

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und
Hygiene

der Universität zu Köln

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

Regulation der Produktion von anti-bakteriellen reaktiven Sauerstoffspezies durch Ceramidsynthasen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Würde eines doctor rerum medicinalium

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Barbara Yvonne März

aus Starnberg

promoviert am 28. Mai 2014

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1.Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. M. Krönke

2.Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. R. J. Wiesner

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 19.Dezember 2013

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. Michael Schramm von mir selbst ausgeführt worden.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Krönke, der es mir ermöglichte, diese Arbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Uniklinik Köln anzufertigen. Er hat mich stetig motiviert und die Arbeit mit vielen Anregungen und konstruktiven Diskussionen begleitet.

Herrn Dr. Michael Schramm danke ich sehr für seine ständige Hilfsbereitschaft, seine unentbehrliche Unterstützung und die Begleitung meiner Arbeit bis zur Fertigstellung.

Bei Frau Katja Krönke-Wiegmann, Frau Dr. Carola Pongratz und Frau Dr. Bettina Tosetti möchte ich mich für die Unterstützung im Labor und die vielen hilfreichen Gespräche bedanken.

Frau Dr. Franziska Peters und Frau Sandra Schramm danke ich ganz besonders für die wertvolle Hilfe bei den Mäuse-Themen.

Herrn Prof. Dr. Olaf Utermöhlen, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme und die nicht endende Hilfsbereitschaft im Labor. Ich habe mich sehr wohl gefühlt.

Ohne das Verständnis und die uneingeschränkte Unterstützung meiner Familie hätte ich dieses Vorhaben nicht zu Ende bringen können. Dafür danke ich Euch ganz herzlich.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Angeborene Immunität	1
1.1.1.	Makrophagen	1
1.1.2.	Nicht-oxidativer Mechanismus zur Elimination eingedrungener Erreger. 2	
1.1.3.	Oxidative Inaktivierung phagozytierter Bakterien.....	2
1.2.	ROS-Produktion in Mitochondrien	5
1.3.	Sphingolipide	6
1.4.	Ceramide	7
1.4.1.	Biosynthese von Ceramiden	7
1.4.2.	Bildung von Ceramiden aus Sphingomyelin.....	8
1.5.	Ceramidsynthasen.....	8
1.6.	Bedeutung der Sphingolipide für die Bildung und Stabilität von Lipid Rafts 10	
1.7.	Ziel der Arbeit	11
2.	Material und Methoden.....	12
2.1.	Material.....	12
2.1.1.	Mäuse	12
2.1.2.	Bakterien.....	12
2.1.3.	Chemikalien, Puffer und Lösungen	12
2.1.4.	Verbrauchsmaterialien	14
2.1.5.	Geräte	15
2.2.	Methoden.....	16
2.2.1.	Zellkultur	16
2.2.2.	Bakterienkultur	16
2.2.3.	Präparation von Knochenmarksmakrophagen (BMDM).....	17
2.2.4.	Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies.....	17
2.2.4.1.	Messung von Superoxidanionen mit MCLA	17
2.2.4.2.	Analyse der intrazellulären ROS-Produktion mit DCF	18
2.2.4.3.	Bestimmung der ROS-Produktion im Durchflusszytometer	18
2.2.4.4.	Messung mitochondrialer ROS mit MitoSOX Red	19
2.2.4.5.	ROS-Produktion nach Infektion mit Bakterien	19
2.2.5.	LDH Release Assay	19
2.2.6.	Statistische Analyse.....	20

3. Ergebnisse	21
3.1. Intrazelluläre und extrazelluläre ROS-Produktion in BMDM von CerS ^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit PMA	21
3.1.1. Messung extrazellulärer ROS	21
3.1.2. Intrazelluläre ROS Produktion.....	29
3.1.3. Bestimmung der intrazellulären ROS Produktion im Durchflusszytometer (FACS).....	36
3.1.4. Charakterisierung der Abhängigkeit der mitochondrialen ROS-Produktion von CerS.....	43
3.2. Analyse der ROS-Produktion nach Infektion mit Bakterien	46
3.2.1. ROS-Produktion nach Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	46
3.2.2. ROS-Produktion nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	50
3.2.3. ROS-Produktion nach Infektion mit <i>Shigella flexneri</i>	54
3.3. Abhängigkeit des Zelltods nach Bakterieninfektion von CerS.....	58
3.3.1. Ceramidsynthase 2	59
3.3.2. Ceramidsynthase 6	62
4. Diskussion	66
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	74
7. Lebenslauf.....	83

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ASMase	Acid Sphingomyelinase,
BHI	Brain Heart Infusion
BMDM	Bone marrow-derived macrophages
BSA	Bovine serum albumin
CFU	Colony forming units
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
g	Erdbeschleunigung
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HeLa	Epitheliale Zervixkarzinom-Zelllinie
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure
IFN- γ	Interferon Gamma
IL-1	Interleucin 1
inf.	infiziert
iNOS	induzierbare NO Synthase
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
L.m.	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria Bertani
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MCLA	2-Methyl-6-[4-methoxyphenyl]-3,7- dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one
M-CSF	Macrophage-colony-stimulating factor

min.	Minuten
MnSOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
MOI	Multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid- Phosphat
NMS	Normales Mausserum
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
NOX	NADPH-Oxidase-Komplex
O ₂	Molekularer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid
OD	Optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit bei der Analyse der Ähnlichkeit zweier Datengruppen
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	pH-Wert, negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
phox	Phagocyte oxidase
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
s. e. m.	Standard error of the mean
S.a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.fl.	<i>Shigella flexneri</i>
SMase	Sphingomyelinase
TNF	Tumornekrosefaktor
unbeh.	unbehandelt
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Angeborene Immunität

Im Laufe der Evolution haben sich zwei Hauptwege zur Abwehr entwickelt, die adaptive und die angeborene Immunität. Beide Komponenten bestehen aus löslichen und zellulären Bestandteilen und beeinflussen sich gegenseitig.

Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem sind die entwicklungsgeschichtlich älteren Abwehrreaktionen antigen-unspezifisch und reagieren sofort nach Kontakt mit einer körperfremden Struktur. Das angeborene Immunsystem bildet kein immunologisches Gedächtnis aus. Zu seinen löslichen Komponenten werden die Proteine des Komplementsystems, antimikrobielle Enzymsysteme (z.B. Lysozym) und Zytokine gerechnet. Letztere bestehen aus Polypeptiden, die als interzelluläre Botenstoffe hormonähnliche Signale vermitteln, wie z.B. Interleukine oder Interferon.

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind größtenteils phagozytierend und entstehen aus Myeloblasten, die über eine myeloische Progenitorzelle aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks stammen. Es gibt Granulozyten (die nach ihrer Anfärbbarkeit in Basophile, Eosinophile und Neutrophile unterteilt werden), Mastzellen, dendritische Zellen und Monozyten. Nach Migration in ein Gewebe differenzieren sich Monozyten zu Makrophagen und verbleiben dort, wie z.B. Kupferzellen in der Leber oder Alveolarmakrophagen in der Lunge.

1.1.1. Makrophagen

Makrophagen spielen in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle. Sie werden durch T-Zell-Zytokine wie z.B. Interferon-Gamma (IFN. γ) aktiviert und sezernieren selbst Zytokine, wie Interleukin1 (IL-1) und IL-6 oder Tumor Nekrose Faktor (TNF). Eingedrungene Erreger werden von Makrophagen phagozytiert und in der Folge sowohl durch oxidative, als auch nicht-oxidative Mechanismen in den Phagosomen abgetötet (Moonis, Ahmad et al. 1992; Scott, Botelho et al. 2003; Haas 2007).

1.1.2. Nicht-oxidativer Mechanismus zur Elimination eingedrungener Erreger

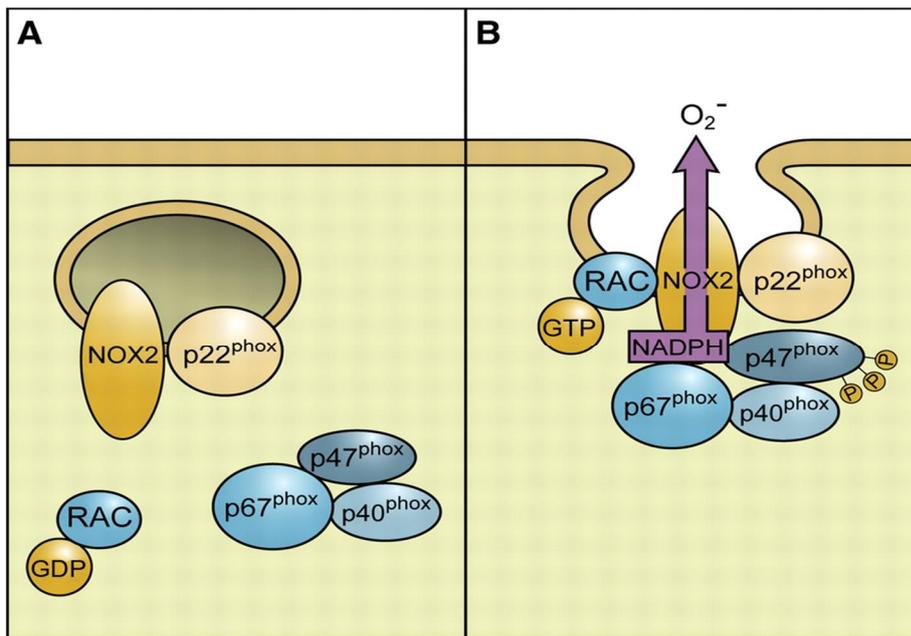
Lange Zeit vermutete man, dass die wichtigste Waffe gegen eingedrungene Bakterien reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies wären (Klebanoff 1975; Nathan and Shiloh 2000). Inzwischen ist bekannt, dass lysosomale saure Hydrolasen in den Phagosomen eine ebenso wichtige Rolle spielen (Segal 2005). Zur Abwehr von Infektionen mit *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* werden in Neutrophilen die Enzyme Elastase und Cathepsin G eingesetzt (Reeves, Lu et al. 2002). Nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* bilden Fibroblasten und Makrophagen zur Abwehr die lysosomale Protease Cathepsin D (del Cerro-Vadillo, Madrazo-Toca et al. 2006).

1.1.3. Oxidative Inaktivierung phagozytierter Bakterien

Makrophagen exprimieren eine induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (inducible nitric oxide synthase, iNOS), welche die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) katalysiert (Vodovotz, Russell et al. 1995; Fratti, Jun et al. 2004). $\text{NO}\cdot$ kann leicht in Phagosomen diffundieren und sich mit sauerstoffhaltigen Molekülen zu bakteriziden reaktiven Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNI) verbinden (z.B. Hydroxyl-Radikal, Stickstoffdioxid, Nitrit, Nitrat, S-Nitro-Thiol) (MacMicking, Xie et al. 1997).

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) werden in Makrophagen durch den NADPH-Oxidase-Komplex (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase-Komplex, NOX2) gebildet (Vazquez-Torres, Jones-Carson et al. 2000). Allgemein werden unter dem Begriff ROS verschiedene, von Sauerstoff abstammende, hoch reaktive Moleküle zusammengefasst. Man unterscheidet Verbindungen, die freie Radikale enthalten, wie das Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$), Peroxylradikale ($\text{RO}_2\cdot$) oder Alkoxyradikale ($\text{RO}\cdot$). Aber auch Verbindungen, die selber keine Radikale darstellen, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) oder das Hypochlorit-Anion (OCl^-) werden unter diesem Begriff eingeordnet, da sie entweder selbst starke Oxidationsmittel sind oder leicht in Radikale umgewandelt werden können (Halliwell and Cross 1994; Bedard and Krause 2007). Das hochreaktive Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$) entsteht in der Zelle entweder aus der Reaktion von Superoxid mit hypochloriger Säure (HOCl) oder Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) (Ramos, Pou et al. 1992).

Der aktive NADPH-Oxidase-Komplex der Phagozyten besteht aus mehreren Untereinheiten, die an der Membran zusammengefügt werden (Vignais 2002; Nauseef 2004). Die katalytische Untereinheit, das Flavocytochrom b_{558} , ein integrales Membranprotein, liegt als Heterodimer aus einem 91-kDa Glycoprotein ($gp91^{phox}$) und einem 22-kDa Protein ($p22^{phox}$) vor (Porter, Kuribayashi et al. 1996; Nauseef 2004). Die regulatorischen Untereinheiten $p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und RAC1 oder RAC2 sind im Zytosol lokalisiert und werden an das Flavocytochrom b_{558} angelagert (DeLeo, Allen et al. 1999; van Bruggen, Anthony et al. 2004). Der vollständige, aktive NADPH-Oxidase-Komplex katalysiert die Übertragung eines Elektrons von NADPH über die Membran des Phagosoms hinweg auf molekularen Sauerstoff. Im Inneren des Phagosoms entsteht so zunächst Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) (Quinn and Gauss 2004). Aus Stickstoffmonoxid- und Superoxid-Radikalen entsteht in Phagosomen das stark bakterizide Peroxinitrit ($ONOO^{\cdot-}$), durch welches eingedrungene Bakterien sehr wirkungsvoll abgetötet werden (Nathan and Shiloh 2000; Szabo, Ischiropoulos et al. 2007). Aufgrund der Toxizität der reaktiven Sauerstoffverbindungen ist die Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplexes genau reguliert. In ruhenden Makrophagen sind die Komponenten des NADPH-Oxidase-Komplexes auch räumlich voneinander getrennt (Abb. 1A). Erst durch eingedrungene Bakterien oder Pilze, bioaktive Lipide, Antikörper oder Chemikalien (z.B. Natriumfluorid oder Phorbol ester) kommt es zur Phosphorylierung von $p47^{phox}$ und Zusammenlagerung aller Bestandteile und damit zur Aktivierung der NOX2 (Robinson and Badwey 1995; Bedard and Krause 2007; Robinson 2008) (Abb. 1B).



Bedard K, Krause K *Physiol Rev* 2007;87:245-313

Abb. 1: Zusammenlagerung des NADPH-Oxidase-Komplexes.

A: In ruhenden Phagozyten sind die Transmembranproteine gp91^{phox} (NOX2) und p22^{phox} auch räumlich von den zytosolischen Komponenten getrennt. B: Nach Phosphorylierung von p47^{phox} kommt es zur Anlagerung von p67^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox} und RAC an die Membrankomponenten (Bedard and Krause 2007).

ROS sind nicht nur das Produkt der Aktivität der NOX2 in phagozytierenden Zellen, sondern können in allen Zelltypen der Eukaryonten generiert werden. Den bekannten und charakterisierten Isoformen dieses Enzyms (NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 und DUOX2) ist gemein, dass sie Elektronen über Membranen transportieren und dabei zunächst Superoxid bilden. NADPH-Oxidasen sind an Prozessen beteiligt, die Immunabwehr, posttranslationale Modifikation von Proteinen, zelluläre Signalübertragung und die Regulation von Genexpression und Zell-Differenzierung betreffen (Bedard and Krause 2007). Vor der Entdeckung der NOX Isoformen, wurde die Herkunft von ROS in nicht-phagozytierenden Zellen alleine den Mitochondrien zugeordnet. Inzwischen wurde bei einer Vielzahl, meist chronischer Krankheiten (z.B. Autoimmunerkrankungen des Zentralnervensystems, Alzheimer, Lungen-Fibrose, Schlaganfall) eine erhöhte NOX-Aktivität festgestellt. In vielen erfolgversprechenden Ansätzen werden spezifische Inhibitoren der NOX Isoformen untersucht (Krause, Lambeth et al. 2012).

1.2. ROS-Produktion in Mitochondrien

Eine andere Quelle für ROS in der Zelle sind die Mitochondrien. 1-2 % des von den Mitochondrien verbrauchten Sauerstoffs wird nur unvollständig reduziert. Vor allem an Komplex I und III der Atmungskette entstehen so freie Elektronen, die mit molekularem Sauerstoff zu Superoxid (O_2^-) reagieren (Ames, Shigenaga et al. 1993; Turrens 2003). Durch die Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) wird produziertes Superoxid zu Wasserstoffperoxid umgewandelt. Über die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion entstehen in Anwesenheit von Metall-Ionen hochreaktive Hydroxyl-Radikale ($HO\cdot$). Bisher wurden zehn Mechanismen identifiziert, bei denen in den Mitochondrien ROS entstehen (Starkov, Fiskum et al. 2004; Andreyev, Kushnareva et al. 2005). Die Mitochondrien selber werden durch die Eigenproduktion von ROS hohen Konzentrationen dieser hochreaktiven Moleküle ausgesetzt, was zu Schäden an mitochondrialer DNA, Lipiden und Proteinen führen kann (Circo, Moyer et al. 2009; Rachek, Yuzefovych et al. 2009).

Als Nebenprodukte biologischer Reaktionen entstehen ROS auch in Peroxisomen, durch Aktivität der Xanthin-Oxidase, der 5-Lipoxygenase und an Cytochrom P-450 (Thannickal and Fanburg 2000; Bedard and Krause 2007).

Unabhängig von Ihrer Herkunft reagieren ROS mit einer großen Anzahl von Molekülen: Proteine, Lipide, Nukleinsäuren, aber auch mit kleinen anorganischen Verbindungen. Wenn in der Zelle mehr ROS entstehen als durch die Aktivität der zytosolischen Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase (CuZnSOD), der mitochondrialen MnSOD, Katalase, oder Glutathionperoxidase beseitigt werden können, werden die zelleigenen Moleküle geschädigt. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet (Thannickal and Fanburg 2000). Daher werden ROS schon seit dem Jahr 1956 mit Schäden in biologischen Systemen, z.B. bei Alterungsprozessen, in Verbindung gebracht (Harman 1956). Aber auch positive Effekte, wie der oxidative burst der Immunabwehr gegen eindringende Pathogene, wurden sehr früh entdeckt. Inzwischen ist bekannt, dass ROS an einer Vielzahl von reversiblen regulatorischen Prozessen beteiligt sind. Bekannt sind unter anderem Regulationsmechanismen, die die Signalübertragung in Zellen, Genexpression (z.B. Induktion der Expression von TNF durch ROS), Zellwachstum, aber auch Zell-Proliferation und Apoptose betreffen (Bedard and Krause 2007).

Die katalytische Untereinheit des in Abschnitt 1.1.3. bereits näher beschriebenen NADPH-Oxidase-Komplex (NOX) besteht aus zwei integralen Membranproteinen, die in der Zytoplasmamembran verankert sind (Porter, Kuribayashi et al. 1996; Nauseef 2004). Daher wird ihre enzymatische Aktivität von der Lipidzusammensetzung der Membran beeinflusst. Zytoplasmamembranen bestehen zu 50 % aus Sphingolipiden, die als wesentlichen Bestandteil Ceramide enthalten. Die Synthese von Sphingolipiden wird in der Zelle fein reguliert. Enzyme, wie z.B. NOX oder spezifische Signalproteine, können durch veränderte Membraneigenschaften eine Konformationsänderung erfahren und dadurch aktiviert oder gehemmt werden (Shao, Segal et al. 2003; Reynwar, Illya et al. 2007; Hatzakis, Bhatia et al. 2009). Dadurch haben Enzyme, die die Shingolipidsynthese regulieren, in der Folge auch Einfluss auf die Aktivität und Regulation integraler Membranproteine. Auch die Amplifizierung der Signaltransduktion an Liganden und Rezeptoren kann verändert werden (Rajendran and Simons 2005).

1.3. Sphingolipide

In Eukaryonten gibt es drei Hauptklassen von Membranlipiden: Phospholipide, Sterole und Sphingolipide. Die Sphingolipide der Säugetierzellen sind äußerst vielfältig aufgebaut: Die Grundlage bildet ein 1,3-Dihydroxy-2-aminoalkan (backbone), das in der Länge der Alkyl-Kette und der Position und Anzahl der Doppelbindungen variieren kann. Darüber hinaus wurden eine Vielzahl von möglichen polaren Kopfgruppen und 12 verschiedene Fettsäurevarianten identifiziert (Merrill, Sullards et al. 2005). Sphingolipide sind vor allem an der äußeren Seite der Plasmamembran lokalisiert und stellen eine Barriere zur extrazellulären Umgebung dar. Sie enthalten als wesentlichen Baustein Ceramid. Die Veresterung der Hydroxylgruppe des Sphingosinanteils mit polaren Kopfgruppen führt zu komplexen Sphingolipiden. Die Verknüpfung mit Sacchariden ergibt Glycosphingolipide. Defekte in der Synthese von Glycosphingolipiden führen zu Störungen in der embryonalen Entwicklung und der Differenzierung von Geweben. Durch den Transfer einer Phosphocholin-Gruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid durch die Sphingomyelin-Synthase im Golgi-Apparat und an der Plasmamembran entsteht Sphingomyelin (Huitema, van den Dikkenberg et al. 2004). Zellen, die kein Sphingomyelin herstellen können, sind nicht lebensfähig (Yamashita, Wada et al. 1999; Tafesse, Huitema et al. 2007).

1.4. Ceramide

Ceramide sind nicht nur wichtige strukturelle Komponenten von Biomembranen, sondern spielen auch eine bedeutende Rolle in bestimmten biologischen Prozessen, da sie als Signal-Moleküle an der Regulation von Zellwachstum (Zell-Differenzierung und Proliferation), Apoptose und Alterungsprozessen beteiligt sind (Kolesnick 2002; Pettus, Chalfant et al. 2002; Futerman and Hannun 2004).

1.4.1. Biosynthese von Ceramiden

Die *de novo* Synthese von Ceramiden findet an der zytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums (ER) statt (Hirschberg, Rodger et al. 1993). Die beteiligten Enzyme wurden in der Vergangenheit untersucht und charakterisiert.

Aus zytosolischem Serin und Palmitoyl-CoA wird zunächst in einer Kondensationsreaktion durch die Serin-Palmitoyl-Transferase 3-Ketosphingarin gebildet (Abb.2). Dieses wird durch die 3- Ketosphingarin Reductase zu Sphingarin reduziert. Die Ceramidsynthese (eine Sphingarin-N-Acyl-Transferase, CerS) acyliert das Sphingarin zu Dihydroceramid. Das nun membrangebundene Dihydroceramid wird im letzten Schritt durch die Dihydroceramid-Desaturase zum Ceramid reduziert, indem zwischen C₄ und C₅ des Sphingosins eine Doppelbindung eingefügt wird (Levy and Futerman 2010).

Ceramide haben eine minimale, aus nur zwei Hydroxylgruppen bestehende hydrophile Region und sind deshalb im wässrigen Milieu des Zytoplasmas kaum löslich. Der Transport zu einer anderen Membran in der Zelle erfolgt deshalb entweder über Vesikel oder über ein Ceramid Transfer Protein (CERT) (Michel, van Echten-Deckert et al. 1997; Venkataraman and Futerman 2000; Dolgachev, Farooqui et al. 2004; Hanada 2006; Hanada 2010).

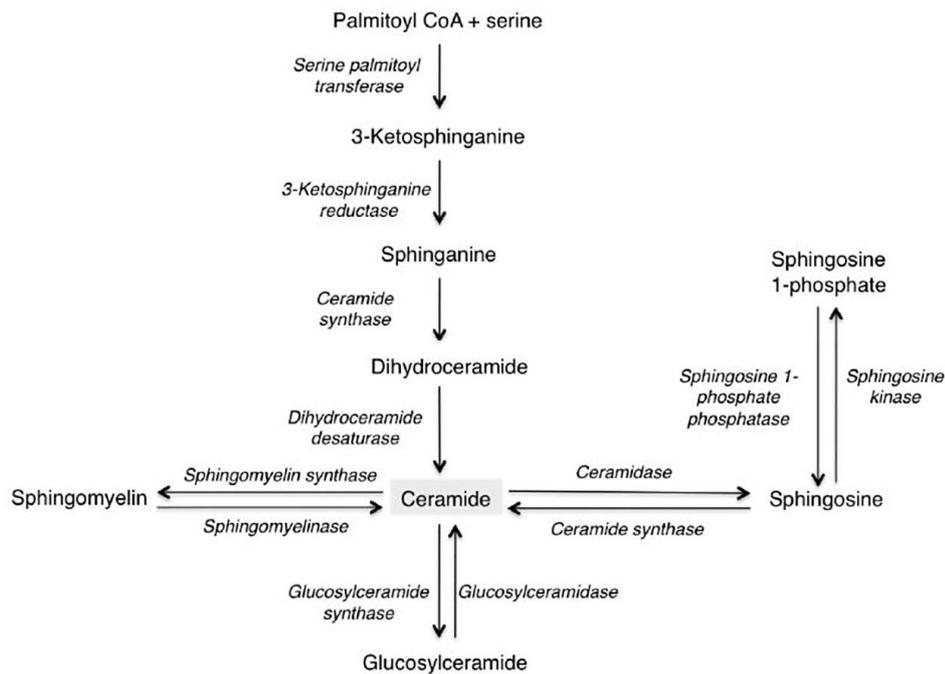


Abb. 2: Biosynthese von Ceramiden (Levy and Futerman 2010)

1.4.2. Bildung von Ceramiden aus Sphingomyelin

Sphingomyelinasen (SMasen) hydrolysieren Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin. Die bisher identifizierten sieben Isoformen werden nach ihrem pH-Optimum in basische, saure und neutrale SMasen eingeteilt. Die zwei letztgenannten Isoformen werden durch diverse Stimuli, wie z.B. TNF, IL-1 β oder IFN- γ aktiviert und bewirken innerhalb kurzer Zeit (Minuten bis Stunden) einen Anstieg des zellulären Ceramid-Levels. Diese Aktivierbarkeit durch Zytokine und der Zusammenhang zwischen den SMasen und der Immunantwort wurde mehrfach gezeigt (Pushkareva, Obeid et al. 1995; Kronke 1999; Marchesini and Hannun 2004; Schneider-Brachert, Tchikov et al. 2004). Die saure Sphingomyelinase (ASMase) wird in den meisten Zelltypen exprimiert und findet sich in Phagosomen, Endosomen, Lysosomen und der Plasmamembran (Kronke 1999; Grassme, Jekle et al. 2001)

1.5. Ceramidsynthasen

In Säugetieren wurden bisher sechs Ceramidsynthasen (CerS1 bis CerS6) identifiziert. Deren Genorte wurden früher auch als Lass (engl. für longevity assurance homologue) bezeichnet, da sie eine hohe Homologie zu dem Genprodukt des LAG1p

(engl. für *longevity assurance gene*) Gens der Hefe aufweisen (Venkataraman, Riebeling et al. 2002; Guillas, Jiang et al. 2003; Riebeling, Allegood et al. 2003). Im Zuge der biochemischen Charakterisierung wurden sie in CerS (Ceramidsynthase) umbenannt (Pewzner-Jung, Ben-Dor et al. 2006). Mit Ausnahme von CerS1 und CerS4, deren Genorte auf Chromosom 19 liegen, sind die Gene der anderen Ceramidsynthasen auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Die Ceramidsynthasen werden in den Geweben in unterschiedlicher Höhe exprimiert und es wird vermutet, dass bestimmte Ceramide spezifische Funktionen in unterschiedlichen Geweben haben. Abb. 3 zeigt die anteilige mRNA-Expression der Ceramidsynthasen in den verschiedenen Geweben des Menschen (Shao, Segal et al. 2003; Levy and Futerman 2010).

