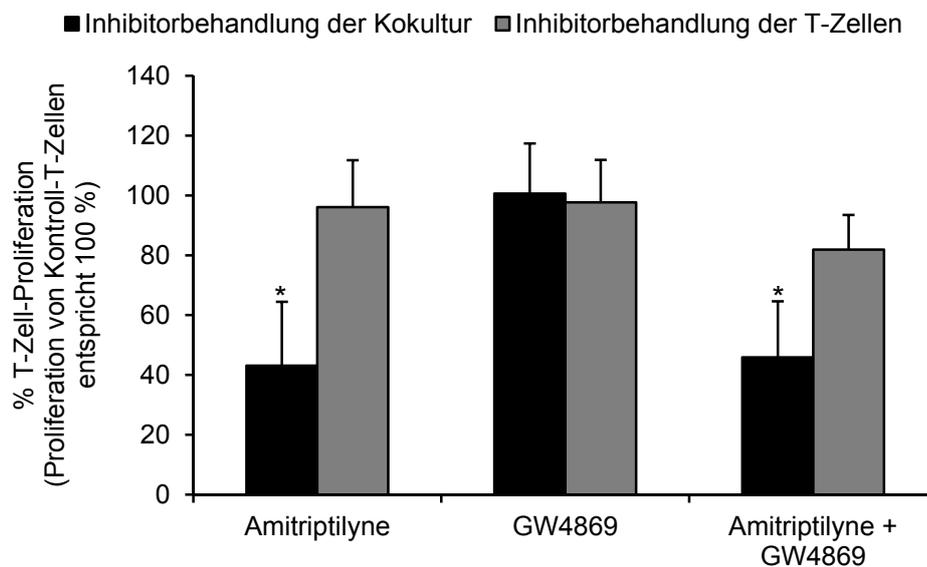


Abbildung 4.28: T-Zell-Proliferation nach Inhibierung von ASM und NSM. LPS-ausgereifte, SA-beladene DCs wurden mit T-Zellen im Verhältnis 1:10 gemischt und für 5 Tage kokultiviert. An Tag 4 der Kokultur wurde dem Medium radioaktiv-markiertes Thymidin hinzugefügt und das Maß der T-Zell-Proliferation an Tag 5 über den Einbau an radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt. Zur Inhibierung der ASM- bzw. NSM-Aktivität wurden die T-Zellen entweder für 2 h bei 37°C mit Amitriptylyne (10 µM) bzw. GW4869 (1,3 µM) vorinkubiert oder die Inhibitoren wurden in den entsprechenden Konzentrationen zu Beginn der Kokultur dem Medium hinzugefügt. Dargestellt ist der Mittelwert aus 4 Experimenten. Die Proliferation unbehandelter Zellen wurde gleich 100 % gesetzt.

Wie in der Abbildung 4.28 dargestellt ist, hatten die Inhibitoren, einzeln oder kombiniert, keinen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation, wenn sie vor Beginn der Kokultur appliziert wurden. Im Gegensatz dazu, konnte eine um 60 % reduzierte T-Zell-Proliferation nach Zugabe des ASM-Inhibitors Amitriptyline zur Kokultur beobachtet werden. Die Zugabe des NSM-Inhibitors GW4869 zur Kokultur zeigte jedoch keinen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation. Somit führte nur die gleichzeitige Inhibierung der ASM-Aktivität in DCs und T-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der T-Zell-Proliferation. Da jedoch die Inhibierung von ASM auf Seiten der T-Zelle die T-Zell-Proliferation nicht beeinträchtigte, scheint eine funktionelle ASM auf Seiten der DC für die Stimulation der T-Zellen wichtiger zu sein.

4.11.3 ASM-defiziente DCs zeigen eine reduzierte stimulatorische Aktivität

Die in Abschnitt 4.11.2 beschriebenen Daten weisen darauf hin, dass für eine effiziente T-Zell-Proliferation eine funktionelle ASM in DCs nötig ist. Um die Bedeutung der ASM-Expression für die T-Zell-Proliferation zu analysieren, wurde die Proliferation von Zellen aus Wildtyp- und $ASM^{-/-}$ -Mäusen untersucht. Dafür wurden SA-beladene, reife DCs aus Wildtyp bzw. $ASM^{-/-}$ -Mäusen mit PBMCs aus Wildtyp- oder $ASM^{-/-}$ -Mäusen für 5 Tage kokultiviert und anschließend das Maß der T-Zell-Proliferation über den Einbau an radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt.

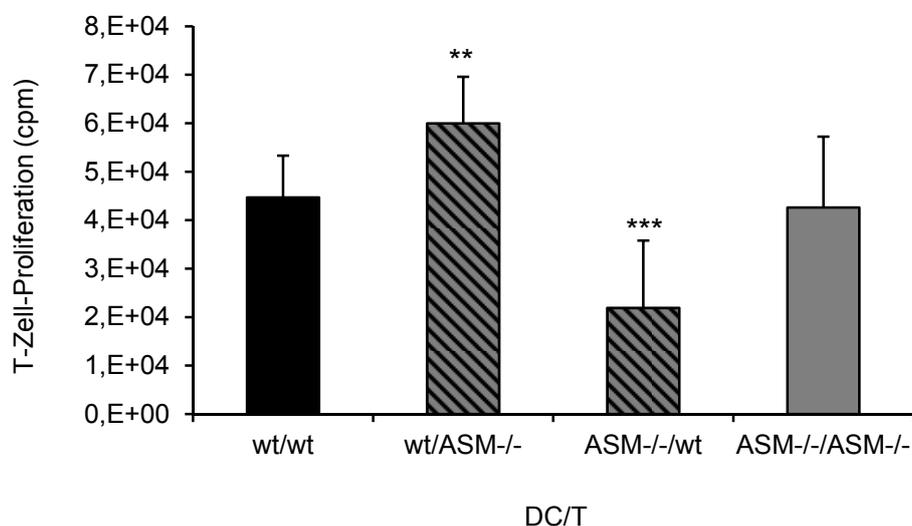


Abbildung 4.29: Proliferation von Zellen aus ASM^{-/-}-Mäusen. LPS-ausgereifte, SA-beladene DCs aus Wildtyp- oder ASM^{-/-}-Mäusen wurden mit PBMCs aus Wildtyp- oder ASM^{-/-}-Mäusen im Verhältnis 1:10 gemischt und für 5 Tage kokultiviert. An Tag 4 der Kokultur wurde dem Medium radioaktiv-markiertes Thymidin hinzugefügt und das Maß der T-Zell-Proliferation an Tag 5 über den Einbau an radioaktiv-markiertem Thymidin bestimmt (n = 4).

Wie die Abbildung 4.29 zeigt, ist die Proliferation von Zellen aus ASM^{-/-}-Mäusen im Vergleich zur Proliferation von Zellen aus Wildtypmäusen nicht verändert. Im Gegensatz dazu, führte die Kokultur von DCs aus ASM^{-/-}-Mäusen mit Wildtyp-PBMCs zu einer Reduktion der T-Zell-Proliferation um 50 %. Dies bestätigt die in 4.11.2 beschriebenen Ergebnisse und zeigt, dass für eine effiziente T-Zell-Stimulation aktive ASM in DCs benötigt wird. Zudem führte die Kokultur von Wildtyp-DCs mit ASM^{-/-}-PBMCs zu einer signifikanten Erhöhung der T-Zell-Proliferation. Im Vergleich zu Wildtyp-Zellen konnte eine Steigerung der T-Zell-Proliferation von 35 % beobachtet werden. Somit scheint im Unterschied zu DCs, das Fehlen der ASM-Aktivität in T-Zellen die Proliferation zu begünstigen.

5 Diskussion

Die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist für eine Vielzahl von T-Zell-Funktionen wie Polarisierung, Adhäsion, Migration sowie die Ausbildung einer IS von Bedeutung (Billadeau et al, 2007; Burkhardt et al, 2008; Samstag et al, 2003). Neben ihrer etablierten Funktion bei der Induktion von Apoptose und der Regulation des Zellzyklus wurde in verschiedenen Studien beschrieben, dass Ceramide in der Lage sind die Zytoskelettdynamik von Zellen zu beeinflussen (Di Bartolomeo & Spinedi, 2002; Gupta et al, 2001; Hu et al, 2005; Panigone et al, 2001; Zeidan et al, 2008). Ceramide werden *de novo* synthetisiert oder sie entstehen durch die Hydrolyse von komplexeren Sphingolipiden wie SM, welche durch SMasen katalysiert wird (Marchesini & Hannun, 2004). In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der Kontakt von T-Zellen mit MV die Aktivierung von SMasen und die nachfolgende Generierung von Ceramiden auf der Oberfläche der Zellen induziert. Zudem konnte die Unfähigkeit MV-kontaktierter T-Zellen morphologisch zu polarisieren direkt auf die durch MV-induzierte Ceramidgenerierung zurückgeführt werden (Gassert et al, 2009). Die Induktion von Ceramiden stellt somit ein mögliches T-Zell-modulatorisches Prinzip dar, weshalb in der vorliegenden Arbeit der generelle Einfluss von Ceramiden auf verschiedene Prozesse im Verlauf der T-Zell-Aktivierung untersucht wurde.

5.1 Einfluss von Ceramiden auf die Zytoskelettdynamik von T-Zellen

Um die Bedeutung von Ceramiden für die Zytoskelettdynamik von T-Zellen zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von Ceramiden auf Polarisierung und Migration von T-Zellen analysiert. Die in dieser Arbeit dargestellten Befunde zeigen, dass neben der MV-induzierten Ceramidgenerierung auch die exogene Akkumulation von Ceramiden mit der chemokininduzierten Zytoskelettorganisation von T-Zellen interferiert. Der überwiegende Anteil ceramidmodifizierter T-Zellen war nicht in der Lage einen polarisierten Phänotyp mit klar erkennbarem *leading edge* und Uropod auf FN auszubilden. Zudem wurde in diesen Zellen eine abweichende Verteilung des

Uropodmarkers CD43 beobachtet (Abb. 4.3). Da die morphologische Polarisierung der Zellen eine entscheidende Voraussetzung für deren gerichtete Bewegung darstellt, wurde in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis auch eine verminderte T-Zell-Chemotaxis infolge der Akkumulation von Ceramiden beobachtet (Abb. 4.7).

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten beeinflusste die Inkubation von Neutrophilen mit C₂₄-Ceramid weder die Beweglichkeit noch die gerichtete Bewegung der Zellen (Sitrin et al, 2011). Neben zellspezifischen Unterschieden ist diese abweichende Beobachtung möglicherweise auf die Ceramidspezies bzw. die Ceramidkonzentration zurückzuführen, die in der Arbeit von Sitrin et al verwendet wurde (7,7 µM C₂₄-Ceramid anstelle von 50 µM C₁₆-Ceramid). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verminderte T-Zell-Chemotaxis infolge der Inkubation mit bSMase mit der verwendeten bSMase-Konzentration korreliert (Abb. 4.6). Infolgedessen wäre auch eine Konzentrationsabhängigkeit für C₁₆-Ceramid zu erwarten, so dass in der Arbeit von Sitrin et al möglicherweise zu geringe Ceramidmengen eingesetzt wurden. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass verschiedene Ceramidspezies die Chemotaxis von Zellen in unterschiedlicher Weise beeinflussen. In Neutrophilen führte vielmehr die Inhibierung der NSM-Aktivität zu einer verminderten Chemotaxis der Zellen (Sitrin et al, 2011). Die Bedeutung der NSM-Aktivität für die Chemotaxis von T-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht direkt untersucht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Ceramidlevel in T-Zellen einer strikten Regulation bedarf und sowohl die Erhöhung als auch die Erniedrigung des Ceramidpools in der Plasmamembran mit der chemotaktischen Bewegung der Zellen interferiert.

