

Untersuchungen zur Wirkung von Adefovir-Dipivoxil und Pitavastatin auf die Funktion humaner T-Zellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von **M.Sc. Linda Voss** (geb. Wagenbrett)

geboren am 27.12.1991 in Hohenmölsen

Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Dirk Reinhold

Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel

eingereicht am: 22.11.2021

verteidigt am: 01.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 T-Zellen.....	2
1.2.1 T-Zell-Aktivierung.....	2
1.2.1.1 <i>Lipid Rafts</i>	4
1.2.2 T-Zellen in Autoimmunerkrankungen	5
1.2.3 Apoptose in T-Zellen	6
1.2.3.1 Caspasen	7
1.2.3.2 Der extrinsische Apoptoseweg.....	7
1.2.3.3 Der intrinsische Apoptoseweg	8
1.3 Die Entwicklung von Arzneimitteln	10
1.3.1 Präklinik	11
1.3.2 Klinische Phasen	11
1.3.2.1 Phase I	11
1.3.2.2 Phase II	12
1.3.2.3 Phase III	12
1.3.3 <i>Drug Repositioning</i>	12
1.4 Adefovir Dipivoxil	13
1.4.1 Wirkmechanismus.....	14
1.4.2 Immunmodulatorische Wirkungen von Adefovir Dipivoxil.....	15
1.5 Pitavastatin	15
1.5.1 Immunmodulatorische Effekte von Statinen.....	17
1.5.2 Statine in Autoimmunerkrankungen	19
1.6 Zielstellung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Geräte und Software	22
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	23
2.3 Zellbiologische Methoden	27
2.3.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem humanen Vollblut.....	27

2.3.2	Isolation von T-Zellen aus humanen mononukleären Zellen	28
2.3.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	28
2.3.4	MNZ Screening Assay	29
2.3.5	Behandlung von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen mit pharmakologischen Substanzen	29
2.3.6	[³ H] -Thymidin-Zellproliferationsassay	30
2.3.7	Apoptose-Messung mittels IncuCyte S3.....	30
2.4	Durchflusszytometrische Analysen.....	30
2.4.1	Antikörper-Markierung von Oberflächenproteinen	31
2.4.2	Bestimmung der Apoptose mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung.....	31
2.4.3	Bestimmung der aktiven Caspasen-8 und -9 mittels Durchflusszytometrie	32
2.4.4	Bestimmung der aktiven Caspasen-3/7 mittels Durchflusszytometrie	32
2.4.5	Zellzyklus Analyse	33
2.4.6	Durchflusszytometrische γ H2AX-Detektion	33
2.4.7	Markierung von T-Zellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)	34
2.5	Proteinbiochemische Methoden	34
2.5.1	Herstellung von Proteinlysaten	34
2.5.2	Proteingehaltsbestimmung	35
2.5.3	Western Blot	35
2.5.3.1	SDS-PAGE	35
2.5.3.2	Western Blotting	36
2.5.4	Immunzytochemische Färbung von γ H2AX-Foci.....	37
2.5.5	Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen mittels Enzyme-Linked Immunsorbent Assay	38
2.6	Statistik.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Screening einer Bibliothek FDA-zugelassener Medikamente auf Inhibitoren der Proliferation von frisch stimulierten und prä-aktivierten MNZ.....	39
3.2	Adefovir Dipivoxil	44
3.2.1	Adefovir Dipivoxil hemmt die Proliferation, Aktivierung und Zytokin- Produktion von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen	44
3.2.2	ADV induziert DNA-Doppelstrangbrüche in ruhenden, frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen	48
3.2.3	ADV induziert die Phosphorylierung von p53 in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen.....	49

3.2.4	ADV induziert an frisch stimulierten T-Zellen einen Arrest in der G ₀ /G ₁ -Phase des Zellzyklus	51
3.2.5	ADV induziert Apoptose in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen	54
3.3	Pitavastatin	58
3.3.1	Pitavastatin inhibiert die Proliferation sowie IL-10- und IL-17-Produktion frisch stimulierter T-Zellen, aber hat keinen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung	58
3.3.2	Pitavastatin führt zum Zellzyklus-Arrest und Zelltod in frisch stimulierten T-Zellen.....	59
3.3.3	Niedrige Pitavastatin Konzentrationen (<1 µM) induzieren Apoptose in frisch stimulierten T-Zellen	62
3.3.4	Pitavastatin induziert in niedrigen Konzentrationen eine starke Phosphorylierung von ERK1/2	65
3.3.5	Die Hyperphosphorylierung von ERK1/2 vermittelt die Pitavastatin-induzierte Apoptose	67
3.3.6	Pitavastatin inhibiert die Proliferation von prä-aktivierten T-Zellen.....	68
3.3.7	Pitavastatin induziert Apoptose in prä-aktivierten T-Zellen	69
4.	Diskussion	71
4.1	Adefovir Dipivoxil	71
4.2	Pitavastatin	75
4.3	Ausblick.....	83
	Zusammenfassung	84
	Summary	86
	Literaturverzeichnis	88
	Publikationsliste	103
	Ehrenerklärung	104

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TZR-Signalkaskade..	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges.	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte bei Arzneimitteln.	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Adefovir.....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mevalonatweges.....	17
Abbildung 6: Immunmodulatorische Effekte von Statinen.	19
Abbildung 7: Screening einer Bibliothek FDA-zugelassener Medikamente..	40
Abbildung 8: Heatmap der 26 identifizierten Substanzen zur Visualisierung der Proliferationsinhibition frisch stimulierter und prä-aktivierter MNZ.	42
Abbildung 9: ADV hemmt die Proliferation frisch stimulierter und prä-aktivierter T-Zellen..	46
Abbildung 10: ADV hemmt die Aktivierung und Zytokin-Produktion frisch stimulierter T-Zellen..	47
Abbildung 11: ADV induziert DNA-Doppelstrangbrüche in ruhenden, frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen.....	50
Abbildung 12: ADV induziert die Phosphorylierung von p53 in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen.....	51
Abbildung 13: ADV induziert einen Zellzyklus-Arrest in der G ₀ /G ₁ -Phase durch Hochregulation von p21.	53
Abbildung 14: ADV induziert Apoptose in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen.....	54
Abbildung 15: ADV aktiviert den intrinsischen Apoptose-Signalweg in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen.....	56
Abbildung 16: ADV induziert die Hochregulation von PUMA in frisch stimulierten T-Zellen.....	57
Abbildung 17: Pitavastatin inhibiert die Proliferation sowie die IL-10- und IL-17-Produktion frisch stimulierter T-Zellen, aber hat keinen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung.	60
Abbildung 18: Effekt von Pitavastatin auf die Zellzyklus-Verteilung und den Zelltod.	61
Abbildung 19: Effekt von Pitavastatin auf die Aktivierung von Caspasen.	64
Abbildung 20: Pitavastatin induziert eine starke ERK1/2-Phosphorylierung.	66
Abbildung 21: Die Hyperphosphorylierung von ERK1/2 vermittelt die Pitavastatin-induzierte Apoptose.....	67
Abbildung 22: Pitavastatin inhibiert die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen.	68
Abbildung 23: Pitavastatin induziert Apoptose in prä-aktivierten T-Zellen.	70

Abbildung 24: Schematische Darstellung der funktionellen Effekte von ADV auf T-Zellen.	75
Abbildung 25: Schematische Darstellung der funktionellen Wirkungen von Pitavastatin auf T-Zellen.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	22
Tabelle 2: Verwendete Software.....	23
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	23
Tabelle 4: Verwendete Pharmakologische Substanzen.....	25
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 6: Verwendete Kits.....	26
Tabelle 7: Antikörper.....	26
Tabelle 8: Pipettierschema für die verwendeten Polyacrylamid-Gele.....	36
Tabelle 9: IC ₅₀ -Werte der 10 ausgewählten Substanzen basierend auf dem [³ H] -Thymidin-Zellproliferationsassay.....	43

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ANPs	Acyclische Nucleosid Phosphonate
Apaf-1	<i>Apoptotic Protease Activating Factor 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchinonsäure
Bis(POM) PMEA	bis(pivaloyloxymethyl) PMEA
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester
CIITA	<i>MHC transactivator class II</i>
CMV	Cytomegalovirus
cpm	<i>count per minute</i>
DAG	Diazylglyzerol
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DHPA	(S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine
DISC	<i>Death Inducing Signaling Complex</i>
DSB	Doppelstrangbrüche
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	European Medicines Agency
ERK	<i>extracellular-signal regulated Kinases</i>
FADD	<i>Fas Associated Death Domain</i>
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FPP	Farnesylpyrophosphat

GEF	Guaninnucleotidaustauschfaktor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
H2AX	Variante X des Histons 2A
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
LAT	<i>Linker of activated T-Cells</i>
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMPs	Matrix-Metalloproteasen
MNZ	mononukleäre Zellen
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
MTP	mitochondriales Transmembranpotential
MVA	Mevalonat
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NK	Natürliche Killerzelle
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
VIII	

PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C γ
PMEA	9-[2-(phosphonomethoxy) ethyl]adenine
PRRs	<i>Pattern-Recognition Receptors</i>
PS	Phosphatidylserin
ROCK	<i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase</i>
RORC	<i>Retinoic acid-related Orphan Receptor C</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
SLE	systemischer Lupus erythematoses
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
t-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
Th	T-Helferzelle
TNFR1	TNF-1-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrose-Faktor- α
TZR	T-Zell-Rezeptor
γ H2AX	an Serin 139 phosphoryliertes H2AX

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper verfügt über zahlreiche Mechanismen, welche der Abwehr von Krankheitserregern dienen. Dazu zählen intakte äußere und innere Körperoberflächen, das angeborene Immunsystem und das adaptive Immunsystem. Die erste Abwehr gegenüber Fremdstoffen und Pathogenen bilden die zahlreichen äußeren Barrieren wie beispielsweise Haut und Schleimhäute. Hinzu kommen weitere chemische und antimikrobielle Schutzvorrichtungen wie etwa ein niedriger pH-Wert oder bestimmte Enzyme wie Lysozym. Gelingt es Krankheitserregern dennoch, diese ersten Abwehrmechanismen zu überwinden, ist die weitere Abwehr durch das Immunsystem notwendig. Diese Mechanismen schützen den Körper vor zahlreichen Bedrohungen von außen, wie Pathogene oder Toxine, aber auch vor Bedrohungen von innen wie entartete Zellen. Anhand seiner Arbeitsweise lässt sich das Immunsystem in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen [1].

Das angeborene Immunsystem bildet die erste Verteidigungslinie gegenüber eingedrungenen Pathogenen. Es erkennt Fremdstoffe an häufig vorkommenden Strukturen wie beispielsweise Lipopolysaccharid (LPS) oder Nukleinsäuren und kann ohne vorherige Aktivierung reagieren. Diese Strukturen werden als pathogen-assoziierte molekulare Muster (engl. *Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) bezeichnet. Durch *Pattern-Recognition Receptors (PRRs)* sind die Zellen des angeborenen Immunsystems in der Lage, diese PAMPs zu erkennen. Neben zellulären Bestandteilen gehören auch eine Reihe von humoralen Komponenten zum angeborenen Immunsystem. Dazu zählen Zytokine, Chemokine, Akute-Phase Proteine und das Komplement-System. Granulozyten, Mast-Zellen, Monozyten/ Makrophagen, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (DCs) bilden hingegen die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems [2].

Zwar gelingt es dem angeborenen Immunsystem die Pathogene unter Kontrolle zu halten, für eine endgültige Elimination erfordert es allerdings die Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch sein weites Spektrum an antigen-spezifischen Oberflächenrezeptoren aus. Durch diese ist es in der Lage, auf nahezu jedes Pathogen zu reagieren. Außerdem hat das adaptive Immunsystem die Fähigkeit, Gedächtniszellen zu bilden. Dadurch kann eine erneute Infektion mit bekannten Pathogenen wesentlich schneller und effektiver bekämpft werden. Ähnlich dem angeborenen Immunsystem kann auch das adaptive Immunsystem in zelluläre und humorale Komponenten eingeteilt werden. Die humorale Komponente bilden Antikörper, welche von Plasmazellen produziert werden, sowie

Zytokine und Chemokine. Zu den zellulären Komponenten zählen die B- und T-Lymphozyten [2].

1.2 T-Zellen

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Immunität. Aufgrund der Expression ihrer Oberflächenmarker *Cluster of Differentiation* (CD) 4 oder 8 können T-Zellen in verschiedene Subtypen unterteilt werden. CD4⁺ Zellen werden auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet. Ihre Aufgabe ist es, andere Immunzellen, beispielsweise B-Zellen oder Makrophagen, zu unterstützen. Sie erkennen Antigene nur über den Haupthistokompatibilitätskomplex-II (engl. *major histocompatibility complex*, MHC) präsentierte Peptide, welche auf antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie DCs, Monozyten/Makrophagen oder B-Zellen exprimiert werden. Th-Zellen können sich weiterhin in verschiedene Subtypen wie Th1, Th2, Th17 oder regulatorische T-Zellen (Treg) differenzieren. Diese Subtypen wiederum erfüllen verschiedene Funktionen. So können Th1-Zellen durch die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) Makrophagen aktivieren und so die Abwehr intrazellulärer Pathogene verbessern. Durch die Produktion von Interleukin-4 (IL-4) von Th2-Zellen werden B-Zellen zur Antikörperproduktion stimuliert. Th17-Zellen produzieren IL-17 und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung neutrophiler Granulozyten. Tregs sind ein spezialisierter Typ von Th-Zellen. Durch die Produktion von IL-10 und TGF- β 1 regulieren sie die Selbsttoleranz des Immunsystems und sind in der Lage, die Aktivierung des Immunsystems zu unterdrücken [2].

CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene über MHC-Klasse I-Moleküle, welche von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert werden. Die Aufgabe der CD8⁺ T-Zellen ist es, Zellen zu erkennen, welche fremde Peptidantigene präsentieren und diese anschließend abzutöten. Dies erfolgt durch die Freisetzung zytotoxischer Proteine wie Granzyme oder Perforin, welche Apoptose in der Zielzelle induzieren [2].

1.2.1 T-Zell-Aktivierung

Nach Abschluss ihrer Reifung im Thymus zirkulieren T-Lymphozyten als naive T-Zellen zwischen den Blutgefäßen und den peripheren lymphatischen Organen. Naive T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung erst Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen. Dieser erfolgt über antigenpräsentierende Zellen wie DCs, Makrophagen oder B-Zellen, welche auf ihrer Oberfläche einen MHC-Antigenpeptid-Komplex präsentieren. Wird dieser Komplex von der naiven T-Zelle mit ihrem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TZR) erkannt, liefert dies das erste Signal zur T-Zell Aktivierung. Zur vollständigen Aktivierung ist dieses Signal jedoch nicht ausreichend. Um naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen, ist ein zweites kostimulatorisches Signal nötig, welches von derselben APC geliefert werden muss, die auch den MHC-Antigenkomplex präsentiert hat. Ein

wesentliches kostimulatorisches Molekül stellt CD28 dar. Es kommt auf naiven T-Zellen vor und bindet an die Liganden B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf APCs exprimiert werden [2]. Die zusätzliche Kostimulation führt in Kombination mit dem TZR-Signal zu einer höheren Proliferationsrate, verminderten Apoptose und einer erhöhten Zytokinproduktion. Dies kommt vor allen Dingen durch eine erhöhte Transkriptionsrate und Stabilisierung der IL-2-mRNA [3], einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L [4] und der erhöhten Expression des hochaffinen Rezeptors für IL-2 (CD25) [5] zustande. Durch die Bindung von IL-2 an seinen hochaffinen Rezeptor wird die klonale Expansion ausgelöst [6].

Nach Erkennung des Antigens durch den TZR erfolgt die Signalübertragung ins Zellinnere. Verantwortlich für die Signalweiterleitung des TZR ist der Molekülkomplex CD3. Dieser besteht aus vier membranverankerten Polypeptiden, den γ -, δ - und zwei ϵ - Ketten, und ist nicht-kovalent mit dem TZR assoziiert. Dieser funktionelle TZR-Komplex ist mit einem Homodimer von ζ -Ketten assoziiert, welche unter anderem ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) in ihrer zytoplasmatischen Domäne enthalten. Diese werden von den Tyrosinkinase Lck und Fyn phosphoryliert [7]. An diese phosphorylierten ITAM-Sequenzen der ζ -Kette kann nun die Tyrosinkinase ZAP-70 binden. Es folgt die Phosphorylierung und Aktivierung von ZAP-70 durch Lck. ZAP-70 wiederum phosphoryliert die Adapterproteine LAT (*Linker of activated T-Cells*) und SLP-76, die zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) führen [8]. Die PLC γ spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wodurch zwei Produkte entstehen: der second messenger Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) [9]. IP₃ bindet an den IP₃-Rezeptor und stimuliert dadurch die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) aktiviert [10]. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF κ B von seinem Inhibitor freigesetzt und kann in den Zellkern translozieren [11]. Der dritte Signalweg, der aktiviert wird, ist die MAP-Kinase-Kaskade. Ras wird durch den Guaninnucleotidaustauschfaktor (GEF) RasGRP aktiviert [9]. Dies führt zur Aktivierung von Raf und führt über MEK-1/2 zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK-1/2. Die Aktivierung von ERK induziert und aktiviert Fos, welcher ein Element des Transkriptionsfaktors AP-1 darstellt [12]. Die Transkriptionsfaktoren NF κ B, NF-AT und AP-1 binden an den Promotor des IL-2-Gens, um die Expression des Zytokins IL-2 zu starten [9] (Abbildung 1). Dies ist essenziell für die Proliferation von T-Zellen und deren Differenzierung zu Effektorzellen [11]. IL-2 bindet anschließend an den hochaffinen

IL-2-Rezeptor, der vor allem von aktivierten T-Zellen exprimiert wird, und bedingt den Übergang von der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus [13].

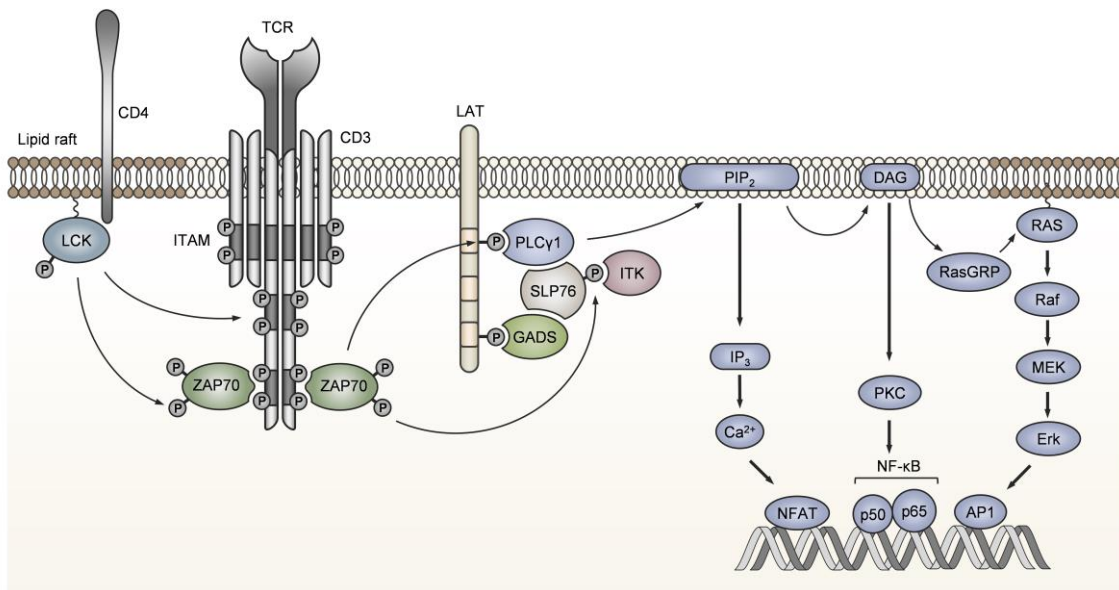


Abbildung 1: TZR-Signalkaskade. Der T-Zell-Rezeptor-Komplex und der Korezeptor sind mit der Proteinkinase Lck assoziiert. Lck phosphoryliert die ITAM-Sequenzen in CD3 γ -, δ -, ϵ - und in der ζ -Kette. Die Tyrosinkinase ZAP-70 bindet die phosphorylierten ITAM-Sequenzen der ζ -Kette und wird durch Lck phosphoryliert und somit aktiviert. ZAP-70 phosphoryliert die Adapterproteine LAT und SLP-76, was zur Aktivierung von PLC γ 1 führt. Die aktivierte PLC γ 1 löst drei wichtige Signalwege aus, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern führen. PLC γ 1 spaltet PIP₂ in IP₃ und DAG. IP₃ öffnet Calciumkanäle, sodass Ca²⁺-Ionen in das Zytosol strömen. Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration führt zur Aktivierung von Calcineurin, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NFAT aktiviert. DAG aktiviert zusammen mit Ca²⁺ die PKC. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert. Ras wird durch den GEF RasGRP aktiviert, was zu einer aufeinanderfolgenden Aktivierung der drei Kinasen Raf, MEK und ERK führt. Die Phosphorylierung von ERK führt zur Aktivierung von AP-1. Zusammen induzieren die Transkriptionfaktoren NFAT, NF κ B und AP-1 im Zellkern die Transkription von Genen, welche für die Differenzierung und Proliferation der T-Zellen notwendig sind.

1.2.1.1 Lipid Rafts

Als *Lipid Rafts* werden bestimmte Bereiche der Zellmembran bezeichnet, welche reich an bestimmten Lipiden und Proteinen sind. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass diese *Lipid Rafts* eine Schlüsselrolle im Rezeptor-Signalling und der Aktivierung von T-Zellen spielen [14]. Außerdem sind sie an weiteren wichtigen zellulären Prozessen, wie Endozytose, Pinozytose, der Sortierung von Proteinen, sowie der Signalübertragung maßgeblich beteiligt [15]. *Lipid Rafts* enthalten einige Lipide in höheren Konzentrationen, vor allem Glykosphingolipide, Sphingomyelin und Cholesterol, was diese Mikrodomänen von der restlichen Plasmamembran unterscheidet [16]. Die genaue Größe und Proteinzusammensetzung der *Lipid Rafts* wird weiterhin diskutiert. Während einige Arbeitsgruppen von einer Größe zwischen 50 und 200 nm sprechen [17], konnten andere Arbeitsgruppen wiederum eine Größe unter

20 nm feststellen [18]. Nach Antigenerkennung kommt es zur Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen der T-Zelle und der APC. In bildgebenden Studien konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der immunologischen Synapse zur zeitlichen und räumlichen Rekrutierung verschiedener Ko-Rezeptoren und Signal-Moleküle kommt [19]. Außerdem erfolgt im Bereich der immunologischen Synapse eine Akkumulation von *Lipid Rafts* [20]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Veränderungen in Größe und Zusammensetzung der *Lipid Rafts* deren Stabilität beeinflussen, was wiederum zu einer abnormalen Signalübertragung führen kann. Beispielsweise konnten bei aktivierten Lymphozyten Änderungen im Membran-Cholesterol Level nachgewiesen werden. Veränderte Cholesterospiegel in der Plasmamembran führen zu einer verringerten Mobilität von Rezeptoren und Signalmolekülen. Dies kann weiterhin den Schwellenwert zur Aktivierung von Rezeptoren, wie beispielsweise des TZR, beeinflussen [21]. Eine Überladung von T-Zellen gesunder Spender mit Cholesterol verringerte die Membranfluidität und behinderte somit die Interaktion von Signalmolekülen [22]. Cholesterol und andere Lipide spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Funktion von *Lipid Rafts*.

1.2.2 T-Zellen in Autoimmunerkrankungen

T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation des Immunsystems. Ihre Aufgabe ist es, eingedrungene Pathogene und Fremdstoffe so schnell wie möglich zu erkennen und zu eliminieren. Von großer Wichtigkeit ist dabei aber die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen. Normalerweise reagieren T-Zellen nicht auf körpereigene Antigene. Dafür verantwortlich sind verschiedene Mechanismen wie die zentrale und periphere Toleranz. Kommt es zum Verlust dieser Selbsttoleranz, richtet sich die Immunantwort gegen körpereigene Antigene [23]. Diese Reaktion wird als Autoimmunität bezeichnet. Erkrankungen, die sich aus dieser Autoimmunität ergeben, werden Autoimmunerkrankungen genannt. Sie sind meist chronisch und gekennzeichnet von einem heterogenen Erscheinungsbild. Autoimmunerkrankungen können in organspezifische (z. B. Diabetes mellitus Typ I oder Multiple Sklerose) oder systemische Autoimmunerkrankungen (z. B. Lupus erythematoses) eingeteilt werden [24] und sind relativ weit verbreitet. Beinahe 5% der Weltbevölkerung entwickeln eine Autoimmunerkrankung, wobei mehr Frauen als Männer betroffen sind [25,26]. Bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen spielen verschiedene Faktoren eine Rolle. Neben genetischen Prädispositionen [27] können auch Umweltfaktoren, wie zum Beispiel virale [28] und bakterielle [29] Infektionen und Toxine, Autoimmunerkrankungen begünstigen. T-Zellen nehmen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ein.

Die zentrale Toleranz entsteht bei der Entwicklung von T-Lymphozyten im Thymus. Hier werden den unreifen T-Zellen über die medullären Thymusepithelzellen sowie über DCs und Makrophagen körpereigene Antigene präsentiert. Alle T-Lymphozyten, die ein Selbstpeptid über MHC-Moleküle mit hoher Affinität binden, werden durch negative Selektion aussortiert. Dadurch werden autoreaktive T-Zellen aus dem Körper eliminiert [30]. Allerdings gelingt es einigen der potenziell autoreaktiven Zellen, dieser Selektion zu entgehen und in die Peripherie zu gelangen. Hier wirken eine Reihe von Mechanismen, um Autoimmunität vorzubeugen. Diese werden unter dem Begriff periphere Toleranz zusammengefasst. Zu diesen Mechanismen zählen die Anergie, klonale Ignoranz, die Deletion und die Suppression durch Tregs [31].

Die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist komplex und meist sind verschiedene Komponenten des Immunsystems beteiligt. Eine besondere Rolle spielen die von aktivierten Lymphozyten sezernierten Zytokine. Unter den T-Effektorzellen tragen insbesondere Th1- und Th17-Zellen zur Pathogenese der Autoimmunerkrankungen bei [15]. Th1-Zellen produzieren vor allem proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , IL-2, Lymphotoxin- α und GM-CSF. Durch die Ausschüttung dieser Zytokine werden auch Makrophagen aktiviert, welche dann das Gewebe infiltrieren und maßgeblich zu dessen Zerstörung beitragen [32]. Die Ausschüttung von IFN- γ induziert in Makrophagen die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffmonoxid (NO), wodurch es zu weiterer Gewebeerstörung kommt [33]. Auch die Th17-Zellen sezernieren zahlreiche proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise IL-17A und IL-22. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Generierung, Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten [34]. Es wird angenommen, dass bei einer Vielzahl der Autoimmunerkrankungen wie beispielsweise rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose oder Diabetes mellitus Typ I, der überwiegende Anteil der T-Zellen zu Th1-Zellen differenziert und an den resultierenden Organschäden beteiligt ist [32]. Es konnte gezeigt werden, dass auch Th2-Zellen z. B. beim Lupus erythematoses, und die damit einhergehende Produktion von Autoantikörpern eine wichtige Rolle spielen. So unterstützen T-Zellen die B-Zellen bei der Produktion von Autoantikörpern [35]. Die B-Zellen selbst spielen eine Rolle bei der Präsentation von Autoantigenen, um T-Zellen zu aktivieren und setzen pathogene Autoantikörper frei [36]. Autoreaktive CD8⁺ T-Zellen können Gewebe direkt durch die Freisetzung zytotoxischer Substanzen wie Perforin und Granzyme und durch Induktion von Apoptose in der Zielzelle zerstören [37].

1.2.3 Apoptose in T-Zellen

Der Begriff Apoptose stammt aus dem Griechischen und leitet sich von *apo* = „ab“ und *ptosis* = „fallen“ ab. Apoptose beschreibt eine Form des programmierten Zelltodes, welcher mit biochemischen und morphologischen Veränderungen einhergeht [38].

Apoptose ist unabdingbar für eine korrekt ablaufende Entwicklung und Funktion des Immunsystems. So werden z. B. autoreaktive T-Zellen während der negativen und positiven Selektion im Thymus durch Apoptose eliminiert. Auch bei der Beendigung einer Immunreaktion spielt Apoptose eine wichtige Rolle. Die durch klonale Expansion entstandenen antigenspezifischen T-Zellen werden nach abgeschlossener Immunreaktion durch Apoptose aus dem Organismus entfernt [39,40]. Neben der Apoptose existieren noch weitere Formen des Zelltodes. Die bekannteste ist die Nekrose. Im Gegensatz zur Apoptose handelt es sich hier nicht um ein kontrolliertes Absterben der Zelle, sondern geht mit entzündlichen Prozessen einher. Beide Formen des Zelltodes können auch parallel ablaufen oder ineinander übergehen. Abhängig vom Stimulus, dessen Dauer und Intensität kann Apoptose und/oder Nekrose als Zelltodmechanismus ausgelöst werden. In geringen Dosen löst z. B. ionisierende Strahlung zuerst Apoptose aus, während steigende Intensitäten zum Zelltod durch Nekrose führen [41,42]. Im Rahmen der Apoptose kommt es zu morphologischen Veränderungen in der Zelle. Dazu gehören Verkleinerung des Zellvolumens, Verdichtung des Zytoplasmas und Kondensation des Chromatins im Zellkern. Es kommt zur Abschnürung von membranumschlossenen Zellbestandteilen (membrane blebbing), die als apoptotic bodies bezeichnet werden. Charakteristisch für die Apoptose ist hierbei, dass die Plasmamembran intakt bleibt [43]. Ein frühes Ereignis von Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite der Plasmamembran. Dies dient als „Eat-me“ Signal und vermittelt die Phagozytose der apoptotischen Zellen, wodurch eine Zelllyse vermieden werden kann [44].

1.2.3.1 Caspasen

Die Aktivierung von Caspasen spielt eine essenzielle Rolle in allen apoptotischen Signalkaskaden. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die Substrate nach einem Aspartat-Rest spalten. Sie liegen in der Regel als inaktive Procaspasen (Zymogene) vor. Caspasen, die an der Apoptose beteiligt sind, werden in Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10) und Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) unterteilt. Die Aktivierung der Effektorcaspasen erfolgt durch die Initiatorcaspasen und hat eine proteolytische Spaltung von zellulären Strukturen zur Folge, welche letztendlich zum Zelltod führen [45,46]. Für die Aktivierung der Initiatorcaspasen werden hauptsächlich zwei Aktivierungswege beschrieben: der extrinsische (Rezeptor-vermittelte) und der intrinsische (mitochondrial-vermittelte) Apoptoseweg [41] (Abbildung 2).

1.2.3.2 Der extrinsische Apoptoseweg

Beim extrinsischen Apoptoseweg erfolgt die Induktion der Apoptose über sogenannte Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche. Am besten charakterisiert ist das CD95-

Rezeptor/Ligand-System. Nach Ligandenbindung erfolgt die Aktivierung des Rezeptors durch Trimerisierung. Dies führt intrazellulär zur Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins FADD (*Fas Associated Death Domain*). Dieses bildet daraufhin mit der *Death Effector Domain* (DED) der Procaspase-8 einen Signalkomplex, der *Death Inducing Signaling Complex* (DISC) genannt wird. An diesem Komplex erfolgt dann die autokatalytische Spaltung der Procaspase-8 und deren Aktivierung. Diese wiederum kann dann die Effektorcaspasen spalten, wodurch die Apoptose vermittelt wird [47].

1.2.3.3 Der intrinsische Apoptoseweg

Beim intrinsischen Apoptoseweg besitzen die Mitochondrien eine zentrale Funktion. Durch die Einwirkung verschiedener apoptotischer Stimuli kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP = *mitochondrial outer membrane permeabilization*). Dies führt zur Depolarisation des mitochondrialen Transmembranpotentials (MTP) und somit zur Apoptoseinduktion [47]. Bei der Aufrechterhaltung des MTP spielen die Proteine der Bcl-2-Familie eine entscheidende Rolle. Die Bcl-2-Familie besteht aus verschiedenen Proteinen, die Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur ihrer Bcl-2 homologen Regionen (BH-Region) aufweisen. Funktionell lassen sich die Bcl-2-Proteine in 3 Gruppen einteilen: pro-apoptotische Proteine, wie z. B. Bid, Bim, Noxa, PUMA, welche nur eine BH-Domäne besitzen (BH3-only Proteine), pro-apoptotische Proteine, wie Bax und Bak, mit 2 oder 3 BH-Domänen (Bax-like Proteine) und anti-apoptotische Proteine, wie z. B. Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, welche 2 bis 4 BH-Domänen (Bcl-2-like Proteine) aufweisen [48]. Bax-like Proteine verlagern sich nach ihrer Aktivierung in die äußere Mitochondrienmembran. Dort bilden sie durch Oligomerisierung Poren in der Membran, was wiederum zur MOMP führt [49]. Die anti-apoptotischen Bcl-2 Proteine hingegen sorgen für die Stabilisierung der Mitochondrienmembran, indem sie die Oligomerisierung von aktivierten pro-apoptotischen Proteinen verhindern. So bindet die BH-3-Domäne von Bcl-x_L und Bcl-2 bevorzugt an Bax [47]. Über ihre BH-3-Domänen sind BH-3 only-Proteine in der Lage, anti-apoptotische Proteine zu binden. So können beispielsweise Bid, Bim und PUMA an die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x_L binden, wohingegen Noxa bevorzugt mit Mcl-1 interagiert [50]. PUMA und NOXA unterliegen der transkriptionellen Kontrolle von p53. Aus diesem Grund werden sie vor allem durch DNA-Schädigung wie γ -Strahlung aktiviert [51]. Über Bid kann der extrinsische Apoptoseweg mit dem intrinsischen Apoptoseweg verknüpft werden [52]. Bid, Bim und PUMA sind in der Lage, die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak zu aktivieren, was wiederum deren Oligomerisierung bewirkt und zur MOMP führt [47,53].

Durch MOMP kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zytosol. Dort bindet es an ATP und das Adapterprotein Apaf-1 (*Apoptotic Protease*

Activating Factor 1). Apaf-1 bindet mit seiner CARD-Domäne an die Procaspase-9 mit der es das sogenannte Apoptosom bildet. Die aktivierte Caspase-9 spaltet anschließend die nachgeschalteten Effektorcaspasen, was zur Induktion der Apoptose führt [54].

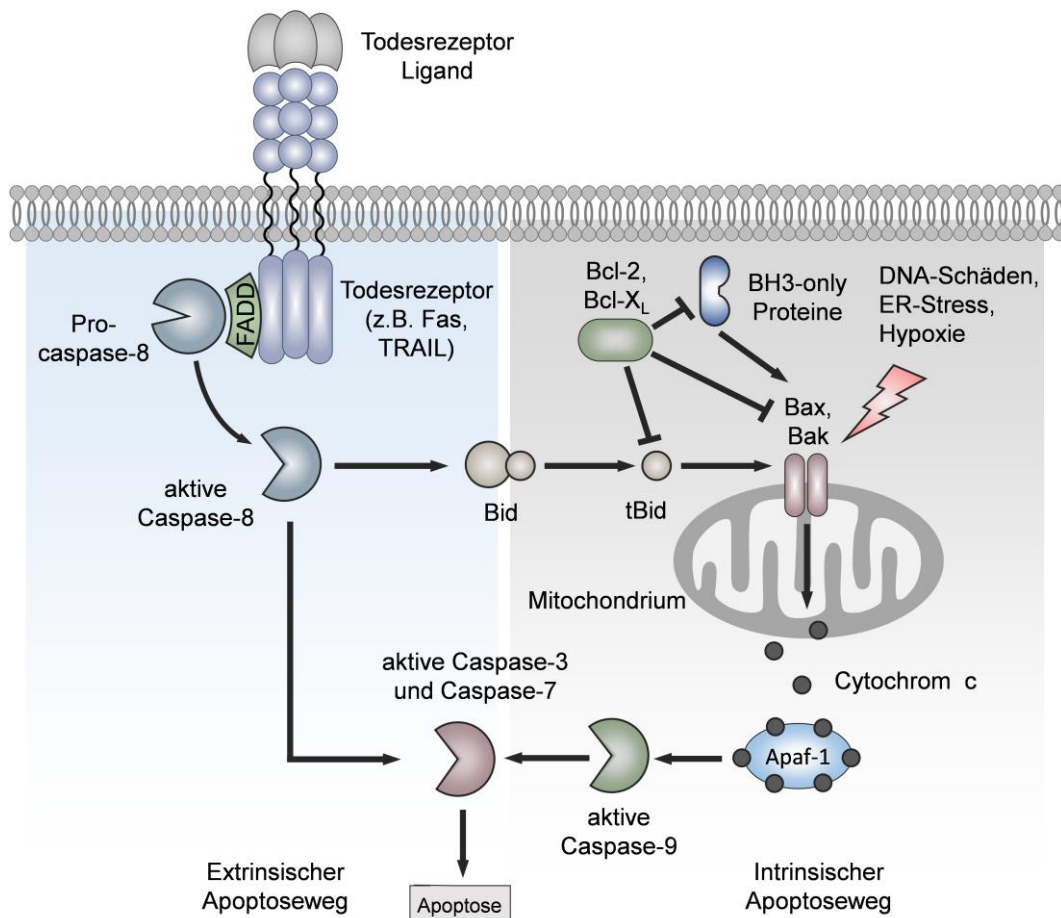


Abbildung 2: Schematische Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges. Beim extrinsischen Apoptoseweg führt die Bindung des Liganden an den Todesrezeptor zur Rekrutierung des zytosolischen Adapterproteins FADD. Dieser bildet mit der Procaspase-8 einen Signalkomplex, in dem es zur autokatalytischen Spaltung und Aktivierung der Procaspase-8 kommt. Diese wiederum aktiviert die Effektorcaspasen 3/7, was letztendlich zur Apoptose führt. Die Caspase-8 kann durch Spaltung von Bid in tBid am intrinsischen Apoptoseweg beteiligt sein. Die Proteine der Bcl-2 Familie regulieren die Apoptose durch die Membranpermeabilität der Mitochondrien. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L sind in der Lage, die Oligomerisierung von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und Bak zu verhindern. BH3-only Proteine können zur direkten Aktivierung von Bax und Bak führen, was wiederum deren Oligomerisierung bewirkt und MOMP zur Folge hat. Dadurch kommt es zur Freisetzung von Cytochrom c, welches an Apaf-1 bindet. Apaf-1 wiederum bindet mit seiner CARD-Domäne an die Procaspase-9, was zu deren Aktivierung führt. Die aktive Caspase-9 spaltet anschließend die nachgeschalteten Effektorcaspasen, was die Induktion der Apoptose zur Folge hat.

