

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

INDUKTION VON INDOLAMIN-2,3-DIOXYGENASE IN HUMANEN  
DENDRITISCHEN ZELLEN DURCH T-ZELL-ANTIKÖRPER

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Katzfuß

2015



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

INDUKTION VON INDOLAMIN-2,3-DIOXYGENASE IN HUMANEN  
DENDRITISCHEN ZELLEN DURCH T-ZELL-ANTIKÖRPER

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Michael Katzfuß

2015

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

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst Holler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlhans

Tag der mündlichen Prüfung: 21. September 2015



## **Inhaltsverzeichnis**

---

1.	Einleitung.....	4
1.1.	Hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	4
1.2.	Graft-versus-Host Disease .....	9
1.3.	Antithymozytenglobulin (ATG) .....	14
1.4.	Der CD52-Antikörper Alemtuzumab .....	16
1.5.	Dendritische Zellen.....	20
1.6.	Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) und der Tryptophan-Stoffwechsel ....	23
1.7.	Zielsetzung der Arbeit .....	29
2.	Material und Methoden .....	30
2.1.	Kultivierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten .....	30
2.1.1.	Erste Versuchsreihe .....	30
2.1.2.	Zweite Versuchsreihe.....	31
2.2.	Quantifizierung von mRNA der Gene IDO-1 und IDO-2 mittels Polymerase- Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.3.	Nachweis von IDO mittels Western Blot .....	34
2.4.	Messung von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten mittels Flüssigkeits- chromatographie-Tandem-Massenspektrometrie .....	37
2.5.	Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie.....	38
2.5.	Statistik.....	39
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Zellkulturen .....	40
3.1.1.	Morphologische Auffälligkeiten von kultivierten dendritischen Zellen bei Zugabe verschiedener Stimuli.....	40
3.1.2.	Zellausbeute .....	43

3.2.	Induktion der Transkription von IDO-1 und IDO-2 .....	44
3.2.1.	IDO-mRNA in Abhängigkeit von der gegebenen ATG-Dosis .....	44
3.2.2.	IDO-mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze .....	44
3.3.	Induktion von IDO auf Proteinebene.....	46
3.3.1.	Nachweis von IDO in Abhängigkeit vom gegebenen Stimulus.....	46
3.3.2.	Nachweis von IDO in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ATG-Gabe .....	46
3.4.	Veränderung der Konzentrationen von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten.....	47
3.4.1.	Effekte auf ausdifferenzierte dendritische Zellen .....	47
3.4.2.	Effekte auf Monozyten während ihrer Differenzierung zu dendritischen Zellen .....	50
3.5.	Expression von Oberflächenantigenen .....	53
4.	Diskussion .....	56
4.1.	Die Morphologie, das Adhäsionsverhalten und das Überleben der kultivierten Zellen.....	56
4.2.	Durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellen .....	57
4.3.	Der IDO-induzierende Effekt von ATG .....	60
4.4.	Die mögliche Bedeutung der IDO-Induktion für die Wirkung von ATG .....	63
5.	Zusammenfassung .....	65
6.	Anhang.....	67
6.1.	Literaturverzeichnis .....	67
6.2.	Abbildungsverzeichnis .....	83
6.3.	Tabellenverzeichnis .....	84
6.4.	Abkürzungsverzeichnis .....	85
6.5.	Danksagung .....	89
6.6.	Erklärung .....	90

## 1. Einleitung

---

### 1.1. Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen wurde zu Beginn des Atomzeitalters erdacht zur Behandlung der Strahlenkrankheit (Lorenz E. 1952). E. Donnall Thomas setzte sie erstmals in der Leukämie-Behandlung ein (Thomas et al. 1975a; Thomas et al. 1975b) und bekam für seine Arbeit auf diesem Gebiet später den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen. Heute ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) eine etablierte Therapieform für zahlreiche maligne und einige nicht-maligne Erkrankungen. Die wichtigsten Indikationen der HSZT sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die einfachste Variante der HSZT ist die autologe HSZT. Dabei sind der Spender und der Empfänger der transplantierten Stammzellen dieselbe Person. Im Gegensatz dazu stammt bei der allogenen HSZT das Transplantat von einem Fremdspender. Die syngene HSZT bezeichnet den Sonderfall, dass Spender und Empfänger eineiige Zwillinge, also genetisch identisch sind (Armitage 1994).

Das Prinzip der autologen HSZT besteht darin, vom Patienten hämatopoetische Stammzellen zu gewinnen, ihn einer Hochdosischemotherapie zu unterziehen und ihm anschließend die konservierten eigenen Stammzellen zurückzueinfundieren. Dieses Vorgehen erlaubt eine Dosisescalation von Chemotherapeutika jenseits der normalerweise tolerierten Maximaldosis, indem die dosislimitierende Knochenmarkstoxizität umgangen wird, die ansonsten eine hämatopoetische Erholung verhindern würde (Mason & Ho 1997).

Allerdings vermögen es auch intensive Therapieregime im Allgemeinen nicht, Tumoren bis auf die letzte Zelle zu zerstören. Außerdem besteht die Gefahr der Kontamination des Autotransplantats mit Tumorzellen. Es resultiert daher beim Patienten ein Zustand von minimaler Restkrankheit (Minimal Residual Disease); die maligne Erkrankung wird gewissermaßen chronifiziert. Tumorrezidive zum Teil auch lange Zeit nach autologer HSZT stellen ein erhebliches Problem dar (Vaughan et al. 2009).

Die allogene HSZT bietet demgegenüber die Vorteile, dass das Stammzelltransplantat frei von malignen Zellen ist, vor allem aber Lymphozyten enthält, die in der Lage sind, eine Immunreaktion gegen verbliebene maligne Zellen des Empfängers zu vermitteln. Diese Immunantwort wird Graft-versus-Leukemia- oder Graft-versus-Tumor-Effekt genannt. Sie hat das Potenzial, die Erkrankung zu heilen im Sinne einer dauerhaften Remission (Weiden et al. 1981).

**Tabelle 1: Mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation behandelte Krankheiten (nach Copelan et al., 2006)**

<b>Autologe HSZT</b>	
Maligne Erkrankungen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Multiples Myelom</li> <li>Non-Hodgkin-Lymphome</li> <li>Morbus Hodgkin</li> <li>Akute myeloische Leukämie</li> <li>Neuroblastom</li> <li>Ovariakarzinom</li> <li>Keimzelltumoren</li> </ul>
Andere Erkrankungen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Autoimmunerkrankungen</li> <li>Amyloidose</li> </ul>
<b>Allogene HSZT</b>	
Maligne Erkrankungen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Akute myeloische Leukämie</li> <li>Akute lymphatische Leukämie</li> <li>Chronische myeloische Leukämie</li> <li>Myelodysplastische Syndrome</li> <li>Myeloproliferative Erkrankungen</li> <li>Non-Hodgkin-Lymphome</li> <li>Morbus Hodgkin</li> <li>Chronische lymphatische Leukämie</li> <li>Multiples Myelom</li> </ul>
Andere Erkrankungen:	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aplastische Anämie</li> <li>Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie</li> <li>Fanconi-Anämie</li> <li>Blackfan-Diamond-Anämie</li> <li>Thalassaemia major</li> <li>Sichelzellanämie</li> <li>Schwerer kombinierter Immundefekt</li> <li>Wiskott-Aldrich-Syndrom</li> <li>Angeborene Stoffwechseldefekte</li> </ul>

Die Spender-Immunkzellen richten sich jedoch nicht nur gegen Tumorzellen, sondern auch gegen normales Gewebe. Die Zerstörung dieses Gewebes wird klinisch als Graft-versus-Host Disease (GVHD) beschrieben. Auf sie wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

Bei der allogenen HSZT gilt es zunächst, einen geeigneten Spender auszuwählen. Erste Wahl sind dabei Geschwister mit identischem Haupt-Histokompatibilitätskomplex-(MHC-)Genotyp.

MHC-Proteine, beim Menschen auch Human Leukocyte Antigens (HLA) genannt, sind Glykoproteine der Zelloberfläche, die eine entscheidende Rolle für die Antigenpräsentation spielen. Je unterschiedlicher die HLA-Genotypen von Spender und Empfänger, desto größer ist die Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation. Da die Gene für HLA eng benachbart auf Chromosom 6 liegen und als Haplotypen vererbt werden, haben zwei Geschwister etwa eine Chance von 25 Prozent, HLA-identisch zu sein (Copelan 2006).

Ist kein HLA-identisches Geschwisterkind vorhanden, muss auf einen unverwandten Spender zurückgegriffen werden. Es bestehen umfangreiche Fremdspenderdatenbanken, in denen potenzielle HLA-typisierte Spender oder auch HLA-typisiertes, eingefrorenes Nabelschnurblut verzeichnet sind (Hurley et al. 2007). Wird auch auf diesem Weg kein passender Spender gefunden, besteht noch die Möglichkeit der haploidentischen Spende, das heißt die Spende von einem erstgradigen Verwandten, der nur einen identischen HLA-Haplotyp aufweist (Aversa et al. 1998).

Neben den Major Histocompatibility Antigenen spielen auch andere Antigene, die außerhalb des MHC-Lokus kodiert sind, eine Rolle für die Verträglichkeit von transplantiertem Gewebe. Dies ist unter anderem daran erkennbar, dass das Risiko für GVHD größer ist bei HLA-identischen unverwandten Spendern als bei ebenfalls HLA-identischen verwandten Spendern (Welniak et al. 2007). Außerdem sind sogenannte Minor Histocompatibility Antigene, die auf Genen des Y-Chromosoms kodiert werden, verantwortlich für die höhere Inzidenz an GVHD und die niedrigere Rückfallrate der zugrundeliegenden Erkrankung bei männlichen Empfängern von Transplantaten, die von weiblichen Spendern stammen (Randolph et al. 2004).

Es gibt unterschiedliche Arten der Gewinnung der zur Transplantation benötigten hämatopoetischen Stammzellen. Knochenmark, gewonnen durch wiederholte Aspiration des posterioren Beckenkamms bei einem narkotisierten Spender, stellte lange Zeit die übliche Quelle hämatopoetischer Stammzellen dar (Copelan 2006). Aus dieser Zeit stammt der Begriff „Knochenmarktransplantation“, der auch noch häufig für die Transplantation von auf andere Weise gewonnenen hämatopoetischen Stammzellen gebraucht wird.

Inzwischen wurde das Knochenmark als am häufigsten herangezogene Quelle für hämatopoetische Stammzellen abgelöst durch peripheres Blut. Durch Gabe von G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) werden Stammzellen aus dem Markstroma mobilisiert, woraufhin mittels Leukapherese eine ausreichende Zahl Stammzellen gewonnen werden kann. Diese Stammzellen werden durch das Oberflächenantigen CD34 (Cluster of Differentiation 34) cha-

rakterisiert (Nowrouzian et al. 2003). Zur kurzen Erläuterung: Leukozyten werden unterschieden durch Membranmoleküle, die sie exprimieren und über die sie mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden können. Diesen Membranmolekülen werden Nummern der CD-Nomenklatur zugeordnet (Cambrosio & Keating 1992).

Periphere Blutstammzellen haben im Vergleich zu Knochenmark den Vorteil, dass sie, neben der weniger invasiven Art der Gewinnung, zu einer schnelleren hämatopoetischen Rekonstitution beim Empfänger führen. Sie enthalten indes mehr T-Zellen und haben eine höhere Inzidenz akuter und chronischer GVHD als transplantiertes Knochenmark zur Folge (Cutler et al. 2001).

Als dritte mögliche Quelle für hämatopoetische Stammzellen dient das bereits erwähnte Nabelschnurblut. Dieses wird unmittelbar nach der Geburt abgesaugt und eingefroren. Es ist reich an hämatopoetischen Stammzellen und erfordert eine weniger strenge HLA-Übereinstimmung, weil die darin enthaltenen T-Zellen größtenteils naiv sind, also noch nicht durch Antigene aktiviert worden sind. Nachteile sind zum einen die relativ langsame hämatologische und immunologische Erholung des Empfängers von Nabelschnurblutstammzellen, zum anderen die begrenzte Menge. Das letztgenannte Problem kann jedoch umgangen werden, indem einem erwachsenen Patienten zwei derartige Transplantate verabreicht werden (Ringden & Le Blanc 2005).

Die Therapie, die den Patienten auf die eigentliche HSZT vorbereitet, wird als Konditionierung bezeichnet. Ihre Ziele sind die Eliminierung maligner Zellen und bei allogener HSZT zusätzlich die Unterdrückung des Immunsystems des Empfängers, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern (Welniak et al. 2007).

Die klassische Konditionierung ist myeloablativ, das heißt sie bewirkt eine Schädigung des Knochenmarks in einem solchen Ausmaß, dass eine eigenständige Erholung der Hämatopoese nicht mehr möglich ist. Die myeloablativ Konditionierung beinhaltet meistens eine Kombination von Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie. Ihre hohe Toxizität beschränkt ihre Anwendung weitgehend auf relativ junge Patienten mit guter Belastbarkeit (Armitage 1994).

Die Beobachtung, dass ein immunvermittelter Graft-versus-Tumor-Effekt einen großen Anteil am Erfolg der allogenen HSZT hat, führte zu der Hypothese, dass auf eine myeloablativ Konditionierung zum Zweck der Tumoreradikation verzichtet werden könne. Darauf aufbauend entwickelte man nicht-myeloablativ Konditionierungsregime. Diese sind in erster Linie immunsuppressiv, um ein Engraftment, also ein Anwachsen der transplantierten Stammzellen im Knochenmark des Empfängers, zu ermöglichen. Sie sind aufgrund ihrer geringeren Toxizität auch für ältere und schwächere Patienten geeignet. Um trotzdem auch eine ausreichende Wir-

kung gegen die Grunderkrankung zu erreichen, werden heute als Mittelweg vor allem Konditionierungsregime von reduzierter Intensität eingesetzt (Pollack et al. 2009).

Dem großen Potenzial insbesondere der allogenen HSZT, anderweitig nicht kurativ behandelbare Erkrankungen von Blutzellen zu heilen, stehen die teils erheblichen Komplikationen entgegen, die sie mit sich bringt. Als Erstes ist hier das Transplantatversagen zu nennen. Das Scheitern des Engraftments oder die Abstoßung des Transplantats nach erfolgtem Engraftment kann in einer Reaktion von verbliebenen immunkompetenten Zellen des Empfängers gegen die Spender-Stammzellen begründet sein, die auch als Host-versus-Graft-Reaktion bezeichnet wird (Giralt & Bishop 2009).

Die akute GVHD, sozusagen das Gegenteil der Host-versus-Graft-Reaktion und die wichtigste Komplikation der allogenen HSZT, wird erst im folgenden Kapitel näher erläutert.

Von großer Bedeutung ist ferner die Infektionsanfälligkeit der Patienten im Rahmen der HSZT. Der Vorgang der Immunrestitution in der Phase zwischen der Ausschaltung des alten Immunsystems und der vollen Funktionsfähigkeit des neuen, transplantierten Immunsystems dauert mindestens ein Jahr. In dieser Zeit sind sowohl das zelluläre als auch das humorale Immunsystem beeinträchtigt (Lum 1987). Gewebeschädigung durch die Konditionierungstherapie sowie Katheter, die im Rahmen der Behandlung gelegt werden, prädisponieren die Patienten zusätzlich für opportunistische Infektionen (Copelan 2006). Bei allogener HSZT sind Infektionen häufiger als bei autologer HSZT, weil auch nach erfolgter Transplantation Immunsuppressiva verabreicht werden. Es werden zahlreiche Präventionsmaßnahmen ergriffen, um Infektionen zu vermeiden, darunter umfassende Hygienemaßnahmen sowie prophylaktische virustatische und antimykotische Therapie. Aspergillose ist die Hauptursache von infektionsbedingten Todesfällen nach allogener HSZT (Sullivan et al. 2001).

Weitere häufige Frühkomplikationen der HSZT sind Mukositis (vor allem oropharyngeal und intestinal), venookklusive Lebererkrankung (auch bekannt als sinusoidales Obstruktionssyndrom) sowie Schädigungen der Lunge (Copelan 2006).

Auch langfristig treten nach HSZT ernste Komplikationen auf. Was die chronische GVHD betrifft, sei wieder auf das nächste Kapitel verwiesen. Daneben ist Hypogonadismus eine sehr häufige Folgeerscheinung. Nach Transplantation kommt es bei den meisten Frauen zu persistierender Anovulation, und auch Männer werden für gewöhnlich infertil. Patienten, die ihre Familienplanung noch nicht abgeschlossen haben, sollten daher vor Therapiebeginn eine Kryokonservierung von Eizellen bzw. Spermien erwägen (Somali et al. 2005).

Sekundärmalignome stellen ein weiteres Problem dar. Ursachen für Sekundärmalignome sind die mutagene Wirkung der konditionierenden Therapie sowie die über einen längeren Zeitraum stark eingeschränkte Immunfunktion und der damit einhergehende Ausfall der immunzellvermittelten Elimination entarteter Zellen. Überlebende der HSZT sollten Karzinogene, insbesondere Tabakrauch, vermeiden und Nachsorgeuntersuchungen zur Krebsfrüherkennung in Anspruch nehmen (Copelan 2006).

## **1.2. Graft-versus-Host Disease**

Die allogene HSZT hat eine große Bedeutung erlangt für die kurative Therapie von hämatologischen Malignomen und Erbkrankheiten der Blutzellen. Der Erfolg dieses wichtigen Verfahrens wird jedoch beschränkt durch das – häufig tödlich endende – Auftreten von GVHD (Pasquini et al. 2010).

Bereits vor etwa fünfzig Jahren wurde die GVHD beschrieben als ein Syndrom, in dem immunkompetente Spenderzellen allogenes Gewebe von immunkompromittierten Empfängern erkennen und angreifen (Billingham 1966-1967). Denn die in allogenen Transplantaten enthaltenen T-Zellen richten sich nicht nur gegen Pathogene und Tumorzellen, sondern auch gegen normales Empfängergewebe, welches sie als „nicht-selbst“ erkennen (Shlomchik 2007).

GVHD kann also immer dann auftreten, wenn T-Zellen von einer Person auf eine andere Person übertragen werden, die diese T-Zellen nicht eliminieren kann. Dies kann der Fall sein bei Bluttransfusionen und bei der Transplantation von soliden Organen, vor allem aber bei allogener HSZT, wo sowohl die Menge der übertragenen T-Zellen erheblich ist als auch das Immunsystem des Empfängers besonders beeinträchtigt ist (Ferrara & Deeg 1991).

Das Risiko für GVHD und ihr Schweregrad hängen von verschiedenen Faktoren ab, darunter das Alter des Transplantatempfängers, die Toxizität der vorausgegangenen Konditionierungstherapie, der Art der Stammzellgewinnung sowie die durchgeführte Prophylaxe (Blazar et al. 2012). Am wichtigsten sind aber die Unterschiede von genetisch determinierten Merkmalen zwischen Spender und Empfänger, nämlich den HLA und den Minor Histocompatibility Antigenen. Auch bei HLA-Übereinstimmung tritt bei 40 Prozent der Patienten nach Transplantation eine behandlungsbedürftige akute GVHD auf, wofür Unterschiede in Minor Histocompatibility

Antigens verantwortlich sind. Dadurch, dass Transplantationen von unverwandten Spendern häufiger werden, steigt auch die Zahl der Patienten mit GVHD (Ferrara et al. 2009).

Man unterscheidet die akute GVHD von der chronischen GVHD. Per definitionem tritt die akute GVHD in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auf, die chronische GVHD danach. Allerdings ist diese Abgrenzung nicht immer sinnvoll, weil sich akute und chronische GVHD auch unabhängig vom Zeitpunkt ihres Auftretens als charakteristische Krankheitsentitäten präsentieren. Inzwischen wurden spät auftretende (late-onset) akute GVHD sowie ein Overlap-Syndrom, das Kennzeichen akuter und chronischer GVHD aufweist, benannt (Filipovich et al. 2005). Late-onset akute GVHD und das Overlap-Syndrom treten verstärkt nach einer Konditionierung von reduzierter Intensität auf, die zunehmend Verwendung findet (Ferrara et al. 2009).

Akute GVHD manifestiert sich überwiegend als Entzündung in den Organen Haut, Darm und Leber (Martin et al. 1990). Die Symptome der akuten GVHD sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die klinische Erscheinung der chronischen GVHD ist vielgestaltig und ähnelt Autoimmunerkrankungen (ebenfalls Tabelle 2). Chronische GVHD folgt häufig der akuten GVHD, kann aber in selteneren Fällen auch auftreten, ohne dass vorher die akute Form bestand. Abgesehen von Rezidiven der Grundkrankheit stellt sie die Hauptursache für einen späten Tod nach allogener HSZT dar (Lee et al. 2002b).

**Tabelle 2: Symptome der GVHD (nach Ferrara et al., 2009)**

<b>Symptome der akuten GVHD</b>	
Haut:	Makulopapulärer Ausschlag
Oberer GI-Trakt:	Nausea Anorexie
Unterer GI-Trakt:	Wässrige Diarrhoe Schwere Bauchschmerzen Blutige Diarrhoe oder Ileus
Leber:	Cholestatische Hyperbilirubinämie
<b>Symptome der chronischen GVHD</b>	
Haut:	Dyspigmentation Alopezie Poikiloderma Lichen-planus-ähnliche Eruptionen Sklerotische Merkmale Nageldystrophie oder -verlust
Mund:	Xerostomie Ulzerationen Lichen-ähnliche Merkmale Mikrostomie
Augen:	Xerophthalmie

	Narbige Konjunktivitis
Bewegungsapparat:	Fasziitis Myositis Gelenksteifheit durch Kontrakturen
Weibliches Genitale:	Vaginalklerose Ulzerationen
GI-Trakt:	Anorexie Ösophagusstrikturen
Leber:	Ikterus Transaminasenerhöhung
Lunge:	Restriktive o. obstruktive Funktionsstörungen Bronchiolitis obliterans Pleuraerguss
Herz:	Perikarditis
Knochenmark:	Thrombozytopenie Anämie Neutropenie

Die Pathogenese der akuten GVHD lässt sich in drei Schritte untergliedern. Zunächst kommt es aufgrund einer Gewebeschädigung im Empfängerkörper, verursacht durch die zugrundeliegende Erkrankung und die Konditionierung, zur Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Die Bedeutung der Gewebeschädigung als Initiator der GVHD wird schon daran erkennbar, dass eine Konditionierung mit reduzierter Intensität zu einer geringeren Inzidenz an GVHD führt als eine myeloablative Konditionierung (Mielcarek et al. 2003; Scott et al. 2006).

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der akuten GVHD spielt das angeborene Immunsystem. Die Verletzung der Darmmukosa als Nebenwirkung zytostatischer Therapie oder durch Infektionen bewirkt, dass Pathogen-assoziierte molekulare Muster wie Lipopolysaccharid (LPS) die Schleimhautbarriere überwinden und über Pathogen-Erkennungsrezeptoren (PRR) wie Toll-like-Rezeptoren einen Zytokinsturm auslösen, der eine akute GVHD begünstigt. Der antiinflammatorische PRR NOD-2 (Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne 2) hat dagegen einen inhibitorischen Effekt auf GVHD und NOD-2-Polymorphismen erhöhen Inzidenz und Schweregrad von GVHD (Holler et al. 2004; Penack et al. 2010).

Das beschädigte Gewebe produziert proinflammatorische Zytokine (zum Beispiel Tumornekrosefaktor  $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ] und Interleukin 1 [IL-1]) und Chemokine, lokale APCs exprimieren daraufhin vermehrt Adhäsionsmoleküle, MHC-Proteine und kostimulatorische Moleküle (Hill et al. 1997; Reits et al. 2006; Ferrara et al. 2009).

Dadurch wird gefördert, dass die Empfänger-APCs in Schritt 2 den Spender-T-Zellen Polypeptide, zum Beispiel Minor Histocompatibility Antigens, präsentieren und diese damit zur Proliferation und Differenzierung anregen (Shlomchik et al. 1999). Auf biochemischer Ebene kommt es dabei nach Kontakt zwischen Antigen und T-Zell-Rezeptor zu intrazellulären Signalkaskaden, welche die Transkription von Genen für Zytokine wie IL-2 anschalten. Diese Interaktion zwischen APCs und T-Zellen kann in allen sekundären lymphatischen Organen stattfinden (Beilhack et al. 2005), initial scheint der Hauptort aber der Gastrointestinaltrakt zu sein (Murai et al. 2003).

Schritt 3 ist schließlich die Gewebeerstörung durch Spender-T-Zellen. Diese werden durch Chemokine von den lymphatischen Geweben zu den Zielorganen geleitet (Wysocki et al. 2005). CD8<sup>+</sup> T-Zellen treten mit MHC-Klasse-I-exprimierenden Parenchymzellen in Kontakt und induzieren Verletzungen über den CD95/CD95-L-Signalweg und die Produktion von zytolytischen Granula. CD4<sup>+</sup> T-Zellen hingegen, ihrerseits aktiviert durch MHC-Klasse-II-tragende APCs, tragen über die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF, IL-1 und Interferon (IFN) sowie die Aktivierung von Makrophagen ihren Teil zur Gewebeerstörung bei (Shlomchik 2007).

Im Prinzip wird GVHD dadurch begrenzt, dass naive T-Zellen, die von transplantierten Stammzellen abstammen, im Empfänger-Thymus Selbst-Toleranz lernen. Allerdings beginnt der Thymus bereits in der Pubertät, sich zurückzubilden, und büßt im Laufe des Lebens an Funktion ein. Dazu kommt bei HSZT-Patienten noch die Schädigung der Thymusepithelzellen durch die zytoreduktive Therapie (Mackall et al. 1995) sowie durch akute GVHD. So ist zu erklären, dass eine chronische GVHD entstehen kann. Insgesamt ist deren Pathophysiologie jedoch weniger gut verstanden als die der akuten GVHD. Bekannt ist, dass TH<sub>2</sub>-Zell-vermittelte Immunantworten eine wichtige Rolle spielen mit dem Resultat der Bildung autoreaktiver, Antikörperproduzierender B-Zellen (Blazar et al. 2012). Anders als bei Pathogen-spezifischer Immunität, wo das Antigen eliminiert werden kann, liegt in der GVHD-Situation eine chronische Antigenstimulation vor, denn die attackierten Antigene werden nie vollständig beseitigt (Shlomchik 2007).

Tatsächlich ist GVHD ein sich selbst verstärkender Prozess: Jede weitere Gewebeschädigung führt zu mehr Entzündung, die wiederum den Graft-versus-Host-Mechanismus befeuert (Blazar et al. 2012). Wenn sich dieser Circulus vitiosus erst einmal etabliert hat, ist es nicht einfach, ihn therapeutisch zu durchbrechen. Daher nimmt die Prävention der GVHD einen sehr hohen Stellenwert ein. Die effektivste Art, eine GVHD zu verhindern, ist die T-Zell-Depletion. Dabei

werden T-Zellen ex vivo durch negative Selektion mittels Antikörpern oder physikalischen Separationsverfahren oder durch positive Selektion mittels CD34<sup>+</sup> Säulen aus dem Transplantat eliminiert. Die Ex-vivo-T-Zell-Depletion zeigte jedoch, bei HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger, keine Vorteile hinsichtlich harter Endpunkte wie krankheitsfreiem Überleben (Marmont et al. 1991) und hat daher an Bedeutung eingebüßt. Eine weitere Möglichkeit ist die T-Zell-Depletion in vivo durch Verabreichung von Anti-T-Zell-Antikörpern (Appelbaum et al. 2009), darunter das polyklonale Antithymozytenglobulin (ATG) sowie der monoklonale Anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab, auf die in den folgenden Kapiteln näher eingegangen wird.

Mit den T-Zellen werden die Haupteffektoren der GVHD ausgeschaltet. Dadurch kann sowohl akute als auch chronische GVHD erheblich eingeschränkt werden, jedoch zu dem Preis von mehr Infektionen und mehr Rezidiven der malignen Grunderkrankung, denn auch die Immunrekonstitution und der Graft-versus-Tumor-Effekt werden beeinträchtigt (Wagner et al. 2005).

Alternative etablierte Pharmaka zur GVHD-Prophylaxe sind die Calcineurin-Inhibitoren Cyclosporin oder Tacrolimus sowie der mTOR-(Mammalian Target of Rapamycin-)Inhibitor Sirolimus, meist verabreicht in Kombination mit Methotrexat oder Mykophenolat-Mofetil. Alle diese Immunsuppressiva haben eine nicht zu vernachlässigende Toxizität (Ferrara et al. 2009).

Wenn sich trotz Präventionsmaßnahmen Symptome einer akuten GVHD zeigen, besteht die Erstlinientherapie in der Gabe von Steroiden. Abgesehen von leichter Haut-GVHD, die eventuell topisch behandelt werden kann, müssen die Steroide in hoher Dosis intravenös verabreicht werden. Über diverse Mechanismen wirken Glukokortikoide antiinflammatorisch und hemmen die Lymphozytenaktivität (Ferrara et al. 2009). Allerdings führen sie in weniger als Hälfte der Fälle zu einer kompletten Remission (MacMillan et al. 2002).

