

Aus der Neurologischen Klinik der Medizinischen Fakultät Mannheim
und dem
Deutschen Krebsforschungszentrum;
Abteilung Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Platten)

Die Rolle der endothelialen Indolamin-2,3-Dioxygenase in der Immunregulation von Gliomen und Multiple Sklerose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu Heidelberg

vorgelegt von
Aram Pascal Abu Hejleh

aus
Düsseldorf

2024

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Doktorvater: Prof. Dr. med. Michael Platten

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	6
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1 EINLEITUNG	10
1.1 Immuntherapie bei malignen Hirntumoren.....	10
1.1.1 Tumormikroumgebung von malignen Gliomen	12
1.1.2 Tryptophan-Metabolismus in malignen Gliomen.....	15
1.1.3 Rolle von IDO1 im Tryptophanstoffwechsel und bei der Immunregulation	18
1.2 Einfluss der Blut-Hirn-Schranke auf die Immunregulation in malignen Gliomen	19
1.2.1 IDO1 im vaskulären Kompartiment.....	21
1.3 Immuntherapien bei Multiple Sklerose.....	22
1.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	23
1.3.2 Rolle des Tryptophanmetabolismus in MS	25
1.3.3 Interaktion der Blut-Hirn-Schranke mit der Immunregulation bei MS	26
1.4 Fragestellung der Doktorarbeit und Ziel der Arbeit.....	28
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Material	30
2.1.1 Geräte	30
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien	30
2.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie	32
2.1.4 Primäre Antikörper	33
2.1.5 Sekundäre Antikörper	33
2.1.6 Zytokine	34
2.1.7 Puffer und Medien.....	34
2.1.8 Kits	35

2.1.9	Software.....	35
2.1.10	Sonstiges	36
2.2	Methoden.....	36
2.2.1	Zelllinien und Zellkultur	36
2.2.2	Versuchstiere	37
2.2.3	Intrakranielle Tumorinokulation, MRT Bildgebung und Strahlentherapie.....	37
2.2.4	Isolierung und Ausreifung von T-Zellen aus Organen	38
2.2.5	Isolierung und Kultivierung von gp-100 spezifischen pmel-1 T-Zellen	39
2.2.6	Adoptiver T-Zell Transfer	39
2.2.7	Biolumineszenzmessung	40
2.2.8	Isolierung von CD31+ Endothelzellen.....	40
2.2.9	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	40
2.2.10	Histologische Färbungen	41
2.2.11	RNA Scope®	41
2.2.12	Durchflusszytometrie	42
2.2.13	Einzelzellanalyse	43
2.2.14	EAE Induktion	43
2.2.15	Graphische Darstellung und statistische Auswertung.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	IDO1 Expression in humanen Gliom-assoziierten Endothelzellen	46
3.2	Expression und Aktivität von eIDO1 in mikrovaskulären Endothelzellen des Mäusehirns	51
3.2.1	In Vitro Nachweis des Tryptophan-Stoffwechsel in murinen Endothelzellen	51
3.2.2	Visualisierung von eIDO1 in murinen GL261-gp100-Tumoren mittels RNA scope®	52
3.2.3	Der Einfluss von eIDO1 und lokaler Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung in vitro	54
3.3	Der Einfluss von eIDO1 in einem, syngenen, orthotopen Mausmodell	55
3.3.1	Die Rolle von eIDO1 und lokaler Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung.....	55
3.3.2	Der Einfluss von eIDO1 auf den adoptiven Transfer von Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen.....	59
3.4	Der Einfluss von eIDO1 auf den Krankheitsverlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE).....	63

4 DISKUSSION	68
4.1 Die Expression von eIDO1 im humanen Glioblastom.....	68
4.2 Auswirkungen von eIDO1 auf das T-Zell Kompartiment im präklinischen Modell	71
4.3 Rolle von eIDO1 in der Neuroinflammation anhand des EAE-Modells.....	72
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick.....	73
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	75
6 LITERATURVERZEICHNIS	77
7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNG	98
8 LEBENSLAUF	99
9 DANKSAGUNG	100

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zelluläre Komponenten des Tumormikromilieu von Hirntumoren

Abbildung 2: Darstellung der Tryptophan-Kynurenin-Stoffwechselroute

Abbildung 3: Expression von IDO1 in humanen Gliom-assoziierten Endothelzellen

Abbildung 4: IDO1 Expression im endothelialen CXCL11+-Subcluster

Abbildung 5: Einfluss der eIDO1 Defizienz auf die Tryptophan- und Kynureninkonzentration in vitro

Abbildung 6: Visualisierung der eIDO1 Expression in GL261-gp100 Gliomen mittels RNAScope®

Abbildung 7: Einfluss von niedrig dosierter Bestrahlung auf humane kortikale Endothelzellen (hCMEC/D3)

Abbildung 8: Einfluss des eIDO1 Knockouts und der stereotaktischen Bestrahlung auf das Tumorwachstum

Abbildung 9: eIDO1 Knockout und lokale Bestrahlung führt zu einer Verschiebung in Richtung der CD4+ T-Zell-Infiltration

Abbildung 10: Therapieschema zur Behandlung von GL261-gp100 tragenden Mäusen mit einer Kombinationstherapie aus Tumorbestrahlung und adoptiven T-Zell-Transfer (ACT)

Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse infiltrierender T-Zellen

Abbildung 12: T-Zell Rekrutierung nach ACT mit gp100-spezifischen CD90.1+ CD8+ T-Zellen

Abbildung 13: Einfluss der eIDO1-Defizienz auf den Krankheitsverlauf der EAE

Abbildung 14: Einfluss der eIDO1 Ablation auf die T-Zell Aktivität in Milz und Rückenmark/Kleinhirn

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium
ACT	Adoptiver T-Zell-Transfer
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
APC	Antigen präsentierende Zellen
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BLI	Biolumineszenzbild
cKO	konditionaler Knock-out
CD	Cluster of Differentiation
Cdh5	Cadherin 5
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
CXCL11	CXC-Motiv-Chemokin 11
CXCR3	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3
Cx3cr1	CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor 1
DAB	3'3-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMT	Disease modifying therapy
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
eIDO1	endotheliales IDO1
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
FDA	Food and Drug Administration
FGF-2	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2
FOXP3+	Forkhead-Box-Protein P3
GBP1	Guanylat-bindendes Protein 1
GBM	Glioblastom
GL261	Glioma 261
Gy	Gray
hCMEC/D3	humane kortikale Mikrovessel-Endothelzellen/D3
HRP	Horseradish peroxidase

ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
ISG15	Interferon-stimulierte Gen 15
IU	International unit
IVIS [®]	In vivo imaging system
i.k.	intrakraniell
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
I-TAC	Inducible T cell- α chemoattractant
KFA	komplette Freund-Adjuvans
MBMEC	Mouse brain microvascular endothelial cell
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NDRG1	N-Myc Downstream Regulated 1
NK	Natürliche Killerzellen
NVU	Neurovaskuläre Einheit
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PD-1	Programmed cell death protein 1
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Perfluoralkoxy-Polymere
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Pmel	Premelanosome Protein
PT	Pertussis-Toxin
ROI	region of interest
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SLN	Sarcolipin
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TDO	Tryptophan-2,3-Dioxygenase
TGF- β	Transforming growth factor β
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TIM-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TM	Tryptophanmetabolismus
TMU	Tumormikroumgebung
TRP	Tryptophan
TVA	Tierversuchsantrag
UCSC	University of California, Santa Cruz
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZPF	Zentrum für präklinische Forschung

1 EINLEITUNG

1.1 Immuntherapie bei malignen Hirntumoren

Das Glioblastom (GBM) ist der häufigste bösartige primäre Hirntumor und trägt mit einer relativen 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 6,8 %, die je nach Alter bei der Diagnose und Geschlecht variiert, unverhältnismäßig stark zur Morbidität und Mortalität bei (Ostrom et al., 2019). Die multimodale Standardtherapie umfasst die chirurgische Tumorresektion gefolgt von einer adjuvanten Bestrahlung zusammen mit einer Temozolomid-basierten Chemotherapie (Stupp et al., 2005). In klinischen Studien lag das mittlere Gesamtüberleben unter dieser Dreifachtherapie 15 - 18 Monate (Gilbert et al., 2013).

In den letzten Jahren konnten neue Erkenntnisse über die Wechselwirkung des Tumormikromilieus mit immuntherapeutischen Strategien zum Verständnis der Tumorbilogie und dessen Resistenzmechanismen beitragen. Die Erfolge der Immuntherapie mittels Immun-Checkpoint-Inhibitoren bei anderen soliden Tumoren, wie beispielsweise dem malignen Melanom, haben zu einem verstärkten Interesse an immuntherapeutischen Ansätzen bei malignen Gliomen geführt (Boyadzis et al., 2018).

Jedoch konnte eine Phase-III-Studie zur Wirksamkeit des PD-1-Inhibitors (Programmed Cell Death Protein 1) Nivolumab keinen Überlebensvorteil nachweisen (Reardon et al., 2020). Auch die Kombination von Nivolumab mit dem CTLA-4 Hemmer (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) Ipilimumab wird in mehreren laufenden Studien bei primären Glioblastomen untersucht (NCT02311920). Ein weiteres Konzept umfasst die neoadjuvante Anti-PD1-Behandlung vor der Tumoroperation. In zwei klinischen Studien führte dieser Therapieansatz zu einer verstärkten Immunzellinfiltration sowie einer verminderten PD-1-Expression auf peripheren T-Zellen, was eine Verbesserung der lokalen sowie systemischen Antitumor-Immunantwort zur Folge hatte (Cloughesy et al., 2019; Schalper et al., 2019).

Zum begrenzten Therapieerfolg von Checkpoint-Inhibitoren bei malignen Hirntumoren trägt maßgeblich die immunologisch „kalte“ Tumormikroumgebung (TMU) bei. Um dem entgegenzuwirken, konzentrieren sich aktuelle Strategien wie die adoptive T-Zell

Therapie, Peptidimpfstoffe und die Virotherapie mittels onkolytischen Viren, auf die Überwindung tumor-intrinsischer und adaptiver Resistenzmechanismen.

Die adoptive T-Zell-Therapie (ACT) zielt darauf ab, die Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen zu stimulieren, etwa durch Selektion oder gentechnische Veränderung von Zellen mit einer Spezifität für bestimmte Tumorantigene (Choi et al., 2019). Die ACT umfasst den Transfer von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL), die T-Zell-Rezeptor- (TCR) und die chimäre Antigenrezeptor (CAR) T-Zell-Therapie.

CAR-T-Zellen sind gentechnisch modifizierte Zellen, die einen chimären Antigenrezeptor gegen ein spezifisches Tumorantigen exprimieren und so zur Identifizierung und Eliminierung von Tumorzellen führen (Mitra et al., 2023). In klinischen und präklinischen Studien zu malignen Gliomen wurden die spezifischen Tumorantigenen IL13Ra2 (interleukin 13 receptor subunit alpha 2), Her2 (human epidermal growth factor receptor 2), B7-H3 (B7 homolog 3) und EGFRvIII (epidermal growth factor receptor variant III) gezielt untersucht, mit mäßigem Erfolg (Brown et al., 2015; Choi et al., 2024; Nehama et al., 2019; Shen et al., 2019). Da die systemische Gabe von CAR-T-Zellen zu einer begrenzten Akkumulation in der Tumorregion führt, wurden in mehreren Studien lokale Applikationen durchgeführt, die zu einer verstärkten Immunzellinfiltration im Tumorbereich führten (Choi et al., 2014).

Peptidimpfstoffe bestehen aus Aminosäuresequenzen, die tumorspezifische bzw. tumorassoziierte Antigene enthalten, die durch Mutationen nur in Tumorzellen, nicht jedoch in normalen Zellen exprimiert werden. Eine multizentrische Phase-II-Studie, in der 65 Patienten mit einem EGFRvIII-positivem Glioblastom (GBM) mit Indoepimut, einem EGFRv3-spezifischen Peptidvakzin, behandelt wurden, zeigte ein verlängertes progressionsfreies Überleben und Gesamtüberleben (Schuster et al., 2015).

Limitiert in ihrer Wirksamkeit werden die immunbasierten Therapien durch die eingeschränkte Immunogenität, tumorinduzierte Immuntoleranz sowie durch behandlungsinduzierte immunregulatorische Effekte, die zu einer Erschöpfung von T-Zellen führen (Ravi et al., 2022). Zudem verhindert die ausgeprägte Tumorerheterogenität bei höhergradigen Gliomen, belegt durch genetisches und epigenetisches Profiling, ein robustes und dauerhaftes Ansprechen auf neue Therapiestrategien (Patel et al., 2014).

Es bleibt abzuwarten, ob Kombinationsstrategien, die auf mehrere Immun-Checkpoints abzielen, zu größeren synergistischen Effekten bei der Behandlung von malignen Gliomen, einschließlich dem GBM, führen können.

1.1.1 Tumormikroumgebung von malignen Gliomen

Lange Zeit lag der Schwerpunkt der Gliomforschung auf den genetischen und molekularen Veränderungen in den Krebszellen und deren Auswirkungen auf das deregulierte Zellwachstum. In den letzten Jahren konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass der Tumorprogress von wachstumsregulierenden Signalen abhängt, die von der Mikroumgebung des Tumors ausgehen (Abbildung 1, (Quail & Joyce, 2017)). In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erkennen, dass es sich bei malignen Hirntumoren um komplexe Mikrokosmen handelt, in denen die TMU eine entscheidende Rolle bei der Tumorprogression, Immunevasion und Therapieresistenz spielt. Die TMU besteht aus verschiedenen Komponenten wie Immunzellen, Perizyten, Fibroblasten, Blutgefäßen und der extrazellulären Matrix, die im Gehirn aus Astrozyten, Mikroglia und Neuronen gebildet werden (Sampson et al., 2020).

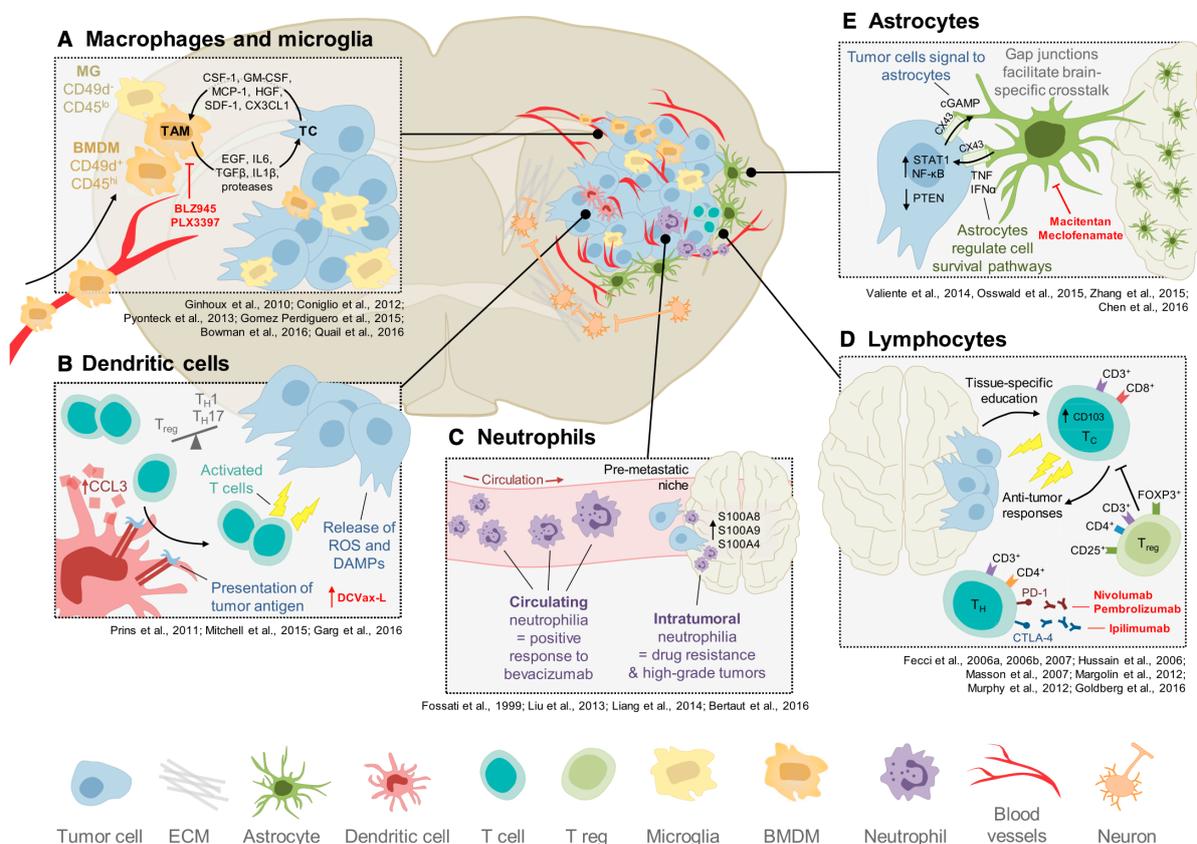


Abbildung 1: Zelluläre Komponenten des Tumormikromilieus von Hirntumoren

Gliome setzen sich aus verschiedenen zellulären Bausteinen zusammen, die von peripheren Immunzellen bis hin zu verschiedenen organ-spezifischen Zelltypen reichen. (A) Die Interaktion zwischen Tumor-assoziierten Makrophagen (TAMs) und Tumorzellen basiert auf die Rekrutierung von TAMs in die Mikroumgebung durch Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch Hirntumorzellen. Dabei sezernieren TAMs pro-tumorigene, überlebensfördernde Faktoren. (B) Dendritische Zellen lösen durch Antigenpräsentation eine antitumorale Immunantwort aus. (C) Neutrophile haben einen prognostischen Wert für Hirntumoren und korrelieren mit einem Ansprechen auf eine Anti-VEGF-A-Therapie mit Bevacizumab. (D) T-Lymphozyten können durch die TMU zu einem immunsuppressiven Phänotyp umprogrammiert werden. Dabei supprimieren regulatorische T-Zellen (T_{reg} -Zellen) zytotoxische T-Zellen was den Tumorstrom begünstigt. (E) Astrozyten kommen nur im ZNS vor und bilden mittels Gap Junctions eine Verbindung zu Tumorzellen, welche zur Tumorstrominvasion sowie Proliferation und Übertragung von Signalmolekülen dient. (Quail DF et al., The Microenvironmental Landscape of Brain Tumors. *Cancer Cell*. 2017 Mar 13;31(3):326-341.)

Ein wesentlicher Bestandteil der Immunzellen in der TMU bei malignen Gliomen sind tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), die einen erheblichen Teil der Tumormasse ausmachen (Graeber et al., 2002). Der Großteil der TAMs stammt aus peripheren Monozyten, die sich nach Rekrutierung in das Gehirn an die lokale TMU durch Expression von "mikroglia-spezifischen" Genen wie z.B. *Cx3cr1* (CX3C-Motiv-Chemokinrezeptor 1), anpassen (Bowman et al., 2016). Etwa 15 % der TAMs stammen hingegen aus geweberesidenten Mikroglia (Chen et al., 2017). TAMs tragen darüber hinaus durch Ausschüttung von wachstumsfördernden Faktoren (u.a. TGF- β , IL-1 β , IL-6) zum Tumorstromprogress bei und korrelieren mit dem Tumorstromgrad (Hambardzumyan et al., 2015). Darüber hinaus tragen die Makrophagen/Mikroglia zur Unterdrückung der Aktivität tumorinfiltrierender Lymphozyten bei, indem sie entweder direkt über die Interaktion von CD80/CD86 (Cluster of Differentiation 80/Cluster of Differentiation 86) mit CTLA-4 oder indirekt durch die Förderung regulatorischer T-Zellen durch Bindung an PD-1 über PD-L wirken (Badie et al., 2001; Razavi et al., 2016a). Bestätigt wurde diese Annahme durch die Ergebnisse von Hussain et al., die zeigen konnte, dass TAMs nur geringe Mengen an pro-inflammatorischen Zytokinen sezernieren und durch das Fehlen der Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 nicht zur T-Zell-Aktivierung beitragen (Hussain et al., 2006).

Im Vergleich zu anderen soliden Tumoren weisen ZNS-Tumoren eine geringe Anzahl an tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) und anderen Immuneffektorzellen auf (Gajewski et al., 2013). Die Wirksamkeit peripherer T-Zellen, die zu malignen Gliomen migrieren, ist aufgrund von intrinsischen und extrinsischen Faktoren innerhalb der TMU deutlich limitiert (McLane et al., 2015a; Watowich et al., 2023). Der Influx

peripherer T-Zellen triggert dabei gegenregulatorische, immunsuppressive Mechanismen, die zur Immunevasion von Gliomen beitragen. Dazu gehört u.a. die verstärkte Expression immuninhibitorischer Rezeptoren wie PD-1, TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3) und CTLA-4, die verminderte Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-2, TNF- α , epigenetische und transkriptionelle Veränderungen sowie eine verstärkte Rekrutierung regulatorischer T-Zellen. (Belk et al., 2022; McLane et al., 2015b; Saeidi et al., 2018). Die Erschöpfung der TILs trägt somit wesentlich zum Scheitern der Immuntherapie bei malignen Gliomen bei. Ein weiterer Grund für die ineffektive T-Zell-Immunantwort ist die verminderte Expression von MHC-Proteinen auf Mikroglia, die für die Antigenpräsentation und -erkennung verantwortlich sind. Diese Verminderung wird durch infiltrierende GBM-Tumorzellen sowie immunsuppressive Zytokine wie TGF- β (Transforming growth factor β), IL-10, und PGE₂ (Prostaglandin E₂) verursacht (Razavi et al., 2016b; Roy et al., 2015).

Dendritische Zellen (DCs) sind myeloide, hochwirksame Antigen-präsentierende Zellen (APCs), die T-Zell-Reaktionen stimulieren und eine entscheidende Rolle in der Immunantwort gegen Hirntumore spielen (Broz et al., 2014). Verglichen mit anderen Tumorentitäten sind DCs in geringerer Anzahl in Gliomen exprimiert, was zu einer verzögerten Immunantwort durch eine reduzierte T-Zell-Aktivierung führt (Simonds et al., 2021). In der TMU können DCs jedoch auch das Tumorstadium unterstützen, wenn sie in einer tolerogenen Form vorliegen. (Pombo Antunes et al., 2021). Ob DCs einen antiproliferativen oder eher pro-tumorigenen Einfluss haben, hängt von den in der TMU vorhandenen DC-Untergruppen ab. Neben der verminderten Anzahl konnten Friedrich et al. zuletzt zeigen, dass die Funktionalität der DCs bei Glioblastom-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen beeinträchtigt ist (Friedrich et al., 2023). Diese Studien deuten darauf hin, dass eine reduzierte Quantität und Qualität von DCs bei Glioblastomen die Tumorkontrolle und die Wirksamkeit von Immuntherapien beeinträchtigen kann.

Neben der veränderten Immunzellzusammensetzung ist auch die Hypoxie ein Merkmal der TMU in Gliomen (Colwell et al., 2017). Die desorganisierte Neovaskularisation führt zu einem O₂-Mangel in der TMU, der durch den übermäßigen O₂-Verbrauch schnell proliferierender Tumorzellen aggraviert wird. Die Gewebhypoxie wirkt als starker Stimulus für die Expression von Genen, die am Tumorstadium und der

Angiogenese beteiligt sind (J. Wei et al., 2011). Dabei wird der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) aktiviert, der im Rahmen eines immunsuppressiven Signalwegs den Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 α (HIF-1 α) hochreguliert und zur Induktion von regulatorischen T-Zellen und der Produktion des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) führt (Ben-Shoshan et al., 2008; Jung et al., 2005). Darüber hinaus führt die hypoxische Mikroumgebung zu einer Polarisierung von TAMs hin zu M2-Makrophagen, die durch einen immunsuppressiven und tumorfördernden Phänotyp charakterisiert sind (Xu et al., 2021).

Die eingangs erwähnte Neovaskularisation ist ebenfalls ein charakteristisches Merkmal der TMU von Glioblastomen. Die Tumorprogression ist eng mit der Gefäßneubildung verbunden, die durch verschiedene angiogene Faktoren wie VEGF vermittelt wird (Plate & Risau, 1995). Die tumorassoziierten Blutgefäße weisen eine erhöhte Permeabilität auf, was zu einer deregulierten Perfusion mit einem erhöhten interstitiellen Flüssigkeitsdruck sowie einer ausgedehnten Hypoxie und Ödemen führt (Jain et al., 2007). Zudem zeichnet sich das Gefäßsystem im Tumor durch erweiterte, unregelmäßige Gefäßdurchmesser und Verzweigungen aus. Bemerkenswert ist, dass ein erheblicher Teil des vaskulären Endothels in Glioblastomen neoplastischen Ursprungs ist. Ricci-Vitiani et al. konnten zeigen, dass 20-90 % (Mittelwert 60,7 %) der Endothelzellen dieselben genomischen Veränderungen aufweisen wie Gliomstammzellen.

Die TMU bei Gliomen beeinflusst sowohl den Tumorprogress als auch die Immunevasion und die Effektivität therapeutischer Strategien maßgeblich.

Jahrzehntelange Forschung hat einzelne Komponenten der TMU identifiziert, die als potenzielle therapeutische Zielstrukturen dienen und derzeit in klinischen Studien getestet werden (Liau et al., 2023).

1.1.2 Tryptophan-Metabolismus in malignen Gliomen

Der Zusammenhang zwischen Krebs und einem gesteigerten Tryptophan (Trp) Katabolismus bzw. Kynureninstoffwechsel wurde bereits in den 1950er Jahren beschrieben (Boyland et al., 1955). In Hirntumoren, einschließlich Glioblastomen (GBM), ist dieser Stoffwechselweg aktiv und trägt durch verschiedene endogene Feedbackmechanismen zu einem immunsuppressiven Mikromilieu bei, das den Tumorprogress fördert. Jene Mechanismen vermitteln auch, im Rahmen von Immuntherapien mittels

Checkpoint-Inhibitoren, eine primäre sowie adaptive Resistenz und limitieren damit die Behandlungseffektivität (H. Li et al., 2019a).

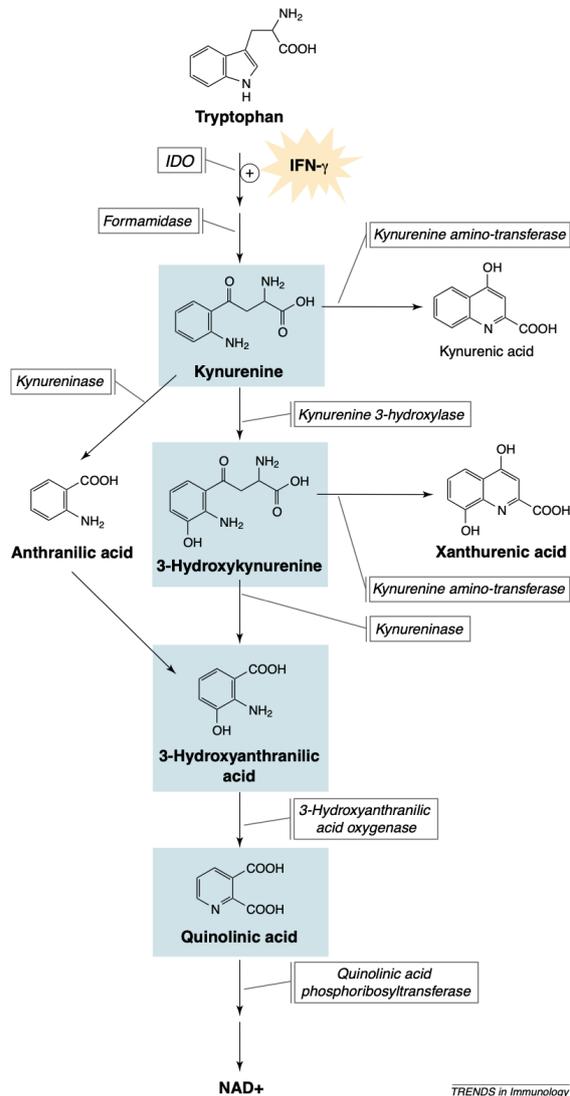


Abbildung 2: Darstellung der Tryptophan-Kynurenin-Stoffwechselroute

95% des freien Trp, welches nicht für die Proteinsynthese verwendet wird, wird über den Tryptophanmetabolismus verstoffwechselt. Dabei katalysiert IDO1 den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Kynurenin, ein Hauptmetabolit von IDO1, wird durch Kynurenin 3-Hydroxylase zu 3-Hydroxykynurenin katalysiert und schlussendlich zu NAD+ verstoffwechselt. Neben IFN-γ gibt es zahlreiche andere Zytokine (nicht in der Abbildung dargestellt), die den Abbau von Trp induzieren. (Grohmann U et al., Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol. 2003 May;24(5):242-8)

Der Tryptophangehalt im Körper wird größtenteils durch die Nahrungsaufnahme und verschiedene Stoffwechselwege bestimmt. Etwa 95 % des freien Trp wird dabei als Substrat für den Kynureninstoffwechsel genutzt und abgebaut, um schließlich Nicotinamidadenindinukleotid (NAD+) zu generieren, das als Energiequelle dient (Le Floc'h et al., 2011). IDO1 und TDO sind die primären und geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme im Kynureninstoffwechsel (sogenannte Kynurenine), die die Produktion und

Akkumulation neuroaktiver und immunmodulierender Metaboliten initiieren. Dabei wird die Spaltung der 2,3-Doppelbindung des Trp-Indolrings und der nachfolgende Einbau von molekularem Sauerstoff katalysiert. Das daraus entstandene Kynurenin wird von mehreren Enzymen zu NAD⁺ verstoffwechselt, wobei Zwischenmetabolite wie 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure anfallen (Platten et al., 2012). Die Akkumulation hat einen immunsuppressiven Effekt und führt zusammen mit der resultierenden Trp Depletion u.a. zur T-Zell Anergie, Hemmung von NK-Zellen sowie Induktion regulatorischer T-Zellen (Opitz et al., 2007).