1.3 Die Entwicklung von Arzneimitteln

Von der Entdeckung bis zur Zulassung eines neuen Medikaments ist es ein langer und kostenintensiver Weg. So bedarf es jahrelanger intensiver Forschung, um aus einer Idee für ein Arzneimittel, über die Identifizierung eines vielversprechenden Wirkstoffs ein Medikament zur Zulassung zu bringen (Abbildung 3). Nachdem die potentiellen Kandidaten ausgewählt sind, muss deren Unbedenklichkeit und Wirksamkeit in Zell- und Tierversuchen, in der sogenannten präklinischen Phase, nachgewiesen werden. Waren diese Tests erfolgreich, wird das potentielle Medikament zuerst an wenigen gesunden Menschen in einer klinischen Phase I Studie getestet. In Phase II wird das Medikament anschließend an wenigen Patienten angewendet, um die optimale Dosierung in der Zielpopulation zu ermitteln. In der folgenden Phase III erfolgt die Testung des Medikaments an einer größeren Patientenkohorte. Diese Phase dient insbesondere dem Nachweis der Wirksamkeit. Verliehen diese Phasen erfolgreich, kann die Zulassung des Medikaments bei der zuständigen Zulassungsbehörde erfolgen. Nach der Zulassung schließt sich die Phase IV an, in welcher Studien zur Langzeitwirkung und Aufdeckung seltener Nebenwirkungen angefertigt werden.

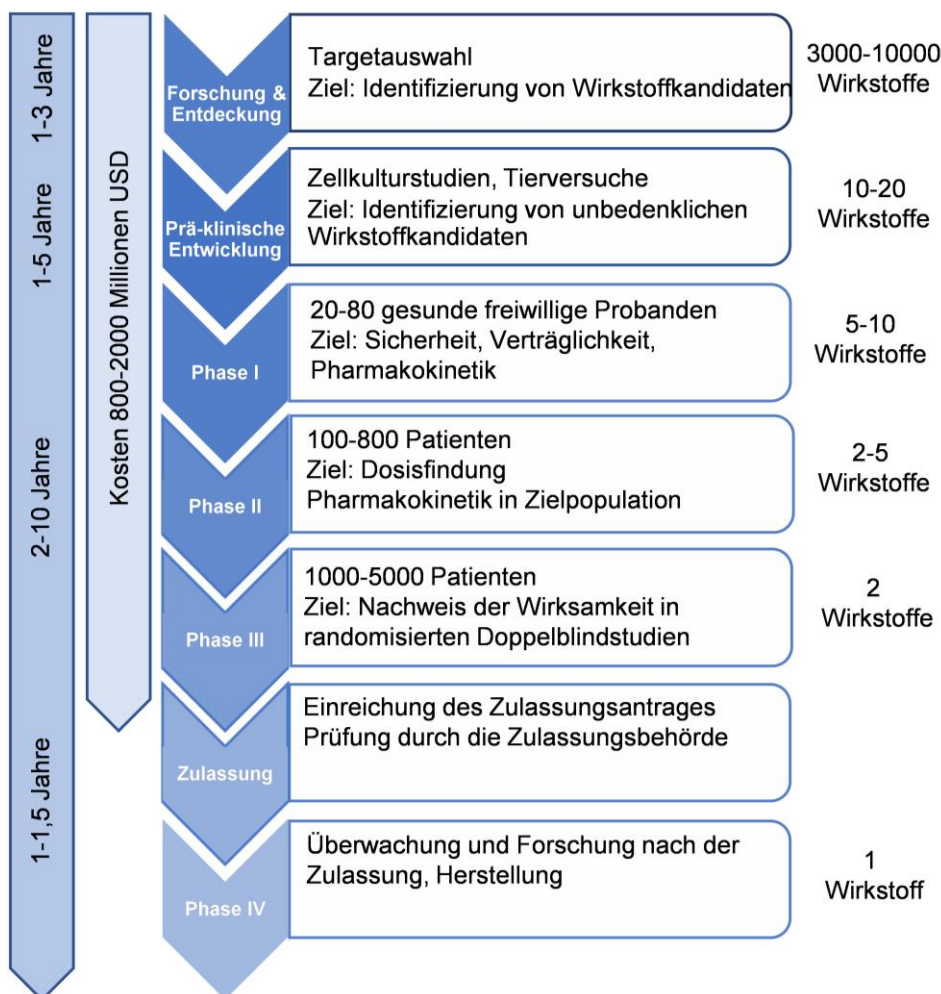


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklungsschritte bei Arzneimitteln.

1.3.1 Präklinik

Ziel der präklinischen Phase ist in erster Linie die Sicherheitsüberprüfung der ausgewählten Wirkstoffe, bevor es zur Anwendung am Menschen kommt. Die Ergebnisse der präklinischen Tests können erste Hinweise auf mögliche Nebenwirkungen liefern und es kann eine Aussage über den tolerierbaren Dosisbereich im Menschen getroffen werden. Außerdem wird durch die ermittelten Resultate die Planung der nachfolgenden klinischen Studien maßgeblich beeinflusst [55]. Die Kosten in dieser Phase, inklusive Forschung und Entwicklung, belaufen sich auf bis zu 200 - 300 Mio. Euro. Im Durchschnitt schafft es nur jedes 10. Präparat, welches die präklinische Phase erfolgreich durchlaufen hat, später tatsächlich zugelassen zu werden [56]. Die Prüfung der Wirkstoffe erfolgt zunächst an *In-vitro*-Testsystemen, wie beispielsweise Zell- oder Gewebekulturen. Dies schließt Versuche zur Pharmakodynamik (Wirkmechanismus, Affinität und Spezifität) als auch zur Toxikologie mit ein. Können in diesen Versuchen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt werden, erfolgt im nächsten Schritt die Testung an Tieren. Hierbei liegt das besondere Augenmerk auf der Ermittlung von Daten zur Pharmakokinetik. Diese umfasst die sogenannten ADMET-Parameter (Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion und Toxizität) [55,57]. Zeigt ein Wirkstoff in allen Bereichen akzeptable Ergebnisse, erfolgt die Vorbereitung auf die klinische Phase, in welcher der Wirkstoff am Menschen erprobt wird.

1.3.2 Klinische Phasen

Nachdem ein Wirkstoff die präklinische Phase erfolgreich durchlaufen hat, darf dieser Wirkstoff am Menschen getestet werden. Die klinische Prüfung eines Arzneimittels durchläuft üblicherweise vier Phasen (Klinische Phase I-IV) [57]. Die rechtlichen Vorgaben für die klinische Prüfung eines Arzneimittels sind in §§ 40 bis 42b des Arzneimittelgesetzes (AMG) geregelt [58].

1.3.2.1 Phase I

In der klinischen Phase I kommt es erstmals zur Anwendung am Menschen. Hierbei handelt es sich in der Regel um junge, gesunde Erwachsene, die sich freiwillig als Probanden zur Verfügung stellen. Die Zahl der Probanden ist mit 20 - 80 eher klein. Die Studien werden meist offen im Cross-over-Design durchgeführt. Es werden pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter im Menschen untersucht. Die Daten dienen zu einer ersten Einschätzung der Dosis-Wirkungs-Beziehung [57]. Auch unerwünschte Wirkungen werden in dieser Phase analysiert. Weniger als 20% der Arzneimittel, die eine Phase I erfolgreich durchlaufen haben, schaffen es später zugelassen zu werden [56].

1.3.2.2 Phase II

In der anschließenden Phase II wird das Arzneimittel erstmals bei Patienten eingesetzt. An diesen Studien nehmen 100 - 800 Patienten mit der entsprechenden Krankheit teil. Ziel dieser Phase ist die Prüfung von Wirksamkeit und Verträglichkeit. Weiterhin soll die optimale Dosierung gefunden werden. Die Untersuchung des Arzneimittels erfolgt offen in nicht kontrollierten oder kontrolliert randomisierten Studien im Vergleich zu einem Placebo oder einer Standardmedikation [57]. Bei positivem Abschluss der Phase II-Studien schließt sich die Phase III an.

1.3.2.3 Phase III

Die Phase III ist die entscheidende Phase der klinischen Prüfung. Ziel dieser Phase ist der biometrisch abgesicherte Nachweis von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit des neuen Arzneimittels. Damit die Ergebnisse der Phase III-Studien besonders aussagekräftig sind, erfolgt die Untersuchung an 1000 - 5000 Personen. Phase III-Studien sind meist kontrollierte randomisierte Doppelblindstudien. Da unerwünschte Neben- und Wechselwirkungen erst nach einer längeren Zeitspanne auftreten können, beträgt die Laufzeit von Phase III-Studien meist mehrere Jahre [57,59]. Durch die lange Laufzeit und die große Teilnehmerzahl sind diese Studien die aufwendigsten und teuersten. Fallen die Ergebnisse positiv aus, kann ein Zulassungsantrag bei der deutschen (Bundesinstitut für Arzneimittel), der europäischen (European Medicines Agency, EMA) oder der amerikanischen (U.S. Food and Drug Administration, FDA) Zulassungsbehörde gestellt werden. Nach der Zulassung und Markteinführung folgen die Phase IV-Studien, auch Pharmakovigilanz genannt [55]. Hier werden Daten zu seltenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen und zu anderen Risiken gesammelt. Die Zulassung eines Arzneimittels kann im Rahmen der Pharmakovigilanz widerrufen werden. In der Regel verbleiben aber 90 % der zugelassenen Arzneimittel auf dem Markt [56].

1.3.3 Drug Repositioning

Wie oben beschrieben, ist die Entwicklung von neuen Arzneimitteln für die Unternehmen der Pharmaindustrie ein langwieriger und kostenintensiver Prozess. Die Kosten sind immens und meist mit einem hohen Risiko verbunden. So blieb in den letzten Jahrzehnten die Zahl der Zulassungen pro Jahr gleich oder war sogar rückläufig. *Drug Repositioning* oder *Drug Repurposing* stellt eine Alternative zur klassischen Arzneimittelentwicklung dar. Die Strategie dieses Verfahrens beruht darauf, für bereits bekannte Wirkstoffe eine neue Anwendung zu finden [60]. Dieses Vorgehen bietet einige Vorteile gegenüber der Neuentwicklung von Arzneimitteln. Der erste und vielleicht wichtigste Vorteil ist, dass das Risiko eines Misserfolges deutlich verringert ist, da das

Arzneimittel sich als sicher in den präklinischen Studien und teilweise auch in den frühen klinischen Studien erwiesen hat [61]. Ein zweiter Vorteil ist, dass sich die Entwicklungszeit in den meisten Fällen verkürzen lässt, weil die präklinische Phase und in einigen Fällen auch die Entwicklung der Formulierung bereits abgeschlossen ist. Der dritte Vorteil ist, dass weniger Kosten entstehen, obwohl dies stark abhängig vom Entwicklungsstatus des potentiellen Wirkstoffkandidaten ist [62]. Die Kosten für die klinische Phase III bleiben mehr oder weniger dieselben, unabhängig davon, ob es sich um ein neu entwickeltes oder wiederverwendetes Medikament handelt. Allerdings können Kosten in der präklinischen und klinischen Phase I und II eingespart werden [61]. Zusammengefasst bietet *Drug Repositioning* die Möglichkeit, ein Medikament schneller bei gleichzeitig geringerem Risiko und Kostenaufwand auf den Markt zu einem Einsatz am Patienten zu bringen.

1.4 Adefovir Dipivoxil

Adefovir Dipivoxil gehört zur Gruppe der azyklischen Nucleosid-Phosphonate (ANPs). Seit der Entdeckung ihrer antiviralen Aktivität in den 1980er Jahren, sind ANPs zu einer der wichtigsten Klassen von antiviralen Nucleosid-Derivaten geworden. So sind sie aus der Behandlung von viralen Infektionen wie mit dem Hepatitis B Virus (HBV), dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder dem Cytomegalovirus (CMV) nicht mehr wegzudenken. 1978 starteten De Clercq und Holý eine Kollaboration [63]. Nach 2 Jahren gelang ihnen die Entdeckung des ersten ANPs (S)-9-(2,3-dihydroxypropyl)adenine (DHPA), eine Substanz mit breiter, aber rückblickend eher schwacher Wirksamkeit gegen eine Reihe von DNA- und RNA-Viren [64]. In den darauffolgenden Jahren synthetisierten sie eine Vielzahl weiterer ANPs, welche unter anderem modifizierte chemische Strukturen aufwiesen und deren Wirksamkeit sich teilweise stark unterschied. Eine dieser Substanzen war das Adenin-Derivat PMEA (9-[2-(phosphonomethoxy) ethyl]adenine, später Adefovir genannt), welches eine selektive Wirksamkeit gegen HIV zeigte [65]. Aufgrund der gut dokumentierten Wirksamkeit in *In-vitro*-Studien fanden die ANPs ihren Weg in die klinische Entwicklung. Diese Studien wurden zunächst von dem Pharmaunternehmen Bristol-Myers und später von Gilead durchgeführt [63]. In diesen Studien zeigte sich, dass PMEA nur eine geringe orale Bioverfügbarkeit aufwies [66]. Um die Bioverfügbarkeit und die Aufnahme in die Zelle zu verbessern, wurden Prodrug-Formulierungen durch die Kopplung an Bis-Ester-Gruppen entwickelt. Diese Formulierung wurde bis(pivaloyloxymethyl) PMEA (bis(POM) PMEA) oder später Adefovir Dipivoxil genannt [67]. Frühe klinische Studien zeigten vielversprechende Ergebnisse bei der Anwendung von Adefovir Dipivoxil an HIV-Patienten. Allerdings zeigte sich auch eine signifikante Nierentoxizität bei der Anwendung von 60 mg oder 120 mg Adefovir Dipivoxil über einen Zeitraum von 6

Monaten. Diese Dosen sind aber zur effizienten Behandlung gegen HIV notwendig [68]. Daher wurde im Dezember 1999 die Entwicklung von Adefovir Dipivoxil für die Therapie von HIV-Patienten gestoppt und die Weiterentwicklung des Medikamentes zur Anwendung bei Hepatitis B fokussiert. In diesen Patienten zeigte Adefovir Dipivoxil bereits bei einer Dosis von 10 mg eine effektive und sichere Wirkung [69,70]. So wurde Adefovir Dipivoxil 2002 für die Behandlung von Hepatitis B durch die FDA zugelassen und wird seitdem unter dem Namen Hepsera vertrieben [71].

1.4.1 Wirkmechanismus

Adefovir Dipivoxil ist fettlöslich und gelangt durch passive Diffusion in die Zellen. Im Gegensatz zu den „klassischen“ ANPs wie Acyclovir benötigt Adefovir aufgrund seiner Struktur keinen initialen Phosphorylierungsschritt zur Aktivierung durch Nucleosid-Kinasen. Einmal in der Zelle angelangt, erfolgt die Aktivierung zu Adefovir-Diphosphat in zwei Schritten durch zelluläre Adenosinmonophosphat (AMP)-Kinasen [72] (Abbildung 4). Adefovir-Diphosphat fungiert als ein Analog des natürlichen Deoxyadenosine-5'-triphosphates. Allerdings fehlt ihm der Deoxyribose-Ring, wodurch es nach Einbau in das Virusgenom zum Kettenabbruch kommt. Auf diese Art und Weise wird die DNA-Polymerase und somit die Virus-Replikation gehemmt [63]. Adefovir-Diphosphat ist auch ein Substrat für die zellulären DNA-Polymerasen α , β und γ . Allerdings ist die Affinität zu den viralen Polymerasen um ein Vielfaches höher als zu den humanen zellulären Polymerasen [73].

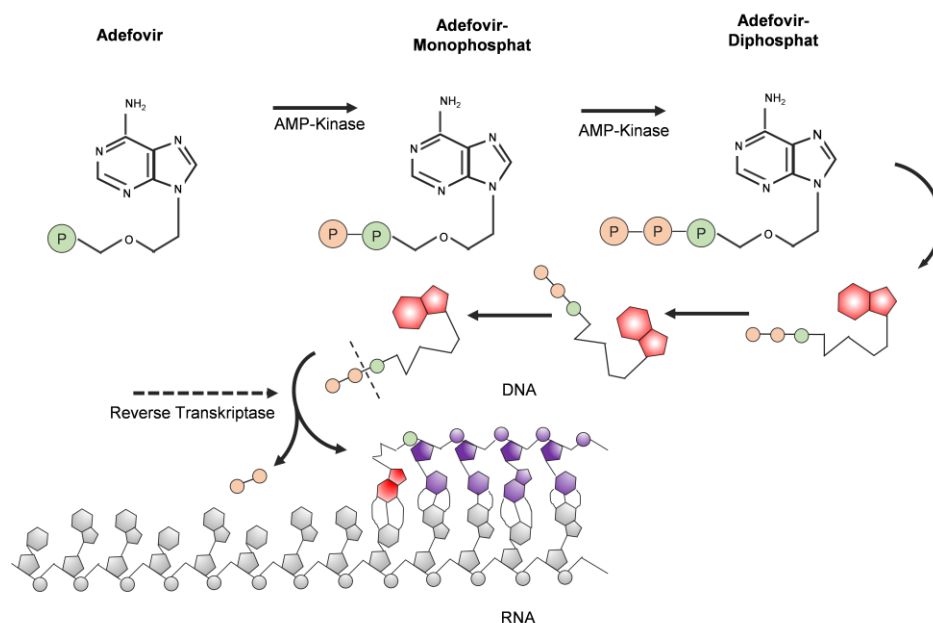


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von Adefovir. Nach Eintritt in die Zellen wird Adefovir von zellulären AMP-Kinasen durch zwei Phosphorylierungsschritte zu Adefovir-Diphosphat aktiviert. Dieser aktive Metabolit fungiert als ein Analog des natürlichen Deoxyadenosine-5'-triphosphates und bewirkt nach Einbau in die DNA durch die Reverse Transkriptase einen Kettenabbruch und hemmt somit die Virus-Replikation. Modifiziert nach [63].

1.4.2 Immunmodulatorische Wirkungen von Adefovir Dipivoxil

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass ANPs neben ihrer antiviralen auch immunmodulatorische Wirkungen besitzen. Zídek et al. untersuchten die Wirkung von Adefovir und Adefovir Dipivoxil im Modell der Adjuvanz-induzierten Arthritis bei Ratten. Sie konnten zeigen, dass beide Substanzen den Beginn der Erkrankung wesentlich verzögerten. Außerdem konnte die arthritische Schwellung der Pfoten durch Gabe von Adefovir Dipivoxil fast komplett verhindert werden [74]. In einer zweiten Studie konnten die Autoren zeigen, dass Adefovir Dipivoxil sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch bei der Adjuvanz-induzierten Arthritis wirkt und die Serumkonzentrationen des Chemokins RANTES in Ratten, welche mit Adefovir Dipivoxil behandelt wurden, signifikant erniedrigt waren [75]. Weiterhin wurde der Effekt von Adefovir und Adefovir Dipivoxil auf murine Makrophagen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Adefovir Dipivoxil konzentrationsabhängig die Produktion von NO in Makrophagen hemmt. Dieser Effekt war auf die verminderte Transkription der induzierbaren NO-Synthase zurückzuführen [76]. In einer anderen Studie wurde die Wirkung von ANPs auf die Zytokinsekretion muriner Makrophagen untersucht. So induzierten sie die Sekretion von TNF- α und IL-10, hatten aber keinen Einfluss auf die IL-2- und IFN- γ -Produktion [77]. Außerdem konnten anti-proliferative Effekte der ANPs auf mitogen-stimulierte Maus- und Ratten-Splenozyten nachgewiesen werden [78]. In diesen Experimenten zeigte Adefovir Dipivoxil einen stärkeren Effekt als Adefovir. Allerdings hatte Adefovir Dipivoxil einen negativen Einfluss auf die Zell-Viabilität. So war die Viabilität von Splenozyten und Makrophagen nach Behandlung mit Adefovir Dipivoxil für 24 h signifikant verringert [79].

1.5 Pitavastatin

Statine sind Substanzen, die ursprünglich in Pilzen entdeckt wurden. Durch die Hemmung des wichtigsten Schrittes in der Sterol-Biosynthese werden sie heute sehr erfolgreich als cholesterolsenkende Arzneimittel eingesetzt. Damit haben sie eine große Bedeutung bei der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [80]. Das erste zugelassene Statin war Mevastatin (Laborname ML-236B, auch Compactin genannt) und wurde aus dem Pilz *Penicillium citrinum* isoliert. 1976 wurde dessen lipid-senkende Wirkung von dem japanischen Forscher Akira Endō erstmalig beschrieben [81]. Seitdem wurde intensiv an der pharmazeutischen Entwicklung der Statine geforscht, sodass heute sieben verschiedene Statin-Arzneimittel auf dem Markt verfügbar sind. Diese unterscheiden sich unter anderem in ihrer Bioverfügbarkeit, ihrer Lipophilie, ihrem Metabolismus und ihren zellulären Transportmechanismen [80]. Alle Statine sind Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), welche das geschwindigkeitsbestimmende Enzym in der Cholesterol-

Biosynthese darstellt. Durch strukturelle Ähnlichkeiten zum natürlichen Substrat HMG-CoA kommt es zur kompetitiven Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, wodurch die Synthese von L-Mevalonat und somit auch von Cholesterol verhindert wird. Dies führt insbesondere in der Leber zu einer verringerten Cholesterol-Synthese. Als Folge davon erhöht sich die Expression der LDL-Rezeptoren in der Membran der Hepatozyten, was zu einer erhöhten Aufnahme von LDL-Partikeln aus dem Blut führt und somit die LDL-Konzentration im Blut senkt [82,83].

Pitavastatin, ein synthetischer HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, weist im Gegensatz zu den anderen Statinen einige pharmakologische Besonderheiten auf. Aufgrund seiner besonderen Struktur hemmt Pitavastatin die HMG-CoA-Reduktase bereits in sehr niedrigen Dosen. So inhibiert Pitavastatin (mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}): 6,8 nM) die HMG-CoA-Reduktase *in vitro* effektiver und mit höherer Affinität als Simvastatin (IC_{50} : 16 nM) oder Pravastatin (IC_{50} : 48 nM) [84]. Verglichen mit anderen Statinen ist Pitavastatin eine moderat lipophile Substanz. Die orale Absorptionsrate beträgt 80% und wird im Gegensatz zu anderen Statinen nicht durch Nahrungsaufnahme beeinträchtigt. Außerdem weist Pitavastatin eine hohe absolute Bioverfügbarkeit auf (> 60% der verabreichten Dosis) [85]. Der größte Unterschied zu anderen Statinen liegt allerdings im Metabolismus von Pitavastatin. Eine Cyclopropylgruppe des Medikaments beeinflusst die Transformation von Pitavastatin durch Leber-Enzyme. Infolgedessen wird die Substanz unverändert mit der Galle ausgeschieden und im Dünndarm reabsorbiert. Somit wird eine verlängerte Wirkdauer erreicht. Ein weiterer Vorteil der Cyclopropylgruppe ist, dass die Metabolisierung von Pitavastatin unabhängig von Cytochrom P450 3A4 (CYP3A4) verläuft [86,87]. In pharmakokinetischen Studien konnte gezeigt werden, dass der Plasmaspiegel (C_{max}) und die *area under the curve* (AUC) von Pitavastatin proportional mit der Dosis ansteigen, was auf eine lineare Pharmakokinetik hindeutet. Das pharmakokinetische Profil ändert sich auch bei der Gabe von mehreren Dosen Pitavastatin nicht. Diese Daten weisen darauf hin, dass es nicht zu einer Akkumulation des Wirkstoffs kommt [87,88]. Im Gegensatz zu anderen Statinen weist Pitavastatin weniger Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten auf. Nur mit Cyclosporin A und Erythromycin sind bisher Wechselwirkungen beschrieben. So erhöht die gleichzeitige Anwendung von Cyclosporin A und Pitavastatin die AUC von Pitavastatin um das 4,6-fache und die Anwendung mit Erythromycin um das 2,8-fache [87,89]. Durch die geringen Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten ist Pitavastatin besonders für Patienten mit Fettstoffwechselstörungen geeignet, die eine Kombinationstherapie benötigen [85].

1.5.1 Immunmodulatorische Effekte von Statinen

Wie bereits in Absatz 1.5 erwähnt, sind Statine Inhibitoren der HMG-CoA-Reduktase, dem Schlüsselenzym der Cholesterolsynthese. Dieses reduziert HMG-CoA zu L-Mevalonat. Durch eine Inhibition dieses Schrittes wird nicht nur die Cholesterolsynthese gehemmt, sondern auch die Synthese weiterer Metabolite innerhalb der Cholesterolsynthese-Kaskade. Dies betrifft auch die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese Metabolite dienen als Lipid-Anker für intrazelluläre Signal-Moleküle, wie zum Beispiel die kleinen GTPasen (Ras, Rhab, Rho und Cdc42). Diese posttranslationalen Modifikationen (Prenylierungen) sind essentiell für die Aktivierung und die Membrantranslokation dieser Proteine. Kleine GTPasen spielen eine wichtige Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation und Motilität [90,91] (Abbildung 5). Neben ihrer lipidsenkenden Wirkung weisen Statine auch eine Reihe pleiotroper Effekte auf, welche hauptsächlich auf die Inhibierung der Proteinprenylierung zurückzuführen sind (Abbildung 6). Zu diesen pleiotropen Effekten gehören immunmodulatorische und anti-inflammatorische Wirkungen [92]. Statine können auch Apoptose, die Reifung von APCs sowie die Differenzierung, Aktivierung und Polarisation von T-Lymphozyten beeinflussen [93].

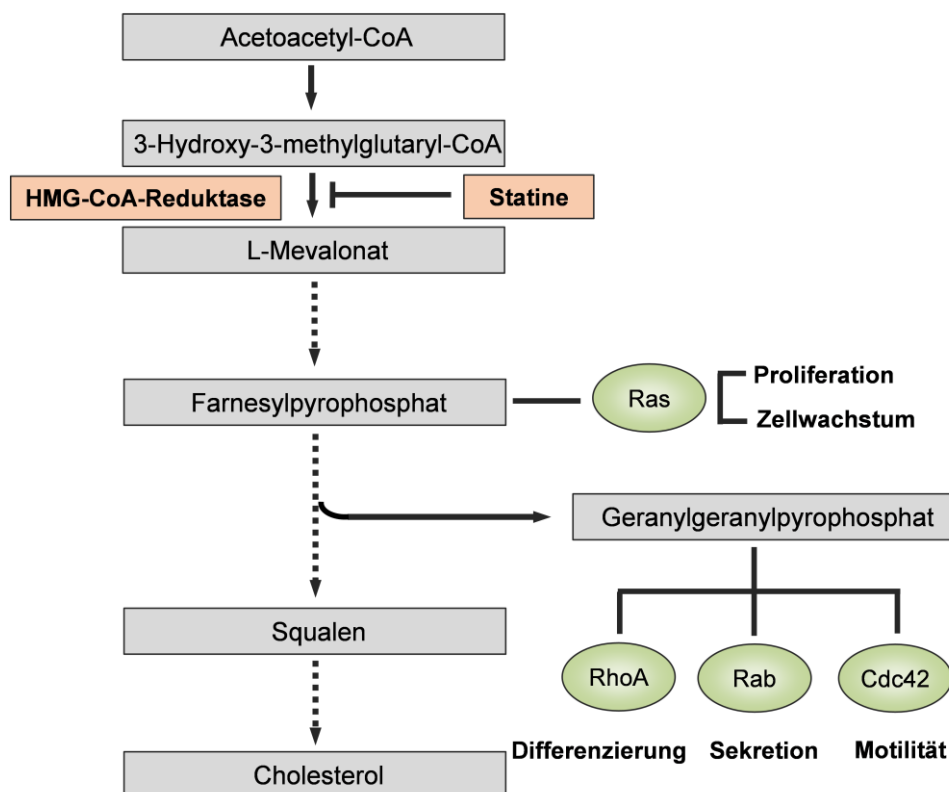


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mevalonatweges. Inhibierung der HMG-CoA-Reduktase durch Statine hemmt die Synthese von Cholesterol und Isoprenoiden.

Weiterhin haben Statine einen Einfluss auf die Expression der Matrix-Metalloproteasen (MMPs)-2 und -9 und inhibieren die Migration mononukleärer Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke [94,95]. Simvastatin reduziert die Expression des Adhäsionsmoleküls *Lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1), welches einen wichtigen Ko-Stimulator für die Migration von T-Zellen darstellt [96]. Atorvastatin und Simvastatin haben einen Einfluss auf die Th1-Zell-Migration, indem sie die CD40/CD40L-Aktivierung durch B-Zellen hemmen [97]. Außerdem verhindern Statine die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB und AP-1, und somit auch die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen [98]. Statine beeinflussen darüber hinaus die Reifung von DCs. Durch Inhibierung der IFN-γ-induzierten Expression des MHC transactivator class II (CIITA) wird die Antigenpräsentation gehemmt [99]. Statine wirken außerdem direkt oder indirekt auf Th-Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Lovastatin die Expression von *T-box expressed in T cells* (t-bet) und *Signal Transducers and Activators of Transcription 4* (STAT4) hemmt und dafür die Expression von GATA3 und STAT6 induziert, was wiederum die Polarisierung von Th2-Zellen fördert. Auch konnte ein Einfluss auf die Zytokinproduktion beobachtet werden. So wurde durch Lovastatin die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-10 und TGF-β gefördert, während gleichzeitig die Produktion von IL-2, IL-12, IFN-γ und TNF-α gehemmt wurde [100,101]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Statine die Phosphorylierung und Expression von STAT1 und STAT3 hemmen, aber die Expression von *Suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) und SOCS7 induzieren. Diese Effekte fördern die Entwicklung von Tregs und inhibieren die Differenzierung in Th17-Zellen. Simvastatin inhibiert die Sekretion von IL-17A und seines Transkriptionsfaktors *Retinoic acid-related Orphan Receptor C* (RORC) in CD4⁺ T-Zellen und hat damit einen direkten Effekt auf die Aktivierung von Th17-Zellen [102,103].

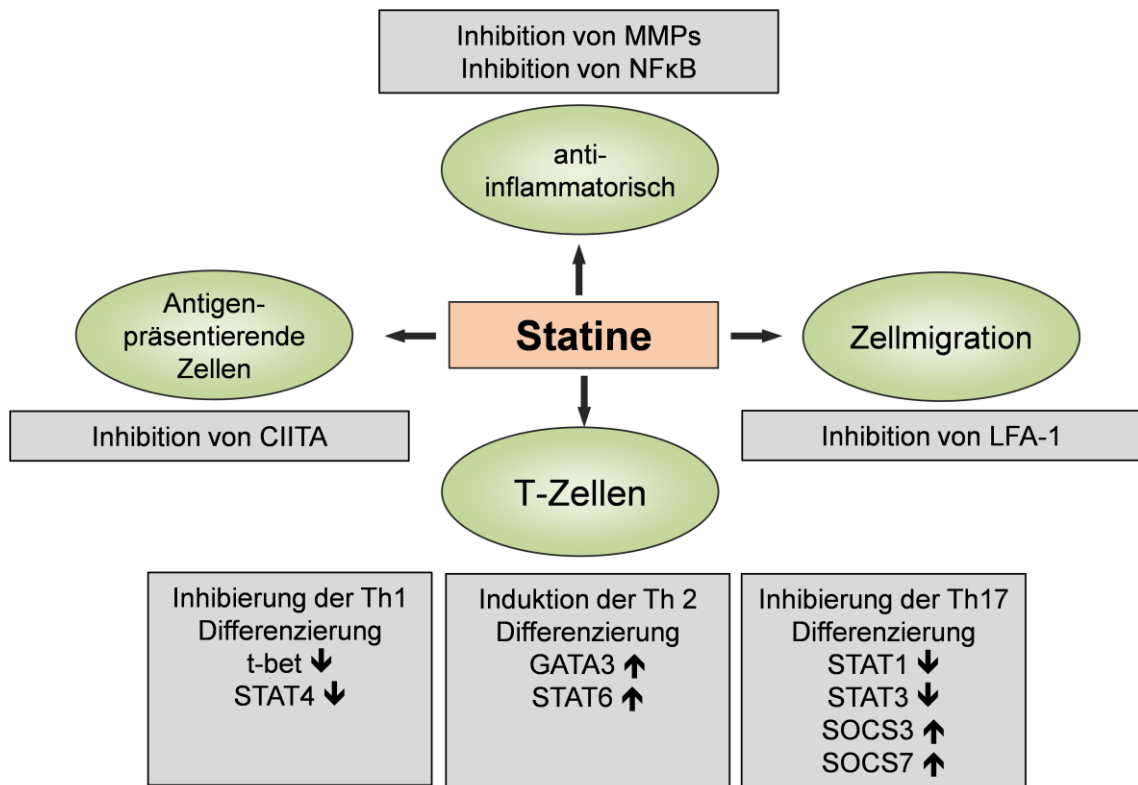


Abbildung 6: Immunmodulatorische Effekte von Statinen.

1.5.2 Statine in Autoimmunerkrankungen

Eine Reihe experimenteller und klinischer Studien beschäftigen sich mit der Wirkung von Statinen bei Autoimmunität. Sena et al. behandelten Patienten mit rezidivierender-remittierender Multipler Sklerose (MS) über 12 Monate mit 20 mg Lovastatin pro Tag. Sie konnten daraufhin einen Rückgang der Anzahl der Gadolinium-anreichernden Läsionen beobachten, der allerdings nicht signifikant war [104]. Paul et al. beobachteten in MS-Patienten, die mit 80 mg Atorvastatin pro Tag behandelt wurden, eine signifikant verringerte Anzahl der Gadolinium-anreichernden Läsionen sowie einen erhöhten IL-10-Plasmaspiegel und eine reduzierte T-Zell-Antwort [105]. Li et al. berichteten, dass in der Zerebrospinalflüssigkeit von MS-Patienten, die eine Kombinationstherapie von Atorvastatin und Methylprednisolon erhielten, signifikant erhöhte IL-10-, IL-13- und IL-35-Konzentrationen sowie reduzierte IFN- γ -Konzentrationen gemessen wurden. Die IL-10-, IL-13- und IL-35-Konzentrationen zeigten dabei eine positive Korrelation zum Expanded Disability Status Scale (EDSS), welcher den Grad der Beeinträchtigung bei MS-Patienten widerspiegelt [106]. In einer Meta-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Kombinationstherapie von Statinen mit IFN- β bei MS-Patienten das Risiko eines Schubes signifikant verringerte und eine Verbesserung des EDSS-Wertes erreicht wurde [107].

Durch ihre cholesterolsenkende und anti-inflammatorische Wirkung konnten auch positive Effekte von Statinen bei Patienten mit einem systemischen Lupus

erythematodes (SLE) beobachtet werden. So wurde eine reduzierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-17 und IL-21 in SLE-Patienten beobachtet. Diese war hauptsächlich auf die Hemmung des *Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase* (ROCK)-Signalweges zurückzuführen [108]. Darüber hinaus zeigten Statine einen positiven Effekt auf den löslichen TNF- α -Rezeptor-Typ 1 (TNFR1) und die C-reaktives Protein (CRP)-Plasmaspiegel in SLE-Patienten [109]. In einer großen Studie an der taiwanesischen Bevölkerung konnte beobachtet werden, dass bei SLE-Patienten, welche Statine einnahmen, die Mortalität und das Risiko für Herz-Kreislauf Erkrankungen verringert waren [110].

Diese Studien erbringen den Nachweis, dass die Statin-Therapie neben ihrer lipidsenkenden Wirkung noch weitere klinisch relevante Effekte hat. Möglicherweise könnten Statine aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkungen als ergänzende Therapie in immunvermittelten Erkrankungen nützlich sein.

1.6 Zielstellung der Arbeit

Die Entwicklung neuer Medikamente ist ein langwieriger und kostenintensiver Prozess, der mit einem großen Risiko behaftet ist. Eine Alternative zur klassischen Arzneimittelentwicklung stellt das *Drug Repositioning* oder *Drug Repurposing* dar. Die Strategie beruht darauf, für bereits bekannte Wirkstoffe eine neue Anwendung zu finden.

Ein wesentliches Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es deshalb, durch ein zelluläres Screening-System zur Proliferation mononukleärer Zellen (MNZ) die Wirkung von 786 zugelassenen Medikamenten zu untersuchen, um potentielle Kandidaten für eine Neuanwendung bei T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen zu identifizieren. Da prä-aktivierte autoreaktive T-Zellen wesentlich an der Immunpathogenese dieser Erkrankungen beteiligt sind, sollten potentielle Kandidaten effektiv die Proliferation sowohl frisch stimulierter als auch prä-aktiverter MNZ hemmen.

Die Untersuchung der Substanzbibliothek identifizierte Adefovir Dipivoxil und Pitavastatin als zwei derartige Substanzen, welche im Rahmen der Arbeit weiter charakterisiert werden sollten.

Dazu wurde die Wirkung von Adefovir Dipivoxil auf die Proliferation, die T-Zell-Aktivierung und die Zytokin-Produktion frisch stimulierter und prä-aktiverter T-Zellen untersucht. Aufgrund der molekularen Struktur wurde darüber hinaus abgeklärt, ob die Substanz DNA-Doppelstrangbrüche induziert und damit einhergehend p53 aktiviert. Weiter wurde die Wirkung von Adefovir Dipivoxil auf den Zellzyklus, eine mögliche Induktion von Apoptose und die damit im Zusammenhang stehenden molekularen Mechanismen betrachtet.