Jede Ceramidsynthase bildet nur Ceramide von ganz bestimmter Kettenlänge (CerS1: C_{18:0}; CerS2: C₂₀, C_{22:0}, C_{24:1} und C_{24:0}, C₂₆; CerS3: C₂₆₋₃₂; CerS4: C₁₈₋₂₀; CerS5: C₁₆; CerS6: C₁₄ und C₁₆). Den durch CerS1 gebildeten C₁₈-Ceramiden und den von CerS6 gebildeten C₁₆-Ceramiden werden beispielsweise gegensätzliche Rollen als pro-apoptotische bzw. überlebensfördernde Moleküle zugeschrieben (Senkal, Ponnusamy et al. 2010). Eine erhöhte Expression von CerS2 findet man in besonders großer Menge in Niere, Leber und Lunge (Laviad, Albee et al. 2008; Pewzner-Jung, Park et al. 2010). Eine Über-Expression von CerS2, schützt HeLa-Zellen vor Apoptose, die durch Ionisierende Strahlung induzierbar ist, während die Überexpression von CerS5 einen gegenteiligen Effekt hat (Mesicek, Lee et al. 2010). Die Ceramidsynthase 4 wird vor allem im Herz, in der Milz und in Leukozyten exprimiert. CerS3 findet sich vor allem in Hoden und in der Haut (Venkataraman, Riebeling et al. 2002; Riebeling, Allegood et al. 2003; Mizutani, Kihara et al. 2005; Mizutani, Kihara et al. 2006).

An isolierter Ceramidsynthase 5 konnte gezeigt werden, dass das aufgereinigte Enzym immer noch Ceramidsynthase- Aktivität besitzt und selektiv C₁₆-Acyl-CoA erkennt (Lahiri and Futerman 2005). Alle Ceramidsynthasen können Sphingosin oder Dihydrosphingosin als Ausgangssubstrat nutzen.

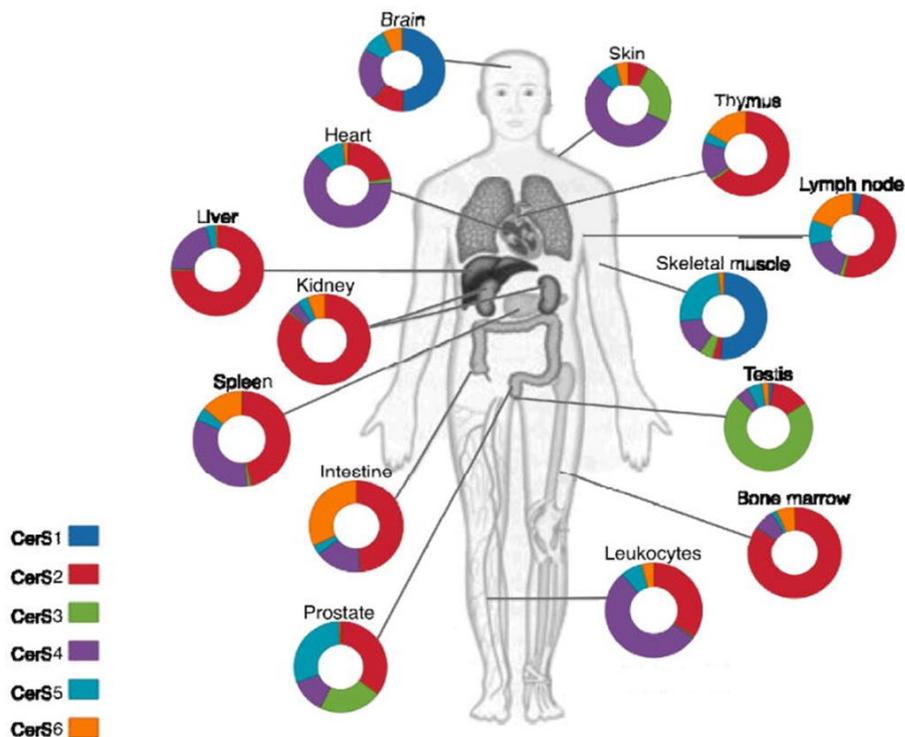


Abb.3: Anteilige Expression verschiedener CerS mRNAs in Geweben des Menschen (Levy and Futerman 2010)

Die Aktivität der Ceramidsynthasen wird durch Fumonisine gehemmt. Diese Familie von Mycotoxinen wird durch Pilze der Gattung *Fusarium verticillioides* gebildet und führt sowohl bei landwirtschaftlichen Nutztieren, als auch beim Menschen zu teilweise schweren Erkrankungen (Marasas 2001). Die Fumonisine ähneln in ihrer chemischen Struktur dem Sphingosin und behindern die Übertragung von Acylgruppen auf Sphingosin durch kompetitive Hemmung an der Sphingosin-Bindungsstelle der Ceramidsynthase (Merrill, Sullards et al. 2001).

1.6. Bedeutung der Sphingolipide für die Bildung und Stabilität von Lipid Rafts

Studien der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass Zellmembranen vom Aufbau nicht homogen sind, sondern dass deren Lipide Domänen bilden. Diese Domänen entstehen durch Wechselwirkungen zwischen Sphingolipiden und Cholesterol und werden als Lipid Rafts bezeichnet (Munro 2003; Zhang, Li et al. 2009). Die Bildung

wird vermutlich zum Teil durch die Affinität des Cholesterols zu bestimmten Sphingolipiden begünstigt. Der Ceramid-Anteil des Sphingomyelins bindet über hydrophobe van-der-Waals-Kräfte an das Sterol-Ring-System des Cholesterols (Kolesnick, Goni et al. 2000; Megha and London 2004). Diese starken hydrophoben Wechselwirkungen und die an dieser Stelle hohe Konzentration an Sphingolipiden und Cholesterol führt zur Bildung von Domänen, die sich von anderen Phospholipiden abtrennen (Simons and Ikonen 1997; Stancevic and Kolesnick 2010). Sphingomyelinasen hydrolysieren Sphingomyelin zu Ceramid und Phosphorylcholin und verändern so die Zusammensetzung der Rafts (Kronke 1999; Goni and Alonso 2002; Bollinger, Teichgraber et al. 2005). Ceramide sind vermutlich auch in der Lage, Cholesterol aus den Lipid Rafts zu verdrängen und dadurch die Struktur zu verändern (Xu, Bittman et al. 2001; Megha and London 2004; Megha, Bakht et al. 2006). Eine vermehrte Generierung von Ceramiden in der Membran verändert drastisch die Eigenschaften der Zellmembran, da Ceramid-Moleküle sich spontan verbinden und kleine ceramid-reiche Domänen ausbilden. Diese sogenannten Mikro-Domänen haben die Neigung zu verschmelzen, indem sie untereinander Wasserstoff-Brücken ausbilden. Die so entstehenden Makro-Domänen können einen Durchmesser von bis zu 5 μm erreichen und werden auch als Membran-Plattformen bezeichnet (Holopainen, Subramanian et al. 1998; Kolesnick, Goni et al. 2000; Nurminen, Holopainen et al. 2002). Auf diesen Plattformen, die veränderte biophysikalische Eigenschaften besitzen, werden Signalmoleküle, wie Rezeptoren und Kinasen angeordnet (Gulbins and Kolesnick 2003).

1.7. Ziel der Arbeit

Über den Einfluss der Ceramidzusammensetzung auf die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran von Makrophagen ist wenig bekannt. Auch die Auswirkungen der veränderten Lipidkomposition auf die Aktivität integraler Membranproteine von Makrophagen wurden bisher nicht ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Effekt die Defizienz einzelner CerS auf die Aktivität der NOX hat und die Überlebensfähigkeit von Makrophagen nach bakteriellen Infektionen analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Mäuse

Die verwendeten CerS KO (Knockout) Mäuse hatten einen C57BL/6 Hintergrund und wurden von der Firma Taconic Artemis (Köln) erzeugt. Die Tiere wurden unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen in der Tierhaltung der medizinischen Fakultät der Universität Köln gezüchtet und gehalten. Für Experimente wurden homozygot transgene *CerS*^{-/-} Mäuse und entsprechende Wildtyp-Wurfgeschwister in einem Alter zwischen sechs und zehn Wochen verwendet. Alle Versuche wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes und den Regeln des Ethik Komitees der Universität Köln durchgeführt.

2.1.2. Bakterien

Listeria monocytogenes (*L.m.*), Stamm EGD-e (Serotyp 1/2a) wurden von C. Kocks (Harvard Medical School, Boston, USA) zur Verfügung gestellt. Einzelkolonien, gewachsen auf Blutagarplatten, wurden durch Animpfen in Brain Heart Infusion Medium (BHI) Medium vermehrt. *Staphylococcus aureus* (*S.a.*), Stamm USA300 wurde durch Animpfen einer Einzelkolonie von Mueller-Hinton Platten (MH) in Luria-Bertani Medium (LB) vermehrt. Von *Shigella flexneri* (*S.fl.*), Stamm M90T wurden Einzelkolonien, die auf MH-Platten gewachsen waren, in Tryptic Soy Broth Medium (TSB) angeimpft und vermehrt. Aliquote von in der log-Phase des Wachstums geernteter Bakterienkulturen wurden bei -80° C gelagert, bei Bedarf auf entsprechende Agarplatten ausplattiert und bei 37° C inkubiert.

2.1.3. Chemikalien, Puffer und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Steinhausen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), AppliChem (Darmstadt, Deutschland) oder Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland) bezogen. Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem, zweifach destilliertem und entgastem Wasser aus einer EASYpure UV/UF Anlage (Werner Reinstwassersysteme, Leverkusen) angesetzt.

Hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert, hitzelabile Lösungen wurden durch eine Filtermembran mit 0,2 µm Porendurchmesser steril filtriert.

Substanz	Zusammensetzung/ Hersteller/ Aufbewahrung
BHI Medium	Brain Heart Infusion Medium
Blutagarplatten	Oxoid Deutschland GmbH, Aufbewahrung bei 4° C
BSA	Fraktion V, Aufbewahrung bei 4° C
DCF-DA	Aufbewahrung bei -20° C
DMEM	1 x Dulbecco´s Modified Eagle Medium, Biochrom AG, Aufbewahrung bei 4° C
DMSO	Merck Millipore
EDTA	Carl Roth GmbH & Co.KG
FCS	Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert bei 56° C für 30 min, Biowest, Aufbewahrung bei -20° C
Gentamicin	10 mg/ml in H ₂ O, frisch angesetzte Lösung
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution, mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , Aufbewahrung bei 4° C
HEPES	1 M HEPES, Invitrogen, Aufbewahrung bei 4° C
LB Medium	Luria Bertani Medium, Aufbewahrung bei 4° C
MACS-Puffer	0,5 % BSA, 200 mM EDTA in PBS, Aufbewahrung bei 4° C
MCLA	Sigma-Aldrich, Aufbewahrung bei -20° C
M-CSF	PeproTech, Aufbewahrung bei -20° C
Mitoxi Red	Invitrogen, Aufbewahrung bei -20° C
Müller Hinton Agarplatten (MH)	Oxoid Deutschland GmbH

Natrium-Pyruvat	100 mM, Biochrom AG, Aufbewahrung bei 4° C
NH ₄ CL/Tris Puffer	8,3 % NH ₄ CL, 0,1 M Tris in H ₂ O Aufbewahrung bei 4° C
normales Mausserum (NMS)	Aufbewahrung bei -20° C
PBS	1 x Dulbecco´s Phosphate Buffered Salt Solution, pH 7,4, Biochrom AG, Aufbewahrung bei 4° C
PBS/ EDTA	PBS mit Zusatz von 0.1 M EDTA
Penicillin/Streptomycin	Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10 ng/ml) in H ₂ O, Biochrom AG Aufbewahrung bei -20° C
PMA	100 µM in DMSO, Aufbewahrung bei -20° C
RPMI	1 x VLE RPMI 1640 Medium, Biochrom AG, Aufbewahrung bei 4° C
TNF	R&D Systems, Inc. Aufbewahrung bei 4° C, rekombinant aus der Maus
Triton X-100	Aufbewahrung bei RT
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, Aufbewahrung bei 4° C
Trypanblau Lösung	1 x, gebrauchsfertige Lösung
TSB Medium	Tryptic Soy Broth

2.1.4. Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller/ Händler
BD Microlance 3 Nadeln (27G x 3,4´´)	Becton Dickinson GmbH
Deckgläser	WWR International
FACS Röhrchen	BD Biosciences
Falcon tubes (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One
Küvetten	Sarstedt AG & Co

LumiNunc Platten (96 well)	Thermo Scientific
Mikrotiterplatten (96-well, weiss, schwarz)	Nunc
Parafilm	AmericanNational Can
Pipetten (5, 10, und 25 ml)	Sarstedt AG & Co
Spritzen (5 ml)	Braun Omnifix, B.Braun AG
Sterilfilteraufsätze	Sarstedt AG & Co
TipOne Pipettenspitzen	STARLAB.com
Zellkulturplatten	TPP
Zellspatel (18 cm)	BD Falcon

2.1.5. Geräte

Bezeichnung	Spezifizierung	Hersteller/ Händler
CO ₂ Incubator	Heraeus HERAcell 240	Thermo Scientific
	Innova 4200	New Brunswick Scientific
Durchflusszytometer	FACSCalibur	BD Biosciences
Eppendorf-Pipetten	Reference ® variabel	Eppendorf
	Research plus 8-Kanal	Eppendorf
Feinwaage	Sartorius L2200P	Gemini B.V.
Incubator	Kelvitron T	Heraeus Instruments GmbH
Inkubator (Schüttler)	Innova 4200	New Brunswick Scientific
Magnetrührer	RCT basic	Kika Labortechnik
Mikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss MicroImaging
	HBO 50/AC	Carl Zeiss
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Berthold Tristar LB 941	Berthold Technologies
	Tecan infinite M 1000	Tecan Group Ltd
Photometer	Eppendorf Bio	Thermo Scientific
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf
Sterilbank	HERAsafe KS	Thermo Scientific
Sterilbank	HERAsafe	Thermo Scientific

Thermomixer	Eppendorf comfort	Thermo Scientific
Vakuumpumpe	Vacuubrand	Bachhofer Labor Geräte
Vortex	Omnilab REAX 2000	Heidolph
Zählkammer	Neubauer improved	LO Laboroptik
Zentrifugen	Eppendorf 5417 R	Thermo Scientific
	Heraeus Multifuge 4 KR	Thermo Scientific

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Knochenmarksmakrophagen (BMDM, bone marrow-derived macrophages) wurden, wenn nicht anders angegeben, in VLE RPMI 1640 kultiviert, dem 10% fötales Kälberserum (FCS, hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56° C), 2 mM HEPES, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 200 nM Natrium-Pyruvat und 10 ng/ml M-CSF (Macrophage-colony-stimulating factor) zugesetzt wurden. Dieses Medium wird im Folgenden als BMDM Medium bezeichnet.

Die BMDM wurden bei 37° C und 5% CO₂ unter sterilen Bedingungen kultiviert.

2.2.2. Bakterienkultur

Aliquots einer in der log-Phase geernteten und bei -80° C gelagerten Bakterienkultur wurden auf Agarplatten ausgestrichen. Nach mindestens 12 stündiger Inkubation bei 37° C wurde eine Einzelkolonie in 5 ml Medium überführt und über Nacht bei 37° C inkubiert. Von dieser Übernachtkultur wurden am nächsten Morgen 1 ml (*Listeria monocytogenes*) bzw. 250 µl (*Staphylococcus aureus* und *Shigella flexneri*) in 25 ml vorgewärmtes Medium überführt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,3 bei 37° C geschüttelt. Für *Staphylococcus aureus* wurde LB Medium, für *Listeria monocytogenes* BHI-Medium und für *Shigella flexneri* TSB-Medium verwendet. Nach dem Zentrifugieren (4° C, 3000 g, 5 min) wurde mit eiskaltem PBS gewaschen und das Bakterienpellett in 1 ml PBS resuspendiert. Die Bakterien wurden für die Infektionsexperimente mit PBS auf eine MOI 50 (multiplicity of infection, entspricht 50 Bakterien pro Zelle) eingestellt.

2.2.3. Präparation von Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Für die *in vitro* Differenzierung von Zellen aus dem Knochenmark zu Knochenmarksmakrophagen (BMDM) wurde Knochenmark aus den Ober- und Unterschenkelknochen von Mäusen präpariert. Zur Entfernung von Erythrozyten wurden die Zellen in 5 ml NH_4Cl /Tris resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (5 min, 4° C, 600 g) wurde das Zellpellet in VLE RPMI 1640 Medium (BMDM Medium), das 10 ng/ml M-CSF enthielt, aufgenommen und in Bakterienkulturen verteilt. M-CSF (Macrophage-colony-stimulating factor) ist ein Zytokin, das für die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu Makrophagen benötigt wird. Die BMDM wurden ab Tag 8 bis zum Tag 10 nach Präparation für Experimente verwendet. Zum Ernten der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml auf 37° C vorgewärmtes PBS, das 1 mM EDTA enthielt, ersetzt. Mit einem Zell-Schaber wurden die Makrophagen vom Schalenboden abgelöst, zentrifugiert (5 min, 4° C, 300 g) und in 1 ml HBSS aufgenommen.

2.2.4. Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies

2.2.4.1. Messung von Superoxidanionen mit MCLA

Die Bestimmung extrazellulärer Superoxidanionen erfolgte in weißen 96-well Mikrotiterplatten (LumiNunc). Die BMDM wurden für die Bestimmung der ROS-Produktion in Suspension verwendet. Alle vorbereitenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um einen definierten Startpunkt für die Analyse zu erhalten. Die Messungen erfolgten bei 37° C.

BMDM, von denen ein Teil mit 10 ng/ml TNF über einen Zeitraum von 72 Stunden vorbehandelt worden war, wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen /ml in HBSS verwendet. Pro well wurden 100 μl der Zellsuspension verwendet und Triplikate gemessen. Ein Teil der Proben wurde mit 25 μM PMA stimuliert (Kontrolle mit 25 μM DMSO). Nach Zugabe von 5 μM MCLA (2-methyl-6-[4-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one) wurde sofort mit der Messung im Microplate Reader (Tecan oder Berthold) über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C begonnen. Die entstehende Lumineszenz wurde jede Minute gemessen. Der Farbstoff MCLA wird durch Superoxidanionen zur Chemilumineszenz angeregt und kann photometrisch quantifiziert werden.

2.2.4.2. Analyse der intrazellulären ROS-Produktion mit DCF

Die Bestimmung der intrazellulären ROS-Produktion erfolgte in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten. Alle Schritte zur Vorbereitung des Experiments erfolgten auf Eis. BMDM, die zum Teil mit 10 ng/ml TNF für 72 Stunden voraktiviert worden waren, wurden mit 20 μM DCF für 15 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4° C, 600 g, 5 min) und mit eiskaltem HBSS gewaschen. Die BMDM wurden auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ mit HBSS eingestellt und 100 μl /well ausplattiert. Nach Zugabe von 25 μM PMA (Kontrolle 25 μM DMSO) wurde sofort mit der Messung im Microplate Reader (Tecan) über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C begonnen. Die Fluoreszenz wurde jede Minute bestimmt. Der Farbstoff 2,7-Dihydrochloro-fluoresceindiacetat (DCFH-DA) diffundiert aufgrund seiner unpolaren Eigenschaften in die Zelle. Im Zytosol der Zelle wird die Acetylgruppe durch zelluläre Esterasen abgespalten. Das entstehende polare Dichlorodihydrofluorescin (DCFH) kann die Zelle nicht mehr verlassen und reichert sich im Inneren an. In der Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies wird DCFH rasch zum grün-fluoreszierenden 2,7-Dichloro-fluorescin (DCF) oxidiert (Royall and Ischiropoulos 1993). Die intrazelluläre Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt daher die Intensität der Fluoreszenz, was einen Rückschluss auf die intrazellulär gebildete Menge an ROS ermöglicht.

2.2.4.3. Bestimmung der ROS-Produktion im Durchflusszytometer

Für die Analyse der intrazellulären ROS-Produktion mittels Durchflusszytometrie wurde ein Teil der BMDM für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert. Jeweils 1×10^6 BMDM in 1 ml HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 μM DCF bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4° C, 600 g, 5 min) und einmal mit HBSS gewaschen. Die BMDM wurden mit 25 μM PMA (Kontrollen mit 25 μM DMSO) bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. 100 μl der Zellsuspension wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 100 μl MACS-Puffer aufgefüllt. Von jeweils 10^4 Zellen wurde im Durchflusszytometer (FACSCalibur) die gebildete Fluoreszenz quantifiziert (488 nm Laser, 525 nm Filter).

2.2.4.4. Messung mitochondrialer ROS mit MitoSOX Red

Für die Analyse der mitochondrialen ROS-Produktion wurde der Farbstoff MitoSOX Red verwendet. MitoSOX Red wird von lebenden Zellen aufgenommen und gelangt direkt in die Mitochondrien. Dort wird es von Superoxid oxidiert und bindet, da es ein Derivat von Ethidiumbromid ist, rot fluoreszierend an die mitochondriale DNA (Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2007). Für dieses Experiment wurden 5×10^5 BMDM in 1 ml HBSS mit 5 μ M MitoSOX versetzt und für 15 Minuten bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert (4° C, 600 g, 5 min) und einmal mit HBSS gewaschen. Nach Aufnahme in 150 μ l MACS-Puffer wurden die BMDM in FACS-Röhrchen überführt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer (FACSCalibur) mit 488 nm angeregt und die Emission bei 575 nm bestimmt.

2.2.4.5. ROS-Produktion nach Infektion mit Bakterien

Für Bakterieninfektionen wurden BMDM in antibiotikafreies BMDM Medium (VLE RPMI 1640 Medium mit 10% FCS, 2mM HEPES, 200 nM Natrium-Pyruvat und 10 ng/ml M-CSF) überführt und in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/well in weiße 96-well Mikrotiterplatten (LumiNunc) ausgesät. Nach drei Stunden Inkubation bei 37° C waren die Makrophagen adhärent und wurden nach dem Zentrifugieren (4° C, 300 g, 5 min) mit HBSS gewaschen. Die Infektion erfolgte durch Zugabe von 50 μ l Bakterien-Mix, der eiskaltes PBS mit Bakterien in einer MOI 50 (multiplicity of infection) und 5 % NMS (normales Maus-Serum) enthielt. Die Mikrotiterplatte wurde zur Synchronisation der Infektion zentrifugiert (4° C, 850 g, 5 min) Der Überstand wurde verworfen und 100 μ l kaltes HBSS zugegeben. Sofort nach Hinzufügen von 100 μ l eiskalter MCLA-Lösung (Endkonzentration 5 μ M) wurde die entstandene Lumineszenz im Microplate Reader (Berthold) quantifiziert. Hierzu wurde über den Zeitraum von einer Stunde jede Minute die Lumineszenz bei einer Temperatur von 37° C gemessen.

2.2.5. LDH Release Assay

Der Anteil abgetöteter BMDM nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* wurde mit Hilfe des CytoTOX 96 Non-Radioactive-Cytotoxicity-Assay (Promega) bestimmt. Wenn die Zytoplasmamembran der Zelle durch Pyroptose oder Apoptose zerstört wird, gelangen intrazelluläre Bestandteile der Zelle ins Medium. Die Lactatdehydrogenase ist ein stabiles, im Zytoplasma

lokalisiertes Enzym, welches die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat katalysiert. Dabei wird gleichzeitig NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert. Die Reaktion findet auch in entgegengesetzter Richtung statt. Aus Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist, gelangt Lactatdehydrogenase ins umgebende Medium. Nach Zugabe eines gelb gefärbten Tetrazoliumsals zum Überstand katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion zu rot-gefärbtem Formazan. Hierbei wird NADH/H^+ wieder zu NAD^+ oxidiert. Die Farbintensität wird photometrisch bei 490 nm bestimmt und korreliert mit der Menge an vorhandener LDH. Die gemessene LDH-Menge, verglichen mit der Gesamtmenge an LDH, ermöglicht die Bestimmung des Anteils getöteter Zellen (Nachlas, Margulies et al. 1960; Wu, Ren et al. 2007).

Für den LDH Release Assay wurden $0,5 \times 10^6$ BMDM/well in 500 μl VLE RPMI 1640 Medium (ohne Antibiotika, mit Zusatz von 10% FCS, 2 mM HEPES, 200 nM Natrium-Pyruvat und 10 ng/ml M-CSF) in einer 12-well Platte ausgesät. Nach ca. drei Stunden waren die Zellen adhärent, der Überstand wurde abgenommen und durch 500 μl vorgewärmtes Medium ersetzt, das Bakterien mit einer MOI 50 und 5% NMS enthielt. Die Platten wurden zur Synchronisation der Infektion bei 4° C und 850 g für 5 min zentrifugiert und 30 min bei 37° C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und drei Mal mit kaltem PBS gewaschen, um nicht-gebundene Bakterien zu entfernen. Nach Zugabe von 1 ml warmen VLE RPMI 1640 Medium, wurden die Platten für eine halbe Stunde bei 37° C inkubiert, damit die gebundenen Bakterien in die Makrophagen aufgenommen werden konnten. Der Zusatz von 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamicin sollte das Wachstum extrazellulär vorhandener Bakterien hemmen. Jeweils zwei, vier und sechs Stunden nach Infektion wurden 100 μl des Überstands zur Bestimmung der LDH-Menge entnommen. Zu dem restlichen Überstand wurde nach sechs Stunden 1 % Triton-X 100 gegeben, um die Zellen zu lysieren. Von dem Gesamtlisat wurden ebenfalls 100 μl für die photometrische Quantifizierung entnommen.

2.2.6. Statistische Analyse

Die statistischen Analysen wurden durch den two-tailed t-Test des Graphikprogramms GraphPad Prism (Graphpad Software, Inc. Version 5.04) bestimmt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Intrazelluläre und extrazelluläre ROS-Produktion in BMDM von CerS^{-/-} Mäusen nach Stimulation mit PMA

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Ceramid-Zusammensetzung der Zellmembran auf die Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplexes (NOX 2) in Makrophagen aus Knochenmark (bone marrow derived macrophages, BMDM) untersucht. Hierzu wurden sowohl extra- als auch intrazelluläre ROS gemessen.

Die Inkubation mit Phorbolestern, z.B. Phorbol- 12-myristat- 13-acetat (PMA), aktiviert die NOX2 und regt sie zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies an. Es kommt zu einer indirekten Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes, da PMA aufgrund seiner Struktur (Ähnlichkeit zu Diacylglycerol) zunächst die Proteinkinase C aktiviert (Ebeling, Vandenbark et al. 1985). Letztere phosphoryliert Membranproteine des NADPH-Oxidase-Komplexes, es kommt zum Einstrom von Ca²⁺ und führt letztendlich zur Bildung von ROS (Niedel, Kuhn et al. 1983).

3.1.1. Messung extrazellulärer ROS

Die NADPH-Oxidasen phagozytierender und nicht-phagozytierender Zellen sind in Membranen lokalisiert und produzieren Superoxidanionen (O₂⁻) (Lambeth 2004). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Ceramid-Zusammensetzung der Membran auf die ROS-Produktion von Makrophagen hat. In Säugetieren gibt es sechs Ceramidsynthasen, (CerS1- CerS6), die jeweils spezifisch Fettsäuren einer bestimmten Kettenlänge verwenden (Pewzner-Jung, Ben-Dor et al. 2006). Es wurde untersucht, in welchem Ausmaß BMDM aus CerS1, CerS2, CerS4, CerS5 und CerS6 knockout Mäusen (KO Mäusen) extrazelluläre ROS produzieren können. Für die Analyse der durch den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2) gebildeten, extrazellulär vorliegenden Superoxidanionen (O₂⁻) wurde das hochsensitive Chemilumineszenz-Substrat MCLA (2-Methyl-6-[4-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one) verwendet, das durch Superoxidanionen zur Chemilumi-

neszenz angeregt wird (Uehara, Maruyama et al. 1993; Tyurina, Serinkan et al. 2004).

