

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS VON ANTITHYMOZYTENGLOBULIN AUF HUMANE
MONOZYTEN UND DENDRITISCHE ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Roider

2016

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS VON ANTITHYMOZYTEN-
GLOBULIN AUF HUMANE
MONOZYTEN UND DENDRITISCHE ZELLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Roider

2016

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marina Kreutz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Hau

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2016

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Angeborenes und erworbenes Immunsystem.....	1
1.2	Monozyten als Teil des angeborenen Immunsystems.....	1
1.2.1	Differenzierung und Charakterisierung.....	1
1.2.2	Aufgaben und Funktionen.....	2
1.3	Humane dendritische Zellen (DCs).....	2
1.3.1	Charakterisierung humaner DCs.....	3
1.3.2	Die Aufgaben der DCs im Immunsystem.....	4
1.3.2.1	Erkennung und Aufnahme von Antigenen.....	4
1.3.2.2	Reifung, Migration und Antigen-Präsentation.....	5
1.3.3	Immunologische Toleranz.....	7
1.3.3.1	Charakterisierung tolerogener DCs.....	7
1.3.3.2	Wirkung tolerogener DCs auf die T-Zell-Polarisation.....	8
1.3.4	Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und Tolerogenität.....	9
1.3.4.1	IDO-Expression in tolerogenen DCs.....	9
1.3.4.2	Induktion tolerogener DCs durch Vitamin-D ₃	10
1.3.4.3	Einfluss von Prostaglandin E ₂ auf DCs.....	10
1.3.4.4	Einfluss des Glukose-Stoffwechsels auf DCs.....	11
1.3.5	Immunologische Toleranz und Transplantation.....	11
1.4	Graft-versus-Host-Disease.....	12
1.5	Immunsuppression durch Antithymozytenglobulin (ATG).....	13
2	Zielsetzung.....	14
3	Material.....	15
3.1	Geräte.....	15
3.2	Verbrauchsmaterial.....	16
3.3	Chemikalien, Substanzen und Proteine.....	17
3.4	Antikörper.....	18
3.5	Molekularbiologisches Material.....	18
3.5.1	Primer für die RT-qPCR.....	18
3.5.2	Molekularbiologisches Material.....	19
3.6	Datenbanken und Software.....	20
4	Methoden.....	21
4.1	Zellbiologische Methoden.....	21
4.1.1	Elutriationszentrifugation: Gewinnung von humanen Monozyten.....	21

4.1.2	Kultivierung von humanen Monozyten.....	22
4.1.2.1	Einfrieren und Auftauen.....	22
4.1.2.2	Zellansatz für Protein- und RNA-Lysate.....	22
4.1.3	Kultivierung und Generierung von humanen DCs.....	23
4.1.3.1	Stimulation und Ernte für Protein-Lysate und Zell-Analyse.....	23
4.1.3.2	Stimulation und Ernte der DCs für mRNA-Analyse.....	24
4.1.4	Bestimmung der Zellzahl.....	24
4.1.4.1	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.....	24
4.1.4.2	Bestimmung der Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung.....	24
4.1.5	Kokultur von DCs und T-Zellen.....	25
4.1.6	Proliferationsassays.....	25
4.1.6.1	^{[3]H} -Thymidin-Markierung.....	25
4.1.6.2	Bromdesoxyuridin (BrdU).....	26
4.1.6.3	Vergleich der ^{[3]H} -Thymidin-Markierung mit dem BrdU-ELISA.....	26
4.1.7	Fluoreszenz-Markierung für die Durchflusszytometrie.....	27
4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	28
4.2.1	Herstellung der Proteinlysate.....	28
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	28
4.2.3	Vorbereiten und Auftragen der Proben.....	29
4.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
4.2.5	Western Blot.....	31
4.2.6	Immunologische Färbung und Entwicklung der Membran.....	32
4.2.7	Auswertung der entwickelten Filme.....	33
4.3	Molekularbiologische Methoden.....	34
4.3.1	Isolierung von RNA aus Zellen.....	34
4.3.2	Reverse-Transkriptase-PCR.....	34
4.3.3	Real-time „quantitative“ PCR (RT-qPCR).....	35
4.3.3.1	Reaktionsansatz der RT-qPCR.....	35
4.3.3.2	Eckdaten des PCR-Programms.....	36
4.3.3.3	Auswertung der RT-qPCR.....	36
4.3.3.4	Primer-Design für die RT-qPCR.....	37
4.4	Methoden zur Analyse von Metaboliten und Zytokinen.....	37
4.4.1	Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA.....	37
4.4.2	Laktatmessung im Überstand.....	37
4.4.3	Messung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃	38
4.5	Statistik.....	38

5	Ergebnisse	39
5.1	Einfluss von ATG auf den Tryptophan-Stoffwechsel	39
5.1.1	Wirkung von ATG auf die Expression von <i>IDO1</i> und <i>IDO2</i>	39
5.1.1.1	<i>IDO</i> -Expression in DCs	40
5.1.1.2	<i>IDO</i> -Expression in Monozyten	42
5.1.2	Wirkung von ATG auf die mRNA-Expression der Kynureninase in DCs	44
5.1.3	Wirkung von ATG auf den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor	45
5.1.4	ATG-vermittelte <i>IDO</i> -Induktion in DCs und Monozyten auf Protein-Ebene	46
5.1.4.1	Nachweis von <i>IDO</i> im Western Blot	46
5.1.4.2	Nachweis von <i>IDO</i> und <i>CD86</i> in der Durchflusszytometrie	47
5.1.5	<i>IDO</i> -Induktion nach ATG-Stimulation in Monozyten	48
5.2	Einfluss von ATG auf den Vitamin-D ₃ -Stoffwechsel	49
5.2.1	Wirkung von ATG auf die Expression von <i>CYP27B1</i>	49
5.2.1.1	<i>CYP27B1</i> in DCs	50
5.2.1.2	<i>CYP27B1</i> in Monozyten	51
5.2.2	Wirkung von ATG auf die Expression von <i>CYP27A1</i> in DCs	51
5.2.3	Wirkung von ATG auf den Vitamin-D-Rezeptor	52
5.2.4	ATG-induzierte Synthese von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃ in DCs	53
5.3	Einfluss von ATG auf den Prostaglandin-Stoffwechsel	54
5.4	Einfluss von ATG den Glukose-Stoffwechsel	56
5.4.1	Hexokinase (<i>HKI</i> , <i>HKII</i>)	56
5.4.2	Laktatdehydrogenase (<i>LDHA</i> , <i>LDHB</i>)	56
5.5	Einfluss von ATG auf die Zytokinsekretion	57
5.5.1	Proinflammatorische Zytokine TNF, IL-6 und IL-12 unter ATG	58
5.5.2	Einfluss von ATG auf die Sekretion von IL-10	60
5.6	Mixed lymphocyte reaction	61
5.6.1	Induktion einer T-Zell-Antwort durch ATG-DCs	61
5.6.2	Aktive T-Zell-Supprimierung durch ATG-DCs	62
6	Diskussion	64
6.1	Direkter Einfluss von ATG auf dendritische Zellen	64
6.1.1	Tryptophan-Stoffwechsel	64
6.1.2	Vitamin-D-Stoffwechsel	66
6.1.3	Prostaglandin-Stoffwechsel	68
6.1.4	Glukose-Stoffwechsel	68
6.1.5	Zytokin-Sekretion	68
6.1.6	Funktionelle Effekte von ATG-DCs auf T-Zellen	69

6.1.7	Zusammenfassung der ATG-Effekte auf DCs	70
6.2	Mögliche Relevanz der ATG-Effekte <i>in vivo</i>	71
7	Zusammenfassung	73
8	Literaturverzeichnis	75
9	Abkürzungsverzeichnis	89
10	Abbildungsverzeichnis.....	93
11	Tabellenverzeichnis	94
12	Anhang.....	95

1 Einleitung

1.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen hat die Aufgabe, potenzielle Krankheitserreger zu erkennen und sie zu eliminieren. Dabei steht es vor der Herausforderung, körpereigene von körperfremden Strukturen zu unterscheiden. Sobald ein potenzieller Erreger in den Körper eindringt, wird die Immunantwort meist durch das sogenannte angeborene Immunsystem eingeleitet [1]. In erster Linie gehören dazu (I) physikalische und chemische Barrieren, wie Epithelien und antibakterielle Moleküle (z.B. Lysozym); außerdem (II) phagozytierende Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (DCs); zusätzlich (III) lösliche Komponenten, wie das Komplementsystem, Chemokine und Zytokine, welche die Immunantwort unterstützen, regulieren und koordinieren [2]. Das angeborene Immunsystem arbeitet zwar sehr schnell, aber vergleichsweise unspezifisch. Es erkennt mittels Rezeptoren körperfremde Strukturen, die vielen Erregern gemeinsam sind und sich im Laufe der Evolution nicht verändert haben [1].

Im Gegensatz dazu kann das etwas langsamer agierende, adaptive Immunsystem, dessen Hauptbestandteile T- und B-Lymphozyten bilden, sehr spezifisch eine große Anzahl bestimmter Moleküle unterscheiden, auch wenn sich diese sehr ähnlich sind. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass die Effizienz und Geschwindigkeit der Immunantwort mit jedem Erregerkontakt zunimmt, da das adaptive Immunsystem eine Gedächtnisfunktion besitzt [2].

1.2 Monozyten als Teil des angeborenen Immunsystems

Monozyten stehen vor allem im Dienst des angeborenen Immunsystems und bilden die Vorstufe für eine Reihe von Zellen, deren primäre Aufgabe die Phagozytose von Erregern oder beschädigten Zellen ist. Dazu zählen insbesondere verschiedene Makrophagen (z.B. Kupfer-Zellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in der Lunge, Mikroglia im Gehirn), aber auch die DCs [3].

1.2.1 Differenzierung und Charakterisierung

Die Bildung der Blutzellen (Hämatopoese) und damit auch der Monozyten (Monopoese) geht von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark aus. Die Differenzierung zu reifen Monozyten erfolgt dabei über myeloide Vorläuferzellen [1]. Sobald die Monopoese

nach etwa zwei Tagen abgeschlossen ist, werden die Monozyten ins Blut ausgeschwemmt und patrouillieren dort auf der Suche nach Erregern oder beschädigten Zellen [4]. Nach wenigen Tagen emigrieren sie transendothelial ins Gewebe (Bindegewebe, Leber, Lunge, u.a.), wo die weitere Differenzierung zu speziellen Makrophagen oder DCs stattfindet [5].

1.2.2 Aufgaben und Funktionen

Monozyten fungieren aber nicht nur als Vorläuferzellen, sondern erfüllen auch selbst wichtige Aufgaben im Auftrag des angeborenen Immunsystems. Ebenso wie DCs besitzen auch Monozyten eine Reihe von *pattern recognition receptors* (PRRs) um pathogene Erreger zu erkennen (s.u.) [2]. Eine Aktivierung der Monozyten via PRRs führt zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL) -1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF) [5]. Diese induzieren wesentliche Bestandteile einer Immunantwort, etwa die Produktion von Akutphaseproteinen in der Leber [6] oder die Sekretion von Chemokinen und Zelladhäsionsmoleküle (z.B. Selektine, Integrine), welche die Immunantwort koordinieren [3]. Durch die Aktivierung der entsprechenden PRRs können Monozyten ebenso auf virale Erreger mit der Produktion von Typ-I-Interferonen reagieren, welche die Zytotoxizität der Immunzellen gegen viral infizierte und entartete Zellen erhöht [7]. Die Funktion, mit der Monozyten hauptsächlich in Verbindung gebracht werden, ist die Phagozytose von Erregern, Fremdkörpern und apoptotischen Zellen, wofür sie weitere PRRs wie Scavenger-, C-Typ Lektin-, Fc γ - oder Komplementrezeptoren besitzen [2]. Außerdem sind Monozyten via IL-10-Sekretion in der Lage, einer überschießenden Immunantwort entgegenzuwirken [8].

1.3 Humane dendritische Zellen (DCs)

Im Jahr 1973 wurden DCs erstmals durch Steinman und Cohn in den lymphatischen Organen der Maus beschrieben [9, 10]. Erst einige Jahre später erkannte man die Ähnlichkeit mit den von Paul Langerhans bereits 1868 beschriebenen Langerhans-Zellen in der Epidermis und konnte auch in nicht lymphatischen Organen weitere Zellen mit vergleichbaren Phänotyp identifizieren [11]. Die Zellen konnten nicht zuletzt morphologisch von bisher bekannten Immunzellen abgegrenzt werden und zeichnen sich dadurch aus, dass sie nach Antigenkontakt über die Lymphgefäße in die lymphatischen Organe einwandern und dort T-Lymphozyten durch Präsentation von Antigenen stimulieren [12].

1.3.1 Charakterisierung humaner DCs

Die von Steinman und Cohn 1973 beschriebenen DCs werden heute als klassische oder konventionelle DCs (cDCs) bezeichnet und stehen damit den plasmazytoiden DCs (pDCs) gegenüber. Ein spezifischer molekularer Marker, der alle Subtypen der DCs umfasst, existiert derzeit nicht [13]. Grundsätzlich gilt, dass alle DCs hohe Level an MHC (Haupthistokompatibilitätskomplex)-Klasse-II-Genen, wie z.B. HLA (*human leukocyte antigen*)-DR exprimieren ohne dabei die typischen Marker anderer Leukozyten zu tragen, wie CD (*cluster of differentiation*) 3 (T-Lymphozyten), CD19/20 (B-Lymphozyten) oder CD56 (NK-Zellen) [14].

Die **pDCs** wurden bereits 1958 entdeckt und aufgrund ihrer Morphologie für eine Variante der Plasmazellen gehalten. Erst später erkannte man, dass diese Zellen eine kleine, aber gut abgrenzbare Subpopulation der DCs darstellen [15]. Sie exprimieren keine myeloide Antigene und tragen stattdessen lymphoide Marker wie CD123 oder CD303 [14]. Die pDCs zeichnen sich insbesondere dadurch aus, dass sie nach Viruskontakt eine im Vergleich zu anderen Zellen große Menge an Interferon- α sezernieren und dadurch eine Virus-gerichtete T-Zell-Antwort induzieren [15].

cDCs sind weit häufiger als pDCs und machen den Großteil aller DCs aus. Sie exprimieren typisch myeloide Antigene wie CD11b oder CD11c und tragen daher auch die Bezeichnung myeloide DCs (mDCs) [14]. Alle DCs stammen von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Entsprechend ihrer eben erwähnten Oberflächenantigene differenzieren sich die pDCs aus lymphoiden und die cDCs aus myeloiden Vorläuferzellen [16]. Sobald die unreifen DCs ausdifferenziert sind, werden sie aus dem Knochenmark ins Blut ausgeschwemmt und migrieren transendothelial in die Epidermis (Langerhans-Zellen) oder ins Interstitium verschiedener Organe (z.B. Gastrointestinaltrakt, Dermis, Lunge, Milz), um dort ihre Aufgaben zu übernehmen [2]. Eine weitere spezielle Subpopulation sind DCs, die von Monozyten abstammen. Ursprünglich zog man Monozyten als wichtigste Vorläuferzellen der DCs in Betracht, da man sie *in vitro* direkt aus diesen generieren konnte [17]. In Mausexperimenten stellte man fest, dass sich Monozyten *in vivo* vor allem in infiziertem oder entzündetem Gewebe zu DCs differenzieren; ebenso können sie aber auch in nicht-entzündetem Gewebe (z.B. Gastrointestinaltrakt, Lunge) als Vorläuferzellen fungieren [18-20]. Weiterhin lassen sich DCs nach zahlreichen funktionellen Gesichtspunkten, wie reif/unreif oder tolerogen/immunogen einteilen. Auch anatomische Gesichtspunkte (Haut, Blut, Milz, u.a.) können als Kriterium dienen [21].

1.3.2 Die Aufgaben der DCs im Immunsystem

DCs sind ein Teil des angeborenen Immunsystems und befinden sich im unreifen Zustand vor allem in der Haut (als Langerhans-Zellen) sowie in der Schleimhaut der Atemwege und des Gastrointestinaltrakts [2]. Damit sind sie strategisch optimal positioniert, um möglichst früh nach einer Infektion mit dem Erreger in Kontakt zu kommen und die adaptive Immunantwort einzuleiten. Im Folgenden soll auf die wichtigsten Funktionen der DCs genauer eingegangen werden.

1.3.2.1 Erkennung und Aufnahme von Antigenen

Um mit Erregern in Kontakt zu treten, nutzt das (angeborene) Immunsystem und damit auch die DCs ein limitiertes Repertoire an Keimbahn-codierten Rezeptoren, um konservierte molekulare Muster (*molecular patterns*) zu erkennen [2]. Diese Muster werden in zwei Kategorien eingeteilt: *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) [22]. Während erstere exogenen Ursprungs sind, wie bspw. Bestandteile von Zellwänden, Flagellen oder fremdartige Nukleinsäuren, stammen letztere von körpereigenen Zellen und werden in der Regel nur bei Zellschaden freigesetzt. Zu den DAMPs gehören etwa Hitze-Schock-Proteine (HSP) oder extrazelluläres Adenosintriphosphat (ATP) [23]. Die bereits erwähnten PRRs erkennen sowohl PAMPs als auch DAMPs. Diese PRRs befinden sich auf der Zelloberfläche, im Zytoplasma oder in endosomalen Vesikeln [2] und werden in verschiedene Subgruppen unterteilt. Zu diesen Subgruppen zählen u.a. die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*)-like Rezeptoren, C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLRs) und Scavenger-Rezeptoren [22]. Die TLRs sind bei weitem am besten charakterisiert, TLR4 erkennt bspw. Lipopolysaccharid (LPS) [24], ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien; TLR9 dagegen bindet an nicht-methylierte Cytosin-Guanin-Basensequenzen, ein allgemeines Charakteristikum prokaryotischer DNA-Moleküle [25]. Nachdem ein Erregerantigen mittels PRR erkannt wurde, wird es in der Regel durch eine unreife DC aufgenommen. Dies erfolgt, soweit bisher bekannt, über unspezifische Makropinozytose oder Phagozytose und Rezeptor-vermittelte Phagozytose [26] bspw. mittels CLRs, Scavenger-Rezeptoren oder Fc γ -Rezeptoren [27]. Dabei können DCs ungebundene Pathogene ebenso effektiv aufnehmen wie opsonierte Partikel und Immunkomplexe [27], apoptotische Zellen [28], Viren oder HSPs [21, 29]. Eine Aktivierung der PRRs hat je nach Rezeptortyp unterschiedliche Bedeutungen für die Zelle: TLRs spielen für DCs eine besondere Rolle, denn sie übermitteln Informationen über den Rezeptorliganden via intrazellulärer Signalkaskaden an die Zelle und induzieren so die Reifung

der DCs und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-12) [30]. CLRd dagegen dienen hauptsächlich der Aufnahme eines Pathogens zum Zwecke der Antigen-Prozessierung und -Präsentation, ohne dabei eine Reifung zu induzieren [31].

1.3.2.2 Reifung, Migration und Antigen-Präsentation

Es sind eine Vielzahl an Faktoren bekannt, welche die Reifung der DCs induzieren oder beeinflussen können: Dazu gehören im Wesentlichen (I) Pathogen-assoziierte Moleküle wie LPS [32], bakterielle DNA [33] oder doppelsträngige RNA [34], die vor allem von TLRs erkannt werden und dadurch den Reifungsprozess in Gang setzen; weiterhin (II) lösliche Faktoren, die entweder immunsuppressiv (IL-10, *transforming growth factor* β [TGF- β], Prostaglandine) oder reifungsfördernd wirken (TNF, IL-1, IL-6); außerdem können (III) T-Zell-abhängige Signale (z.B. CD40-Ligand) die Reifung induzieren [35]. [21]

Die Reifung der DCs führt zu erheblichen funktionellen und strukturellen Veränderungen, die schematisch in Abbildung 1-1 dargestellt sind. Während die unreifen DCs für eine effiziente Antigen-Aufnahme und -Verarbeitung ausgestattet sind, ist das molekulare Equipment der reifen DCs auf eine effektive T-Zell-Stimulation ausgelegt [21]. Dies erklärt, warum die Reifung der DCs einerseits zu einem fast vollständigen Verlust der Endozytose-Aktivität führt [36, 37], andererseits aber mit einer gesteigerten Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. CD40, CD58, CD80, CD86) und Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12, TNF) einhergeht. Zusätzlich werden MHC-Klasse-II- [38] und MHC-Klasse-I-Moleküle deutlich stärker exprimiert [39]. Auch die Anpassung ihres Repertoires an Chemokin-Rezeptoren stellt eine wichtige Voraussetzung für eine effektive T-Zell-Stimulation dar: Unreife DCs exprimieren vor allem solche Chemokin-Rezeptoren, wie CC-Typ-Rezeptor (CCR) 2, CCR5, CCR6, CXC-Typ-Rezeptor (CXCR) 1 und CXCR2, die proinflammatorische – bspw. durch Keratinozyten sezernierte – Chemokine erkennen [40, 41]. Reife DCs zeigen dagegen eine verminderte Expression dieser Rezeptoren und exprimieren im Gegenzug den Chemokin-Rezeptor CCR7 verstärkt [42]. Dieser bindet an die Chemokine CC-Typ-Ligand (CCL) 21, welches von den Endothelzellen der Lymphgefäße exprimiert wird, und CCL19, welches in den T-Zell-Gebieten der lymphatischen Organe exprimiert wird [40]. Diese Anpassung erlaubt den reifen DCs den Ort der Entzündung zu verlassen und über afferente Lymphgefäße in die T-Zell-reichen Regionen der sekundären lymphatischen Organe zu migrieren [42].

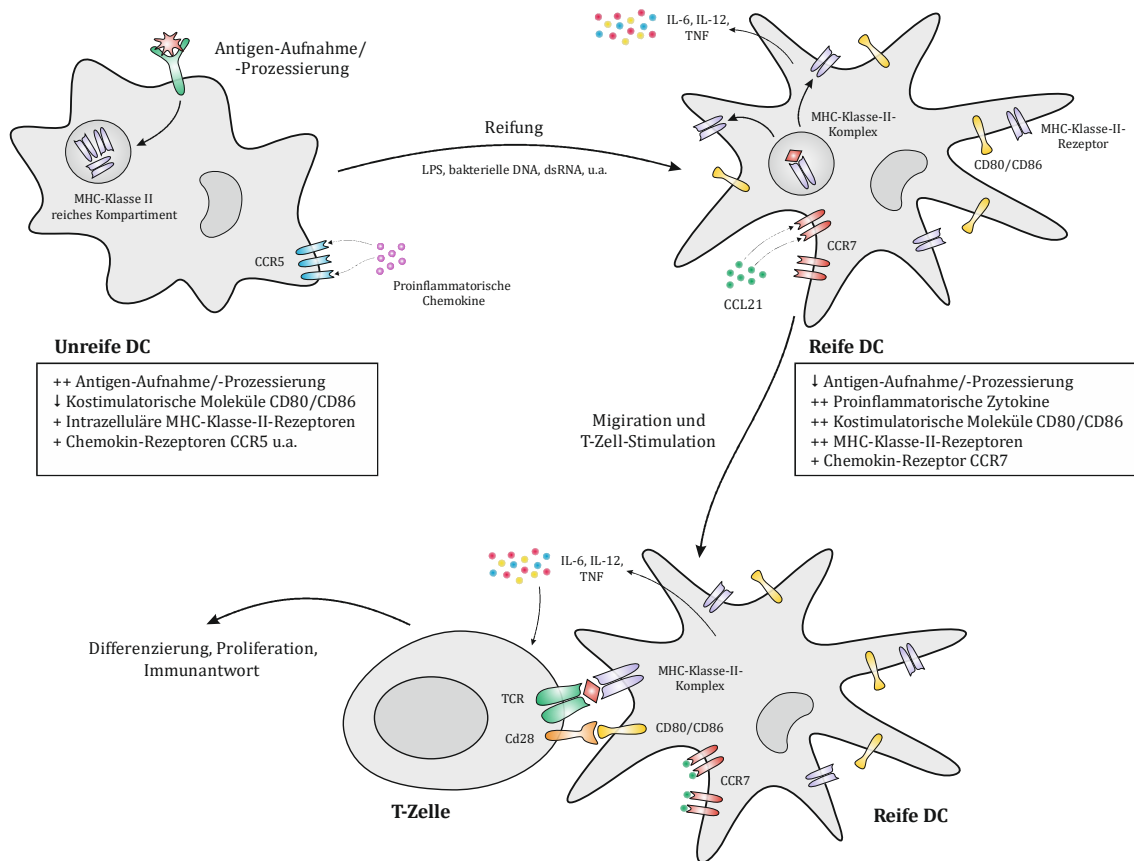


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der DC-Reifung und ihre funktionellen Veränderungen

Der Reifungsprozess einer DC wird z.B. durch die Stimulation eines PRR angestoßen. Diese führt zu den gezeigten funktionellen Veränderungen der DC und ermöglicht die Initiierung einer T-Zell-Antwort. Symbolerklärung: + Induktion, ++ starke Induktion, ↓ Suppression. Abbildung eigens mittels CorelDraw erstellt.

Im Blut oder in der Lymphe gelöste Antigene können auch ungebunden in die lymphatischen Organe gelangen und erst dort von unreifen DCs aufgenommen werden. Während des Reifungsprozesses werden die aufgenommenen Antigene in Endosomen zu Peptiden abgebaut, bevor sie anschließend an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und schließlich an der Zelloberfläche exprimiert werden [2]. Endogene Peptide werden dagegen an MHC-Klasse-I-Moleküle gebunden und mit Hilfe dieser präsentiert. Das Signal, welches die T-Lymphozyten zur erfolgreichen Aktivierung benötigen, ist das Zusammentreffen des MHC-Peptid-Komplexes auf DCs mit dem passenden T-Zell-Rezeptor (TCR) auf T-Zellen [43]. Die Korezeptoren CD4 und CD8, die sich ebenfalls auf den T-Zellen befinden, bestimmen, ob die Zelle an MHC-Klasse-I- (CD8) oder MHC-Klasse-II-Komplexe (CD4) bindet. Der interzelluläre Kontakt wird durch β -Integrine und andere Zelladhäsionsmoleküle (CD2, CD50, CD54 und CD58) stabilisiert [21]. Das zweite Signal kommt durch die Interaktion kostimulatorischer Moleküle der DCs mit ihren jeweiligen Liganden seitens der T-Zellen zustande: Neben zahlreichen weiteren Signalwegen wird dabei das Zusammenspiel der B7-Moleküle

B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) mit CD28 als entscheidend angesehen [43]. Ebenfalls gut untersucht sind kostimulatorische Signale, die von Rezeptoren und Liganden der TNF-Superfamilie ausgehen [44]. Eine erfolgreiche T-Zell-Stimulation durch DCs führt zur Proliferation und Differenzierung in Effektor- oder Memory-T-Zellen, welche schließlich Träger der Immunantwort sind. Durch ihre Fähigkeit, Pathogene mittels PRRs zu erkennen, aufzunehmen und schließlich den T-Zellen stimulierend zu präsentieren, übernehmen DCs eine Schlüsselrolle im Immunsystem und verbinden dadurch das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem [2].

1.3.3 Immunologische Toleranz

Die Induktion einer immunologischen Toleranz gehört zu den entscheidenden Aufgaben des Immunsystems: Dieser Prozess gewährleistet, dass Mikroorganismen in unserem Körper erfolgreich vernichtet werden, körpereigenes Gewebe jedoch gleichzeitig verschont bleibt [45]. Die Bedeutung dieser Toleranz wurde durch zahlreiche Mausmodelle eindrucksvoll bestätigt: Dort führte z.B. der Knockout von *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4* (CTLA-4) zu massiven lymphoproliferativen und autoimmunologischen Defekten [46, 47]. CTLA-4 (CD152) ist auf der Oberfläche von T-Zellen zu finden und kann anstelle von CD28 mit B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf DCs interagieren [48]. Es gehört zu den sogenannten koinhibitorischen Molekülen, die im Sinne einer Gegenregulation die T-Zell-Antwort bremsen oder im Falle körpereigener Antigene sogar ganz verhindern sollen [49]. Derartige Mechanismen greifen in den sekundären lymphatischen Organen und werden unter dem Begriff periphere Toleranz subsumiert; demgegenüber bezeichnet man die im Thymus stattfindende negative Selektion unreifer, selbstreaktiver T-Zellen als zentrale Toleranz [1]. Parallel zur Stimulation immunreaktiver T-Zellen spielen DCs auch beim Generieren „toleranter“ T-Zellen eine entscheidende Rolle. DCs mit dieser Aufgabe bezeichnet man als tolerogene DCs. Die Bedeutung dieser Zellen für die Toleranzbildung konnte durch Tiermodelle unterstrichen werden, in denen eine vollständige Ablation der DCs massive autoimmunologische Defekte auslöste [50]. Im Folgenden sollen die tolerogenen DCs charakterisiert und deren Bedeutung für die immunologische Toleranz verdeutlicht werden.

1.3.3.1 Charakterisierung tolerogener DCs

Tolerogene DCs zeichnen sich durch eine hohe Expression von MHC Klasse-II-Rezeptoren und niedrige Expression von kostimulatorischen B7-Molekülen aus [51]. Dabei fehlt diesen DCs eine relevante Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β , IL-6, IL-12 oder

TNF [52]. Diesen Phänotyp bezeichnet man auch als „semireif“. Neben fehlenden proinflammatorischen und kostimulatorischen Signalen zeichnen sich tolerogene DCs durch die Sekretion immunsuppressiver Faktoren, wie z.B. IL-10 und TGF- β aus [53]. Außerdem sind tolerogene DCs Träger koinhibitorischer Moleküle, wie CTLA-4. Weiterhin werden trotz Reifung der DCs Proteine hochreguliert, die für die Einwanderung in die sekundären lymphatischen Organe verantwortlich sind, so z.B. der Chemokin-Rezeptor CCR7 [54]. Dies ist notwendig, da auch tolerogene DCs mit den T-Lymphozyten interagieren müssen. Gleichzeitig werden solche Proteine supprimiert, deren Aufgabe darin besteht, die Verankerung der DCs im Gewebe sicherzustellen. Dazu gehören etwa E-Cadherin oder α 6-Integrin [51]. Dies gewährleistet, dass DCs trotz fehlender Stimulation in die lymphatischen Organe migrieren können, um dort mit den T-Zellen in Kontakt zu treten. Daneben spielt auch die Induktion verschiedener Stoffwechselwege eine Rolle (s.u.).

1.3.3.2 Wirkung tolerogener DCs auf die T-Zell-Polarisation

Die Hauptaufgabe der tolerogenen DCs besteht darin, die Aktivität und Differenzierung der T-Zellen zu regulieren. Dabei kommt es zu einer Suppression der T_H1 -Zellen bzw. zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen (T_{Reg}). Reife DCs sezernieren das Zytokin IL-12, welches maßgeblich an der Initiierung einer T_H1 -Antwort beteiligt ist [55]. Tolerogene DCs sezernieren dagegen kein IL-12, sondern die immunsuppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β . Die Sekretion von IL-10 und TGF- β gehört zu den wesentlichen Mechanismen, wie tolerogene DCs eine Toleranzbildung hervorrufen [51]. Die beiden Zytokine verhindern zum einen die vollständige Ausreifung der DCs und damit eine effektive T_H1 -Stimulation [56], zum anderen wird die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen in induzierte T_{Reg} angestoßen [57]. T_{Reg} übernehmen selbst wichtige Aufgaben bei der Toleranzbildung, z.B. sind sie in der Lage T_H1 -, NK-Zellen [58] und B-Lymphozyten [59] zu inhibieren. Das von T_H1 -Zellen sezernierte Zytokin IFN- γ ist in der Lage die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO)-Expression in DCs zu verstärken [60]. Dies ist deshalb relevant, weil die IDO-Expression selbst *de novo* regulatorische FOXP3⁺ T-Zellen induzieren kann [61]. In Abbildung 1-2 ist ein schematischer Überblick zu den erläuterten Effekten tolerogener DCs dargestellt.

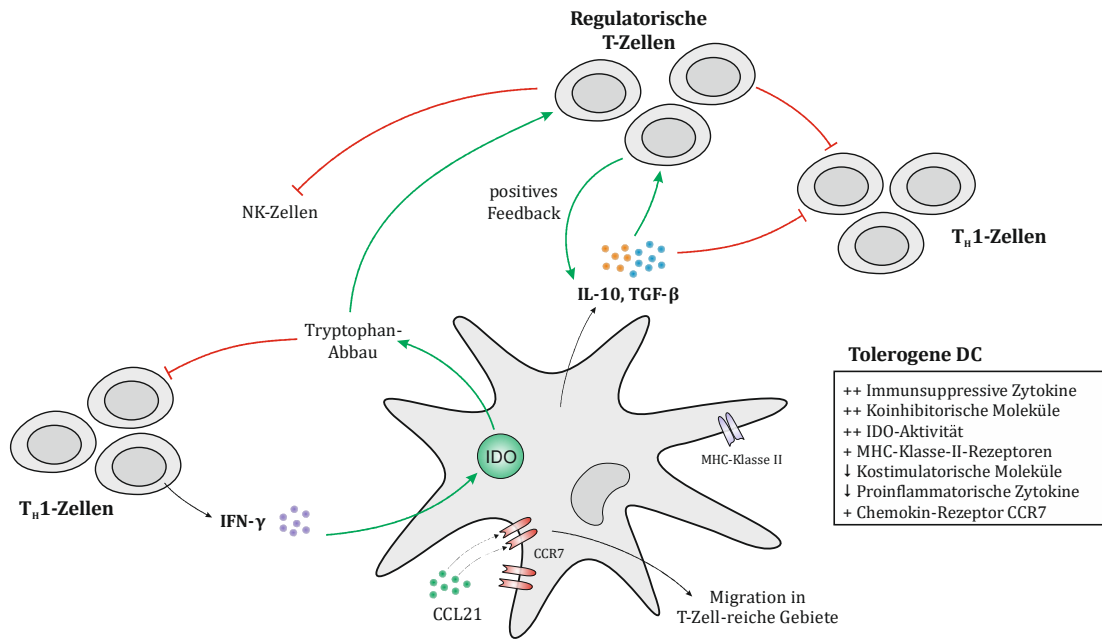


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der T-Zell-Polarisation durch tolerogene DCs

Eine tolerogene, IDO⁺ DC steuert die Polarisierung der T-Zellen über die Freisetzung von Kynurenin sowie die Depletion von Tryptophan. T_{reg} werden zusätzlich über die Sekretion von IL-10 und TGF-β induziert. Symbolerklärung: + Induktion, ++ starke Induktion, ↓ Suppression. Abbildung eigens in Anlehnung an [51] mittels CorelDraw erstellt.