Parallel wurde der Einfluss von Pitavastatin auf die Proliferation, T-Zell Aktivierung und Zytokin-Produktion sowie auf den Zellzyklus und die Apoptose-Induktion frisch stimulierter und prä-aktiverter T-Zellen evaluiert. Aufgrund des Wirkmechanismus der Substanz erfolgte nachfolgend die Untersuchung der Expression von pERK1/2 und eines möglichen molekularen Zusammenhangs dieser mit der Apoptose-Induktion.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Software

Tabelle 1: Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
AKLIDES	Medipan
AutoMACS-Separator	Miltenyi Biotec
BD FACSCalibur	Becton Dickinson
BD LSRFortessa	Becton Dickinson
Blotter Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad
Cell-Harvester	Inotech
Elektrophorese-System Mini-PROTEAN®	Bio-Rad
Feinwaage	Sartorius
IncuCyte S3 Live Cell Analysis System	Sartorius
Inkubator Steri-cult 200-Incubator	Forma Scientific
Inolab pH 720 pH Messer	WTW
Multiwellreader Safire	Tecan
Odyssey Infrared Imaging System	Li-Cor Biosciences
Plattformschüttler wippend, Duomax 2030	Heidolph
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific
Stromversorgungsgerät – PowerPac 300	Bio-Rad
Thermomixer compact	Eppendorf
Wallac MicroBeta TriLux Scintillation Counter	Perkin Elmer
Zentrifuge – Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge – Centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge – Multifuge 3 S-R	Heraeus
Zentrifuge – Rotantall TR	Hettich

Tabelle 2: Verwendete Software

Software	Hersteller
AKLIDES-Nuk-Software	Medipan
CellQuest	BD Biosciences
FACSDiva	BD Biosciences
FlowJo 7.6.4	Treestar
Graph Pad Prism 7	GraphPad Software
IncuCyte S3 v2018B	Sartorius
LI-COR Image Studio	Li-Cor Biosciences
Magellan-Software	Tecan
MS Office (Word, Excel, Powerpoint) Version 2010	Microsoft

2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Merck
³ H-Thymidin	MP Biomedicals
Acrylamid (29:1; 30 % w/v)	AppliChem
AIM-V-Medium	Gibco
Ammonium Persulfat (APS, 10 %; 0,1g/ml)	Roth
Biocoll-Separationsmedium	Biochrom
Bovines Serumalbumin (BSA, Fraktion V)	AppliChem
Bromphenolblau	Roth
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Eindeckmedium mit DAPI (5 µg/ml)	Medipan
Ethanol (99% v/v)	Chemsolute
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Roth

Formaldehyd-Lösung (4,0 %)	Fischar
Glycin für Molekularbiologie	AppliChem
Heparin (5000 Units/ml)	Biochrom
Incucyte® Caspase-3/7 Green Dye	Sartorius
IncuCyte® Cytotox Red Reagent	Sartorius
Magermilchpulver	Roth
Methanol (≥ 99 %)	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem
Natriumorthovanadate (Na ₄ VO ₃)	Sigma
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PBS Dulbecco, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (1x Lösung steril)	Sigma
PBS Dulbecco, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (Pulver)	Biochrom
Pefabloc®Sc (PEFA-Block)	Roth
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Roth
Phytohämagglutinin (PHA)	Remel Europe Ltd.
PI/RNase-Färbepuffer	BD Bioscience
RPMI 1640-Medium	PAN Biotech GmbH
Salzsäure (5 M)	Zentralapotheke Universitätsklinikum Magdeburg
Sammelgelpuffer (Stacking Gel Buffer)	Bio-Rad
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva
SYTOX AADvanced dead cell stain solution	Thermo Fisher Scientific
Tertamethylethylenediamine (TEMED)	Sigma
TGS (10-fach konzentriert)	Bio-Rad
Trenngelpuffer (Resolving Gel Buffer)	Bio-Rad
Tris für Molekularbiologie	AppliChem
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich
Tween 20	Serva

Tabelle 4: Verwendete Pharmakologische Substanzen

Substanz	Hersteller
Adefovir Dipivoxil	Selleckchem
Cholesterol	Selleckchem
Cladribine	Selleckchem
Enzo's SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2	Enzo Life Sciences
Farnesyl Pyrophosphate	Biomol GmbH
Geranylgeranyl Pyrophosphate	Biomol GmbH
Mevalonolacton	Sigma-Aldrich
Pitavastatin Calcium	Selleckchem
U0126	Selleckchem

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
12-Well-Objektträger, silanisiert	Medipan
24- bzw. 48-Well-Zellkulturplatte (Flachboden, steril)	Costar
96-Well-Mikrotiterplatte (MTP; Flachboden, steril)	TPP
Bedruckte Filtermembran A	Perkin Elmer
Deckgläschen (24 x 60 mm)	Menzel
Filterpapier	Munktell
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare
Reaktionsgefäße für die Durchflusszytometrie (5 ml)	Corning
Reaktionsgefäße mit Klippverschluss - 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss - 15 ml und 50 ml	Greiner
Szintillator Meltilex A	Perkin Elmer

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kits	Hersteller
CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-8-Färbekit	ThermoFisher Scientific
CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-9-Färbekit	ThermoFisher Scientific
CellEvent™ Caspase-3/7 Grüner Durchflusszytometrie-Assay-Kit	ThermoFisher Scientific
FITC Annexin V Apoptosis Detection-Kit with PI	BioLegend
Human IFN-gamma Quantikine ELISA- Kit	R&D Systems
Human IL-10 Quantikine ELISA-Kit	R&D Systems
Human IL-17 Quantikine ELISA-Kit	R&D Systems
Human IL-5 Quantikine ELISA-Kit	R&D Systems
Pan T Cell Isolation-Kit, human	Miltenyi Biotech
Pierce™ BCA™ Protein-Assay	ThermoFisher Scientific

Tabelle 7: Antikörper

FC: Durchflusszytometrie, IF: Immunfluoreszenz, S: Stimulation, WB: Western Blot

Antikörper	Spezies/ Klon	Hersteller	Anwendung
Anti-beta-Actin	Maus (monoklonal)	Sigma	WB
Anti-human CD28	Maus Hybridomüberstände Klon: 248.23.2	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie	S
Anti-human CD3	Maus Hybridomüberstände Klon: OKT.3	Institut für Molekulare und Klinische Immunologie	S
Anti-Maus-IgG-Alexa488	Ziege (polyklonal)	Life technologies	IF, FC
Anti-Maus-IgG	Ziege	Dianova	S
Anti-p21	Kaninchen (monoklonal)	Abcam	WB

	Klon: EPR3993		
Anti-p53	Maus (monoklonal)	ThermoFisher Scientific	WB
	Klon: DO-7		
Anti-phospho-Histone H2A.X (Serin-139)	Maus (monoklonal)	Millipore	IF, FC
	Klon: JBW301		
Anti-PUMA	Kaninchen (polyklonal)	Abcam	WB
APC anti-human CD69	Maus (monoklonal)	BioLegend	FC
	Klon: FN50		
IRDye® 680LT anti-Rabbit	Ziege (polyklonal)	LiCor	WB
IRDye® 800CW anti-Mouse	Ziege (polyklonal)	LiCor	WB
P44/42 MAP Kinase	Maus (monoklonal)	Cell Signaling	WB
PE anti-human CD25	Maus (monoklonal)	BioLegend	FC
	Klon: BC96		
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling	WB
Phospho-p53 (Serin-15)	Kaninchen (polyklonal)	Cell Signaling	WB

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolation mononukleärer Zellen aus dem humanen Vollblut

Die Aufreinigung von MNZ aus humanem Vollblut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei können Zellpopulationen mit Hilfe eines Biocoll-Gradienten durch eine isopyknische Zentrifugation getrennt werden. Biocoll hat mit 1,077 g/ml eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, jedoch eine geringere als Erythrozyten und Granulozyten. Die MNZ sammeln sich nach der Zentrifugation in der Interphase zwischen dem Biocoll-Gradienten und dem Plasma an, wohingegen die Erythrozyten und Granulozyten durch das Biocoll auf den Boden des Röhrchens sinken und dort sedimentieren.

200 ml peripheres Vollblut wurde von gesunden Spenderinnen und Spendern durch Venenpunktion gewonnen. Für die Blutentnahme lag ein positives Votum der Ethikkommission der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vor (Nr. 141/19). Die Spender willigten schriftlich zur Entnahme sowie zur wissenschaftlichen Verwendung

ihres Blutes ein. Das Blut wurde zur Gerinnungshemmung im Verhältnis 2:1 mit heparinhaltigem RPMI 1640-Medium (5 U Heparin/ml) versetzt und vorsichtig auf das als Trennmedium verwendete Biocoll geschichtet. Anschließend folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 18°C, mit 490 x g, Bremse Stufe 2, um die einzelnen Blutbestandteile aufzutrennen. Die in der Interphase zwischen Trennmedium und Plasma befindliche MNZ-Fraktion wurde vorsichtig abgenommen und dreimal mit RPMI 1640-Medium gewaschen (10 min bei 500 x g). Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer Zählkammer. Die MNZ wurden entweder direkt weiterverarbeitet oder es erfolgte die weitere Isolation von T-Zellen.

2.3.2 Isolation von T-Zellen aus humanen mononukleären Zellen

Die Isolierung von T-Zellen aus MNZ erfolgte durch die negative Isolation mit der magnetischen Zelltrennung (*magnetic activated cell sorting*, MACS). Die Methode basiert auf einer Anreicherung der gewünschten Zellpopulation durch eine antikörpervermittelte Depletion der unerwünschten Zellen. Die MNZ wurden zuerst mit einem Antikörpermischung aus biotinylierten Antikörpern gegen CD14, CD15, CD16, CD19, CD34, CD36, CD56, CD123 und CD235a (Glycophorin A) inkubiert. Dabei binden die Antikörper an die jeweiligen Epitope auf den zu depletierenden Zellen. Danach wird die Zellsuspension mit Streptavidin gekoppelten Magnetpartikeln inkubiert, welche an die biotinylierten Antikörper binden. Anschließend folgte die Separation über eine Säule mit einem starken permanenten Magnetfeld, an der die Antikörper-Magnetpartikel-markierten Zellen haften blieben, wohingegen alle nicht markierten Zellen die Säule durchliefen.

Zur Separation wurde das „Pan T Cell Isolation Kit II“ verwendet. Frisch isolierte MNZ wurden in eiskaltem MACS-Puffer gewaschen und das Pellet anschließend in MACS-Puffer resuspendiert (100 Millionen Zellen/400 µl). Danach wurden die Zellen für 5 min bei 4°C mit 50 µl pro 100 Mio. MNZ biotinylierter Antikörper inkubiert. Es folgte die Zugabe von MACS-Puffer und 90 µl pro 100 Mio. MNZ anti-Biotin-Mikrobeads und eine weitere 10-minütige Inkubation bei 4°C. Die Separation erfolgte am autoMACS. Die isolierten Pan-T-Zellen wurden in AIM-V-Medium aufgenommen und die entsprechenden Zellzahlen mittels Neubauer Zählkammer bestimmt.

MACS- Puffer: PBS + 0.5% BSA

2.3.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden zunächst 10 µl einer 1:10 verdünnten Einzelzellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung versetzt, um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können. Der Farbstoff gelangt über die defekte Zellmembran toter Zellen ins Zytoplasma und färbt dieses dunkelblau. Nach sorgfältigem Resuspendieren

wurde die gefärbte Zellsuspension auf die Neubauer Zählkammer überführt und die Anzahl vitaler Zellen von 4 Großquadraten mithilfe des Inversmikroskops bestimmt. Die Bestimmung der Lebendzellzahl/ml erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{ermittelte Anzahl lebender Zellen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4}{4}$$

2.3.4 MNZ Screening Assay

Für das Screening nach Substanzen, die die Proliferation von frisch stimulierten sowie prä-aktivierten MNZ hemmen, wurde die Enzo's SCREEN-WELL® FDA approved drug library V2 verwendet. Diese Bibliothek enthielt 786 Substanzen, die in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst waren.

Im ersten Schritt des Screenings wurden MNZ (1×10^5 Zellen/Vertiefung) in 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät, mit Phytohämagglutinin (PHA, 1 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen (0,1; 1; 10 μM) inkubiert. Die Proliferation wurde mittels des [^3H] -Thymidin-Zellproliferationsassays bestimmt (siehe 2.3.6).

Im zweiten Schritt des Screenings wurden die initialen Treffer zusätzlich auf ihre Wirkung an prä-aktivierten MNZ getestet. Dafür wurden frisch isolierte MNZ mit PHA prä-stimuliert. Nach 48 h wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen zugegeben (0,1; 1; 10 μM). Danach folgte eine weitere Inkubation von 24 h. Die Proliferation wurde dann mittels des [^3H] -Thymidin-Zellproliferationsassays bestimmt.

2.3.5 Behandlung von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen mit pharmakologischen Substanzen

Frisch isolierte T-Zellen wurden in AIM-V Medium resuspendiert und je nach Untersuchung und benötigter Zellzahl in 96-, 48- bzw. 24-Well-Zellkulturplatten, welche mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichtet waren, ausgesät. Für Versuche an frisch stimulierten T-Zellen folgte sofort die Zugabe der zu untersuchenden pharmakologischen Substanzen in den angegebenen Konzentrationen. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C im CO₂-Inkubator. Für Untersuchungen an prä-aktivierten T-Zellen wurden die Zellen zunächst für 48 h mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert. Die Zugabe der pharmakologischen Substanzen erfolgte erst nach dieser 48-stündigen Stimulationsperiode. Danach wurden die Zellen für weitere 24 h bei 37°C im CO₂-Inkubator inkubiert und standen dann für nachfolgende Untersuchungen bereit.

2.3.6 [³H] -Thymidin-Zellproliferationsassay

Zur Bestimmung der DNA-Synthese wurden 1×10^5 Zellen pro 100 μl in anti-CD3/CD28-beschichtete 96-Well-Zellkulturplatten pipettiert und für 72 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Markierung der DNA-synthetisierenden Zellen mit dem radioaktiv markierten Nukleosid [³H] -Thymidin (dT), indem 20 μl [³H] -Thymidin (0,2 μCi) in jedes Well gegeben wurden. Danach folgte eine Inkubationszeit von 6 h bei 37°C, in der das [³H] -Thymidin von den Zellen in die DNA eingebaut wurde. Die Zell-DNA wurde mit einem Cell-Harvester auf Glasfiltermatten überführt und diese in einer Mikrowelle mit Szintillatorwachs beschichtet. Danach wurde der Filter im Wallac MicroBeta Scintillation Counter analysiert und der radioaktive Zerfall pro Minute (engl. counts per minute, cpm) als Maß für das eingebaute [³H] -Thymidin und die Zellproliferation ermittelt.

2.3.7 Apoptose-Messung mittels IncuCyte S3

Zur Analyse der Zellviabilität und Apoptose wurde das Lebend-Zell-Analyse-System IncuCyte S3 verwendet. Mit Hilfe dieses Analyse-Systems ist es möglich, kinetische Messungen an lebenden Zellen durchzuführen, indem automatisch generierte mikroskopische Aufnahmen hinsichtlich zuvor festgelegter Parameter untersucht wurden. Durch Kombination des roten und grünen Fluoreszenzkanals sowie des Phasenkontrasts ist es möglich, biologische Prozesse auf zellulärer Ebene in Echtzeit direkt im Inkubator zu erfassen und gleichzeitig zu analysieren. Zur Detektion der Apoptose und der Zellviabilität wurden zwei Farbstoffe verwendet: das *IncuCyte™ Caspase 3/7 green reagent*, welches aktive Caspase-3 und Caspase-7 detektiert und *IncuCyte™ Cytotox red reagent* welches als Indikator für die Nekrose dient.

Die Zellen (3×10^4 Zellen/Well) wurden in eine 96-Well-Platte gesät und mit den entsprechenden Substanzen inkubiert. Danach wurden das *IncuCyte™ Caspase 3/7 green reagent* in einer Konzentration von 1,6 μM und *IncuCyte™ Cytotox red reagent* in einer Konzentration von 250 nM zugefügt und die Platten im IncuCyte platziert. Es wurden alle drei Stunden mikroskopische Aufnahmen der einzelnen Wells aufgenommen und anschließend mit der Software ausgewertet. Die Bilder wurden bezüglich der Anzahl grüner Objekte (Caspase-3/7-positive Zellen) und roter Objekte (Cytotox-positive Zellen) pro Well analysiert.

2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie kennzeichnet eine Methode zur Analyse der physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in Suspension. Bei der Messung werden fluoreszenzmarkierte Zellen zunächst durch einen coaxialen Hüllstrom fokussiert (Hydrodynamische Fokussierung) und anschließend einzeln in einer Messzelle an drei Lasern vorbeigeführt. Dabei absorbieren die Antikörper-gekoppelten Fluorochrome die

Energie des Laserlichts und setzen diese in Form von Fluoreszenzlicht wieder frei, welches von Photodetektoren registriert wird. Neben der Fluoreszenz wird auch die Intensität des Streulichts durch Detektoren erfasst. Das Vorwärtsstreulicht („forward scatter“, FSC) charakterisiert dabei die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt von der Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht hingegen („side scatter“, SSC) charakterisiert die Brechung des Lichts im rechten Winkel und wird von der Granularität sowie den Membraneigenschaften der Zellen beeinflusst. Mithilfe spezifischer Fluoreszenzmarker können Informationen über z. B. die Zellmembran, einzelne Zellorganellen, DNA, oder einzelne Proteine gesammelt werden. Dadurch ist es möglich, zelluläre Parameter wie die Proliferation, die Viabilität, Membranpotentiale, Zellzyklusverteilungen oder Zelltodmechanismen zu analysieren.

2.4.1 Antikörper-Markierung von Oberflächenproteinen

Zur Analyse von Aktivierungsmarkern mittels Durchflusszytometrie wurden je 1×10^6 T-Zellen in Rundbodengefäße überführt. Nach dem Zentrifugieren ($300 \times g$, 5 min) wurden die Zellen in 500 μ l PBS gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Zur Markierung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen anschließend mit den verschiedenen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern in entsprechender Verdünnung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis unter Lichtausschluss wurden die Zellen mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen und in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend folgte die Messung der Proben am LSR Fortessa.

FACS-Puffer: PBS w/o Ca^{2+}
 2 mM EDTA

2.4.2 Bestimmung der Apoptose mittels AnnexinV/Propidiumiodid-Färbung

Die Bestimmung der Apoptose erfolgte mittels AnnexinV/ Propidiumiodid (PI)-Färbung. Diese Methode macht sich zu Nutze, dass im frühen Stadium der Apoptose die asymmetrische Phospholipidverteilung der Zellmembran verloren geht. Dadurch verlagert sich das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) von der Membraninnenseite zur Membranaußenseite [44]. Annexin V bindet in Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen spezifisch an das exponierte PS. Die gleichzeitige Färbung mit einem DNA-Farbstoff wie PI ermöglicht eine zusätzliche Unterscheidung von früh- und spät-apoptotischen Zellen. Bei nekrotischen oder spät-apoptotischen Zellen tritt ein Verlust der Membranintegrität auf, wodurch PI in den Zellkern gelangt und dort die DNA anfärbt. Diese Zellen erscheinen bei der durchflusszytometrischen Analyse positiv für Annexin V und PI, wohingegen frühapoptotische Zellen nur Annexin V positiv sind.

Zur Analyse der Apoptose wurden die Zellen in Rundbodengefäße überführt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 1x Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert. Danach wurden die Zellen ($0,5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$) für 15 min im Dunkeln mit 2,5 μl Annexin V-FITC und 2,5 μl PI inkubiert. Zum Schluss wurden zu jeder Probe 200 μl des 1x Annexin-V-Bindungspuffers gegeben und die Proben am LSR Fortessa gemessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der FlowJo-Software.

2.4.3 Bestimmung der aktiven Caspasen-8 und -9 mittels Durchflusszytometrie

In Säugetierzellen existieren zwei Apoptosesignalwege, welche sehr gut beschrieben sind. Der extrinsische Signalweg, welcher durch extrazelluläre Signale rezeptorvermittelt induziert wird und der intrinsische Signalweg, bei dem die Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen. Durch die Aktivierung bestimmter Caspasen lassen sich Rückschlüsse auf die beteiligten Apoptosewege ziehen [111]. Zur Bestimmung der aktiven Caspase-8 und -9 wurden das CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-8 Staining-Kit und das CaspGLOW Fluorescein Active Caspase-9 Staining-Kit verwendet. Die Markierung der Zellen erfolgt mittels Fluoreszenz-markierter Caspase-Inhibitoren, die irreversibel an die aktivierte Caspase binden. Durch eine zusätzliche Fluoromethylketon-Gruppe (FMK) erfolgt die Bindung der Inhibitoren kovalent an das Zentrum der Caspase, was zu deren irreversiblen Hemmung führt.

Die Zellen wurden in Rundbodengefäße überführt und einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 200 μl 1:500 verdünntem FITC-IETD-FMK (Caspase-8-Inhibitor) oder FITC-LEHD-FMK (Caspase-9-Inhibitor) in PBS bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen zweimal mit 300 μl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200 μl Waschpuffer resuspendiert und am FACS Calibur analysiert.

2.4.4 Bestimmung der aktiven Caspasen-3/7 mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung der Apoptose wurden die aktiven Caspasen-3 und -7 bestimmt. Die Caspasen-3 und -7 gehören zu den Effektor-Caspasen, die nach Aktivierung andere zelluläre Proteine der Apoptose spalten und somit die Apoptose vermitteln. Die Messung erfolgte mit dem CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit. Das membran-durchgängige Substrat wird von den aktiven Caspasen-3 oder -7 gespalten, wodurch ein Farbstoff an die DNA binden kann und somit ein grünes Fluoreszenzsignal erzeugt.

Die Zellen wurden in Rundbodengefäße überführt und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit 500 nM CellEvent™ Caspase-3/7 green

Detektionsreagenz in PBS für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach folgte die Messung der Proben am FACS Calibur.

2.4.5 Zellzyklus Analyse

Zur Bestimmung der Zellzyklusphasen wurde der DNA-interkalierende Farbstoff PI verwendet. Durch Bestimmung des DNA-Gehalts lässt sich eine Aussage über die Zellzyklusphase treffen, in der sich die untersuchten Zellen jeweils befinden. In der G₀/G₁-Phase bestehen die Chromosomen der Zelle aus einem Chromatid, es ist also nur ein einfacher DNA-Satz vorhanden. Dies spiegelt sich auch in einer geringen Signalintensität für PI wider. In der folgenden S-Phase wird die DNA repliziert, wodurch der DNA-Gehalt und infolgedessen auch die Fluoreszenzintensität von PI ansteigt. In der G₂/M-Phase liegt die vollständig replizierte DNA in doppelter Form vor, weshalb hier die Signalintensität am höchsten ist.

2 x 10⁶ T-Zellen wurden in Rundbodengefäße überführt und für 5 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit PBS/ 1% BSA gewaschen und erneut zentrifugiert. Es folgte die Fixierung der Zellen mit 1 ml 70 %igem eiskalten Ethanol für 2 h bei -20°C. Im Anschluss wurden eine 10-minütige Zentrifugation bei 200 x g und zwei weitere Waschschriffe mit PBS/ 1% BSA durchgeführt. Danach folgte die Färbung der Zellen mit 1 µg/ml PI/RNase-Färbelösung für 15 min. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Calibur. Zur Quantifizierung der verschiedenen Zellzyklusphasen wurde das Dean-Jett-Fox Model der FlowJow Software genutzt.

2.4.6 Durchflusszytometrische γH2AX-Detektion

Ein sensitiver Biomarker für die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) ist die Phosphorylierung des Histons H2AX an Serin 139 (γH2AX), welches über entsprechende Antikörper immunzytochemisch nachweisbar ist [112,113].

Für die durchflusszytometrische γH2AX-Analyse wurden 1 x 10⁶ T-Zellen in Rundbodengefäße überführt und einmal mit PBS gewaschen. Es folgte die erste Fixierung für 20 min mit 2%igem Paraformaldehyd (PFA). Nach einem Waschschriff mit PBS/0,5% BSA schloss sich eine zweite Fixierung in 70%igem Ethanol für 20 min, gefolgt von zwei weiteren Waschschriffen mit PBS an. Nach Abschluss der Fixierung wurden die Zellen mit 0,2% Triton-X-100, verdünnt in Blockierungspuffer, für 5 min auf Eis permeabilisiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit Blockierungspuffer gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten γH2AX-Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Blockierungspuffer gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (1:500 in Blockierungspuffer) für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit Waschpuffer

folgte eine 15-minütige Inkubation mit 200 µl PI/RNase-Färbelösung. Die Messung der Proben erfolgte am LSR Fortessa.

Waschpuffer: PBS
 0,5% BSA

Blockierungspuffer: PBS
 1% BSA

2.4.7 Markierung von T-Zellen mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE)

Carboxyfluorescein-Diacetate Succinimidylester (CFDA-SE) ist eine membrangängige, nicht fluoreszierende Verbindung, die durch unspezifische intrazelluläre Esterasen in den fluoreszierenden Farbstoff Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) umgewandelt wird. Dieser bindet an freie Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine. Bei jeder Zellteilung wird die intrazelluläre Konzentration von CFSE halbiert. Anhand der Fluoreszenzintensität kann somit die Proliferation von Zellen analysiert werden.

Zur Markierung der Zellen wurde das Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml PBS/5% FCS resuspendiert und anschließend mit 5 µM CFSE versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min im Dunkeln wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml PBS/5% FCS gestoppt. Um das überschüssige CFSE zu entfernen, wurden die Zellen nochmals mit 10 ml PBS/5% gewaschen. Anschließend wurden die CFSE-markierten T-Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in AIM-V Medium resuspendiert, in mit anti-CD3/CD28-Antikörpern beschichteten 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für 96 h inkubiert. Danach wurden die Zellen in Rundbodengefäße überführt und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Um tote Zellen auszuschließen, folgte die Färbung mit 1 µl SYTOX AADvanced dead cell stain solution für 5 min. Die Messung der Proben erfolgte am LSR Fortessa.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Herstellung von Proteinlysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen für zwei Minuten bei 3300 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach folgten ein Waschschrift mit kaltem PBS und eine erneute zweiminütige Zentrifugation. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit RIPA-Lysepuffer inkubiert und nachfolgend 10 Minuten bei 16000 x g

zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand für weitere Untersuchungen verwendet.

Alternativ wurden die Zellen mit 1x Probenpuffer lysiert und mehrmals durch eine Kanüle von 0,55 mm Durchmesser geschert, bis die Konsistenz flüssig war. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurden die Lysate für 5 min auf 99°C erhitzt und anschließend bei -20°C gelagert.

RIPA Lysepuffer:

- 150 mM NaCl
- 1% Triton X-100
- 50 mM Tris, pH 8,0
- 0,5% Na Deoxycholat
- 0,1% SDS
- 1 mM Na-Orthovanadate
- 1 mM PMSF
- 10 µg/ml PEFA-Block

5 x Probenpuffer:

- 50% (w/v) Glycerol
- 100 mM Tris, pH 6,8
- 5% SDS
- 1% (w/v) Bromophenolblau
- 10% (v/v) 2-mercaptoethanol

2.5.2 Proteingehaltbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde die BCA (Bicinchinonsäure)-Methode genutzt. Hierbei reduzieren Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen (Biuret-Reaktion), die dann mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Dafür wurden 50 Teile BCA-Reagenz mit einem Teil 4% CuSO_4 gemischt. 25 µl der 1:25 verdünnten Proben wurden mit 200 µl BCA-Reaktionsgemisch für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm in einem Multiwell Counter gemessen. Eine entsprechende Standardkurve mit BSA (0, 5, 25, 50, 125, 250 µg/ml) wurde jeweils mitgemessen.

2.5.3 Western Blot

2.5.3.1 SDS-PAGE

Die analytische Auftrennung von Proteinen erfolgte als denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Ein Gelnetz aus polymerisiertem Acrylsäureamid und dem quervernetzenden Bisacrylsäureamid dient

hierbei der Auftrennung. Zur Initiation der Polymerisation werden als Radikalbildner Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. Ein großporiges Sammelgel oberhalb der eigentlichen Trennmatrix hilft bei der Konzentrierung des Proteingemisches zu einer Laufmittelfront.

Zelllysate, die mit 5-fachem Propenpuffer gemischt und bei 99°C für 5 min erhitzt worden waren, wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden hierbei entsprechend ihres spezifischen Molekulargewichtes auf 10 - 15%igen Polyacrylamid-Gelen (siehe Tabelle 8) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde in 1x Laufpuffer bei 130 V durchgeführt. Bei jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard mitgeführt.

Tabelle 8: Pipettierschema für die verwendeten Polyacrylamid-Gele.

	Sammelgel	Trenngel (10%)	Trenngel (15%)
Wasser	5,15 ml	3,75 ml	3,38 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,1 ml	-	-
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	-	2,25 ml	3,38 ml
30% Acrylamid 29:1	1,13ml	3 ml	4,5 ml
10% APS	60 µl	60 µl	90 µl
TEMED	17,5 µl	12,5 µl	18,8 µl

1 x Laufpuffer: 25 mM Tris
0,1 % SDS
192 mM Glycin

2.5.3.2 Western Blotting

Beim Western-Blotting werden die durch eine SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran überführt. Hierbei wurde das „semi dry“ Blottingverfahren angewendet. Dabei wird nur ein geringes Volumen an Transferpuffer benötigt, indem alle verwendeten Materialien in dem Puffer getränkt werden. Das Blot-Sandwich wurde wie folgt auf der Anode der Blot-Apparatur zusammengesetzt:

- Filterpapier (3 Lagen)
- Nitrozellulose-Membran
- SDS – Polyacrylamidgel
- Filterpapier (3 Lagen)

Der Transfer erfolgte bei 0,14 A über 60 min. Im Anschluss an den Blot wurde die Nitrozellulosemembran 5 min mit 1x TBS/Tween gewaschen und die noch freien

Proteinbindungsstellen auf der Membran mindestens 1 h in 5 % fettfreiem Milchpulver in TBS/Tween blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder 2 h bei Raumtemperatur in TBS/Tween mit 5 % BSA mit einem spezifischen Antikörper versetzt, der an das Ziel-Protein bindet. Nach erneutem Waschen mit TBS/Tween erfolgte die Inkubation mit dem sekundären IRDye-markierten Antikörper 1:10000 in Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde die Membran mindestens dreimal gewaschen und die Proteinbanden mittels Odyssey Infrared Imaging System bei 680 nm bzw. 800 nm visualisiert. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mit der Software LI-COR Image Studio über die Quantifizierung der Bandenintensität.

Transferpuffer: 39 mM Glycin
 48 mM Tris
 0,037% (w/v) SDS
 20% (v/v) Methanol

TBS/Tween: 50 mM Tris (pH 7,4)
 150 mM NaCl
 0,01 % Tween 20

2.5.4 Immunzytochemische Färbung von γ H2AX-Foci

Durch eine immunzytochemische Färbung können spezifisch ausgewählte Proteine durch Antikörper sichtbar gemacht werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet zunächst ein proteinspezifischer Erstantikörper, an den anschließend ein fluorophor-gekoppelter Zweitantikörper bindet. Durch die Anregung des Fluorophors in einem Fluoreszenzmikroskop mit einer definierten Wellenlänge kann das Protein „indirekt“ detektiert werden.

Dazu wurden ruhende T-Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, einmal mit PBS gewaschen, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in PBS resuspendiert. Davon wurden 25 μ l der Zellsuspension pro Auftragsfläche auf einen silanisierten Glasobjektträger pipettiert und die Zellen 10 min sedimentieren gelassen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 15 min mit einer 2%igen Formaldehyd (FA)-Lösung. Zur Entfernung des Fixans wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Permeabilisierung der Zellmembran für 5 Minuten mit 0,2% Triton X-100 verdünnt in PBS/1% BSA auf Eis inkubiert. Es folgten drei 10-minütige Waschschrte in PBS/1% BSA. Die Inkubation des 1:1000 verdünnten γ H2AX-Primärantikörpers erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS/1% BSA wurden die Zellen mit dem 1:2000 verdünnten Sekundärantikörper für 60 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte das Einbetten der Objektträger in DAPI-haltigem Eindeckmedium. Für die automatisierte γ H2AX-Analyse der Objektträger wurde die digitale Mikroskopieplattform AKLIDES genutzt.

2.5.5 Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Die quantitative Bestimmung der IFN- γ -, IL-5-, IL-10 und IL-17-Konzentrationen in Zellkulturüberständen erfolgte mittels kommerzieller Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Kits nach entsprechenden Herstellervorgaben. Diese Methode beruht auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA-Verfahrens. Hierbei erfolgt die Bindung des Antigens zunächst mit Hilfe eines an eine feste Phase gebundenen Fangantikörpers und anschließend die Detektion mit einem zweiten Enzym-gekoppelten Antikörper. Anhand der Intensität der Farbreaktion, die durch Umsetzung eines Substrates durch das gekoppelte Enzym hervorgerufen wird, kann die Menge des eingesetzten Antigens durch Vergleich mit einem mitgeführten Antigenstandard ermittelt werden.

Die Zellkulturüberstände und Standards wurden in 96-well Mikrotiterplatten, welche mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen die jeweiligen Zytokine beschichtet waren, pipettiert. Während einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur folgte die Antigenbindung an den jeweiligen immobilisierten Antikörper. Es folgten drei Waschschritte, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen. Danach wurde ein spezifischer Enzym-gekoppelter Antikörper zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach anschließenden Waschschritten wurde die Substratlösung zugegeben. Die ausgelöste Farbreaktion war in ihrer Stärke direkt proportional zur eingesetzten Zytokinkonzentration. Die Messung der Extinktionen nach abgestoppter Farbreaktion erfolgte bei 450 und 570 nm in einem Multiwellreader. Anschließend wurde die Zytokinkonzentration der Proben über entsprechend mitgeführte Standardkurven mit Hilfe der Magellan-Software berechnet.

2.6 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und der Statistik- und Graphik-Software Graph Pad Prism 7.0. Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen erfolgte als Varianzanalyse für Messwertwiederholungen (engl. repeated measures ANOVA) und anschließendem Post-hoc-Tests nach Dunnett. Dargestellt werden die gemessenen Daten als arithmetischer Mittelwert plus Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Als statistisch signifikant galten Werte von $p \leq 0,05$. Signifikanzen sind in den Darstellungen wie folgt gekennzeichnet: **** $P \leq 0,0001$, *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $P \leq 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1 Screening einer Bibliothek FDA-zugelassener Medikamente auf Inhibitoren der Proliferation von frisch stimulierten und prä-aktivierten MNZ

Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben, sind T-Zellen maßgeblich an der Pathogenese einiger Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I oder MS beteiligt. Eine besondere Rolle spielen dabei bereits aktivierte, autoreaktive T-Zellen [114]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass einige der etablierten Immunsuppressiva, wie Cyclosporin A und Dexamethason, *in vitro* keinen Einfluss auf die Proliferation derartiger prä-aktivierter T-Zellen ausüben [115]. Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, Substanzen bzw. Medikamente zu finden, welche nicht nur die Aktivierung und Proliferation naiver T-Zellen unterdrücken können, sondern auch eine immunsuppressive Wirkung auf bereits aktivierte T-Zellen haben. Eine derartige besondere „zweifache immunsuppressive Wirkung“ von Medikamenten könnte zur Entwicklung verbesserter Therapieformen für T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktionen beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte ein Screening von 786 bereits zugelassenen Medikamenten, um potentielle Kandidaten zu identifizieren, die in T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen eine Neuanwendung finden könnten. Diese sollten dazu zwei Kriterien erfüllen: sie sollten sowohl die Proliferation frisch stimulierter als auch die prä-aktivierter MNZ hemmen. Dafür wurde ein einfaches Screening-System entwickelt und verwendet. Im ersten Schritt wurde nach Substanzen gesucht, welche die Proliferation von frisch stimulierten MNZ inhibieren. In einem zweiten Schritt wurden diese Substanzen dann bezüglich ihrer Wirkung auf die Proliferation prä-aktivierter MNZ getestet.

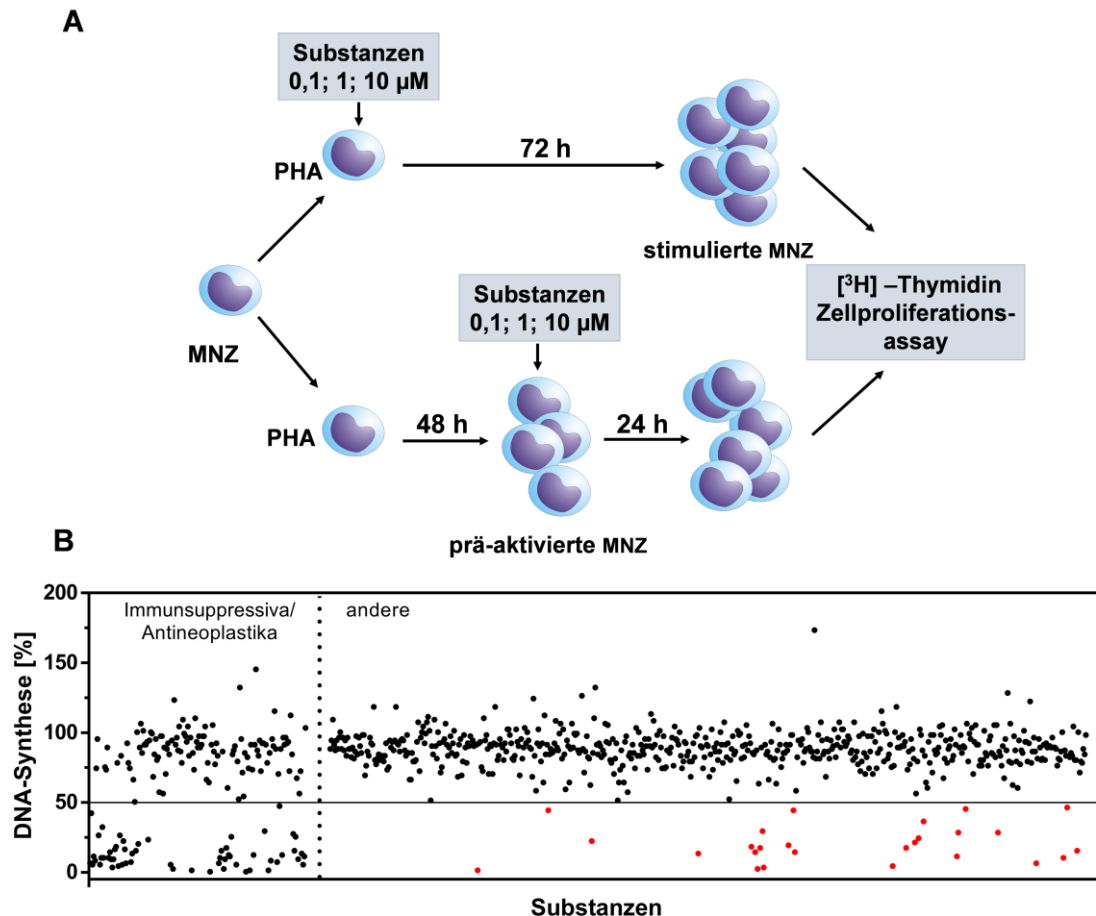


Abbildung 7: Screening einer Bibliothek FDA-zugelassener Medikamente. (A) Schematische Darstellung der zwei Screening-Schritte. (B) Dargestellt sind die Ergebnisse aller 786 untersuchten Substanzen bei einer Konzentration von 1 μM nach 72 h Inkubationszeit. In rot sind die Substanzen dargestellt, welche die DNA-Synthese von frisch stimulierten MNZ $>50\%$ hemmen (horizontale Linie), aber weder als immunsuppressive noch als antineoplastische Medikamente klassifiziert sind.

Für den ersten Screening-Schritt wurden frisch isolierte MNZ gesunder Spender mit PHA stimuliert in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen (0,1; 1; 10 μM) der einzelnen Substanzen für 72 h inkubiert. Die DNA-Synthese als Maß der Zell-Proliferation wurde mit Hilfe des [^3H] -Thymidin-Zellproliferationsassays quantifiziert (Abbildung 7A). Dabei wurden 85 Substanzen identifiziert, welche bei einer Konzentration von 1 μM die Proliferation von frisch stimulierten MNZ zu mindestens 50 % inhibierten. Von diesen 85 Substanzen waren 59 bereits als immunsuppressive oder anti-neoplastische Medikamente zugelassen (Abbildung 7B). Deshalb wurden diese von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Im zweiten Schritt des Screenings wurde die Wirkung der verbliebenen 26 Substanzen auf die Proliferation prä-aktivierter MNZ getestet. Dafür wurden frisch isolierte MNZ zunächst in Abwesenheit der Substanzen mit PHA stimuliert. Nach 48 h Vorstimulation wurden die Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (0,1; 1; 10 μM) zur T-Zell-Kultur gegeben und nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h die Proliferation mittels

3. Ergebnisse

des [³H] -Thymidin-Zellproliferationsassays bestimmt (Abbildung 8). Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurden 10 Substanzen gefunden, welche sowohl die Proliferation frisch stimulierter MNZ als auch die prä-aktivierter MNZ bei einer Konzentration von 1 µM um mindestens um 50 % hemmen. Diese Substanzen waren: Dipyridamol, Pitavastatin, Adefovir Dipivoxil, Colchicin, Mebendazol, Digoxin, Nicotin, Adapalen, Albendazol und Itraconazol.