In Neutrophilen und Makrophagen kann die Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplexes durch TNF und andere Faktoren erhöht werden. Diese Substanzen lösen nicht selber die ROS-Produktion aus, sondern bewirken einen *steady to go*-Status, der bei einem zweiten Stimulus zu einer schnelleren und stärkeren Aktivität der NOX2 führt. Dieser Vorgang wird als *sPriming* bezeichnet. Die Aktivierung der NOX2 erfolgt durch Protein-Phosphorylierung, GTPase-Aktivierung und Anlagerung von zytosolischen Komponenten an die Zytoplasmamembran und damit Bildung des aktiven Enzymkomplexes NOX2 (El-Benna, Dang et al. 2008).

Abb. 4 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf einer Messung der extrazellulären ROS-Produktion von Wildtyp-BMDM, die mit MCLA durchgeführt wurde. Dargestellt ist die zu jedem Zeitpunkt gemessene MCLA Lumineszenz. Stimulation mit PMA bewirkte in den ruhenden Makrophagen nur eine minimale Produktion extrazellulärer ROS im Vergleich zu unbehandelten BMDM. Durch Priming mit TNF wurde die NOX2 der Makrophagen in einen voraktivierten Zustand gebracht. Danach war eine deutliche Erhöhung der Superoxidproduktion messbar. Die zusätzliche Stimulierung TNF-vorbehandelter BMDM mit PMA, führte nochmals zu einer Steigerung der ROS-Produktion. Die extrazelluläre ROS-Produktion durch den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2) ließ sich also sehr effektiv durch das Priming mit TNF und Stimulation mit PMA steigern. Die Menge der messbaren ROS erreichte nach ca. 15 bis 20 Minuten ihr Maximum.

Der Einfluss der Ceramid-Zusammensetzung der Membran auf die Aktivität der NOX2 wurde mit BMDM aus CerS KO Mäusen analysiert. Die Maximalwerte der gemessenen ROS-Produktion wurden zu unbehandelten BMDM des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt.

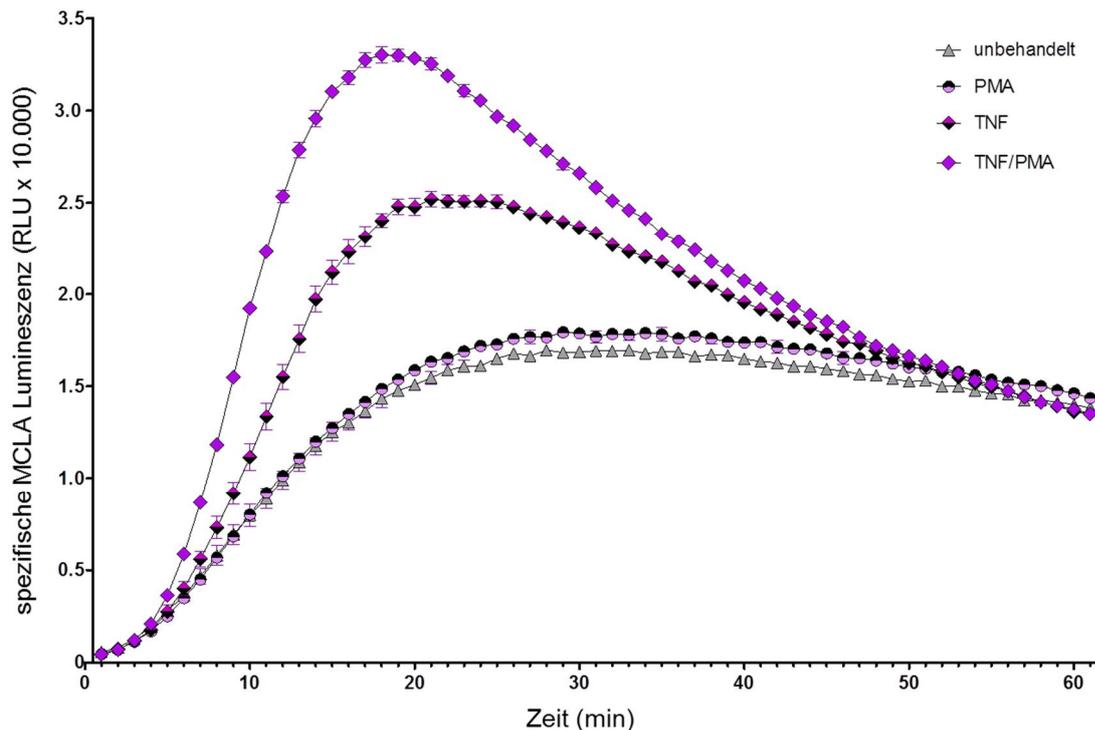


Abb. 4: Die extrazelluläre ROS-Produktion von BMDM wird durch Priming mit TNF und Stimulation mit PMA stark erhöht.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert, wo angegeben, mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die Lumineszenz von MCLA wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Gezeigt sind pro Zeitpunkt der Mittelwert \pm s. e. m. (standard error of the mean) von Triplikaten einer exemplarischen Messung.

Ceramidsynthese 1

BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen bildeten gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM (Abb. 5). Die Stimulation unbehandelter Makrophagen mit PMA hatte keinen merklichen Effekt auf die Superoxid-Produktion. Mit TNF-vorbehandelte *CerS1*^{-/-} BMDM produzierten wie der entsprechende Wildtyp deutlich mehr ROS. Nach zusätzlicher Stimulation mit PMA erhöhte sich die Menge an generiertem Superoxid nochmals um das 1,4 fache im Vergleich zu den nur mit TNF-geprimten Zellen. Die gemessenen Werte der *CerS1*^{-/-} BMDM zeigten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp.

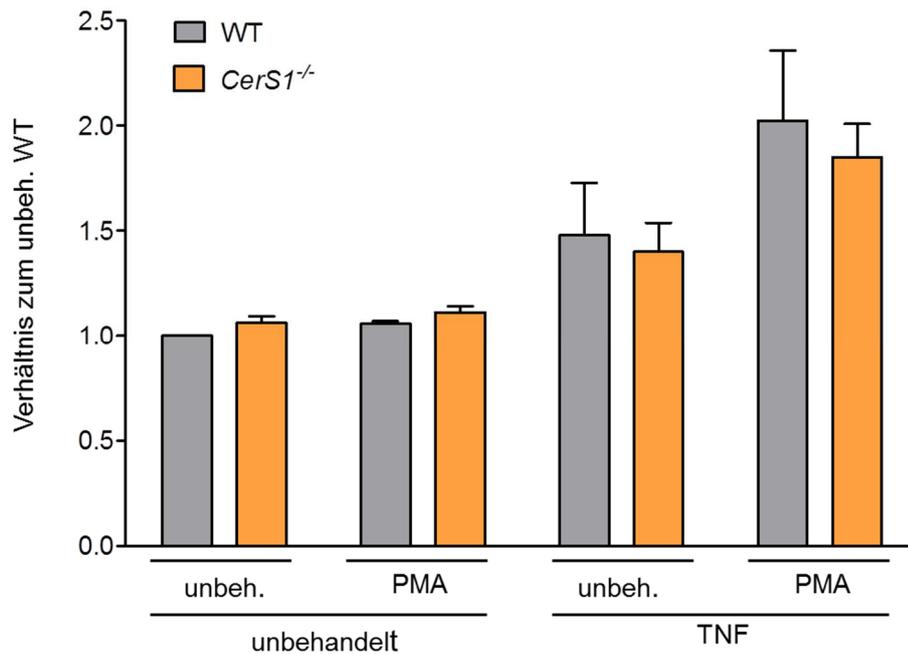


Abb. 5: BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen produzieren gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden BMDM in HBSS ausplattiert und 1×10^5 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplicaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehauelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 2

Unbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen generierten gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie der Wildtyp (Abb. 6). Die Stimulation mit PMA hatte sowohl in *CerS2*^{-/-} BMDM, als auch in Wildtyp-BMDM keinen deutlichen Effekt. Wurden die Makrophagen mit TNF vorbehandelt, produzierten BMDM aus dem Wildtyp die 1,5-fache Menge an extrazellulären ROS, die BMDM aus *CerS2*^{-/-} nur die 1,2-fache Menge. Wurden TNF-geprimte Zellen zusätzlich mit PMA stimuliert, generierten die Makrophagen des Wildtyps 2,3 mal mehr ROS, zeigten also eine deutlich erhöhte Aktivität des NADPH-Oxidase-Komplex gegenüber nur mit TNF behandelten BMDM.

TNF vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzierten nach Stimulation mit PMA hingegen lediglich das 1,4-fache an ROS. TNF-geprimte *CerS2*^{-/-} BMDM, die zusätzlich mit PMA stimuliert wurden generierten also nur 61% der ROS-Menge, die entsprechend behandelte Wildtypmakrophagen produzierten. Die *CerS2*^{-/-} BMDM zeigten also eine, wenn auch geringere, Reaktion auf das Priming mit TNF. Die Zugabe von PMA konnte jedoch die NOX2 Aktivität nicht weiter steigern. Das TNF Priming in den *CerS2*^{-/-} BMDM ist also gestört.

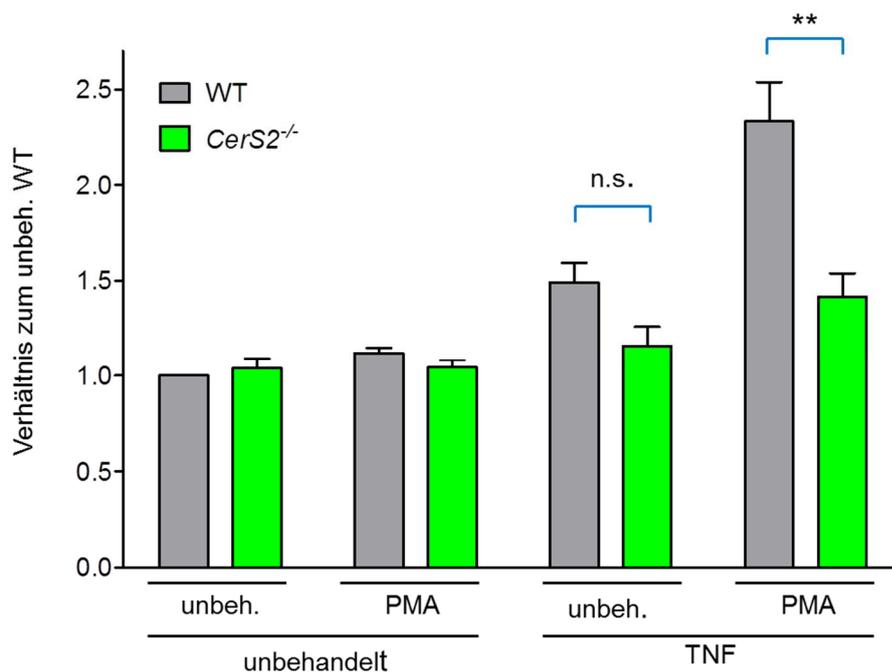


Abb. 6: Mit TNF vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzieren nach Stimulation mit PMA signifikant weniger extrazelluläre ROS als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden BMDM in HBSS ausplattiert und 1×10^5 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplicaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von neun unabhängigen Experimenten mit insgesamt neun Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS2*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$) dargestellt.

Ceramidsynthese 4

Unbehandelte BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen erzeugten gleiche Mengen Superoxid wie Wildtyp-BMDM (Abb. 7). Die Stimulation mit PMA hatte in *CerS4*^{-/-} BMDM und im Wildtyp keinen signifikanten Effekt. Priming mit TNF führte bei *CerS4*^{-/-} BMDM zu einem gleich hohen Anstieg produzierter ROS, wie bei BMDM aus dem Wildtyp. Zusätzliche Stimulation TNF-behandelter BMDM mit PMA führte zu einer nochmaligen deutlichen Erhöhung der generierten ROS, sowohl im Wildtyp, als auch in *CerS4*^{-/-} BMDM. *CerS4*^{-/-} BMDM zeigten also im Hinblick auf die Superoxidproduktion keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp.

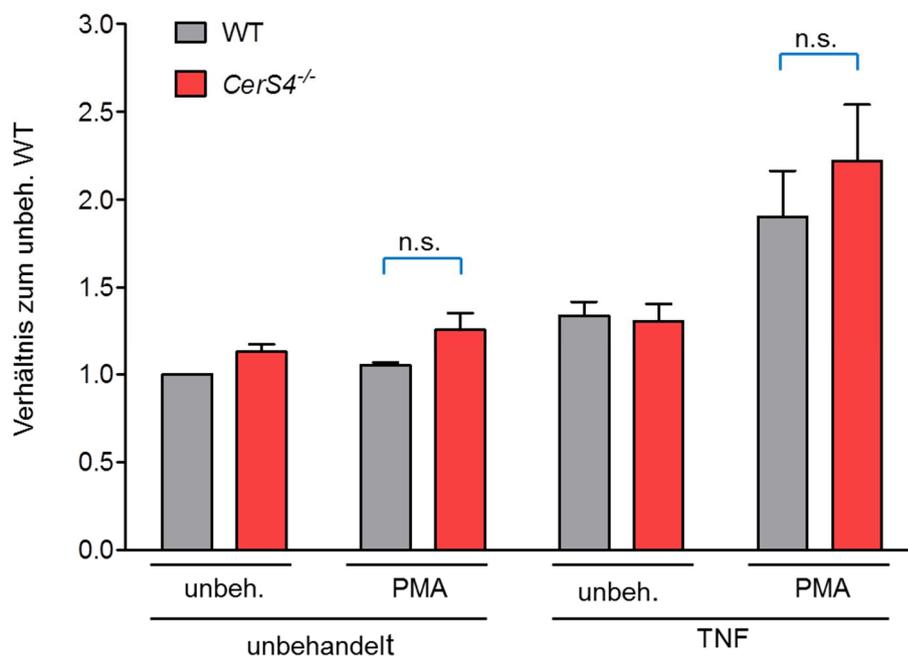


Abb. 7: BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen generieren gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden BMDM in HBSS ausplattiert und 1×10^5 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplicaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m dargestellt.

Ceramidsynthase 5

Unbehandelte BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen produzierten gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie unbehandelte BMDM des Wildtyps (Abb. 8). Stimulation mit PMA hatte, wie auch im Wildtyp, keinen Effekt. Priming mit TNF führte in den *CerS5^{-/-}* BMDM zu einer Erhöhung der ROS-Produktion, die aber analog zum Wildtyp war. Die zusätzliche Stimulation mit PMA von TNF-vorbehandelten Makrophagen führte in Wildtyp und in *CerS5^{-/-}* BMDM zu einer sehr viel stärkeren Superoxidgenerierung. Der Unterschied zwischen den *CerS5^{-/-}* BMDM und den Wildtyp-BMDM war nicht signifikant.

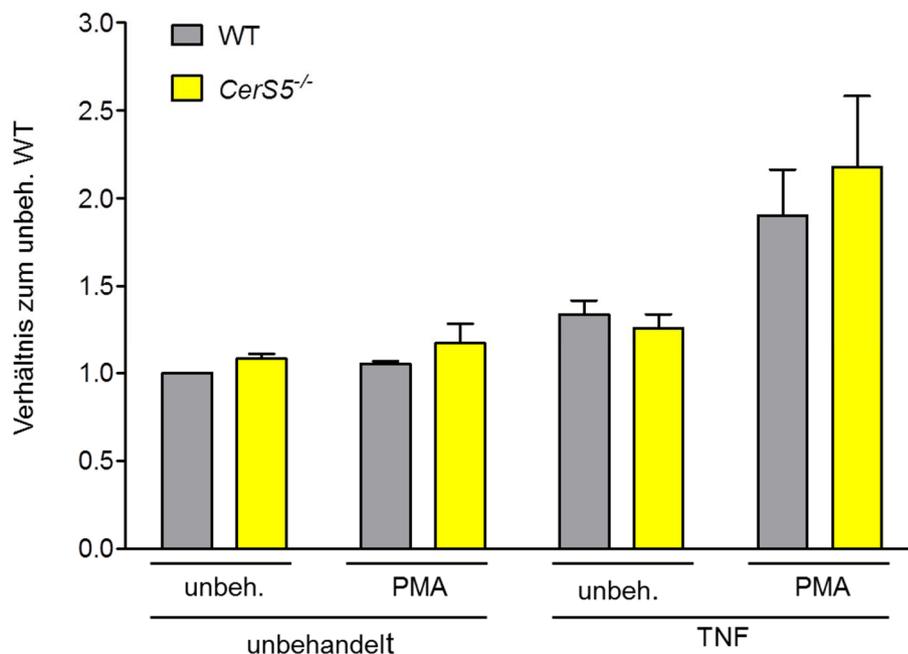


Abb. 8: BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen generieren gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden BMDM in HBSS ausplattiert und 1×10^5 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplicaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 6

Unbehandelte und mit PMA stimulierte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen generierten gleiche Mengen extrazellulärer ROS wie der Wildtyp (Abb. 9). Priming mit TNF bewirkte eine leichte Erhöhung der Superoxid-Produktion gegenüber unbehandelten BMDM: Bei Wildtyp-BMDM stieg die ROS-Menge um das 1,4-fache, bei *CerS6*^{-/-} BMDM um das 1,7-fache an. Nach Stimulation mit PMA produzierten TNF-geprimte Wildtyp-BMDM die 2,4-fache Menge an ROS, TNF-geprimte *CerS6*^{-/-} BMDM generierten sogar das 4,3-fache an extrazellulären ROS gegenüber den unbehandelten Makrophagen und damit 1,8-mal mehr, als der entsprechende Wildtyp.

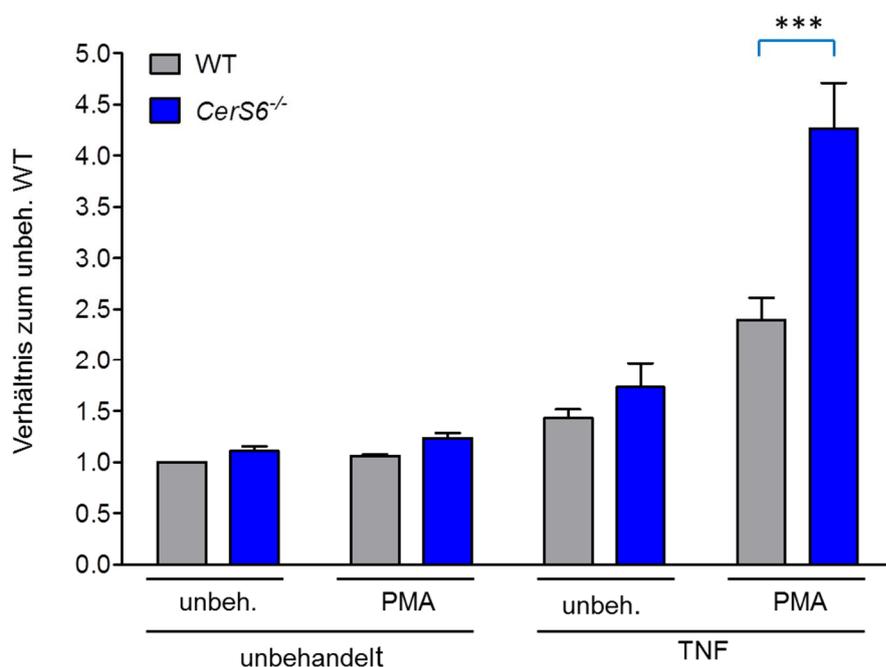


Abb. 9: BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen produzieren nach Priming mit TNF und Stimulation mit PMA signifikant mehr Superoxid als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden BMDM in HBSS ausplattiert und 1×10^5 Zellen pro well in eine Mikrotiterplatte ausgesät. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA stimuliert und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von zehn unabhängigen Experimenten mit insgesamt zehn Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) dargestellt.

3.1.2. Intrazelluläre ROS Produktion

Die Messung der intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies erfolgte nach Inkubation der Zellen mit 2,7-Dihydrochlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA), welches aufgrund seiner unpolaren Eigenschaften in die Zelle diffundieren kann. Im Zytosol der Zelle wird die Acetylgruppe durch zelluläre Esterasen abgespalten. Das entstehende polare Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) kann die Zelle nicht mehr verlassen und reichert sich im Zytoplasma an. In der Gegenwart von reaktiven Sauerstoffspezies wird DCFH rasch zum grün-fluoreszierenden 2,7-Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert (Royall and Ischiropoulos 1993). Die intrazelluläre Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmt daher die Intensität der DCF Fluoreszenz, die somit einen Rückschluss auf die intrazellulär gebildete Menge an ROS ermöglicht.

Kinetik der intrazellulären ROS Produktion

Die Veränderung der intrazellulären ROS Produktion im Zeitverlauf wurde in Mikrotiterplatten im Microplate Reader gemessen. Abb. 10 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf einer Messung der intrazellulären ROS-Produktion nach DCF-Färbung in Wildtyp-BMDM. Bei unbehandelten WT-Knochenmarksmakrophagen konnte man im zeitlichen Verlauf einen kontinuierlichen Anstieg der Fluoreszenz beobachten. Die Stimulation mit PMA, das zur indirekten Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes führt, hatte keinen messbaren Effekt auf die intrazelluläre ROS-Produktion. Vorbehandlung der Makrophagen mit TNF führte zu einer deutlich geringeren Fluoreszenz der Zellen sowohl zu Beginn der Messung, als auch im weiteren Verlauf. Auch hier hatte die Stimulation mit PMA keinen signifikanten Effekt auf die Menge der generierten ROS. In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse nach PMA Stimulation nicht gezeigt, da kein Effekt auftrat. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie wurden die Werte der Messung zum Zeitpunkt $t = 0$ min als Balkendiagramme dargestellt.

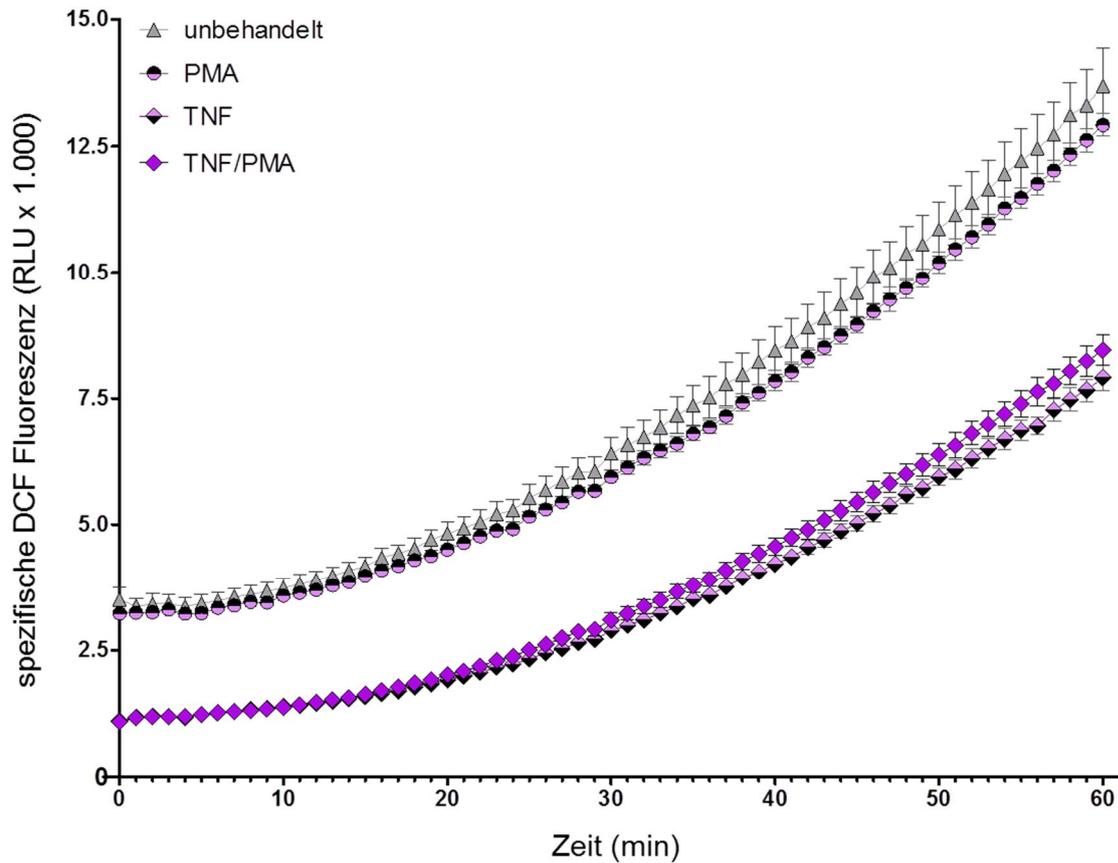


Abb. 10: Messung der intrazellulären ROS-Produktion mit DCF in WT-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Danach wurde, wo angegeben mit 25 μ M PMA stimuliert. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Alle Proben wurden als Triplikate angesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm s. e. m. aus drei, in einem Experiment verwendeten, Wildtypen.

Ceramidsynthese 1

Die Menge der intrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies war in unbehandelten *CerS1*^{-/-} BMDM genauso groß wie im unbehandelten Wildtyp. Priming mit TNF führte wie im Wildtyp zu geringerer ROS-Produktion (Abb. 11).

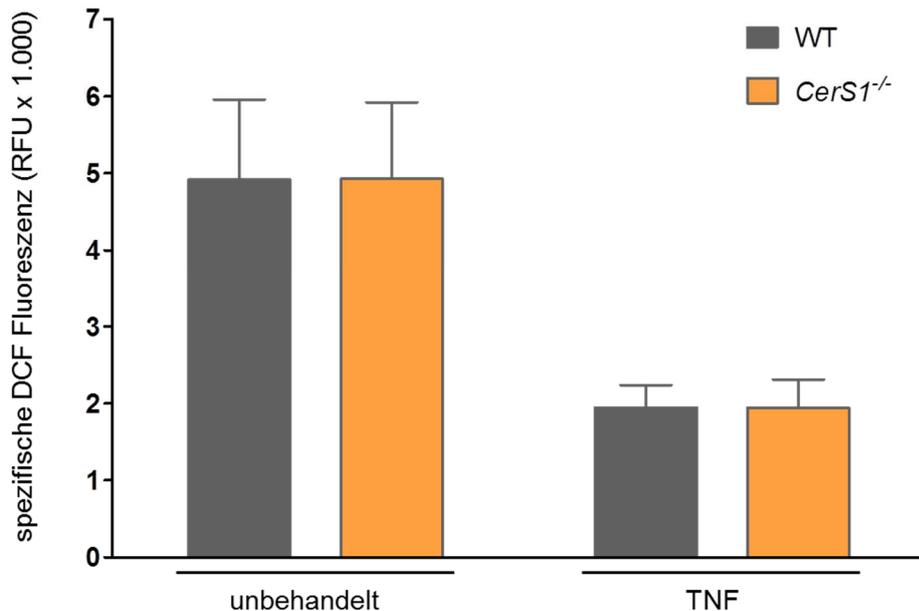


Abb. 11: BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen produzieren gleiche Mengen an intrazellulären ROS wie WT-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt ist der zum Zeitpunkt $t=0$ gemessene Wert der ROS-Produktion. Das Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 2

Unbehandelte *CerS2*^{-/-} BMDM generierten zum Zeitpunkt t=0 deutlich mehr intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies als unbehandelte WT BMDM (Abb. 12). Priming mit TNF führte sowohl bei Wildtyp-BMDM, als auch bei *CerS2*^{-/-} BMDM zu einer geringeren Produktion von intrazellulären ROS im Vergleich zu unbehandelten BMDM. Die TNF-vorbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM generierten genauso viel intrazelluläre ROS wie der TNF-vorbehandelte Wildtyp.