Patienten mit steroidrefraktärer akuter GVHD haben eine schlechte Prognose (Blazar et al. 2012). Für die Zweitlinientherapie stehen zahlreiche Ansätze zur Verfügung, viele sind aber noch im experimentellen Stadium. Zu nennen sind ATG, IL-2-Rezeptor-, Anti-CD147- und TNF-Antikörper, außerdem extrakorporale Photopherese und zelluläre Therapien wie die Verabreichung von mesenchymalen Stammzellen (Bacigalupo 2007). Vielversprechend ist auch der Einsatz regulatorischer T-Zellen (T<sub>reg</sub>). In Mausversuchen wurde nachgewiesen, dass vom Spender stammende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> alloreaktive T-Zellen hemmen, ohne den Graft-versus-Tumor-Effekt aufzuheben (Edinger et al. 2003). Solche selektiven Therapien werden vermutlich in Zukunft eine wesentliche Rolle spielen.

### 1.3. Antithymozytenglobulin (ATG)

Polyklonales ATG ist die aufgereinigte IgG-Fraktion aus Sera von Kaninchen, Pferden oder seltener Ziegen, die mit humanen Thymozyten oder T-Zell-Linien immunisiert wurden. Thymozyten sind Zellsuspensionen von humanen Thymuszellen; das Thymusgewebe wird von Patienten gewonnen, die sich einer Herzoperation unterziehen (Mohty 2007).

ATG ist ein starkes Immunsuppressivum, das überwiegend in der Transplantationsmedizin zur Anwendung kommt. Bei der Transplantation solider Organe (Niere, Leber, Pankreas, Herz, Lunge) soll mit ATG eine Abstoßungsreaktion, bei der allogenen HSZT ein Transplantatversagen wie auch eine GVHD verhindert werden. Daneben gehört ATG zur Standardtherapie bei Patienten mit Aplastischer Anämie, die nicht stammzelltransplantiert werden, denn die Aplastische Anämie ist meist autoimmunologischer Genese. In Zukunft könnten auch andere Autoimmunerkrankungen mit ATG behandelt werden (Gaber et al. 2010).

Häufige akute Nebenwirkungen von ATG sind Fieber und Schüttelfrost. Langfristig ist die Rate an Epstein-Barr-Virus-(EBV-)positiven lymphoproliferativen Erkrankungen nach Transplantation erhöht im Vergleich zu Patienten, die kein ATG bekommen (Finke et al. 2009).

Eine Metastudie, die sechs randomisierte kontrollierte Studien über ATG als GVHD-Prophylaxe bei allogener HSZT analysiert, kommt zu dem Schluss, dass ATG das Gesamtüberleben nicht erhöht, aber die Inzidenz höhergradiger akuter GVHD (> Grad II) reduziert. Der Nutzen für chronische GVHD hinsichtlich der Lebensqualität bleibt unklar (Theurich et al. 2012).

Unter den aktuell kommerziell verfügbaren Präparaten sind Atgam<sup>®</sup>, ein Pferde-ATG des Herstellers Pfizer (New York, USA), sowie die Kaninchen-ATGs Thymoglobulin<sup>®</sup> von Genzyme (Cambridge, USA) und ATG-Fresenius S<sup>®</sup> (Fresenius Biotech, Gräfelfing). Während für Thymoglobulin<sup>®</sup> die Kaninchen tatsächlich mit Thymozyten immunisiert werden, geschieht die Immunisierung für ATG-Fresenius<sup>®</sup> mit kultivierten Jurkat-Zellen, einer Zell-Linie, die aktivierten T-Zellen ähnelt. Angesichts der unterschiedlichen Herstellung dieser Medikamente kann man nicht ohne Weiteres von den Eigenschaften eines ATG-Präparates auf die eines anderen schließen (Mohty 2007). In unseren Experimenten wurde ausschließlich ATG-Fresenius<sup>®</sup> verwendet (siehe 2.1.).

Der menschliche Thymus besteht zum Großteil aus T-Zellen, enthält aber in beträchtlichen Mengen auch Stromazellen, APCs sowie B-Zellen (Isaacson et al. 1987). Folglich enthalten

ATG-Zubereitungen Antikörper gegen ein sehr breites Spektrum von Antigenen. Einige dieser Antigene sind T-Zell-spezifisch, manche werden aber auch auf natürlichen Killerzellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen gefunden (Mohty 2007). Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die bekannten Zielantigene von ATG.

**Tabelle 3: Zusammenfassung bekannter Zielantigene von ATG (nach Mohty 2007)**

Immunreaktionen	Adhäsion und Zellmigration	Heterogene Signalwege
CD1a	CD11a/CD18 (LFA-1)	CD2
CD3/TCR, CD4, CD8	CD44, CD49/CD29 (VLA-4)	CD5
CD6, CD7, CD16	CD50 (ICAM-3), CD51/61	CD6
CD19, CD20	CD54 (ICAM-1)	CD11b
CD25, CD28	CD56	CD29
CD30, CD32	CD58 (LFA-3), LPAM-1	CD38, CD40
CD40, CD80	CD102 (ICAM-2)	CD45
CD86, CD152 (CTLA-4)	CD195 (CCR5)	CD95
HLA Klasse I und II	CD197 (CCR7)	CD126
β2-Mikroglobulin	CD184 (CXCR4)	CD138

Der Hauptwirkungsmechanismus von ATG ist die T-Zell-Depletion. ATG führt dosisabhängig zu niedrigen T-Zell-Zahlen nicht nur im peripheren Blut, sondern auch in den Lymphknoten und in der Milz, den Orten also, wo die adaptive Immunantwort initiiert wird (Preville et al. 2001). Die T-Zell-Depletion wird erreicht durch Komplement-abhängige Lyse, die im peripheren Blut vorherrscht, aber auch durch Antikörper-abhängige, Zell-vermittelte Zytotoxizität sowie Apoptose-Induktion über Fas/FasL-Interaktionen und nachfolgende Phagozytose durch Makrophagen in den lymphatischen Geweben (Genestier et al. 1998).

Der Körper versucht, einen Verlust an T-Zellen durch neue Proliferation zu kompensieren, um die Homöostase wiederherzustellen. Die T-Zell-Proliferation nach ATG-Gabe führt zu einer veränderten Zusammensetzung der T-Zell-Subspezies. ATG bewirkt eine über Jahre anhaltende Umkehr des Verhältnisses von CD4<sup>+</sup> zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Offenbar können die im Thymus gebildeten CD4<sup>+</sup> Zellen nicht im gleichen Maße regeneriert werden wie die extrathymisch produzierten CD8<sup>+</sup> Zellen; die Folge ist eine relative Überregeneration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Müller et al. 1997). Ähnliches ist zu beobachten bei Gedächtnis-T-Zellen, deren Anteil nach T-Zell-Depletion zunimmt, wohingegen der Anteil naiver T-Zellen abnimmt (Ge 2002). Außerdem hat sich gezeigt, dass ATG in vitro zu einer Expansion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> führt (Lopez et al. 2006).

Aber die Wirkung von ATG beschränkt sich nicht auf T-Zellen. Wie oben erwähnt, enthält ATG auch Antikörper gegen B-Zellen. ATG kann naive, aktivierte B-Zellen und im Knochenmark angesiedelte Plasmazellen in die Apoptose treiben, vermutlich über die Quervernetzung von Oberflächenantigenen (Zand et al. 2005). Dieser Effekt erstreckt sich auch auf die neoplastischen Plasmazellen des Multiplen Myeloms, die zusätzlich über Komplement-vermittelte Lyse eliminiert werden. Eine Einbeziehung von ATG in die Behandlung des Plasmozytoms ist daher denkbar (Zand et al. 2006; Timm et al. 2006).

Darüber hinaus bindet ATG an DCs und induziert dabei ebenfalls die Komplement-vermittelte Lyse. Außerdem hemmt ATG die Fähigkeit von T-Zellen, nach Stimulation durch DCs zu proliferieren (Monti et al. 2003). Auch in vivo ist der DC-depletierende Effekt von ATG nachgewiesen (Fang et al. 2005).

Ein weiterer Angriffspunkt von ATG ist die Leukozytenmigration. ATG enthält Antikörper gegen Integrine, Chemokinrezeptoren und Leukozytenadhäsionsrezeptoren. ATG bewirkt die Herunterregulierung von Oberflächenantigenen über den Mechanismus der Internalisierung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Solange der Antikörper vorhanden ist, wird der entsprechende Signalweg gehemmt. Dieser Vorgang wird auch Modulation genannt. Über die Modulation verschiedener Zelloberflächenmoleküle, die die Leukozytenmigration steuern, hemmt ATG das Rollen von Leukozyten auf dem Endothel, deren stabile Adhäsion und Transmigration (Michallet et al. 2003; Chappell et al. 2006).

Es wird also deutlich, dass das polyklonale ATG neben der T-Zell-Depletion – die zwar wichtig ist, um GVHD zu verhindern, die aber auch den Graft-versus-Tumor-Effekt beeinträchtigt – noch zahlreiche weitere komplexe immunmodulatorische Wirkungsmechanismen aufweist.

### **1.4. Der CD52-Antikörper Alemtuzumab**

In den 1970er Jahren wurde eine Methode entwickelt, Antikörper einer bestimmten Spezifität in unbegrenzter Menge herzustellen. Der entscheidende Schritt war die Fusion von Plasmazellen mit Tumorzellen, wodurch eine sogenannte Hybridomzelllinie mit unbeschränkter Teilungsfähigkeit entsteht, die monoklonale Antikörper produziert (Köhler & Milstein 1975).

Im folgenden Jahrzehnt fanden Waldmann und Hale einen Maus-Antikörper, der die Fähigkeit besaß, humane T-Zellen zu lysieren, dabei aber hämatopoetische Stammzellen aussparte. Dieser Antikörper vom Typ IgM wurde Campath-1M genannt (abgeleitet von „Cambridge Pathology“, wo er erforscht wurde) (Hale et al. 1983). Später wurde er weiterentwickelt zu einem IgG-Isotyp namens Campath-1G. Da allerdings artfremde Antikörper stark immunogen sind und daher bei wiederholter Gabe ihre Wirksamkeit verlieren, ging man dazu über, Maus-Antikörper zu humanisieren, das heißt deren für die Spezifität verantwortlichen Antigen-bindenden Domänen mit einem humanen Gerüst zu einem chimärischen Immunglobulin zu verschmelzen. Auf diese Weise wurde aus Campath-1G das humanisierte Campath-1H (Riechmann et al. 1988), das heute Alemtuzumab heißt.

Alemtuzumab ist also ein humanisierter monoklonaler Antikörper. Er richtet sich gegen ein Epitop des Antigens CD52. CD52 ist ein kleines Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 28 kDa. Es wird von einem einzelnen Gen kodiert, das auf Chromosom 1 liegt, und seine Peptidsequenz besteht aus nur zwölf Aminosäuren. An seinem N-Terminus hängt ein komplexes Kohlenhydrat mit negativ geladenen N-Acetylneuraminsäure-Resten, der C-Terminus ist über ein Glykosylphosphatidylinositol-Lipid in der Zellmembran verankert (Xia et al. 1993; Treumann et al. 1995). CD52 wird auf der Oberfläche normaler und maligner Leukozyten exprimiert, nicht aber auf hämatopoetischen Vorläuferzellen, Erythrozyten oder Thrombozyten. In besonders großer Menge wird CD52 auf Lymphozyten gefunden, wo es geschätzte fünf Prozent der Zelloberfläche bedeckt (Hale 2001), was die Lymphozyten zu einem hervorragenden Therapieziel macht. Interessanterweise kommt CD52 nicht nur auf Blutzellen, sondern auch auf Epithelzellen der Fortpflanzungsorgane und auf reifen Spermien vor. Reproduktive Nebenwirkungen von Alemtuzumab sind aber nicht bekannt (Ravandi & O'Brien 2005).

Die Funktion von CD52 ist unklar. Vermutet wird aber, dass es mit seinen negativen Ladungen quasi als „Antiadhäsionsmolekül“ eine Rolle für Zellmobilität und Zell-Zell-Interaktionen spielt (Ferrajoli et al. 2001).

Alemtuzumab entfaltet seine therapeutische Wirkung, indem es an CD52 auf der Oberfläche von Zielzellen bindet, woraufhin diese über verschiedene Mechanismen zerstört werden: durch Komplement-vermittelte Lyse, Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (Lowenstein et al. 2006) und Apoptose-Induktion (Smolewski et al. 2005). Bei therapeutischen Alemtuzumab-Dosen resultiert eine fast vollständige Lymphozyten-Depletion im peripheren Blut; in den lymphatischen Organen verbleibt allerdings im Tierversuch ein gewisser Pool an T- und B-Zellen (Hu et al. 2009). Da Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen weniger CD52 ex-

primieren, werden sie von Alemtuzumab weniger getroffen (Brett et al. 1996). Auch  $CD4^+CD25^+$   $T_{reg}$  werden offenbar relativ ausgespart oder regenerieren sich überproportional (Cox et al. 2005); allerdings ist die Datenlage hierzu widersprüchlich (Lopez et al. 2006). Die zuletzt genannten Faktoren könnten jedenfalls dazu beitragen, dass eine Alemtuzumab-Behandlung, abgesehen von Patienten mit sehr hoher Morbidität, trotz der Lymphopenie nicht zu einer dramatisch hohen Inzidenz an gewöhnlichen oder opportunistischen Infektionen führt.

Der Campath-1-Antikörper wurde entwickelt zur Depletion von T-Zellen in allogenen Knochenmarktransplantaten. Heute wird Alemtuzumab auch in vivo für die Prophylaxe und Therapie der GVHD eingesetzt. Ähnlich wie ATG vermag Alemtuzumab eine GVHD zu verhindern, jedoch zum Preis eines erhöhten Risikos für Transplantatversagen und Rezidive der malignen Grunderkrankung (Hale 2002). Die Transplantation solider Organe ist ein weiterer klinischer Einsatzbereich. Alemtuzumab wird verwendet in der Nieren-, Leber- und Pankreastransplantation zur Prävention einer Transplantatabstoßung (Ferrajoli et al. 2001).

Wie oben erwähnt, tragen auch maligne T- und B-Zellen CD52. Auf bestimmten Leukämiezellen wird CD52 sogar stärker exprimiert als auf normalen Lymphozyten (Ginaldi et al. 1998). Dies macht Alemtuzumab zu einem vielversprechenden Wirkstoff gegen lymphatische Neoplasien. Die Effektivität von Alemtuzumab in der Therapie der Fludarabin-refraktären chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) ist erwiesen (Keating 2002). Auch die T-Zell-Prolymphozytenleukämie (T-PLL), sonst schwer zu behandeln, spricht gut auf Alemtuzumab an (Pawson et al. 1997; Dearden et al. 2001). Bei Non-Hodgkin-Lymphomen wurde Alemtuzumab im großen Stil getestet, jedoch mit begrenztem Erfolg. Gute Ergebnisse wurden einzig bei Lymphomen mit Hautbeteiligung erzielt (Lundin et al. 1998).

Inzwischen wird Alemtuzumab auch bei schweren Formen von Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Die meisten Daten existieren für die Multiple Sklerose (MS). Die Anwendung von Alemtuzumab bei MS basiert auf dem Wissen, dass die Krankheit durch T-Zell-abhängige entzündliche Demyelinisierung des ZNS entsteht. In einem frühen Krankheitsstadium senkt Alemtuzumab, verglichen mit IFN- $\beta$ , signifikant den Zuwachs an Behinderung, einen entscheidenden Endpunkt der MS (Coles et al. 2008). Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde über einen zumindest kurzfristigen Nutzen von Alemtuzumab berichtet (Isaacs et al. 1992).

Alemtuzumab ist also ein sehr wirkungsstarkes Medikament. Als solches hat es jedoch auch heftige unerwünschte Wirkungen, deren Kenntnis für den klinischen Gebrauch unabdingbar ist. Einige Stunden nach der intravenösen Verabreichung kommt es typischerweise zu einem Zyto-

kin-Release-Syndrom mit den folgenden, nach ihrer Häufigkeit geordneten Erscheinungen: Rigor, Fieber, Übelkeit, Erbrechen, Hautausschlag, Dyspnoe und arterielle Hypotonie (Keating 2002). Die meisten dieser akuten Nebenwirkungen äußern sich als „grippeähnliche“ Symptome, treten hauptsächlich nach der ersten Alemtuzumab-Infusion auf und nehmen üblicherweise im Laufe der folgenden Anwendungen in ihrer Intensität ab. Die prophylaktische Gabe von Antihistaminika und Paracetamol sowie eine besonders langsame Infusion können die Symptome weitgehend verhindern und werden deshalb empfohlen. Thrombozytopenie und Neutropenie sind häufige Komplikationen bei Patienten mit CLL, die mit Alemtuzumab behandelt werden. Mit Transfusionen und Wachstumsfaktoren bekommt man sie aber in der Regel gut in den Griff (Keating et al. 2004).

Die schwere Lymphopenie, die durch Alemtuzumab ausgelöst wird, ist einerseits therapeutisch erwünscht, andererseits prädisponiert sie zu Infektionen. Insbesondere stark vorbehandelte Patienten neigen zu bakteriellen und Pilzinfektionen sowie Reaktivierungen von Viren der Familie der Herpesviridae (Keating 2002). Inzwischen gehören eine antibakterielle und antivirale Prophylaxe zum Standardschema bei der Alemtuzumab-Therapie maligner Erkrankungen (Keating et al. 2004). Ebenfalls mit der Immunsuppression in Verbindung gebracht wird das Auftreten von EBV-positiven lymphoproliferativen Erkrankungen bei Patienten mit einer Alemtuzumab-Behandlung in ihrer Vorgeschichte, über das mehrfach berichtet wurde (Ghobrial et al. 2003; Kluin-Nelemans et al. 2008).

Bei Autoimmunerkrankungen hat Alemtuzumab ein besonderes Nebenwirkungsspektrum. So entwickeln MS-Patienten auffällig oft eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, namentlich Morbus Basedow (Coles et al. 1999). Außerdem scheint die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), ein Zustand, in dem sich das Immunsystem gegen eigene Thrombozyten richtet, vermehrt nach Alemtuzumab-Behandlung aufzutreten (Coles et al. 2008). Weshalb sich diese „Verschiebung“ der Autoimmunität auf andere Ziele vollzieht, ist unklar. Es kommt außerdem vor, dass Patienten mit systemischer Vaskulitis neutralisierende Antikörper gegen das eigentlich wenig immunogene, weil humanisierte Alemtuzumab bilden (Lockwood et al. 1993). Insgesamt verhindern die beträchtlichen unerwünschten Wirkungen von Alemtuzumab bisher einen breiteren Einsatz bei Autoimmunerkrankungen.

## 1.5. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind die wichtigsten APCs. Sie sind darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu verarbeiten und anderen Zellen zu präsentieren (Novak & Bieber 2008). Erst in den 1970er Jahren wurde diese wichtige Zellart von Ralph M. Steinman und Kollegen entdeckt und aufgrund ihrer Morphologie nach dem griechischen Wort „dendron“ (Baum) benannt (Steinman & Cohn 1973). Für die Erforschung der DCs wurde Steinman 2011 postum der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen.

Wie man heute weiß, stellen DCs eine sehr heterogene Gruppe von Zellen dar. Obwohl sich DCs auch aus der lymphatischen hämatopoetischen Reihe entwickeln können (Doulatov et al. 2010), stammen sie in der Mehrzahl aus der myeloischen Reihe ab, und zwar von dem Makrophagen-DC-Vorläufer (Macrophage Dendritic Cell Progenitor, MDP) (Fogg et al. 2006). Der MDP differenziert im Knochenmark entweder zu Monozyten oder – unter dem Einfluss des Zytokins Flt-3-Ligand (Waskow et al. 2008) – zu dem gemeinsamen DC-Vorläufer (Common Dendritic Cell Progenitor, CDP). Aus dem CDP entstehen schließlich die unmittelbaren Vorstufen der DCs (Precursor-DCs, Pre-DCs), welche bereits im peripheren Blut gefunden werden (Liu et al. 2009).

Die Unterscheidung zahlreicher DC-Subtypen ist komplex, uneinheitlich und unterliegt ständiger Veränderung (Hart 1997; Shortman & Liu 2002; Rossi & Young 2005; Dudziak et al. 2007; Geissmann et al. 2010; Kushwah & Hu 2011; Lewis & Reizis 2012). Üblicherweise werden die DCs in zwei große Untergruppen unterteilt: konventionelle DCs und nicht-konventionelle DCs. Die konventionellen DCs stammen von Pre-DCs ab und üben die klassischen, unten aufgeführten DC-Funktionen aus. Die nicht-konventionellen DCs umfassen plasmazytoide DCs und von Monozyten abstammende DCs (Kushwah & Hu 2011).

Von Monozyten abstammende DCs ähneln abgesehen von ihrer Herkunft den mobilen konventionellen DCs. Sie sind unter allen DC-Gruppen die für die In-vitro-Erforschung am leichtesten zugängliche. Auch für unsere Experimente haben wir DCs aus Monozyten kultiviert (siehe 2.1.).

Plasmazytoide DCs unterscheiden sich in ihrer Morphologie, Abstammung und Funktion von konventionellen DCs. Sie heißen plasmazytoide, weil sie in ihrer Gestalt den Plasmazellen gleichen. Sie gehen aus dem CDP hervor, jedoch nicht aus den Pre-DCs; anders als konventionelle DCs, die sich ihrer terminalen Differenzierung in der Peripherie unterziehen, schließen plasma-

zytoide DCs ihre Entwicklung im Knochenmark ab und besiedeln erst dann die Peripherie (Lewis & Reizis 2012). Entscheidend für das Einschlagen dieses eigenständigen Weges ist die Induktion des Transkriptionsfaktors E2-2 (Cisse et al. 2008). Die Hauptaufgabe plasmazytoider DCs ist die massive Produktion von Typ-I-Interferonen (IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) als Reaktion auf virale Infektionen; sie sind aber auch zur Antigenpräsentation fähig (Cella et al. 1999; Colonna et al. 2004).

Die DCs der Epidermis wurden bereits im 19. Jahrhundert von ihrem Namensgeber Paul Langerhans beschrieben. Er hielt sie damals allerdings für Nervenzellen (Langerhans 1868). Langerhans-Zellen sind insofern eine Besonderheit, als sie sich offenbar aus embryonalen Vorläufern entwickeln, welche die Epidermis bereits vor der Geburt besiedeln und sich dort differenzieren. Erwachsene Langerhans-Zellen können sich in situ durch Proliferation selbst erneuern (Chorro et al. 2009).

Nur kurz erwähnt seien hier die follikulären DCs, die eine ganz eigene Zellart darstellen. Sie sind keine Leukozyten, sondern stromaler Herkunft, und interagieren mit B-Zellen in der Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe (Tew et al. 2001).

Nun zu den klassischen DC-Funktionen: DCs bevölkern die Körperoberflächen wie die Haut und die Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltraktes. Als Wächter an den Grenzen des Organismus zur Umwelt spüren sie mit ihren langen Ausläufern gefährliche Antigene auf und vermitteln deren Bekämpfung durch T-Zellen (Novak & Bieber 2008).

Zunächst löst ein Stimulus die terminale Reifung oder Aktivierung der im Wartestand befindlichen DCs aus, zum Beispiel ein mikrobielles Produkt über einen Toll-like Rezeptor (Kadowaki et al. 2001). Die Aktivierung führt zur Sekretion von Zytokinen, zur Expression von kostimulatorischen Molekülen und Chemokinrezeptoren. Die Zytokine dienen der Rekrutierung weiterer DCs und NK-Zellen (Rossi & Young 2005), durch die Chemokinrezeptoren wird die Wanderung der DCs in die Lymphknoten erleichtert (Scandella et al. 2002).

Zur Antigenaufnahme nutzen DCs Phagozytose, Endozytose, Pinozytose und spezifische Rezeptoren (Rossi & Young 2005). Die Antigene werden zerlegt und ihre Bruchstücke auf MHC-Proteine geladen. Diesen Vorgang nennt man Antigenprozessierung. Der Komplex aus MHC-Protein und Antigenfragment wird an der Zelloberfläche transportiert. Spezifische T-Zellen erkennen mit ihren T-Zell-Rezeptoren präsentierte Antigene, woraufhin sie sich weiter differenzieren und proliferieren. Antigene, die aus dem Extrazellulärraum stammen, werden auf typischerweise auf MHC-II-Proteinen präsentiert, wohingegen MHC-I-Proteine Antigene des eige-

nen zytosolischen Kompartimentes tragen. Doch DCs besitzen die Fähigkeit der Kreuzpräsentation von Antigenen. Das bedeutet, dass extrazelluläre Antigene auf MHC-I-Proteine geladen werden, was die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermöglicht (Albert et al. 1998).

Die am weitesten fortgeschrittene klinische Anwendung von DCs ist die Krebs-Immuntherapie mit dendritischen Zellvakzinen. Dafür werden DCs aus dem Blut von Patienten mit einer malignen Erkrankung ex vivo kultiviert und mit Tumorantigenen beladen. Nach Reinfusion der autologen DCs sollen sie eine T-Zell-Reaktion gegen den Tumor initiieren oder verstärken. Die meisten Erfahrungen bestehen bei Melanom-Patienten, aber auch zahlreiche andere Tumorarten werden untersucht (Gilboa 2007).

Es wäre allerdings zu kurz gegriffen, die Rolle von DCs lediglich in der Abwehr von Pathogenen und malignen Zellen zu sehen. DCs haben ihre Aufgabe ebenso in der Vermittlung von Immuntoleranz. So präsentieren DCs im Thymus Selbst-Antigene und tragen damit zur negativen Selektion von T-Zellen bei (Gallegos & Bevan 2004). Auch in der Peripherie prägen DCs T-Zellen in der Abwesenheit von Infektionen in Richtung Toleranz, indem sie ständig Selbstantigene präsentieren, ohne zugleich kostimulatorische Moleküle oder Zytokine zu exprimieren (Scheinecker et al. 2002).

Des Weiteren muss das Immunsystem nicht nur Fremd von Selbst unterscheiden. Wichtiger noch ist die Unterscheidung zwischen harmlosen und gefährlichen Signalen. Antigenität ist zwar notwendig für Immunogenität, aber in vielen Fällen nicht ausreichend (Matzinger 2002). Zum Beispiel können bakterielle Antigene eine starke Reaktion hervorrufen, wenn sie mit einem Adjuvans verabreicht werden, während sie im Darm toleriert werden (Uhlir & Powrie 2003). In diesem sensiblen Bereich sind DCs die Weichensteller, die T-Zellen stimulieren oder unterdrücken, je nachdem, welche Gefahrensignale beteiligt sind (Grohmann et al. 2003). DCs können also auch Toleranz induzieren gegenüber den Antigenen, die sie präsentieren (Steinman et al. 2003). Um das Enzym, das eine maßgebliche Rolle dabei spielt, geht es im folgenden Kapitel.

## **1.6. Das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) und der Tryptophan-Stoffwechsel**

Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO, auch IDO-1; EC 1.13.11.52) ist ein intrazelluläres Enzym, das den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Kynureninweges im Tryptophanstoffwechsel katalysiert, nämlich die Oxidation von Tryptophan zu N-Formylkynurenin. 1967 von Osamu Hayaishi und Mitarbeitern entdeckt (Yamamoto & Hayaishi 1967), dauerte es noch Jahrzehnte, bis IDOs wirkliche Bedeutung auf dem schmalen Grat zwischen Pathogenabwehr und Immunpathologie erkannt wurde.