Um die Ergebnisse des Screenings zu bestätigen, wurden im Folgenden weitere Dosis-Wirkungs-Studien an frisch stimulierten und prä-aktivierten MNZ durchgeführt. Dafür wurden humane MNZ mit PHA stimuliert und mit steigenden Konzentrationen der Substanzen (0 - 1000 nM) für 72 h inkubiert. Die etablierten Immunsuppressiva Dexamethason und Cyclosporin A wurden parallel als Vergleichssubstanzen verwendet. Für die Analyse von prä-aktivierten MNZ wurden die Substanzen erst nach einer 48-stündigen Stimulation mit PHA zu den Zellen gegeben. Die Proliferation wurde analog mit Hilfe des [³H] -Thymidin-Zellproliferationsassays nach weiteren 24 h gemessen. Anschließend wurden die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC₅₀-Werte der DNA-Synthesehemmung) der einzelnen Medikamente entsprechend für frisch stimulierte und prä-aktivierte MNZ berechnet (Tabelle 9).

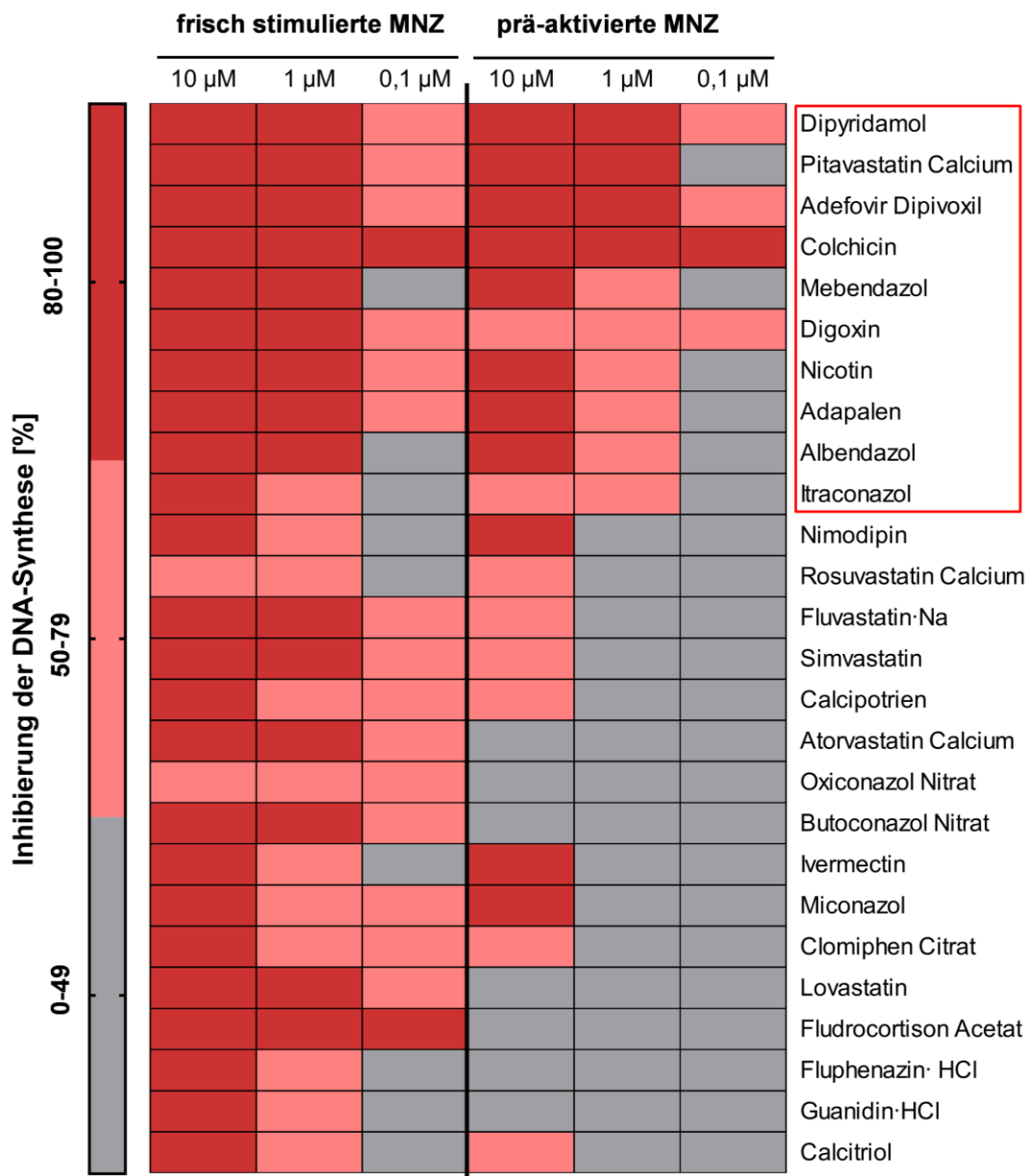


Abbildung 8: Heatmap der 26 identifizierten Substanzen zur Visualisierung der Proliferationsinhibition frisch stimulierter und prä-aktiverter MNZ. Dargestellt sind die Ergebnisse des zweiten Screening-Schrittes. In den Spalten sind die getesteten Konzentrationen für frisch stimulierte und prä-aktivierte MNZ aufgetragen. Die Farben signalisieren eine Proliferationshemmung von 0-49 % (grau), 50-79 % (hell rot), bzw. 80-100 % (dunkel rot). Identifizierte Substanzen, die sowohl die Proliferation von frisch stimulierten als auch die von prä-aktivierten MNZ hemmten, sind mit einem roten Rahmen gekennzeichnet.

Tabelle 9: IC₅₀-Werte der 10 ausgewählten Substanzen basierend auf dem [3H]-Thymidin-Zellproliferationsassay.

IC ₅₀ [nM]	frisch stimulierte MNZ	prä-aktivierte MNZ
Dexamethason	690,1	>1000
Cyclosporin A	652,6	>1000
Pitavastatin	17,4	767,1
Digoxin	69,2	109,0
Colchicin	86,3	96,4
Adefovir Dipivoxil	101,4	398,3
Dipyridamol	215,8	167,4
Adapalen	372,8	378,0
Mebendazol	528,4	560,6
Albendazol	659,4	887,8
Itraconazol	774,2	>1000
Nicotin	>1000	>1000

Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, konnten für die beiden etablierten Immunsuppressiva Dexamethason und Cyclosporin A keine IC₅₀-Werte für prä-aktivierte MNZ im getesteten Konzentrationsbereich erhoben werden. Im Gegensatz dazu hemmten fast alle der 10 durch das Screening ermittelten Substanzen die Proliferation beider Zellsysteme bei einer Konzentration von 1 µM, wobei sich teilweise große Unterschiede in den IC₅₀-Werten zeigten. Für Nicotin konnten in diesem Dosisbereich in beiden Zellsystemen keine IC₅₀-Werte ermittelt werden. Itraconazol zeigte nur einen inhibierenden Effekt bei frisch stimulierten MNZ. Zur weiteren Eingrenzung wurden die weniger potenten Substanzen (IC₅₀ > 500 nM) Nicotin, Itraconazol, Albendazol und Mebendazol für weiterführende Untersuchungen ausgeschlossen. Für die restlichen sechs Substanzen wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, um eventuelle ungünstige Eigenschaften aufzudecken und zu prüfen, inwieweit Daten über eine immunmodulatorische Wirkung bereits vorliegen.

Adapalen ist nur für die topische Anwendung bei Akne zugelassen und somit nur bedingt für die gesuchte Indikation geeignet [116]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Dipyridamol die Aufnahme von Thymidin in die Zellen hemmt [117,118]. Daher stellt der [3H]-Thymidin-Zellproliferationsassay für Dipyridamol nur eine unzureichende Methode zu Proliferationsanalyse dar, da zwar der Einbau des markierten Thymidins, nicht aber die DNA-Synthese an sich, inhibiert sein könnte. Ein Nachteil von Digoxin ist seine geringe therapeutische Breite, weswegen es schnell zu toxischen Nebenwirkungen der Substanz kommen kann [119]. Außerdem konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden, dass Digoxin die Th17-Differenzierung durch Hemmung

des Transkriptionsfaktors ROR γ t hemmt [120,121]. Ähnlich wie Digoxin hat auch Colchicin nur eine geringe therapeutische Breite und weist auch in der therapeutischen Dosis eine Reihe von Nebenwirkungen auf [122].

Für Adefovir Dipivoxil waren zum Zeitpunkt der Literaturrecherche einige immunmodulatorischen Wirkungen bekannt (siehe Kapitel 1.4.2), jedoch fehlten Daten zur Wirkung auf humane T-Zellen und der Wirkmechanismus der Substanz war nicht hinreichend aufgeklärt. Pitavastatin wies mit Abstand den niedrigsten IC₅₀-Wert im Zellsystem der frisch stimulierten MNZ auf. Zwar existierten eine Vielzahl an Studien über Statine und ihre immunmodulatorischen Wirkungen, allerdings ist Pitavastatin das jüngste Mitglied der Statin-Familie und wurde erst 2011 zugelassen. Aus diesem Grund liegen zu Pitavastatin noch vergleichsweise wenige Daten vor. Wie in Kapitel 1.5 beschrieben, weist Pitavastatin im Gegensatz zu anderen Statinen ein sehr günstiges pharmakologisches Profil auf. Infolgedessen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit Adefovir Dipivoxil und Pitavastatin für die weitere Charakterisierung ausgewählt, die in den folgenden Kapiteln beschrieben wird.

3.2 Adefovir Dipivoxil

3.2.1 Adefovir Dipivoxil hemmt die Proliferation, Aktivierung und Zytokin-Produktion von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen

Um die Ergebnisse des Screenings zu bestätigen, wurde der Einfluss von Adefovir Dipivoxil (ADV) auf die Proliferation stimulierter humaner T-Zellen untersucht. Dabei wurde Cladribin, ein zur Behandlung der rezidivierenden-remittierenden Multiplen Sklerose zugelassenes Medikament, als Referenz-Substanz genutzt. Wie ADV gehört auch Cladribin zur Gruppe der Adenosin-Analoga [123].

Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen von ADV oder Cladribin für 72 h inkubiert. Für die Analyse von prä-aktivierten T-Zellen wurden ADV oder Cladribin erst nach einer 48-stündigen Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern zu den Zellen gegeben. Die Proliferation wurde mit Hilfe des [³H]-Thymidin-Zellproliferationsassays nach 72 h gemessen. Wie erwartet, war eine starke Inhibierung der Proliferation von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen durch ADV zu beobachten (Abbildung 9A). Basierend auf dem [³H]-Thymidin-Zellproliferationsassay konnte für frisch stimulierte T-Zellen ein IC₅₀ von 63,12 nM und für prä-aktivierte T-Zellen ein IC₅₀ von 364,8 nM ermittelt werden. Im Gegensatz dazu, zeigte Cladribin zwar eine signifikante Hemmung der Proliferation frisch stimulierter T-Zellen, hatte aber keinen Einfluss auf die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen (Abbildung 9E). Der IC₅₀-Wert für frisch stimulierte T-Zellen betrug für Cladribin

3. Ergebnisse

372,4 nM, während für prä-aktivierte T-Zellen im untersuchten Dosisbereich kein genauer IC₅₀-Wert (>1000 nM) ermittelt werden konnte.

Um noch detaillierter zu untersuchen, wie ADV die Teilung der T-Zellen beeinflusst, wurden CFSE-Experimente (Abbildung 9B-D) durchgeführt, welche es ermöglichten, die Frequenz der sich teilenden Zellen zu ermitteln. Der Prozentsatz sich teilender frisch stimulierter T-Zellen war, im Vergleich zur Kontrolle ($90,8 \pm 1 \%$), nach Inkubation mit 1000 nM ADV ($23,4 \pm 5,3 \%$) stark reduziert. Auch die Frequenz sich teilender prä-aktivierter T-Zellen war signifikant niedriger, wenn diese mit ADV behandelt wurden (von $90,3 \pm 1,2 \%$ in den Kontrollen auf $38,3 \pm 3,0 \%$ bei Behandlung mit 1000 nM ADV). Cladribin konnte die Frequenz sich teilender frisch stimulierter T-Zellen nur in den beiden höchsten applizierten Dosen reduzieren (von $91,8 \pm 1,1 \%$ in den Kontrollen auf $12,6 \pm 1,4 \%$ bei Behandlung mit 1000 nM Cladribin). Die Frequenz sich teilender prä-aktivierter T-Zellen war nur bei Behandlung mit der höchsten Cladribin-Dosis von 1000 nM von $89,6 \pm 2 \%$ auf $75,5 \pm 2,4 \%$ leicht reduziert (Abbildung 9F-H).

Die ADV-induzierte Hemmung der Proliferation zeigte sich auch durch eine erniedrigte Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 sowie durch eine reduzierte Zytokin-Produktion. Stimulation mit anti-CD3/CD28-Antikörpern allein führte zu einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD25, welche nach Behandlung mit ADV konzentrationsabhängig vermindert war (Abbildung 10A, B). Dementsprechend war auch die Produktion der Zytokine IFN- γ , IL-5, IL-10 und IL-17 (Abbildung 10C), welche mittels ELISA nach 72 h in den Zellkulturüberständen bestimmt wurden, reduziert.

Zusammengefasst machen diese Ergebnisse deutlich, dass ADV die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen schon in kleinen nanomolaren Dosen effizient inhibieren kann.

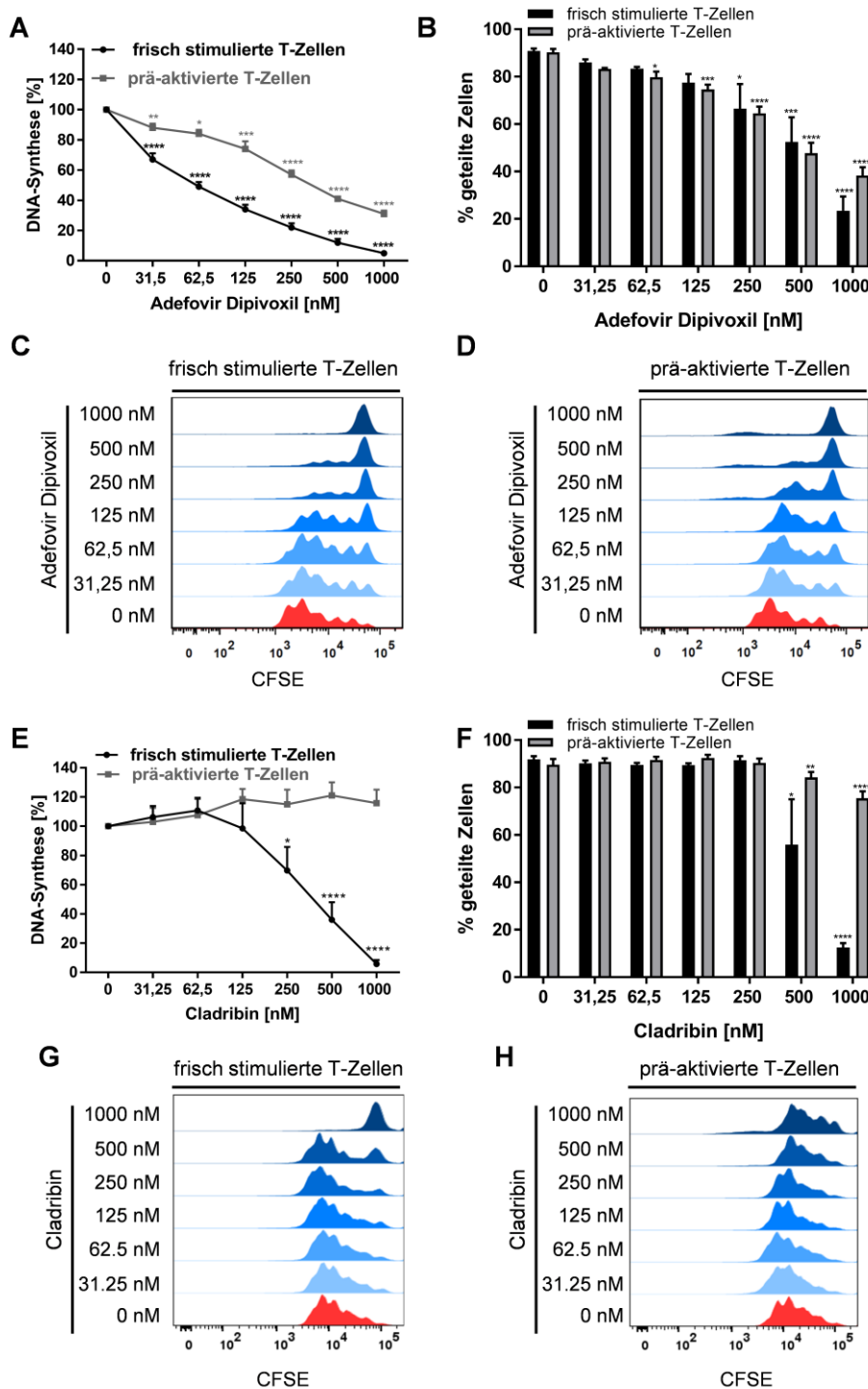


Abbildung 9: ADV hemmt die Proliferation frisch stimulierter und prä-aktiver T-Zellen.

(A-H) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (schwarz) oder prä-aktiviert (grau) und mit steigenden ADV- (A-D) oder Cladribin-Konzentrationen (E-H) inkubiert. (A, E) Die Bestimmung der DNA-Synthese erfolgte nach 72 h mittels [³H]-Thymidin-Einbaus. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten in Relation zu stimulierten Kontrollzellen. (B, F) Die Proliferation von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen wurde durch CFSE-Färbung nach 96 h am Durchflusszytometer als Prozentsatz sich teilender Zellen ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten. Histogramme der CFSE-Färbung von frisch stimulierten T-Zellen (C, G) und prä-aktivierten T-Zellen (D, H) aus einem repräsentativen Experiment (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

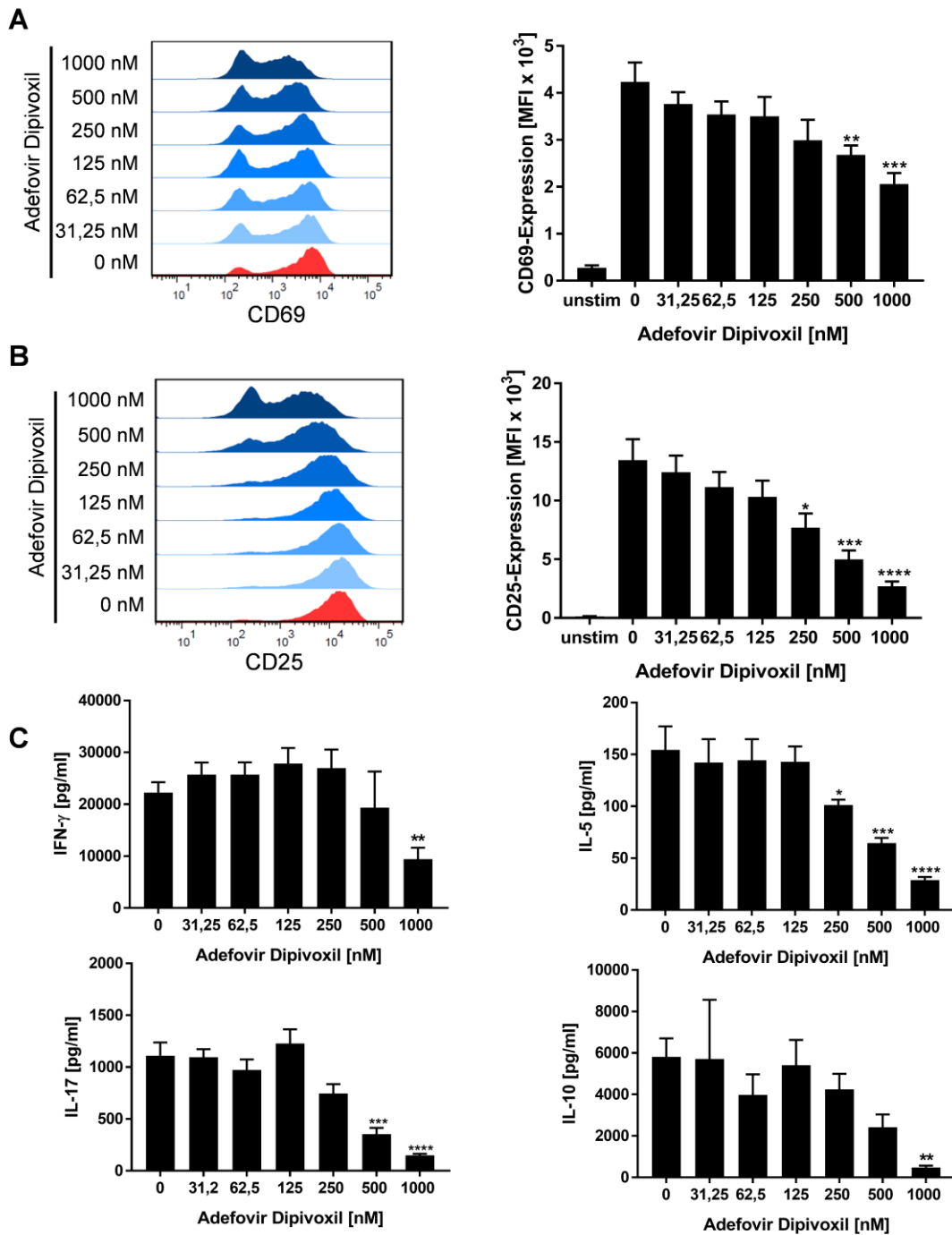


Abbildung 10: ADV hemmt die Aktivierung und Zytokin-Produktion frisch stimulierter T-Zellen. (A-C) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen ADV inkubiert. Die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 wurde nach 16 h (A) und CD25 nach 48 h (B) mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme (links) und die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) (rechts). Die Konzentration der Zytokine IFN- γ , IL-5, IL-17 und IL-10 wurden nach 72 h mittels spezifischer ELISA in den Zellkulturüberständen gemessen (C). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

3.2.2 ADV induziert DNA-Doppelstrangbrüche in ruhenden, frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen

ADV gehört zur Gruppe der Nucleotid-Analoga und besitzt keinen normalen Deoxyribose-Ring [63]. Aufgrund dieser chemischen Struktur bestand der Verdacht, dass ADV an Zellen DNA-Schäden induzieren kann. Ein sensitiver Biomarker für die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) ist die Phosphorylierung des Histons H2AX (γ H2AX) [112,113]. Die Quantifizierung der DSB erfolgte nach immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci [124] mit dem automatischen Mikroskopiesystem AKLIDES, sowie mittels Durchflusszytometrie.

Ruhende T-Zellen wurden mit ADV oder Cladribin als Referenzsubstanz inkubiert und anschließend die Anzahl an γ H2AX-Foci bestimmt. Wie in Abbildung 11A dargestellt, führte die Inkubation von ruhenden T-Zellen mit ADV für 8 h zu einer steigenden Anzahl an γ H2AX-Foci pro Zelle. ADV bewirkte eine signifikante Induktion von DNA-DSB von $0,50 \pm 0,06$ Foci pro Zelle in den Kontrollkulturen auf $1,90 \pm 0,13$ Foci pro Zelle bei Behandlung der T-Zellen mit 1000 nM ADV (Abbildung 11B). Eine Inkubation von ruhenden T-Zellen mit Cladribin für 8 h induzierte ebenfalls γ H2AX-Foci, wie auf den repräsentativen Mikroskopie-Bildern in Abbildung 11C zu erkennen ist. Die Anzahl der Foci stieg signifikant von $0,60 \pm 0,16$ Foci pro Zelle in den Kontrollkulturen auf $7,97 \pm 1,34$ Foci pro Zelle bei Behandlung der T-Zellen mit 1000 nM Cladribin (Abbildung 11D).

Um den Effekt von ADV auf die DNA-Schädigung genauer zu untersuchen, wurde die Expression von γ H2AX in aktivierten T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da die basale Expression von γ H2AX abhängig von der jeweiligen Zellzyklus-Phase ist, wurde zusätzlich der DNA-Gehalt der Zellen untersucht. Frisch stimulierte T-Zellen, die für 24 h mit 125 nM ADV inkubiert wurden, zeigten bereits eine signifikante Erhöhung der γ H2AX-Foci von $2,7 \pm 1,0$ % in unbehandelten Kontrollkulturen auf $24,2 \pm 3,8$ % (Abbildung 11E, G). Die Expression von γ H2AX nahm mit steigender ADV-Dosis stetig zu und erreichte ein Maximum von $88,6 \pm 1,4$ % bei Behandlung mit 1000 nM ADV. Wie an der PI Färbung zu erkennen ist, befanden sich die meisten Zellen 24 h nach Aktivierung noch in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus.

Die Phosphorylierung von H2AX war auch in prä-aktivierten T-Zellen 24 h nach Behandlung mit ADV signifikant erhöht. Im Gegensatz zu frisch stimulierten T-Zellen war die Rate an γ H2AX-positiven Zellen bereits bei Behandlung mit der niedrigsten ADV-Konzentration von 31,25 nM signifikant erhöht und stieg von $3,5 \pm 0,5$ % (Kontrolle) auf $41,1 \pm 0,8$ %. Wie in den Dot Plots in Abbildung 11F zu erkennen ist, verstärkte sich die γ H2AX-Expression hauptsächlich in der Zellpopulation mit erhöhtem DNA-Gehalt, d. h. in Zellen, die sich in der S/G₂-Phase befanden. Aufgrund der erhöhten Sensitivität für

ADV-induzierte DNA-Schäden in Zellen, die sich in der S/G₂-Phase befinden, wurde bereits nach Inkubation mit geringsten ADV-Konzentrationen ein Großteil dieser Zellpopulation als γ H2AX-positiv klassifiziert. Folglich war bei prä-aktivierten T-Zellen kein konzentrationsabhängiger Anstieg der γ H2AX-positiven Population zu beobachten. Insgesamt wurde eine Rate von $51,4 \pm 2,3$ % γ H2AX-positiver Zellen in allen angewendeten Konzentrationen nicht überschritten (Abbildung 11F, H).

Zusammengefasst bestätigen diese Ergebnisse, dass ADV in ruhenden, frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen DNA-Schäden induziert.

3.2.3 ADV induziert die Phosphorylierung von p53 in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen

Als Antwort auf einen DNA-Schaden ist die Phosphorylierung von p53 am Ser15 eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen von p53. Zusätzlich wird dessen transkriptionale Aktivität signifikant induziert, was nachfolgend zu einem Zellzyklus-Stopp oder bei irreparablen Schäden zur Apoptose führen kann [125].

Da ADV wie oben beschrieben DNA-Schäden induzieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit als nächstes mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung der Effekt von ADV auf die Phosphorylierung von p53 untersucht. Die Behandlung von frisch stimulierten T-Zellen mit 1000 nM ADV für 24 h führte zu einem 11,9-fachen Anstieg der Phosphorylierung von p53 an Ser15 im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12A, B). Zusätzlich war bei Zellen, die mit 1000 nM ADV behandelt wurden, auch die Expression des gesamten p53-Proteins um das 4,6-fache erhöht (Abbildung 12C). Bei prä-aktivierten T-Zellen war nur eine leichte Erhöhung der p53-Phosphorylierung an Ser15 zu beobachten, welche nach der höchsten applizierten Dosis von 1000 nM signifikant um das 2,3-fache anstieg (Abbildung 12D, E). Allerdings konnte auch in diesem Zellsystem bei T-Zellen, die für 24 h mit 1000 nM ADV inkubiert wurden, eine signifikante Erhöhung des gesamten p53-Proteins um das 3,6-fache nachgewiesen werden (Abbildung 12F).

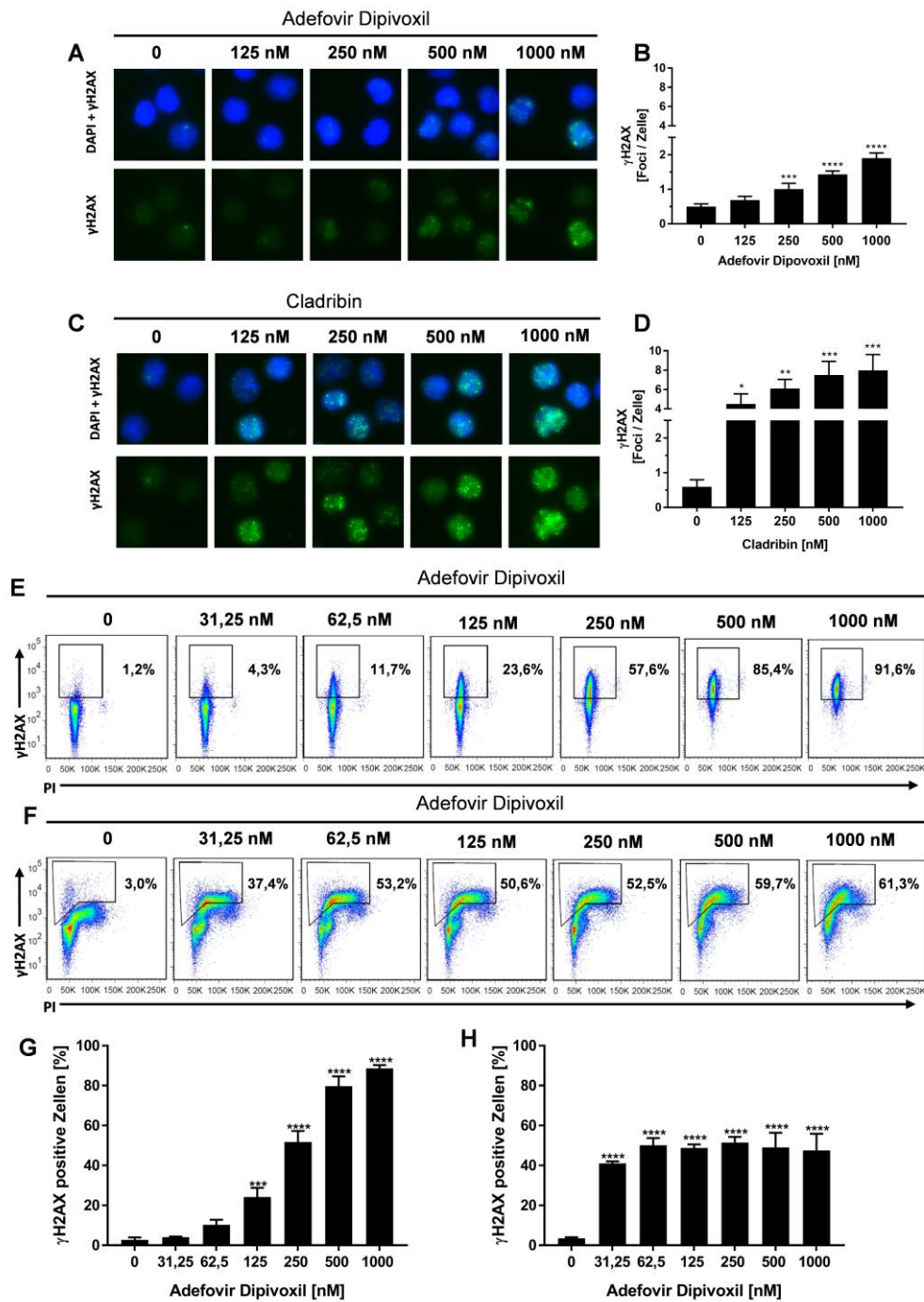


Abbildung 11: ADV induziert DNA-Doppelstrangbrüche in ruhenden, frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen. Ruhende humane T-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen ADV (A, B) oder Cladribin (C, D) für 8 h inkubiert. Die Anzahl der DNA-Doppelstrangbrüche wurde mittels immunzytochemischer Färbung der γ H2AX-Foci und automatischer Foci-Quantifizierung bestimmt. Repräsentative Mikroskopie-Bilder der γ H2AX-Foci (grün) und der DAPI-Kernfärbung (blau) (A, C). Quantifizierung der mittleren Anzahl an γ H2AX-Foci/Zelle (B, D). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (E, G) oder für 48 h prä-aktiviert (F, H) und mit steigenden ADV-Konzentrationen für jeweils 24 h inkubiert. Repräsentative Dot Plots der durchflusszytometrischen γ H2AX-Analyse und der PI-Färbung des DNA-Gehaltes (E, F). Das Gate der γ H2AX-positiven Zellpopulation ist durch einen schwarzen Rahmen gekennzeichnet. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der γ H2AX-positiven Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten (G, H). (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

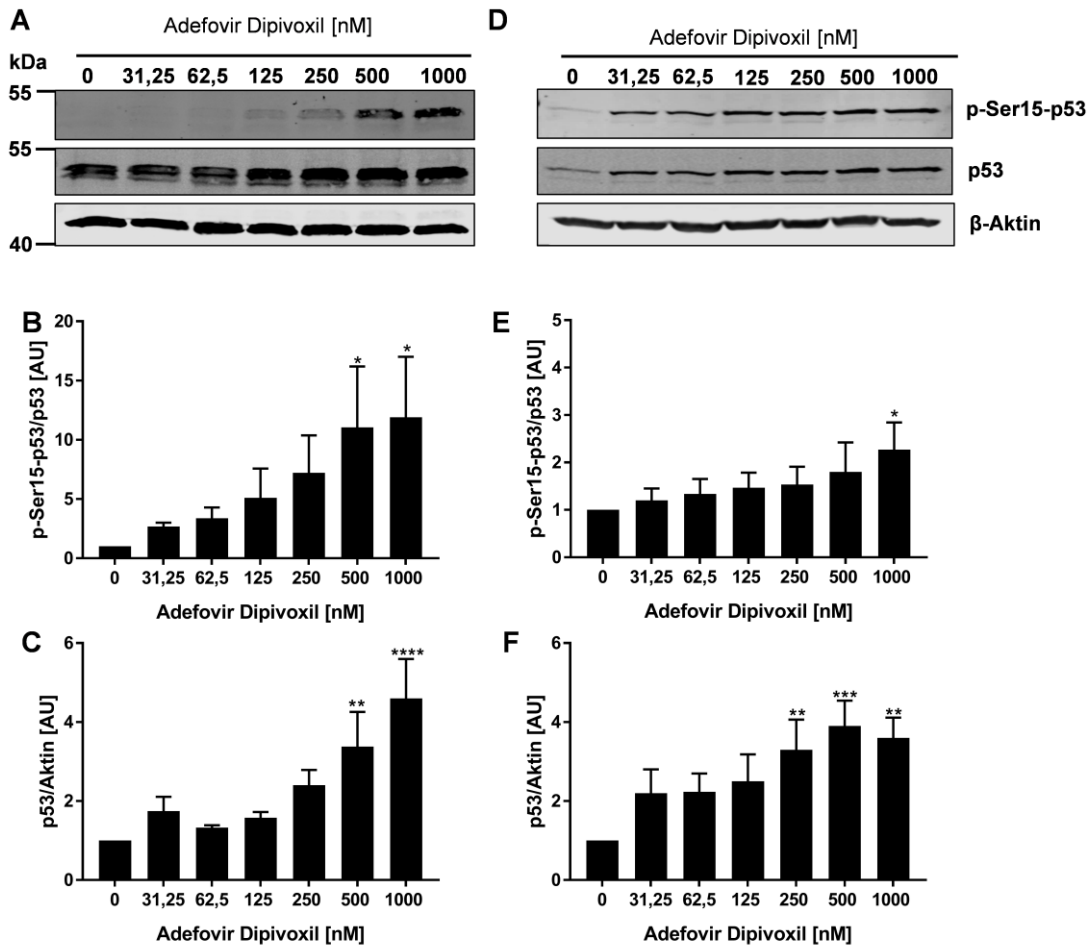


Abbildung 12: ADV induziert die Phosphorylierung von p53 in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (A-C) oder für 48 h prä-aktiviert (D-F) und mit steigenden Konzentrationen ADV inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung analysiert. (A, C) Repräsentative Western Blot-Bilder der Expression von p-Ser15-p53 und totalem p53; β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Expression von p-Ser15-p53 (B, E) und p53 (C, F) basierend auf der densitometrischen Auswertung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

3.2.4 ADV induziert an frisch stimulierten T-Zellen einen Arrest in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus

Da eine Aktivierung von p53 zu einem Zellzyklus-Arrest oder Apoptose führen kann [126], wurde in weiteren Experimenten die Zellzyklus-Verteilung von frisch stimulierten T-Zellen, welche für 72 h mit ADV behandelt wurden, mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie in Abbildung 13A und B dargestellt, konnte bei T-Zellen, die mit ADV behandelt wurden, ein Zellzyklus-Arrest in der G_0/G_1 -Phase beobachtet werden. Der Prozentsatz an Zellen in der G_0/G_1 -Phase stieg von $50,1 \pm 5,3$ % in den stimulierten Kontroll-Zellkulturen auf 100 % in stimulierten T-Zellen, die mit 1000 nM ADV inkubiert

wurden. Gleichzeitig sank der Prozentsatz der T-Zellen in der G₂/M-Phase von 40 ± 10 % auf 0 % unter den gleichen Bedingungen (Abbildung 13A, B).

Ein wichtiges Ziel-Gen von p53 stellt p21 dar. Dieses Protein hemmt Cyclin-abhängige Kinasen, welche für das Fortschreiten des Zellzyklus essentiell sind [127]. Aus diesem Grund wurde die p21-Expression mittels Western Blot untersucht (Abbildung 13C). Durch die Behandlung mit 1000 nM ADV für 24 h konnte in frisch stimulierten T-Zellen eine signifikante und um das 4-fache erhöhte Expression von p21 beobachtet werden (Abbildung 13D). In Kulturen prä-aktivierter T-Zellen konnte eine geringe, aber signifikante Erhöhung der p21-Expression für fast alle untersuchten ADV-Konzentrationen festgestellt werden (1,6-fach bei 1000 nM ADV, Abbildung 13E, F).

Diese Daten weisen darauf hin, dass ADV in beiden Zellsystemen durch Hochregulation der p21-Expression konzentrationsabhängig einen Zellzyklus-Arrest in der G₀/G₁-Phase induziert.

