

Aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik
und Zelltherapeutika (ITZ)
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Dr. med. Johannes Fischer

Regulation und antibakterielle Wirkung der Indolamin-2,3-Dioxygenase-
Aktivität in Dendritischen Zellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Michael Ahlbrink

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Rüdiger Sorg

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Walter Däubener

„Aus großer Kraft folgt große Verantwortung“

Ben Parker

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APC	Antigen präsentierende Zelle(n)
BrdU	5'-Brom-2'-Deoxy-Uridin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit(s)</i>
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte(s)</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DC	Dendritische Zelle(n)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>
GMP	<i>Granulocyte-macrophage Progenitor(s)</i>
HSA	Humanes Serumalbumin
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LC	<i>Langerhans Cell(s)</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein-Kinase</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle(n)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MLP	<i>Multi Lymphoid Progenitor(s)</i>
MNC	Mononukleären Zelle(n)
moDC	<i>Monocyte derived Dendritic Cell(s)</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor KappaB</i>
OD	Optische Dichte
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell(s)</i>
PBS	<i>Phosphat-Buffered Saline</i>
pDC	Plamacytoide dendritische Zelle(n)
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin-E2
PLC	<i>Peptide-Loading Complex</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor(s)</i>
smDC	<i>Semi-Matured Dendritic Cell(s)</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>

TAP	<i>Transporter Associated With Antigen Processing</i>
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
Th-Zellen	T-Helfer-Zelle(n)
TLR	<i>Toll-Like-Receptor(s)</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TPIL	PGE2+TNF α +IFN γ +LPS
Treg	Regulatorische T-Zelle(n)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Dendritische Zellen	1
1.1.1 Untergruppen der Dendritischen Zellen	1
1.1.2 Regulation der adaptiven Immunantwort	4
1.2 Indolamin-2,3-Dioxygenase.....	7
1.3 Ziele der Arbeit	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material	10
2.1.1 Antikörper, Reagenzien und Kits	10
2.1.2 Geräte.....	12
2.1.3 Software	12
2.1.4 Verbrauchsmaterial und Einwegartikel	13
2.2 Methoden	14
2.2.1 Zellzahlbestimmung	14
2.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus <i>Buffy Coats</i>	14
2.2.3 Isolierung von Monozyten aus mononukleären Zellen	15
2.2.4 Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen.....	15
2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen	16
2.2.6 Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Enzymaktivität.....	17
2.2.7 Fluoreszenzmarkierung und durchflusszytometrische Analyse	17
2.2.8 Bestimmung des Bakterienwachstums	18
2.2.9 Allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen.....	19
2.2.10 Statistik	20
3 Ergebnisse.....	21
3.1 Isolierung von Monozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes	21
3.2 Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen	22

3.3	Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität der Dendritischen Zellen	26
3.4	Allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen	29
3.5	Hemmung des Bakterienwachstums durch Dendritische Zellen	32
4	Diskussion	37
4.1	Einfluss verschiedener Stimuli auf die Ausreifung Dendritischer Zellen.....	37
4.2	Auswirkung der unterschiedlichen Reifungsfaktoren auf die allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen	39
4.3	Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität Dendritischer Zellen	40
4.4	Hemmung von Bakterienwachstum durch Dendritische Zellen	43
5	Zusammenfassung	46
6	Quellenverzeichnis	48
7	Danksagung	55

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden 1973 das erste Mal von Steinman und Cohn als adhärenente Zellpopulation beschrieben, die aus lymphatischem Gewebe von Mäusen gewonnen werden konnte. Ihre zu Makrophagen unterschiedliche Form und Bewegungsmuster veranlassten Steinman und Cohn die neu entdeckte Zellreihe als Dendritische Zellen (DC) zu bezeichnen.(1, 2) Die Wichtigkeit und Funktionsvielfalt der DC für die humorale und insbesondere die zelluläre adaptive Immunität wurden jedoch erst ab 1987 richtig eingeschätzt, wie Rowley und Fitch 2012 zusammenfassten.(3)

Die Steuerung des Immunsystems ist eine komplizierte Aufgabe des menschlichen Körpers. DC spielen eine herausragende Rolle als Dirigenten der adaptiven Immunantwort. In Geweben nehmen sie als unreife Zellen Antigene auf, um diese als Peptide über *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I und II Moleküle im Lymphknoten T-Zellen im Kontext weiterer immunrelevanter Moleküle wie bspw. costimulatorischer Moleküle zu präsentieren. Hierdurch können DC für die Antigene und damit Pathogene wie z.B. Bakterien und Viren, aber auch neoplastische Zellen, spezifische T-Zellen aktivieren und eine gegen diese Antigene gerichtete Immunantwort auslösen.(4) Weiterhin kommt den DC die Aufgabe zu, die Toleranz des Abwehrsystems gegen körpereigene, gesunde Zellen aufrecht zu erhalten.

1.1.1 Untergruppen der Dendritischen Zellen

DC können in mehrere Untergruppen unterteilt werden. Vereinfacht können myeloide/klassische, plasmazytoide und von Monozyten abgeleitete DC unterschieden werden. *In vitro* werden DC häufig aus Monozyten differenziert und dann als *Monocyte-Derived* DC bezeichnet.(4) Die genauen Aufgaben und Unterschiede zwischen den einzelnen DC-Untergruppen im menschlichen Körper sind in Grundzügen geklärt, aber die Details sind noch Bestandteil intensiver aktueller Forschung.

In Abbildung 1 ist eine Übersicht der DC in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation und ihren Vorläuferzellen dargestellt. Allen menschlichen DC gemein ist die Expression von MHC II und das Fehlen von typischen Zellmarkern von B-Zellen (CD19/20), T-Zellen (CD3) und

von natürlichen Killerzellen (CD56). Die im Blut vorkommenden DC können in drei Gruppen unterteilt werden. Die myeloiden $CD1c^+$, die myeloiden $CD141^+$ und die plasmazytoiden $CD303^+$ DC. Während es in der myeloiden $CD1c^+$ Population noch eine schwache Expression des Monozytenmarkers $CD14$ gibt bzw. eine kleine Subpopulation $CD14^+$ Zellen, sind die $CD141^+$ DC durch das Fehlen von $CD14$ zusätzlich von den anderen Untergruppen und Monozyten abgegrenzt. Die $CD141^+$ DC haben die Fähigkeit, Interferon (IFN) β zu produzieren und $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen durch Kreuzpräsentation aufgenommener Antigene über MHC I zu aktivieren. In dieser Fähigkeit und ihrem Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmoleküle scheinen sie den $CD8\alpha^+$ DC in Mäusen zu entsprechen, wobei nicht in allen Einzelheiten geklärt ist, ob dies für alle Eigenschaften der Zellen zutreffend ist.(5, 6)

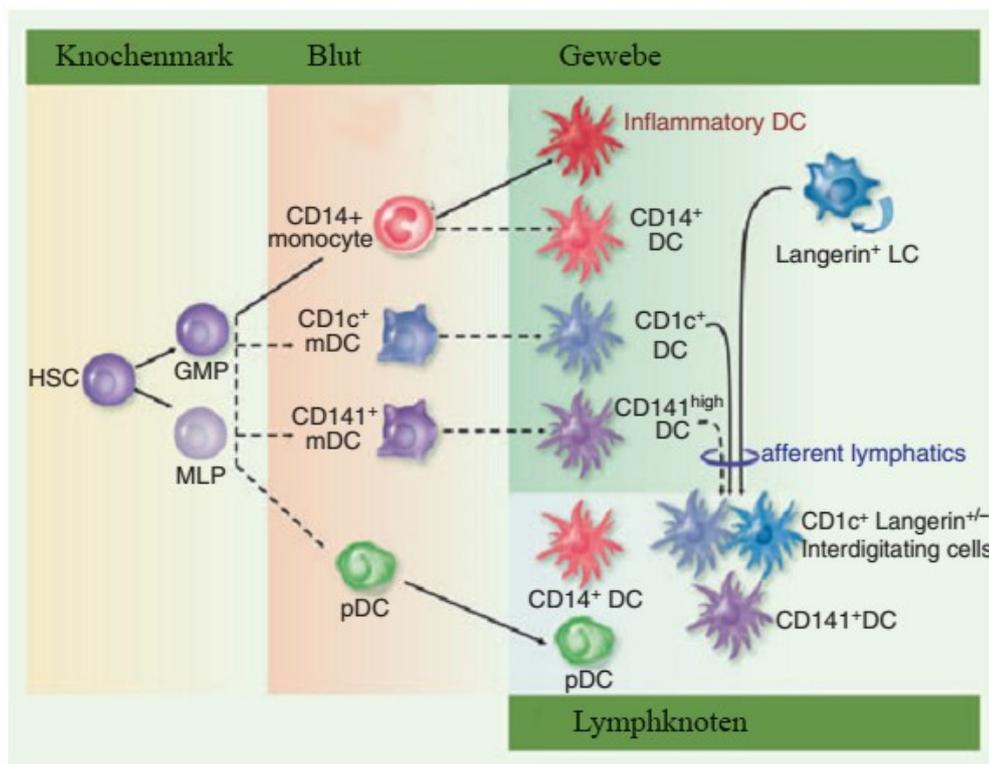


Abb. 1: Entwicklung und Lokalisation der Dendritischen Zellen im menschlichen Körper. Dargestellt sind die verschiedenen DC und ihre Vorläuferzellen in Abhängigkeit von der Lokalisation im Knochenmark, Blut, Gewebe und Lymphknoten. Die gestrichelten Linien kennzeichnen eine Entwicklung der Zellen, die noch weiterer Studien bedarf. Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) entwickeln sich die Granulocyte-Macrophage Progenitors (GMP) und die Multi-Lymphoid Progenitors (MLP), die wiederum Vorstufen der verschiedenen DC Subtypen und Monozyten sind. Myeloide DC werden als mDC und plasmazytoide DC als pDC gekennzeichnet. LC bezeichnet die Langerhans-Zellen. Modifiziert nach Collin et al.(4)

Die plasmazytoiden DC (pDC) haben die Fähigkeit, das früher als IFN I bezeichnete IFN α zu produzieren. Im Gegensatz zu den IFN β produzierenden CD141⁺ DC und der anderen myeloiden CD1c⁺ Untergruppe der DC unterscheiden sich die pDC in der Expression von CD68, wobei dieser Marker auch von Monozyten exprimiert wird.(5, 7, 8)

Die Fähigkeit der DC, Gewebe zu verlassen, unterscheidet sie von den Makrophagen, die einmal ins Gewebe eingewandert, dieses nicht mehr verlassen können. Im Mausmodell zeigte sich, dass abhängig vom Gewebe und den dort vorliegenden Umgebungsfaktoren sich die jeweiligen unterschiedlichen Subtypen der DC sowohl aus den myeloiden als auch den lymphoiden Vorläuferzellen als Anpassungsreaktion auf die vorherrschenden Ansprüche an das Immunsystem entwickeln können. Diese Beobachtung scheint sich auch auf humane DC anwenden zu lassen, wobei es hier jedoch noch genaueren Untersuchungen bedarf.(9) In nicht-lymphatischen Geweben sind sowohl die schon beschriebenen mDC und pDC zu finden, als auch „inflammatorische DC“, die von CD14⁺ Monozyten aus dem Blut abstammen. Die im Gewebe vorkommenden CD14⁺ DC, die keine spezifischen Marker der myeloiden DC, wie CD141 oder CD1c aufweisen, werden auch als „interstitielle“ oder „Haut-Typ“-DC bezeichnet. Sie stammen wie die inflammatorischen DC von CD14⁺ Monozyten ab. Im Gegensatz zu den interstitiellen DC treten die inflammatorischen DC im Gewebe erst in Erscheinung bei Entzündungen oder Infektionen. Weitere spezialisierte DC finden sich mit den Langerhans-Zellen im Plattenepithel der Haut sowie mit der Migroglia im Gehirn.(4)

Obwohl DC in fast allen Geweben nachgewiesen werden können, ist ihre Frequenz sehr gering. Deshalb wurden unterschiedliche *in vitro* Ansätze und Methoden entwickelt, um DC aus Stamm- und Vorläuferzellen zu gewinnen. Aus CD34⁺ hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen bspw. aus dem Knochenmark können durch Stimulation mit GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) und Tumornekrosefaktor- α (TNF α) DC differenziert werden.(10) Die häufigste Methode DC in größeren Mengen zu gewinnen, ist durch die Differenzierung von Blutmonozyten. Monozyten können hierfür mittels verschiedenster Techniken angereichert werden, z.B. durch immunmagnetische positive Selektion unter Verwendung eines für den Monozytenmarker CD14 spezifischen Antikörpers.(11) Die Methode, wie die Monozyten separiert werden, scheint keinen Einfluss auf die Funktion der gewonnenen DC zu haben, die DC-Präparationen unterscheiden sich aber in der Menge und Reinheit der gewonnenen Zellen. Die

Bedingungen (Zytokine, Medium, Zeitverlauf) für die Differenzierung der Monozyten zu unreifen DC (iDC) und für deren Ausreifung zu reifen DC können jedoch in funktionell unterschiedlichen DC resultieren, die sich z.B. in der Antigenaufnahme, Zytokin-Produktion oder ihrer T-Zell-stimulatorischen Aktivität unterscheiden. Ob sie dabei Toleranz oder Immunität induzieren, lässt sich nicht alleine aus den phänotypischen Markern ableiten, sondern ist multifaktoriell.(12)

1.1.2 Regulation der adaptiven Immunantwort

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) und hierzu gehören insbesondere die DC in den epithelialen Geweben der Lunge, des Magendarm-Trakts und der Haut, die den menschlichen Körper nach Außen abgrenzen, schützen den Organismus vor einem „unbeobachteten“ Eindringen von Pathogenen.(13, 14) Diese DC sind in einem unreifen Stadium. Über verschiedene Oberflächenrezeptoren, wie *Scavenger* Rezeptoren, *Toll-Like* Rezeptoren und *C-Type* Lektine sind sie befähigt, die Gegenwart von Pathogenen wahr zu nehmen und diese aufzunehmen, wodurch letztlich Peptidantigene der Pathogene über MHC Moleküle präsentiert werden können und so die Basis für die Aktivierung für diese Peptide spezifischer T-Zellen geschaffen wird.

Von den APC durch Phagozytose, Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommene Proteine werden in den Phagolysosomen bzw. sauren Endosomen enzymatisch zu Peptiden abgebaut. Fusionieren diese Kompartimente mit den sogenannten MHC II-reichen Vesikeln, kommt es zu einer Beladung der MHC II Moleküle mit Peptiden. Durch Fusion dieser Vesikel mit der Zellmembran gelangen die MHC II/Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche der APC und werden in die Zellmembran integriert.(15)

Im Gegensatz zu dieser Präsentation von Peptiden exogenen Ursprungs über MHC II-Moleküle auf der Oberfläche von APC, werden über MHC I-Moleküle auf allen Körperzellen Peptide endogenen Ursprungs präsentiert, die dem Immunsystem ein Abbild der in der jeweiligen Zelle ablaufenden Proteinbiosynthese vermitteln. Ein Teil der in den Zellen neu synthetisierten Proteine werden im Zytosol von Proteasomen zu Peptiden abgebaut und durch eine weitere Kürzung durch zytosolische Peptidasen auf eine Länge von 8-11 Aminosäureresten getrimmt. Zur Präsentation auf der Zelloberfläche über MHC I Moleküle werden die Peptide durch *Transporter Associated with Antigen Processing* (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und dort im sogenannten *Peptide-*

Loading Complex (PLC) an MHC I schwere Ketten und β 2-Mikroglobulin gebunden. Hieran beteiligt sind eine Reihe von Hilfsproteinen, wie ERp57, Calnexin und Calreticulin.(16, 17) Die fertig beladenen MHC I-Peptid Komplexe werden über den sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass auch intrazelluläre Pathogene, bzw. die von diesen infizierten Zellen, vom Immunsystem erkannt und abgetötet werden können. Im Gegensatz zu anderen Körperzellen können DC auch Peptide von aufgenommenen Proteinen über MHC I präsentieren, ein Mechanismus, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird und eine zentrale Rolle in der Initiationsphase der zytotoxischen T-Zell-Antwort spielt.(18)

Nach Aufnahme und Prozessierung der Proteine beginnen DC durch weitere vom Pathogen stammende Signale oder pathologische Veränderungen im umliegenden Gewebe induziert, auszureifen. Sie verlassen den Ort der Aufnahme des Antigens und migrieren zu den Lymphknoten oder gelangen in die Milz. Dort präsentieren sie über MHC I und II Moleküle im Kontext weiterer Oberflächenmoleküle, wie Adhäsionsmoleküle und costimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86, Peptide der zuvor aufgenommenen Antigene. Über MHC II präsentierte Peptide können von für das jeweilige Peptid spezifischen $CD4^+$ T-Helfer-Zellen erkannt werden, über MHC I präsentierte Peptide von $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen. In beiden Fällen resultiert die Erkennung der Peptide auf den reifen DC in einer Aktivierung der T-Zellen, ihrer Proliferation und ihrer Differenzierung zu Effektorzellen. Zytotoxische Effektorzellen verlassen daraufhin die lymphatischen Organe. Treffen sie im Gewebe auf Körperzellen, die das gleiche Peptid präsentieren (z.B. virusinfizierte Zellen, wenn das Peptid ursprünglich viralen Ursprungs war), können sie diese erkennen und abtöten. T-Helfer-Zellen differenzieren je nach polarisierendem Signal von den DC zu unterschiedlichen T-Helfer-Zellsubtypen. Sezernieren die DC IL-12, werden die $CD4^+$ T-Zellen zu T_H1 -Zellen, die durch die Bildung von bspw. $IFN\gamma$ Makrophagen aktivieren und an der Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen beteiligt sind. $CD4^+$ T-Zellen können aber in der Gegenwart anderer polarisierender Signale wie bspw. des Oberflächenmoleküls OX40L auch zu T_H2 -Zellen oder einem anderen Effektorsubtyp differenzieren, der andere Aspekte zellulärer und humoraler Immunität reguliert, wie die Entstehung einer Eosinophilen-Antwort und einer entsprechenden Anpassung der Antikörper-Antwort der B-Zellen auf das Antigen. Somit steuern die DC über die Präsentation der Peptide und die Expression eines bestimmten Repertoires costimulatorischer und polarisierender Moleküle die Entwicklung und Art der Immunantwort.(19) Verantwortlich für dieses Repertoire an