Zusätzlich zur verminderten T-Zell-Chemotaxis wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine reduzierte Beweglichkeit ceramidmodifizierter Zellen in Antwort auf SDF-1 α nachgewiesen (Abb.4.10). Die Migration der Zellen wurde mittels eines *under agarose assays* analysiert. In diesem Assay verwenden Leukozyten einen Migrationsmodus, der unabhängig von der integrinvermittelten Anbindung an das Substrat ist, weshalb die Bewegung der Zellen im Wesentlichen durch die Polymerisation von Aktinfilamenten angetrieben wird (Lammermann & Sixt, 2009). Die Ergebnisse des *under agarose assays* zeigen, dass ceramidmodifizierte Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen wesentlich kürzere Strecken zurücklegen, was folglich in einer reduzierten Geschwindigkeit der Zellen resultiert. Diese Befunde

zeigen erneut, dass Ceramide mit der chemokininduzierten Reorganisation des Aktinzytoskeletts interferieren, da ein kontinuierlicher Aktinfluss aufrechterhalten werden muss, um die Bewegung der Zellen zu gewährleisten.

Die dynamische Reorganisation des Aktinzytoskeletts bedarf sowohl der Aktivität aktinpolymerisierender als auch -depolymerisierender Faktoren. In Übereinstimmung damit konnte in der Arbeit von Klemke et al gezeigt werden, dass die Expression des aktinbindenden Proteins Cofilin, welches Aktinstränge durchtrennt und somit neue, freie Plusenden für die erneute Polymerisation von Aktinfilamenten schafft, für die 3D-Migration von T-Zellen notwendig ist (Klemke et al, 2010). Zudem wurde in der Arbeit von Klemke et al beschrieben, dass die Aktivität von Cofilin infolge der T-Zell-Stimulation mit SDF-1 α durch die Ras-vermittelte Aktivierung von MEK reguliert wird. MEK wiederum inhibiert die Aktivität der LIM-Kinase (LIMK), welche Serin 3 in Cofilin phosphoryliert und damit das Protein inaktiviert. Aktives Ras wurde in migrierenden T-Zellen überwiegend im *leading edge* detektiert, folglich wurden auch geringere Mengen phosphorylierten Cofilins im *leading edge* im Vergleich zum distalen Bereich der Zelle gefunden (Klemke et al, 2010). Die Dephosphorylierung und damit Aktivierung von Cofilin wird u.a. durch die *slingshot* Phosphatase bzw. PP1 und PP2A vermittelt (Ambach et al, 2000; Samstag et al, 2003). Da bereits beschrieben wurde, dass Ceramide die Aktivierung von PP1 bzw. PP2A induzieren (Ruvolo, 2003), stellt dies einen interessanten Mechanismus dar, wie Ceramide die Aktivität von Cofilin beeinflussen könnten. Eine erhöhte Aktivität von Cofilin durch die ceramidvermittelte Aktivierung von PP1 oder PP2A könnte in einer verstärkten Depolymerisation von Aktinfilamenten und somit in einer gestörten Migration der Zellen resultieren. Ob die Induktion von Ceramiden zu einer veränderten Regulation von Cofilin in T-Zellen führt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Dies wäre jedoch eine interessante Fragestellung, da auch in MV-kontaktierten T-Zellen eine gesteigerte Aktivierung von Cofilin beobachtet wurde (Müller et al, 2006).

Infolge der Chemokinstimulation von T-Zellen werden unterschiedliche Signalwege innerhalb der Zelle aktiviert, was in Polarisierung und Migration der Zellen in Richtung des Chemokingradienten resultiert (Thelen & Stein, 2008). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen keine eindeutige Beschreibung der Ereignisse zu, wie Ceramide mit Polarisierung und Migration von T-Zellen interferieren, die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR4 ist jedoch infolge der

Akkumulation von Ceramiden nicht verändert (Abb. 4.12). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Ceramide die Lokalisation des Rezeptors beeinflussen und dadurch das CXCR4-Signal beeinträchtigen. Ceramide verändern die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen, da sie innerhalb der Membran zu ceramidreichen Membrandomänen kondensieren (Holopainen et al, 1998; Kolesnick et al, 2000; Nurminen et al, 2002). Darüber hinaus beeinflussen Ceramide die Struktur von *lipid rafts*, da sie das Cholesterol aus diesen Membrandomänen verdrängen (Megha & London, 2004; Rouquette-Jazdanian et al, 2007). Obwohl die Assoziation von CXCR4 mit *lipid rafts* kontrovers diskutiert wird, konnten verschiedene Studien die Lokalisation des Rezeptors innerhalb von *lipid rafts* nachweisen (Kozak et al, 2002; Manes et al, 2000; Nguyen & Taub, 2002; Nguyen & Taub, 2003; Percherancier et al, 2003; Popik et al, 2002). Der Einfluss von Ceramiden auf die Organisation dieser Membrandomänen könnte demnach auch Konsequenzen für die Lokalisation des Chemokinrezeptors haben und somit die Signalweiterleitung des Rezeptors beeinträchtigen. Zudem wurde in der Literatur beschrieben, dass Cholesterol für Chemokinbindung und Signalweiterleitung des Rezeptors notwendig ist (Ablan et al, 2006; Nguyen & Taub, 2002; Nguyen & Taub, 2003). In den Arbeiten von Nguyen et al konnte gezeigt werden, dass die Depletion bzw. Oxidation von Cholesterol in einer verminderten Bindung von SDF-1 α an den Rezeptor resultiert, was auf eine konformationelle Änderung des Rezeptors zurückzuführen ist. Funktionell werden dadurch Calcium-Einstrom und Chemotaxis der Zellen in Antwort auf SDF-1 α gestört. Demnach wäre Cholesterol nicht ausschließlich für die Assoziation des Rezeptors mit *lipid rafts* erforderlich, sondern der Rezeptor wird durch die Wechselwirkung mit Cholesterol in einer aktiven Konformation gehalten. Es scheint allerdings unwahrscheinlich, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte auf eine konformationelle Änderung des Rezeptors zurückzuführen sind, da der in Abb. 4. 12 verwendete CXCR4-Antikörper ein konformationelles Epitop erkennt.

In Übereinstimmung mit der Unfähigkeit morphologisch zu polarisieren wurde infolge der Chemokinstimulation von T-Zellen auch eine abweichende Verteilung von CXCR4 sowie intrazellulärer Signalproteine in ceramidmodifizierten Zellen beobachtet (Abb. 4.13-4.14). Es ist in der Literatur beschrieben, dass G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR) wie CCR2, CCR5 und CXCR4 in polarisierten

T-Zellen im Bereich des *leading edge* akkumulieren, wobei die Polarisierung des Rezeptors durch die Chemokinstimulation induziert wird (Nieto et al, 1997; Samstag et al, 2003). Eine Polarisierung des CXCR4-Rezeptors konnte infolge der Akkumulation von Ceramiden nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.13), was darauf hindeutet, dass Ceramide mit dem CXCR4-Signal interferieren. Neben der Lokalisation von CXCR4 war gleichermaßen die Verteilung intrazellulärer Proteine infolge der Akkumulation von Ceramiden gestört (Abb 4.14). In dieser Arbeit wurde die Verteilung von PI3K, SHIP, pAkt und pERM-Proteinen untersucht. In polarisierten T-Zellen akkumulieren pERM-Proteine im Uropod der Zellen, wohingegen PI3K, SHIP und pAkt vermehrt im *leading edge* der Zellen lokalisiert sind. In ceramidmodifizierten Zellen wurde jedoch keine Relokalisation der Proteine in distinkte Bereiche der Zelle detektiert.

Unabhängig von der Lokalisation des Rezeptors könnten Ceramide auch intrazelluläre Signalwege beeinflussen, die infolge der Stimulation des Rezeptors aktiviert werden. Rac gilt als wesentlicher Faktor für die Ausbildung von Lamellipodien, weshalb die Rac-vermittelte Polymerisation von Aktinfilamenten für die T-Zell-Polarisierung essentiell ist (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004). Die Aktivierung von Rac infolge der Stimulation von Chemokinrezeptoren wird hauptsächlich durch den RacGEF DOCK-2 vermittelt (Fukui et al, 2001; Nombela-Arrieta et al, 2007). Darüber hinaus reguliert der *Par polarity complex* (*Par: partition-defective*) bestehend aus Par3, Par6 und PKC ζ die chemokininduzierte Polarisierung von T-Zellen. Dieser Komplex ist im *leading edge* lokalisiert und wird durch die Aktivität von Cdc42 induziert (Gerard et al, 2007). Die Expression einer dominant-negativen Mutante von Cdc42 verhindert ebenso wie die Überexpression einer Kinase-inaktiven Mutante von PKC ζ die Polarisierung von T-Zellen (Gerard et al, 2007; Real et al, 2007). Die Arbeit von Real et al zeigt, dass durch die Überexpression einer inaktiven PKC ζ -Mutante die Ausbildung eines Uropods in Antwort auf CCL-19 inhibiert wird. Akkumulationen von F-Aktin wurden jedoch in allen Bereichen der Zellen gefunden, ein Phänotyp, der dem in dieser Arbeit beobachteten Phänotyp ceramidmodifizierter Zellen sehr ähnelt. Die Akkumulation von Ceramiden verhindert zwar die chemokininduzierte Polarisierung der Zellen auf FN, jedoch ist in einigen Zellen (vor allem nach C₁₆-Inkubation) die Ausbildung von mehreren Membranausläufern zu beobachten, was

darauf hindeuten könnte, dass die initiale Polymerisation von Aktinfilamenten stattfindet, die Zellen jedoch nicht in der Lage sind ein Lamellipodium zu stabilisieren. Eine verminderte PKC ζ -Aktivität infolge der Akkumulation von Ceramiden erscheint allerdings unwahrscheinlich, da die ceramidvermittelte Aktivierung der Kinase in unterschiedlichen Zelltypen beschrieben wurde (Bourbon et al, 2002; Ruvolo, 2003; van Blitterswijk et al, 2003). Ceramide beeinflussen jedoch möglicherweise die Lokalisation der Kinase bzw. die Regulation weiterer, essentieller Proteine (u.a. Rho-GTPasen), wodurch die T-Zell-Polarisierung unterbunden wird. Interessanterweise konnte in MV-kontaktierten T-Zellen eine verminderte TCR-induzierte Aktivierung der GTPasen Cdc42 und Rac gezeigt werden (Müller et al, 2006), allerdings ist derzeit nicht bekannt, ob die Aktivität der Proteine gleichermaßen infolge der Stimulation mit Chemokinen beeinträchtigt wird. Da die verminderte Polarisierung MV-kontakter T-Zellen auf die MV-induzierte Ceramidgenerierung zurückzuführen ist, wäre dies jedoch einen möglicher Mechanismus, wie Ceramide mit der Polarisierung von T-Zellen interferieren.