1.3.4 Zusammenhang zwischen Stoffwechsel und Tolerogenität

1.3.4.1 IDO-Expression in tolerogenen DCs

Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) steht als Schlüsselenzym am Anfang des Tryptophan-Stoffwechsels. Die Metaboliten dieses Stoffwechselwegs sind für ihre immunregulatorischen Eigenschaften bekannt [62]. Im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert IDO die Umwandlung von Tryptophan in N-Formylkynurenin, welches die Arylformamidase daraufhin zu Kynurenin verstoffwechselt [62, 63]. Die Expression von IDO ist ein typisches Kennzeichen tolerogener DCs. Der Entzug von Tryptophan aus dem Mikromilieu bewirkt sowohl eine verminderte Proliferation [64, 65] als auch eine verstärkte Apoptose der T-Zellen [66]. Daneben wirken auch die Metaboliten des Tryptophan-Stoffwechsels (z.B. Kynurenin, Chinolinsäure, 3-Hydroxy-Anthralinsäure) immunsuppressiv und scheinen für den tolerogenen Effekt von IDO verantwortlich zu sein: So konnte gezeigt werden, dass die Metaboliten direkt antiproliferativ und Apoptose-induzierend auf TH1-, nicht aber auf TH2-Zellen wirken [67-69]. Weiterhin induziert die IDO-Expression in DCs *de novo* regulatorische FOXP3⁺ T-Zellen [61]. Diese exprimieren wiederum das koinhibitorische Molekül CTLA-4, welches als Ligand von CD80 und CD86 auf DCs fungieren kann [51]. Auf diese Weise blockiert es nicht nur solche kostimulatorischen Moleküle, sondern induziert

auch IDO in DCs [70]. Da IDO erneut regulatorische T-Zellen induzieren kann, ist es möglich, dass hier ein sich-selbst-verstärkender Mechanismus vorliegt; damit würden wenige IDO-kompetente Zellen ausreichen, um eine relevante Toleranzbildung zu bewirken [71]. Es ist bislang noch nicht völlig geklärt, wie die IDO-Expression in DCs die Differenzierung der naiven T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen beeinflusst. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der IDO-Metabolit Kynurenin an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) bindet und damit essentiell für die Induktion regulatorischer T-Zellen ist [72, 73].

1.3.4.2 Induktion tolerogener DCs durch Vitamin-D₃

Obwohl Vitamin D₃ teils mit der Nahrung zugeführt werden muss, deckt der menschliche Körper einen Großteil seines Bedarfs selbst. Mit Hilfe von UV-Licht wird Vitamin D₃ in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin synthetisiert. Daraufhin wird Vitamin D₃ in der Leber an C-25 und anschließend in der Niere an C-1 hydroxyliert. [74] Die erste Hydroxylierung kann durch das Enzym Sterol-27-Hydroxylase Cytochrom P450 27A1 (kurz: CYP27A1) [75] oder durch die Vitamin-D-25-Hydroxylase Cytochrom P450 2R1 (kurz: CYP2R1) [76] erfolgen. Die zweite Hydroxylierung zu 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (kurz: 1,25(OH)₂D₃) wird durch die 1 α -Hydroxylase Cytochrom P450 27B1 (kurz: CYP27B1) katalysiert [77]. Von diesen Metaboliten bindet nur 1,25(OH)₂D₃ hochaffin an den intrazellulären Vitamin-D-Rezeptor (VDR). Als entscheidendes Effektorhormon im Calciumhaushalt erfüllt es seine wichtigsten Funktionen in der Niere, im Darm, in den Knochen und in der Nebenschilddrüse [74]. Im Jahr 1987 erschien erstmals eine Publikation, in der beschrieben wurde, dass der VDR auch von DCs exprimiert wird und eventuell für die immunregulatorischen Effekte von 1,25(OH)₂D₃ verantwortlich ist [78]. Erst einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass 1,25(OH)₂D₃ die Differenzierung und Reifung der DCs verhindert sowie zu einer verminderten Expression von CD80 und CD86 führt und folglich die stimulatorische Wirkung der DCs auf T-Zellen abschwächt [79-81]. Zudem inhibiert 1,25(OH)₂D₃ die IL-12-Sekretion und steigert die IL-10-Sekretion durch DCs [82].

1.3.4.3 Einfluss von Prostaglandin E₂ auf DCs

Ein weiterer immunmodulierender Stoffwechselweg ist der Prostaglandin-Stoffwechsel: Prostaglandin E₂ (PGE₂) gilt als wichtiger Mediator bei Entzündungsvorgängen und wird nach Stimulation mit proinflammatorischen Stimuli wie LPS oder TNF von verschiedenen Immunzellen vermehrt sezerniert [83]. Bei der Synthese von Prostaglandinen wird Arachidonsäure zunächst aus membrangebundenen Phospholipiden, z.B. mittels Phospholipase

A₂, freigesetzt und anschließend mittels Cyclooxygenase (COX) und Peroxidase zu Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgewandelt. Ausgehend von PGH₂ erfolgt dann die Synthese der verschiedenen Prostaglandine durch spezifische Enzyme. [84] Die beiden Isoformen der Cyclooxygenasen COX1, welche vorwiegend konstitutiv, und COX2, welche vorwiegend adaptiv exprimiert wird, übernehmen die führende Rolle bei der Synthese der Prostaglandine [85]. Bezüglich des Einflusses von PGE₂ auf DCs sind widersprüchliche Aussagen publiziert: Einerseits wurde beschrieben, dass die Anwesenheit von PGE₂ bei gleichzeitiger Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (TNF, IL-1 β , IL-6) die Reifung der DCs und ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren, begünstigt [86, 87]; andererseits zeigen DCs, die mit PGE₂ behandelt werden, eine verminderte Produktion von IL-12 und eine vermehrte Produktion von IL-10 [85, 88]. Da PGE₂ in DCs außerdem IDO induziert [89, 90], scheint es eher einen tolerogenen DC-Phänotyp zu erzeugen oder zumindest zu unterstützen [91].

1.3.4.4 Einfluss des Glukose-Stoffwechsels auf DCs

In der Literatur finden sich nur wenige Informationen darüber, ob der Glukose-Stoffwechsel eine Rolle für die Tolerogenität der DCs spielt. Ein zentrales Enzym des Glukose-Stoffwechsels ist die Hexokinase, welche die Glukose nach Eintritt in die Zelle phosphoryliert und somit ihren Eintritt in die Glykolyse steuert [84]. Es ist bisher nicht untersucht, welche Bedeutung sie für DCs haben. Ein weiteres wichtiges Enzym ist die Laktatdehydrogenase (LDH), die je nach Isoform die Umwandlung von Pyruvat in Laktat oder umgekehrt katalysiert [92, 93]. Im Rahmen einer Publikation über die Auswirkungen des Tumormilieus auf den Phänotyp von DCs wurde u.a. der Effekt von Laktat auf DCs untersucht. Dort konnte gezeigt werden, dass Laktat in der Lage ist, die Differenzierung der DCs zu inhibieren; weiterhin inhibierte es die Sekretion von IL-6, IL-12 und TNF, wogegen die Sekretion von IL-10 unverändert blieb [94].

1.3.5 Immunologische Toleranz und Transplantation

Die Fähigkeiten der DCs immunologische Toleranz zu induzieren, lässt an neue Möglichkeiten denken, Autoimmunerkrankungen, Allergien oder Abstoßungsreaktionen zu behandeln. Im Gegensatz zu klassischen Immunsuppressiva, welche systemisch wirken und somit teils lebensgefährliche Nebenwirkungen verursachen, könnte die Manipulation einer einzelnen Zellentität solche unerwünschten Effekte verringern. In Tiermodellen und *in vitro* Experimenten wurden mittlerweile vielfältige Mechanismen [53] entdeckt, wie tolerogene DCs *ex vivo* oder *in vitro* induziert werden können. Unabhängig vom experimentellen Aufbau ist

festzustellen, dass immunsuppressive Mediatoren wie IL-10, TGF- β , PGE₂, Vitamin D₃, oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF) bei der Induktion tolerogener DCs eine wichtige Rolle spielen [95-98]. Auch immunsuppressive Medikamente können auf den Phänotyp der DCs Einfluss nehmen. So wurde u.a. für Rapamycin und Dexamethason gezeigt, dass sie DCs auf verschiedenen Ebenen wie Differenzierung, Antigenaufnahme, Reifung und Zytokin-Sekretion beeinflussen [99, 100]. In einer vergleichenden Untersuchung [101] wurden verschiedene immunsuppressive Mediatoren (IL-10, TGF- β , Dexamethason, Vitamin D₃, Rapamycin), auf ihre Fähigkeit tolerogene DCs zu induzieren, analysiert. Es zeigte sich, dass IL-10 am effektivsten tolerogene DCs induzierte und diese einen stabilen Phänotyp besaßen. Obwohl die ersten Ergebnisse mit tolerogenen DCs bspw. in einem experimentellen Typ-I-Diabetes-Modell vielversprechend waren [102], gibt es noch zahlreiche Hindernisse, die es zu überwinden gilt, bis tolerogene DCs im Menschen als Therapeutikum effektiv eingesetzt werden können. So sind intravenös injizierte, tolerogene DCs bspw. kaum in der Lage durch die hochendothelialen Venolen in die sekundären lymphatischen Organe zu migrieren [103]. Diese Fähigkeit ist bei IL-10-induzierten DCs besonders schlecht ausgeprägt und wird von anderen immunsuppressiven Mediatoren zusätzlich beeinflusst [104]. Weiterhin muss zunächst geklärt werden, welche Applikationsform (intravenös, subkutan, intraartikulär, u.a.) optimal ist [105] und ob für bestimmte Antigene tolerogene DCs induzierbar sind [53].

1.4 Graft-versus-Host-Disease

Für Patienten mit malignen oder auch genetischen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems ist die (allogene) Stammzelltransplantation (SCT) eine etablierte und kurative, jedoch auch komplikationsträchtige Therapiemöglichkeit. Vor der Transplantation erfolgt zunächst eine myeloablative Radio- und Chemotherapie, welche die blutbildenden Zellen und eventuell noch vorhandene maligne Zellen zerstören soll [106]. Nach der Transplantation werden die Patienten prophylaktisch mit potenten Immunsuppressiva behandelt, um eine Immunreaktion gegen die Empfängerzellen zu unterbinden. Trotzdem ist die Graft-versus-Host-Disease (GvHD) neben den Infektionen die wichtigste Komplikation nach einer SCT. Die Effektorzellen der GvHD sind die T-Zellen des Spenders im Transplantat, die ihre Immunreaktion gegen den antigenfremden Empfänger richten [107]. Doch in gleicher Weise wie beim gesunden Menschen bedürfen sie einer Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen wie DCs, die ihnen die unbekanntenen Antigene präsentieren und sie dadurch aktivieren. Anschließend erfolgt die zelluläre und inflammatorische Immunantwort gegen den Empfänger [107].

Bei diesem Modell spielen sowohl die DCs des Empfängers als auch die des Spenders eine große Rolle [108-110]. Der Einsatz von tolerogenen DCs zur Behandlung der GvHD wurde im Mausmodell bereits mit positiven Ergebnissen getestet [111-113]. Eine Beeinflussung der DCs scheint also ein durchaus sinnvoller Ansatz für die Behandlung der GvHD zu sein.

1.5 Immunsuppression durch Antithymozytenglobulin (ATG)

ATG wird bereits seit mehreren Jahrzehnten bei allogener SCT zur Prophylaxe einer GvHD eingesetzt. ATG wird von verschiedenen Herstellern produziert, deren Präparationen sich in der Art der Immunisierung unterscheiden. In der hier vorliegenden Arbeit wurde ATG Fresenius S (20 mg/ml) verwendet. Dieses polyklonale IgG-Antikörpergemisch wird aus dem Serum von Kaninchen gewonnen, die mit Jurkat-Zellen (CD4⁺ Zelllinie einer T-Zell-Leukämie) immunisiert werden [114]. ATG ist bei der Behandlung oder Prävention einer akuten Transplantatabstoßung oder zur Prävention der akuten GvHD indiziert. Das polyklonale Antikörper-Gemisch ist gegen verschiedene Oberflächenantigene gerichtet. Mit durchflusszytometrischen Analysen konnte ein Teil der Zielantigene identifiziert werden, die verschiedene Immunzellen exprimieren [115-118]. Dementsprechend heterogen ist das Spektrum der nachgewiesenen Effekte. Zu den Zielzellen gehören T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, DCs und NK-Zellen [119]. Der Effekt, welcher am besten dokumentiert und vermutlich in erster Linie der klinischen Wirkung von ATG zugrundeliegt, ist die Depletion der T-Lymphozyten mittels Komplement-abhängiger Lyse oder alternativ mittels Apoptose und Phagozytose [120].

Neueren Metaanalysen zufolge muss der breite Einsatz von ATG allerdings zunehmend kritisch beurteilt werden. Zwar vermag ATG die Häufigkeiten der schweren Fälle von GvHD (Grad III und IV), jedoch nicht die Gesamthäufigkeit oder die Sterblichkeit nach SCT zu reduzieren [121-123].

2 Zielsetzung

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ATG verschiedene Effekte auf DCs hat. Möglicherweise spielen diese für seine immunsuppressive Wirkung eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit soll darauf aufbauend die Wirkung von ATG auf DCs näher untersucht werden. Mittels Titration soll zunächst die minimale Wirkkonzentration von ATG auf DCs ermittelt werden, wobei die verwendeten DCs aus humanen Monozyten *in vitro* differenziert wurden. Neben der Analyse der DC-Aktivierung und -Differenzierung (Zytokinantwort, Oberflächenantigene, Reifung) sollen verschiedene Stoffwechselwege, insbesondere der Tryptophan-Stoffwechsel analysiert werden. Im Vergleich zur Analyse der DCs sollen in gleicher Weise andere myeloische Zellen (z.B. Monozyten) untersucht werden.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Hersteller, Firmensitz
CASY® Zellzählgerät	Roche, Mannheim
CO ₂ -Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Eisbereiter	Scotsman, Mailand (Italien)
Elektrische Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Fernwald
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elutriator Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, Krefeld
Entwicklungsmaschine	AGFA, Köln
Image Reader	Biorad, München
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikroplattenleser	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
Mikroplattenschweißgerät	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Thermo Fisher, Waltham (USA)
Multipipetten, Pipetten	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND 1000	Peqlab, Erlangen
Netzteil für Elektrophorese	Seva, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler PTC-200	Biometra, Göttingen
Realplex Mastercycler Gradient S	Eppendorf, Hamburg
Rüttler	Janke & Kunkel, Staufen
Thermoschüttler	Eppendorf, Hamburg
Trennkammer für Gegenstromzentrifugation	Beckmann, München
Vortexer	Scientific Industries, New York (USA)
Waage LP 1200S	Sartorius, Göttingen
Wallac-Betaplattenzähler	Perkin Emler, Gaithersburg (USA)
Wallac-Harvesters	Perkin Emler, Gaithersburg (USA)
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Western-Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen

Zentrifuge für Mikrotiterplatten	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifugen	Heraeus, Hanau

3.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller, Firmensitz
Dispenserspitzen vers. Größen	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten vers. Größen	Corning, Kaiserslautern
Filterpipettenspitzen vers. Größen	Kisker Biotech, Steinfurt
Fotofilm Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Gel-Blotting-Paper	Schleicher & Schuell, Dassel
Immobilon-P Membran, PVDF	Merck Millipore, Darmstadt
Injektionskanüle (20 G)	BD Biosciences, Heidelberg
Injektionsspritze (1,0 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Kryobehälter für Kryoröhrchen	Nalgene, Roskilde (Dänemark)
Kryoröhrchen (2,0 ml)	Corning, Kaiserslautern
Magermilchpulver	TSI, Zeven
Mikrotiterplatten (96-Well)	BD Biosciences, Heidelberg
PCR-Platten twin.tec (96-Well)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (0,1 µl bis 10 µl)	Gilson, Limburg
Pipettenspitzen vers. Größen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrol-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Reaktionsgefäß (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäß (2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Siegelfolie für PCR-Platten	Eppendorf, Hamburg
Spritzenvorsatzfilter vers. Größen	Sartorius, Göttingen
Teflonbeutel Biofolie 25	Heraeus Sepatech, Hanau
Zellkulturflasche	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturflaschen vers. Größen	Corning, Kaiserslautern
Zellkulturplatte (6-Well)	Corning, Kaiserslautern
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.3 Chemikalien, Substanzen und Proteine

Substanz	Hersteller, Firmensitz
6-Aminocapronsäure	Sigma-Aldrich, München
Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin BSA	Sigma-Aldrich, München
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua B. Braun	B. Braun, Melsungen
CASY [®] ton	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Ficoll	PAN Biotech, Aidenbach
Glycin	Merck, Darmstadt
GM-CSF	PeptoTech, Hamburg
Humanes AB-Serum	PAN Biotech, Aidenbach
Humanes Immunglobulin	Octa-pharma, Langenfeld
Interferon- γ	Böhringer Ingelheim, Ingelheim
Interleukin-4	PeptoTech, Hamburg
L-Alanyl-L-Glutamin (200 nM)	Biochrom AG, Berlin
Lipopolysaccharid (S. abortus equi S-form)	Enzo Life Sciences, Lörrach
Luminol	Sigma-Aldrich, München
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, München
Penicillin Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich, München
Protease-Inhibitor Tablette, complete	Roche, Mannheim
Re-Blot Stripping-Lösung	Merck Millipore, Darmstadt
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, München
RPMI 1640 Medium	Life Technologies, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich, München
Szintillationslösung	Beide Canberra Packard, Schwadorf, Österreich
TopSeal-A-Folien	
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	USB, Cleveland (USA)
Tween 20	Sigma-Aldrich, München

3.4 Antikörper

Antikörper	Spezies	Konjugat	Hersteller, Firmensitz
Anti-Maus Ig	Kaninchen	HRP	Dako, Hamburg
Anti-Mensch CD86	Maus, IgG ₁	APC	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Mensch IDO	Maus, IgG ₁	Alexa Fluor 488	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Mensch IDO	Maus, IgG ₁	-	Adipogen, San Diego (USA)
Anti-Mensch β -Aktin	Ziege	-	Abcam, Cambridge (UK)
Antithymozytenglobulin	Kaninchen	-	Fresenius, Bad Homburg
Anti-Ziege Ig	Kaninchen	HRP	Dako, Hamburg
IgG Isotyp	Kaninchen	-	Molecular Innovations, Novi (USA)
Isotyp	Maus, IgG ₁	APC	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp	Maus, IgG ₁	Alexa Fluor 488	R&D Systems, Wiesbaden

3.5 Molekularbiologisches Material

3.5.1 Primer für die RT-qPCR

Die mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie aufgereinigten Primer für die RT-qPCR wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bzw. Metabion (Planegg-Martinsried) bezogen. Das Design der Primer erfolgte gemäß Kapitel 4.3.3.4.

Gen	Sequenz
<i>18S</i>	vorwärts: 5' ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG 3' rückwärts: 5' CCTACGGAAACCTTGTTACGAC 3'
<i>AHR</i>	vorwärts: 5' CTTCATATGTCGTCTAAGGTGTCTGCTG 3' rückwärts: 5' GGTGGAAGTATTGATCCATCTTTCCC 3'
<i>COX1</i>	vorwärts: 5' CTACGAGCAGTTCTTGTTCAACACC 3' rückwärts: 5' ATGACATCCACAGCCACATGCAG 3'
<i>COX2</i>	vorwärts: 5' CCAGAGCAGGCAGATGAAATACCAG 3' rückwärts: 5' TCGATGTCACCATAGAGTGCTTCC 3'
<i>CYP27A1</i>	vorwärts: 5' GTCTGGCTACCTGCACTTCTTACTG 3' rückwärts: 5' TCAGGGTCCTTTGAGAGGTGGT 3'

Gen	Sequenz
<i>CYP27B1</i>	vorwärts: 5' TGGCAGAGCTTGAATTGCAAATGG 3' rückwärts: 5' ACTGTAGGTTGATGCTCCTTTCAGGT 3'
<i>HK I</i>	vorwärts: 5' GAGGACTGGACCGTCTGAATGTG 3' rückwärts: 5' CGTCTGGTGCATGATTCTGGAG 3'
<i>HK II</i>	vorwärts: 5' TGCCCGCCAGAAGACATTAGAG 3' rückwärts: 5' GGTCCAAGGCCAAGAAGTCC 3'
<i>IDO1</i>	vorwärts: 5' GGTCATGGAGATGTCCGTAAGGT 3' rückwärts: 5' CCAGTTTCTTGGAGAGTTGGCAG 3'
<i>IDO2</i>	vorwärts: 5' GCATTCGTCATAGCAAGGAAAGTGG 3' rückwärts: 5' CTGTCAGCAAGTGGTCCTGTC 3'
<i>KYNU</i>	vorwärts: 5' TGTAGGAGCCAATGAGAAAGAAATAGCCC 3' rückwärts: 5' CGCATACTTTCTTCAATGTTAAGTCCGTG 3'
<i>LDHA</i>	vorwärts: 5' GGTTGGTGCTGTTGGCATGG 3' rückwärts: 5' TGCCCCAGCCGTGATAATGA 3'
<i>LDHB</i>	vorwärts: 5' GATGGTGGTTGAAAGTGCCTATGAAGTC 3' rückwärts: 5' AGCCACACTTAATCCAATAGCCCA 3'
<i>VDR</i>	vorwärts: 5' GTTGCCTCCAATGAGTCCTTCAC 3' rückwärts: 5' CAGTCCCACCTGGAACCTTGATGAG 3'

3.5.2 Molekularbiologisches Material

Substanz	Hersteller, Firmensitz
2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Deca-Nukleotid-Primer (50 µM)	Life Technologies, Darmstadt
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
QuantiFast SYBR Green PCR Kit	Quiagen, Hilden
RNase-free DNase Set	Quiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Quiagen, Hilden

3.6 Datenbanken und Software

Software	Hersteller, Firmensitz
Citavi 4	Swiss Academic Software, Wädenswil (Schweiz)
CorelDraw Graphics Suite X6	Corel, Ottawa (Kanada)
Eppendorf Software OCR	Eppendorf, Hamburg
FlowJo	Tree Star, Ashland (USA)
GraphPad Prism Version 5.02	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Image Lab	Biorad, München
Microsoft Office Excel 2013	Microsoft, Redmond (USA)
Microsoft Office Word 2013	Microsoft, Redmond (USA)
NanoDrop Software	Peqlab, Erlangen
Perl Primer Version 1.1.21	http://perlprimer.sourceforge.net/
Softmax	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
UCSC Genome Browser	http://www.genome.ucsc.edu/

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zentrifugationsschritte wurden, soweit nicht anders beschrieben, bei 4°C, 300g für 8 Minuten durchgeführt. Die Inkubation der Zellkulturen fand bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit im Brutschrank statt. Alle Tätigkeiten, die keimfreies Arbeiten erfordern, wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Das Zellkulturmedium setzte sich wie folgt zusammen:

Medium: RPMI 1640
 Glutamin (2 mmol/l)
 Penicillin (50 U/ml)
 Streptomycin (50 mg/ml)

Je nach Anwendungen wurden dem Medium entweder Fetales Kälberserum (FCS) oder humanes AB-Serum beigefügt. Ist im Text von *Medium A* bzw. *A⁺* die Rede, so enthält das Medium zusätzlich 2% bzw. 5% humanes AB-Serum. *Medium B* enthält stattdessen 10% FCS.

4.1.1 Elutriationszentrifugation: Gewinnung von humanen Monozyten

Die humanen Monozyten wurden mittels Leukapherese von freiwilligen und gesunden Spendern gewonnen. Dabei wurde dem Spender über einen periphervenösen Zugang Vollblut entnommen. Nachdem via Zellseparator die Leukozyten und die Thrombozyten von den Erythrozyten getrennt wurden, erhielt der Patient die nicht benötigte Erythrozytenfraktion über einen weiteren venösen Zugang wieder zurück [124]. In einem nächsten Schritt wurde das Leukapherisat, welches hauptsächlich Leukozyten und Thrombozyten, aber auch einige Erythrozyten enthält, mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll weiter aufgereinigt und anschließend dreimal mit PBS gewaschen [125], so dass die von Granulozyten gereinigte Zellfraktion nur noch die mononukleären Zellen enthielt. Als letzter Schritt folgte nun eine Gegenstromzentrifugation, mit der die Zellen nach Größe, Dichte und Form separiert werden können [126]. Die Zellen wurden dabei in verschiedene Fraktionen aufgeteilt und aus dem Schlauch- und Zentrifugensystem gewaschen. Da Monozyten die größten und schwersten Zellen dieser Population darstellen, wurden sie erst am Ende aus dem System ausgewaschen. Die isolierten Monozyten wurden anschließend in RPMI 1640 resuspendiert. Die Reinheit der Monozyten lag bei $\geq 85\%$ und wurde sowohl mikroskopisch als auch via

Analyse des Oberflächenantigens CD14 überprüft. Weiterhin wurde sichergestellt, dass sich die Monozyten des Spenders zum Zeitpunkt der Leukapherese in nichtstimulierten Zustand befanden. Dazu wurde regelmäßig das proinflammatorische Zytokin IL-6 in Zellkulturüberständen mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Monozyten identisch zu 4.1.2.2 24 Stunden ohne Stimulus kultiviert.

4.1.2 Kultivierung von humanen Monozyten

4.1.2.1 Einfrieren und Auftauen

Nach abgeschlossener Elutriation können die Monozyten entweder sofort in Kultur genommen oder zunächst eingefroren werden, um sie zu einem späteren Zeitpunkt verwenden zu können. Beim Einfrieren wurden etwa 20 bis 40 Mio. Monozyten in 900 μ l *Medium B* aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zusammen mit 180 μ l DMSO (Endkonzentration 10%) und 720 μ l FCS (Endkonzentration 40%) in Kryoröhrchen überführt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen anschließend für 48 h in einem mit Isopropanol gefülltem Kryogefäß bei -80°C gelagert, welches eine stufenweise Abkühlung um etwa 1°C pro Minute ermöglicht. Die Langzeitlagerung fand in flüssigem Stickstoff statt (-196°C). Beim Auftauen wurden die Kryoröhrchen zunächst einige Minuten auf Eis gelagert. Sobald die Zellsuspension ganz aufgetaut war, wurde sie in *Medium B* überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet in *Medium B* aufgenommen und kultiviert.

4.1.2.2 Zellansatz für Protein- und RNA-Lysate

Die Monozyten wurden in *Medium A* kultiviert und in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro ml Medium in 6-Well-Mikrotiterplatten zu je 2 ml Zellsuspension pro Well ausgesät. Die Zellen wurden mit ATG (5, 10, 50, 100 und 500 $\mu\text{g/ml}$), IgG- Kontrolle (100 und 500 $\mu\text{g/ml}$), LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml), IFN- γ (100 U/ml) plus LPS (10 ng/ml) und IFN- γ (100 U/ml) plus ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Die Zellen wurden je nach Experiment 24 oder 48 Stunden lang inkubiert.

Da Monozyten nach Stimulation mit LPS oder auch ATG stark adhärent wachsen und nur ein geringer Anteil der Zellen in Suspension bleibt, ist eine vollständige Ernte nur mit dem Zellschaber möglich. Dafür wurde das Medium zunächst vollständig in ein 2 ml Tube überführt und abzentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen, in ein 1,5 ml Tube überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Um jegliche Reste des Mediums zu

entfernen, wurden sowohl das Well als auch das Zellpellet mit 4°C kaltem PBS gespült. Danach wurde der jeweilige Lysepuffer in das Well gegeben. Der Zellteppich war nun mit dem Lysepuffer bedeckt und wurde mit einem Zellschaber abgekratzt. Dieses Lysat wurde auf das Zellpellet pipettiert und anschließend weiterverarbeitet (siehe dazu 4.2.1 für Protein-Lysate, 4.3.1 für RNA-Lysate). Um ausreichende Mengen RNA bzw. Protein zu bekommen, mussten mehrere Wells gepoolt werden: Für Protein-Lysate wurden daher 4 (8 Mio. Monozyten) und für RNA-Lysate jeweils 2 Wells (4 Mio. Monozyten) gepoolt.

4.1.3 Kultivierung und Generierung von humanen DCs

Es ist möglich DCs *in vitro* aus humanen Monozyten zu generieren. Dazu wurden dem *Medium B* Interleukin-4 (IL-4, 144 U/ml) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF, 225 U/ml) hinzugefügt. Anschließend wurden die Monozyten in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro 1,5 ml Medium 6 Tage lang in Zellkulturflaschen inkubiert. Im Lichtmikroskop wurde die Differenzierung morphologisch kontrolliert.

4.1.3.1 Stimulation und Ernte für Protein-Lysate und Zell-Analyse

Im Anschluss an diesen Differenzierungsprozess wurden die DCs für die Analyse der Proteinexpression und für die Weiterverarbeitung der unversehrten Zellen (Durchflusszytometrie, Kokultur) direkt in den Zellkulturflaschen stimuliert. Das Medium wurde dabei nicht gewechselt. Die Zellen wurden 48 Stunden lang mit oder ohne ATG (100 µg/ml), IgG-Kontrolle (100 µg/ml), LPS (10 ng/ml), IFN-γ (100 U/ml), IFN-γ (100 U/ml) plus LPS (10 ng/ml) und IFN-γ (100 U/ml) plus ATG (100 µg/ml) inkubiert. Durch diese Stimulation wurden besonders die mit ATG oder LPS stimulierten Zellen teilweise adhären. Um die Zellen möglichst intakt zu ernten, wurde die Zellsuspension zunächst aus den Zellkulturflaschen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert. Währenddessen wurden die Zellkulturflaschen mit 20 ml 4°C kaltem PBS gefüllt und so für 5 min bei 4°C inkubiert. Dadurch lösten sich die meisten adhären Zellen ab. 1,5 ml des Überstandes aus dem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden in ein entsprechendes Tube überführt und bis zur weiteren Analyse bei -20°C aufbewahrt, der Rest wurde verworfen. Nach anschließendem Überführen der PBS-Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen wurde ein weiteres Mal zentrifugiert. Das PBS wurde verworfen und das Zellpellet erneut in 1 bis 2 ml *Medium B* resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellkonzentration mittels automatisierter Zellzählung bestimmt. Für die Durchflusszytometrie und die Kokultur konnten diese Zellen verwendet werden. Für

Protein-Lysate wurden die Zellen ein weiteres Mal abzentrifugiert, anschließend mit 4°C kaltem PBS gewaschen und dem Lysepuffer ausgesetzt. Einzelheiten siehe dazu 4.2.1.

4.1.3.2 Stimulation und Ernte der DCs für mRNA-Analyse

Für die Analyse der mRNA-Expression wurden die Zellen im Anschluss an den Differenzierungsprozess zunächst aus den Zellkulturflaschen geerntet. Da nicht stimulierte DCs i.d.R. nicht in den Zellkulturflaschen adhären, konnte die Zellsuspension einfach in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und abzentrifugiert werden. Nach erneuter Resuspension in wenigen ml *Medium A* und automatisierter Zellzählung wurden die DCs in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro ml *Medium A* in 6-Well-Mikrotiterplatten zu je 2 ml pro Well ausgesät und identisch zu den Monozyten (siehe 4.1.2.2) stimuliert. Die Zellen wurden 4 oder 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie wie Monozyten geerntet (siehe 4.1.2.2).

4.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Sowohl Monozyten als auch DCs wurden i.d.R. mittels automatisierter Zellzählung gezählt. In einigen Experimenten wurde alternativ eine Neubauer-Zählkammer verwendet.

4.1.4.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension zunächst mit einer 0,2% Trypanblau-Lösung verdünnt (Verdünnungsfaktor n meist zwischen 2 und 16). Trypanblau ist nur bei intakter Zellmembran nicht zellgängig, somit erscheinen lebende Zellen ungefärbt, tote Zellen und Fragmente sind dagegen bläulich. Im Phasenkontrastmikroskop wurde anschließend die Zahl der ungefärbten Zellen in den 4 Großquadranten der Neubauer-Zählkammer bestimmt und der Durchschnittswert m pro Großquadrat ermittelt. Die Zellkonzentration c (in Zellen/ml) berechnet sich dann nach folgender Formel:

$$c = m \cdot n \cdot 10^4$$

4.1.4.2 Bestimmung der Zellzahl mittels automatisierter Zellzählung

Eine Alternative zur Zählkammer stellt die automatische Zellzählung dar, wie sie bspw. durch das Gerät CASY® (Innovatis, Mannheim) ermöglicht wird. Die Zellen werden in einer isotonen Elektrolytlösung (CASY® ton, Innovatis, Mannheim) verdünnt und von einer Kapillare angesaugt. Der Durchfluss der Zellen durch diese Kapillare erhöht den Widerstand und erzeugt einen elektrischen Puls. Das Gerät registriert sowohl die Quantität als auch die Qualität der Pulse und bestimmt damit die Größe und Anzahl der registrierten Partikel. Dies

ermöglicht, Zellfragmente und kleinere oder auch größere Zellpopulationen aus der Zählung auszuschließen. Das Gerät wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

4.1.5 Kokultur von DCs und T-Zellen

Für die Kokultur wurden die DCs, wie in 4.1.3.1 beschrieben geerntet und anschließend einmal mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Die allogenen T-Zellen wurden ebenfalls aus der Elutriation isoliert, eingefroren und für die Kokultur wieder aufgetaut. Sowohl die T-Zellen als auch die DCs werden im *Medium A*⁺ suspendiert. Vor Verwendung wurde das Medium dreifach filtriert, um Lipide zu entfernen. Die Kokultur wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte zu 200 µl pro Well angesetzt. Der Reaktionsansatz bestand aus 100.000 T-Zellen pro Well und verschiedenen Konzentrationen von DCs (20.000, 10.000, 5.000, 2500, 1250, 625 Zellen pro Well). Außerdem wurde sowohl eine Kontrolle ohne T-Zellen und als auch eine Kontrolle ohne DCs mitgeführt. Jeder Reaktionsansatz wurde dreifach angesetzt. In weiteren Ansätzen wurden zwei unterschiedlich stimulierte DCs im Verhältnis 1:2 gemischt. Das heißt ein Ansatz mit 100.000 T-Zellen und 20.000 DCs enthielt bspw. je 10.000 DCs, die mit LPS oder mit ATG stimuliert wurden. Die Kokultur inkubierte 5 Tage im Brutschrank. Im Anschluss wurde ein Proliferationsassay durchgeführt.