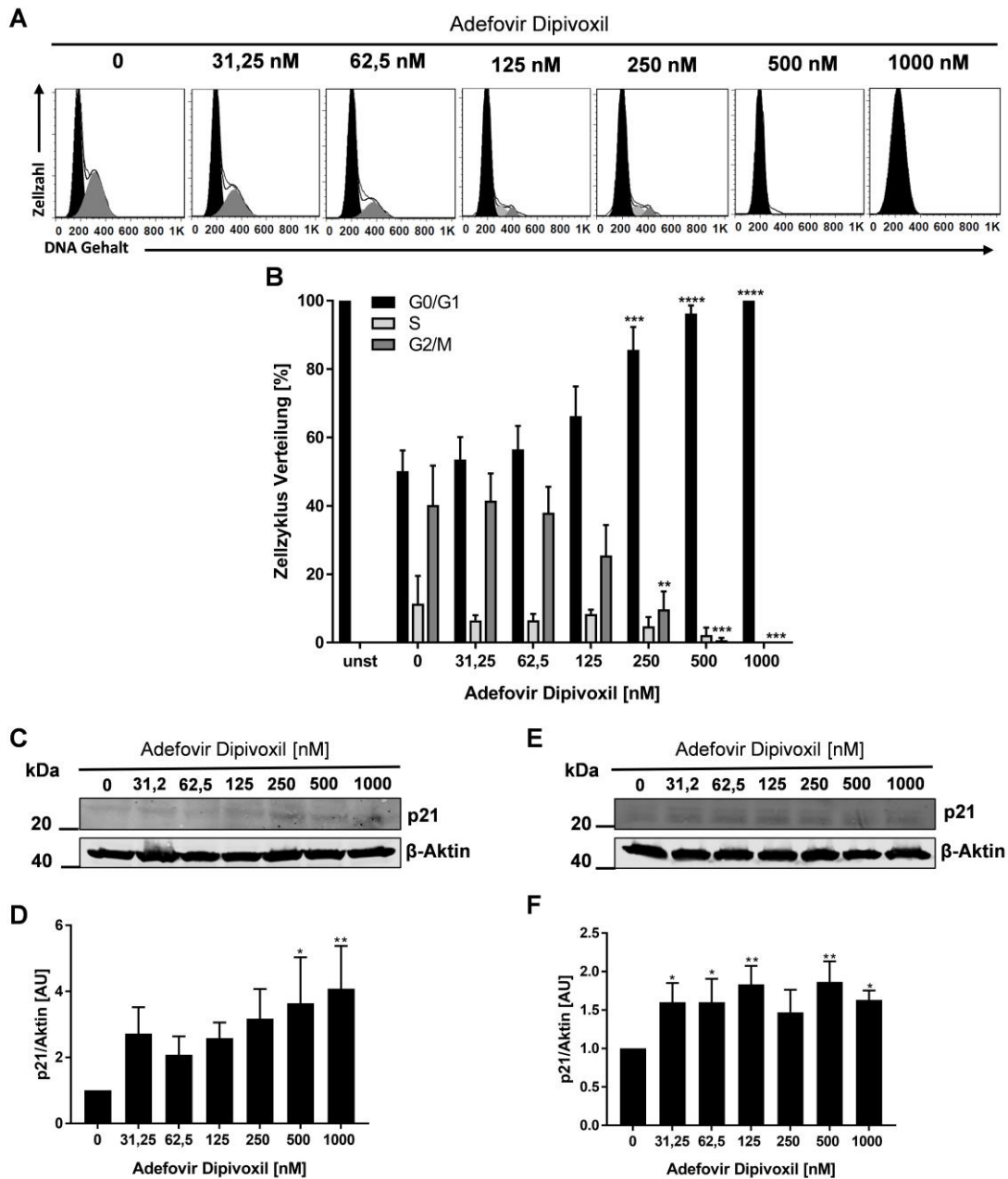


Abbildung 13: ADV induziert einen Zellzyklus-Arrest in der G₀/G₁-Phase durch Hochregulation von p21. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und für 72 h mit steigenden ADV-Konzentrationen inkubiert. Der DNA-Gehalt und die Zellzyklus-Phase wurden mittels PI-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme des DNA-Gehalts (A) G₀/G₁ (schwarz), S (hellgrau), G₂/M (dunkelgrau). (B) Die Balken zeigen den Prozentsatz der Zellen in G₀/G₁-Phase, S-Phase und G₂/M-Phase an. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (C, D) oder für 48 h prä-aktiviert (E, F) und mit steigenden Konzentrationen ADV inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung analysiert (C, E). Repräsentative Western Blot-Bilder der p21-Expression; β-Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (D, F) Gezeigt ist die relative Quantifizierung der Expression von p21 basierend auf der densitometrischen Auswertung. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von 5 (D) oder 3 (F) unabhängigen Experimenten. (****: P ≤ 0,0001; ***: P ≤ 0,001; **: P ≤ 0,01; *: P ≤ 0,05).

3.2.5 ADV induziert Apoptose in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen

Um zu untersuchen, ob die ADV-induzierte Aktivierung von p53 zum Zelltod führt, wurden frisch stimulierte T-Zellen für 72 h mit steigenden ADV-Konzentrationen inkubiert und anschließend mittels AnnexinV/PI-Färbung sowie Durchflusszytometrie analysiert. In Zellkulturen unbehandelter stimulierter T-Zellen betrug die Frequenz apoptotischer Zellen $22,1 \pm 1,0$ %. In Kulturen frisch stimulierter T-Zellen, welche mit ADV behandelt wurden, stieg die Frequenz apoptotischer Zellen dosisabhängig bis zu $53,0 \pm 2,4$ % bei einer Inkubation mit 1000 nM ADV signifikant an (Abbildung 14A, C). In Kulturen prä-aktivierter T-Zellen erhöhte sich die Rate apoptotischer Zellen nach Inkubation mit 1000 nM ADV signifikant von $23,2 \pm 1,1$ % (unbehandelt) auf $39,5 \pm 6,7$ % (Abbildung 14B, D).

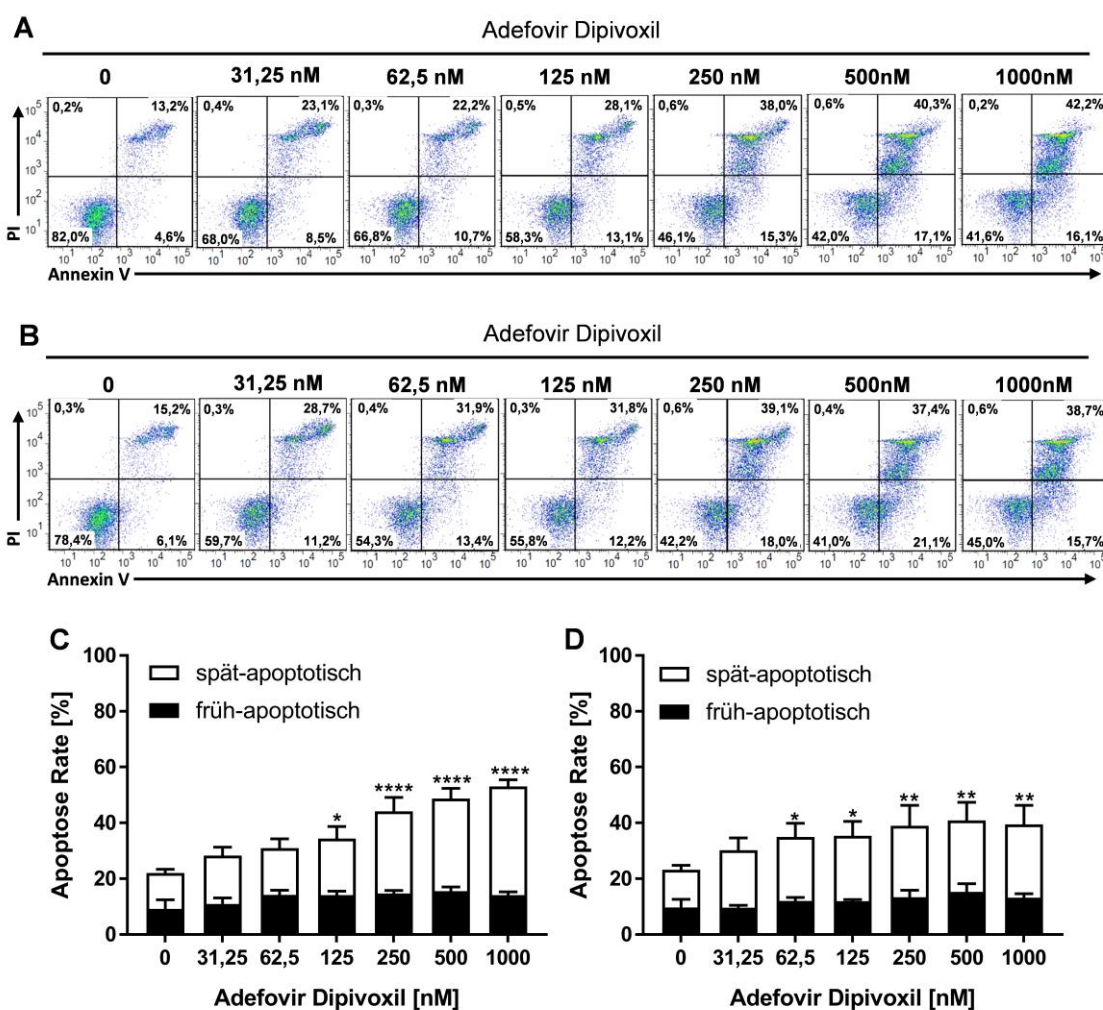


Abbildung 14: ADV induziert Apoptose in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (A, C) oder für 48 h prä-aktiviert (B, D) und mit steigenden Konzentrationen von ADV inkubiert. Nach 72 h wurden die T-Zellen mit AnnexinV/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A, B) Repräsentative Dot Plots und (C, D) die quantitative Auswertung der früh- und spät-apoptotischen Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

Das p53-Protein kann den intrinsischen Apoptose-Signalweg induzieren [126]. Eine Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer Induktion der Initiator-Caspase-9, welche dann die Effektor-Caspasen-3 und -7 spaltet, was wiederum zur Vermittlung des Zelltods führt [41]. Um die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 zu untersuchen, wurden frisch stimulierte T-Zellen für 72 h mit steigenden Konzentrationen von ADV inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte einen dosisabhängigen Anstieg der Caspase-9-positiven Zellen von $6,9 \pm 0,8$ % in den Kontrollkulturen auf $33,2 \pm 6,9$ % bei Behandlung der T-Zellen mit 1000 nM ADV (Abbildung 15A, B). In prä-aktivierten T-Zellen führte die Behandlung mit 250 nM ADV zu einem Anstieg der Caspase-9-positiven Zellen von $6,8 \pm 0,8$ % auf $14,7 \pm 2,9$ % (Abbildung 15C, D).

In folgenden Experimenten wurde die Expression der Effektor-Caspasen-3/7 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Expression der aktiven Caspasen-3/7 in frisch stimulierten T-Zellen war nach einer 72-stündigen Inkubation signifikant von $15,1 \pm 3,0$ % in den Kontrollkulturen auf $26,9 \pm 3,4$ % bei einer Behandlung der T-Zellen mit 1000 nM ADV gestiegen (Abbildung 15E). Auch in prä-aktivierten T-Zellen konnte durch eine Behandlung mit 1000 nM ADV über 24 h ein signifikanter Anstieg der aktiven Caspasen-3/7 von $15,3 \pm 2,9$ % auf $26,5 \pm 5$ % beobachtet werden (Abbildung 15F).

Um die Kinetik der ADV-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde die Aktivität der Caspasen-3/7 mittels des Lebend-Zell-Analyse System IncuCyte S3 gemessen. Die Detektion des Caspase-spezifischen grünen Fluoreszenzsignals erfolgte über einen Zeitraum von 70 h (Abbildung 15G, links). ADV induzierte einen Anstieg der Caspase-3 und -7-positiven Zellen ab einer Inkubationszeit von 24 h, welcher nach 48 h ein Plateau erreichte. Parallel wurde eine Cytotox Red-Färbung durchgeführt, um die Zellviabilität über die Zeit zu beobachten (Abbildung 15G, rechts). Durch die Inkubation frisch stimulierter T-Zellen mit ADV sank die Zellviabilität dosisabhängig nach 24 h. Die kinetische Analyse der aktiven Caspasen-3 und -7 sowie der Zellviabilität bestätigte die signifikante Induktion der Apoptose durch ADV in beiden Zellsystemen, welche zuvor mittels Durchflusszytometrie als Endpunktmessung ermittelt wurde.

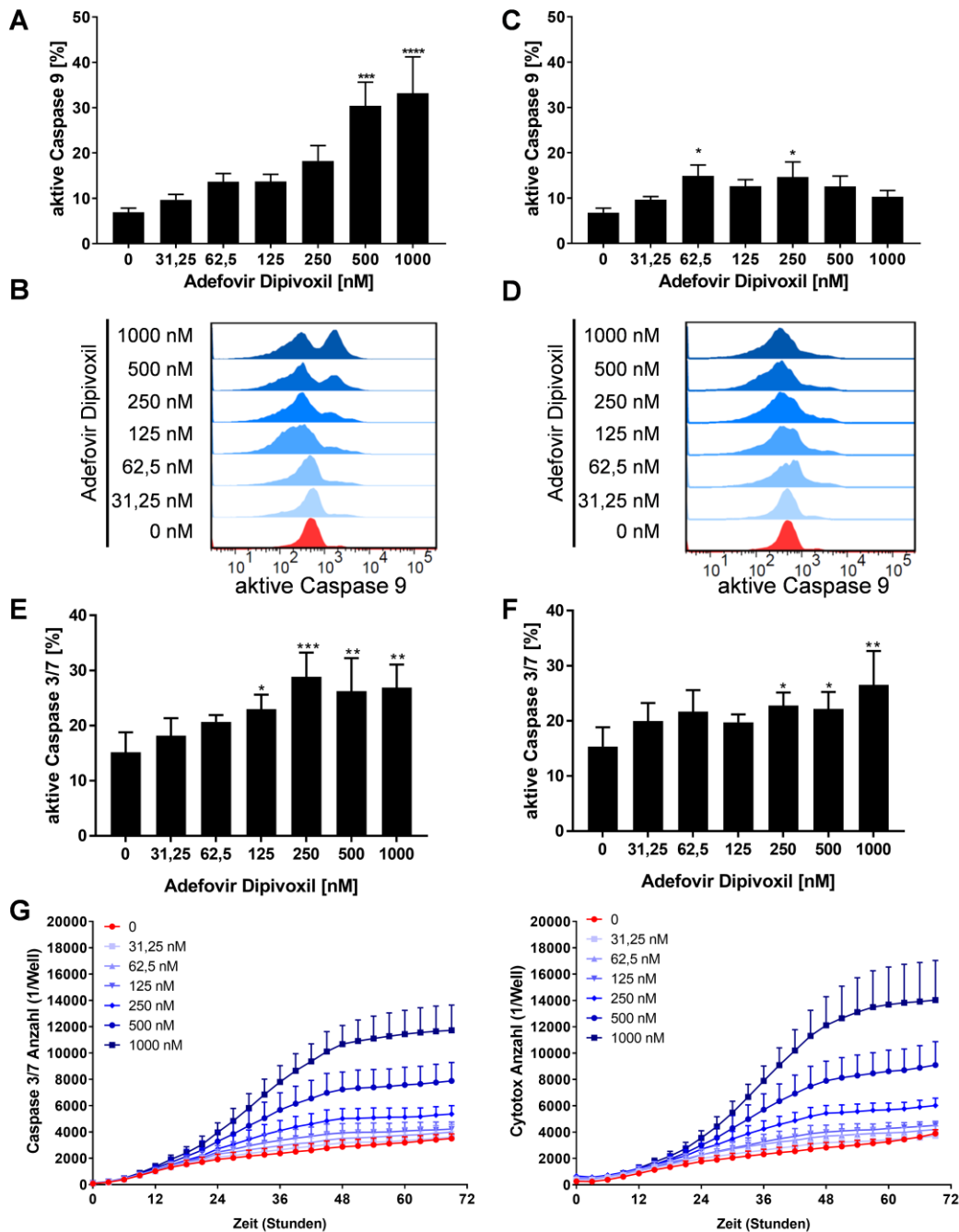


Abbildung 15: ADV aktiviert den intrinsischen Apoptose-Signalweg in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (A, B, E) oder für 48 h prä-aktiviert (C, D, F) und mit steigenden Konzentrationen von ADV inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit dem Caspase-9-Inhibitor FITC-LEHD-FMK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme (B, D) und die Mittelwerte \pm SEM der Caspase-9-positiven Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten (A, C). Nach 72 h wurden die Zellen mit dem CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detektions-Reagenz gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Caspase 3/7-positiven Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten (E, F). (G) Für die kinetischen Analysen wurden humane T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden ADV-Konzentrationen in Anwesenheit des Caspase 3/7- und CytotoxRed-Reagenz inkubiert. Die kinetische Messung der Anzahl Caspase 3/7-positiver Zellen (links) und der Anzahl CytotoxRed-positiver Zellen als Maß der Zellviabilität (rechts) erfolgte mittels IncuCyte S3 in 3 h-Intervallen über einen Zeitraum von 70 h. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

3. Ergebnisse

Somit konnte gezeigt werden, dass ADV sowohl in frisch stimulierten als auch in prä-aktivierten T-Zellen in der Lage ist, p53 zu aktivieren (Abbildung 12), einen Zellzyklus-Arrest hervorzurufen (Abbildung 13) und Apoptose zu induzieren (Abbildung 14 und Abbildung 15). Um eine bessere Einsicht in die molekularen Mechanismen der ADV-induzierten Apoptose zu bekommen, wurde PUMA untersucht, welches eines der wichtigsten Zielgene von p53 darstellt [126]. Frisch stimulierte T-Zellen wurden dazu mit ansteigenden Konzentrationen von ADV behandelt und nach 24 h in Zelllysaten die Expression von PUMA mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung bestimmt. Die Behandlung mit 1000 nM ADV führte zu einem signifikanten 4,9-fachen Anstieg der PUMA-Expression (Abbildung 16A, B). Bei prä-aktivierten T-Zellen war ein Trend in Richtung einer erhöhten PUMA-Expression zu erkennen, der allerdings nur bei einer ADV-Konzentration von 500 nM (3,9-fache Erhöhung) signifikant war (Abbildung 16C, D).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass ADV den intrinsischen Apoptose-Signalweg in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen durch Hochregulation von PUMA induziert.

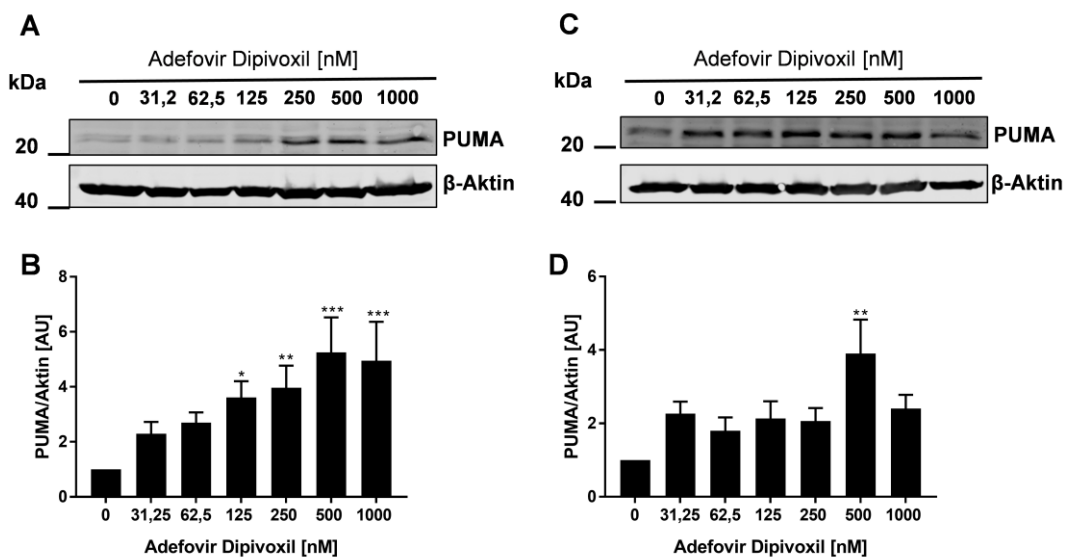


Abbildung 16: ADV induziert die Hochregulation von PUMA in frisch stimulierten T-Zellen.

Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern frisch stimuliert (A, B) oder für 48 h prä-aktiviert (C, D) und mit steigenden Konzentrationen ADV inkubiert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. (A, C) Repräsentative Western Blot-Bilder der PUMA-Expression; β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. (B, D) Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Expression von PUMA basierend auf der densitometrischen Auswertung von 6 (B) oder 3 (D) unabhängigen Experimenten. (***: P \leq 0,001; **: P \leq 0,01; *: P \leq 0,05).

3.3 Pitavastatin

3.3.1 Pitavastatin inhibiert die Proliferation sowie IL-10- und IL-17-Produktion frisch stimulierter T-Zellen, aber hat keinen Einfluss auf die T-Zell Aktivierung

Als weitere stark immunsuppressive Substanz wurde im Screening (Kapitel 3.1.) Pitavastatin identifiziert. Um die Ergebnisse des Screenings der FDA-zugelassenen Medikamente zu bestätigen, wurde der Einfluss von Pitavastatin auf die Proliferation von stimulierten humanen T-Zellen untersucht. Dabei erfolgte zu Beginn der Untersuchungen auch ein Vergleich mit anderen auf dem Markt erhältlichen Statinen.

Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen (3,12 nM bis 400 nM) von Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Rosuvastatin, Simvastatin und Pitavastatin für 72 h inkubiert. Die DNA-Synthese als Maß der Proliferation wurde mittels des [³H]-Thymidin-Zellproliferationsassays quantifiziert. Alle Statine, mit Ausnahme von Pravastatin, inhibierten signifikant die Proliferation der stimulierten T-Zellen (Abbildung 17A). Die potenteste Substanz war Pitavastatin mit einem IC₅₀-Wert von 3,6 nM, gefolgt von Fluvastatin (76 nM) und Atorvastatin (79 nM). Am wenigsten wirksam war Pravastatin, für das kein IC₅₀-Wert ermittelt werden konnte (>400 nM). Dieser Vergleich zeigt, dass Pitavastatin sich aus der Gruppe der Statine als eine besondere Substanz heraushebt, die schon in sehr kleinen Dosen die Proliferation frisch stimulierter T-Zellen supprimiert.

Wie in Kapitel 1.5.1 beschrieben, führt die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase nicht nur zu einer verringerten Cholesterolsynthese, sondern auch zu einer verringerten Produktion von Intermediär-Metaboliten des Mevalonatweges, wie FPP und GGPP [90]. Um aufzuklären, ob durch Supplementation dieser Intermediate die Proliferationshemmung aufgehoben werden kann, wurden T-Zellen mit 100 nM Pitavastatin und parallel mit 6 mM Mevalonat (MVA), mit 10 µM FPP bzw. GGPP oder mit 100 µM Cholesterin (Chol) ko-inkubiert. Durch Supplementation von MVA konnte die Pitavastatin-induzierte T-Zell-Proliferationshemmung komplett und durch die Zugabe von Cholesterin teilweise aufgehoben werden. FPP und GGPP dagegen hatten keine Wirkung auf die Proliferationshemmung (Abbildung 17B). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Cholesterolsynthese möglicherweise einen Einfluss auf die beobachtete Proliferationshemmung hat, wohingegen die Proteinprenylierung keine entscheidende Rolle zu spielen scheint.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob Pitavastatin einen direkten Effekt auf die T-Zell-Aktivierung hat. Dazu wurden T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und für 16 h bzw. 48 h mit steigenden Pitavastatin-Konzentrationen inkubiert. Die Stimulation

allein führte erwartungsgemäß zu einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Jedoch bewirkte die parallele Behandlung der T-Zellen mit Pitavastatin keine signifikante Änderung der Expression von CD69 und CD25 (Abbildung 17C, D). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte ebenfalls kein Einfluss von Pitavastatin auf die Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-5 durch frisch stimulierte T-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings waren die Konzentrationen der Zytokine IL-10 und IL-17 in T-Zellkulturen, die über einen Zeitraum von 72 h mit Pitavastatin behandelt wurden, signifikant verringert (Abbildung 17E).

3.3.2 Pitavastatin führt zum Zellzyklus-Arrest und Zelltod in frisch stimulierten T-Zellen

Um festzustellen, ob die Proliferationshemmung durch einen Zellzyklusarrest oder durch Apoptose ausgelöst wird, wurden im Folgenden eine Zellzyklusanalyse und Apoptose-Messungen durchgeführt. Die Untersuchung der Zellzyklus-Verteilung von frisch stimulierten T-Zellen, die für 72 h mit Pitavastatin behandelt wurden, erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Wie in Abbildung 18A und B dargestellt, stieg der Prozentsatz von Zellen in der G₀/G₁-Phase von 50 \pm 6 % in den Kontrollkulturen auf 72 \pm 6 % in den T-Zellen, die mit 1000 nM Pitavastatin behandelt wurden. Gleichzeitig sank der Prozentsatz von Zellen in der G₂/M-Phase von 40 \pm 12 % auf 24 \pm 5 %. Allerdings konnte dieser Effekt auf den Zellzyklus nur bei höheren nicht aber bei niedrigen Pitavastatin-Konzentrationen beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass nur höhere Pitavastatin-Konzentrationen einen Zellzyklus-Arrest in G₀/G₁ induzieren.

Um weiter zu untersuchen, ob Pitavastatin stattdessen in der Lage ist, Apoptose auszulösen, wurden frisch stimulierte T-Zellen für 72 h mit steigenden Pitavastatin-Konzentrationen inkubiert und anschließend mittels AnnexinV/PI-Färbung am Durchflusszytometer analysiert. Wie in Abbildung 18C und D dargestellt, war nach Inkubation der T-Zellen mit verschiedenen Pitavastatin-Konzentrationen in den Zellkulturen ein signifikanter Anstieg des Prozentsatzes spät-apoptotischer Zellen zu beobachten. So stieg die Rate spät-apoptotischer Zellen von 13,5 \pm 1,6 % in den Kontrollkulturen auf 34,1 \pm 6,3 % in Anwesenheit von 100 nM bzw. auf 27,1 \pm 4,6 % in Anwesenheit von 1000 nM Pitavastatin. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Inkubation frisch stimulierter T-Zellen mit Pitavastatin eine Apoptose-Induktion bewirkt.

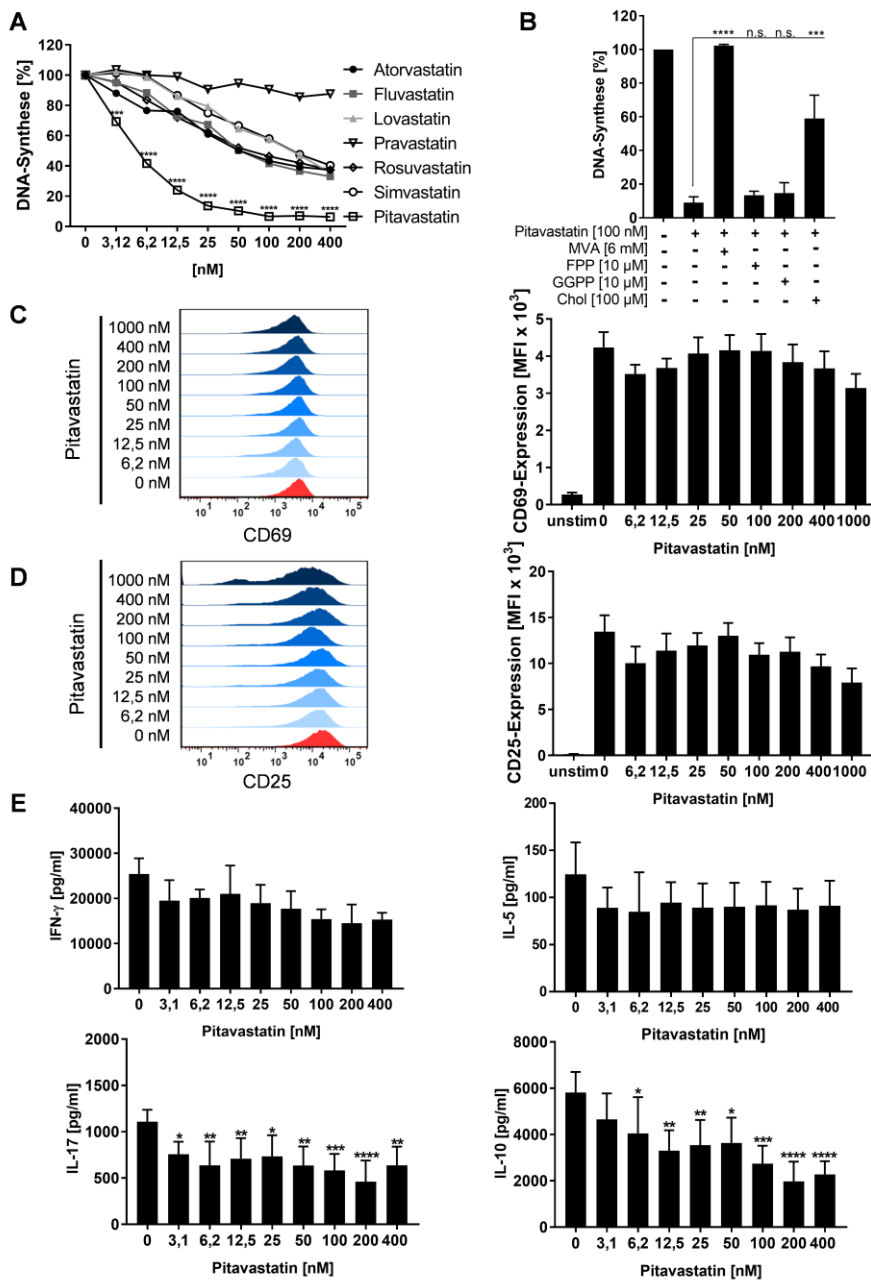


Abbildung 17: Pitavastatin inhibiert die Proliferation sowie die IL-10- und IL-17-Produktion frisch stimulierter T-Zellen, aber hat keinen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und für 72 h mit steigenden Statin-Konzentrationen (A) oder 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 6 mM MVA, 10 μM FPP, 10 μM GGPP oder 100 μM Cholesterol (Chol) inkubiert (B). Die Bestimmung der DNA-Synthese erfolgte mittels des [³H]-Thymidin-Einbaus. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten in Relation zu stimulierten Kontrollzellen. (C-E) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen Pitavastatin inkubiert. Die Expression der T-Zell-Aktivierungsmarker CD69 wurde nach 16 h (C) und die von CD25 nach 48 h (D) mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Histogramme (links) und die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) (rechts). Die Konzentrationen der Zytokine IFN-γ, IL-5, IL-17 und IL-10 in den T-Zellkulturüberständen wurden nach 72 h mittels spezifischer ELISA bestimmt (E). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 4 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; nicht signifikant (n.s.): $P \geq 0,05$).

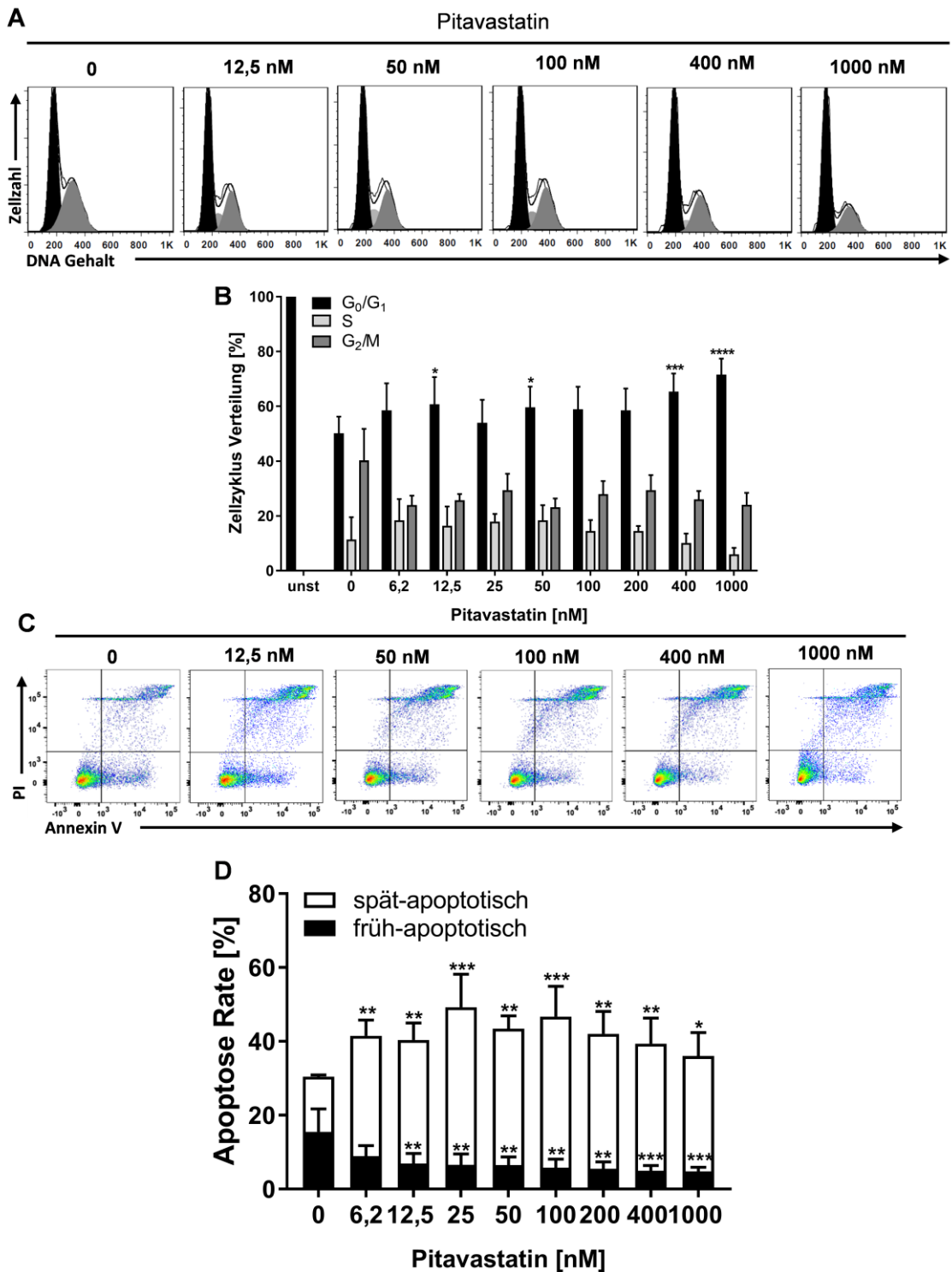


Abbildung 18: Effekt von Pitavastatin auf die Zellzyklus-Verteilung und den Zelltod. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und für 72 h mit steigenden Konzentrationen von Pitavastatin inkubiert. Der DNA-Gehalt und die Zellzyklus-Phase wurden mittels PI-Färbung und durchflusszytometrischer Analyse quantifiziert. Dargestellt sind repräsentative Histogramme des DNA-Gehalts (A) G₀/G₁ (schwarz), S (hellgrau), G₂/M (dunkelgrau). (B) Die Balken zeigen den Prozentsatz der Zellen in G₀/G₁-Phase, S-Phase und G₂/M-Phase an. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM aus 4 unabhängigen Experimenten. Nach 72 h wurden die Zellen mit AnnexinV/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (C) Repräsentative Dot Plots und (D) quantitative Auswertung der früh- und spät-apoptotischen Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. (***: P ≤ 0,001; **: P ≤ 0,01; *: P ≤ 0,05).

3.3.3 Niedrige Pitavastatin Konzentrationen (<1 μM) induzieren Apoptose in frisch stimulierten T-Zellen

Die Aktivierung der Caspase-8 erfolgt hauptsächlich über den extrinsischen Apoptoseweg, wohingegen die Aktivierung der Caspase-9 durch den intrinsischen Apoptoseweg initiiert wird. Diese Initiator-Caspasen spalten dann die Effektor-Caspasen-3 und -7, was letztendlich zum Zelltod führt [47].

Um die Rolle von Caspasen im Pitavastatin-induzierten Zelltod zu untersuchen, wurde die Expression der aktiven Caspase-8, Caspase-9 und Caspasen-3/7 mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abbildung 19A-C). Dazu wurden frisch stimulierte T-Zellen für 72 h mit steigenden Konzentrationen von Pitavastatin inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass eine 72-stündige Behandlung mit Pitavastatin die Expression der aktiven Caspase-8 bis um das 2,3-fache (200 nM) erhöhte (Abbildung 19A, links). Eine Koinkubation der T-Zellen mit jeweils 100 nM Pitavastatin und 6 mM MVA konnte die Aktivierung der Caspase-8 komplett verhindern. Hingegen konnte eine Koinkubation mit 100 μM Cholesterol die Aktivierung der Caspase-8 nicht unterbinden (Abbildung 19A, rechts). Wie in Abbildung 19B dargestellt, erhöhte eine Behandlung der T-Zellen mit Pitavastatin die Expression der aktiven Caspase-9 in diesen um bis das 3,5-fache (bei 100 nM). Durch Supplementation mit MVA oder Cholesterol konnte die Aktivierung der Caspase-9 hingegen effektiv verhindert werden (Abbildung 19B, rechts). Die Expression der aktiven Caspasen-3/7 war nach Behandlung mit 100 nM Pitavastatin um das 3,4-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung 19C, links). Auch hier konnte eine Supplementation mit MVA oder Cholesterol die Aktivierung der Caspasen-3/7 effektiv unterbinden (Abbildung 19C, rechts). Auffällig war, dass die Expression der aktiven Caspasen nicht konzentrationsabhängig anstieg. Die Aktivität der einzelnen Caspasen war bei einer Inkubation der T-Zellen mit höheren Pitavastatin-Konzentrationen schwächer als bei einer Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen.

Um die Kinetik der Pitavastatin-induzierten Apoptose im Detail zu untersuchen, wurde die Caspase-3/7-Aktivität mithilfe des Lebend-Zell-Analyse-Systems IncuCyte S3 gemessen. Die Messung des spezifischen grünen Fluoreszenz-Signals erfolgte dabei über einen Zeitraum von 82 h (Abbildung 19D). Interessanterweise induzierte Pitavastatin an den frisch stimulierten T-Zellen einen Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität erst nach ca. 50 h, was auf einen verzögerten Apoptose-Mechanismus hinweist. Auch in diesen Experimenten wurde die höchste Caspase-Aktivität bei einer Pitavastatin-Konzentration von 100 nM gemessen, wohingegen die Caspase-Aktivität der T-Zellen in Gegenwart von 1000 nM deutlich schwächer war. Um dieses Phänomen weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden die T-Zellen mit höheren Pitavastatin-

3. Ergebnisse

Konzentrationen (bis 20 μM) inkubiert. Wie aus Abbildung 19E ersichtlich, war in diesen Experimenten die Expression der aktiven Caspasen-3/7 umgekehrt proportional zur Pitavastatin-Konzentration und in den T-Zellen am höchsten, die mit der niedrigsten verabreichten Dosis von 100 nM behandelt wurden. Diese Ergebnisse geben einen deutlichen Hinweis darauf, dass Pitavastatin insbesondere in niedrigen, nanomolaren Konzentrationen Apoptose in T-Zellen induziert.