Oberflächenmolekülen und sezernierten Faktoren der DC sind dabei die die DC aktivierenden Signale. Sie werden u.a. von sogenannten *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP) ausgelöst. Zu den PAMP gehören z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Proteoglycane, unmethylierte DNA mit CpG Motiven, doppelsträngige RNA und diverse Glykosylierungen von Proteinen und Lipiden, d.h. Strukturen, die vielen Pathogenen gemeinsamen sind, im menschlichen Organismus jedoch nicht vorkommen. Sie werden von DC mit *Pattern Recognition Receptors* (PRR) erkannt. Zur Detektion von LPS steht den DC dabei bspw. der *Toll-Like* Rezeptor-4 (TLR-4) als PRR zur Verfügung.(19, 20)

DC sind nicht nur hauptverantwortlich für die Einleitung der Immunabwehr, sondern auch für den Erhalt der Selbsttoleranz. Der Erhalt der Toleranz ist eine essentielle Funktion des menschlichen Körpers zur Vermeidung überschießender Immunreaktionen gegen körpereigene Gewebe, aber auch körperfremde Zellen wie ungeborene Föten. Zentral wird Toleranz über die negative Selektion der unreifen T-Zellen im Thymus (hier Thymozyten genannt) vermittelt. Dies geschieht, wenn unreife T-Zellen Selbstantigene auf thymusständigen pDC erkennen. Als Konsequenz dieser Erkennung sterben sie ab. Für B-Zellen erfolgt die negative Selektion im Knochenmark. Als Mechanismen der peripheren Toleranz werden Mechanismen zusammengefasst, die nicht während der Entwicklung der Zellen, sondern während der Immunantwort greifen. Peripher erzeugen DC bspw. Toleranz gegenüber einem Antigen, wenn das Peptid auf unreifen DC, d.h. in der Abwesenheit von costimulatorischen Molekülen wie CD80 oder CD86, erkannt wird.(21)

Toleranz kann sich sowohl in einem einfachen Ausbleiben der Immunantwort durch die Eliminierung der reaktiven T- oder B-Zellen äußern, oder aber auch in einer Ausbildung von spezialisierten Zellen, die die Immunantwort antigenspezifisch hemmen. Solche Zellen stellen bspw. regulatorische T-Zellen (Treg) dar. Während autoreaktive T-Zell-Klone im Thymus zerstört werden, kommt es zusätzlich zur Ausbildung von natürlichen Treg, die Selbstantigene erkennen, aber eine Immunantwort gegen diese Selbstantigene unterdrücken.(22) Unter Einwirkung von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 oder *Transforming Growth Factor- β* (TGF β), kommt es aber auch im Verlauf einer Immunantwort zur Ausbildung von Treg. Mit IL-10 stimulierte DC erhalten selbst die Fähigkeit IL-10 zu produzieren und damit Treg zu induzieren. Die Differenzierung von T-Zellen zu Treg wird nicht nur durch anti-inflammatorische Zytokine begünstigt, sondern auch durch Veränderungen im Metabolismus von Tryptophan und Kohlenmonoxid.

Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) greift in den Tryptophan-Stoffwechsel ein und stimuliert die Differenzierung von T-Zellen zu Treg.(23)

1.2 Indolamin-2,3-Dioxygenase

Durch Indolamin-2,3-Dioxygenase werden Indolamin-Derivate, wie die essentielle Aminosäure Tryptophan zu verschiedenen Metaboliten abgebaut. Diese Metabolite werden im ersten Geschwindigkeits-limitierenden Schritt zu Formylkynurenin abgebaut und im nächsten Schritt unter Kynurenine subsumiert. Weitere Substrate von IDO sind 5-Hydroxytryptophan, Tryptamin und Serotonin.(24, 25) 1985 wurde IDO in verschiedenen menschlichen Geweben nachgewiesen, wie Lunge, Milz, Verdauungstrakt und in höherer Konzentration in der Plazenta.(26) Es gibt zwei Gene, die IDO kodieren, IDO1 und IDO2. Die beiden Enzyme unterscheiden sich in ihrer Enzymkinetik, wobei die Funktion im menschlichen Körper von IDO2 noch nicht hinreichend geklärt ist.(27) Die folgenden Anmerkungen beziehen sich daher zumeist auf IDO1. Vor der Entdeckung von IDO beim Menschen wurde eine andere Häm-Dioxygenase in der menschlichen Leber entdeckt, die den gleichen enzymatischen Schritt von Tryptophan zu N-Formylkynurenin katalysiert. Dieses Enzym wurde als Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) bezeichnet.(28)

Inzwischen ist bekannt, dass IDO von verschiedenen Zelltypen gebildet werden kann. Monozyten und Makrophagen bilden nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ IDO.(29) Unter dem Einfluss des Liganden von CD80/CD86 CTLA-4 und in der Gegenwart verschiedener Stimulatoren abhängig oder unabhängig von $\text{IFN}\gamma$ zeigte sich eine funktionelle IDO Expression in DC, sowohl im Maus-Modell, als auch bei menschlichen DC.(30) Nach Munn et al. resultiert eine Stimulation menschlicher DC mit $\text{IFN}\gamma$ nicht in einer funktionellen IDO Expression. Hierfür ist die zusätzliche Ligandierung von CD80/86 mit CTLA-4 erforderlich.(31) Fujigaki et al. postulierten für *Monocyte-Derived* DC unterschiedliche $\text{IFN}\gamma$ -abhängige als auch $\text{IFN}\gamma$ -unabhängige, über andere Stimulatoren wie LPS vermittelte Aktivierungswege für IDO. Während der $\text{IFN}\gamma$ abhängige Weg über $\text{STAT1}\alpha$ oder IRF-1 induziert wird, wird eine Induktion von IDO mit LPS bei Makrophagen und von Monozyten abstammenden Zellen über einen NF- κ B und/oder p38-MAPK abhängigen Weg angenommen.(32) Entsprechend scheint die Regulation der IDO-Aktivität in DC komplex zu sein und ist letztlich noch nicht endgültig aufgeklärt.

Der Abbau von Tryptophan als essentielle Aminosäure verhindert das Wachstum von

Bakterien, Viren und Parasiten. Auf der anderen Seite wird die Anzahl an T-Zellen verringert. Unter einer Depletion von Tryptophan kommt es zu einem Arrest im G1-Stadium des Zellzyklus der aktivierten T-Zellen. Ein Fortschreiten in die Synthesephase des Zellzyklus ist nur unter Vorhandensein von Tryptophan möglich. Weiter erweisen die T-Zellen sich anfällig für den Untergang durch Apoptose.(33, 34) Aber auch die Metabolite haben eine biologische Aktivität. Durch Kynurenin wird die Apoptose von T_H1 -Zellen eingeleitet. T_H2 -Zellen sind hiervon nicht betroffen. Hierdurch wird das Verhältnis von T_H1/T_H2 zu T_H2 -Zellen verschoben. Durch die Stimulation von Treg wird darüber hinaus die Gesamtzahl an T-Zellen verringert. Dieses und die Tatsache, dass sich T_H1 und T_H2 -Zellen gegenseitig zusätzlich hemmen, verhindert überschießende Immunreaktionen.(35, 36)

Diese immunsupprimierenden Eigenschaften von IDO spielen in vielen Systemen eine Rolle: Die IDO-Aktivität in Tumoren kann das Tumorwachstum fördern, bzw. hemmt die Abwehr des Körpers gegen den Tumor.(37) Erstmals in Mäusen konnte gezeigt werden, dass mit IDO-Inhibitoren behandelte schwangere Mäuse Abstoßungsreaktion gegen die Föten zeigen. Eine Alloantwort des mütterlichen Immunsystems wird somit durch IDO verhindert.(38)

Die Depletion von Tryptophan und die beim Tryptophanabbau entstehenden Metabolite sind somit nicht nur bedeutsam für die direkte Abwehr mikrobieller Erreger, sondern auch wichtige Mechanismen für die Aufrechterhaltung von immunologischer Toleranz. Deshalb ist ein besseres Verständnis der Regulation der IDO Aktivität in DC als zentraler Einheit des Immunsystems zur Aktivierung von Immunabwehr und Aufrechterhaltung von Bedeutung.(35, 39)

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Regulationsbedingungen von IDO in DC und die funktionellen Konsequenzen einer IDO-Aktivität in DC weiter aufzuklären, indem untersucht wurde:

- Ob durch unterschiedliche Ausreifungsfaktoren ausgereifte DC sich in ihrer IDO-Aktivität unterscheiden und ob der Reifegrad der DC von Bedeutung für die IDO-Aktivität ist.
- Ob diese Prozesse durch die Anwesenheit von IFN γ beeinflusst werden.
- Ob der Reifegrad der Zellen bzw. ihre IDO-Aktivität einen funktionellen Ausdruck im allostimulatorischen Potential der DC bzw. ihrer Fähigkeit bakterielles Wachstum zu hemmen findet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper, Reagenzien und Kits

mAb (Spezifität)	Konjugat	Klon	Isotyp	Hersteller
CD14	FITC/PE	RM052	IgG2a Maus	Beckman-Coulter, Krefeld
CD14	Microbeads		IgG2a Maus	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD83	FITC/PE	HB15a	IgG2b Maus	Beckman-Coulter, Krefeld
IgG1	FITC/PE	679, 1Mc7	IgG1 Maus	Beckman-Coulter, Krefeld

Tabelle 1: Antikörper für die Zellisolierung und Durchflusszytometrie

Reagenz	Hersteller	Firmensitz
Ammoniumchlorid-Lösung pH 7,4	Uniklinik Düsseldorf Zentralapotheke	Düsseldorf
Aqua destillata	Fischar	Saarbrücken
Biocoll (Ficoll-Lösung)	Biochrom	Berlin
Blutagar	bioMérieux	Nürtingen
BrdU-Zellproliferationskit (ELISA)	Roche	Mannheim
CellGroDC Medium	CellGenix	Freiburg
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences	Heidelberg
DMSO; Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich	Seelze
Ehrlich's Reagenz; p-Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma-Aldrich	Seelze
Essigsäure, 96%	Merck	Darmstadt
FCS; fötales Kälberserum	PAA Laboratories	Cölbe
GM-CSF; <i>Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor</i>	CellGenix	Freiburg
HSA, 20%; humanes Serumalbumin	Octapharma	Langenfeld
IL-4; Interleukin-4	CellGenix	Freiburg
IFN γ ; Interferon- γ	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
L-Kynurenin	Sigma-Aldrich	Seelze
LPS; Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich	Seelze
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich	Seelze
PFA, 4%; Paraformaldehyd	USB Corporation	Staufen
PBS; <i>Phosphate-Buffered Saline</i>	Lonza	Verviers, Belgien
RPMI-1640 (L-Tryptophan frei)	Pan Biotech	Aidenach
TNF α ; Tumornekrosefaktor- α	CellGenix	Freiburg
Trichloressigsäure, 30%	AppliChem	Darmstadt
Trypanblau-Lösung, 4%	Sigma-Aldrich	Seelze
X-Vivo 15 Medium	Lonza	Verviers, Belgien

Tabelle 2: Reagenzien und Kits

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Firmensitz
Cell-Dyn-3500R Blutzell-analysegerät	Abbott	Wiesbaden
CO ₂ Inkubator CB210	Binder	Tuttlingen
CO ₂ Inkubator 3111	Forma/ Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Photometer Modell 680	Bio Rad	München
ELISA Reader MQX200	Biotek Instruments	Heilenpark
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf	Hamburg
FACS Canto	BD Biosciences	Heidelberg
Finn-Pipetten	Thermo Scientific	Bonn
Microplate Reader Rainbow	Tecan	Männedorf, Schweiz
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss	Jena
Multipipette	Eppendorf	Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Brand	Wertheim
Pipetboy Accujet	Brand	Wertheim
Präzisionswaage W620	Kern	Balingen-Frommern
Sterilbank Lamin Air 1.8	Holten	Allerød, Dänemark
VarioMACS	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Wasserbad WB22	Memmert	Schwabach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf	Hamburg

Tabelle 3: Geräte

2.1.3 Software

Software	Hersteller	Firmensitz
Endnote X7	ISI Research Soft	Berkeley, CA, USA
FACS DIVA 6.0	BD Biosciences	Heidelberg
KC Junior	BIO-Tek Instruments	Winooski, VT, USA
LibreOffice	The Document Foundation	Berlin
Prism 5.0	Graph Pad	San Diego, CA, USA

Tabelle 4: Software

2.1.4 Verbrauchsmaterial und Einwegartikel

Material	Hersteller	Firmensitz
24-Well-Platten	Greiner BioOne	Frickenhausen
48-Well-Platten	BD Biosciences	Heidelberg
96-Well-Platten (Flachboden)	Greiner BioOne	Frickenhausen
96-Well-Platten (Spitzboden)	Greiner BioOne	Frickenhausen
Dispenser, 100 µl	Brand	Wertheim
Dispenser, 20 µl	Eppendorf	Hamburg
Kanülen	B.Braun	Melsungen
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner BioOne	Frickenhausen
LD MACS-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
LS MACS-Säulen	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
Parafilm	Bernis Flexible Packaging	Soignies, Belgien
Pasteurpipetten	Greiner BioOne	Frickenhausen
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl 1000 µl	Starlab	Hamburg
Reaktionsgefäße, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner BioOne	Frickenhausen
Rundbodenröhrchen, 5 ml	BD Biosciences	Heidelberg
Stripetten, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning/Costar	Wiesbaden

Tabelle 5: Verbrauchsmaterial und Einwegartikel

2.2 Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl und Vitalität wurden die Zellen mit einer Pipette resuspendiert, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit 10 µl Trypanblau-Lösung vermischt. Aus der nun entstandenen 1:2 verdünnten Suspension wurden 10 µl auf eine Neubauer-Zählkammer mit Deckgläschen gegeben. Unter einem Mikroskop konnten die vitalen und avitalen Zellen ausgezählt werden. Trypanblau hat die Eigenschaft, dass es die Zellmembran vitaler Zellen nicht durchdringen kann, aber tote Zellen aufgrund ihrer porösen Membran angefärbt werden. Durch Zählung der vitalen (ungefärbten) und avitalen (blaugefärbten) Zellen auf zwei der vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer wurde die vorherige 1:2 Verdünnung berücksichtigt. Der gezählte Wert der vitalen Zellen $\times 10^4$ gibt die Zellzahl pro ml an. Multipliziert mit dem Gesamtvolumen erhält man die Gesamtzellzahl. Der Anteil vitaler Zellen berechnet sich aus:

$$\text{Anzahl vitaler Zellen} \times 100 / (\text{Anzahl vitaler} + \text{toter Zellen}).$$

Eine weitere Möglichkeit der Zellzahlbestimmung war die Verwendung des Cell-Dyn-3500R Blutzellanalysegeräts, wofür 500 µl der Zellsuspension verwendet wurden.

2.2.2 Isolierung von mononukleären Zellen aus *Buffy Coats*

Zur Isolierung von mononukleären Zellen (MNC) aus der leukozytenreichen Fraktion (*Buffy Coat*) von freiwilligen Blutspenden (Blutbank, Universitätsklinikum Düsseldorf) erfolgte die Auftrennung der einzelnen Zellfraktionen mit Hilfe eines Ficoll-Dichtegradienten. Nach Bestimmung der Zellzahl und des Blutbildes mit Hilfe des Cell-Dyn-3500R Blutzellanalysegeräts wurden 15 ml Ficoll in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt und mit 1:2 mit PBS verdünntem Vollblut überschichtet. Zur Auftrennung wurden die Röhrchen zentrifugiert (20 min, 20°C, 850 g, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation zeigten sich von oben nach unten folgende Schichten: Plasma, Interphase mit MNC, Ficoll-Lösung und dann Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen. Die Interphase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Nach Sedimentation in der Zentrifuge (10 min, 4°C, 750 g) wurde der Überstand verworfen, das Zellsediment in 25 ml Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und für 10 min bei 4°C inkubiert, um die

verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Nach der Lyse erfolgten zwei Waschschrte mit PBS (7 min, 4°C, 550 g). Die Zellen wurden dann mit dem Blutzellanalysegerät ausgezählt, zur Isolierung der Monozyten verwendet oder zur späteren Nutzung mit einer Zelldichte von 5×10^7 /ml bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Isolierung von Monozyten aus mononukleären Zellen

Für die Isolierung von Monozyten aus MNC nutzt man die selektive Expression von CD14 auf der Zelloberfläche der Monozyten. Nach dem Protokoll von Sorg et al. wurden die CD14 tragenden Monozyten immunmagnetisch angereichert.(40) Dazu wurden MNC auf eine Zellzahl von $2,5 \times 10^8$ /ml mit 0,5% HSA/PBS eingestellt und mit 1,5 µl anti-CD14-*Microbeads* pro 10^6 Monozyten für 30 min bei 4°C inkubiert. In einen VarioMACS eingebrachte LS-MACS-Säulen wurden zweimal mit 5 ml 0,5% HSA/PBS gespült. Jede Säule hat ein Fassungsvermögen von 1×10^8 Zellen. Die mit den anti-CD14-*Microbeads* inkubierten Zellen wurden mit 0,5% HSA/PBS auf 3 ml pro Säule aufgefüllt, auf die Säule aufgetragen und zweimal mit 5 ml 0,5% HSA/PBS nachgespült. Die hierdurch als Durchlauf gewonnenen CD14⁻ mononukleären Zellen wurden sedimentiert (7 min, 4 °C, 550 g) und bei -80 °C eingefroren oder weiterverarbeitet.