Ein weiterer immunsuppressiver Mechanismus ist die Funktion der Trp-Derivate als endogene AhR-Liganden (Hubbard et al., 2015; Opitz et al., 2011a). Der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) ist ein zytosolischer Transkriptionsfaktor, der vor allem im Darm und der Haut exprimiert wird und für die Entgiftung von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen verantwortlich ist (S. Li et al., 2018). In Gliomen ist AhR überexprimiert und korreliert mit der Expression von IDO1, was auf eine AhR-Aktivierung durch Trp-Metabolite hinweist (Sadik et al., 2020). Kynurenin, ein Hauptmetabolit von IDO1, hemmt durch Bindung an AhR die Aktivität von Effektor-T-Zellen. Diese Interaktion fördert zudem die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Helferzellen in einen regulatorischen T-Zell-Phänotyp und trägt somit zur Ausbildung einer immunsuppressiven Mikroumgebung bei (Mezrich et al., 2010).

Die Produktion von Trp-Metaboliten im Gehirn, hauptsächlich durch IFN- γ induziert, ist zelltypspezifisch: Während Astrozyten vorwiegend Kynureninsäure synthetisieren, bilden Mikroglia zunehmend Quinolinsäure, die bei Gliomen vermehrt vorkommt und mit einem malignen Phänotyp assoziiert ist (Sahm et al., 2013).

IFN- γ , ein proinflammatorisches Zytokin, ist ein potenter Induktor des Kynureninstoffwechsels und Teil eines endogenen Mechanismus, der zur Immuntoleranz innerhalb der TMU von Gliomen beiträgt. Im Rahmen entzündlicher Prozesse und der damit verbundenen T-Zell-Infiltration führt die Aktivität zytotoxischer CD8⁺ Zellen zu einer verstärkten Expression von IDO1, was über einen Feedbackmechanismus den Abbau von Trp weiter verstärkt (Spranger et al., 2013).

Die Erkenntnisse über den Tryptophanstoffwechsel und den Einfluss seiner immunsuppressiven Derivate in Gliomen bieten vielfältige Ansätze für therapeutische

Interventionen. Die Blockade von IDO1 wird derzeit als Strategie zur Unterbindung der immunmodulatorischen Signale untersucht und könnte somit die antitumorale Immunantwort stärken. Erste Kombinationsansätze mit etablierten Therapieformen wie der Strahlen- und Chemotherapie, gemäß des Stupp Protokolls, konnten bereits synergistische Effekte erzielen (Stupp et al., 2005; Sun et al., 2018).

1.1.3 Rolle von IDO1 im Tryptophanstoffwechsel und bei der Immunregulation

Die humane Indolamin-2,3-Dioxygenase 1 (IDO1) ist ein monomeres, häm-haltiges Protein, das auf Chromosom 8p12 kodiert wird und durch die Oxygenierung von Trp den Abbau zu dem Metaboliten Kynurenin in der Tryptophan-Kynurenin-Stoffwechselroute katalysiert (Burkin et al., 1993; Fujiwara et al., 1978). Damit stellt IDO1, wie bereits erwähnt (siehe Abschnitt 1.1.2), den ersten Schritt dieses Stoffwechselwegs dar. Zur Familie der IDO-Gene gehört neben IDO1 auch die IDO2-Isoform, welche in ihrer Aminosäuresequenz eine signifikante Ähnlichkeit aufweist, jedoch in ihrer gewebespezifischen Expression eine geringere Relevanz zu haben scheint (Ball et al., 2009). Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), das dritte Tryptophan-metabolisierende Enzym, wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und ist mit IDO1/IDO2 strukturell nicht verwandt (Pilotte et al., 2012). In den letzten Jahren wurde jedoch eine erhöhte TDO-Expression in humanen Gliomzellen nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass TDO ebenfalls eine Rolle in der mit dem Tryptophanmetabolismus assoziierten Immunmodulation spielt (Opitz et al., 2011).

Die Expression von IDO1 wurde in verschiedenen Krebsentitäten, einschließlich malignen Hirntumoren, nachgewiesen und als unabhängiger negativer Prognosefaktor identifiziert (Zhai et al., 2018). Höhergradige Gliome zeigen tendenziell eine stärkere IDO1-Expression, die mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (Mitsuka et al., 2013; Wainwright et al., 2012). Neben IDO1 positiven Tumorzellen, konnte mittels immunhistochemischer Verfahren und single cell RNA sequencing IDO1 in Endothelzellen, Fibroblasten und infiltrierenden Immunzellen des Tumormikromilieus nachgewiesen werden (Meireson et al., 2020). Darüber hinaus wurde die IDO1-Expression auch in peripheren mononukleäre Blutzellen (PBMC) aus Blutproben von Krebspatienten nachgewiesen (Chevolet et al., 2015).

IDO1 fungiert als Immuncheckpoint und spielt eine Schlüsselrolle in der Immunregulation (Mellor et al., 2017). Diese Wirkung beruht hauptsächlich auf der intrazellulären Tryptophan-Depletion und der Akkumulation der nachgeschalteten, immunsuppressiven Kynurenin-Metaboliten sowie deren Auswirkungen (Zhai et al., 2018).

IDO1 wird durch proinflammatorische Zytokine, insbesondere IFN- γ , induziert, wodurch die Transkription des IDO1-Gens in verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, dendritischen Zellen und Fibroblasten stimuliert wird (Jorgovanovic et al., 2020). Weitere Faktoren, die IDO1 induzieren sind u. a. die Interaktion mit T-Zellen sowie AhR-Liganden und regulatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β (Grohmann et al., 2002; Jaronen & Quintana, 2014).

Mehrere Mechanismen liegen der immunologischen Unterdrückung nach einer IDO1-Aktivierung zugrunde. Die IDO1-Induktion führt zur Herunterregulierung von Effektor T-Zellen und erhöht die Apoptoseanfälligkeit von CD8 $^+$ T-Zellen (Lee et al., 2002). Zudem wirken die Tryptophan-Metaboliten L-Kynurenin, 3-Hydroxy-L-Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure antiproliferativ und pro-apoptotisch auf NK-Zellen und TH1-Zellen, die durch antigenpräsentierende Zellen aktiviert werden (Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002). Das Zusammenspiel aus Tryptophan-Depletion und der Akkumulation von nachgeschalteten Metaboliten hat einen synergistischen Effekt auf die Beeinträchtigung der Zytotoxizität von CD8 $^+$ Effektor-T-Lymphozyten und führt ebenfalls zu einer gesteigerten Ausschüttung von TGF β . Dieser Effekt fördert die Differenzierung von naiven T-Zellen zu FOXP3 $^+$ (Forkhead-Box-Protein P3) regulatorischen T-Zellen (T $_{\text{Reg}}$ -Zellen) (Fallarino et al., 2006; Wainwright et al., 2012).

Die pleiotropen Effekte des Tryptophan-Kynurenin-Stoffwechsels, mit IDO1 als zentralem Regulator, resultieren letztlich in der Hemmung von T-Zellen, der Induktion von TReg-Zellen und der Erzeugung immunmodulatorischer Metaboliten. Diese Effekte tragen maßgeblich zur Schaffung eines immunsuppressiven Tumormikromilieus in Gliomen bei

1.2 Einfluss der Blut-Hirn-Schranke auf die Immunregulation in malignen Gliomen

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine selektive, physiologische Barriere, die die Homöostase im zentralen Nervensystem (ZNS) aufrechterhält. Sie besteht aus Endothelzellen, die durch Tight Junctions verbunden sind, sowie aus Perizyten, astrozytären Endfüßen und Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), die zusammen eine

neurovaskuläre Einheit (NVU) bilden (Blanchette & Daneman, 2015). Zu den Hauptfunktionen der BHS gehören der Schutz des ZNS vor zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen, die hochselektive Zufuhr von Nährstoffen sowie die Abfuhr von Stoffwechselprodukten (Ballabh et al., 2004). Gleichzeitig erschwert die BHS in Kombination mit der immunsuppressiven Tumorumgebung (TMU) von Gliomen die Antigenpräsentation und behindert die Migration peripherer Immunzellen in das Hirnparenchym.

Viele neurologische und neuroonkologische Erkrankungen, wie Alzheimer, Epilepsie, traumatische Hirnverletzungen und Hirntumoren, sind mit einer Funktionsstörung der BHS verbunden. Während des Tumorprogress kommt es zu einer anatomisch-funktionellen Umstrukturierung der BHS, die in der Literatur als Blut-Tumor-Schranke bezeichnet wird (Steege, 2021). Während bei niedriggradigen Gliomen die normale Vaskularisierung und Funktion der BHS weitestgehend intakt bleiben, sind höhergradige Gliome durch ein desorganisiertes Gefäßsystem und eine erhöhte Permeabilität der BHS gekennzeichnet (Dhermain et al., 2010). Diese erhöhte Undichtigkeit der BHS bei Glioblastomen konnte bildgebend mittels Magnetresonanztomographie (MRT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachgewiesen werden (Sarkaria et al., 2018).

Unter physiologischen Bedingungen sind Leukozyten nicht im Hirnparenchym präsent. Aufgrund der erhöhten Permeabilität der BHS kommt es jedoch zu einem verstärkten Einstrom peripherer Leukozyten ins ZNS, gefördert durch die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Lyck et al., 2017). Dieser Prozess wird unter anderem durch Chemokine gesteuert, die nicht nur die Infiltration ins ZNS, sondern auch die zielgerichtete Bewegung innerhalb des Hirnparenchyms beeinflussen. Tumorzellen exprimieren jedoch Chemokine, die selektiv immunsuppressive Zellen rekrutieren, während sie solche Chemokine unterdrücken, die die Rekrutierung zytotoxischer Lymphozyten fördern (Slaney et al., 2014). Beispielsweise zeigte eine RNA-Sequenzierung von Schaffenrath et al., dass die Expression von CCL19, einem Chemokin, das die Wanderung von CCR7-exprimierenden T-Zellen zum Tumor auslöst, in tumorassoziierten Endothelzellen herunterreguliert ist (Schaffenrath et al., 2021).

Im Glioblastom kommt es zusätzlich zu einer starken Ansammlung von Mikrogliazellen. Die Aktivierung der Mikroglia, wie sie im Rahmen des Tumorwachstums

stattfindet, kann die Expression der Tight Junctions herunterregulieren und somit ebenfalls zur Diskontinuität der BHS beitragen (da Fonseca et al., 2014).

Insgesamt sind verschiedene Bestandteile der TMU in der Lage, die Eigenschaften der BHS grundlegend zu beeinflussen. Die gestörte Integrität der BHS ermöglicht eine verstärkte Infiltration peripherer Immunzellen in das Tumorgewebe. Dies kann einerseits eine adaptive Immunantwort gegen den Tumor einleiten, andererseits jedoch auch zu einer immunologischen Dysbalance führen.

1.2.1 IDO1 im vaskulären Kompartiment

Glioblastome sind durch eine ausgeprägte Vaskularisation charakterisiert, wobei die Gefäßversorgung eine protektive TMU fördert und eine aktive Rolle in der Tumorprogression spielt. IDO1 trägt dabei maßgeblich zur pathologischen Neovaskularisation bei, indem es die Expression von IFN γ und Interleukin-6 (IL-6) reguliert (Mondal et al., 2016).

Die physiologische Expression von IDO1 in Endothelzellen ist limitiert, wird jedoch während der Schwangerschaft in den Chorionzotten der maternalen Plazenta verstärkt exprimiert. Dort trägt es zur Immuntoleranz, dem antimikrobiellen Schutz sowie zur Optimierung der Durchblutung bei (Sedlmayr et al., 2014). Die endotheliale IDO-Expression (eIDO1) wurde ebenfalls in mehreren Krebsentitäten, einschließlich Kolorektal-, Nierenzell-, Magen- und Ösophaguskarzinomen, nachgewiesen (Cui et al., 2018; Meireson et al., 2018; Riesenber et al., 2007; Tokumoto et al., 2017). In Nierenzellkarzinomen stellt das Tumorgefäßsystem die Hauptquelle von IDO1 dar und zeigte eine signifikant inverse Korrelation zwischen der Dichte der IDO1-exprimierenden Tumorgefäße und der Anzahl der proliferierenden Ki67-positiven Tumorzellen. Riesenber et al. postulierten daher einen Zusammenhang zwischen eIDO1-Expression und einem eingeschränkten Tumorwachstum (Riesenber et al., 2007).

Beim malignen Melanom fungiert eIDO1 als immunsuppressiver Feedbackmechanismus, der durch die Ausschüttung von IFN γ durch T-Zellen im Rahmen von Immuntherapien verstärkt exprimiert wird (Georganaki et al., 2020a). Somit kann die Expression von eIDO1 zur Resistenz bei Therapiestrategien führen, die zu einer Ausschüttung von IFN γ führen, wie z.B. die Checkpoint-Inhibitor- oder CAR-T-Zell-Therapie.

Die eIDO1-vermittelte Degradation in Endothelzellen führt zu einer signifikanten Verringerung der T-Zell Proliferation, was insbesondere in der Transplantationsimmunologie von Bedeutung ist. Beutelspacher et al. konnten zeigen, dass allogene T-Zell-Reaktionen durch die Expression von IDO1 in humanen Nabelschnurvenen reduziert wurden (Beutelspacher et al., 2006).

Die Interaktion zwischen IDO1, dem Kynureninstoffwechsel und der BHS hat einen wesentlichen Einfluss auf die immunsuppressive TMU. Die BHS weist normalerweise eine begrenzte Expression des Kynureninstoffwechsels auf, diese wird jedoch durch pro-inflammatorische Zytokine wie IFN γ hochreguliert. Dies führt zur Produktion von Zwischenmetaboliten wie Quinolinsäure, was letztlich zu einer T-Zell-Anergie führt (Owe-Young et al., 2008).

Über die immunregulative Funktion von eIDO1 bei malignen Gliomen ist wenig bekannt. Die folgenden Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Entschlüsselung der Rolle von eIDO1 und dessen Funktionalität während des Tumorwachstums leisten.

1.3 Immuntherapien bei Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmun vermittelte, chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS. Während eines MS-Schubs infiltrieren autoreaktive, periphere Lymphozyten, die sich gegen ZNS-Antigene richten, über eine kompromittierte BHS (siehe 1.3.3) das ZNS und lösen eine Entzündungskaskade aus. Die Behandlung der MS basiert auf drei Therapiesäulen: der Schubtherapie, der verlaufsmodifizierenden Therapie und der symptomatischen Therapie. Der Schwerpunkt liegt auf der langfristigen immunmodulatorischen Stufentherapie, die in der Literatur als disease-modifying therapy (DMT) bezeichnet wird. Diese hat einen antiinflammatorischen Effekt, der zu einer Verringerung der klinischen Schubrate führt (Jakimovski et al., 2024). Derzeit sind mehr als zehn Präparate von der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) und der US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) für die MS-Behandlung zugelassen, was einen individuellen Ansatz bei der Therapie ermöglicht (Wiendl et al., 2021).

Klinische Studien haben gezeigt, dass die Einleitung der DMT bereits beim ersten Schubereignis den Zeitraum bis zum nächsten Schub verlängern und die 2-Jahres-

Konversionsrate zur schubförmig remittierenden MS um 40-45 % senken kann (Montalban et al., 2018; Tintore et al., 2020). Die Auswahl des geeigneten Immunmodulators sollte unter Berücksichtigung der Krankheitsaktivität, individueller Komorbiditäten sowie des Sicherheitsprofils des Medikaments erfolgen. Eine Metaanalyse von Weideman et al. stellte fest, dass Patienten über 53 Jahre ein erhöhtes Risiko für DMT-assoziierte Beeinträchtigungen durch eine langfristige Immunsuppression aufweisen und die Wirksamkeit der immunmodulatorischen Therapie in dieser Altersgruppe geringer ist (Weideman et al., 2017).

In den letzten Jahren auch Antikörpertherapien für die MS Behandlung zugelassen (Jones & Goldman, 2014; Nicholas et al., 2014). Natalizumab, ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen das Zelladhäsionsmolekül Alpha-4-Integrin richtet, hemmt die Migration von T-Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke (Baker, 2007).

Anti-CD20-Antikörper wie Ocrelizumab, Ofatumumab und Ublituximab bewirken eine Depletion der im peripheren Blut zirkulierenden CD20-positiven Zellen, hauptsächlich B-Zellen, die ebenfalls eine Rolle in der Pathophysiologie der MS spielen (Cencioni et al., 2021; Hauser et al., 2020)

Andere Immunmodulatoren umfassen die Beta-Interferone, die die Synthese pro-inflammatorischer Zytokine hemmen, wobei die detaillierte Wirkungsweise bei MS nicht genau entschlüsselt werden konnte (Rudick & Goelz, 2011). Dimethylfumarat und Glatirameracetat lassen sich wie die Beta-Interferone einer niedrigeren Wirksamkeitskategorie zuordnen und erreichten in klinischen Studien eine relative Reduktion der Schubrate im Vergleich zu Placebo von 30-50% (Khan et al., 2013; Viglietta et al., 2015).

1.3.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) dient als Tiermodell zur Untersuchung autoimmuner Entzündungskrankheiten des zentralen Nervensystems (ZNS) und weist klinische, immunologische und neuropathologische Gemeinsamkeiten mit der MS auf. Dieses Modell ist nicht nur für die Erforschung der Immunpathogenese von Bedeutung, sondern bildet auch die Grundlage für die Entwicklung zahlreicher Immuntherapeutika. Erstmals wurde die EAE von Rivers et al. zur Untersuchung einer akuten disseminierten Enzephalomyelitis, welche als Nebenwirkung der

Tollwutimpfung bei Menschen auftrat, erfolgreich in Rhesusaffen reproduziert (Rivers et al., 1933). Eine bedeutende Weiterentwicklung des EAE-Modells erfolgte durch die Einführung von Freund Adjuvans, das die Induktion der ZNS-Entzündung beschleunigte (Kabat et al., 1948).

Anfangs war Immunisierung von Mäusen problematisch, da die Krankheitsausprägung unzureichend und heterogen war. Durch die Einführung von Pertussistoxin (PT) konnte jedoch die klinische Symptomatik verstärkt werden (Yasuda et al., 1975; Robert & Levine, 1966). Der Wirkmechanismus von PT basiert auf der Erhöhung der vaskulären Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), was die Infiltration proinflammatorischer Zellen erleichtert und zu einem schnelleren Ausbruch der Erkrankung führt (Bergman et al., 1978). Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgt mit enzephalitogenen Peptiden wie dem Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), das basische Myelinprotein (MBP), sowie dem Proteolipid Protein (PLP), jeweils in Kombination mit Freund-Adjuvans und PT (Stromnes & Goverman, 2006). Diese Peptide wirken als Autoantigene und lösen eine T-Zell-vermittelte Neuroinflammation aus, die durch die Bildung spezifischer Antikörper zu einer umfassenden Demyelinisierung führt – einem neuropathologischen Merkmal, das auch bei MS zu beobachten ist (Storch et al., 1998).

Ähnlich wie bei der MS zeigt die EAE einen heterogenen Krankheitsverlauf, der von verschiedenen Faktoren wie dem verabreichten Immunogen, dem genetischen Hintergrund des Versuchstieres, dem Geschlecht und epigenetischen Einflüssen beeinflusst wird (Sobel, 2000). Klinisch manifestiert sich die Krankheit als aufsteigende, schlaffe Lähmung, die mit der Erschlaffung des Schwanzes beginnt und sich progredient auf die Hinter- und Vordergliedmaßen ausweitet. Diese Form wird als "klassische EAE" betitelt und durch MOG₃₅₋₅₅ induziert, während PLP₁₃₉₋₁₅₁ einen schubförmig remittierenden Verlauf auslöst (Gold et al., 2006).

Trotz der Ähnlichkeiten zur MS lassen sich die Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien aufgrund der heterogenen Ätiopathogenese der MS nur eingeschränkt auf den Menschen übertragen. Insbesondere in Bezug auf die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, die sich in murinen EAE-Modellen als vielversprechend, jedoch bei MS-Patienten als unbrauchbar und nebenwirkungsreich erwiesen haben, bezeichneten

Sriram und Steiner die EAE sogar als irreführendes Modell in der Arzneimittelforschung (Sriram & Steiner, 2005).

1.3.2 Rolle des Tryptophanmetabolismus in MS

Die Interaktion zwischen Immunsystem und Tryptophanmetabolismus (TM) gewinnt immer mehr an Bedeutung, da sie eine entscheidende Rolle bei der Ätiopathogenese und dem Verlauf der MS spielt und neue Ansätze für therapeutische Interventionen eröffnet (Vécsei et al., 2013). Während eines MS-Schubs führt die erhöhte Entzündungsaktivität, ausgelöst durch proinflammatorische Zytokine wie IFN γ (Interferon-gamma), zu einer verstärkten Depletion von Tryptophan (Lovelace et al., 2016). Die nachfolgende Akkumulation neurotoxischer und neuroprotektiver Metaboliten, die entlang des Tryptophan-Stoffwechselwegs gebildet werden, haben immunregulatorische Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf (O. Watzlawik et al., 2015).

Die Konzentration dieser Stoffwechselintermediate kann als Biomarker für das Fortschreiten der MS dienen (Flanagan et al., 1995). So wurde in Studien gezeigt, dass die Konzentrationen von Quinolin- und Kynureninsäure, die mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) im Liquor gemessen werden, je nach Verlaufsform der Erkrankung variieren und mit dem Auftreten klinischer Symptome korrelieren. Während eines akuten MS-Schubs wurden im Liquor erhöhte Konzentrationen dieser Metabolite festgestellt, während in der Remissionsphase der schubförmig remittierenden MS (RRMS) deren Konzentrationen mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar waren (Aeinehband et al., 2016; Rejdak et al., 2007).

Quinolinsäure ist neurotoxisch und trägt durch die NMDA-Rezeptor-vermittelte Exzitotoxizität zur Apoptose von Oligodendrozyten bei. Die damit einhergehende Demyelinisierung der Axone führt somit zum Fortschreiten der Neurodegeneration (Sundaram et al., 2014). Hauptquellen für Quinolinsäure sind Mikroglia und infiltrierende Monozyten, die in großer Zahl in den Plaques von MS-Patienten zu finden sind (Guillemin, 2012). Die Migration dieser proinflammatorischen Monozyten ins ZNS während eines MS-Schubs korreliert mit dem Schweregrad der Symptomatik sowie der Quinolinsäurekonzentration in Blut und Liquor (Yamasaki et al., 2014).

Eine Schlüsselrolle im Tryptophanmetabolismus bei MS spielt das Enzym IDO1, das als Schrittmacher dieses Stoffwechselwegs fungiert. Die verstärkte IDO1 Expression stellt dabei eine endogene, immunsuppressive Reaktion auf den autoimmunen Prozess dar und somit auch auf die damit einhergehende, verstärkte Rekrutierung und Infiltration der Lymphozyten zum ZNS (Vécsei et al., 2013). Dabei ist der Zeitpunkt der IDO1-Aktivierung von entscheidender Bedeutung. Während die chronische Aktivierung von IDO1 zur Neurodegeneration führt, hat die kurzzeitige Aktivierung einen immunsuppressiven Effekt (Sundaram et al., 2020).

Dahingegen führte die genetische Ablation von IDO1 oder eine pharmakologische Inhibition mittels 1-Methyltryptophan zu einer Exazerbation der Symptomatik im EAE-Modell. IDO1-defiziente Mäuse zeigten eine verstärkte Infiltration von Th1- und Th17-Zellen sowie eine Verminderung der regulatorischen T-Zellen (Yan et al., 2010). Die vermehrte Expression von IDO1 führt jedoch zu einer Remission der klinischen Symptomatik bei Verringerung der Neuroinflammation.

Ungeachtet zahlreicher Studien zur funktionalen Rolle von IDO1 in tierexperimentellen Modellen und bei MS-Patienten sind die Ergebnisse uneinheitlich. Diese Inkonsistenzen sind vermutlich auf den variablen Verlauf der Krankheit zurückzuführen.

1.3.3 Interaktion der Blut-Hirn-Schranke mit der Immunregulation bei MS

Die Dysfunktion der BHS spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS und trägt zur Entstehung von Läsionen im ZNS bei. Eine der Hauptursachen für die Bildung dieser Läsionen ist die Infiltration von Leukozyten in das ZNS-Parenchym, die durch eine gestörte BHS ermöglicht wird. Diese Infiltration ist ein charakteristisches Merkmal der MS und gehört zu den frühesten klinischen Befunden bei MS-Patienten. Erleichtert wird die Leukozytenmigration durch die Schädigung von Tight Junctions und der damit verbundenen, erhöhten Permeabilität der BHS. Diese Verbindungsstrukturen beschränken im physiologischen Zustand den Zugang von peripheren Zellen zum ZNS und tragen somit zum Immunprivileg des Gehirns bei. Der Verlust dieser Barrierefunktion infolge einer Neuroinflammation ermöglicht das Eindringen von Leukozyten, was zur Zerstörung von Oligodendrozyten, zur Schädigung von Axonen und schließlich zur Demyelinisierung und Läsionsbildung führt (Larochelle et al., 2011).

Obwohl die genaue zeitliche Abfolge der pathologischen Ereignisse unklar ist, haben histopathologische sowie bildmorphologische Untersuchungen gezeigt, dass strukturellen Veränderungen der BHS der Leukozyteninfiltration und Myelinschädigung vorausgehen (Goodkin et al., 1998; Kirk et al., 2003). Diese Erkenntnisse stützen die Hypothese, dass eine Störung der Barrierefunktion eine Voraussetzung für das Eindringen entzündlicher Zellen ist. Daher gilt die Einschränkung der Infiltration proinflammatorischer Immunzellen ins ZNS als eine der vielversprechendsten therapeutischen Strategien bei MS (Freedman et al., 2020). Zugleich belegen zahlreiche Studien den Einfluss verschiedener Zellpopulationen auf die funktionelle Veränderung der BHS (Zierfuss et al., 2024).

Sowohl während akuter MS-Schübe als auch im murinen EAE-Modell ist die Funktionsstörung der BHS mit der Aktivierung von Endothelzellen durch proinflammatorische Faktoren verbunden. Insbesondere führt die Sekretion entzündungsfördernder Zytokine durch einwandernde Leukozyten zu einer Störung der Tight Junctions und einer Modifikation der Basalmembranproteine. (Spencer et al., 2018). Zudem führt die Sezernierung von Chemokinen auf der luminalen Oberfläche von Endothelzellen zu einer verstärkten Hochregulierung von Zelladhäsionsmolekülen, die die transzelluläre Migration von Immunzellen deutlich erleichtern (Alvarez et al., 2011). Dabei binden die Zelladhäsionsmoleküle *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) und *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), welche vom Endothel exprimiert werden, sowie Integrine auf peripheren Leukozyten und unterstützen somit die Leukozytenmigration hin zum ZNS (Steiner et al., 2010).

Die infiltrierenden Immunzellen bestehen hauptsächlich aus antigenpräsentierenden Zellen und zytotoxischen T-Zellen sowie Th1- und Th17-Helferzellen, die wesentlich zur Demyelinisierung perivaskulärer Bereiche beitragen (Friese & Fugger, 2009; Kebir et al., 2009; McMahon et al., 2006). Auch Astrozyten, die Teil der NVU sind und die Integrität der BHS aufrechterhalten, können während entzündlicher Prozesse inflammatorische Zytokine sezernieren, die zur Aktivierung von Endothelzellen und zur Dysfunktion der BHS beitragen (Schiera et al., 2024). Des Weiteren interagieren Astrozyten mit Zellen des Immunsystems, einschließlich autoreaktiver Lymphozyten, und nehmen einen entzündlichen und neurotoxischen Phänotyp an, der das Absterben von Neuronen und Oligodendrozyten induziert (Kunkl et al., 2022).