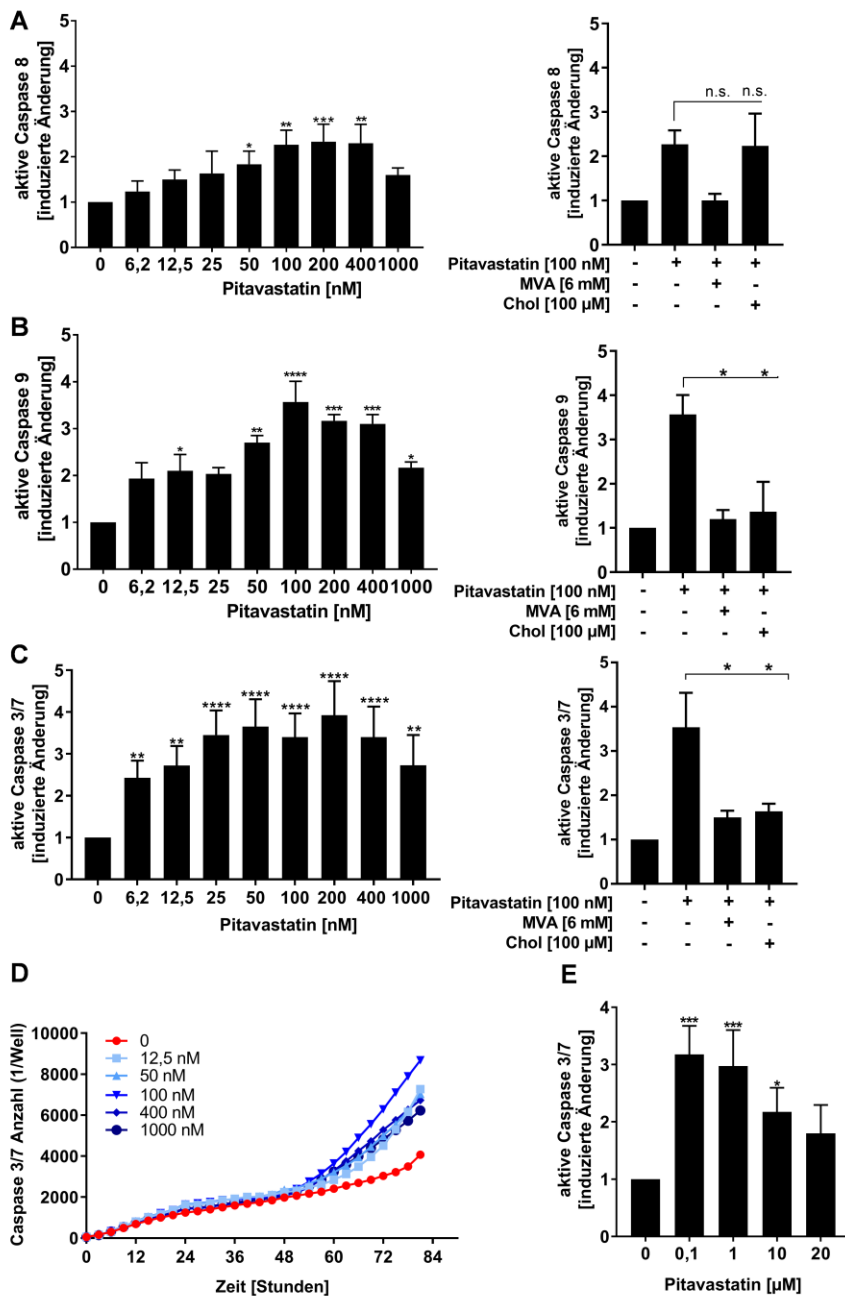


Abbildung 19: Effekt von Pitavastatin auf die Aktivierung von Caspasen. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen von Pitavastatin bzw. von 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 6 mM MVA oder 100 μM Cholesterol (Chol) inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit dem Caspase 8-Inhibitor FITC-IETD-FMK (A), dem Caspase-9 Inhibitor FITC-LEHD-FMK (B) oder dem CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detektions-Reagenz gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. (D) Für die kinetischen Analysen wurden humane T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen von Pitavastatin in Anwesenheit des Caspase-3/7 Reagenz inkubiert. Die kinetische Messung der Anzahl der Caspase-3/7-positiven T-Zellen erfolgte mittels IncuCyte S3 in 3 h-Intervallen über einen Zeitraum von 80 h. (E) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit hohen Konzentrationen von Pitavastatin inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit dem Caspase-3/7 Green Detektions-Reagenz gefärbt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; nicht signifikant (n.s.): $P \geq 0,05$).

3.3.4 Pitavastatin induziert in niedrigen Konzentrationen eine starke Phosphorylierung von ERK1/2

Es ist bekannt, dass MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase)-Signalwege eine Vielzahl biologischer Prozesse steuern. Auch bei der Regulation der Apoptose spielen sie eine wichtige Rolle [128]. Um eine mögliche Beteiligung von MAPK bei der Pitavastatin-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde in den folgenden Experimenten die Expression und Aktivierung von ERK1/2 analysiert. Dafür wurden T-Zellen 24 h bis 72 h mit Pitavastatin inkubiert und anschließend die Expression und Aktivierung von ERK1/2 mittels Western Blot und Immunfärbung quantifiziert (Abbildung 20A, C). Überraschenderweise konnte in diesen Untersuchungen eine starke, durch Pitavastatin vermittelte Phosphorylierung von ERK1/2 in den T-Zell-Lysaten beobachtet werden. Bereits nach 24 h Inkubationszeit zeigte sich ein leichter Anstieg der ERK-Phosphorylierung im Vergleich zu Kontrollkulturen (1,25-fach bei Behandlung mit 100 nM Pitavastatin). Nach einer Inkubationszeit von 48 h war dieser Effekt noch deutlicher zu erkennen. Die höchste ERK1/2-Phosphorylierung konnte nach 72-stündiger Inkubation mit 100 nM Pitavastatin (5,2-fach) beobachtet werden. Durch eine Koinkubation mit 6 mM MVA konnte diese Hyperphosphorylierung von ERK1/2 komplett verhindert werden. Die Zugabe von 100 µM Cholesterol führte teilweise zu einer verringerten ERK1/2-Phosphorylierung (Abbildung 20B).

Diese Ergebnisse waren sehr überraschend, da sich in der internationalen Literatur eine Vielzahl an Studien finden, welche von einer Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung durch Statine berichten [129–131]. In den meisten dieser Untersuchungen wurden die Statine aber in höheren mikromolaren Konzentrationen eingesetzt. Dieser Fakt unterstützt die Vermutung, dass die Wirkung der jeweiligen Statine auf die ERK1/2-Phosphorylierung abhängig von der eingesetzten Konzentration sein könnte.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden stimulierte T-Zellen für 48 h mit Pitavastatin-Konzentrationen von 0,1 - 20 µM behandelt und anschließend die ERK1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert (Abbildung 20D, E). In den Lysaten der T-Zellen, die mit hohen Pitavastatin-Konzentrationen behandelt wurden, war die ERK1/2-Phosphorylierung deutlich abgeschwächt (0,3-fach bei 20 µM im Vergleich zur Kontrolle), wohingegen sie bei der niedrigsten eingesetzten Konzentration von 0,1 µM um das 2,6-fache erhöht war.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Pitavastatin in geringen Dosen die Phosphorylierung von ERK1/2 induziert, höhere Konzentrationen aber den gegenteiligen Effekt vermitteln.

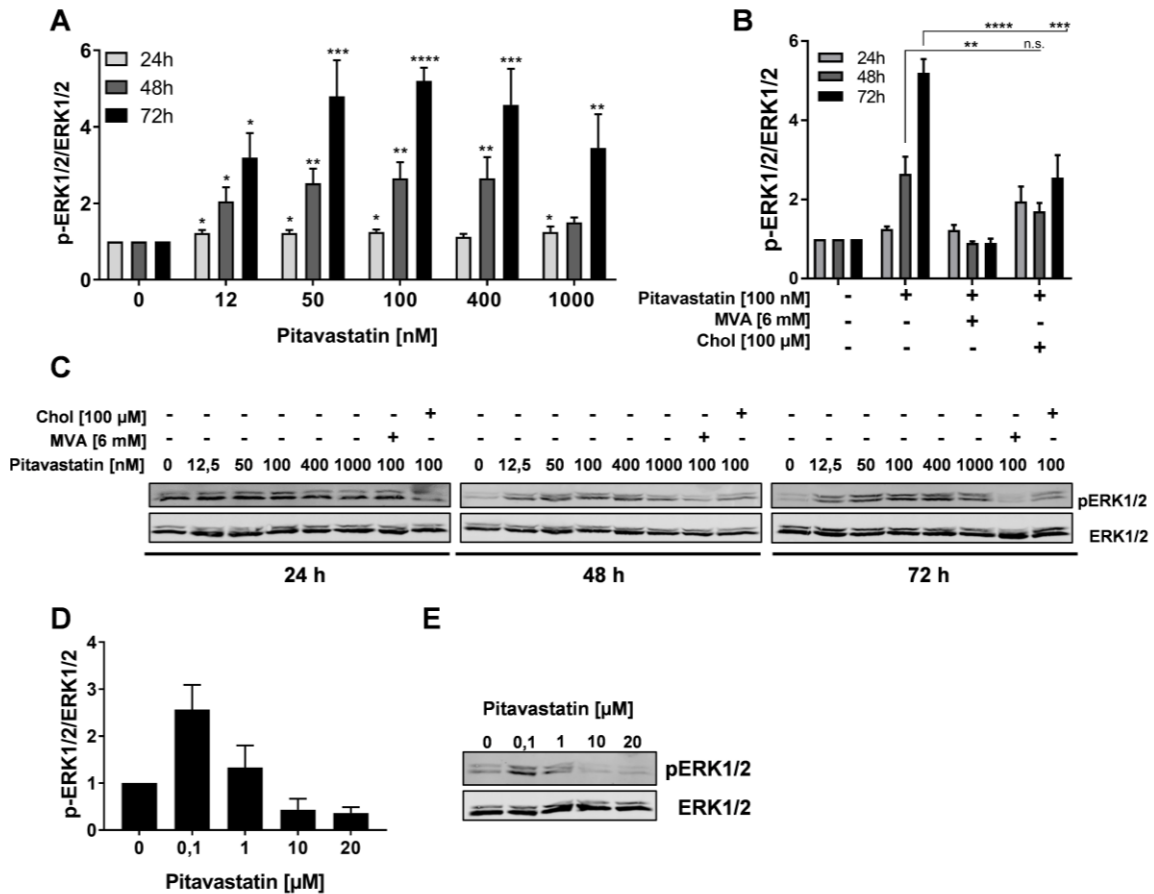


Abbildung 20: Pitavastatin induziert eine starke EKR1/2-Phosphorylierung. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit steigenden Konzentrationen Pitavastatin (A) oder 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 6 mM MVA oder 100 µM Cholesterol (Chol) inkubiert (B). Nach einer Inkubationszeit von 24 h, 48 h oder 72 h wurden die Zellen lysiert und die Lysate mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung analysiert. (A, B) Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Expression von pERK1/2 basierend auf der densitometrischen Auswertung (Mittelwert \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten). (C) Repräsentative Western Blot-Bilder von pERK1/2 und totalem ERK1/2. (D, E) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit hohen Konzentrationen von Pitavastatin inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mittels Western Blot analysiert. (D) Dargestellt ist die relative Quantifizierung der Expression von pERK1/2 basierend auf der densitometrischen Auswertung (Mittelwert \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten). (E) Repräsentative Western Blot-Bilder von pERK1/2 und totalem ERK1/2. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$; n.s.: $P \geq 0,05$).

3.3.5 Die Hyperphosphorylierung von ERK1/2 vermittelt die Pitavastatin-induzierte Apoptose

Um zu analysieren, ob die starke ERK1/2-Phosphorylierung verantwortlich für die Pitavastatin-induzierte Apoptose ist, wurde der spezifische MEK1/2-Inhibitor U0126 verwendet, welcher die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert. Dazu wurden die T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und parallel mit 100 nM Pitavastatin inkubiert. Der MEK1/2-Inhibitor wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zu den mit Pitavastatin-behandelten Zellen gegeben (0 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h und 48 h nach Aktivierung). Nach insgesamt 72-stündiger Inkubationszeit wurde die Aktivität der Caspase-3/7 mittels Durchflusszytometrie und die ERK1/2-Phosphorylierung mittels Western Blot bestimmt. Wie in Abbildung 21A dargestellt, induzierte Pitavastatin allein die Expression der aktiven Caspase-3/7 in den T-Zellen um das 3,8-fache. Eine Behandlung der T-Zellen mit U0126 allein hatte keine Auswirkungen auf die Expression der aktiven Caspase-3/7. Bei Zugabe von U0126 zu Pitavastatin-behandelten T-Zellen konnte eine reduzierte Expression der aktiven Caspase-3/7 beobachtet werden, wenn die Zugabe bis zu einem Zeitpunkt von 8 h nach Stimulation erfolgte. Wurde der MEK1/2-Inhibitor erst 24 h oder 48 h nach der Stimulation zugegeben, konnte die Induktion der Caspase-3/7 nicht mehr verhindert werden. Wie in Abbildung 21B zu erkennen, konnte die Phosphorylierung von ERK1/2 zu allen Zeitpunkten effektiv durch U0126 verhindert werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pitavastatin durch eine anhaltende ERK-Aktivierung Apoptose in frisch stimulierten T-Zellen induziert.

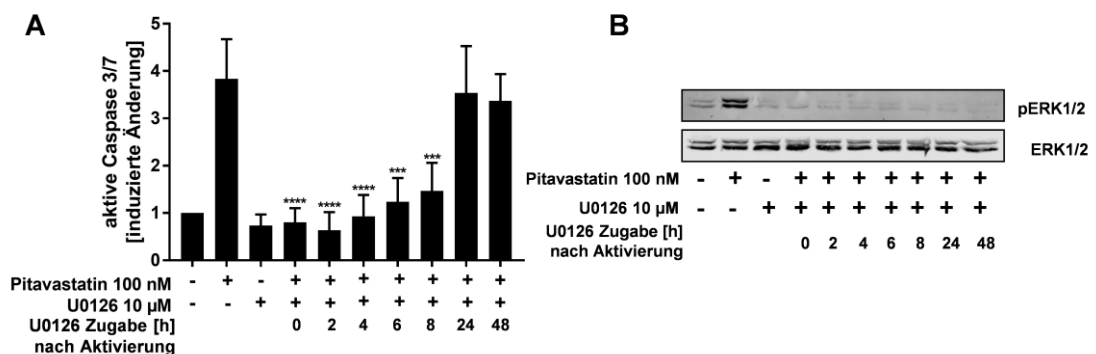


Abbildung 21: Die Hyperphosphorylierung von ERK1/2 vermittelt die Pitavastatin-induzierte Apoptose. Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und mit 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 10 µM des MEK1/2-Inhibitor U0126 inkubiert. Dieser wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aktivierung zu den Kulturen gegeben. (A) Nach 72 h wurden die Zellen mit dem CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detektions-Reagenz gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) Repräsentativer Western Blot von pERK1/2 und totalem ERK1/2.

3.3.6 Pitavastatin inhibiert die Proliferation von prä-aktivierten T-Zellen

Wie bereits erwähnt, spielen prä-aktivierte autoreaktive T-Zellen eine essentielle Rolle in der Immunpathogenese von Autoimmunerkrankungen. Deswegen sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Wirkung von Pitavastatin auf prä-aktivierte T-Zellen untersucht werden.

Dafür wurden humane T-Zellen mit anti-CD3/CD28-Antikörpern für 48 h stimuliert. Nach dieser 48-stündigen Stimulationszeit wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen (3,12 nM bis 400 nM) von Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pravastatin, Rosuvastatin, Simvastatin und Pitavastatin für weitere 24 h inkubiert. Die DNA-Synthese als Maß der Proliferation wurde mittels des [³H]-Thymidin-Zellproliferationsassays quantifiziert (Abbildung 22A). Pitavastatin inhibierte signifikant die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 48,5 nM. Für die anderen Statine konnten keine IC₅₀-Werte ermittelt werden (>400 nM). Weitere Experimente erbrachten den Befund, dass eine Supplementation von MVA die Proliferationshemmung komplett und eine Zugabe von Cholesterol teilweise aufheben konnte (Abbildung 22B).

Diese Daten zeigten, dass Pitavastatin im Gegensatz zu den anderen untersuchten Statinen auch eine signifikant hemmende Wirkung auf die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen hat. Wie für die frisch stimulierten T-Zellen scheint die Inhibierung der Proliferation auch für prä-aktivierte T-Zellen abhängig von der Cholesterol-Synthese und -Konzentration zu sein.

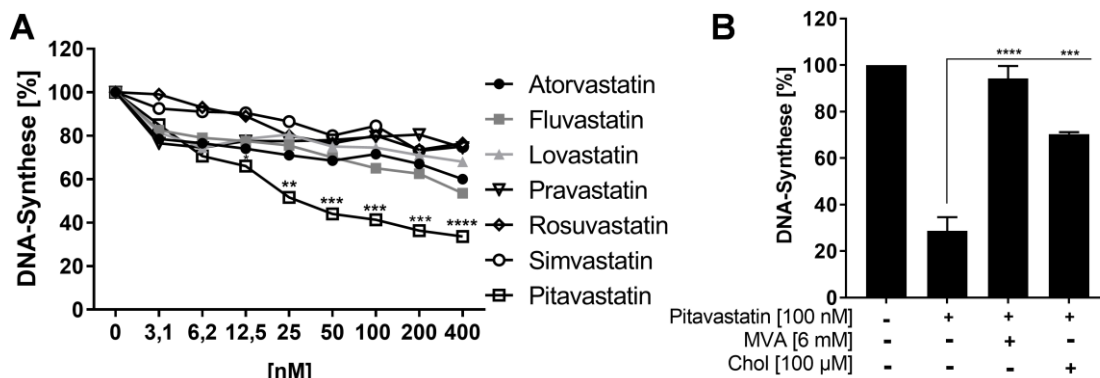


Abbildung 22: Pitavastatin inhibiert die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen. Ruhende humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern prä-aktiviert und mit steigenden Statin-Konzentrationen (A) oder 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 6 mM MVA oder 100 µM Cholesterol (Chol) inkubiert (B). Die Bestimmung der DNA-Synthese erfolgte nach 72 h mittels Messung des [³H]-Thymidin-Einbaus. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von 3 unabhängigen Experimenten in Relation zu stimulierten Kontrollzellen. (****: P ≤ 0,0001; ***: P ≤ 0,001; **: P ≤ 0,01).

3.3.7 Pitavastatin induziert Apoptose in prä-aktivierten T-Zellen

Um zu überprüfen, ob Pitavastatin auch in prä-aktivierten T-Zellen den Zelltod induziert, wurde zunächst eine AnnexinV/PI-Färbung durchgeführt. Dafür wurden die T-Zellen für einen Zeitraum von 48 h mit anti-CD3/CD28-Antikörpern stimuliert und danach für weitere 24 h mit steigenden Konzentrationen Pitavastatin inkubiert (Abbildung 23A, B). In allen getesteten Konzentrationen war ein signifikanter Anstieg der Rate an spät-apoptotischen T-Zellen zu beobachten. Der höchste Anstieg war von $14,5 \pm 0,9$ % in den Kontrollzellen auf $25,7 \pm 3,1$ % bei einer Konzentration von 200 nM Pitavastatin zu erkennen.

Um zu verifizieren, dass es sich tatsächlich um eine Apoptose-Induktion handelt, wurde zusätzlich die Expression der aktiven Caspase-3/7 mittels Durchflusszytometrie in prä-aktivierten T-Zellen quantifiziert. Wie in Abbildung 23C, links zu erkennen, induziert Pitavastatin die Expression der aktiven Caspase-3/7 in allen untersuchten Pitavastatin-Konzentrationen. Nach Behandlung mit 100 nM Pitavastatin war die Expression um das 3,4-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Supplementation mit MVA oder Cholesterol konnte die Aktivierung der Caspasen-3/7 effektiv verhindern (Abbildung 23C, rechts).

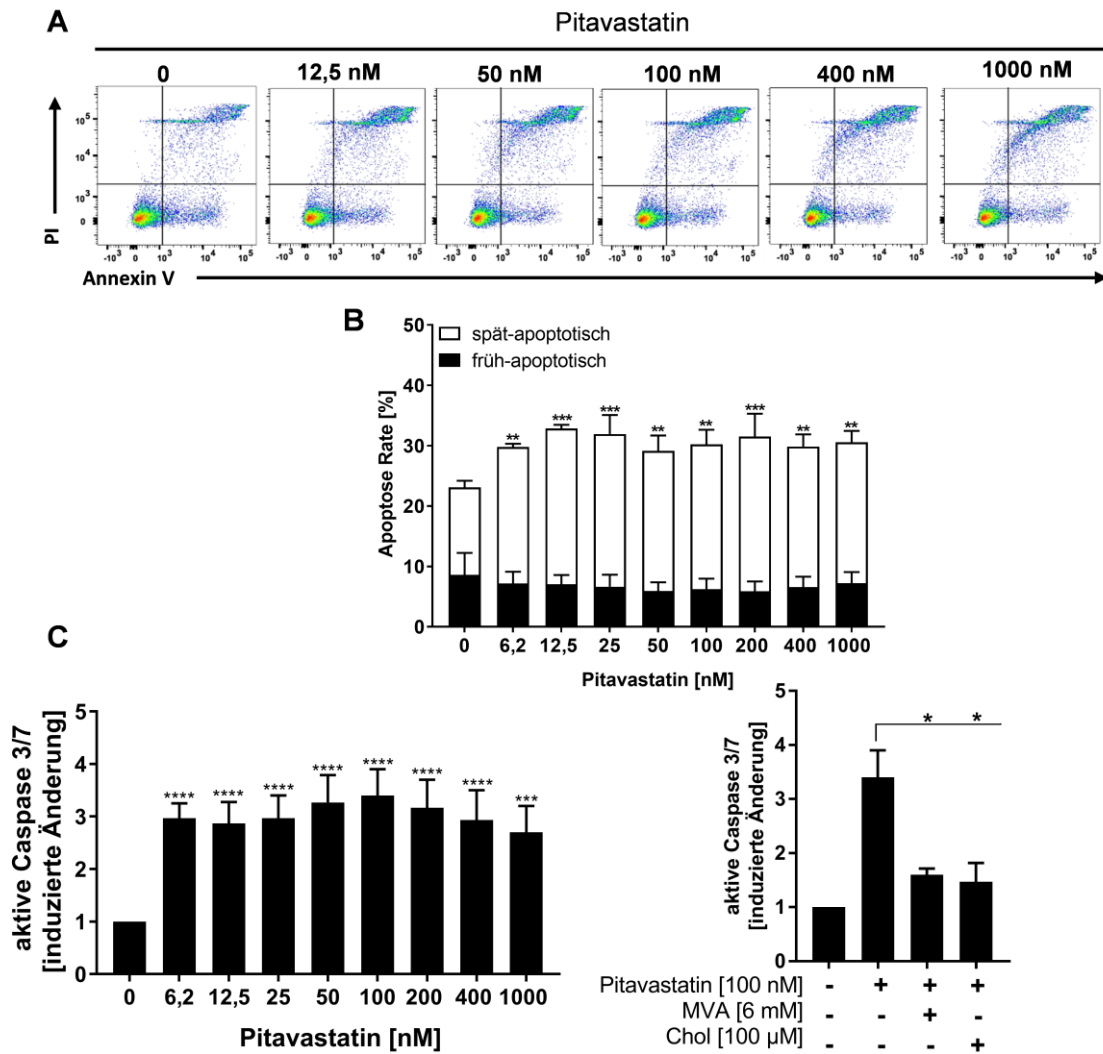


Abbildung 23: Pitavastatin induziert Apoptose in prä-aktivierten T-Zellen. Ruhende humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern prä-aktiviert und mit steigenden Statin-Konzentrationen inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit AnnexinV/PI gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Dot Plots und (B) quantitative Auswertung der früh- und spät-apoptotischen Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. (C) Humane T-Zellen wurden mit anti-CD3/CD28-Antikörpern prä-aktiviert und mit steigenden Konzentrationen Pitavastatin oder 100 nM Pitavastatin in An- oder Abwesenheit von 6 mM MVA oder 100 μM Cholesterol (Chol) inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen mit dem Caspase-3/7 Green Detektions-Reagenz gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten. (****: $P \leq 0,0001$; ***: $P \leq 0,001$; **: $P \leq 0,01$; *: $P \leq 0,05$).

4. Diskussion

Die Neuanwendung bereits zugelassener Medikamente für andere therapeutische Anwendungen ist im Gegensatz zur klassischen Arzneimittelentwicklung eine zeit- und kostensparende Alternative, welche auch mit einem vergleichsweise geringeren Risiko verbunden ist. Deshalb wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit insgesamt 786 bereits zugelassene Medikamente hinsichtlich einer möglichen immun-inhibitorischen Wirkung auf T-Zellen untersucht. Ziel war es, Medikamente zu identifizieren, welche zukünftig potenziell zur Behandlung von T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen genutzt werden könnten.

Sowohl Adefovir Dipivoxil als auch Pitavastatin konnten im durchgeführten Screening der 786 Substanzen als vielversprechende Kandidaten identifiziert werden.

4.1 Adefovir Dipivoxil

Die initiale Aktivierung und anschließende klonale Expansion autoreaktiver T-Zellen stellt einen Schlüsselvorgang in der Pathogenese verschiedener Autoimmunreaktionen dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADV effizient die Proliferation frisch stimulierter humaner T-Zellen *in vitro* inhibiert. Des Weiteren wiesen ADV-behandelte T-Zellen eine verminderte Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf. Diese Ergebnisse zeigen, dass ADV sowohl die Aktivierung als auch die klonale Expansion von T-Zellen inhibiert und somit auch die initiale Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen verhindern könnte.

Nach der Aktivierung differenzieren CD4⁺ T-Zellen zu verschiedenen T-Helferzellpopulationen, welche anhand der Sekretion definierter Zytokine unterschieden werden können. Für verschiedene Autoimmunerkrankungen konnte bereits eine Dominanz bestimmter T-Helferzellpopulationen nachgewiesen werden, welche die Immunpathogenese maßgeblich bestimmen [132]. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass ADV-behandelte T-Zellen *in vitro* eine verminderte Sekretion der Zytokine IFN- γ , IL-5 und IL-17 aufwiesen. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass ADV in der Lage ist, die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1-, Th2- und Th17-Zellen zu inhibieren. Diese Eigenschaft könnte zur Verbesserung von Symptomen bei Th1/Th17- oder Th2-dominierten Autoimmunreaktionen beitragen. Regulatorische T-Zellen können die initiale Aktivierung autoreaktiver T-Zellen unterbinden sowie Effektorzellen inaktivieren und spielen deshalb eine wichtige Rolle bei Autoimmunreaktionen [133]. Auch die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10, das u. a. von einigen regulatorischen T-Zellen produziert wird, war nach Behandlung mit ADV vermindert.

Aufgrund fehlender Symptome wird die initiale Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen in der frühen Phase in der Pathogenese von Autoimmunreaktionen häufig nicht erkannt. Erst die Reaktivierung von T-Zellen im Gewebe und die sich anschließende Entzündungsreaktion führt zur klinischen Manifestation [134]. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, dass ADV in nanomolaren Konzentrationen ebenfalls sehr effizient die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen inhibiert. Im Vergleich dazu übten die etablierten Immunsuppressiva Dexamethason und Cyclosporin A keine immunsuppressive Wirkung auf prä-aktivierte T-Zellen aus. Demnach könnte sich ADV auch zur Behandlung einer manifesten Autoimmunreaktion eignen.

Im Rahmen der hier durchgeführten Studie wurde Cladribin als Referenzsubstanz genutzt, da es wie ADV ein Adenosin-Analoga darstellt [135]. Cladribin wird als sicheres und effektives Medikament bei der Behandlung der schubförmigen Multiplen Sklerose eingesetzt [123]. Während Cladribin die Proliferation frisch stimulierter T-Zellen effizient inhibierte, konnte mit der Substanz nur eine schwache Wirkung auf prä-aktivierte T-Zellen beobachtet werden. Singh et al. berichteten, dass Cladribin in humanen Monozyten die Apoptose induzierte. Im Gegensatz dazu wiesen differenzierte dendritische Zellen, welche von Monozyten abstammen, eine Resistenz gegenüber einer Cladribin-Behandlung auf [136]. Auch diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADV möglicherweise eine stärkere immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen haben könnte als Cladribin. Obwohl beide Substanzen zu den Adenosin-Analoga zählen, unterscheidet sich der Wirkstoffmetabolismus der beiden Medikamente. Die Effektivität und Resistenz von Nukleosid-Analoga ist außerdem stark abhängig vom Zelltyp und der jeweiligen Zellzyklus-Phase [137,138].

ADV gehört zur Gruppe der azyklischen Nukleosid Phosphonate (ANPs) [139]. Es konnte gezeigt werden, dass ANPs immunmodulatorische Wirkungen aufweisen. Beispielsweise konnte nach Behandlung mit ANPs eine verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid in murinen Makrophagen und eine Modulation der Zytokinsekretion in Makrophagen und Hepatozyten beobachtet werden [76,140]. Weiterhin konnten Zidek et al. einen antiproliferativen Effekt auf Maus- und Ratten-Splenozyten nachweisen [78]. Außerdem zeigte ADV einen wirksamen Effekt im Tiermodell der Adjuvanz-induzierten Arthritis. In weiteren Untersuchungen konnten Zidek et al. eine anti-inflammatorische Wirkung von ADV nicht nur in der induktiven Phase, sondern auch in der etablierten Phase einer Arthritis demonstrieren [75].

Diese Beobachtungen stimmen mit den Resultaten dieser Arbeit überein, dass ADV die Proliferation sowohl frisch stimulierter als auch prä-aktivierter T-Zellen inhibieren kann.

ADV liegt als Diester-Proform vor, welche in Körperzellen rasch in Adefovir, ein Analog des Adenosinmonophosphats, umgewandelt wird [141]. Nach dem Eintritt in die Zelle

wird Adefovir von zellulären Adenosinmonophosphat (AMP)-Kinasen zu Adefovir-Diphosphat umgewandelt. Dieser aktive Metabolit besitzt in T-Zellen eine lange intrazelluläre Halbwertszeit von ca. 16 h [138]. Adefovir-Diphosphat wirkt als ein Analog des natürlichen Deoxynucleosidtriphosphates. In dieser Form dient es als Substrat und damit als Inhibitor der viralen Polymerase [63]. Es ist bekannt, dass Adefovir nicht nur auf virale Polymerasen eine hemmende Wirkung hat, sondern auch mit humanen Polymerasen interagieren kann. So dient Adefovir-Diphosphat auch als Substrat für die DNA-Polymerasen α , β und γ [142]. In Bezug darauf konnten Pisarev et al. bereits zeigen, dass Adefovir bei einer Konzentration von 100 μM die DNA-Replikation vollständig inhibiert [143]. Dies könnte ein möglicher Wirkmechanismus sein, mit dem ADV die Proliferation von T-Zellen hemmt.

Weiterhin ist bekannt, dass ADV nach dem Einbau in die DNA einen Kettenabbruch im wachsenden DNA-Strang verursacht, da dem Molekül der normale Desoxyribose-Ring fehlt [63]. Infolgedessen werden DNA-Reparaturmechanismen initiiert, welche die Phosphorylierung des Histons H2AX bedingen. Im Hinblick darauf konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl frisch stimulierte als auch prä-aktivierte T-Zellen nach ADV-Behandlung einen Anstieg von γH2AX -Foci aufweisen. Prä-aktivierte T-Zellen zeigten eine heterogene Verteilung von Zell-Populationen in allen Zellzyklusphasen auf. Es ist bekannt, dass Zellen in der S- und G₂-Phase bereits eine erhöhte Expression von γH2AX -Foci besitzen [144]. Darüber hinaus sind Zellen in der Replikationsphase besonders empfindlich gegenüber der Behandlung mit Nukleosid-Analoga. Aus diesem Grund reagierten prä-aktivierte T-Zellen sensitiver auf die ADV-Behandlung, was sich in einer signifikant erhöhten Anzahl von γH2AX -Foci bereits bei der niedrigsten verabreichten ADV-Dosis äußerte. Im Gegensatz dazu befand sich der Großteil der frisch stimulierten T-Zellen noch in der G₀/G₁-Phase. Daher konnten in diesem Zellsystem erhöhte γH2AX -Signale insbesondere bei höheren ADV-Konzentrationen festgestellt werden. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen beschrieben Khoury et al. DNA-Schäden in ADV-behandelten AML-Zelllinien [145]. Eine erhöhte Expression von γH2AX -Foci durch ADV-Behandlung konnte auch in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen nachgewiesen werden [146]. Außerdem induzierte ADV strukturelle Chromosomenschäden im *In-vitro*-Chromosomenabberationstest an humanen peripheren Lymphozyten. Dennoch wurde keine durch ADV induzierte erhöhte Tumorzinzidenz in Ratten und Mäusen festgestellt [147].

DNA-Schäden können zu einer Reihe von Folgeeffekten führen, beispielsweise zu einem Zellzyklus-Stopp, oder im Falle eines schwerwiegenden Schadens auch zur Apoptose. Das p53-Protein, welches in beide Vorgänge funktionell involviert ist, wird durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung, aktiviert [148]. Bei einem

Zellzyklus-Arrest in der G₁-Phase erhöht p53 die Transkription des Proteins p21, welches wiederum die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen inhibiert [148,149]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ADV sowohl in frisch stimulierten als auch in prä-aktivierten T-Zellen die Phosphorylierung und die Expression von p53 induziert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass p53 aufgrund der ADV-induzierten DNA-Schäden aktiviert wird. Kastan et al. berichteten von einer Akkumulation des p53-Proteins durch DNA-schädigende Substanzen [150]. In Übereinstimmung mit der p53-Aktivierung, konnte bei frisch stimulierten T-Zellen nach ADV-Behandlung ein Zellzyklus-Arrest in der G₀/G₁-Phase beobachtet werden.

Es ist bekannt, dass viele pro-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, wie PUMA, NOXA, Bad und Bim, direkt durch p53 reguliert werden [151]. Diese Gene bewirken eine verstärkte Sekretion von Cytochrom c aus den Mitochondrien ins Zellplasma. Cytochrom c wiederum aktiviert das Adapterprotein APAF-1, welches ebenfalls von p53 beeinflusst wird. Diese Prozesse führen zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9 und anschließend zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 [148]. In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Aktivität der Caspase-9 in frisch stimulierten T-Zellen, die mit ADV behandelt wurden, nachgewiesen werden. Des Weiteren induzierte ADV in frisch stimulierten sowie prä-aktivierten T-Zellen die Aktivierung der Effektorcaspasen-3 und -7 und nachfolgend die Apoptose. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis darauf, dass ADV in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen durch Aktivierung des p53-Signalweges den intrinsischen Apoptoseweg initiiert. In diesem Zusammenhang konnten Houry et al. bereits zeigen, dass ADV durch Transaktivierung pro-apoptotischer Gene und durch die Aktivierung der Caspasen-9 und -7 in AML-Zelllinien Apoptose induziert [145].

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass ADV eine potente Substanz ist, welche die Proliferation sowohl frisch stimulierter als auch prä-aktivierter T-Zellen in nanomolaren Konzentrationen inhibieren kann. ADV beeinträchtigt die T-Zell-Aktivierung und hemmt dosisabhängig die Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5) und Th17 (IL-17) Zytokin-Produktion. Außerdem konnte eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und eine erhöhte Phosphorylierung von p53 nachgewiesen werden. Dies führte durch Hochregulation von p21 zu einem Arrest in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus und zur Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges in frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen (Abbildung 24). Da die Sicherheit und Effizienz einer täglichen Dosis von 10 mg ADV in zahlreichen Studien an chronischen Hepatitis B-Patienten nachgewiesen wurde [152], könnte ADV ein neuer potentieller Kandidat für die Therapie bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen sein. Es sollten weiterführende prospektive Studien durchgeführt werden, um die Anwendung für ADV bei Autoimmunerkrankungen zu überprüfen.

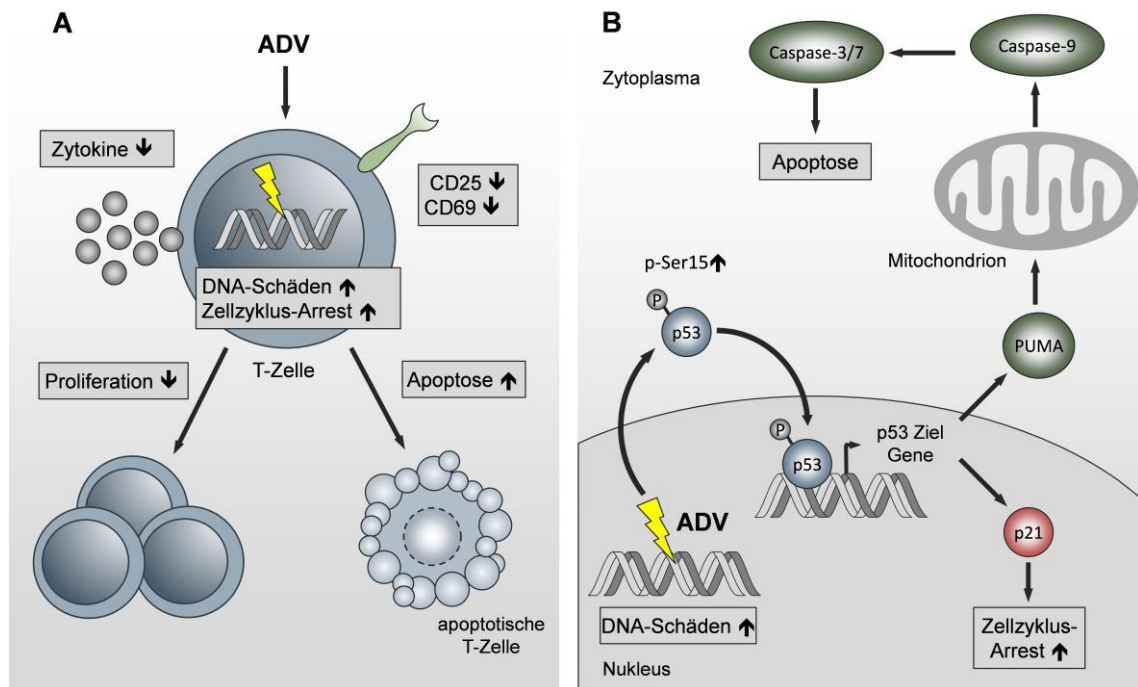


Abbildung 24: Schematische Darstellung der funktionellen Effekte von ADV auf T-Zellen.

(A) ADV hemmte die Proliferation frisch stimulierter und prä-aktivierter T-Zellen. Diese Proliferationshemmung war mit einer verminderten Expression von Aktivierungsmarkern und einer verringerten Zytokin-Produktion assoziiert. Außerdem konnte die Induktion von DNA-Schäden, ein Zellzyklus-Arrest und Apoptose beobachtet werden. (B) Die Behandlung mit ADV induzierte DNA-DSB, welche zu einer erhöhten Expression und Phosphorylierung von p53 führten. Als Reaktion auf die DNA-Schäden wurden p21 und PUMA durch p53 transaktiviert. Dies verursachte einen Zellzyklus-Arrest und induzierte den intrinsischen Apoptoseweg.

4.2 Pitavastatin

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde das Statin Pitavastatin als weiteres potentiell Medikament zur Neuanwendung bei T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen identifiziert.

Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, welche einen frühen und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese durch Konversion von HMG-CoA in Mevalonat katalysiert. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Cholesterolsynthese verhindert. Zusätzlich sind auch weitere pleiotrope Effekte von Statinen bekannt, welche unabhängig von deren cholesterolsenkender Wirkung sind [153]. In *In-vitro*- und *In-vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass Statine direkte anti-inflammatorische [154] und immunmodulatorische Effekte aufweisen [155].

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Statine die Proliferation frisch stimulierter T-Zellen hemmen. Dabei wies Pitavastatin, verglichen mit den anderen untersuchten Statinen, mit Abstand den stärksten Effekt auf. Pitavastatin war in der Lage, die Proliferation frisch stimulierter T-Zellen mit einem IC_{50} -Wert von 3,6 nM zu

inhibieren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit war eine hemmende Wirkung von Statinen auf die T-Zell-Proliferation bereits in vorangegangenen Studien dargestellt worden [156,157]. Insbesondere hervorzuheben ist, dass Pitavastatin in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht nur die Proliferation frisch stimulierter T-Zellen hemmte, sondern dieser Effekt auch bei prä-aktivierten T-Zellen beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen die besondere Eigenschaft von Pitavastatin, da bereits aktivierte autoreaktive T-Zellen auch eine Schlüsselrolle in der Immunpathogenese einiger Autoimmunerkrankungen einnehmen [114]. Wie oben bereits beschrieben, sind einige etablierte Immunsuppressiva wie z.B. Dexamethason und Cyclosporin A nicht in der Lage, die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen zu hemmen [115].