Die CD14⁺ Zellen befinden sich auf der Säule im Magnetfeld des VarioMACS und wurden nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld mit 5 ml 0,5% HSA/PBS in ein 15 ml Röhrchen mit Stempeldruck eluiert. Die Zellzahlbestimmung der CD14⁺ Monozyten wurde mittels Cell-Dyn-3500R Blutzellanalysegerät vorgenommen bzw. erfolgte inklusive Vitalitätsbestimmung mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer. Die Monozyten konnten nun direkt weiterverarbeitet oder in Kryoröhrchen mit einer Anzahl von 1×10^7 /ml bei -80 °C eingefroren werden.

2.2.4 Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen

Die Differenzierung von unreifen DC erfolgte durch ein sechstägiges Kulturverfahren aus CD14⁺ Monozyten nach einem modifizierten Protokoll von Zhou & Tedder.(41, 42) An Tag sechs wurden den unreifen DC dann verschiedene Stimuli hinzugegeben, um eine IDO-Aktivität und/oder eine Ausreifung der DC zu induzieren.

Die Monozyten wurden an Tag 0 mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in CellGroDC mit 1000 U/ml *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) und

50 U/ml Interleukin-4 (IL-4) in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Das Volumen in einem Well betrug 2 ml. Ein Mediumwechsel erfolgte an Tag 3 und 6, indem 1 ml Medium abgenommen und verworfen wurde und 1 ml CellGroDC mit 2000 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4 pro Well hinzugefügt wurde.

Zusätzlich zu diesen Zytokinen erfolgte an Tag 6 eine Stimulation mit verschiedenen Faktoren, wie in Tabelle 6 aufgeführt.

Ansatz	Zytokine (Konzentration)
A	Tumornekrosefaktor α (TNF α ; 1000 U/ml)
B	Interferon- γ (IFN γ ; 1000 U/ml)
C	Prostaglandin E2 (PGE2; 1 μ g/ml)
D	Lipopolysaccharid (LPS; 50 ng/ml)
E	IFN γ (1000 U/ml), LPS (50 ng/ml)
F	IFN γ (1000 U/ml), PGE2 (1 μ g/ml)
G	IFN γ (1000 U/ml), TNF α (1000 U/ml)
H	IFN γ (100 U/ml), TNF α (1000 U/ml), PGE2 (1 μ g/ml), LPS (50 ng/ml) (TPIL)

Tabelle 6: Verschiedene Ansätze zur Stimulation unreifer DC

Zusätzlich wurde an Tag 6, wenn die Bestimmung der IDO-Aktivität vorgenommen werden sollte, Tryptophan mit 100 μ g/ml zu den Wells hinzugegeben. An Tag 9 wurden Überstände der Kulturen für die IDO-Bestimmung abgenommen und die Zellen für durchflusszytometrische Analysen geerntet oder in weitere Versuche eingebracht.

2.2.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurden diese gezählt und sedimentiert (7 min, 4 °C, 550 g). Das Zellsediment wurde anschließend in 500 μ l 8% HSA/RPMI-1640 pro einzufrierendem Kryoröhrchen aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Zu dieser Zellsuspension wurden 500 μ l/Kryoröhrchen 22% DMSO/RPMI-1640 hinzugegeben. Das DMSO verhindert die Kristallisation während des Einfrierens. Danach wurden die Kryoröhrchen sofort bei -80 °C eingefroren.

Zum Auftauen wurde 1 ml 8% HSA/RPMI-1640 pro aufzutauendem Kryoröhrchen in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt. Die tiefgefrorenen Kryoröhrchen wurden in der Hand angetaut.

Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml 8% HSA/RPMI-1640 pro Kryoröhrchen vollständig aufgetaut und in das vorbereitete Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt und bei 550 g, 4 °C für 7 min zentrifugiert. Die Zellen konnten danach für Versuche eingesetzt werden.

2.2.6 Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Enzymaktivität

Der Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Däubener et al.(43) Es wurden je Ansatz 160 µl Zellkulturüberstand der DC-Generierung an Tag 9 abgenommen und in ein Well einer 96-Well-Spitzbodenplatte überführt. Zu diesem Zeitpunkt konnte der Überstand für eine spätere Analyse eingefroren werden. Zu jedem Well wurden 10 µl 30% Trichloressigsäure hinzugegeben, um die Proteine auszufällen und N-Formylkynurenin zu L-Kynurenin zu hydrolysieren. Um diese Vorgänge zu beschleunigen, wurde die Platte für 30 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Für die Sedimentation der Proteine wurde die Platte für 10 min bei 500 g bei 22 °C zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden abgenommen und in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt. Zu jedem Well wurden dann 100 µl Ehrlich's Reagenz (12 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd /ml in 99% Essigsäure) hinzugegeben.

L-Kynurenin, als Produkt der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität, reagiert mit Ehrlich's Reagenz zu einem gelben Azofarbstoff, der quantitativ mittels ELISA-Reader (492 nm) bestimmt werden kann. Die Absorption ist proportional zur Konzentration des gebildeten L-Kynurenins und damit ein Maß für die enzymatische Aktivität der Indolamin-2,3-Dioxygenase in den Kulturen. Als Positivkontrollen wurden 5% und 10% Kynureninlösungen verwendet. Negativkontrollen waren *Aqua destillata* sowie Medium.

2.2.7 Fluoreszenzmarkierung und durchflusszytometrische Analyse

Die auch als FACS-Analyse bezeichnete durchflusszytometrische Analyse beschreibt ein Verfahren, Zellen anhand ihrer Zellgröße, Granularität und Expression von Oberflächenmolekülen quantitativ zu erfassen.

Zur Messung der Oberflächen-Expression werden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper an das jeweilige zu untersuchende Antigen gebunden. Hierfür wurden 5 µl des

entsprechenden Antikörpers in einem Polypropylen-Rundbodenröhrchen vorgelegt. Die zu analysierenden Zellen wurden in einem Volumen von 100 µl in PBS und einer Gesamtzellzahl von nicht unter 1×10^5 Zellen in das Rundbodenröhrchen überführt und für 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenen Antikörpern wurde ein Waschschrift mit PBS (7 min, 550 g, 4 °C) durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen konnten nun nach Aufnahme in 100 µl PBS direkt am Durchflusszytometer gemessen oder zur späteren Messung in 100 µl 4% Paraformaldehyd fixiert werden. Als Negativkontrollen dienten Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörpern.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen erfolgte an einem FACS Canto Durchflusszytometer. Anhand der Größen- (*Forward Scatter, FSC*) und Granularitätscharakteristika (*Side Scatter, SSC*) wurden die Zellen elektronisch auf vitale Zellen eingeschränkt und deren Fluoreszenz bestimmt.

2.2.8 Bestimmung des Bakterienwachstums

Zur Bestimmung des Bakterienwachstums bzw. der Hemmung des Wachstums durch DC wurde zum einen die durch das Bakterienwachstum hervorgerufene Trübung des Mediums mittels Photometer bestimmt und nach Ausplattierung einer Verdünnungsreihe auf Blut-Agar zum anderen die *Colony Forming Units* (CFU) ausgezählt.

Die entsprechend Tabelle 6 mit verschiedenen Zytokinen stimulierten DC-Kulturen wurden an Tag 9 der Ausreifung mit jeweils einer Kolonie/Well *Staphylococcus aureus* angeimpft. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurden 100 µl des Kulturmediums abgenommen, in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt und bei einer Wellenlänge von 620 nm auf die optische Dichte hin untersucht.

Für die Bestimmung der *Colony Forming Units* wurden in eine 48-Well-Platte 900 µl/Well Tryptophan-freies RPMI-1640 vorgelegt. Die Anzahl der vorgelegten Wells betrug acht Wells pro Stimulationsbedingung. Aus der angeimpften Platte (s. o.) wurden von jedem Well 100 µl Kulturmedium nach Resuspendieren abgenommen und in das jeweils zugehörige erste Well der 48-Well-Platte gegeben. Aus diesem Well wurden nach gutem Durchmischen 100 µl entnommen und diese in das nächste Well der Reihe überführt (1:10 Verdünnung). Diese Arbeitsschritte wurden für die verbliebenen sieben Wells der Verdünnungsreihe wiederholt. Aus dem 1:10⁸ verdünnten achten Well wurden 100 µl verworfen, um in allen acht Wells ein Volumen von 900 µl zu erhalten. Pro Well wurden

nun jeweils zweimal 10 µl abgenommen und jeweils auf ein Achtel einer zuvor in acht Teile unterteilten Blut-Agar-Petrischale pipettiert. Diese Petrischale wurde für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Auf der Blut-Agar-Petrischale konnten sich nun folgende Wachstumsmuster zeigen:

1. Kein Wachstum.
2. Flächiges Wachstum ohne Möglichkeit der Diskriminierung einzelner Kolonien
3. Diskriminierbare vereinzelt Kolonien

Von dem Achtel ausgehend, in dem die Kolonien diskriminierbar waren und damit gezählt werden konnten, wurden nun die Kolonien gezählt und mit dem Verdünnungsfaktor (X) der bewachsenen Achtel mit 1×10^X multipliziert. Da man 10 µl und damit näherungsweise 1/100 der Verdünnung aus der 48 Well-Platte entnommen hatte, wurde der erhaltene Wert mit 100 multipliziert. Um der Verdünnung beim Schritt der Entnahme von 100 µl aus der Ursprungsplatte der Dendritischen Zellen mit 1 ml Volumen Rechnung zu tragen, wurde der nun erhaltene Wert mit 10 multipliziert.

2.2.9 Allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen

Zur Untersuchung der allostimulatorischen Aktivität von unreifen und reifen DC wurden diese (Tabelle 6) in unterschiedlichen Zellzahlen (100, 1000, 2000, 5000 /Well) in einer 96-Well-Rundbodenplatte mit MNC eines anderen Spenders mit einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/Well in X-Vivo 15 Medium in einem Volumen von 200 µl/Well ausplattiert. Die Platte wurde bei 37 °C und 5% CO₂ für 5 Tage inkubiert.

Am Tag 5 wurden 20 µl/Well 5'-Brom-2'-Deoxy-Uridin-Lösung (BrdU) (1:100 verdünnt mit X-Vivo 15) hinzugegeben. Das BrdU wird während der DNA-Synthese proliferierender Zellen anstelle des Thymin in die DNA eingebaut. Um diesen Einbau zu messen, wurde die Platte für 16 h bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Dann wurden die Zellen gut resuspendiert, in eine 96-Well-Flachbodenplatte überführt und anschließend zentrifugiert (20 °C, 10 min, 300 g, ohne Bremse). Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Platte bei 60 °C für 60 min getrocknet. Zur Fixierung und zur Denaturierung der DNA wurden nun 200 µl/Well FixDenat-Lösung (Kit) hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der FixDenat-Lösung wurden 100 µl Peroxidase-konjugierter

anti-BrdU-Antikörper (1:100 verdünnt mit Verdünnungslösung, Kit) pro Well hinzupipettiert und für weitere 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit je 200 μ l/Well Waschpuffer (1:10 verdünnt mit *Aqua destillata*, Kit), um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Damit die gebundenen Antikörper sichtbar gemacht werden konnten, wurden 100 μ l/Well Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat (Kit) zugegeben und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte und damit indirekt die DNA-Synthese bzw. Proliferation der Zellen wurde nun mittels ELISA-Reader bei 655 nm gegenüber 490 nm ermittelt. Alle Versuche wurden als Triplikate angesetzt. Als Negativkontrolle dienten die Werte von Ansätzen von MNC ohne die Zugabe von DC.

2.2.10 Statistik

Alle Werte repräsentieren soweit nicht anders angegeben Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test geprüft. Für Proben mit signifikant unterschiedlicher Varianz wurde zusätzlich die Welch-Korrektur verwendet. Statistische Ausreißer wurden mittels des Grubb's Test identifiziert und aus der Berechnung ausgeschlossen. Die Korrelation und damit der lineare Zusammenhang wurde mittels Pearson Test dargestellt. Der Einfluss von zwei unabhängigen Variablen auf eine weitere Variable wurde mittels Two-Way Anova-Test untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Monozyten aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Monozyten wurden als $CD14^+$ Zellen immunmagnetisch aus der mononukleären Zellfraktion, welche durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus *Buffy Coats* gesunder Spender gewonnen wurde, isoliert. Die Reinheit der Monozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

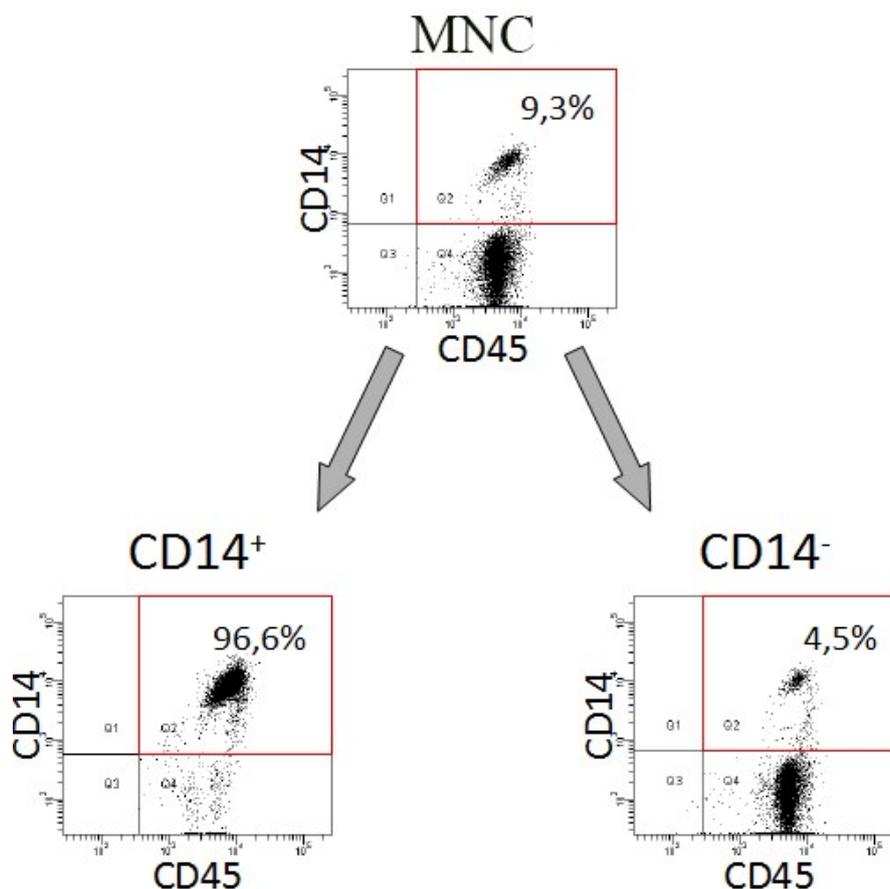


Abb. 2: Isolierung von Monozyten aus MNC. Monozyten wurden als $CD14^+$ Zellen immunmagnetisch aus MNC angereichert. Der Anteil $CD14^+CD45^+$ Monozyten in MNC sowie in der $CD14^+$ und $CD14^-$ Fraktion wurde nach Anfärbung mit $CD14$ und $CD45$ spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch bestimmt. Quadranten wurden anhand von Isotypkontrollen eingestellt. Der jeweilige Quadrant mit den $CD14^+CD45^+$ Monozyten ist rot umrandet, der jeweilige Anteil der Monozyten ist aufgeführt.

Vor der Isolierung lag der Anteil CD14⁺CD45⁺ Monozyten bei 30,67 ± 10,45% (n=3). Nach der Anreicherung machten Monozyten 96,68 ± 0,23% der CD14⁺ Fraktion aus. In Abbildung 2 sind exemplarisch die Ergebnisse einer solchen durchflusszytometrischen Analyse dargestellt.

3.2 Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen

Um Monozyten zu unreifen Dendritischen Zellen zu differenzieren, wurden sie für sechs Tage in der Gegenwart der Zytokine GM-CSF und IL-4 kultiviert. Unreife DC wurden dann in der Gegenwart unterschiedlicher Stimuli für weitere drei Tage kultiviert, um die Ausreifung zu induzieren. Differenzierung und Ausreifung können über die Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD83 verfolgt werden: Monozyten sind CD14⁺CD83⁻, unreife DC CD14^{-/low}CD83⁻ und reife DC CD14⁻CD83⁺.

Ein exemplarisches Beispiel der Differenzierung und Ausreifung von DC mit TNF α als Reifungsfaktor ist in Abbildung 3 dargestellt. Beispiele für die durchflusszytometrische Analyse der Ausreifung in der Gegenwart der unterschiedlichen Stimuli ab Tag sechs finden sich in Abbildung 4. Abbildung 5 fasst die Frequenz CD14⁻CD83⁺ reifer DC an Tag 9 unter den unterschiedlichen Bedingungen für alle durchgeführten Experimente als Säulendiagramm zusammen.

In der Gegenwart von TNF α als Reifungsfaktor zeigten 29,14 ± 6,24% (n=14) der Zellen den CD14⁻CD83⁺ Immunphänotyp reifer DC, wogegen in der Abwesenheit eines Reifungsstimulus der Anteil dieser Zellen nur bei 1,65 ± 0,45% lag (n=4; p=0,0007). Auch die Stimuli LPS (29,69 ± 6,42%; n=12; p=0,0011), IFN γ +LPS (42,20 ± 5,44%; n=20; p<0,0001) und TNF α +IFN γ +PGE2+LPS (48,81 ± 5,44%; n=16; p<0,0001) induzierten eine signifikante Ausreifung der DC. Nach Stimulation mit IFN γ +TNF α war ebenfalls eine signifikante Zunahme des Anteils reifer CD83⁺ DC zu beobachten (6,84 ± 1,34%; n=9; p=0,0051), diese lag aber unter der für mit TNF α alleine beobachteten Frequenz (s.o.). Im Gegensatz hierzu konnte für die Stimuli IFN γ (0,76 ± 0,10; n=13), PGE2 (0,58 ± 0,13%; n=6) und IFN γ +PGE2 (3,89 ± 0,85; n=15) keine signifikante Ausreifung der DC beobachtet werden. IFN γ scheint somit alleine keinen Reifungsstimulus darzustellen, jedoch synergistisch mit LPS auf die Ausreifung zu wirken und die TNF α -induzierte Ausreifung zu hemmen.