Zusätzlich zur veränderten Lokalisation von Oberflächenproteinen und intrazellulären Molekülen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ceramide mit dem Aktivierungsstatus von Akt und ERM-Proteinen interferieren (Abb. 4.15-4.16). Infolge der Akkumulation von Ceramiden wurde eine verminderte Phosphorylierung von Akt nach Chemokin- bzw. CD3/CD28-Stimulation detektiert (Abb 4.16). Für unterschiedliche Zelllinien wurde bereits beschrieben, dass Ceramide durch die Aktivierung von PKC ζ bzw. PP2A die Aktivität von Akt negativ regulieren (Blouin et al, 2010; Bourbon et al, 2002; Dey et al, 2007; Doornbos et al, 1999; Fox et al, 2007; Hajduch et al, 2008; Mao et al, 2000). Die Phosphorylierung der Akt-Kinase wird durch die Aktivierung der PI3K und die nachfolgende Generierung von PIP3 induziert. PIP3 ermöglicht die Rekrutierung von PH-Domänen-enthaltenden Proteinen wie Akt zur Plasmamembran, woraufhin Akt durch die Aktivität von PDK1 phosphoryliert wird (Harris et al, 2008). Die verminderte Phosphorylierung von Akt ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Ceramide die Rekrutierung von Akt in bestimmte Signalcluster verhindern. Ein solcher Mechanismus wurde u.a. in Adipozyten beschrieben (Hajduch et al, 2008). In der Arbeit von Hajduch et al wird das Model postuliert, dass Ceramide die Rekrutierung von PKC ζ und Akt in Caveolin-reiche Membrandomänen vermitteln, wodurch die Phosphorylierung von Akt durch

PDK1 in weniger strukturierten Bereichen der Membran verhindert wird. Zudem wird die Phosphatase PTEN in Caveolin-reiche Membrandomänen rekrutiert, wodurch zusätzlich die Aktivierung von Akt unterbunden wird. Die Aktivierung von Akt ist zum einen für die Regulation des Zellzyklus von Bedeutung, zum anderen wurde in der Literatur beschrieben, dass Akt durch die Wechselwirkung mit Adaptorproteinen wie Girdin die Aktindynamik von Zellen reguliert und somit die Migration von Zellen beeinflusst (Stambolic & Woodgett, 2006). Ob die ceramidinduzierten Effekte auf die Zytoskelettdynamik von T-Zellen auf die verminderte Phosphorylierung von Akt zurückzuführen sind bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Neben der verminderten Phosphorylierung von Akt wurde auch eine veränderte Regulation von ERM-Proteinen beobachtet. Die Akkumulation von Ceramiden führte zu einer verminderten Phosphorylierung und damit Inaktivierung von Ezrin, wohingegen ein geringerer Einfluss auf die Phosphorylierung von Moesin detektiert wurde (Abb. 4.15). Der Einfluss von Ceramiden auf die Aktivierung von Ezrin ist in Übereinstimmung mit der Studie von Zeidan et al, in der nach Inkubation von MCF-7-Zellen mit C₁₈-Ceramid bzw. bSMase ebenfalls eine reduzierte Ezrin-Phosphorylierung beobachtet wurde (Zeidan et al, 2008). In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin gleichermaßen die Phosphorylierung von Ezrin beeinflusst, was auf die ASM-vermittelte Ceramidgenerierung und nachfolgende Aktivierung der Phosphatase PP2A zurückzuführen ist. Die Inkubation der Zellen mit Cisplatin resultierte zudem in einem Verlust von Membranextensionen sowie einer verminderten Migration der Zellen. Diese Effekte konnten jedoch durch die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von Ezrin aufgehoben werden, wodurch die Notwendigkeit der Ezrin-Aktivierung für die Migration der Zellen deutlich wird. Ob der für MCF-7-Zellen beobachtete Mechanismus der Ezrin-Dephosphorylierung auch für T-Zellen zutrifft, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Zudem wurde kein direkter Zusammenhang zwischen der reduzierten Ezrin-Phosphorylierung und der verminderten Migration von T-Zellen infolge der Akkumulation von Ceramiden erbracht. In mehreren Studien wurde jedoch bereits die Bedeutung der Ezrin-Aktivierung für Polarisation und Migration von Zellen beschrieben (Lee et al, 2004; Li et al, 2007b; Prag et al, 2007). Die Beobachtung, dass die Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante von Ezrin die Migration von T-Zellen sogar fördert, legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Effekte

von Ceramiden auf T-Zell-Polarisierung und –Migration, zumindest teilweise, durch die Inaktivierung von Ezrin vermittelt werden (Lee et al, 2004; Li et al, 2007b). Der Einfluss von Ceramiden auf die Phosphorylierung von ERM-Proteinen könnte darüber hinaus für die T-Zell-Aktivierung von Bedeutung sein, da die koordinierte Regulation von ERM-Proteinen für die Ausbildung der IS, den Calcium-Einstrom sowie die IL-2-Produktion notwendig ist (Faure et al, 2004; Ilani et al, 2007; Shaffer et al, 2009).

In einer neueren Studie von Canals et al konnte gezeigt werden, dass verschiedene Sphingolipide die Aktivität von ERM-Proteinen in unterschiedlicher Weise regulieren. Während Ceramide die Aktivität von ERM-Proteinen negativ regulieren, führt die Generierung von S1P zu einer Hyperphosphorylierung von ERM-Proteinen (Canals et al, 2010). Zudem wurde in dieser Arbeit beschrieben, dass die Inaktivierung von ERM-Proteinen direkt durch Ceramide vermittelt wird und nicht auf eine Reduktion des SM-Pools zurückzuführen ist. Dies lässt vermuten, dass auch in T-Zellen die Dephosphorylierung von Ezrin durch Ceramide vermittelt wird. Ceramide stellen jedoch ein zentrales Intermediat des Sphingolipidstoffwechsels dar. Ceramide können durch die Aktivität unterschiedlicher Enzyme in SM oder komplexere Sphingolipide metabolisiert werden. Ceramidasen bewirken die Umwandlung von Ceramid zu Sphingosin. Durch die Aktivität von Proteinkinasen entstehen aus Ceramid und Sphingosin C1P und S1P, welche ebenfalls zu den biologisch aktiven Sphingolipiden gehören (Bartke & Hannun, 2009). Es kann daher nicht eindeutig geschlussfolgert werden, ob die in dieser Arbeit beobachteten Effekte ausschließlich durch die Akkumulation von Ceramiden induziert werden. Gleichmaßen könnte die Generierung anderer Sphingolipidspezies Ursache für die beobachteten Effekte sein. Eine Erhöhung des S1P-Pools scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da S1P als Gegenspieler von Ceramiden gilt und die Migration bzw. die Proliferation von Zellen fördert (Hannun & Obeid, 2008).

In der Literatur wurde bereits mehrfach beschrieben, dass Ceramide in der Lage sind die Adhärenz unterschiedlicher Zelltypen negativ zu beeinflussen, wobei die verminderte Adhärenz der Zellen meist auf eine veränderte Oberflächenexpression von Integrinen zurückzuführen ist (Feldhaus et al, 2002; Hu et al, 2005; Lee et al, 2010; Panigone et al, 2001). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte in dieser Arbeit ebenfalls eine reduzierte Adhärenz ceramidmodifizierter T-Zellen an FN bzw.

ICAM-1 gezeigt werden (Abb. 4.4-4.5). Folglich wird sowohl die β 1- als auch die β 2-integrinvermittelte Adhärenz von T-Zellen durch die Akkumulation von Ceramiden gestört. Eine verminderte Oberflächenexpression von β 1-Integrinen bzw. LFA-1 konnte infolge der Akkumulation von Ceramiden jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass anzunehmen ist, dass Ceramide mit der Integrinaktivierung interferieren. Es gibt zwei Mechanismen, die bei der Integrinaktivierung eine Rolle spielen: zum einen wird durch eine Konformationsänderung der Integrine die Affinität für den Liganden erhöht, zum anderen wird bewirkt das Clustering von Integrinen eine Steigerung der Avidität (Hogg et al, 2003). Die Adhärenz ceramidmodifizierter Zellen an FN wurde in der Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen untersucht. Durch die Zugabe divalenter Ionen wird *in vitro* der Wechsel von der niederaffinen zur hochaffinen Integrinkonformation induziert (Hogg et al, 2003), so dass die in dieser Arbeit dargestellten Befunde die Vermutung nahe legen, dass ceramidmodifizierte Zellen nicht in der Lage sind diese Konformationsänderung zu vollziehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen ist, dass Ceramide die Integrinaktivierung beeinträchtigen, indem sie das Clustering von Integrinrezeptoren beeinflussen. Das TCR-induzierte Clustering von Integrinrezeptoren bedarf der Reorganisation des Zytoskeletts, da die Integrinbindung an das Zytoskelett zunächst gelöst werden muss, um die laterale Beweglichkeit der Moleküle zu ermöglichen (Barreiro et al, 2007). Da, wie in dieser und in vorherigen Arbeiten gezeigt, Ceramide die stimulationsabhängige Zytoskelettorganisation von T-Zellen beeinträchtigen (Gassert et al, 2009), könnte somit auch das Clustering von Integrinmolekülen infolge der Akkumulation von Ceramiden gestört werden. Zudem ist in der Literatur bekannt, dass durch Interaktion von Integrinen mit aktinbindenden Proteinen wie Talin die Integrinaktivierung reguliert wird (Tadokoro et al, 2003).

Neben der exogenen Akkumulation von Ceramiden wurde zudem der Einfluss der MV-induzierten Ceramidgenerierung auf Chemotaxis und Migration der Zellen untersucht. Überraschenderweise ist die jedoch chemotaktische Aktivität in Antwort auf SDF-1 α von MV-kontaktierten Zellen im Vergleich zu MOCK-behandelten Zellen nicht verändert (Abb. 4.8). Dies steht im Gegensatz zur verminderten Chemotaxis, die nach Akkumulation von Ceramiden durch bSMase bzw. C₁₆ beobachtet wurde. Die beobachteten Unterschiede sind möglicherweise auf eine geringere Ceramidinduktion infolge des MV-Kontaktes zurückzuführen, allerdings wurde der

Ceramidlevel auf der Zelloberfläche nach MV-Kontakt bzw. bSMase- oder C₁₆-Inkubation nicht verglichen. Die Beobachtung, dass die verminderte T-Zell-Chemotaxis von der verwendeten bSMase-Dosis abhängig ist (Abb 4.6), unterstützt jedoch die Vermutung, dass nicht ausreichende Mengen an Ceramiden infolge des MV-Kontaktes generiert werden, um einen Effekt auf die Chemotaxis der Zellen zu beobachten. Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass noch 1 h nachdem die Zellen mit bSMase inkubiert wurden der Ceramidlevel auf der Oberfläche der Zellen leicht erhöht ist (Abb. 4.1). Infolge des MV-Kontaktes wird das Basisniveau nach etwa 20 min bis 30 min wieder hergestellt (Gassert et al, 2009).

Im Gegensatz zu diesen Befunden zeigten MV-kontaktierte Zellen im *under agarose* assay eine verringerte Beweglichkeit im Vergleich zu MOCK-behandelten Zellen. Dieser Effekt ist zudem auf die MV-induzierte Generierung von Ceramiden zurückzuführen, da Zellen, in denen die ASM-Aktivität vor MV-Kontakt pharmakologisch inhibiert wurde, annähernd identische Geschwindigkeiten wie MOCK-behandelte Zellen aufwiesen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die MV-induzierten Effekte auf die T-Zell-Polarisierung ebenfalls durch Ceramide vermittelt werden (Gassert et al, 2009). Die Induktion von Ceramiden stellt somit einen Mechanismus dar, wie MV mit der Zytoskelettdynamik von T-Zellen interferiert. Das unterschiedliche Migrationsverhalten MV-kontakter Zellen im Chemotaxisassay im Vergleich zum *under agarose assay* ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass im *under agarose assay* die Bewegung der Zellen allein durch die Polymerisation von Aktinfilamenten angetrieben wird. So sind die Ceramid-induzierten Effekte auf die Zytoskelettdynamik von T-Zellen in diesem Assay möglicherweise stärker ausgeprägt als in einem Transwell-Filtersystem, in dem Aktin-Myosin-vermittelte Kontraktionen des Zellkörpers die treibende Kraft für die Bewegung darstellen. Geht man davon aus, dass durch den Kontakt mit MV geringere Ceramidmengen induziert werden als durch die Inkubation mit bSMase oder C₁₆-Ceramid, wären diese zwar ausreichend, um eine verminderte Beweglichkeit im *under agarose assay* zu beobachten, die Migration im Transwell-Filtersystem bleibt jedoch unverändert.

Neben der ceramidinduzierten Dephosphorylierung von ERM-Proteinen (Abb. 4.15) führt auch der Kontakt mit MV zu einer verminderten Aktivierung von Ezrin und Moesin (Müller et al, 2006). Ob die verminderte ERM-Phosphorylierung nach MV-

Kontakt durch die MV-induzierte Generierung von Ceramiden vermittelt wird, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Dies wäre jedoch eine interessante Fragestellung, da die verminderte Phosphorylierung von ERM-Proteinen einen möglichen Mechanismus darstellt, wie Ceramide mit Polarisierung und Migration der Zellen interferieren.