4.1.6 Proliferationsassays

Um die T-Zell-Proliferation zu quantifizieren wurde die [³H]-Thymidin-Markierung verwendet. Vergleichend dazu wurde weiterhin ein Assay mit BrdU durchgeführt.

4.1.6.1 [³H]-Thymidin-Markierung

Die [³H]-Thymidin-Markierung erfolgte im Anschluss an die Inkubationszeit von 5 Tagen in 96-Well-Mikrotiterplatten. Den Zellen wurde pro Well 0,5 µCi der radioaktiven Lösung zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 18 bis 20 Stunden wurden die Zellen mit Hilfe des Wallac-Harvesters auf 96-Well-Filterplatten übertragen. Anschließend wurden je 50 µl Szintillationslösung die Wells gegeben und die Mikrotiterplatte mit TopSeal-A-Folien verschweißt. Zum Schluss wurde die emittierte β⁻-Strahlung, die vom Einbau des [³H]-Thymidins in die DNA der T-Zellen herrührt, mit dem Wallac-Betaplattenzähler registriert. Die Messergebnisse werden als *counts per minute* (cpm) ausgegeben. Dies gilt als verlässliches Maß für die Zellproliferation [127]. Die radioaktive Markierung und die Messung der Signale wurden von Frau Alice Peuker durchgeführt.

4.1.6.2 Bromdesoxyuridin (BrdU)

Vergleichend dazu wurde ein *Cell Proliferation ELISA*, *BrdU* (colorimetric, Roche, Mannheim) durchgeführt. Der Assay wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) als Thymidin-Analogon in die zelluläre DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird [128]. Die eingebaute DNA wird mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten Antikörpers detektiert. Die Peroxidase setzt ein Substrat um und bewirkt einen Farbumschlag, der photometrisch bestimmt werden kann.

4.1.6.3 Vergleich der [³H]-Thymidin-Markierung mit dem BrdU-ELISA

Im Rahmen einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) wurden die beiden Assays miteinander verglichen. Obwohl die [³H]-Thymidin-Markierung bereits etabliert war, schien der ELISA mit der BrdU-Markierung eine sinnvolle Alternative zu sein, da er billiger und einfacher zu handhaben war. Zudem fällt dabei kein radioaktiver Abfall an.

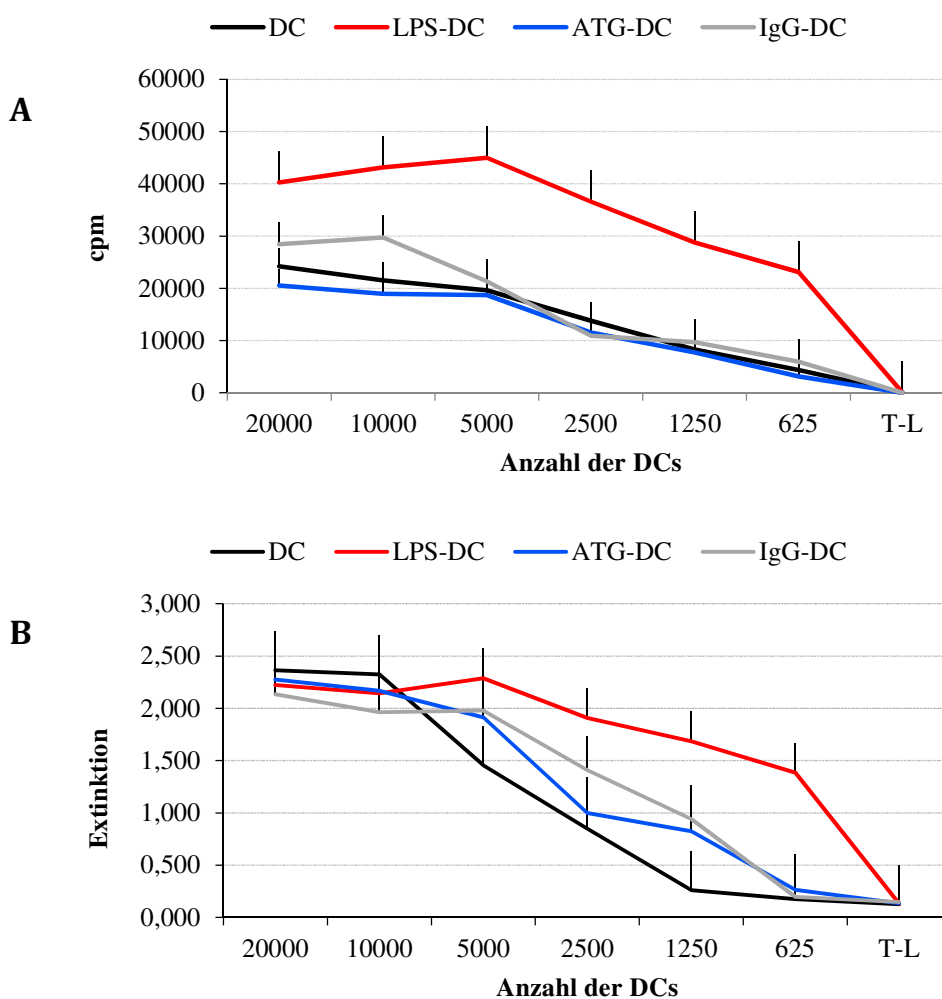


Abbildung 4-1: Vergleich von [³H]-Thymidin-Markierung (A) mit BrdU-Assay (B)

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 48 Stunden mit oder ohne LPS (10 ng/ml), ATG (100 µg/ml) oder IgG-Kontrolle (100 µg/ml) inkubiert. Die jeweiligen DCs werden mit DC, LPS-, ATG- oder IgG-DC bezeichnet. Im Anschluss

wurden unterschiedliche Konzentrationen von DCs mit je 100.000 T-Zellen in Kokultur gesetzt und für 5 Tage inkubiert. Im Anschluss wurde entweder die [³H]-Thymidin-Markierung (**A**) oder der BrdU-ELISA (**B**) durchgeführt. Dargestellt sind die gemittelten cpm-Werte (**A**) oder Extinktionen (**B**) + Standardfehler aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten.

Abbildung 4-1 zeigt den Vergleich der beiden Methoden in 3 unabhängigen Experimenten. Zunächst ist zu sehen, dass der BrdU-ELISA (**B**) bei den höheren Zellkonzentration (20.000, 10.000, 5.000) keine Differenzierung der verschiedenen DC-Populationen erlaubt. Mit der [³H]-Thymidin-Markierung ist die Differenzierbarkeit für alle Zellkonzentrationen ähnlich gut. Bei den niedrigeren Zellkonzentrationen lassen sich die Signale im BrdU-ELISA zwar etwas besser differenzieren, wobei diese Unterschiede nicht signifikant waren. Daher fiel die Entscheidung trotz schlechterer Handhabung zugunsten der [³H]-Thymidin-Markierung.

4.1.7 Fluoreszenz-Markierung für die Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die DCs, wie in 4.1.3.1 beschrieben, kultiviert und geerntet. Es wurden das Oberflächenprotein CD86 und das intrazelluläre Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) mit direkt konjugierten Antikörpern gefärbt. Um Fluoreszenz-Signale zu berücksichtigen, die durch unspezifische Bindung der Antikörper entstehen, wurde parallel dazu eine Färbung mit Isotyp-Kontrollen durchgeführt. Pro Färbung und Ansatz wurden 0,5 Mio. DCs verwendet. Die entsprechende Menge der Zellsuspension wurde in Polystyrol-Röhrchen überführt und einmal mit Wasch-/Block-Puffer (500 ml PBS + 5 ml Natriumazid + 6 ml humanes Immunglobulin [Octa-pharma, Langenfeld]) gewaschen. Anschließend wurde der Anti-CD86-Antikörper bzw. der entsprechende Isotyp dem Datenblatt entsprechend hinzugegeben. Nach 30 min bei 4°C wurden die Zellen ein weiteres Mal mit Wasch-/Block-Puffer gewaschen. Daraufhin erfolgte die intrazelluläre Färbung von IDO: Dazu wurden die Zellen mit 500 µl *Fixation Buffer* (R&D Systems, Wiesbaden) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur, wurden die Zellen zweimal mit PBS und einmal mit *Permeabilisation/Wash-Buffer* (R&D Systems, Wiesbaden) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 50 µl desselben Puffers aufgenommen. Nun wurde der Anti-IDO-Antikörper bzw. der entsprechende Isotyp dem Datenblatt entsprechend hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei 4°C wurden die Zellen zweimal mit *Permeabilisation/Wash-Buffer* und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl 1% Paraformaldehyd fixiert. Die Messung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer FACS Calibur. Die Aufnahme und Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *CellQuestPro* und *FlowJo*.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

Zur Analyse von Proteinen wurden Zellysate aus den Zellen isoliert und deren Proteinmenge quantifiziert, um sie mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufzutrennen und mittels Western Blot detektieren zu können.

4.2.1 Herstellung der Proteinlysate

Um Proteinlysate von den Zellen zu isolieren, wurden ein gebrauchsfertiger Lysepuffer (*Radio-Immunoprecipitation Assay*-Puffer [Sigma-Aldrich, München]) und ein Protease-Inhibitor-Gemisch (Protease-Inhibitor Tablette, *complete* [Roche, Mannheim]) verwendet. Der fertige Protein-Lysepuffer wurde bei -20°C gelagert und erst kurz vor Verwendung aufgetaut. Pro 10 Mio. Monozyten oder 5 Mio. DCs wurden 100 μl Lysepuffer eingesetzt. Anknüpfend an 4.1.2.2 und 4.1.3.1, wo beschrieben wurde, wie die Zellen für ein Protein-Lysat geerntet werden, wird nun die weitere Verarbeitung des Lysats erläutert. Die jeweiligen Reaktionsgefäße mit Zellpellet und Lysepuffer wurden gründlich gevortext und anschließend für mindestens 24 Stunden bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde das Lysat für 15 min bei 10.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Proteinen wurde in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gegebenenfalls aliquotiert. Das Pellet mit Resten von Zellmembran und Zellkernen wurde verworfen. Anschließend wurde das isolierte Protein bei -80°C gelagert.

4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um später bei der Gelelektrophorese gleiche Mengen an Protein auftragen zu können, war es notwendig die Proteinkonzentration der Lysate zu ermitteln. Dazu wurde der kommerziell erhältliche *DC Protein Assay* (Bio-Rad, München) verwendet. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Methode nach Lowry [129]. In alkalischer Lösung bildet sich zwischen Cu^{2+} -Ionen und den Peptidbindungen der Proteine ein blau-violetter Komplex (Biuret-Reaktion). In einem zweiten Schritt werden die Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen reduziert. Diese wiederum reduzieren das gelbliche Folin-Ciocalteu-Reagenz, eine Mischung aus Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren, zu Molybdän- und Wolframblau. Die resultierende Blaufärbung kann bei verschiedenen Wellenlängen vermessen werden. Der Assay wurde nach den Herstelleranweisungen in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt. Als Standard wurde Rinder Serum-Albumin mit einer Messobergrenze von 1,5 mg/ml verwendet. Die Proben wurden je nach erwarteter Proteinmenge zwischen 1:5 und 1:20 in PBS verdünnt.

4.2.3 Vorbereiten und Auftragen der Proben

Nach erfolgreicher Proteinbestimmung wurden die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet. Dazu wurden 20 µg Protein entnommen und mit PBS auf ein Volumen von 20 µl verdünnt. Weiterhin wurden 20 µl eines 2-fach konzentrierten Ladepuffers (s.u.) hinzugegeben, so dass die Proteinkonzentration 0,5 µg/µl betrug.

Tabelle 4-1: Ladepuffer (2-fach konzentriert)

SDS	2,0 g	10%
Bromphenolblau	10 mg	0,02%
TRIS-Puffer 13,0 g TRIS in 100 ml H ₂ O _{bidest} (1,07 M)	5 ml	107 mM
Glycerin	10 ml	20%
β-Mercaptoethanol	5 ml	10%
H₂O_{bidest}	auf 50 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Der Ladepuffer erfüllt mehrere Zwecke: Das Glycerin sorgt mit seiner hohen Dichte dafür, dass das Gemisch leichter in die Probenaschen absinkt und dort verbleibt. Die Einfärbung mittels Bromphenolblau ermöglicht die Verfolgung der Lauffront während der Elektrophorese. Das β-Mercaptoethanol ist als starkes Reduktionsmittel in der Lage, die Disulfidbrücken der Proteine zu spalten und diese zu denaturieren. Gleichzeitig lagert sich das negativ geladene SDS an die Proteine. Durch die Abstoßung benachbarter SDS-Moleküle entfalten sich die Proteine linear und verlieren damit ihre Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur. Dieser Vorgang wird durch das spätere Aufkochen noch verstärkt. Zusätzlich überdeckt das SDS die Eigenladung der Proteine. Dadurch beeinflussen weder Struktur noch Eigenladung die Elektrophorese. Stattdessen ist die Auftrennung nur von der Größe und damit von der Masse der Proteine abhängig [130].

Die mit dem Ladepuffer versetzten Proben wurden gevortext, für 10 min bei 95°C in einem Thermoschüttler aufgeköcht, danach kurz abzentrifugiert und bis zum Auftragen auf Eis gestellt. Je nach Kamm wurden unterschiedliche Mengen an Protein aufgetragen. In einen Kamm mit 10 oder 11 Probenaschen wurden jeweils 5 µg (\cong 10 µl) und in einem mit 16 Probenaschen je 2,5 µg (\cong 5 µl) der Probe aufgetragen. Als Molekulargewichtstandard wurde der *Kaleidoscope Prestained Standard* (Biorad, München) verwendet. Hiervon wurden pro Gel 5 µl aufgetragen.

4.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE laufen die Proteine vom Minus- zum Pluspol. Sie wandern dabei durch ein löchriges, molekulares Netz, welches durch Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid entsteht. In der vorliegenden Arbeit wurde das sogenannte Lämmli-System verwendet [131]. Dabei handelt es sich um eine diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Diskontinuierlich bezieht sich dabei auf den pH-Sprung zwischen Sammel- und Trenngel. Dieses System stellt sicher, dass die Proteine im Sammelgel gestapelt werden und gleichzeitig ins Trenngel eintreten können. Die verwendeten Sammel- bzw. Trenngele hatten dabei eine Acrylamidkonzentration von 5% bzw. 12%. Für das Gießen der Gele wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Tabelle 4-2: Stammlösungen für...

	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
Trenngelpuffer 91 g TRIS in 500 ml H ₂ O _{bidest} (pH = 8,8)	25 ml	–
Sammelgelpuffer 30 g TRIS in 500 ml H ₂ O _{bidest} (pH = 6,8)	–	25 ml
SDS-Lösung 10 g SDS in 100 ml H ₂ O _{bidest}	1 ml	1 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	40 ml	16,7 ml
H ₂ O _{bidest}	34 ml	57,3 ml

Die Polymerisation wurde durch Zugabe der Ammoniumperoxidsulfat (APS)-Lösung als Polymerisationsinitiator und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator entsprechend der folgenden Tabelle gestartet:

Tabelle 4-3: Gellösungen für...

	12% Trenngel	5% Sammelgel
Trenngelstammlösung	6 ml	–
Sammelgelstammlösung	–	2,5 ml
TEMED	6 µl	2,5 µl
APS-Lösung 50 mg APS in 500 µl H ₂ O _{bidest}	30 µl	20 µl

Die Gellösungen wurden erst unmittelbar vor Verwendung hergestellt. Zunächst wurde die Trenngellösung in die vorbereitete Gelkammer gegeben und dann mit H₂O_{bidest} überschichtet. Dies gewährleistet eine gleichmäßige Polymerisation des Gels am Rand. Nach ca. 30 min wurde das Wasser abgossen und die Sammelgellösung in die Gelkammer gegeben. Zügig wurde dann zur Aussparung der Probestaschen ein geeigneter Kamm luftblasenfrei in

die Gellösung eingebracht. Nach weiteren 30 min war das Gel fertig und wurde sofort verwendet. Das fertige Gel wurde dann samt Gelkammer in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Diese wurde mit Lauffpuffer gefüllt und auf ihre Dichtigkeit überprüft.

Tabelle 4-4: Lauffpuffer (5-fach konzentriert)

Glycin	216 g	0,95 M
TRIS	15 g	40 mM
SDS	15 g	0,5 %
H₂O_{bidest}	auf 3000 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Nach Entfernen des Kamms wurden die vorbereiteten Proben (siehe 4.2.3) und der Molekulargewichtsstandard in die Probentaschen pipettiert. Danach wurde die Apparatur unter Strom gesetzt. Das Einlaufen der Proteine in das Gel fand bei 80 V statt, das Sammelgel durchwanderten die Proteine bei 100 V, das Trenngel bei 130 V. Sobald die Lauffront den unteren Rand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet.

4.2.5 Western Blot

Um die elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen immunologisch nachweisen zu können, wurden sie vom Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu das sogenannte Semidry-Blot-System verwendet. Dafür wurden zunächst drei verschiedene Puffer benötigt:

Tabelle 4-5: Anodenpuffer A

TRIS	36,3 g	300 mM
Methanol	200 ml	20%
H₂O_{bidest}	auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Tabelle 4-6: Anodenpuffer B

TRIS	3,03 g	25 mM
Methanol	200 ml	20%
H₂O_{bidest}	auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Tabelle 4-7: Kathodenpuffer C

6-Aminohexansäure	5,2 g	40 mM
Methanol	200 ml	20%
H₂O_{bidest}	auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Die PVDF-Membran wurde passend für das Gel zugeschnitten und in Isopropanol getränkt, erst dann ist sie funktionsfähig. Die Blotpapiere (jeweils 1 Blatt) wurden im jeweiligen Puffer getränkt und dann zusammen mit Gel und PVDF-Membran folgendermaßen angeordnet:

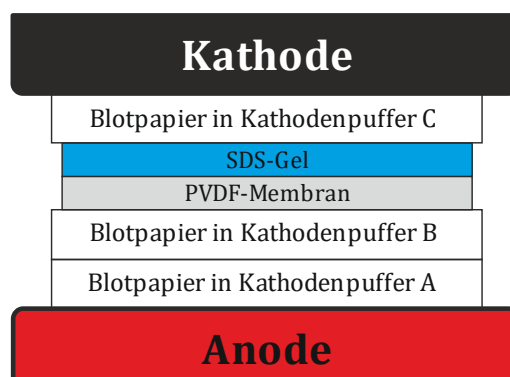


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus

Die negativ geladenen Proteine „laufen“ von der Kathode zur Anode und sind durch die Blot-Anordnung in der Lage an der PVDF-Membran zu binden. Die versch. Puffer erleichtern diesen Prozess.

Es war darauf zu achten, dass sich zwischen den Schichten keine Luftblasen befinden und der Deckel (Kathode) der Blot-Apparatur direkt auf dem obersten Blotpapier aufsitzt. Danach wurde die Blot-Apparatur unter Spannung gesetzt. Es wurde 60 min lang bei 8 V geblottet. Sobald die Apparatur unter Strom gesetzt wird, werden die immer noch stark negativ geladenen Protein-SDS-Komplexe in Richtung Anode, und damit auf die Membran gezogen. An dieser bleiben sie dann aufgrund von nicht-kovalenten Wechselwirkungen haften.

4.2.6 Immunologische Färbung und Entwicklung der Membran

Nach erfolgreichem Proteintransfer folgte jetzt die immunologische Detektion der gesuchten Proteine. Zunächst wurden folgende Puffer benötigt:

Tabelle 4-8: TBS-Puffer (10-fach konzentriert)

TRIS	45,8 g	189 mM
NaCl	175,5 g	1,5 M
HCl	pH = 7,4 einstellen	
H₂O_{bidest}	auf 2000 ml Gesamtvolumen auffüllen,	

Tabelle 4-9: Waschpuffer

TBS-Puffer (10-fach)	100 ml	18,9 mM
Tween 20	1 ml	0,1%
H₂O_{bidest}	auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die PVDF-Membran über Nacht bei 4°C in 5% Magermilchlösung (5 g Magermilchpulver in 100 ml TBST-Puffer, filtriert) inkubiert. Danach wurde der jeweilige Primärantikörper in 5% Magermilchlösung verdünnt [Anti-IDO (R&D Systems, Wiesbaden) 1:500; Anti-IDO (Adipogen, San Diego, USA) 1:1000; Anti- β -Aktin (abcam, Cambridge, UK) 1:1000] und mit der Membran für 90 bis 120 min (s.u.) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal je 15 min mit Waschpuffer gespült, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Ebenso wurde mit den Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern [Anti-Maus (Dako, Hamburg) 1:2500; Anti-Ziege (Dako, Hamburg) 1:2000] verfahren. Danach inkubierte die Membran 2 min lang bei Raumtemperatur in der selbst hergestellten Entwicklerlösung [132]:

Tabelle 4-10: Entwicklerlösung (ECL-Mix)

Luminol	100 mg	250 mM
p-Coumarin-Säure	13,14 mg	90 mM
TRIS-HCl (1,0 M) 12,1 g TRIS in 100 ml H ₂ O _{bidest}	20 ml	100 mM
DMSO	2 ml	1%
H₂O_{bidest}	auf 200 ml Gesamtvolumen auffüllen	

Anschließend wurde die Membran in einer Fotokassette fixiert. In einer Dunkelkammer wurde ein lichtempfindlicher Film auf die Membran gelegt. Abhängig von der Signalstärke wurde er unterschiedlich lange aufgelegt und danach entwickelt. Zum Schluss wurde der fertige Film in die Fotokassette mit der Membran gelegt und der Standard übertragen. Mit Hilfe der *Reblot Stripping Solution* (Merck Millipore, Darmstadt) wurde der gebundene Antikörper wieder vollständig entfernt, so dass auch beim Nachweis von verschiedenen Proteinen auf einer Membran keine Doppelbanden zu sehen waren. Die *Stripping Solution* wurde gemäß den Herstellerangaben verwendet. Im Anschluss daran wurde die Membran wieder über Nacht bei in 5% Magermilchlösung inkubiert und erneut gefärbt.

4.2.7 Auswertung der entwickelten Filme

Die entwickelten Filme wurden auf ein weißes Blatt Papier gelegt und so mit Hilfe des *Image Readers* (Biorad, München) und der Software *Image Lab* (Biorad, München) eingelesen und digitalisiert. Dafür wurde der Modus *colorimetric* in der Kategorie *Blots* verwendet. Die eingelesenen Filme wurden anschließend mit der Funktion *Volume Tools* quantifiziert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

Bei allen molekularbiologischen Arbeiten wurden RNase-/DNase-freie Filterspitzen und RNase-/DNase-freies H₂O verwendet.

4.3.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Im Kapitel 4.1.2.2 wurde beschrieben wie die Zellen für RNA-Lysate geerntet wurden. Die RNA-Isolation wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Für 2 bis 5 Mio. Zellen wurden 350 µl Lysepuffer verwendet. Der Lysepuffer enthält u.a. Guanidinisothiocyanat, welches als chaotrope Substanz Zellen lysiert und Proteine (u.a. RNasen) sehr effektiv denaturiert. Die Isolationsmethode beruht darauf, dass die RNA zunächst an eine Membransäule gebunden und nach mehreren Waschschritten, die u.a. Proteine entfernen, mit H₂O eluiert wird. Zusätzlich wurde mit dem *RNase-free DNase Set* (Qiagen, Hilden) ein DNase-Verdau gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die RNA-Menge wurde mittels *NanoDrop 1000* (Peqlab, Erlangen) photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.3.2 Reverse-Transkriptase-PCR

Mit dem Ziel die Expression bestimmter mRNA-Sequenzen zu quantifizieren, wurde als nächstes die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde die Reverse Transkriptase verwendet. Dafür wurden folgende Materialien verwendet:

Tabelle 4-11: Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes

• 500 ng der RNA-Probe, mit H ₂ O auf 13 µl aufgefüllt	13 µl
• 2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphate-Mix (dNTP-Mix, je 10 µM)	1 µl
• DekaNukleotid-Primer („Random Decamers“)	1 µl
• M-MLV-Puffer (5-fach konzentriert)	4 µl
• M-MLV Reverse Transkriptase aus dem murinen Leukämie-Virus, Stamm Moloney (kurz: M-MLV)	1 µl
	20 µl

Die Reaktion umfasste folgende Schritte: Zunächst wurde die auf 13 µl aufgefüllte RNA-Probe mit dem dNTP-Mix und den DekaNukleotid-Primer in einem 0,5 ml Tube vermischt. Dann wurde dieser Reaktionsansatz im Thermocycler für 5 min bei 65°C aufgeheizt und anschließend auf Eis gestellt. Dort wurde der M-MLV-Puffer hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde weitere 2 min bei 42°C inkubiert, woraufhin die Reverse Transkriptase beigegeben wurde. Nun inkubierte der Ansatz 50 min lang bei 42°C (in dieser Phase findet die

reverse Transkription statt), gefolgt von 15 min bei 65°C (Inaktivierung der reversen Transkriptase). Die cDNA wurde danach bei -20°C gelagert.

4.3.3 Real-time „quantitative“ PCR (RT-qPCR)

Nach erfolgreicher cDNA-Synthese erfolgte die Quantifizierung der gesuchten mRNA-Sequenzen mittels RT-qPCR. Das Prinzip der hier angewandten Methode basiert auf einer Polymerase-Kettenreaktion. Dem Reaktionsansatz wird der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green I* (SG) zugegeben. SG interkaliert in doppelsträngige DNA. Der daraus entstehende DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert und emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Sobald die Amplifikation der gesuchten Sequenz beginnt, steigt auch die gemessene Fluoreszenz an. Der PCR-Zyklus, in dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt, ist der sogenannte *cycle threshold*-Wert (*ct*-Wert). Eine Standardgerade mit bekannten cDNA-Mengen und den daraus bestimmten *ct*-Werten ermöglicht die Berechnung einer relativen cDNA-Menge im Reaktionsansatz. Der Nachteil bei dieser Variante der RT-qPCR ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Sobald bei der PCR artifizielle Produkte entstehen, verfälscht dies die wahre cDNA-Menge. Mit einer Analyse der Schmelzkurve am Ende der PCR kann man diesen Nachteil ausgleichen und erkennen, ob mehr als ein Produkt entstanden ist.

4.3.3.1 Reaktionsansatz der RT-qPCR

In der vorliegenden Arbeit wurde der *QuantiFast SYBR Green PCR Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Reaktionen wurden in 96-Well-PCR-Platten angesetzt. Das Reaktionsvolumen umfasste 10 µl und setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 4-12: Zusammensetzung des RT-qPCR-Ansatzes

• <i>QuantiFast SYBR Green Mix</i>	5 µl
• H ₂ O	3 µl
• Sense-/Antisense-Primer (10 µM), jeweils	0,5 µl
• cDNA-Probe (1:10 in H ₂ O verdünnt, Standardreihe)	1 µl
	10 µl

Die Standardwerte wurden als Doppel-, die zu untersuchenden Proben als Dreifachwerte angesetzt. Die unbekanntenen Proben wurden 1:10 in H₂O verdünnt. Als Standard wurde jeweils eine für das zu untersuchende Gen (stark) positive cDNA-Probe eingesetzt. Diese wurde für die niedrigste Verdünnung 1:2 in H₂O verdünnt. Rein deskriptiv wird diese Ver-

dünnung als „unverdünnter“ Standard bezeichnet. Davon ausgehend wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, bspw. mit den Schritten „unverdünnt“, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 und 1:10000. Je nach Expressionsstärke des Gens musste eine andere Verdünnungsreihe gewählt werden. Des Weiteren wurde eine Negativ-Kontrolle mitgeführt, die statt cDNA H₂O enthält.

4.3.3.2 Eckdaten des PCR-Programms

Die RT-qPCR wurde am Realplex Mastercycler EpGradient S (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Das PCR-Programm wurde folgendermaßen konfiguriert:

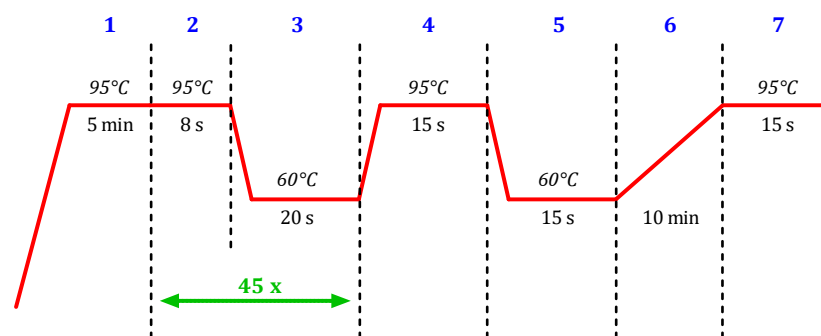


Abbildung 4-3: PCR-Programm am Realplex Mastercycler EpGradient S

Nachdem in Phase 1 die Doppelstränge aufgeschmolzen werden, werden die Schritte 2 und 3 insgesamt 45-mal wiederholt. In dieser Phase findet die eigentliche Amplifikation statt. Die Phasen 4 bis 7 dienen der Schmelzkurvenanalyse. Eine Messung für ein zu untersuchendes Gen dauerte ungefähr 60 min.

4.3.3.3 Auswertung der RT-qPCR

Die Software des PCR-Geräts errechnet aus den *ct*-Werten der Standardproben eine Regressionsgerade (= Standardgerade), wobei auf der y-Achse der *ct*-Wert linear und auf der x-Achse die relative cDNA-Menge logarithmisch aufgetragen ist. Mit Hilfe dieser Standardgeraden berechnet die Software die relative cDNA-Menge in den zu untersuchenden Proben. Außerdem berechnet die Software die Steigung der Standardgeraden (*slope*), welche Ausdruck für die Effizienz der PCR ist.

Damit eine objektive Aussage über die relative cDNA-Menge in einer Probe getroffen werden kann, benötigt man ein Maß für die gesamte Menge an cDNA in einer Probe. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Expression der 18S-rRNA proportional zur Menge an cDNA in der Probe ist (*housekeeper*). Für jede Probenverdünnung wurde daher die Menge der 18S-rRNA quantifiziert.

4.3.3.4 Primer-Design für die RT-qPCR

Die verwendeten Primer für die RT-qPCR waren entweder innerhalb der Arbeitsgruppe bereits etabliert oder wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entworfen. Als Datenbank für DNA- und mRNA-Sequenzen wurde die Webseite <http://www.genome.ucsc.edu/> verwendet. Die Primer wurden mit Hilfe der Software Perlprimer entworfen. Dabei wurden die folgenden Charakteristika verwendet:

- Schmelztemperatur 65-68°C
- Länge: 18 bis 28 Basenpaare
- GC-Gehalt zwischen 40% und 60%
- Länge des Amplikons: 70 bis 250 Basenpaare
- Amplikon umfasst mehr als 1 Exon

Mit Hilfe der Tools BLAT und *in-silico*-PCR der oben genannten Webseite wurde die Spezifität der Primer überprüft, bevor sie auf dem Gerät getestet wurden.

4.4 Methoden zur Analyse von Metaboliten und Zytokinen

4.4.1 Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Die Bestimmung von Zytokinen (IL-6, IL-10, IL-12, TNF) im Zellkulturüberstand erfolgte mittels ELISA. Dafür wurde das *DuoSet® System* (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Diese Kits beruhen auf dem sogenannten Sandwich-Verfahren: Dabei wird ein erster Antikörper (*capture antibody*) mit dem Fc-Teil an eine feste Phase (96-Well Mikrotiterplatte) gebunden. Das zugegebene Antigen wird dann vom *capture antibody* „eingefangen“. Ein weiterer Antikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an das Antigen, allerdings an ein anderes Epitop. An diesen Antikörper wird ein Enzym gebunden, das in der Lage ist, ein Substrat so umzusetzen, dass ein Farbstoff entsteht, der photometrisch vermessen werden kann. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

4.4.2 Laktatmessung im Überstand

Die Messung der Laktatkonzentration in den Zellkulturüberständen von DCs wurde nicht selbst, sondern im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Dort erfolgte die Bestimmung am Analysegerät ADVIA 1650. Bei dieser Methode wird Laktat durch das Enzym Laktatoxidase zu Pyruvat und Wasserstoffperoxid oxidiert. Mittels einer Peroxidase reagiert das Wasserstoffperoxid mit einem Chromogen. Der gebildete Farbstoff kann mittels Spektrophotometrie gemessen werden.

4.4.3 Messung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃

Die Messung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ in den Zellkulturüberständen wurde vom Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg mittels *chemiluminescence immunoassay* (CLIA) durchgeführt.