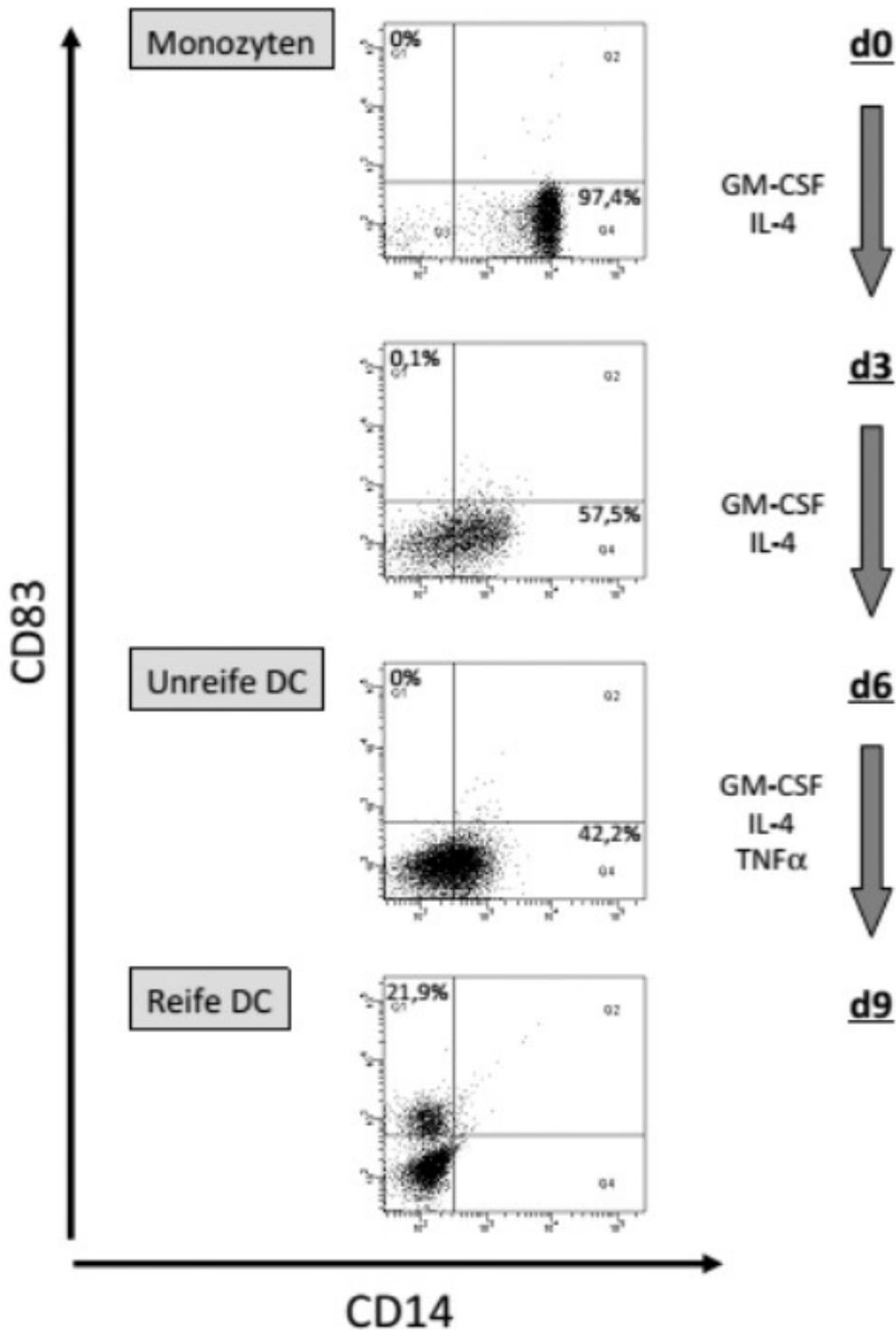


Abb. 3: Differenzierung und Ausreifung von DC aus Monozyten. Monozyten wurden in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 für sechs Tage kultiviert. Anschließend folgte eine weitere dreitägige Kultur in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 sowie TNF α als Reifungsfaktor. An den Tagen 0, 3, 6 und 9 wurde der Anteil CD14⁺CD83⁻ Monozyten und CD14⁺CD83⁺ reifer DC durchflusszytometrisch bestimmt. Die jeweilige Frequenz ist angezeigt. Quadranten wurden entsprechend von Isotypkontrollen gesetzt.

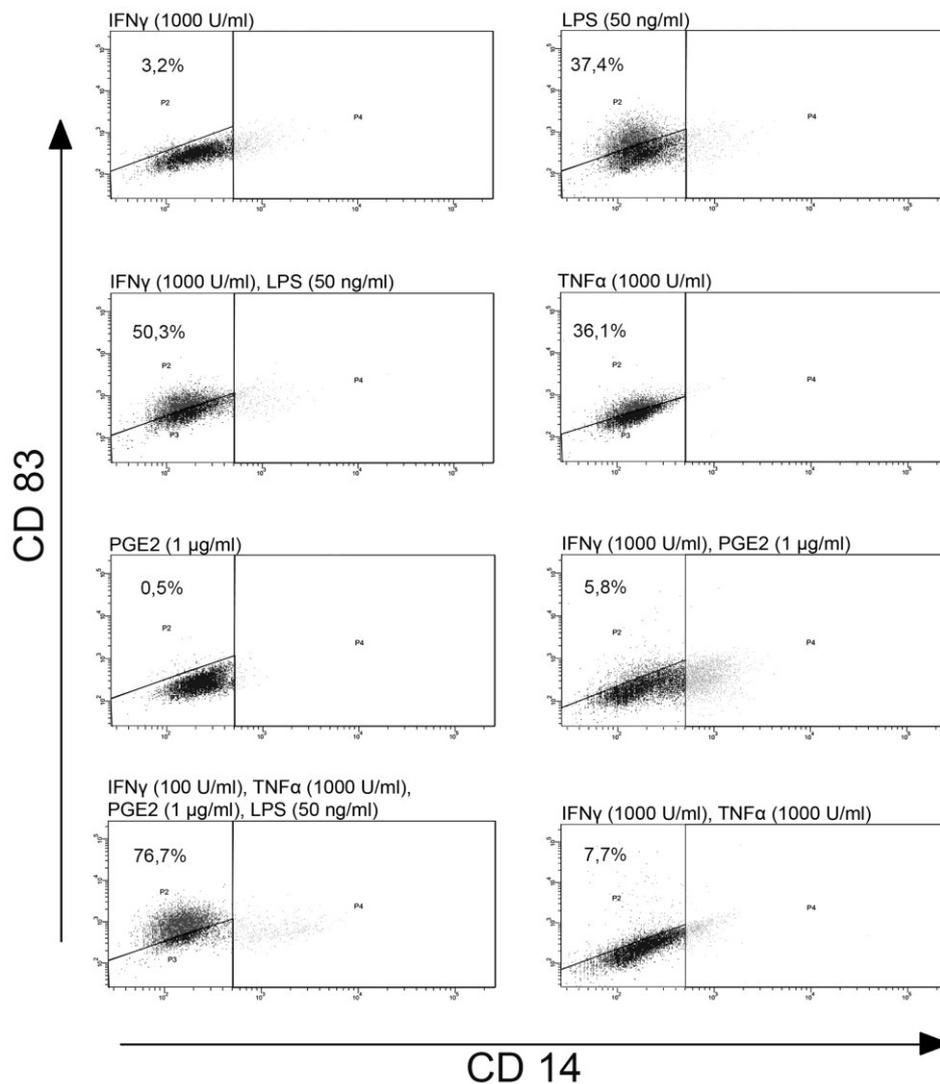


Abb. 4: Frequenz CD14⁺CD83⁺ reifer DC nach der Differenzierung und Ausreifung von DC unter unterschiedlichen Reifungsbedingungen. Monozyten wurden für sechs Tage in der Gegenwart von GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert und diese anschließend unter den jeweils angezeigten Bedingungen für drei Tage ausgereift. Der Anteil CD14⁺CD83⁺ reifer DC an Tag 9 wurde durchflusszytometrisch nach Anfärbung mit CD14 und CD83 spezifischen Antikörpern bestimmt und ist in Prozent jeweils angegeben. Quadranten wurde entsprechend von Isotypkontrollen gesetzt.

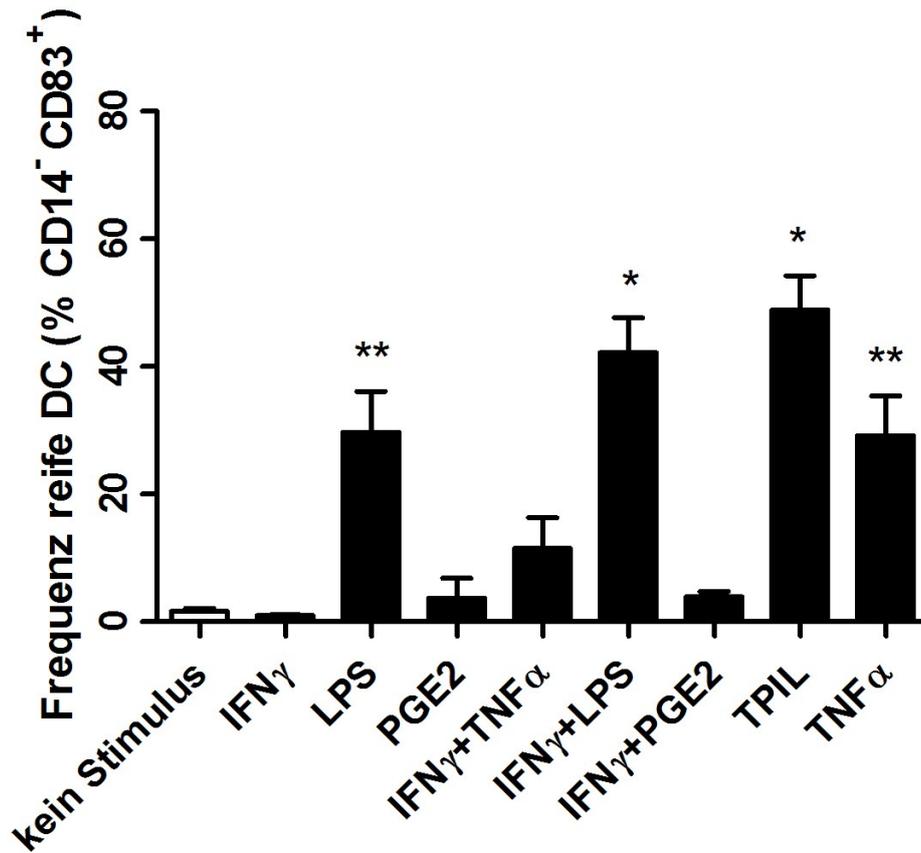


Abb. 5: Frequenz reifer DC nach Ausreifung in der Gegenwart unterschiedlicher Reifungsstimuli. Unreife DC wurden für drei Tage in der Gegenwart der jeweils aufgeführten Stimuli ausgereift. Dann wurde der Anteil CD14⁻CD83⁺ reifer DC durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens 4 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz gegenüber unstimulierten unreifen DC ist angezeigt: *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$. TPIL: TNF α +IFN γ +PGE2+LPS.

3.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität der Dendritischen Zellen

Unreife Dendritische Zellen wurden ab Tag 6 unter unterschiedlichen Bedingungen kultiviert (siehe Tabelle 6). Der Nachweis der IDO-Aktivität der Zellen wurde durch Quantifizierung des aus Tryptophan gebildeten Abbauproduktes Kynurenin im konditionierten Medium an Tag 9 bestimmt (Abbildung 6).

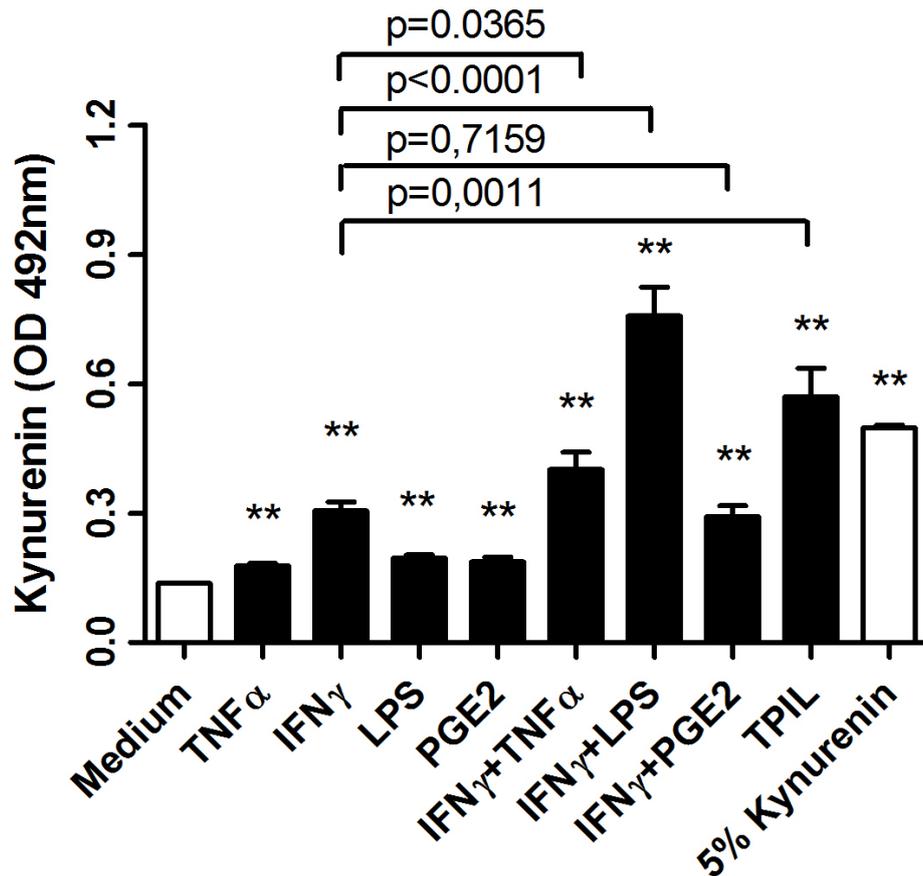


Abb. 6: Nachweis der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität Dendritischer Zellen. Unreife DC wurden mit den jeweils angegebenen Faktoren für drei Tage stimuliert. Anschließend wurde die IDO-Aktivität der Zellen durch den Nachweis des Abbauproduktes Kynurenin im konditionierten Medium der Zellen photometrisch bei 492 nm bestimmt. Als Negativkontrolle wurde Medium verwendet, als Positivkontrolle eine 5% Kynureninlösung. Die Kontrollen sind als weiße Balken dargestellt. Die statistische Signifikanz gegenüber Medium ist angezeigt: **, $p \leq 0,01$. Für den Vergleich der jeweiligen Stimulationen mit und ohne IFN γ sind die einzelnen p-Werte angegeben. TPIL: TNF α +IFN γ +PGE2+LPS. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens sechs unabhängigen Experimenten.

DC, die mit $\text{TNF}\alpha$, LPS und PGE2 alleine stimuliert wurden, zeigten keine substanzielle IDO-Aktivität im Vergleich zur Mediumkontrolle ($0,14 \pm 0,0002$; $n=18$), während $\text{IFN}\gamma$ alleine eine deutliche IDO-Aktivität induzierte ($0,31 \pm 0,021$; $n=12$; $p<0,0001$). Auch die Kombination von $\text{IFN}\gamma$ mit den anderen Faktoren führte zu einer signifikanten IDO-Aktivität ($p<0,0001$ für alle Kombinationen). Diese war dabei mit Ausnahme der Kombination von $\text{IFN}\gamma$ +PGE2 auch jeweils signifikant höher als die IDO-Aktivität, die durch $\text{IFN}\gamma$ alleine stimuliert wurde. Die höchste IDO-Aktivität wurde für die Kombination $\text{IFN}\gamma$ +LPS beobachtet ($0,76 \pm 0,07$; $n=20$).

$\text{IFN}\gamma$ wirkte somit synergistisch mit den anderen Faktoren. In Abbildung 7 wurden die Ansätze, die sich in der Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ (mit oder ohne) unterscheiden, kombiniert und einander gegenübergestellt. Hier wird die Abhängigkeit der IDO-Aktivität von DC von $\text{IFN}\gamma$ sehr deutlich: Ansätze mit $\text{IFN}\gamma$ haben eine signifikant höhere IDO-Aktivität als Ansätze ohne $\text{IFN}\gamma$ ($p<0,0001$). $\text{IFN}\gamma$ scheint zwar nicht der einzige Faktor zu sein, der die IDO-Aktivität in DC beeinflusst, aber er zeigt sich in dieser Versuchsanordnung als entscheidender Faktor für eine gesteigerte Aktivität.

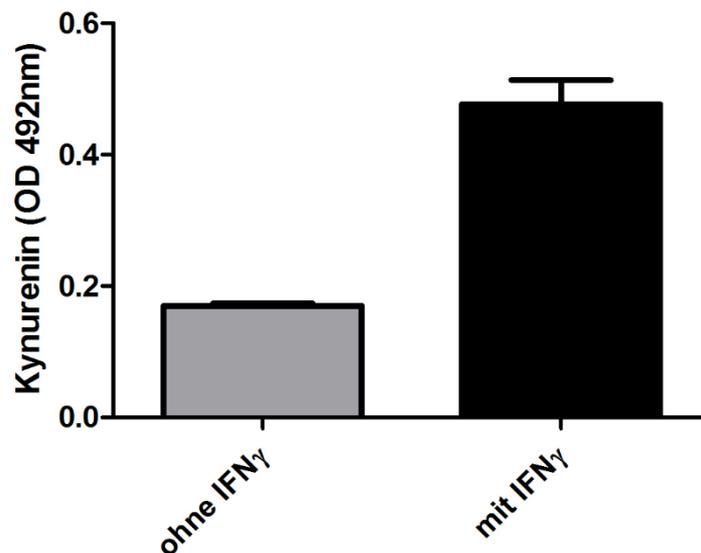


Abb. 7: Einfluss von $\text{IFN}\gamma$ auf die Indolamin-2,3-Dioxygenase Aktivität. Unreife DC wurden mit verschiedenen Faktoren und Faktorkombinationen (s. Tabelle 6), die $\text{IFN}\gamma$ enthielten oder nicht, für drei Tage stimuliert. Anschließend wurde Kynurenin im konditionierten Medium der Zellen als Maß für die IDO-Aktivität der Zellen photometrisch bei 492 nm bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler der Ansätze mit und ohne $\text{IFN}\gamma$.