5.2 Rolle von Ceramiden für Aktivierung und Proliferation von T-Zellen

Die Ausbildung einer IS zwischen DCs und T-Zellen ist ein wesentlicher Schritt im Verlauf der T-Zell-Aktivierung. Die Bedeutung der Ceramidinduktion für die Konjugatbildung wurde jedoch bisher noch nicht untersucht. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Ceramide nicht an der Kontaktfläche zwischen DC und T-Zelle akkumulieren, sondern vielmehr von der Kontaktstelle ausgeschlossen werden (Abb. 4.17). Die Analyse von T-Zellen, welche mit α -CD3/ α -CD28-beschichteten Mikrokügelchen stimuliert wurden, bestätigt dieses Ergebnis, da auch in diesem Ansatz keine Ceramidreicherungen im Bereich der Kontaktstelle detektiert wurden (Abb. 4.18). Dies deutet darauf hin, dass Ceramide möglicherweise die Signalweiterleitung bzw. die Zusammenlagerung von Signalkomplexen an der Kontaktstelle negativ beeinflussen, weshalb ceramidreiche Domänen aus der Synapse ausgeschlossen werden. In Übereinstimmung damit findet zwar eine Polarisierung ASM-enthaltender, vesikulärer Kompartimente zur Synapse statt, diese scheinen jedoch nicht mit der Plasmamembran zu fusionieren (Abb. 4.19). Infolge der Überexpression einer HA-getaggten ASM in T-Zellen, wurde die gleiche Verteilung von ASM in Konjugaten beobachtet, so dass eine unspezifische Bindung des Antikörpers ausgeschlossen werden kann (Abb. 4.19).

Obwohl die Ceramidverteilung innerhalb von Konjugaten vermuten lässt, dass Ceramide die Synapsenbildung negativ beeinflussen, wird die Architektur der Synapse durch die Induktion von Ceramiden auf T-Zellen nicht verändert, da eine normale Verteilung von CD3 und des MTOC in DC/T-Zell-Konjugaten beobachtet wurde (Abb. 4.20). Somit scheint das unmittelbare TCR-Signal infolge der Induktion von Ceramiden nicht verändert zu sein, da für die Translokation des MTOC zur Synapse TCR-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierungen sowie die Aktivierung von *src*-

Kinasen, Lck, Fyn und ZAP-70 notwendig sind (Blanchard et al, 2002; Lowin-Kropf et al, 1998; Martin-Cofreces et al, 2006). In Übereinstimmung damit führte auch die Inkubation von Jurkat-Zellen mit bSMase zu keiner veränderten TCR-induzierten Tyrosin-Phosphorylierung (Rouquette-Jazdanian et al, 2007). Diese Daten sind insofern überraschend, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, die chemokininduzierte Polarisierung von T-Zellen durch die Akkumulation von Ceramiden beeinträchtigt wird (Abb. 4.3). Hingegen wird die Polarisierung der Zellen infolge eines spezifischen Kontaktes mit DCs durch die Akkumulation von Ceramiden nicht verändert. Diese Unterschiede sind möglicherweise auf die unterschiedliche Bedeutung von *lipid rafts* für das CXCR4- bzw. TCR-Signal zurückzuführen. In APC/T-Zell-Konjugaten wurden zwar höher strukturierte Membranbereiche innerhalb des pSMACs beschrieben (Owen et al, 2010), die Bildung von TCR-Mikroclustern bzw. des cSMACs findet jedoch unabhängig von *lipid rafts* statt (Hashimoto-Tane et al, 2010). Zudem konnte in der Arbeit von Rouquette-Jazdanian gezeigt werden, dass *raft*-Marker wie Lck, Lat, CD55 oder GM1 in der Lage sind an ceramidreiche/cholesterolarme Membrandomänen zu binden und dass das unmittelbare TCR-Signal durch die Depletion des Cholesterols nicht beeinträchtigt wird. Hingegen ist für das CXCR4-Signal das Vorhandensein von Cholesterol essentiell (Ablan et al, 2006; Nguyen & Taub, 2002; Nguyen & Taub, 2003). Da Ceramide in der Lage sind die Struktur von *lipid rafts* zu verändern, indem sie das Cholesterol aus diesen Membranbereichen verdrängen (Megha & London, 2004; Rouquette-Jazdanian et al, 2007), wäre dies ein möglicher Mechanismus, wie Ceramide zwar das CXCR4-Signal beeinträchtigen, das unmittelbare TCR-Signal jedoch unverändert bleibt.

Zusätzlich zur normalen Verteilung von IS-Molekülen wird auch die Konjugatfrequenz infolge der Induktion von Ceramiden nicht beeinflusst, unabhängig davon, ob DCs oder T-Zellen mit bSMase vorbehandelt wurden oder ob das Enzym direkt zur Kokultur gegeben wurde (Abb. 4.21-4.22). Dies scheint im Widerspruch zur verminderten Adhärenz ceramidmodifizierter T-Zellen an ICAM-1 zu stehen (Abb. 4.5), allerdings wurde in dieser Arbeit allein die Bedeutung der Ceramidgenerierung für die Interaktion von LFA-1 und ICAM-1 untersucht. Die verminderte Bindung von LFA-1 an ICAM-1 wird in DC/T-Zell-Konjugaten möglicherweise durch die Interaktion anderer Adhäsionsmoleküle mit ihren jeweiligen Bindungspartnern kompensiert, beispielsweise CD2/LFA-3. Der unterschiedliche Einfluss von Ceramiden auf Zell-Substrat- bzw. Zell-Zell-Interaktion wurde auch für Neutrophile beschrieben. Die

Inkubation von Neutrophilen mit SMase führte zwar zu einer verminderten Adhärenz der Zellen an Gelatine, welche durch $\beta 2$ -Integrine vermittelt wird, das Clustering von Neutrophilen nach PMA- oder fMLP-Stimulation blieb infolge der Inkubation mit bSMase jedoch unverändert (Feldhaus et al, 2002).

Neben der Induktion von Ceramiden hatte auch die pharmakologische Inhibierung der ASM- oder NSM-Aktivität in T-Zellen bzw. der genetische Knockout von ASM in DCs oder T-Zellen keinen Einfluss auf die Konjugatfrequenz (Abb. 4.23-4.24). Dies ist in Übereinstimmung mit der Studie von Herz et al, in der die Konjugatfrequenz zwischen ASM^{-/-} CD8⁺ T-Zellen und den Zielzellen im Vergleich zur Konjugatfrequenz zwischen Wildtypzellen und den Zielzellen ebenfalls nicht verändert war, allerdings handelt es sich dabei um die Ausbildung einer zytotoxischen Synapse. Darüber hinaus konnte in der Arbeit von Herz et al gezeigt werden, dass die fehlende ASM-Aktivität in T-Zellen die initiale Ausbildung der zytotoxischen Synapse nicht beeinflusst, da eine normale Verteilung von Talin in diesen Konjugaten detektiert wurde und die zytoplasmatischen Granula der Zellen zur Kontaktfläche polarisieren. Die ASM-Aktivität ist jedoch für die Funktionalität der Konjugate notwendig, da ASM^{-/-} CD8⁺ T-Zellen nicht in der Lage waren den Inhalt der Granula zu entleeren, wodurch die zytotoxische Aktivität der Zellen vermindert wird (Herz et al, 2009).

Obwohl Ceramide die Konjugatfrequenz und die Lokalisation von CD3 bzw. des MTOC nicht verändern, wird jedoch die Funktionalität der Konjugate durch die Akkumulation von Ceramiden beeinträchtigt, da infolge der Akkumulation von Ceramiden ein verminderter Calcium-Einstrom sowie eine reduzierte Proliferation von T-Zellen nachgewiesen wurde (Abb. 4.26-4-27). Es ist in der Literatur beschrieben, dass T-Zellen Orai1 und Stim1 zur Kontaktstelle translozieren, wodurch ein lokaler Calcium-Einstrom an der Synapse vermittelt wird (Lioudyno et al, 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Akkumulation von Ceramiden die Translokation von Orai1 und Stim1 zur Synapse beeinträchtigt wird (Abb. 4.25). Darüber hinaus wurde ein verminderter Calcium-Einstrom in DC/T-Zell-Konjugaten infolge der Induktion von Ceramiden detektiert (Abb. 4.26). Dies ist in Übereinstimmung mit Studien, die belegen, dass Ceramide mit der Aktivität von Calcium-Kanälen interferieren. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass sowohl die stimulationsabhängige Induktion von Ceramiden als auch die exogene Akkumulation von Ceramiden mit dem Calcium-Einstrom in T-Zellen interferiert

(Church et al, 2005; Lepple-Wienhues et al, 1999; Rouquette-Jazdanian et al, 2007). In murinen APC/T-Zell-Konjugaten wurde infolge der Inkubation von T-Zellen mit C₂-Ceramid ebenfalls ein verminderter Calcium-Influx beobachtet (Detre et al, 2006). Bedingt durch den verringerten Calcium-Einstrom konnte in einigen Studien auch eine verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT sowie eine reduzierte IL-2-Produktion nach Akkumulation von Ceramiden gezeigt werden (Detre et al, 2006; Lepple-Wienhues et al, 1999). Der Einfluss von Ceramiden auf die Aktivierung von NFAT oder die Produktion von IL-2 wurde in dieser Arbeit zwar nicht untersucht, in Übereinstimmung mit dem verminderten Calcium-Signal und der verringerten Phosphorylierung von Akt (Abb. 4.16) wurde allerdings eine reduzierte Proliferation ceramidmodifizierter Zellen nach CD3/CD28-Stimulation beobachtet (Abb. 4.27). Die Expression von CD3 und CD28 wird durch die Akkumulation von Ceramiden nicht verändert (Abb. 4.16), so dass auszuschließen ist, dass die Inhibierung der Proliferation auf eine verminderte Expression von CD3 und CD28 zurückzuführen ist. Allerdings ist die Inhibierung der Proliferation von der Ceramidkonzentration abhängig, da eine Konzentration von 50 µM C₁₆-Ceramid die Proliferation der Zellen nur marginal inhibierte, während der Effekt bei einer Konzentration von 100 µM C₁₆-Ceramid deutlich ausgeprägt war. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Ceramid-induzierte Reduktion des Calcium-Signals bzw. der IL-2-Produktion ebenfalls konzentrationsabhängig ist (Detre et al, 2006).

Im Gegensatz zur Akkumulation von Ceramiden führte die pharmakologische Inhibierung der ASM- bzw. NSM-Aktivität in T-Zellen zu keiner verminderten Proliferation der Zellen in einer MLR (Abb. 4.28). Untersuchungen zur Proliferation von ASM^{-/-}-Zellen haben zudem gezeigt, dass eine fehlende ASM-Aktivität in T-Zellen die Proliferation der Zellen sogar fördert (Abb. 4.29). Der genetische Knockout von ASM in DCs resultierte hingegen in einer verminderten T-Zell-Proliferation, was darauf hindeutet, dass eine funktionelle ASM in DCs für die Proliferation von T-Zellen notwendig ist. Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Befunde kann die unterschiedliche Bedeutung der ASM-Aktivität für die Proliferation von T-Zellen nicht erklärt werden. In der Literatur ist bekannt, dass die Stimulation von CD40 die Aktivierung von ASM und nachfolgende Ceramidgenerierung induziert (Grassme et al, 2002). Somit wäre die verminderte stimulatorische Aktivität von ASM^{-/-}-DCs möglicherweise auf die Notwendigkeit der ASM-Aktivierung für das

CD40-Signal zurückzuführen. Dies bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die Proliferation von ASM^{-/-}-Zellen ist verglichen mit Wildtypzellen allerdings nicht verringert (Abb. 4.29). Dies ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Herz et al, in der gezeigt werden konnte, dass die Anzahl antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen in ASM^{-/-}-Mäusen gegenüber Wildtypmäusen ebenfalls nicht verändert ist. Durch das Fehlen der ASM-Aktivität wird somit die Generierung von Effektorzellen nicht beeinträchtigt (Herz et al, 2009).