4.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Messwerte erfolgte mit der Software „GraphPad Prism 5“. Die Messwerte wurden stets gemittelt, außerdem wurde der Standardfehler errechnet (standard error of the mean, SEM). Signifikanztest zwischen zwei verschiedenen Präparationen erfolgte mit dem ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Test. Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde der Unterschied zwischen zwei Ansätzen als signifikant, bei $p \leq 0,01$ als hochsignifikant und bei $p \leq 0,001$ als höchst-signifikant betrachtet. Bei $p > 0,05$ wurde der Unterschied als nicht signifikant (n.s.) bezeichnet.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Effekte von Antithymozytenglobulin (ATG) auf DCs spezifisch sind oder eine unspezifische Reaktion auf den artfremden Antikörper ist. Zu diesem Zweck wurde ein polyklonaler IgG-Kaninchen-Antikörper (kurz: IgG-Kontrolle) als Kontrolle mitgeführt. In der statistischen Analyse wurden ATG-Konzentrationen kleiner 50 µg stets der Negativ-Kontrolle (-) gegenübergestellt. Die beiden höheren ATG-Konzentrationen 100 und 500 µg wurden mit der jeweiligen Konzentration an IgG-Kontrolle verglichen. Die IgG-Kontrolle und die Vergleichsstimuli (LPS, IFN- γ , ATG + IFN- γ) wurden immer relativ zur Negativkontrolle analysiert. Darüber hinaus ist anzumerken, dass nur statistisch signifikante Unterschiede als solche markiert wurden (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$); nicht signifikante (n.s.) Unterschiede wurden dementsprechend nicht gekennzeichnet. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Tests.

5.1 Einfluss von ATG auf den Tryptophan-Stoffwechsel

In klinischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Patienten, die mit ATG behandelt wurden, vermehrt Tryptophan-Metaboliten (z.B. Kynurenin) im Urin ausscheiden [133]. Es ist seit längerem bekannt, dass diese als immunsuppressiv geltenden Metaboliten u.a. von DCs gebildet werden können und für ihre Tolerogenität eine entscheidende Rolle spielen [62]. Auf diesen Überlegungen basierend lieferte eine vorausgegangene Arbeit erste Hinweise, dass ATG in der Lage ist, IDO in DCs zu induzieren und dadurch die Konzentration von Tryptophan-Metaboliten zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit wurde nun sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene genauer untersucht, ob dieser Effekt auf IDO spezifisch durch ATG induziert wird oder auch durch die IgG-Kontrolle ausgelöst werden kann.

5.1.1 Wirkung von ATG auf die Expression von *IDO1* und *IDO2*

Um zunächst den Effekt von ATG auf die mRNA-Expression von *IDO1* und *IDO2* in DCs untersuchen zu können, wurden die Zellen 4 bzw. 24 Stunden mit fünf verschiedenen ATG-Konzentrationen inkubiert. Um zu überprüfen, ob der Effekt spezifisch ist, dienten DCs, die mit der IgG-Kontrolle inkubiert wurden, als Vergleich. Als starker IDO-Stimulus gilt der TLR4-Ligand LPS [134, 135], der daher als Positivkontrolle eingesetzt und mit ATG, IFN- γ und ATG plus IFN- γ verglichen wurde. Nicht stimulierte und damit unreife DCs wurden

als Negativkontrolle eingesetzt. Zum Vergleich wurden auch Monozyten als Vorläuferzellen der DCs analysiert.

5.1.1.1 *IDO*-Expression in DCs

Bereits nach 4 Stunden Inkubation war zu sehen, dass ATG die *IDO1*-Expression in DCs konzentrationsabhängig induzierte, die IgG-Kontrolle nicht (Abbildung 5-1A). Dieser Effekt war für eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ statistisch signifikant. Nach 24 Stunden (Abbildung 5-1B) war dieser Unterschied noch deutlicher zu sehen und für beide Konzentrationen (100, 500 $\mu\text{g/ml}$) signifikant.

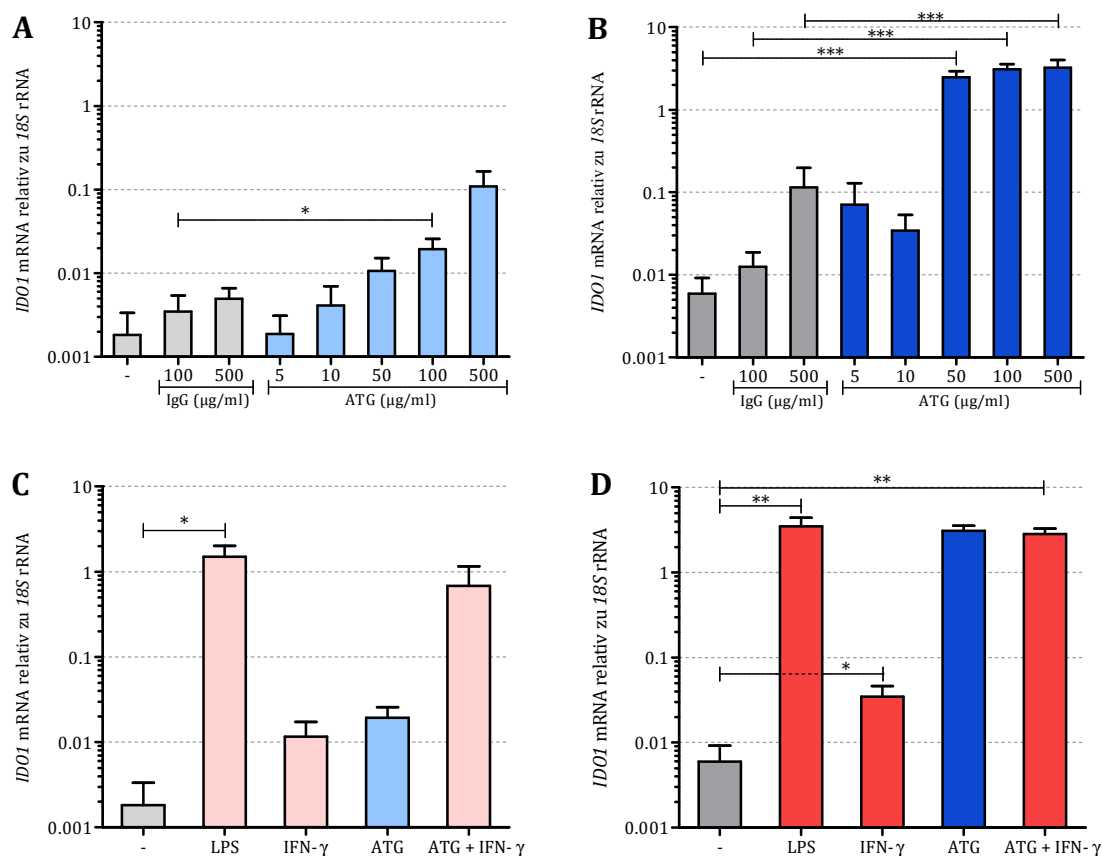


Abbildung 5-1: *IDO1*-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die *IDO1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Die Wirkung von ATG war nach 24 Stunden nicht mehr konzentrationsabhängig, sondern bereits ab 50 $\mu\text{g/ml}$ voll ausgeprägt. Die IgG-Kontrolle zeigte keinen signifikanten Effekt. Im Vergleich mit anderen Stimuli stellte sich ATG als durchaus potent heraus (Abbildung 5-1C, D): Es zeigte sich, dass die Wirkung von ATG zwar langsamer als die von LPS eintrat,

aber nach 24 Stunden dasselbe Expressionsniveau erreicht. IFN- γ hatte dagegen eine vergleichsweise geringe Wirkung. Der Zusatz von IFN- γ zu ATG verstärkte den Effekt des Globulins nach 4 Stunden nicht signifikant. Umgekehrt rief der Zusatz von ATG zu IFN- γ nach 24 Stunden eine signifikant stärkere Expression hervor.

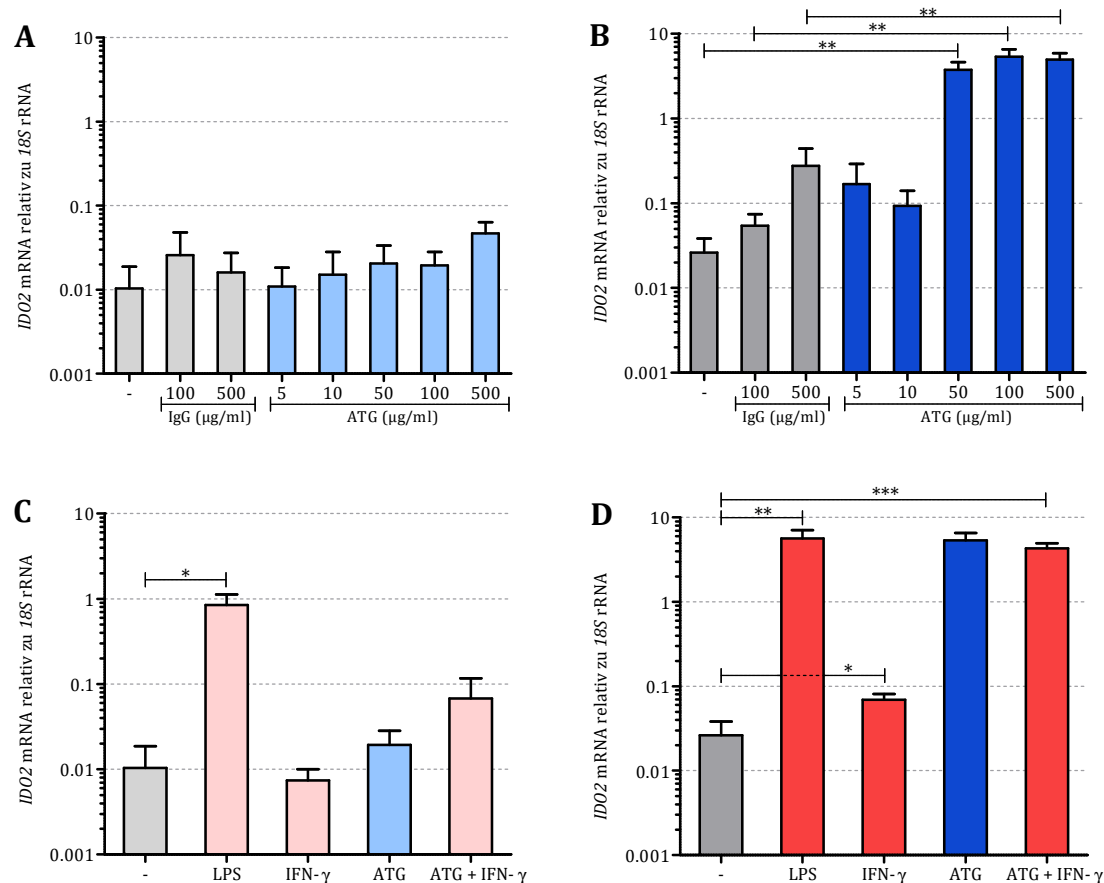


Abbildung 5-2: IDO2-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 µg/ml) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 µg/ml) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die IDO2-mRNA- relativ zur 18S-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

IDO2 ist das Isoenzym von IDO1; auf Protein-Ebene ist es meist schwächer exprimiert als IDO1. Nichtsdestotrotz zeigte sich IDO2 in einer Publikation [136] als elementarer Bestandteil der IDO-vermittelten T-Zell-Regulation. Daher wurde die IDO2-Expression ebenfalls analysiert: Wie in Abbildung 5-2 dargestellt ist, zeigte sich nach 24 Stunden ein zu IDO1 vergleichbares Bild. Allerdings war nach 4 Stunden Inkubation weder durch ATG noch durch die IgG-Kontrolle eine relevante Veränderung der mRNA-Expression von IDO2 nachweisbar. Nach 24 Stunden induzierte ATG IDO2 signifikant ver-

glichen mit der IgG-Kontrolle. Letztere zeigte dagegen keinen signifikanten Effekt. Identisch zu *IDO1* war der maximale Effekt von ATG bereits bei 50 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Vergleicht man ATG mit anderen Stimuli (Abbildung 5-2C, D), ist zu sehen, dass die Wirkung von $\text{IFN-}\gamma$ zwar signifikant ist, aber deutlich schwächer ausfiel als die von ATG. Die Kombination von ATG und $\text{IFN-}\gamma$ veränderte die Expression im Vergleich zu ATG alleine nicht. Die Wirkung von LPS war dagegen bereits nach 4 Stunden signifikant.

5.1.1.2 *IDO*-Expression in Monozyten

Unter den zahlreichen möglichen Antigenen, die ATG binden könnte, befinden sich auch einige auf Monozyten [115-118]. Bekanntermaßen dienen Monozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als Vorläuferzellen für DCs. Demzufolge teilen die beiden Zelltypen einige Oberflächenantigene. Um herauszufinden, ob spezifische Oberflächenproteine auf DCs für die Wirkung von ATG auf DCs verantwortlich sind, wurden auch Monozyten untersucht.

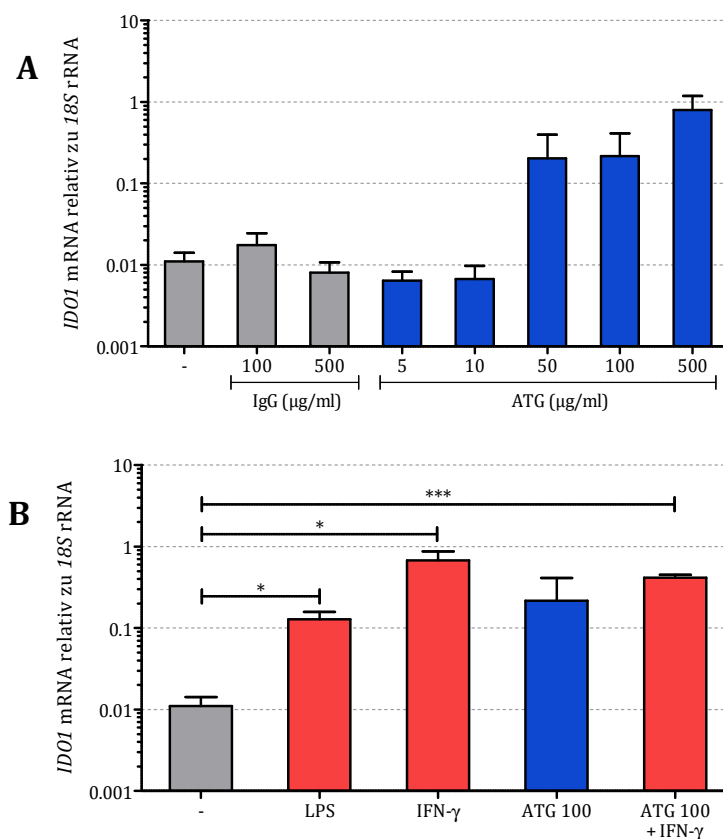


Abbildung 5-3: *IDO1*-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A). LPS (10 ng/ml), $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) und $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) + ATG dienten als Vergleichsstimuli zu ATG (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die *IDO1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus 3 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 5-3A ist zu sehen, dass die IgG-Kontrolle keinerlei Einfluss auf die *IDO1*-Expression in Monozyten hatte. ATG hatte ab einer Konzentration von 50 µg/ml einen nicht signifikanten Effekt auf die Expression von *IDO1*.

Im Gegensatz zu den DCs, bei denen IFN-γ kaum einen Effekt auf die *IDO1*-Expression hatte, bewirkte es bei den Monozyten eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression. Der Effekt von LPS zeigte sich zwar ebenfalls als signifikant, war aber tendenziell schwächer als der von IFN-γ. Die Kombination aus IFN-γ und ATG war im Vergleich zur Negativkontrolle hochsignifikant.

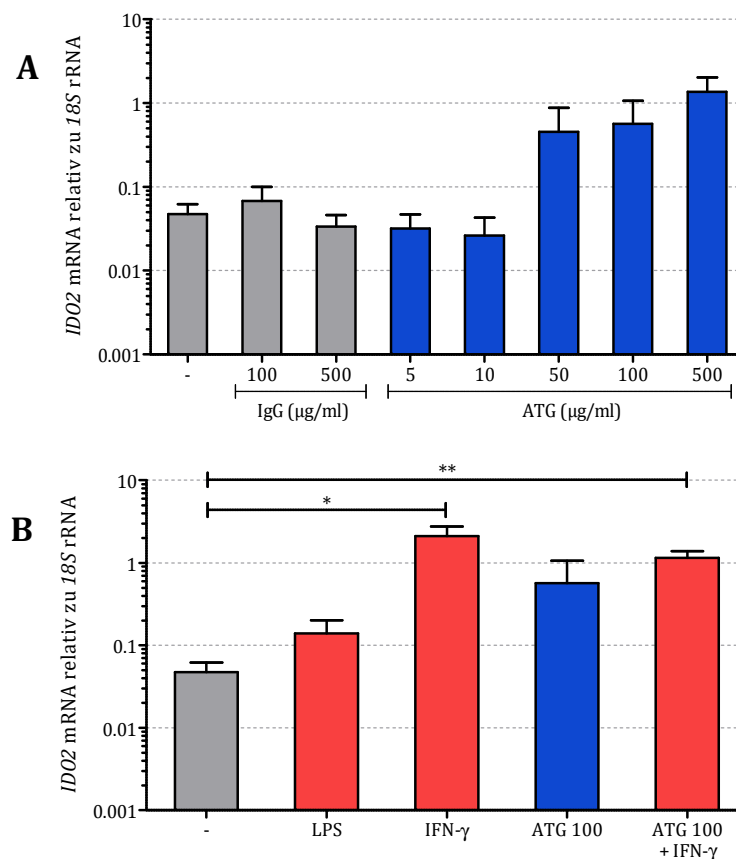


Abbildung 5-4: IDO2-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A). LPS (10 ng/ml), IFN-γ (100 U/ml) und IFN-γ (100 U/ml) + ATG dienten als Vergleichsstimuli zu ATG (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die *IDO2*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus 3 unabhängigen Experimenten.

Die *IDO2*-Expression der Monozyten unter ATG-Stimulation (Abbildung 5-4) unterschied sich kaum von der *IDO1*-Expression. Interessant war die fehlende Induktion bei *IDO2* im Vergleich zu *IDO1* nach LPS-Stimulation. Im Gegensatz dazu verstärkte IFN-γ die *IDO2*-Induktion signifikant. Auch der Zusatz von IFN-γ zu ATG war im Vergleich zu ATG alleine in der Lage, den Effekt auf ein signifikantes Niveau zu heben. Zusammenfassend lässt sich

einerseits festhalten, dass ATG eine signifikante und spezifische Wirkung auf die *IDO*-Expression von DCs hat, andererseits, dass Monozyten stärker auf $\text{IFN-}\gamma$ reagieren, DCs dagegen stärker auf LPS.

5.1.2 Wirkung von ATG auf die mRNA-Expression der Kynureninase in DCs

Es gibt Hinweise darauf, dass eine Stimulation der DCs zur Reifung nicht isoliert mit einer Induktion von *IDO* einhergeht, sondern gleichzeitig auch andere Enzyme des Tryptophan-Stoffwechsels betrifft, wie z.B. die Kynureninase [137]. Daher wurde untersucht, ob ATG auch hier eingreift. Die Kynureninase wird vom Gen *KYNU* codiert und befindet sich weiter stromabwärts im Stoffwechselweg. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Kynurenin in Anthranilsäure und 3-Hydroxykynurenin in 3-Hydroxyanthranilsäure [138, 139]. Die Analyse der mRNA-Expression erfolgte identisch zu der von *IDO1/IDO2* (siehe 5.1.1).

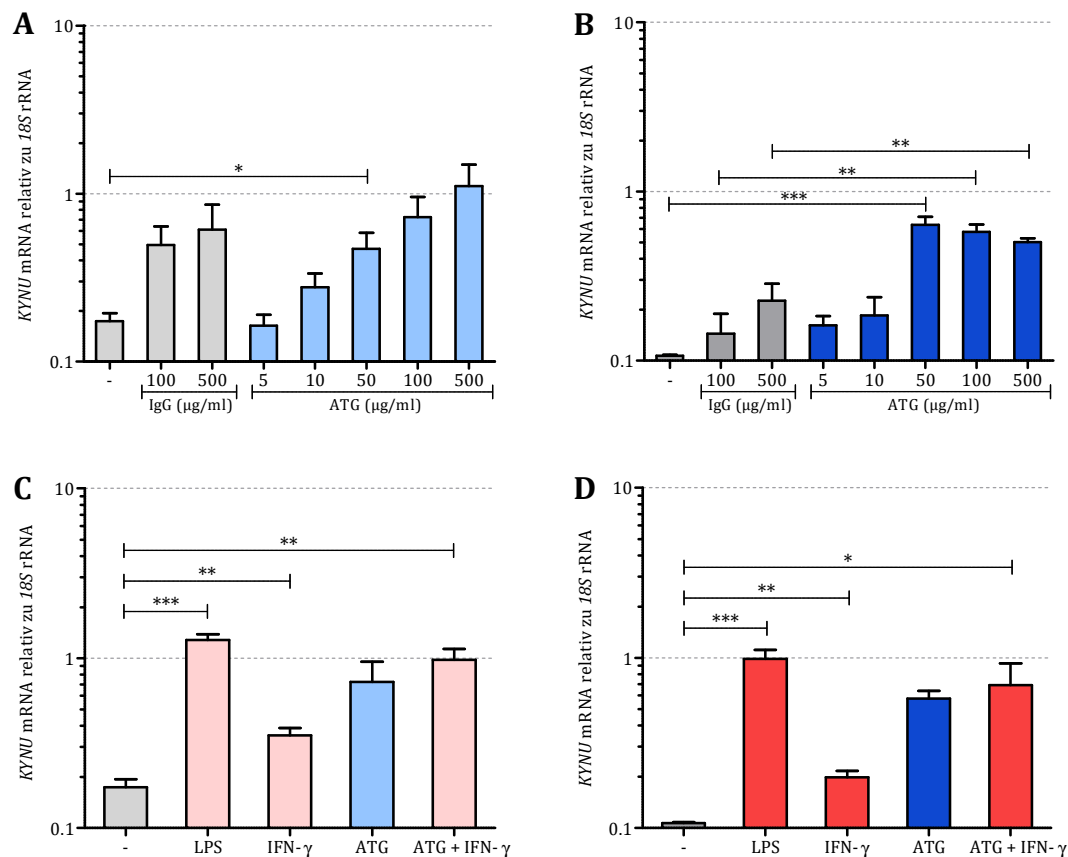


Abbildung 5-5: KYNU-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) und $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) + ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die *KYNU*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden zeigte sich, dass sowohl ATG als auch die IgG-Kontrolle die mRNA-Expression von *KYNU* konzentrationsabhängig ähnlich stark induzieren konnten (Abbildung 5-5A). Jedoch war nur die ATG-vermittelte Induktion auch nach 24 Stunden stabil. Die statistische Analyse zeigte eine hochsignifikant stärkere *KYNU*-Expression unter ATG im Vergleich zur IgG-Kontrolle. IFN- γ zeigte sowohl nach 4 als auch 24 Stunden eine schwache, aber signifikante Zunahme der Expression; LPS regulierte die mRNA-Expression dagegen ebenso hoch wie ATG. Der Zusatz von IFN- γ zu ATG zeigte keine weitere Veränderung.

5.1.3 Wirkung von ATG auf den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor

Seit Kurzem ist bekannt, dass der Tryptophan-Metabolit Kynurenin als Ligand des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) fungiert [72]. Weiterhin soll der AHR an dem tolerogenen Effekt von IDO entscheidend beteiligt sein [73].

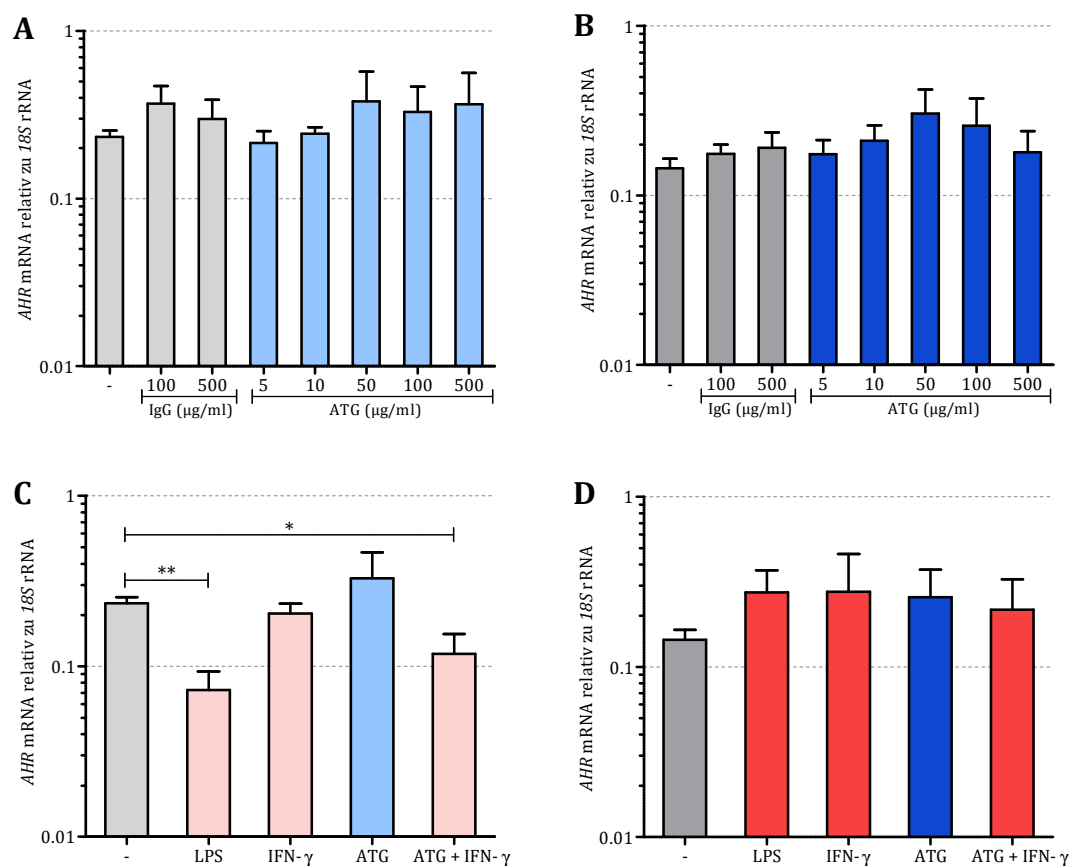


Abbildung 5-6: AHR-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) dienten als Vergleichsstimuli zu ATG (100 μ g/ml) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die *AHR*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Daher wurde in Verbindung mit dem Tryptophan-Stoffwechsel auch die *AHR*-mRNA-Expression untersucht. Lediglich LPS und die Kombination aus IFN- γ und ATG führten nach 4 Stunden zu einer geringen, aber signifikanten Abnahme der Expression. ATG hatte dagegen keinen Effekt auf die *AHR*-Expression.

5.1.4 ATG-vermittelte IDO-Induktion in DCs und Monozyten auf Protein-Ebene

Als Nächstes sollte die Spezifität des ATG-Effekts auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden. Dazu wurde zunächst ein Western Blot durchgeführt. In einem weiteren Schritt sollte zusätzlich der durchflusszytometrische Nachweis von IDO etabliert und mit dem Western Blot verglichen werden. Dafür wurde der dort verwendete AF488-konjugierte Antikörper im Western Blot eingesetzt und mit dem bisherigen Antikörper verglichen. Die Western Blots wurden anschließend quantifiziert und sowohl untereinander als auch mit der durchflusszytometrischen Analyse verglichen. Dafür wurden die Zellen 48 Stunden mit ATG inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte und mit der IgG-Kontrolle behandelte DCs. Weitere Ansätze wurden mit LPS, IFN- γ und IFN- γ plus LPS inkubiert. Auch hier wurden zum Vergleich Monozyten untersucht.

5.1.4.1 Nachweis von IDO im Western Blot

Der Nachweis von IDO im Western Blot wurde mit einem unkonjugierten (Adipogen, Liestal) und einem AF488-konjugierten Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden) durchgeführt. Zum einen sollte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass beide Antikörper IDO spezifisch nachweisen, zum anderen, dass ATG das Enzym IDO tatsächlich spezifisch induziert und, dass die IgG-Kontrolle keinen Effekt auf die Expression hat.

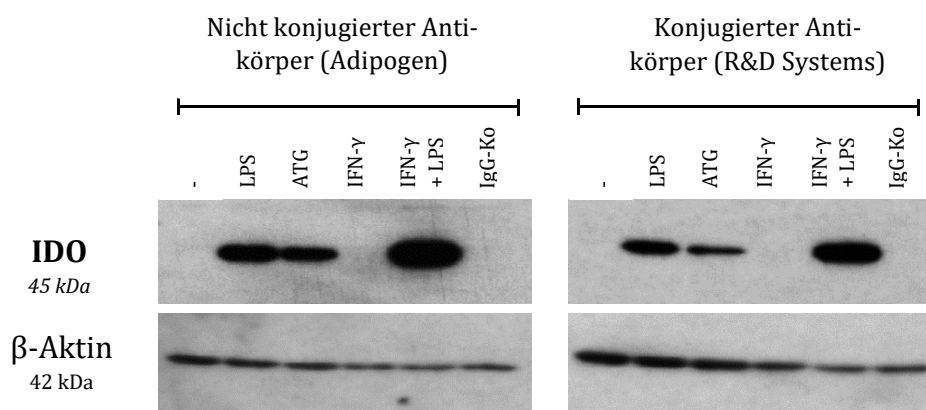


Abbildung 5-7: Qualitativer Vergleich der beiden Anti-IDO-Antikörper im Western Blot

Aus Monozyten generierte DCs wurde 48 h ohne (-) oder mit LPS (10 ng/ml), ATG (100 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml), IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) oder IgG-Kontrolle (100 μ g/ml) inkubiert. Nach Isolation des zellulären Gesamt-Proteins erfolgte im Anschluss an eine SDS-PAGE der immunologische Nachweis von IDO mittels Western Blot. Dafür wurden

wie gezeigt 2 versch. Antikörper verwendet. Danach wurde der jeweilige Anti-IDO-Antikörper vom Blot abgelöst, um mit einer erneuten Färbung die Menge an β -Aktin als Beladungskontrolle zu bestimmen.

5.1.4.2 Nachweis von IDO und CD86 in der Durchflusszytometrie

Ziel des durchflusszytometrischen IDO-Nachweises war es, die Expression von IDO mit verschiedenen Reifungsmarkern der DCs in Verbindung zu bringen. Daher wurde zusätzlich zu IDO der Reifungsmarker CD86 gefärbt.

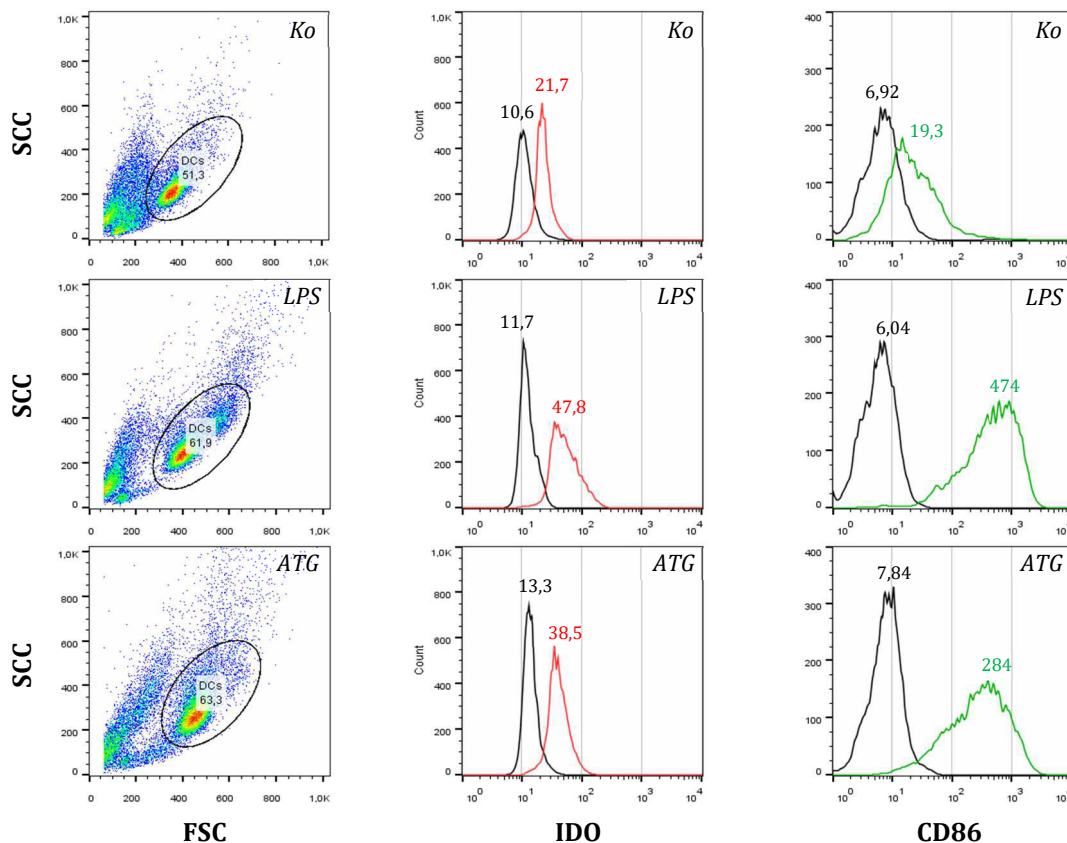


Abbildung 5-8: Histogramme der IDO- und CD86-Expression in der Durchflusszytometrie

Aus Monozyten generierte DCs wurde 48 h ohne (Ko) oder mit LPS (10 ng/ml) oder ATG (100 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit dem AF488-konjugierten Anti-IDO-Antikörper und dem APC-konjugierten Anti-CD86-Antikörper (beides R&D Systems, Wiesbaden) gefärbt. Die Messung der gefärbten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer FACS Calibur (BD Biosciences, Heidelberg). Die Auswertung wurde mittels der Software FlowJo (Treestar, Ashland) durchgeführt. Gezeigt sind die Histogramme (IDO, CD86) und die Dot Plots eines repräsentativen Experiments.