Nun wurde als zusätzlicher Einflussfaktor für die IDO-Aktivität der Zellen der Grad der Ausreifung der DC, der sich je nach Reifungsstimulus unterschied (Abbildung 5), mit einbezogen. In Abbildung 8 wurden zusammengehörige Messpaare (Frequenz CD83⁺ und OD 492 nm) für alle Ansätze (Abbildung 8C) sowie getrennt für die Ansätze mit IFN γ (Abbildung 8B) und ohne (Abbildung 8A) gegeneinander geplottet.

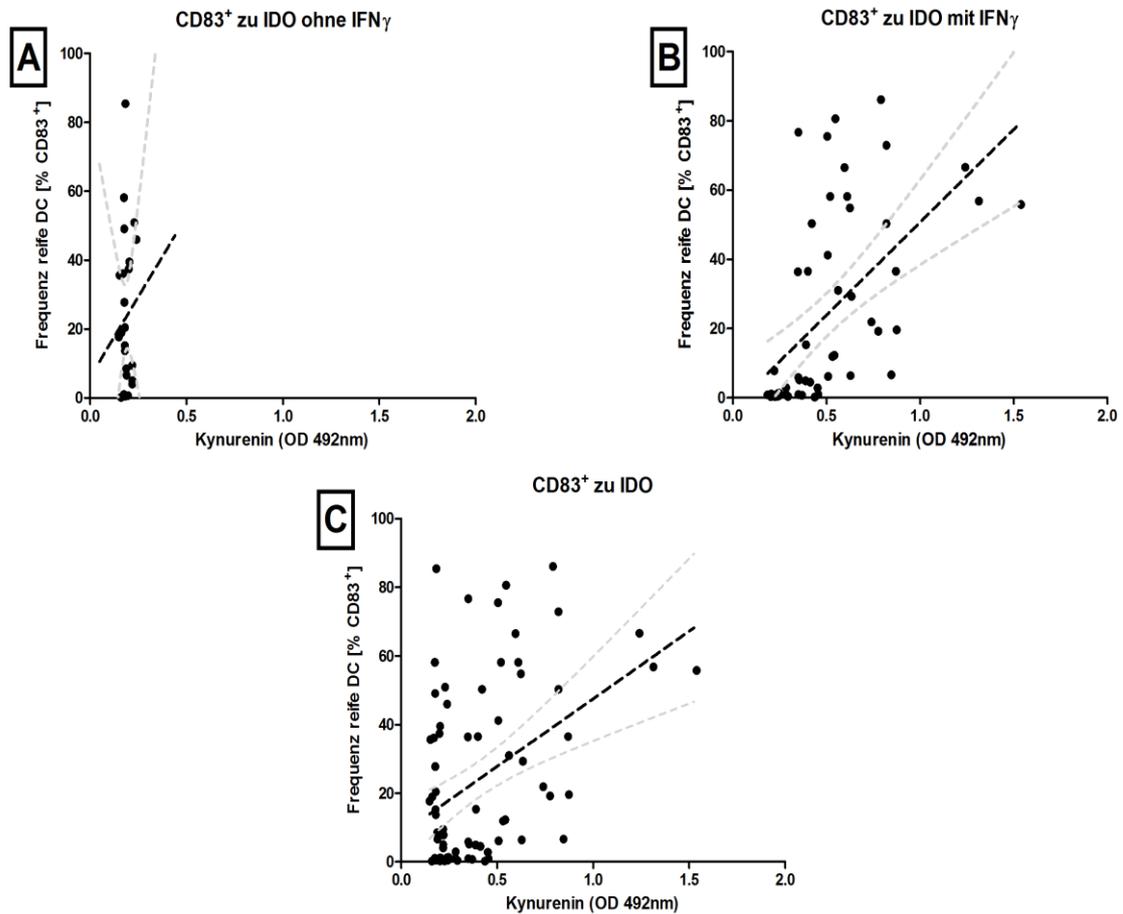


Abb. 8: Vergleich der IDO-Aktivität in Abhängigkeit vom Reifestatus der DC und IFN γ . Für alle DC-Kulturen (C) bzw. für Kulturen in der Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von IFN γ wurden der Grade der Ausreifung (Frequenz CD83⁺) gegen die IDO-Aktivität (OD 492 nm) geplottet. Die schwarzen gestrichelten Linien kennzeichnen die lineare Regression. Die Konfidenzintervalle sind durch graue gestrichelte Linien angezeigt.

Für alle 78 Messpaare (Abbildung 8C), unabhängig von der Verwendung von IFN γ im Reifungsstimulus, konnte eine signifikante Korrelation zwischen Ausreifung und IDO-Aktivität festgestellt werden (Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=0,435$; 95% Konfidenzintervall 0,235 – 0,600; $p<0,0001$). Diese Korrelation zeigte sich auch für die

Ansätze mit $\text{IFN}\gamma$ (Abbildung 8B; $r=0,5738$; 95% Konfidenzintervall $0,3591 - 0,7308$; $p<0,0001$; $n=53$), nicht jedoch für die Ansätze ohne $\text{IFN}\gamma$ (Abbildung 8A; $r=0,09828$; $n=25$).

Zusammenfassend kann hier gesagt werden, dass dieIDO-Aktivität von DC vom Vorhandensein von $\text{IFN}\gamma$ während der Ausreifung der unreifen DC abhängig ist, die Ausreifung selbst aber in der Gegenwart von $\text{IFN}\gamma$ ebenfalls einen positiven Effekt auf dieIDO-Aktivität hat.

3.4 Allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen

Reife Dendritische Zellen sind durch ihre allostimulatorische Aktivität charakterisiert, d.h. sie sind potente Stimulatoren der Proliferation allogener T-Zellen in einer sogenannten allogenen gemischten Leukozytenkultur (MLC). Um die allostimulatorische Aktivität der unter den unterschiedlichen Bedingungen ausgereiften DC zu bestimmen, wurden unterschiedliche Zellzahlen der DC mit 5×10^4 allogenen MNC als Quelle für T-Zellen für fünf Tage kokultiviert und an Tag 6 der Einbau des Basenanalogs Bromdeoxyuridin als Maß für die T-Zell-Proliferation gemessen.

Alle DC-Präparationen zeigten die für DC typische potente allostimulatorische Aktivität (Abbildung 9). Im Vergleich zu einer Ausreifung mit $\text{TNF}\alpha$, einem häufig für DC verwendeten Reifungsstimulus,(41) ergab ein *Two-Way* Anova Test, mit Ausnahme der Kombination von $\text{TNF}\alpha$ mit $\text{IFN}\gamma$, die in einer signifikant niedrigeren allostimulatorischen Aktivität der DC resultierte ($p=0,0351$), keine signifikant unterschiedliche allostimulatorische Aktivität der verschiedenen ausgereiften DC-Präparationen. Im Vergleich zur Ausreifung mit TPIL, die den höchsten Anteil $\text{CD}83^+$ Zellen lieferte (Abbildung 5), zeigten mit $\text{IFN}\gamma$ ($p=0,0264$), $\text{IFN}\gamma+\text{TNF}\alpha$ ($p=0,002$) und $\text{IFN}\gamma+\text{PGE}2$ ($p=0,0228$) ausgereifte DC eine signifikant reduzierte allostimulatorische Aktivität, d.h. die DC-Präparationen, die den geringsten Anteil $\text{CD}83^+$ reifer DC hatten. Im Vergleich zu $\text{TNF}\alpha$, LPS und $\text{LPS}+\text{IFN}\gamma$ fand sich dagegen kein signifikanter Unterschied. Wie zu erwarten, hatte der Anteil reifer DC somit einen deutlichen Einfluss auf die allostimulatorische Aktivität der DC.

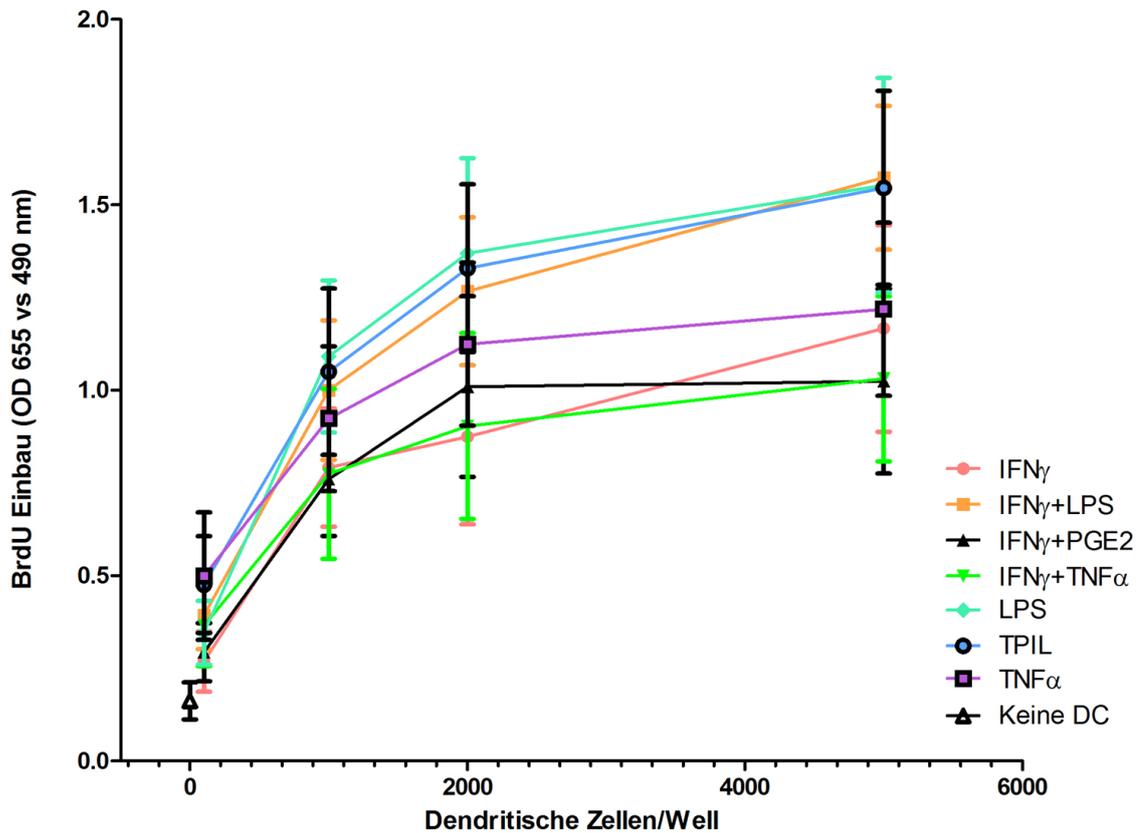


Abb. 9: Allostimulatorische Aktivität der ausgereiften DC. Die mit den jeweils angezeigten Reifungsstimuli ausgereiften DC wurden mit unterschiedlicher Zellzahl (100-5000 DC/Well) mit 5×10^4 allo genen MNC kokultiviert. Nach sechs Tagen Kokultur wurde der Einbau des Basenanalogons Bromdeoxyuridin photometrisch (655 vs 490 nm) als Maß für die T-Zell-Proliferation bestimmt. MNC ohne Zugabe von DC dienten als Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler als Triplikate unabhängiger Experimente.

In Abbildung 10 wurde dieser Zusammenhang nochmals verdeutlicht und der Anteil CD83⁺ Zellen sowie der BrdU-Einbau als Maß für die allostimulatorische Aktivität nach Stimulation allo gener MNC mit 2000 DC für die verschiedenen Ansätze zusammen dargestellt.

Die Ansätze mit IFN γ , IFN γ +TNF α und IFN γ +PGE2 zeigten den geringsten Anteil reifer Dendritischer Zellen. Gleichwohl findet sich in diesen Ansätzen auch der geringste BrdU-Einbau. Die höchste Frequenz reifer CD83⁺ DC trat bei den Ansätzen mit TPIL, TNF α , IFN γ +LPS und LPS als Reifungsstimulus auf. Diese Ansätze zeigten auch die höchste Proliferation der allo genen MNC.

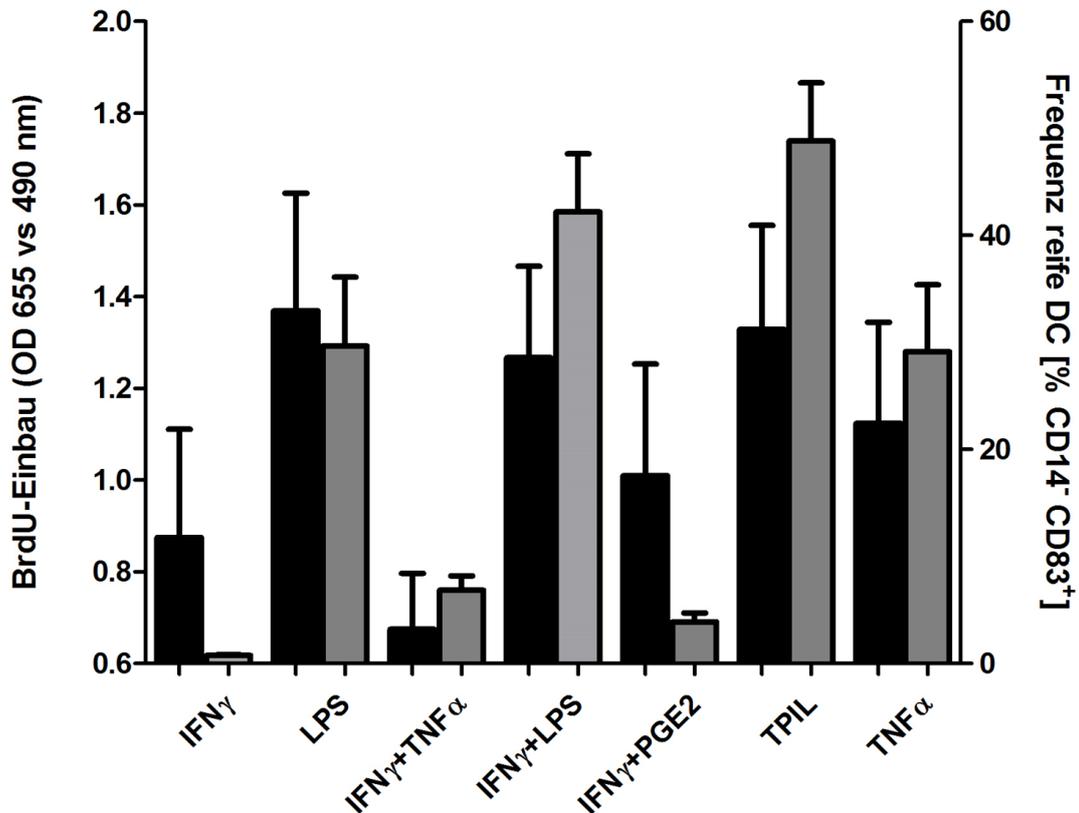


Abb. 10: Zusammenhang zwischen der Ausreifung der DC und ihrer allostimulatorischen Aktivität. Unreife DC wurden mit den jeweils angegebenen Faktoren ausgereift. Nach drei Tagen wurde der Anteil CD83⁺ reifer DC durchflusszytometrisch bestimmt (graue Balken, rechte Achse) und die allostimulatorische Aktivität von 2000 DC in einer MLC ermittelt (schwarze Balken, rechte Achse). Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler von mindestens sechs unabhängigen Experimenten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Grad der Ausreifung der DC nicht komplett proportional zur Fähigkeit der Zellen ist, die Proliferation allogener T-Zellen hervorzurufen, aber ein hoher Anteil reifer DC mit einer starken Proliferation assoziiert ist und ein niedrigerer Reifegrad in einer geringeren Proliferation der T-Zellen resultiert.

3.5 Hemmung des Bakterienwachstums durch Dendritische Zellen

Um die Fähigkeit das Wachstum von Bakterien zu inhibieren der unter den unterschiedlichen Bedingungen ausgereiften DC zu ermitteln, wurden die DC-Kulturen an Tag 9 mit *Staphylococcus aureus* angeimpft und nach 24 h Inkubation die durch das Bakterienwachstum verursachte Trübung des Mediums photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm bestimmt (Abbildung 11).