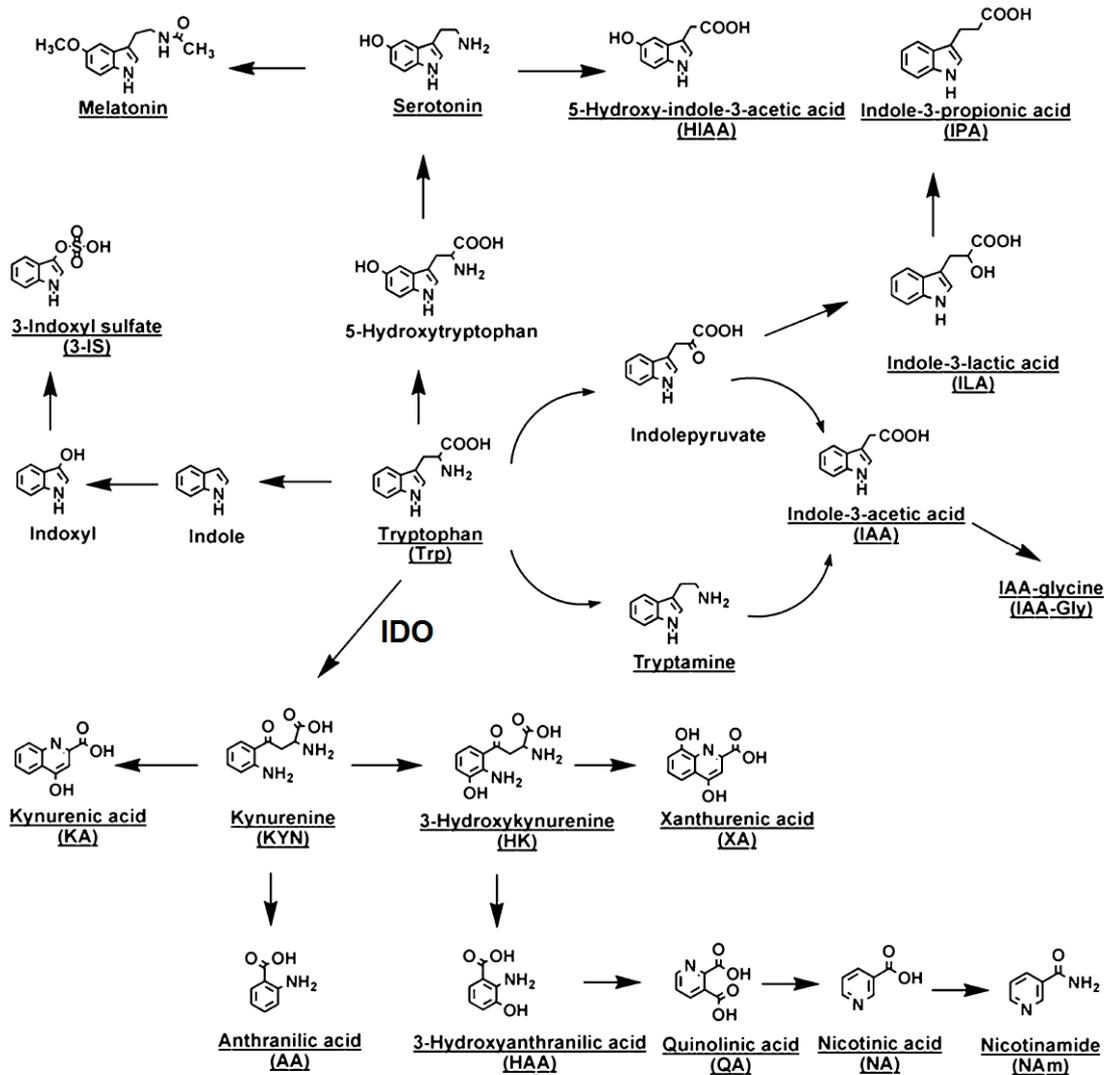
L-Tryptophan ist eine essenzielle Aminosäure, das heißt Säugetiere können sie nicht de novo produzieren und sind auf die exogene Zufuhr angewiesen. Tryptophan ist die am seltensten in Proteinen von Säugetieren vorkommende Aminosäure. Ein kleiner Teil des aufgenommenen Tryptophan wird in Proteine eingebaut, für den Rest gibt es in menschlichen Zellen zwei Katabolisierungswege. Erstens den Serotoninweg, der der Herstellung des Neurotransmitters Serotonin und des Hormons Melatonin dient; zweitens den Kynureninweg, bei dem Tryptophan zu diversen biologisch aktiven Metaboliten abgebaut wird, die kollektiv als Kynurenine bezeichnet werden, und schließlich zu Nikotinamid, das auch als Niacin oder Vitamin B<sub>3</sub> bezeichnet wird (Takikawa 2005). Niacin kann also entweder über die Nahrung aufgenommen werden oder, bei ausreichenden Tryptophanvorräten, über den Kynureninweg selbst produziert werden.

Eine dritte Möglichkeit des Tryptophanabbaus, die im Darm vorkommt, ist die bakterielle Degradation unter anderem über den Indolweg (Smith & Macfarlane 1997). Eine graphische Übersicht über den Tryptophanstoffwechsel bietet Abb. 1.

IDO ist das Schlüsselenzym des Kynureninweges. Es katalysiert die oxidative Spaltung der 2,3-Doppelbindung im Pyrrolring von Tryptophan. Dabei entsteht N-Formylkynurenin, das anschließend durch Abspaltung von Ameisensäure zu dem stabilen Endprodukt Kynurenin metabolisiert wird (King & Thomas 2007).

IDO wird von einem Gen mit 10 Exons kodiert, das sich über ca. 15 Kilobasenpaare auf Chromosom 8 erstreckt (Kadoya et al. 1992). Die IDO-Proteinsequenz besteht aus 403 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 45 kDa (Tone et al. 1990). In der Tertiärstruktur ist IDO in zwei  $\alpha$ -helikale Domänen gefaltet. Als prosthetische Gruppe, das heißt als fest an das Enzym

gebundenes Koenzym, ist ein Häm-Molekül zwischen den beiden  $\alpha$ -Helizes positioniert (Sugimoto 2006).



**Abb. 1: Schema des Tryptophanstoffwechsels.** Die von IDO katalysierte Reaktion ist beschriftet. (Bearbeitet nach Zhu et al. 2011.)

Erst in jüngerer Zeit entdeckte man die Existenz eines Isoenzym von IDO. Man nannte es Indolamin-2,3-dioxygenase 2 (IDO-2). Das IDO-2-Gen ähnelt dem IDO-1-Gen und liegt neben diesem auf Chromosom 8. Evolutionsbiologisch sind die beiden IDOs wahrscheinlich durch genetische Duplikation entstanden. Die enzymatische Aktivität von IDO-2 gleicht weitgehend der von IDO-1, das Expressionsmuster ist jedoch unterschiedlich (Ball et al. 2007; Ball et al. 2009).

IDO-1 und IDO-2 sind nicht die einzigen Enzyme, welche die Reaktion von Tryptophan zu Kynurenin katalysieren können. Viel länger schon als IDO ist das Enzym Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO; EC 1.13.11.11) bekannt (Kotake & Masayama 1936). TDO hat eine engere Substratspezifität als IDO, das seinen Namen der Tatsache verdankt, dass es verschiedene Indolamine zur Reaktion bringen kann. Die Expression von TDO ist weitgehend auf die Leber beschränkt. Von dort aus kontrolliert das Enzym den Tryptophanerspiegel. Es ist unabhängig von immunologischen Signalen (Thackray et al. 2008).

IDO hingegen wird nahezu ubiquitär exprimiert und auf komplexe Art reguliert. Besonders hohe IDO-Aktivität wird in der Plazenta gemessen (Kudo et al. 2004) und in Organen mit großen Schleimhautoberflächen wie Darm oder Lunge sowie in lymphatischen Organen wie Thymus und Milz; außerdem im Nebenhoden (Takikawa et al. 1986). Die Transkription des IDO-Gens reagiert sehr stark auf Signale des Immunsystems und kann in vielen verschiedenen Zellarten induziert werden. Der wichtigste bekannte Stimulus ist das Zytokin IFN- $\gamma$  (Ozaki et al. 1988; Taylor & Feng 1991), das die IDO-Induktion über die Transkriptionsfaktoren STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1) und IRF-1 (Interferon Regulatory Factor 1) vermittelt (Chon et al. 1996).

Es besteht ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Entzündung, IFN- $\gamma$  und IDO-Expression, aber neben IFN- $\gamma$  gibt es weitere Moleküle, die IDO induzieren können bzw. das IFN- $\gamma$ -Signal verstärken können (Mellor & Munn 2004): der Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien LPS sowie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  (Babcock & Carlin 2000; Wang et al. 2010).

Auch Antikörper gegen CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4; auch bekannt als CD152) können IDO induzieren, und zwar durch Bindung der Zelloberflächenmoleküle B7-1 und B7-2 (CD80 bzw. CD86; Grohmann et al. 2002). Über CTLA-4 können T<sub>reg</sub> DCs dazu anregen, IDO zu exprimieren (Fallarino et al. 2003). DCs können dann die IDO-Expression selbstständig aufrechterhalten, indem sie Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) synthetisieren und dieses autokrin oder parakrin wiederum IDO induziert (Belladonna et al. 2008). Die IDO-Produktion von DCs ist für die Modulation des zellulären Immunsystems besonders bedeutsam. Interessanterweise hat IDO-1 in diesem Zusammenhang eine intrazelluläre Signalfunktion, die von seiner katalytischen Aktivität, also dem Tryptophanabbau, unabhängig ist: TGF- $\beta$  bewirkt die Phosphorylierung von ITIMs (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs) in der nicht-katalytischen Domäne von IDO-1, woraufhin IDO-1 verschiedene nachgelagerte Signaleffektoren aktivieren kann, die zur Ausprägung eines regulatorischen Phänotyps in plasmazytoi-

den DCs führen. IDO-2 besitzt unvollständige ITIMs und entbehrt deshalb einer solchen Signalfunktion (Pallotta et al. 2011).

Auch posttranslational wird die IDO-Aktivität reguliert. Als Hämprotein ist IDO nach der Translation auf die Bereitstellung seines Koenzyms angewiesen, um seine Wirksamkeit entfalten zu können. Außerdem ist IDO nur aktiv, wenn das Eisenion in der Häm-Gruppe in reduzierter Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ) vorliegt, und ist daher abhängig vom intrazellulären Redox-Status (Taniguchi et al. 1979). Sowohl durch Beeinflussung der Häm-Biosynthese als auch durch Veränderung des Redoxpotenzials mit Antioxidanzien lässt sich die IDO-Aktivität *in vitro* steuern (Thomas et al. 2001). Ein anderer Weg, IDO auszuschalten, ist die Proteolyse. Die proteasomale Degradation von IDO kann durch Stickstoffmonoxid (NO) verstärkt werden (Hucke et al. 2004) und geschieht abhängig von SOCS-3 (Suppressor of Cytokine Signaling 3; Orabona et al. 2008). Über SOCS-3 kann beispielsweise das proinflammatorische Zytokin IL-6 zum Abbau von IDO beitragen und so Toleranz durchbrechen (Grohmann et al. 2001).

Die Wirkung von IDO beruht auf zwei maßgeblichen Mechanismen: zum einen auf dem Entzug der essenziellen Aminosäure Tryptophan, zum anderen auf der Akkumulation von Metaboliten, sie selbst immunsuppressiv sind. Säuger-Zellen können einen Aminosäure-Mangel über den mTOR-Signalweg wahrnehmen und ihre Teilungsaktivität entsprechend den lokalen Bedingungen anpassen (Rohde et al. 2001). Tryptophandepletion im Mikromilieu von IDO-exprimierenden DCs hemmt die Proliferation von T-Zellen (Munn et al. 1999) und macht die T-Zellen anfälliger für Apoptose (Lee et al. 2002a).

Für diverse Tryptophanabbauprodukte wurde eine T-Zell-toxische Wirkung gezeigt, darunter Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure (Terness et al. 2002) und Chinolinsäure (Fallarino et al. 2002a). Kynurenin aktiviert den Transkriptionsfaktor AhR (Aryl Hydrocarbon Receptor) in naiven T-Zellen, was deren Differenzierung zu  $T_{\text{reg}}$  bewirken kann (Mezrich et al. 2010).

Ursprünglich wurde IDO jedoch nicht als Vermittler von Toleranz betrachtet, sondern ausschließlich für seine Rolle in der Pathogenabwehr. Tatsächlich vermag IDO *in vitro* durch Verbrauch von Tryptophan in Wirtszellen die Proliferation von intrazellulären Erregern, die selbst kein Tryptophan synthetisieren können, zu hemmen (Pfefferkorn 1984).

Erst 1998 wurde die immunsuppressive Funktion von IDO im Zusammenhang mit Toleranz an der fetomaternalen Grenzfläche beschrieben: Die IDO-abhängige Unterdrückung von T-Zell-Reaktionen in der Plazenta stellt einen wichtigen Mechanismus dar, der eine Abstoßung des

genetisch unterschiedlichen (allogenen) Fetus durch die schwangere Mutter verhindert (Munn et al. 1998).

Nach heutigem Verständnis wird IDO immer dort, wo eine Entzündung auftritt, via IFN- $\gamma$  hochreguliert, um einer überschießenden Immunantwort entgegenzuwirken. Das Zytokin IFN- $\gamma$  hat also eine ambivalente Rolle: Einerseits zeigt es zahlreiche proinflammatorische Effekte, andererseits wirkt es auch als Begrenzer von Entzündung (Wilke et al. 2011). Was zunächst paradox erscheint, wird begreiflich, wenn man die Folgen eines defekten Tryptophankatabolismus auf Autoimmunerkrankungen und andere chronisch-entzündliche Erkrankungen untersucht: Durch IDO-Hemmung kann man im Tiermodell eine Autoimmunenenzephalomyelitis auslösen (Sakurai et al. 2002) und eine Kolitis verstärken (Gurtner et al. 2003), und ein gestörter Tryptophanabbau liegt der Entzündungsaktivität der Erbkrankheit Septische Granulomatose zugrunde (Romani et al. 2008).

Von hoher medizinischer Relevanz ist auch die Bedeutung von IDO bei Krebs. Tumorzellen schaffen es auf verschiedene Weise, der Erkennung und Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen, was man zusammenfassend als Tumor-Immunescape oder -Immunoediting bezeichnet (Dunn et al. 2002). Die meisten menschlichen Tumoren exprimieren konstitutiv IDO, und IDO verhindert die Abstoßung ansonsten immunogener Tumorzellen (Uyttenhove et al. 2003). Es ist außerdem bekannt, dass APCs die Fähigkeit der Kreuzpräsentation von Tumorantigenen gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen. Dies geschieht vermutlich in Tumor-drainierenden Lymphknoten, wo das Immunsystem initial auf Tumoren aufmerksam wird (Huang et al. 1994), denn dort werden IDO-exprimierende DCs gefunden, die Antigen-spezifische T-Zell-Anergie vermitteln (Munn et al. 2004a) und T<sub>reg</sub> aktivieren können (Sharma et al. 2007).

Basierend auf diesen Erkenntnissen werden IDO-Inhibitoren als Tumorummuntherapie vorklinisch (Muller et al. 2005) und inzwischen auch in klinischen Phasen getestet (Löb et al. 2009). Bemerkenswert ist, dass 1-Methyl-L-Tryptophan bevorzugt IDO-1 hemmt, während das entsprechende D-Stereoisomer ein selektiver IDO-2-Inhibitor ist. 1-Methyl-D-Tryptophan hat einen stärkeren Antitumoreffekt als die L-Form, was vermuten lässt, dass speziell IDO-2 am Tumorummescape-Mechanismus beteiligt ist (Metz et al. 2007). In Hirntumoren ist hingegen das Isoenzym TDO aktiv; das von ihm gebildete Kynurenin aktiviert den oben erwähnten AhR-Signalweg und scheint so zum Immunescape beizutragen (Opitz et al. 2011).

Daneben spielt IDO eine Rolle in der Pathogenese der HIV-Infektion. HIV infiziert Makrophagen und induziert dort IDO (Grant et al. 2000). Dies ist zunächst einmal wenig erstaunlich, da

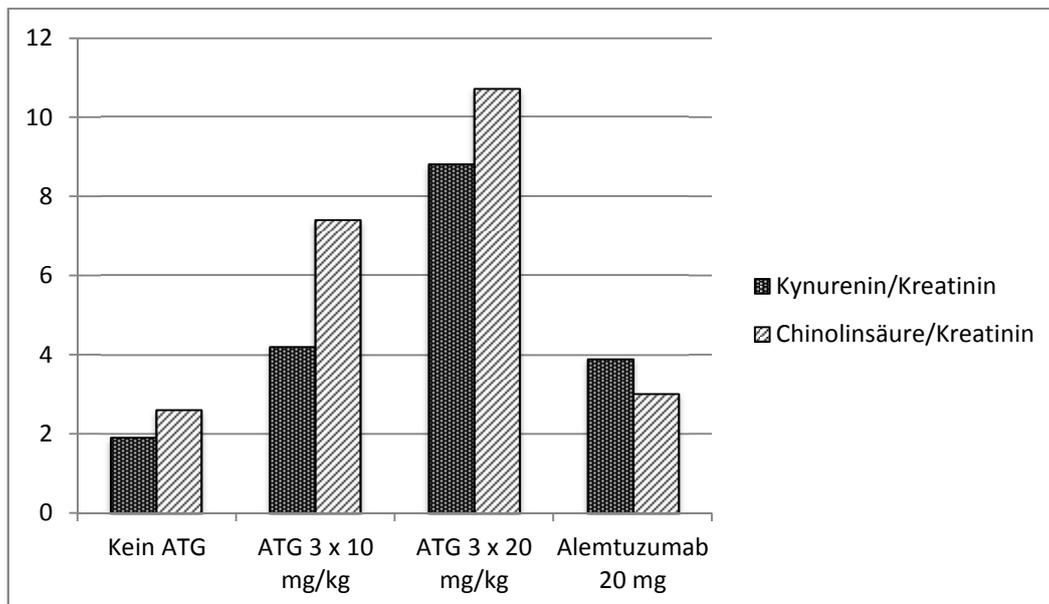
IDO wie oben erklärt generell mit Entzündungszuständen assoziiert ist und intrazelluläre Erreger durch Tryptophanaushungerung in Schach halten kann. Es kann aber auch das Gegenteil erreicht werden, indem IDO die adaptive Immunabwehr gegen das Virus behindert und die Makrophagen in der Folge als Reservoir für HIV dienen. Die bei HIV-Infektion nachgewiesenen systemisch niedrigen Tryptophanspiegel könnten zudem zur allgemeinen Immunschwäche beitragen (Fuchs et al. 1990). Ein weiterer Aspekt ist die Neurotoxizität des Tryptophanmetaboliten Chinolinsäure, die zur HIV-assoziierten Neuropathie beitragen könnte (Kerr et al. 1997).

Eine andere Wirkung von IDO auf das ZNS ist die Schaffung eines Serotoninmangels. Allgemein kann mit chronischen Entzündungen eine Affektstörung einhergehen; man spricht in diesem Zusammenhang von „inflammatorischer Depression“ (Dantzer et al. 2008). Schon früh wurde spekuliert, dass die Depression als Nebenwirkung der Behandlung mit rekombinantem IFN- $\gamma$  durch IDO verursacht werden könnte, zumal auch Serotonin als IDO-Substrat erhalten kann (Byrne et al. 1986). Inzwischen wurde in Tierversuchen gezeigt, dass IDO in der Tat an der Pathogenese von Schmerz und Depression beteiligt ist (O'Connor et al. 2009; Kim et al. 2012).

Schließlich ist IDO an der Toleranz von Transplantaten beteiligt und wird in diesem Bereich therapeutisch genutzt. Lokale IDO-Expression hemmt Abstoßungsreaktionen in der Xenotransplantation, also der Transplantation zwischen verschiedenen Spezies (Mulley et al. 2008). Mit Hilfe von Adenoviren lässt sich das IDO-1-Gen in zu transplantierende Zellen transferieren, was deren Überleben in allogenen Empfängern verlängert (Alexander et al. 2002). Auch in der GVHD scheint IDO, insbesondere im Kolon, eine wichtige Rolle zu spielen. Knock-out-Mäuse mit deaktiviertem IDO-Gen zeigen im Vergleich zum Wildtyp nach allogener HSZT vermehrte Darmentzündung und T-Zell-Infiltration und sterben schneller an GVHD (Jasperson et al. 2008). Wichtige IDO-exprimierende Zellen im Rahmen der GVHD scheinen Monozyten und APCs zu sein (Hainz et al. 2005; Jasperson et al. 2009). IDO-Hochregulierung in APCs hat daher ein therapeutisches Potenzial in der Prävention der GVHD.

## 1.7. Zielsetzung der Arbeit

In einer 2011 abgeschlossenen klinischen Studie wurden bei Patienten, die sich einer allogenen HSZT unterzogen, die durch das Enzym IDO gebildeten Tryptophanmetaboliten untersucht. Dabei fiel auf, dass es nicht nur im Rahmen einer GVHD, sondern auch am Tag der Transplantation zu einem Ansteigen sämtlicher immunsuppressiver Metaboliten kam (Landfried et al. 2011). In einer detaillierten Analyse zeigte sich, dass dieser Anstieg ausschließlich bei Patienten auftrat, die im Rahmen der Vorbehandlung zur Transplantation eine Serotherapie mit ATG erhalten hatten, und dass dieser Anstieg sogar dosisabhängig erfolgte, während zwei Patienten, die den monoklonalen Antikörper Alemtuzumab erhielten, keine deutliche Induktion zeigten (Abb. 2).



**Abb. 2: Kynurenin und Chinolinsäure im Urin von HSZT-Patienten am Transplantationstag.** Mittelwerte von im Urin gemessenem Kynurenin bzw. Chinolinsäure im Verhältnis zu Kreatinin ( $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ ). Fallzahlen: Kein ATG n=10, ATG 3 x 10 mg/kg n=17, ATG 3 x 20 mg/kg n=11, Alemtuzumab 20 mg n=2. Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne ATG-Behandlung waren signifikant für Kynurenin und Chinolinsäure, Unterschiede zwischen ATG-Dosisgruppen waren signifikant für Kynurenin. (Daten von Prof. Dr. Ernst Holler, Klinik für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Regensburg)

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von ATG im Vergleich zum Einfluss von Alemtuzumab auf humane DCs *in vitro* zu untersuchen. Der IDO-induzierende Effekt sollte auf Ebene der mRNA, auf Proteinebene sowie auf Ebene der entsprechenden Tryptophanmetaboliten untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

---

### 2.1. Kultivierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten

Durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Regensburg wurden uns die durch Leukapherese gewonnenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes gesunder Spender bereitgestellt. Daraus wurde durch Elutriation (Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Hypaque [PAN Biotech, Aidenbach] und anschließende Gegenstromzentrifugation in der Avanti Centrifuge J-20 XP [Beckman Coulter, Brea, USA]) die Fraktion der Monozyten isoliert.

#### 2.1.1. Erste Versuchsreihe

Die so gewonnenen Monozyten wurden in der ersten Versuchsreihe sieben Tage in 1,5 ml Medium pro  $1 \times 10^6$  Monozyten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, in Brutschränken des Modells BBD 6220 (Heraeus, Hanau). Das Medium setzte sich zusammen aus 90 % RPMI-1640 (PAN-Biotech) und 10 % FCS-DC (fetales Kälberserum für dendritische Zellen; BioWhittaker, Walkersville, USA).

Das RPMI-1640 wurde vor Benutzung stets mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin in den Konzentrationen 50 U/ml bzw. 50 µg/ml (Pen Strep, Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA) sowie mit der Glutamin-Quelle L-Alanyl-L-Glutamin (Biochrom, Berlin) in der Konzentration 2 mmol/l versetzt; darauf wird im weiteren Text nicht mehr gesondert hingewiesen.

Es wurden Zellkulturflaschen vom Hersteller Corning (Corning, USA) verwendet.

Zur Differenzierung in dendritische Zellen wurden den Zellkulturen die Zytokine GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor; 144 U/ml) und IL-4 (224 U/ml; beides von PeproTech, Rocky Hill, USA) hinzugegeben (Bender et al. 1996).

Bei einem Teil der Kulturen wurden an Tag 5 zur Reifungsstimulation der dendritischen Zellen 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS, aus Salmonella abortus equi; Alexis, Grünberg) in die Zellkulturflaschen gegeben; die so konditionierten Zellen werden fortan als mDC (Mature Dendritic Cells) bezeichnet.

Bei einem anderen Teil der Kulturen wurde an Tag 5 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 (mammalian derived; Peprotech) in die Zellkulturflaschen gegeben; die auf diese Weise konditionierten Zellen werden fortan tDCs (TGF-treated Dendritic Cells) genannt.

Nach sieben Tagen wurden die Zellen mit einem Umkehrmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Oberkochen) hinsichtlich ihrer Morphologie inspiziert, geerntet und die entstandenen dendritischen Zellen gezählt. Dazu wurde eine Neubauer-Zählkammer (Marienfeld, Lauda-Königshofen) benutzt.

Anschließend wurden dendritische Zellen in der Konzentration  $1 \times 10^6$  pro 1 ml Medium, bestehend aus 98 % RPMI-1640 und 2 % AB-Serum (humanem Serum der Blutgruppe AB; PAN Biotech), in Well-Platten gegeben und mit verschiedenen Konzentrationen der Medikamente ATG-Fresenius S<sup>®</sup>, Alemtuzumab (MabCampath<sup>®</sup>, Genzyme) oder Interferon  $\gamma$ -1b (Imukin<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim) versetzt.

Nach 24 Stunden wurde der Inhalt der Wells unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Cell Scraper 25 cm, Sarstedt, Nümbrecht) geerntet, abzentrifugiert, der Überstand eingefroren (siehe 2.4.), das Zellpellet zweimal mit PBS (Dulbecco's PBS, PAA Laboratories, Pasching, Österreich) gewaschen und anschließend lysiert (siehe 2.2. bzw. 2.3.).

### **2.1.2. Zweite Versuchsreihe**

In der zweiten Versuchsreihe wurden jeweils  $5 \times 10^6$  Monozyten in 7,5 ml Medium (90 % RPMI-1640, 10 % FCS-DC, dazu 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4) für acht Tage bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei einem Teil der Zellen wurden die Substanzen LPS (10 ng/ml) oder IFN- $\gamma$  (200 U/ml) nach sechs Tagen hinzugegeben.

Für einen zusätzlichen Ansatz bestand das Medium aus 98 % RPMI-1640 und 2 % AB-Serum; auf Zytokine wurde hier verzichtet.

ATG oder Alemtuzumab wurden in der festen Konzentration von 100  $\mu$ g/ml zeitgleich mit den Zellen (Tag 0), nach sechs Tagen oder zu diesen beiden Zeitpunkten direkt in die Zellkulturflaschen gegeben.

Nach Ablauf der acht Tage wurden die Zellen mit dem Durchlichtmikroskop Evos XL (AMG, Bothel, USA) fotografiert, der Inhalt der Zellkulturflaschen abzentrifugiert, 2 ml vom Überstand

eingefroren und die entstandenen dendritischen Zellen gezählt, einmal mit PBS gewaschen und anschließend lysiert oder für die Durchflusszytometrie verwendet.

## **2.2. Quantifizierung von mRNA der Gene IDO-1 und IDO-2 mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für das Lysieren der kultivierten Zellen sowie die Isolation der enthaltenen RNA wurde bei einem Teil der Proben der RNeasy Kit (Qiagen, Hilden), bei einem anderen Teil der Proben der peqGOLD Total RNA Kit (Peqlab Biotechnologie, Erlangen) gemäß den Anleitungen der Hersteller benutzt.

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit dem NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer unter Verwendung der gleichnamigen Software (beides von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt.

Zusätzlich wurde die Qualität der RNA mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit gemäß Anleitung überprüft. Dabei kamen das Gerät Agilent 2100 Bioanalyzer und die Software 2100 Expert (alles von Agilent Technologies, Santa Clara, USA) zum Einsatz.

Anschließend wurde die isolierte RNA mittels Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) in eine komplementäre cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden 0,5 µg RNA aus jeder Probe mit DNase- und RNase-freiem Wasser (Gibco, Life Technologies) auf ein Volumen von 13 µl verdünnt.

Als Nächstes wurden jeweils 1 µl Random Decamers (Primer mit einer zufälligen Sequenz aus zehn Basen; Ambion, Life Technologies) und 1 µl Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP) dazugegeben. Die dNTP waren eine Mischung aus 60 µl RNase- und DNase-freiem Wasser sowie je 10 µl dATP, dGTP, dTTP und dCTP aus dem Ultrapure dNTP Set (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) oder alternativ aus dem Deoxynucleoside Triphosphate Set (Roche Diagnostics, Mannheim).

Mit dem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, St. Bruno, Kanada) durchliefen die Proben das folgende Heizprogramm:

1. 65 °C für 5 Minuten
2. 42 °C für 2 Minuten
3. 42 °C für 50 Minuten
4. 70 °C für 15 Minuten

Nach Schritt 1 wurden jeweils 4 µl Fünffachpuffer (M-MLV RT 5x Buffer) und nach Schritt 2 1 µl reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase; beides von Promega, Madison, USA) zum Starten der Reaktion hinzupipettiert.

In der quantitativen Realtime-PCR (qRT-PCR) wird aus der gesamten cDNA nur die DNA eines bestimmten Gens mithilfe der sequenzspezifischen Primer vervielfältigt. Wir verglichen die Menge der produzierten DNA des gesuchten Gens mit der produzierten DNA des „Housekeepers“ 18S-rRNA. Da 18S-rRNA von allen Zellen gleichmäßig exprimiert wird, kann man im Ergebnis beurteilen, in welchen Proben das gesuchte Gen relativ stark und in welchen Proben es relativ wenig exprimiert wurde. Das Verfahren nennt sich Realtime-PCR, weil das Gerät in Echtzeit mithilfe eines den Proben zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs, der sich in die Doppelstrang-DNA einlagert, die DNA-Menge bei jedem Heizzyklus misst.