In Abbildung 5-8 sind die Histogramme eines repräsentativen Experiments dargestellt. Es zeigt, dass das IDO-Signal unter LPS und ATG stärker war als bei der nichtstimulierten Kontrolle. Die Färbung von CD86 zeigt, dass sowohl LPS als auch ATG die CD86-Expression im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle induzierten. In Abbildung 5-9 ist die Zusammenfassung der Auswertung der IDO- (A) und CD86-Expression (B) aller 6 Experimente gezeigt. Zunächst ist festzustellen, dass IFN- γ und die IgG-Kontrolle sowohl auf

die IDO- als auch auf die CD86-Expression keinen Effekt hatten. Im Gegensatz dazu konnten LPS bzw. IFN- γ plus LPS das Enzym IDO (A) und den Reifungsmarker CD86 (B) signifikant induzieren. ATG zeigte nur bei CD86 eine signifikante Induktion, während hingegen die IDO-Expression nur tendenziell erhöht war.

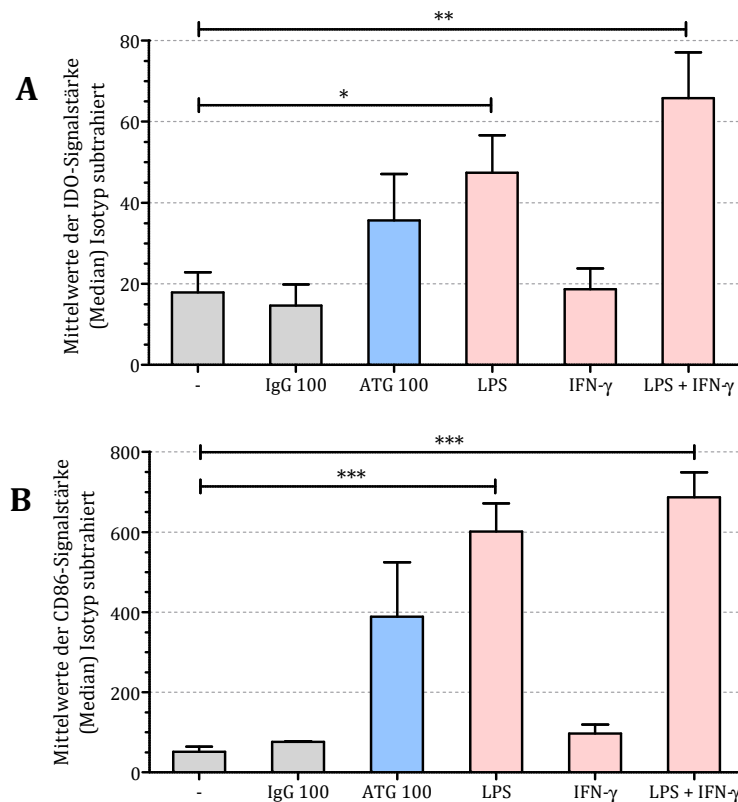


Abbildung 5-9: IDO- (A) und CD86-Expression (B) in der Durchflusszytometrie nach 48 h

Aus Monozyten generierte DCs wurde 48 h ohne (-) oder mit LPS (10 ng/ml), ATG, IFN- γ (100 U/ml) oder IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) oder IgG inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit dem AF488-konjugierter Anti-IDO-Antikörper (A) bzw. dem APC-konjugierten Anti-CD86-Antikörper (B) (beide R&D Systems, Wiesbaden) gefärbt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACS Calibur (BD Biosciences, Heidelberg). Die Auswertung wurde mittels der Software FlowJo (Treestar, Ashland) durchgeführt. Gezeigt sind die Mittelwerte (+ SEM) der Histogramme (Median) von insgesamt 6 (IgG nur 3) unabhängigen Experimenten.

Obwohl die Durchflusszytometrie und der Western Blot durchaus vergleichbare Ergebnisse liefern, war nur im Western Blot ein signifikanter Effekt von ATG auf IDO zu nachweisbar. Dafür ist vermutlich das relativ hohe, unspezifische Signal der nicht stimulierten Zellen in der Durchflusszytometrie verantwortlich.

5.1.5 IDO-Induktion nach ATG-Stimulation in Monozyten

Die Analyse der mRNA-Expression unter ATG-Stimulation der Monozyten hatte eine nicht-signifikante Induktion der beiden *IDO*-Gene gezeigt. Mit einer Western Blot-Analyse sollte untersucht werden, ob ATG eine IDO-Expression auf Protein-Ebene bewirkt. Abbildung

5-10 zeigt repräsentativ eines von 3 unabhängig durchgeführten Experimente mit 24- und 48-stündiger Inkubation: Zunächst ist festzustellen, dass die Inkubationszeit keinen Einfluss hatte. Ganz im Gegensatz zu den DCs, wo LPS und ATG die IDO-Expression induzierten, zeigte sich in den Monozyten kein Effekt. Die IgG-Kontrolle hatte erwartungsgemäß keine Wirkung. Interessanterweise bewirkte aber IFN- γ eine Induktion von IDO. Damit bestätigte der Western Blot die Ergebnisse der mRNA-Expression.

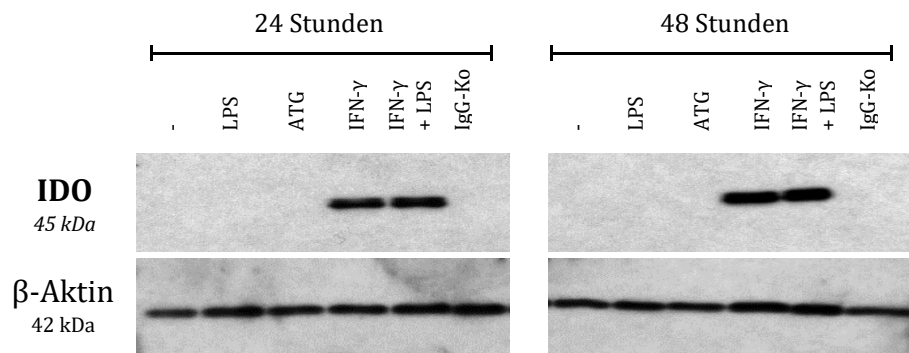


Abbildung 5-10: IDO-Expression nach 24 bzw. 48 h Stimulation in Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurde 24 bzw. 48 h ohne (-) oder mit LPS (10 ng/ml), ATG (100 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml) oder IFN- γ (100 U/ml) + LPS (10 ng/ml) oder IgG-Kontrolle (100 μ g/ml) inkubiert. Nach Isolation des zellulären Proteins erfolgte im Anschluss an eine SDS-PAGE der Nachweis von IDO mittels Western Blot. Dafür wurde der AF488-konjugierte Anti-IDO-Antikörper (R&D Systems, Wiesbaden) verwendet. Danach wurde dieser Antikörper vom Blot abgelöst um mit einer erneuten Färbung die Menge an β -Aktin zu bestimmen.

5.2 Einfluss von ATG auf den Vitamin-D₃-Stoffwechsel

Obwohl der Einfluss von Vitamin D auf das Immunsystem schon seit etwa 40 Jahren diskutiert wird, wurden vor allem in jüngerer Zeit neue Erkenntnisse gewonnen, welche Rolle der Vitamin-D₃-Stoffwechsel bei der Immunmodulation, u.a. in DCs spielt [140]. Für Vitamin D₃ und seine Metaboliten wurden vielfältige Effekte auf Differenzierung, Reifung und Zytokin-Sekretion beschrieben [79-82].

5.2.1 Wirkung von ATG auf die Expression von *CYP27B1*

In DCs scheint vor allem die 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase (Cytochrom P450 Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1; kurz: *CYP27B1*) eine entscheidende Bedeutung zu haben [81]. Es katalysiert die Hydroxylierung von 25(OH)D₃ zum physiologisch aktiven 1,25(OH)₂D₃. Die mRNA-Analyse erfolgte ebenso wie bei der Untersuchung von *IDO1* und *IDO2* (siehe 5.1.1). Dabei wurden sowohl DCs als auch Monozyten untersucht.

5.2.1.1 *CYP27B1* in DCs

Der Effekt von ATG auf *CYP27B1* war vergleichbar mit dem auf *IDO*: Nach 4 Stunden war bereits eine nicht signifikante, konzentrationsabhängige Zunahme der Expression zu sehen. Die IgG-Kontrolle hatte einen ähnlich schwachen Effekt. Nach 24 Stunden war eine verstärkte Wirkung von ATG feststellbar, die im Vergleich zur IgG-Kontrolle signifikant erhöht war (100 $\mu\text{g/ml}$). Ähnlich wie bei anderen bisher betrachteten Enzymen war die Induktion bereits ab 50 $\mu\text{g/ml}$ voll ausgeprägt, wobei sich für die übrigen Konzentrationen kein signifikanter Unterschied zeigte. Übereinstimmend mit anderen mRNA-Analysen stimulierte ATG genauso gut wie LPS, jedoch zeitverzögert. IFN- γ hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression von *CYP27B1* und zeigte auch als Zusatz zu ATG keine Wirkung.

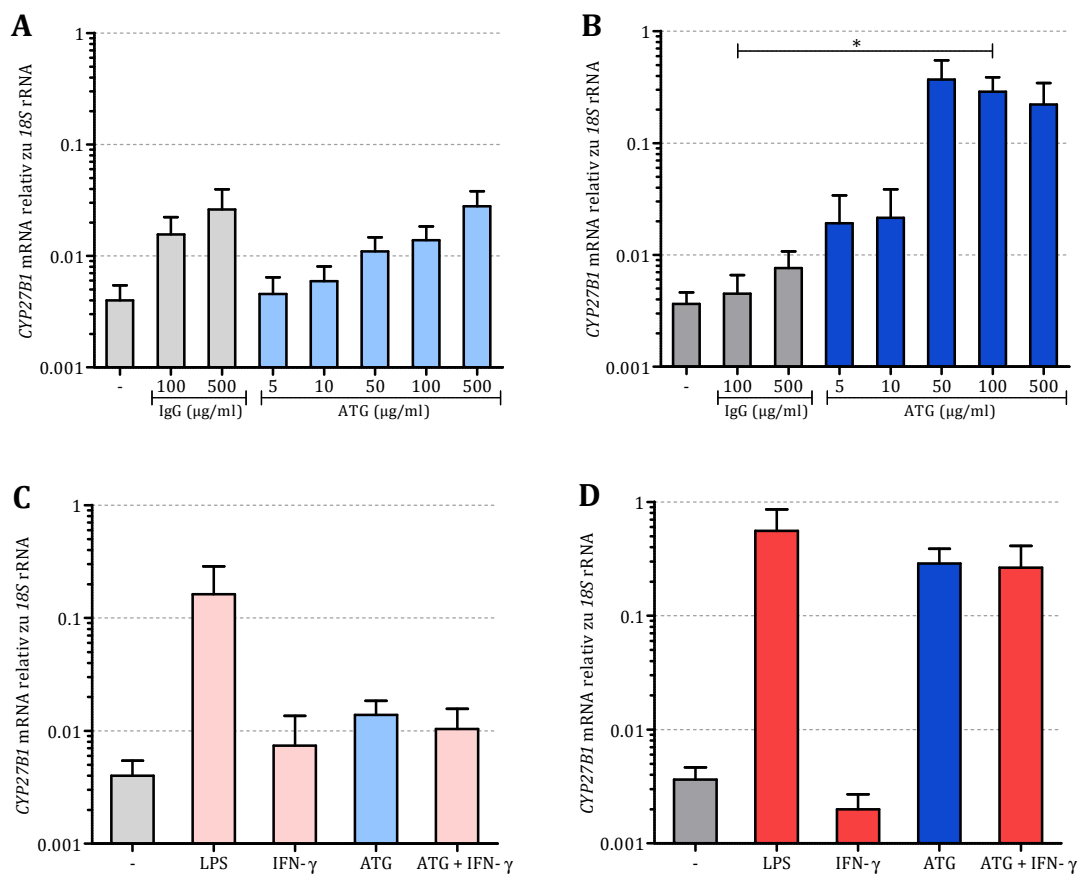


Abbildung 5-11: *CYP27B1*-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die *CYP27B1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

5.2.1.2 *CYP27B1* in Monozyten

Um die Spezifität der Wirkung von ATG auf DCs zu prüfen, wurden im Vergleich Monozyten untersucht. Relativ zur nichtstimulierten Kontrolle waren die Effekte von ATG und der IgG-Kontrolle vernachlässigbar (Abbildung 5-12). Im Gegensatz dazu induzierte LPS die Expression *CYP27B1* deutlich. Während ATG und IFN- γ getrennt keine Wirkung zeigten, führte die Kombination aus beiden tendenziell zur Suppression der mRNA-Expression von *CYP27B1*.

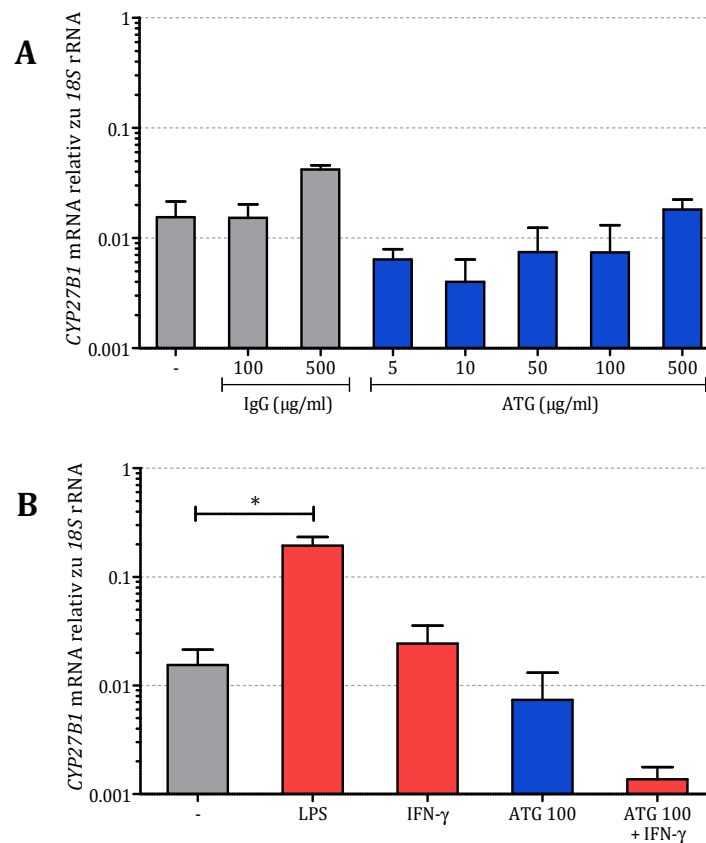


Abbildung 5-12: *CYP27B1*-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten

Frisch isolierte humane Monozyten wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG dienten als Vergleichsstimuli (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die *CYP27B1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus 3 unabhängigen Experimenten.

5.2.2 Wirkung von ATG auf die Expression von *CYP27A1* in DCs

Die Vitamin-D₃-25-Hydroxylase (Cytochrom P450 Familie 27, Subfamilie A, Polypeptid 1; kurz: *CYP27A1*) ist im Vitamin-D-Stoffwechsel eine Position weiter stromaufwärts lokalisiert und hydroxyliert das physiologisch inaktive Vitamin D₃ zum 25(OH)D₃ [75]. Über *CYP27A1* ist lediglich bekannt, dass es in Monozyten, DCs und Makrophagen exprimiert

wird. [141]. Um zu prüfen, wie spezifisch der Einfluss von ATG auf den Vitamin-D-Stoffwechsel ist, wurde *CYP27A1* in DCs untersucht.

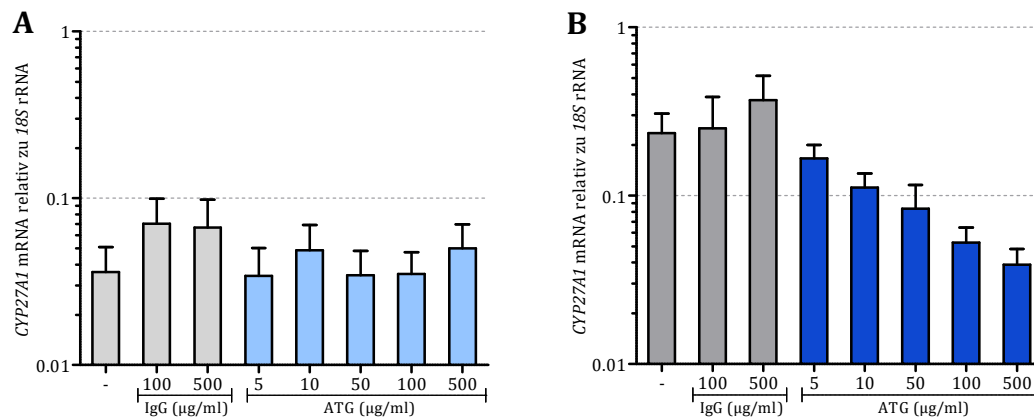


Abbildung 5-13: *CYP27A1*-mRNA-Expression nach 4 h (A) bzw. 24 h (B) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h (A) bzw. 24 h (B) ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die *CYP27A1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 5-13 ist zu sehen, dass nach 4 Stunden Inkubation mit ATG kein Effekt erkennbar war. Nach 24 Stunden nahm die Expression sowohl in den nichtstimulierten als auch in den mit IgG behandelten Zellen tendenziell zu. Dagegen verhinderte ATG – abhängig von der eingesetzten Konzentration – diese Hochregulation von *CYP27A1* nicht signifikant. Diese tendenzielle Suppression steht im Gegensatz zu den bisherigen Ergebnissen bei *IDO* und *CYP27B1*, in denen ATG eine Induktion der mRNA-Expression bewirkte.

5.2.3 Wirkung von ATG auf den Vitamin-D-Rezeptor

Der intrazelluläre Vitamin-D-Rezeptor (VDR) ist entscheidend für die Wirkung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Wird er nicht in ausreichenden Mengen exprimiert, kann die Zelle nicht auf $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reagieren. Aus diesem Grund erfolgte ebenso eine Überprüfung der mRNA-Expression des VDR in DCs, wie in Abbildung 5-14 zu sehen ist. Nach 4 Stunden zeigte keine der verwendeten Substanzen einen Effekt auf die Expression des VDR (Daten nicht gezeigt). Auch nach 24 Stunden hatten ATG und LPS keinen Effekt auf die mRNA-Expression des VDR. Auch $\text{IFN-}\gamma$ blieb ohne Wirkung.

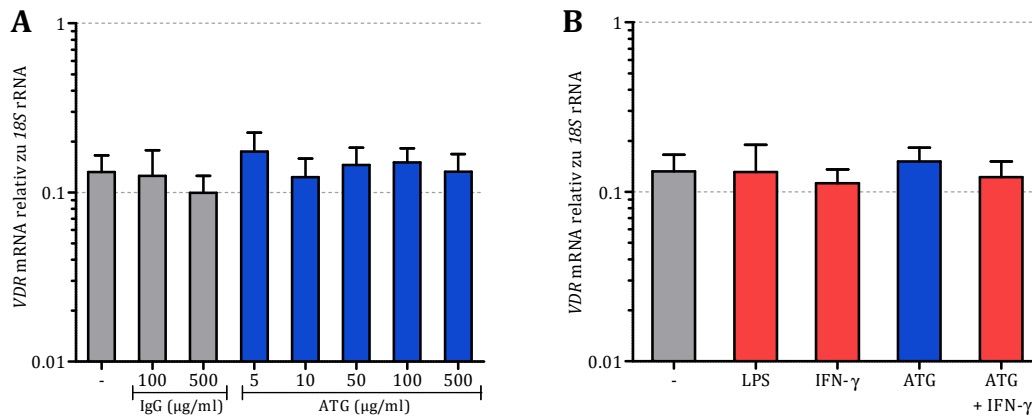


Abbildung 5-14: VDR-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 μ g/ml) (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die VDR-mRNA- relativ zur 18S-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

5.2.4 ATG-induzierte Synthese von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ in DCs

Nachdem sich in der mRNA-Analyse gezeigt hatte, dass ATG die *CYP27B1*-Expression in DCs deutlich hochreguliert, sollte die Frage geklärt werden, ob die mit ATG stimulierten DCs dadurch in der Lage sind, signifikante Mengen an 1,25(OH)₂D₃ zu produzieren. Dazu wurden DCs mit oder ohne ATG (100 μ g/ml) oder IgG-Kontrolle inkubiert. Weiterhin wurden mit LPS stimulierte DCs und ein Ansatz ganz ohne Zellen (Medium) analysiert. Zeitgleich mit dem Stimulus wurde 25(OH)D₃ (50 pmol/l) hinzugegeben. Als Kontrolle wurden die gleichen Ansätze ohne Zugabe von 25(OH)D₃ inkubiert.

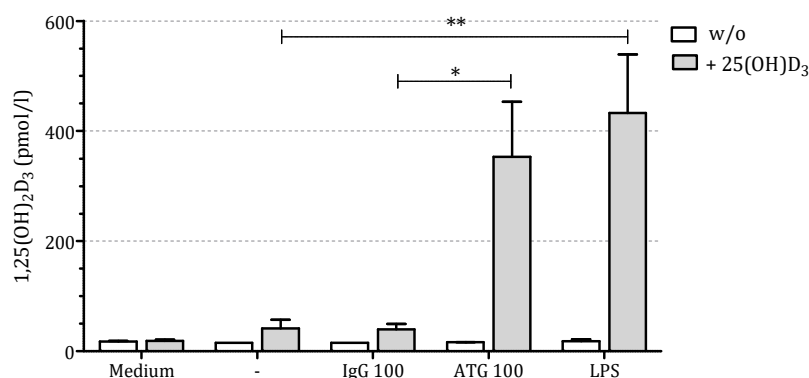


Abbildung 5-15: 1,25(OH)₂D₃ im Zellkulturüberstand von DCs nach 24 h Stimulation

Aus Monozyten generierte DCs wurden 24 h lang mit oder ohne IgG-Kontrolle, ATG oder LPS (10 ng/ml) inkubiert. Ein weiterer Ansatz wurde ohne Zellen inkubiert. Gleichzeitig wurden die Ansätze mit oder ohne $5 \cdot 10^{-8}$ mol/l 25(OH)D₃ versetzt. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C eingefroren; im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg wurde der Gehalt an 1,25(OH)₂D₃ mittels Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) bestimmt (Messbereich: 15,6 pmol/l - 504 pmol/l). Gezeigt sind die Mittelwerte (in pmol/l, + SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 5-15 ist zunächst zu sehen, dass das verwendete Medium und die Stimuli den Gehalt an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ nicht erhöhen. Ein nicht vorhandener Fehlerbalken ist auf jeweils gleiche Werte unterhalb der Messgrenze (15,6 pmol/l) zurückzuführen. Bei Zusatz von $25(\text{OH})\text{D}_3$ zeigte sich deutlich, dass die mit ATG stimulierten DCs im Vergleich zur IgG-Kontrolle signifikante Mengen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ produzierten. LPS erzielte denselben Effekt.

5.3 Einfluss von ATG auf den Prostaglandin-Stoffwechsel

Der Prostaglandin-Stoffwechsel gilt ebenfalls als immunmodulierender Stoffwechselweg. Vor allem für Prostaglandin E_2 (PGE_2) ist beschrieben, dass es den Phänotyp der DCs auf verschiedenen Ebenen, wie Reifung, Zytokin-Sekretion und T-Zell-Stimulation beeinflussen kann [86-88]. Daher wurde untersucht, ob die *COX1*- und *COX2*-Expression in DCs von ATG beeinflusst werden. Die mRNA-Analyse erfolgte ebenso wie bei der Untersuchung von *IDO1* und *IDO2* (siehe 5.1.1).

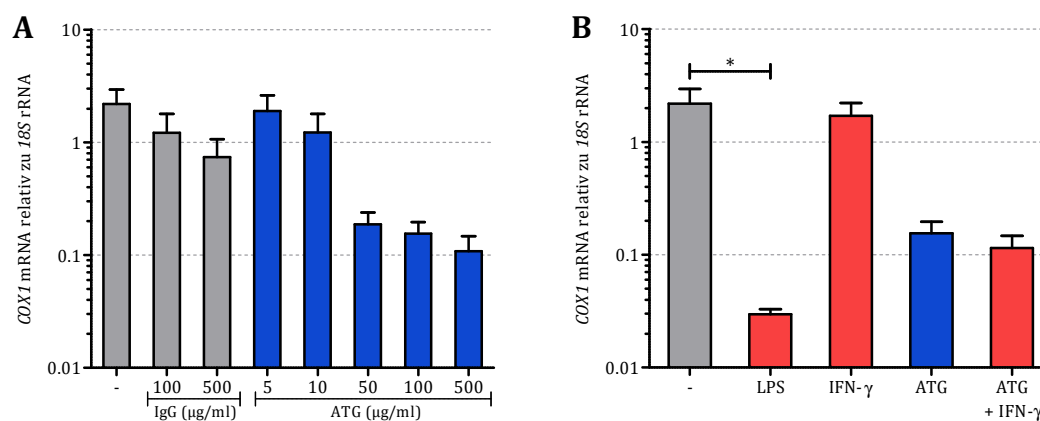


Abbildung 5-16: *COX1*-mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG (100 $\mu\text{g/ml}$) (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die *COX1*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Nach 4 Stunden hatten sowohl ATG als auch die IgG-Kontrolle keinen Effekt auf die *COX1*-Expression (Daten nicht gezeigt). Abbildung 5-16 zeigt die *COX1*-Expression nach 24 Stunden ATG-Einfluss: ATG führte zu einer nicht signifikanten Expressionsminderung. Ebenso reagierten die DCs auf LPS erst nach 24 Stunden mit einer signifikanten Reduktion der *COX1*-Expression. IFN- γ hatte keinen Effekt.

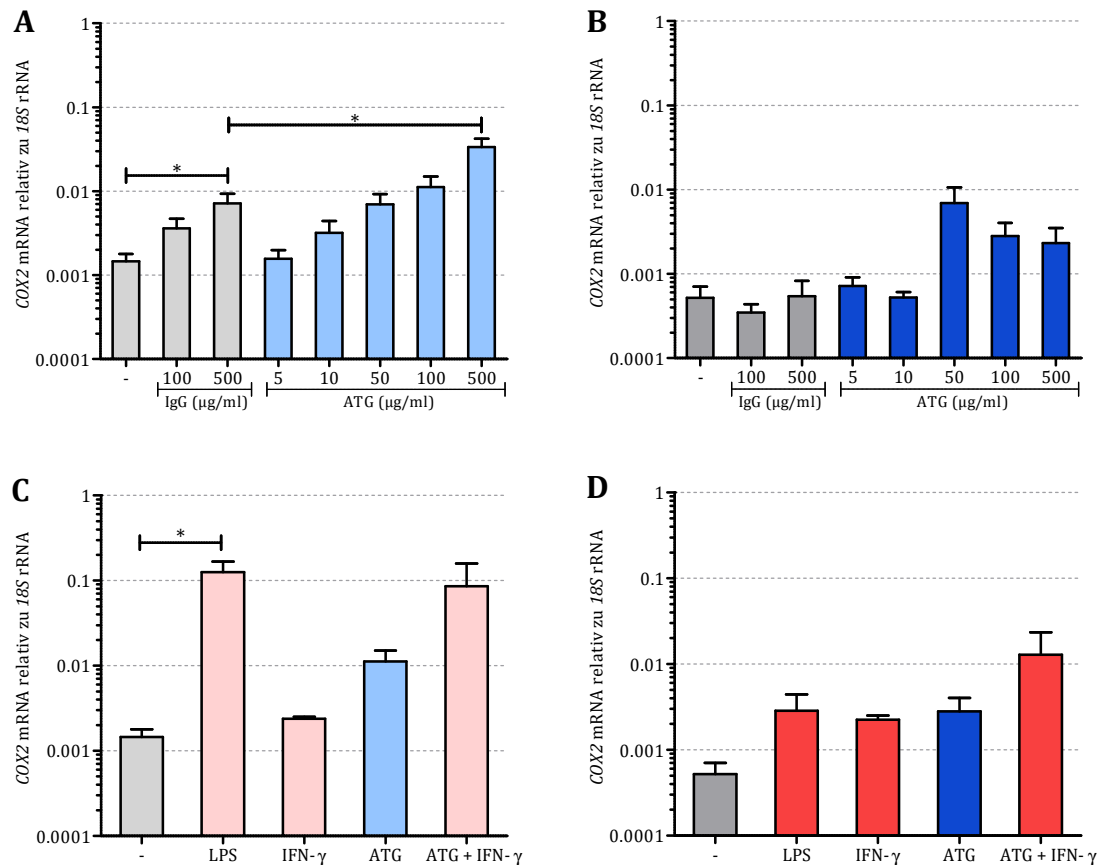


Abbildung 5-17: COX2-mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 4 h bzw. 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) dienten als Vergleichsstimuli zu ATG (100 μ g/ml) (C, D). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 4 h bzw. 24 h wurde mittels RT-qPCR die COX2-mRNA- relativ zur 18S-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Die Untersuchung der COX2-Expression ist in Abbildung 5-17 zu sehen: Nach 4 Stunden stimulierte sowohl ATG als auch die IgG-Kontrolle die mRNA-Expression von COX2 konzentrationsabhängig. Dabei induzierte ATG COX2 signifikant stärker als die IgG-Kontrolle. Nach 24 Stunden war keine signifikante Regulation mehr nachweisbar. Der Effekt von ATG war tendenziell schwächer als der von LPS und ließ sich durch den Zusatz von IFN- γ nicht signifikant verstärken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Effekte von ATG auf die Expression von COX1 und COX2 gegenläufig sind. ATG supprimierte tendenziell die Expression von COX1 (24 h) und induzierte die Expression von COX2 signifikant. COX2 konnte allerdings auch durch die IgG-Kontrolle signifikant hochreguliert werden.

5.4 Einfluss von ATG den Glukose-Stoffwechsel

Es gibt kaum Hinweise darauf, welche Rolle der Glukose-Stoffwechsel in DCs spielt und wie er reguliert wird. Lediglich für Laktat – dem Endprodukt der Glykolyse – gibt es Daten, die zeigen, dass es die Differenzierung und Reifung der DCs beeinflusst [94].

5.4.1 Hexokinase (*HKI, HKII*)

Zunächst wurden die mRNA-Expression der Isoenzyme Hexokinase I und II (*HKI, HKII*) untersucht. ATG hatte auf keine der beiden Gene einen Einfluss (Daten nicht gezeigt).

5.4.2 Laktatdehydrogenase (*LDHA, LDHB*)

Weiterhin wurde die Expression von *LDHA* und *LDHB* untersucht, welche für die M- und H-Untereinheit der LDH kodieren. Die LDH ist ein tetrameres Enzym, das sich aus Kombinationen der 2 Untereinheiten zusammensetzt.

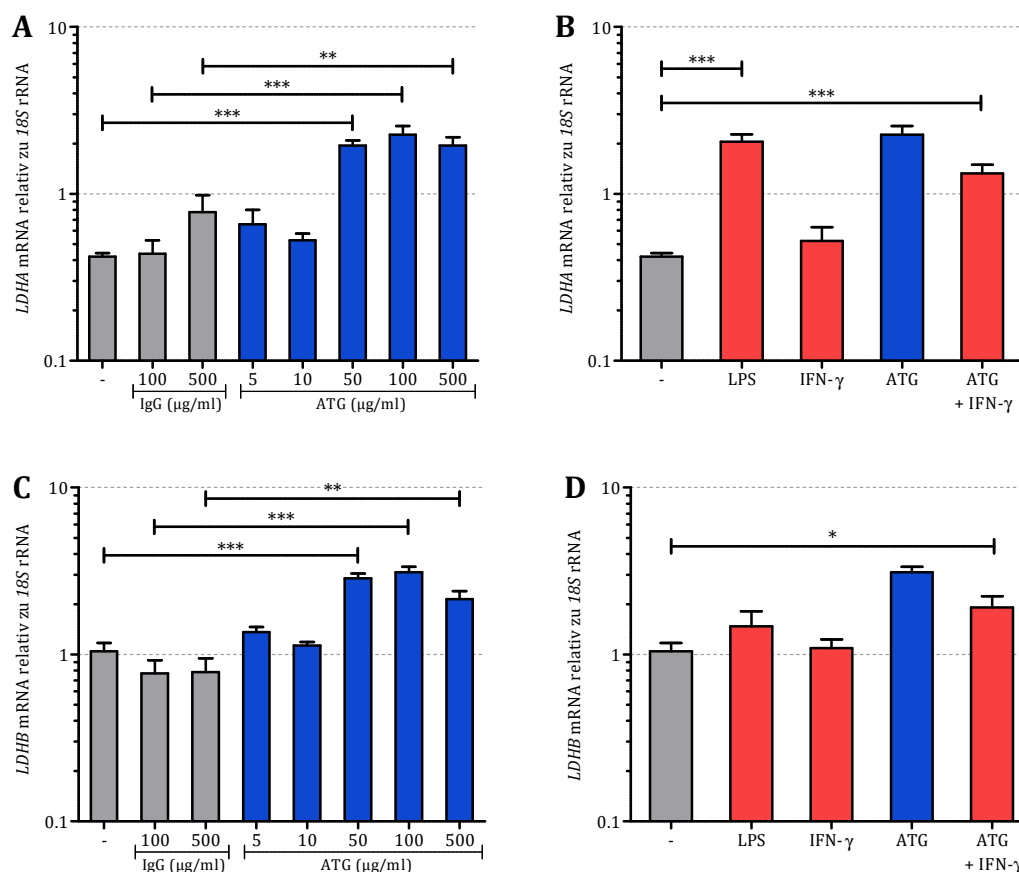


Abbildung 5-18: *LDHA* (A, B) und *LDHB* (C, D) mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, C). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml), und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 µg/ml) dienen als Vergleichsstimuli (B). Nach Isolation der zellulären Gesamt-RNA nach 24 h wurde mittels RT-qPCR die *LDHA*- bzw. die *LDHB*-mRNA- relativ zur *18S*-rRNA-Expression ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

Die daraus entstehenden Isoenzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer katalytischen Aktivität: Das Isoenzym LDH-5, welches aus 4 M-Untereinheiten besteht, setzt bevorzugt Pyruvat in Laktat um. LDH-1 setzt sich aus 4 H-Untereinheiten zusammen und katalysiert dementsprechend den umgekehrten Reaktionsweg. Nach 4 Stunden hatte keine der eingesetzten Substanzen einen Effekt auf die *LDHA*- oder *LDHB*-Expression (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 5-18A und C ist zu sehen, dass ATG sowohl die Expression von *LDHA* als auch von *LDHB* im Vergleich zur IgG-Kontrolle signifikant induzierte. Die IgG-Kontrolle hatte keinen signifikanten Effekt. Im Gegensatz dazu stimulierte LPS nur *LDHA* signifikant. IFN- γ hatte keinen Effekt.