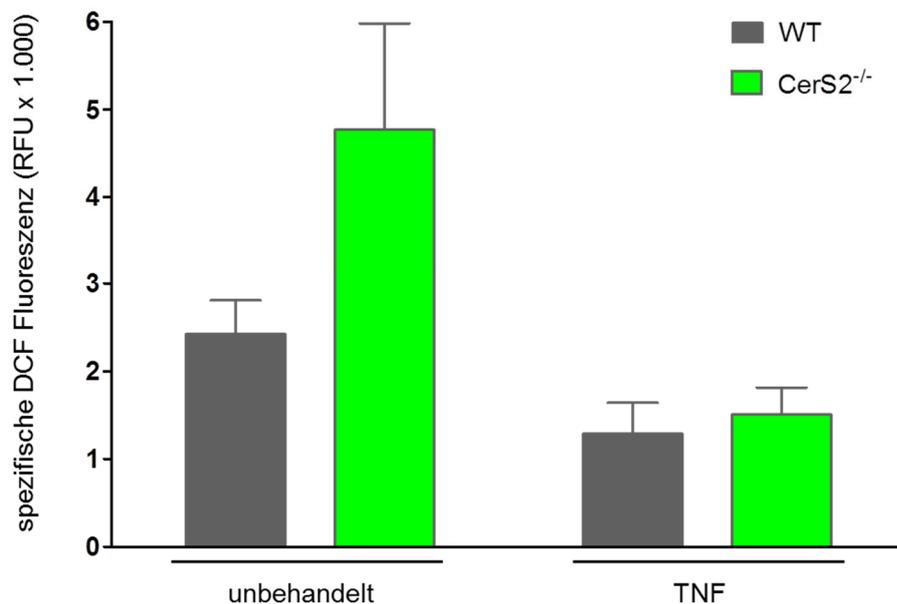


Abb. 12: Unbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzieren deutlich mehr intrazelluläre ROS als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt ist der zum Zeitpunkt t=0 gemessene Wert der ROS-Produktion. Das Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt vier Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 4

BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen fluoreszierten nach DCF-Färbung ebenso stark, wie BMDM aus Wildtypmäusen (Abb. 13). Priming mit TNF führte zu einer geringeren Produktion intrazellulärer ROS, sowohl in den *CerS4*^{-/-} BMDM, als auch im Wildtyp. Zwischen *CerS4*^{-/-} und Wildtyp-BMDM bestand kein Unterschied bezüglich der intrazellulär generierten Menge an reaktiven Sauerstoffspezies.

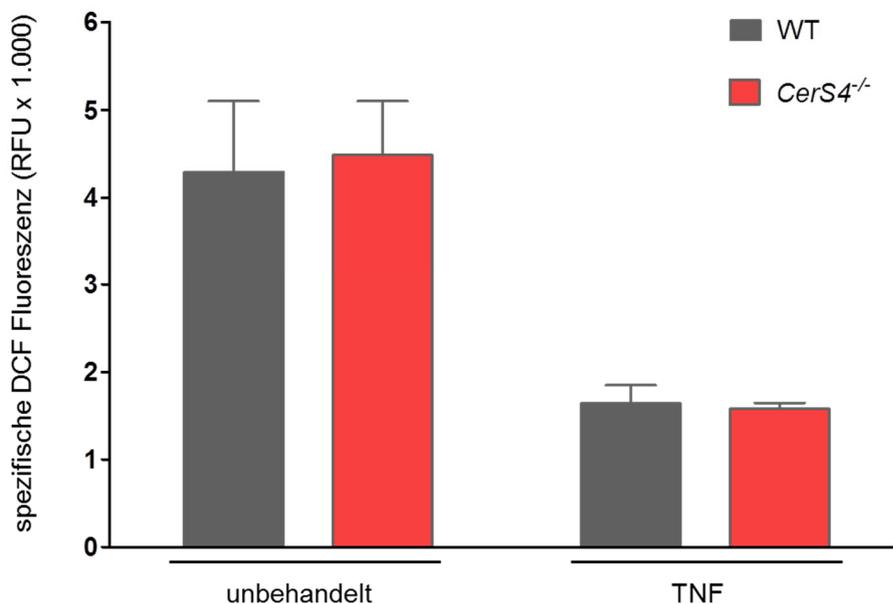


Abb. 13: BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen generieren gleiche Mengen an intrazellulären ROS wie WT-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt ist der zum Zeitpunkt t=0 gemessene Wert der ROS-Produktion. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthase 5

Unbehandelte BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen generierten gleiche Mengen an intrazellulären ROS wie BMDM aus dem Wildtyp. Sowohl im Wildtyp, als auch in *CerS5^{-/-}* Makrophagen führte Priming mit TNF zu einer geringeren ROS-Produktion (Abb. 14).

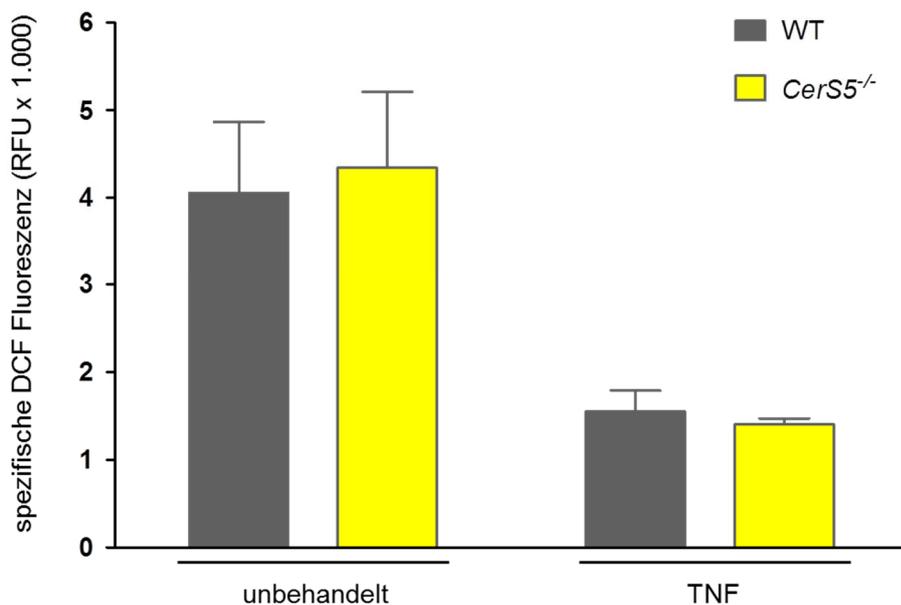


Abb. 14: BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen generieren intrazellulär gleiche Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt ist der zum Zeitpunkt t=0 gemessene Wert der ROS-Produktion. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 6

Die Messung der intrazellulär erzeugten reaktiven Sauerstoffspezies zeigte, dass unbehandelte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen gleiche Mengen an ROS generierten wie Wildtyp-BMDM (Abb. 15). Priming mit TNF führte sowohl in Wildtyp-BMDM, als auch in BMDM der *CerS6*^{-/-} Mäuse dazu, dass weniger ROS produziert wurden.

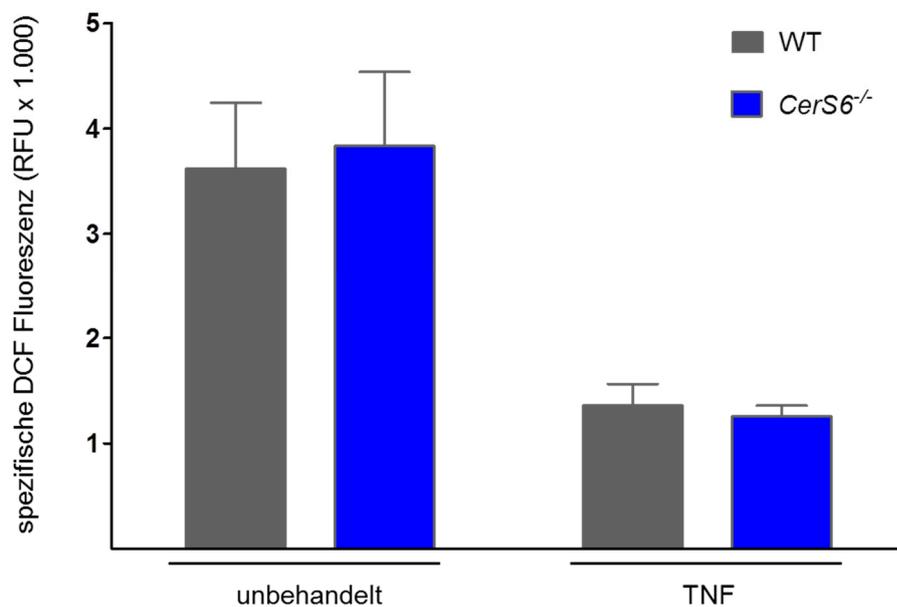


Abb. 15: BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen produzieren intrazellulär die gleiche Menge ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte in HBSS ausplattiert und für 15 Minuten mit 20 μ M DCF angefärbt. Die DCF Fluoreszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt ist der zum Zeitpunkt t=0 gemessene Wert der ROS-Produktion. Das Ergebnis von sieben unabhängigen Experimenten mit insgesamt sieben Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

3.1.3. Bestimmung der intrazellulären ROS Produktion im Durchflusszytometer (FACS)

Die Menge an intrazellulär generierten reaktiven Sauerstoffspezies wurde nach Färbung mit 2,7-Dihydrochlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) mittels der Durchflusszytometrie analysiert (Kinnula, Aito et al. 1998).

Bei einigen Experimenten, die im Mikroplatten Reader durchgeführt wurden, konnte bei den TNF-geprimten BMDM im Verlauf der Messung, die über 60 Minuten erfolgte, eine Zunahme der DCF Fluoreszenz nach PMA-Stimulation beobachtet werden. Um diesen potentiellen Effekt von PMA auf die intrazelluläre ROS-Produktion näher zu untersuchen, wurden Messungen mit der Durchflusszytometrie durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Analyse der Fluoreszenz einzelner Zellen und ist deshalb deutlich sensitiver als der Microplate Reader.

Ein Vergleich der BMDM aller verwendeten Wildtypen zeigte, dass die intrazellulär messbare Fluoreszenz und damit die intrazellulär produzierte ROS Menge nach Stimulation mit PMA im Vergleich zu den unbehandelten BMDM nicht zunahm (Abb. 16). Wurden die Knochenmarksmakrophagen mit TNF vorbehandelt, ergab die Messung im Durchflusszytometer eine Abnahme der Fluoreszenz um 48 % gegenüber den unbehandelten BMDM und damit eine deutlich geringere Produktion an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies. Eine zusätzliche Stimulierung der TNF-geprimten BMDM mit PMA steigerte die ROS-Produktion dagegen signifikant um das 1,4-fache.

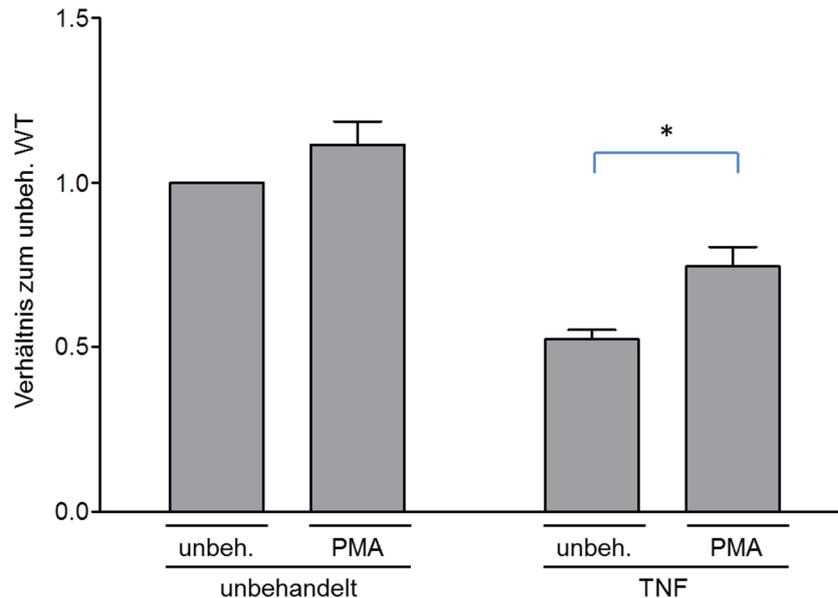


Abb. 16: WT-BMDM produzieren nach TNF Vorbehandlung deutlich weniger ROS als unbehandelte BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10^6 BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 μ M DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10^4 Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die DCF-Fluoreszenz bezogen auf unbehandelte BMDM. Das Ergebnis von neun unabhängigen Experimenten mit insgesamt zehn Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen TNF behandelten BMDM mit und ohne PMA-Stimulation wurde mit dem two-tailed t-Test analysiert. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$) dargestellt.

Ceramidsynthase 1

Die Bestimmung der DCF-Fluoreszenz im Durchflusszytometer zeigte, dass unbehandelte BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen gleiche Mengen an intrazellulären ROS bildeten wie Wildtyp-BMDM (Abb. 17). Nach Stimulation mit PMA stieg die ROS-Produktion in unbehandelten *CerS1*^{-/-} BMDM und unbehandelten Wildtyp-BMDM nicht an. TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen und Wildtyp-BMDM produzierten gleichermaßen intrazellulär deutlich weniger reaktive Sauerstoffspezies. Zusätzliche PMA-Stimulation führte in TNF-behandelten BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen und in TNF-behandelten Wildtyp-BMDM zu einer Erhöhung der generierten ROS-Menge in gleichem Ausmaß.

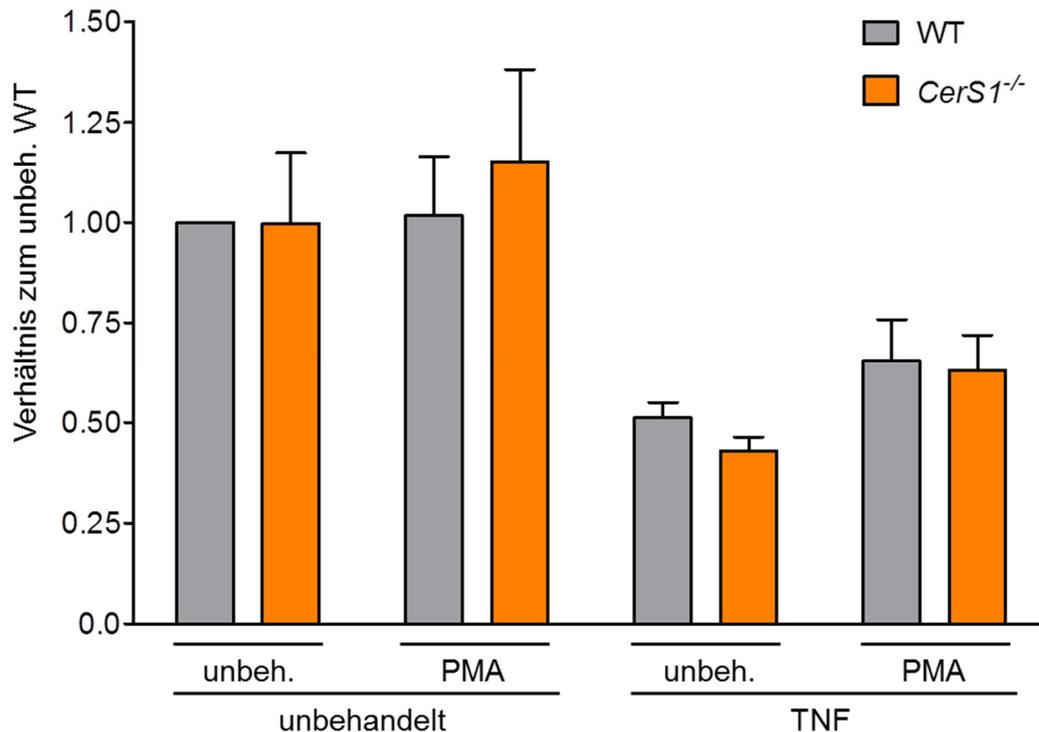


Abb. 17: BMDM aus *CerS1*^{-/-} Mäusen produzieren gleiche Mengen intrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10^6 BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 μ M DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10^4 Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS Menge, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps. Das Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt vier Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 2

Die Messung intrazellulär generierter ROS ergab für unbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen, wie auch bei der Messung in Mikrotiterplatten, einen Unterschied: BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen generierten 1,44-mal mehr ROS als der Wildtyp (Abb. 18). Stimulation der Zellen mit PMA hatte nur im unbehandelten Wildtyp eine leichte Erhöhung der generierten ROS zur Folge. In unbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM hatte die PMA Stimulation keinen Effekt auf die ROS-Produktion. Mit TNF-geprimte BMDM produzierten sowohl in Wildtyp, als auch in *CerS2*^{-/-} Mäusen deutlich weniger ROS als unbehandelte Zellen. Wurden die TNF-vorbehandelten Zellen zusätzliche mit PMA stimuliert, stieg die Menge an intrazellulär produzierten ROS sowohl im Wildtyp,

als auch in den *CerS2*^{-/-} BMDM an. Zwischen *CerS2*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM ergaben sich nach Priming mit TNF demnach keine Unterschiede in der ROS-Produktion.

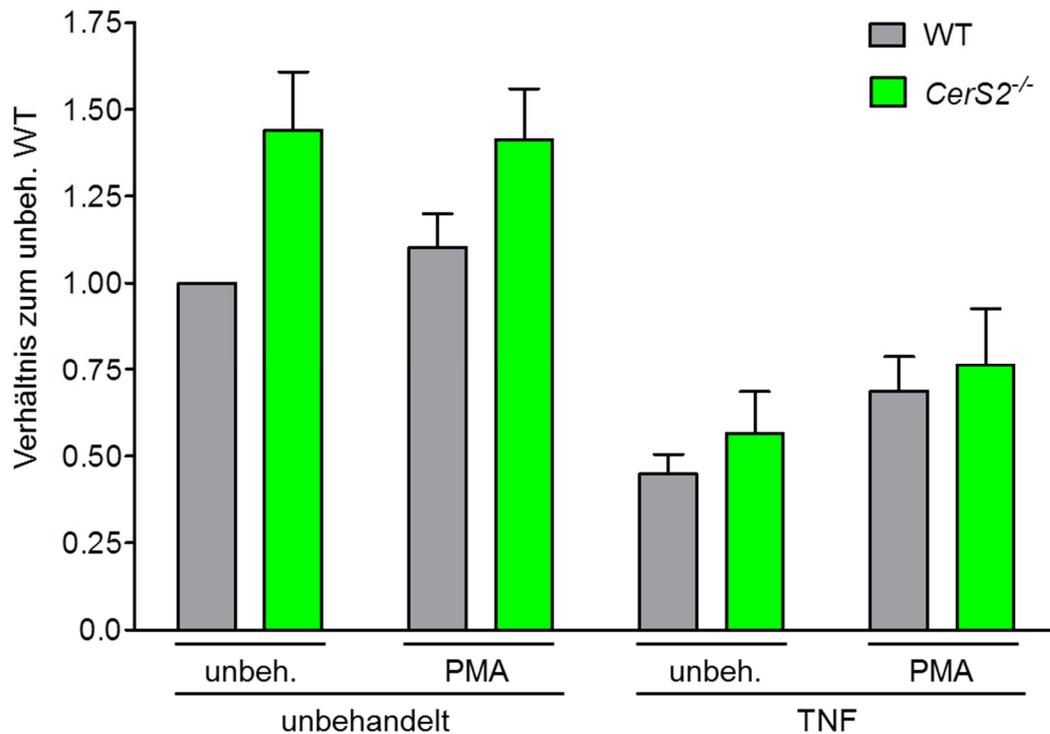


Abb. 18: Unbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen bilden intrazellulär mehr ROS, als BMDM aus dem Wildtyp.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10⁶ BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 µM DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 µM PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10⁴ Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps. Das Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen wird als Mittelwert ± s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthase 4

Aus Knochenmark von *CerS4*^{-/-} Mäusen gewonnene Makrophagen generierten gleiche Mengen an intrazellulären ROS wie Wildtyp-BMDM (Abb.19). Unbehandelte BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen verhielten sich wie BMDM aus Wildtypmäusen. Die ROS Produktion stieg im Wildtyp und auch in *CerS4*^{-/-} Knochenmarksmakrophagen nach PMA-Zugabe geringfügig an. Priming mit TNF führte zu einer deutlich verringerten

Menge an intrazellulär produzierten reaktiven Sauerstoffspezies. Die zusätzliche Stimulation von TNF-vorbehandelten Zellen mit PMA führte sowohl in *CerS4^{-/-}* BMDM als auch in Wildtyp-BMDM zu einer Erhöhung der ROS-Produktion.

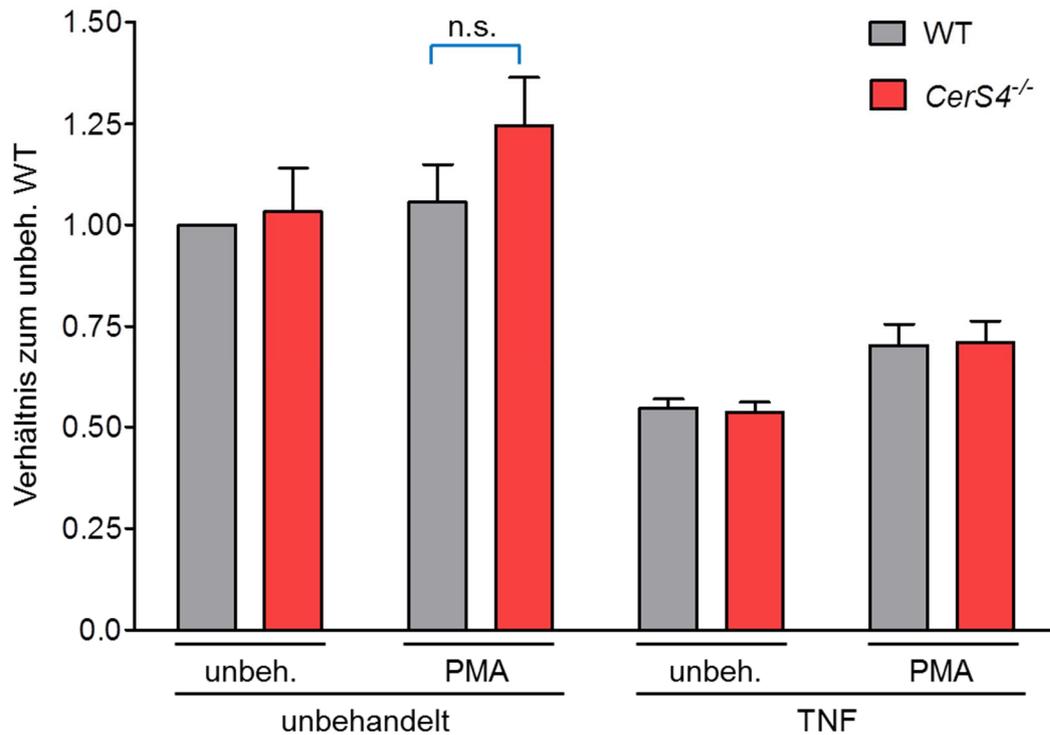


Abb. 19: BMDM aus *CerS4^{-/-}* Mäusen produzieren ebenso viel intrazelluläre ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10^6 BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 μ M DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10^4 Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthase 5

Die mittels Durchflusszytometrie durchgeführte Analyse der intrazellulären ROS-Produktion in *CerS5^{-/-}* BMDM ergab keine Unterschiede zu BMDM des Wildtyps (Abb. 20). Unbehandelte BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen produzierten genauso viele ROS wie der Wildtyp. Die Stimulation mit PMA führte zu einem geringfügigen An-

stieg, der in *CerS5^{-/-}* BMDM gleich hoch war wie im Wildtyp. Priming mit TNF führte sowohl im Wildtyp, als auch in *CerS5^{-/-}* BMDM zu einer, gegenüber unbehandelten Knochenmarksmakrophagen, deutlich reduzierten ROS-Produktion. Die zusätzliche Stimulation der mit TNF-vorbehandelten Zellen mit PMA führte zu einem Anstieg der DCF-Fluoreszenz. *CerS5^{-/-}* BMDM generierten auch hier die gleiche Menge an reaktiven Sauerstoffspezies wie der Wildtyp.

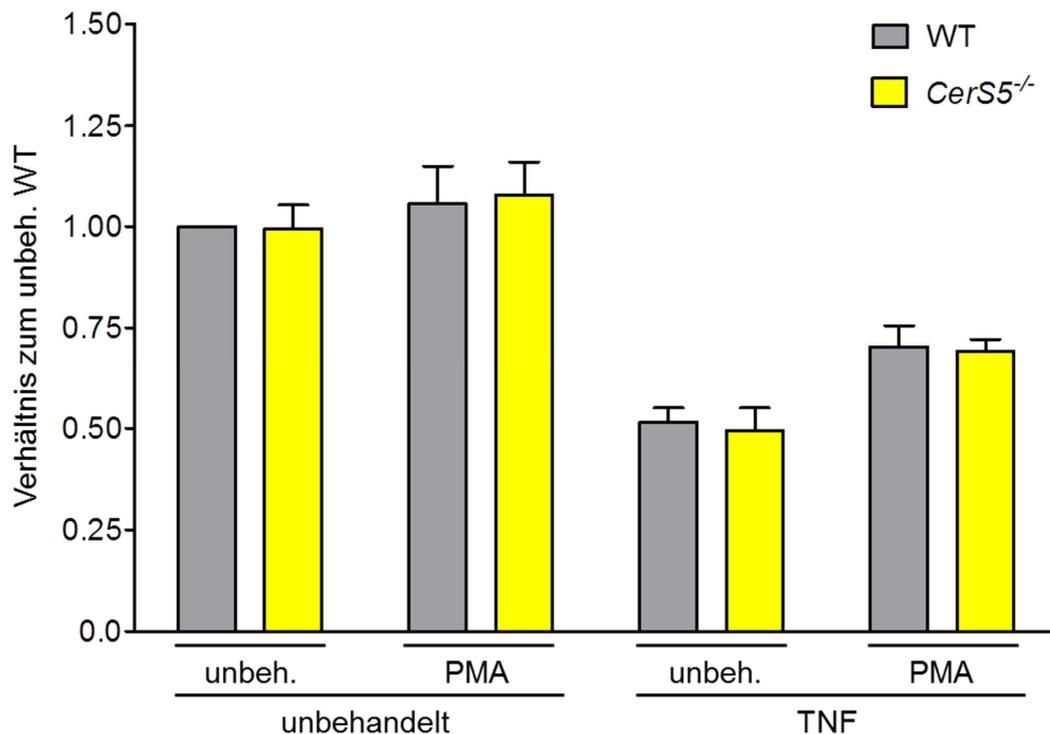


Abb. 20: BMDM aus *CerS5^{-/-}* Mäusen produzieren gleiche Mengen intrazellulärer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10^6 BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 μ M DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 μ M PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10^4 Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge, bezogen auf unbehandelte Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 6

BMDM aus *CerS6^{-/-}* Mäusen generierten bei der Messung im Microplate Reader gleiche Mengen intrazellulärer ROS wie der Wildtyp. Auch in der ROS-Messung via

Durchflusszytometrie zeigte sich, dass unbehandelte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen genauso viel intrazelluläre ROS erzeugten wie die entsprechenden Wildtypzellen (Abb. 21). Stimulation mit PMA erhöhte in *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM geringfügig die ROS Produktion. Priming mit TNF führte in *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM dazu, dass im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen deutlich weniger intrazelluläre ROS generiert wurde. Stimulation der TNF-vorbehandelten BMDM mit PMA führte sowohl im Wildtyp, als auch in *CerS6*^{-/-} Makrophagen im Vergleich zu den nur mit TNF-geprimten Zellen zu einer Erhöhung der ROS-Produktion.