Für die qRT-PCR wurde von einer 1:10-Verdünnung der cDNA-Proben jeweils 1 µl eingesetzt. Hinzu kamen jeweils 5 µl vom Farbstoff SYBR Green I (QuantiFast SYBR Green, Qiagen; Produkt enthält Taq-Polymerase), 3 µl RNase- und DNase-freies Wasser, 0,5 µl Forward-Primer und 0,5 µl Reverse-Primer. Die Primer wurden zuvor 1:10 in RNase- und DNase-freiem Wasser verdünnt.

Im Folgenden sind die als Primer verwendeten Oligonukleotide mit ihrer Basensequenz aufgelistet (alle von Eurofins MWG Operon, Ebersberg):

- 18S-rRNA forward: 5'-ACC GAT TGG ATG GTT TAG TGA G-3'
- 18S-rRNA reverse: 5'-CCT ACG GAA ACC TTG TTA CGA C-3'
- IDO-1 forward: 5'-GGT CAT GGA GAT GTC CGT AAG GT-3'
- IDO-1 reverse: 5'-CCA GTT TCT TGG AGA GTT GGC AG-3'
- IDO-2 forward: 5'-GCA-TTC GTC ATA GCA AGG AAA GTG G-3'
- IDO-2 reverse: 5'-CTG TCA GCA AGT GGT CCT GTC-3'

Die qRT-PCR fand dann im Realplex Mastercycler statt, die Aufzeichnung und Auswertung der Daten geschah mit der gleichnamigen Software (Eppendorf, Hamburg).

Das qRT-PCR-Programm wies folgende Heizzyklen auf:

1. 95 °C für 5 min
  2. 95 °C für 8 s
  3. 60 °C für 20 s
  4. 95 °C für 15 s
  5. 60 °C für 15 s
  6. 60 °C - 95 °C für 10 min
  7. 95 °C für 15 s
- } 45x

### 2.3. Nachweis von IDO mittels Western Blot

Die kultivierten Zellen eines Versuchsansatzes (siehe 2.1.) wurden mit jeweils 100 µl RIPA Buffer (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; diesem zugesetzt wurde zuvor auf ein Volumen von 10 ml eine Tablette des Complete Mini Protease Inhibitor von Roche Diagnostics) lysiert und danach bei -80 °C aufbewahrt.

Als nächster Schritt wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben photometrisch ermittelt. Dabei wurde mit dem D<sub>C</sub> Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) gemäß Anleitung gearbeitet. Als Photometer wurde der E-max Precision Microplate Reader (MWG-Biotech, Ebersberg) mit der Software „SOFTmax“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) verwendet.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurde ein Gel hergestellt, das in seinem unteren Anteil aus einer in Tabelle 4 beschriebenen Stammlösung, 1 ‰ TEMED (Tetramethylethyldiamin, Sigma-Aldrich) und 6 ‰ in 10-prozentiger APS-Lösung (Ammoniumperoxodisulfat, Merck, Darmstadt), in seinem oberen Anteil aus einer ebenfalls in Tabelle 4 beschriebenen Stammlösung, 1 ‰ TEMED und 8 ‰ 10-prozentiger APS-Lösung bestand.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Stammlösungen für die Western-Blot-Gele**

	<b>Untergel-Stammlösung</b>	<b>Obergel-Stammlösung</b>
Tris/HCl-Lösung (Tris[hydroxymethyl]aminomethan [USB, Cleveland, USA], auf den angegebenen pH-Wert titriert mit HCl [Merck])	25 ml; 1,5 M; pH 8,8	25 ml; 0,5 M; pH 6,8
10-prozentige SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat, Sigma-Aldrich)	1 ml	1 ml
30-prozentige Acrylamid-Lösung (Rotiphorese® Gel 30; Carl Roth, Karlsruhe)	40 ml	17 ml
Aqua bidestillata	34 ml	57 ml

Alle oben genannten Lösungen wurden mit Aqua bidestillata angesetzt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in einer Laufappatur von Biometra (Göttingen) unter Zugabe von Laemmli-Elektrodenpuffer (8 mM Tris, 0,19 M Glycin [Merck], 0,1 % SDS in Aqua bidestillata). In die Taschen dieses Gels wurden jeweils 5 µg Protein, mit PBS auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt und zusätzlich mit 10 µl SDS-Probenpuffer (siehe unten) versetzt, pipettiert.

Der SDS-Probenpuffer setzte sich folgendermaßen zusammen:

- 10 ml Glycerin (Sigma-Aldrich)
- 5 ml 1 M Tris/HCl-Lösung, pH 6,8
- 2 g SDS
- 5 ml 2-Mercaptoethanol (Gibco, Life Technologies)
- 10 mg Bromphenolblau (Sigma-Aldrich)

Als Standardprobe zum Vergleich der Molekulargewichte diente Kaleidoscope Precision Plus Protein (Bio-Rad Laboratories). Mit dem Gerät Blue Power Plus (SERVA Electrophoresis, Heidelberg) wurde eine Spannung von zunächst 60 V, dann 110 V erzeugt.

Für das Blotting, also das Übertragen der Proteinbanden vom Gel auf eine Membran, auf der sie mit Antikörpern markiert und sichtbar gemacht werden können, wurde eine Blotapparatur von Biometra verwendet. Auf deren untere Fläche, die der Anode entspricht, wurden nacheinander folgende Schichten gelegt:

- drei Lagen Filterpapier (Whatman Chromatography Paper 3 mm, GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) getränkt in einen Puffer aus 0,3 M Tris/HCl-Lösung (pH 10,4) und 20 % Methanol (Merck)
- drei Lagen Filterpapier getränkt in einen Puffer aus 25 mM Tris/HCl-Lösung (pH 10,4) und 20 % Methanol
- eine Blotmembran (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore, Billerica, USA)
- das SDS-Gel (siehe oben)
- drei Lagen Filterpapier getränkt in einen Puffer aus 4 mM  $\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure (Sigma-Aldrich) und 20 % Methanol

Mit dem bereits zuvor benutzten Gerät Blue Power Plus wurde eine Spannung von 11 V erzeugt.

Nach erfolgtem Blotten wurden die unspezifischen Bindungen mithilfe einer Blocklösung blockiert, welche aus einer 5-prozentigen Lösung von Magermilchpulver (Sucofin, TSI, Zeven) in TBS-Tween bestand. Mit TBS-Tween wird hier eine Lösung aus 0,1 % TWEEN 20 (Sigma-Aldrich) in TBS-Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl [Merck]) bezeichnet.

Danach wurde die Blotmembran mit den Antikörpern inkubiert; die Angaben hierzu finden sich in Tabelle 5. Vor und nach jeder Antikörper-Inkubation wurde die Blotmembran jeweils dreimal in TBS-Tween gewaschen.

**Tabelle 5: Für den Western Blot verwendete Antikörper**

<b>IDO</b>	
<b>Primärantikörper</b>	Mouse anti IDO
Hersteller:	Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA)
Verdünnung:	1 : 2.000
Inkubationszeit:	1 Stunde
<b>Sekundärantikörper</b>	Goat anti Mouse, konjugiert mit HRP
Hersteller:	Dako (Glostrup, Dänemark)
Verdünnung:	1 : 2.500
Inkubationszeit:	1 Stunde
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	
<b>Primärantikörper</b>	Goat anti $\beta$ -Aktin
Hersteller:	Abcam (Cambridge, UK)
Verdünnung:	1 : 1.000
Inkubationszeit:	1,5 Stunden

<b>Sekundärantikörper</b>	Rabbit anti Goat, konjugiert mit HRP
Hersteller:	Dako
Verdünnung:	1 : 2.000
Inkubationszeit:	1 Stunde

Vor dem Entwickeln der Proteinbanden auf einem Film wurde die Blotmembran kurzzeitig in eine Enhanced Chemilumineszenz-Mischung (ECL-Mix) gelegt. Diese war folgendermaßen zusammengesetzt:

- 200 ml Wasser
- 20 ml Tris/HCl-Lösung, pH 8
- 2 ml 250 mM Lösung von Luminol-Natrium-Salz (Sigma-Aldrich) in Wasser
- 0,9 ml 90 mM Lösung von p-Coumarinsäure in Dimethylsulfoxid (beides von Sigma-Aldrich)

Zu 10 ml ECL-Mix wurden frisch 3 µl 30-prozentige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Fisher, Saarbrücken) gegeben.

Schließlich wurde ein Film (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) für eine Zeitspanne zwischen wenigen Sekunden bis wenigen Minuten belichtet und in dem Gerät Curix 60 (AGFA, Mortsel, Belgien) entwickelt.

Zum Ablösen der Antikörper von der Blotmembran, bevor mit einem neuen Antikörper inkubiert wurde, wurde die Re-Blot Plus Mild Solution (Millipore) verwendet.

## **2.4. Messung von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie**

Überstände aus den abzentrifugierten Zellkulturen (siehe 2.1.) wurden bei -20 °C aufbewahrt. Mittels Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurden die Konzentrationen von Tryptophan und verschiedenen Tryptophanmetaboliten in den Überständen gemessen.

Die massenspektrometrischen Messungen wurden freundlicherweise durch das Institut für Funktionelle Genomik der Universität Regensburg übernommen. An dieser Stelle sei auf die

Veröffentlichung von Wentao Zhu et al. in *Analytical and Bioanalytical Chemistry* hingewiesen, in der auf die Methode der quantitativen Bestimmung von Tryptophanmetaboliten durch LC-MS/MS eingegangen wird (Zhu et al. 2011).

## **2.5. Detektion von Oberflächenantigenen mittels Durchflusszytometrie**

Für die Detektion verschiedener Oberflächenantigene wurden die Zellen mit fluoreszenzgefärbten Antikörpern gegen diese Antigene markiert und anschließend mittels FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) analysiert. Die verwendeten Antikörper waren entweder mit dem Farbstoff PE (Phycoerythrin) oder FITC (Fluoresceinisothiocyanat) gekoppelt.

Jeweils 500.000 kultivierte Zellen (siehe 2.1.) wurden zweimal mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Der FACS-Puffer bestand aus PBS, versetzt mit 0,6 mg/ml Octagam<sup>®</sup> (Octapharma, Langenfeld) und 0,1 % NaN<sub>3</sub> (Merck). Den gewaschenen Zellen wurden Antikörper gegen CD1a (mit PE markiert), CD14 (FITC), CD83 (FITC), HLA-DR (FITC), CD80 (FITC) und CD86 (FITC) oder CD209 (PE), CD11b (FITC), CD11c (FITC) und CD18 (FITC) und CD54 (FITC) jeweils in der in der Produktbeschreibung empfohlenen Menge hinzugegeben. Zusätzlich zu den spezifischen Antikörpern wurde auch jeweils ein unspezifischer, mit PE oder FITC markierter Antikörper der entsprechenden Ig-Klasse als Isotypkontrolle verwendet. Die Antikörper stammten von Beckman Coulter (CD1a, CD14, CD83, HLA-DR, Isotypen), BD Biosciences (Franklin Lakes, USA; CD80, CD86), R&D Systems (Minneapolis, USA; CD209 = DC-SIGN), eBioscience (San Diego, USA; CD11b, CD11c, CD18) sowie Cymbus Biotechnologies (Southampton, Großbritannien; CD54).

Nach 20 Minuten bei 4 °C im Dunkeln folgten zwei weitere Waschschriffe mit FACS-Puffer, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen, und die Fixierung mit 300 µl 1-prozentigem Paraformaldehyd (Merck). Die Messungen erfolgten am Gerät FACSCalibur und wurden mit der Software CellQuest Pro (beide von BD Biosciences) ausgewertet.

## 2.5. Statistik

Bei Stichproben aus mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden der Mittelwert (arithmetisches Mittel) und die Standardabweichung ausgerechnet.

Die statistische Signifikanz von Unterschieden verschiedener Ansätze wurde mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test geprüft. Hierbei wurden die Werte  $p \leq 0,05$  als signifikant (\*),  $p \leq 0,01$  als sehr signifikant (\*\*) und  $p \leq 0,001$  als höchst signifikant (\*\*\*) betrachtet.

## 3. Ergebnisse

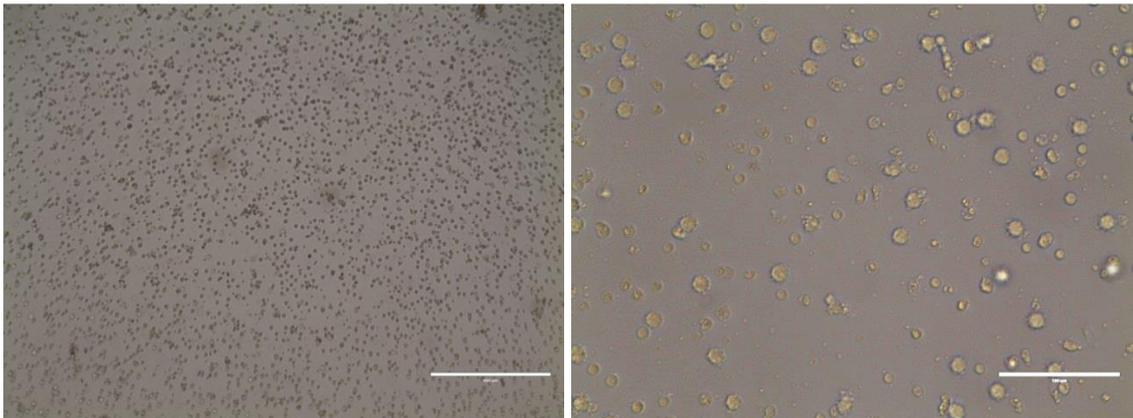
---

### 3.1. Zellkulturen

#### 3.1.1. Morphologische Auffälligkeiten von kultivierten dendritischen Zellen bei Zugabe verschiedener Stimuli

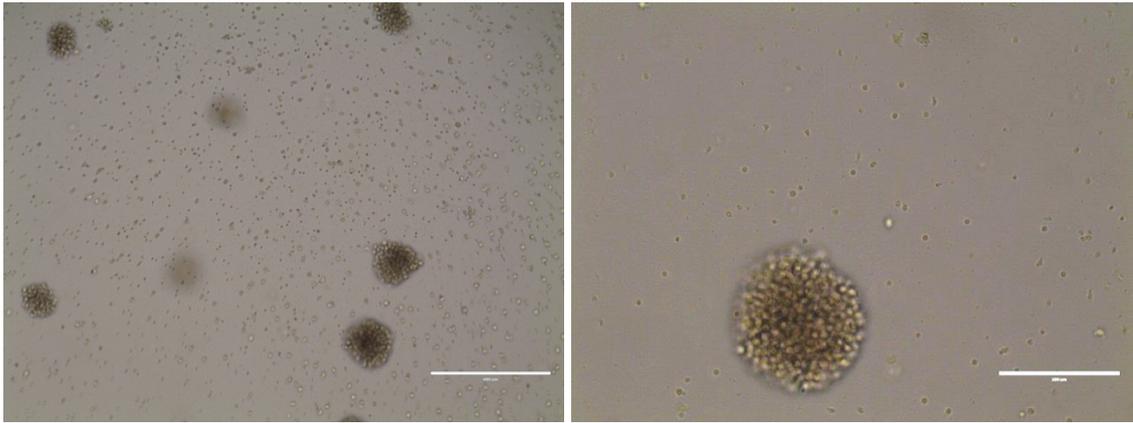
Im Rahmen der Zellkulturen fiel auf, dass sich die Morphologie der Zellen deutlich unterschied, je nachdem, wie die Zellen behandelt worden waren.

Die dendritischen Zellen, die nicht mit Antikörpern in Berührung gekommen waren, lagen am Ende der Inkubationszeit als runde Zellen überwiegend einzeln vor. Typische Zellausläufer waren lichtmikroskopisch nicht zu erkennen (Abb. 3).



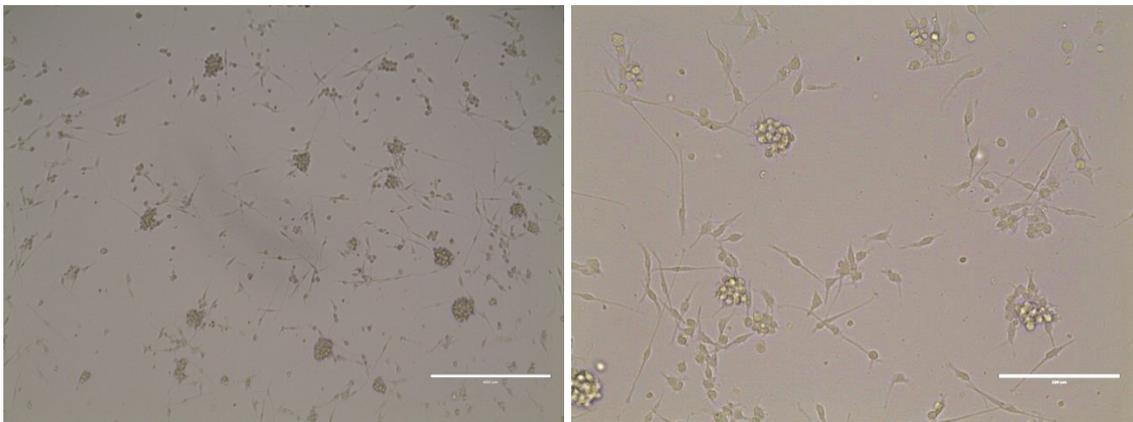
**Abb. 3: Zellkulturfotos Negativkontrolle.**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Fotografiert an Tag 8. Links Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400  $\mu\text{m}$ ). Rechts Vergrößerung 20 x (weißer Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). Exemplarische Bilder aus vier unabhängigen Experimenten.

Wurde hingegen LPS hinzugefügt, so fanden sich viele Zellen zu großen Aggregaten zusammen (Abb. 4).



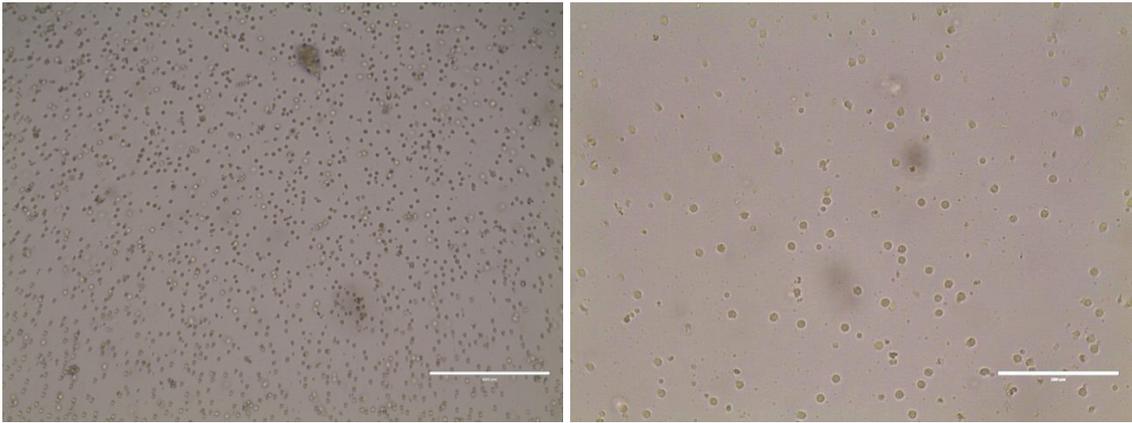
**Abb. 4: Zellkulturfotos LPS.**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4), zusätzlich Gabe von 10 ng/ml LPS an Tag 6. Fotografiert an Tag 8. Links Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400  $\mu\text{m}$ ). Rechts Vergrößerung 20 x (weißer Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). Exemplarische Bilder aus vier unabhängigen Experimenten.

Bei Zugabe von ATG bildeten sich größere Zellen mit jeweils zwei länglichen, in entgegengesetzte Richtungen zeigenden Ausläufern. Andere Zellen aggregierten zu kleinen Verbänden (Abb. 5).



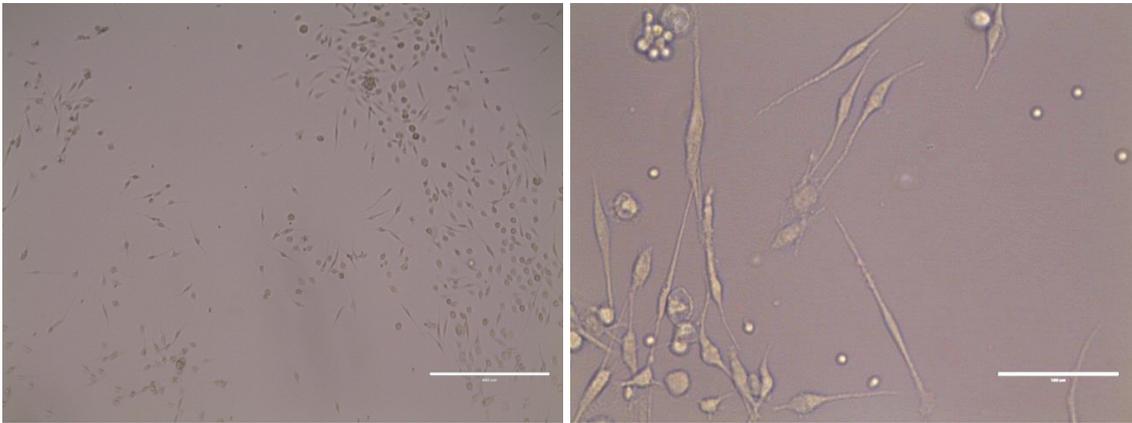
**Abb. 5: Zellkulturfotos ATG.**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4), zusätzlich Gabe von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ATG an Tag 6. Fotografiert an Tag 8. Links Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400  $\mu\text{m}$ ). Rechts Vergrößerung 20 x (weißer Balken entspricht 200  $\mu\text{m}$ ). Exemplarische Bilder aus vier unabhängigen Experimenten.

Derartige Veränderungen traten bei den Kulturen mit Alemtuzumab nicht auf. Die Alemtuzumab-behandelten Zellen präsentierten sich ähnlich wie die oben gezeigten Zellen der Negativkontrolle (Abb. 6).



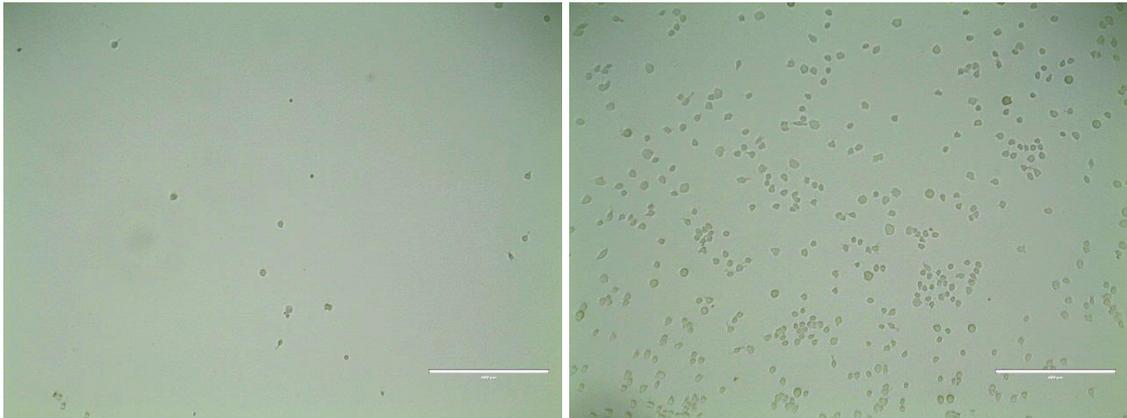
**Abb. 6: Zellkulturfotos Alemtuzumab.**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4), zusätzlich Gabe von 100 µg/ml Alemtuzumab an Tag 6. Fotografiert an Tag 8. Links Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400 µm). Rechts Vergrößerung 20 x (weißer Balken entspricht 200 µm). Exemplarische Bilder aus vier unabhängigen Experimenten.

Wurde schließlich ATG in die Zellkulturflaschen gegeben, die Zytokine GM-CSF und IL-4 aber weggelassen, so entstanden ebenfalls längliche Zellen, die allerdings deutlich weniger dicht lagen als in den anderen Ansätzen (Abb. 7).



**Abb. 7: Zellkulturfotos ATG ohne Zytokine.**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC), zusätzlich Gabe von 100 µg/ml ATG an den Tagen 0 und 6. Fotografiert an Tag 8. Links Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400 µm). Rechts Vergrößerung 40 x (weißer Balken entspricht 100 µm). Exemplarische Bilder aus vier unabhängigen Experimenten.

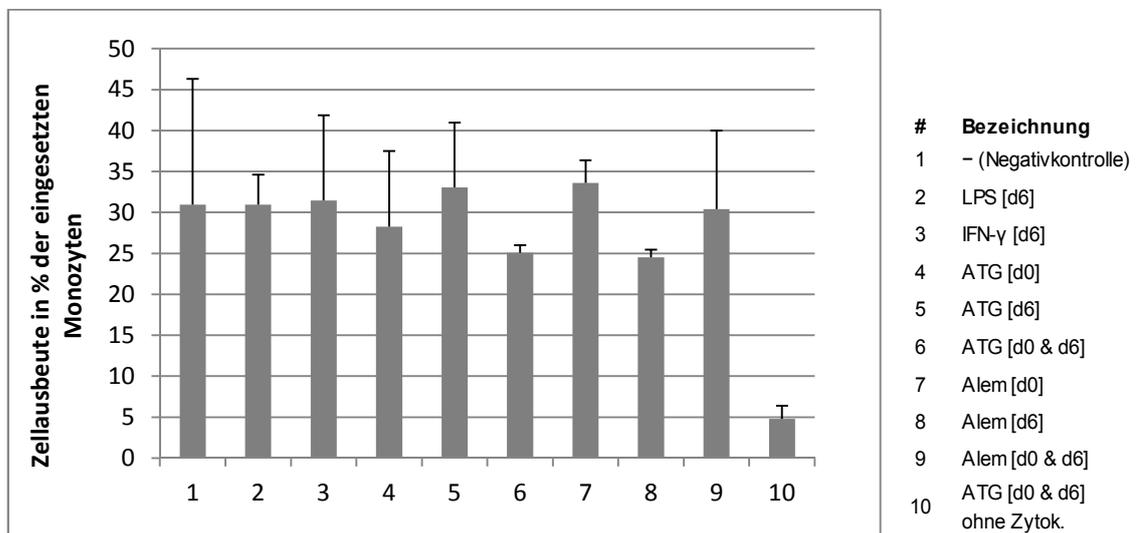
Beim Betrachten der leeren Zellkulturflaschen nach Ernte der Zellen konnte man feststellen, dass bei den IFN- $\gamma$ -Proben erheblich mehr adhärenzte Zellen in den Flaschen verblieben waren als bei allen anderen Proben (Abb. 8).



**Abb. 8: Fotos leere Zellkulturflaschen ohne und mit IFN- $\gamma$ .**  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Links keine weiteren Zusätze, rechts zusätzlich Gabe von 200 U/ml IFN- $\gamma$  an Tag 6. Fotografiert an Tag 8 nach (!) Ernte. Vergrößerung 10 x (weißer Balken entspricht 400  $\mu$ m).

### 3.1.2. Zellausbeute

Bei der Zellausbeute zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit der verschiedenen Zusätze. Im Mittel konnten etwa zwischen 25 und 30 Prozent der eingesetzten Monozyten nach acht Tagen als intakte Zellen gezählt werden (Abb. 9).



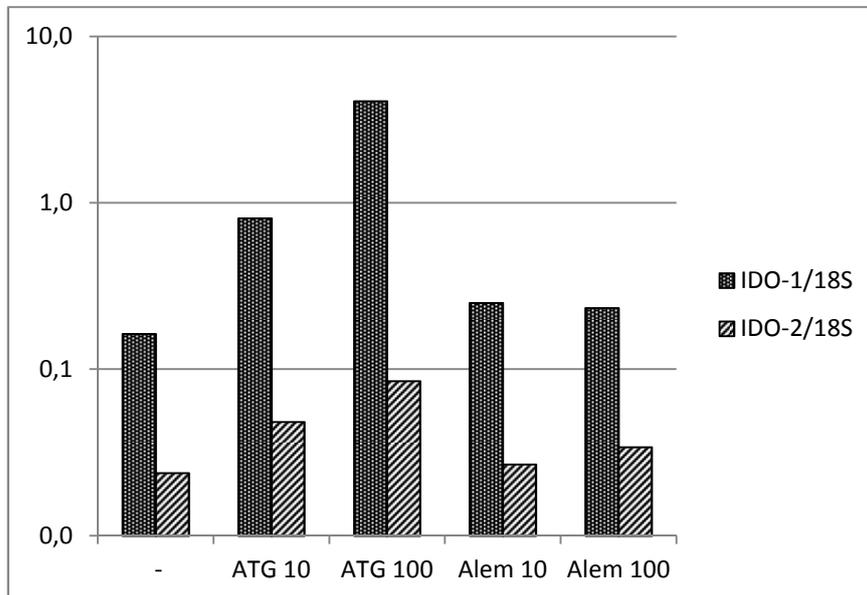
**Abb. 9: Zellausbeute.** Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen. Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze zu den in eckigen Klammern angegebenen Zeitpunkten direkt in die Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ansatz ATG [d0 & d6] ohne Zytok.: GM-CSF und IL-4 wurden weggelassen. Ernte an Tag 8, Zählen der überlebenden Zellen.