Abbildung 5-19 zeigt die im Zellkulturüberstand gemessene Menge an Laktat. Während sowohl die IgG-Kontrolle als auch ATG keinen Effekt hatten, war der Laktatspiegel unter LPS-Stimulation signifikant erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ATG die Expression beider Untereinheiten, LPS dagegen nur *LDHA* induzierte.

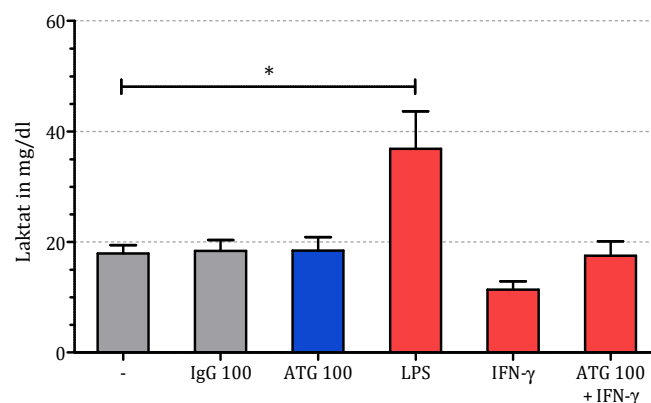


Abbildung 5-19: Laktat im Zellkulturüberstand von DCs nach 24 h Stimulation

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit ATG, IgG, LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen. Im Institut für Klinische Chemie des Universitätsklinikums Regensburg wurde anschließend mittels Analysegerät ADVIA 1650 der Laktat-Gehalt bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (+ SEM) aus 4 Experimenten.

5.5 Einfluss von ATG auf die Zytokinsekretion

Zytokine gehören zu den wesentlichen Mediatoren, durch die tolerogene DCs ihre immun-suppressiven Eigenschaften vermitteln. Weiterhin sind sie dazu in der Lage, den tolerogenen Phänotyp in DCs zu induzieren und zu stabilisieren. Zu diesen Zytokinen gehören in erster Linie IL-10 und TGF- β , da sie die Ausreifung der DCs supprimieren und die Differenzierung naiver T-Zellen in regulatorische T-Zellen begünstigen können [57]. IL-10 inhibiert zusätzlich die Induktion einer T_H1 -Immunantwort [56]. Bislang gibt es keine Daten darüber, ob

ATG Zytokine in DCs induziert. Es konnte lediglich eine Induktion von Interferon- α nachgewiesen werden [142]. Daher wurde parallel zur Untersuchung des Stoffwechsels analysiert, ob ATG die Sekretion verschiedener Zytokine beeinflussen kann. Zum einen wurde IL-10 als Vertreter der immunsuppressiven Zytokine analysiert, zum anderen wurden die proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und IL-12 untersucht, da bspw. die fehlende Sekretion von IL-12 ein weiteres Charakteristikum für tolerogene DCs ist [52]. Um zu sehen, wie spezifisch die Wirkung von ATG auf die DCs ist, wurden vergleichend Monozyten betrachtet. Für die Analyse der Zytokine wurden die DCs für 24 Stunden mit denselben Stimuli wie bei der Untersuchung der mRNA-Expression (siehe 5.1.1) inkubiert. Die Menge des zu analysierten Zytokins wurde im Zellkulturüberstand mit Hilfe von *DuoSet® System* ELISA's (R&D Systems, Wiesbaden) bestimmt.

5.5.1 Proinflammatorische Zytokine TNF, IL-6 und IL-12 unter ATG

In Abbildung 5-20 ist die Sekretion von TNF vergleichend in Monozyten und DCs dargestellt. Die Daten zeigen, dass in Monozyten weder die IgG-Kontrolle noch ATG einen Effekt

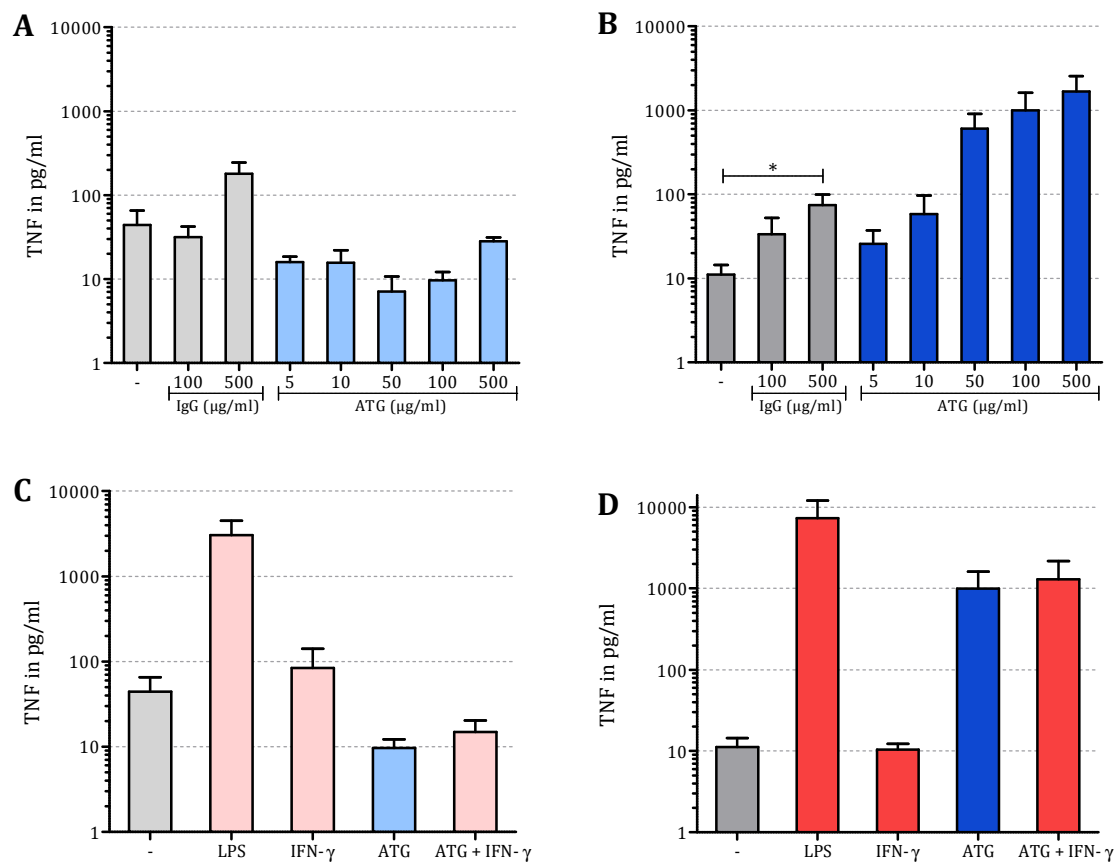


Abbildung 5-20: TNF-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation

Frisch isolierte humane Monozyten bzw. aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100

$\mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG ($100 \mu\text{g/ml}$) (C, D). Nach der Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgenommen. Mit Hilfe von ELISAs (*DuoSet® System Kits*, R&D Systems, Wiesbaden) wurde die Menge an TNF quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 (Monozyten) bzw. mindestens 4 (DCs) unabhängigen Experimenten.

hatten. Nur die Stimulation mit LPS führte zu einer nicht signifikanten Sekretion von TNF in Monozyten. Im Gegensatz zur IgG-Kontrolle war ATG in der Lage, die TNF-Sekretion in DCs konzentrationsabhängig zu induzieren, wobei diese allerdings im Vergleich zu LPS deutlich geringer ausfiel. Sowohl der Effekt von ATG als auch der von LPS waren dabei nicht signifikant. $\text{IFN-}\gamma$ konnte weder als Einzelsubstanz noch als Zusatz zu ATG die TNF-Sekretion beeinflussen. Im Gegensatz dazu hatte ATG sowohl in Monozyten als auch in DCs keinen relevanten Einfluss auf die IL-6-Produktion (Abbildung 5-21). Nur LPS konnte die IL-6-Sekretion signifikant induzieren. Weiterhin ist zu sehen, dass $\text{IFN-}\gamma$ bzw. die Kombination aus $\text{IFN-}\gamma$ und ATG keinen Effekt hatte.

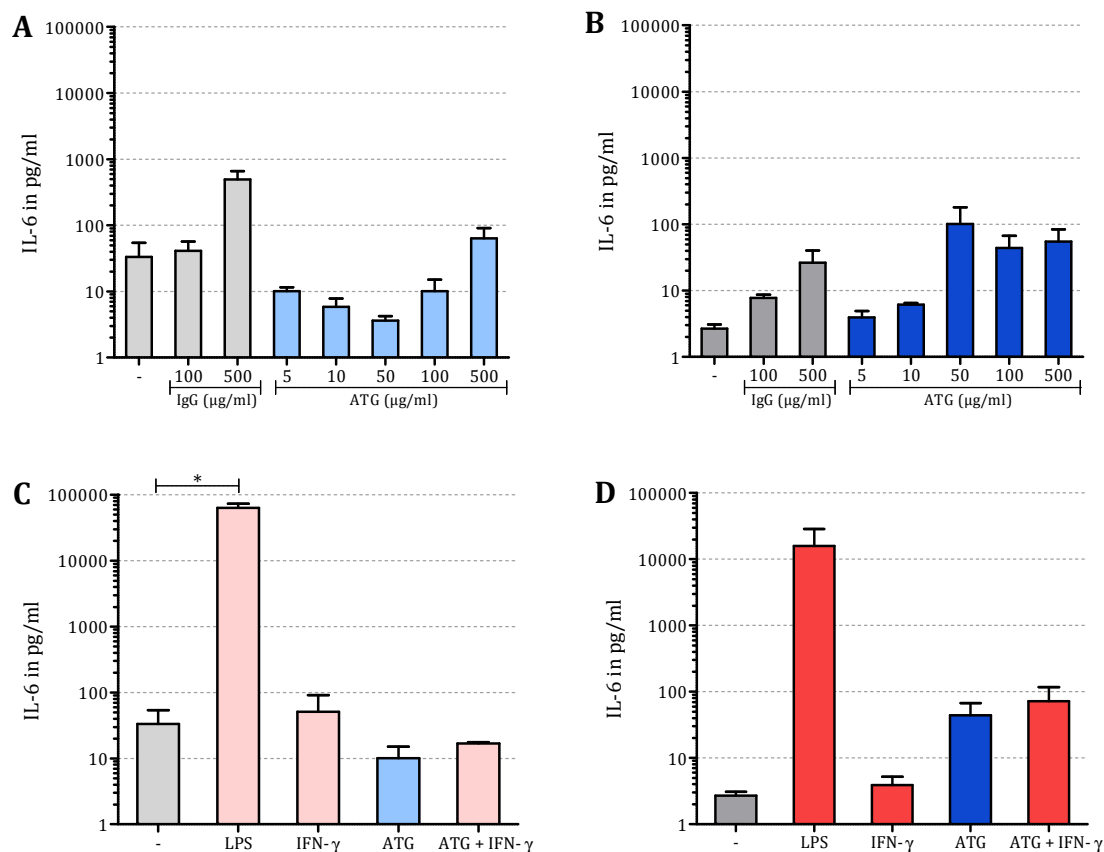


Abbildung 5-21: IL-6-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation

Frisch isolierte humane Monozyten bzw. aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) und $\text{IFN-}\gamma$ (100 U/ml) + ATG ($100 \mu\text{g/ml}$) dienen als Vergleichsstimuli zu ATG ($100 \mu\text{g/ml}$) (C, D). Nach der Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgenommen. Mit Hilfe von ELISAs (*DuoSet® System Kits*, R&D Systems, Wiesbaden) wurde die Menge an IL-6 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten.

Wie in Abbildung 5-22 verdeutlicht, war weder ATG noch die IgG-Kontrolle in der Lage, relevante Mengen an IL-12 in DCs zu induzieren. Die verschiedenen ATG-Konzentrationen unterschieden sich nicht wesentlich (Daten nicht gezeigt). Auch hier führte nur LPS zu einer nicht signifikanten Induktion von IL-12. IFN- γ zeigte erneut keinen Effekt. Die Kulturüberstände der Monozyten wurden nicht auf IL-12 untersucht, da Monozyten dieses Zytokin nicht produzieren.

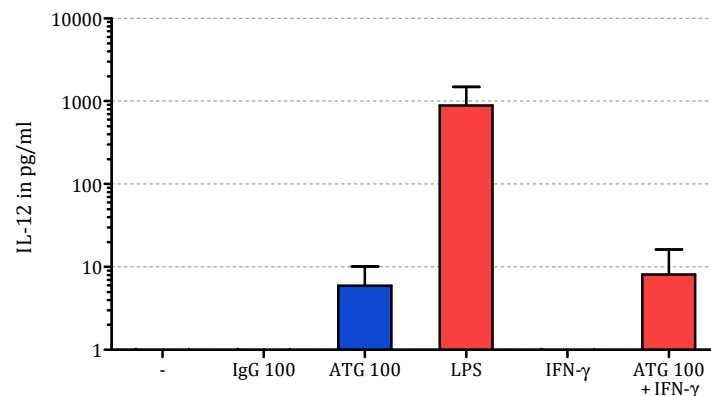
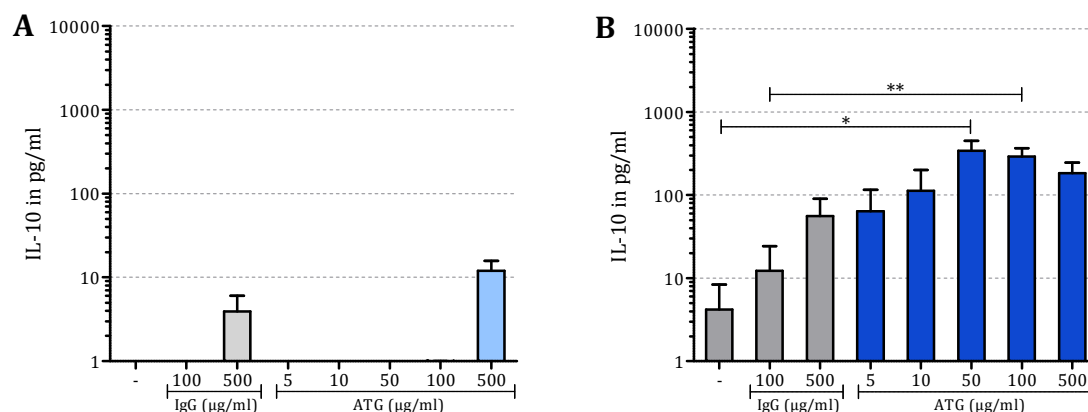


Abbildung 5-22: IL-12-Sekretion in DCs nach 24 h Stimulation

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit ATG, IgG-Kontrolle, LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) oder IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurde der Kulturüberstand abgenommen. Mit Hilfe von ELISAs (*DuoSet® System Kits*, R&D Systems, Wiesbaden) wurde die Menge an IL-12 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten.

5.5.2 Einfluss von ATG auf die Sekretion von IL-10

Abbildung 5-23 stellt den Einfluss von ATG auf die IL-10-Sekretion in Monozyten und DCs dar. Während die Monozyten nicht auf die Stimulation mit ATG reagierten, zeigten die DCs eine – im Vergleich zur IgG-Kontrolle – signifikante Induktion der IL-10-Sekretion. Die IgG-Kontrolle induzierte IL-10 weder in Monozyten noch in DCs. Der Effekt von LPS erwies sich als nicht signifikant.



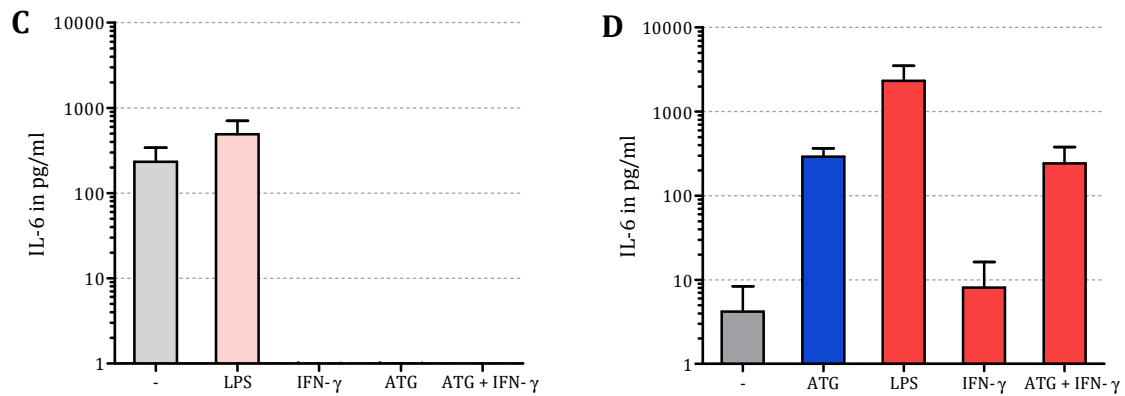


Abbildung 5-23: IL-10-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation

Frisch isolierte humane Monozyten bzw. aus Monozyten generierte DCs wurden für 24 h ohne (-) oder mit versch. Konzentrationen von ATG oder IgG inkubiert (A, B). LPS (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) + ATG (100 μ g/ml) dienten als Vergleichsstimuli zu ATG (100 μ g/ml) (C, D). Nach der Inkubationszeit wurde der Kulturüberstand abgenommen. Mit Hilfe von ELISAs (*DuoSet® System Kits*, R&D Systems, Wiesbaden) wurde die Menge an IL-10 quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 (Monozyten) bzw. mindestens 4 (DCs) unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ATG keine unspezifische proinflammatorische Antwort hervorrief, sondern selektiv die Sekretion von IL-10 induzierte. Auf die Zytokin-Sekretion der Monozyten hatte ATG dagegen keinen Einfluss.

5.6 Mixed lymphocyte reaction

Die unter ATG beobachteten Veränderungen der DCs könnten eine Suppression der T-Zellen zur Folge haben. Dies würde bedeuten, dass ATG in der Lage ist, tolerogene DCs zu induzieren. Um dies zu überprüfen, wurde eine *mixed lymphocyte reaction* (MLR) durchgeführt. Dazu wurden DCs 5 Tage lang mit allogenen T-Zellen inkubiert. Danach wurde die von den DCs induzierte Proliferation der T-Zellen durch Zugabe von [3 H]-Thymidin ermittelt. Alternativ wurde die Proliferation durch Zugabe von Bromdesoxyuridin (BrdU) analysiert. Dabei werden [3 H]-Thymidin bzw. BrdU in die DNA proliferierender T-Zellen eingebaut. Da DCs nicht proliferieren, kann damit die Proliferation der T-Zellen bestimmt werden. Ein Vergleich der beiden Methoden ist im Kapitel 4.1.6.3 dargestellt.

5.6.1 Induktion einer T-Zell-Antwort durch ATG-DCs

Zunächst sollte untersucht werden, ob die DCs unter den vorliegenden Versuchsbedingungen überhaupt in der Lage sind, die T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Bekanntermaßen stimulieren reife DCs (LPS-DCs) die T-Zell-Proliferation sehr gut. Daher wurden LPS-DCs mit den ATG- und IgG-DCs verglichen. Die DCs wurden für 48 Stunden mit den jeweiligen

Stimuli inkubiert. Danach wurden die gewaschenen DCs in unterschiedlichen Konzentrationen mit jeweils 100.000 allogenen T-Zellen gemischt und für 5 Tage inkubiert. Anschließend wurde die [³H]-Thymidin-Markierung für 24 h durchgeführt. In Abbildung 5-24 ist zu sehen, dass Lymphozyten, die mit ATG-DC oder IgG-DC stimuliert wurden, ein ähnliches Proliferationsniveau haben wie unreife DCs. Die mit LPS-DCs stimulierten T-Zellen zeigten dagegen eine deutlich gesteigerte Proliferation.

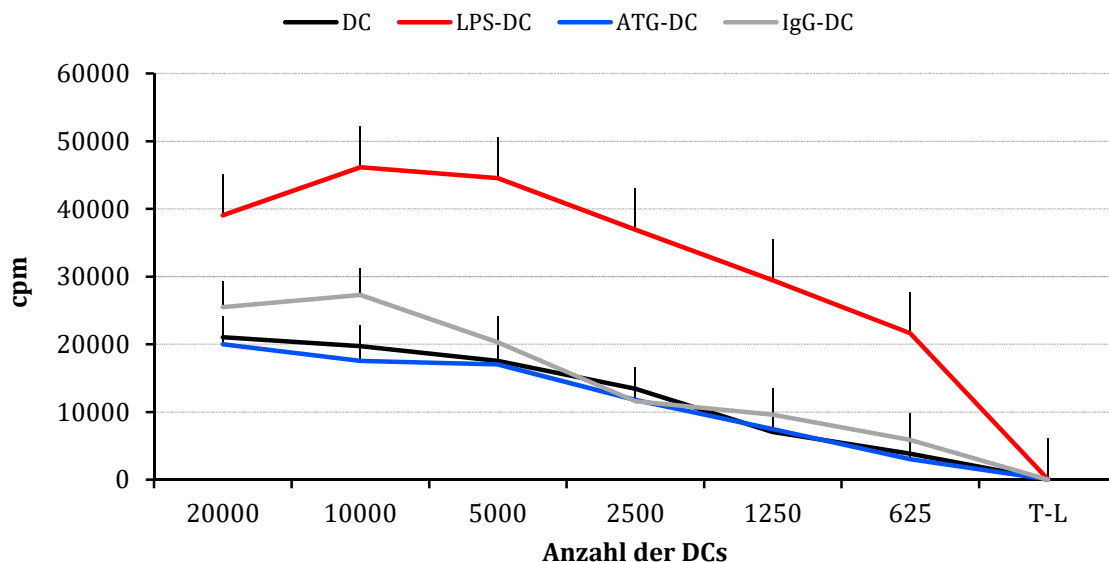


Abbildung 5-24: MLR mit verschiedenen DC-Populationen

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 48 Stunden mit oder ohne LPS (10 ng/ml), ATG (100 µg/ml) oder IgG (100 µg/ml) inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Konzentrationen von DCs mit je 100.000 T-Zellen in Kokultur gesetzt und für 5 Tage inkubiert. Im Anschluss wurde die [³H]-Thymidin-Markierung für 24 h durchgeführt. Gezeigt sind die gemittelten cpm-Werte (+ SEM) aus 4 unabhängigen Experimenten.

5.6.2 Aktive T-Zell-Supprimierung durch ATG-DCs

Im vorherigen Kapitel hatte sich gezeigt, dass ATG-DCs die T-Zellen im Vergleich zu den LPS-DCs kaum zur Proliferation anregen. Weiterhin stellte sich nun die Frage, ob ATG-DCs in der Lage sind, die Proliferation der T-Zellen aktiv zu supprimieren. Zu diesem Zweck wurden die eingesetzten LPS-DCs mit der gleichen Anzahl an ATG-DCs gemischt und mit 100.000 T-Zellen für 5 Tage in Kokultur gesetzt. So enthielt zum Beispiel ein Ansatz mit 20.000 DCs und 100.000 T-Zellen jeweils 10.000 LPS- und ATG-DCs. Zur Kontrolle wurden in gleicher Weise LPS- mit nicht stimulierten und IgG-DCs gemischt. Abbildung 5-25A zeigt eines von 3 unabhängig durchgeführten Experimenten: Es ist zu sehen, dass die beiden Mischpopulationen IgG-DC + LPS-DC bzw. DC + LPS-DC im Vergleich zur Einzelpopulation LPS-DC keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der T-Zellen hatten. Im Gegensatz dazu konnten die ATG-DC die durch LPS-DC induzierte Proliferation supprimieren.

Zusammenfassend ist allerdings festzuhalten, dass diese 3 Experimente noch keine eindeutige Aussage zulassen. Jedoch liefern sie Hinweise darauf, dass die ATG-DCs in der Lage sind, die Proliferation der T-Zellen aktiv zu supprimieren.

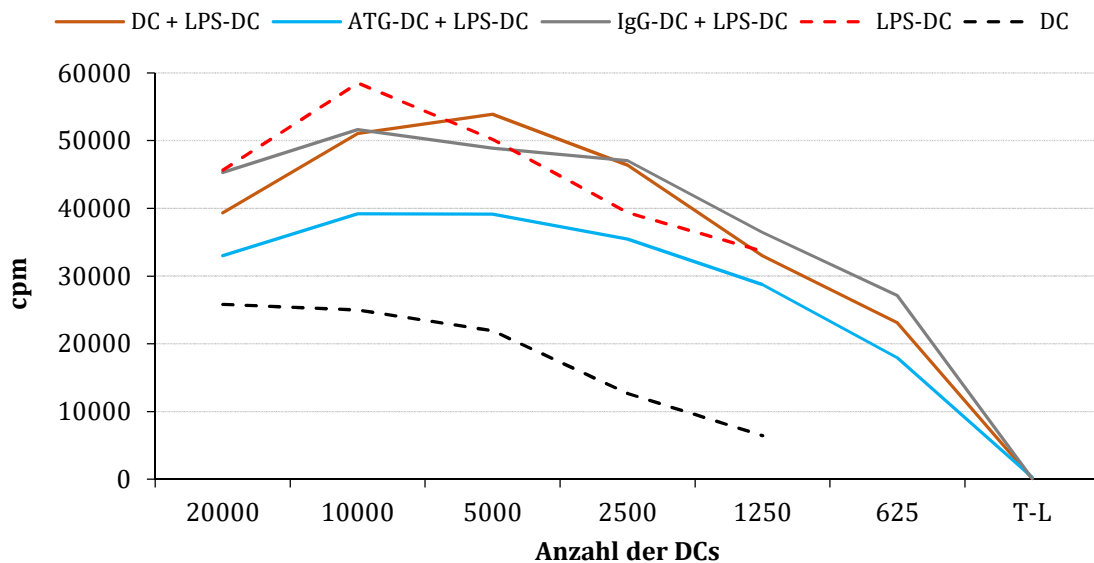


Abbildung 5-25: T-Zell-Supprimierung durch ATG-DCs

Aus Monozyten generierte DCs wurden für 48 Stunden mit oder ohne LPS (10 ng/ml), ATG (100 µg/ml) oder IgG (100 µg/ml) inkubiert. Im Anschluss wurden unterschiedliche Konzentrationen von DCs mit je 100.000 T-Zellen in Kokultur gesetzt und für 5 Tage inkubiert. Dabei wurden DCs 1:1 gemischt. Danach wurde die [³H]-Thymidin-Markierung für 24 h durchgeführt. Zum Vergleich sind auch Einzelpopulationen (LPS-DC, nicht stimulierte DC) als gestrichelte Linien gezeigt. Diese wurden im Vergleich zu den Mischpopulationen jeweils um eine Position nach links verschoben, da eine MLR mit einer Gesamtzellzahl von 10.000 LPS-DC oder nicht stimulierten DC der Mischpopulation entspricht, die eine Gesamtzellzahl von 20.000 hat. Denn diese setzten sich bspw. aus je 10.000 LPS-DC und nicht stimulierten DC zusammen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

6 Diskussion

6.1 Direkter Einfluss von ATG auf dendritische Zellen

6.1.1 Tryptophan-Stoffwechsel

In einer vorrausgegangen Arbeit konnte festgestellt werden, dass eine Stimulation der DCs mit ATG zu einer signifikanten Depletion von Tryptophan im Zellkulturüberstand führte. Entsprechend konnte dort ebenfalls eine signifikante Zunahme der beiden Tryptophan-Metaboliten Anthranilsäure und Kynurenin beobachtet werden. In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst bestätigt werden, dass ATG eine spezifische Induktion des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DCs verursacht, die aller Wahrscheinlichkeit nach Ursache für den verstärkten Katabolismus ist. Konkret konnte nachgewiesen werden, dass ATG sowohl die mRNA-Expression der beiden Enzyme *IDO1* und *IDO2* als auch die Expression des Gesamtproteins IDO in DCs spezifisch induzierte. Die verwendete Kontrolle (polyklonaler IgG-Antikörper gesunder Kaninchen, kurz: IgG-Kontrolle) hatte keinen Effekt. Ähnlich verhielt es sich mit dem Enzym Kynureninase, welches ATG auf mRNA-Ebene ebenfalls spezifisch induzieren konnte. Obwohl Gillet-Hladky *et al.* eine andere ATG-Präparation verwendeten, beobachteten sie in humanen, aus Monozyten generierten DCs ebenfalls eine Induktion der *IDO*-mRNA-Expression nach Stimulation mit 100 µg/ml ATG [142]. Dies deutet daraufhin, dass die Wirkung von ATG auf IDO nicht auf eine bestimmte ATG-Präparation beschränkt ist. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass alle durch ATG hervorgerufenen Effekte spätestens bei einer Konzentration von 100 µg/ml voll ausgeprägt waren und sich durch den Einsatz noch höherer Konzentrationen nicht weiter steigern ließen. Leitner *et al.* bzw. Michallet *et al.* verwendeten für ihre Bindungsanalysen ebenfalls eine ATG-Konzentration von maximal 100 µg/ml. Beide Arbeitsgruppen haben verschiedene ATG-Präparationen miteinander verglichen, u.a. auch ATG Fresenius [116, 118]. Eine Konzentration von 500 µg/ml ATG Fresenius, wie sie von Ayuk *et al.* zur Analyse der ATG-vermittelten Depletion verwendet wurde [143], scheint nicht notwendig oder sinnvoll zu sein; vor allem unter dem Gesichtspunkt, dass 100 µg/ml ATG mit der *in vivo* erreichten ATG-Konzentrationen im Blut von Patienten gut übereinstimmt [144]. Bei diesen ATG-Konzentrationen war der Effekt auf IDO ähnlich stark ausgeprägt wie unter LPS-Stimulation (10 ng/ml). Auch bei Monozyten war eine Konzentration von 100 µg/ml für den Effekt,

sofern vorhanden, ausreichend; gleiches gilt für die Kynureninase in DCs. Wie bereits erwähnt, bewirkt diese Hochregulation von IDO tatsächlich eine Aktivierung des Tryptophan-Katabolismus. Dies führt zu einer Depletion des Tryptophans und zu einer Anhäufung der entsprechenden Metaboliten im Kulturüberstand. Diese Stoffwechselsituation hat über verschiedene Mechanismen Einfluss auf T-Zellen. Ein derart aktiver Tryptophan-Stoffwechsel ist ein typisches Charakteristikum für tolerogene DCs [71].

In neueren Veröffentlichungen bringen verschiedene Autoren den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AHR) mit dem Tryptophan-Stoffwechsel in Verbindung [72, 73, 145-147]. Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression des *AHR* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *AHR*-mRNA unter ATG gut nachweisbar exprimiert ist, im Vergleich zu nichtstimulierten DCs ATG jedoch keinen Unterschied erzielte. In verschiedenen Publikationen [72, 73] konnte Kynurenin als Ligand des AHR identifiziert werden; weiterhin scheint die Aktivierung des Rezeptors durch einen geeigneten Liganden, wie etwa Kynurenin, wichtig für die Aktivierung von IDO1 und IDO2 zu sein [73, 146]. Dies könnte bedeuten, dass sich z.B. eine durch ATG vermittelte IDO-Induktion mit nachfolgender Anhäufung von Kynurenin via autokriner AHR-Bindung selbst verstärkt. Ebenso wäre ein parakriner Mechanismus denkbar: Tolerogene DCs aktivieren durch das Anhäufen von Kynurenin den AHR in unreifen DCs. Als weiterer Rezeptor, der vor allem in Immunzellen exprimiert wird und Kynurenin als Ligand akzeptiert, wurde der G-Protein-gekoppelte Rezeptor 35 (GPR35) identifiziert [148]. Zudem werden weitere Effekte der Tryptophan-Metaboliten, die nicht das Immunsystem betreffen, dem N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Rezeptor zugeschrieben [149, 150].

Der durch ATG verstärkte Tryptophan-Metabolismus ist im Hinblick auf eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD), in der ATG im Einsatz ist, besonders interessant. Verschiedene Autoren konnten in Mausmodellen belegen, dass IDO in unterschiedlichen Transplantationssituationen einen wichtigen Faktor für die Akzeptanz des Transplantats darstellt [151-153]. Jaspersen *et al.* konnten mit IDO-defizienten Mäusen nachweisen, dass das Schlüsselenzym des Tryptophan-Stoffwechsel ein entscheidender Faktor bei der Schwere und Ausprägung der GvHD ist [154, 155]. Damit im Konsens stehen Curti *et al.*, die in IDO einen der wichtigsten Regulatoren der GvHD sehen [156]. Unter Betrachtung dieser Gesichtspunkte erscheint die Induktion von IDO in DCs als ein möglicher Wirkmechanismus, durch den ATG seine tolerogene Wirkung *in vivo* entfalten könnte.