Die inhibitorische Wirkung von Pitavastatin auf die Proliferation prä-aktivierter T-Zellen stellt eine Besonderheit und potenziell auch einen pharmakologischen Vorteil von Pitavastatin gegenüber anderen Statinen dar, da eine Proliferationshemmung prä-aktivierter T-Zellen durch kein anderes Statin beobachtet werden konnte.

Die vielfältigen immunomodulatorischen Effekte von Statinen werden hauptsächlich über die Hemmung des Mevalonatweges vermittelt [158]. In dieser Arbeit konnte sowohl in frisch stimulierten als auch in prä-aktivierten T-Zellen die Inhibierung der Proliferation durch Supplementation von Mevalonat zu Pitavastatin-behandelten T-Zellen komplett aufgehoben werden. Dieser Befund macht deutlich, dass die Wirkung von Pitavastatin auf die Proliferation reversibel und eindeutig abhängig von der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen einiger anderer Studien [159–162] hatte die Zugabe von FPP oder GGPP keinen Einfluss auf die Pitavastatin-induzierte Proliferationshemmung. Dies lässt vermuten, dass die Inhibierung der Prenylierung keine entscheidende Rolle bei der Inhibierung der Proliferation spielt. Allerdings konnte durch Zugabe von Cholesterol die Pitavastatin-induzierte Inhibierung der Proliferation zumindest teilweise aufgehoben werden. Es ist bekannt, dass die Fettsäuresynthese, einschließlich der Cholesterolsynthese, in proliferierenden T-Zellen stark gesteigert ist [163]. Eine Hemmung der Cholesterolsynthese führt in stark proliferierenden Zellen wie T-Lymphozyten oder Fibroblasten zu einer verringerten DNA-Synthese-Rate [164,165].

Trotz der beobachteten Pitavastatin-vermittelten T-Zell-Proliferationshemmung konnten keine Effekte auf die Expression der Aktivierungsmarker CD69 und CD25 nachgewiesen werden. Die Expression des frühen Aktivierungsmarker CD69 wird durch eine Aktivierung des TZR induziert und ist abhängig von der Ras-Aktivierung [166], während die Expression von CD25 hauptsächlich durch die Aktivierung von NF-AT induziert wird [167]. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Pitavastatin keinen direkten Einfluss auf

die TZR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen hat. Im Gegensatz dazu konnten Blank et al. zeigen, dass die Behandlung von CD4⁺ T-Zellen mit Atorvastatin zu einer verminderten Expression von CD69 und CD25 führt [156]. Ghittoni et al. berichteten ebenfalls von einer verminderten Expression von CD69 und CD25 auf MNZ nach Behandlung mit Simvastatin [168]. Allerdings wurden in diesen Studien die Zellen für 24 h mit dem Statin vorinkubiert. Des Weiteren wurden im Vergleich zu dieser Promotionsarbeit wesentlich höhere Konzentrationen verwendet. Eine Vorinkubation mit einem Statin könnte in der T-Zelle zu einem Mangel an Cholesterolem und Isoprenoide führen, bevor diese aktiviert wird. Insbesondere das Fehlen der Isoprenoide könnte die Translokation bestimmter Signalmoleküle wie Ras zur Membran verhindern, was wiederum zu einer gestörten Funktion dieser Moleküle führt [169]. Dies könnte erklären, wieso in den genannten Studien die T-Zell-Aktivierung supprimiert war.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Dissertation in Anwesenheit von Pitavastatin eine verminderte Produktion des Th17-spezifischen Zytokins IL-17 sowie des von Treg sekretierten anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 festgestellt werden. Dieser Befund deckt sich mit Daten aus einer Studie im Mausmodell der Autoimmunmyokarditis. Von den Autoren wurde eine verminderte Produktion von IL-17 durch autoreaktive CD4⁺ T-Zellen beobachtet [170]. Eine *In-vitro*-Studie an humanen Th1-Zellen konnte ebenfalls eine verminderte IL-10-Produktion bei Zugabe von Statinen beobachten [171]. Die Produktion der Zytokine IFN- γ und IL-5 waren in dieser Studie allerdings nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu einer anderen Untersuchung, in der über eine verminderte IFN- γ -Produktion in PMA-stimulierten T-Zellen nach Pitavastatin-Behandlung berichtet wurde [129]. Eine Erklärung für die in der Literatur beobachteten Unterschiede bezüglich des Einflusses von Statinen auf die Zytokin-Produktion von T-Lymphozyten könnten die unterschiedlichen genetischen Hintergründe der in den Studien verwendeten Spender sein. Als einen weiteren Faktor müssen die Unterschiede in den eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen Statine in Betracht gezogen werden. Da Pitavastatin die Produktion der Zytokine IL-17 und IL-10 inhibierte, sollte in zukünftigen Studien weiter geklärt werden, ob Pitavastatin spezifisch die Proliferation von Th17- und Treg-Zellen hemmt. Beide Th-Subtypen können anhand der Expression von spezifischen Transkriptionsfaktoren unterschieden werden. Während Th17-Zellen ROR γ T exprimieren, zeichnen sich Treg durch die Expression von FoxP3 aus. Durch Anfärbung dieser Transkriptionsfaktoren und CFSE-Färbung könnte die Proliferation dieser beiden T-Zell-Subtypen durchflusszytometrisch unterschieden werden.

Da kein Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung zu beobachten war, wurde in weiteren Experimenten untersucht, ob Pitavastatin den Zellzyklus beeinflusst. Ein durch

Pitavastatin induzierter Zellzyklus-Arrest konnte nur in T-Zellen festgestellt werden, die mit hohen Pitavastatin-Konzentrationen behandelt wurden. In vorangegangenen Studien wurde bereits berichtet, dass Statine in T-Zellen einen Zellzyklus-Arrest durch die Induktion der Expression von p27^{kip1} und p21 vermitteln [172,173]. Diese Effekte von Statinen wurden auch für andere Zelltypen wie Tumorzellen beschrieben [174–176].

Allerdings wurde bei allen verabreichten Pitavastatin-Konzentrationen ein Anstieg der Apoptose-Rate sowohl in frisch-stimulierten als auch in prä-aktivierten T-Zellen beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass der Wirkmechanismus in beiden Zellsystemen gleich ist. Samson et al. und Brinkkoetter et al. berichteten bereits, dass Statine in humanen CD4⁺ T-Zellen Apoptose induzieren [172,177]. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Statine in verschiedenen Tumorzelllinien, wie zum Beispiel Lymphomzellen [178], Pankreaskarzinom-Zellen [179], Cholangiokarzinom-Zellen [130] und Glioblastom-Zelllinien [180] Apoptose induzieren. Somit kann geschlossen werden, dass die beobachtete Hemmung der T-Zell-Proliferation durch Pitavastatin höchstwahrscheinlich auf eine erhöhte Apoptose zurückzuführen ist.

Apoptose kann in Zellen durch verschiedene Stimuli induziert werden. Abhängig von diesen Stimuli existieren zwei Hauptsignalwege der Apoptose: der extrinsische Weg, an dem vor allen Dingen die Caspase-8 beteiligt ist und der intrinsische oder mitochondriale Apoptoseweg, welcher zur Aktivierung der Caspase-9 und der nachgeschalteten Caspasen-3 und -7 führt [181,182].

Die Behandlung frisch stimulierter T-Zellen mit Pitavastatin führte zu einer erhöhten Expression der aktiven Caspasen-8, -9 und -3/7. Die Pitavastatin-induzierte Apoptose wird demnach sowohl durch den extrinsischen als auch durch den intrinsischen Apoptoseweg vermittelt. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in humanen CD4⁺ T-Zellen [177] und Hepatozyten [183] beobachtet. In diesen Zellsystemen führte die Behandlung mit Statinen zu einer Aktivierung der Caspasen-8, -9 und -3. Eine Aktivierung der Caspase-9 und der Caspasen-3 und -7 durch Statine wurde auch in Glioblastom-Zellen, Nicht-kleinzelligen Lungenkrebs-Zellen und Brustkrebs-Zellen beobachtet [184]. Um den Einfluss von Pitavastatin auf einzelne Apoptose-Mechanismen weiter zu differenzieren, sind weitere Analysen notwendig. So könnte die Expression bestimmter Todesrezeptoren wie TNF-R1 oder TRAIL-1 bestimmt werden, um festzustellen ob Pitavastatin diese induziert. Weiterhin könnte die Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien untersucht werden. Außerdem wären Expressionsanalysen des pro-apoptotischen Proteins Bid interessant, da dieses als Schnittstelle zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweg fungiert [185].

Eine Zugabe von Mevalonat konnte die Pitavastatin-induzierte Aktivierung der Caspasen-9 und -3/7 verhindern. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Blockierung des Mevalonat-Weges die apoptotische Kaskade des intrinsischen Apoptoseweges auslöst. Durch Zugabe von Cholesterol konnte die Pitavastatin-induzierte Aktivierung der Caspasen-9 und -3/7 ebenfalls verhindert werden, was vermuten lässt, dass die Pitavastatin-induzierte Apoptose auf einen Mangel an Cholesterol zurückzuführen ist. Die kinetische Analyse der Caspase-3/7-Aktivierung zeigte einen Anstieg der aktiven Caspasen-3/7 erst nach 50 h. Diese Befunde deuten auf einen verzögerten Mechanismus in der Apoptose-Induktion hin und stimmen mit Ergebnissen von Kuzyk et al. überein. Diese Autoren konnten zeigen, dass Simvastatin in Neuroblastom-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt Apoptose induziert [186].

Interessanterweise konnte die stärkste Apoptose-Induktion in T-Zellen beobachtet werden, welche mit niedrigen Pitavastatin-Konzentrationen unter 1 μM inkubiert wurden. Bei Behandlung der T-Zellen mit höheren Pitavastatin-Konzentrationen war die Apoptose-Induktion deutlich abgeschwächt. Dies deutet auf eine biphasische Wirkung von Pitavastatin hin.

Konzentrationsabhängige Wirkungen von Pitavastatin wurden bereits in anderen Zusammenhängen beobachtet. Wang et al. konnten zeigen, dass niedrige Dosen von Pitavastatin in Endothelzellen die Expression von eNOS aktivierten, während höhere Konzentrationen eNOS hemmten [187]. Ebenfalls erhöhten niedrige Konzentrationen von Pitavastatin die Migration, Proliferation und Viabilität in vaskularen Endothelzellen, wohingegen hohe Konzentrationen diese Funktionen inhibierten [188]. In zukünftigen Untersuchungen sollte abgeklärt werden, ob höhere Pitavastatin-Konzentrationen statt zu Apoptose zu einem Zellzyklus-Arrest führen könnten. In diesem Zusammenhang könnte auch die Expression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p27kip1 und p21 untersucht werden.

Der Ras/Raf/Extracellular signal-regulated kinase (ERK)-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei einer Vielzahl zellulärer Funktionen wie beispielsweise Zell-Proliferation oder Zell-Überleben [189]. Der Einfluss von Statinen auf diesen Signalweg wurde in der Vergangenheit von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht.

Ghittoni et al. berichteten, dass Simvastatin die Aktivierung von ERK1/2 in T-Zellen inhibiert [168]. Eine Statin-induzierte Hemmung der ERK1/2-Aktivierung wurde ebenfalls in anderen Zelltypen, wie z.B. Glioblastom- oder Cholangiokarzinom-Zellen beobachtet [129–131].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch nach Behandlung von frisch-stimulierten T-Zellen mit Pitavastatin eine anhaltende Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt. Dieser Effekt war am deutlichsten nach 72 h zu beobachten, was darauf hindeutet, dass es sich um

eine verzögerte ERK-Aktivierung handelt, welche unabhängig vom initialen TZR-Signal abläuft. Ähnlich zur Apoptose-Induktion konnte die stärkste ERK1/2-Phosphorylierung in T-Zellen beobachtet werden, welche mit niedrigen Pitavastatin-Konzentrationen behandelt wurden, während die Behandlung mit hohen Konzentrationen zu einer Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung führte.

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die anhaltende Phosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich für die Pitavastatin-induzierte Apoptose in T-Zellen sein könnte. Auch das Ergebnis, dass die durch Pitavastatin-induzierte Apoptose durch Inhibierung der MEK-Aktivität mit dem spezifischen Inhibitor U0126 effizient verhindert werden konnte, zeigt, dass die Apoptose-Induktion abhängig von der ERK1/2-Phosphorylierung durch die Ras/Raf/MEK-Kaskade ist.

Obwohl ERK1/2 allgemein als überlebensfördernder Faktor der MAP-Kinase-Familie bekannt ist, deutet eine wachsende Anzahl an Arbeiten darauf hin, dass die ERK-Aktivierung unter bestimmten Bedingungen auch Zelltod induzieren kann [190]. Eine pro-apoptotische Funktion für ERK ist bisher bekannt für Antitumor-Verbindungen wie Quercetin [191] oder Taxol [192]. Je nach Stimulus und Zelltyp kann die ERK-Aktivierung mit dem intrinsischen [193] oder dem extrinsischen Apoptoseweg [194] assoziiert sein. Es wurde gezeigt, dass die ERK-Aktivierung einen direkten Einfluss auf die mitochondriale Funktion haben kann, indem sie das Membranpotential verringert, was zu einer Freisetzung von Cytochrom c und einer anschließenden Aktivierung der Caspasen-9 und -3 führt [195]. Die ERK-Aktivität kann direkt die Expression pro-apoptotischer Proteine wie Bax [196] und Bak [197] beeinflussen. Li et al. berichteten, dass die durch ERK aktivierte Caspase-8 die Freisetzung von Cytochrom c durch proteolytische Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bid induziert [198]. Da in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, dass die pro-apoptotische Aktivierung von ERK1/2 auch abhängig von dessen Lokalisation ist [199], sollte diese in zukünftigen Arbeiten weiter im Detail untersucht werden. Durch eine Immunfluoreszenzfärbung und mikroskopische Analyse könnte geprüft werden, ob sich ERK nach Inkubation von T-Zellen mit Pitavastatin in der Zellmembran, dem Zytosol oder in der Mitochondrien-Membran befindet.

Supplementation mit Mevalonat oder Cholesterol konnte die Pitavastatin-induzierte Hyperphosphorylierung von ERK1/2 verhindern. Dies deutet auf einen Cholesterol-abhängigen Effekt hin. Cholesterol hat einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung, da es die Dynamik von Proteinen in den *Lipid Rafts* verändern kann, indem es beispielsweise die Kolokalisation von Rezeptoren verringert, welche für die Signalübertragung wichtig sind. Es ist bekannt, dass die Funktion der *Lipid Rafts* abhängig von der Cholesterol-Konzentration ist [200, 201]. Zhuang et al. konnten zeigen, dass Simvastatin die Cholesterol-Konzentration in den *Lipid Rafts* senkte, was zu einer veränderten

Signalübertragung führte und Apoptose induzierte [202]. Interessanterweise konnten Furuchi und Anderson zeigen, dass eine Verringerung des Membran-Cholesterols zu einer erheblichen Phosphorylierung von ERK1/2 im Zytosol führt [203]. Es sollte deswegen zukünftig auch untersucht werden, inwieweit Pitavastatin die Cholesterolkonzentration der Zellen beeinflusst. Hierzu könnte geprüft werden, ob die Cholesterolkonzentration in der gesamten Zelle vermindert ist oder ob dieser Effekt speziell in der Zellmembran oder den *Lipid Rafts* auftritt.

Zusammenfassend konnte Pitavastatin im Rahmen dieser Arbeit als eine sehr potente Statin-Verbindung identifiziert werden, welche *in vitro* die Proliferation sowohl frisch stimulierter als auch prä-aktivierter T-Zellen in geringen nanomolaren Dosen hemmt. Diese Proliferationshemmung ist auf eine erhöhte Apoptose zurückzuführen, die insbesondere bei Behandlung von T-Zellen mit niedrigen Pitavastatin-Konzentrationen unter 1 μM beobachtet werden konnte. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Cholesterolkonzentration in der Membran verringert, was zu einer Hyperphosphorylierung von ERK1/2 führt. Die anhaltende Aktivierung von ERK1/2 induziert die Aktivierung der Caspase-9 und Caspasen-3/7, was letztendlich zur Apoptose führt (Abbildung 25).

Aufgrund der Tatsache, dass Pitavastatin im Vergleich zu anderen Statinen ein günstigeres pharmakologisches Profil aufweist [85] und die Sicherheit und Wirksamkeit der Substanz in mehreren Studien gezeigt wurde [204], könnte Pitavastatin ein potentieller Kandidat für die Therapie von T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen sein. In prospektiven Studien sollte die mögliche Anwendung von Pitavastatin bei diesen Krankheiten geprüft werden.

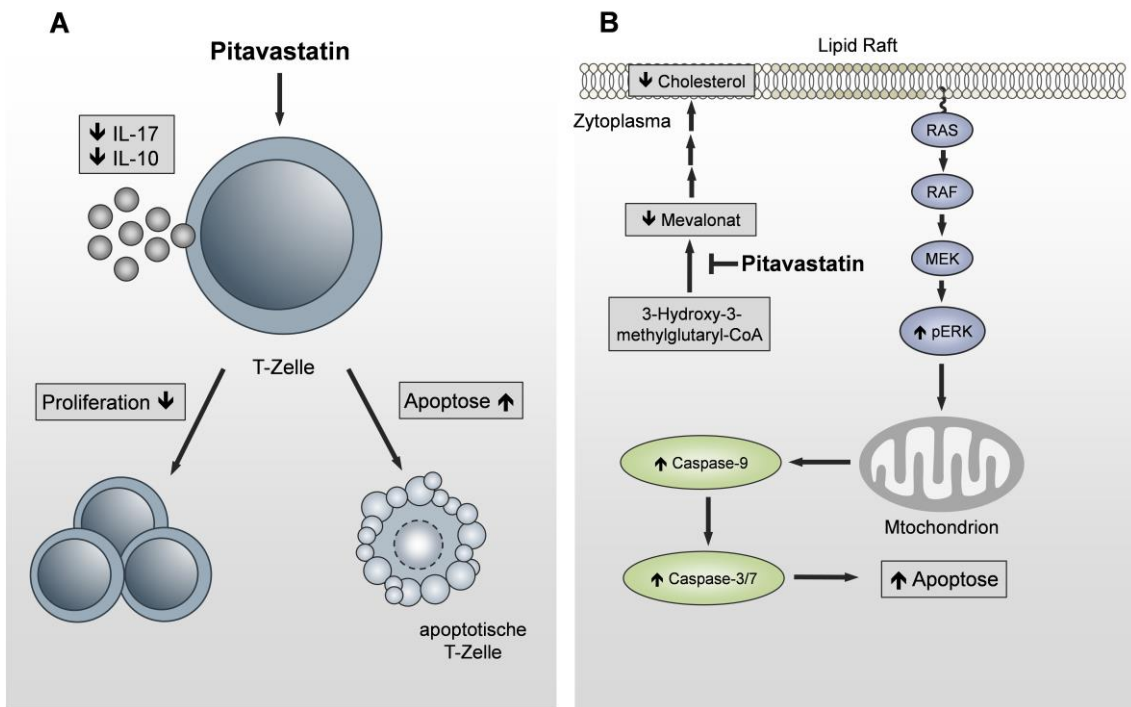


Abbildung 25: Schematische Darstellung der funktionellen Wirkungen von Pitavastatin auf T-Zellen. (A) Pitavastatin inhibiert die Proliferation von frisch stimulierten und prä-aktivierten T-Zellen. Die Hemmung der Proliferation ist mit einer verringerten Produktion der Zytokine IL-17 und IL-10 sowie einer erhöhten Apoptose-Induktion verbunden. (B) Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase wird die Cholesterolkonzentration in den *Lipid Rafts* verringert, was zu einer Hyperphosphorylierung von ERK1/2 führt. Diese anhaltende ERK1/2-Phosphorylierung induziert die Aktivierung der Caspase-9 und Caspasen-3/7, was die Apoptose der Zelle bewirkt.

4.3 Ausblick

In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass die Medikamente ADV und Pitavastatin potentielle Kandidaten für eine Neuanwendung der Therapie T-Zell-vermittelter Autoimmunreaktionen sein könnten. Weiterführende Studien sind notwendig, um die vorgelegten Ergebnisse weiter zu erhärten.

Die Wirkung von ADV und Pitavastatin wurde im Rahmen dieser Arbeit an T-Zellen gesunder Spender untersucht. Es ist bekannt, dass T-Zellen gesunder Spender sich von T-Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen unterscheiden [205]. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen die immunsuppressive Wirkung von ADV und Pitavastatin auch an T-Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen bestätigt werden.

Weiterhin sollte der Einfluss von ADV und Pitavastatin auch in Tiermodellen, wie zum Beispiel der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) als einem Tiermodell der Multiplen Sklerose überprüft werden. Dadurch könnten zusätzliche Erkenntnisse über die *In-vivo*-Wirksamkeit von ADV und Pitavastatin gewonnen werden. Auch könnte der mögliche therapeutische Effekt dieser Substanzen abgeschätzt werden.

Darüber hinaus sind prospektive Studien an Patienten mit entsprechenden Erkrankungen notwendig, um abschließend klären zu können, ob ADV und Pitavastatin eine Anwendung bei T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen finden könnten.

Zusammenfassung

Die Neuanwendung bereits zugelassener Medikamente für andere therapeutische Indikationen ist im Gegensatz zur klassischen Arzneimittelentwicklung eine zeit-, risiko- und kostensparende Strategie.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde mit einem zellulären Screening-System die Wirkung von 786 FDA-zugelassenen Medikamenten analysiert und nach Kandidaten gesucht, welche potenziell eine Neuanwendung in der Behandlung von T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen finden können.

Dazu wurden die Medikamente an frisch stimulierten und prä-aktivierten MNZ bezüglich ihrer proliferationshemmenden Wirkung getestet. Im Rahmen dieses Screenings konnten die beiden Medikamente Adefovir Dipivoxil (ADV), zugelassen zur Behandlung der Hepatitis B, und das Statin Pitavastatin als vielversprechende immunsuppressive Kandidaten identifiziert werden.

Weiterhin folgten Untersuchungen zum Einfluss von ADV und Pitavastatin auf die Proliferation, Aktivierung, Zytokinproduktion, Viabilität und Apoptose frisch stimulierter sowie prä-aktivierter humaner T-Zellen.

ADV konnte die Proliferation in beiden T-Zell-Stimulationssystemen dosisabhängig supprimieren (mittlere inhibitorische Konzentrationen [IC₅₀]: 63,12 nM für frisch stimulierte T-Zellen und 364,8 nM für prä-aktivierte T-Zellen). Darüber hinaus inhibierte ADV die T-Zell-Aktivierung und dosisabhängig auch die Zytokinproduktion von Th1 (IFN- γ)-, Th2 (IL-5)- und Th17 (IL-17)-Zytokinen. Eine Behandlung der T-Zellen mit ADV induzierte DNA-Doppelstrangbrüche, sowie nachfolgend die Phosphorylierung von p53-Phospho-Ser15. Als Folge der DNA-Schädigung wurden p21 und PUMA durch p53 transaktiviert, was einerseits zu einem Zellzyklus-Arrest in der G₀/G₁-Phase führte und andererseits den intrinsischen Apoptoseweg induzierte.

Auch Pitavastatin inhibierte die Proliferation in beiden T-Zell-Stimulationssystemen dosisabhängig ([IC₅₀]: 3,6 nM für frisch stimulierte T-Zellen und 48,5 nM für prä-aktivierte T-Zellen). Die Substanz zeigte keinen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung, suppressierte jedoch die Th17 (IL-17)- und IL-10-Zytokinproduktion. Die Behandlung von T-Zellen mit hohen Pitavastatin-Konzentrationen führte zu einem Zellzyklus-Arrest, während niedrige Dosen (<1 μ M) Apoptose induzierten. Die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase mit niedrigen Pitavastatin-Konzentrationen bewirkte eine Hyperphosphorylierung von ERK1/2, die zu einer Aktivierung der Caspasen-9 und -3/7 führte, welche letztendlich Apoptose vermittelten.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass ADV und Pitavastatin neue potenzielle Kandidaten für eine Behandlung von T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen sein könnten. Prospektive Studien sollten durchgeführt werden, um die mögliche therapeutische Anwendung von ADV und Pitavastatin bei Patienten mit diesen Krankheiten zu bestätigen.

Summary

Repositioning of approved drugs for identifying new therapeutic purposes is an alternative, time and cost saving strategy to classical drug development.

In this study, a screening of a library of 786 FDA-approved drugs was performed to detect compounds, which can potentially be repurposed for treatment of T cell-mediated autoimmune diseases.

Investigating the effect of these diverse substances on mitogen-stimulated proliferation of both, freshly stimulated and pre-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), we identified Adefovir Dipivoxil (ADV), which is approved for the treatment of hepatitis B, and Pitavastatin, a statin drug, as very potent immunosuppressive compounds.

The influence of ADV and Pitavastatin on proliferation, activation, cytokine production, viability and apoptosis of freshly stimulated as well as pre-activated human T cells was analysed.

It was observed that ADV was capable of suppressing the proliferation in both T cell stimulation systems in a dose-dependent manner (50% inhibition [IC_{50}]: 63.12 nM and 364.8 nM for freshly stimulated T cells and pre-activated T cells, respectively). Moreover, the drug impaired T cell activation and inhibited Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5), and Th17 (IL-17) cytokine production dose-dependently. Furthermore, ADV treatment induced DNA double-strand breaks, which led to an increase of p53-phospho-Ser15 expression. In response to DNA damage p21 and PUMA were transactivated by p53. Subsequently, this caused cell cycle arrest at G₀/G₁ phase and activation of the intrinsic apoptosis pathway.

Pitavastatin was capable of suppressing the proliferation in both T cell stimulation systems in a dose-dependent manner (50% inhibition [IC_{50}]: 3.6 nM and 48.5 nM for freshly stimulated T cells and pre-activated T cells, respectively). Pitavastatin had no influence on T cell activation, but inhibited Th17 (IL-17) and IL-10 cytokine production. Pitavastatin treatment with high doses resulted in cell cycle arrest while low doses (< 1 μ M) induced apoptosis. Inhibition of HMG-CoA reductase by Pitavastatin induced a hyperphosphorylation of ERK1/2 at low concentrations, leading to activation of caspase-9 and 3/7 which subsequently induces apoptosis.

These results indicated that ADV and Pitavastatin could be new potential candidates for treatment of T cell-mediated autoimmune diseases. Prospective studies should be

performed to verify this possible therapeutic application of ADV and Pitavastatin for such disorders.

Literaturverzeichnis

- [1] F. Horn, *Biochemie des Menschen*, 4. Auflage, Thieme, 2009.
- [2] K. Murphy, P. Travers, M. Walport, *Janeway Immunologie*, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [3] J.D. Fraser, B.A. Irving, G.R. Crabtree, A. Weiss, Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28, *Science* 251 (1991) 313–316. <https://doi.org/10.1126/science.1846244>.
- [4] L.H. Boise, A.J. Minn, P.J. Noel, C.H. June, M.A. Accavitti, T. Lindsten, C.B. Thompson, CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL, *Immunity*. 3 (1995) 87–98. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90161-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90161-2).
- [5] C. Cerdan, Y. Martin, M. Courcoul, H. Brailly, C. Mawas, F. Birg, D. Olive, Prolonged IL-2 receptor alpha/CD25 expression after T cell activation via the adhesion molecules CD2 and CD28. Demonstration of combined transcriptional and post-transcriptional regulation., *J. Immunol.* 149 (1992) 2255–2261.
- [6] K. Sugamura, T. Takeshita, H. Asao, S. Kumaki, K. Ohbo, K. Ohtani, M. Nakamura, The IL-2/IL-2 Receptor System: Involvement of a Novel Receptor Subunit, γ Chain, in Growth Signal Transduction, *Tohoku J. Exp. Med.* 168 (1992) 231–237. <https://doi.org/10.1620/tjem.168.231>.
- [7] L.P. Kane, J. Lin, A. Weiss, Signal transduction by the TCR for antigen, *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000) 242–249. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(00\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(00)00083-2).
- [8] L.E. Samelson, Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: The role of adapter proteins, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 371–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.092601.111357>.
- [9] M. Huse, The T-cell-receptor signalling network, *J. Cell Sci.* 122 (2009) 1269–1273. <https://doi.org/10.1242/jcs.042762>.
- [10] M. Oh-hora, A. Rao, Calcium signaling in lymphocytes, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.004>.
- [11] S. Paul, B.C. Schaefer, A new look at T cell receptor signaling to nuclear factor- κ B, *Trends Immunol.* 34 (2013) 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.02.002>.
- [12] I. Štefanová, B. Hemmer, M. Vergelli, R. Martin, W.E. Biddison, R.N. Germain, TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 248–254. <https://doi.org/10.1038/ni895>.
- [13] D.A. Cantrell, K.A. Smith, Transient expression of interleukin 2 receptors: Consequences for T cell growth, *J. Exp. Med.* 158 (1983) 1895–1911. <https://doi.org/10.1084/jem.158.6.1895>.
- [14] E.C. Jury, F. Flores-Borja, P.S. Kabouridis, Lipid rafts in T cell signalling and disease, *Semin. Cell Dev. Biol.* 18 (2007) 608–615. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.08.002>.
- [15] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*. 387 (1997) 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- [16] K. Simons, E. Ikonen, Functional rafts in cell membranes, *Nature*. 387 (1997) 569–572. <https://doi.org/10.1038/42408>.
- [17] D. Zacharias, J. Violin, A. Newton, R. Tsien, Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells, *Science*. 296 (2002) 913–916. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1068539>.

- [18] A. Pralle, P. Keller, E. Florin, K. Simons, J. Hörber, Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 997–1007. <https://doi.org/10.1083/JCB.148.5.997>.
- [19] D. Depoil, R. Zaru, M. Guiraud, A. Chaveau, J. Harrigue, G. Bismuth, C. Utzny, S. Müller, S. Valitutti, Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization, *Immunity.* 22 (2005) 185–194. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2004.12.010>.
- [20] P. Janes, S. Ley, A. Magee, Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 447–461. <https://doi.org/10.1083/JCB.147.2.447>.
- [21] E.C. Jury, F.-B. Fabian, P.S. Kabouridis, Lipid rafts in T cell signalling and disease, *Semin. Cell Dev. Biol.* 18 (2007) 608. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2007.08.002>.
- [22] D. Nguyen, J. Espinoza, D. Taub, Cellular cholesterol enrichment impairs T cell activation and chemotaxis, *Mech. Ageing Dev.* 125 (2004) 641–650. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2004.08.002>.
- [23] Q. Zhang, D.A.A. Vignali, Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity, *Immunity.* 44 (2016) 1034–1051. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.017>.
- [24] J.M. Anaya, Common mechanisms of autoimmune diseases (the autoimmune tautology), *Autoimmun. Rev.* 11 (2012) 781–784. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.02.002>.
- [25] C.C. Goodnow, Multistep Pathogenesis of Autoimmune Disease, *Cell.* 130 (2007) 25–35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.033>.
- [26] D. Fairweather, S. Frisancho-Kiss, N.R. Rose, Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective, *Am. J. Pathol.* 173 (2008) 600–609. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.071008>.
- [27] F. Ceccarelli, N. Agmon-Levin, C. Perricone, Genetic Factors of Autoimmune Diseases 2017, *J. Immunol. Res.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/2789242>.
- [28] F. Ramondetti, S. Sacco, M. Comelli, G. Bruno, A. Falorni, A. Iannilli, G. d’Annunzio, D. Iafusco, M. Songini, S. Toni, V. Cherubini, F. Carle, F. Cerutti, G. Novelli, L. Bianchi, S. Piffer, R. Lorini, N. Minuto, F. Roncarolo, M.T. Tenconi, B. Predieri, M.F. Reali, A. Medici, M. Biagioni, R. Gesuita, F. Santeusano, G. De Giorgi, N. Visalli, C. Bizzarri, F. Chiarelli, S. Tumini, F. Prisco, S. Confetto, P. Frongia, A.M. Marinaro, F. Chiarelli, S. Tumini, F. Prisco, S. Confetto, P. Frongia, A.M. Marinaro, Type 1 diabetes and measles, mumps and rubella childhood infections within the Italian Insulin-dependent Diabetes Registry, *Diabet. Med.* 29 (2012) 761–766. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03529.x>.
- [29] S. Masala, D. Paccagnini, D. Cossu, V. Brezar, A. Pacifico, N. Ahmed, R. Mallone, L.A. Sechi, Antibodies recognizing mycobacterium avium paratuberculosis epitopes cross-react with the beta-cell antigen znt8 in sardinian type 1 diabetic patients, *PLoS One.* 6 (2011) e26931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026931>.
- [30] L. Klein, B. Kyewski, P.M. Allen, K.A. Hogquist, Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don’t see), *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 377–391. <https://doi.org/10.1038/nri3667>.

- [31] U. Khan, H. Ghazanfar, T Lymphocytes and Autoimmunity, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 341 (2018) 125–168. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.008>.
- [32] A. Jäger, V.K. Kuchroo, Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation, *Scand. J. Immunol.* 72 (2010) 173–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02432.x>.
- [33] G. Arellano, P.A. Ottum, L.I. Reyes, P.I. Burgos, R. Naves, Stage-specific role of interferon-gamma in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Front. Immunol.* 6 (2015) 29. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00492>.
- [34] K. Yasuda, Y. Takeuchi, K. Hirota, The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases, *Semin. Immunopathol.* 41 (2019) 283–297. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00733-8>.
- [35] R.R. Singh, IL-4 and many roads to lupuslike autoimmunity, *Clin. Immunol.* 108 (2003) 73–79. [https://doi.org/10.1016/S1521-6616\(03\)00145-1](https://doi.org/10.1016/S1521-6616(03)00145-1).
- [36] T. Dörner, A.M. Jacobi, P.E. Lipsky, B cells in autoimmunity, *Arthritis Res. Ther.* 11 (2009) 247. <https://doi.org/10.1186/ar2780>.
- [37] U. Walter, P. Santamaria, CD8+ T cells in autoimmunity, *Curr. Opin. Immunol.* 17 (2005) 624–631. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.09.014>.
- [38] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer.* 26 (1972) 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- [39] P.H. Krammer, CD95's deadly mission in the immune system, *Nature.* 407 (2000) 789–795. <https://doi.org/10.1038/35037728>.
- [40] P. Bouillet, D. Metcalf, D.C.S. Huang, Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity, *Science.* 286 (1999) 1735–1738. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1735>.
- [41] S. Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [42] W. Fiers, R. Beyaert, W. Declercq, P. Vandenabeele, More than one way to die: Apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage, *Oncogene.* 18 (1999) 7719–7730. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203249>.
- [43] J.J. Cohen, Apoptosis, *Immunol. Today.* 14 (1993) 126–130. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90214-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90214-6).
- [44] S.J. Martin, C.P.M. Reutelingsperger, A.J. McGahon, J.A. Rader, R.C.A.A. Van Schie, D.M. LaFace, D.R. Green, Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of BCL-2 and Abl, *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1545–1556. <https://doi.org/10.1084/jem.182.5.1545>.
- [45] M.O. Hengartner, The biochemistry of apoptosis, *Nature.* 407 (2000) 770–776. <https://doi.org/10.1038/35037710>.
- [46] G.S. Salvesen, S.J. Riedl, Caspase mechanisms, *Adv. Exp. Med. Biol.* 615 (2008) 13–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_2.
- [47] E. Dykhuizen, Means to an End: Apoptosis and Other Cell Death Mechanisms, *Q. Rev. Biol.* 87 (2012) 68–68. <https://doi.org/10.1086/663910>.
- [48] S. Cory, J.M. Adams, The BCL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch, *Nat. Rev. Cancer.* 2 (2002) 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrc883>.

- [49] J.C. Martinou, R.J. Youle, Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics, *Dev. Cell.* 21 (2011) 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.017>.
- [50] T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, J.E. Chipuk, C. Bonzon, B.A. Sullivan, D.R. Green, D.D. Newmeyer, BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly, *Mol. Cell.* 17 (2005) 525–535. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.003>.
- [51] K. Nakano, K.H. Vousden, PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53, *Mol. Cell.* 7 (2001) 683–694. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00214-3).
- [52] H. Li, H. Zhu, C.J. Xu, J. Yuan, Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell.* 94 (1998) 491–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81590-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81590-1).
- [53] M. Giam, D.C.S. Huang, P. Bouillet, BH3-only proteins and their roles in programmed cell death, *Oncogene.* 27 (2008) S128–S136. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.50>.
- [54] H. Zou, Y. Li, X. Liu, X. Wang, An APAf-1 · cytochrome C multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11549–11556. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11549>.
- [55] L. Hein, J.W. Fischer, Taschenatlas Pharmakologie, 8. überarb, Thieme, 2019.
- [56] D. Fischer, Die Pharmaindustrie, 5. Auflage, Springer Spektrum, 2020.
- [57] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, Mutschler Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 9. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2008.
- [58] §40-42b Arzneimittelgesetz
- [59] H. Lüllmann, K. Mohr, M. Wehling, L. Hein, Pharmakologie und Toxikologie, 17. Auflag, Thieme, 2010.
- [60] T.T. Ashburn, K.B. Thor, Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 673–683. <https://doi.org/10.1038/nrd1468>.
- [61] S. Pushpakom, F. Iorio, P.A. Eyers, K.J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Williams, J. Latimer, C. McNamee, A. Norris, P. Sanseau, D. Cavalla, M. Pirmohamed, Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2018) 41–58. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- [62] A. Breckenridge, R. Jacob, Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2018) 1–2. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.92>.
- [63] E. De Clercq, A. Holý, Case history: Acyclic nucleoside phosphonates: A key class of antiviral drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 928–940. <https://doi.org/10.1038/nrd1877>.
- [64] A. Holý, G.S. Ivanova, Aliphatic analogues of nucleotides: Synthesis and affinity towards nucleases, *Nucleic Acids Res.* 1 (1974) 19–34. <https://doi.org/10.1093/nar/1.1.19>.
- [65] E. De Clercq, T. Sakuma, M. Baba, R. Pauwels, J. Balzarini, I. Rosenberg, A. Holý, Antiviral activity of phosphonylmethoxyalkyl derivatives of purine and pyrimidines, *Antiviral Res.* 8 (1987) 261–272. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(87\)80004-9](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(87)80004-9).