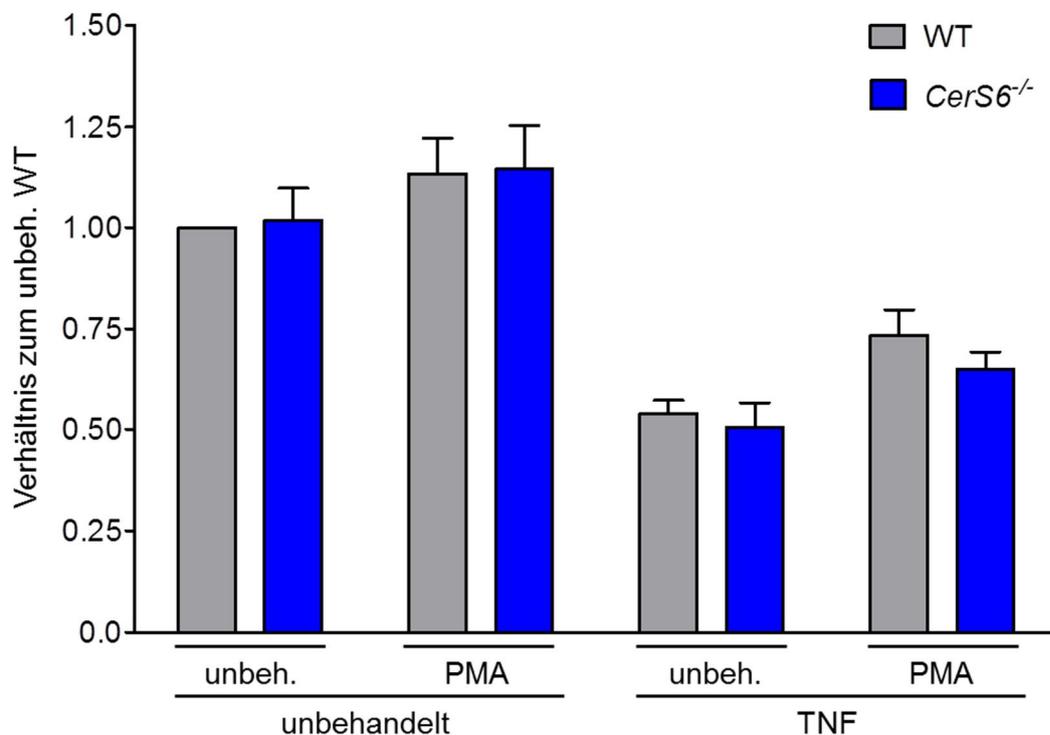


Abb. 21: BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen produzieren gleiche Mengen intrazellulärer ROS wie der Wildtyp.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Fluoreszenz von DCF gemessen. 10⁶ BMDM/ml in HBSS wurden für 15 Minuten mit 20 µM DCF bei 37° C angefärbt. Wo angegeben, wurde mit 25 µM PMA bei 37° C für 30 Minuten stimuliert. Jeweils 10⁴ Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 525 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps. Das Ergebnis von acht unabhängigen Experimenten mit insgesamt acht Mäusen wird als Mittelwert ± s. e. m. dargestellt.

3.1.4. Charakterisierung der Abhängigkeit der mitochondrialen ROS-Produktion von CerS

In Mitochondrien entstehen ROS als Nebenprodukte der oxidativen Phosphorylierung. Etwa 1-3 % des von Mitochondrien verbrauchten Sauerstoffs wird nur unvollständig reduziert. Vor allem an Komplex I und Komplex III der Atmungskette (abhängig vom Gewebe und der Spezies) entstehen so freie Elektronen, die sehr schnell mit molekularem Sauerstoff reagieren können und Superoxidanionen bilden (Ames, Shigenaga et al. 1993; Turrens 2003). Der Farbstoff MitosoxRed wird von lebenden Zellen aufgenommen und gelangt direkt in die Mitochondrien. Dort wird er von Superoxid oxidiert und bindet, da es ein Derivat von Ethidiumbromid ist, rot fluoreszierend an die mitochondriale DNA (Mukhopadhyay, Rajesh et al. 2007). Die entstandene Fluoreszenz kann im Durchflusszytometer analysiert werden. BMDM aus *CerS2^{-/-}* und *CerS6^{-/-}* Mäusen hatten im Vergleich zu Wildtyp-BMDM Unterschiede in der extrazellulären bzw. intrazellulären ROS-Produktion gezeigt. Deshalb wurde mit Hilfe des MitosoxRed-Tests analysiert, ob die Produktion mitochondrialer ROS durch eine veränderte Ceramid-Zusammensetzung der Membranen ebenfalls beeinflusst wird. In Mitochondrien produzierte ROS stellen eine Teilmenge der intrazellulär gemessenen ROS-Produktion dar. Aus diesem Grund wurde von *CerS1^{-/-}*, *CerS4^{-/-}* und *CerS5^{-/-}* BMDM, die sowohl extra- als auch intrazellulär gleiche Mengen ROS wie der Wildtyp produzierten, die mitochondriale ROS-Produktion nicht untersucht.

Ceramidsynthese 2

Unbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen generierten tendenziell mehr mitochondriale ROS als der Wildtyp (Abb. 22). Priming mit TNF führte in Wildtyp-BMDM und in *CerS2*^{-/-} BMDM zu einer leichten Abnahme der mitochondrialen ROS-Produktion. Mit TNF-geprimte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen erzeugten auch hier tendenziell etwas mehr reaktive Sauerstoffderivate als die entsprechenden BMDM des Wildtyps.

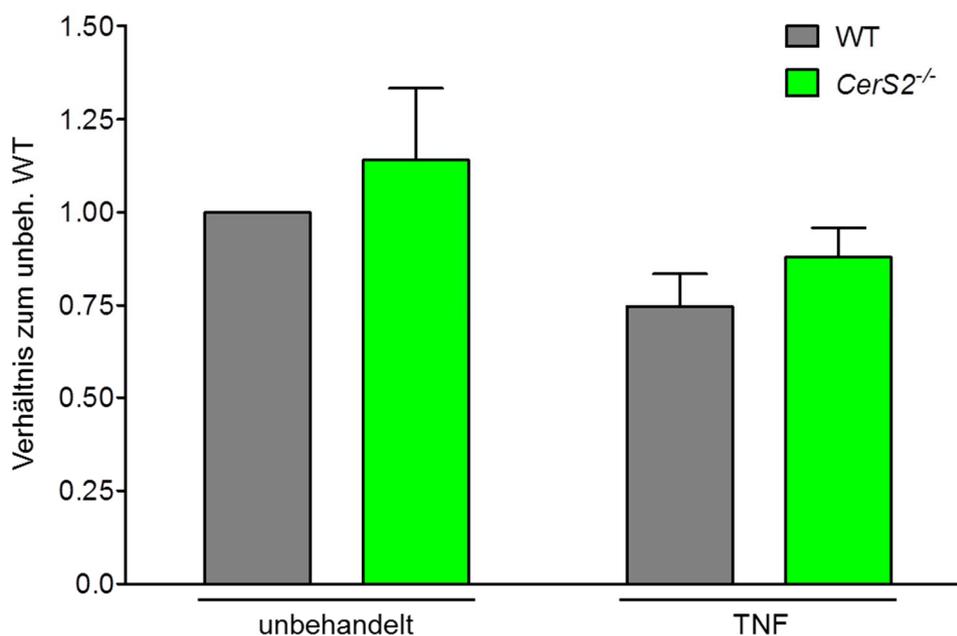


Abb. 22: BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen bilden tendenziell mehr mitochondriale ROS als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von MitosoxRed gemessen. 1×10^6 BMDM/ml in HBSS wurden im Dunkeln mit 5 μ M MitosoxRed für 15 Minuten bei 37°C angefärbt. 1×10^4 Makrophagen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 575 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge der *CerS2*^{-/-} BMDM, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps. Das Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt vier Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthese 6

Unbehandelte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen generierten gleiche Mengen mitochondrialer ROS wie der Wildtyp (Abb. 23). Nach Priming mit TNF war sowohl in Wildtyp-BMDM, als auch in *CerS6*^{-/-} BMDM eine leichte Abnahme der mitochondrialen ROS-Produktion messbar. Zwischen TNF-vorbehandelten BMDM aus Wildtypmäusen und TNF-geprimten BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen war ebenfalls kein Unterschied festzustellen.

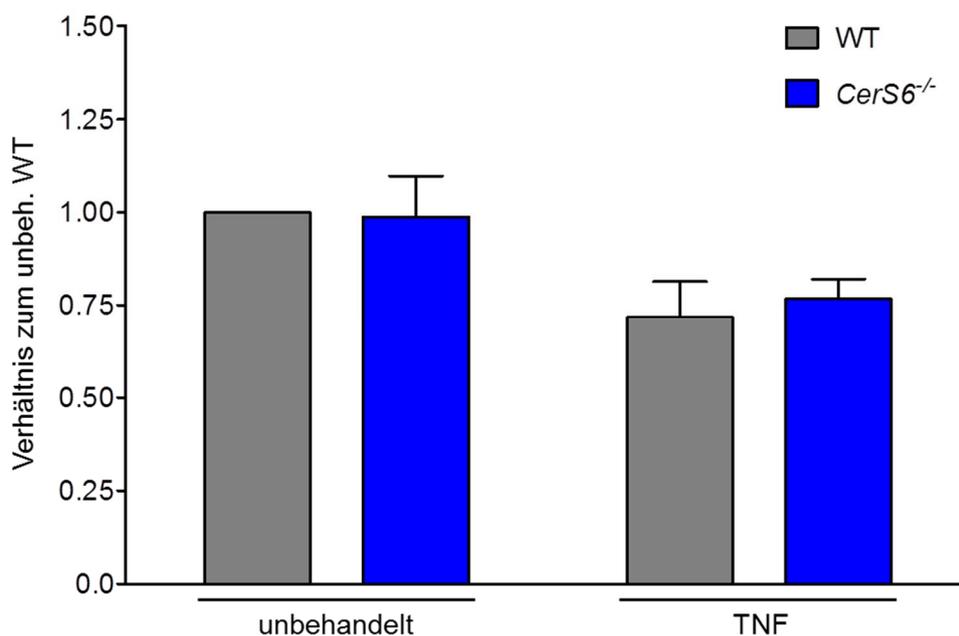


Abb. 23: BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen bilden gleiche Mengen mitochondrialer ROS wie Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Fluoreszenz von MitoSoxRed gemessen. 1×10^6 BMDM/ml in HBSS wurden im Dunkeln mit 5 μ M MitoSoxRed für 15 Minuten bei 37°C angefärbt. 1×10^4 Makrophagen wurden im Durchflusszytometer analysiert (488 nm Laser, 575 nm Filter). Gezeigt ist die produzierte ROS-Menge der *CerS6*^{-/-} BMDM, bezogen auf unbehandelte Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von vier unabhängigen Experimenten mit insgesamt vier Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

3.2. Analyse der ROS-Produktion nach Infektion mit Bakterien

Untersuchungen der extrazellulären ROS-Produktion in *CerS2*^{-/-} BMDM hatten gezeigt, dass diese nach Priming mit TNF und Stimulation mit PMA signifikant weniger ROS als Wildtyp-BMDM produzierten. Die intrazelluläre ROS-Produktion unbehandelter *CerS2*^{-/-} BMDM war hingegen im Vergleich zu Wildtyp-BMDM deutlich erhöht. *CerS6*^{-/-} BMDM generierten nach Priming mit TNF signifikant mehr extrazelluläres Superoxid als Wildtyp-BMDM. Die intrazelluläre ROS-Produktion von *CerS6*^{-/-} BMDM war im Vergleich zu Wildtyp-BMDM gleich hoch. Um zu analysieren, ob diese Veränderungen der ROS-Produktion auch bei Infektionen mit Bakterien auftreten, wurden BMDM aus *CerS2*^{-/-} und *CerS6*^{-/-} mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* infiziert. Die Infektionen wurden mit drei verschiedenen Bakteriengattungen durchgeführt, um unterschiedliche Pathogenitäts-Mechanismen zu berücksichtigen. Zur Messung extrazellulär produzierter ROS wurde wiederum MCLA verwendet. Von allen Proben wurde jeweils der Maximalwert der Lumineszenz ermittelt und zu dem der nicht infizierten Wildtyp-BMDM ins Verhältnis gesetzt.

3.2.1. ROS-Produktion nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe, kugelförmige Bakterien, die in Haufen- bzw. Traubenform wachsen. *Staphylococcus aureus* (*S.a.*) ist als Besiedler von Haut und Schleimhäuten bei Menschen und Tieren anzutreffen. Bei einem geschwächten Immunsystem kann es zu einer starken Vermehrung des Erregers kommen, was zu lebensbedrohlichen Krankheiten, wie Lungenentzündung, Endokarditis, toxischen Schock-Syndrom (TSS) oder Sepsis führen kann. Für Phagozyten konnte gezeigt werden, dass eingedrungene *S.a.* vor allem durch Aktivität der NOX2 eliminiert werden (Jackson, Gallin et al. 1995).

Abb. 24 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf einer Messung der extrazellulären ROS-Produktion in BMDM nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*. Die Infektion mit *Staphylococcus aureus* führte in ruhenden Makrophagen im Vergleich zu den nicht infizierten BMDM zu einer leichten Erhöhung der ROS-Produktion. Die Infektion von TNF-vorbehandelten BMDM mit *Staphylococcus aureus* führte zu einer starken Zunahme der generierten Superoxid-Menge. Die extrazelluläre ROS-Produktion durch den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2) nach Infektion mit *Staphylococcus*

aureus ließ sich also sehr effektiv durch Priming mit TNF steigern. Die Menge der messbaren ROS Produktion erreichte nach ca. 10 bis 15 Minuten ihr Maximum.

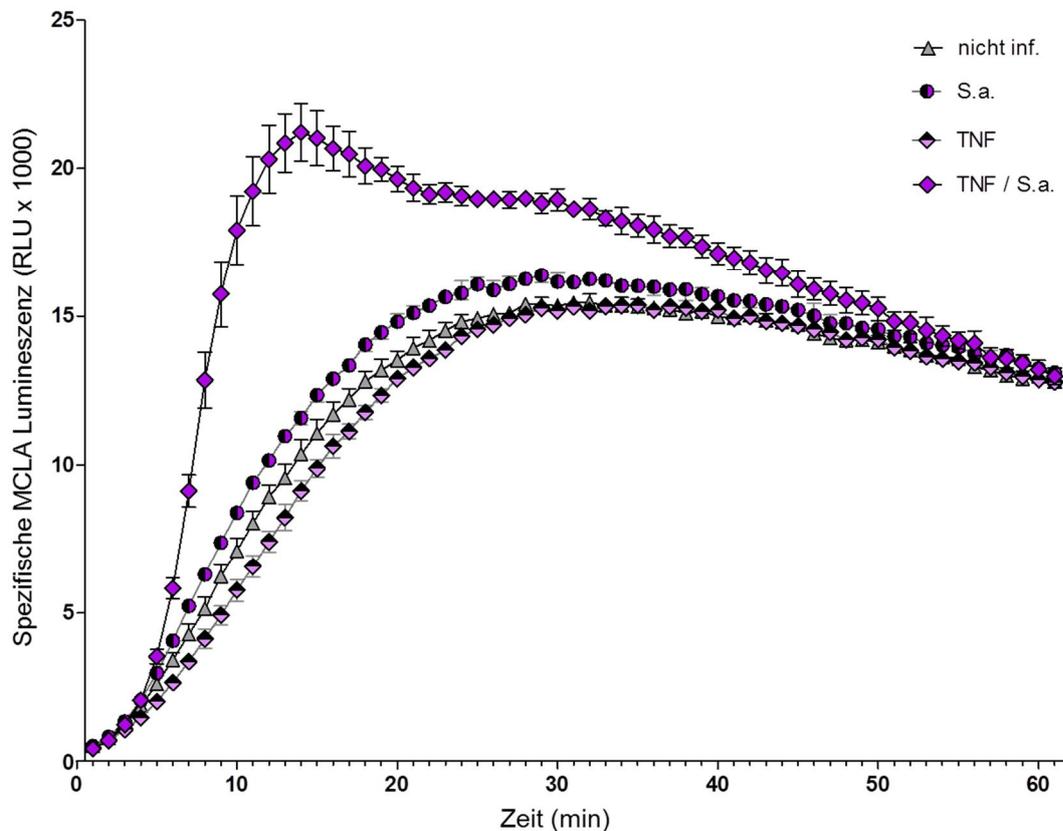


Abb. 24: TNF-vorbehandelte BMDM produzieren nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* große Mengen an Superoxid.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Staphylococcus aureus* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm s. e. m. der zu jedem Zeitpunkt gemessenen MCLA Lumineszenz.

Ceramidsynthese 2

BMDM aus *CerS2^{-/-}* Mäusen bildeten nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* signifikant weniger ROS als Wildtyp-BMDM (Abb. 25). Infizierte Wildtyp-BMDM produzierten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen das 1,4-fache an ROS, BMDM aus *CerS2^{-/-}* Mäusen hingegen nur das 1,1-fache. Wurden TNF-vorbehandelte Makro-

phagen mit *Staphylococcus aureus* infiziert, erhöhte sich die ROS Produktion in Wildtyp-BMDM um das 2,7-fache. BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzierten im Vergleich zu den unbehandelten BMDM des Wildtyps lediglich die 1,7-fache Menge an reaktiven Sauerstoffspezies. Die Infektion mit *Staphylococcus aureus* führte also bei *CerS2*^{-/-} BMDM sowohl ohne, als auch mit TNF-Priming zu einer signifikant geringeren Superoxidproduktion als im Wildtyp. Wie bereits in den Messungen extrazellulärer ROS-Produktion mit PMA-Stimulation gezeigt werden konnte, hatte das Priming mit TNF in *CerS2*^{-/-} BMDM auch nach Infektion mit *S.aureus* einen signifikant geringeren Effekt als in Wildtyp-BMDM:

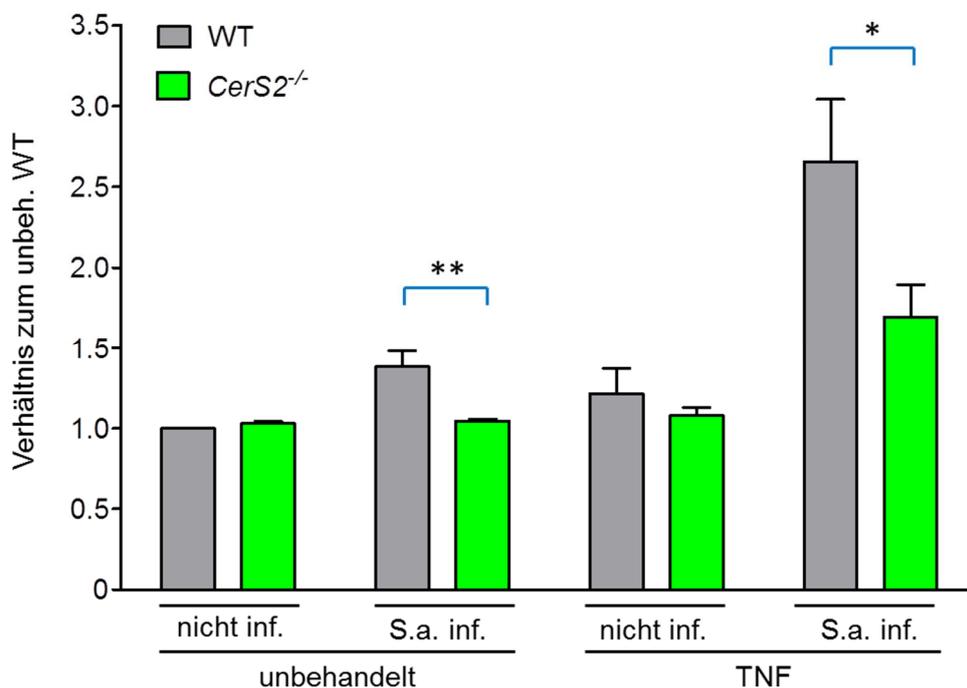


Abb. 25: BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzieren nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* signifikant weniger extrazelluläre ROS als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Staphylococcus aureus* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt werden die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von sechs unabhängigen Experimenten mit insgesamt sechs Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS2*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$) dargestellt.

Ceramidsynthase 6

Nicht infizierte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen generierten genauso viele ROS wie der Wildtyp (Abb. 26). Nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* produzierten sowohl *CerS6*^{-/-} Makrophagen, als auch Wildtyp-BMDM geringfügig mehr extrazelluläre ROS als unbehandelte Zellen. Priming mit TNF führte in nicht infizierten Wildtyp-BMDM und in BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen zu einer minimalen Erhöhung der ROS Produktion. Nach Infektion der TNF-vorbehandelte Makrophagen mit *Staphylococcus aureus* erhöhte sich die produzierte Superoxid Menge bei den BMDM des Wildtyps um das 3,2-fache. In BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen zeigte das Priming mit TNF eine deutlich stärkere Wirkung: Die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies stieg im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp um das 4,9-fache.

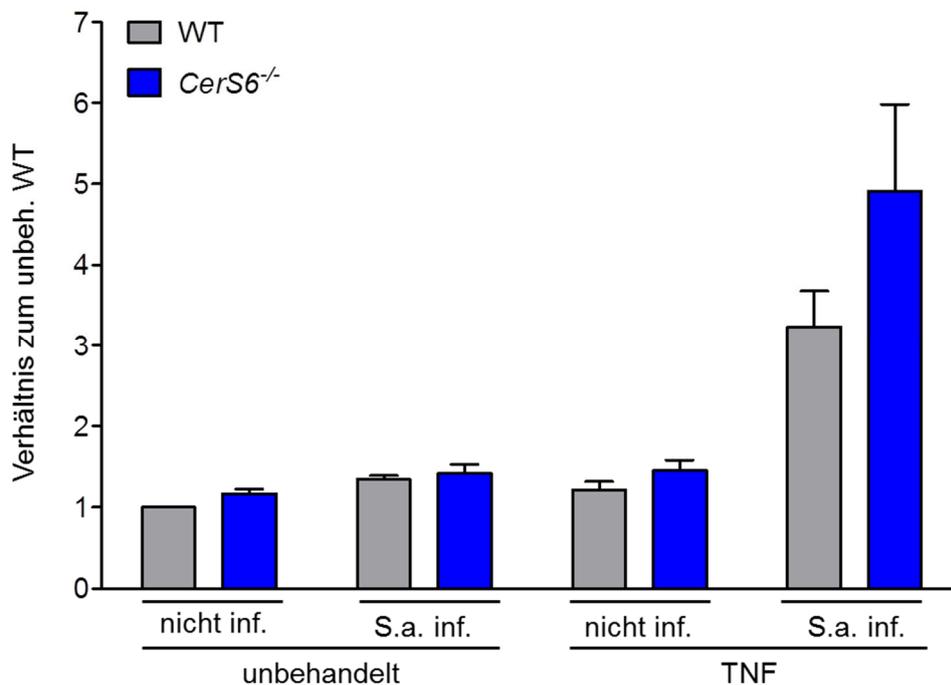


Abb. 26: TNF-Priming erhöht die ROS-Produktion nach *Staphylococcus aureus* Infektion in BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen stärker als in Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Staphylococcus aureus* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehauelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

3.2.2. ROS-Produktion nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein grampositives, fakultativ anaerobes Stäbchen, das in immungeschwächten Personen, Schwangeren und Neugeborenen schwere Infektionen verursachen kann. Infektion von Mäusen mit nicht-letalen Dosen der Bakterien führt zu einer starken Immunantwort, an der sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem beteiligt sind. Zunächst wird die Anzahl der sich vermehrenden Bakterien durch aktivierte Makrophagen unter Kontrolle gebracht. Durch eine spezifische T-Zell-Antwort werden die Bakterien schließlich eliminiert und durch T-Gedächtnis-Zellen entsteht Schutz vor einer erneuten Infektion (Zenewicz and Shen 2007). Nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* bilden Fibroblasten und Makrophagen zur Abwehr die lysosomale Protease Cathepsin D (del Cerro-Vadillo, Madrazo-Toca et al. 2006). Die Infektion mit Listerien wird in Makrophagen sowohl durch die Aktivität der NOX2, als auch durch nicht-oxidative Mechanismen abgewehrt.

Abb. 27 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf einer Messung der extrazellulären ROS Produktion in BMDM nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* führte in den ruhenden Makrophagen im Vergleich zu den nicht infizierten BMDM zu einer geringfügigen Erhöhung der ROS-Produktion. Die Infektion von TNF-vorbehandelten BMDM mit *Listeria monocytogenes* führte zu einer starken Zunahme der ROS-Produktion. Die extrazelluläre ROS-Produktion durch den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2) nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* ließ sich also sehr effektiv durch Priming mit TNF steigern. Das Maximum der ROS-Produktion war nach ca. 10 bis 20 Minuten erreicht.

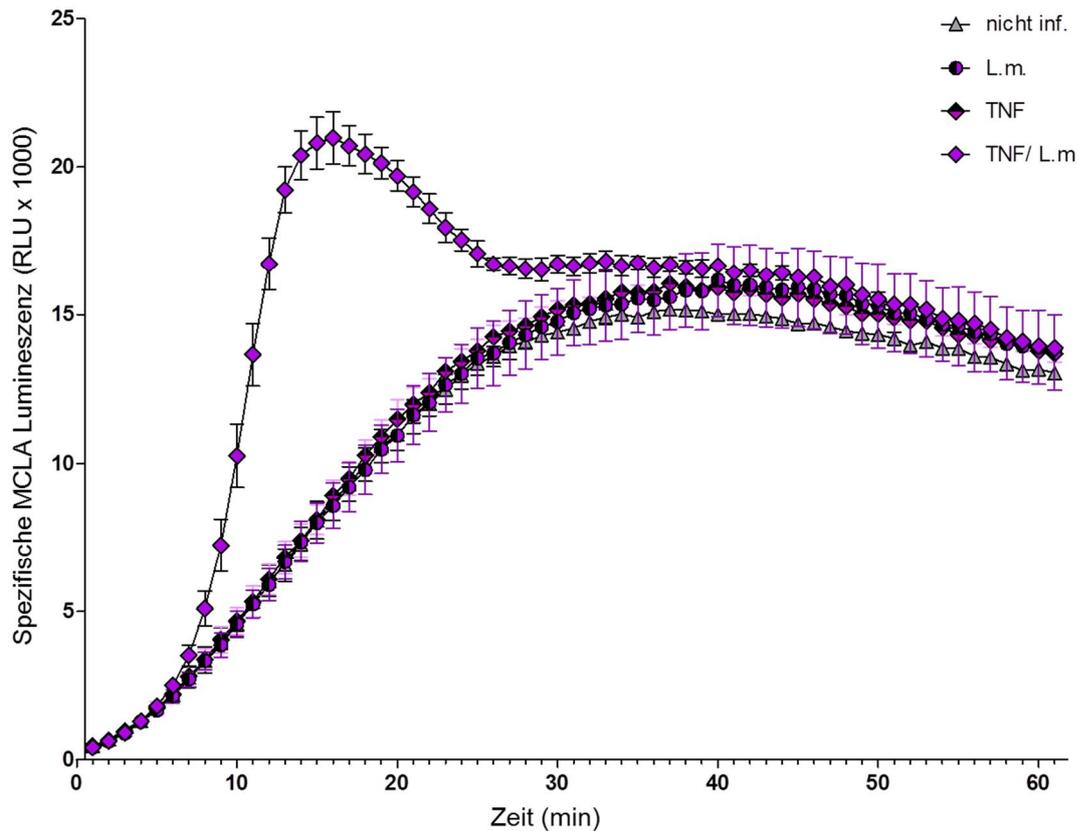


Abb. 27: Priming mit TNF erhöht die ROS-Produktion nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* in BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Listeria monocytogenes* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm s. e. m. der zu jedem Zeitpunkt gemessenen MCLA Lumineszenz.