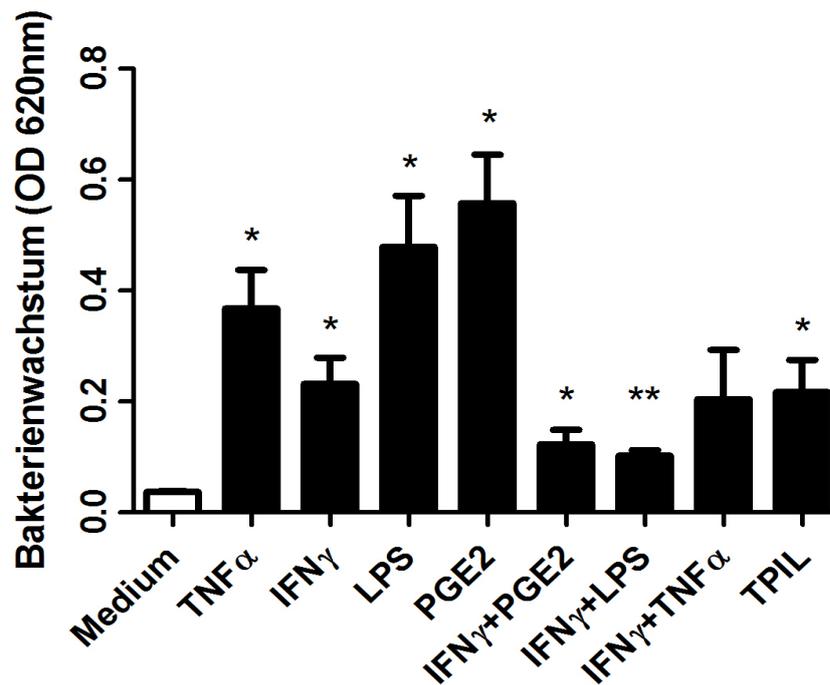


Abb. 11: Hemmung des Bakterienwachstums durch Dendritische Zellen. Unreife DC wurden mit den jeweils angegebenen Faktoren für drei Tage ausgereift. Anschließend wurden die Wells mit einer Kolonie *Staphylococcus aureus* angeimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert und die Trübung des Mediums durch Bakterienwachstum photometrisch bei 620 nm gemessen. Als Kontrolle diente Medium, welches nicht angeimpft wurde. Statistische Signifikanz im Vergleich zur Mediumkontrolle ist angezeigt: **, $p \leq 0,01$; *, $p \leq 0,05$. Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler von 2-6 unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zur Mediumkontrolle konnte in allen mit *Staphylococcus aureus* angeimpften DC-Kulturen ein signifikantes Bakterienwachstum nachgewiesen werden (Abbildung 11). Der Ansatz mit PGE2 als Reifungsstimulus zeigte dabei das stärkste Bakterienwachstum. Im Vergleich hierzu zeigten DC-Kulturen, in denen IFN γ ($p=0,0108$), IFN γ +PGE2

($p=0,001$), $\text{IFN}\gamma$ +LPS ($p=0,0352$) oder TPIL ($p=0,0126$) als Reifungsstimuli verwendet wurden, sowie tendenziell auch Kulturen mit $\text{IFN}\gamma$ + $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,0736$) ein signifikant reduziertes Bakterienwachstum. Für $\text{TNF}\alpha$ oder LPS gereifte DC konnte dagegen keine Reduktion des Bakterienwachstums beobachtet werden. Somit scheint $\text{IFN}\gamma$ die das Bakterienwachstum inhibierende Wirkung von DC zu fördern, da in allen Ansätzen, die gegenüber PGE2-gereiften DC eine Reduktion des Bakterienwachstums zeigten, $\text{IFN}\gamma$ zum Einsatz kam.

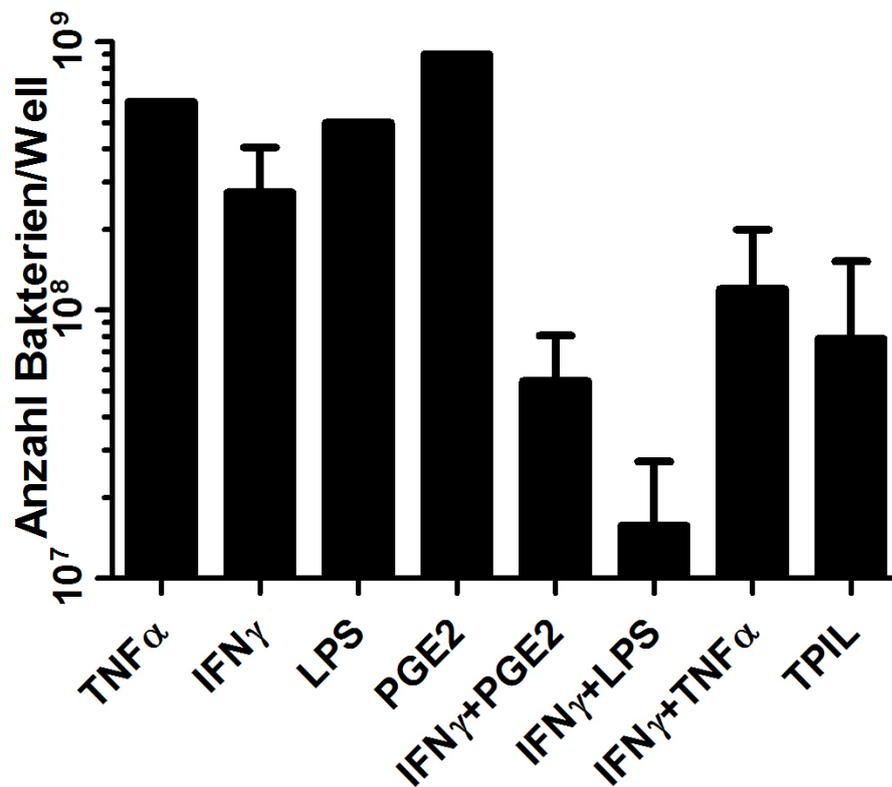


Abb. 12: Hemmung des Bakterienwachstums durch reife Dendritische Zellen. Unreife DC wurden mit den jeweils angegebenen Faktoren für drei Tage ausgereift. Anschließend wurden die Kulturen mit einer Kolonie/Well *Staphylococcus aureus* angeimpft, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann eine Verdünnungsreihe auf Blut-Agar-Platten ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Anzahl an Kolonien ausgezählt und von der Koloniezahl auf die Bakterienzahl/Well hochgerechnet. Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler bei $n=1-4$.

Zur weiteren Überprüfung dieses Sachverhalts wurde der Einfluss der DC auf das Bakterienwachstum auch über die Quantifizierung der Koloniebildung (*CFU-Assay*) bestimmt. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der angeimpften Kulturen nach Inkubation über Nacht ausplattiert und die Anzahl an Kolonien nach 24 h ausgezählt, und von dieser Zahl die Anzahl der Bakterien in den Kulturen hochgerechnet (Abbildung 12).

Auf eine statistische Auswertung wurde auf Grund der teilweise geringen Anzahl an Experimenten (n=1-4) verzichtet. Es waren jedoch tendenziell die gleichen Ergebnisse wie bei der Trübungsmessung (Abbildung 11) zu beobachten: Ansätze, welche IFN γ enthielten (mit der Ausnahme von IFN γ alleine), zeigten eine deutliche Reduktion der Anzahl bakterieller Kolonien.

Um die Bedeutung von IFN γ als Teil des Reifungsstimulus der DC für deren hemmende Wirkung auf das Bakterienwachstum weiter zu untermauern, wurden nun die Trübungsmessungen der Ansätze ohne und mit IFN γ zusammengefasst und einander gegenübergestellt (Abbildung 13). Konditionierte Medien in der Anwesenheit von IFN γ ausgereifter DC zeigten ein signifikant geringeres Bakterienwachstum ($0,117 \pm 0,015$; n=14; $p < 0,0001$) als in der Abwesenheit von IFN γ ausgereifter DC ($0,468 \pm 0,050$; n=9). Dendritische Zellen zeigen somit unter dem Einfluss von IFN γ eine stärkere Hemmung des Bakterienwachstums.

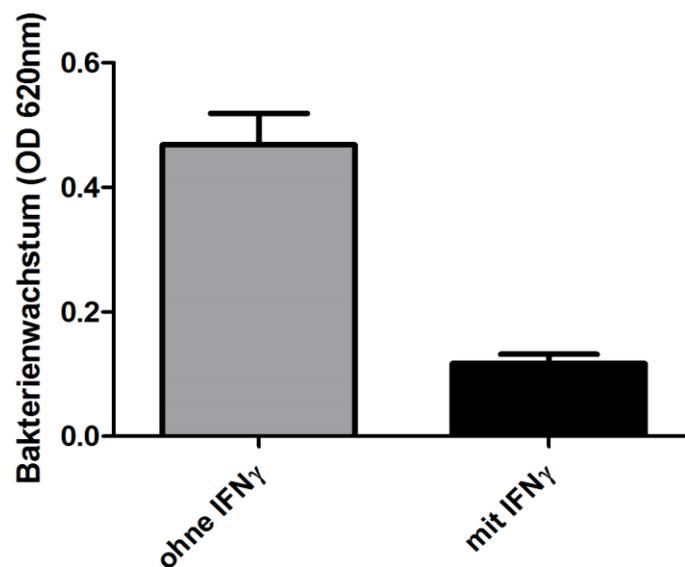


Abb. 13: Einfluss von IFN γ auf die Hemmung des Bakterienwachstums durch Dendritische Zellen. Unreife DC wurden mit verschiedenen Faktoren und Faktorkombination (s. Tabelle 6), die IFN γ enthielten oder nicht, für drei Tage stimuliert. Anschließend wurde das Bakterienwachstum in den Kulturen nach Animpfen mit einer Kolonie *Staphylococcus aureus*/Well durch photometrische Messung der Trübung des Mediums bei 620 nm bestimmt. Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler der Ansätze mit und ohne IFN γ

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass DC, die in der Gegenwart von $\text{IFN}\gamma$ ausgereift wurden, die Fähigkeit aufweisen, das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Zuvor waren ähnliche Beobachtungen auch für die IDO-Aktivität der DC gemacht worden (Kapitel 3.3). Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der IDO-Aktivität der DC und der Hemmung des Wachstums von Bakterien gibt.

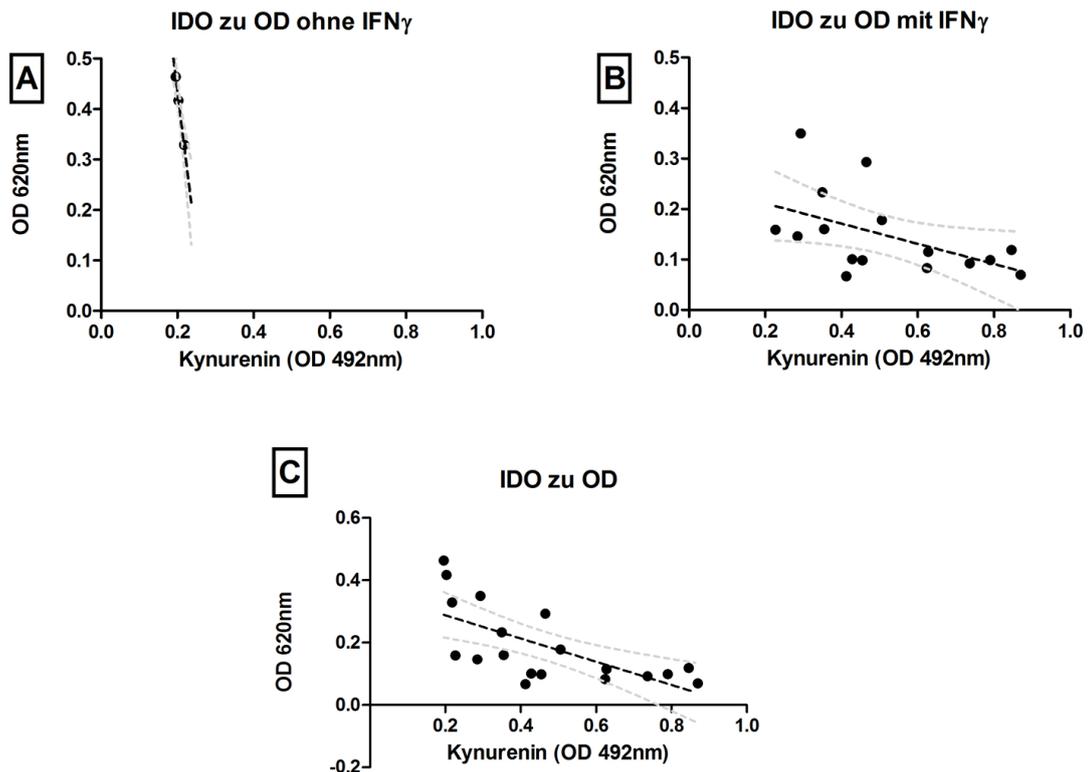


Abb. 14: Abhängigkeit der Hemmung des Bakterienwachstums von der IDO-Aktivität der DC und $\text{IFN}\gamma$. Für alle DC-Kulturen (C) bzw. für alle Kulturen, die in der Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von $\text{IFN}\gamma$ durchgeführt wurden, wurden die IDO-Aktivität (OD 492 nm) gegen das Bakterienwachstum (OD 620 nm) in den jeweiligen Kulturen gegeneinander aufgetragen. Die schwarze gestrichelte Linie kennzeichnet die lineare Regression. Die Konfidenzintervalle sind durch graue gestrichelte Linien angezeigt.

In Abbildung 14 wurden zusammengehörige Messpaare (IDO-Aktivität und Bakterienwachstum (OD 620 nm) für alle Ansätze (Abbildung 14C) sowie getrennt für die Ansätze mit (Abbildung 14B) und ohne $\text{IFN}\gamma$ (Abbildung 14A) gegeneinander aufgetragen. Für alle 19 Messpaare (Abbildung 14C) konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen IDO-Aktivität und dem Bakterienwachstum festgestellt werden

(Korrelationskoeffizient nach Pearson $r=-0,672$; 95% Konfidenzintervall $-0,863 - -0,313$; $p=0,0016$). Damit ergibt sich der Zusammenhang, dass dieIDO-Aktivität mit der Hemmung des Bakterienwachstums korreliert. In Abbildung 8 konnte zudem dargestellt werden, dass die Bildung vonIDO abhängig ist von der Verwendung von $IFN\gamma$ und die Ausreifung der DC zusätzlich dieIDO-Aktivität fördert.

Da die Ergebnisse aus Kapitel 3.3 die Abhängigkeit derIDO-Aktivität von DC von $IFN\gamma$ dokumentieren und diese Abhängigkeit sich auch im Ausmaß der Hemmung des Bakterienwachstums widerspiegelt, zeigt, dass DC in Abhängigkeit von einer Stimulation mit $IFN\gamma$ das Wachstum von BakterienIDO-abhängig hemmen können.

4 Diskussion

4.1 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Ausreifung Dendritischer Zellen

Ausgereifte Dendritische Zellen sind gegenüber unreifen Dendritischen Zellen u.a. gekennzeichnet durch verschiedene Oberflächenmarker, durch eine verringerte Antigenaufnahme und gesteigerte T-Zell-stimulatorische Aktivität sowie eine ausgeprägte Migration zu lymphatischen Organen.(41, 44, 45) Das Vermögen unterschiedlicher Stimuli, DC zur Ausreifung zu bringen, wurde von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben. So berichteten bereits Sallusto & Lanzavecchia(44) und Romani et al.(46) 1994 bzw. 1996, dass $\text{TNF}\alpha$ eine Ausreifung induziert, O'Neil et al. beschrieben eine Ausreifung u.a. mithilfe von TLR-Rezeptor Agonisten, $\text{TNF}\alpha$, Interferonen oder durch aktivierte Lymphozyten (47), und Zhou & Tedder konnten ebenfalls eine Ausreifung unter dem Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ nachweisen, die über die Induktion des Oberflächenmoleküls CD83 spezifisch verfolgt werden konnte.(41) Ein auch heute noch für die Gewinnung reifer Dendritischer Zellen für Immuntherapien angewandter Cocktail pro-inflammatorischer Zytokine wurde von Jonuleit et al. 1997 publiziert. Dieser Cocktail enthält neben $\text{TNF}\alpha$ noch IL-1 β , IL-6 und PGE2. Mit diesem starken Reifungscocktail konnten Ausreifungsraten (Frequenz CD83⁺) von 84,6 \pm 9,8% erzielt werden.(48)

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Reifungsstimuli eingesetzt, um die Ausreifung von Dendritischen Zellen unter serumfreien Kulturbedingungen zu untersuchen, wobei der Anteil an CD83⁺ Zellen als Maß für die Ausreifung diente. Der höchste Anteil an CD83⁺ DC wurde mit den Kombinationen $\text{IFN}\gamma$ +LPS (42,2%) und PGE2+ $\text{IFN}\gamma$ +LPS+ $\text{TNF}\alpha$ (48,8%) erhalten. Auch Dohnal et al. wiesen für $\text{IFN}\gamma$ +LPS eine potente Induktion der Ausreifung von DC nach.(49) Für diese Studie waren Monozyten allerdings mittels Adhärenz und nicht durch immunmagnetische Selektion gewonnen worden und mit AB-Plasma supplementiertem AIM-V Medium kam ein anderes, serumhaltiges Medium zum Einsatz. Zudem wurde die Ausreifung nur durch 6-stündige Stimulation (hier drei Tage) mit $\text{IFN}\gamma$ +LPS induziert, um DC in einem *semimature* Stadium (smDC) zu erhalten. Hierdurch wollten die Autoren eine größtmögliche Ausschüttung von IL-12 erzeugen, da IL-12 für eine $\text{T}_{\text{H}1}$ -Polarisierung der T-Helfer-Antwort verantwortlich gemacht wird, wie sie für eine optimale anti-tumorale zytotoxische Immunantwort benötigt

wird. In anderen Ansätzen wurde nach 48 h Inkubation über CD83 der Anteil reifer DC bestimmt. Die Frequenz der Ausreifung wurde von Dohnal et al. nicht in Zahlen angegeben, lag aber grafisch bei Werten zwischen ca. 30-40%. Dieses ist ein etwas geringerer Wert als in dieser Arbeit mit $42,20 \pm 5,44\%$ erreicht wurde. Die spezifische Aktivität des verwendeten IFN γ wurde in der Arbeit von Dohnal et al. nicht angegeben, so dass keine Rückschlüsse auf den Einfluss von Konzentrationsunterschieden in IFN γ neben Unterschieden in der Gewinnung der Monozyten und im Medium auf die Ausreifung möglich sind. Unterschiedlich ist auch die Bestimmung der Ausreifung nach 48 Stunden Stimulation im Gegensatz zu 72 Stunden, was ebenfalls zu höheren Werten führen könnte. Die von Dohnal et al. verwendeten weiteren Marker für den Nachweis der Ausreifung von DC wie MHC I, CD80 und CD86 wurden hier nicht untersucht.