- [66] K.C. Cundy, J.P. Shaw, W.A. Lee, Oral, subcutaneous, and intramuscular bioavailabilities of the antiviral nucleotide analog 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine in cynomolgus monkeys, *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) 365–368. <https://doi.org/10.1128/AAC.38.2.365>.
- [67] J.E. Starrett, D.R. Tortolani, J. Russell, M.J.M. Hitchcock, V. Whiterock, J.C. Martin, M.M. Mansuri, Synthesis, Oral Bioavailability Determination, and in vitro Evaluation of Prodrugs of the Antiviral Agent 9-[2-(Phosphonomethoxy)ethyl]adenine (PMEA), *J. Med. Chem.* 37 (1994) 1857–1864. <https://doi.org/10.1021/jm00038a015>.
- [68] J. Kahn, S. Lagakos, M. Wulfsohn, D. Cherng, M. Miller, J. Cherrington, D. Hardy, G. Beall, R. Cooper, R. Murphy, N. Basgoz, E. Ng, S. Deeks, D. Winslow, J.J. Toole, D. Coakley, Efficacy and safety of adefovir dipivoxil with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial, *J. Am. Med. Assoc.* 282 (1999) 2305–2312. <https://doi.org/10.1001/jama.282.24.2305>.
- [69] H. Izzedine, J.S. Hulot, V. Launay-Vacher, P. Marcellini, S.J. Hadziyannis, G. Currie, C.L. Brosgart, C. Westland, S. Arterbrun, G. Deray, Renal safety of adefovir dipivoxil in patients with chronic hepatitis B: Two double-blind, randomized, placebo-controlled studies, *Kidney Int.* 66 (2004) 1153–1158. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00866.x>.
- [70] P. Marcellin, T.-T. Chang, S.G. Lim, M.J. Tong, W. Sievert, M.L. Shiffman, L. Jeffers, Z. Goodman, M.S. Wulfsohn, S. Xiong, J. Fry, C.L. Brosgart, Adefovir Dipivoxil for the Treatment of Hepatitis B e Antigen–Positive Chronic Hepatitis B, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 808–816. <https://doi.org/10.1056/nejmoa020681>.
- [71] T.M. Dando, G.L. Plosker, Adefovir Dipivoxil: A Review of its Use in Chronic Hepatitis B, *Drugs.* 63 (2003) 2215–2234. <https://doi.org/10.2165/00003495-200363200-00007>.
- [72] I. Votruba, R. Bernaerts, T. Sakuma, E. De Clercq, A. Merta, I. Rosenberg, A. Holý, Intracellular phosphorylation of broad-spectrum anti-DNA virus agent (S)-9-(3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine and inhibition of viral DNA synthesis., *Mol. Pharmacol.* 32 (1987) 524–9.
- [73] P. Kramata, I. Votruba, B. Otová, A. Holý, Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs toward DNA polymerases alpha, delta and epsilon., *Mol. Pharmacol.* 49 (1996) 1005–11.
- [74] Z. Zídek, A. Holý, D. Franková, B. Otová, Suppression of rat adjuvant arthritis by some acyclic nucleotide analogs, *Eur. J. Pharmacol.* 286 (1995) 307–310. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00586-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00586-3).
- [75] Z. Zídek, D. Franková, A. Holý, Chemokines, nitric oxide and antiarthritic effects of 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine (Adefovir), *Eur. J. Pharmacol.* 376 (1999) 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00343-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00343-X).
- [76] Z. Zídek, D. Franková, A. Holý, M. Boubelík, P. Dráber, Inhibition of murine macrophage nitric oxide synthase expression by a pivoxil prodrug of antiviral acyclic nucleotide analogue 9-(2-phosphonomethoxyethyl)adenine, *Biochem. Pharmacol.* 54 (1997) 855–861. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00228-1).
- [77] Z. Zídek, A. Holý, D. Franková, Immunomodulatory properties of antiviral acyclic nucleotide analogues: Cytokine stimulatory and nitric oxide costimulatory effects, in: *Int. J. Immunopharmacol., Int J Immunopharmacol*, 1997: pp. 587–597. [https://doi.org/10.1016/S0192-0561\(97\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0192-0561(97)00047-7).
- [78] Z. Zídek, P. Potměšil, A. Holý, Cytostatic activity of antiviral acyclic nucleoside phosphonates in rodent lymphocytes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 192 (2003) 246–253. [https://doi.org/10.1016/S0041-008X\(03\)00215-1](https://doi.org/10.1016/S0041-008X(03)00215-1).

- [79] Z. Zídek, E. Kmoníčková, A. Holý, Cytotoxicity of pivoxil esters of antiviral acyclic nucleoside phosphonates: adefovir dipivoxil versus adefovir., *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 149 (2005) 315–319. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.049>.
- [80] C.R. Sirtori, The pharmacology of statins, *Pharmacol. Res.* 88 (2014) 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.002>.
- [81] A. Endo, M. Kuroda, K. Tanzawa, Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity, *FEBS Lett.* 72 (1976) 323–326. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(76\)80996-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(76)80996-9).
- [82] M. Hashemi, R. Hoshyar, S. Ande, Q.M. Chen, C. Solomon, A. Zuse, M. Naderi, Mevalonate Cascade and its Regulation in Cholesterol Metabolism in Different Tissues in Health and Disease, *Curr. Mol. Pharmacol.* 10 (2016) 13–26. <https://doi.org/10.2174/1874467209666160112123746>.
- [83] D.W. Bilheimer, S.M. Grundy, M.S. Brown, J.L. Goldstein, Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1982) 4124–4128. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.13.4124>.
- [84] T. Aoki, H. Nishimura, S. Nakagawa, J. Kojima, H. Suzuki, T. Tamaki, Y. Wada, N. Yokoo, F. Sato, H. Kimata, M. Kitahara, K. Toyoda, M. Sakashita, Y. Saito, Pharmacological profile of a novel synthetic inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, *Arzneimittel-Forschung/Drug Res.* 47 (1997) 904–909. <https://doi.org/10.1002/chin.199748176>.
- [85] A.L. Catapano, Pitavastatin: A different pharmacological profile, *Clin. Lipidol.* 7 (2012) 3–9. <https://doi.org/10.2217/clp.12.21>.
- [86] H. Fujino, I. Yamada, S. Shimada, M. Yoneda, J. Kojima, Metabolic fate of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase: Human UDP-glucuronosyltransferase enzymes involved in lactonization, *Xenobiotica.* 33 (2003) 27–41. <https://doi.org/10.1080/0049825021000017957>.
- [87] A.L. Catapano, Pitavastatin - pharmacological profile from early phase studies, *Atheroscler. Suppl.* 11 (2010) 3–7. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(10\)71063-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(10)71063-1).
- [88] R.Y.A. Mukhtar, J. Reid, J.P.D. Reckless, Pitavastatin, *Int. J. Clin. Pract.* 59 (2005) 239–252. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2005.00461.x>.
- [89] A. Corsini, R. Ceska, Drugdrug interactions with statins: Will pitavastatin overcome the statins Achilles heel?, *Curr. Med. Res. Opin.* 27 (2011) 1551–1562. <https://doi.org/10.1185/03007995.2011.589433>.
- [90] M. Ahmadi, S. Amiri, S. Pecic, F. Machaj, J. Rosik, M.J. Łos, J. Alizadeh, R. Mahdian, S.C. da Silva Rosa, D. Schaafsma, S. Shojaei, T. Madrakian, A.A. Zeki, S. Ghavami, Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866 (2020) 165968. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165968>.
- [91] R. Ciurleo, P. Bramanti, S. Marino, Role of statins in the treatment of multiple sclerosis, *Pharmacol. Res.* 87 (2014) 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2014.03.004>.
- [92] S. Khattri, G. Zandman-Goddard, Statins and autoimmunity, *Immunol. Res.* 56 (2013) 348–357. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8409-8>.

- [93] S. Dehnavi, N. Sohrabi, M. Sadeghi, P. Lansberg, M. Banach, K. Al-Rasadi, T.P. Johnston, A. Sahebkar, Statins and autoimmunity: State-of-the-art, *Pharmacol. Ther.* 214 (2020) 107614. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107614>.
- [94] B. Reuter, C. Rodemer, S. Grudzenski, S. Meairs, P. Bugert, M.G. Hennerici, M. Fatar, Effect of Simvastatin on MMPs and TIMPs in Human Brain Endothelial Cells and Experimental Stroke, *Transl. Stroke Res.* 6 (2015) 156–159. <https://doi.org/10.1007/s12975-014-0381-7>.
- [95] G. Ntolkeras, C. Barba, A. Mavropoulos, G.K. Vasileiadis, E. Dardiotis, L.I. Sakkas, G. Hadjigeorgiou, D.P. Bogdanos, On the immunoregulatory role of statins in multiple sclerosis: the effects on Th17 cells, *Immunol. Res.* 67 (2019) 310–324. <https://doi.org/10.1007/s12026-019-09089-5>.
- [96] G. Weitz-Schmidt, K. Welzenbach, V. Brinkmann, T. Kamata, J. Kallen, C. Bruns, S. Cottens, Y. Takada, U. Hommel, Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site, *Nat. Med.* 7 (2001) 687–692. <https://doi.org/10.1038/89058>.
- [97] A. Shimabukuro-Vornhagen, S. Zoghi, T.M. Liebig, K. Wennhold, J. Chemitz, A. Draube, M. Kochanek, F. Blaschke, C. Pallasch, U. Holtick, C. Scheid, S. Theurich, M. Hallek, M.S. von Bergwelt-Baildon, Inhibition of Protein Geranylgeranylation Specifically Interferes with CD40-Dependent B Cell Activation, Resulting in a Reduced Capacity To Induce T Cell Immunity, *J. Immunol.* 193 (2014) 5294–5305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203436>.
- [98] S.-M. Cheng, J.-H. Lai, S.-P. Yang, T.-P. Tsao, L.-J. Ho, J.-T. Liou, C.-C. Cheng, Modulation of human T cells signaling transduction by lovastatin, *Int. J. Cardiol.* 140 (2010) 24–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.10.044>.
- [99] S.J. Lee, H. Qin, E.N. Benveniste, The IFN- γ -induced transcriptional program of the CIITA gene is inhibited by statins, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 2325–2336. <https://doi.org/10.1002/eji.200838189>.
- [100] K. Shimada, J.K. Park, H. Daida, T helper 1/T helper 2 balance and HMG-CoA reductase inhibitors in acute coronary syndrome: Statins as immunomodulatory agents?, *Eur. Heart J.* 27 (2006) 2916–2918. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl376>.
- [101] W. Liu, W.M. Li, C. Gao, N.L. Sun, Effects of atorvastatin on the Th1/Th2 polarization of ongoing experimental autoimmune myocarditis in Lewis rats, *J. Autoimmun.* 25 (2005) 258–263. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2005.06.005>.
- [102] K. Maneechotesuwan, K. Kasetsinsombat, V. Wamanuttajinda, A. Wongkajornsilp, P.J. Barnes, Statins enhance the effects of corticosteroids on the balance between regulatory T cells and Th17 cells, *Clin. Exp. Allergy.* 43 (2013) 212–222. <https://doi.org/10.1111/cea.12067>.
- [103] X. Zhang, J. Jin, X. Peng, V.S. Ramgolam, S. Markovic-Plese, Simvastatin Inhibits IL-17 Secretion by Targeting Multiple IL-17-Regulatory Cytokines and by Inhibiting the Expression of IL-17 Transcription Factor RORC in CD4 + Lymphocytes, *J. Immunol.* 180 (2008) 6988–6996. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6988>.
- [104] A. Sena, R. Pedrosa, M. Graça Morais, Therapeutic potential of lovastatin in multiple sclerosis, *J Neurol.* 250 (2003) 754–755. <https://doi.org/10.1007/s00415-003-1070-8>.
- [105] F. Paul, S. Waiczies, J. Wuerfel, J. Bellmann-Strobl, J. Dörr, H. Walczies, M. Haertle, K.D. Wernecke, H.D. Volk, O. Aktas, F. Zipp, Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis, *PLoS One.* 3 (2008) e1928–e1928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001928>.

- [106] X.L. Li, Z.C. Zhang, B. Zhang, H. Jiang, C.M. Yu, W.J. Zhang, X. Yan, M.X. Wang, Atorvastatin calcium in combination with methylprednisolone for the treatment of multiple sclerosis relapse, *Int. Immunopharmacol.* 23 (2014) 546–549. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2014.10.004>.
- [107] S. Bhardwaj, C.I. Coleman, D.M. Sobieraj, Efficacy of statins in combination with interferon therapy in multiple sclerosis: A meta-analysis, *Am. J. Heal. Pharm.* 69 (2012) 1494–1499. <https://doi.org/10.2146/ajhp110675>.
- [108] C. Rozo, Y. Chinenov, R.K. Maharaj, S. Gupta, L. Leuenberger, K.A. Kirou, V.P. Bykerk, S.M. Goodman, J.E. Salmon, A.B. Pernis, Targeting the RhoA-ROCK pathway to reverse T-cell dysfunction in SLE, *Ann. Rheum. Dis.* 76 (2017) 740–747. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-209850>.
- [109] G.A. Ferreira, A.L. Teixeira, D.C. Calderaro, E.I. Sato, Atorvastatin reduced soluble receptors of TNF-alpha in systemic lupus erythematosus, *Clin. Exp. Rheumatol.* 34 (2016) 42–48. <https://europepmc.org/article/med/26574625> (accessed February 17, 2021).
- [110] H.H. Yu, P.C. Chen, Y.H. Yang, L.C. Wang, J.H. Lee, Y.T. Lin, B.L. Chiang, Statin reduces mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus patients with hyperlipidemia: A nationwide population-based cohort study, *Atherosclerosis.* 243 (2015) 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.030>.
- [111] D.R. McIlwain, T. Berger, T.W. Mak, Caspase functions in cell death and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 (2013) 1–28. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>.
- [112] E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner, DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- [113] E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon, W.M. Bonner, Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo, *J. Cell Biol.* 146 (1999) 905–915. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.905>.
- [114] V. Malmström, C. Trollmo, L. Klareskog, Modulating co-stimulation: A rational strategy in the treatment of rheumatoid arthritis?, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) 15–20. <https://doi.org/10.1186/ar1505>.
- [115] K. Guttek, L. Wagenbrett, A. Reinhold, K. Grüngreiff, D. Reinhold, Zinc aspartate suppresses proliferation and Th1/Th2/Th17 cytokine production of pre-activated human T cells in vitro, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49 (2018) 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.003>.
- [116] N. Shear, ADAPALENE, in: *Litt's Drug Eruptions React. Man.*, CRC Press, 2020: pp. 20–20. <https://doi.org/10.3109/9781841847665-7>.
- [117] J.M. Hughes, M.H.N. Tattersall, Potentiation of methotrexate lymphocytotoxicity in vitro by inhibitors of nucleoside transport, *Br. J. Cancer.* 59 (1989) 381–384. <https://doi.org/10.1038/bjc.1989.76>.
- [118] O. Widström, C. Busch, G. Tornling, B.S. Nilsson, G. Unge, Dipyridamole suppresses uptake of thymidine in human and bovine cells in vitro, *Agents Actions.* 11 (1981) 287–289. <https://doi.org/10.1007/BF01967628>.
- [119] O.J. Ziff, D. Kotecha, Digoxin: The good and the bad, *Trends Cardiovasc. Med.* 26 (2016) 585–595. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.03.011>.

- [120] J.R. Huh, M.W.L. Leung, P. Huang, D.A. Ryan, M.R. Krout, R.R.V. Malapaka, J. Chow, N. Manel, M. Ciofani, S. V. Kim, A. Cuesta, F.R. Santori, J.J. Lafaille, H.E. Xu, D.Y. Gin, F. Rastinejad, D.R. Littman, Digoxin and its derivatives suppress T H17 cell differentiation by antagonizing ROR γ 3t activity, *Nature*. 472 (2011) 486–490. <https://doi.org/10.1038/nature09978>.
- [121] J. Lee, S. Baek, J. Lee, J. Lee, D.G. Lee, M.K. Park, M. La Cho, S.H. Park, S.K. Kwok, Digoxin ameliorates autoimmune arthritis via suppression of Th17 differentiation, *Int. Immunopharmacol.* 26 (2015) 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.03.017>.
- [122] Y.Y. Leung, L.L. Yao Hui, V.B. Kraus, Colchicine-Update on mechanisms of action and therapeutic uses, *Semin. Arthritis Rheum.* 45 (2015) 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2015.06.013>.
- [123] B.M. Jacobs, F. Ammoscato, G. Giovannoni, D. Baker, K. Schmierer, Cladribine: Mechanisms and mysteries in multiple sclerosis, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-317411>.
- [124] A. Willitzki, S. Lorenz, R. Hiemann, K. Guttek, A. Goihl, R. Hartig, K. Conrad, E. Feist, U. Sack, P. Schierack, L. Heiserich, C. Eberle, V. Peters, D. Roggenbuck, D. Reinhold, Fully automated analysis of chemically induced γ H2AX foci in human peripheral blood mononuclear cells by indirect immunofluorescence, *Cytom. Part A*. 83 (2013) 1017–1026. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22350>.
- [125] L.J. Ko, C. Prives, p53: Puzzle and paradigm, *Genes Dev.* 10 (1996) 1054–1072. <https://doi.org/10.1101/gad.10.9.1054>.
- [126] K.T. Biegging, L.D. Attardi, Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression, *Trends Cell Biol.* 22 (2012) 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.10.006>.
- [127] A.G. Georgakilas, O.A. Martin, W.M. Bonner, p21: A Two-Faced Genome Guardian, *Trends Mol. Med.* 23 (2017) 310–319. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.02.001>.
- [128] J. Yue, J.M. López, Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 2346. <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>.
- [129] L.W. Chen, C.S. Lin, M.C. Tsai, S.F. Shih, Z.W. Lim, S.J. Chen, P.F. Tsui, L.J. Ho, J.H. Lai, J.T. Liou, Pitavastatin Exerts Potent Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Effects via the Suppression of AP-1 Signal Transduction in Human T Cells, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 1–15. <https://doi.org/10.3390/ijms20143534>.
- [130] M. Kamigaki, T. Sasaki, M. Serikawa, M. Inoue, K. Kobayashi, H. Itsuki, T. Minami, M. Yukutake, A. Okazaki, T. Ishigaki, Y. Ishii, K. Kosaka, K. Chayama, Statins induce apoptosis and inhibit proliferation in cholangiocarcinoma cells, *Int. J. Oncol.* 39 (2011) 561–568. <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1087>.
- [131] M. Yanae, M. Tsubaki, T. Satou, T. Itoh, M. Imano, Y. Yamazoe, S. Nishida, Statin-induced apoptosis via the suppression of ERK1/2 and Akt activation by inhibition of the geranylgeranyl-pyrophosphate biosynthesis in glioblastoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 30 (2011) 74. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-74>.
- [132] I. Raphael, S. Nalawade, T.N. Eagar, T.G. Forsthuber, T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases, *Cytokine*. 74 (2015) 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>.
- [133] M. Dominguez-Villar, D.A. Hafler, Regulatory T cells in autoimmune disease, *Nat. Immunol.* 19 (2018) 665–673. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0120-4>.

- [134] V. Malmström, C. Trollmo, L. Klareskog, Modulating co-stimulation: A rational strategy in the treatment of rheumatoid arthritis?, *Arthritis Res. Ther.* 7 (2005) 15–20. <https://doi.org/10.1186/ar1505>.
- [135] E. Beutler, Cladribine (2-chlorodeoxyadenosine), *Lancet.* 340 (1992) 952–956. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92826-2](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92826-2).
- [136] V. Singh, C.K. Prajeeth, V. Gudi, K. Bénardais, E. V. Voss, M. Stangel, 2-Chlorodeoxyadenosine (cladribine) induces apoptosis in human monocyte-derived dendritic cells, *Clin. Exp. Immunol.* 173 (2013) 288–297. <https://doi.org/10.1111/cei.12109>.
- [137] T.P. Leist, R. Weissert, Cladribine, *Clin. Neuropharmacol.* 34 (2011) 28–35. <https://doi.org/10.1097/WNF.0b013e318204cd90>.
- [138] P. Aduma, M.C. Connelly, R. V Srinivas, A. Fridland, Metabolic diversity and antiviral activities of acyclic nucleoside phosphonates., *Mol. Pharmacol.* 47 (1995) 816–822.
- [139] V.M. Pisarev, S.-H. Lee, M.C. Connelly, A. Fridland, Intracellular Metabolism and Action of Acyclic Nucleoside Phosphonates on DNA Replication, *Mol. Pharmacol.* 52 (1997) 63–68. <https://doi.org/10.1124/mol.52.1.63>.
- [140] P. Kostecká, A. Holý, H. Farghali, Z. Zídek, E. Kmoníčková, Differential effects of acyclic nucleoside phosphonates on nitric oxide and cytokines in rat hepatocytes and macrophages, *Int. Immunopharmacol.* 12 (2012) 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2011.12.005>.
- [141] S. Noble, K.L. Goa, Adefovir dipivoxil, *Drugs.* 58 (1999) 479–487. <https://doi.org/10.2165/00003495-199958030-00010>.
- [142] J.M. Cherrington, S.J.W. Allen, N. Bischofberger, M.S. Chen, Kinetic interaction of the diphosphates of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine and other anti:HIV active purine congeners with HIV reverse transcriptase and human DNA polymerases, *Antivir. Chem. Chemother.* (1995) 217–221. <https://doi.org/10.1177/095632029500600403>
- [143] V.M. Pisarev, S.H. Lee, M.C. Connelly, A. Fridland, Intracellular metabolism and action of acyclic nucleoside phosphonates on DNA replication, *Mol. Pharmacol.* 52 (1997) 63–68. <https://doi.org/10.1124/mol.52.1.63>.
- [144] S.H. MacPhail, J.P. Banáth, Y. Yu, E. Chu, P.L. Olive, Cell cycle-dependent expression of phosphorylated histone H2AX: Reduced expression in unirradiated but not X-irradiated G1-phase cells, *Radiat. Res.* 159 (2003) 759–767. <https://doi.org/10.1667/RR3003>.
- [145] H. Khoury, R. He, A. Schimmer, J.R. Beadle, K.Y. Hostetler, M.D. Minden, Octadecyloxyethyl Adefovir Exhibits Potent in vitro and in vivo Cytotoxic Activity and Has Synergistic Effects with Ara-C in Acute Myeloid Leukemia, *Chemotherapy.* 63 (2018) 225–237. <https://doi.org/10.1159/000491705>.
- [146] A. Patel, E. Seraia, D. Ebner, A.J. Ryan, Adefovir dipivoxil induces DNA replication stress and augments ATR inhibitor related cytotoxicity, *Int. J. Cancer.* 147 (2020) 1474–1484. <https://doi.org/10.1002/ijc.32966>.
- [147] PROPOSED FINAL LABELING FOR HEPSERA TABLETS As of September 20 , 2002 Tablets Rx Only WARNINGS 1 . SEVERE ACUTE EXACERBATIONS OF HEPATITIS HAVE BEEN REPORTED IN PATIENTS WHO HAVE DISCONTINUED ANTI-HEPATITIS B THERAPY , INCLUDING THERAPY WITH HEPSERA , (2002) 6–27.

- [148] S.L. Harris, A.J. Levine, The p53 pathway: Positive and negative feedback loops, *Oncogene*. 24 (2005) 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>.
- [149] J.D. Siliciano, C.E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella, M.B. Kastan, DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53, *Genes Dev.* 11 (1997) 3471–3481. <https://doi.org/10.1101/gad.11.24.3471>.
- [150] M.B. Kastan, O. Onyekwere, D. Sidransky, B. Vogelstein, R.W. Craig, Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage, *Cancer Res.* 51 (1991) 6304-6311.
- [151] B.J. Aubrey, G.L. Kelly, A. Janic, M.J. Herold, A. Strasser, How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?, *Cell Death Differ.* 25 (2018) 104–113. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.
- [152] H. Fontaine, A. Vallet-Pichard, M.L. Chaix, G. Currie, J. Serpaggi, V. Verkarre, A. Varaut, E. Morales, B. Nalpas, C. Brosgart, S. Pol, Efficacy and safety of adefovir dipivoxil in kidney recipients, hemodialysis patients, and patients with renal insufficiency, *Transplantation*. 80 (2005) 1086–1092. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000178305.39231.a2>.
- [153] J.K. Liao, U. Laufs, Pleiotropic effects of statins, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 89–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095748>.
- [154] A. S. Antonopoulos, M. Margaritis, R. Lee, K. Channon, C. Antoniades, Statins as Anti-Inflammatory Agents in Atherogenesis: Molecular Mechanisms and Lessons from the Recent Clinical Trials, *Curr. Pharm. Des.* 18 (2012) 1519–1530. <https://doi.org/10.2174/138161212799504803>.
- [155] S.C. Chow, Immunomodulation by statins: mechanisms and potential impact on autoimmune diseases., *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 57 (2009) 243–251. <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0038-5>.
- [156] N. Blank, M. Schiller, S. Krienke, F. Busse, B. Schätz, A.D. Ho, J.R. Kalden, H.-M. Lorenz, Atorvastatin Inhibits T Cell Activation through 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase without Decreasing Cholesterol Synthesis, *J. Immunol.* 179 (2007) 3613–3621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.6.3613>.
- [157] A. Jameel, K.G.J. Ooi, N.R. Jeffs, G. Galatowicz, S.L. Lightman, V.L. Calder, Statin modulation of human T-cell proliferation, IL-1 β and IL-17 production, and IFN- γ T cell expression: Synergy with conventional immunosuppressive agents, *Int. J. Inflamm.* 2013 (2013) 434568. <https://doi.org/10.1155/2013/434568>.
- [158] W. Palinski, S. Tsimikas, Immunomodulatory effects of statins: Mechanisms and potential impact on arteriosclerosis, *J. Am. Soc. Nephrol.* 13 (2002) 1673–1681. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000018400.39687.8C>.
- [159] J. Crosbie, M. Magnussen, R. Dornbier, A. Iannone, T.A. Steele, Statins inhibit proliferation and cytotoxicity of a human leukemic natural killer cell line, *Biomark. Res.* 1 (2013) 33. <https://doi.org/10.1186/2050-7771-1-33>.
- [160] S. Waiczies, I. Bendix, F. Zipp, Geranylgeranylation but not GTP-loading of Rho GTPases determines T cell function, in: *Sci. Signal.*, American Association for the Advancement of Science, 2008: pp. pt3–pt3. <https://doi.org/10.1126/stke.112pt3>.
- [161] L. Burke, D. Allen, C. Kukoly, Both farnesylpyrophosphate (FPP) and geranylgeranylpyrophosphate (GGPP) rescue prenylation in the presence of statins, but only GGPP rescues cell viability., *Cancer Res.* 64 (2004) 466.
- [162] H. Gbelcová, S. Rimpelová, Z. Knejzlík, J. Šáchová, M. Kolář, H. Strnad, V. Repiská, W.C. D'Acunto, T. Ruml, L. Víttek, Isoprenoids responsible for protein prenylation modulate the biological effects of statins on pancreatic cancer cells, *Lipids Health Dis.* 16 (2017) 250. <https://doi.org/10.1186/s12944-017-0641-0>.

- [163] C.J. Fox, P.S. Hammerman, C.B. Thompson, Fuel feeds function: Energy metabolism and the T-cell response, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 844–852. <https://doi.org/10.1038/nri1710>.
- [164] R. Chakrabarti, E.G. Engleman, Interrelationships between mevalonate metabolism and the mitogenic signaling pathway in T lymphocyte proliferation, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 12216–12222.
- [165] A. Bietz, H. Zhu, M. Xue, C. Xu, Cholesterol metabolism in T cells, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01664>.
- [166] J. Das, M. Ho, J. Zikherman, C. Govern, M. Yang, A. Weiss, A.K. Chakraborty, J.P. Roose, Digital Signaling and Hysteresis Characterize Ras Activation in Lymphoid Cells, *Cell.* 136 (2009) 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.051>.
- [167] K. Schuh, T. Twardzik, B. Kneitz, J. Heyer, A. Schimpl, E. Serfling, The interleukin 2 receptor α chain/CD25 promoter is a target for nuclear factor of activated T cells, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1369–1373. <https://doi.org/10.1084/jem.188.7.1369>.
- [168] R. Ghittoni, L. Patrussi, K. Pirozzi, M. Pellegrini, P.E. Lazzerini, P.L. Capecchi, F.L. Pasini, C.T. Baldari, Simvastatin inhibits T-cell activation by selectively impairing the function of Ras superfamily GTPases, *FASEB J.* 19 (2005) 1–24. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2702fje>.
- [169] S.M. Sebti, A.D. Hamilton, Inhibition of Ras prenylation: A novel approach to cancer chemotherapy, *Pharmacol. Ther.* 74 (1997) 103–114. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(97\)00014-4](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(97)00014-4).
- [170] K. Tajiri, N. Shimojo, S. Sakai, T. Machino-Ohtsuka, K. Imanaka-Yoshida, M. Hiroe, Y. Tsujimura, T. Kimura, A. Sato, Y. Yasutomi, K. Aonuma, Pitavastatin regulates helper T-Cell differentiation and ameliorates autoimmune myocarditis in mice, *Cardiovasc. Drugs Ther.* 27 (2013) 413–424. <https://doi.org/10.1007/s10557-013-6464-y>.
- [171] E. Perucha, R. Melchiotti, J.A. Bibby, W. Wu, K.S. Frederiksen, C.A. Roberts, Z. Hall, G. LeFricc, K.A. Robertson, P. Lavender, J.G. Gerwien, L.S. Taams, J.L. Griffin, E. de Rinaldis, L.G.M. van Baarsen, C. Kemper, P. Ghazal, A.P. Cope, The cholesterol biosynthesis pathway regulates IL-10 expression in human Th1 cells, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08332-9>.
- [172] P.T. Brinkkoetter, U. Gottmann, J. Schulte, F.J. Van Der Woude, C. Braun, B.A. Yard, Atorvastatin interferes with activation of human CD4+ T cells via inhibition of small guanosine triphosphatase (GTPase) activity and caspase-independent apoptosis, *Clin. Exp. Immunol.* 146 (2006) 524–532. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03217.x>.
- [173] O. Aktas, S. Waiczies, A. Smorodchenko, J. Dörr, B. Seeger, T. Prozorovski, S. Sallach, M. Endres, S. Brocke, R. Nitsch, F. Zipp, Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 725–733. <https://doi.org/10.1084/jem.20021425>.
- [174] J. Vosper, A. Masuccio, M. Kullmann, C. Ploner, S. Geley, L. Hengst, Statin-induced depletion of geranylgeranyl pyrophosphate inhibits cell proliferation by a novel pathway of Skp2 degradation, *Oncotarget.* 6 (2015) 2889–2902. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3068>.

- [175] M. Feldt, O. Bjarnadottir, S. Kimbung, K. Jirström, P.O. Bendahl, S. Veerla, D. Grabau, I. Hedenfalk, S. Borgquist, Statin-induced anti-proliferative effects via cyclin D1 and p27 in a window-of-opportunity breast cancer trial, *J. Transl. Med.* 13 (2015) 133. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0486-0>.
- [176] S.T. Wang, H.J. Ho, J.T. Lin, J.J. Shieh, C.Y. Wu, Simvastatin-induced cell cycle arrest through inhibition of STAT3/SKP2 axis and activation of AMPK to promote p27 and p21 accumulation in hepatocellular carcinoma cells, *Cell Death Dis.* 8 (2017) e2626–e2626. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.472>.
- [177] K.T.R. Samson, K. Minoguchi, A. Tanaka, N. Oda, T. Yokoe, S. Okada, Y. Yamamoto, Y. Watanabe, M. Yamamoto, S. Ohta, M. Adachi, Effect of fluvastatin on apoptosis in human CD4+T cells, *Cell. Immunol.* 235 (2005) 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.08.028>.
- [178] X.F. Qi, L. Zheng, K.J. Lee, D.H. Kim, C.S. Kim, D.Q. Cai, Z. Wu, J.W. Qin, Y.H. Yu, S.K. Kim, HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway, *Cell Death Dis.* 4 (2013) 1–12. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.44>.
- [179] A. Mohammed, L. Qian, N.B. Janakiram, S. Lightfoot, V.E. Steele, C. V. Rao, Atorvastatin delays progression of pancreatic lesions to carcinoma by regulating PI3/AKT signaling in p48 Cre/+ LSL-Kras G12D/+ mice, *Int. J. Cancer.* 131 (2012) 1951–1962. <https://doi.org/10.1002/ijc.27456>.
- [180] C. Cemeus, T.T. Zhao, G.M. Barrett, I.A. Lorimer, J. Dimitroulakos, Lovastatin enhances gefitinib activity in glioblastoma cells irrespective of EGFRvIII and PTEN status, *J. Neurooncol.* 90 (2008) 9–17. <https://doi.org/10.1007/s11060-008-9627-0>.
- [181] D.R. Green, Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system, *Immunol. Rev.* 193 (2003) 5–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065X.2003.00045.x>.
- [182] C.A. Guimarães, R. Linden, Programmed cell death: Apoptosis and alternative deathstyles, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1638–1650. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x>.
- [183] T. Kubota, K. Fujisaki, Y. Itoh, T. Yano, T. Sendo, R. Oishi, Apoptotic injury in cultured human hepatocytes induced by HMG-CoA reductase inhibitors, *Biochem. Pharmacol.* 67 (2004) 2175–2186. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.037>.
- [184] J. Alizadeh, A.A. Zeki, N. Mirzaei, S. Tewary, A.R. Moghadam, A. Glogowska, P. Nagakannan, E. Eftekharpour, E. Wiechec, J.W. Gordon, F.Y. Xu, J.T. Field, K.Y. Yoneda, N.J. Kenyon, M. Hashemi, G.M. Hatch, S. Hombach-Klonisch, T. Klonisch, S. Ghavami, Mevalonate Cascade Inhibition by Simvastatin Induces the Intrinsic Apoptosis Pathway via Depletion of Isoprenoids in Tumor Cells, *Sci Rep* 7 (2017) 44841. <https://doi.org/10.1038/srep44841>.
- [185] R. Khosravi-Far, M.D. Esposti, Death receptor signals to mitochondria, *Cancer Biol. Ther.* 3 (2004) 1051–1057. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.11.1173>.
- [186] C.L. Kuzyk, C.C. Anderson, J.R. Roede, Simvastatin Induces Delayed Apoptosis Through Disruption of Glycolysis and Mitochondrial Impairment in Neuroblastoma Cells, *Clin. Transl. Sci.* 13 (2020) 563–572. <https://doi.org/10.1111/cts.12740>.
- [187] J. Wang, T. Tokoro, K. Matsui, S. Higa, I. Kitajima, Pitavastatin at low dose activates endothelial nitric oxide synthase through PI3K-AKT pathway in endothelial cells, *Life Sci.* 76 (2005) 2257–2268. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.12.003>.

- [188] M. Katsumoto, T. Shingu, R. Kuwashima, A. Nakata, S. Nomura, K. Chayama, Biphasic Effect of HMG-CoA Reductase Inhibitor, Pitavastatin, on Vascular Endothelial Cells and Angiogenesis, *Circ. J.* (2005) 1547-1555. <https://doi.org/10.1253/circj.69.1547>.
- [189] R. Sever, J.S. Brugge, Signal transduction in cancer, *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 5 (2015) a006098. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006098>.
- [190] S. Cagnol, J.C. Chambard, ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - Apoptosis, autophagy and senescence, *FEBS J.* 277 (2010) 2–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>.
- [191] Y.H. Kim, D.H. Lee, J.H. Jeong, Z.S. Guo, Y.J. Lee, Quercetin augments TRAIL-induced apoptotic death: Involvement of the ERK signal transduction pathway, *Biochem. Pharmacol.* 75 (2008) 1946–1958. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.02.016>.
- [192] S.S. Bacus, A. V. Gudkov, M. Lowe, L. Lyass, Y. Yung, A.P. Komarov, K. Keyomarsi, Y. Yarden, R. Seger, Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53, *Oncogene.* 20 (2001) 147–155. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204062>.
- [193] G.S. Kim, J.S. Hong, S.W. Kim, J.M. Koh, C.S. An, J.Y. Choi, S.L. Cheng, Leptin induces apoptosis via ERK/cPLA2/cytochrome c pathway in human bone marrow stromal cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21920–21929. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204598200>.
- [194] A. Nesterov, M. Nikrad, T. Johnson, A.S. Kraft, Oncogenic Ras sensitizes normal human cells to tumor necrosis factor- α -related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis, *Cancer Res.* 64 (2004) 3922–3927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2219>.
- [195] X. Zhang, P. Shan, M. Sasidhar, G.L. Chupp, R.A. Flavell, A.M.K. Choi, P.J. Lee, Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 305–315. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0156OC>.
- [196] Y.K. Kim, H.J. Kim, C.H. Kwon, J.H. Kim, J.S. Woo, J.S. Jung, J.M. Kim, Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells, *J. Appl. Toxicol.* 25 (2005) 374–382. <https://doi.org/10.1002/jat.1081>.
- [197] T. Panaretakis, L. Hjortsberg, K.P. Tamm, A.C. Björklund, B. Joseph, D. Grander, Interferon α induces nucleus-independent apoptosis by activating extracellular signal-regulated kinase 1/2 and c-Jun NH2-terminal kinase downstream of phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin, *Mol. Biol. Cell.* 19 (2008) 41–50. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-04-0358>.
- [198] H. Li, X. Wang, N. Li, J. Qiu, Y. Zhang, X. Cao, hPEBP4 resists TRAIL-induced apoptosis of human prostate cancer cells by activating Akt and deactivating ERK1/2 pathways, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 4943–4950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609494200>.
- [199] S. Cagnol, J.-C. Chambard, ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death - apoptosis, autophagy and senescence, *FEBS J.* 277 (2010) 2–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07366.x>.
- [200] A. Honigmann, V. Mueller, H. Ta, A. Schoenle, E. Sezgin, S.W. Hell, C. Eggeling, Scanning STED-FcS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells, *Nat. Commun.* 5 (2014) 5412. <https://doi.org/10.1038/ncomms6412>.

- [201] T.Y. Hou, D.N. McMurray, R.S. Chapkin, Omega-3 fatty acids, lipid rafts, and T cell signaling, *Eur. J. Pharmacol.* 785 (2016) 2–9. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.091>.
- [202] L. Zhuang, J. Kim, R.M. Adam, K.R. Solomon, M.R. Freeman, Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 959–968. <https://doi.org/10.1172/JCI200519935>.
- [203] T. Furuchi, R.G.W. Anderson, Cholesterol depletion of caveolae causes hyperactivation of extracellular signal-related kinase (ERK), *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 21099–21104. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.33.21099>.
- [204] FDA, Pitavastatin Medical Review, (2009) 1–141.
- [205] J.A. Bluestone, H. Bour-Jordan, M. Cheng, M. Anderson, T cells in the control of organ-specific autoimmunity, *J. Clin. Invest.* 125 (2015) 2250–2260. <https://doi.org/10.1172/JCI78089>.

Publikationsliste

K. Guttek, **L. Wagenbrett**, A. Reinhold, K. Grüngreiff, D. Reinhold, Zinc aspartate suppresses proliferation and Th1/Th2/Th17 cytokine production of pre-activated human T cells in vitro, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 49 (2018) 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.003>.

L. Voss, K. Guttek, A. Reddig, A. Reinhold, M. Voss, B. Schraven, D. Reinhold, Screening of FDA-Approved Drug Library Identifies Adefovir Dipivoxil as Highly Potent Inhibitor of T Cell Proliferation, *Front. Immunol.* 11 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.616570>.

D. Reinhold, K. Guttek, A. Reddig, **L. Voss**, C. Schubert, S. Kahlfuss, K. Grüngreiff, B. Schraven, A. Reinhold, Zinc aspartate induces IL-16 secretion and apoptosis in human T cells, *Biomedicines.* 9 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9030246>.

A. Reddig, **L. Voss**, K. Guttek, D. Roggenbuck, E. Feist, D. Reinhold, Impact of Different JAK Inhibitors and Methotrexate on Lymphocyte Proliferation and DNA Damage, *J. Clin. Med.* 10 (2021) 1431. <https://doi.org/10.3390/jcm10071431>

L. Voss, K. Guttek, A. Reddig, A. Reinhold, M. Voss, L. Simeoni, B. Schraven, D. Reinhold, Pitavastatin Is a Highly Potent Inhibitor of T-Cell Proliferation, *Pharmaceuticals (Basel)* 14 (2021) 727. <https://doi.org/10.3390/ph14080727>.

Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchliche Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 22.11.2021