Ceramidsynthese 2

Nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* produzierten Wildtyp-BMDM das 1,3-fache an extrazellulär generiertem Superoxid, bezogen auf den nicht infizierten Wildtyp (Abb. 28). *CerS2*^{-/-} BMDM produzierten das 1,2-fache und damit tendenziell etwas weniger ROS als der entsprechende Wildtyp. TNF-vorbehandelte Wildtyp-BMDM generierten nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* die 2,1-fache Menge an ROS. Priming mit TNF führte in BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen nur zu einem 1,5-fachen An-

stieg der ROS-Produktion, im Vergleich zum nicht infizierten Wildtyp. Wiederum hatte das Priming mit TNF in infizierten *CerS2*^{-/-} BMDM einen deutlich geringeren Effekt auf die ROS-Produktion als in Wildtyp-BMDM.

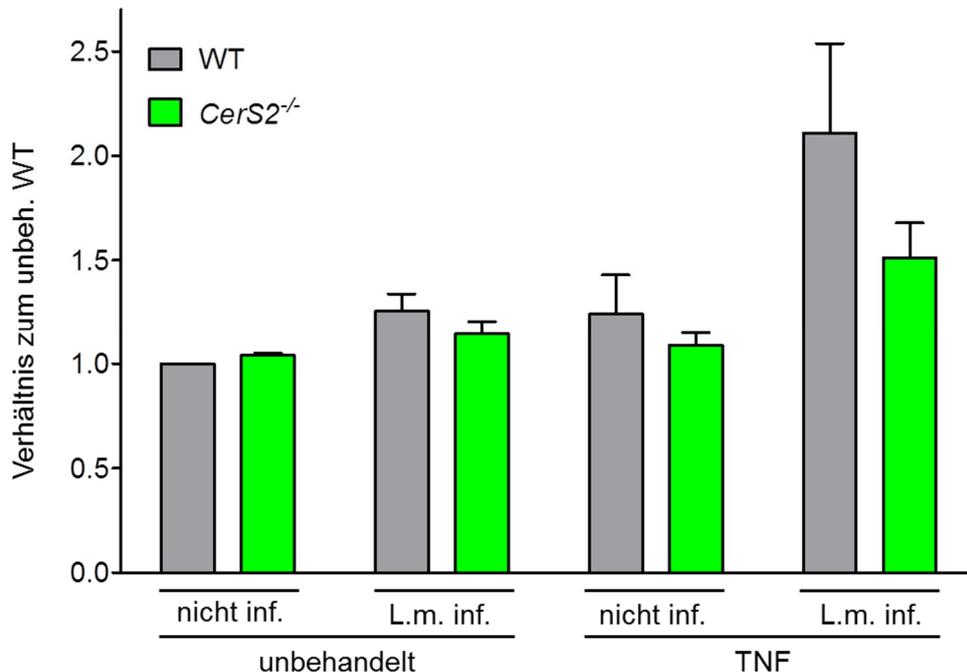


Abb. 28: Priming mit TNF führt in *CerS2*^{-/-} BMDM nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* nur zu einer schwachen Erhöhung der ROS-Produktion.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Listeria monocytogenes* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthase 6

BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen und Wildtyp-BMDM produzierten nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* geringfügig mehr ROS, als der nicht infizierte Wildtyp (Abb. 29). Priming mit TNF führte in BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen zu einer Erhöhung der ROS-Produktion um das 1,5-fache und hatte damit tendenziell einen etwas stärkeren Effekt als im Wildtyp mit einer Erhöhung um das 1,2-fache. Wurden TNF-vorbehandelte Makrophagen mit *Listeria monocytogenes* infiziert, erhöhte sich die generierte ROS Menge bei Wildtyp-BMDM um das 2,2-fache. Die Wirkung des Primings durch TNF war in den BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen noch stärker: die Makrophagen produzierten die 3,3-fache Menge an Superoxid im Vergleich zu nicht infizierten Wildtyp-BMDM.

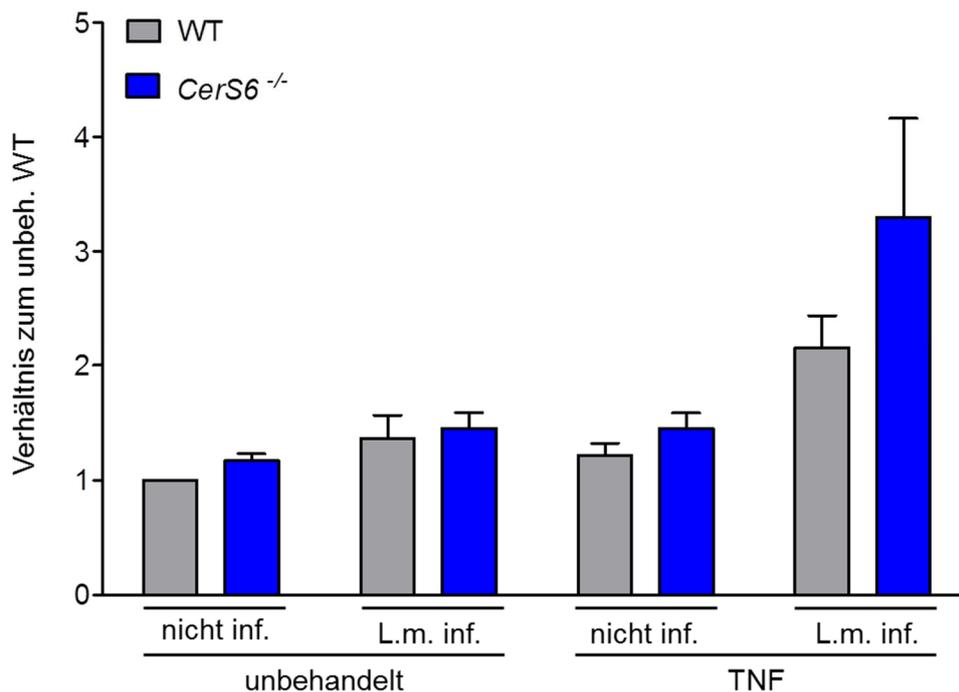


Abb. 29: Priming mit TNF führte nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* in BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen zu einer tendenziell höheren Superoxid-Produktion als in Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Listeria monocytogenes* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt sind die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert un behandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von fünf unabhängigen Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

3.2.3. ROS-Produktion nach Infektion mit *Shigella flexneri*.

Shigellen sind gram-negative, fakultativ anaerobe Stäbchen, die zu den Enterobacteriaceae gehören. Sie sind entero-invasiv und verursachen schwere Durchfälle. *Shigella flexneri* benötigt als Virulenzfaktor IpaB (Invasion plasmid antigen B) um in die Wirtszelle eindringen zu können. Im weiteren Verlauf der Infektion entkommen die Erreger aus dem Phagosom in das Zytoplasma und induzieren den Tod von infizierten Makrophagen (Senerovic, Tsunoda et al. 2012). Die Infektion mit Shigellen führt in Makrophagen zu einer vergleichsweise geringen ROS-Produktion, die vermutlich auf die eisenhaltige Superoxiddismutase (FeSOD) der Shigellen zurückzuführen ist (Franzon, Arondel et al. 1990). Abb. 30 zeigt exemplarisch den typischen Verlauf einer Messung der extrazellulären ROS-Produktion in BMDM nach Infektion mit *Shigella flexneri*. Die Infektion mit *Shigella flexneri* führte in ruhenden Makrophagen zu einer leichten Erhöhung der ROS-Produktion. Die Infektion von TNF-vorbehandelten BMDM mit *Shigella flexneri* führte zu einer messbaren, aber geringen Zunahme der ROS-Produktion. Die extrazelluläre ROS-Produktion durch den NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2) ließ sich also nur geringfügig durch Priming mit TNF und Infektion mit *Shigella flexneri* steigern. Das Maximum der ROS-Produktion war nach ca. 28 bis 38 Minuten erreicht.

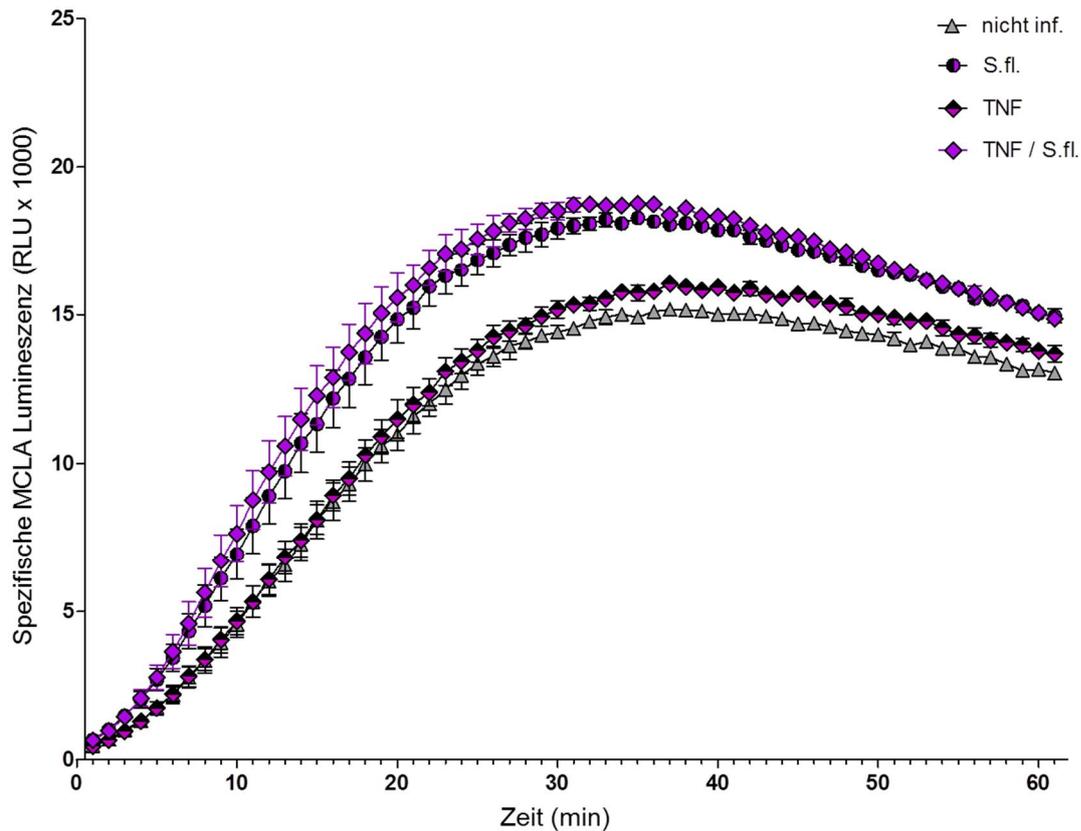


Abb. 30: Nach Priming mit TNF und Infektion mit *Shigella flexneri* produzieren BMDM nur sehr geringe Mengen an Superoxid.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Shigella flexneri* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm s. e. m. der zu jedem Zeitpunkt gemessenen MCLA Lumineszenz.

Ceramidsynthase 2

Unbehandelte BMDM aus *CerS2^{-/-}* Mäusen generierten nach Infektion mit *Shigella flexneri* nur geringe ROS Mengen und verhielten sich damit genauso, wie die mit *Shigella flexneri* infizierten BMDM des Wildtyps (Abb. 31). Priming mit TNF führte sowohl in BMDM des Wildtyps als auch in *CerS2^{-/-}* Makrophagen nicht zur Erhöhung der ROS-Produktion. Die Infektion TNF-vorbehandelter BMDM mit *Shigella flexneri* bewirkte nur einen minimalen Anstieg der Superoxid Produktion: in BMDM des

Wildtyps um das 1,6-fache, in *CerS2*^{-/-} Makrophagen um das 1,5-fache, bezogen auf unbehandelte BMDM des Wildtyps.

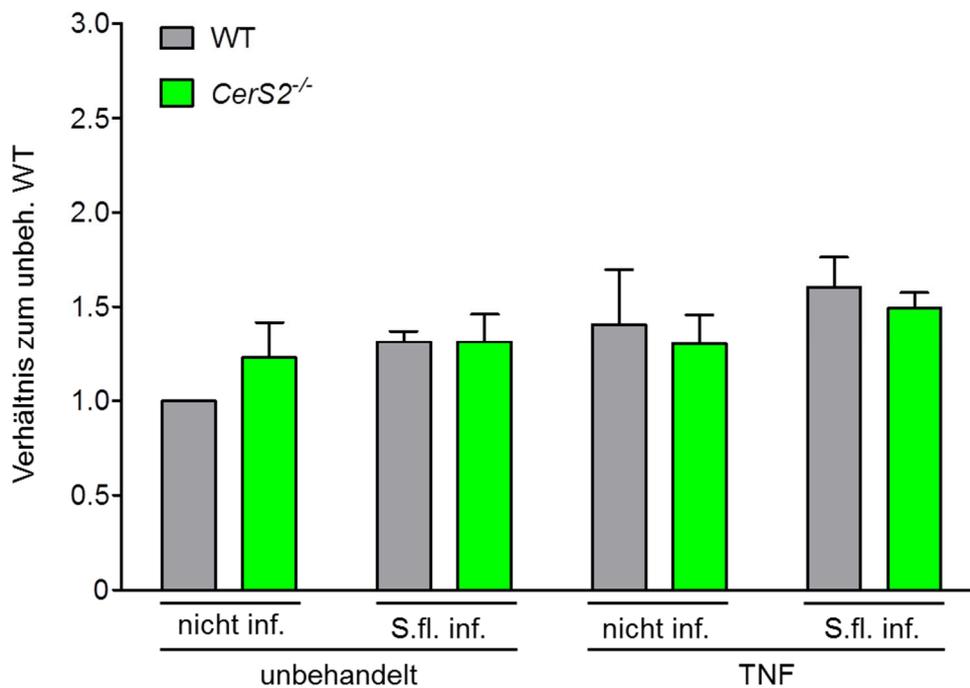


Abb. 31: Mit TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzieren wie BMDM aus dem Wildtyp nach Infektion mit *Shigella flexneri* nur minimale Mengen an Superoxid.

BMDM wurden für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert (wo angezeigt) und die ROS Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Shigella flexneri* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt werden die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert un behandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt.

Ceramidsynthase 6

Unbehandelte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen generierten die 1,2-fache Menge ROS im Vergleich zu Wildtyp-BMDM (Abb. 32). Die Infektion von un behandelten Makrophagen mit *Shigella flexneri* führte in Wildtyp-BMDM und in BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen zu einer geringfügigen Erhöhung der ROS Produktion um das 1,4-fache. Priming mit TNF führte bei den BMDM des Wildtyps lediglich zu einer Erhöhung des

messbaren Superoxids um das 1,2-fache. Die ROS-Produktion der TNF-behandelten *CerS6*^{-/-} BMDM stieg hingegen um das 1,5-fache an. Nach Infektion der TNF-vorbehandelten BMDM mit *Shigella flexneri* war im Wildtyp kein Unterschied zu den nicht geprimten und mit *Shigella flexneri* infizierten Makrophagen messbar. In TNF-geprimten BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen konnte hingegen ein signifikanter Anstieg der ROS Produktion um das 2-fache des unbehandelten Wildtyps festgestellt werden. Obwohl die ROS-Produktion nach Infektion mit *Shigella flexneri* sehr schwach ausgeprägt war, wurde also in TNF-vorbehandelten BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen mehr Superoxid produziert, als in TNF-vorbehandelten BMDM aus Wildtypmäusen.

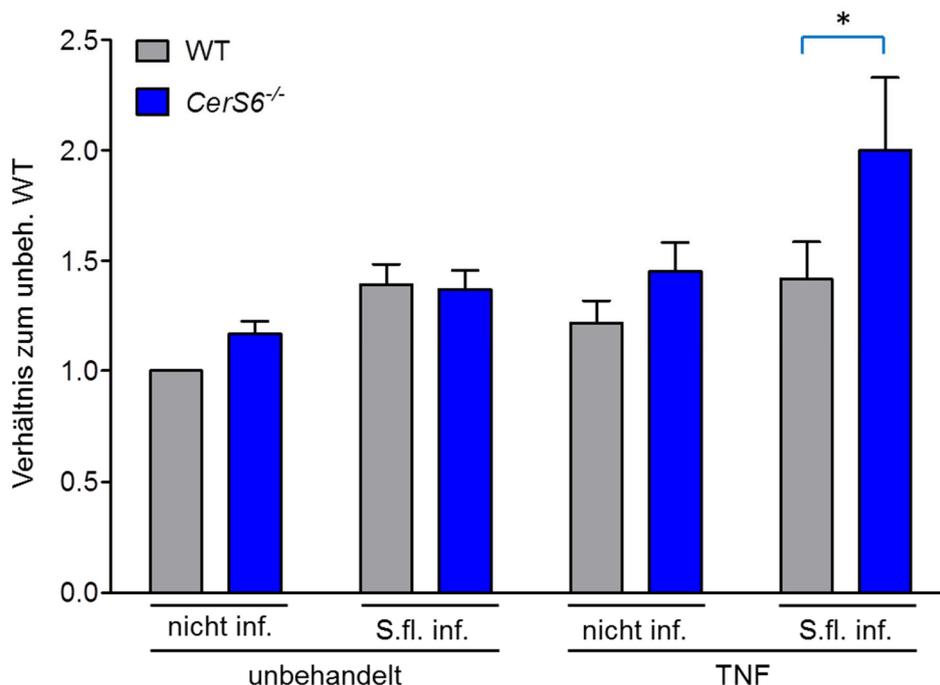


Abb. 32: TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen produzieren nach Infektion mit *Shigella flexneri* mehr ROS als BMDM aus Wildtypmäusen.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und die ROS-Produktion als Lumineszenz von MCLA gemessen. Dazu wurden 1×10^5 BMDM pro well einer Mikrotiterplatte ausgesät, wo angezeigt mit *Shigella flexneri* infiziert (MOI 50) und mit 5 μ M MCLA versetzt. Die MCLA Lumineszenz wurde in einem Microplate Reader über einen Zeitraum von 60 Minuten bei 37° C jede Minute bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Triplikaten angesetzt. Gezeigt werden die Maximalwerte der Superoxidproduktion, bezogen auf den Maximalwert unbehandelter Wildtyp-BMDM. Das Ergebnis von 5 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5 Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m.) dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$) dargestellt.

3.3. Abhängigkeit des Zelltods nach Bakterieninfektion von CerS

Mit TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen produzierten sowohl nach Stimulation mit PMA, als auch nach Infektion mit verschiedenen Bakterien weniger extrazelluläre ROS als BMDM aus Wildtyp Mäusen. Die intrazelluläre ROS-Produktion unbehandelter *CerS2*^{-/-} BMDM war im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-BMDM tendenziell erhöht. Für BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen konnte hingegen gezeigt werden, dass TNF-vorbehandelte Knochenmarksmakrophagen nach PMA-Stimulation oder Bakterieninfektion deutlich mehr extrazellulär messbares Superoxid generierten. Die Abhängigkeit des Zelltods von CerS und ROS wurde in BMDM nach Infektion von Makrophagen aus *CerS2*^{-/-} und *CerS6*^{-/-} Mäusen mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* untersucht. Die Infektionen wurden mit drei verschiedenen Bakteriengattungen durchgeführt, um unterschiedliche Pathogenitäts-Mechanismen zu berücksichtigen. Mit dem Lactatdehydrogenase Freisetzungstest (LDH Release Assay) kann sowohl der apoptotische, als auch der pyroptotische Zelltod analysiert werden. Die Lactatdehydrogenase ist ein stabiles, im Zytoplasma lokalisiertes Enzym, welches die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat katalysiert. Dabei wird gleichzeitig NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert. Aus Zellen, deren Zellmembran geschädigt ist oder Zellen, die durch Pyroptose absterben, gelangt Lactatdehydrogenase ins umgebende Medium. Nach Zugabe eines gelb gefärbten Tetrazoliumsalzes zum Überstand katalysiert das Enzym Diaphorase die Reduktion zu rot gefärbten Formazan. Hierbei wird NADH/H⁺ wieder zu NAD⁺ oxidiert. Die Farbintensität kann photometrisch bestimmt werden und korreliert mit der Menge an vorhandener LDH. Bezogen auf die Gesamtmenge an LDH lässt sich der Anteil toter Zellen bestimmen (Nachlas, Margulies et al. 1960; Wu, Ren et al. 2007).

3.3.1. Ceramidsynthase 2

BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen wurden mit *Staphylococcus aureus* und *Listeria monocytogenes* infiziert und der Anteil der abgetöteten Zellen mit Hilfe des LDH Release Assay bestimmt.

Zelltod nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Die im Überstand messbare LDH Menge aus unbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM war zwei, vier und sechs Stunden nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* deutlich höher als die LDH Menge aus Wildtyp-BMDM (Abb. 33). Nach sechs Stunden waren 41 % der Wildtyp-BMDM, aber 70 % der *CerS2*^{-/-} BMDM tot. Priming mit TNF hatte auf die Widerstandsfähigkeit der Wildtyp-BMDM wenig Einfluss. Nach sechs Stunden waren 35 % der Makrophagen aufgrund der Infektion mit den Bakterien lysiert. TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen hingegen hatten gegenüber unbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM einen Überlebensvorteil: Sechs Stunden nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* waren nur 45 % statt 70 % der Zellen tot. TNF-Priming reduzierte also den Zelltod von *S.a.* infizierten *CerS2*^{-/-} Makrophagen.

Zelltod nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Die im Überstand messbare LDH-Menge aus unbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM war zwei, vier und sechs Stunden nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* signifikant höher als die LDH Menge aus Wildtyp-BMDM (Abb. 34). Nach sechs Stunden waren 55 % der Wildtyp-BMDM und 83 % der *CerS2*^{-/-} BMDM tot. Priming mit TNF hatte keinen deutlichen Effekt auf das Überleben der Wildtyp-BMDM. Nach sechs Stunden waren 59 % der Makrophagen aufgrund der *Listeria monocytogenes* Infektion tot. TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen hingegen hatten gegenüber unbehandelten *CerS2*^{-/-} BMDM einen Überlebensvorteil: Sechs Stunden nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* waren nur 51 % statt 83 % der Zellen abgestorben. TNF-vorbehandelte Wildtyp-BMDM und *CerS2*^{-/-} BMDM wurden durch die Listerien-Infektion gleich stark getötet.

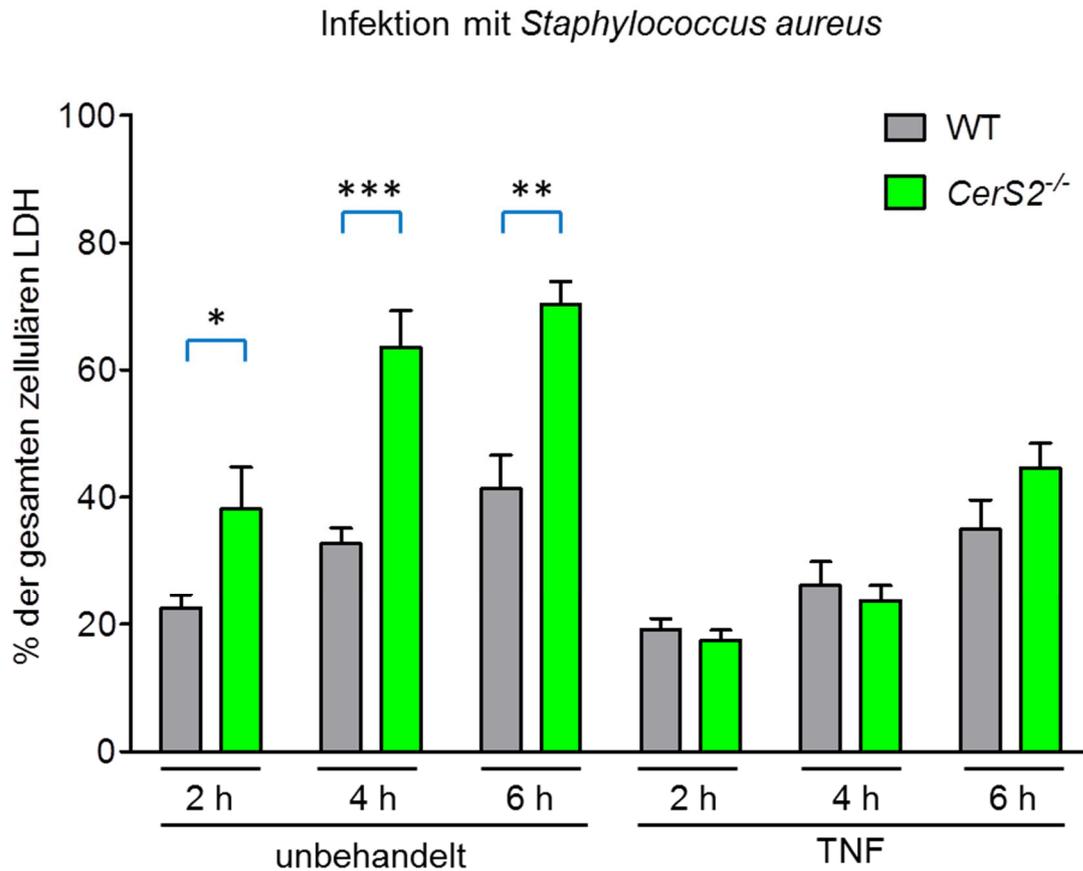


Abb. 33: Im Überstand mit *Staphylococcus aureus* infizierter BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen ist signifikant mehr LDH nachweisbar als im Überstand von BMDM aus Wildtypmäusen.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und $0,5 \times 10^6$ BMDM in 12-well Platten ausgesät. Die Infektion mit *Staphylococcus aureus* erfolgte mit MOI 50. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden 100 μ l des Überstands abgenommen und die LDH Menge photometrisch bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Gezeigt ist das Verhältnis der zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten LDH-Menge zur Gesamtmenge der vorhandenen LDH nach vollständiger Lyse der BMDM mit 1 % Triton-X 100. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt drei Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS2*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

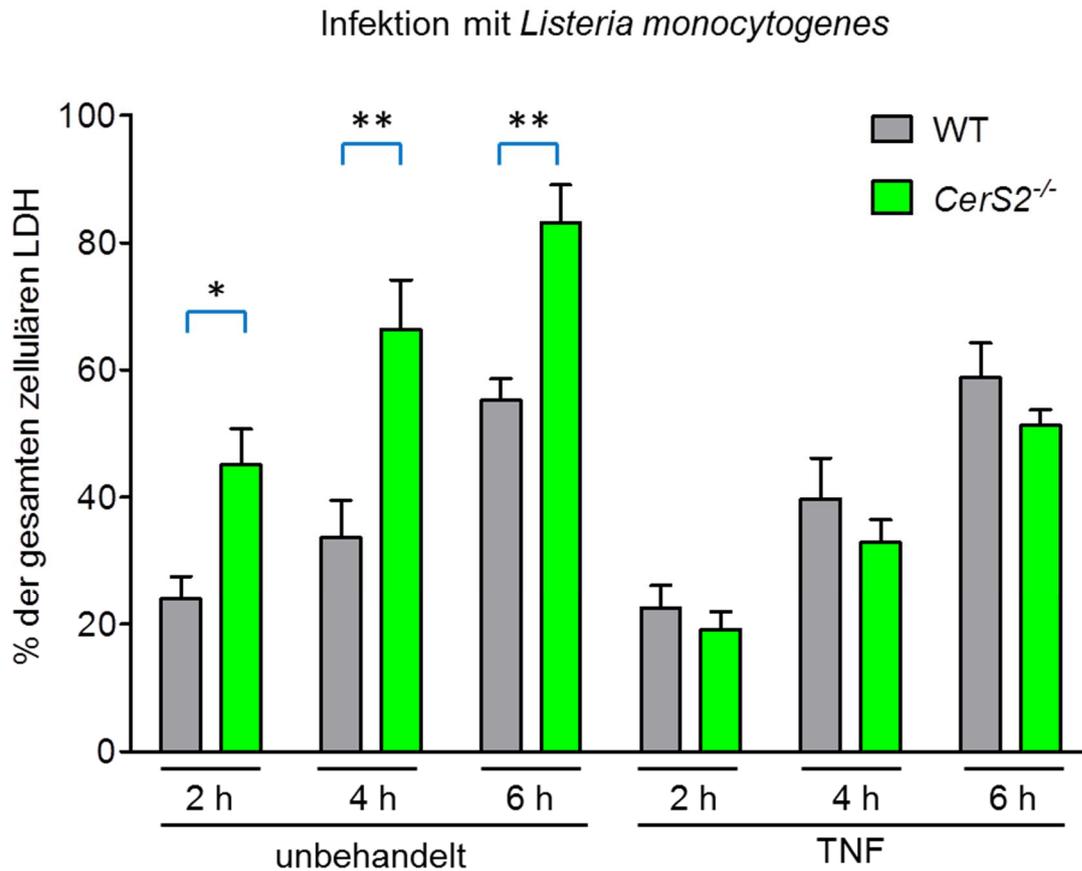


Abb. 34: Im Überstand unbehandelter, mit *Listeria monocytogenes* infizierter BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen ist deutlich mehr LDH nachweisbar, als in BMDM des Wildtyps.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und $0,5 \times 10^6$ BMDM in 12-well Platten ausgesät. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* erfolgte mit MOI 50. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden 100 μ l des Überstands abgenommen und die LDH Menge photometrisch bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Gezeigt ist das Verhältnis der zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten LDH Menge zur Gesamtmenge der vorhandenen LDH nach vollständiger Lyse der BMDM mit 1 % Triton-X 100. Das Ergebnis von 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt 3 Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS2*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3.3.2. Ceramidsynthase 6

BMDM aus *CerS6^{-/-}* Mäusen wurden mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* infiziert und der Anteil der abgetöteten Zellen mit Hilfe des LDH Release Assay bestimmt.