Obwohl PGE2 alleine keine Ausreifung der DC bewirkte, was die Ergebnisse von Kalinski et al. bestätigten (50, 51), die mit fötalem Kälberserum supplementiertem IMDM-Medium und anderen Zytokinkonzentrationen und -zugabezeitpunkten arbeiteten, führte die Kombination von PGE2 mit IFN γ , LPS und TNF α zu einer deutlichen Ausreifung der DC. Ob dabei PGE2 für die Zunahme der Ausreifung gegenüber TNF α , LPS und LPS+IFN γ verantwortlich ist, ist unklar. Durch Zugabe von PGE2 zum zuvor beschriebenen Cocktail aus IL-1 β , IL-6 und TNF α zeigte sich jedoch auch bei Kalinski et al. eine Steigerung der Ausreifung, was einen Effekt von PGE2 nahelegt.(48, 50, 51)

Auch für LPS und TNF α konnte eine Ausreifung der DC dokumentiert werden, wobei der Anteil CD83⁺ Zellen für beide Reifungsfaktoren bei 29% lag. Für LPS beschrieben dies auch Brosbbol-Ravnborg et al., die darüber hinaus eine Hemmung durch Vitamin D₃ dokumentierten. Genaue Zahlen der Ausreifung wurden in dieser Arbeit nicht angegeben. Die aus Monozyten gewonnenen DC in dieser Versuchsanordnung wurden allerdings in mit AB-Plasma supplementiertem RPMI-1640 Medium kultiviert.(52) Die Wirkung von TNF α auf die Ausreifung von DC war bereits 1994 von Sallusto & Lanzavecchia (44) bzw. 1996 von Romani et al.(46) und Zhou & Tedder (41) gezeigt worden, wenn in diesen Arbeiten auch Serum-supplementierte Medien zum Einsatz kamen. Zhou&Tedder, die ebenfalls CD83 als Marker für reife DC verwendeten, berichteten von CD83⁺ Frequenzen von 78-95%. Die Gewinnung der Monozyten und reifen DC erfolgte allerdings mittels Selektion durch Adhärenz und Kultivierung in RPMI-1640 Medium.(41, 53)

IFN γ alleine konnte keine Ausreifung der DC induzieren. Für aus Knochenmark von

Mäusen gewonnene *Bone Marrow Dendritic Cells* zeigten Xue et al., dass diese DC durch IFN γ eine Reifung erfahren und im Phänotyp mit LPS stimulierten Zellen vergleichbar sind. Auch wenn sich die aus Knochenmark gewonnenen DC von Mäusen und die moDC von Menschen nicht gleichsetzen lassen, ist in Frage zu stellen, ob die von Xue et al. beobachtete Reifung nicht auf die Benutzung von LPS an Tag 7 der mittels Adhärenz isolierten Zellen zum Erreichen einer größeren Reinheit verursacht wurde, d.h. dadurch dass die Zellen einen zusätzlichen Reifungsstimulus erhalten haben.(54)

Auch wenn IFN γ alleine keine Aktivität für die Reifung von DC zu besitzen scheint, so war es doch in Kombination mit anderen Faktoren wirksam. In Kombination mit LPS steigerte es synergistisch den Anteil CD83⁺ DC (s.o.). Wurde IFN γ mit TNF α kombiniert, nahm der Anteil reifer DC von 29,1% auf 6,8% ab. Eine Hemmung der Ausreifung von DC durch IFN γ wurde auch von Rojas-Canales et al. für eine TNF α +PGE2 induzierte Ausreifung der DC berichtet.(55) IFN γ scheint daher kein direkter Reifungsfaktor für DC zu sein, sondern die Aktivität anderer Faktoren positiv oder negativ zu beeinflussen.

4.2 Auswirkung der unterschiedlichen Reifungsfaktoren auf die allostimulatorische Aktivität der Dendritischen Zellen

In Abhängigkeit von der Ausreifung und des damit verbundenen Expressionsmusters costimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche von DC, verändert sich das Ausmaß ihrer T-Zell-stimulatorischen Aktivität.(56) Da die unterschiedlichen Reifungsstimuli in einer unterschiedlichen, phänotypisch fassbaren Ausreifung der DC (CD83 Expression) resultierten (s. o.), wurde überprüft, ob sich dies auch funktionell darstellen lässt. Die DC wurden mit allogenen T-Zellen kokultiviert und die hierdurch induzierte T-Zell-Proliferation als Maß der allostimulatorischen Aktivität der DC gewertet.

Die DC zeigten die für DC charakteristische potente Stimulation allogener T-Zellen. Die DC:T-Zell-Ratio, die in einem Plateau der T-Zell-Proliferation resultierte, betrug ca. 1:25, was sich ungefähr mit den Ergebnissen von Figdor et al. deckt, die ein Verhältnis von 1:20 beschrieben.(57)

Ein Vergleich der Proliferation der T-Zellen in Abhängigkeit vom Reifungsstimulus zeigte eine deutliche Assoziation der allostimulatorischen Aktivität der Zellen mit ihrer CD83 Expression, d.h. dem Grad der Ausreifung der Zellen. So hatten die Zellpräparationen mit dem niedrigsten Anteil an CD83⁺ Zellen (IFN γ , IFN γ +PGE2, IFN γ +TNF α) eine signifikant

geringere allostimulatorische Aktivität als Zellen, die mit der Faktorkombination TNF α +PGE2+IFN γ +LPS ausgereift wurden und den höchsten Anteil CD83⁺ Zellen zeigten. Unterschiede in der allostimulatorischen Aktivität zwischen Zellpräparationen mit einem CD83⁺ Anteil von 29% (TNF α , LPS), 42% (IFN γ +LPS) und 49% (TNF α +PGE2+IFN γ +LPS) konnten dagegen nicht detektiert werden.

Im Gegensatz hierzu kamen Jeras et al. zu dem Schluss, dass mit LPS ausgereifte DC eine höhere T-Zell-stimulatorische Aktivität aufweisen, als die mit TNF α ausgereiften Zellen.(58) Eine gegenteilige Schlussfolgerung zog die Gruppe um Abediankenari, die eine stärkere Antwort auf mit TNF α gegenüber LPS stimulierten DC feststellte.(59) Schwierig ist hier jedoch die Vergleichbarkeit, da die verwendeten Zytokine nicht in Aktivitäts- sondern in Gewichtseinheiten angegeben wurden. Zudem wurde nur ein festes Verhältnis von 1:10 der DC zu T-Zellen verwendet, was die Aussage dieser Arbeit ebenfalls schlecht vergleichbar macht.

In Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen, konnten Luger et al. ebenfalls zeigen, dass die Zugabe von IFN γ zu LPS eine Steigerung der Ausreifung und der T-Zell-stimulatorischen Aktivität der DC bewirkt. Luger et al. postulierten weiter eine zeitabhängige Produktion von IL-10 und IL-12 und einen hierdurch verursachten Umschwung von einer pro-inflammatorischen zu einer anti-inflammatorischen Wirkung der IFN γ +LPS stimulierten DC, was auch in einem Shift der stimulierten T-Zellen von T_H1-Zellen zu Treg seinen Ausdruck findet.(60) Die Zeitabhängigkeit sowie das Zytokinprofil wurden in dieser Arbeit nicht untersucht, aber die Steigerung der Proliferation durch Zugabe von LPS konnte im Vergleich mit IFN γ alleine als Stimulus bestätigt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die phänotypisch nachgewiesenen Unterschiede in der Ausreifung der DC sich auch auf die Funktion der Zellen auswirken. Dabei reicht die Auflösung des verwendeten Testsystems möglicherweise nicht aus, um Unterschiede in der T-Zell-stimulatorischen Aktivität der DC nachzuweisen, wenn der Anteil CD83⁺ DC über 30% liegt.

4.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität Dendritischer Zellen

In der vorliegenden Arbeit konnte ein klarer Zusammenhang zwischen derIDO-Aktivität von DC und einer Ausreifung der Zellen nachgewiesen werden. Doch reichte die Ausreifung alleine nicht aus, um eineIDO-Aktivität zu induzieren. Hierfür war die Präsenz von IFN γ

während der Ausreifung essentiell. So führte LPS zu einer Ausreifung der Zellen, resultierte jedoch nicht in einerIDO-Aktivität. Erst die Kombination von IFN γ mit LPS resultierte in einer signifikanteIDO-Aktivität, die deutlich über der von IFN γ alleine induziertenIDO-Aktivität lag. Dabei nahm in der Gegenwart von LPS+IFN γ auch der Anteil CD83⁺ reifer DC zu. Interessanterweise induzierte IFN γ alleine zwarIDO, fungierte aber nicht als Reifungsfaktor für DC, d.h. ein strikter Zusammenhang zwischen Ausreifung undIDO-Aktivität scheint nicht zu bestehen.

Jurgens et al. verglichen dieIDO-Aktivität von LPS und IFN γ +LPS ausgereiften DC und konnten den gleichen Zusammenhang nachweisen, obwohl ein Plasma-supplementiertes Kulturmedium verwendet wurde. Sie stellten zusätzlich fest, dass auch die Ausreifungsdauer bzw. die Zeit nach Zugabe eines Ausreifungsstimulus einen Einfluss hat. Nur Zellen, die mindestens 24 Stunden vorher mit IFN γ +LPS als Stimulus in Kontakt kamen, waren zur Produktion von signifikanten Mengen anIDO befähigt. 4 Stunden nach Kontakt mit dem Ausreifungsstimulus zeigte sich noch keine entsprechende Produktion. Allerdings zeigten sie auch, dass keine durchgehende Stimulation nötig ist, sondern, dass nach 4 stündiger Inkubation mit den Stimuli und nach 24 stündiger Reaktivierung in frischem Medium ohne erneute Stimulation sich eineIDO Produktion zeigt.(61) In dieser Arbeit wurde der zeitliche Zusammenhang der Stimulation nicht untersucht. Zudem wurden alle Messungen derIDO-Aktivität nach 72 Stunden durchgeführt. Auch von Bubnoff et al. beschrieben, dass nur ausgereifte DC zu einerIDO-Produktion fähig sind.(62) Sie verglichen u.a. IFN γ und LPS und kamen zu dem Schluss, dass beide FaktorenIDO induzieren, aber sowohl die Enzym-Expression als auch die Enzymaktivität für LPS höher ist, wobei die Enzymaktivität proportional zur Expression war. Die Kombination von IFN γ mit LPS wurde nicht untersucht.(62) Mit dem Grad der Ausreifung der DC zeigte sich auch in dieser Arbeit, mit IFN γ als zusätzlichem Stimulus, eine Korrelation mit derIDO-Aktivität. Dies entspricht den hier beschriebenen Ergebnissen, obwohl nicht bestätigt werden konnte, dass IFN γ alleine eine Ausreifung der DC hervorruft. Die Gewinnung von Monozyten durch negative statt positive Selektion durch von Bubnoff et al. bzw. die Verwendung eines Mediums mit fötalem Kälberserum gegenüber einem serumfreien Medium könnte möglicherweise eine Erklärung liefern, warum die Zellpopulationen unter IFN γ in der Versuchsanordnung von Bubnoff et al. ausreifen.

In dieser Arbeit konnte für die Stimulation der iDC mit TNF α , LPS und PGE2 gezeigt

werden, dass hierdurch keine bzw. nur eine sehr geringeIDO-Aktivität der DC hervorgerufen wird. Diese Beobachtung wurde von Braun et al. bestätigt. Für PGE2 wiesen sie allerdings nach, dass im Gegensatz zu TNF α und LPS, die IDO-mRNA verstärkt exprimiert wird. Mittels Zugabe von TNF α zu dem Ansatz mit PGE2 konnte jedoch auch IDO-Aktivität induziert werden.(63) Braun et al. postulierten darauf basierend eine zweistufige Aktivierung der IDO ohne IFN γ . Hier muss jedoch angemerkt werden, dass auch in dieser Arbeit die gemessenen Kynurenin-Werte unter zusätzlicher IFN γ Gabe erheblich gesteigert wurden. Wolf et al. konnten die Beobachtungen von Braun et al. nicht bestätigen. Sie fanden weder eine Genexpression noch eine Enzymaktivität unter TNF α und PGE2 Stimulation, ein Unterschied, für den als Ursache einige methodische Unterschiede eingeräumt wurden. Sie zeigten, dass DC, die mittels TNF α zur Ausreifung stimuliert wurden, nicht befähigt sind, in einem nennenswerten Maß IDO zu produzieren. Durch Zugabe von IFN γ konnte jedoch eine Zunahme der Expression von IDO hervorgerufen werden.(64) O'Connor et al. haben 2009 ein ähnlich Zusammenhang bei Mäusen beschrieben: Microglia zeigte unter Zugabe von TNF α zu mittels IFN γ stimulierten Zellen eine Steigerung der IDO-Produktion.(65) Dieser Regulationsmechanismus scheint also konserviert zu sein.

Der von Fujigaki et al. 2006 postulierte IFN γ -unabhängige Weg der IDO-Induktion entspricht nicht dem hier identifizierten Zusammenhang, dass die IDO-Produktion und insbesondere das Ausmaß des Tryptophan-Abbaus abhängig vom Vorhandensein von IFN γ während der Ausreifung der DC ist. Fujigaki et al. beschrieben die IDO-Produktion bei MNC und einer von Monozyten abgeleiteten Zelllinie eines an einer Leukämie erkrankten Spenders.(32) Dass diese Zellen unter Stimulation mit LPS zu einem Abbau von Tryptophan zu Kynureninen befähigt waren, lässt nicht den Schluss zu, dass diese Fähigkeit auf DC übertragbar ist. Auch wenn moDC aus Monozyten als Vorläuferzellen generiert werden, ist das Spektrum der Oberflächenmarker und die Funktionsvielfalt der DC ein gänzlich anderes als das der ursprünglichen Monozyten. IDO könnte daher in den unterschiedlichen Zelltypen unterschiedlich reguliert werden. Ob dabei die IFN γ -unabhängig IDO-Induktion im Verlauf der Differenzierung von iDC oder im Verlauf der Ausreifung verloren geht, bleibt offen.

Der hier beobachtete Zusammenhang zwischen Ausreifungsgrad der DC und funktioneller IDO-Aktivität wurde auch von Chung et al. beschrieben. Sie verwiesen darauf, dass IFN γ

ein „universeller Induktor der Indolamin-2,3-Dioxygenase“ ist. Dennoch wiesen sie nach, dass nach Ausreifung mit dem Zytokin-Cocktail bestehend aus IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE₂, nahezu alle ausgereiften Zellen IDO exprimieren.(66) Vernachlässigt wurde hier allerdings der Vergleich von ausgereiften Zellen unter zusätzlicher Stimulation mit IFN γ . Die Ergebnisse lassen daher keinen Rückschluss zu, ob es sich um einen reinen statistischen Unterschied handelt oder ob die IDO-Aktivität von zusätzlich mit IFN γ stimulierten Zellen deutlich höher ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass moDC während der Ausreifung unter dem zusätzlichen Einfluss von IFN γ beginnen eine IDO-Aktivität zu zeigen, wobei der Grad der Ausreifung die IDO-Aktivität ebenfalls zu beeinflussen scheint. Die Protokolle zur Generierung von reifen DC, die zur Vakzinierungsimmuntherapie gegen Tumoren eingesetzt werden, die teilweise darauf optimiert wurden, eine maximale IL-12 Sekretion und damit die benötigte T_H1-Polarisierung durch die DC zu erhalten, wie bspw. die Verwendung von LPS+IFN γ ,(67) sollten auch auf die IDO-Aktivität der Zellen hin untersucht werden, da durch die Induktion von IDO anstelle der gewünschten anti-tumoralen Immunität auch anti-tumorale Toleranz induziert werden könnte.(68)

4.4 Hemmung von Bakterienwachstum durch Dendritische Zellen

In dieser Arbeit konnte dokumentiert werden, dass ausgereifte DC, abhängig von IFN γ , IDO-Aktivität zeigen. Dabei war die IDO-Aktivität der Zellen mit einer Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* assoziiert.

