

# Indolamin-2,3-Dioxygenase-Expression im Interferon- $\gamma$ -stimulierten Einschlusskörpermyositis-Zellmodell. Eine immunhistochemische Analyse.

Theresa Stooß<sup>1</sup>, Michael Hauke<sup>1</sup>, Julia Wejda<sup>2</sup>, Jens Schmidt<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Medizinische Hochschule Brandenburg Theodor Fontane <sup>2</sup> Immanuel Klinik Rüdersdorf, Abteilung für Neurologie und Schmerztherapie

## Hintergrund und Fragestellung

### Einschlusskörpermyositis: ein Krankheitsbild mit Degeneration und Entzündung

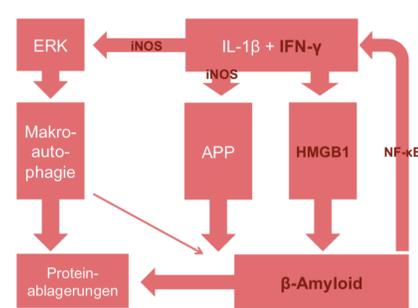
Die Einschlusskörpermyositis (IBM) gehört zur Gruppe der idiopathischen entzündlichen Myosiden (IIM). Die IIM bestehen aus einer heterogenen Gruppe von Autoimmunerkrankungen des Muskels. Sie sind geprägt von Muskelentzündung, -schwund und -schwäche. Anhand klinischer Symptomatik, Serologie und immunzytologischer Verteilungsmuster werden die verschiedenen IIM unterschieden.

Charakteristisch für die IBM ist, dass sie erst ab dem mittleren Alter auftritt. Histopathologisch ist das Krankheitsbild geprägt von entzündlichen und degenerativen Muskelfaseränderungen mit geränderten Vakuolen, dysfunktionalen Mitochondrien, Proteinablagerungen und endomyosialem Leukozyteninfiltrat. Diese Veränderungen zeigen an, dass bei der IBM die an sich feinregulierten Prozesse von Autophagie und Immunreaktion dysreguliert sind. Während für andere IIM effektive Therapien existieren, gestaltet sich die Therapie der IBM bisher schwierig. Deshalb ist es notwendig, die Synergien von Degeneration und Entzündung besser zu verstehen.

### Indolamin-2,3-Dioxygenase reguliert die Immunhomöostase

Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO1) hat immunregulatorische Funktion. Es wird in der späten Entzündungsphase durch Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) induziert und katalysiert den geschwindigkeitsregulierenden Schritt im Kynureninweg. Durch oxidativen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan und dabei entstehende, toxische Kynurenine wirkt es apoptotisch auf Zellen. Im entzündlichen Geschehen trägt IDO1 auf diese Weise dazu bei, dass eine überschießende T-Zell-Antwort verhindert wird. Demgegenüber wirkt eine dauerhaft erhöhte IDO1-Expression immunsuppressiv (bspw. bei Krebserkrankungen). Eine reduzierte IDO1-Expression begünstigt wiederum die Entstehung von Autoimmunerkrankungen (bspw. Multiple Sklerose).

Im Kontext der IBM wurde IDO1 bisher noch nicht untersucht. Allerdings wird das Enzym durch Faktoren induziert, die im Rahmen entzündlicher und degenerativer Prozesse nachweislich zur Entstehung der IBM beitragen (Abb. 1). Daher stellt sich die Frage, ob IDO1 eine Rolle im Pathomechanismus der IBM spielt.



**Abbildung 1** Modell vom Zusammenspiel entzündlicher und degenerativer Prozesse im Skelettmuskel bei IBM. Die *in vitro*-Studie von Schmidt und Kolleg\*innen deutet darauf hin, dass eine IL-1 $\beta$ -bedingte iNOS-Aktivierung zu einer verstärkten Phosphorylierung von mitogen-aktivierter Proteinkinase ERK und APP führt. Vermehrte Proteinablagerungen sind die Folge. Außerdem sehen Keller und Kollegen in der HMGB1-RAGE-A $\beta$ -Achse eine zentrale Verbindung zwischen entzündlichen und degenerativen Prozessen: HMGB1 führt zu vermehrten  $\beta$ -Amyloid-Ablagerungen, die über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu einem Anstieg von IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  und in der Folge von HMGB1 führen. Die rot hervorgehobenen Faktoren induzieren IDO1 und legen die Vermutung nahe, dass das Enzym auch eine Rolle im Pathomechanismus der IBM spielen könnte.