## 3.2. Induktion der Transkription von IDO-1 und IDO-2

### 3.2.1. IDO-mRNA in Abhängigkeit von der gegebenen ATG-Dosis

Die Auswertung der quantitativen Realtime-PCR ergab, dass die mRNA der Gene IDO-1 und IDO-2 vermehrt in den mit LPS, aber auch in den mit ATG behandelten Proben vorlag.

Im ersten Versuchsansatz, in dem die Monozyten zunächst sieben Tage zu dendritischen Zellen differenzierten und erst danach, für 24 Stunden in Well-Platten, mit ATG oder Alemtuzumab inkubiert wurden, ist eine dosisabhängige IDO-Induktion durch ATG erkennbar. Alemtuzumab bewirkt keine gesteigerte IDO-Transkription (Abb. 10).



**Abb. 10: Expression von IDO-1 bzw. IDO-2 relativ zu 18S abhängig von der Konzentration der gegebenen Zusätze.** n = 1. Zellkultur: Monozyten inkubiert in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). An Tag 7 Ernte und je  $1 \times 10^6$  Zellen inkubiert in 1 ml Medium (98 % RPMI, 2 % AB-Serum) in 6-Well-Platte für 24 h mit/ohne ATG/Alemtuzumab (Konzentrationen in  $\mu\text{g/ml}$ ).

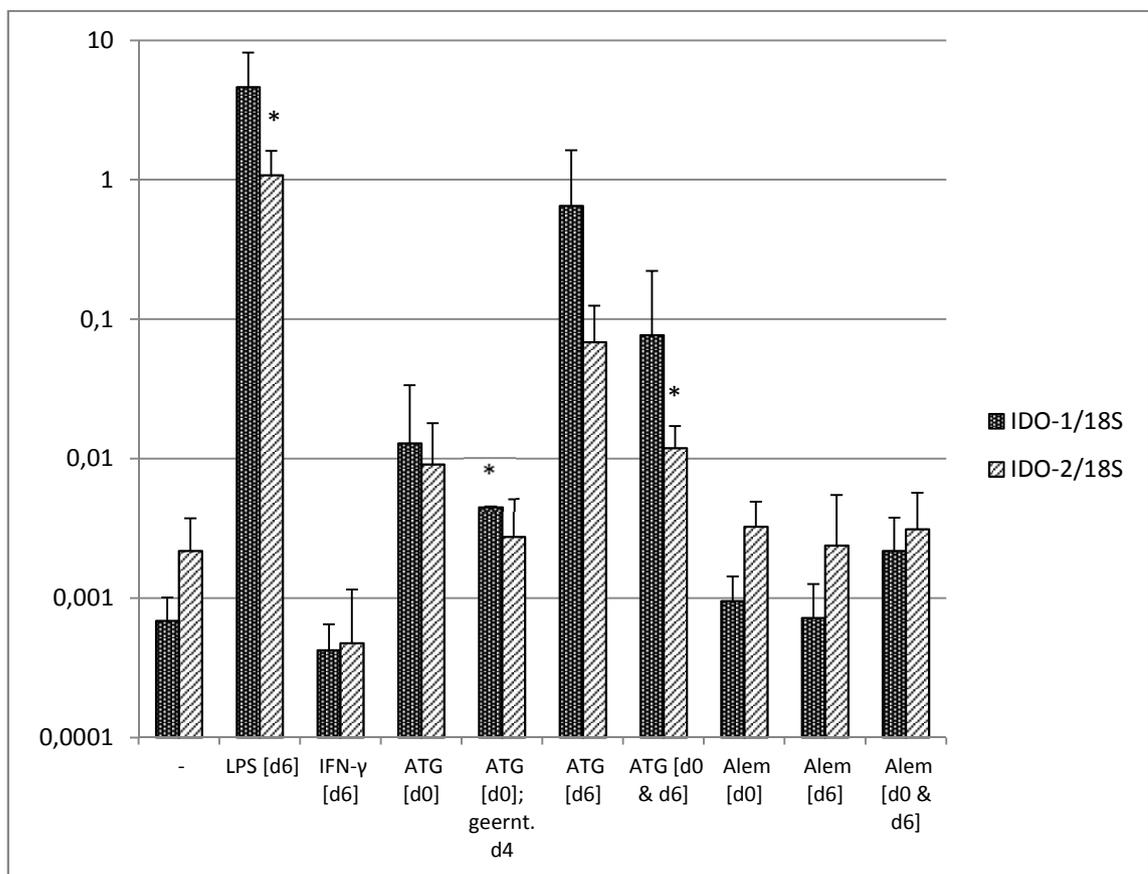
### 3.2.2. IDO-mRNA in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze

Bei den Zellkulturen, in denen die Zusätze bereits zu früheren Zeitpunkten hinzugefügt wurden, zeigte LPS die größte IDO-Induktion, wobei diese in unseren Versuchen, verglichen mit der Negativkontrolle, signifikant war für IDO-2.

Auch bei Zugabe von ATG stieg die gemessene Menge an IDO-mRNA deutlich. IDO-1 stieg stärker als IDO-2. Am größten war der Effekt bei ATG-Gabe erst an Tag 6, bei einer Gesamtkulturdauer von acht Tagen. Signifikant war die Zunahme von IDO-1 bei Gabe an Tag 0 und Ernte bereits an Tag 4 sowie von IDO-2 bei Gabe an Tag 0 und Tag 6 und Ernte an Tag 8.

Bei den Zellen, die mit Alemtuzumab behandelt waren, waren die Unterschiede zur Negativkontrolle vergleichsweise gering. Hier wurde allerdings IDO-2 stärker exprimiert als IDO-1.

IFN- $\gamma$  bewirkte in unseren Versuchen eine geringere IDO-Expression als die Negativkontrolle, diese Ergebnisse sind jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 11).

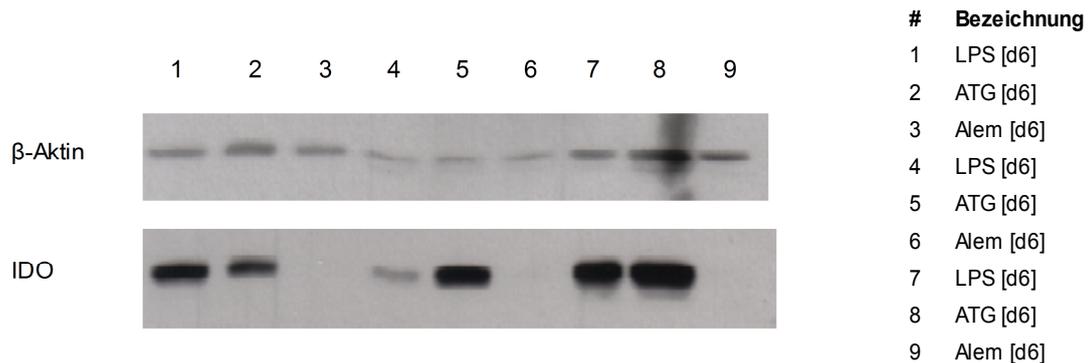


**Abb. 11: Expression von IDO-1 bzw. IDO-2 relativ zu 18S abhängig vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze.** Mittelwerte aus je nach Ansatz zwei bis vier gleichartigen Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen. Zellkultur: je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze zu den in eckigen Klammern angegebenen Zeitpunkten direkt in die Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ernte an Tag 8 (ATG [d0] geernt. d4: bereits an Tag 4). Ansätze mit  $p \leq 0,05$  sind mit \* gekennzeichnet.

### 3.3. Induktion von IDO auf Proteinebene

#### 3.3.1. Nachweis von IDO in Abhängigkeit vom gegebenen Stimulus

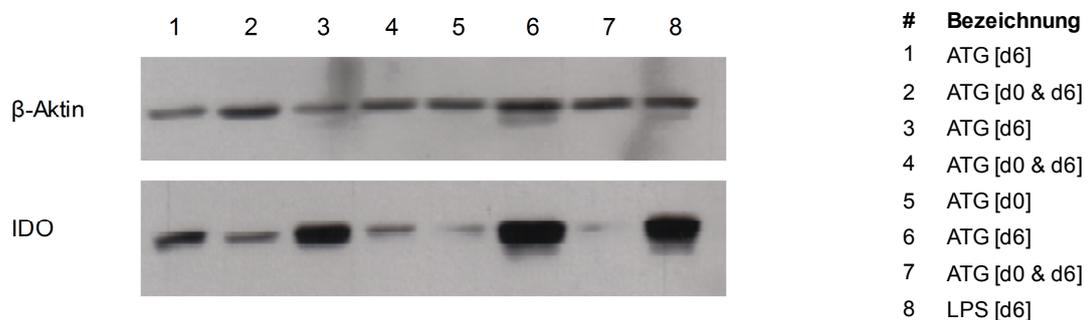
Im Western Blot konnte IDO-Protein in den Proben nachgewiesen werden, die mit LPS oder mit ATG behandelt waren, nicht aber in den mit Alemtuzumab behandelten Proben (Abb. 12).



**Abb. 12: Western-Blot-Analyse der Expression von IDO in Abhängigkeit des gegebenen Stimulus.** Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze an Tag 6 direkt in die Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ernte an Tag 8. Die  $\beta$ -Aktin-Färbung dient als Beladungskontrolle.

#### 3.3.2. Nachweis von IDO in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ATG-Gabe

Wurde ATG zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Zellkultur gegeben, zeigte sich Folgendes: Bei einer Kulturdauer von acht Tagen ergab die einmalige ATG-Gabe an Tag 6 im Western Blot ein stärkeres IDO-Signal als die zweimalige Gabe an Tag 0 und Tag 6 sowie die einmalige Gabe nur an Tag 0 (Abb. 13).



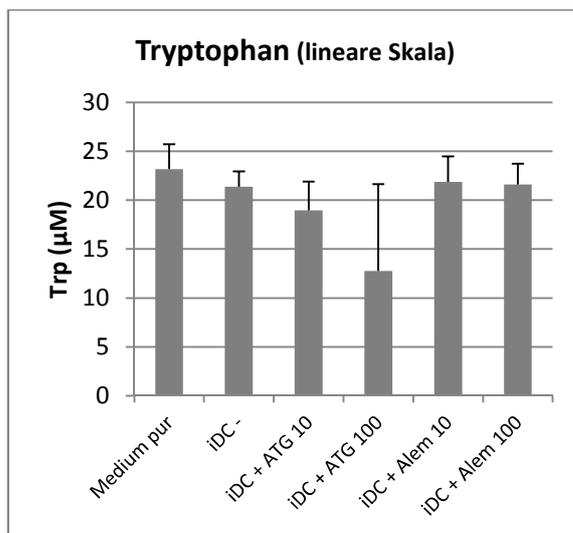
**Abb. 13: Western-Blot-Analyse der Expression von IDO in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ATG-Gabe.** Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze zu den in eckigen Klammern angegebenen Zeitpunkten direkt in die

Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; ATG: 100 µg/ml). Ernte an Tag 8. Die β-Aktin-Färbung dient als Beladungskontrolle.

### 3.4. Veränderung der Konzentrationen von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten

#### 3.4.1. Effekte auf ausdifferenzierte dendritische Zellen

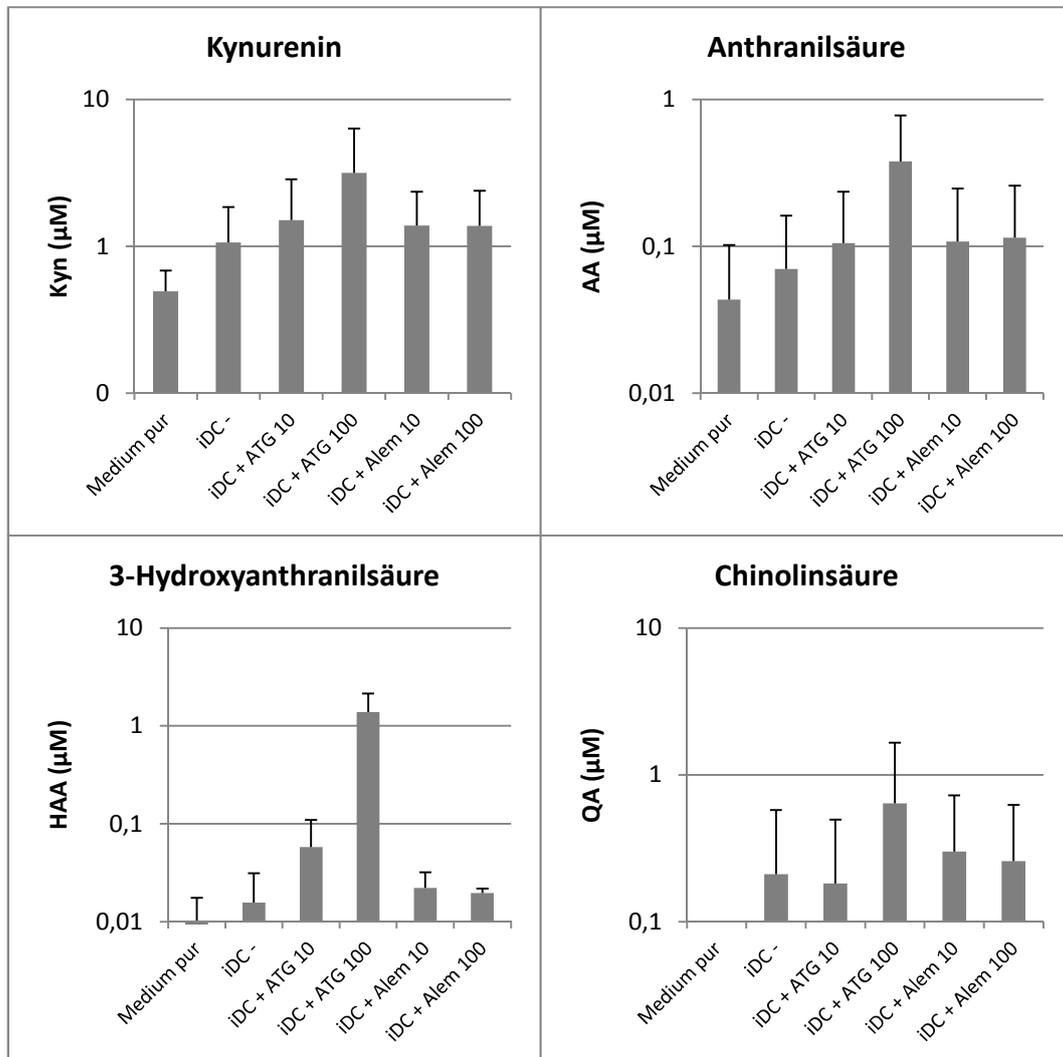
Wurden die Monozyten zunächst für sieben Tage zur Differenzierung zu dendritischen Zellen gebracht und dann für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen ATG inkubiert, resultierte eine dosisabhängige Abnahme der massenspektrometrisch im Überstand gemessenen Tryptophan-Konzentration: je mehr ATG, desto weniger Tryptophan. Der analoge Versuchsaufbau mit Alemtuzumab ergab keine derartige Veränderung (Abb. 14).



**Abb. 14: Dosisabhängige Tryptophan-Konzentration.** n = 3 oder 2 (Alem). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen. Zellkultur: Monozyten inkubiert in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). An Tag 7 Ernte und je  $1 \times 10^6$  Zellen inkubiert in 1 ml Medium (98 % RPMI, 2 % AB-Serum) in 6-Well-Platte für 24 h mit/ohne ATG/Alemtuzumab (Konzentrationen in µg/ml).

Die Konzentrationen der im Überstand gemessenen Tryptophanmetaboliten Kynurenin, Anthranilsäure und 3-Hydroxyanthranilsäure stiegen in Abhängigkeit der gegebenen ATG-Dosis, wo-

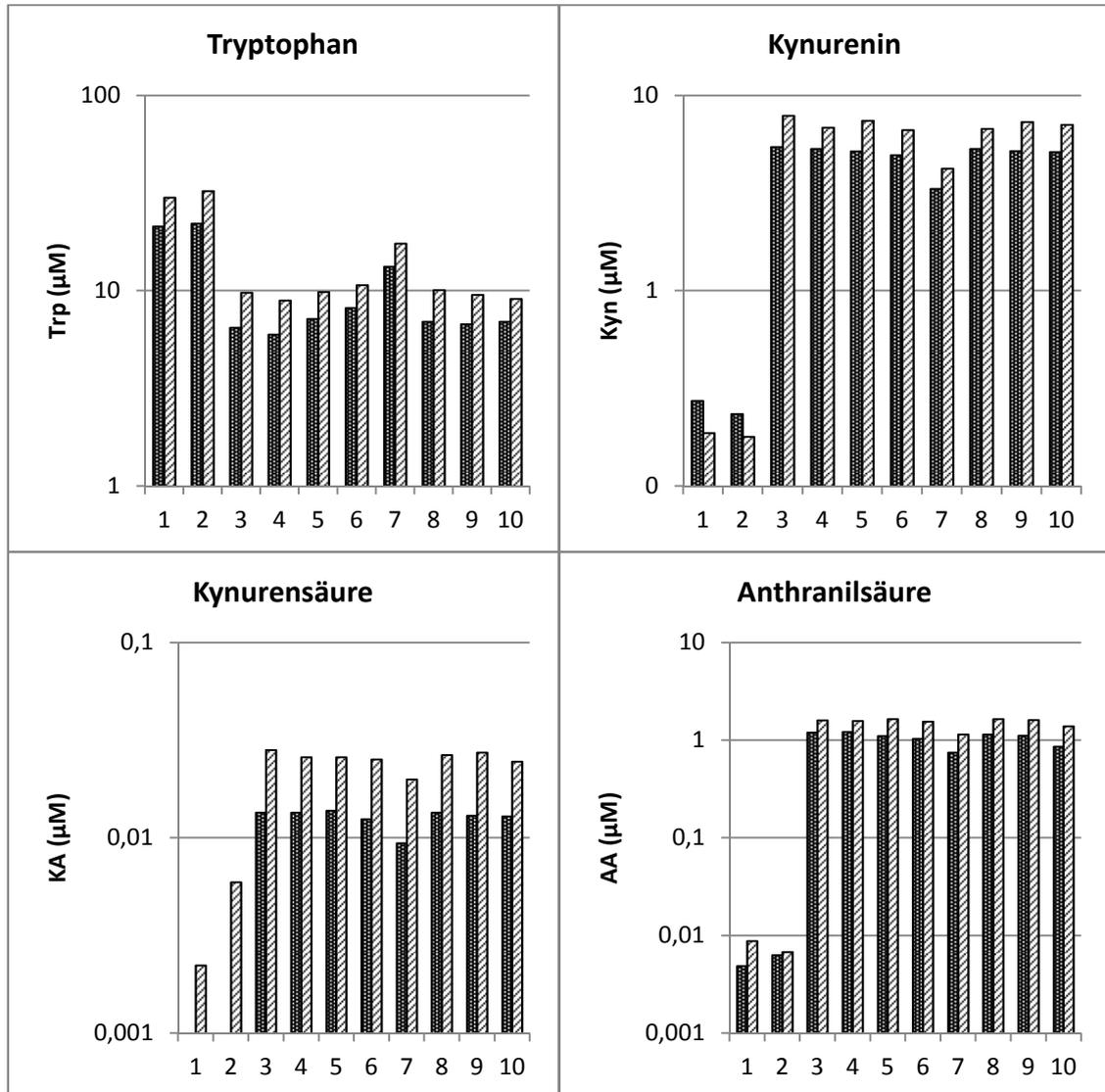
bei Alemtuzumab wiederum keinen derartigen Effekt tätigte. Für Chinolinsäure war ein Anstieg nur bei Gabe der höheren Dosis von 100 µg/ml ATG zu sehen (Abb. 15).



**Abb. 15: Dosisabhängige Konzentration von Tryptophanmetaboliten.** n = 3 oder 2 (Alem). Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen. Im ersten Ansatz (Medium pur) lag Chinolinsäure unter der Quantifizierungsgrenze (Säule fehlt). Zellkultur: Monozyten inkubiert in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). An Tag 7 Ernte und je  $1 \times 10^6$  Zellen inkubiert in 1 ml Medium (98 % RPMI, 2 % AB-Serum) in 6-Well-Platte für 24 h mit/ohne ATG/Alemtuzumab (Konzentrationen in µg/ml).

In einem alternativen Versuchsansatz wurden die dendritischen Zellen zusätzlich zu den oben erklärten Kulturbedingungen an Tag 5 mit LPS stimuliert. Dazu kam dann an Tag 7 bis 8 IFN- $\gamma$ , ATG oder Alemtuzumab. Das Resultat ist konträr zu dem der vorherigen Versuche: ATG führt zu einem Anstieg von Tryptophan und zu einem Abfall von Kynurenin, Kynurensäure und

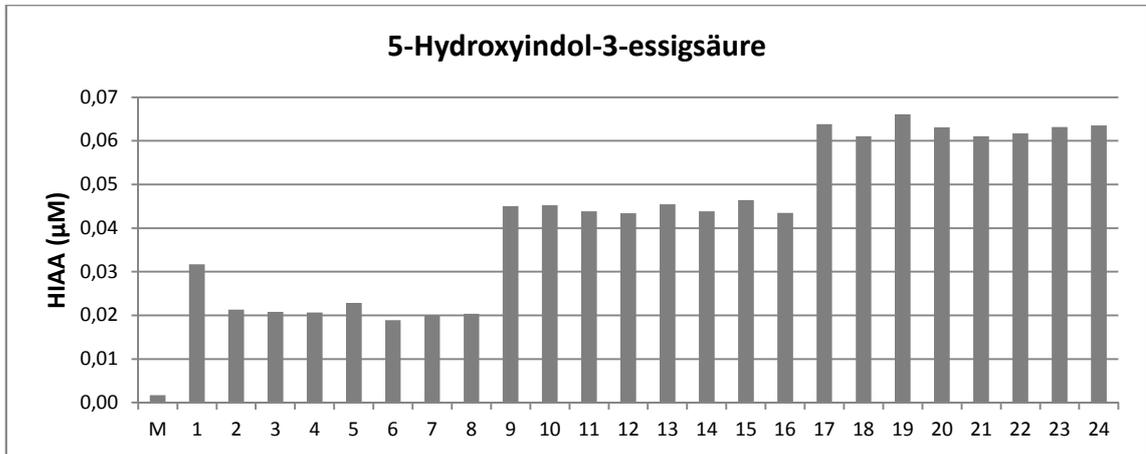
Anthranilsäure, und zwar umso ausgeprägter, je mehr ATG gegeben wurde. Alemtuzumab zeigt keinen vergleichbaren Effekt, ebensowenig IFN- $\gamma$  (Abb. 16).



**Abb. 16: Dosisabhängige Konzentration von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten bei reifen dendritischen Zellen.** n = 2 (jedes Säulenmuster kennzeichnet ein Experiment). In Ansatz 1 und 2 des ersten Experimentes lag Kynurensäure unter der Quantifizierungsgrenze (Säulen fehlen). Zellkultur: Monozyten inkubiert in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). mDC: an Tag 5 zusätzliche Gabe von 10 ng/ml LPS. An Tag 7 Ernte und je  $2 \times 10^6$  Zellen inkubiert in 2 ml Medium (98 % RPMI, 2 % AB-Serum) in 12-Well-Platte für 24 h mit den rechts angegebenen Zusätzen (IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 1, 10 oder 100  $\mu$ g/ml).

- | #  | Bezeichnung         |
|----|---------------------|
| 1  | Medium pur          |
| 2  | iDC -               |
| 3  | mDC -               |
| 4  | mDC + IFN- $\gamma$ |
| 5  | mDC + ATG 1         |
| 6  | mDC + ATG 10        |
| 7  | mDC + ATG 100       |
| 8  | mDC + Alem 1        |
| 9  | mDC + Alem 10       |
| 10 | mDC + Alem 100      |

Ähnlich wie zuvor mit LPS stimulierten wir die Zellen in einem weiteren Versuch an Tag 5 mit TGF- $\beta$ . Hier fiel insbesondere auf, dass in den TGF-behandelten Proben höhere Konzentrationen des Serotoninmetaboliten 5-Hydroxyindol-3-essigsäure messbar waren als in den anderen Proben (Abb. 17).



**Probenbezeichnung:**

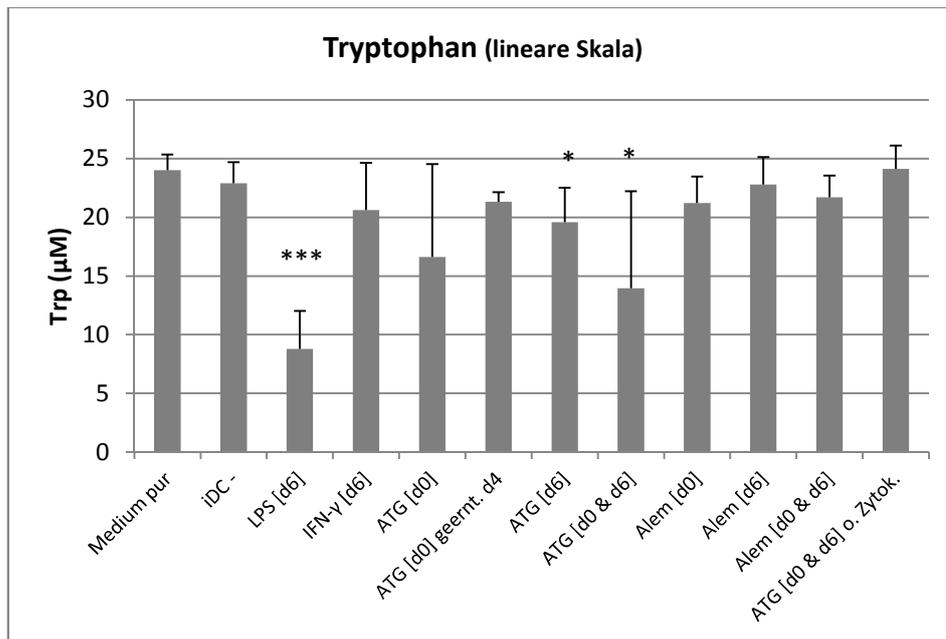
M	Medium pur				
1	iDC -	9	mDC -	17	tDC -
2	iDC +IFN- $\gamma$	10	mDC +IFN- $\gamma$	18	tDC +IFN- $\gamma$
3	iDC +ATG 1	11	mDC +ATG 1	19	tDC +ATG 1
4	iDC +ATG 10	12	mDC +ATG 10	20	tDC +ATG 10
5	iDC +ATG 100	13	mDC +ATG 100	21	tDC +ATG 100
6	iDC +Alem 1	14	mDC +Alem 1	22	tDC +Alem 1
7	iDC +Alem 10	15	mDC +Alem 10	23	tDC +Alem 10
8	iDC +Alem 100	16	mDC +Alem 100	24	tDC +Alem 100

**Abb. 17: Anstieg von 5-Hydroxyindol-3-essigsäure unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ .** n = 2. Angabe der Mittelwerte. Zellkultur: Monozyten inkubiert in der Konzentration  $1 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). mDC/tDC: an Tag 5 zusätzliche Gabe von 10 ng/ml LPS bzw. TGF- $\beta$ . An Tag 7 Ernte und je  $2 \times 10^6$  Zellen inkubiert in 2 ml Medium (98 % RPMI, 2 % AB-Serum) in 12-Well-Platte für 24 h mit den oben angegebenen Zusätzen (IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 1, 10 oder 100  $\mu$ g/ml).