6 Zusammenfassung

Ceramide sind biologisch aktive Sphingolipide, die verschiedene zelluläre Signalwege regulieren, meist im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose oder der Regulation des Zellzyklus. Darüber hinaus wurde in der Literatur beschrieben, dass Ceramide die Zytoskelettdynamik unterschiedlicher Zelltypen beeinflussen, die Bedeutung von Ceramiden für die Funktion von T-Zellen wurde allerdings bisher wenig untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die exogene Akkumulation von Ceramiden ebenso wie die Generierung von Ceramiden durch bSMase die Adhärenz von T-Zellen an FN bzw. ICAM-1 beeinträchtigt. Des Weiteren konnte eine verminderte T-Zell-Polarisierung auf FN sowie eine reduzierte Chemotaxis und Motilität ceramidmodifizierter T-Zellen in Antwort auf SDF-1 α nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der Unfähigkeit ceramidmodifizierter Zellen morphologisch zu polarisieren wird ferner die Relokalisation von Oberflächenmolekülen und intrazellulärer Proteine durch die Akkumulation von Ceramiden gestört. Überdies konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ceramide mit dem Aktivierungsstatus von Akt und ERM-Proteinen interferieren, da eine verminderte stimulationsabhängige Phosphorylierung von Akt und ERM-Proteinen in ceramidmodifizierten Zellen nachgewiesen wurde.

Ein wesentlicher Schritt im Verlauf der T-Zell-Aktivierung ist die Ausbildung einer immunologischen Synapse mit dendritischen Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass, obwohl ceramidreiche Membrandomänen von der Kontaktstelle ausgeschlossen werden, Konjugatfrequenz und Architektur der IS durch die Induktion von Ceramiden nicht beeinflusst werden, da eine normale Verteilung von CD3 und des MTOC beobachtet wurde. Allerdings wird die Funktionalität der Konjugate durch die Induktion von Ceramiden beeinträchtigt. Ceramidmodifizierte Zellen waren nur eingeschränkt in der Lage Orai1 und Stim1 zur Kontaktfläche mit DCs zu translozieren. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde auch ein verminderter Calcium-Einstrom sowie eine verminderte Proliferation infolge der Akkumulation von Ceramiden detektiert. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Ceramide wesentliche Prozesse im Verlauf der T-Zell-Aktivierung beeinflussen, so dass die Pathogen-induzierte Generierung von

Ceramiden einen möglichen Mechanismus darstellt, die Funktion von T-Zellen zu beeinträchtigen.

.

7 Summary

Ceramides are sphingolipids regulating various signalling pathways mainly associated with the induction of apoptosis and cell cycle arrest. Besides their established role in these processes several lines of evidence suggest that ceramides also regulate cytoskeletal dynamics in non-hematopoietic cells, but their role in T lymphocyte function has not yet been addressed. In this study we show that accumulation of membrane ceramides affects several processes required for accurate T cell function. Treatment of T cells with bSMase or exogenously added ceramides interfered with T cell adhesion to FN and ICAM-1 as well as T cell polarisation, chemotaxis and motility in response to SDF-1 α . In line with the impairment to morphologically polarise, relocation of surface receptors as well as intracellular signalling molecules was also impaired upon ceramide treatment of T cells. Moreover, increase in cellular ceramide levels interfered with cellular signalling pathways as revealed by reduced phosphorylation levels of Akt and ERM-proteins.

T cell activation requires the formation of an IS with DCs. In this study we could show, that ceramides, although excluded from the DC/T cell interface, do not interfere with conjugate frequency or synapse organisation, since a normal distribution of CD3 and the MTOC was observed. Nevertheless, ceramide generation interfered with the translocation of Orai1 and Stim1 to the interface and in line with this observation a reduced calcium-influx in T cells was detected upon bSMase exposure. In addition to the decrease in cytosolic calcium levels ceramides also reduced the ability of T cells to proliferate in response to CD3/CD28-stimulation. Therefore the induction of ceramides by certain pathogens, including MV, might be a possible mechanism to interfere with essential processes required for T cell activation.

8 Literaturverzeichnis

- Abdel Shakor AB, Kwiatkowska K, Sobota A (2004) Cell surface ceramide generation precedes and controls FcγRII clustering and phosphorylation in rafts. *J Biol Chem* **279**: 36778-36787
- Ablan S, Rawat SS, Viard M, Wang JM, Puri A, Blumenthal R (2006) The role of cholesterol and sphingolipids in chemokine receptor function and HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. *Virology* **3**: 104
- Abt M, Gassert E, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells. *J Gen Virol* **90**: 909-914
- Ambach A, Saunus J, Konstandin M, Wesselborg S, Meuer SC, Samstag Y (2000) The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **30**: 3422-3431
- Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J (2003) CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol* **84**: 1189-1197
- Anes E, Kuhnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G (2003) Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* **5**: 793-802
- Avota E, Avots A, Niewiesk S, Kane LP, Bommhardt U, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2001) Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nat Med* **7**: 725-731
- Avota E, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2011) DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells. *PLoS Pathog* **7**: e1001290
- Avota E, Muller N, Klett M, Schneider-Schaulies S (2004) Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts. *J Virol* **78**: 9552-9559
- Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**: 245-252
- Banerjee AK (1987) The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* **48**: 363-364
- Bankamp B, Hodge G, McChesney MB, Bellini WJ, Rota PA (2008) Genetic changes that affect the virulence of measles virus in a rhesus macaque model. *Virology* **373**: 39-50

- Bankamp B, Wilson J, Bellini WJ, Rota PA (2005) Identification of naturally occurring amino acid variations that affect the ability of the measles virus C protein to regulate genome replication and transcription. *Virology* **336**: 120-129
- Barenholz Y, Thompson TE (1980) Sphingomyelins in bilayers and biological membranes. *Biochim Biophys Acta* **604**: 129-158
- Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F (2007) Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* **218**: 147-164
- Bartke N, Hannun YA (2009) Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* **50 Suppl**: S91-96
- Bellini WJ, Englund G, Rozenblatt S, Arnheiter H, Richardson CD (1985) Measles virus P gene codes for two proteins. *J Virol* **53**: 908-919
- Bellini WJ, Rota JS, Lowe LE, Katz RS, Dyken PR, Zaki SR, Shieh WJ, Rota PA (2005) Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis* **192**: 1686-1693
- Bellini WJ, Rota JS, Rota PA (1994) Virology of measles virus. *J Infect Dis* **170 Suppl 1**: S15-23
- Bilderback TR, Gazula VR, Dobrowsky RT (2001) Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways. *J Neurochem* **76**: 1540-1551
- Billadeau DD, Nolz JC, Gomez TS (2007) Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* **7**: 131-143
- Bionda C, Hadchity E, Alphonse G, Chapet O, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D (2007) Radioresistance of human carcinoma cells is correlated to a defect in raft membrane clustering. *Free Radic Biol Med* **43**: 681-694
- Blanchard N, Di Bartolo V, Hivroz C (2002) In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* **17**: 389-399
- Blouin CM, Prado C, Takane KK, Lasnier F, Garcia-Ocana A, Ferre P, Dugail I, Hajduch E (2010) Plasma membrane subdomain compartmentalization contributes to distinct mechanisms of ceramide action on insulin signaling. *Diabetes* **59**: 600-610
- Blumberg BM, Kolakofsky D (1981) Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol* **40**: 568-576
- Bollinger CR, Teichgraber V, Gulbins E (2005) Ceramide-enriched membrane domains. *Biochim Biophys Acta* **1746**: 284-294

- Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M (2002) Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ζ : implications for growth arrest. *J Biol Chem* **277**: 3286-3292
- Bretscher A, Edwards K, Fehon RG (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 586-599
- Bromley SK, Burack WR, Johnson KG, Somersalo K, Sims TN, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML (2001) The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**: 375-396
- Brossard C, Feuillet V, Schmitt A, Randriamampita C, Romao M, Raposo G, Trautmann A (2005) Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* **35**: 1741-1753
- Brown DA, London E (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 111-136
- Burkhardt JK, Carrizosa E, Shaffer MH (2008) The actin cytoskeleton in T cell activation. *Annu Rev Immunol* **26**: 233-259
- Canals D, Jenkins RW, Roddy P, Hernandez-Corbacho MJ, Obeid LM, Hannun YA (2010) Differential effects of ceramide and sphingosine 1-phosphate on ERM phosphorylation: probing sphingolipid signaling at the outer plasma membrane. *J Biol Chem* **285**: 32476-32485
- Cathomen T, Mrkic B, Spehner D, Drillien R, Naef R, Pavlovic J, Aguzzi A, Billeter MA, Cattaneo R (1998a) A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* **17**: 3899-3908
- Cathomen T, Naim HY, Cattaneo R (1998b) Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* **72**: 1224-1234
- Cattaneo R, Kaelin K, Baczko K, Billeter MA (1989) Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56**: 759-764
- Cattaneo R, Rebmann G, Schmid A, Baczko K, ter Meulen V, Billeter MA (1987) Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* **6**: 681-688
- Chalfant CE, Kishikawa K, Mumby MC, Kamibayashi C, Bielawska A, Hannun YA (1999) Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**: 20313-20317
- Charrin S, Alcover A (2006) Role of ERM (ezrin-radixin-moesin) proteins in T lymphocyte polarization, immune synapse formation and in T cell receptor-mediated signaling. *Front Biosci* **11**: 1987-1997

- Charruyer A, Grazide S, Bezombes C, Muller S, Laurent G, Jaffrezou JP (2005) UV-C light induces raft-associated acid sphingomyelinase and JNK activation and translocation independently on a nuclear signal. *J Biol Chem* **280**: 19196-19204
- Church LD, Hessler G, Goodall JE, Rider DA, Workman CJ, Vignali DA, Bacon PA, Gulbins E, Young SP (2005) TNFR1-induced sphingomyelinase activation modulates TCR signaling by impairing store-operated Ca²⁺ influx. *J Leukoc Biol* **78**: 266-278
- Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, Gulbins E, Kolesnick R (2001) Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* **276**: 23954-23961
- Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R (2002) Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett* **531**: 47-53
- Daleke DL (2008) Regulation of phospholipid asymmetry in the erythrocyte membrane. *Curr Opin Hematol* **15**: 191-195
- de Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerongen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD (2007) Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog* **3**: e178
- de Vries RD, Lemon K, Ludlow M, McQuaid S, Yuksel S, van Amerongen G, Rennick LJ, Rima BK, Osterhaus AD, de Swart RL, Duprex WP (2010) In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. *J Virol* **84**: 4714-4724
- de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB (2006) Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* **80**: 3477-3486
- de Witte L, de Vries RD, van der Vlist M, Yuksel S, Litjens M, de Swart RL, Geijtenbeek TB (2008) DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes. *PLoS Pathog* **4**: e1000049
- del Pozo MA, Nieto M, Serrador JM, Sancho D, Vicente-Manzanares M, Martinez C, Sanchez-Madrid F (1998) The two poles of the lymphocyte: specialized cell compartments for migration and recruitment. *Cell Adhes Commun* **6**: 125-133
- Detre C, Kiss E, Varga Z, Ludanyi K, Paszty K, Enyedi A, Kovcsdi D, Panyi G, Rajnavolgyi E, Matko J (2006) Death or survival: membrane ceramide controls the fate and activation of antigen-specific T-cells depending on signal strength and duration. *Cell Signal* **18**: 294-306
- Dey R, Majumder N, Bhattacharjee S, Majumdar SB, Banerjee R, Ganguly S, Das P, Majumdar S (2007) Leishmania donovani-induced ceramide as the key mediator of Akt dephosphorylation in murine macrophages: role of protein kinase C ζ and phosphatase. *Infect Immun* **75**: 2136-2142
- Di Bartolomeo S, Spinedi A (2002) Ordering ceramide-induced cell detachment and apoptosis in human neuroepithelioma. *Neurosci Lett* **334**: 149-152

Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA (1993) Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem* **268**: 15523-15530

Doornbos RP, Theelen M, van der Hoeven PC, van Blitterswijk WJ, Verkleij AJ, van Bergen en Henegouwen PM (1999) Protein kinase Czeta is a negative regulator of protein kinase B activity. *J Biol Chem* **274**: 8589-8596

Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295-305

Dumitru CA, Gulbins E (2006) TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene* **25**: 5612-5625

Engelking O, Fedorov LM, Lilischkis R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (1999) Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins. *J Gen Virol* **80 (Pt 7)**: 1599-1608