Zelltod nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* wurde aus absterbenden BMDM der *CerS6^{-/-}* Mäuse signifikant weniger LDH freigesetzt als aus BMDM des Wildtyps (Abb. 35). Nach zwei Stunden waren 39 %, nach 4 Stunden 69 % und nach sechs Stunden 70 % der Wildtyp-BMDM abgetötet. Die BMDM der *CerS6^{-/-}* Mäuse konnten der Infektion besser widerstehen. Nach zwei Stunden waren 31%, nach 4 Stunden 36 % und selbst sechs Stunden später waren nur 45 % der *CerS6^{-/-}* BMDM abgetötet. Das Priming mit TNF schien in den Experimenten eine schützende Wirkung zu haben. Nach sechs Stunden waren 42 % der Wildtyp-BMDM und lediglich 25 % der *CerS6^{-/-}* BMDM abgestorben. Priming mit TNF schützt Wildtyp-BMDM vor Zelltod. Die bessere Überlebensfähigkeit der *CerS6^{-/-}* BMDM, nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*, wird nach TNF-Priming nochmals deutlich verbessert.

Zelltod nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Infektion mit *Listeria monocytogenes* führte nach zwei Stunden zum Zelltod von 40 % der Wildtyp und 43 % der *CerS6^{-/-}* BMDM (Abb. 36). Nach vier Stunden waren 74 % der Wildtyp-BMDM und 58 % der *CerS6^{-/-}* Makrophagen abgetötet. Sechs Stunden später waren 78 % der Wildtyp und 58 % der *CerS6^{-/-}* BMDM tot. Priming mit TNF schien Wildtyp und *CerS6^{-/-}* BMDM tendenziell vor Zelltod durch Listerieninfektion zu schützen. TNF-vorbehandelte Wildtyp-BMDM waren sechs Stunden nach Infektion zu 58 % abgetötet. Die Makrophagen aus TNF behandelten *CerS6^{-/-}* Mäusen waren signifikant besser vor dem Zelltod nach Listerien-Infektion geschützt, lediglich 46 % waren nach sechs Stunden abgestorben.

Zelltod nach Infektion mit *Shigella flexneri*

Nach Infektion mit *Shigella flexneri* wurde aus BMDM der *CerS6^{-/-}* Mäuse weniger LDH freigesetzt, als aus BMDM des Wildtyps (Abb. 37). Zwei Stunden nach Infektion waren 29 % und nach 4 Stunden 50 % der Wildtyp-BMDM abgetötet. Nach 6 Stunden war der Wert der freigesetzten LDH Menge aus Wildtyp-BMDM auf 63 %

gestiegen. Die BMDM der *CerS6*^{-/-} Mäuse waren nach Shigellen-Infektion besser vor dem Zelltod geschützt: Nach zwei Stunden waren 20 %, nach vier Stunden 30 % und selbst sechs Stunden später waren nur 34 % der *CerS6*^{-/-} BMDM abgetötet. Das Priming mit TNF schien die BMDM vor dem Zelltod nach Infektion zu schützen. Nach sechs Stunden waren nur 35 % der Wildtyp-BMDM und lediglich 26 % der *CerS6*^{-/-} BMDM abgestorben.

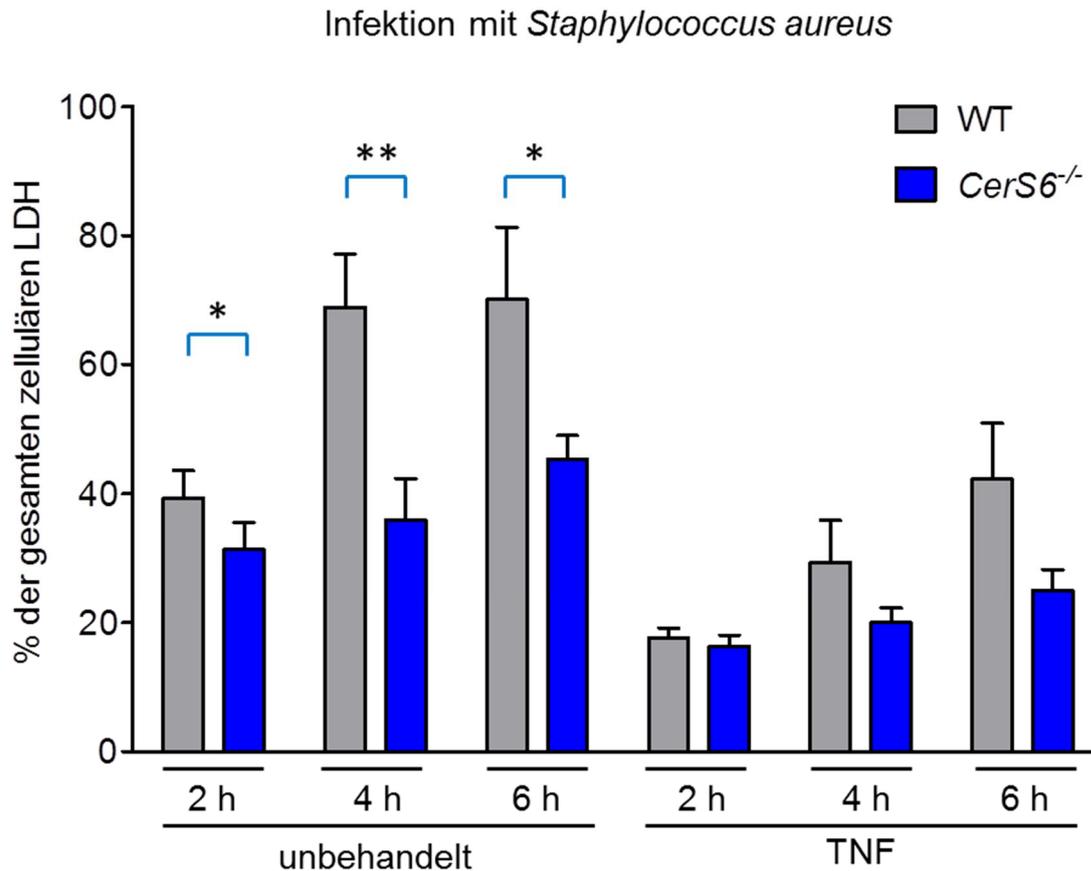


Abb. 35: Im Überstand unbehandelter, mit *Staphylococcus aureus* infizierter BMDM aus *Cers6*^{-/-} Mäusen ist deutlich weniger LDH nachweisbar, als in BMDM des Wildtyps.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und $0,5 \times 10^6$ BMDM in 12-well Platten ausgesät. Die Infektion mit *Staphylococcus aureus* erfolgte mit MOI 50. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden 100 μ l des Überstands abgenommen und die LDH Menge photometrisch bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Gezeigt ist das Verhältnis der zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten LDH Menge zur Gesamtmenge der vorhandenen LDH nach vollständiger Lyse der BMDM mit 1 % Triton-X 100. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt drei Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

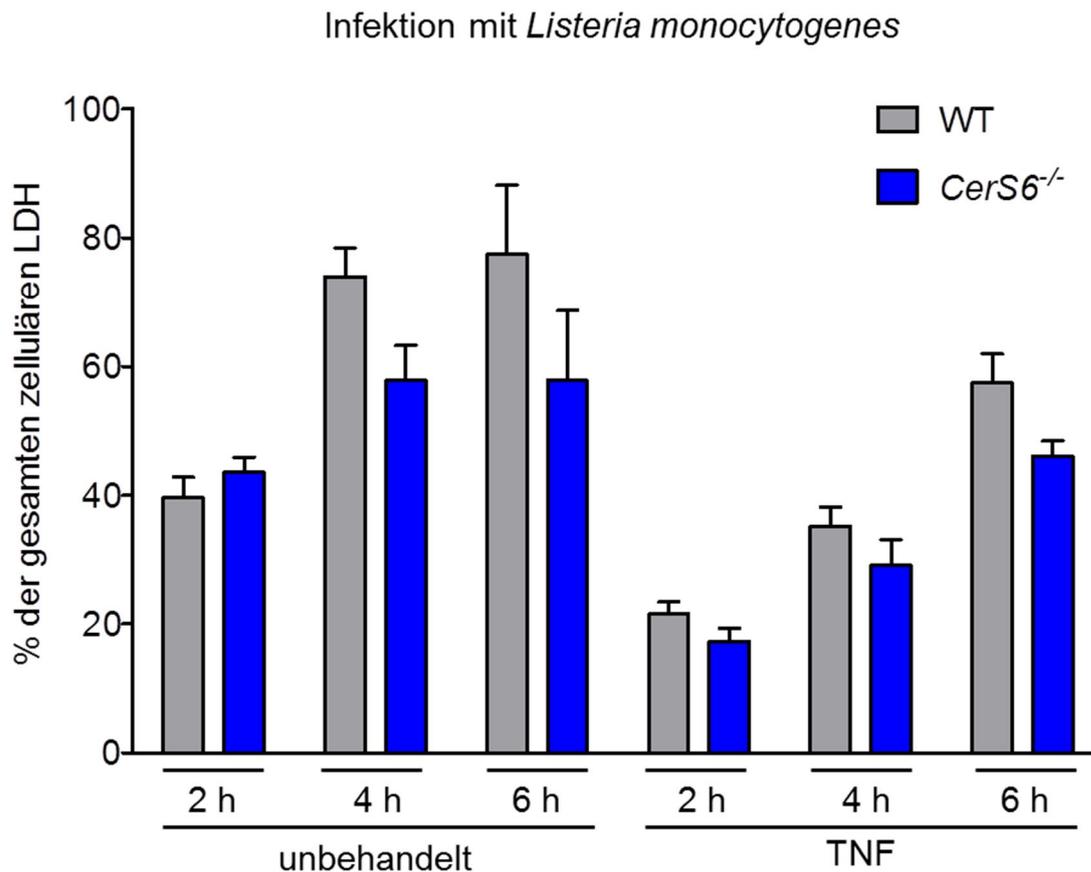


Abb. 36: BMDM aus *Cers6*^{-/-} Mäusen sind besser vor dem Zelltod nach *Listeria monocytogenes* Infektion geschützt als Wildtyp-BMDM.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und $0,5 \times 10^6$ BMDM in 12-well Platten ausgesät. Die Infektion mit *Listeria monocytogenes* erfolgte mit MOI 50. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden 100 μ l des Überstands abgenommen und die LDH Menge photometrisch bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Gezeigt ist das Verhältnis der zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten LDH Menge zur Gesamtmenge der vorhandenen LDH nach vollständiger Lyse der BMDM mit 1 % Triton-X 100. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt drei Mäusen ist als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

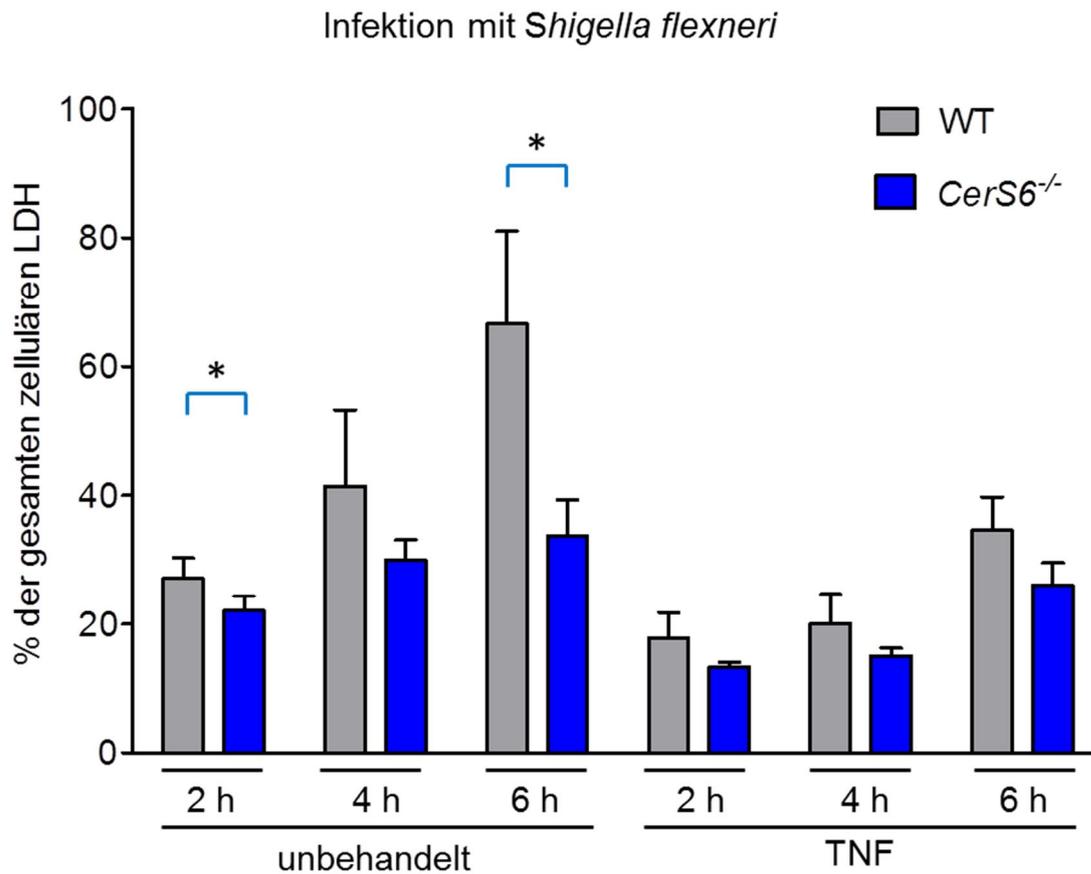


Abb. 37: BMDM aus *Cers6*^{-/-} Mäusen sind besser vor dem Zelltod nach *Shigella flexneri*-Infektion geschützt als BMDM des Wildtyps.

BMDM wurden (wo angezeigt) für 72 Stunden mit 10 ng/ml TNF stimuliert und $0,5 \times 10^6$ BMDM in 12-well Platten ausgesät. Die Infektion mit *Shigella flexneri* erfolgte mit MOI 50. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden 100 μ l des Überstands abgenommen und die LDH Menge photometrisch bestimmt. Die Proben eines Experiments wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. Gezeigt ist das Verhältnis der zum jeweiligen Zeitpunkt gebildeten LDH Menge zur Gesamtmenge der vorhandenen LDH nach vollständiger Lyse der BMDM mit 1 % Triton-X 100. Das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt drei Mäusen wird als Mittelwert \pm s. e. m. dargestellt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen *CerS6*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM wurde mittels two-tailed t-Test bestimmt. P-Werte sind durch * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) oder *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

4. Diskussion

Phagozytierende Zellen des Immunsystems, d.h. vor allem Makrophagen und Neutrophile bilden nach Kontakt mit Bakterien reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zur Abtötung eingedrungener Erreger führen. Hauptquelle der ROS ist der NADPH-Oxidase-Komplex (NOX2). Eine weitere Quelle von ROS sind die Mitochondrien, in denen ROS als Nebenprodukt der Zellatmung anfallen oder nach Infektion sogar vermehrt gebildet werden können (West, Brodsky et al. 2011).

Die katalytische Untereinheit der NOX2 besteht aus integralen Membranproteinen, deren enzymatische Aktivität möglicherweise durch die Zusammensetzung der Plasmamembran und den daraus resultierenden biophysikalischen Eigenschaften der Membran beeinflusst wird (Shao, Segal et al. 2003; Nauseef 2004; Bedard and Krause 2007). Die Komposition der Zellmembranen wird unter anderem durch die Aktivität verschiedener Ceramidsynthasen (CerS) gesteuert. Über den Einfluss der Ceramid-Zusammensetzung auf die biophysikalischen Eigenschaften der Plasmamembran von Makrophagen ist wenig bekannt. Auch die Auswirkungen einer veränderten Lipidkomposition auf die Aktivität integraler Membranproteine wie NOX2 wurden bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass genetisch determinierte Defizienz der Ceramidsynthase Isoenzyme 2 und 6 (*CerS2*^{-/-} bzw. *CerS6*^{-/-}) bei Makrophagen zu Veränderungen in der ROS-Produktion führen. In *CerS2*^{-/-} Knochenmarksmakrophagen (BMDM) zeigte sich ein defektes TNF-Priming und in Folge dessen eine reduzierte Aktivierbarkeit von NOX2. In *CerS6*^{-/-} BMDM war dagegen die ROS-Produktion durch NOX2 nach TNF-Priming deutlich erhöht. *CerS2* Defizienz führte zudem zu einer signifikant erhöhten Suszeptibilität der BMDM gegenüber bakteriellen Infektionen, während *CerS6*^{-/-} BMDM protektiert waren. *CerS1*^{-/-}, *CerS4*^{-/-} und *CerS5*^{-/-} BMDM zeigten hingegen hinsichtlich der ROS-Produktion keine Unterschiede zum Wildtyp.

CerS2 wird in Säugern in den meisten Geweben und Zelltypen exprimiert und hat bei der Acylierung von Sphinganolin eine hohe Präferenz für lange Fettsäurereste (C₂₂-C₂₆). Besonders starke Expression von *CerS2* findet man in Leber, Niere und Lunge (Mizutani, Kihara et al. 2005; Laviad, Albee et al. 2008; Pewzner-Jung, Park et al. 2010). Eine Analyse der Sphingolipid-Zusammensetzung von Leberzellen aus

CerS2^{-/-} Mäusen ergab eine relative Erhöhung der Konzentrationen von C₁₆-Ceramid, C₁₆-Sphingosin und C₁₆-Sphinganin gegenüber ihren längerkettigen Varianten (Pewzner-Jung, Park et al. 2010). In *CerS2*^{-/-} Mäusen werden fehlende langkettige Ceramide also offenbar durch kürzerkettige Varianten kompensiert, was zu veränderten biophysikalischen Membraneigenschaften führt (Silva, Ben David et al. 2012). Der Gesamtgehalt an Ceramiden und Sphingomyelin bleibt jedoch unverändert (Ben-David, Pewzner-Jung et al. 2011; Grosch, Schiffmann et al. 2012). Die veränderte Sphingolipid-Zusammensetzung der Membranen von *CerS2*^{-/-} Zellen hat vermutlich einen Einfluss auf viele zelluläre Prozesse, die stark von der Membranstruktur abhängen. Betroffen könnten die Funktionen von Membranproteinen, die Kommunikation zwischen Zellen, das Trafficking und Sorting von Molekülen und die Signaltransduktion sein (van Meer and Sprong 2004; Ballabio and Gieselmann 2009).

Das basale Ausmaß an extrazellulär produzierten ROS war in ruhenden *CerS2*^{-/-} BMDM genauso hoch wie in Wildtyp-BMDM. TNF Stimulation bringt ruhende Knochenmarksmakrophagen in einen voraktivierten Zustand (engl. „Priming“), bei dem auf einen zweiten Stimulus hin NOX2 deutlich mehr ROS produziert (El-Benna, Dang et al. 2008). Die Riboflavinkinase (RFK) vermittelt über Bindung an den TNF-Rezeptor und die katalytische Untereinheit p22^{phox} des NADPH-Oxidase-Komplexes die Bildung des TNF-Rezeptor/NOX Signalosoms, welches für die TNF induzierte NOX-Aktivierung nötig ist (Yazdanpanah, Wiegmann et al. 2009). Nach Priming mit TNF erhöhte sich die Superoxidproduktion von *CerS2*^{-/-} BMDM im Gegensatz zu Wildtyp-BMDM nur minimal. Auch die zusätzliche Stimulation von TNF-vorbehandelten Makrophagen mit PMA führte in *CerS2*^{-/-} BMDM nicht zu einer Erhöhung der ROS-Produktion. Infektionen mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* zeigten, dass auch hier TNF-vorbehandelte BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen nach Infektion deutlich weniger Superoxid produzierten als BMDM aus dem Wildtyp. In BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen ist also das TNF-Priming von NOX2 defekt, während die NOX2 Aktivität von ruhenden *CerS2*^{-/-} Makrophagen nicht beeinträchtigt ist.

In einer vor kurzem veröffentlichten Arbeit von Park et al. konnte gezeigt werden, dass die in der Leber von *CerS2*^{-/-} Mäusen beobachtete Insulin-Resistenz eine Folge der veränderten Membranzusammensetzung darstellt (Park, Park et al. 2013). In *CerS2*^{-/-} Hepatozyten wird die Phosphorylierung des Insulinrezeptors und dessen

Translokation in Lipid Rafts verhindert. (Silva, Ben David et al. 2012). Analog könnte in *CerS2*^{-/-} BMDM die physische und funktionelle Kopplung des TNF Rezeptors über die RFK an NOX2 gestört sein. Dies könnte das beeinträchtigte TNF-Priming von NOX2 in *CerS2*^{-/-} Makrophagen erklären. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus des defekten TNF-Primings in *CerS2* defizienten Zellen bedarf einer eigenständigen, tiefergehenden Analyse.

Ein Teil der von NOX2 produzierten ROS gelangt in Form von H₂O₂ ins Zytoplasma. Dort oxidiert H₂O₂ Cystein-Reste von Proteinen und fungiert so als Signalmolekül (Gopalakrishna, McNeill et al. 2013). Eine weitere wichtige Quelle für intrazelluläre ROS sind die Mitochondrien. Hier entstehen ROS als Nebenprodukt der Zellatmung oder werden nach Infektion vermehrt gebildet (West, Brodsky et al. 2011). Die Analyse der intrazellulären ROS-Produktion in BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen zeigte, dass bereits das basale Ausmaß der ROS-Produktion höher war als in Wildtyp-BMDM. Die Menge der mitochondrial gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies war in BMDM aus *CerS2*^{-/-} Mäusen etwas höher als in BMDM des Wildtyps, was auf die Mitochondrien als mögliche Quelle der in *CerS2*^{-/-} Makrophagen generierten intrazellulären ROS hindeutet. In Untersuchungen von Zigdon et. al konnte gezeigt werden, dass erhöhte C₁₆ Ceramid- und Sphingankonzentrationen in Zellen aus *CerS2*^{-/-} Mäusen zu einer direkten Inhibierung des Komplexes IV der mitochondrialen Atmungskette führen und dadurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden (Zigdon, Kogot-Levin et al. 2013). Die ständige Produktion von ROS versetzt die Zelle in einen Zustand chronischen oxidativen Stresses. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die erhöhte intrazelluläre ROS-Produktion in *CerS2*^{-/-} BMDM verantwortlich sein.

Nach Priming mit TNF produzierten Wildtyp-BMDM deutlich weniger intrazelluläre ROS als unbehandelte Zellen, während extrazellulär deutlich mehr ROS generiert wurden. Dies könnte an einer verstärkten Verlagerung (Translokation) der NOX2 von intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran liegen. Ein weiterer Grund könnte eine verringerte ROS-Produktion in den Mitochondrien sein. Von mit IFN- oder mit LPS aktivierten Makrophagen ist bekannt, dass diese nach TNF-Priming die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien drosseln und den Stoffwechsel auf Glykolyse umstellen (Rodriguez-Prados, Traves et al. 2010), was die Produktion von ROS als Abfallprodukt der Zellatmung reduziert.

ROS spielen sowohl bei der Abwehr von Bakterien als auch beim Zelltod eine entscheidende Rolle. Die Vitalität von *CerS2*^{-/-} Makrophagen war nach Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder *Listeria monocytogenes* signifikant erniedrigt. Nach Priming mit TNF war die Vitalität von *CerS2*^{-/-} BMDM hingegen vergleichbar mit Wildtyp-BMDM. Die erhöhte Produktion mitochondrialer ROS in ruhenden *CerS2*^{-/-} Makrophagen korreliert demnach mit einer erniedrigten Vitalität nach Infektion. Die Verringerung der intrazellulären ROS-Produktion durch TNF-Behandlung hingegen korreliert mit einem protektiven Effekt. Eine denkbare Ursache hierfür könnte eine verringerte mitochondriale ROS-Produktion durch die Umstellung des Stoffwechsels der Makrophagen sein. Makrophagen werden in M1 und M2-Subtypen eingeteilt. Der klassische proinflammatorische M1 Makrophage entsteht in Anwesenheit von Stimuli wie IFN- oder LPS und sekretiert proinflammatorische Zytokine, wie TNF und IL-6 (Mantovani, Sica et al. 2004). Aktivierte M1 Makrophagen wechseln von oxidativer Phosphorylierung zu Glykolyse (O'Neill and Hardie 2013), so dass an der Atmungskette in Mitochondrien weniger ROS freigesetzt werden. Ob das in *CerS2*^{-/-} Makrophagen gestörte TNF-Priming von NOX2 und die damit verringerte Produktion antibakterieller ROS zu einer erhöhten Empfänglichkeit der BMDM für Bakterieninfektionen führt, konnte mit den durchgeführten Experimenten nicht abschließend geklärt werden.

Die Ceramidsynthase 6 wird in niedrigen Konzentrationen in allen Geweben exprimiert und hat eine hohe Präferenz für Fettsäuren einer Kettenlänge von C₁₄ und C₁₆. Eine relativ höhere Expression dieses Gens findet man in Organen wie Darm, Leber, Milz und Niere, aber auch in Lymphknoten, Thymus und Knochenmark (Laviad, Albee et al. 2008; Levy and Futerman 2010). C₁₆-Ceramid ist das vorherrschende kurzkettige Ceramid in Fibroblasten, Endothelzellen und Zellen des Immunsystems (Pettus, Baes et al. 2004; Mizutani, Kihara et al. 2005). Es scheint auch eine besondere Bedeutung für die Apoptose dieser Zellen zu haben (Osawa, Uchinami et al. 2005).