### 3.4.2. Effekte auf Monozyten während ihrer Differenzierung zu dendritischen Zellen

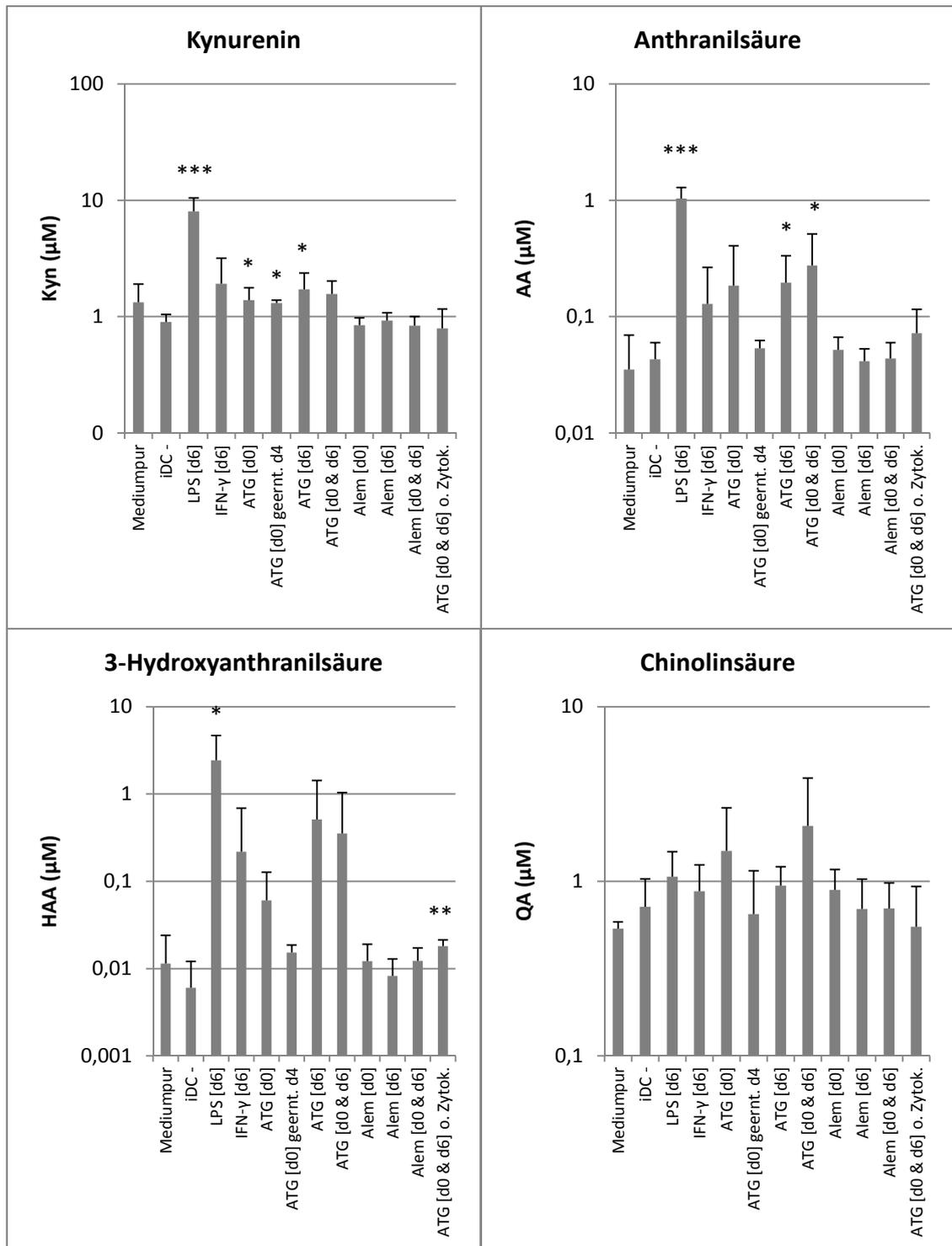
Daneben untersuchten wir die Gabe von verschiedenen Zusätzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen. LPS, gegeben an Tag 6 bei insgesamt acht Tagen Zellkultur, bewirkte den größten Abfall der Tryptophan-Konzentration; die Veränderung im Vergleich zu entsprechenden Proben ohne LPS (iDC -) war höchst signifi-

kant. Auch ATG-Gabe führte zu einem Tryptophan-Abfall, wobei dieser am stärksten ausgeprägt und signifikant war bei zweimaliger ATG-Gabe an Tag 0 und Tag 6. Ebenfalls signifikant war der Effekt bei einmaliger ATG-Gabe an Tag 6. Alemtuzumab oder IFN- $\gamma$  zeigten keine signifikante Tryptophan-Verminderung. Eine zweimalige ATG-Gabe an Tag 0 und Tag 6 bewirkte dann keine Tryptophan-Reduktion, wenn in der Zellkultur die Zytokine GM-CSF und IL-4 weggelassen wurden (Abb. 18).



**Abb. 18: Tryptophan-Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze.** Mittelwerte aus je nach Ansatz fünf bis sieben gleichartigen Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen (ATG [d0] geernt. d4: n = 2). Zellkultur: je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze zu den in eckigen Klammern angegebenen Zeitpunkten direkt in die Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ernte an Tag 8 (ATG [d0] geernt. d4: bereits an Tag 4). Ansatz ATG [d0 & d6] o. Zytok.: GM-CSF und IL-4 wurden weggelassen. \* bedeutet  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

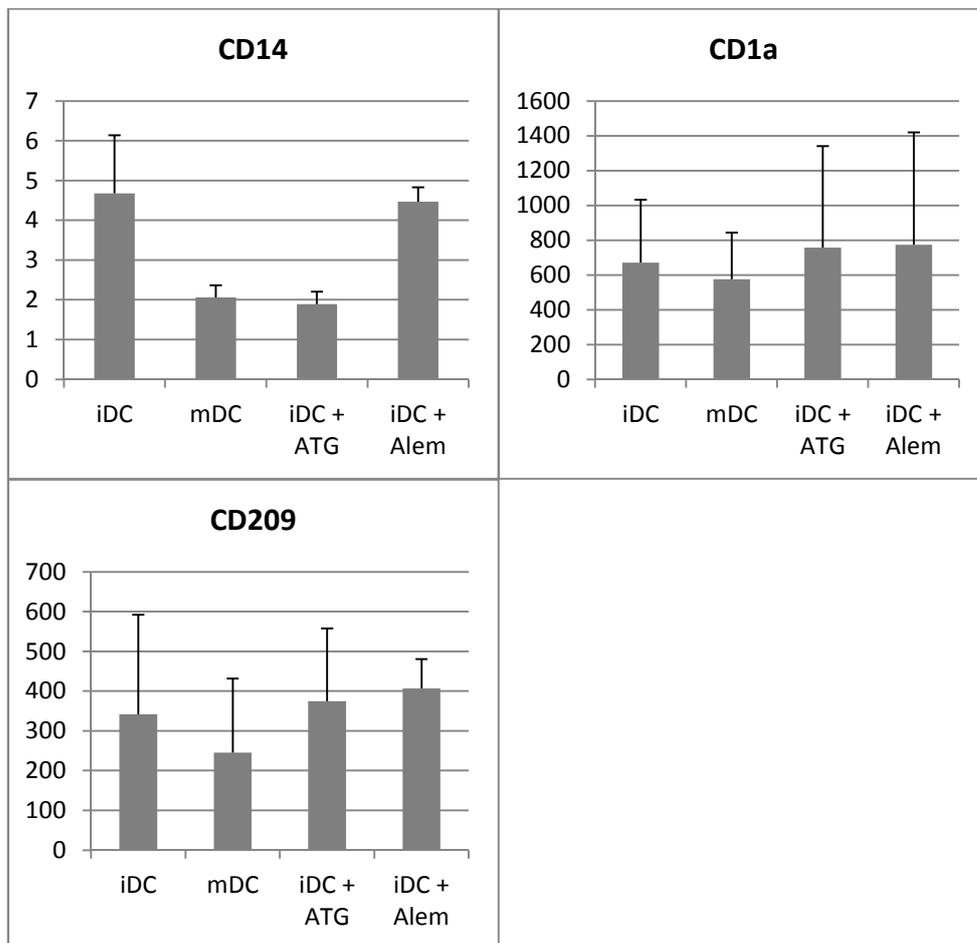
Analog dazu stiegen die Tryptophan-Metabolite Kynurenin, Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure sowie Chinolinsäure in LPS- und ATG-behandelten Proben, nicht oder kaum aber bei Alemtuzumab-behandelten Proben. Auch einige dieser Ergebnisse sind signifikant (Abb. 19).



**Abb. 19: Konzentration von Tryptophanmetaboliten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze.** Mittelwerte aus je nach Ansatz fünf bis sieben gleichartigen Experimenten mit Angabe der Standardabweichungen (ATG [d0] geernt. d4: n = 2). Zellkultur: je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze zu den in eckigen Klammern angegebenen Zeitpunkten direkt in die Zellkulturflaschen (LPS: 10 ng/ml; IFN- $\gamma$ : 200 U/ml; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ernte an Tag 8 (ATG [d0] geernt. d4: bereits an Tag 4). Ansatz ATG [d0 & d6] o. Zytok.: GM-CSF und IL-4 wurden weggelassen. \* bedeutet  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 3.5. Expression von Oberflächenantigenen

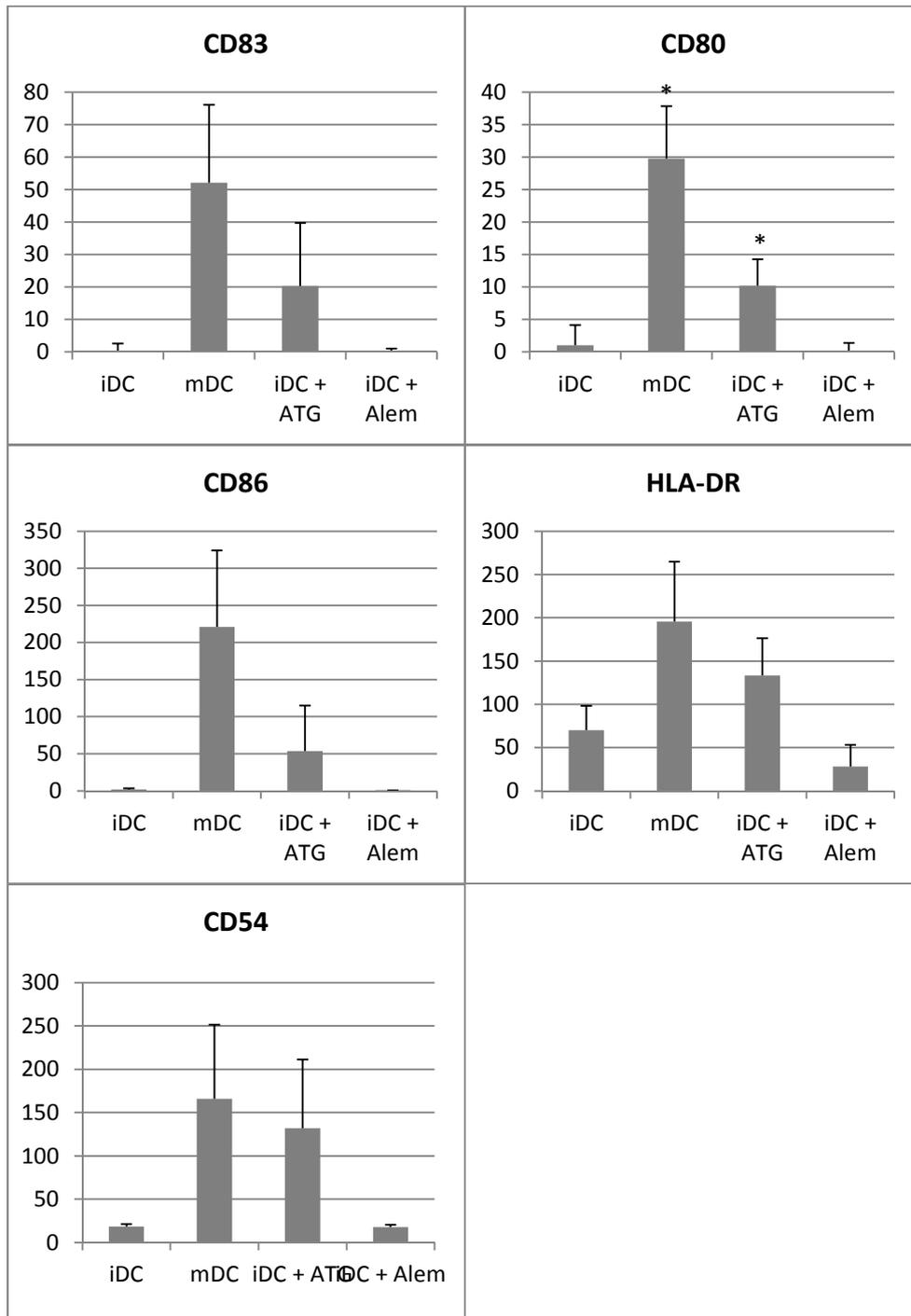
In der Durchflusszytometrie zeigte sich, dass das Oberflächenantigen CD14 in LPS- und ATG-behandelten Proben deutlich weniger, in Alemtuzumab-behandelten Proben jedoch kaum weniger exprimiert wurde als in Proben mit unreifen DCs ohne weitere Zusätze. CD1a wurde durch LPS leicht unterdrückt, durch ATG und Alemtuzumab hingegen leicht angeregt. Ähnlich verhielt es sich mit CD209 (Abb. 20).



**Abb. 20: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD14, CD1a und CD209.** Gerechnet wurde mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der Isotypenkontrolle.  $n = 3$ . Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen. Zellkultur: Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze an Tag 6 direkt in die Zellkulturflaschen (mDC: 10 ng/ml LPS; ATG und Alemtuzumab: 100  $\mu$ g/ml). Ernte an Tag 8.

Die Expression der Reifungs- bzw. Aktivierungsmarker CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54 wurde von LPS jeweils stark erhöht, von ATG mäßig stark erhöht und von Alemtuzumab

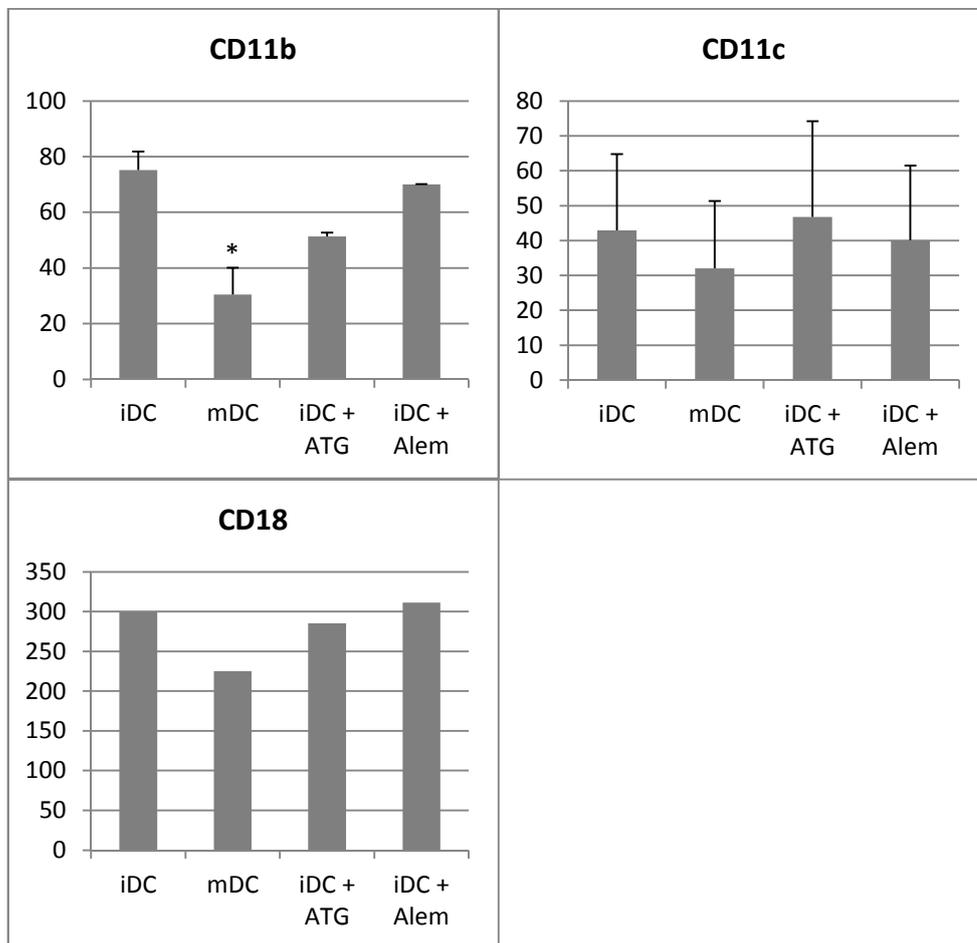
vermindert. Die Unterschiede bei Gabe von LPS und ATG im Vergleich mit iDC waren signifikant für CD80 (Abb. 21).



**Abb. 21: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54.** Gerechnet wurde mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der Isotypenkontrolle. n = 3. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen. Zellkultur: Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml

Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze an Tag 6 direkt in die Zellkulturflaschen (mDC: 10 ng/ml LPS; ATG und Alemtuzumab: 100 µg/ml). Ernte an Tag 8. \* bedeutet  $p \leq 0,05$ .

Das Integrin CD11b wurde durch alle Zusätze herunterreguliert, am stärksten durch LPS, am wenigsten stark durch Alemtuzumab. Signifikant war der LPS-vermittelte Effekt. Auch die CD11c-Expression wurde durch LPS-Gabe abgeschwächt, im geringen Maße auch von Alemtuzumab. In ATG-behandelten Proben wurde dagegen im Mittel eine leicht erhöhte CD11c-Menge gemessen. CD18 wurde von LPS deutlich und von ATG geringfügig herunterreguliert, von Alemtuzumab schwach hochreguliert (Abb. 22).



**Abb. 22: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD11b, CD11c und CD18.** Gerechnet wurde mit den Medianen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten nach Abzug der Isotypenkontrolle.  $n = 1$  für CD18,  $n = 2$  für CD 11b,  $n = 3$  für CD11c. Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichungen außer bei CD18. Zellkultur: Je  $5 \times 10^6$  Monozyten inkubiert in 7,5 ml Medium (90 % RPMI, 10 % FCS-DC sowie 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4). Zusätze an Tag 6 direkt in die Zellkulturflaschen (mDC: 10 ng/ml LPS; ATG und Alemtuzumab: 100 µg/ml). Ernte an Tag 8. \* bedeutet  $p \leq 0,05$ .

## 4. Diskussion

---

### 4.1. Die Morphologie, das Adhäsionsverhalten und das Überleben der kultivierten Zellen

Die Generierung von DCs aus Monozyten mit Hilfe der Zytokine GM-CSF und IL-4, wie wir sie durchgeführt haben, ist eine etablierte Methode. Die dabei in vitro entstehenden Zellen stellen ein gutes Modell für die in vivo vorkommenden DCs dar (Sallusto & Lanzavecchia 1994; Bender et al. 1996; Pickl et al. 1996).

Mit den Konzentrationen der weiteren von uns in die Zellkulturen gegebenen Zusätze haben wir versucht, die physiologische bzw. therapeutische In-vivo-Situation nachzuahmen und darüber hinaus dosisabhängige Effekte nachzuweisen. Über ATG sind verschiedene pharmakokinetische Studien beschrieben. Bei Patienten, denen 6 mg/kg Körpergewicht ATG vor allogener HSZT verabreicht wurde, ermittelten Waller et al. Spitzenwerte von durchschnittlich 64 µg/ml ATG im Blut, die im Median nach 15 Tagen auf < 1 µg/ml abgefallen waren (Waller et al. 2003). Remberger et al. maßen bei ähnlichen Patienten die Kaninchen-IgG-Spiegel im Serum am Transplantationstag und teilten diese in die Gruppen niedrig (< 70 µg/ml) und hoch (> 70 µg/ml) ein; ein hoher Kaninchen-IgG-Spiegel war mit einer niedrigen Inzidenz akuter GVHD korreliert (Remberger & Sundberg 2005). Unsere Versuche mit Konzentrationen von 1, 10 und (in den meisten Fällen) 100 µg/ml ATG im Zellkulturmedium bilden also in ihrer Größenordnung die In-vivo-Verhältnisse ab. Die verwendeten Alemtuzumab-Mengen sind jeweils an ATG angelehnt.

Dass die DCs, die mit LPS in Kontakt kommen, eine starke Tendenz zur Verklumpung zeigen (Abb. 4), ist vermutlich in der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen begründet. Wie in Abb. 21 gezeigt wird, führte LPS in unseren Versuchen zu einer besonders hohen Expression von CD54 (entspricht ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1). Dieser Sachverhalt ist auch in der Literatur für DCs beschrieben (Mihret et al. 2011). ATG bewirkte eine etwas geringere CD54-Expression als LPS. Diese Ergebnisse decken sich mit der beobachteten Zellaggregation, die bei LPS am stärksten, bei ATG am zweitstärksten ausfiel (Abb. 3 bis 6). Gegen den Zusammenhang spricht allerdings, dass die Integrine CD11b und CD18, die als Bindungspartner für Adhäsionsmoleküle dienen können, durch LPS herunterreguliert werden (Abb. 22).

Bei unseren DCs waren die üblichen schmalen Zellausläufer, die dieser Zellart ihren Namen geben, nicht erkennbar (Abb. 3 bis 7), was allerdings bei der einfachen lichtmikroskopischen Betrachtung ungefärbter Zellen auch nicht zu erwarten war. ATG führte jedoch bei einem beträchtlichen Teil der DCs zur Ausbildung jeweils zweier breiter, bipolar angeordneter Zellfortsätze (Abb. 5). Die gleiche Beobachtung machten wir bei Monozyten, die zwar mit ATG versetzt, aber nicht mit GM-CSF und IL-4 zur Differenzierung zu DCs gebracht worden waren (Abb. 7). Wie es dazu kommt, ist unklar; ähnliche Befunde anderer Arbeitsgruppen sind uns nicht bekannt.

Beim Überleben der DCs zeigten sich keine großen Unterschiede (Abb. 9). Nur wenn die Zytokine GM-CSF und IL-4 weggelassen wurden, wurden wesentlich weniger Zellen gezählt. Weder die Gabe von LPS noch von IFN- $\gamma$ , ATG oder Alemtuzumab führte zu einer deutlich verminderter Zellausbeute. Auch wenn Antikörper die Oberfläche der dendritischen Zellen besetzen, kann unter Kulturbedingungen, wie wir sie hatten, mangels Phagozyten keine Opsonierung stattfinden. Offenbar bewirkten ATG und Alemtuzumab in der Zellkultur auch keine Komplementvermittelte Lyse, obwohl Serum vorhanden war.

Mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten gezüchtete DCs sind nicht-adhärenz (Chapuis et al. 1997). Durch lichtmikroskopische Betrachtung vergewisserten wir uns, dass nur ein äußerst geringer Anteil der Zellen nach der Ernte in den Zellkulturflaschen verblieben war. Einzig bei den IFN- $\gamma$ -Proben blieb ein relevanter Teil der DCs in den Flaschen haften und entzog sich somit der Ernte (Abb. 8), was in Kapitel 4.3. weiter besprochen wird.

## **4.2. Durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellen**

CD14 ist der wichtigste Marker für Monozyten und Makrophagen. Er ist Teil des LPS-Rezeptorkomplexes (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch 1993). Die von uns kultivierten Zellen haben auf dem Differenzierungsweg zu DCs ihre CD14-Expression weitgehend verloren – umso mehr, wenn sie mit LPS oder ATG behandelt worden waren (Abb. 20).

CD1a ist ein MHC-Klasse-I-ähnliches Protein. Es wird unter anderem auf DCs, nicht aber auf unstimulierten Monozyten gefunden (Blumberg et al. 1995). CD209, besser bekannt als DC-SIGN (Dendritic Cell Specific Intercellular Adhesion Molecule 3 Grabbing Non-Integrin), ist ein C-Typ-Lektin, dessen Expression auf DCs beschränkt ist. Es wirkt als Adhäsionsmolekül,

das, wie sein Name sagt, ICAM-3 bindet, und hat darüber hinaus weitere Funktionen (Svajger et al. 2010). Sowohl CD1a als auch CD209 wurden von unseren Zellen in hohem Maße exprimiert (Abb. 20).

Die generell niedrige CD14- und hohe CD1a und CD209-Expression beweist, dass aus den eingesetzten Monozyten nach acht Tagen Kultur mit GM-CSF und IL-4 DCs geworden sind.

CD83 ist ein Reifungsmarker für DCs. Er wird hochreguliert während der Entwicklung von unreifen DCs, die auf die Antigenaufnahme und -prozessierung spezialisiert sind, zu reifen DCs, deren Aufgabe die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen ist (Prechtel & Steinkasserer 2007). Für die Interaktion mit den T-Zellen sind kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 (= B7-1 bzw. B7-2) von Bedeutung; diese werden ebenfalls im Zuge der DC-Reifung hochreguliert (Slavik et al. 1999). Bei DCs, die aus Monozyten von Spendern mit koronarer Herzkrankheit generiert werden, ist eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 nachweisbar. Dies lässt darauf schließen, dass das durch die Arteriosklerose geschaffene proinflammatorische Zytokinmilieu, aus dem die Monozyten stammen, bereits ausreicht, um diese kostimulatorischen Moleküle zu induzieren (Dopheide et al. 2007).

HLA-DR ist ein MHC der Klasse II, seine Funktion ist also die Antigenpräsentation. Es kennzeichnet wie CD80 und CD86 reife DCs in Abgrenzung zu unreifen DCs (Tureci et al. 2003). Die HLA-DR-Expression von Monozyten wird in der Intensivmedizin als prognostischer Marker überwacht, weil eine ausbleibende HLA-DR-Erholung eine Immunschwäche anzeigt und mit dem erhöhten Risiko für Sekundärinfektionen einhergeht (Lukaszewicz et al. 2009; Gouel-Cheron et al. 2012).

CD54 ist die CD-Bezeichnung für das Adhäsionsmolekül ICAM-1. ICAM-1 ist ein Ligand des Integrins LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen 1), aber auch des unten näher beschriebenen Integrins Mac-1 (Macrophage Antigen 1; Maio & Del Vecchio 1992). Durch Bindung an Integrine stabilisiert ICAM-1 die sogenannte immunologische Synapse zwischen APC und T-Zelle (Grakoui et al. 1999). ICAM-1 wird durch diverse Entzündungsmediatoren wie proinflammatorische Zytokine hochreguliert (Roebuck & Finnegan 1999) und kann als Marker für die Aktivität für APCs gelten, zeigt also an, ob diese kostimulatorische Moleküle bilden und zur Antigenpräsentation bereit sind (Sheikh & Jones 2008).

Unsere FACS-Analysen ergaben wie zu erwarten eine deutliche Induktion der DC-Reifungs- bzw. -Aktivierungsmarker CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54 durch LPS (Abb. 21). Aber auch ATG vermochte die DCs zur Reifung zu bringen, wenngleich die genannten Marker

weniger stark exprimiert wurden als bei LPS. Alemtuzumab hingegen zeigte keinen derartigen Effekt, die DCs blieben im unreifen, inaktiven Zustand.

Gillet-Hladky et al. haben ebenfalls den Effekt von ATG auf die Reifung von DCs untersucht. Auch sie brachten Monozyten von gesunden Spendern zur Differenzierung zu DCs, allerdings unter etwas anderen Bedingungen: eine etwas höhere Zelldichte in Well-Platten, 200 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 statt, wie bei uns, 144 U/ml GM-CSF und 224 U/ml IL-4. Außerdem tauschten sie das Medium mehrmals gegen frisches aus. Von Tag 6 bis Tag 8 wurden ihre DCs mit unterschiedlichen Stimuli zur Reifung gebracht. Bei einem Teil der Proben gaben sie von Anfang an 100 µg/ml ATG ins Medium. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass die Reifungsmarker CD83, CD80, CD86 und HLA-DR von den Zellen, die ab Tag 0 ATG ausgesetzt waren und zusätzlich von Tag 6 bis Tag 8 mit TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, weniger stark exprimiert wurden als bei gleichem Versuchsaufbau ohne ATG. Wurde die Reifungsinduktion weggelassen, führte ATG zu einer niedrigeren CD54-Expression als normale iDCs. ATG scheint also unter diesen Umständen die Reifung von Monozyten/DCs zu hemmen (Gillet-Hladky et al. 2006). Wenn dagegen, wie bei unseren Durchflusszytometrie-Versuchen, ATG erst an Tag 6 die bereits weitgehend differenzierten DCs mit ATG behandelt werden, ist der Effekt gegenteilig: Die Reifung wird angeregt. Darüber hinaus ist hervorzuheben, dass wir nicht „Zellen + ATG + Reifungsstimulus“ mit „Zellen + ATG“ verglichen haben (wie Gillet-Hladky et al.), sondern „Zellen ohne Zusatz“ mit „Zellen + LPS“ bzw. „Zellen + ATG“.

CD11b, CD11c und CD18 sind Integrine. Integrine sind heterodimere Zelloberflächenproteine, welche die Adhäsion von Zellen untereinander oder zu extrazellulärer Matrix vermitteln. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Leukozytenmigration aus dem Blut zu entzündeten und lymphatischen Geweben. Sie sind aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzt. CD11b und CD11c sind  $\alpha$ -Integrine, ihre alternativen Namen lauten Integrin  $\alpha_M$  (ITGAM) bzw. Integrin  $\alpha_X$  (ITGAX). CD18, auch bekannt als Integrin  $\beta_2$  (ITGB2), gehört zur Integrin- $\beta$ -Familie. CD11b und CD18 bilden zusammen den Komplex Mac-1 (= Integrin  $\alpha_M\beta_2$ ), der von verschiedenen Zellen der myeloiden Reihe, unter anderem DCs, exprimiert wird (Hyun et al. 2009). Die Einheit aus CD11c und CD18 heißt auch p150,95 (= Integrin  $\alpha_X\beta_2$ ) und hat ihre Hauptfunktion als Fibrinogenrezeptor (Mazzone & Ricevuti 1995). CD11c gilt auch Marker zur Identifikation von DCs, weil es insbesondere von dieser Zellart exprimiert wird (Bradford et al. 2011).