Erlenhoefler C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J (2001) CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* **75**: 4499-4505

Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J (2002) Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* **83**: 1431-1436

Escoffier C, Manie S, Vincent S, Muller CP, Billeter M, Gerlier D (1999) Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* **73**: 1695-1698

Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassme H, Gulbins E (2001) Mechanisms of *Staphylococcus aureus* induced apoptosis of human endothelial cells. *Apoptosis* **6**: 431-439

Esolen LM, Ward BJ, Moench TR, Griffin DE (1993) Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* **168**: 47-52

Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629-635

Faure S, Salazar-Fontana LI, Semichon M, Tybulewicz VL, Bismuth G, Trautmann A, Germain RN, Delon J (2004) ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* **5**: 272-279

Feldhaus MJ, Weyrich AS, Zimmerman GA, McIntyre TM (2002) Ceramide generation in situ alters leukocyte cytoskeletal organization and beta 2-integrin function and causes complete degranulation. *J Biol Chem* **277**: 4285-4293

Feske S (2007) Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* **7**: 690-702

- Fievet BT, Gautreau A, Roy C, Del Maestro L, Mangeat P, Louvard D, Arpin M (2004) Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J Cell Biol* **164**: 653-659
- Finnegan CM, Blumenthal R (2006) Fenretinide inhibits HIV infection by promoting viral endocytosis. *Antiviral Res* **69**: 116-123
- Finnegan CM, Rawat SS, Cho EH, Guiffre DL, Lockett S, Merrill AH, Jr., Blumenthal R (2007) Sphingomyelinase restricts the lateral diffusion of CD4 and inhibits human immunodeficiency virus fusion. *J Virol* **81**: 5294-5304
- Finnegan CM, Rawat SS, Puri A, Wang JM, Ruscetti FW, Blumenthal R (2004) Ceramide, a target for antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 15452-15457
- Fontana JM, Bankamp B, Bellini WJ, Rota PA (2008) Regulation of interferon signaling by the C and V proteins from attenuated and wild-type strains of measles virus. *Virology* **374**: 71-81
- Fooksman DR, Vardhana S, Vasiliver-Shamis G, Liese J, Blair DA, Waite J, Sacristan C, Victora GD, Zanin-Zhorov A, Dustin ML (2010) Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annu Rev Immunol* **28**: 79-105
- Forthal DN, Aarnaes S, Blanding J, de la Maza L, Tilles JG (1992) Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis* **166**: 421-424
- Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, Unal O, Yun JK, Naides SJ, Kester M (2007) Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem* **282**: 12450-12457
- Freiberg BA, Kupfer H, Maslanik W, Delli J, Kappler J, Zaller DM, Kupfer A (2002) Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* **3**: 911-917
- Friedl P (2004) Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 14-23
- Friedl P, Brocker EB (2000) T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev Immunol* **7**: 249-266
- Friedl P, den Boer AT, Gunzer M (2005) Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**: 532-545
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zanker KS (1998) CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur J Immunol* **28**: 2331-2343
- Friedl P, Gunzer M (2001) Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol* **22**: 187-191

- Friedl P, Weigelin B (2008) Interstitial leukocyte migration and immune function. *Nat Immunol* **9**: 960-969
- Fugier-Vivier I, Servet-Delprat C, Rivaller P, Rissoan MC, Liu YJ, Roubourdin-Combe C (1997) Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* **186**: 813-823
- Fukui Y, Hashimoto O, Sanui T, Oono T, Koga H, Abe M, Inayoshi A, Noda M, Oike M, Shirai T, Sasazuki T (2001) Haematopoietic cell-specific CDM family protein DOCK2 is essential for lymphocyte migration. *Nature* **412**: 826-831
- Galadari S, Kishikawa K, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA (1998) Purification and characterization of ceramide-activated protein phosphatases. *Biochemistry* **37**: 11232-11238
- Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS Pathog* **5**: e1000623
- Gerard A, Mertens AE, van der Kammen RA, Collard JG (2007) The Par polarity complex regulates Rap1- and chemokine-induced T cell polarization. *J Cell Biol* **176**: 863-875
- Grassme H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E (2003a) Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* **22**: 5457-5470
- Grassme H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF (1997) Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell* **91**: 605-615
- Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, Kolesnick R, Gulbins E (2001a) CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* **276**: 20589-20596
- Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E (2002) Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* **168**: 298-307
- Grassme H, Jendrossek V, Riehle A, von Kurthy G, Berger J, Schwarz H, Weller M, Kolesnick R, Gulbins E (2003b) Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat Med* **9**: 322-330
- Grassme H, Riehle A, Wilker B, Gulbins E (2005) Rhinoviruses infect human epithelial cells via ceramide-enriched membrane platforms. *J Biol Chem* **280**: 26256-26262
- Grassme H, Schwarz H, Gulbins E (2001b) Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 1016-1030
- Griffin DE (1995) Immune responses during measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**: 117-134
- Griffin DE (2010) Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev* **236**: 176-189

- Griffin DE, Bellini WJ (1996) Measles virus. *Fields Virology*: 1267-1312
- Griffin DE, Ward BJ (1993) Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* **168**: 275-281
- Grosjean I, Caux C, Bella C, Berger I, Wild F, Banchereau J, Kaiserlian D (1997) Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* **186**: 801-812
- Gunzer M, Schafer A, Borgmann S, Grabbe S, Zanker KS, Brocker EB, Kampgen E, Friedl P (2000) Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13**: 323-332
- Gupta N, Nodzenski E, Khodarev NN, Yu J, Khorasani L, Beckett MA, Kufe DW, Weichselbaum RR (2001) Angiostatin effects on endothelial cells mediated by ceramide and RhoA. *EMBO Rep* **2**: 536-540
- Hajduch E, Turban S, Le Liepvre X, Le Lay S, Lipina C, Dimopoulos N, Dugail I, Hundal HS (2008) Targeting of PKCzeta and PKB to caveolin-enriched microdomains represents a crucial step underpinning the disruption in PKB-directed signalling by ceramide. *Biochem J* **410**: 369-379
- Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* **10**: 73-80
- Hannun YA, Obeid LM (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 139-150
- Harder T, Simons K (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 534-542
- Harder TC, Osterhaus AD (1997) Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* **5**: 120-124
- Harris SJ, Parry RV, Westwick J, Ward SG (2008) Phosphoinositide lipid phosphatases: natural regulators of phosphoinositide 3-kinase signaling in T lymphocytes. *J Biol Chem* **283**: 2465-2469
- Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, Kohda D, Yanagi Y, Maenaka K (2007) Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19535-19540
- Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiyo J, Maenaka K, Yanagi Y (2011) Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. *Nat Struct Mol Biol*

- Hashimoto-Tane A, Yokosuka T, Ishihara C, Sakuma M, Kobayashi W, Saito T (2010) T-cell receptor microclusters critical for T-cell activation are formed independently of lipid raft clustering. *Mol Cell Biol* **30**: 3421-3429
- Hauck CR, Grassme H, Bock J, Jendrossek V, Ferlinz K, Meyer TF, Gulbins E (2000) Acid sphingomyelinase is involved in CEACAM receptor-mediated phagocytosis of *Neisseria gonorrhoeae*. *FEBS Lett* **478**: 260-266
- Herz J, Pardo J, Kashkar H, Schramm M, Kuzmenkina E, Bos E, Wiegmann K, Wallich R, Peters PJ, Herzig S, Schmelzer E, Kronke M, Simon MM, Utermohlen O (2009) Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat Immunol* **10**: 761-768
- Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, Tsukita S (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol* **135**: 37-51
- Hogg N, Laschinger M, Giles K, McDowall A (2003) T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* **116**: 4695-4705
- Holopainen JM, Subramanian M, Kinnunen PK (1998) Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* **37**: 17562-17570
- Horikami SM, Moyer SA (1995) Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**: 35-50
- Horinouchi K, Erlich S, Perl DP, Ferlinz K, Bisgaier CL, Sandhoff K, Desnick RJ, Stewart CL, Schuchman EH (1995) Acid sphingomyelinase deficient mice: a model of types A and B Niemann-Pick disease. *Nat Genet* **10**: 288-293
- Hu W, Xu R, Zhang G, Jin J, Szulc ZM, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM, Mao C (2005) Golgi fragmentation is associated with ceramide-induced cellular effects. *Mol Biol Cell* **16**: 1555-1567
- Huppa JB, Davis MM (2003) T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**: 973-983
- Huwiler A, Brunner J, Hummel R, Vervoordeldonk M, Stabel S, van den Bosch H, Pfeilschifter J (1996) Ceramide-binding and activation defines protein kinase c-Raf as a ceramide-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 6959-6963
- Huwiler A, Johansen B, Skarstad A, Pfeilschifter J (2001) Ceramide binds to the CaLB domain of cytosolic phospholipase A2 and facilitates its membrane docking and arachidonic acid release. *Faseb J* **15**: 7-9
- Ibarra N, Pollitt A, Insall RH (2005) Regulation of actin assembly by SCAR/WAVE proteins. *Biochem Soc Trans* **33**: 1243-1246

Iezzi G, Karjalainen K, Lanzavecchia A (1998) The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**: 89-95

Ikeda M, Kihara A, Igarashi Y (2006) Lipid asymmetry of the eukaryotic plasma membrane: functions and related enzymes. *Biol Pharm Bull* **29**: 1542-1546

Ilani T, Khanna C, Zhou M, Veenstra TD, Bretscher A (2007) Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. *J Cell Biol* **179**: 733-746

Ilani T, Vasiliver-Shamis G, Vardhana S, Bretscher A, Dustin ML (2009) T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat Immunol* **10**: 531-539

Iwasaki M, Takeda M, Shirogane Y, Nakatsu Y, Nakamura T, Yanagi Y (2009) The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein. *J Virol* **83**: 10374-10383

Jeckel D, Karrenbauer A, Birk R, Schmidt RR, Wieland F (1990) Sphingomyelin is synthesized in the cis Golgi. *FEBS Lett* **261**: 155-157

Kashkar H, Wiegmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Kronke M (2005) Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **280**: 20804-20813

Klagge IM, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2000) Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur J Immunol* **30**: 2741-2750

Klemke M, Kramer E, Konstandin MH, Wabnitz GH, Samstag Y (2010) An MEK-cofilin signalling module controls migration of human T cells in 3D but not 2D environments. *Embo J* **29**: 2915-2929

Kolesnick RN, Goni FM, Alonso A (2000) Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol* **184**: 285-300

Kolzer M, Arenz C, Ferlinz K, Werth N, Schulze H, Klingenstein R, Sandhoff K (2003) Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate is a potent and selective inhibitor of acid sphingomyelinase. *Biol Chem* **384**: 1293-1298

Kozak SL, Heard JM, Kabat D (2002) Segregation of CD4 and CXCR4 into distinct lipid microdomains in T lymphocytes suggests a mechanism for membrane destabilization by human immunodeficiency virus. *J Virol* **76**: 1802-1815

Lacour S, Hammann A, Graziade S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, Laurent G, Gambert P, Solary E, Dimanche-Boitrel MT (2004) Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* **64**: 3593-3598

- Lamb RA (1996) Paramyxoviridae, the viruses and their replication. *Fields Virology*: 1177-1204
- Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M (2008) Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* **453**: 51-55
- Lammermann T, Sixt M (2009) Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **21**: 636-644
- Lannert H, Gorgas K, Meissner I, Wieland FT, Jeckel D (1998) Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J Biol Chem* **273**: 2939-2946
- Lee JH, Katakai T, Hara T, Gonda H, Sugai M, Shimizu A (2004) Roles of p-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation. *J Cell Biol* **167**: 327-337
- Lee YG, Lee J, Cho JY (2010) Cell-permeable ceramides act as novel regulators of U937 cell-cell adhesion mediated by CD29, CD98, and CD147. *Immunobiology* **215**: 294-303
- Leonard VH, Sinn PL, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray PB, Jr., McChesney MB, Cattaneo R (2008) Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest* **118**: 2448-2458
- Lepple-Wienhues A, Belka C, Laun T, Jekle A, Walter B, Wieland U, Welz M, Heil L, Kun J, Busch G, Weller M, Bamberg M, Gulbins E, Lang F (1999) Stimulation of CD95 (Fas) blocks T lymphocyte calcium channels through sphingomyelinase and sphingolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13795-13800
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**: 678-689
- Li Q, Nance MR, Kulikauskas R, Nyberg K, Fehon R, Karplus PA, Bretscher A, Tesmer JJ (2007a) Self-masking in an intact ERM-merlin protein: an active role for the central alpha-helical domain. *J Mol Biol* **365**: 1446-1459
- Li Y, Harada T, Juang YT, Kyttaris VC, Wang Y, Zidanic M, Tung K, Tsokos GC (2007b) Phosphorylated ERM is responsible for increased T cell polarization, adhesion, and migration in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* **178**: 1938-1947
- Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD (2008) Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 2011-2016
- Lowin-Kropf B, Shapiro VS, Weiss A (1998) Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* **140**: 861-871