Die pathologischen Veränderungen der BHS lassen sich auf zwei Hauptmechanismen zurückführen: 1. die erhöhte Permeabilität der BHS durch anatomisch-funktionelle Transformationen und 2. die Sekretion von Chemokinen durch Endothelzellen und Astrozyten, die die Rekrutierung und Effektorfunktion einwandernder Leukozyten beeinflussen. Somit erleichtert die funktionelle Umstrukturierung der BHS die Migration von Leukozyten ins ZNS und reziprok führt ein vermehrter Influx von Leukozyten durch Alteration des lokalen Mikromilieu zu einer weiteren Destruktion der BHS.

1.4 Fragestellung der Doktorarbeit und Ziel der Arbeit

Die größte Herausforderung bei der Immuntherapie von Hirntumoren ist die Gewährleistung einer suffizienten Infiltration peripherer Immunzellen hin zum Tumor bei erhaltener Effektorfunktion. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die strukturell und funktionell aberrante Gefäßversorgung im Tumorgewebe, die sowohl den Zugang der tumorfiltrierenden Immunzellen als auch deren zytotoxische Aktivität einschränkt. Im Gegensatz dazu führt die Dysfunktion der BHS bei der MS zu einer unkontrollierten Infiltration von Lymphozyten, was eine Entzündungskaskade auslöst und zur Läsionsbildung beiträgt.

Während die Bedeutung der angiokrinen Immunregulation im ZNS zunehmend erkannt wird, sind die genauen zellulären und molekularen Mechanismen unzureichend bekannt, bieten aber ein vielversprechendes therapeutisches Ziel zur Modulation der Neuroinflammation.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, wie eIDO1 die T-Zell-Immunität in malignen Hirntumoren beeinflusst. Hierfür werden menschliche Gliom-Proben sowie etablierte konditionale Knockout-Mausmodelle (das syngene GL261-Gliom-Modell und IDOflox X VE-Cadherin-Cre-Mäuse) verwendet. Ergänzend dazu wird das EAE-Mausmodell der Multiplen Sklerose eingesetzt, um die Auswirkungen von eIDO1 auf die autoimmune Neuroinflammation und den klinischen Verlauf zu bewerten.

Die spezifischen Ziele der Untersuchungen umfassen

1. Die Untersuchung des Einflusses von eIDO1 und lokaler Bestrahlung auf die T-Zell-Rekrutierung und Effektorfunktion im GL261-Gliom-Modell.
2. Die Analyse des Einflusses von eIDO1 auf den adoptiven Transfer von antigenspezifischen CD8+ T-Zellen im GL261-Gliom-Modell.
3. Die Bewertung der Auswirkungen von eIDO1 auf die autoimmune Neuroinflammation und den klinischen Verlauf im EAE-Modell.

Diese Untersuchungen sollen ein tieferes Verständnis der Rolle von eIDO1 in der Immunmodulation bei Hirntumoren und MS liefern und potenziell neue therapeutische Ansätze aufzeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Applied Biosystems™ 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Epredia™ Shandon™ Glasdeckplatten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
EZ-Batch Slide Holder	Advanced Cell Diagnostics Inc., Newark, CA, USA
EZ-Batch Wash Tray	Advanced Cell Diagnostics Inc., Newark, CA, USA
FACSCanto™ II Cell Analyzer	BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
HybEZ Humidifying Paper	Advanced Cell Diagnostics Inc., Newark, CA, USA
HybEZ™ II Oven	Advanced Cell Diagnostics Inc., Newark, CA, USA
IVIS® Spectrum in vivo imaging system	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
MACS® SmartStrainer (70 µm)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS® SmartStrainer (100 µm)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Multifuge X3R Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien/Chemikalien	Hersteller
2-Mercaptophenol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Accutase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ammoniumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carprofen	Pfizer, New York City, NY, USA

D-Luciferin	StayBrite™, BioVision, Mountain View, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dinatrium-Ethylen-Diamintetraacetat (Na ₂ EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eukitt®	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fötale Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Fixable viability dye eFluor780	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF2)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hämalaun (sauer nach Mayer)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
HISTOPRIME HistoClear-II	Biozol, Eching, Deutschland
inkomplettes Freund-Adjuvans	Difco, Detroit, MI, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ketamin 100mg/ml (Ketavet)	Pfizer, Berlin, Deutschland
L-Glutamine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Liberase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MEM non-essential amino acid solution	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Percoll®	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNAscope® Negativkontrolle	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Positivkontrolle	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Probe – CDH5	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Probe – IDO	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Protease IV	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Target Retrieval (10X)	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
RNAscope® Wash Buffer Reagents	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
ROTI® Histofix	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RPMI-1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tissue-Tek™ O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Staufen im Breisgau, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypanblau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween® 20	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA
VECTASHIELD® HardSet™ with DAPI	Vector Laboratories, Inc., Newark, CA, USA
Xylazin 20mg/ml (Rompun)	Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland

2.1.3 Antikörper für Durchflusszytometrie

Antikörper Durchflusszytometrie	Hersteller
Anti-Maus CD11b FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD11c PE-Cy7	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus CD206 PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD25 PerCP-Cy5.5	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD3 eFluor™ 450	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Anti-Maus CD3 FITC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus CD4 PB	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD45 BV510	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD45 PE Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD8 AF700	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD8 APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD90.1 FITC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus FoxP3 PE	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus F4/80 PB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Anti-Maus IFN γ APC	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus Gr-1 AF700	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
Anti-Maus Ki-67 PE-Cy7	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus MHC II APC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4 Primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller
hgp 100 ²⁵⁻³³	Arbeitsgruppe GMP & T-Zell-Therapie, DKFZ Heidelberg, Deutschland
Anti-Human CD3 (Hase)	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Anti-Maus Iba1 (Hase)	Wako Diagnostics, Richmond, VA, USA

2.1.5 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Alexa Fluor 633 Ziege Anti-Hase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Alexa Fluor 488 Esel Anti-Ziege	Abcam, Cambridge, UK
Anti-Maus CD31 (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Anti-Maus F4/80-FITC (Ratte)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human IDO (Hase)	Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande

2.1.6 Zytokine

Zytokine	Hersteller
rm-IFN γ	PeproTech, Cranbury, NJ, USA
rhIL-2	Novartis, Basel, Schweiz

2.1.7 Puffer und Medien

Puffer/Medien	Zusammensetzung
ACK Lysepuffer	VE H ₂ O 0.15 M NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0.1 mM Na ₂ EDTA
FACS Puffer	1X PBS 3% FBS 2mM EDTA
GL261 Medium	DMEM 10% FBS 1% Penicillin/Streptomycin
MACS Puffer	1x PBS 3% FBS 2mM EDTA
SSC Puffer	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0 mit NaOH einstellen
T-Zell Medium	RMPI-1640 10 % FBS 1% Penicillin/Streptomycin 50 μ M 2-Mercaptoethanol 2mM L-Glutamin 25mM HEPES
RMPI-1640	10 % FBS 1% Penicillin/Streptomycin 50 μ M 2-Mercaptoethanol 2mM L-Glutamin 25mM HEPES 1mM Natriumpyruvatlösung 0.1mM MEM non-essential amino acid solution

Waschpuffer	1X PBS 0,3% Triton X-100
Blocking Puffer	1X PBS 0,3% Triton X-100 1% BSA
Perm/Wash™ Puffer	BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
IC-Fixierungspuffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.8 Kits

Kits	Hersteller
ArC™ Aminreaktive Kompensations-Bead-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CD8a+ T Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
DAB Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
FoxP3 transcription factor buffer Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Endothelial cell isolation kit	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland
RNeasy Protect Animal Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAscope® Fluorescent Multiplex Kit	Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA
VECTASTAIN® Elite® ABC-HRP Kit	Vector Laboratories, Peterborough, UK
EndoGRO™-MV Complete Media Kit	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.9 Software

Software	Hersteller
Affinity Designer Version 1.9.2	Serif, Inc., West Bridgford, UK
FlowJo Version 10.7.1	FlowJo LLC 2006-2022
GraphPad Prism 8.3.0	GraphPad Software Inc.
ImageJ Version 1.50i	National Institutes of Health, Bethesda, USA
Living Image 4.0 software	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

QuPath Version 0.2.3	Open-Source Software
QuantStudio™ Design & Analysis Software Version 1.5.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.10 Sonstiges

Sonstiges	Hersteller
10 µl Hamilton-Mikronadel	Stoeltin, Wood Dale, IL, USA
Bepanthen	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
MOG ³⁵⁻⁵⁵ MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK	Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ, Heidelberg, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis (H37 RA)	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
PAP Stift	Abcam, Cambridge, UK
Pertussis Toxin	List Biomedical Laboratories, Campbell, CA, USA
20 G Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
27 G Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
29 G Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
30 G Kanüle	B. Braun, Melsungen, Deutschland
96-Well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

GL261- und GL261-gp100-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Standard Zellkultur Medium kultiviert, das mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin supplementiert wurde (s. 2.1.7). Am Tag der Tumorinokulation wurden die Zellen nach Gabe von Accutase und Spülung mit PBS geerntet. Die Zelllinien wurden routinemäßig auf Mykoplasma-Kontaminationen getestet.

GL261-Zellen wurden vom National Cancer Institute erworben. Zur Untersuchung der Transmigration von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen (s. 2.2.7) und ihrer Aktivität erfolgte über retrovirale Transduktion die Generierung der syngenischen GL261-gp100-

GFP Zelllinie, durchgeführt in Vorarbeiten von Dr. Katharina Sahn und Dr. Martina Ott. Humane kortikale Endothelzellen (hCMEC/D3) wurden in EndoGRO™-MV Complete Media Kit kultiviert, das mit 1 ng/mL FGF-2 supplementiert wurde.

2.2.2 Versuchstiere

Sechs bis neun Wochen alte männliche und weibliche Mäuse wurden sowohl für Tumorversuche als auch für die EAE-Induktion in der Tierhaltung des Zentrums für präklinische Forschung (ZPF) im Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg unter speziellen pathogenfreien, temperaturkontrollierten ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) Bedingungen mit einem umgekehrten 12-Stunden-Licht- und 12-Stunden-Dunkel-Zyklus, gehalten. C57BL/6J WT-Mäuse wurden von *The Jackson Laboratory* bezogen. floxIDO X VE-Cadherin-Cre-Mäuse (eIDO cKO) wurden in der Tieranlage des DKFZ, Heidelberg, erzeugt und gezüchtet. Der konditionelle Knockout von IDO1 in Endothelzellen wird durch die Kreuzung von Mäusen mit loxP-Stellen, die das Exon 4 des *Ido1*-Gens flankieren, mit *Cdh5*-Cre-Mäusen erzeugt. *Pmel-1/luc-mcherry*-Mäuse wurden durch Kreuzung von *pmel-1*-Mäusen mit *luc-mcherry*-Mäusen generiert. *Luc-mCherry*-Mäuse exprimieren Luciferase und mCherry unter dem *Actb*-Promotor und wurden im Transgen-Service des ZPF, DKFZ, Heidelberg, gezüchtet. Alle Tierversuche wurden nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von den staatlichen Behörden (Regierungspräsidium Karlsruhe, Deutschland, Tierversuchsantrag (TVA) Nr. G27-17, Nr. G-245/17. Nr. G-113/16) genehmigt.

2.2.3 Intrakranielle Tumorinokulation, MRT Bildgebung und Strahlentherapie

Für die Tumorinokulation wurden pro Maus insgesamt 10^5 GL261-gp100 Tumorzellen, verdünnt in 2 μl PBS, in die rechte Hemisphäre implantiert. Die Injektionskoordinaten lagen 2 mm rechts lateral des Bregmas und 1 mm anterior der Koronarnaht mit einer Tiefe von 3 mm unterhalb der Dura. Die Inokulation der Tumorzellen erfolgte unter Narkose (Ketamin, 100 mg/kg i.p. und Xylazin, 10 mg/kg i.p.), durchgeführt mit einer 10 μl Hamilton Mikronadel, die von einer feinstufigen, stereotaktischen Apparatur gesteuert wurde. Die Mäuse erhielten für 2 Tage nach der Operation Analgetika und wurden täglich auf tumorbedingte Symptome untersucht. Bei Anzeichen von neurologischen Defiziten oder Erreichen einer Tumorgröße von $\geq 6\text{mm}$ erfolgte die vorzeitige Terminierung der Tiere. Die bilddiagnostische Überwachung des Tumorwachstums

mittels Magnetresonanztomographie (MRT) wurde von der Neuroradiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Heidelberg (PD Dr. Dr. Michael O. Breckwoldt/Manuel Fischer) an einem 9,4-Tesla-Kleintier-NMR-Scanner mit horizontaler Bohrung und einer Vier-Kanal-Phased-Array-Oberflächenempfangsspule (BioSpec 94/20 USR, Bruker Bio-Spin GmbH, Ettlingen, Deutschland) durchgeführt.

Im Rahmen der stereotaktischen Bestrahlung erhielten die Mäuse 4 Fraktionen à 2 Gy ab Tag 9 oder 10 für vier aufeinanderfolgende Tage auf einem 2x2cm großem Bestrahlungsfeld. Die Tumorbestrahlung erfolgte im MultiRad 225 in der Abteilung für Radioonkologie/Radiobiologie (Prof Dr. Dr. Michael Baumann/ Dr. rer. nat. Ina Kurth) des DKFZ Heidelberg.

2.2.4 Isolierung und Ausreifung von T-Zellen aus Organen

Für die Isolierung der T-Zellen zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden folgende Organe/Gewebe entnommen: gesamtes Tumorgewebe, Kleinhirn, Milz, Lymphknoten aus der Hals- und Axillarregion und Blut. Die Tiere wurden durch eine terminale Herzperfusion mit 20 ml - 30 ml PBS getötet. Dabei folgte zuerst eine kardiale Blutentnahme von 1-2 ml Blut. Anschließend wurde die linke und die rechte, tumortragende Hemisphäre sowie das Kleinhirn entnommen. Das gesamte Tumorgewebe wurde mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert und unter langsamer Rotation bei 37°C für 30 Minuten in HBSS inkubiert, ergänzt mit 50 µg/ml Liberase zur Kollagendissoziation. Das verdaute Tumormaterial wurde zweimal mit Hilfe eines Stößels durch ein 100 µm- und ein 70 µm-Zellsieb gepresst, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Vor der weiteren Bearbeitung wurden die Proben für 5 Minuten bei 600xG herunterzentrifugiert, der Tumorüberstand entnommen und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Zur weiteren Aufreinigung der Tumorzellsuspension erfolgte die Entfernung des Myelins mit 4,5 ml Percoll®. Dabei wurde nach einer Dichtegradientenzentrifugation für 10 Minuten bei einer Umdrehungszahl von 2700 pro Minute der weiße, Myelin enthaltende Überstand vorsichtig mit einer Vakuumpipette entfernt.

Blutproben wurden durch Herzpunktion gewonnen und in Eppendorf Tubes® gesammelt, die mit 0,5 M EDTA beschichtet waren und schließlich zur Separierung des Plasmas für 10 Minuten bei 10000xG zentrifugiert.

Die Milz wurde exzidiert und zweimal durch einen 70-µm-Zellsieb mechanisch dissoziiert, gefolgt von einer Lyse der Erythrozyten in ACK Lyse Puffer.

Tumor-drainierende Lymphknoten wurden aus der Hals- und Axillarregion der Maus entnommen und ebenfalls durch ein 70 µm Zellsieb gesiebt, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden in T-Zell Medium resuspendiert und für die weitere durchflusszytometrische Analyse auf Eis gelagert (siehe 2.2.14).

2.2.5 Isolierung und Kultivierung von gp-100 spezifischen pmel-1 T-Zellen

Für die Untersuchung der Einwanderung von peripheren T-Zellen in die TMU wurden CD90.1+ CD8+ T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten von 6 bis 10 Wochen alten pmel-1- oder pmel-luc-mcherry-Mäusen isoliert und durch ein 70 µm-Zellsieb mechanisch dissoziiert. Nach Lyse der Erythrozyten mit ACK-Lysepuffer wurden die isolierten Immunzellen in einem murinen T-Zell-Proliferationsmedium kultiviert, bestehend aus RPMI-1640, ergänzt mit 10% FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 25 mM HEPES pH 7.4, 1 mM Natriumpyruvat, 5×10^{-5} M 2-Mercaptoethanol und 2 mM L-Glutamin. Zusätzlich erfolgte für 3 Tage bei 37°C, 5% CO₂ eine Stimulation der isolierten T-Zellen mittels 30 IU/ml IL-2 und 2 µg/ml hgp100₂₅₋₃₃ (Sonderanfertigung; Arbeitsgruppe GMP & T-Zell-Therapie, DKFZ Heidelberg). Für den adoptiven T-Zelltransfer wurden die CD90.1+ CD8+ T-Zellen mit dem *CD8a+ T Cell Isolation Kit, mouse* gemäß den Anweisungen des Herstellers selektiert (siehe 2.1.8). CD90.1 ist ein Oberflächenprotein, das besonders häufig auf peripheren T-Zellen vorkommt und eine klare Unterscheidung zwischen tumorinfiltrierenden Immunzellen des Spenders und des Empfängers ermöglicht (Moon et al., 2009).

2.2.6 Adoptiver T-Zell Transfer

Für den adoptiven T-Zell-Transfer (ACT) erfolgte an Tag 11 nach Inokulation der Tumorzellen die i.v. Injektion von $2,5 - 5 \times 10^6$ gp-100 spezifischen CD90.1+ CD8+ T-Zellen, enthalten in 150µ Zellsuspension, in die rechte oder linke Schwanzvene mittels einer 30G Kanüle. Anschließend folgte die i.p. Injektion von 50 000 IU IL-2 an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zur Stimulation der applizierten T-Zellen.

2.2.7 Biolumineszenzmessung

Um die adoptiv-transferierten CD90.1+ CD8+ T-Zellen von pmel-Luc_mCherry-Mäusen zu verfolgen, wurde das In-vivo-Bildgebungssystem (IVIS) Lumina Series III von Perkin Elmer an den Tagen 1 bis 2 nach dem ACT verwendet. Zur besseren Detektion der Biolumineszenzsignale wurden die Mäuse vor der Bildgebung im Gebiet des Tumors, der Tumor drainierenden Lymphknoten und der Milz rasiert. Dann erfolgte die Injektion von 50 mg/kg d-Luciferin s.c. und eine Narkose mit 3-4% Isofluran in einer eigens dafür vorgesehenen Kammer (Bestandteil des XGI-8 Anästhesie Systems (Caliper Life Sciences®)) wurde eingeleitet. Die Biolumineszenzbilder (BLI) wurden 10 Minuten nach der d-Luciferin-Applikation mit einer Belichtungszeit von 30, 45 und 60 Sekunden aufgenommen. Während der Aufnahmen wurden die Mäuse kontinuierlich mit 1,5 % Isofluran unter ständiger Beobachtung narkotisiert. Die Biolumineszenzdaten wurden mit der Software Living Image 4.3 erfasst und ausgewertet. Die BLI-Quantifizierung erfolgte durch Festlegung von *regions of interest* (ROI) um den Tumor herum, und die Biolumineszenzsignale wurden als Photonen/Sekunde quantifiziert. Zur optimalen Vergleichbarkeit wurden die ROIs für jedes Experiment identisch gehalten.

2.2.8 Isolierung von CD31+ Endothelzellen

Zur Bestätigung des Tryptophan-Stoffwechsel im vaskulären Kompartiment wurden primäre murine CD31+ Endothelzellen aus zerebralen Hemisphären von C57BL/6J-Wildtyp (WT)-Mäusen unter Verwendung des Miltenyi MACS Endothelzell-Isolationskits isoliert und in EBM-2-Basalmedium mit Zusätzen (Lonza, EGM™- 2-MV Bullet-Kit™, CC-3202) bei 37°C, 5% CO₂ gemäß den Anweisungen des Herstellers (siehe 2.1.8) kultiviert.

2.2.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Der Nachweis von Kynurenin- und Tryptophan im Zellüberstand von stimulierten Endothelzellen wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) durchgeführt. Dafür wurde der Zellkulturüberstand von CD31+ Endothelzellen aus Wildtyp- und Knockout-Mäusen 24 Stunden lang mit 10 µg/ml IFN γ stimuliert. Anschließend wurden die Kynurenin- und Tryptophanmengen quantifiziert. Die Proteinausfällung erfolgte durch Gabe von 33,73 µl 72%iger Trichloressigsäure auf ein definiertes

Volumen von 200 µl Überstand, gefolgt von einer 10-minütigen Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit. Anschließend wurden die Überstände in HPLC-Glasfläschchen überführt und auf den jeweiligen Enzymgehalt untersucht. Die HPLC-Messungen und Analysen wurden von Alessa Henneberg und Dr. Soumya Mohapatra (AG Opitz, Abteilung Metabolischer Crosstalk bei Krebserkrankungen, DKFZ Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.10 Histologische Färbungen

Zur histologischen Identifizierung von IDO1+ Zellen von primären und rezidivierenden humanen Gliomen wurden Formalin-fixierte in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von primären und rezidivierenden humanen Gliomen vom WHO-Grad 3 bis 4 aus dem Archiv der Abteilung für Neuropathologie in Heidelberg verwendet. Die Proben wurden mit einem Kryotom (Leica CM3050 S Kryostat) in 3 µm große Scheiben geschnitten und mit einem Ventana Benchmark Ultra Immunostainer bearbeitet. Das DAB-Färbungsverfahren umfasste die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 0,3 % H₂O₂ für 3 Minuten und die Behandlung mit Blocking-Puffer, gefolgt von einer Inkubation mit dem primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Im nächsten Schritt wurde das ABC-HRP-Kit (siehe 2.1.8) (120 µl pro Schnitt) für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetragen gefolgt von einem Waschschrift und einer Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 2 Minuten. IDO1+ Zellen wurden mit DAB unter Verwendung des ultraView Universal DAB Detection Kit sichtbar gemacht. Folgende Primärantikörper wurden verwendet: anti-human CD8, anti-human CD3, anti-human CD31 und anti-human IDO1 (siehe 2.1.5). Die Dichte der IDO1+-Zellen wurde semiquantitativ bei einer 100-fachen mikroskopischen Vergrößerung innerhalb von 1 mm² bewertet, und bei visueller Feststellung einer spezifischen, positiven Färbung als vorhanden gewertet.

2.2.11 RNAScope®

Mit der RNAScope® Technologie kann RNA in einzelnen Zellen durch ein auf Hybridisierung basierendes Signalverstärkungssystem licht- oder fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden (F. Wang et al., 2012). Dabei können sowohl gefrorene als auch Formalin-fixierte in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte verwendet werden. Die Färbungen für die In-situ-Hybridisierung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers Advanced Cell Diagnostics durchgeführt. Für diese In-situ-Hybridisierung mittels

RNAscope® wurden die Mäuse durch kardiale Perfusion mit PBS terminiert. Die entnommenen Gehirne wurden 4 Stunden lang mit 4% PFA behandelt und anschließend in 30%ige Saccharoselösung überführt und bei 4°C für 24 bis 48 Stunden gelagert. Anschließend wurden die isolierten Gehirne in Tissue-Tek™ O.C.T. eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden in 10 µm große Scheiben geschnitten und im ersten Schritt für 5 Minuten in Target Retrieval Lösung erhitzt gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in Wasserstoffperoxid. Dann folgte die Behandlung mit 5 Tropfen Protease IV bei Raumtemperatur für eine bessere Antigenzugänglichkeit. Die Sonden, IDO1 (Kat.-Nr. 323104-C1) und Cdh5 (Kat.-Nr. 323105-C2), ein vaskuläres Cadherin, wurden nach Auftragen auf die Gewebeschnitte für 2 Stunden bei 40°C in einem speziellen, vom Hersteller erhältlichen Hybridisierungssofen, inkubiert. Anschließend wurden Verstärkersonden hinzugefügt. Die Signalvisualisierung erfolgte durch sondenspezifische HRP-basierte Detektion durch Opal-Farbstoffe. Die Gewebeschnitte wurden dann für 30 Sekunden mit DAPI inkubiert und mit ProLong Gold Antifade-Mountant-Medium eingedeckelt. Für die Bilder wurde das Zeiss LSM 710 ConfoCor 3 Mikroskop verwendet und in 20-facher Vergrößerung mittels ImageJ analysiert.

2.2.12 Durchflusszytometrie

Zur Immunzell-Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellsuspensionen zuerst in 96-Well-Platten mit konischem Boden pipettiert. Alle Inkubations- und Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C. Für die extrazelluläre Färbung wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit PBS mit fluoreszierenden Antikörpern gegen die jeweiligen Oberflächenantigene, wie z.B. CD8 oder Ki-67 angefärbt und für 30 Minuten lichtgeschützt auf Eis inkubiert. Vor der Oberflächenfärbung wurde die Fc-Gamma-Rezeptor-Blockierung der einzelnen Zellsuspensionen für 30 Minuten in PBS mit Anti-Maus-CD16/32 durchgeführt.

Fixable viability dye eFluor 520 wurde verwendet, um tote Zellen auszuschließen. Für die intrazellulären Antigene IFN γ und FoxP3 wurden die Zellsuspensionen mit 20 µg/ml hgp100₂₅₋₃₃ und 10 µg/ml Brefeldin A in T-Zell-Medium 4 Stunden lang bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde über Nacht ein Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Kit aufgetragen und die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen intrazelluläre Antigene am Folgetag für 45 Minuten auf Eis appliziert. Die Durchflusszytometrie wurde entweder am BD FACS LSR Fortessa oder am BD FACS Canto

Il mittels der BD FACSDiva Software durchgeführt. Für die Datenanalyse wurde FlowJo V10 verwendet.

2.2.13 Einzelzellanalyse

Single cell-Transkriptomdaten von humanen Glioblastomen (12 Patienten; > 37.000 Zellen) wurden vom UCSC Cell Browser (<https://gbm.cells.ucsc.edu>) bezogen und zur weiteren Analyse in R importiert. Die Zellen wurden mit den in den Metadaten angegebenen Namen versehen. Die Endothelzellen wurden anschließend aussortiert und der neu gebildete Cluster mit Seurat reanalysiert. Die Daten wurden zunächst mit der in Seurat implementierten *sctransform*-Funktion normalisiert und dann mit UMAP visualisiert. Unüberwachtes Clustering wurde angewandt und die wichtigsten Markergene für jedes Cluster wurden mit der Funktion *FindAllMarkers* identifiziert. Für die Analyse der Signalwege wurde PROGENy verwendet, um eine Auf- oder Abregulierung zu ermitteln. Die Analysen wurden von Chin Leng Tan (AG Platten, Abteilung für Immunogenomics, DKFZ Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

2.2.14 EAE Induktion

Zur Induktion der EAE für das murine MS-Modell erfolgte die subkutane Injektion einer 1:1 Emulsion, bestehend aus Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) und komplettem Freund-Adjuvans (KFA), bei Wildtyp und floxIDO X VE-Cadherin-Mäusen. Zur Herstellung der KFA wurde eine Ampulle der hitzeinaktivierten Mykobakterien 15 Minuten lang gemörsert und in 25 ml inkompletten Freund's Adjuvans, bestehend aus einer Mineralölemulsion, gelöst. Das starke Adjuvans trägt durch Verstärkung der Antigenwirkung zu einer ausgeprägten Immunantwort bei (Fillmore et al., 2003; Freund et al., 1947). Anschließend wurde das KFA mit gleichen Teilen MOG Peptid (4mg/ml) emulgiert, wovon jeweils 50 µl beidseits auf Höhe der untersten Rippe nach Vorschub der Injektionsnadel zur Axilla, s.c. injiziert wurden. Somit betrug die Gesamtdosis MOG 200 µg pro Maus. Zuvor erfolgte die i.p. Verabreichung von 50 µg Pertussis-Toxin, gelöst in 200 µl PBS, zur Erleichterung der EAE-Induktion. Nach 48h wurde die zweite Pertussis Toxin Dosis in derselben Dosierung appliziert. Der klinische Zustand wurde eine Woche nach Beginn der Immunisierung anhand einer detaillierten Punkteskala beurteilt (Lanz et al., 2010):

Score	Klinische Zeichen
0,7	partieller Verlust des Schwanztonus
1	kompletter Verlust des Schwanztonus
1,3	Verlust des Schwanztonus und unsicherer Gang. Die Maus kann jedoch ohne Probleme über das Gitter laufen.
1,7	Hinterbeine fallen nur selten durch das Gitter (meist beim Krabbeln parallel zum Gitter)
2	normales Krabbeln und Fallen durch das Gitter gleichmäßig verteilt (normales Krabbeln im Käfig)
2,3	normales Gehen auf dem Gitter ist nicht mehr möglich. Beim Gehen im Käfig zeigt sich eine Hinterbeinparese, die Bewegung der Hinterbeine ist noch sichtbar
2,7	Lähmung eines Hinterbeins
3	vollständige Lähmung beider Hinterbeine, Mäuse ziehen die Hinterbeine symmetrisch hinter sich her
3,3	Hinterherziehen der Hinterbeine in seitlicher Schräglage (Drehung der Hüften), Verschlechterung des Gesamteindrucks
3,7	Vorderbeine haben keinen Halt am Gitter, wenn die Mäuse mit dem Schwanz kopfüber gehalten werden
4	vollständige Lähmung der Vorderbeine. Die vorderen Gliedmaßen fallen ständig durch das Gitter und die Maus kann sich nicht selbst mobilisieren
4,3	Maus kann sich gar nicht mehr bewegen
5	Exitus Letalis

Bei Erreichen eines Punktwertes von 4 wurden die Mäuse aus tierschutzrechtlichen Gründen euthanisiert.