Abbildung modifiziert nach Keller CW et al. 2017 und Schmidt K et al. 2017.

## Material und Methoden

### IBM-Zellmodell

- Rhabdomyosarkom-Muskellzellen der Zelllinie CCL-136

### Versuchsbedingungen

- Stimulation: IFN- $\gamma$ , 300 U/ml
- IDO1-Inhibitor: Linrodostat (BMS 986205), 50 bzw. 100 nM
- Inkubation: 24 bzw. 48 Stunden

### Immunhistochemische Analysen

#### Fixierung

- 4% Formaldehydlösung, 15 Min. bei RT

#### Blockierung

- 3% BSA, 2% Triton X-100, 0,2% Tween-20 gelöst in TBS, 60 Min. bei RT

#### Primäre Antikörper

- IDO1-AK (D5J4ETM), MHC-I-AK (MCA485G), LC3-AK (LC3-5F10)
- 1:100 bzw. 1:200 gelöst in TBS mit 1% BSA, 0,3% Triton X-100, 60 Min. bei RT

#### Sekundäre Antikörper

- Ziege-anti-Kaninchen-AK (IDO1), AlexaFlour 488 (grün), Ziege-anti-Ratte-AK (MHC-I), AlexaFlour 594 (rot), Ziege-anti-Maus-AK (LC3), AlexaFlour 594 (rot)
  - 1:600 gelöst in TBS mit 1% BSA, 0,3% Triton X-100, 45 Min. bei RT
- Zellkernfärbung
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (blau)
  - 1:2000 gelöst in PBS, 3 Min. bei RT

### Real-Time-PCR-Analysen

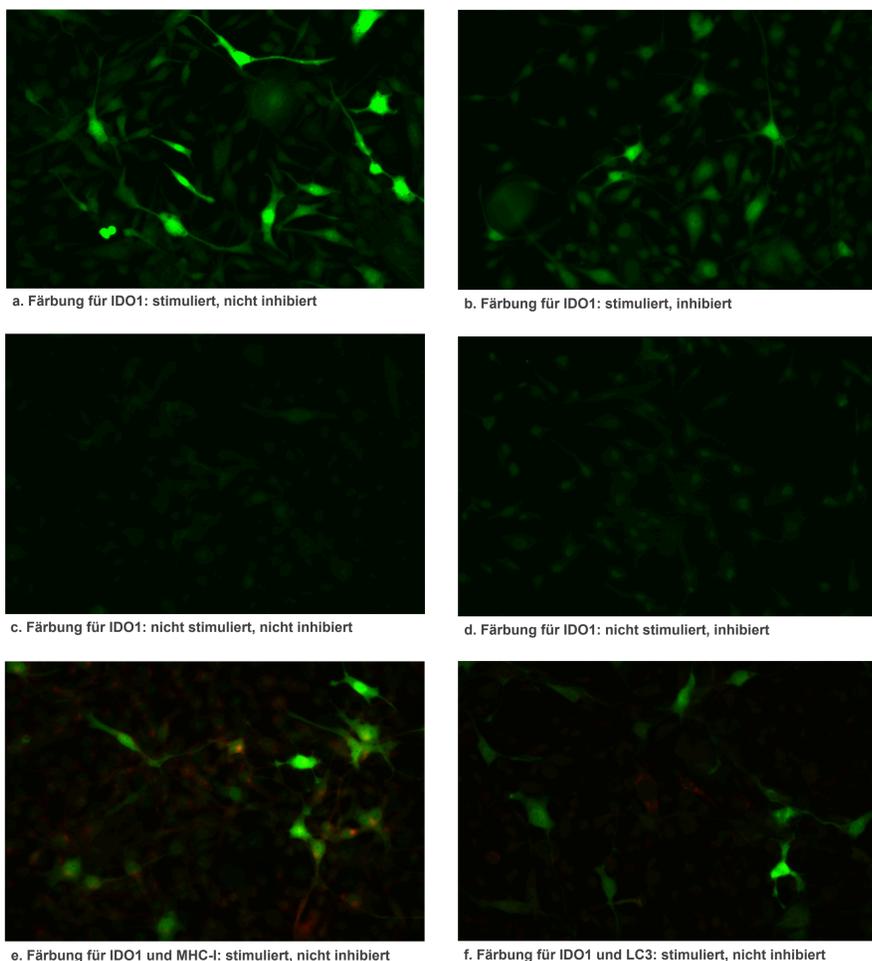
mRNA-Isolation, cDNA-Synthese und RT-PCR-Analyse erfolgten mithilfe entsprechender Kits nach Herstellerangaben.