- Ludlow M, Rennick LJ, Sarlang S, Skibinski G, McQuaid S, Moore T, de Swart RL, Duprex WP (2010) Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral surface without syncytium formation or release of infectious virus. *J Gen Virol* **91**: 971-979
- Machesky LM, Mullins RD, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3739-3744
- Mandon EC, Ehses I, Rother J, van Echten G, Sandhoff K (1992) Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver. *J Biol Chem* **267**: 11144-11148
- Manes S, del Real G, Lacalle RA, Lucas P, Gomez-Mouton C, Sanchez-Palomino S, Delgado R, Alcami J, Mira E, Martinez AC (2000) Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Rep* **1**: 190-196
- Manie SN, Debreyne S, Vincent S, Gerlier D (2000) Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* **74**: 305-311
- Mao M, Fang X, Lu Y, Lapushin R, Bast RC, Jr., Mills GB (2000) Inhibition of growth-factor-induced phosphorylation and activation of protein kinase B/Akt by atypical protein kinase C in breast cancer cells. *Biochem J* **352 Pt 2**: 475-482
- Marchesini N, Hannun YA (2004) Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* **82**: 27-44
- Martin-Cofreces NB, Sancho D, Fernandez E, Vicente-Manzanares M, Gordon-Alonso M, Montoya MC, Michel F, Acuto O, Alarcon B, Sanchez-Madrid F (2006) Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol* **176**: 4201-4207
- Masse N, Ainouze M, Neel B, Wild TF, Buckland R, Langedijk JP (2004) Measles virus (MV) hemagglutinin: evidence that attachment sites for MV receptors SLAM and CD46 overlap on the globular head. *J Virol* **78**: 9051-9063
- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* **140**: 647-657
- Megha, London E (2004) Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem* **279**: 9997-10004
- Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH (2004) T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**: 154-159
- Michel C, van Echten-Deckert G (1997) Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **416**: 153-155

- Milhas D, Clarke CJ, Hannun YA (2010) Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids. *FEBS Lett* **584**: 1887-1894
- Miller MJ, Safrina O, Parker I, Cahalan MD (2004) Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* **200**: 847-856
- Moll M, Klenk HD, Maisner A (2002) Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* **76**: 7174-7186
- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A (1998) Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**: 82-86
- Müller N, Avota E, Schneider-Schaulies J, Harms H, Krohne G, Schneider-Schaulies S (2006) Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering. *Traffic* **7**: 849-858
- Naim HY, Ehler E, Billeter MA (2000) Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J* **19**: 3576-3585
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**: 6025-6032
- Naniche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB (2000) Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol* **74**: 7478-7484
- Ng CG, Coppens I, Govindarajan D, Pisciotta J, Shulaev V, Griffin DE (2008) Effect of host cell lipid metabolism on alphavirus replication, virion morphogenesis, and infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16326-16331
- Ng CG, Griffin DE (2006) Acid sphingomyelinase deficiency increases susceptibility to fatal alphavirus encephalomyelitis. *J Virol* **80**: 10989-10999
- Nguyen DH, Taub D (2002) CXCR4 function requires membrane cholesterol: implications for HIV infection. *J Immunol* **168**: 4121-4126
- Nguyen DH, Taub DD (2003) Inhibition of chemokine receptor function by membrane cholesterol oxidation. *Exp Cell Res* **291**: 36-45
- Nieto M, Frade JM, Sancho D, Mellado M, Martinez AC, Sanchez-Madrid F (1997) Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J Exp Med* **186**: 153-158
- Niewiesk S, Eisenhuth I, Fooks A, Clegg JC, Schnorr JJ, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V (1997) Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J Virol* **71**: 7214-7219

- Niewiesk S, Ohnimus H, Schnorr JJ, Gotzelmann M, Schneider-Schaulies S, Jassoy C, ter Meulen V (1999) Measles virus-induced immunosuppression in cotton rats is associated with cell cycle retardation in uninfected lymphocytes. *J Gen Virol* **80 (Pt 8)**: 2023-2029
- Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunisaki Y, Megias D, Marques M, Carrera AC, Manes S, Fukui Y, Martinez AC, Stein JV (2004) Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity* **21**: 429-441
- Nombela-Arrieta C, Mempel TR, Soriano SF, Mazo I, Wymann MP, Hirsch E, Martinez AC, Fukui Y, von Andrian UH, Stein JV (2007) A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J Exp Med* **204**: 497-510
- Nurminen TA, Holopainen JM, Zhao H, Kinnunen PK (2002) Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres. *J Am Chem Soc* **124**: 12129-12134
- Nussbaum O, Broder CC, Moss B, Stern LB, Rozenblatt S, Berger EA (1995) Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* **69**: 3341-3349
- Oh-hora M, Rao A (2008) Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **20**: 250-258
- Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Takeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, Tashiro M (2000) Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol* **145**: 905-920
- Okada H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M (2001) Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol* **146**: 859-874
- Owen DM, Oddos S, Kumar S, Davis DM, Neil MA, French PM, Dustin ML, Magee AI, Cebeckauer M (2010) High plasma membrane lipid order imaged at the immunological synapse periphery in live T cells. *Mol Membr Biol* **27**: 178-189
- Palosaari H, Parisien JP, Rodriguez JJ, Ulane CM, Horvath CM (2003) STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* **77**: 7635-7644
- Panigone S, Bergomas R, Fontanella E, Prinetti A, Sandhoff K, Grabowski GA, Delia D (2001) Up-regulation of prosaposin by the retinoid HPR and its effect on ceramide production and integrin receptors. *Faseb J* **15**: 1475-1477
- Parks CL, Lerch RA, Walpita P, Wang HP, Sidhu MS, Udem SA (2001) Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol* **75**: 921-933

- Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA (2000) Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**: 259-270
- Percherancier Y, Lagane B, Planchenault T, Staropoli I, Altmeyer R, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Hoessli DC, Bachelerie F (2003) HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J Biol Chem* **278**: 3153-3161
- Plempner RK, Hammond AL, Gerlier D, Fielding AK, Cattaneo R (2002) Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol* **76**: 5051-5061
- Popik W, Alce TM, Au WC (2002) Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J Virol* **76**: 4709-4722
- Prag S, Parsons M, Keppler MD, Ameer-Beg SM, Barber P, Hunt J, Beavil AJ, Calvert R, Arpin M, Vojnovic B, Ng T (2007) Activated ezrin promotes cell migration through recruitment of the GEF Dbl to lipid rafts and preferential downstream activation of Cdc42. *Mol Biol Cell* **18**: 2935-2948
- Qiu H, Edmunds T, Baker-Malcolm J, Karey KP, Estes S, Schwarz C, Hughes H, Van Patten SM (2003) Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J Biol Chem* **278**: 32744-32752
- Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M (2007) T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14418-14423
- Real E, Faure S, Donnadiou E, Delon J (2007) Cutting edge: Atypical PKCs regulate T lymphocyte polarity and scanning behavior. *J Immunol* **179**: 5649-5652
- Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J (2006) RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol* **80**: 5951-5957
- Rotolo JA, Zhang J, Donepudi M, Lee H, Fuks Z, Kolesnick R (2005) Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling. *J Biol Chem* **280**: 26425-26434
- Rouquette-Jazdanian AK, Pelassy C, Breitmayer JP, Aussel C (2007) Full CD3/TCR activation through cholesterol-depleted lipid rafts. *Cell Signal* **19**: 1404-1418
- Runkler N, Pohl C, Schneider-Schaulies S, Klenk HD, Maisner A (2007) Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* **9**: 1203-1214
- Ruvolo PP (2003) Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* **47**: 383-392

Ryon JJ, Moss WJ, Monze M, Griffin DE (2002) Functional and phenotypic changes in circulating lymphocytes from hospitalized zambian children with measles. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 994-1003

Salditt A, Koethe S, Pohl C, Harms H, Kolesnikova L, Becker S, Schneider-Schaulies S (2010) Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. *J Gen Virol* **91**: 1464-1472

Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH (2003) Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol* **73**: 30-48

Schissel SL, Keesler GA, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I (1998) The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem* **273**: 18250-18259

Schissel SL, Schuchman EH, Williams KJ, Tabas I (1996) Zn²⁺-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene. *J Biol Chem* **271**: 18431-18436

Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (1996) Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 13194-13199

Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, ter Meulen V (1995) Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol* **69**: 7257-7259

Schneider-Schaulies S, Bieback K, Avota E, Klagge I, ter Meulen V (2002) Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation. *J Mol Med* **80**: 73-85

Schneider-Schaulies S, Dittmer U (2006) Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J Gen Virol* **87**: 1423-1438

Schneider-Schaulies S, Kreth HW, Hofmann G, Billeter M, Ter Meulen V (1991) Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* **182**: 703-711

Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Bacsko K, Cattaneo R, Billeter M, ter Meulen V (1989) Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology* **171**: 525-534

Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V (1995) Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol* **25**: 976-984

- Schnorr JJ, Seufert M, Schlender J, Borst J, Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (1997a) Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J Gen Virol* **78** (Pt 12): 3217-3226
- Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kampgen E, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (1997b) Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 5326-5331
- Schuchman EH (2007) The pathogenesis and treatment of acid sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease. *J Inherit Metab Dis* **30**: 654-663
- Schwindling C, Quintana A, Krause E, Hoth M (2010) Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J Immunol* **184**: 184-190
- Serrador JM, Alonso-Lebrero JL, del Pozo MA, Furthmayr H, Schwartz-Albiez R, Calvo J, Lozano F, Sanchez-Madrid F (1997) Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol* **138**: 1409-1423
- Servet-Delprat C, Vidalain PO, Bausinger H, Manie S, Le Deist F, Azocar O, Hanau D, Fischer A, Roubardin-Combe C (2000) Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* **164**: 1753-1760
- Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA (2003) The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**: 389-397
- Shaffer MH, Dupree RS, Zhu P, Saotome I, Schmidt RF, McClatchey AI, Freedman BD, Burkhardt JK (2009) Ezrin and moesin function together to promote T cell activation. *J Immunol* **182**: 1021-1032
- Shingai M, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, Saito H, Ogura H, Matsumoto M, Seya T (2007) Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *J Immunol* **179**: 6123-6133
- Shishkova Y, Harms H, Krohne G, Avota E, Schneider-Schaulies S (2007) Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation. *Cell Microbiol* **9**: 1974-1986
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**: 720-731
- Sitrin RG, Sassanella TM, Petty HR (2011) An obligate role for membrane-associated neutral sphingomyelinase activity in orienting chemotactic migration of human neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* **44**: 205-212
- Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS (2009) T cell activation. *Annu Rev Immunol* **27**: 591-619

Stambolic V, Woodgett JR (2006) Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* **16**: 461-466

Steineur MP, Grosjean I, Bella C, Kaiserlian D (1998) Langerhans cells are susceptible to measles virus infection and actively suppress T cell proliferation. *Eur J Dermatol* **8**: 413-420

Suryanarayana K, Baczko K, ter Meulen V, Wagner RR (1994) Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* **68**: 1532-1543

Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM, Ginsberg MH, Calderwood DA (2003) Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* **302**: 103-106

Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JC (2006) The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* **281**: 29421-29425