6.1.2 Vitamin-D-Stoffwechsel

Ähnlich eindeutige Ergebnisse wie der Tryptophan-Stoffwechsel lieferte die Untersuchung des Vitamin-D₃-Stoffwechsels. Es konnte nachgewiesen werden, dass ATG Fresenius die Expression der *CYP27B1*-mRNA deutlich steigerte. Auch hier war eine ATG-Konzentration von 100 µg/ml völlig ausreichend, um einen signifikanten Effekt zu erzeugen. Weitere Experimente verdeutlichten die Relevanz dieser Beobachtung: Dabei konnte gezeigt werden, dass DCs nach Stimulation mit ATG und Zugabe von 25(OH)D₃ in der Lage waren, 1,25(OH)₂D₃ zu produzieren. In keinem der Experimente konnte ein Effekt der IgG-Kontrolle beobachtet werden. In ähnlicher Weise konnten Fritsche *et al.* nachweisen, dass DCs, die mit LPS stimuliert wurden, das Enzym CYP27B1 exprimieren und dadurch die Fähigkeit erlangen, 25(OH)D₃ in 1,25(OH)₂D₃ umzusetzen [157]. In der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin festgestellt werden, dass die mRNA-Expression des Vitamin-D-Rezeptors (VDR) in DCs exprimiert ist, aber keiner Regulation durch ATG unterliegt. Dies steht im Widerspruch zu Hewison *et al.*, die eine zur Expression von CYP27B1 reziproke Regulation des VDR fordern [158]. Im vorliegenden Fall müsste dies eine verminderte VDR-mRNA-Expression bei verstärkter *CYP27B1*-mRNA-Expression bedeuten; dies war aber nicht der Fall. Nichtsdestotrotz erscheint die Diskussion über einen auto- oder parakriner Mechanismus, wie sie Hewison *et al.* in diesem Zusammenhang führen interessant. Eine reziproke Regulation ließe eine autokrine Einflussnahme wegen der geringeren VDR-Expression nicht plausibel erscheinen [159]. Stattdessen wäre ein parakriner Mechanismus wahrscheinlicher, und zwar in dem Sinne, dass einige wenige 1,25(OH)₂D₃-produzierende DCs die übrigen beeinflussen. Dies wäre dann vergleichbar mit dem Tryptophan-Stoffwechsel und der Expression des AHR. Liegt wie im vorliegenden Fall keine reziproke Regulation vor, erscheinen sowohl auto- als auch parakrine Mechanismen möglich. 1,25(OH)₂D₃ wirkt auf DCs, indem es die Differenzierung und Reifung der DCs inhibiert und damit zu einer verminderten Expression von CD80 und CD86 führt. Folglich schwächt dies die Fähigkeit der DCs, T-Zellen zu stimulieren [79-81]. Des Weiteren supprimiert 1,25(OH)₂D₃ die IL-12-Produktion und steigert die IL-10-Produktion [82]. Damit gehört die Produktion von 1,25(OH)₂D₃ genauso wie die Induktion vonIDO zu den tolerogenen Eigenschaften, die ATG vermitteln könnte.

Interessanterweise beobachteten sowohl Correale *et al.* in einer klinischen Studie mit Patienten, die an Multiple Sklerose (MS) leiden [160], als auch Farias *et al.* in Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE), einem Krankheitsmodell, welches der

MS sehr ähnlich ist, [161], dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in der Lage ist, IDO^+ tolerogene DCs zu induzieren. Außerdem sahen sie, dass diese IDO -Induktion mit einer verstärkten Aktivität des Transkriptionsfaktors STAT3 einhergeht. Dieser spielt für den Signalweg von IDO eine wesentliche Rolle [162]. In beiden Modellen korrelierte die Anwesenheit von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ mit einer günstigeren Prognose der Autoimmunerkrankungen.

In einer klinischen Untersuchung konnten Kreutz *et al.* bereits 2003 eine negative Korrelation zwischen den $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -Serumspiegeln und der Schwere der GvHD nach Stammzelltransplantation beobachten [163]. Diese Feststellung konnte in ähnlicher Weise von Glotzbecker *et al.* bestätigt werden [164]: Patienten mit erniedrigten $25(\text{OH})\text{D}_3$ vor der allogenen SCT hatten ein signifikant höheres Risiko eine chronische GvHD zu erleiden. Ebenso sahen Silva *et al.* in einer Studie mit nur 12 Patienten dezente Hinweise darauf, dass die Patienten von einer präventiven Behandlung mit Vitamin- D_3 profitieren [165].

Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit Hinweise darauf erbracht werden, dass ATG die mRNA-Expression von *CYP27A1* tendenziell inhibierte. Auch hier hatte die IgG-Kontrolle keinen Effekt. Fraglich ist, ob dieser Effekt Relevanz hat, da Zhu *et al.* nachweisen konnten, dass der Knockout von *CYP2R1*, einem weiteren Enzym welches die Hydroxylierung von Vitamin D_3 zu $25(\text{OH})\text{D}_3$ katalysiert, eine größere Bedeutung für den $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegel hat als der Knockout von *CYP27A1* [166]. Ganz im Gegensatz zum Knockout von *CYP27A1* führte der von *CYP2R1* zu einer deutlichen Absenkung des $25(\text{OH})\text{D}_3$ -Spiegels. Entsprechend haben Patienten mit zerebrotendinöser Xanthomatose (CTX), die eine nicht funktionsfähige Mutation des *CYP27A1*-Gens tragen, keinerlei Veränderungen im Vitamin- D_3 -Stoffwechsel [167]. Die CTX ist eine extrem seltene autosomal-rezessiv vererbte Krankheit und führt zu einer massiven Cholestase mit Ablagerungen von Cholesterin und Cholestanol, welche zu schweren u.a. neurologischen Beeinträchtigungen führen [168]. Dies deutet darauf hin, dass der menschliche Körper die Funktion des Enzyms im Vitamin- D_3 -, aber nicht im Cholesterin-Stoffwechsel kompensieren kann [169]. Natürlich könnte das Enzym in DCs eine andere Bedeutung haben. Um eine Aussage treffen zu können, müsste der Effekt von ATG auf *CYP2R1* ebenfalls untersucht werden. Unabhängig davon muss die Frage gestellt werden, welchen „Sinn“ eine Herunterregulation von *CYP27A1* und eine Hochregulation von *CYP27B1* unter dem Einfluss von ATG hat. Theoretisch würde eine verminderte Expression von *CYP27A1* die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus Vitamin D_3 trotz der verstärkten Expression von *CYP27B1* einschränken. Da aber DCs $25(\text{OH})\text{D}_3$ aus ihrer Umgebung aufnehmen, ist die Expression von *CYP27A1* für die Synthese von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

wahrscheinlich nicht von Bedeutung [170-172]. Eine solche Situation wäre mit den hier durchgeführten Experimenten vergleichbar, in denen 25(OH)D₃ zugegeben wurde.

6.1.3 Prostaglandin-Stoffwechsel

Bei der Untersuchung des Prostaglandin-Stoffwechsels der DCs wurde die mRNA-Expression der beiden Cyclooxygenasen *COX1* und *COX2* unter Einfluss von ATG analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass *COX1* unter ATG im Vergleich zur IgG-Kontrolle tendenziell inhibiert, wohingegen *COX2* signifikant induziert wurde. Die IgG-Kontrolle hatte keinen Effekt auf *COX1*, war jedoch in der Lage die Expression von *COX2* zu verstärken, wengleich der Unterschied zwischen ATG (500 µg/ml) und IgG-Kontrolle (500 µg/ml) signifikant war. Unklar ist, wie sich die Änderung der Expression der COX-Enzyme auf die tatsächliche Produktion von PGE₂ durch DCs ist. Für die Beantwortung dieser Frage wäre es sinnvoll, die Menge an Prostaglandinen in den Zellkulturüberständen zu quantifizieren. Die paradoxe Wirkung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) wurde eingangs bereits erwähnt: Einerseits steigert es zusammen mit TNF die IL-12-Produktion und damit die Möglichkeit der T-Zell-Stimulation [173]. Andererseits ist PGE₂ in der Lage die Reifung der DCs und ihre Fähigkeit der Antigenpräsentation zu minimieren [174]. Dazu passend konnten von Bergwelt-Baildon *et al.* eineIDO-induzierende Wirkung von PGE₂ aufzeigen [90]. Insgesamt bleibt fraglich, welche Rolle PGE₂ und die beiden Cyclooxygenasen für die Wirkung von ATG auf DCs spielen.

6.1.4 Glukose-Stoffwechsel

In den hier gezeigten Experimenten induzierte ATG in DCs sowohl *LDHA* als auch *LDHB* signifikant. Die Menge an Laktat im Zellkulturüberstand blieb allerdings unverändert, so dass die verstärkte Expression der LDH-Untereinheiten vermutlich ohne Relevanz bleibt. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in der gleichzeitigen Induktion beider Untereinheiten. LPS induzierte dagegen nur LDHA, was eine signifikante Erhöhung des Laktatspiegels zur Folge hatte. Auf die beiden Isoenzyme der Hexokinase hatte ATG keinen Effekt.

6.1.5 Zytokin-Sekretion

Die Analyse der Zytokin-Sekretion zeigte, dass DCs auf ATG nicht mit einer unspezifischen proinflammatorischen Antwort reagieren, sondern gezielt bestimmte Zytokine sezernieren. So konnte gezeigt werden, dass ATG-stimulierte DCs weder IL-6 noch IL-12, aber IL-10

und nicht signifikante Mengen an TNF sezernieren. Im Gegensatz dazu hatte die IgG-Kontrolle keinen Effekt auf IL-6, IL-10 und IL-12, zeigte jedoch für eine Konzentration von 500 µg/ml eine signifikante Wirkung auf die TNF-Sekretion der DCs. In Monozyten hatte ATG dagegen keinen signifikanten Effekt auf die Zytokin-Sekretion. Gillet-Hladky *et al.* untersuchten ebenfalls die Zytokin-Sekretion, da sie allerdings eine andere ATG-Präparation verwendeten, können die Daten kaum verglichen werden. Trotzdem konnten sie nach ATG-Inkubation ebenfalls keine IL-12-Sekretion in DCs beobachten [142]. Dafür konnten Gillet-Hladky *et al.* in ihren Experimenten Interferon- α nachweisen, woraus sie schlossen, dass mit ATG stimulierte DCs die T_H2-Antwort fördern, wohingegen die T_H1-Antwort supprimiert wird. Deutlich widersprüchlich sind die Ergebnisse bezüglich IL-10: Während Gillet-Hladky *et al.* ATG-Stimulation kein IL-10 nachweisen konnten [142], war das Zytokin in der vorliegenden Arbeit in signifikanten Mengen vorhanden. Das Vorgehen bei der Stimulation mit ATG war jedoch unterschiedlich: Während Gillet-Hladky *et al.* die Monozyten bzw. DCs von Anfang an mit ATG stimulierten, wurde in der vorliegenden Arbeit ATG erst hinzugegeben, nachdem die Differenzierung zu DCs abgeschlossen war. IL-10 ist im Hinblick auf ATG von besonderem Interesse, da es als immunsuppressives Zytokin große Bedeutung für tolerogene DCs hat. Es blockiert die Ausreifung der DCs und verhindert dadurch eine effektive Stimulation der T-Zellen [56]. Die Wirkung von ATG auf die IL-10-Sekretion war spezifisch in DCs, nicht jedoch in Monozyten nachweisbar.

6.1.6 Funktionelle Effekte von ATG-DCs auf T-Zellen

Die bereits dargestellten Ergebnisse über den Einfluss von ATG auf den Tryptophan-, Vitamin-D₃- und Prostaglandin-Stoffwechsel und auf das Zytokinprofil sprechen deutlich dafür, dass ATG tolerogene DCs induziert. Daher wurde überprüft, wie sich dieser Phänotyp *in vitro* auf die Aktivierung von T-Zellen durch DCs auswirkt. Mit ATG stimulierte DCs wurden zusammen mit allogenen T-Zellen inkubiert. Dies wird als *mixed lymphocyte reaction* (MLR) bezeichnet. Eine solche Situation findet sich auch nach allogener SCT, bei der die allogenen T-Zellen des Spenders auf die DCs des Empfängers treffen. Als Maß für die Aktivität der T-Zellen wurde ihre Proliferationsrate bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die mit ATG stimulierten DCs kaum in der Lage waren, T-Zellen adäquat zur Proliferation anzuregen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Monti *et al.*. Obwohl sie eine andere ATG-Präparation verwendeten, konnten auch sie in einer MLR keine Stimulation der T-Zellen beobachten [175]. In der vorliegenden Arbeit konnten zusätzlich deutliche Hinweise dafür erbracht werden, dass mit ATG inkubierte DCs in der Lage sind, die Induktion

und Aktivierung von T-Zellen durch LPS-DC zu inhibieren. Dies sollte in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Weiterhin geht die Induktion von IDO in DCs mit einer verstärkten *de novo* Differenzierung regulatorischer T-Zellen einher [61]. Diese Wirkung zeigt auch das immunsuppressive Zytokin IL-10 [57]. Im Gegenzug sezernieren regulatorische T-Zellen ebenfalls IL-10, was zur Stabilisierung eines tolerogenen Phänotyps beiträgt. Regulatorische T-Zellen hemmen wiederum die Immunantwort der T_H1 - und T_H2 -Zellen [51, 62]. Unklar ist bisher, wie die IDO-Expression in DCs zu einer T-Zell-Suppression führt. Die anfängliche Theorie von Mellor *et Munn* besagt, dass der Entzug von Tryptophan aus dem Mikromilieu zu einer funktionellen T-Zell-Suppression führt [71]. Eine weitere Theorie von Terness *et al.* sieht die Metaboliten, wie Kynurenin, für die Suppression als verantwortlich an [69]. Grohmann *et al.* erklären den Effekt dadurch, dass der intensivierete Metabolismus die Eigenschaften der DCs beeinflusst, und so die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren, supprimiert [176]. Gonzales sieht die ersten beiden Theorien als ursächlich für die dritte Theorie an [62, 177]. Unabhängig davon steht fest, dass ein verstärkter Tryptophan-Metabolismus die Proliferation von T-Zellen unterdrückt [64, 65]. Gleichzeitig induziert er eine verstärkte Apoptose von T- und NK-Zellen [66-69].

6.1.7 Zusammenfassung der ATG-Effekte auf DCs

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ATG vielfältige Veränderungen in DCs induziert, nicht jedoch in Monozyten. Abbildung 6-1 versucht, diese Ergebnisse mit der bisherigen Literatur in Zusammenhang zu bringen.

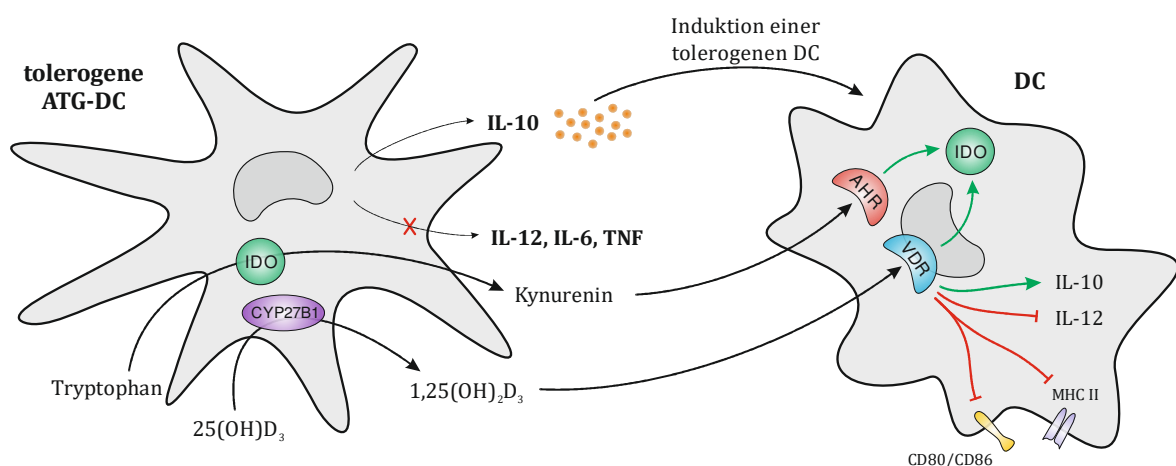


Abbildung 6-1: Effekte von ATG auf DCs und deren mögliche parakrine Einflüsse auf weitere DCs

Gezeigt sind die potenziellen Effekte, die ATG-DCs auf weitere DCs ausüben könnte. Erklärung siehe Text. Abbildung eigens mittels CorelDraw erstellt.

Dargestellt sind zunächst die beobachtete Induktion des Tryptophan- und Vitamin-D₃-Stoffwechsels, sowie die Sekretion von IL-10. Eine signifikante Sekretion weiterer proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12, TNF) konnte nicht festgestellt werden. Entgegen der Erwartungen führte die IgG-Kontrolle zu einer signifikanten Sekretion von TNF. Ohne weitere proinflammatorische Zytokine führt TNF laut Menges *et al.* zu einer Semi-Reifung der DCs [178].

Besonders interessant ist der verstärkte Tryptophan- und Vitamin-D₃-Stoffwechsel, mit nachfolgender Anhäufung von Kynurenin und 1,25(OH)₂D₃. Für beide Stoffwechselprodukte wurde nachgewiesen, dass sie die Expression von IDO stimulieren [146, 161]. 1,25(OH)₂D₃ übt seine Wirkung mutmaßlich via VDR aus, wohingegen Kynurenin als Ligand des AHR fungiert [72, 73]. Penna *et al.* konnten unter Einfluss von 1,25(OH)₂D₃ weiterhin eine Induktion der IL-10-Sekretion und eine Inhibierung der IL-12-Sekretion beobachten [82]. Zusätzlich supprimiert 1,25(OH)₂D₃ die Differenzierung und die Reifung der DCs, insbesondere die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 und der MHC-Klasse-II-Moleküle [79-81]. Damit wird die Fähigkeit der DCs, T-Zellen zu stimulieren ebenfalls verschlechtert. Diese Überlegungen lassen den Schluss zu, dass ATG-DCs neben ihren Effekten auf T-Zellen auch in der Lage sind, parakrin einen tolerogenen Phänotyp in weiteren DCs zu induzieren.

6.2 Mögliche Relevanz der ATG-Effekte *in vivo*

Landfried *et al.* beobachteten in der Phase vor einer Stammzelltransplantation (SCT), in der die Patienten mit ATG Fresenius behandelt wurden, einen Anstieg der Tryptophan-Metaboliten Kynurenin und Chinolinsäure im Urin [133]. Vermutlich ist die Induktion von IDO und eventuell nachgeschalteter Enzyme (z.B. Kynureninase) dafür verantwortlich. IDO wird allerdings in einer Vielzahl von Zellen exprimiert, einschließlich Endothel- und glatten Muskelzellen [179-181]. Weiterhin existiert das Enzym Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), welches zwar dieselbe Reaktion katalysiert, aber fast ausschließlich in der Leber zu finden ist [182]. Möglicherweise beeinflusst ATG sowohl TDO als auch IDO in anderen Körperzellen, was dann zu einer vermehrten Ausscheidung im Urin führt.

Die entscheidende Frage ist, ob die aufgezeigten *in vitro* Effekte *in vivo* eine Rolle spielen können und zur immunsuppressiven und tolerogenen Wirkung von ATG beitragen. Einerseits führt ATG zur Depletion von T-Zellen und zerstört damit das eigentliche Ziel der tolerogenen DCs. Andererseits reduziert ATG auch die Anzahl der DCs. Fang *et al.* konnten

in ihren *ex vivo* Experimenten nachweisen, dass sich die Anzahl myeloider bzw. plasmazytoider DCs im Blut nach Inkubation mit ATG Fresenius und Komplementfaktoren um 80 bzw. 85% reduziert [183]. Selbiges konnten sie mit Patienten, die mit oder ohne ATG behandelt wurden, *in vivo* bestätigen. Daher muss kritisch hinterfragt werden, ob ATG die Wirkung auf DCs, die *in vitro* beobachtet werden, *in vivo* überhaupt entfalten kann. Allerdings befindet sich nur ein geringer Teil der DCs im Blut, der Großteil hält sich in den verschiedenen Gewebetypen (Gastrointestinaltrakt, Leber) oder in der Haut (z.B. Langerhans-Zellen) auf. Es wäre von besonderem Interesse zu wissen, wie die DCs dort auf ATG reagieren, da sich die GvHD in diesen Organen manifestiert [119]. Simpson schreibt, dass ATG, welches vor der SCT verabreicht wurde, weiterhin im Knochenmark verbleibt und anschließend die T-Zellen des Empfängers und Spenders depletiert [184]. Dies bedeutet, dass ATG seine Wirkung auch auf die DCs des Transplantats ausüben kann. Weiterhin zeigen neue Publikationen, dass ATG *in vivo* regulatorische T-Zellen induziert [185, 186]. Die Induktion tolerogener DCs könnte ein möglicher Mechanismus sein, wie ATG diese Wirkung vermittelt. Besonders interessant an den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekten ist die Möglichkeit, dass die Veränderung des DC-Phänotyps möglicherweise stabil bleibt und damit einen langfristigen Effekt von ATG ermöglicht, ohne dabei die negativen Konsequenzen einer T-Zell-Depletion zur Folge zu haben. Abschließend bleibt festzuhalten, dass ATG seine immunsuppressive Wirkung vermutlich nicht nur durch die T-Zell-Depletion vermittelt, sondern auch durch die vielfältig beschriebenen Effekte auf andere Immunzellen. Möglicherweise gehören die in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Veränderungen in DCs ebenfalls dazu.

7 Zusammenfassung

Die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen hat eine große Bedeutung in der Therapie maligner hämatologischer Erkrankungen. Allerdings wird der Erfolg dieser Therapieoption durch die Entwicklung einer Graft-versus-Host-Disease (GvHD) beschränkt. Prophylaktisch werden daher immunsuppressive Medikamente wie Antithymozytenglobulin (ATG) eingesetzt. Der am besten dokumentierte Effekt von ATG ist die Depletion von T-Zellen via Komplement-abhängiger Lyse oder alternativ via Apoptose und Phagozytose. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Effekte ATG auf humane Monozyten und dendritische Zellen (DCs) hat.

Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass ATG im Gegensatz zu einer polyklonalen IgG-Kontrolle zu einer signifikant gesteigerten Expression des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) in DCs führt. Die Expression von IDO in DCs hat immunregulatorische Effekte, wie z.B. die Induktion regulatorischer T-Zellen. Weiterhin konnte auf mRNA-Ebene eine verstärkte Expression der Kynureninase, einem weiteren Enzym des Tryptophan-Stoffwechsels, beobachtet werden. In Monozyten hatte ATG dagegen keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Enzyme.

Weiterhin konnte dargelegt werden, dass ATG die mRNA-Expression des Enzyms 25-Hydroxyvitamin D₃ 1 α -Hydroxylase induziert. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von 25-Hydroxy-Vitamin D₃ zu physiologisch aktivem 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃]. In einem nächsten Schritt konnte nachgewiesen werden, dass ATG zu einer signifikanten Zunahme von 1,25(OH)₂D₃ im Überstand der DCs führt. Von 1,25(OH)₂D₃ ist bekannt, dass es die Reifung und Differenzierung von DCs und somit ihre Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren, inhibiert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass ATG in humanen DCs zu einer signifikant gesteigerten Sekretion von IL-10, ohne gleichzeitige Produktion von IL-12 führt. Diese Kombination ist ein typisches Charakteristikum für tolerogene DCs. In Monozyten hatte ATG keinen Effekt auf die Zytokin-Sekretion. Eine Inkubation der DCs mit allogenen T-Zellen zeigte, dass mit ATG stimulierte DCs nicht in der Lage sind allogene T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Weiterhin lieferte diese Methode deutliche Hinweise darauf, dass die mit ATG stimulierten DCs in der Lage sind, die Proliferation von T-Zellen, welche durch reife DCs induziert wurde, zu inhibieren.

In summa legen die Daten der vorliegenden Arbeit nahe, dass ATG im Gegensatz zu einer polyklonalen IgG-Kontrolle dazu in der Lage ist, einen tolerogenen DC-Phänotyp zu indu-

zieren. Dieser Mechanismus könnte für die unter ATG beschriebene Induktion regulatorischer T-Zellen verantwortlich sein. Neben dem bekannten Effekt der T-Zell-Depletion könnte ATG seine immunsuppressive Wirkung auch durch die oben beschriebenen Mechanismen vermitteln. Ob diese Effekte *in vivo* allerdings tatsächlich von Bedeutung sind, muss erst durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

8 Literaturverzeichnis

1. Welsch, U.; Sobotta, J. (2006): Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen. 2., völlig überarb. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer
2. Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. (2012): Cellular and molecular immunology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders
3. Kantari, C.; Pederzoli-Ribeil, M.; Witko-Sarsat, V. (2008): The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. In: *Contrib Microbiol* 15, S. 118–146
4. Swirski, F. K. (2011): The spatial and developmental relationships in the macrophage family. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31 (7), S. 1517–1522
5. Auffray, C.; Sieweke, M. H.; Geissmann, F. (2009): Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 27, S. 669–692
6. Bode, J. G.; Albrecht, U.; Häussinger, D.; Heinrich, P. C.; Schaper, F. (2012): Hepatic acute phase proteins--regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling. In: *Eur. J. Cell Biol.* 91 (6-7), S. 496–505
7. Siegal, F. P.; Kadowaki, N.; Shodell, M.; Fitzgerald-Bocarsly, P. A.; Shah, K.; Ho, S. et al. (1999): The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. In: *Science* 284 (5421), S. 1835–1837
8. de Waal Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; de Vries, J E (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. In: *J. Exp. Med.* 174 (5), S. 1209–1220
9. Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *J. Exp. Med.* 137 (5), S. 1142–1162
10. Steinman, R. M.; Cohn, Z. A. (1974): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. In: *J. Exp. Med.* 139 (2), S. 380–397
11. Schuler, G.; Romani, N.; Steinman, R. M. (1985): A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. In: *J. Invest. Dermatol.* 85 (1 Suppl), 99s-106s
12. Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (6673), S. 245–252
13. Liu, K.; Nussenzweig, M. C. (2010): Origin and development of dendritic cells. In: *Immunol. Rev.* 234 (1), S. 45–54
14. Collin, M.; McGovern, N.; Haniffa, M. (2013): Human dendritic cell subsets. In: *Immunology* 140 (1), S. 22–30

15. Colonna, M.; Trinchieri, G.; Liu, Y.-J. (2004): Plasmacytoid dendritic cells in immunity. In: *Nat. Immunol.* 5 (12), S. 1219–1226
16. MacDonald, K. P A; Munster, D. J.; Clark, G. J.; Dzionek, A.; Schmitz, J.; Hart, Derek N J (2002): Characterization of human blood dendritic cell subsets. In: *Blood* 100 (13), S. 4512–4520
17. Sallusto, F.; Lanzavecchia, A. (1994): Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. In: *J. Exp. Med.* 179 (4), S. 1109–1118
18. Landsman, L.; Varol, C.; Jung, S. (2007): Distinct differentiation potential of blood monocyte subsets in the lung. In: *J. Immunol.* 178 (4), S. 2000–2007
19. León, B.; Ardavín, C. (2008): Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. In: *Immunol. Cell Biol.* 86 (4), S. 320–324
20. Varol, C.; Landsman, L.; Fogg, D. K.; Greenshtein, L.; Gildor, B.; Margalit, R. et al. (2007): Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 204 (1), S. 171–180
21. Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J. et al. (2000): Immunobiology of dendritic cells. In: *Annu. Rev. Immunol.* 18, S. 767–811
22. Takeuchi, O.; Akira, S. (2010): Pattern recognition receptors and inflammation. In: *Cell* 140 (6), S. 805–820
23. Krishnaswamy, J. K.; Chu, T.; Eisenbarth, S. C. (2013): Beyond pattern recognition: NOD-like receptors in dendritic cells. In: *Trends Immunol.* 34 (5), S. 224–233
24. Hoshino, K.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Sanjo, H.; Ogawa, T.; Takeda, Y. et al. (1999): Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. In: *J. Immunol.* 162 (7), S. 3749–3752
25. Hemmi, H.; Takeuchi, O.; Kawai, T.; Kaisho, T.; Sato, S.; Sanjo, H. et al. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. In: *Nature* 408 (6813), S. 740–745
26. Sallusto, F.; Cella, M.; Danieli, C.; Lanzavecchia, A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. In: *J. Exp. Med.* 182 (2), S. 389–400
27. Fanger, N. A.; Wardwell, K.; Shen, L.; Tedder, T. F.; Guyre, P. M. (1996): Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. In: *J. Immunol.* 157 (2), S. 541–548
28. Albert, M. L.; Pearce, S. F.; Francisco, L. M.; Sauter, B.; Roy, P.; Silverstein, R. L.; Bhardwaj, N. (1998): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. In: *J. Exp. Med.* 188 (7), S.

1359–1368

29. Arnold-Schild, D.; Hanau, D.; Spehner, D.; Schmid, C.; Rammensee, H. G.; de la Salle, H.; Schild, H. (1999): Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. In: *J. Immunol.* 162 (7), S. 3757–3760
30. Dzopalic, T.; Rajkovic, I.; Dragicevic, A.; Colic, M. (2012): The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. In: *Immunol. Res.* 52 (1-2), S. 20–33
31. Figdor, C. G.; van Kooyk, Y.; Adema, G. J. (2002): C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. In: *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2), S. 77–84
32. Rescigno, M.; Granucci, F.; Citterio, S.; Foti, M.; Ricciardi-Castagnoli, P. (1999): Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. In: *Immunol. Today* 20 (5), S. 200–203
33. Hartmann, G.; Weiner, G. J.; Krieg, A. M. (1999): CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (16), S. 9305–9310
34. Cella, M.; Salio, M.; Sakakibara, Y.; Langen, H.; Julkunen, I.; Lanzavecchia, A. (1999): Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. In: *J. Exp. Med.* 189 (5), S. 821–829
35. Caux, C.; Massacrier, C.; Vanbervliet, B.; Dubois, B.; van Kooten, C.; Durand, I.; Banchereau, J. (1994): Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. In: *J. Exp. Med.* 180 (4), S. 1263–1272
36. Garrett, W. S.; Chen, L. M.; Kroschewski, R.; Ebersold, M.; Turley, S.; Trombetta, S. et al. (2000): Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. In: *Cell* 102 (3), S. 325–334
37. Steinman, R. M.; Swanson, J. (1995): The endocytic activity of dendritic cells. In: *J. Exp. Med.* 182 (2), S. 283–288
38. Chow, A.; Toomre, D.; Garrett, W.; Mellman, I. (2002): Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. In: *Nature* 418 (6901), S. 988–994
39. Trombetta, E. S.; Mellman, I. (2005): Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23, S. 975–1028
40. Cravens, P. D.; Lipsky, P. E. (2002): Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune inflammatory diseases. In: *Immunol. Cell Biol.* 80 (5), S. 497–505
41. Sallusto, F.; Schaerli, P.; Loetscher, P.; Schaniel, C.; Lenig, D.; Mackay, C. R. et al. (1998): Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. In: *Eur. J. Immunol.* 28 (9), S. 2760–2769

42. Chan, V. W.; Kothakota, S.; Rohan, M. C.; Panganiban-Lustan, L.; Gardner, J. P.; Wachowicz, M. S. et al. (1999): Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. In: *Blood* 93 (11), S. 3610–3616
43. Leitner, J.; Grabmeier-Pfistershammer, K.; Steinberger, P. (2010): Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes. In: *Immunol. Lett.* 128 (2), S. 89–97
44. Watts, T. H. (2005): TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. In: *Annu. Rev. Immunol.* 23, S. 23–68
45. Li, L.; Boussiotis, V. A. (2006): Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. In: *J. Mol. Med.* 84 (11), S. 887–899
46. Tivol, E. A.; Borriello, F.; Schweitzer, A. N.; Lynch, W. P.; Bluestone, J. A.; Sharpe, A. H. (1995): Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. In: *Immunity* 3 (5), S. 541–547
47. Waterhouse, P.; Penninger, J. M.; Timms, E.; Wakeham, A.; Shahinian, A.; Lee, K. P. et al. (1995): Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*. In: *Science* 270 (5238), S. 985–988
48. Leibson, P. J. (2004): The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. In: *Curr. Opin. Immunol.* 16 (3), S. 328–336
49. Chen, L.; Flies, D. B. (2013): Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (4), S. 227–242
50. Ohnmacht, C.; Pullner, A.; King, Susan B S; Drexler, I.; Meier, S.; Brocker, T.; Voehringer, D. (2009): Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. In: *J. Exp. Med.* 206 (3), S. 549–559
51. Svajger, U.; Rozman, P. (2014): Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation. In: *J. Leukoc. Biol.* 95 (1), S. 53–69
52. Lutz, M. B.; Schuler, G. (2002): Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? In: *Trends Immunol.* 23 (9), S. 445–449
53. Saei, A.; Hadjati, J. (2013): Tolerogenic dendritic cells: key regulators of peripheral tolerance in health and disease. In: *Int. Arch. Allergy Immunol.* 161 (4), S. 293–303
54. Ohl, L.; Mohaupt, M.; Czeloth, N.; Hintzen, G.; Kiafard, Z.; Zwirner, J. et al. (2004): CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. In: *Immunity* 21 (2), S. 279–288
55. de Jong, Esther C; Smits, H. H.; Kapsenberg, M. L. (2005): Dendritic cell-mediated T cell polarization. In: *Springer Semin. Immunopathol.* 26 (3), S. 289–307
56. Moore, K. W.; de Waal Malefyt, R; Coffman, R. L.; O'Garra, A. (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. In: *Annu. Rev. Immunol.* 19, S. 683–765

57. Chen, Z.-m.; O'Shaughnessy, M. J.; Gramaglia, I.; Panoskaltsis-Mortari, A.; Murphy, W. J.; Narula, S. et al. (2003): IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+CD25- T cells to acquire regulatory cell function. In: *Blood* 101 (12), S. 5076–5083
58. Trzonkowski, P.; Szmit, E.; Mysliwska, J.; Dobyszek, A.; Mysliwski, A. (2004): CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 112 (3), S. 258–267
59. Lim, H. W.; Hillsamer, P.; Banham, A. H.; Kim, C. H. (2005): Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (7), S. 4180–4183
60. Däubener, W.; MacKenzie, C. R. (1999): IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. In: *Adv. Exp. Med. Biol.* 467, S. 517–524
61. Fallarino, F.; Grohmann, U.; You, S.; McGrath, B. C.; Cavener, D. R.; Vacca, C. et al. (2006): The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. In: *J. Immunol.* 176 (11), S. 6752–6761
62. Mándi, Y.; Vécsei, L. (2012): The kynurenine system and immunoregulation. In: *J Neural Transm* 119 (2), S. 197–209
63. Ball, H. J.; Sanchez-Perez, A.; Weiser, S.; Austin, Christopher J D; Astelbauer, F.; Miu, J. et al. (2007): Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. In: *Gene* 396 (1), S. 203–213
64. Munn, D. H.; Shafizadeh, E.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Pashine, A.; Mellor, A. L. (1999): Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. In: *J. Exp. Med.* 189 (9), S. 1363–1372
65. Hwu, P.; Du, M. X.; Lapointe, R.; Do, M.; Taylor, M. W.; Young, H. A. (2000): Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. In: *J. Immunol.* 164 (7), S. 3596–3599
66. Lee, G. K.; Park, H. J.; Macleod, M.; Chandler, P.; Munn, D. H.; Mellor, A. L. (2002): Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. In: *Immunology* 107 (4), S. 452–460
67. Fallarino, F.; Grohmann, U.; Vacca, C.; Bianchi, R.; Orabona, C.; Spreca, A. et al. (2002): T cell apoptosis by tryptophan catabolism. In: *Cell Death Differ.* 9 (10), S. 1069–1077
68. Frumento, G.; Rotondo, R.; Tonetti, M.; Damonte, G.; Benatti, U.; Ferrara, G. B. (2002): Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *J. Exp. Med.* 196 (4), S. 459–468
69. Terness, P.; Bauer, T. M.; Röse, L.; Dufter, C.; Watzlik, A.; Simon, H.; Opelz, G. (2002): Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. In: *J. Exp. Med.* 196 (4), S.