2.2.15 Graphische Darstellung und statistische Auswertung

Alle Daten sind, wie in der Abbildungslegende angegeben, als Mittelwert (\pm SEM, SD) oder individuelle Werte dargestellt. Die Signifikanz wurde entweder durch einen ungepaarten, zweiseitigen t-Test oder einen Mann-Whitney-Test ermittelt. Der p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, n.s.: $p > 0.05$). Die Statistiken wurden mit GraphPad Prism 8.0 berechnet. Übersichtsgrafiken wurden mit BioRender erstellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 IDO1 Expression in humanen Gliom-assoziierten Endothelzellen

Um das Expressionsmuster von IDO1 in dem vaskulären Kompartiment humaner Gliome zu untersuchen, wurden dreizehn gepaarte, primäre und rezidivierende Gliom-Präparate vom WHO-Grad 3 und 4 immunhistochemisch mittels dem DAB-Färbeverfahren analysiert. Hochgradig rezidivierende Gliome wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Primärtumoren insgesamt eine etwas höhere, jedoch nicht signifikante Anzahl von IDO1+ Zellen auf (Abb. 3A). Tumorzellen hingegen zeigten nach histomorphologischen Kriterien eine schwach bis gar nicht vorhandene bräunliche IDO1-Färbung auf. Dies steht im Einklang mit zuvor veröffentlichten Daten, die eine geringe IDO1-Expression in neoplastischen Zellen und der myeloischen Zellreihe von humanem GBM-Gewebe zeigten (Darmanis et al., 2017a; Mahlokozera et al., 2021a). Tumor-assoziierte Endothelzellen in hochgradig, rezidivierenden Gliomen hingegen exprimierten IDO1 (Abb. 3B). Zudem ergaben sich anhand der immunhistochemischen Auswertung der Tumorproben Hinweise für eine Korrelation zwischen der IDO1 Expression und dem Malignitätsgrad der Gliome (Abb. 3C).

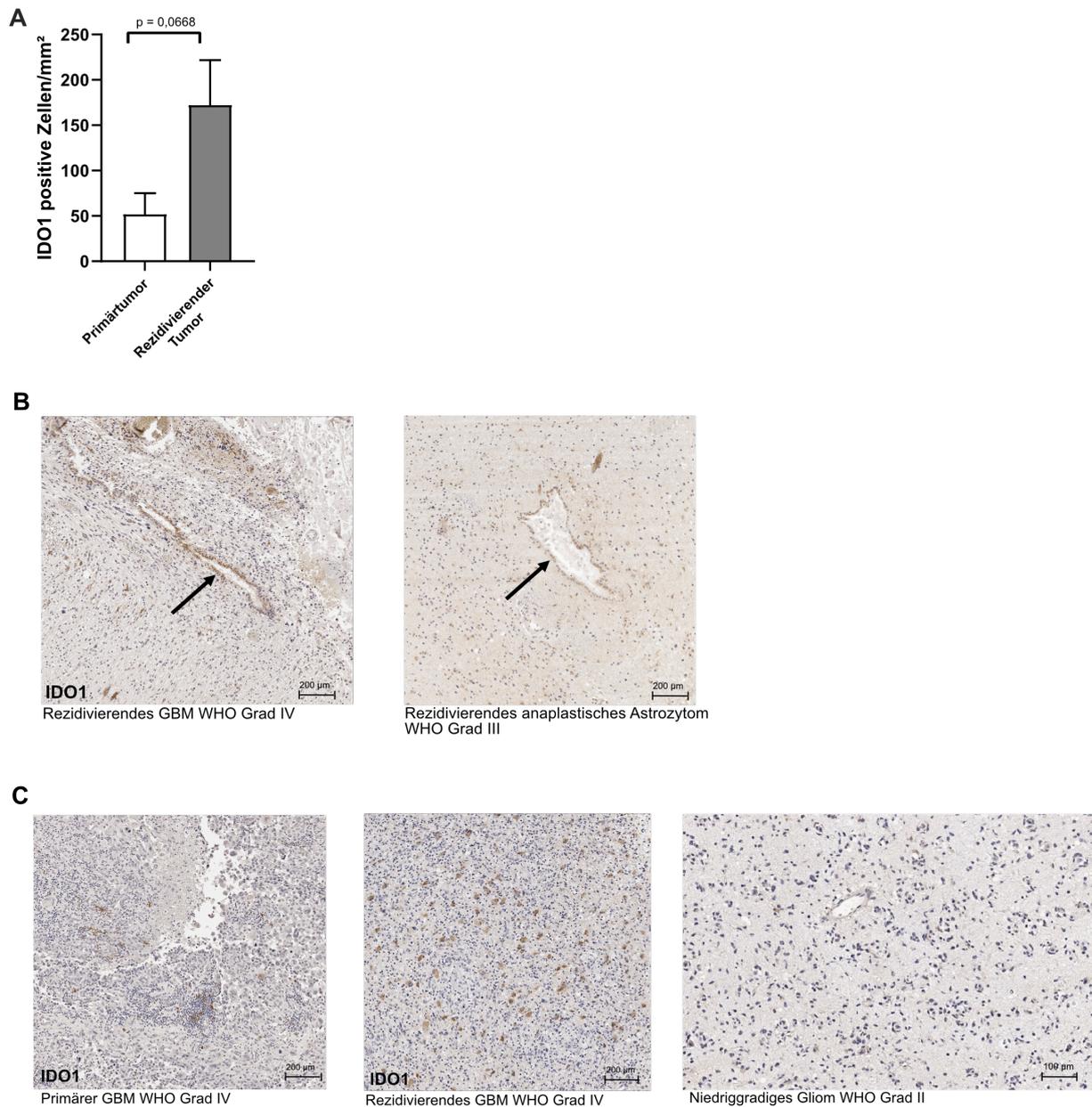
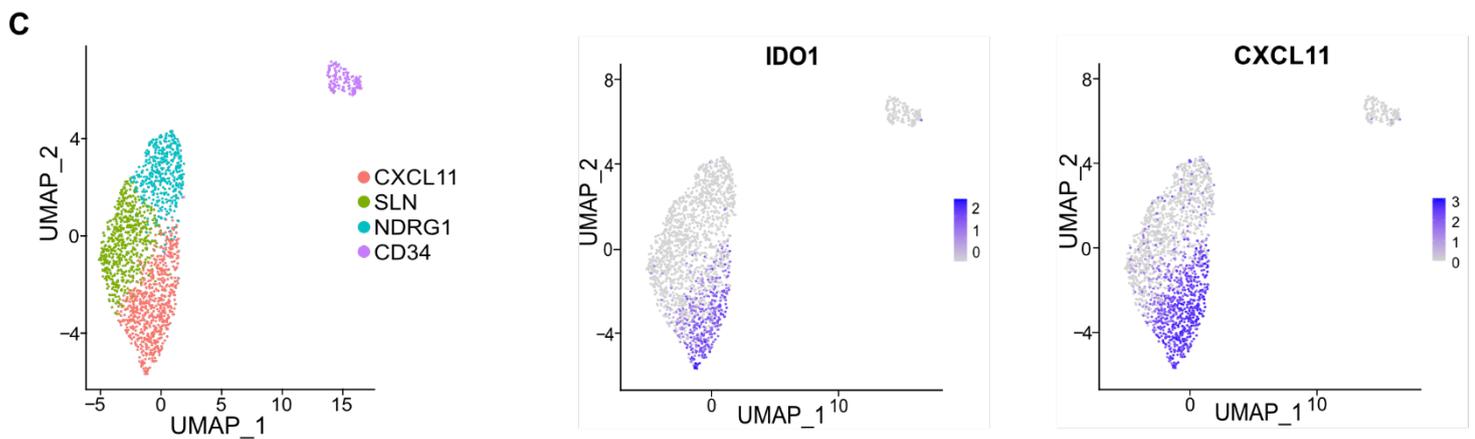
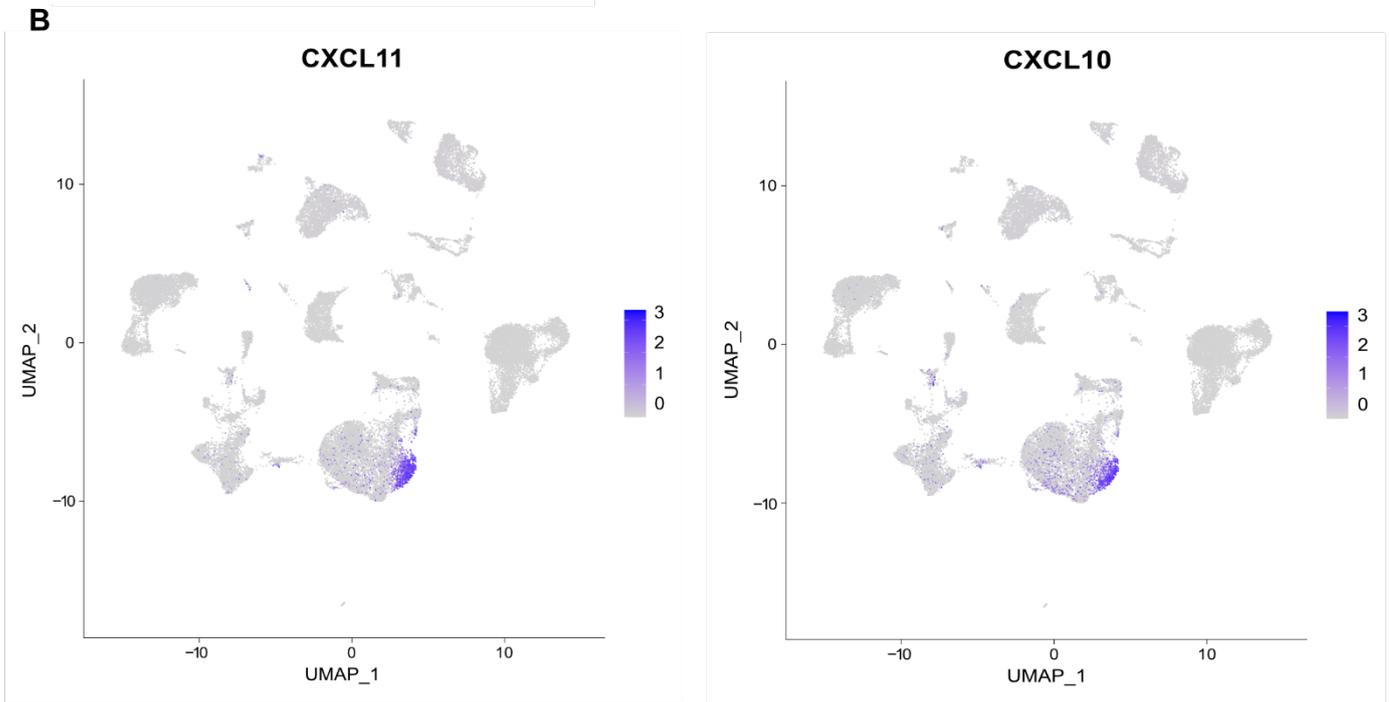
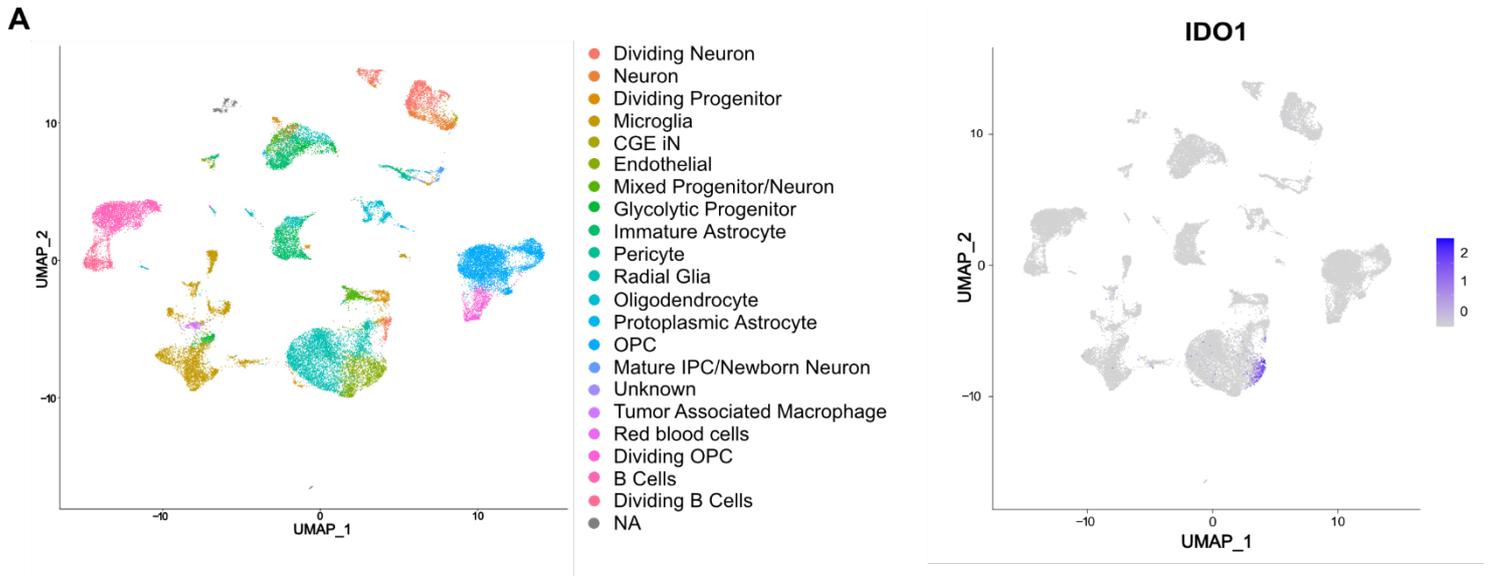


Abbildung 3: Expression von IDO1 in humanen Gliom-assoziierten Endothelzellen.

(A) Quantitative Analyse der IDO1+-Zellen in primären und rezidivierenden humanen Gliomen des WHO-Grades III und IV innerhalb von 1 mm². Die Anzahl der IDO1+-Zellen ist bei rezidivierenden humanen Gliomen leicht, aber nicht signifikant erhöht (n=5; p=0,0668) (B) Repräsentative IHC-Färbungen von rezidivierenden, humanen Gliomen / anaplastischen Astrozytomen mit IDO1-spezifischen Antikörpern. Der Pfeil zeigt IDO1 positive ECs in einem GBM WHO Grad IV Rezidiv sowie im rezidivierenden anaplastischen Astrozytom Grad III. (C) Repräsentative IHC-Färbungen von höher- und niedriggradigen Gliomen mit IDO1-spezifischen Antikörpern. IDO1 wird vermehrt in höhergradigen, sowie rezidivierenden Gliomen exprimiert. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt. Der Maßstab entspricht jeweils 200 µm.

Im nächsten Schritt wurde das Expressionsprofil von IDO1 in scRNA-seq Daten, die aus dem öffentlich zugänglichen UCSC-Zellbrowser stammen, untersucht. Dies erfolgte, um die immunhistochemischen Ergebnisse in einem unabhängigen Datensatz zu validieren und die IDO1-Expression Zelltyp-spezifisch nachzuweisen. Für die Entwicklung des GBM-Tumorzell-Atlas wurden die Tumorzellen mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung auf ein zelluläres Referenzgerüst des menschlichen Gehirns abgebildet.

Hierbei wurden elf unbehandelte, primäre GBM analysiert (Müller et al., 2018; Speir et al., 2021). In den untersuchten Tumorpräparaten wurde IDO1 hauptsächlich im Endothelkompartiment exprimiert (Abb. 4A). CD31, auch bekannt als Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM-1), ist einer der wichtigsten konstitutiv exprimierten Endothelzellmarker (NEWMAN, 1994). *Unsupervised clustering* von CD31+ Endothelzellen ergab vier verschiedene Untergruppen, wobei die IDO1-Expression auf ein CXCL11+ (C-X-C motif chemokine 11) Cluster beschränkt war (Abb. 4B und Abb. 4C). Dieser Subcluster war hauptsächlich durch einen aktivierten JAK/STAT-Signalweg und der Expression von IFN γ -induziertem GBP1 (Guanylat-bindendes Protein 1) und ISG15 (Interferon stimulierte Gen 15) charakterisiert (Abb. 4D) (Perng & Lenschow, 2018; Santos et al., 2020). Die übrigen drei endothelialen Subcluster SLN (Sarcophilin), CD34 und NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated 1) exprimierten wenig bis gar kein IDO1. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ähnliche proinflammatorische Auslöser CXCL11 und IDO1 induzieren und unterstützen die Annahme, dass Tumor-assoziierte Endothelzellen eine große Heterogenität in Bezug auf eine entzündliche Signatur aufweisen (Lo et al., 2011; X. Wang et al., 2020). Bemerkenswert ist, dass die endotheliale Expression von TDO2, einem weiteren Enzym, das den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin katalysiert, gering war (Abb. 5E)



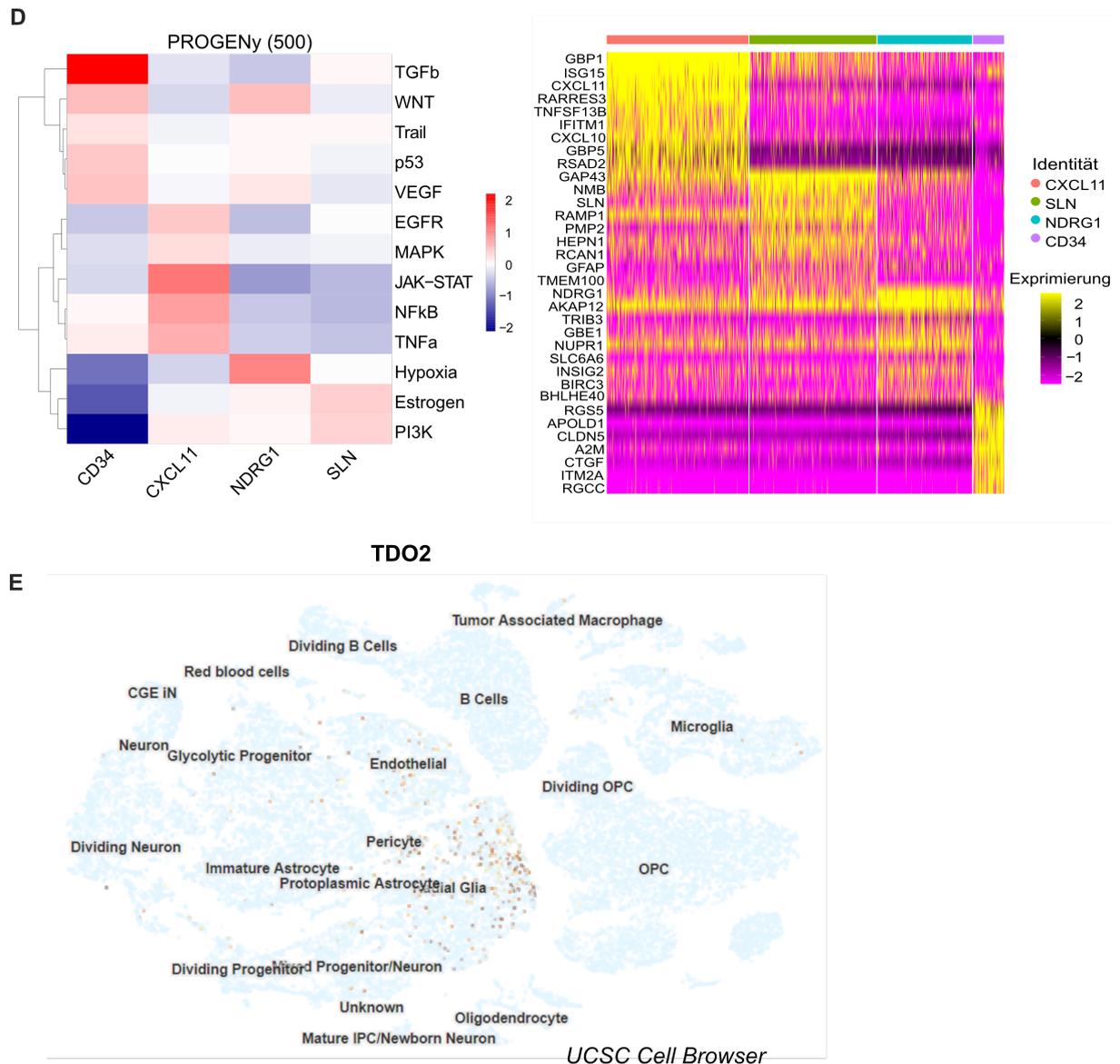


Abbildung 4: IDO1 Expression im endothelialen CXCL11+-Subcluster.

(A) UMAP-Projektion des UCSC-Datensatzes, farbkodiert nach Zellpopulationen primärer GBM. IDO1 wird vorwiegend in ECs exprimiert. (B) Die IDO1-Expression ist auf ein CXCL11+ Cluster und zu einem geringeren Ausmaß auf ein CXCL10+ Cluster beschränkt (C) UMAP-Diagramm, das bei der Analyse von GBM unterschiedliche Endothel-Cluster aufweist. (D) Pathway-Analyse von Einzelzell-Cluster definierenden Genen sowie Heatmap der RNA-Expression der jeweiligen Gene. Der CXCL11 Subcluster wird durch einen aktivierten JAK-STAT-Signalweg charakterisiert. (E) Die TDO2 Expression, dargestellt in einem tSNE-Plot, verteilt sich auf mehrere Zelltypen und wird in Endothelzellen kaum exprimiert.

3.2 Expression und Aktivität von eIDO1 in mikrovaskulären Endothelzellen des Mäusehirns

3.2.1 In Vitro Nachweis des Tryptophan-Stoffwechsel in murinen Endothelzellen

Um einen aktiven Tryptophan-Stoffwechsel in murinen Endothelzellen zu bestätigen, wurden mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns (MBMEC; engl.: murine brain microvascular endothelial cells) aus Wildtyp- und eIDO cKO-Mäusen isoliert.

Hierfür wurden eIDO1-spezifische, konditionale Knockout-Mäuse (eIDO cKO) generiert, bei denen IDO1 ausschließlich in Endothelzellen ausgeknockt ist, die VE-Cadherin exprimieren (sogenannte floxIDO X VE-Cadherin-Cre oder eIDO cKO-Mäuse). Die Tryptophan- und Kynureninkonzentration im Zellüberstand der MBMEC wurden nach 48 Stunden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen. Während der Tryptophangehalt nahezu gleich blieb, führte die Deletion von eIDO zu einem signifikant niedrigerem Kynureninegehalt (Abb. 5). Obwohl Tryptophan auch durch TDO und IDO2 abgebaut wird, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass IDO1 einen bedeutenden Anteil an der Verstoffwechslung von Tryptophan ausmacht.

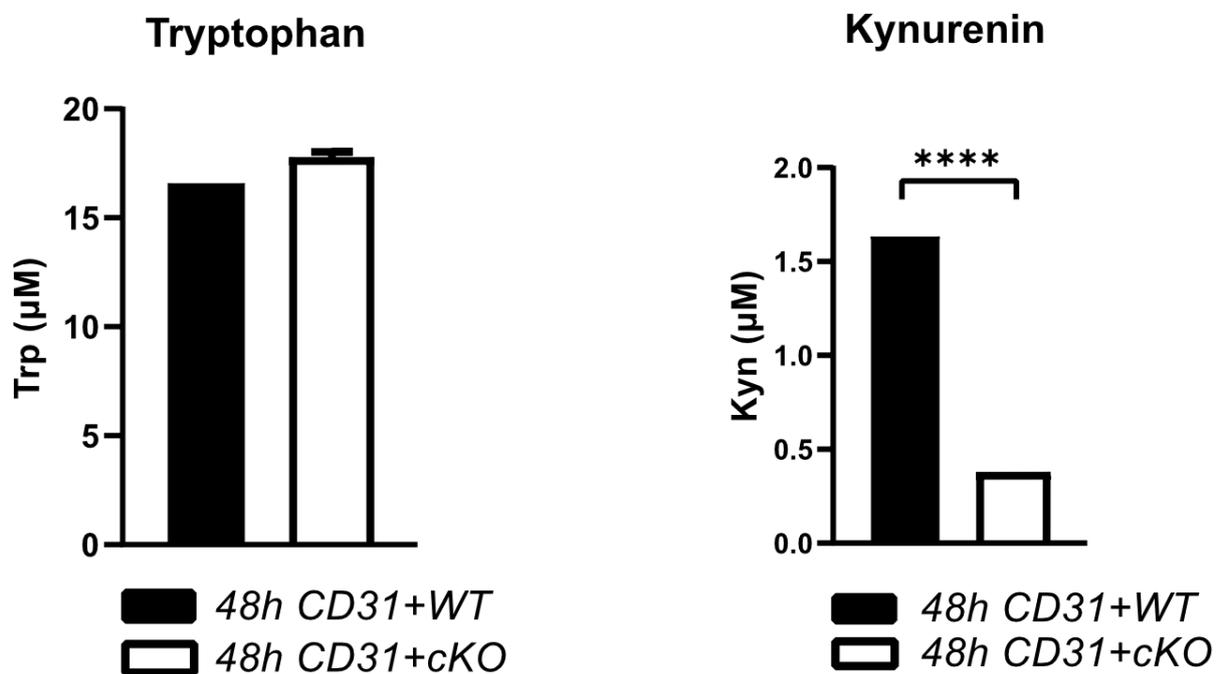


Abbildung 5: Einfluss der eIDO1 Defizienz auf die Tryptophan- und Kynureninkonzentration *in vitro*. Die MBMECs wurden aus C57BL/6J WT-Mäusen und eIDO cKO-Mäusen isoliert, gereinigt und kultiviert. Die Zellüberstände wurden nach 48 Stunden geerntet, um den Kynurenin- und Tryptophangehalt mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu quantifizieren. Nach 48 Stunden blieb die Tryptophankonzentration unverändert, während der Kynureninspiegel im Überstand von den eIDO cKO-MBMECs oder CD31+ eIDO cKO

Zellen signifikant verringert war. Die statistische Signifikanz wurde durch einen zweiseitigen t-Test ermittelt (n=5/5 ****p < 0.0001).

3.2.2 Visualisierung von eIDO1 in murinen GL261-gp100-Tumoren mittels RNAscope[®]

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von eIDO1 in murinen Gliomen wurde ein syngenes, orthotopes GL261-Gliom-Modell, das das Tumor-assoziierte Antigen gp100 exprimiert, verwendet. Endothelzellen in GL261-gp100-Tumoren exprimierten IDO1, was durch die Kolorisierung mit Cadherin 5 (CDH5), auch bekannt als vasculäres endotheliales Cadherin (VE-Cadherin), einem spezifischen Marker für Endothelzellen, mittels RNAscope[®] bestätigt wurde (Abb. 6A). Es zeigte sich überwiegend eine IDO1 Expression im GL261 Tumorgewebe (Abb. 6B). Um die Wirkung von endotheliale IDO1 auf die Transmigration und Zusammensetzung der infiltrierenden Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke sowie die Effektorfunktion tumorspezifischer T-Zellen zu untersuchen, wurden eIDO1-spezifische, konditionale Knockout-Mäuse (eIDO cKO) generiert, bei denen IDO1 ausschließlich in Endothelzellen ausgeknockt ist, welche VE-Cadherin exprimieren. (Abb. 6C) (Alva et al., 2006).