Integrine können, zum Beispiel als Reaktion auf Chemokine, rasch durch Konformationsänderungen der extrazellulären Domänen ihre Affinität für Liganden erhöhen. Diesen Vorgang nennt

man Inside-Out-Signaling. So können Leukozyten, die im nicht-adhäsiven Zustand zirkulieren, sehr schnell auf veränderte Bedingungen reagieren (Harris et al. 2000). Aber Adhäsionsproteine können auch in intrazellulären Vesikeln gespeichert sein und nach einer Stimulation an die Zelloberfläche mobilisiert werden. Mediatoren wie TNF können auf diese Weise Mac-1 und p150,95 auf Monozyten hochregulieren (Miller et al. 1987).

In unseren Versuchen wurden CD11b und CD18 auf mDCs und in geringerem Ausmaß auf mit ATG behandelten DCs herunterreguliert (Abb. 22). Eine hohe Expression der Reifungsmarker CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54 (Abb. 21) ging also einher mit einer niedrigen Expression der Integrine CD11b und CD18. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass reife DCs nicht mehr auf bestimmte Chemokine ansprechen (Caux et al. 2000) – denn diese Fähigkeit ist für reife DCs, die ihren Bestimmungsort bereits erreicht haben, nicht mehr von Bedeutung.

### **4.3. Der IDO-induzierende Effekt von ATG**

Allgemein ist zu ATG anzumerken, dass die in Kapitel 1.3 dargelegte Art seiner Herstellung gewisse Unterschiede zwischen verschiedenen Chargen erwarten lässt. In-vitro-Vergleichsstudien haben allerdings gezeigt, dass diese Unterschiede gering sind (Popow et al. 2012). Für alle in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurde nur eine Packung ATG Fresenius® verwendet. Es sind jedoch abweichende Ergebnisse möglich, wenn bei der Reproduktion der Experimente ein ATG-Präparat eines anderen Herstellers benutzt wird.

In der quantitativen PCR zeigte sich, dass ATG IDO konzentrationsabhängig zu induzieren vermag: 100 µg/ml ATG erhöhen die IDO-mRNA mehr als 10 µg/ml (Abb. 10). Allerdings wurde dieser Versuch nur einmal durchgeführt, sodass seine Aussagekraft begrenzt ist.

In Abb. 11 sieht man, dass die gemessene IDO-Induktion am höchsten ist bei ATG-Gabe zwei Tage vor Ernte der DCs. Der Effekt scheint also von recht kurzer Dauer zu sein.

Außerdem konnten wir demonstrieren, dass auch das IDO-2-Gen durch ATG induziert wird. Gillet-Hladky et al. beschrieben die Produktion von IDO-mRNA durch ATG-behandelte DCs, allerdings vor Entdeckung des Isoenzym IDO-2 (Gillet-Hladky et al. 2006). Es ist bisher umstritten, welche Rolle IDO-2 bei Entzündungsvorgängen spielt. So steigert eine Malaria-Infektion nicht die Expression von IDO-2, und IFN-γ-Knock-out-Mäuse erhalten ihre IDO-2-

Spiegel aufrecht, was nahelegt, dass dieses Zytokin nicht der Hauptregulator von IDO-2 ist (Ball et al. 2007). Andere Studien zeigen hingegen, dass IFN- $\gamma$  und auch LPS IDO-2 in Pre-DCs und DCs induzieren können (Metz et al. 2007; Löb et al. 2008). Auch Toxoplasmose und Leishmaniose führen zur Expression von IDO-2-mRNA (Divanovic et al. 2012).

Unter den in Abb. 11 beschriebenen Bedingungen wurden in den Kontrollproben wie auch in den Alemtuzumab-Proben sogar höhere Mengen IDO-2-mRNA als IDO-1-mRNA nachgewiesen. IDO-1 war jedoch durch LPS und durch ATG stärker induzierbar.

Anhand der Western-Blot-Ergebnisse wird deutlich, dass IDO nicht nur als Gentranskript, sondern auch als Protein in ATG-behandelten DCs vorliegt (Abb. 12). Interessant ist die Betrachtung von verschiedenen Zeitpunkten, an denen ATG zur Zellkultur hinzugefügt wurde: Die in Abb. 13 gezeigten Banden lassen vermuten, dass IDO zu jedem Zeitpunkt, an dem ATG gegeben wird, gebildet wird. Allerdings ist das Protein acht Tage später nicht mehr im gleichen Ausmaß nachweisbar wie zwei Tage später. Dies impliziert eine kurze Halbwertszeit des Proteins unter unseren Kulturbedingungen. Bei zweimaliger Stimulation mit ATG hat die zweite Gabe einen geringeren Effekt als die erste Gabe – die Zellen sind offenbar in ihrer Kapazität, IDO zu bilden, bereits weitgehend erschöpft.

Die Befunde der massenspektrometrischen Messungen sind für diese Arbeit von besonderer Bedeutung. Denn die Expression von IDO-Protein ist nicht gleichzusetzen mit Tryptophan-abbauender IDO-Enzymaktivität (Fallarino et al. 2002b; Munn et al. 2004b). In Kapitel 3.4. wird daher gezeigt, dass das produzierte IDO auch tatsächlich Tryptophan degradiert.

Aus Abb. 14 und 15 geht eine Dosisabhängigkeit der ATG-Wirkung hervor: Je mehr ATG zu den DCs gegeben wird, desto stärker vermindert sich die Tryptophan-Konzentration im Überstand und erhöht sich die Konzentration der entsprechenden Tryptophan-Metaboliten. Wenn die Zellen jedoch erst LPS, dann einen Tag später ATG ausgesetzt werden, tätigt ATG paradoxerweise einen gegenteiligen Effekt (Abb. 16). Hier ist eine Parallele zu den oben dargelegten Ergebnissen von Gillet-Hladky et al. erkennbar, auch wenn die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist, weil sich der Versuchsaufbau erheblich unterscheidet (siehe Kapitel 4.2.). Von ihnen wurde gefunden, dass ATG, wenn zusätzlich zu verschiedenen Reifungsstimuli wie beispielsweise LPS gegeben, die Reifungsinduktion durch Stimuli beeinträchtigen kann (Gillet-Hladky et al. 2006). Ein additiver Effekt von ATG und LPS scheint *in vitro* jedenfalls nicht vorhanden zu sein.

Als Nebenbefund stellten wir fest, dass TGF- $\beta$  zu einer auffälligen Erhöhung des Tryptophan-Metaboliten 5-Hydroxyindol-3-essigsäure (HIAA) führt (Abb. 17). TGF- $\beta$  scheint also einen Tryptophanabbau in Richtung Serotonin-Weg zu bewirken (vgl. Abb. 1). Es ist bekannt, dass zwischen Serotonin und TGF- $\beta$  ein Zusammenhang besteht. So vermag Serotonin die TGF- $\beta$ -Genexpression zu induzieren (Buskohl et al. 2012). Wichtiger in diesem Zusammenhang ist, dass TGF- $\beta$  seinerseits, über den Transkriptionsfaktor KLF-11 (Krüppel-like Factor 11), der auch TIEG-2 (TGF- $\beta$ -Inducible Early Gene 2) genannt wird, das Serotonin-abbauende Enzym Monoaminoxidase A (MAO-A) aktivieren kann (Grunewald et al. 2012).

Wie aus Abb. 18 und 19 hervorgeht, ist der Tryptophanabbau auf dem Kynureninweg am stärksten ausgeprägt bei zweimaliger Stimulation der Zellen mit ATG. Wenn ATG nur einmal gegeben wird, ist tendenziell die Gabe an Tag 6 wirkungsvoller als die Gabe an Tag 0, bei einer Gesamtkulturdauer von acht Tagen.

Eine wichtige Frage ist bisher offengeblieben: Warum zeigte IFN- $\gamma$  in unseren Versuchen keine deutliche IDO-Induktion, wie man eigentlich erwartet hätte? IFN- $\gamma$  gilt gemeinhin als das wichtigste IDO-hochregulierende Zytokin (Ozaki et al. 1988; Taylor & Feng 1991). Unsere massenspektrometrische Messergebnisse lassen nur auf eine mäßig gesteigerte IDO-Aktivität durch IFN- $\gamma$  schließen (Abb. 18 und 19), auf RNA-Ebene ist gar keine IDO-Induktion erkennbar (Abb. 11).

Prinzipiell denkbar ist, dass die verwendete IFN- $\gamma$ -Konzentration von 200 U/ml zu niedrig war. In der Literatur findet sich ein Beleg, wonach bei der Leukämiezelllinie THP-1 eine deutlich gesteigerte IDO-Aktivität erst ab etwa 750 U/ml IFN- $\gamma$  feststellbar ist (Corm et al. 2009). Möglicherweise wäre auch eine weitere stimulierende Substanz nötig gewesen, um einen befriedigenden Effekt zu erzielen. Zum Beispiel erhöhen TNF- $\alpha$  und IL-1 synergistisch die IFN-induzierte IDO-Aktivität durch Hochregulierung des IFN- $\gamma$ -Rezeptors (Shirey et al. 2006).

Eine andere potenzielle Erklärung hat mit der Ernte der Zellen zu tun. Bei den IFN- $\gamma$ -Proben blieben auffällig viele Zellen in den Zellkulturflaschen hängen und konnten nicht aus diesen mobilisiert werden (Abb. 8). Gerade die Zellen, die sich von IFN- $\gamma$  haben stimulieren lassen, sind also womöglich an den Kulturflaschen adhärirt und haben sich damit der Analyse ihrer RNA entzogen. In den Überständen konnte trotzdem eine gewisser Tryptophanabbau (Abb. 18) und eine entsprechende Akkumulation von Tryptophanmetaboliten (Abb. 19) gemessen werden.

Die Ansätze ohne die Zytokine GM-CSF und IL-4, die in Abb. 18 und 19 abgebildet sind, sind nur sehr eingeschränkt verwertbar, weil vermutlich deutlich weniger Zellen überlebt haben als in den anderen Ansätzen (Abb. 7 und 9).

Dass von Monozyten abstammende DCs in vitro nur wenig CD52 exprimieren (Buggins et al. 2002), könnte den geringen Effekt von Alemtuzumab in unseren Experimenten erklären.

#### **4.4. Die mögliche Bedeutung der IDO-Induktion für die Wirkung von ATG**

Da Tryptophanmetaboliten eine starke T-Zell-suppressive Wirkung haben (Fallarino et al. 2002a; Terness et al. 2002) und eine Verschiebung zu T<sub>reg</sub> herbeiführen (Mezrich et al. 2010), liegt der Verdacht nahe, dass ein relevanter Anteil an der Wirkung von ATG IDO-vermittelt ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen übereinstimmend, dass ATG in DCs IDO auf Ebene von RNA, Protein und IDO-abhängigen Tryptophanmetaboliten induziert.

Als möglicher Mechanismus wäre eine direkte Induktion von IDO vorstellbar. Zielantigene von ATG sind unter anderem CD152 (CTLA-4) und CD86 (Pistillo et al. 2002; Monti et al. 2003). Durch Bindung an diese Antigene kann IDO induziert werden (Grohmann et al. 2002; Fallarino et al. 2003).

Die IDO-Induktion könnte jedoch auch reaktiv im Rahmen des ebenfalls durch ATG ausgelösten Zytokin-Release-Syndroms stattfinden. In diesem Falle würde ATG zur Ausschüttung von Zytokinen führen, welche ihrerseits als eine Art natürlichen Abschaltmechanismus das immun-suppressive Enzym IDO induzieren. Allerdings bewirkt auch Alemtuzumab in der klinischen Anwendung ein Zytokin-Release-Syndrom, induziert aber offenbar kaum IDO (Abb. 2).

Unsere durchflusszytometrischen Analysen deuten darauf hin, dass ATG ähnlich wie LPS als DC-Reifer oder -Aktivator wirkt. Aber auch bei LPS ist der Mechanismus nicht ausschließlich IFN- $\gamma$ -vermittelt, sondern am Beispiel von LPS wurde gezeigt, dass dieses unabhängig von IFN- $\gamma$  über die Aktivierung von JNK (C-Jun-N-terminale Kinasen) IDO induzieren kann (Jung et al. 2007; Wang et al. 2010).

Der genaue Mechanismus der IDO-Induktion durch ATG ist jedenfalls noch zu ergründen. Dazu sind weitere experimentelle Ansätze erforderlich. Denkbar wäre beispielsweise der Einsatz eines IFN- $\gamma$ -Antikörpers zur Blockade der Wirkung dieses Zytokins. Mit spezifischen IDO-Inhibitoren könnte die Wirkung verschiedener Enzym-Isotypen voneinander unterschieden werden. Zum anderen könnte man Transkriptionsfaktoren untersuchen, die möglicherweise eine Rolle für die IDO-Regulation spielen. Schließlich gilt es herauszufinden, ob noch andere Zellen des Immunsystems außer den DCs von ATG zur IDO-Expression angeregt werden.

Eine weitere Frage ist, ob die durch ATG vermittelte IDO-Induktion, wie sie in vitro zweifelsfrei nachgewiesen werden kann, auch in vivo einen klinisch relevanten Effekt auf die Patienten hat. Es ist bekannt, dass bei Auftreten einer akuten GVHD nach allogener HSZT auch ohne das Zutun von ATG die IDO-Aktivität zunimmt (Landfried et al. 2011; Xu et al. 2013). Möglicherweise steigert ATG die IDO-Aktivität im klinischen Setting zusätzlich und wirkt auf diese Weise der GVHD entgegen. Unklar ist, wie lange IDO aktiviert sein muss, damit sich ein immunologischer Effekt bei transplantierten Patienten zeigt. Zur Klärung dieser Fragestellungen sind weitere klinische Untersuchungen nötig.

## 5. Zusammenfassung

---

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation hat eine große Bedeutung erlangt für die kurative Therapie von schweren hämatologischen Erkrankungen. Diese Behandlungsform kann jedoch erhebliche Komplikationen mit sich bringen, deren wichtigste die Graft-versus-Host Disease (GVHD) ist. Bei der GVHD greifen vom Spender stammende T-Zellen Empfängerewebe an, welches sie als fremd erkennen. Initiiert wird diese Immunreaktion durch Entzündungsvorgänge in geschädigtem Gewebe, die insbesondere durch Antigen-präsentierende Zellen im Gastrointestinaltrakt vermittelt werden.

Schon seit Längerem finden gegen T-Zellen gerichtete Antikörper in der Prävention und Therapie der GVHD Verwendung. Antithymozytenglobulin (ATG) ist ein Medikament, das Antikörper gegen ein breites Spektrum an Antigenen verschiedener Immunzellen enthält. Alemtuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD52, das von Lymphozyten in besonders großer Menge exprimiert wird. Sowohl ATG als auch Alemtuzumab führen zu einer Depletion von T-Zellen, weisen aber auch andere immunmodulatorische Wirkungen auf.

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein Enzym, das für den Abbau der Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin verantwortlich ist. Seine Rolle liegt in der Vermittlung von Immuntoleranz: IDO-exprimierende dendritische Zellen (DCs) hemmen die T-Zell-Proliferation und fördern die Bildung regulatorischer T-Zellen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Induktion von IDO ein Mechanismus ist, über den ATG immunsuppressiv wirkt und eine GVHD verhindern oder mildern kann. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von ATG im Vergleich zum Einfluss von Alemtuzumab auf humane DCs in vitro zu untersuchen.

Dazu wurden die Monozyten gesunder Spender mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 versetzt, woraufhin sie sich zu DCs differenzierten. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit Lipopolysaccharid (LPS), ATG, Alemtuzumab oder anderen Substanzen stimuliert.

Morphologisch zeigten die mit LPS behandelten Zellen im Vergleich mit Kontrollproben eine auffällige Verklumpung zu großen Aggregaten, was vermutlich in der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie CD54 begründet ist. ATG bewirkte hingegen die Ausbildung jeweils zweier breiter, bipolar angeordneter Zellfortsätze.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen zeigte einen Verlust des Monozytenmarkers CD14 bei gleichzeitiger Ausprägung der DC-Marker CD1a und CD209. Darüber hinaus

führten LPS und ATG, nicht aber Alemtuzumab, zur Induktion von CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54, die auf eine stattgefundene Reifung der DCs hindeuten, sowie zu einer Herunterregulation der Integrine CD11b und CD18.

Durch quantitative Realtime-PCR konnten wir belegen, dass ATG und auch – wenngleich in geringerem Ausmaß – Alemtuzumab zur vermehrten Bildung von mRNA der Gene IDO-1 und IDO-2 führen. Im Western Blot war das IDO-Protein nur in Proben nachweisbar, die mit LPS oder ATG behandelt worden waren. Zudem wurden die IDO-Banden schwächer, wenn längere Zeit zwischen ATG-Gabe und Zellernte vergangen war, was mit einer begrenzten Stabilität des Proteins in der Kultur zu erklären ist.

Massenspektrometrisch wurde die Konzentration von Tryptophan und seinen Metaboliten gemessen. Dabei ergaben sich ein Abfall von Tryptophan und ein entsprechender Anstieg der Kynurenine unter dem Einfluss von ATG; unter Alemtuzumab blieben solche Veränderungen aus. Bei zweimaliger ATG-Gabe war der Effekt noch stärker ausgeprägt als bei einmaliger Gabe. Diese Ergebnisse beweisen eine tatsächliche enzymatische Aktivität des produzierten IDO-Proteins.

Waren die Zellen hingegen mit LPS vorstimuliert, hatte ATG keine additive, sondern eine gegenteilige Wirkung auf die Tryptophan- und Kynurenin-Konzentrationen. Offenbar stehen diese beiden DC-reifenden Substanzen also in einem komplexen Zusammenspiel.

Insgesamt zeigen die für diese Arbeit erhobenen Daten, dass ATG DCs zur Reifung bringt und in diesen Zellen das Enzym IDO auf Ebene von RNA, Protein und IDO-abhängigen Tryptophanmetaboliten induziert. Ob dieser Effekt direkt durch Bindung der in ATG enthaltenen Antikörper an ihre Zielantigene ausgelöst wird oder indirekt unter Vermittlung anderer Zytokine, bleibt in weiteren Versuchen zu klären.

## 6. Anhang

---

### 6.1. Literaturverzeichnis

- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392(6671): 86–89.
- Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 2002; 51(2): 356–365.
- Appelbaum FR, Forman SJ, Negrin RS, Blume KG, eds. *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009.
- Armitage JO. Bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 1994; 330(12): 827–838.
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, Ruggeri L, Barbabietola G, Aristei C, Latini P, Reisner Y, Martelli MF. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *The New England journal of medicine* 1998; 339(17): 1186–1193.
- Babcock TA, Carlin JM. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine* 2000; 12(6): 588–594.
- Bacigalupo A. Management of acute graft-versus-host disease. *British journal of haematology* 2007; 137(2): 87–98.
- Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJD, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jermin LS, Hunt NH. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene* 2007; 396(1): 203–213.
- Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJD, Weiser S, Hunt NH. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2009; 41(3): 467–471.
- Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Wieland CB, Herman EI, Baker EM, Cao Y, Contag CH, Negrin RS. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood* 2005; 106(3): 1113–1122.
- Belladonna ML, Volpi C, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Pallotta MT, Boon L, Gizzi S, Fiorretti MC, Grohmann U, Puccetti P. Cutting edge: Autocrine TGF-beta sustains default tolerogenesis by IDO-competent dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md 2008; 181(8): 5194–5198.
- Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *Journal of immunological methods* 1996; 196(2): 121–135.
- Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lectures* 1966-1967; 62: 21–78.

- Blazar BR, Murphy WJ, Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nature reviews* 2012; 12(6): 443–458.
- Blumberg RS, Gerdes D, Chott A, Porcelli SA, Balk SP. Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunological reviews* 1995; 147: 5–29.
- Bradford BM, Sester DP, Hume DA, Mabbott NA. Defining the anatomical localisation of subsets of the murine mononuclear phagocyte system using integrin alpha X (Itgax, CD11c) and colony stimulating factor 1 receptor (Csf1r, CD115) expression fails to discriminate dendritic cells from macrophages. *Immunobiology* 2011; 216(11): 1228–1237.
- Brett S, Baxter G, Cooper H, Johnston JM, Tite J, Rapson N. Repopulation of blood lymphocyte sub-populations in rheumatoid arthritis patients treated with the depleting humanized monoclonal antibody, CAMPATH-1H. *Immunology* 1996; 88(1): 13–19.
- Buggins AG, Mufti GJ, Salisbury J, Codd J, Westwood N, Arno M, Fishlock K, Pagliuca A, Devereux S. Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood* 2002; 100(5): 1715–1720.
- Buskohl PR, Sun ML, Thompson RP, Butcher JT. Serotonin potentiates transforming growth factor-beta3 induced biomechanical remodeling in avian embryonic atrioventricular valves. *PloS one* 2012; 7(8): e42527.
- Byrne GI, Lehmann LK, Kirschbaum JG, Borden EC, Lee CM, Brown RR. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. *Journal of interferon research* 1986; 6(4): 389–396.
- Cambrosio A, Keating P. A Matter of FACS: Constituting Novel Entities in Immunology. *Medical Anthropology Quarterly* 1992; 6(4): 362–384.
- Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, Bouteiller O de, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer seminars in immunopathology* 2000; 22(4): 345–369.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine* 1999; 5(8): 919–923.
- Chappell D, Beiras-Fernandez A, Hammer C, Thein E. In Vivo Visualization of the Effect of Polyclonal Antithymocyte Globulins on the Microcirculation after Ischemia/Reperfusion in a Primate Model. *Transplantation* 2006; 81(4): 552–558.
- Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *European journal of immunology* 1997; 27(2): 431–441.
- Chon SY, Hassanain HH, Gupta SL. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *The Journal of biological chemistry* 1996; 271(29): 17247–17252.
- Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P, Malissen B, Kissenpfennig A, Barbaroux J, Groves R, Geissmann F. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *The Journal of experimental medicine* 2009; 206(13): 3089–3100.
- Cisse B, Caton ML, Lehner M, Maeda T, Scheu S, Locksley R, Holmberg D, Zweier C, den Hollander NS, Kant SG, Holter W, Rauch A, Zhuang Y, Reizis B. Transcription factor E2-2

- is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 2008; 135(1): 37–48.
- Coles AJ, Compston DAS, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine* 2008; 359(17): 1786–1801.
- Coles AJ, Wing M, Smith S, Coraddu F, Greer S, Taylor C, Weetman A, Hale G, Chatterjee VK, Waldmann H, Compston A. Pulsed monoclonal antibody treatment and autoimmune thyroid disease in multiple sclerosis. *Lancet* 1999; 354(9191): 1691–1695.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu Y. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* 2004; 5(12): 1219–1226.
- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *The New England journal of medicine* 2006; 354(17): 1813–1826.
- Corm S, Berthon C, Imbenotte M, Biggio V, Lhermitte M, Dupont C, Briche I, Quesnel B. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. *Leukemia research* 2009; 33(3): 490–494.
- Cox AL, Thompson SAJ, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DAS, Coles AJ. Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *European journal of immunology* 2005; 35(11): 3332–3342.
- Cutler C, Giri S, Jeyapalan S, Paniagua D, Viswanathan A, Antin JH. Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation: a meta-analysis. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001; 19(16): 3685–3691.
- Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature reviews* 2008; 9(1): 46–56.
- Dearden CE, Matutes E, Cazin B, Tjonnfjord GE, Parreira A, Nomdedeu B, Leoni P, Clark FJ, Radia D, Rassam SM, Roques T, Ketterer N, Brito-Babapulle V, Dyer MJ, Catovsky D. High remission rate in T-cell prolymphocytic leukemia with CAMPATH-1H. *Blood* 2001; 98(6): 1721–1726.
- Divanovic S, Sawtell NM, Trompette A, Warning JI, Dias A, Cooper AM, Yap GS, Arditi M, Shimada K, Duhadaway JB, Prendergast GC, Basaraba RJ, Mellor AL, Munn DH, Aliberti J, Karp CL. Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *The Journal of infectious diseases* 2012; 205(1): 152–161.
- Dopheide JF, Sester U, Schlitt A, Horstick G, Rupprecht HJ, Munzel T, Blankenberg S. Monocyte-derived dendritic cells of patients with coronary artery disease show an increased expression of costimulatory molecules CD40, CD80 and CD86 in vitro. *Coronary artery disease* 2007; 18(7): 523–531.
- Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nature immunology* 2010; 11(7): 585–593.
- Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Chong C, Liu K, Lee H, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC. Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N 2007; 315(5808): 107–111.*

- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 2002; 3(11): 991–998.
- Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nature medicine* 2003; 9(9): 1144–1150.
- Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre M, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* 2003; 4(12): 1206–1212.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation* 2002a; 9(10): 1069–1077.
- Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor AL, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P. Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *International immunology* 2002b; 14(1): 65–68.
- Fang L, Fehse B, Engel M, Zander A, Kroger N. Antithymocyte globulin induces ex vivo and in vivo depletion of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Transplantation* 2005; 79(3): 369–371.
- Ferrajoli A, O'Brien S, Keating MJ. Alemtuzumab: a novel monoclonal antibody. *Expert opinion on biological therapy* 2001; 1(6): 1059–1065.
- Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 1991; 324(10): 667–674.
- Ferrara JLM, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; 373(9674): 1550–1561.
- Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiora D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers MED. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2005; 11(12): 945–956.
- Finke J, Bethge WA, Schmoor C, Ottinger HD, Stelljes M, Zander AR, Volin L, Ruutu T, Heim DA, Schwerdtfeger R, Kolbe K, Mayer J, Maertens JA, Linkesch W, Holler E, Koza V, Bornhauser M, Einsele H, Kolb H, Bertz H, Egger M, Grishina O, Socie G. Standard graft-versus-host disease prophylaxis with or without anti-T-cell globulin in haematopoietic cell transplantation from matched unrelated donors: a randomised, open-label, multicentre phase 3 trial. *The lancet oncology* 2009; 10(9): 855–864.
- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science (New York, N 2006; 311(5757): 83–87.*
- Fuchs D, Forsman A, Hagberg L, Larsson M, Norkrans G, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. *Journal of interferon research* 1990; 10(6): 599–603.

- Gaber AO, Monaco AP, Russell JA, Lebranchu Y, Mohty M. Rabbit antithymocyte globulin (thymoglobulin): 25 years and new frontiers in solid organ transplantation and haematology. *Drugs* 2010; 70(6): 691–732.
- Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine* 2004; 200(8): 1039–1049.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N 2010; 327(5966): 656–661.*
- Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins. *Blood* 1998; 91(7): 2360–2368.
- Ge Q. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99(5): 2989–2994.
- Ghobrial IM, Otteman LA, White WL. An EBV-positive lymphoproliferative disorder after therapy with alemtuzumab. *The New England journal of medicine* 2003; 349(26): 2570-2; discussion 2570-2.
- Gilboa E. DC-based cancer vaccines. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117(5): 1195–1203.
- Gillet-Hladky S, Carvalho CM de, Bernaud J, Bendahou C, Bloy C, Rigal D. 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. *Transplantation* 2006; 82(7): 965–974.
- Ginaldi L, Martinis M de, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, Catovsky D. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leukemia research* 1998; 22(2): 185–191.
- Giralt S, Bishop MR. Principles and overview of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer treatment and research* 2009; 144: 1–21.
- Gouel-Cheron A, Allaouchiche B, Guignant C, Davin F, Floccard B, Monneret G. Early interleukin-6 and slope of monocyte human leukocyte antigen-DR: a powerful association to predict the development of sepsis after major trauma. *PloS one* 2012; 7(3): e33095.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science (New York, N 1999; 285(5425): 221–227.*
- Grant RS, Naif H, Thuruthyil SJ, Nasr N, Littlejohn T, Takikawa O, Kapoor V. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *Journal of virology* 2000; 74(9): 4110–4115.
- Grohmann U, Bianchi R, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Micheletti A, Fioretti MC, Puccetti P. Functional plasticity of dendritic cell subsets as mediated by CD40 versus B7 activation. *Journal of immunology (Baltimore, Md 2003; 171(5): 2581–2587.*
- Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, Orabona C, Uyttenhove C, Fioretti MC, Puccetti P. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of immunology (Baltimore, Md 2001; 167(2): 708–714.*

- Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature immunology* 2002; 3(11): 1097–1101.
- Grunewald M, Johnson S, Lu D, Wang Z, Lomber G, Albert PR, Stockmeier CA, Meyer JH, Urrutia R, Miczek KA, Austin MC, Wang J, Paul IA, Woolverton WL, Seo S, Sittman DB, Ou X. Mechanistic role for a novel glucocorticoid-KLF11 (TIEG2) protein pathway in stress-induced monoamine oxidase A expression. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287(29): 24195–24206.
- Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1762–1773.
- Hainz U, Obexer P, Winkler C, Sedlmayr P, Takikawa O, Greinix H, Lawitschka A, Potschger U, Fuchs D, Ladisch S, Heitger A. Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood* 2005; 105(10): 4127–4134.
- Hale G. The CD52 antigen and development of the CAMPATH antibodies. *Cytotherapy* 2001; 3(3): 137–143.
- Hale G. Alemtuzumab in stem cell transplantation. *Medical oncology (Northwood, London, England)* 2002; 19: S33-47.
- Hale G, Bright S, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, Waldmann H. Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. *Blood* 1983; 62(4): 873–882.
- Harris ES, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA. The leukocyte integrins. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275(31): 23409–23412.
- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90(9): 3245–3287.
- Hill GR, Crawford JM, Cooke KR, Brinson YS, Pan L, Ferrara JL. Total body irradiation and acute graft-versus-host disease: the role of gastrointestinal damage and inflammatory cytokines. *Blood* 1997; 90(8): 3204–3213.
- Holler E, Rogler G, Herfarth H, Brenmoehl J, Wild PJ, Hahn J, Eissner G, Scholmerich J, Andreesen R. Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2004; 104(3): 889–894.
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science (New York, N 1994; 264(5161): 961–965.*
- Hucke C, MacKenzie CR, Adjogble KDZ, Takikawa O, Daubener W. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and immunity* 2004; 72(5): 2723–2730.
- Hurley CK, Maiers M, Marsh SGE, Oudshoorn M. Overview of registries, HLA typing and diversity, and search algorithms. *Tissue antigens* 2007; 69 Suppl 1: 3–5.
- Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, Siders WM, Kaplan JM. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology* 2009; 128(2): 260–270.