BMDM aus *CerS6*^{-/-} Mäusen generierten unbehandelt und nach Stimulation mit PMA die gleiche Menge extrazellulärer ROS wie BMDM aus dem Wildtyp. Priming mit TNF führte zu einer leichten Erhöhung der Superoxidmenge im Vergleich zum Wildtyp. Wurden TNF-geprimte BMDM mit PMA stimuliert, produzierten *CerS6*^{-/-} BMDM signifikant mehr extrazelluläre ROS als entsprechende BMDM aus dem Wildtyp. Der

gleiche Effekt wurde nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* beobachtet: Nach Priming mit TNF war die extrazelluläre ROS-Produktion infizierter *CerS6^{-/-}* BMDM deutlich höher als im Wildtyp. Somit lässt sich festhalten, dass in *CerS6^{-/-}* BMDM das TNF-Priming von NOX2 effektiver ist. Die veränderte Membranzusammensetzung erleichtert möglicherweise die Kopplung des TNF-Rezeptors über die RFK an den NADPH-Oxidase-Komplex.

Das basale Ausmaß der intrazellulären ROS-Produktion in *CerS6^{-/-}* BMDM war hingegen identisch zu derjenigen von Wildtyp-BMDM. Auch nach Priming mit TNF waren in der intrazellulären ROS-Produktion keine Unterschiede zu Wildtyp-BMDM feststellbar.

Das effektivere TNF-Priming von NOX2 in *CerS6^{-/-}* Makrophagen und die damit verbundene erhöhte Produktion extrazellulärer ROS könnte zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber Bakterieninfektionen führen. Nach Infektion mit *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* oder *Shigella flexneri* hatten *CerS6^{-/-}* BMDM einen deutlichen Überlebensvorteil gegenüber Wildtyp-BMDM. Priming mit TNF führte zudem in *CerS6^{-/-}* und Wildtyp-BMDM in der Tat zu einer verbesserten Vitalität nach Bakterieninfektion.

In *CerS6^{-/-}* BMDM führt demnach TNF nicht nur zu einer verbesserten antibakteriellen ROS-Produktion, sondern auch zu einer erhöhten Resistenz gegen Bakterieninfektionen.

Die Ceramidsynthase 1 hat eine hohe Affinität zu C₁₈ Fettsäuren und wird in der Maus vor allem im Gehirn und im Skelettmuskel exprimiert. Auch in Hoden und Lymphknoten ist eine, wenn auch deutlich geringere, Expression nachweisbar. Im Knochenmark ist die CerS1-Expression sehr niedrig (Laviad, Albee et al. 2008). Die Untersuchung der extrazellulären ROS-Produktion von ruhenden Makrophagen zeigte, dass *CerS1^{-/-}* BMDM gleiche basale Mengen Superoxid generierten wie der Wildtyp. Stimulation von NOX2 mit PMA führte in Wildtyp-BMDM wie in *CerS1^{-/-}* BMDM zu einem leichten Anstieg der produzierten Superoxid-Menge. Priming mit TNF erhöhte in *CerS1^{-/-}* BMDM die ROS-Produktion in gleichem Ausmaß wie in Wildtyp-BMDM. Mit TNF-geprimte und mit PMA stimulierte *CerS1^{-/-}* BMDM generierten ebenfalls gleiche Mengen an extrazellulären Superoxid wie der Wildtyp.

Sowohl die Aktivierung von NOX2 als auch das Priming mit TNF sind demnach nicht abhängig von der CerS1. Das basale Level an intrazellulären ROS war in Wildtyp-BMDM und *CerS1*^{-/-} BMDM gleich hoch. Stimulation mit PMA führte in BMDM aus dem Wildtyp und in *CerS1*^{-/-} BMDM gleichermaßen zu einer leichten Erhöhung der generierten ROS. Die zusätzliche Stimulation mit PMA führte in TNF-vorbehandelten BMDM zu einem signifikanten Anstieg der ROS-Produktion. Dieser Anstieg war in *CerS1*^{-/-} BMDM genauso hoch wie in Wildtyp-BMDM.

Makrophagen aus *CerS1*^{-/-} Mäusen zeigten also weder bei der Produktion von extrazellulären ROS durch NOX2 noch bei den im Zytoplasma vorhandenen ROS Unterschieden zu BMDM aus Wildtypmäusen. Die CerS1 spielt bei der NOX2-Aktivierung der Makrophagen demnach keine Rolle. Im Knochenmark ist die CerS1-Expression sehr niedrig (Laviad, Albee et al. 2008). Möglicherweise hat deshalb die Abwesenheit der CerS1 in den untersuchten Knochenmarksmakrophagen keinen Einfluss auf die Membranzusammensetzung und damit keinen Effekt auf die NOX2 Aktivität und die Bildung des TNF-Rezeptor/NOX Signalosoms.

CerS4 hat eine hohe Präferenz zu C₁₈ und C₂₀ Fettsäuren und wird in allen Geweben exprimiert. Höhere Expression dieses Enzyms findet man in der Haut, im Herz, in der Leber und in Leukozyten (Mizutani, Kihara et al. 2005; Levy and Futerman 2010). Die Messung der basalen Menge an extrazellulär produzierten Superoxid offenbarte keine signifikanten Unterschiede zwischen *CerS4*^{-/-} BMDM und Wildtyp-BMDM. Auch das TNF-Priming funktionierte in *CerS4*^{-/-} Zellen wie im Wildtyp. Die Analyse der intrazellulären ROS-Produktion zeigte ebenfalls, dass BMDM aus *CerS4*^{-/-} Mäusen basal und nach Priming mit TNF normale Mengen ROS generierten.

CerS5 hat eine hohe Präferenz zu C₁₆ Fettsäuren, ist zwar auf mRNA-Ebene in allen Geweben nachweisbar, wird auf Proteinebene jedoch relativ schwach exprimiert (Levy and Futerman 2010). Die Analyse der intra- und extrazellulären ROS-Produktion ergab für unbehandelte und mit TNF vorbehandelte *CerS5*^{-/-} BMDM keine messbaren Unterschiede zu BMDM aus dem Wildtyp. Die Ceramidsynthase 5 spielt also bei der NOX2-Aktivierung in Makrophagen keine Rolle.

Zusammenfassend führt die Defizienz für CerS2 und CerS6 in BMDM zu einer Veränderung der ROS-Produktion und der Suszeptibilität gegenüber bakteriellen

Infektionen. CerS1, CerS4 und CerS5 spielen hingegen bei der Aktivierbarkeit der NOX2 in Makrophagen keine Rolle. Interessanterweise zeigten sich in *CerS2*^{-/-} und *CerS6*^{-/-} BMDM entgegengesetzte Effekte: Bei *CerS2*^{-/-} BMDM war das TNF-Priming von NOX2 gestört. In *CerS6*^{-/-} BMDM hingegen führte Priming mit TNF zu einer deutlich stärkeren NOX2-Aktivierbarkeit als im Wildtyp. In *CerS2*^{-/-} Mäusen ist die Bildung langkettiger Ceramide gestört, in *CerS6*^{-/-} Mäusen ist hingegen die Synthese kurzkettiger C₁₄ und C₁₆ Ceramide defekt. Die veränderte Membranzusammensetzung in *CerS6*^{-/-} BMDM in Richtung längerer Ceramide erleichtert möglicherweise die Kopplung des TNF-Rezeptors über die RfK an den NADPH-Oxidase-Komplex und führt zu einem effektiveren TNF-Priming der NOX2, während eine Verschiebung in Richtung kürzerer Ceramide in *CerS2*^{-/-} BMDM dies verhindert. Defizienz für CerS2 und damit das Fehlen langkettiger Ceramide führt zudem zu einer deutlich erhöhten Suszeptibilität gegenüber Bakterieninfektionen, während eine Defizienz für CerS6 die Suszeptibilität verringerte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Kettenlänge bestimmter, in Plasmamembranen gebildeter Ceramide einen großen Einfluss auf die Effektivität des TNF-Primings der NOX2 und damit auf die antibakterielle Immunantwort muriner Makrophagen hat. Vor dem Hintergrund, dass Ceramidsynthasen über subtile Änderungen der Ceramidkomposition von zellulären Membranen die Aktivierung von NOX2 regulieren, bekommen die Ergebnisse dieser Studie ihre biologische Relevanz.

5. Zusammenfassung

Ceramidsynthasen (CerS) gehören zur Klasse der N-Acyltransferasen und sind an der Synthese von Ceramiden in Plasmamembranen beteiligt. Die in Säugetieren bekannten sechs Isoformen (CerS1-CerS6) haben jeweils starke Präferenzen für Fettsäuren der verschiedenen Kettenlängen von C₁₆ bis C₃₂. Anteil und Fettsäurelänge der Ceramide haben Auswirkungen auf die biophysikalischen Eigenschaften von Membranen und können so die Funktion der darin lokalisierten Proteine beeinflussen. Die katalytische Untereinheit des für die anti-bakterielle Immunabwehr essentiellen Phagozyten-NADPH-Oxidase-Komplexes (NOX2) besteht aus zwei integralen Membranproteinen. Ob die Funktion von NOX2 von der Aktivität der unterschiedlichen CerS abhängig ist, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Die Analyse der extrazellulären ROS-Produktion von Knochenmarksmakrophagen (BMDM) aus *CerS*^{-/-} Mäusen zeigte eine normale Aktivität von NOX2 in ruhenden *CerS1*^{-/-}, *CerS2*^{-/-}, *CerS4*^{-/-}, *CerS5*^{-/-} und *CerS6*^{-/-} BMDM. TNF-Priming erhöhte die von Wildtyp, *CerS1*^{-/-}, *CerS4*^{-/-} und *CerS5*^{-/-} BMDM produzierten Mengen extrazellulärer ROS. *CerS2*^{-/-} BMDM hingegen produzierten nach TNF-Priming nicht mehr ROS als ohne Priming, während *CerS6*^{-/-} BMDM nach TNF-Priming noch einmal deutlich mehr ROS produzierten als Wildtyp-BMDM.

Die intrazelluläre ROS-Produktion, die mitochondrial gebildete ROS beinhaltet, war in *CerS1*^{-/-}, *CerS4*^{-/-}, *CerS5*^{-/-} und *CerS6*^{-/-} BMDM gleich hoch wie im Wildtyp. *CerS2*^{-/-} BMDM produzierten hingegen deutlich mehr intrazelluläre ROS.

Nach Infektion von BMDM mit *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* oder *Shigella flexneri* war die Überlebensrate von *CerS2*^{-/-} BMDM im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. *CerS6*^{-/-} BMDM hatten hingegen einen Überlebensvorteil. Die Generierung von Ceramiden mit einer Kettenlänge von C₁₄-C₁₆ (CerS6) und C₂₀-C₂₆ (CerS2) ist also für die Effektivität des TNF-Primings von NOX2 und die anti-bakterielle Immunantwort von Bedeutung, während CerS1 (C₁₈), CerS4 (C₁₈-C₂₀) und CerS5 (C₁₆) keine Rolle spielen. Die Kettenlänge der in Plasmamembranen von CerS gebildeten Ceramide hat somit einen großen Einfluss auf die antibakterielle Immunantwort.

6. Literaturverzeichnis

1. Ames, B. N., M. K. Shigenaga, et al. (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.
2. Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva, et al. (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 200-214.
3. Ballabio, A. and V. Gieselmann (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 684-696.
4. Bedard, K. and K. H. Krause (2007). "The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
5. Ben-David, O., Y. Pewzner-Jung, et al. (2011). "Encephalopathy caused by ablation of very long acyl chain ceramide synthesis may be largely due to reduced galactosylceramide levels." J Biol Chem **286**(34): 30022-30033.
6. Bollinger, C. R., V. Teichgraber, et al. (2005). "Ceramide-enriched membrane domains." Biochim Biophys Acta **1746**(3): 284-294.
7. Circu, M. L., M. P. Moyer, et al. (2009). "Contribution of glutathione status to oxidant-induced mitochondrial DNA damage in colonic epithelial cells." Free Radic Biol Med **47**(8): 1190-1198.
8. del Cerro-Vadillo, E., F. Madrazo-Toca, et al. (2006). "Cutting edge: a novel nonoxidative phagosomal mechanism exerted by cathepsin-D controls *Listeria monocytogenes* intracellular growth." J Immunol **176**(3): 1321-1325.
9. DeLeo, F. R., L. A. Allen, et al. (1999). "NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis." J Immunol **163**(12): 6732-6740.
10. Dolgachev, V., M. S. Farooqui, et al. (2004). "De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells." J Biol Chem **279**(22): 23238-23249.
11. Ebeling, J. G., G. R. Vandenbark, et al. (1985). "Diacylglycerols mimic phorbol diester induction of leukemic cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(3): 815-819.
12. El-Benna, J., P. M. Dang, et al. (2008). "Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane." Semin Immunopathol **30**(3): 279-289.

13. Franzone, V. L., J. Aronoff, et al. (1990). "Contribution of superoxide dismutase and catalase activities to *Shigella flexneri* pathogenesis." *Infect Immun* **58**(2): 529-535.
14. Fratti, R. A., Y. Jun, et al. (2004). "Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles." *J Cell Biol* **167**(6): 1087-1098.
15. Futerman, A. H. and Y. A. Hannun (2004). "The complex life of simple sphingolipids." *EMBO Rep* **5**(8): 777-782.
16. Goni, F. M. and A. Alonso (2002). "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity." *FEBS Lett* **531**(1): 38-46.
17. Gopalakrishna, R., T. H. McNeill, et al. (2013). "Methods for studying oxidative regulation of protein kinase C." *Methods Enzymol* **528**: 79-98.
18. Grassme, H., A. Jekle, et al. (2001). "CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts." *J Biol Chem* **276**(23): 20589-20596.
19. Grosch, S., S. Schiffmann, et al. (2012). "Chain length-specific properties of ceramides." *Prog Lipid Res* **51**(1): 50-62.
20. Guillas, I., J. C. Jiang, et al. (2003). "Human homologues of LAG1 reconstitute Acyl-CoA-dependent ceramide synthesis in yeast." *J Biol Chem* **278**(39): 37083-37091.
21. Gulbins, E. and R. Kolesnick (2003). "Raft ceramide in molecular medicine." *Oncogene* **22**(45): 7070-7077.
22. Haas, A. (2007). "The phagosome: compartment with a license to kill." *Traffic* **8**(4): 311-330.
23. Halliwell, B. and C. E. Cross (1994). "Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress." *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 5-12.
24. Hanada, K. (2006). "Discovery of the molecular machinery CERT for endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking of ceramide." *Mol Cell Biochem* **286**(1-2): 23-31.
25. Hanada, K. (2010). "Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein." *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **86**(4): 426-437.
26. Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11**(3): 298-300.
27. Hatzakis, N. S., V. K. Bhatia, et al. (2009). "How curved membranes recruit amphipathic helices and protein anchoring motifs." *Nat Chem Biol* **5**(11): 835-841.
28. Hirschberg, K., J. Rodger, et al. (1993). "The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver." *Biochem J* **290 (Pt 3)**: 751-757.

29. Holopainen, J. M., M. Subramanian, et al. (1998). "Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane." Biochemistry **37**(50): 17562-17570.
30. Huitema, K., J. van den Dikkenberg, et al. (2004). "Identification of a family of animal sphingomyelin synthases." EMBO J **23**(1): 33-44.
31. Jackson, S. H., J. I. Gallin, et al. (1995). "The p47phox mouse knock-out model of chronic granulomatous disease." J Exp Med **182**(3): 751-758.
32. Kinnula, V. L., H. Aito, et al. (1998). "Similarities between TNF and exogenous oxidants on the cytotoxic response of c-Myc-expressing fibroblasts in vitro." Cancer Lett **125**(1-2): 191-198.
33. Klebanoff, S. J. (1975). "Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes." Semin Hematol **12**(2): 117-142.
34. Kolesnick, R. (2002). "The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway." J Clin Invest **110**(1): 3-8.
35. Kolesnick, R. N., F. M. Goni, et al. (2000). "Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects." J Cell Physiol **184**(3): 285-300.
36. Krause, K. H., D. Lambeth, et al. (2012). "NOX enzymes as drug targets." Cell Mol Life Sci **69**(14): 2279-2282.
37. Kronke, M. (1999). "Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes." Chem Phys Lipids **101**(1): 109-121.
38. Kronke, M. (1999). "Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways." Chem Phys Lipids **102**(1-2): 157-166.
39. Lahiri, S. and A. H. Futerman (2005). "LASS5 is a bona fide dihydroceramide synthase that selectively utilizes palmitoyl-CoA as acyl donor." J Biol Chem **280**(40): 33735-33738.
40. Lambeth, J. D. (2004). "NOX enzymes and the biology of reactive oxygen." Nat Rev Immunol **4**(3): 181-189.
41. Laviad, E. L., L. Albee, et al. (2008). "Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate." J Biol Chem **283**(9): 5677-5684.
42. Levy, M. and A. H. Futerman (2010). "Mammalian ceramide synthases." IUBMB Life **62**(5): 347-356.

43. MacMicking, J., Q. W. Xie, et al. (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-350.
44. Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
45. Marasas, W. F. (2001). "Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective." Environ Health Perspect **109 Suppl 2**: 239-243.
46. Marchesini, N. and Y. A. Hannun (2004). "Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation." Biochem Cell Biol **82**(1): 27-44.
47. Megha, O. Bakht, et al. (2006). "Cholesterol precursors stabilize ordinary and ceramide-rich ordered lipid domains (lipid rafts) to different degrees. Implications for the Bloch hypothesis and sterol biosynthesis disorders." J Biol Chem **281**(31): 21903-21913.
48. Megha and E. London (2004). "Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function." J Biol Chem **279**(11): 9997-10004.
49. Merrill, A. H., Jr., M. C. Sullards, et al. (2005). "Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry." Methods **36**(2): 207-224.
50. Merrill, A. H., Jr., M. C. Sullards, et al. (2001). "Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins." Environ Health Perspect **109 Suppl 2**: 283-289.
51. Mesicek, J., H. Lee, et al. (2010). "Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells." Cell Signal **22**(9): 1300-1307.
52. Michel, C., G. van Echten-Deckert, et al. (1997). "Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide." J Biol Chem **272**(36): 22432-22437.
53. Mizutani, Y., A. Kihara, et al. (2005). "Mammalian Lass6 and its related family members regulate synthesis of specific ceramides." Biochem J **390**(Pt 1): 263-271.
54. Mizutani, Y., A. Kihara, et al. (2006). "LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity." Biochem J **398**(3): 531-538.
55. Moonis, M., I. Ahmad, et al. (1992). "Macrophages in host defence--an overview." Indian J Biochem Biophys **29**(2): 115-122.

56. Mukhopadhyay, P., M. Rajesh, et al. (2007). "Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy." Nat Protoc **2**(9): 2295-2301.
57. Munro, S. (2003). "Lipid rafts: elusive or illusive?" Cell **115**(4): 377-388.
58. Nachlas, M. M., S. I. Margulies, et al. (1960). "The determination of lactic dehydrogenase with a tetrazolium salt." Anal Biochem **1**: 317-326.
59. Nathan, C. and M. U. Shiloh (2000). "Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 8841-8848.
60. Nauseef, W. M. (2004). "Assembly of the phagocyte NADPH oxidase." Histochem Cell Biol **122**(4): 277-291.
61. Niedel, J. E., L. J. Kuhn, et al. (1983). "Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(1): 36-40.
62. Nurminen, T. A., J. M. Holopainen, et al. (2002). "Observation of topical catalysis by sphingomyelinase coupled to microspheres." J Am Chem Soc **124**(41): 12129-12134.
63. O'Neill, L. A. and D. G. Hardie (2013). "Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation." Nature **493**(7432): 346-355.
64. Osawa, Y., H. Uchinami, et al. (2005). "Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- α ." J Biol Chem **280**(30): 27879-27887.
65. Park, J. W., W. J. Park, et al. (2013). "Ablation of very long acyl chain sphingolipids causes hepatic insulin resistance in mice due to altered detergent-resistant membranes." Hepatology **57**(2): 525-532.
66. Pettus, B. J., M. Baes, et al. (2004). "Mass spectrometric analysis of ceramide perturbations in brain and fibroblasts of mice and human patients with peroxisomal disorders." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(14): 1569-1574.
67. Pettus, B. J., C. E. Chalfant, et al. (2002). "Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives." Biochim Biophys Acta **1585**(2-3): 114-125.
68. Pewzner-Jung, Y., S. Ben-Dor, et al. (2006). "When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis." J Biol Chem **281**(35): 25001-25005.
69. Pewzner-Jung, Y., H. Park, et al. (2010). "A critical role for ceramide synthase 2 in liver homeostasis: I. alterations in lipid metabolic pathways." J Biol Chem **285**(14): 10902-10910.

70. Porter, C. D., F. Kuribayashi, et al. (1996). "Detection of gp91-phox precursor protein in B-cell lines from patients with X-linked chronic granulomatous disease as an indicator for mutations impairing cytochrome b558 biosynthesis." Biochem J **315** (Pt 2): 571-575.
71. Pushkareva, M., L. M. Obeid, et al. (1995). "Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression." Immunol Today **16**(6): 294-297.
72. Quinn, M. T. and K. A. Gauss (2004). "Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases." J Leukoc Biol **76**(4): 760-781.
73. Rachek, L. I., L. V. Yuzefovych, et al. (2009). "Troglitazone, but not rosiglitazone, damages mitochondrial DNA and induces mitochondrial dysfunction and cell death in human hepatocytes." Toxicol Appl Pharmacol **240**(3): 348-354.
74. Rajendran, L. and K. Simons (2005). "Lipid rafts and membrane dynamics." J Cell Sci **118**(Pt 6): 1099-1102.
75. Ramos, C. L., S. Pou, et al. (1992). "Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes." J Biol Chem **267**(12): 8307-8312.
76. Reeves, E. P., H. Lu, et al. (2002). "Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux." Nature **416**(6878): 291-297.
77. Reynwar, B. J., G. Illya, et al. (2007). "Aggregation and vesiculation of membrane proteins by curvature-mediated interactions." Nature **447**(7143): 461-464.
78. Riebeling, C., J. C. Allegood, et al. (2003). "Two mammalian longevity assurance gene (LAG1) family members, trh1 and trh4, regulate dihydroceramide synthesis using different fatty acyl-CoA donors." J Biol Chem **278**(44): 43452-43459.
79. Robinson, J. M. (2008). "Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes." Histochem Cell Biol **130**(2): 281-297.
80. Robinson, J. M. and J. A. Badwey (1995). "The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view." Histochem Cell Biol **103**(3): 163-180.
81. Rodriguez-Prados, J. C., P. G. Traves, et al. (2010). "Substrate fate in activated macrophages: a comparison between innate, classic, and alternative activation." J Immunol **185**(1): 605-614.

82. Royall, J. A. and H. Ischiropoulos (1993). "Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells." Arch Biochem Biophys **302**(2): 348-355.
83. Schneider-Brachert, W., V. Tchikov, et al. (2004). "Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles." Immunity **21**(3): 415-428.
84. Scott, C. C., R. J. Botelho, et al. (2003). "Phagosome maturation: a few bugs in the system." J Membr Biol **193**(3): 137-152.
85. Segal, A. W. (2005). "How neutrophils kill microbes." Annu Rev Immunol **23**: 197-223.
86. Senerovic, L., S. P. Tsunoda, et al. (2012). "Spontaneous formation of IpaB ion channels in host cell membranes reveals how Shigella induces pyroptosis in macrophages." Cell Death Dis **3**: e384.
87. Senkal, C. E., S. Ponnusamy, et al. (2010). "Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways." FASEB J **24**(1): 296-308.
88. Shao, D., A. W. Segal, et al. (2003). "Lipid rafts determine efficiency of NADPH oxidase activation in neutrophils." FEBS Lett **550**(1-3): 101-106.
89. Silva, L. C., O. Ben David, et al. (2012). "Ablation of ceramide synthase 2 strongly affects biophysical properties of membranes." J Lipid Res **53**(3): 430-436.
90. Simons, K. and E. Ikonen (1997). "Functional rafts in cell membranes." Nature **387**(6633): 569-572.
91. Stancevic, B. and R. Kolesnick (2010). "Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling." FEBS Lett **584**(9): 1728-1740.
92. Starkov, A. A., G. Fiskum, et al. (2004). "Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species." J Neurosci **24**(36): 7779-7788.
93. Szabo, C., H. Ischiropoulos, et al. (2007). "Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics." Nat Rev Drug Discov **6**(8): 662-680.
94. Tafesse, F. G., K. Huitema, et al. (2007). "Both sphingomyelin synthases SMS1 and SMS2 are required for sphingomyelin homeostasis and growth in human HeLa cells." J Biol Chem **282**(24): 17537-17547.

95. Thannickal, V. J. and B. L. Fanburg (2000). "Reactive oxygen species in cell signaling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **279**(6): L1005-1028.
96. Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol **552**(Pt 2): 335-344.
97. Tyurina, Y. Y., F. B. Serinkan, et al. (2004). "Lipid antioxidant, etoposide, inhibits phosphatidylserine externalization and macrophage clearance of apoptotic cells by preventing phosphatidylserine oxidation." J Biol Chem **279**(7): 6056-6064.
98. Uehara, K., N. Maruyama, et al. (1993). "The first application of a chemiluminescence probe, 2-methyl-6-[p-methoxyphenyl]-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA), for detecting O₂- production, in vitro, from Kupffer cells stimulated by phorbol myristate acetate." FEBS Lett **335**(2): 167-170.
99. van Bruggen, R., E. Anthony, et al. (2004). "Continuous translocation of Rac2 and the NADPH oxidase component p67(phox) during phagocytosis." J Biol Chem **279**(10): 9097-9102.
100. van Meer, G. and H. Sprong (2004). "Membrane lipids and vesicular traffic." Curr Opin Cell Biol **16**(4): 373-378.
101. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, et al. (2000). "Antimicrobial actions of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase in experimental salmonellosis. I. Effects on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro." J Exp Med **192**(2): 227-236.
102. Venkataraman, K. and A. H. Futerman (2000). "Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems." Trends Cell Biol **10**(10): 408-412.
103. Venkataraman, K., C. Riebeling, et al. (2002). "Upstream of growth and differentiation factor 1 (uog1), a mammalian homolog of the yeast longevity assurance gene 1 (LAG1), regulates N-stearoyl-sphinganine (C18-(dihydro)ceramide) synthesis in a fumonisin B1-independent manner in mammalian cells." J Biol Chem **277**(38): 35642-35649.
104. Vignais, P. V. (2002). "The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism." Cell Mol Life Sci **59**(9): 1428-1459.
105. Vodovotz, Y., D. Russell, et al. (1995). "Vesicle membrane association of nitric oxide synthase in primary mouse macrophages." J Immunol **154**(6): 2914-2925.
106. West, A. P., I. E. Brodsky, et al. (2011). "TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS." Nature **472**(7344): 476-480.

107. Wu, D., Z. Ren, et al. (2007). "Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue." J Immunol **179**(7): 4829-4839.
108. Xu, X., R. Bittman, et al. (2001). "Effect of the structure of natural sterols and sphingolipids on the formation of ordered sphingolipid/sterol domains (rafts). Comparison of cholesterol to plant, fungal, and disease-associated sterols and comparison of sphingomyelin, cerebroside, and ceramide." J Biol Chem **276**(36): 33540-33546.
109. Yamashita, T., R. Wada, et al. (1999). "A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9142-9147.
110. Yazdanpanah, B., K. Wiegmann, et al. (2009). "Riboflavin kinase couples TNF receptor 1 to NADPH oxidase." Nature **460**(7259): 1159-1163.
111. Zenewicz, L. A. and H. Shen (2007). "Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview." Microbes Infect **9**(10): 1208-1215.
112. Zhang, Y., X. Li, et al. (2009). "Ceramide-enriched membrane domains--structure and function." Biochim Biophys Acta **1788**(1): 178-183.
113. Zigdon, H., A. Kogot-Levin, et al. (2013). "Ablation of ceramide synthase 2 causes chronic oxidative stress due to disruption of the mitochondrial respiratory chain." J Biol Chem **288**(7): 4947-4956.

7. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.