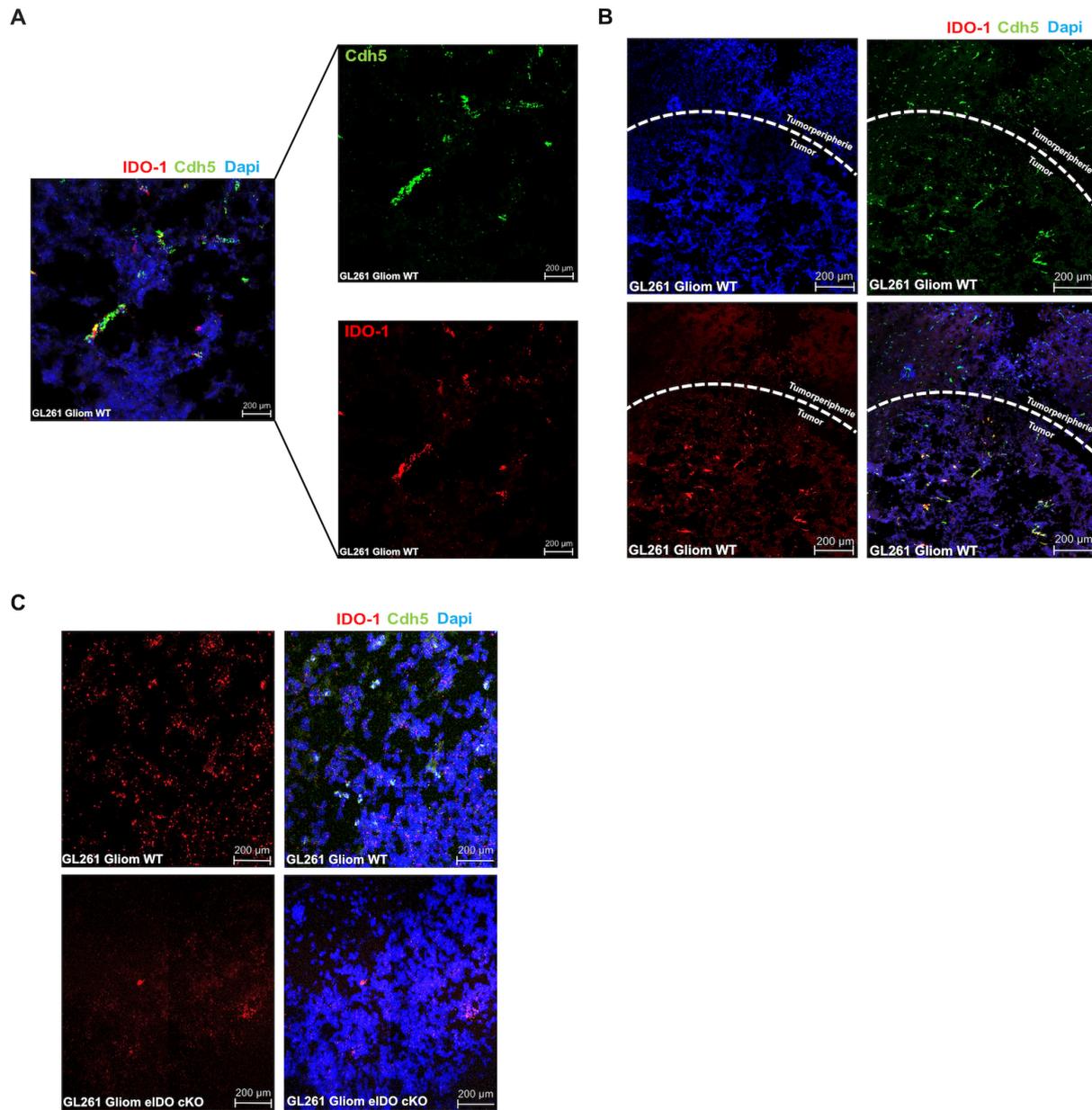


Abbildung 6: Visualisierung der eIDO1 Expression in GL261-gp100 Gliomen mittels RNAScope®. (A) Koronare Schnitte von GL261-gp100-Gliomen von WT-Mäusen wurden für IDO1 und Cdh5 mRNA unter Verwendung der RNAScope®-Technologie gefärbt. (B) Die IDO1-Expression ist hauptsächlich auf das GL261-Gliomgewebe beschränkt. (C) Endotheliale IDO1-Expression in koronaren Schnitten von GL261-Gliom in WT- und eIDO KO-Mäusen. Der Maßstab entspricht jeweils 200 µm.

3.2.3 Der Einfluss von eIDO1 und lokaler Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung in vitro

Niedrig dosierte Strahlentherapie führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Immunzellen hin zu murinen Tumoren, was ebenfalls in früheren, bisher unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe anhand des orthotopen murinen Gliommodells bestätigt werden konnte (Herrera et al., 2022). Folglich kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulierung von immunologischen Checkpoints, einschließlich einer verstärkten IDO1 Expression (M. Li et al., 2014). Zur Ausschaltung des immunsuppressiven Effekts von IDO1 haben Kesawarani et al. eine hypofraktionierte Strahlentherapie mit einer pharmakologischen Inhibition von IDO1 kombiniert, was zu einer erhöhten Anzahl tumorinfiltrierender, zytotoxischer T-Zellen führte (Kesawarani et al., 2018). Um den Einfluss der niedrig dosierten Bestrahlung auf eIDO1 zu untersuchen, erfolgte vor den tierexperimentellen Versuchen ein in-vitro-Versuch mit humanen, kortikalen Endothelzellen (hCMEC/D3). Hierbei führte die alleinige Bestrahlung mit jeweils 2 Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen zu einer signifikant verstärkten IDO1 Expression (Abb. 7)

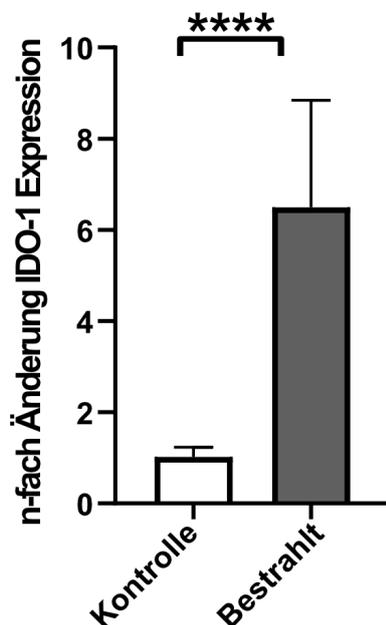


Abbildung 7: Einfluss von niedrig dosierter Bestrahlung auf humane kortikale Endothelzellen (hCMEC/D3). Die Zellbestrahlung erfolgte im Multirad225 in der Abteilung für Radioonkologie/Radiobiologie am DKFZ Heidelberg an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 2 Gy und führte zu einer signifikant gesteigerten IDO1 Expression. Der IDO1 Gehalt wurde mittels qPCR quantifiziert. Die statistische Signifikanz wurde durch einen ungepaarten,

zweiseitigem t-Test definiert ($n=3/3$, **** $p < 0.0001$). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (\pm SEM) dargestellt.

3.3 Der Einfluss von eIDO1 in einem, syngenem, orthotopen Mausmodell

3.3.1 Die Rolle von eIDO1 und lokaler Bestrahlung auf die T-Zell Rekrutierung und Aktivierung

Um die Auswirkung des eIDO1 Knockouts auf die strahleninduzierte Immunezellinfiltration zu untersuchen, wurde eine intrakranielle Tumoringektion mit GL261-gp100 Zellen bei WT- und eIDO-KO Mäusen (floxIDO X VE-Cadherin-Cre) durchgeführt, gefolgt von einer stereotaktischen Strahlentherapie mit einer Dosis von 2 Gy an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Abb. 8A). Um das Tumorstadium zu kontrollieren, erfolgte eine MRT-Bildgebung am Tag acht und fünfzehn nach Tumoringektion (Abb. 8B). Nach fünfzehn Tagen ließ sich kein signifikanter Einfluss auf die Tumorstadium zwischen beiden Versuchsgruppen beobachten (Abb. 8C). Es ließ sich eine leicht positive, jedoch nicht signifikante Korrelation zwischen der Tumorstadium und der Anzahl der infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen feststellen. Zudem zeigte sich ein Zusammenhang zwischen einem schnellem Tumorstadium und einer verstärkten CD8⁺ T-Zellmigration (Abb. 8D).

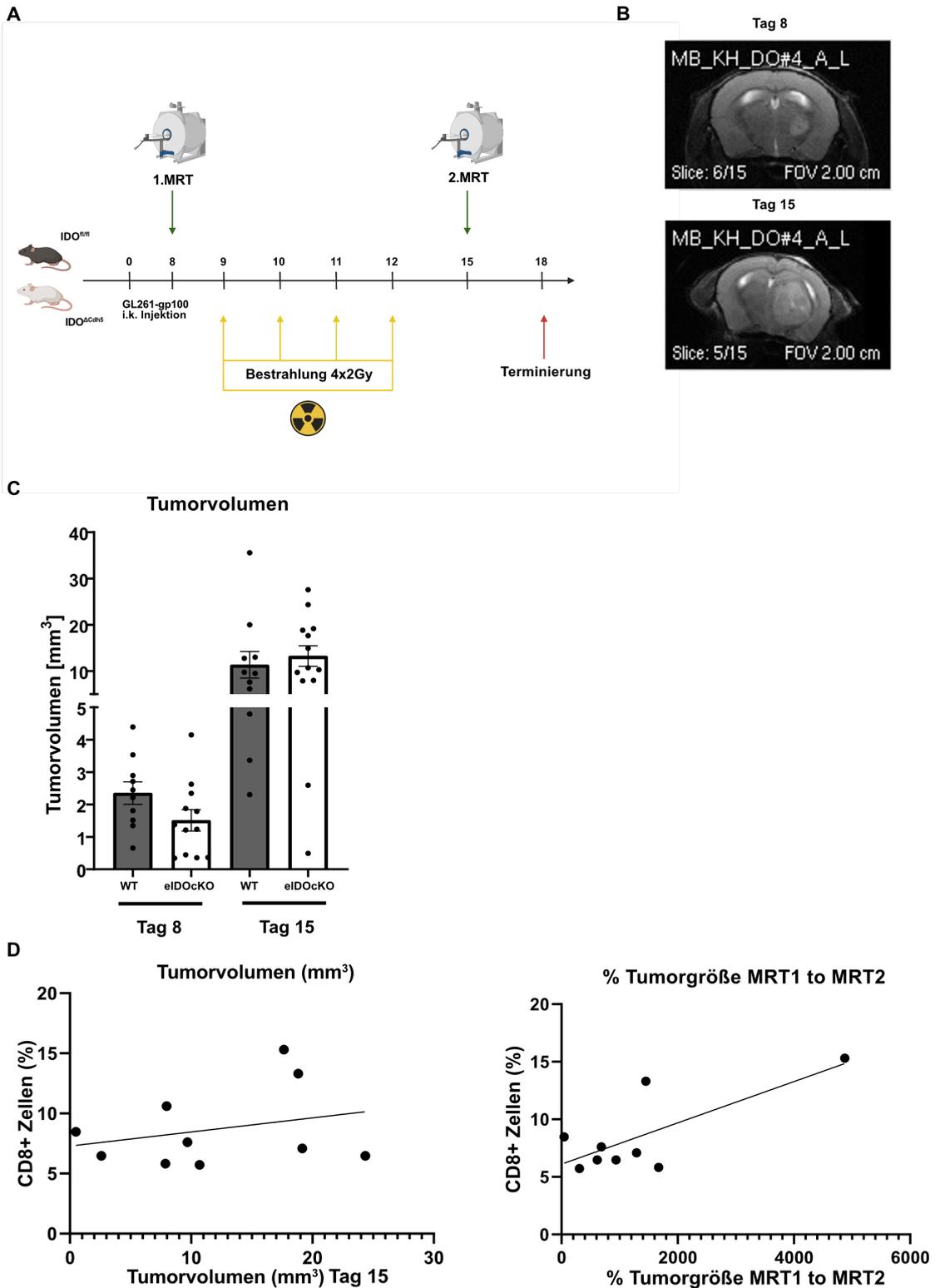
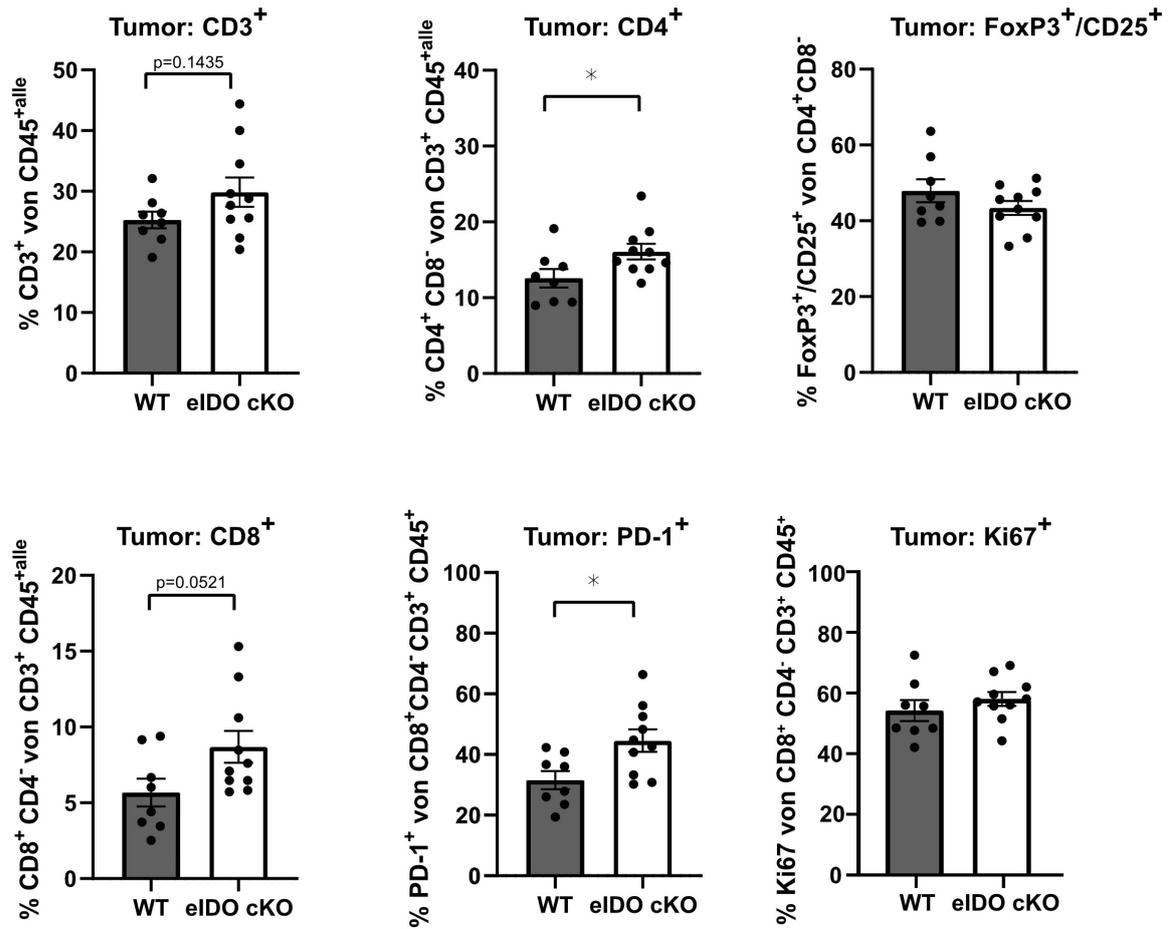


Abbildung 8: Einfluss des eIDO1 Knockouts und der stereotaktischen Bestrahlung auf das Tumorstadium. (A) Für den Nachweis der Immunzellinfiltration wurden $GL261-gp100$ -Zellen in eIDO cKO und Wildtyp-Mäusen ($n = 11$ WT vs. $n = 14$ eIDO cKO-Mäuse) intrakranial injiziert. Eine niedrig dosierte, stereotaktische Tumorstadiumbestrahlung mit 2 Gy wurde an vier aufeinanderfolgenden Tagen, beginnend an Tag neun, durchgeführt. (B)

Repräsentative MRT-Bilder vom Tumorwachstum an Tag acht und fünfzehn einer eIDO cKO-Maus. (C) An den gemessenen Tagen acht und fünfzehn gibt es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Tumorgöße zwischen den beiden Versuchsgruppen ($n=11/14$; $r=0,14$). (D) Leichte, jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil von CD8+ T-Zellen an infiltrierenden Immunzellen und dem Tumolvolumen gemessen in mm^3 , sowie dem prozentualen Tumorwachstum zwischen Tag acht und fünfzehn in % ($n=11/14$; $r=0,07$ für Tumolvolumen, $r=0,55$ für % Tumorgöße). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (\pm SEM) dargestellt.

Eine durchflusszytometrische Untersuchung gab Aufschluss bezüglich der peripheren Immunzellinfiltration hin zum Tumor ab Tag achtzehn (Abb. 8A). Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CD4+ T-Zellen sowie eine signifikant erhöhte Expression von PD-1 als Marker für eine T-Zell-Dysfunktion auf CD8+ T-Zellen im Tumorgewebe von eIDO1-defizienten Mäusen (Abb. 9A). Interessanterweise hatte der Verlust von eIDO1 weder einen Effekt auf die regulatorischen T-Zellen noch ließ sich eine verstärkte Infiltration von CD8+ T-Zellen beobachten (Abb. 9A). Die Proliferation von CD8 + T-Zellen, gemessen durch eine Ki67 Färbung, wies ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen auf. In den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) zeigte sich kein Effekt hinsichtlich der Immunzellrekrutierung, weder bezüglich CD4+ noch CD8+ T-Zellen (Abb. 9B). Diese Daten deuten darauf hin, dass der Verlust von eIDO1 keinen Einfluss auf sowohl die Gesamtanzahl der infiltrierenden T-Zellen sowie die Größe des Tumors hat, jedoch mit einer leichten Verschiebung der Immunzellinfiltration in Richtung CD4+ T-Zellen einhergeht.

A



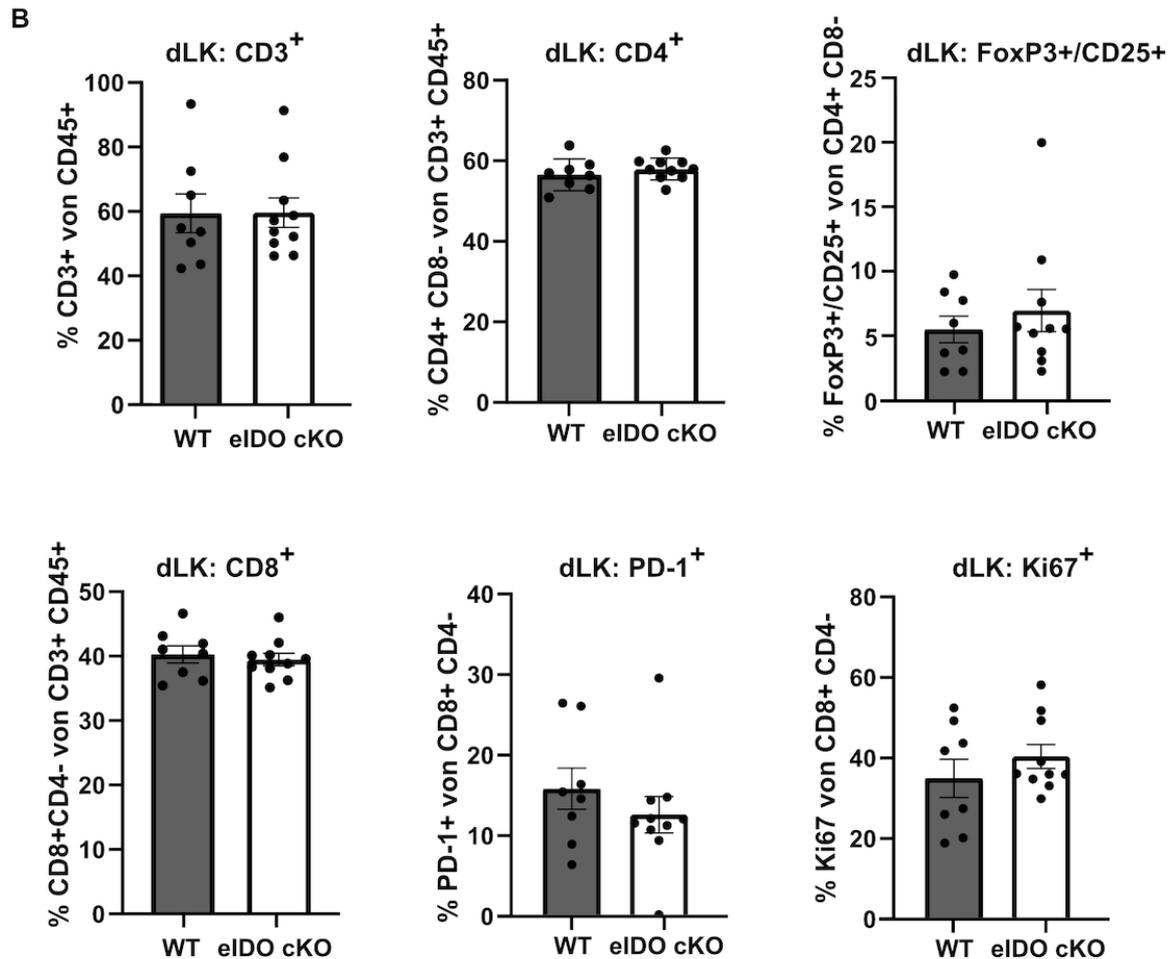


Abbildung 9: eIDO1 Knockout und lokale Bestrahlung führt zu einer Verschiebung in Richtung der CD4⁺ T-Zell-Infiltration (A) Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TILs) sowie Lymphozyten in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) (B) wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die T-Zell-Frequenz und weitere Untergruppen untersucht: CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, PD1- und Ki67 Expression auf CD8⁺ T-Zellen und regulatorische T-Zellen. Für (A) wurde die statistische Signifikanz durch einen ungepaarten t-Test in Kombination mit einem Mann-Whitney-Test bestimmt (Tumor n=8/10, dLK n=8/10; *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

3.3.2 Der Einfluss von eIDO1 auf den adoptiven Transfer von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Bisher unveröffentlichte, tierexperimentelle Daten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass eine niedrig dosierte Bestrahlung von orthotopen Gliomen in Kombination mit einer adoptiven T-Zell-Therapie zu einem deutlichen Anstieg der Migration von aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus der Peripherie hin zum Tumorgewebe führte. Aus diesem Grund wurde in dem nächsten Versuchsschritt ein adoptiver T-Zell-Transfer (ACT) mit

Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durchgeführt, um die Auswirkungen eines konditionalen eIDO1 KO in Kombination mit einer niedrig dosierten Strahlentherapie auf die periphere T-Zell-Infiltration in das Tumorgewebe zu untersuchen. Der ACT erfolgte am elften Tag nach der Tumorkonkulation mit gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Für den visuellen Nachweis der Lokalisierung und Aktivierung der T-Zelleinwanderung mittels ACT wurden pmel-Luc-mCherry-Mäuse verwendet. Luc-mCherry-Mäuse exprimieren Luciferase, sowie den immunofluoreszenten Marker *mcherry*, der der in-vivo-Visualisierung der infiltrierenden T-Zellen sowie der Analyse ihrer Dynamik dient und ebenfalls durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Pmel-1-Mäuse tragen zudem einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch für gp100, ein endogenes, Tumor-assoziiertes Antigen (TAA) ist, das häufig in humanen Gliomen exprimiert wird (Prins et al., 2003). Vor der Injektion unterliefen die isolierten T-Zellen von pmel-Luc_mCherry-Mäusen eine Zellseparation auf magnetischer Basis, gefolgt von einer Stimulation mit gp100 und IL-2 (Besser et al., 2009). Diese dreiteilige Behandlung stimuliert die Proliferation der injizierten T-Zellen und erhöht die Wirksamkeit der T-Zell-Erkennung (Hanada et al., 2019). Zeitgleich zum ACT erfolgte eine lokale Tumorbestrahlung beider Versuchsgruppen für vier Tage mit 2 Gy (Abb. 10A). Auch bei diesem Behandlungsschema hatte die Depletion von eIDO1 keinen Einfluss auf die Tumorgöße, gemessen mittels MRT an Tag acht nach intrakranieller Injektion der GL261-gp100 Tumorzellen (Abb.10B).

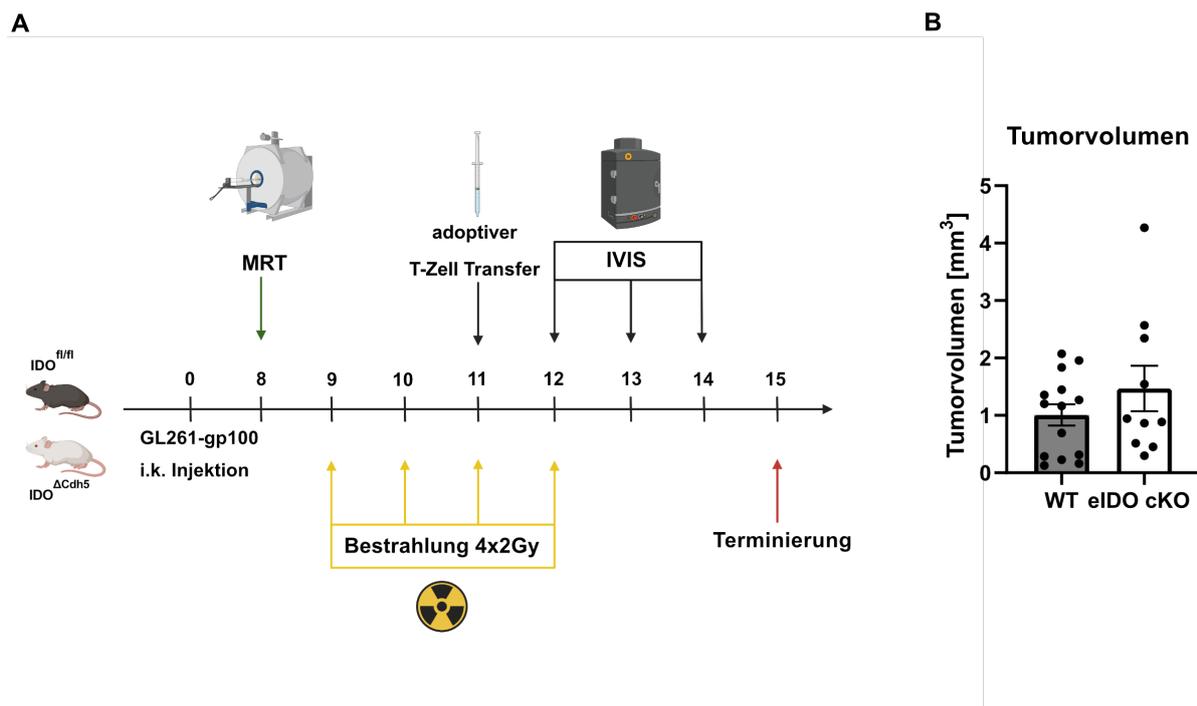


Abbildung 10: Therapieschema zur Behandlung von GL261-gp100 tragenden Mäusen mit einer Kombinationstherapie aus Tumorbestrahlung und adoptiven T-Zell-Transfer (ACT). (A) Intrakranielle Injektion von GL261-gp100-Zellen in floxDIO X VE-Cadherin-Cre-Mäusen und Kontrollmäusen (n=14 vs. n=10 Tiere). Ein ACT mit gp100-spezifischen, tumorinfiltrierenden, zytotoxischen T-Zellen wurde am Tag elf zusätzlich zu einer niedrig dosierten Strahlentherapie appliziert. (B) Die Tumorumfänge wurden mit MRT an Tag acht gemessen.

Vier Tage nach dem ACT wurde die Multicolor-Durchflusszytometrie zur Analyse des Phänotyps der tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) genutzt. Hier zeigte der Gesamtzustrom von T-Zell-Subpopulationen keinen Unterschied in Abhängigkeit von der eIDO1-Expression (Abb. 11A-B).