- Hyun Y, Lefort CT, Kim M. Leukocyte integrins and their ligand interactions. *Immunologic research* 2009; 45(2-3): 195–208.
- Isaacs JD, Watts RA, Hazleman BL, Hale G, Keogan MT, Cobbold SP, Waldmann H. Humanised monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1992; 340(8822): 748–752.
- Isaacson P, Norton A, Addis B. The human thymus contains a novel population of B lymphocytes. *The Lancet* 1987; 330(8574): 1488–1491.
- Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltis-Mortari A, Mellor AL, Munn DH, Blazar BR. Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood* 2009; 114(24): 5062–5070.
- Jaspersen LK, Bucher C, Panoskaltis-Mortari A, Taylor PA, Mellor AL, Munn DH, Blazar BR. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2008; 111(6): 3257–3265.
- Jung ID, Lee C, Jeong Y, Lee JS, Park WS, Han J, Park Y. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS letters* 2007; 581(7): 1449–1456.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine* 2001; 194(6): 863–869.
- Kadoya A, Tone S, Maeda H, Minatogawa Y, Kido R. Gene structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical and biophysical research communications* 1992; 189(1): 530–536.
- Keating M, Coutre S, Rai K, Osterborg A, Faderl S, Kennedy B, Kipps T, Bodey G, Byrd JC, Rosen S, Dearden C, Dyer MJS, Hillmen P. Management guidelines for use of alemtuzumab in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical lymphoma* 2004; 4(4): 220–227.
- Keating MJ. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99(10): 3554–3561.
- Kerr SJ, Armati PJ, Pemberton LA, Smythe G, Tattam B, Brew BJ. Kynurenine pathway inhibition reduces neurotoxicity of HIV-1-infected macrophages. *Neurology* 1997; 49(6): 1671–1681.
- Kim H, Chen L, Lim G, Sung B, Wang S, McCabe MF, Rusanescu G, Yang L, Tian Y, Mao J. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *The Journal of clinical investigation* 2012; 122(8): 2940–2954.
- King NJC, Thomas SR. Molecules in focus: indoleamine 2,3-dioxygenase. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2007; 39(12): 2167–2172.
- Kluin-Nelemans HC, Coenen JL, Boers JE, van Imhoff GW, Rosati S. EBV-positive immunodeficiency lymphoma after alemtuzumab-CHOP therapy for peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 2008; 112(4): 1039–1041.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256(5517): 495–497.
- Kotake Y, Masayama T. Über den Mechanismus der Kynurenin-Bildung aus Tryptophan. *Z. Physio. Chem. (Zeitschrift für physiologische Chemie)* 1936; 243(6): 237–244.

- Kudo Y, Boyd CAR, Spyropoulou I, Redman CWG, Takikawa O, Katsuki T, Hara T, Ohama K, Sargent IL. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *Journal of reproductive immunology* 2004; 61(2): 87–98.
- Kushwah R, Hu J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology* 2011; 133(4): 409–419.
- Landfried K, Zhu W, Waldhier MC, Schulz U, Ammer J, Holler B, Wolff D, Edinger M, Peter K, Kreutz M, Andreesen R, Oefner PJ, Holler E. Tryptophan catabolism is associated with acute GVHD after human allogeneic stem cell transplantation and indicates activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Blood* 2011; 118(26): 6971–6974.
- Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 1868(44): 325–337.
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002a; 107(4): 452–460.
- Lee SJ, Klein JP, Barrett AJ, Ringden O, Antin JH, Cahn J, Carabasi MH, Gale RP, Giral S, Hale GA, Ilhan O, McCarthy PL, Socie G, Verdonck LF, Weisdorf DJ, Horowitz MM. Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. *Blood* 2002b; 100(2): 406–414.
- Lewis KL, Reizis B. Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2012; 4(8): a007401.
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA, Guernonprez P, Meredith MM, Yao K, Chu F, Randolph GJ, Rudensky AY, Nussenzweig M. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science (New York, N 2009; 324(5925): 392–397.*
- Löb S, Königsrainer A, Rammensee H, Opelz G, Terness P. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nature reviews* 2009; 9(6): 445–452.
- Löb S, Königsrainer A, Schäfer R, Rammensee H, Opelz G, Terness P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood* 2008; 111(4): 2152–2154.
- Lockwood CM, Thiru S, Isaacs JD, Hale G, Waldmann H. Long-term remission of intractable systemic vasculitis with monoclonal antibody therapy. *Lancet* 1993; 341(8861): 1620–1622.
- Lopez M, Clarkson MR, Albin M, Sayegh MH, Najafian N. A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Journal of the American Society of Nephrology JASN* 2006; 17(10): 2844–2853.
- Lorenz E. CCUD. Modification of Acute Irradiation Injury in Mice and Guinea-Pigs by Bone Marrow Injections. *Radiology* 1952; 58(6): 863–877.
- Lowenstein H, Shah A, Chant A, Khan A. Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transplant international official journal of the European Society for Organ Transplantation* 2006; 19(11): 927–936.
- Lukaszewicz A, Grienay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Critical care medicine* 2009; 37(10): 2746–2752.

- Lum LG. The kinetics of immune reconstitution after human marrow transplantation. *Blood* 1987; 69(2): 369–380.
- Lundin J, Osterborg A, Brittinger G, Crowther D, Dombret H, Engert A, Epenetos A, Gisselbrecht C, Huhn D, Jaeger U, Thomas J, Marcus R, Nissen N, Poynton C, Rankin E, Stahel R, Uppenkamp M, Willemze R, Mellstedt H. CAMPATH-1H monoclonal antibody in therapy for previously treated low-grade non-Hodgkin's lymphomas: a phase II multicenter study. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Low-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1998; 16(10): 3257–3263.
- Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Andrich MP, Chen CC, Feuerstein IM, Horowitz ME, Magrath IT, Shad AT, Steinberg SM. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy. *The New England journal of medicine* 1995; 332(3): 143–149.
- MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NKC, Davies SM, Blazar BR. Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2002; 8(7): 387–394.
- Maio M, Del Vecchio L. Expression and functional role of CD54/Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) on human blood cells. *Leukemia & lymphoma* 1992; 8(1-2): 23–33.
- Marmont AM, Horowitz MM, Gale RP, Sobocinski K, Ash RC, van Bekkum DW, Champlin RE, Dicke KA, Goldman JM, Good RA. T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 1991; 78(8): 2120–2130.
- Martin PJ, Schoch G, Fisher L, Byers V, Anasetti C, Appelbaum FR, Beatty PG, Doney K, McDonald GB, Sanders JE. A retrospective analysis of therapy for acute graft-versus-host disease: initial treatment. *Blood* 1990; 76(8): 1464–1472.
- Mason JR, Ho AD. Advances in autologous stem cell transplantation. *Cancer investigation* 1997; 15(6): 553–560.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science (New York, N 2002; 296(5566): 301–305.*
- Mazzone A, Ricevuti G. Leukocyte CD11/CD18 integrins: biological and clinical relevance. *Haematologica* 1995; 80(2): 161–175.
- Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews* 2004; 4(10): 762–774.
- Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer research* 2007; 67(15): 7082–7087.
- Mezrich JD, Fechner JH, Zhang X, Johnson BP, Burlingham WJ, Bradfield CA. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md 2010; 185(6): 3190–3198.*
- Michallet M, Preville X, Flacher M, Fournel S, Genestier L, Revillard J. Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins. *Transplantation* 2003; 75(5): 657–662.

- Mielcarek M, Martin PJ, Leisenring W, Flowers MED, Maloney DG, Sandmaier BM, Maris MB, Storb R. Graft-versus-host disease after nonmyeloablative versus conventional hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2003; 102(2): 756–762.
- Mihret A, Mamo G, Tafesse M, Hailu A, Parida S. Dendritic Cells Activate and Mature after Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC research notes* 2011; 4: 247.
- Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *The Journal of clinical investigation* 1987; 80(2): 535–544.
- Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U* 2007; 21(7): 1387–1394.
- Monti P, Allavena P, Di Carlo V, Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. *International immunopharmacology* 2003; 3(2): 189–196.
- Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature medicine* 2005; 11(3): 312–319.
- Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, Heymanns J, Radsak K, Sprenger H, Lange H. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64(10): 1432–1437.
- Mulley WR, Li YQ, Wee JL, Dodge N, Christiansen D, Simeonovic C, Ierino FL, Sandrin MS. Local expression of IDO, either alone or in combination with CD40Ig, IL10 or CTLA4Ig, inhibits indirect xenorejection responses. *Xenotransplantation* 2008; 15(3): 174–183.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine* 1999; 189(9): 1363–1372.
- Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *The Journal of clinical investigation* 2004a; 114(2): 280–290.
- Munn DH, Sharma MD, Mellor AL. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* 2004b; 172(7): 4100–4110.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, N)* 1998; 281(5380): 1191–1193.
- Murai M, Yoneyama H, Ezaki T, Suematsu M, Terashima Y, Harada A, Hamada H, Asakura H, Ishikawa H, Matsushima K. Peyer's patch is the essential site in initiating murine acute and lethal graft-versus-host reaction. *Nature immunology* 2003; 4(2): 154–160.
- Novak N, Bieber T. 2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2008; 121(2 Suppl): S370-4; quiz S413.
- Nowrouzian MR, Waschke S, Bojko P, Welt A, Schuett P, Ebeling P, Flasshove M, Moritz T, Schuette J, Seeber S. Impact of chemotherapy regimen and hematopoietic growth factor on mobilization and collection of peripheral blood stem cells in cancer patients. *Annals of on-*

- cology official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO 2003; 14 Suppl 1: i29-36.
- O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Molecular psychiatry* 2009; 14(5): 511–522.
- Opitz CA, Litzemberger UM, Sahn F, Ott M, Tritschler I, Trump S, Schumacher T, Jestaedt L, Schrenk D, Weller M, Jugold M, Guillemin GJ, Miller CL, Lutz C, Radlwimmer B, Lehmann I, Deimling A von, Wick W, Platten M. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011; 478(7368): 197–203.
- Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008; 105(52): 20828–20833.
- Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(4): 1242–1246.
- Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Bicciano S, Mazza EMC, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* 2011; 12(9): 870–878.
- Pasquini MC, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clinical transplants* 2010: 87–105.
- Pawson R, Dyer MJ, Barge R, Matutes E, Thornton PD, Emmett E, Kluin-Nelemans JC, Fibbe WE, Willemze R, Catovsky D. Treatment of T-cell prolymphocytic leukemia with human CD52 antibody. *Journal of clinical oncology official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1997; 15(7): 2667–2672.
- Penack O, Holler E, van den Brink MRM. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 2010; 115(10): 1865–1872.
- Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1984; 81(3): 908–912.
- Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* 1996; 157(9): 3850–3859.
- Pistillo MP, Tazzari PL, Bonifazi F, Bandini G, Kato T, Matsui T, Nishioka K, Conte R, Ferrara GB. Detection of a novel specificity (CTLA-4) in ATG/TMG globulins and sera from ATG-treated leukemic patients. *Transplantation* 2002; 73(8): 1295–1302.
- Pollack SM, O'Connor TP, JR, Hashash J, Tabbara IA. Nonmyeloablative and reduced-intensity conditioning for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a clinical review. *American journal of clinical oncology* 2009; 32(6): 618–628.

- Popow I, Leitner J, Majdic O, Kovarik JJ, Saemann MD, Zlabinger GJ, Steinberger P. Assessment of batch to batch variation in polyclonal antithymocyte globulin preparations. *Transplantation* 2012; 93(1): 32–40.
- Prechtel AT, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Archives of dermatological research* 2007; 299(2): 59–69.
- Preville X, Flacher M, LeMauff B, Beauchard S, Davelu P, Tiollier J, Revillard JP. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 2001; 71(3): 460–468.
- Randolph SSB, Gooley TA, Warren EH, Appelbaum FR, Riddell SR. Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants. *Blood* 2004; 103(1): 347–352.
- Ravandi F, O'Brien S. Alemtuzumab. *Expert review of anticancer therapy* 2005; 5(1): 39–51.
- Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, Groothuis TA, Chakraborty M, Wansley EK, Camphausen K, Luiten RM, Ru AH de, Neijssen J, Griekspoor A, Mesman E, Verreck FA, Spits H, Schlom J, van Veelen P, Neefjes JJ. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* 2006; 203(5): 1259–1271.
- Remberger M, Sundberg B. Rabbit-immunoglobulin G levels in patients receiving thymoglobulin as part of conditioning before unrelated donor stem cell transplantation. *Haematologica* 2005; 90(7): 931–938.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. *Nature* 1988; 332(6162): 323–327.
- Ringden O, Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2005; 113(11-12): 813–830.
- Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of leukocyte biology* 1999; 66(6): 876–888.
- Rohde J, Heitman J, Cardenas ME. The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276(13): 9583–9586.
- Romani L, Fallarino F, Luca A de, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, Vacca C, Bistoni F, Fioretti MC, Grohmann U, Segal BH, Puccetti P. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 2008; 451(7175): 211–215.
- Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md)* 2005; 175(3): 1373–1381.
- Sakurai K, Zou J, Tschetter JR, Ward JM, Shearer GM. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology* 2002; 129(1-2): 186–196.
- Sallusto F, Lanzavecchia A. 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. *The Journal of experimental medicine* 1994; 179(4): 1109–1118.

- Scandella E, Men Y, Gillessen S, Forster R, Groettrup M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 100(4): 1354–1361.
- Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196(8): 1079–1090.
- Scott BL, Sandmaier BM, Storer B, Maris MB, Sorrow ML, Maloney DG, Chauncey TR, Storb R, Deeg HJ. Myeloablative vs nonmyeloablative allogeneic transplantation for patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukemia with multilineage dysplasia: a retrospective analysis. *Leukemia official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U* 2006; 20(1): 128–135.
- Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou D, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117(9): 2570–2582.
- Sheikh NA, Jones LA. CD54 is a surrogate marker of antigen presenting cell activation. *Cancer immunology, immunotherapy CII* 2008; 57(9): 1381–1390.
- Shirey KA, Jung J, Maeder GS, Carlin JM. Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. *Journal of interferon & cytokine research the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 2006; 26(1): 53–62.
- Shlomchik WD. Graft-versus-host disease. *Nature reviews* 2007; 7(5): 340–352.
- Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science (New York, N* 1999; 285(5426): 412–415.
- Shortman K, Liu Y. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature reviews* 2002; 2(3): 151–161.
- Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunologic research* 1999; 19(1): 1–24.
- Smith, Macfarlane. Formation of Phenolic and Indolic Compounds by Anaerobic Bacteria in the Human Large Intestine. *Microbial ecology* 1997; 33(3): 180–188.
- Smolewski P, Szmigielska-Kaplon A, Cebula B, Jamroziak K, Rogalinska M, Kilianska Z, Robak T. Proapoptotic activity of alemtuzumab alone and in combination with rituximab or purine nucleoside analogues in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia & lymphoma* 2005; 46(1): 87–100.
- Somali M, Mpatakoias V, Avramides A, Sakellari I, Kaloyannidis P, Smias C, Anagnostopoulos A, Kourtis A, Rousso D, Panidis D, Vagenakis A. Function of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in long-term survivors of hematopoietic stem cell transplantation for hematological diseases. *Gynecological endocrinology the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2005; 21(1): 18–26.
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine* 1973; 137(5): 1142–1162.

- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 2003; 21: 685–711.
- Sugimoto H. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: Catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(8): 2611–2616.
- Sullivan KM, Dykewicz CA, Longworth DL, Boeckh M, Baden LR, Rubin RH, Sepkowitz KA. Preventing opportunistic infections after hematopoietic stem cell transplantation: the Centers for Disease Control and Prevention, Infectious Diseases Society of America, and American Society for Blood and Marrow Transplantation Practice Guidelines and beyond. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology* 2001: 392–421.
- Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: an adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular signalling* 2010; 22(10): 1397–1405.
- Takikawa O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications* 2005; 338(1): 12–19.
- Takikawa O, Yoshida R, Kido R, Hayaishi O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of biological chemistry* 1986; 261(8): 3648–3653.
- Taniguchi T, Sono M, Hirata F, Hayaishi O, Tamura M, Hayashi K, Iizuka T, Ishimura Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Kinetic studies on the binding of superoxide anion and molecular oxygen to enzyme. *The Journal of biological chemistry* 1979; 254(9): 3288–3294.
- Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1991; 5(11): 2516–2522.
- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine* 2002; 196(4): 447–457.
- Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakal AK, Qin D. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. *Trends in immunology* 2001; 22(7): 361–367.
- Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society transactions* 2008; 36(Pt 6): 1120–1123.
- Theurich S, Fischmann H, Shimabukuro-Vornhagen A, Chemnitz JM, Holtick U, Scheid C, Skoetz N, Bergwelt-Baildon M von. Polyclonal anti-thymocyte globulins for the prophylaxis of graft-versus-host disease after allogeneic stem cell or bone marrow transplantation in adults. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2012; 9: CD009159.
- Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson L, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (second of two parts). *The New England journal of medicine* 1975a; 292(17): 895–902.
- Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone-marrow transplantation (first of two parts). *The New England journal of medicine* 1975b; 292(16): 832–843.
- Thomas SR, Salahifar H, Mashima R, Hunt NH, Richardson DR, Stocker R. Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: posttransla-

- tional regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *Journal of immunology* (Baltimore, Md 2001; 166(10): 6332–6340.
- Timm MM, Kimlinger TK, Haug JL, Kline MP, Greipp PR, Rajkumar SV, Kumar SK. Thymoglobulin targets multiple plasma cell antigens and has in vitro and in vivo activity in multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20(10): 1863–1869.
- Tone S, Takikawa O, Habara-Ohkubo A, Kadoya A, Yoshida R, Kido R. Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. *Nucleic acids research* 1990; 18(2): 367.
- Treumann A, Lively MR, Schneider P, Ferguson MA. Primary structure of CD52. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270(11): 6088–6099.
- Tureci O, Bian H, Nestle FO, Radrizzani L, Rosinski JA, Tassis A, Hilton H, Walstead M, Sahin U, Hammer J. Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis. *FASEB journal official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2003; 17(8): 836–847.
- Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *The Journal of clinical investigation* 2003; 112(5): 648–651.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine* 2003; 9(10): 1269–1274.
- Vaughan W, Seshadri T, Bridges M, Keating A. The principles and overview of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer treatment and research* 2009; 144: 23–45.
- Wagner JE, Thompson JS, Carter SL, Kernan NA. Effect of graft-versus-host disease prophylaxis on 3-year disease-free survival in recipients of unrelated donor bone marrow (T-cell Depletion Trial): a multi-centre, randomised phase II-III trial. *Lancet* 2005; 366(9487): 733–741.
- Waller EK, Langston AA, Lonial S, Cherry J, Somani J, Allen AJ, Rosenthal H, Redei I. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-thymocyte globulin in recipients of partially HLA-matched blood hematopoietic progenitor cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2003; 9(7): 460–471.
- Wang Y, Lawson MA, Dantzer R, Kelley KW. LPS-induced indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia. *Brain, behavior, and immunity* 2010; 24(2): 201–209.
- Waskow C, Liu K, Darrasse-Jeze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, Shengelia T, Yao K, Nussenzweig M. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nature immunology* 2008; 9(6): 676–683.
- Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED. Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 1981; 304(25): 1529–1533.
- Welniak LA, Blazar BR, Murphy WJ. Immunobiology of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Annual review of immunology* 2007; 25: 139–170.
- Wilke CM, Wei S, Wang L, Kryczek I, Kao J, Zou W. Dual biological effects of the cytokines interleukin-10 and interferon-gamma. *Cancer immunology, immunotherapy* CII 2011; 60(11): 1529–1541.

- Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 2005; 105(11): 4191–4199.
- Xia MQ, Hale G, Lively MR, Ferguson MA, Campbell D, Packman L, Waldmann H. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *The Biochemical journal* 1993; 293 (Pt 3): 633–640.
- Xu J, Wei J, Zhu X, Zhang X, Guan J, Wang J, Yin J, Xiao Y, Zhang Y. Increased plasma indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interferon-gamma levels correlate with the severity of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 2013; 19(2): 196–201.
- Yamamoto S, Hayaishi O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *The Journal of biological chemistry* 1967; 242(22): 5260–5266.
- Zand MS, Vo T, Huggins J, Felgar R, Liesveld J, Pellegrin T, Bozorgzadeh A, Sanz I, Briggs BJ. Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways. *Transplantation* 2005; 79(11): 1507–1515.
- Zand MS, Vo T, Pellegrin T, Felgar R, Liesveld JL, Ifthikharuddin JJ, Abboud CN, Sanz I, Huggins J. Apoptosis and complement-mediated lysis of myeloma cells by polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Blood* 2006; 107(7): 2895–2903.
- Zhu W, Stevens AP, Dettmer K, Gottfried E, Hoves S, Kreutz M, Holler E, Canelas AB, Kema I, Oefner PJ. Quantitative profiling of tryptophan metabolites in serum, urine, and cell culture supernatants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bio-analytical chemistry* 2011; 401(10): 3249–3261.
- Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today* 1993; 14(3): 121–125.

## 6.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema des Tryptophanstoffwechsels. ....	24
Abb. 2: Kynurenin und Chinolinsäure im Urin von HSZT-Patienten am Transplantationstag. .	29
Abb. 3: Zellkulturfotos Negativkontrolle.....	40
Abb. 4: Zellkulturfotos LPS.....	41
Abb. 5: Zellkulturfotos ATG.....	41
Abb. 6: Zellkulturfotos Alemtuzumab. ....	42
Abb. 7: Zellkulturfotos ATG ohne Zytokine. ....	42
Abb. 8: Fotos leere Zellkulturflaschen ohne und mit IFN- $\gamma$ . ....	43
Abb. 9: Zellausbeute. ....	43
Abb. 10: Expression von IDO-1 bzw. IDO-2 relativ zu 18S abhängig von der Konzen- tration der gegebenen Zusätze.....	44
Abb. 11: Expression von IDO-1 bzw. IDO-2 relativ zu 18S abhängig vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze. ....	45
Abb. 12: Western-Blot-Analyse der Expression von IDO in Abhängigkeit des gegebenen Stimulus.....	46
Abb. 13: Western-Blot-Analyse der Expression von IDO in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der ATG-Gabe. ....	46
Abb. 14: Dosisabhängige Tryptophan-Konzentration. ....	47
Abb. 15: Dosisabhängige Konzentration von Tryptophanmetaboliten.....	48
Abb. 16: Dosisabhängige Konzentration von Tryptophan und Tryptophanmetaboliten bei reifen dendritischen Zellen. ....	49
Abb. 17: Anstieg von 5-Hydroxyindol-3-essigsäure unter dem Einfluss von TGF- $\beta$ .....	50
Abb. 18: Tryptophan-Konzentration in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze.....	51
Abb. 19: Konzentration von Tryptophanmetaboliten in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Gabe der Zusätze. ....	52
Abb. 20: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD14, CD1a und CD209.....	53
Abb. 21: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD83, CD80, CD86, HLA-DR und CD54.....	54
Abb. 22: FACS-Analyse der Oberflächenantigene CD11b, CD11c und CD18.....	55

### 6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mit hämatopoetischer Stammzelltransplantation behandelte Krankheiten (nach Copelan et al., 2006) .....	5
Tabelle 2: Symptome der GVHD (nach Ferrara et al., 2009) .....	10
Tabelle 3: Zusammenfassung bekannter Zielantigene von ATG (nach Mohty 2007) .....	15
Tabelle 4: Zusammensetzung der Stammlösungen für die Western-Blot-Gele .....	35
Tabelle 5: Für den Western Blot verwendete Antikörper .....	36

## 6.4. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
AA	Anthranilic acid (Anthranilsäure)
Abb.	Abbildung
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
Alem	Alemtuzumab
APC	Antigen Presenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATG	Antithymozytenglobulin
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CDP	Common Dendritic Cell Progenitor (gemeinsamer Dendritische-Zellen-Vorläufer)
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Antigen 4
d	day (Tag)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dendritic Cells (dendritische Zellen)
DC-SIGN	Dendritic Cell Specific Intercellular Adhesion Molecule 3 Grabbing Non-Integrin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC	Enzyme Commission
ECL	Enhanced Chemolumineszenz
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)

FCS-DC	Fetal Calf Serum for Dendritic Cells (fetales Kälberserum für dendritische Zellen)
Fe	Eisen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)
GVHD	Graft-versus-Host Disease (Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit)
h	hours (Stunden)
HAA	3-Hydroxyanthranilic acid (3-Hydroxyanthranilsäure)
HCl	Chlorwasserstoff
HIAA	5-Hydroxyindole-3-acetic acid (5-Hydroxyindol-3-essigsäure)
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Human Leukocyte Antigens
HRT	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IRF-1	Interferon Regulatory Factor 1
ITGAM	Integrin $\alpha_M$
ITGAX	Integrin $\alpha_X$
ITGB2	Integrin $\beta_2$
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
JNK	C-Jun-N-terminale Kinasen
KA	Kynurenic acid (Kynurensäure)
kDa	Kilo-Dalton

KLF-11	Krüppel-like Factor 11
Kyn	Kynurenin
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (Flüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie)
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen 1 (Lymphozytenfunktion-assoziiertes Antigen 1)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol pro Liter
Mac-1	Macrophage Antigen 1 (Makrophagen-Antigen 1)
MAO-A	Monoaminoxidase A
mDC	Mature Dendritic Cells (reife dendritische Zellen)
MDP	Macrophage Dendritic Cell Progenitor (Makrophagen-Dendritische-Zellen-Vorläufer)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupt-Histokompatibilitätskomplex)
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	Multiple Sklerose
mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
NOD-2	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne 2
o.	ohne
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
Pre-DCs	Precursor-DCs
QA	Quinolinic acid (Chinolinsäure)
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid (ribosomale Ribonukleinsäure)

RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SOCS-3	Suppressor of Cytokine Signaling 3
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TIEG-2	Transforming Growth Factor $\beta$ Inducible Early Gene 2
TNF	Tumornekrosefaktor
T-PLL	T-Zell-Prolymphozytenleukämie
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Units (internationale Einheiten)
ZNS	Zentralnervensystem
Zytok.	Zytokine

## **6.5. Danksagung**

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Reinhard Andreesen und seinem Nachfolger Prof. Dr. Wolfgang Herr für die Ermöglichung der Forschungsarbeit in ihrer Klinik, bei Prof. Dr. Ernst Holler für die Überlassung des Themas und die kompetente Begleitung des Projektes, bei Prof. Dr. Marina Kreutz für die hervorragende Betreuung im Labor und viele hilfreiche Anregungen, bei Dr. Katrin Peter für methodische Anleitungen sowie bei Alice Peuker und Gabriele Schönhammer für die Einarbeitung und fortwährende Unterstützung bei praktischen Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Wentao Zhu, Dr. Katja Dettmer-Wilde und Prof. Dr. Peter Oefner vom Institut für Funktionelle Genomik der Universität Regensburg für die gute und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

## **6.6. 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.

Regensburg, September 2015

---

Michael Katzfuß