Ein Einfluss der IDO-Aktivität auf das Wachstum von Mikroorganismen wurde bereits für verschiedene Zellpopulationen dokumentiert. Pfefferkorn et al. zeigten, dass mit IFN γ stimulierte Fibroblasten über einen Abbau von Tryptophan das Wachstum von *Toxoplasma gondii* hemmen.(69) Beatty et al. wiesen nach, dass in HeLa 229, einer Zelllinie aus Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, durch IDO intrazelluläres Tryptophan nach IFN γ -Stimulation abgebaut wird und es hierdurch zu einem Ausbleiben des Wachstums von *Chlamidia trachomatis in vitro* kommt.(70) Zusätzlich zu diesen intrazellulären Krankheitserregern konnten Schroten et al. bei zerebralem Abszess durch *Staphylococcus aureus* zeigen, dass die mikrovaskulären Endothelzellen durch IFN γ zur IDO-Produktion und zur Hemmung der Staphylokokken befähigt sind. Dieser Effekt ließ sich durch Zugabe

von TNF α noch verstärken. Die alleinige TNF α -Zugabe hatte keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum.(71) Die IDO-Aktivität hemmt somit sowohl das Wachstum intrazellulärer als auch extrazellulärer Pathogene. Die Arbeitsgruppe um Däubener et al. konnte 2009 in diesem Zusammenhang nachweisen, dass Bakterien einen höheren Bedarf an der essentiellen Aminosäure Tryptophan haben als T-Zellen. Diese Beobachtung könnte den Widerspruch einer gleichzeitigen antibakteriellen und immunsuppressiven Aktivität von IDO auflösen, da die beiden eigentlich gegenläufigen Effekte bei unterschiedlichen Tryptophanmangelsituationen wirksam würden. Ob darüber hinaus Metabolite des Tryptophan-Abbaus wie bei der Hemmung der T-Zell-Antwort bei der Hemmung des Bakterienwachstums eine Rolle spielen, ist noch nicht vollständig geklärt, wurde von Däubener et al. jedoch in Frage gestellt.(72)

Neben Fibroblasten, Epithelzellen und Endothelzellen (s.o.) wurde auch für Makrophagen ein IDO-vermittelter anti-mikrobieller Effekt nachgewiesen. Eine durch IFN γ induzierte Expression von IDO in Makrophagen und eine daraus resultierende Hemmung des Wachstums von Streptokokken der Gruppe B konnte von MacKenzie et al. nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit wurde eine Steigerung der IDO-Produktion durch die zusätzliche Stimulation der Zellen mit TNF α beobachtet.(73)

Für DC konnten Popov et al. nachweisen, dass sie einen wichtigen Beitrag leisten, um Granulom-Erkrankungen wie z.B. die Listeriose oder eine Infektion mit *Bartonella henselae* in Schach zu halten. Sie kamen zu dem Schluss, dass DC in Abhängigkeit von TNF α oder IFN γ als zelluläre Komponente der Immunabwehr und durch IDO zum Erhalt der Granulom-Struktur und damit der Eindämmung des Krankheitserregers beitragen.(74)

Somit zeigen verschiedene Arbeiten für verschiedene Zellpopulationen die Induktion von IDO durch IFN γ , welche weiter durch TNF α gesteigert wird, und eine antimikrobielle Wirkung der IDO-Aktivität,(69-73) wie es auch in dieser Arbeit für DC und das Wachstum von *Staphylococcus aureus* beschrieben wurde. Eine Induktion von IDO durch TNF α alleine, wie es von Popov et al. beschrieben wurde, wurde weder hier noch von Schroten et al. beobachtet. Eine mögliche Erklärung könnte eine endogene IFN γ -Produktion in der Versuchsanordnung von Popov et al. sein. Tatsächlich wiesen die Autoren nach, dass die eingesetzten TNF α -Inhibitoren die IFN γ -Expression hemmen.(74)

Auch die von von Bergwelt-Baildon et al. beschriebene IDO-Aktivität in DC nach Stimulation mit PGE2 (75) konnte hier nicht nachgewiesen werden. PGE2 alleine induzierte

weder eine Ausreifung der DC noch eineIDO-Aktivität, und es konnte hier klar dokumentiert werden, dass dieIDO-Aktivität in DC sowohl vonIFN γ als auch von einer Ausreifung der DC abhängig ist. Da die von von Bergwelt-Baildon et al. beschriebeneIDO-Aktivität sehr schwach war und insgesamt nur 2 Experimente durchgeführt wurden, muss die Signifikanz dieserIDO-Aktivität kritisch betrachtet werden. Es kann jedoch nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass unterschiedliche Kulturbedingungen für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sind. Auch hier müsste ggf. geprüft werden, obPGE2 möglicherweiseIFN γ in den Zellen induziert.

Zusammenfassend konnte dokumentiert werden, dass DC neben ihrer zentralen Rolle in der Initiationsphase der adaptiven Immunantwort durchIDO, welches durchIFN γ im Zusammenspiel mit Reifungsfaktoren der DC induziert wird, auch eine direkte antibakterielle Aktivität besitzen.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) spielen eine zentrale Rolle in der T-Zell-Immunität. Sie präsentieren im Kontext verschiedener immunrelevanter Moleküle über *Major Histocompatibility Complex*-Moleküle Peptide von Pathogenen und initiieren so eine gegen die Pathogene gerichtete T-Zell-Antwort. Abhängig von den Ausreifungsbedingungen während der Antigenaufnahme durch die DC, können sie jedoch auch immunsuppressive Faktoren wie das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) bilden, welches Tryptophan zu Kynurenin abbaut, und hierdurch zur immunologischen Toleranz beitragen bzw. einer überschießenden Immunantwort entgegen wirken.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Reifungsfaktoren (u. a. Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ)) auf die Ausreifung von aus Monozyten differenzierten, unreifen DC untersucht und bestimmt, unter welchen Ausreifungsbedingungen die DC eine IDO-Aktivität zeigen. Da durch die IDO-Aktivität ein lokaler Tryptophanmangel entsteht, der das Wachstum von Mikroorganismen inhibieren kann, wurde weiter geprüft, ob für DC auch eine direkte, IDO-vermittelte antimikrobielle Aktivität nachweisbar ist.

LPS und TNF α fungierten alleine als potente Ausreifungsfaktoren von DC und induzierten die Expression des für reife DC spezifischen Oberflächenmoleküls CD83. Wurde LPS mit IFN γ oder mit TNF α , IFN γ und Prostaglandin E2 kombiniert, nahm der Anteil an reifen DC noch weiter zu. Im Gegensatz hierzu hatte IFN γ alleine keine Reifungsfaktoraktivität. Vielmehr modulierte IFN γ die Aktivität anderer Faktoren: in Kombination mit TNF α nahm der Anteil CD83⁺ reifer DC signifikant ab, in Kombination mit LPS signifikant zu im Vergleich zur Ausreifung mit TNF α bzw. LPS alleine. Diese phänotypischen Unterschiede ließen sich tendenziell auch funktionell bestätigen: Ansätze mit einem höheren Anteil an CD83⁺ DC zeigten eine signifikant stärkere, der für reife DC typischen allostimulatorischen Aktivität als Ansätze mit einem niedrigeren Anteil CD83⁺ Zellen.

Eine IDO-Aktivität der DC konnte nur für solche Ansätze nachgewiesen werden, für die auch eine Ausreifung beobachtet werden konnte, wobei die Ausreifung an sich jedoch nicht ausreichte, um IDO zu induzieren. Nur wenn gleichzeitig mit den Reifungsfaktoren IFN γ zugegeben wurde, wurde neben der Ausreifung auch die Induktion der IDO-Aktivität nachweisbar. Diese korrelierte sehr gut mit der Hemmung des Wachstums von

Staphylococcus aureus durch die DC, d.h. DC fungieren nicht nur als Antigen-präsentierende Zellen, sondern auch als eigenständige anti-mikrobielle Effektorzellen, die IDO vermittelt das Bakterienwachstum supprimieren.

6 Quellenverzeichnis

1. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137(5):1142-62.
2. Goud TJ, Schotte C, van Furth R. Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte colonies grown in vitro. *J Exp Med.* 1975;142(5):1180-99.
3. Rowley DA, Fitch FW. The road to the discovery of dendritic cells, a tribute to Ralph Steinman. *Cell Immunol.* 2012;273(2):95-8. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.01.002.
4. Collin M, McGovern N, Haniffa M. Human dendritic cell subsets. *Immunology.* 2013;140(1):22-30. doi: 10.1111/imm.12117.
5. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.
6. Ueno H, Schmitt N, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(4):376-80. doi: 10.1038/icb.2010.28.
7. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine.* 1999;5(8):919-23. doi: 10.1038/11360.
8. Kishimoto K, Tate G, Kitamura T, Kojima M, Mitsuya T. Cytologic features and frequency of plasmacytoid dendritic cells in the lymph nodes of patients with histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi-Fujimoto disease). *Diagnostic cytopathology.* 2010;38(7):521-6. doi: 10.1002/dc.21265.
9. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(1):19-30. doi: 10.1038/nri1996.
10. Strobl H. Molecular mechanisms of dendritic cell sublineage development from human hematopoietic progenitor/stem cells. *International archives of allergy and immunology.* 2003;131(2):73-9. doi: 70921.
11. Babatz J, Rollig C, Oelschlagel U, Zhao S, Ehninger G, Schmitz M, et al. Large-scale immunomagnetic selection of CD14+ monocytes to generate dendritic cells for cancer immunotherapy: a phase I study. *Journal of hematotherapy & stem cell research.* 2003;12(5):515-23. doi: 10.1089/152581603322448222.
12. Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, et al. Current approaches in dendritic cell generation and future implications for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(10):1513-37. doi: 10.1007/s00262-007-0334-z.

13. Nelson DJ, McMenamin C, McWilliam AS, Brenan M, Holt PG. Development of the airway intraepithelial dendritic cell network in the rat from class II major histocompatibility (Ia)-negative precursors: differential regulation of Ia expression at different levels of the respiratory tract. *J Exp Med*. 1994;179(1):203-12.
14. Nestle FO, Zheng XG, Thompson CB, Turka LA, Nickoloff BJ. Characterization of dermal dendritic cells obtained from normal human skin reveals phenotypic and functionally distinctive subsets. *J Immunol*. 1993;151(11):6535-45.
15. Böhm H, Munk K. Zoologie Taschenlehrbuch Biologie. In. Thieme; 2011.
16. Hulpke S, Tampe R. The MHC I loading complex: a multitasking machinery in adaptive immunity. *Trends in biochemical sciences*. 2013;38(8):412-20. doi: 10.1016/j.tibs.2013.06.003.
17. Foti M, Granucci F, Aggujaro D, Liboi E, Luini W, Minardi S, et al. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol*. 1999;11(6):979-86.
18. Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annual review of immunology*. 2013;31:443-73. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910.
19. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*. 2005;17(1):1-14. doi: 10.1093/intimm/dxh186.
20. Schulz O, Edwards AD, Schito M, Aliberti J, Manickasingham S, Sher A, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity*. 2000;13(4):453-62.
21. Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*. 2001;194(6):769-79.
22. Mold JE, Michaelsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008;322(5907):1562-5. doi: 10.1126/science.1164511.
23. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Advances in immunology*. 2010;108:111-65. doi: 10.1016/b978-0-12-380995-7.00004-5.
24. van Baren N, Van den Eynde BJ. Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance. *Front Immunol*. 2015;6:34. doi: 10.3389/fimmu.2015.00034.
25. 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):2516-22.
26. Yamazaki F, Kuroiwa T, Takikawa O, Kido R. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *The*

Biochemical journal. 1985;230(3):635-8.

27. Meininger D, Zalameda L, Liu Y, Stepan LP, Borges L, McCarter JD, et al. Purification and kinetic characterization of human indoleamine 2,3-dioxygenases 1 and 2 (IDO1 and IDO2) and discovery of selective IDO1 inhibitors. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1814(12):1947-54. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.07.023.
28. Efimov I, Basran J, Thackray SJ, Handa S, Mowat CG, Raven EL. Structure and reaction mechanism in the heme dioxygenases. *Biochemistry*. 2011;50(14):2717-24. doi: 10.1021/bi101732n.
29. Heyes MP, Chen CY, Major EO, Saito K. Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *The Biochemical journal*. 1997;326 (Pt 2):351-6.
30. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(10):762-74. doi: 10.1038/nri1457.
31. 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. *J Immunol*. 2004;172(7):4100-10.
32. Fujigaki H, Saito K, Fujigaki S, Takemura M, Sudo K, Ishiguro H, et al. The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *Journal of biochemistry*. 2006;139(4):655-62. doi: 10.1093/jb/mvj072.
33. Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999;189(9):1363-72.
34. 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*. 2002;107(4):452-60.
35. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends in immunology*. 2003;24(5):242-8.
36. Xu H, Zhang GX, Ciric B, Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol Lett*. 2008;121(1):1-6. doi: 10.1016/j.imlet.2008.08.008.
37. Munn DH. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Current opinion in immunology*. 2006;18(2):220-5. doi: 10.1016/j.coi.2006.01.002.
38. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*. 1998;281(5380):1191-3.

39. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol.* 2000;164(7):3596-9.
40. Sorg RV, Andres S, Kogler G, Fischer J, Wernet P. Phenotypic and functional comparison of monocytes from cord blood and granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis products. *Experimental hematology.* 2001;29(11):1289-94.
41. Zhou LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(6):2588-92.
42. Rapp M, Ozcan Z, Steiger HJ, Wernet P, Sabel MC, Sorg RV. Cellular immunity of patients with malignant glioma: prerequisites for dendritic cell vaccination immunotherapy. *Journal of neurosurgery.* 2006;105(1):41-50. doi: 10.3171/jns.2006.105.1.41.
43. Daubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer HG, Hadding U. A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods.* 1994;168(1):39-47.
44. 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. *J Exp Med.* 1994;179(4):1109-18.
45. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, et al. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer seminars in immunopathology.* 2000;22(4):345-69.
46. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996;196(2):137-51.
47. O'Neill DW, Adams S, Bhardwaj N. Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood.* 2004;104(8):2235-46. doi: 10.1182/blood-2003-12-4392.
48. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997;27(12):3135-42. doi: 10.1002/eji.1830271209.
49. Dohnal AM, Witt V, Hugel H, Holter W, Gadner H, Felzmann T. Phase I study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for the treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy.* 2007;9(8):755-70. doi: 10.1080/14653240701589221.
50. Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *J Immunol.* 1997;159(1):28-35.
51. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of

IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol.* 1998;161(6):2804-9.

52. Brosbol-Ravnborg A, Bundgaard B, Hollsberg P. Synergy between vitamin D(3) and Toll-like receptor agonists regulates human dendritic cell response during maturation. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:807971. doi: 10.1155/2013/807971.

53. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154(8):3821-35.

54. Xue M, Zhu L, Meng Y, Wang L, Sun H, Wang F, et al. Detailed modulation of phenotypes and functions of bone marrow dendritic cells (BMDCs) by interferon-gamma (IFN-gamma). *Int Immunopharmacol.* 2013;17(2):366-72. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.002.

55. Rojas-Canales D, Krishnan R, Jessup CF, Coates PT. Early exposure of interferon-gamma inhibits signal transducer and activator of transcription-6 signalling and nuclear factor kappaB activation in a short-term monocyte-derived dendritic cell culture promoting 'FAST' regulatory dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(3):447-58. doi: 10.1111/j.1365-2249.2011.04537.x.

56. Lanzavecchia A, Sallusto F. Progressive differentiation and selection of the fittest in the immune response. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):982-7. doi: 10.1038/nri959.

57. Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nature medicine.* 2004;10(5):475-80. doi: 10.1038/nm1039.

58. Jeras M, Bergant M, Repnik U. In vitro preparation and functional assessment of human monocyte-derived dendritic cells-potential antigen-specific modulators of in vivo immune responses. *Transpl Immunol.* 2005;14(3-4):231-44. doi: 10.1016/j.trim.2005.03.012.

59. Abediankenari S, Yousefzadeh Y, Azadeh H, Vahedi M. Comparison of several maturation inducing factors in dendritic cell differentiation. *Iranian journal of immunology : IJI.* 2010;7(2):83-7. doi: IJIV7i2A3.

60. Luger R, Valookaran S, Knapp N, Vizzardelli C, Dohnal AM, Felzmann T. Toll-like receptor 4 engagement drives differentiation of human and murine dendritic cells from a pro- into an anti-inflammatory mode. *PLoS One.* 2013;8(2):e54879. doi: 10.1371/journal.pone.0054879.

61. Jurgens B, Hainz U, Fuchs D, Felzmann T, Heitger A. Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells. *Blood.* 2009;114(15):3235-43. doi: 10.1182/blood-2008-12-195073.

62. Von Bubnoff D, Scheler M, Wilms H, Fimmers R, Bieber T. Identification of IDO-positive and IDO-negative human dendritic cells after activation by various proinflammatory stimuli. *J Immunol.* 2011;186(12):6701-9. doi: 10.4049/jimmunol.1003151.

63. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood*. 2005;106(7):2375-81. doi: 10.1182/blood-2005-03-0979.
64. Wolf B, Posnick D, Fisher JL, Lewis LD, Ernstoff MS. Indoleamine-2,3-dioxygenase enzyme expression and activity in polarized dendritic cells. *Cytotherapy*. 2009;11(8):1084-9. doi: 10.3109/14653240903271230.
65. O'Connor JC, Andre C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, et al. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(13):4200-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009.
66. Chung DJ, Rossi M, Romano E, Ghith J, Yuan J, Munn DH, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*. 2009;114(3):555-63. doi: 10.1182/blood-2008-11-191197.
67. Felzmann T, Huttner KG, Breuer SK, Wimmer D, Ressmann G, Wagner D, et al. Semi-mature IL-12 secreting dendritic cells present exogenous antigen to trigger cytolytic immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;54(8):769-80. doi: 10.1007/s00262-004-0637-2.
68. Platten M, Wick W, Van den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res*. 2012;72(21):5435-40. doi: 10.1158/0008-5472.can-12-0569.
69. Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(3):908-12.
70. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*. 1994;62(9):3705-11.
71. Schroten H, Spors B, Hucke C, Stins M, Kim KS, Adam R, et al. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*. 2001;32(4):206-10. doi: 10.1055/s-2001-17375.
72. Daubener W, Schmidt SK, Heseler K, Spekker KH, MacKenzie CR. Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells. Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102(6):1110-6. doi: 10.1160/th09-04-0250.
73. MacKenzie CR, Hadding U, Daubener W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis*. 1998;178(3):875-8.

74. Popov A, Abdullah Z, Wickenhauser C, Saric T, Driesen J, Hanisch FG, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J Clin Invest*. 2006;116(12):3160-70. doi: 10.1172/JCI28996.
75. von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, et al. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood*. 2006;108(1):228-37. doi: 10.1182/blood-2005-08-3507.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit zu verfassen. Als erstes Rüdiger Sorg, der mir immer geduldig mit Rat und Tat zur Seite stand und mir die passenden Denkanstöße gab, auch wenn die Verzweiflung manchmal überhandnahm. Ich danke Dir, dass ich in Deiner Arbeitsgruppe meine Dissertation fertigen konnte.

Corinna, Fredericke und Verena für eine tolle Zeit und alles, was ihr mir beigebracht habt. Ohne Euch hätte ich die Laborzeit wohl nicht überstanden.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin und zukünftigen Ehefrau und Mutter meiner Kinder, dass Sie an mich geglaubt hat und mich immer wieder angetrieben hat diese Dissertation fertig zu stellen. Hättest Du mir in den schwierigen Zeiten nicht den Rücken freigehalten, hätte ich die Arbeit wohl nie zu Ende gebracht.

Als letztes möchte ich meinen Eltern danken. Ihr habt es mir erst ermöglicht mein Studium aufzunehmen und damit den Grundstein für meine Promotion gelegt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

12.05.2016, Michael Ahlbrink

Unterschrift