Die mRNA-Expression der Zielgene wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode berechnet.

## Schlussfolgerungen

- Die immunhistochemischen und RT-PCR-Analysen zeigen, dass IDO1 durch IFN- $\gamma$ -Stimulation im IBM-Zellmodell exprimiert wird.
- Die IFN- $\gamma$ -bedingte IDO1-Expression geht mit fadenförmig veränderten Zellgruppen einher.
- Auf die IDO1-Expression kann immunhistochemisch ein Effekt des Inhibitors nachgewiesen werden; im RT-PCR zeigt sich dieser Effekt teilweise.
- Im proinflammatorischen Setting können außerdem immunhistochemisch MHC-I-Rezeptoren und mittels RT-PCR MHC-II-Rezeptoren, IL-1 $\beta$  und CXCL9 nachgewiesen werden; ein Effekt des IDO1-Inhibitors kann partiell, aber nicht konsistent beobachtet werden.
- LC3 kann immunhistochemisch kaum nachgewiesen werden.
- **Auf Basis der vorliegenden Ergebnisse lässt sich vermuten, dass IDO1 kein Agens im Entzündungsgeschehen der IBM ist. Ein Blick auf den intramuskulären Kynureninweg und eine PGC-1 $\alpha$ -Überexpression mit ihrem Effekt auf mitochondriale Dysfunktion erscheint dennoch lohnenswert.**

## Ergebnisse



**Abbildung 2 a-f** Immunfluoreszenzfärbung für IDO1 mit Ziege-anti-Kaninchen-AK (AlexaFlour488, grün) und MHC-I mit Ziege-anti-Ratte-AK (AlexaFlour594, rot) bzw. LC3 mit Ziege-anti-Maus-AK (AlexaFlour594, rot) in CCL-136-Zellen. a. Färbung für IDO1: IFN- $\gamma$ -stimuliert, nicht inhibiert, 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv. b. Färbung für IDO1: IFN- $\gamma$ -stimuliert, IDO1-inhibiert (100 nM), 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv. c. Färbung für IDO1: nicht stimuliert, nicht inhibiert, 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv. d. Färbung für IDO1: nicht stimuliert, IDO1-inhibiert (100 nM), 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv. e. Färbung für IDO1 und MHC-I: IFN- $\gamma$ -stimuliert, nicht inhibiert (100 nM), 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv. f. Färbung für IDO1 und LC3: IFN- $\gamma$ -stimuliert, nicht inhibiert (100 nM), 48 Stunden Inkubation, 20x Objektiv.

**Abbildung 3 a-d** Relative Genexpression in Bezug auf die Kontrollbedingungen (n=1). a. Relative Genexpression von IDO1 und MHC-I nach 24 Stunden Inkubation. b. Relative Genexpression von MHC-II, IL-1 $\beta$  und CXCL9 nach 24 Stunden Inkubation. c. Relative Genexpression von IDO1 und MHC-I nach 48 Stunden Inkubation. d. Relative Genexpression von MHC-II, IL-1 $\beta$  und CXCL9 nach 48 Stunden Inkubation. Abkürzungen: IFN- $\gamma$ -: nicht stimuliert, IFN- $\gamma$ +: IFN- $\gamma$ -stimuliert; Linrodostat: nicht inhibiert (0 nM) bzw. IDO1-inhibiert (50 oder 100 nM).