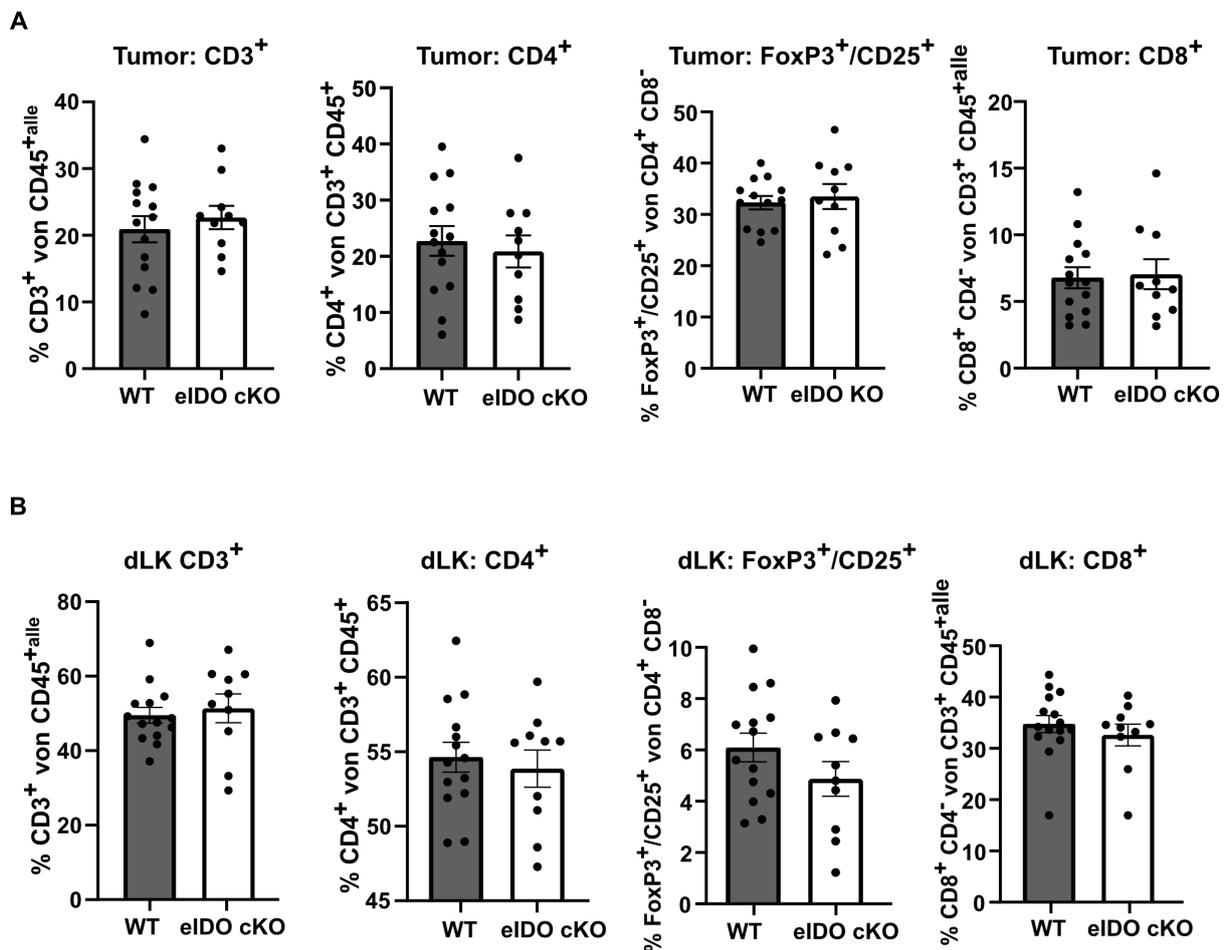
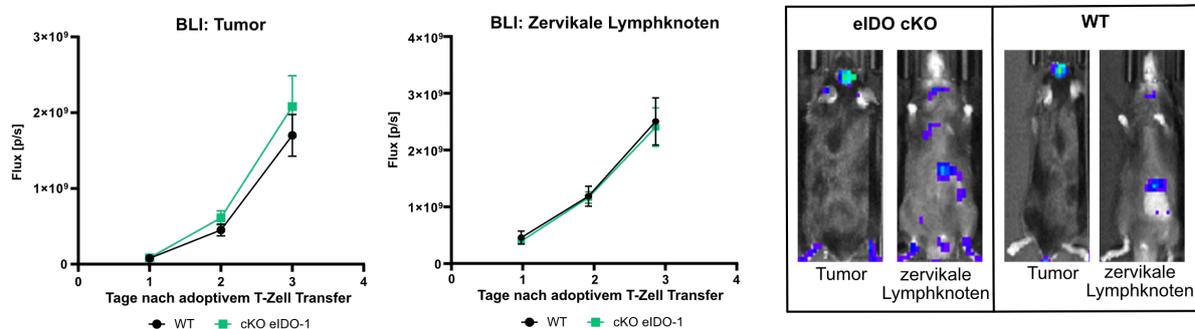


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse infiltrierender T-Zellen (A) Tumor infiltrierende Lymphozyten (TILs) und T-Zellen in den Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLK) (B) wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die T-Zell-Häufigkeit und in CD4⁺, CD8⁺ und FoxP3⁺/CD25⁺ T-Zellsubpopulationen differenziert (n=14/10). Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

Die periphere T-Zellmigration und Rekrutierung zum Tumorgewebe und den Tumordrainierenden Lymphknoten wurde ein Tag nach dem ACT sowie nach abgeschlossener stereotaktischer Tumorbestrahlung mittels in vivo Biolumineszenz Messungen der Luciferase-exprimierenden pmel-luc mcherry T-Zellen erfasst. Die Immunphänotypisierung der adoptiv transferierten gp100-spezifischen T-Zellen erfolgte über deren immunfluoreszenten Marker mcherry. Zusammenfassend hatte die Ablation von eIDO1 keinen Einfluss auf die Rekrutierung von adoptiv übertragenen CD90.1⁺ CD8⁺ T-Zellen, wie IVIS (Abb. 12A) und Durchflusszytometrie (Abb. 12B) zeigen.

A



B

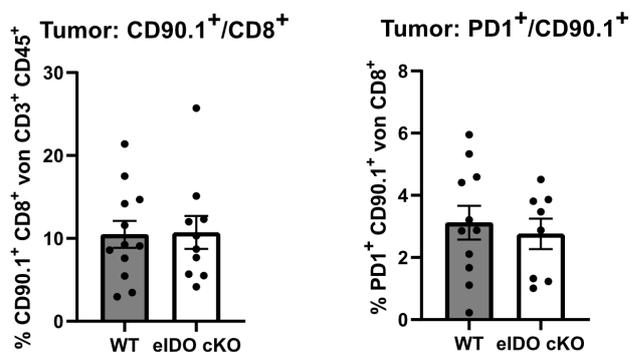
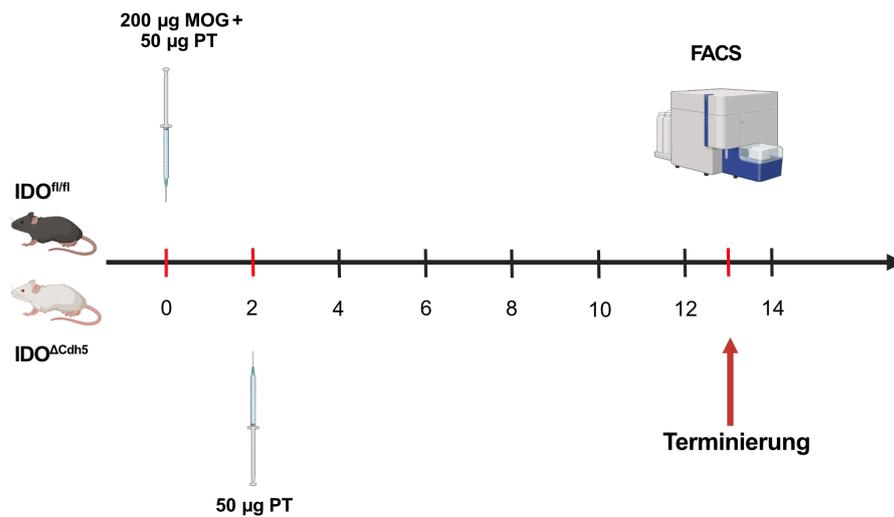


Abbildung 12: T-Zell Rekrutierung nach ACT mit gp100-spezifischen CD90.1⁺ CD8⁺ T-Zellen. (A) Die Verfolgung der adoptiv übertragenen CD90.1⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde mit In-vivo-Biolumineszenz-Bildgebung (IVIS) durchgeführt. Die Quantifizierung der Biolumineszenzsignale von den Luciferase-exprimierenden zytotoxischen T-Zellen im Tumor und den drainierenden, zervikalen Lymphknoten erfolgte mittels IVIS Lumina Series III mit einer Belichtungszeit von 30, 45 und 60 Sekunden an Tag zwölf bis Tag vierzehn. (B) Durchflusszytometrische Analyse von CD90.1⁺ CD8⁺ T-Zellen und CD90.1⁺ T-Zellen mit Expression des Erschöpfungsmarkers PD1⁺. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (± SEM) dargestellt.

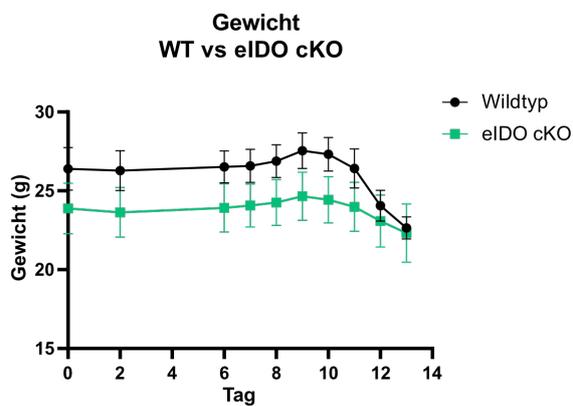
3.4 Der Einfluss von eIDO1 auf den Krankheitsverlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)

Die Dysregulation von neuroprotektiven und neurotoxischen Metaboliten im Rahmen des Tryptophanstoffwechsels sowie eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) tragen zur multifaktoriellen Immunpathogenese der Multiplen Sklerose (MS) bei (Lovelace et al., 2016). Zur Klärung der Frage, ob ein konditionaler Knockout von IDO1 in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem meistgenutzten tierexperimentellen MS-Modell hat, erfolgte die Induktion der EAE in eIDO cKO-Mäusen und einer entsprechenden Kontrollgruppe. Die Immunisierung erfolgte mit 200 µg MOG sowie 50 µg Pertussis-Toxin (PT). An Tag zwei folgte die erneute intraperitoneale Injektion von PT zur Erhöhung der BHS-Permeabilität, was zu einer vereinfachten Infiltration proinflammatorischer Zellen in das ZNS führt (Abb. 13A). Zwischen beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gewichtsverlaufs (Abb. 13B). Interessanterweise schritten die klinischen Symptome bei den eIDO cKO-Mäusen schneller voran, was sich nach 8 Tagen in einem höheren EAE-Score widerspiegelte. Dieser Effekt kehrte sich jedoch bis zur Terminierung um, und die Wildtyp-Mäuse erreichten nach dreizehn Tagen einen höheren Score (Abb. 13C). Insgesamt hatte die eIDO1 Depletion keine erkennbaren Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der EAE.

A



B



C

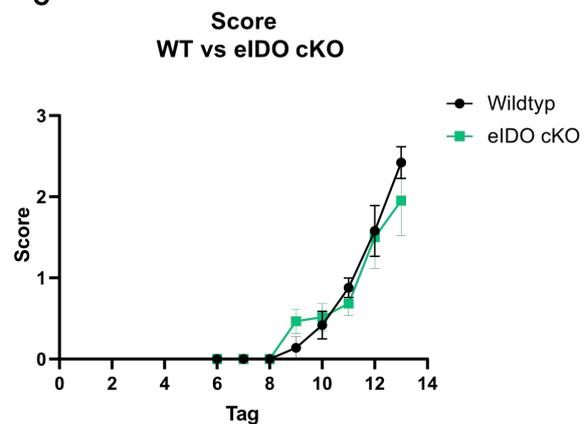


Abbildung 13: Einfluss der eIDO1-Defizienz auf den Krankheitsverlauf der EAE (A) Immunisierung der eIDO cKO-Mäuse und Kontrollmäuse (n=6 vs. n=6 Tiere) erfolgte mit 200 µg MOG + 50 µg PT. An Tag zwei folgte eine weitere Gabe von 50 µg PT. Nach dreizehn Tagen wurden die Tiere euthanisiert und die Immunzellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) Ab dem sechsten Tag wurden die Versuchstiere täglich gewogen. (C) Zur Erfassung des klinischen Verlaufs wurde täglich der EAE-Score bestimmt. Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler (\pm SEM) dargestellt.

Die Immunphänotypisierung der infiltrierenden T-Zellsubpopulationen in der Milz zeigte bei eIDO cKO-Mäusen eine leicht vermehrte Infiltration von CD3⁺ T-Zellen sowie einen erhöhten prozentualen Anteil an regulatorischen T-Zellen (Abb. 14B). Die durchflusszytometrische Analyse der Kleinhirn- und Rückenmarksproben ergab lediglich eine leicht erhöhte Infiltration der CD8⁺-T-Zellen. Zusammenfassend, hatte die IDO1 Ausschaltung in den Endothelzellen keinen signifikanten Einfluss auf die periphere Immunzellrekretierung und somit auf den inflammatorischen und

demyelinisierenden Verlauf der Erkrankung. Diese Daten deuten darauf hin, dass eIDO1 keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der infiltrierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen im ZNS und den sekundären lymphatischen Organen hat und somit den klinischen Verlauf im EAE-Modell vermutlich nicht beeinflusst.

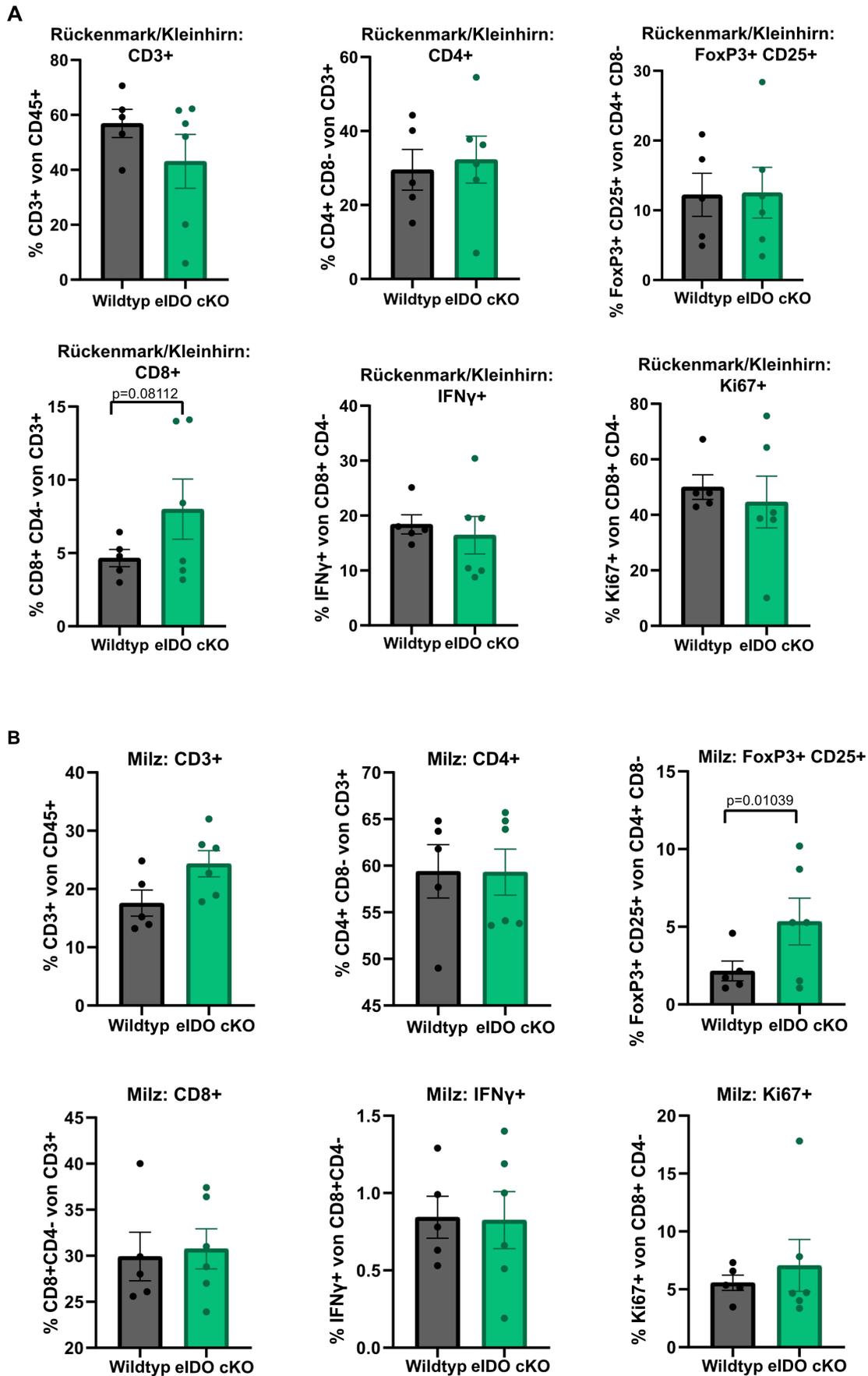


Abbildung 14: Einfluss der eIDO1 Ablation auf die T-Zell Aktivität in Milz und Rückenmarks-/Kleinhirngewebe (A) T-Zellen in der Milz und im Rückenmarks-/Kleinhirngewebe (B)

wurden isoliert und mittels Durchflusszytometrie auf die T-Zell-Häufigkeit und in CD4+, CD8+ und FoxP3+/CD25+ T-Zellsubpopulationen unterteilt. Zudem erfolgte eine weitere Differenzierung von CD8+ T-Zellen über die spezifischen intrazellulär gefärbten Marker IFN- γ , sowie FoxP3 zur Erfassung regulatorischer T-Zellen und dem Proliferationsmarker Ki67 (n=5/6). Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler (\pm SEM) dargestellt.

4 DISKUSSION

4.1 Die Expression von eIDO1 im humanen Glioblastom

IDO1 spielt eine zentrale Rolle bei der Tumor-assoziierten Immunsuppression (Munn & Mellor, 2016). Trotz dieser Erkenntnis zeigte die pharmakologische Hemmung von IDO1 in Kombination mit einer Checkpoint-Inhibition in mehreren klinischen Studien keinen signifikanten klinischen Nutzen (Günther et al., 2019; Labadie et al., 2019).

In einer Phase-III-Studie wurden Patienten mit einem fortgeschrittenen malignen Melanom entweder mit Epcadostat, einem IDO1-Inhibitor, und Pembrolizumab (PD-1-Inhibitor) oder mit einem Placebo sowie Pembrolizumab behandelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen hinsichtlich des progressionsfreien Überlebens oder des Gesamtüberlebens festgestellt werden (Long et al., 2019). Eine mögliche, molekulare Grundlage für das fehlende Therapieansprechen ist die IFN γ vermittelte Induktion von IDO1, welche von aktivierten T-Zellen im Rahmen der Immuncheckpoint-Blockade, ausgeschüttet wird. Da tumorinfiltrierende Lymphozyten eine Hauptquelle von IFN γ darstellen, könnten diese IDO1 im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus hochregulieren und damit zur Immunevasion des Tumors beitragen (Meireson et al., 2020).

Verglichen mit anderen Tumorentitäten ist die Datenlage zur immunsuppressiven Wirkung von IDO1 in malignen Hirntumoren im Rahmen klinischer Studien noch unzureichend. Präklinische Studien an Mäusen mit orthotopen Glioblastomen zeigten jedoch, dass die Kombination von Strahlentherapie und dualer Immuntherapie mit Nivolumab und einem IDO1-Inhibitor die Überlebensrate signifikant verlängern konnte (Ladomersky et al., 2018). Die Ergebnisse einer klinischen Studie der Arbeitsgruppe von Prof. Campian in der eine Dreifachtherapie mittels einem PD-1-Inhibitor, Bevacizumab (Antikörper gegen VEGF), Strahlentherapie und einem IDO1-Inhibitor zur Behandlung von rezidivierenden Glioblastomen implementiert werden soll, stehen noch aus (NCT03532295). Während die meisten Studien die Rolle von IDO1 und anderen Tryptophan-metabolisierenden Enzymen wie TDO, die von Gliomzellen und verschiedenen Immunzellpopulationen exprimiert werden, untersucht haben, bleibt die Funktion von

IDO1 im vaskulären Kompartiment, insbesondere in ECs, und dessen Beitrag zum immunsuppressiven TME weitgehend ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von eIDO1 in humanen Gliomproben analysiert. Außerdem wurden die Auswirkungen eines eIDO1-Mangels in Kombination mit einer T-Zell-Immuntherapie und niedrig dosierten Strahlentherapie auf das lokale T-Zell-Kompartiment, insbesondere auf die Schnittstelle zwischen Immunzellen und dem Endothel in experimentellen Gliomen, untersucht.

Um die Rolle von eIDO1 in humanen Gliomen zu beurteilen, wurde die Expression von eIDO1 in primären und rezidivierenden Gliomen der Grade III und IV immunhistochemisch untersucht. Dabei wurde eIDO1 vermehrt in rezidivierenden, hochgradigen Gliomen nachgewiesen (Abb. 3A). Die Standardtherapie des primären Glioblastoms (GBM) umfasst derzeit die Kombination aus Operation, Strahlen- und Chemotherapie mit Temozolomid (Stupp et al., 2005). Eine mögliche Erklärung für die verstärkte Expression von eIDO1 bei rezidivierendem GBM könnte eine bestrahlungsinduzierte Immunstimulation sein. Lokale Bestrahlung maligner Gliome führt zu einer Steigerung der Proliferation und Effektorfunktion von antigenspezifischen T-Zellen (Lai et al., 2019a). Dies führt zu einer erhöhten Expression der Effektorzytokine IFN- γ und TNF- α , die von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ausgeschüttet werden, und möglicherweise zu einer verstärkten eIDO1-Expression (S. Wei et al., 2013). Weitere Versuche sind erforderlich, um diese Ergebnisse zu validieren.

Erstmals konnte in der Analyse von scRNA-seq-Daten menschlicher GBM gezeigt werden, dass tumorassoziierte Endothelzellen (ECs) eine klare Heterogenität aufweisen, die in vier Cluster unterteilt werden kann (Abb. 4). Dabei ist eIDO1 auf eine Subpopulation der Endothelzellen beschränkt, die durch die Expression des Interferon-induzierten Proteins CXCL11 gekennzeichnet ist (Abb. 4C). CXCL11, auch bekannt als induzierbares T-Zell- α -Chemoattraktant (I-TAC), ist ein Chemokin, das durch Bindung an CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3) auf Zielzellen wie T- und NK-Zellen wirkt (Cole et al., 1998; Tokunaga et al., 2018). Frühere Studien haben CXCL11 in der tumorassoziierten Vaskularisation von menschlichen Glioblastomen und Meningeomen nachgewiesen (Walters et al., 2014; Würth et al., 2011). In Glioblastom-Proben wurden höhere CXCL11-Mengen festgestellt als in niedriggradigen Gliomen oder normalem

Hirngewebe (Calatuzzolo et al., 2011). Eine Signalweganalyse von Einzelzell-Cluster-definierenden Genen sowie eine Heatmap der RNA-Expression der jeweiligen Gene zeigten, dass der CXCL11+ Subcluster durch einen aktivierten JAK-STAT-Signalweg und eine Hochregulierung von IFN γ -induziertem GBP1 und ISG15 charakterisiert ist (Abb. 4D). Dies ist durch das gemeinsame Zytokin IFN γ zu erklären, dessen Ausschüttung zu einer Aktivierung von JAK1, JAK2 und STAT1 führt (Iwasaki et al., 2021). Die Co-Expression von IDO1 und den entsprechenden Chemokinen ist Teil einer IFN γ -verknüpften Reaktion und somit möglicherweise miteinander verflochten (Dangaj et al., 2019).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind detaillierte Signalwege, die die IDO1 Expression in ECs induzieren nicht gänzlich entschlüsselt. Die scRNA-seq-Daten legen nahe, dass die CXCL11-CXCR3-Achse einen reziproken Einfluss auf die eIDO1-Aktivierung haben könnte. Der spezifische Knockout von eIDO1 in murinen Endothelzellen führt zu einer signifikanten Reduktion der Kynureninsynthese (Abb. 5) und damit zu einer Aufrechterhaltung der Effektorfunktion von Tumor-infiltrierenden T-Zellen. Die Wirkung eines IDO1-KO im vaskulären Kompartiment wird jedoch durch eine tumorassoziierte Expression von IDO1 und TDO und verschiedensten Immunzellpopulationen beeinträchtigt. Mehrere öffentlich zugängliche scRNA-seq-Datensätze, die insgesamt sieben Patienten mit primärem GBM einschließen, zeigten ebenfalls eine Ko-Lokalisierung von CXCL11 und eIDO, jedoch eine eher geringe Expression von IDO1 in neoplastischen- und myeloischen Zellen, was die interindividuelle Heterogenität der IDO1-Expression im humanen GBM verdeutlicht (Darmanis et al., 2017b; Mahlokozera et al., 2021b). Limitiert werden scRNA-seq Datensätze durch ihre Unfähigkeit alle vorhandenen IDO1-Isoformen zu erfassen. Daher wäre eine Smartseq-Sequenzierung in voller Länge erforderlich, um alle potenzielle Isoformen in Zukunft identifizieren zu können, und somit eine präzisere Darstellung der eIDO-Expression zu ermöglichen (Picelli et al., 2014).

Ein weiterer Faktor, der die eIDO1 Expression beeinflussen könnte, sind die Auswirkungen einer Strahlentherapie. Studien an murinen Tumormodellen haben gezeigt, dass Bestrahlung die Rekrutierung von Immunzellen zum Tumor verstärkt (Elmadany et al., 2023). Dies könnte folglich zu einer Hochregulation immunologischer Checkpoints führen und schließlich eine verstärkte IDO1-Expression bewirken. Im Rahmen

eines *in vitro*-Versuches mit humanen, kortikalen Endothelzellen führte eine niedrig dosierte Bestrahlung zu einer signifikant verstärkten IDO1 Expression (Abb. 7). Basierend auf diesen Beobachtungen wurde in dem vorliegenden Projekt postuliert, dass ein genetischer Knockout von eIDO1 in Kombination mit Strahlentherapie und adoptivem T-Zell Transfer eine synergistische Wirkung auf die periphere T-Zell Rekrutierung erzielen könnte.

4.2 Auswirkungen von eIDO1 auf das T-Zell Kompartiment im präklinischen Modell

Zur Bestätigung der IDO1 Expression in murinen EC, erfolgte eine Visualisierung mittels RNAscope® Technologie (Abb. 6). Hierbei konnte die Expression von IDO1 im Gefäßendothel durch die Ko-Lokalisierung mit Cadherin 5 (CDH5), einem spezifischen Marker für Endothelzellen, verifiziert werden, was ebenfalls in früheren Studien sowohl im GBM als auch in anderen Tumorentitäten gezeigt werden konnte (Batista et al., 2009; Riesenberg et al., 2007).

Um die immunmodulatorische Wirkung von eIDO1 in murinen ECs weiter zu charakterisieren, wurden im nächsten Schritt konditionale eIDO1-Knockout-Mäuse in einem syngenem, orthotopen GL261-gp100-Modell eingesetzt (Abb. 8A). Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass eine lokale, hypofraktionierte Bestrahlung in Kombination mit einem adoptiven T-Zell-Transfer synergistisch wirkt, indem es die Proliferation und Effektor-Funktion der applizierten T-Zellen steigert und tumorassoziierte Antigene exponiert (Lai et al., 2019b; Weiss et al., 2018). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Mäuse entweder mit einer niedrig dosierten Strahlentherapie oder mit einer Kombination aus Bestrahlung und adoptiven T-Zell-Transfer behandelt (Abb. 8A, Abb. 10A).

Im Rahmen der alleinigen Bestrahlung von WT vs. eIDO-KO Mäusen zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Tumolvolumens oder der Gesamtanzahl der infiltrierenden T-Zellen (Abb. 8C, Abb. 9A). Der Verlust von eIDO1 hatte auch keine Auswirkungen auf die Anzahl der regulatorischen T-Zellen oder die Infiltration von CD8+ T-Zellen. Ebenso konnte in den tumor-drainierenden Lymphknoten kein Unterschied in der Immunzellrekrutierung festgestellt werden (Abb. 9B). Nach zusätzlicher Implementierung eines adoptiven T-Zell-Transfer mit Antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen (Abb. 10), zeigte sich auch hier kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl

infiltrierender T-Zellen hin zum Tumor oder dem Tumolvolumen (Abb. 10B, Abb. 11A). Zusammenfassend hatte die Ablation von eIDO1 somit keine Auswirkung auf die Rekrutierung von adoptiv übertragenen CD90.1+ CD8+ T-Zellen, wie die Bildgebung mittels IVIS (Abb. 12A) und die durchflusszytometrische Auswertung (Abb. 12B) zeigen.

Unsere Daten aus dem syngenem Maus-Gliom-Modell sprechen daher gegen eine bedeutende Rolle des tumorendothelialen IDO1 als ausschlaggebender immunsuppressiver Feedback-Mechanismus (Georganaki et al., 2020b; Kocher et al., 2021; H. Li et al., 2019b). Dies führt zu der Annahme, dass die hypofraktionierte Strahlentherapie keinen ausreichenden proinflammatorischen Auslöser induziert, um eIDO auf ein Niveau zu bringen, dass die T-Zell-Infiltration beeinflussen kann. Zudem wird der potenzielle Einfluss von eIDO1 auf das Immunzellkompartiment durch die gleichzeitig vorhandene, individuell variierende Expression von IDO1 in Tumor- und Immunzellen abgeschwächt, was die präzise Analyse seiner Funktion erschwert.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Expression von IDO1 in Gliom-assoziierten ECs bestätigen und erstmals verschiedene endotheliale Subcluster identifizieren, die mit der CXCL11-CXCR3-Achse verbunden sind. Dennoch lassen die Daten keine signifikante Auswirkung auf die Gliom-Immunität durch den Verlust von eIDO1 in Kombination mit niedrig dosierter Strahlentherapie und adoptivem T-Zell-Transfer erkennen.