447–457

70. Grohmann, U.; Orabona, C.; Fallarino, F.; Vacca, C.; Calcinaro, F.; Falorni, A. et al. (2002): CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. In: *Nat. Immunol.* 3 (11), S. 1097–1101
71. Mellor, A. L.; Munn, D. H. (2004): IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. In: *Nat. Rev. Immunol.* 4 (10), S. 762–774
72. Mezrich, J. D.; Fechner, J. H.; Zhang, X.; Johnson, B. P.; Burlingham, W. J.; Bradfield, C. A. (2010): An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. In: *J. Immunol.* 185 (6), S. 3190–3198
73. Nguyen, N. T.; Kimura, A.; Nakahama, T.; Chinen, I.; Masuda, K.; Nohara, K. et al. (2010): Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107 (46), S. 19961–19966
74. Rassow, J. (2008): Biochemie. 50 Tabellen. 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe)
75. Guo, Y. D.; Strugnell, S.; Back, D. W.; Jones, G. (1993): Transfected human liver cytochrome P-450 hydroxylates vitamin D analogs at different side-chain positions. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (18), S. 8668–8672
76. Shinkyō, R.; Sakaki, T.; Kamakura, M.; Ohta, M.; Inouye, K. (2004): Metabolism of vitamin D by human microsomal CYP2R1. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (1), S. 451–457
77. Kundu, R.; Chain, B. M.; Coussens, A. K.; Khoo, B.; Noursadeghi, M. (2014): Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells. In: *Eur. J. Immunol.*
78. Brennan, A.; Katz, D. R.; Nunn, J. D.; Barker, S.; Hewison, M.; Fraher, L. J.; O’Riordan, J. L. (1987): Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol. In: *Immunology* 61 (4), S. 457–461
79. Griffin, M. D.; Lutz, W. H.; Phan, V. A.; Bachman, L. A.; McKean, D. J.; Kumar, R. (2000): Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 270 (3), S. 701–708
80. Berer, A.; Stöckl, J.; Majdic, O.; Wagner, T.; Kollars, M.; Lechner, K. et al. (2000): 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. In: *Exp. Hematol.* 28 (5), S. 575–583
81. Piemonti, L.; Monti, P.; Sironi, M.; Fraticelli, P.; Leone, B. E.; Dal Cin, E. et al. (2000): Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. In: *J. Immunol.* 164 (9), S. 4443–4451
82. Penna, G.; Adorini, L. (2000): 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. In: *J. Immunol.* 164 (5), S. 2405–2411

83. Harris, S. G.; Padilla, J.; Koumas, L.; Ray, D.; Phipps, R. P. (2002): Prostaglandins as modulators of immunity. In: *Trends Immunol.* 23 (3), S. 144–150
84. Heinrich, P. C.; Löffler, G. (2011): Biochemie und Pathobiochemie. 9., komplett überarb. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch)
85. Agard, M.; Asakrah, S.; Morici, L. A. (2013): PGE(2) suppression of innate immunity during mucosal bacterial infection. In: *Front Cell Infect Microbiol* 3, S. 45
86. Rubio, M. T.; Means, T. K.; Chakraverty, R.; Shaffer, J.; Fudaba, Y.; Chittenden, M. et al. (2005): Maturation of human monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) in the presence of prostaglandin E2 optimizes CD4 and CD8 T cell-mediated responses to protein antigens: role of PGE2 in chemokine and cytokine expression by MoDCs. In: *Int. Immunol.* 17 (12), S. 1561–1572
87. Jonuleit, H.; Kühn, U.; Müller, G.; Steinbrink, K.; Paragnik, L.; Schmitt, E. et al. (1997): Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. In: *Eur. J. Immunol.* 27 (12), S. 3135–3142
88. Harizi, H.; Juzan, M.; Pitard, V.; Moreau, J.-F.; Gualde, N. (2002): Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. In: *J. Immunol.* 168 (5), S. 2255–2263
89. Munn, D. H.; Sharma, M. D.; Lee, J. R.; Jhaver, K. G.; Johnson, T. S.; Keskin, D. B. et al. (2002): Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Science* 297 (5588), S. 1867–1870
90. von Bergwelt-Baildon, Michael S.; Popov, A.; Saric, T.; Chemnitz, J.; Classen, S.; Stoffel, M. S. et al. (2006): CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. In: *Blood* 108 (1), S. 228–237
91. Gottfried, E.; Kreutz, M.; Mackensen, A. (2008): Tumor-induced modulation of dendritic cell function. In: *Cytokine Growth Factor Rev.* 19 (1), S. 65–77
92. Markert, C. L.; Shaklee, J. B.; Whitt, G. S. (1975): Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. In: *Science* 189 (4197), S. 102–114
93. Doherty, J. R.; Cleveland, J. L. (2013): Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. In: *J. Clin. Invest.* 123 (9), S. 3685–3692
94. Gottfried, E.; Kunz-Schughart, L. A.; Ebner, S.; Mueller-Klieser, W.; Hoves, S.; Andreesen, R. et al. (2006): Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. In: *Blood* 107 (5), S. 2013–2021
95. Li, Q.; Guo, Z.; Xu, X.; Xia, S.; Cao, X. (2008): Pulmonary stromal cells induce the generation of regulatory DC attenuating T-cell-mediated lung inflammation. In: *Eur. J. Immunol.* 38 (10), S. 2751–2761

96. Gabrilovich, D. I.; Nagaraj, S. (2009): Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. In: *Nat. Rev. Immunol.* 9 (3), S. 162–174
97. You, Q.; Cheng, L.; Kedl, R. M.; Ju, C. (2008): Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. In: *Hepatology* 48 (3), S. 978–990
98. Natarajan, S.; Thomson, A. W. (2010): Tolerogenic dendritic cells and myeloid-derived suppressor cells: potential for regulation and therapy of liver auto- and alloimmunity. In: *Immunobiology* 215 (9-10), S. 698–703
99. Hackstein, H.; Thomson, A. W. (2004): Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. In: *Nat. Rev. Immunol.* 4 (1), S. 24–34
100. Piemonti, L.; Monti, P.; Allavena, P.; Sironi, M.; Soldini, L.; Leone, B. E. et al. (1999): Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. In: *J. Immunol.* 162 (11), S. 6473–6481
101. Boks, M. A.; Kager-Groenland, J. R.; Haasjes, Michiel S P; Zwaginga, J. J.; van Ham, S Marieke; Brinke, A. ten (2012): IL-10-generated tolerogenic dendritic cells are optimal for functional regulatory T cell induction--a comparative study of human clinical-applicable DC. In: *Clin. Immunol.* 142 (3), S. 332–342
102. Marin-Gallen, S.; Clemente-Casares, X.; Planas, R.; Pujol-Autonell, I.; Carrascal, J.; Carrillo, J. et al. (2010): Dendritic cells pulsed with antigen-specific apoptotic bodies prevent experimental type 1 diabetes. In: *Clin. Exp. Immunol.* 160 (2), S. 207–214
103. Randolph, G. J.; Ochando, J.; Partida-Sánchez, S. (2008): Migration of dendritic cell subsets and their precursors. In: *Annu. Rev. Immunol.* 26, S. 293–316
104. Lutz, M. B. (2012): Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. In: *Front Immunol* 3, S. 123
105. Chu, C.-C.; Di Meglio, P.; Nestle, F. O. (2011): Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. In: *Semin. Immunol.* 23 (1), S. 28–41
106. Link, H.; Kolb, H. J.; Ebell, W.; Hossfeld, D. K.; Zander, A.; Niethammer, D. et al. (1997): Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Teil I: Definitionen, prinzipielle Anwendungsmöglichkeiten, Komplikationen. In: *Med. Klin. (Munich)* 92 (8), 480-91, 505
107. Stenger, E. O.; Turnquist, H. R.; Mapara, M. Y.; Thomson, A. W. (2012): Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. In: *Blood* 119 (22), S. 5088–5103
108. Shlomchik, W. D.; Couzens, M. S.; Tang, C. B.; McNiff, J.; Robert, M. E.; Liu, J. et al. (1999): Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. In: *Science* 285 (5426), S. 412–415
109. Matte, C. C.; Liu, J.; Cormier, J.; Anderson, B. E.; Athanasiadis, I.; Jain, D. et al. (2004): Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. In: *Nat. Med.* 10 (9), S. 987–992

110. Duffner, U. A.; Maeda, Y.; Cooke, K. R.; Reddy, P.; Ordemann, R.; Liu, C. et al. (2004): Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. In: *J. Immunol.* 172 (12), S. 7393–7398
111. Fujita, S.; Sato, Y.; Sato, K.; Eizumi, K.; Fukaya, T.; Kubo, M. et al. (2007): Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. In: *Blood* 110 (10), S. 3793–3803
112. Sato, K.; Eizumi, K.; Fukaya, T.; Fujita, S.; Sato, Y.; Takagi, H. et al. (2009): Naturally occurring regulatory dendritic cells regulate murine cutaneous chronic graft-versus-host disease. In: *Blood* 113 (19), S. 4780–4789
113. Sato, K.; Yamashita, N.; Yamashita, N.; Baba, M.; Matsuyama, T. (2003): Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. In: *Immunity* 18 (3), S. 367–379
114. Eiermann, T. H.; Freitag, S.; Cortes-Dericks, L.; Sahm, H.; Zander, A. R. (2001): Jurkat cell-reactive anti-thymocyte globulin assessed ex vivo by flow cytometry persists three weeks in circulation. In: *Journal of hematology & stem cell research* 10 (3), S. 385–390
115. Bourdage, J. S.; Hamlin, D. M. (1995): Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte/antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. In: *Transplantation* 59 (8), S. 1194–1200
116. Michallet, M.-C.; Preville, X.; Flacher, M.; Fournel, S.; Genestier, L.; Revillard, J.-P. (2003): Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. In: *Transplantation* 75 (5), S. 657–662
117. Rebellato, L. M.; Gross, U.; Verbanac, K. M.; Thomas, J. M. (1994): A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. In: *Transplantation* 57 (5), S. 685–694
118. Leitner, J.; Grabmeier-Pfistershammer, K.; Majdic, O.; Zlabinger, G.; Steinberger, P. (2011): Interaction of antithymocyte globulins with dendritic cell antigens. In: *Am. J. Transplant.* 11 (1), S. 138–145
119. Mohty, M. (2007): Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. In: *Leukemia* 21 (7), S. 1387–1394
120. Mohty, M.; Gaugler, B. (2008): Mechanisms of action of antithymocyte globulin: old dogs with new tricks! In: *Leuk. Lymphoma* 49 (9), S. 1664–1667
121. Theurich, S.; Fischmann, H.; Chakupurakal, G.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Chemnitz, J. M.; Holtick, U. et al. (2013): Anti-thymocyte globulins for post-transplant graft-versus-host disease prophylaxis-A systematic review and meta-analysis. In: *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 88 (1), S. 178–186
122. Theurich, S.; Fischmann, H.; Shimabukuro-Vornhagen, A.; Chemnitz, J. M.; Holtick, U.; Scheid, C. et al. (2012): Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults. In:

Cochrane Database Syst Rev 9, CD009159

123. Kumar, A.; Mhaskar, A. R.; Reljic, T.; Mhaskar, R. S.; Kharfan-Dabaja, M. A.; Anasetti, C. et al. (2012): Antithymocyte globulin for acute-graft-versus-host-disease prophylaxis in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review. In: *Leukemia* 26 (4), S. 582–588
124. Graw, R. G.; Herzig, G. P.; Eisel, R. J.; Perry, S. (1971): Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator. In: *Transfusion* 11 (2), S. 94–101
125. Johnson, W. D.; Mei, B.; Cohn, Z. A. (1977): The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte. In: *J. Exp. Med.* 146 (6), S. 1613–1626
126. Sanderson, R. J.; Shepperdson, R. T.; Vatter, A. E.; Talmage, D. W. (1977): Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes. In: *J. Immunol.* 118 (4), S. 1409–1414
127. Rajewsky, M. F. (1965): In vitro studies of cell proliferation in tumours. II. Characteristics of a standardised in vitro system for the measurement of 3H-thymidine incorporation into tissue explants. In: *Eur J Cancer* 1 (3), S. 281–287
128. Ormerod, M. G. (1997): Analysis of cell proliferation using the bromodeoxyuridine/Hoechst-ethidium bromide method. In: *Methods Mol. Biol.* 75, S. 357–365
129. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.* 193 (1), S. 265–275
130. Rehm, H.; Letzel, T. (2010): *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 6. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (Experimentator)
131. Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685
132. Haan, C.; Behrmann, I. (2007): A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. In: *J. Immunol. Methods* 318 (1-2), S. 11–19
133. Landfried, K.; Zhu, W.; Waldhier, M. C.; Schulz, U.; Ammer, J.; Holler, B. et al. (2011): Tryptophan catabolism is associated with acute GVHD after human allogeneic stem cell transplantation and indicates activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Blood* 118 (26), S. 6971–6974
134. Bubnoff, D. von; Scheler, M.; Wilms, H.; Fimmers, R.; Bieber, T. (2011): Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli. In: *J. Immunol.* 186 (12), S. 6701–6709
135. Jürgens, B.; Hainz, U.; Fuchs, D.; Felzmann, T.; Heitger, A. (2009): Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. In: *Blood* 114 (15), S. 3235–3243

136. Metz, R.; Smith, C.; Duhadaway, J. B.; Chandler, P.; Baban, B.; Merlo, Lauren M F et al. (2014): IDO2 is critical for IDO1-mediated T-cell regulation and exerts a non-redundant function in inflammation. In: *Int. Immunol.*
137. McIlroy, D.; Tanguy-Royer, S.; Le Meur, N.; Guisle, I.; Royer, P.-J.; Léger, J. et al. (2005): Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. In: *J. Leukoc. Biol.* 78 (3), S. 794–803
138. Alberati-Giani, D.; Buchli, R.; Malherbe, P.; Broger, C.; Lang, G.; Köhler, C. et al. (1996): Isolation and expression of a cDNA clone encoding human kynureninase. In: *Eur. J. Biochem.* 239 (2), S. 460–468
139. Soda, K.; Tanizawa, K. (1979): Kynureninases: enzymological properties and regulation mechanism. In: *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 49, S. 1–40
140. Lagishetty, V.; Liu, N. Q.; Hewison, M. (2011): Vitamin D metabolism and innate immunity. In: *Mol. Cell. Endocrinol.* 347 (1-2), S. 97–105
141. Gottfried, E.; Rehli, M.; Hahn, J.; Holler, E.; Andreesen, R.; Kreutz, M. (2006): Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (1), S. 209–213
142. Gillet-Hladky, S.; de Carvalho, Camila Miranda; Bernaud, J.; Bendahou, C.; Bloy, C.; Rigal, D. (2006): Rabbit antithymocyte globulin inhibits monocyte-derived dendritic cells maturation in vitro and polarizes monocyte-derived dendritic cells towards tolerogenic dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Transplantation* 82 (7), S. 965–974
143. Ayuk, F. A.; Fang, L.; Fehse, B.; Zander, A. R.; Kröger, N. (2005): Antithymocyte globulin induces complement-dependent cell lysis and caspase-dependent apoptosis in myeloma cells. In: *Exp. Hematol.* 33 (12), S. 1531–1536
144. Fresenius Biotech GmbH (Hg.) (2011): Fachinformation ATG-Fresenius S 20 mg/ml
145. Hao, N.; Whitelaw, M. L. (2013): The emerging roles of AhR in physiology and immunity. In: *Biochem. Pharmacol.* 86 (5), S. 561–570
146. Vogel, Christoph F A; Goth, S. R.; Dong, B.; Pessah, I. N.; Matsumura, F. (2008): Aryl hydrocarbon receptor signaling mediates expression of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 (3), S. 331–335
147. Simones, T.; Shepherd, D. M. (2011): Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. In: *Toxicol. Sci.* 119 (2), S. 293–307
148. Wang, J.; Simonavicius, N.; Wu, X.; Swaminath, G.; Reagan, J.; Tian, H.; Ling, L. (2006): Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. In: *J. Biol. Chem.* 281 (31), S. 22021–22028
149. Stone, T. W.; Mackay, G. M.; Forrest, C. M.; Clark, C. J.; Darlington, L. G. (2003): Tryptophan metabolites and brain disorders. In: *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (7), S. 852–859

150. Stone, T. W.; Darlington, L. G. (2002): Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. In: *Nat Rev Drug Discov* 1 (8), S. 609–620
151. Laurence, J. M.; Wang, C.; Park, E. T.; Buchanan, A.; Clouston, A.; Allen, Richard D M et al. (2008): Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection. In: *Transplantation* 85 (9), S. 1357–1361
152. Guillonneau, C.; Hill, M.; Hubert, F.-X.; Chiffolleau, E.; Hervé, C.; Li, X.-L. et al. (2007): CD40Ig treatment results in allograft acceptance mediated by CD8CD45RC T cells, IFN-gamma, and indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *J. Clin. Invest.* 117 (4), S. 1096–1106
153. Cook, C. H.; Bickerstaff, A. A.; Wang, J.-J.; Nadasdy, T.; Della Pelle, P.; Colvin, R. B.; Orosz, C. G. (2008): Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO. In: *J. Immunol.* 180 (5), S. 3103–3112
154. Jasperson, L. K.; Bucher, C.; Panoskaltis-Mortari, A.; Taylor, P. A.; Mellor, A. L.; Munn, D. H.; Blazar, B. R. (2008): Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. In: *Blood* 111 (6), S. 3257–3265
155. Jasperson, L. K.; Bucher, C.; Panoskaltis-Mortari, A.; Mellor, A. L.; Munn, D. H.; Blazar, B. R. (2009): Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. In: *Blood* 114 (24), S. 5062–5070
156. Curti, A.; Trabanelli, S.; Salvestrini, V.; Baccarani, M.; Lemoli, R. M. (2009): The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. In: *Blood* 113 (11), S. 2394–2401
157. Fritsche, J.; Mondal, K.; Ehrnsperger, A.; Andreesen, R.; Kreutz, M. (2003): Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells. In: *Blood* 102 (9), S. 3314–3316
158. Hewison, M.; Freeman, L.; Hughes, S. V.; Evans, K. N.; Bland, R.; Eliopoulos, A. G. et al. (2003): Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. In: *J. Immunol.* 170 (11), S. 5382–5390
159. Hewison, M. (2012): Vitamin D and immune function: an overview. In: *Proc Nutr Soc* 71 (1), S. 50–61
160. Correale, J.; Ysraelit, M. C.; Gaitán, M. I. (2011): Vitamin D-mediated immune regulation in multiple sclerosis. In: *J. Neurol. Sci.* 311 (1-2), S. 23–31
161. Farias, A. S.; Spagnol, G. S.; Bordeaux-Rego, P.; Oliveira, Camila O F; Fontana, Ana Gabriela M; de Paula, Rosemeire F O et al. (2013): Vitamin D3 induces IDO+ tolerogenic DCs and enhances Treg, reducing the severity of EAE. In: *CNS Neurosci Ther* 19 (4), S. 269–277
162. Barton, B. E. (2006): STAT3: a potential therapeutic target in dendritic cells for the induction of transplant tolerance. In: *Expert Opin. Ther. Targets* 10 (3), S. 459–470

163. Kreutz, M.; Eissner, G.; Hahn, J.; Andreesen, R.; Drobnik, W.; Holler, E. (2004): Variations in 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 serum levels during allogeneic bone marrow transplantation. In: *Bone Marrow Transplant.* 33 (8), S. 871–873
164. Glotzbecker, B.; Ho, V. T.; Aldridge, J.; Kim, H. T.; Horowitz, G.; Ritz, J. et al. (2013): Low levels of 25-hydroxyvitamin D before allogeneic hematopoietic SCT correlate with the development of chronic GVHD. In: *Bone Marrow Transplant.* 48 (4), S. 593–597
165. Silva, F.; Pérez-Simón, J. A.; Caballero-Velazquez, T.; Sánchez-Guijo, F. M.; Villanueva-Gomez, F.; Vazquez, L. et al. (2011): Effect of vitamin D treatment in chronic GVHD. In: *Bone Marrow Transplant.* 46 (10), S. 1395–1397
166. Zhu, J. G.; Ochalek, J. T.; Kaufmann, M.; Jones, G.; Deluca, H. F. (2013): CYP2R1 is a major, but not exclusive, contributor to 25-hydroxyvitamin D production in vivo. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (39), S. 15650–15655
167. Verrips, A.; Hoefsloot, L. H.; Steenbergen, G. C.; Theelen, J. P.; Wevers, R. A.; Gabreëls, F. J. et al. (2000): Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. In: *Brain* 123 (Pt 5), S. 908–919
168. Björkhem, I.; Leitersdorf, E. (2000): Sterol 27-hydroxylase deficiency: a rare cause of xanthomas in normocholesterolemic humans. In: *Trends Endocrinol. Metab.* 11 (5), S. 180–183
169. Sakaki, T.; Kagawa, N.; Yamamoto, K.; Inouye, K. (2005): Metabolism of vitamin D3 by cytochromes P450. In: *Front. Biosci.* 10, S. 119–134
170. Holick, M. F. (2007): Vitamin D deficiency. In: *N. Engl. J. Med.* 357 (3), S. 266–281
171. Heaney, R. P. (2012): Vitamin D--baseline status and effective dose. In: *N. Engl. J. Med.* 367 (1), S. 77–78
172. Powe, C. E.; Evans, M. K.; Wenger, J.; Zonderman, A. B.; Berg, A. H.; Nalls, M. et al. (2013): Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. In: *N. Engl. J. Med.* 369 (21), S. 1991–2000
173. Rieser, C.; Böck, G.; Klocker, H.; Bartsch, G.; Thurnher, M. (1997): Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. In: *J. Exp. Med.* 186 (9), S. 1603–1608
174. Harizi, H.; Juzan, M.; Grosset, C.; Rashedi, M.; Gualde, N. (2001): Dendritic cells issued in vitro from bone marrow produce PGE(2) that contributes to the immunomodulation induced by antigen-presenting cells. In: *Cell. Immunol.* 209 (1), S. 19–28
175. Monti, P.; Allavena, P.; Di Carlo, V.; Piemonti, L. (2003): Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. In: *Int. Immunopharmacol.* 3 (2), S. 189–196
176. Grohmann, U.; Fallarino, F.; Puccetti, P. (2003): Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. In: *Trends Immunol.* 24 (5), S. 242–248

177. González, A.; Varo, N.; Alegre, E.; Díaz, A.; Melero, I. (2008): Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiologic approach. In: *Adv Clin Chem* 45, S. 155–197
178. Menges, M.; Rössner, S.; Voigtländer, C.; Schindler, H.; Kukutsch, N. A.; Bogdan, C. et al. (2002): Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. In: *J. Exp. Med.* 195 (1), S. 15–21
179. Schroten, H.; Spors, B.; Hucke, C.; Stins, M.; Kim, K. S.; Adam, R.; Däubener, W. (2001): Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. In: *Neuropediatrics* 32 (4), S. 206–210
180. Pantoja, L. G.; Miller, R. D.; Ramirez, J. A.; Molestina, R. E.; Summersgill, J. T. (2000): Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. In: *Infect. Immun.* 68 (11), S. 6478–6481
181. Beutelspacher, S. C.; Tan, P. H.; McClure, M. O.; Larkin, D F P; Lechler, R. I.; George, A J T (2006): Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses. In: *Am. J. Transplant.* 6 (6), S. 1320–1330
182. Knox, W. E.; Mehler, A. H. (1950): The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. I. The coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. In: *J. Biol. Chem.* 187 (1), S. 419–430
183. Fang, L.; Fehse, B.; Engel, M.; Zander, A.; Kröger, N. (2005): Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. In: *Transplantation* 79 (3), S. 369–371
184. Simpson, D. (2003): T-cell depleting antibodies: new hope for induction of allograft tolerance in bone marrow transplantation? In: *BioDrugs* 17 (3), S. 147–154
185. Shimony, O.; Nagler, A.; Gellman, Y. N.; Refaeli, E.; Rosenblum, N.; Eshkar-Sebban, L. et al. (2012): Anti-T lymphocyte globulin (ATG) induces generation of regulatory T cells, at least part of them express activated CD44. In: *Journal of clinical immunology* 32 (1), S. 173–188
186. Xia, C. Q.; Chernatynskaya, A. V.; Wasserfall, C. H.; Wan, S.; Looney, B. M.; Eisenbeis, S. et al. (2012): Anti-thymocyte globulin (ATG) differentially depletes naive and memory T cells and permits memory-type regulatory T cells in nonobese diabetic mice. In: *BMC immunology* 13, S. 70

9 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-Dihydroxy-Vitamin D ₃
25(OH)D ₃	25-Hydroxy-Vitamin D ₃
³ H	Tritium
AB-Serum	Serum von Spendern mit der Blutgruppe AB
AF488	Alexa Fluor 488, Farbstoff
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Allophycocyanin, Farbstoff
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Antithymozytenglobulin
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCL	CC-Typ-Ligand, Chemokin
CCR	CC-Typ-Rezeptor, Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
cDNA	Komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
CLIA	Chemilumineszenz-Immunassay
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptoren
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
Cpm	Impulse pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte antigen 4</i>
ct-Wert	<i>Cycle threshold</i> -Wert
CXCR	CXC-Typ-Rezeptor, Chemokinrezeptor
CYP27A1	Gen für Vitamin-D ₃ -25-Hydroxylase (Cytochrom P450 Familie 27, Subfamilie A, Polypeptid 1)
CYP27B1	Gen für 25-Hydroxyvitamin D ₃ 1 α -Hydroxylase (Cytochrom P450 Familie 27, Subfamilie B, Polypeptid 1)
CYP2R1	Gen für Vitamin-D ₃ -25-Hydroxylase (Cytochrom P450 Familie 2, Subfamilie R, Polypeptid 1)

Abkürzung	Bedeutung
DAMP	Beschädigungs-assoziiertes molekulares Muster (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ECL	Verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Form der Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
Fc	<i>Fragment crystallisable</i>
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FOXP3	Forkhead box protein 3
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	Transplantat-Wirt-Reaktion (<i>graft-versus-host disease</i>)
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	Zweifach destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HSP	Hitze-Schock-Protein (<i>heat shock protein</i>)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
ml	Milliliter
M-MLV	Muriner Leukämie-Virus, Stamm Moloney

Abkürzung	Bedeutung
mRNA	Messenger RNA
n.s.	Nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pDC	Plasmazytoide DC
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pattern recognition receptor</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radio-Immunpräzipitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RPMI	Entwicklungsort des Mediums (<i>Roswell Park Memorial Institut</i>)
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
s.u.	Siehe unten
SCT	Stammzelltransplantation (<i>stem cell transplantation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SG	DNA-Farbstoff, <i>SYBR Green</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor β</i>)
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-ähnlicher/like Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{Reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Abkürzung	Bedeutung
u.a.	Und andere
UK	Vereinigtes Königreich (<i>United Kingdom</i>)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (<i>United States of America</i>)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Versch.	Verschiedene
w/o	Ohne (<i>without</i>)
z.B.	Zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der DC-Reifung und ihre funktionellen Veränderungen.....	6
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der T-Zell-Polarisation durch tolerogene DCs.....	9
Abbildung 4-1: Vergleich von [³ H]-Thymidin-Markierung (A) mit BrdU-Assay (B)	26
Abbildung 4-2: Schematische Darstellung des Blot-Aufbaus	32
Abbildung 4-3: PCR-Programm am Realplex Mastercycler EpGradient S.....	36
Abbildung 5-1: <i>IDO1</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs.....	40
Abbildung 5-2: <i>IDO2</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs.....	41
Abbildung 5-3: <i>IDO1</i> -mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten.....	42
Abbildung 5-4: <i>IDO2</i> -mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten.....	43
Abbildung 5-5: <i>KYNU</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs	44
Abbildung 5-6: <i>AHR</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs	45
Abbildung 5-7: Qualitativer Vergleich der beiden Anti-IDO-Antikörper im Western Blot.....	46
Abbildung 5-8: Histogramme der IDO- und CD86-Expression in der Durchflusszytometrie	47
Abbildung 5-9: IDO- (A) und CD86-Expression (B) in der Durchflusszytometrie nach 48 h.....	48
Abbildung 5-10: IDO-Expression nach 24 bzw. 48 h Stimulation in Monozyten.....	49
Abbildung 5-11: <i>CYP27B1</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs	50
Abbildung 5-12: <i>CYP27B1</i> -mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in Monozyten.....	51
Abbildung 5-13: <i>CYP27A1</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A) bzw. 24 h (B) Stimulation in DCs.....	52
Abbildung 5-14: <i>VDR</i> -mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs.....	53
Abbildung 5-15: 1,25(OH) ₂ D ₃ im Zellkulturüberstand von DCs nach 24 h Stimulation.....	53
Abbildung 5-16: <i>COX1</i> -mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs.....	54
Abbildung 5-17: <i>COX2</i> -mRNA-Expression nach 4 h (A, C) bzw. 24 h (B, D) Stimulation in DCs.....	55
Abbildung 5-18: <i>LDHA</i> (A, B) und <i>LDHB</i> (C, D) mRNA-Expression nach 24 h Stimulation in DCs	56
Abbildung 5-19: Laktat im Zellkulturüberstand von DCs nach 24 h Stimulation.....	57
Abbildung 5-20: TNF-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation	58
Abbildung 5-21: IL-6-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation	59
Abbildung 5-22: IL-12-Sekretion in DCs nach 24 h Stimulation.....	60
Abbildung 5-23: IL-10-Sekretion in Monozyten (A, C) und DCs (B, D) nach 24 h Stimulation	61
Abbildung 5-24: MLR mit verschiedenen DC-Populationen	62
Abbildung 5-25: T-Zell-Supprimierung durch ATG-DCs.....	63
Abbildung 6-1: Effekte von ATG auf DCs und deren mögliche parakrine Einflüsse auf weitere DCs	70

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4-1: Ladepuffer (2-fach konzentriert)	29
Tabelle 4-2: Stammlösungen für...	30
Tabelle 4-3: Gellösungen für...	30
Tabelle 4-4: Laufpuffer (5-fach konzentriert)	31
Tabelle 4-5: Anodenpuffer A	31
Tabelle 4-6: Anodenpuffer B.....	31
Tabelle 4-7: Kathodenpuffer C.....	31
Tabelle 4-8: TBS-Puffer (10-fach konzentriert)	32
Tabelle 4-9: Waschpuffer	32
Tabelle 4-10: Entwicklerlösung (ECL-Mix)	33
Tabelle 4-11: Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes	34
Tabelle 4-12: Zusammensetzung des RT-qPCR-Ansatzes	35

12 Anhang

12.1 Danksagung

Mein Dank geht im Besonderen an **Prof. Dr. Marina Kreutz**, die mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit unter ihrer ausgezeichneten Betreuung durchzuführen. Sie unterstützte mich stets mit konstruktiven Ratschlägen und vielen Ideen zu weiteren Experimenten, welche die Zeit im Labor nie langweilig werden ließen.

In gleicher Weise möchte ich **Dr. Katrin Peter** danken, weil sie mir den Zugang zur Denkweise wissenschaftlicher und experimenteller Arbeit vermittelte. Vielen Dank für die hervorragende und engagierte Betreuung, die permanente Verfügbarkeit bei Problemen, sowie für die konstruktive Kritik.

Prof. Dr. Wolfgang Herr danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit und des Promotionsstipendiums in seiner Abteilung.

Außerdem geht mein Dank an **Alice Peuker**, die mir besonders am Anfang meiner Labortätigkeit unterstützend zur Seite stand und beim Erlernen der Methoden viel Geduld zeigte. Ich bedanke mich beim ganzen Laborteam für die tolle Atmosphäre und die Hilfe bei kleineren und größeren Schwierigkeiten.

Ich danke **meinen Eltern** von Herzen dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mich in jeder Hinsicht unterstützen. Ich danke **meiner Schwester** für ihre Korrektur, aber auch dafür, dass sie mir in den schwierigen Phasen des Studiums immer zur Seite stand.

Ann-Sophie, Vielen Dank für deine Geduld, deine Unterstützung, deine Aufmunterung, Danke für Alles.

12.2 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

Datum, Ort

.....

Unterschrift