Tahara M, Takeda M, Seki F, Hashiguchi T, Yanagi Y (2007a) Multiple amino acid substitutions in hemagglutinin are necessary for wild-type measles virus to acquire the ability to use receptor CD46 efficiently. *J Virol* **81**: 2564-2572

Tahara M, Takeda M, Yanagi Y (2007b) Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol* **81**: 6827-6836

Takasu T, Mgone JM, Mgone CS, Miki K, Komase K, Namae H, Saito Y, Kokubun Y, Nishimura T, Kawanishi R, Mizutani T, Markus TJ, Kono J, Asuo PG, Alpers MP (2003) A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect* **131**: 887-898

Takeuchi K, Kadota SI, Takeda M, Miyajima N, Nagata K (2003a) Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* **545**: 177-182

Takeuchi K, Miyajima N, Nagata N, Takeda M, Tashiro M (2003b) Wild-type measles virus induces large syncytium formation in primary human small airway epithelial cells by a SLAM(CD150)-independent mechanism. *Virus Res* **94**: 11-16

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y (2000) SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**: 893-897

Thelen M, Stein JV (2008) How chemokines invite leukocytes to dance. *Nat Immunol* **9**: 953-959

Tober C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston IC, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (1998) Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* **72**: 8124-8132

- Utermohlen O, Karow U, Lohler J, Kronke M (2003) Severe impairment in early host defense against *Listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase. *J Immunol* **170**: 2621-2628
- van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J (2003) Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* **369**: 199-211
- Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML (2006) T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity* **25**: 117-127
- Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F (2004) Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* **4**: 110-122
- Vincent S, Gerlier D, Manie SN (2000) Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* **74**: 9911-9915
- Vongpunsawad S, Oezgun N, Braun W, Cattaneo R (2004) Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. *J Virol* **78**: 302-313
- Ward SG (2006) T lymphocytes on the move: chemokines, PI 3-kinase and beyond. *Trends Immunol* **27**: 80-87
- Ward SG, Marelli-Berg FM (2009) Mechanisms of chemokine and antigen-dependent T-lymphocyte navigation. *Biochem J* **418**: 13-27
- Watanabe T, Noritake J, Kaibuchi K (2005) Regulation of microtubules in cell migration. *Trends Cell Biol* **15**: 76-83
- Weidmann A, Fischer C, Ohgimoto S, Ruth C, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2000a) Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol* **74**: 7548-7553
- Weidmann A, Maisner A, Garten W, Seufert M, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2000b) Proteolytic cleavage of the fusion protein but not membrane fusion is required for measles virus-induced immunosuppression in vitro. *J Virol* **74**: 1985-1993
- Welstead GG, Hsu EC, Iorio C, Bolotin S, Richardson CD (2004) Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. *J Virol* **78**: 9666-9674
- Wild TF, Fayolle J, Beauverger P, Buckland R (1994) Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* **68**: 7546-7548
- Wild TF, Malvoisin E, Buckland R (1991) Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* **72 (Pt 2)**: 439-442

Witko SE, Kotash C, Sidhu MS, Udem SA, Parks CL (2006) Inhibition of measles virus minireplicon-encoded reporter gene expression by V protein. *Virology* **348**: 107-119

Wolf K, Muller R, Borgmann S, Brocker EB, Friedl P (2003) Amoeboid shape change and contact guidance: T-lymphocyte crawling through fibrillar collagen is independent of matrix remodeling by MMPs and other proteases. *Blood* **102**: 3262-3269

Yanagi Y, Takeda M, Ohno S (2006) Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. *J Gen Virol* **87**: 2767-2779

Yin X, Zafrullah M, Lee H, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R (2009) A ceramide-binding C1 domain mediates kinase suppressor of ras membrane translocation. *Cell Physiol Biochem* **24**: 219-230

Zal T, Volkmann A, Stockinger B (1994) Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* **180**: 2089-2099

Zeidan YH, Hannun YA (2007) Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase Cdelta-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **282**: 11549-11561

Zeidan YH, Jenkins RW, Hannun YA (2008) Remodeling of cellular cytoskeleton by the acid sphingomyelinase/ceramide pathway. *J Cell Biol* **181**: 335-350

Zhang Y, Mattjus P, Schmid PC, Dong Z, Zhong S, Ma WY, Brown RE, Bode AM, Schmid HH (2001) Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 11775-11782

Zhang Y, Yao B, Delikat S, Bayoumy S, Lin XH, Basu S, McGinley M, Chan-Hui PY, Lichenstein H, Kolesnick R (1997) Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase. *Cell* **89**: 63-72

9 Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
Akt	Serin/Threonin Proteinkinase
APC	<i>antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zelle
APME	akute postinfektiöse Masernenzephalitis
APS	Ammoniumpersulfat
Arp2/3	<i>actin related proteins</i>
ASM	<i>acid sphingomyelinase</i> , saure Sphingomyelinase
ATV	<i>Adjusted Trypsin Versene</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	bovines Serumalbumin
bSMase	<i>bacterial sphingomyelinase</i> , bakterielle Sphingomyelinase
C	Kohlenstoff
°C	Grad Celcius
C1P	Ceramid-1-Phosphat
Cbl-b	E3 Ubiquitin Ligase
CCR	Chemokinrezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDV	<i>canine distemper virus</i> , Hundestaupavirus
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
cpm	<i>counts per minute</i>
cSMAC	<i>central supramolecular activation cluster</i>
CRAC	<i>calcium release-activated calcium</i>
CSFE	5, 6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dSMAC	<i>distal supramolecular activation cluster</i>

EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin/Radixin/Moesin
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FERM-Domäne	4.1 ERM-Domäne
FIP	fusionsinhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
FN	Fibronektin
F-Protein	Fusions-Protein
FSC	<i>forward scatter</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i> , Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HBSS	<i>Hanks balanced salts</i>
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> , humane Leukozytenantigene
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HS	humanes Serum
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat

IS	immunologische Synapse
KSR	<i>kinase suppressor of ras</i>
l	Liter
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
L-Protein	large-Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MCP	<i>membrane cofactor protein, CD46</i>
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> , mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIBE	<i>measles inclusion body encephalitis</i> , Einschlusskörperchen Enzephalitis
min	Minute
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	Matrix-Protein
MTOC	<i>microtubule organizing centre</i>
MV	Masernvirus
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NPD	<i>Niemann-Pick-Disease</i> , Niemann-Pick-Krankheit
N-Protein	Nukleokapsid-Protein
NSM	<i>neutral sphingomyelinase</i> , neutrale Sphingomyelinase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
Par	<i>partition defective</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PDV	<i>phocine distemper virus</i> , Seehundstaupevirus
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PH	<i>pleckstrin homology</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PIP2	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidyl-inositol-3,4,5-trisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PLL	Poly-L-Lysin
P-Protein	Phospho-Protein
PPRV	Peste-des-Petits-Ruminants-Virus
pSMAC	<i>peripheral supramolecular activation cluster</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
R18	Octadecyl Rhodamin B Chlorid
(m) RNA	(<i>messenger</i>) Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPV	Rinderpestvirus
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SA	Superantigen
SDF-1 α	<i>stromal cell-derived factor 1α</i>
SDS	Natrium (<i>Sodium</i>)-Dodecylsulfat
SEA	Staphylococcus Enterotoxin A
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
sec	Sekunde
SHIP	<i>SH2-containing inositol phosphatase 1</i>
SLAM	<i>signalling lymphocyte activation molecule</i>
SM	Sphingomyelin
SMAC	<i>supramolecular activation cluster</i>
SMase	Sphingomyelinase
SSC	<i>sideward scatter</i>
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
T	Threonin
TCID50	<i>tissue culture infectious dosis 50</i>
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Th	T-Helfer
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor
U	Unit
UV	Ultraviolett
üN	über Nacht
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
WB	Western Blot
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WTF	Wildtyp Fleckenstein
ZAP70	<i>ζ-chain associated protein of 70 kDa</i>

10 Veröffentlichungen

10.2 Publikationen

Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression. *PLoS Pathog* **5**: e 1000623

Abt M, **Gassert E**, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells. *J Gen Virol* **90**: 909-914

Avota E, **Gassert E**, Schneider-Schaulies S (2010) Measles virus immunosuppression: from effectors to mechanisms. *Med Microbiol Immunol*. **199(3)**: 227-237

10.3 Vorträge

Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus interference with T lymphocyte polarisation and motility: a novel function for membrane ceramides. 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 18-21, 2009

Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus interference with T lymphocyte polarisation and motility: a novel function for membrane ceramides. DGZ Young Scientist Meeting “*Imaging Cell Migration*”, Martinsried, September 10-12, 2009

4th Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the University Würzburg, Erlangen and Tübingen. Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation and viral immunosuppression. Kloster Schöntal, November 15-17, 2009

XVII. Measles Meeting. Interaction between MV-infected dendritic cells and T cells: functional assessment of the immunological synapse. Würzburg, 2007

XVIII. Measles Meeting. Interaction between MV-infected dendritic cells and T cells: functional assessment of the immunological synapse. Würzburg, 2008

IX. Measles Meeting. Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation and viral immunosuppression. Würzburg, 2009

XX. Measles Meeting. Membrane ceramides in T lymphocyte cytoskeletal reorganisation and immunoregulation. Würzburg, 2010

10.4 Poster

Shishkova J, Avota E, **Gassert E**, Harms H, Müller N, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S (2007) Measles virus glycoprotein signaling contributes to formation of unstable, nonfunctional synapses between infected dendritic cells and T cells in vitro. Symposium *Cell Adhesion in the Immune System*, Bonn, Juni 29-30, 2007

Abt M, **Gassert E**, Schneider-Schaulies S (2007) Measles virus infection of dendritic cells: consequences for DC migration and T cell attraction. 3rd European Congress of Virology, Nürnberg, September 1-5, 2007

Gassert E, Rechkemmer N, Shishkova Y, Harms H, Schneider-Schaulies S (2008) Measles virus glycoprotein signaling contributes to formation of unstable, nonfunctional synapses between infected dendritic cells and T cells in vitro. 18th Annual Meeting of the Society for Virology, Heidelberg, März 5-8, 2008

3rd Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the University Würzburg, Erlangen and Tübingen. Analysis of immune synapses formed between measles virus-infected dendritic cells and T cells. Wildbad, Rothenburg o. d. Tauber, Juli 6-8, 2008

Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus interference with T lymphocyte polarisation and motility: A novel function for membrane ceramides. 19th Annual Meeting of the Society for Virology, Leipzig, März 18-21, 2009

Gassert E, Avota E, Harms H, Krohne G, Gulbins E, Schneider-Schaulies S (2009) Measles virus interference with T lymphocyte polarisation and motility: A novel function for membrane ceramides. DGZ Young Scientist Meeting "*Imaging Cell Migration*", Martinsried, September 10-12, 2009

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Sibylle Schneider Schaulies für die Überlassung des interessanten Themas, die gute Betreuung und ihr andauerndes Interesse am Gelingen dieser Arbeit

Prof. Dr. Marie-Christine Dabauvalle für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens

Dr. Rik L. de Swart for being my third supervisor and his scientific discussions

Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die stets guten Ratschläge im Dienstagsseminar

Dr. Harry Harms und Dr. Nora Müller für die Hilfe am konfokalen Mikroskop

Erich Gulbins für die Bereitstellung der ASM Knockout Mäuse

allen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Peter Friedl, Universitätshautklinik Würzburg, für ihre Kooperationsbereitschaft und die Hilfe bei der Durchführung der Migrationsassays

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

meinen Kollegen Elita, Ibo, Susi, Alice, Charlene, Belinda, Christian sowie den ehemaligen Kollegen Andi, Hieu, Christine, Nicolette, Babs und Bea für die wunderbare Zeit in Würzburg

Caro für ihre tatkräftige Unterstützung

allen Mitarbeitern der AG Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die nette und humorvolle Arbeitsatmosphäre

meiner Freundin Sabine Krippner und meiner Familie für den Rückhalt und die Unterstützung bei der Verwirklichung meiner Ziele

Last but not least möchte ich diese Arbeit C. Fröhlich widmen, die durch ihre Hilfe und guten Ratschläge die Verwirklichung dieser Arbeit möglich gemacht hat.