4.3 Rolle von eIDO1 in der Neuroinflammation anhand des EAE-Modells

IDO1 trägt zur Suppression proinflammatorischer T-Zell Reaktionen bei, die sowohl im Kontext von malignen Hirntumoren zur Immunevasion beitragen als auch im Rahmen einer autoimmunen Neuroinflammation, wie etwa bei der MS, einer unkontrollierten T-Zell Infiltration entgegenwirken können. Das Verständnis der gemeinsamen und unterschiedlichen immunregulatorischen Wege in MS könnte dabei helfen, die Immunzellinfiltration bei Glioblastomen (GBM) besser zu verstehen und damit auch Immuntherapiestrategien zur Tumorbehandlung zu optimieren.

Um die Auswirkungen eines konditionalen Knockouts von IDO1 in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke auf den klinischen Verlauf der EAE zu eruieren, wurde die EAE

in VE-Cadherin-Cre X IDOflox-Mäusen und einer entsprechenden Kontrollgruppe induziert (Abb. 13A). Die eIDO1 Ablation hatte dabei weder einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung noch auf den inflammatorischen und demyelinisierenden Verlauf der Erkrankung, welcher anhand des EAE-Scores quantifiziert wurde (Abb. 13B und 13C)

Zudem ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der peripheren Immunzellrekrutierung feststellen (Abb. 14). Diese präklinischen Daten deuten darauf hin, dass eIDO1 keine Auswirkungen auf die Zusammensetzung der infiltrierenden CD4+ und CD8+ T-Zellen im ZNS und den sekundären lymphatischen Organen hat. Dies legt nahe, dass die Expression von IDO1 im vaskulären Kompartiment nicht ausreicht, um eine bedeutende immunregulatorische Wirkung auszuüben. Bekräftigt wird diese Vermutung durch Wetzel et al., die eine deutliche Exazerbation des Krankheitsverlaufs im EAE-Modell mit Mäusen mit einem konstitutiven KO von IDO1 zeigten (Wetzel et al., 2020).

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu anderen Studien, in denen die pharmakologische Blockade von IDO1 mit Epacadostat zu einer Verbesserung der klinischen Symptome der EAE führte (Zarzecki et al., 2020). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz ist die divergente Wirkung einer IDO1-Aktivierung. Dabei stellt es einen endogenen, immunregulierenden Mechanismus dar, um autoreaktiven Lymphozyten durch den Abbau von Tryptophan und der damit einhergehenden Einschränkung der T-Zell Proliferation entgegenzuwirken (Kwidzinski et al., 2005). Jedoch führt eine verstärkte IDO1-Induktion ebenfalls zu einem Anstieg neurotoxischer Metaboliten wie Quinolinsäure, die zur Neurodegeneration und somit zu einer Aggravation der klinischen Symptomatik führen kann (Kwidzinski & Bechmann, 2007).

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit wurde die Rolle von IDO1 im vaskulären Kompartiment von malignen Hirntumoren sowie im EAE-Modell untersucht, mit dem Ziel, neue Therapiestrategien zu entwickeln. Die Ergebnisse zeigen, dass der zelltypspezifische Knockout von eIDO1 in experimentellen Gliomen keine signifikante Veränderung der Immunzellzusammensetzung bewirkte. Ebenso hatte der Knockout im EAE-Modell weder Einfluss auf das Tumolvolumen noch auf den klinischen Verlauf der Erkrankung.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der potenzielle Einfluss von eIDO1 auf das Immunzellkompartiment durch die zugleich vorhandene Expression von IDO1 in Tumor- und Immunzellen nivelliert wird. Zusammengenommen sprechen diese Daten also gegen eine dominante Rolle von eIDO1 für die Hirntumor-Immunität und den klinischen Verlauf im EAE-Modell.

Zukünftige grundlagenwissenschaftliche Studien sind notwendig, um die Interaktionen tumor-assoziiertes Endothelzellen mit der Effektorfunktion und Zusammensetzung von Immunzellen in Glioblastomen zu entschlüsseln. Insbesondere könnten scRNA-seq-Daten aus großen Patientenkohorten hilfreich sein, um die mit dem vaskulären Kompartiment verbundenen Signalwege zu identifizieren und weiter zu erforschen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Eine große Herausforderung bei der Immuntherapie von Hirntumoren besteht darin, die Ansiedlung peripher aktivierter, adaptiver Immunzellen im Tumor zu gewährleisten und gleichzeitig ihre Effektorfunktion zu aufrechtzuerhalten. Hier spielt die Hirntumorvaskulatur zusammen mit der Blut-Hirn-Schranke (BHS) eine wichtige Rolle bei der Regulierung der T-Zell-Transmigration und -Aktivität. Die BHS, bestehend aus spezialisierten Endothelzellen und perivaskulären Zellen, bildet eine dichte anatomische und funktionelle Barriere, die die Infiltration und Effektorfunktion von peripheren Immunzellen entscheidend kontrolliert. Die vaskuläre Nische maligner Gliome ist daher ein Schlüsselkompartiment, das die immunsuppressive Mikroumgebung von malignen Hirntumoren prägt. Die Dysfunktion der BHS ist ebenfalls charakteristisch für die Pathophysiologie der Multiplen Sklerose (MS) und führt zu einer vermehrten Infiltration von Leukozyten in das ZNS-Parenchym, bedingt durch die Schädigung von Tight Junctions und die damit einhergehende erhöhte Permeabilität.

In beiden Krankheitsbildern ist der Abbau der essenziellen Aminosäure Tryptophan zu Metaboliten wie Kynurenin als entscheidender Stoffwechselweg identifiziert worden, der die Immunantwort supprimiert. Das Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase-1 (IDO1) spielt hierbei eine Schlüsselrolle, indem es den ersten und limitierenden Schritt im Tryptophankatabolismus katalysiert. Frühere Studien haben gezeigt, dass IDO1 sowohl in der Tumormikroumgebung (TMU) von hochgradigen Gliomen exprimiert wird als auch einen immunmodulatorischen Effekt im klinischen Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS, hat. Im Kontext von malignen Hirntumoren trägt IDO1 zur Suppression proinflammatorischer T-Zell-Reaktionen bei und fördert so die tumorinduzierte Immunevasion. In der MS hingegen wirkt es einer unkontrollierten T-Zell-Infiltration entgegen. Während viele Studien die Rolle von IDO1 im Zusammenhang mit Gliomzellen und verschiedenen Immunzellpopulationen untersucht haben, bleibt die Funktion von IDO1 im vaskulären Kompartiment und dessen Beitrag zur immunsuppressiven TMU weitgehend unklar.

Diese Arbeit soll einen Beitrag zur Klärung der Funktionalität von IDO1 im vaskulären Kompartiment von malignen Hirntumoren sowie im EAE-Modell leisten, mit dem Ziel neue Therapiestrategien zu entwickeln. Dabei wurden die Auswirkungen eines eIDO1-

Mangels zum einen in Kombination mit einem adoptiven T-Zell Transfer und niedrig dosierten Strahlentherapie auf das lokale T-Zell-Kompartiment in einem syngenem, orthotopem Mausmodell untersucht und zum anderen auf den klinischen Verlauf sowie die Immunzellzusammensetzung im EAE-Modell analysiert. Die Analyse von scRNA-seq-Daten zeigte, dass IDO1 in humanen Gliomgewebe überwiegend von Endothelzellen exprimiert wird, die eine mit dem JAK/STAT-Signalweg verbundene CXCL11+-Genexpressionssignatur aufweisen. Zudem führte eine niedrig dosierte Tumorbestrahlung zu einer Induktion von IDO1 in humanen kortikalen Endothelzellen.

Der zelltypspezifische Knockout von eIDO1 in experimentellen Gliomen führte jedoch weder zu einer signifikanten Veränderung der Immunzellzusammensetzung noch zu einem Einfluss auf das Tumolvolumen oder den klinischen Verlauf. Auch im EAE-Modell zeigte die eIDO1 Ablation weder einen signifikanten Einfluss auf die Gewichtsentwicklung noch auf den klinischen Verlauf der Erkrankung. Die Vermutung liegt nahe, dass der potenzielle Einfluss von eIDO1 auf das Immunzellkompartiment durch die gleichzeitige Expression von IDO1 in Tumor- und Immunzellen nivelliert wird. Zusammengefasst sprechen diese Daten also gegen eine dominante Rolle von eIDO1 für die Hirntumor-Immunität und den klinischen Verlauf im EAE-Modell.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aeinehband, S., Brenner, P., Ståhl, S., Bhat, M., Fidock, M. D., Khademi, M., Olsson, T., Engberg, G., Jokinen, J., Erhardt, S., & Piehl, F. (2016). Cerebrospinal fluid kynurenines in multiple sclerosis; relation to disease course and neurocognitive symptoms. *Brain, Behavior, and Immunity*, *51*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.07.016>
- Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P., & Iruela-Arispe, M. L. (2006). VE-cadherin-cre-recombinase transgenic mouse: A tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Developmental Dynamics*, *235*(3), 759–767. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20643>
- Alvarez, J. I., Cayrol, R., & Prat, A. (2011). Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1812*(2), 252–264. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2010.06.017>
- Badie, B., Schartner, J., Prabakaran, S., Paul, J., & Vorpahl, J. (2001). Expression of Fas ligand by microglia: possible role in glioma immune evasion. *Journal of Neuroimmunology*, *120*(1–2), 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(01\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(01)00361-7)
- Baker, D. E. (2007). Natalizumab: overview of its pharmacology and safety. *Reviews in Gastroenterological Disorders*, *7*(1), 38–46. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17392628/>
- Ball, H. J., Yuasa, H. J., Austin, C. J. D., Weiser, S., & Hunt, N. H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(3), 467–471. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2008.01.005>
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood–brain barrier: an overview: Structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, *16*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2003.12.016>
- Batista, C. E. A., Juhász, C., Muzik, O., Kupsky, W. J., Barger, G., Chugani, H. T., Mittal, S., Sood, S., Chakraborty, P. K., & Chugani, D. C. (2009). Imaging correlates of differential expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human brain tumors. *Molecular Imaging and Biology*, *11*(6), 460–466. <https://doi.org/10.1007/S11307-009-0225-0>
- Belk, J. A., Daniel, B., & Satpathy, A. T. (2022). Epigenetic regulation of T cell exhaustion. *Nature Immunology* *2022* *23*:6, *23*(6), 848–860. <https://doi.org/10.1038/s41590-022-01224-z>
- Ben-Shoshan, J., Maysel-Auslender, S., Mor, A., Keren, G., & George, J. (2008). Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *European Journal of Immunology*, *38*(9), 2412–2418. <https://doi.org/10.1002/EJI.200838318>

- Bergman, R. K., Munoz, J. J., & Portis, J. L. (1978). Vascular permeability changes in the central nervous system of rats with hyperacute experimental allergic encephalomyelitis induced with the aid of a substance from *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, *21*(2), 627–637. <https://doi.org/10.1128/iai.21.2.627-637.1978>
- Besser, M. J., Schallmach, E., Oved, K., Treves, A. J., Markel, G., Reiter, Y., & Schachter, J. (2009). Modifying interleukin-2 concentrations during culture improves function of T cells for adoptive immunotherapy. *Cytotherapy*, *11*(2), 206–217. <https://doi.org/10.1080/14653240802590391>
- Beutelspacher, S. C., Tan, P. H., McClure, M. O., Larkin, D. F. P., Lechler, R. I., & George, A. J. T. (2006). Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) by Endothelial Cells: Implications for the Control of Alloresponses. *American Journal of Transplantation*, *6*(6), 1320–1330. <https://doi.org/10.1111/J.1600-6143.2006.01324.X>
- Blanchette, M., & Daneman, R. (2015). Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development*, *138 Pt 1*, 8–16. <https://doi.org/10.1016/J.MOD.2015.07.007>
- Bowman, R. L., Klemm, F., Akkari, L., Pyonteck, S. M., Sevenich, L., Quail, D. F., Dhara, S., Simpson, K., Gardner, E. E., Iacobuzio-Donahue, C. A., Brennan, C. W., Tabar, V., Gutin, P. H., & Joyce, J. A. (2016). Macrophage Ontogeny Underlies Differences in Tumor-Specific Education in Brain Malignancies. *Cell Reports*, *17*(9), 2445–2459. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2016.10.052>
- Boyiadzis, M. M., Kirkwood, J. M., Marshall, J. L., Pritchard, C. C., Azad, N. S., & Gulley, J. L. (2018). Significance and implications of FDA approval of pembrolizumab for biomarker-defined disease. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *6*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/S40425-018-0342-X>
- Brown, C. E., Badie, B., Barish, M. E., Weng, L., Ostberg, J. R., Chang, W. C., Naranjo, A., Starr, R., Wagner, J., Wright, C., Zhai, Y., Bading, J. R., Ressler, J. A., Portnow, J., D'Apuzzo, M., Forman, S. J., & Jensen, M. C. (2015). Bioactivity and Safety of IL13R α 2-Redirected Chimeric Antigen Receptor CD8+ T Cells in Patients with Recurrent Glioblastoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(18), 4062–4072. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0428>
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., Amigorena, S., van'tVeer, L. J., Sperling, A. I., Wolf, D. M., & Krummel, M. F. (2014). Dissecting the tumor myeloid compartment reveals rare activating antigen-presenting cells critical for T cell immunity. *Cancer Cell*, *26*(5), 638–652. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2014.09.007>
- Burkin, D. J., Kimbro, K. S., Barr, B. L., Jones, C., Taylor, M. W., & Gupta, S. L. (1993). Localization of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase (IDO) Gene to the Pericentromeric Region of Human Chromosome 8. *Genomics*, *17*(1), 262–263. <https://doi.org/10.1006/GENO.1993.1319>

- Calatuzzolo, C., Canazza, A., Pollo, B., Di Pierro, E., Ciusani, E., Maderna, E., Salce, E., Sponza, V., Frigerio, S., Di Meo, F., Schinelli, S., & Salmaggi, A. (2011). Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. *Cancer Biology & Therapy*, 11(2), 242–253. <https://doi.org/10.4161/CBT.11.2.13951>
- Cencioni, M. T., Mattoscio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A., & Muraro, P. A. (2021). B cells in multiple sclerosis — from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nature Reviews Neurology* 2021 17:7, 17(7), 399–414. <https://doi.org/10.1038/s41582-021-00498-5>
- Chen, Z., Feng, X., Herting, C. J., Garcia, V. A., Nie, K., Pong, W. W., Rasmussen, R., Dwivedi, B., Seby, S., Wolf, S. A., Gutmann, D. H., & Hambardzumyan, D. (2017). Cellular and Molecular Identity of Tumor-Associated Macrophages in Glioblastoma. *Cancer Research*, 77(9), 2266–2278. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2310>
- Chevolet, I., Speeckaert, R., Schreuer, M., Neyns, B., Krysko, O., Bachert, C., Hennart, B., Allorge, D., van Geel, N., van Gele, M., & Brochez, L. (2015). Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. *Oncoimmunology*, 4(3), 1–8. <https://doi.org/10.4161/2162402X.2014.982382>
- Choi, B. D., Gerstner, E. R., Frigault, M. J., Leick, M. B., Mount, C. W., Balaj, L., Niki-forow, S., Carter, B. S., Curry, W. T., Gallagher, K., & Maus, M. V. (2024). Intraventricular CARv3-TEAM-E T Cells in Recurrent Glioblastoma. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2314390>
- Choi, B. D., Maus, M. V., June, C. H., & Sampson, J. H. (2019). Immunotherapy for Glioblastoma: Adoptive T-cell Strategies. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 25(7), 2042–2048. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1625>
- Choi, B. D., Suryadevara, C. M., Gedeon, P. C., Herndon, J. E., Sanchez-Perez, L., Bigner, D. D., & Sampson, J. H. (2014). Intracerebral delivery of a third generation EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor is efficacious against human glioma. *Journal of Clinical Neuroscience: Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 21(1), 189–190. <https://doi.org/10.1016/J.JOCN.2013.03.012>
- Cloughesy, T. F., Mochizuki, A. Y., Orpilla, J. R., Hugo, W., Lee, A. H., Davidson, T. B., Wang, A. C., Ellingson, B. M., Rytlewski, J. A., Sanders, C. M., Kawaguchi, E. S., Du, L., Li, G., Yong, W. H., Gaffey, S. C., Cohen, A. L., Mellinghoff, I. K., Lee, E. Q., Reardon, D. A., ... Prins, R. M. (2019). Neoadjuvant anti-PD-1 immunotherapy promotes a survival benefit with intratumoral and systemic immune responses in recurrent glioblastoma. *Nature Medicine* 2019 25:3, 25(3), 477–486. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0337-7>
- Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G., & Neote, K. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity

- binding to CXCR3. *The Journal of Experimental Medicine*, 187(12), 2009–2021. <https://doi.org/10.1084/JEM.187.12.2009>
- Colwell, N., Larion, M., Giles, A. J., Seldomridge, A. N., Sizdahkhani, S., Gilbert, M. R., & Park, D. M. (2017). Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro-Oncology*, 19(7), 887–896. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOW258>
- Cui, G., Li, C., Xu, G., Sun, Z., Zhu, L., Li, Z., Zheng, W., Li, J., & Yuan, A. (2018). Tumor-Associated Fibroblasts and Microvessels Contribute to the Expression of Immunosuppressive Factor Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Human Esophageal Cancers. *Pathology Oncology Research: POR*, 24(2), 269–275. <https://doi.org/10.1007/S12253-017-0244-0>
- da Fonseca, A. C. C., Matias, D., Garcia, C., Amaral, R., Geraldo, L. H., Freitas, C., & Lima, F. R. S. (2014). The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2014.00362>
- Dangaj, D., Bruand, M., Grimm, A. J., Ronet, C., Barras, D., Duttagupta, P. A., Lanitis, E., Duraiswamy, J., Tanyi, J. L., Benencia, F., Conejo-Garcia, J., Ramay, H. R., Montone, K. T., Powell, D. J., Gimotty, P. A., Facciabene, A., Jackson, D. G., Weber, J. S., Rodig, S. J., ... Coukos, G. (2019). Cooperation between Constitutive and Inducible Chemokines Enables T Cell Engraftment and Immune Attack in Solid Tumors. *Cancer Cell*, 35(6), 885–900.e10. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2019.05.004>
- Darmanis, S., Sloan, S. A., Croote, D., Mignardi, M., Chernikova, S., Samghababi, P., Zhang, Y., Neff, N., Kowarsky, M., Caneda, C., Li, G., Chang, S. D., Connolly, I. D., Li, Y., Barres, B. A., Gephart, M. H., & Quake, S. R. (2017a). Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell Reports*, 21(5), 1399–1410. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.030>
- Darmanis, S., Sloan, S. A., Croote, D., Mignardi, M., Chernikova, S., Samghababi, P., Zhang, Y., Neff, N., Kowarsky, M., Caneda, C., Li, G., Chang, S. D., Connolly, I. D., Li, Y., Barres, B. A., Gephart, M. H., & Quake, S. R. (2017b). Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell Reports*, 21(5), 1399–1410. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.030>
- Dhermain, F. G., Hau, P., Lanfermann, H., Jacobs, A. H., & van den Bent, M. J. (2010). Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas. *The Lancet Neurology*, 9(9), 906–920. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70181-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70181-2)
- Elmadany, N., Michel, J., Sonner, J., Ovchinnikova, S., Sanghvi, K., Bernhardt, I., Zhang, X.-W., Jähne, K., Sati, A., Anders, S., Breckwoldt, M., Platten, M., & Sahm, K. (2023). 861 Fractionated irradiation activates glioma immune microenvironment and boosts antigen-specific T cell response in experimental gliomas. *Journal*

- for *ImmunoTherapy of Cancer*, 11(Suppl 1), A960–A960.
<https://doi.org/10.1136/JITC-2023-SITC2023.0861>
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2006). The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(11), 6752–6761. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.176.11.6752>
- Fillmore, P. D., Brace, M., Troutman, S. A., Blankenhorn, E. P., Diehl, S., Rincon, M., & Teuscher, C. (2003). Genetic analysis of the influence of neuroantigen-complete Freund's adjuvant emulsion structures on the sexual dimorphism and susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis. *American Journal of Pathology*, 163(4), 1623–1632. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63519-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63519-5)
- Flanagan, E. M., Erickson, J. B., Viveros, O. H., Chang, S. Y., & Reinhard, J. F. (1995). Neurotoxin Quinolinic Acid Is Selectively Elevated in Spinal Cords of Rats with Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, 64(3), 1192–1196. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64031192.x>
- Freedman, M. S., Devonshire, V., Duquette, P., Giacomini, P. S., Giuliani, F., Levin, M. C., Montalban, X., Morrow, S. A., Oh, J., Rotstein, D., & Yeh, E. A. (2020). Treatment Optimization in Multiple Sclerosis: Canadian MS Working Group Recommendations. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 47(4), 437–455. <https://doi.org/10.1017/CJN.2020.66>
- Freund, J., Stern, E. R., & Pisani, T. M. (1947). Isoallergic Encephalomyelitis and Radiculitis in Guinea Pigs After One Injection of Brain and Mycobacteria in Water-in-Oil Emulsion. *The Journal of Immunology*, 57(2), 179–194. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.57.2.179>
- Friedrich, M., Hahn, M., Michel, J., Sankowski, R., Kilian, M., Kehl, N., Günter, M., Bunse, T., Pusch, S., Von Deimling, A., Wick, W., Autenrieth, S. E., Prinz, M., Platten, M., & Bunse, L. (2023). Dysfunctional dendritic cells limit antigen-specific T cell response in glioma. *Neuro-Oncology*, 25(2), 263–276. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAC138>
- Friese, M. A., & Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 66(2), 132–141. <https://doi.org/10.1002/ANA.21744>
- Fruento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., & Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), 459–468. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020121>
- Fujiwara, M., Shibata, M., Watanabe, Y., Nukiwa, T., Hirata, F., Mizuno, N., & Hayaishi, O. (1978). Indoleamine 2,3-dioxygenase. Formation of L-kynurenine from L-tryptophan in cultured rabbit pineal gland. *Journal of Biological Chemistry*, 253(17), 6081–6085. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)34582-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34582-9)

- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature Immunology* 2013 14:10, 14(10), 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/ni.2703>
- Georganaki, M., Ramachandran, M., Tuit, S., Núñez, N. G., Karampatzakis, A., Fotaki, G., van Hooren, L., Huang, H., Lugano, R., Ulas, T., Kaunisto, A., Holland, E. C., Ellmark, P., Mangsbo, S. M., Schultze, J., Essand, M., Tugues, S., & Dimberg, A. (2020a). Tumor endothelial cell up-regulation of IDO1 is an immunosuppressive feed-back mechanism that reduces the response to CD40-stimulating immunotherapy. *OncolImmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1730538>
- Georganaki, M., Ramachandran, M., Tuit, S., Núñez, N. G., Karampatzakis, A., Fotaki, G., van Hooren, L., Huang, H., Lugano, R., Ulas, T., Kaunisto, A., Holland, E. C., Ellmark, P., Mangsbo, S. M., Schultze, J., Essand, M., Tugues, S., & Dimberg, A. (2020b). Tumor endothelial cell up-regulation of IDO1 is an immunosuppressive feed-back mechanism that reduces the response to CD40-stimulating immunotherapy. *Oncoimmunology*, 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1730538>
- Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K. D., Stupp, R., Hegi, M. E., Jaeckle, K. A., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Won, M., Blumenthal, D. T., Mahajan, A., Schultz, C. J., Erridge, S., Baumert, B., Hopkins, K. I., Tzuk-Shina, T., Brown, P. D., Chakravarti, A., Curran, W. J., & Mehta, M. P. (2013). Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: A randomized phase III clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 4085–4091. https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.6968/SUPPL_FILE/PROTOCOL_JCO.2013.49.6968.PDF
- Gold, R., Linington, C., & Lassmann, H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 Years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain*, 129(8), 1953–1971. <https://doi.org/10.1093/brain/awl075>
- Goodkin, D. E., Rooney, W. D., Sloan, R., Bacchetti, P., Gee, L., Vermathen, M., Waubant, E., Abundo, M., Majumdar, S., Nelson, S., & Weiner, M. W. (1998). A serial study of new MS lesions and the white matter from which they arise. *Neurology*, 51(6), 1689–1697. <https://doi.org/10.1212/WNL.51.6.1689>
- Graeber, M. B., Scheithauer, B. W., & Kreutzberg, G. W. (2002). Microglia in brain tumors. *GLIA*, 40(2), 252–259. <https://doi.org/10.1002/GLIA.10147>
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology*, 3(11), 1097–1101. <https://doi.org/10.1038/NI846>
- Guillemin, G. J. (2012). Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS Journal*, 279(8), 1356–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08485.x>
- Günther, J., Däbritz, J., & Wirthgen, E. (2019). Limitations and Off-Target Effects of Tryptophan-Related IDO Inhibitors in Cancer Treatment. *Frontiers in Immunology*, 10(July), 1801. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01801>

- Hambardzumyan, D., Gutmann, D. H., & Kettenmann, H. (2015). The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nature Neuroscience* 2016 19:1, 19(1), 20–27. <https://doi.org/10.1038/nn.4185>
- Hanada, K. I., Yu, Z., Chappell, G. R., Park, A. S., & Restifo, N. P. (2019). An effective mouse model for adoptive cancer immunotherapy targeting neoantigens. *JCI Insight*, 4(10), 1–11. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.124405>
- Hauser, S. L., Kappos, L., Arnold, D. L., Bar-Or, A., Brochet, B., Naismith, R. T., Traboulsee, A., Wolinsky, J. S., Belachew, S., Koendgen, H., Levesque, V., Manfrini, M., Model, F., Hubeaux, S., Mehta, L., & Montalban, X. (2020). Five years of ocrelizumab in relapsing multiple sclerosis: OPERA studies open-label extension. *Neurology*, 95(13), E1854–E1867. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010376>
- Herrera, F. G., Ronet, C., de Olza, M. O., Barras, D., Crespo, I., Andreatta, M., Corria-Osorio, J., Spill, A., Benedetti, F., Genolet, R., Orcurto, A., Imbimbo, M., Ghisoni, E., Rodrigo, B. N., Berthold, D. R., Sarivalasis, A., Zaman, K., Duran, R., Dromain, C., ... Coukos, G. (2022). Low-Dose Radiotherapy Reverses Tumor Immune Desertification and Resistance to Immunotherapy. *Cancer Discovery*, 12(1), 108–133. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-0003>
- Hubbard, T. D., Murray, I. A., & Perdew, G. H. (2015). Indole and Tryptophan Metabolism: Endogenous and Dietary Routes to Ah Receptor Activation. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(10), 1522–1535. <https://doi.org/10.1124/DMD.115.064246>
- Hussain, S. F., Yang, D., Suki, D., Aldape, K., Grimm, E., & Heimberger, A. B. (2006). The role of human glioma-infiltrating microglia/macrophages in mediating anti-tumor immune responses. *Neuro-Oncology*, 8(3), 261–279. <https://doi.org/10.1215/15228517-2006-008>
- Iwasaki, T., Kohashi, K., Toda, Y., Ishihara, S., Yamada, Y., & Oda, Y. (2021). Association of PD-L1 and IDO1 expression with JAK–STAT pathway activation in soft-tissue leiomyosarcoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 147(5), 1451–1463. <https://doi.org/10.1007/S00432-020-03390-9/TABLES/2>
- Jain, R. K., Di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G., & Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature Reviews Neuroscience* 2007 8:8, 8(8), 610–622. <https://doi.org/10.1038/nrn2175>
- Jakimovski, D., Bittner, S., Zivadinov, R., Morrow, S. A., Benedict, R. H., Zipp, F., & Weinstock-Guttman, B. (2024). Multiple sclerosis. In *The Lancet* (Vol. 403, Issue 10422, pp. 183–202). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01473-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01473-3)
- Jaronen, M., & Quintana, F. J. (2014). Immunological relevance of the coevolution of IDO1 and AHR. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 118423. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00521/BIBTEX>

- Jones, D. E., & Goldman, M. D. (2014). Alemtuzumab for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a review of its clinical pharmacology, efficacy and safety. *Expert Review of Clinical Immunology*, *10*(10), 1281–1291. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.951332>
- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research* *2020* *8*:1, *8*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S40364-020-00228-X>
- Jung, J. E., Lee, H., Cho, I., Chung, D. H., Yoon, S., Yang, Y. M., Lee, J. W., Choi, S., Park, J., Ye, S., & Chung, M. (2005). STAT3 is a potential modulator of HIF-1-mediated VEGF expression in human renal carcinoma cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(10), 1296–1298. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-3099FJE>
- KABAT, E. A., WOLF, A., & BEZER, A. E. (1948). Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *The Journal of Experimental Medicine*, *88*(4), 417–426. <https://doi.org/10.1084/jem.88.4.417>
- Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J. I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., & Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon- γ -expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *66*(3), 390–402. <https://doi.org/10.1002/ANA.21748>
- Kesarwani, P., Prabhu, A., Kant, S., Kumar, P., Graham, S. F., Buelow, K. L., Wilson, G. D., Miller, C. R., & Chinnaiyan, P. (2018). Tryptophan metabolism contributes to radiation-induced immune checkpoint reactivation in glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, *24*(15), 3632–3643. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-0041>
- Khan, O., Rieckmann, P., Boyko, A., Selmaj, K., & Zivadinov, R. (2013). Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *73*(6), 705–713. <https://doi.org/10.1002/ANA.23938>
- Kirk, J., Plumb, J., Mirakhur, M., & McQuaid, S. (2003). Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *The Journal of Pathology*, *201*(2), 319–327. <https://doi.org/10.1002/PATH.1434>
- Kocher, F., Amann, A., Zimmer, K., Geisler, S., Fuchs, D., Pichler, R., Wolf, D., Kurz, K., Seeber, A., & Pircher, A. (2021). High indoleamine-2,3-dioxygenase 1 (IDO) activity is linked to primary resistance to immunotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Translational Lung Cancer Research*, *10*(1), 304–313. <https://doi.org/10.21037/TLCR-20-380>
- Kunkl, M., Amormino, C., Tedeschi, V., Fiorillo, M. T., & Tuosto, L. (2022). Astrocytes and Inflammatory T Helper Cells: A Dangerous Liaison in Multiple Sclerosis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.824411>

- Kwidzinski, E., & Bechmann, I. (2007). IDO expression in the brain: a double-edged sword. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, *85*(12), 1351–1359. <https://doi.org/10.1007/S00109-007-0229-7>
- Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R., & Bechmann, I. (2005). Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(10), 1347–1349. <https://doi.org/10.1096/FJ.04-3228FJE>
- Labadie, B. W., Bao, R., & Luke, J. J. (2019). Reimagining IDO pathway inhibition in cancer immunotherapy via downstream focus on the tryptophan–kynurenine–aryl hydrocarbon axis. *Clinical Cancer Research*, *25*(5), 1462–1471. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2882>
- Ladomersky, E., Zhai, L., Lenzen, A., Lauing, K. L., Qian, J., Scholtens, D. M., Gritsina, G., Sun, X., Liu, Y., Yu, F., Gong, W., Liu, Y., Jiang, B., Tang, T., Patel, R., Platanias, L. C., David James, C., Stupp, R., Lukas, R. V., ... Wainwright, D. A. (2018). IDO1 inhibition synergizes with radiation and PD-1 blockade to durably increase survival against advanced glioblastoma. *Clinical Cancer Research*, *24*(11), 2559–2573. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3573>
- Lai, J. Z., Zhu, Y. Y., Ruan, M., Chen, L., & Zhang, Q. Y. (2019a). Local Irradiation Sensitized Tumors to Adoptive T Cell Therapy via Enhancing the Cross-Priming, Homing, and Cytotoxicity of Antigen-Specific CD8 T Cells. *Frontiers in Immunology*, *10*, 2857. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02857/FULL>
- Lai, J. Z., Zhu, Y. Y., Ruan, M., Chen, L., & Zhang, Q. Y. (2019b). Local Irradiation Sensitized Tumors to Adoptive T Cell Therapy via Enhancing the Cross-Priming, Homing, and Cytotoxicity of Antigen-Specific CD8 T Cells. *Frontiers in Immunology*, *10*. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02857>
- Lanz, T. V., Opitz, C. A., Ho, P. P., Agrawal, A., Lutz, C., Weller, M., Mellor, A. L., Steinman, L., Wick, W., & Platten, M. (2010). Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). *Stem Cells and Development*, *19*(5), 657–668. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0385>
- Larochelle, C., Alvarez, J. I., & Prat, A. (2011). How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? In *FEBS Letters* (Vol. 585, Issue 23, pp. 3770–3780). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066>
- Le Floc'h, N., Otten, W., & Merlot, E. (2011). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*, *41*(5), 1195–1205. <https://doi.org/10.1007/S00726-010-0752-7>
- Lee, G. K., Park, H. J., MacLeod, M., Chandler, P., Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2002). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*, *107*(4), 452–460. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2567.2002.01526.X>

- Li, H., Bullock, K., Gurjao, C., Braun, D., Shukla, S. A., Bossé, D., Lalani, A. K. A., Gopal, S., Jin, C., Horak, C., Wind-Rotolo, M., Signoretti, S., McDermott, D. F., Freeman, G. J., Van Allen, E. M., Schreiber, S. L., Stephen Hodi, F., Sellers, W. R., Garraway, L. A., ... Giannakis, M. (2019a). Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade. *Nature Communications*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-019-12361-9>
- Li, H., Bullock, K., Gurjao, C., Braun, D., Shukla, S. A., Bossé, D., Lalani, A. K. A., Gopal, S., Jin, C., Horak, C., Wind-Rotolo, M., Signoretti, S., McDermott, D. F., Freeman, G. J., Van Allen, E. M., Schreiber, S. L., Stephen Hodi, F., Sellers, W. R., Garraway, L. A., ... Giannakis, M. (2019b). Metabolomic adaptations and correlates of survival to immune checkpoint blockade. *Nature Communications* *2019* *10*:1, *10*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12361-9>
- Li, M., Bolduc, A. R., Hoda, M. N., Gamble, D. N., Dolisca, S. B., Bolduc, A. K., Hoang, K., Ashley, C., McCall, D., Rojiani, A. M., Maria, B. L., Rixe, O., MacDonald, T. J., Heeger, P. S., Mellor, A. L., Munn, D. H., & Johnson, T. S. (2014). The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway controls complement-dependent enhancement of chemo-radiation therapy against murine glioblastoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *2*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/2051-1426-2-21>
- Li, S., Bostick, J. W., & Zhou, L. (2018). Regulation of innate lymphoid cells by aryl hydrocarbon receptor. *Frontiers in Immunology*, *8*(JAN), 311218. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01909/BIBTEX>
- Liau, L. M., Ashkan, K., Brem, S., Campian, J. L., Trusheim, J. E., Iwamoto, F. M., Tran, D. D., Ansstas, G., Cobbs, C. S., Heth, J. A., Salacz, M. E., D'Andre, S., Aiken, R. D., Moshel, Y. A., Nam, J. Y., Pillainayagam, C. P., Wagner, S. A., Walter, K. A., Chaudhary, R., ... Bosch, M. L. (2023). Association of Autologous Tumor Lysate-Loaded Dendritic Cell Vaccination With Extension of Survival Among Patients With Newly Diagnosed and Recurrent Glioblastoma: A Phase 3 Prospective Externally Controlled Cohort Trial. *JAMA Oncology*, *9*(1), 112. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2022.5370>
- Lo, B. K. K., Jalili, R. B., Zloty, D., Ghahary, A., Cowan, B., Dutz, J. P., Carr, N., Shapiro, J., & McElwee, K. J. (2011). CXCR3 ligands promote expression of functional indoleamine 2,3-dioxygenase in basal cell carcinoma keratinocytes. *British Journal of Dermatology*, *165*(5), 1030–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2011.10489.x>
- Long, G. V., Dummer, R., Hamid, O., Gajewski, T. F., Caglevic, C., Dalle, S., Arance, A., Carlino, M. S., Grob, J. J., Kim, T. M., Demidov, L., Robert, C., Larkin, J., Anderson, J. R., Maleski, J., Jones, M., Diede, S. J., & Mitchell, T. C. (2019). Epcadostat plus pembrolizumab versus placebo plus pembrolizumab in patients with unresectable or metastatic melanoma (ECHO-301/KEYNOTE-252): a phase 3, randomised, double-blind study. *The Lancet. Oncology*, *20*(8), 1083–1097. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30274-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30274-8)
- Lovelace, M. D., Varney, B., Sundaram, G., Franco, N. F., Ng, M. L., Pai, S., Lim, C. K., Guillemin, G. J., & Brew, B. J. (2016). Current evidence for a role of the

- kynurenine pathway of tryptophan metabolism in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology*, 7(AUG), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00246>
- Lyck, R., Lécuyer, M. A., Abadier, M., Wyss, C. B., Matti, C., Rosito, M., Enzmann, G., Zeis, T., Michel, L., García Martín, A. B., Sallusto, F., Gosselet, F., Deutsch, U., Weiner, J. A., Schaeren-Wiemers, N., Prat, A., & Engelhardt, B. (2017). ALCAM (CD166) is involved in extravasation of monocytes rather than T cells across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(8), 2894–2909. <https://doi.org/10.1177/0271678X16678639>
- Mahlokozera, T., Patel, B., Chen, H., Desouza, P., Qu, X., Mao, D. D., Hafez, D., Yang, W., Taiwo, R., Paturu, M., Salehi, A., Gujar, A. D., Dunn, G. P., Mosammamarast, N., Petti, A. A., Yano, H., & Kim, A. H. (2021a). Competitive binding of E3 ligases TRIM26 and WWP2 controls SOX2 in glioblastoma. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26653-6>
- Mahlokozera, T., Patel, B., Chen, H., Desouza, P., Qu, X., Mao, D. D., Hafez, D., Yang, W., Taiwo, R., Paturu, M., Salehi, A., Gujar, A. D., Dunn, G. P., Mosammamarast, N., Petti, A. A., Yano, H., & Kim, A. H. (2021b). Competitive binding of E3 ligases TRIM26 and WWP2 controls SOX2 in glioblastoma. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26653-6>
- McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S., & Wherry, E. J. (2015a). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Immunol-041015-055318>, 37, 457–495. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055318>
- McLane, L. M., Abdel-Hakeem, M. S., & Wherry, E. J. (2015b). CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Immunol-041015-055318>, 37, 457–495. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-041015-055318>
- McMahon, E. J., Bailey, S. L., & Miller, S. D. (2006). CNS dendritic cells: Critical participants in CNS inflammation? *Neurochemistry International*, 49(2), 195–203. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2006.04.004>
- Meireson, A., Chevolet, I., Hulstaert, E., Ferdinande, L., Ost, P., Geboes, K., De Man, M., Van de Putte, D., Verset, L., Kruse, V., Demetter, P., & Brochez, L. (2018). Peritumoral endothelial indoleamine 2, 3-dioxygenase expression is an early independent marker of disease relapse in colorectal cancer and is influenced by DNA mismatch repair profile. *Oncotarget*, 9(38), 25216–25224. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.25393>
- Meireson, A., Devos, M., & Brochez, L. (2020). IDO Expression in Cancer: Different Compartment, Different Functionality? In *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.531491>
- Mellor, A. L., Lemos, H., & Huang, L. (2017). Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Tolerance: Where Are We Now? *Frontiers in Immunology*, 8(OCT), 27. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2017.01360>

- Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., & Bradfield, C. A. (2010). An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *185*(6), 3190–3198. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0903670>
- Mitra, A., Barua, A., Huang, L., Ganguly, S., Feng, Q., & He, B. (2023). From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Frontiers in Immunology*, *14*, 1188049. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1188049/BIBTEX>
- Mitsuka, K., Kawataki, T., Satoh, E., Asahara, T., Horikoshi, T., & Kinouchi, H. (2013). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and correlation with pathological malignancy in gliomas. *Neurosurgery*, *72*(6), 1031–1038. <https://doi.org/10.1227/NEU.0b013e31828cf945>
- Mondal, A., Smith, C., DuHadaway, J. B., Sutanto-Ward, E., Prendergast, G. C., Bravo-Nuevo, A., & Muller, A. J. (2016). IDO1 is an Integral Mediator of Inflammatory Neovascularization. *EBioMedicine*, *14*, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.11.013>
- Montalban, X., Gold, R., Thompson, A. J., Otero-Romero, S., Amato, M. P., Chandraratna, D., Clanet, M., Comi, G., Derfuss, T., Fazekas, F., Hartung, H. P., Havrdova, E., Hemmer, B., Kappos, L., Liblau, R., Lubetzki, C., Marcus, E., Miller, D. H., Olsson, T., ... Zipp, F. (2018).ECTRIMS/EAN Guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *24*(2), 96–120. <https://doi.org/10.1177/1352458517751049>
- Moon, J. J., Chu, H. H., Hataye, J., Pagán, A. J., Pepper, M., McLachlan, J. B., Zell, T., & Jenkins, M. K. (2009). Tracking epitope-specific T cells. *Nature Protocols*, *4*(4), 565–581. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.9>
- Müller, S., Di Lullo, E., Bhaduri, A., Alvarado, B., Yagnik, G., Kohanbash, G., Aghi, M., & Diaz, A. (2018). A single-cell atlas of human glioblastoma reveals a single axis of phenotype in tumor-propagating cells. *BioRxiv*, 377606. <https://doi.org/10.1101/377606>
- Munn, D. H., & Mellor, A. L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. In *Trends in Immunology* (Vol. 37, Issue 3, pp. 193–207). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.002>
- Nehama, D., Di Ianni, N., Musio, S., Du, H., Patané, M., Pollo, B., Finocchiaro, G., Park, J. J. H., Dunn, D. E., Edwards, D. S., Damrauer, J. S., Hudson, H., Floyd, S. R., Ferrone, S., Savoldo, B., Pellegatta, S., & Dotti, G. (2019). B7-H3-redirected chimeric antigen receptor T cells target glioblastoma and neurospheres. *EBioMedicine*, *47*, 33–43. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.08.030>
- NEWMAN, P. J. (1994). The Role of PECAM-1 in Vascular Cell Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *714*(1), 165–174. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb12041.x>
- Nicholas, J. A., Racke, M. K., Imitola, J., & Boster, A. L. (2014). First-line natalizumab in multiple sclerosis: rationale, patient selection, benefits and risks. *Therapeutic*

- Advances in Chronic Disease*, 5(2), 62–68.
<https://doi.org/10.1177/2040622313514790>
- O. Watzlawik, J., Wootla, B., & Rodriguez, M. (2015). Tryptophan Catabolites and Their Impact on Multiple Sclerosis Progression. *Current Pharmaceutical Design*, 22(8), 1049–1059. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151215095940>
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., Von Deimling, A., Wick, W., & Platten, M. (2011a). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>
- Opitz, C. A., Litzenburger, U. M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., Jugold, M., Guillemin, G. J., Miller, C. L., Lutz, C., Radlwimmer, B., Lehmann, I., Von Deimling, A., Wick, W., & Platten, M. (2011b). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), 197–203. <https://doi.org/10.1038/nature10491>
- Opitz, C. A., Wick, W., Steinman, L., & Platten, M. (2007). Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(19–20), 2542–2563. <https://doi.org/10.1007/S00018-007-7140-9>
- Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology*, 21(Suppl 5), V1–V100. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOZ150>
- Owe-Young, R., Webster, N. L., Mukhtar, M., Pomerantz, R. J., Smythe, G., Walker, D., Armati, P. J., Crowe, S. M., & Brew, B. J. (2008). Kynurenine pathway metabolism in human blood-brain-barrier cells: Implications for immune tolerance & neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 105(4), 1346–1357. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05241.x>
- Patel, A. P., Tirosh, I., Trombetta, J. J., Shalek, A. K., Gillespie, S. M., Wakimoto, H., Cahill, D. P., Nahed, B. V., Curry, W. T., Martuza, R. L., Louis, D. N., Rozenblatt-Rosen, O., Suvà, M. L., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6190), 1396–1401. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1254257>
- Perng, Y. C., & Lenschow, D. J. (2018). ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nature Reviews Microbiology*, 16(7), 423–439. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>
- Picelli, S., Faridani, O. R., Björklund, Å. K., Winberg, G., Sagasser, S., & Sandberg, R. (2014). Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nature Protocols* 2013 9:1, 9(1), 171–181. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.006>

- Pilotte, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolušić, E., Frédérick, R., De Plaen, E., Uyttenhove, C., Wouters, J., Masereel, B., & Van Den Eynde, B. J. (2012). Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(7), 2497–2502. https://doi.org/10.1073/PNAS.1113873109/SUPPL_FILE/PNAS.201113873SI.PDF
- Plate, K. H., & Risau, W. (1995). Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia*, *15*(3), 339–347. <https://doi.org/10.1002/GLIA.440150313>
- Platten, M., Weller, M., & Wick, W. (2012). Shaping the glioma immune microenvironment through tryptophan metabolism. *CNS Oncology*, *1*(1), 99. <https://doi.org/10.2217/CNS.12.6>
- Pombo Antunes, A. R., Scheyltjens, I., Lodi, F., Messiaen, J., Antoranz, A., Duerinck, J., Kancheva, D., Martens, L., De Vlaminck, K., Van Hove, H., Kjølnér Hansen, S. S., Bosisio, F. M., Van der Borgh, K., De Vleeschouwer, S., Sciot, R., Bouwens, L., Verfaillie, M., Vandamme, N., Vandenbroucke, R. E., ... Movahedi, K. (2021). Single-cell profiling of myeloid cells in glioblastoma across species and disease stage reveals macrophage competition and specialization. *Nature Neuroscience* *2021 24:4*, *24*(4), 595–610. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00789-y>
- Prins, R. M., Odesa, S. K., & Liao, L. M. (2003). Immunotherapeutic Targeting of Shared Melanoma-Associated Antigens in a Murine Glioma Model. *Cancer Research*, *63*(23), 8487–8491.
- Ravi, V. M., Neidert, N., Will, P., Joseph, K., Maier, J. P., Kückelhaus, J., Vollmer, L., Goeldner, J. M., Behringer, S. P., Scherer, F., Boerries, M., Follo, M., Weiss, T., Delev, D., Kernbach, J., Franco, P., Schallner, N., Dierks, C., Carro, M. S., ... Heiland, D. H. (2022). T-cell dysfunction in the glioblastoma microenvironment is mediated by myeloid cells releasing interleukin-10. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-022-28523-1>
- Razavi, S. M., Lee, K. E., Jin, B. E., Aujla, P. S., Gholamin, S., & Li, G. (2016a). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery*, *3*. <https://doi.org/10.3389/FSURG.2016.00011>
- Razavi, S. M., Lee, K. E., Jin, B. E., Aujla, P. S., Gholamin, S., & Li, G. (2016b). Immune Evasion Strategies of Glioblastoma. *Frontiers in Surgery*, *3*, 175663. <https://doi.org/10.3389/FSURG.2016.00011/BIBTEX>
- Reardon, D. A., Brandes, A. A., Omuro, A., Mulholland, P., Lim, M., Wick, A., Baehring, J., Ahluwalia, M. S., Roth, P., Bähr, O., Phuphanich, S., Sepulveda, J. M., De Souza, P., Sahebjam, S., Carleton, M., Tatsuoka, K., Taitt, C., Zwirter, R., Sampson, J., & Weller, M. (2020). Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, *6*(7), 1003–1010. <https://doi.org/10.1001/JAMAONCOL.2020.1024>

- Rejdak, K., Petzold, A., Kocki, T., Kurzepa, J., Grieb, P., Turski, W. A., & Stelmasiak, Z. (2007). Astrocytic activation in relation to inflammatory markers during clinical exacerbation of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neural Transmission*, 114(8), 1011–1015. <https://doi.org/10.1007/s00702-007-0667-y>
- Riesenberg, R., Weiler, C., Spring, O., Eder, M., Buchner, A., Popp, T., Castro, M., Kammerer, R., Takikawa, O., Hatz, R. A., Stief, C. G., Hofstetter, A., & Zimmermann, W. (2007). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(23), 6993–7002. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0942>
- Rivers, T. M., Sprunt, D. H., & Berry, G. P. (1933). Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine*, 58(1), 39–52. <https://doi.org/10.1084/jem.58.1.39>
- Robert, E. P. I. E. R. O. N. I., & Levine, L. E. O. (1966). *H Y P E R A C U T E A L L E R G I C E N C E P H A L O M Y E L I T I S : A D J U V A N T E F F E C T O F P E R T U S S I S V A C C I N E S A N D E X T R A C T S I S E Y M O U R L E V I N E , E U G E N E J . W E N K , H E N R Y B . D E V L I N , R O B E R T E . P I E R O N I r i N D L E O L E V I N E . 97(3).*
- Roy, L. O., Poirier, M. B., & Fortin, D. (2015). Transforming growth factor-beta and its implication in the malignancy of gliomas. *Targeted Oncology*, 10(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/S11523-014-0308-Y/FIGURES/6>
- Rudick, R. A., & Goelz, S. E. (2011). Beta-interferon for multiple sclerosis. *Experimental Cell Research*, 317(9), 1301–1311. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2011.03.002>
- Sadik, A., Somarribas Patterson, L. F., Öztürk, S., Mohapatra, S. R., Panitz, V., Secker, P. F., Pfänder, P., Loth, S., Salem, H., Prentzell, M. T., Berdel, B., Iskar, M., Faessler, E., Reuter, F., Kirst, I., Kalter, V., Foerster, K. I., Jäger, E., Guevara, C. R., ... Opitz, C. A. (2020). IL4I1 Is a Metabolic Immune Checkpoint that Activates the AHR and Promotes Tumor Progression. *Cell*, 182(5), 1252-1270.e34. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.07.038>
- Saeidi, A., Zandi, K., Cheok, Y. Y., Saeidi, H., Wong, W. F., Lee, C. Y. Q., Cheong, H. C., Yong, Y. K., Larsson, M., & Shankar, E. M. (2018). T-cell exhaustion in chronic infections: Reversing the state of exhaustion and reinvigorating optimal protective immune responses. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02569>
- Sahm, F., Oezen, I., Opitz, C. A., Radlwimmer, B., Von Deimling, A., Ahrendt, T., Adams, S., Bode, H. B., Guillemin, G. J., Wick, W., & Platten, M. (2013). The endogenous tryptophan metabolite and NAD⁺ precursor quinolinic acid confers resistance of gliomas to oxidative stress. *Cancer Research*, 73(11), 3225–3234. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3831/650811/AM/THE-ENDOGENOUS-TRYPTOPHAN-METABOLITE-AND-NAD>

- Sampson, J. H., Gunn, M. D., Fecci, P. E., & Ashley, D. M. (2020). Brain immunology and immunotherapy in brain tumours. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 20, Issue 1, pp. 12–25). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0224-7>
- Santos, J. C., Boucher, D., Schneider, L. K., Demarco, B., Dilucca, M., Shkarina, K., Heilig, R., Chen, K. W., Lim, R. Y. H., & Broz, P. (2020). Human GBP1 binds LPS to initiate assembly of a caspase-4 activating platform on cytosolic bacteria. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16889-z>
- Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N., Giannini, C., Burns, T. C., Kizilbash, S. H., Laramy, J. K., Swanson, K. R., Kaufmann, T. J., Brown, P. D., Agar, N. Y. R., Galanis, E., Buckner, J. C., & Elmquist, W. F. (2018). Is the blood-brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*, 20(2), 184–191. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOX175>
- Schaffnerath, J., Wyss, T., He, L., Rushing, E. J., Delorenzi, M., Vasella, F., Regli, L., Neidert, M. C., & Keller, A. (2021). Blood-brain barrier alterations in human brain tumors revealed by genome-wide transcriptomic profiling. *Neuro-Oncology*, 23(12), 2095–2106. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOAB022>
- Schalper, K. A., Rodriguez-Ruiz, M. E., Diez-Valle, R., López-Janeiro, A., Porciuncula, A., Idoate, M. A., Inogés, S., de Andrea, C., López-Diaz de Cerio, A., Tejada, S., Berraondo, P., Villarroel-Espindola, F., Choi, J., Gúrpide, A., Giraldez, M., Goicoechea, I., Gallego Perez-Larraya, J., Sanmamed, M. F., Perez-Gracia, J. L., & Melero, I. (2019). Neoadjuvant nivolumab modifies the tumor immune microenvironment in resectable glioblastoma. *Nature Medicine*, 25(3), 470–476. <https://doi.org/10.1038/S41591-018-0339-5>
- Schiera, G., Di Liegro, C. M., Schirò, G., Sorbello, G., & Di Liegro, I. (2024). Involvement of Astrocytes in the Formation, Maintenance, and Function of the Blood–Brain Barrier. In *Cells* (Vol. 13, Issue 2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/cells13020150>
- Schuster, J., Lai, R. K., Recht, L. D., Reardon, D. A., Paleologos, N. A., Groves, M. D., Mrugala, M. M., Jensen, R., Baehring, J. M., Sloan, A., Archer, G. E., Bigner, D. D., Cruickshank, S., Green, J. A., Keler, T., Davis, T. A., Heimberger, A. B., & Sampson, J. H. (2015). Editor’s choice: A phase II, multicenter trial of rindopepimut (CDX-110) in newly diagnosed glioblastoma: the ACT III study. *Neuro-Oncology*, 17(6), 854. <https://doi.org/10.1093/NEUONC/NOU348>
- Sedlmayr, P., Blaschitz, A., & Stocker, R. (2014). The Role of Placental Tryptophan Catabolism. *Frontiers in Immunology*, 5(MAY). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00230>
- Shen, L., Li, H., Bin, S., Li, P., Chen, J., Gu, H., & Yuan, W. (2019). The efficacy of third generation anti-HER2 chimeric antigen receptor T cells in combination with PD1 blockade against malignant glioblastoma cells. *Oncology Reports*, 42(4), 1549–1557. <https://doi.org/10.3892/OR.2019.7263>

- Simonds, E. F., Lu, E. D., Badillo, O., Karimi, S., Liu, E. V., Tamaki, W., Rancan, C., Downey, K. M., Stultz, J., Sinha, M., McHenry, L. K., Nasholm, N. M., Chuntova, P., Sundström, A., Genoud, V., Shahani, S. A., Wang, L. D., Brown, C. E., Walker, P. R., ... Hellström, M. (2021). Deep immune profiling reveals targetable mechanisms of immune evasion in immune checkpoint inhibitor-refractory glioblastoma. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 9(6), e002181. <https://doi.org/10.1136/JITC-2020-002181>
- Slaney, C. Y., Kershaw, M. H., & Darcy, P. K. (2014). Trafficking of T cells into tumors. *Cancer Research*, 74(24), 7168–7174. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2458>
- Sobel, R. A. (2000). Genetic and epigenetic influence on EAE phenotypes induced with different encephalitogenic peptides. *Journal of Neuroimmunology*, 108(1–2), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(99\)00270-2](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(99)00270-2)
- Speir, M. L., Bhaduri, A., Markov, N. S., Moreno, P., Nowakowski, T. J., Papatheodorou, I., Pollen, A. A., Raney, B. J., Seninge, L., Kent, W. J., & Haeussler, M. (2021). UCSC Cell Browser: Visualize your single-cell data. *Bioinformatics*, 37(23), 4578–4580. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btab503>
- Spencer, J. I., Bell, J. S., & DeLuca, G. C. (2018). Vascular pathology in multiple sclerosis: Reframing pathogenesis around the blood-brain barrier. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 89, Issue 1, pp. 42–52). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2017-316011>
- Spranger, S., Spaapen, R. M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T. T., & Gajewski, T. F. (2013). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine*, 5(200), 200ra116. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.3006504>
- Sriram, S., & Steiner, I. (2005). Experimental allergic encephalomyelitis: A misleading model of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 58(6), 939–945. <https://doi.org/10.1002/ana.20743>
- Stegg, P. S. (2021). The blood-tumour barrier in cancer biology and therapy. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 18(11), 696–714. <https://doi.org/10.1038/S41571-021-00529-6>
- Steiner, O., Coisne, C., Cecchelli, R., Boscacci, R., Deutsch, U., Engelhardt, B., & Lyck, R. (2010). Differential Roles for Endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in Shear-Resistant T Cell Arrest, Polarization, and Directed Crawling on Blood–Brain Barrier Endothelium. *The Journal of Immunology*, 185(8), 4846–4855. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903732>
- Storch, M. K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallström, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Lington, C., & Lassmann, H. (1998). Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathology*, 8(4), 681–694. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00194.x>

- Stromnes, I. M., & Goverman, J. M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature Protocols*, 1(4), 1810–1819. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.285>
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J. B., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., Curschmann, J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Gorlia, T., Allgeier, A., Lacombe, D., Cairncross, J. G., Eisenhauer, E., & Mirimanoff, R. O. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England Journal of Medicine*, 352(10), 987–996. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA043330>
- Sun, S., Du, G., Xue, J., Ma, J., Ge, M., Wang, H., & Tian, J. (2018). PCC0208009 enhances the anti-tumor effects of temozolomide through direct inhibition and transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in glioma models. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 32. <https://doi.org/10.1177/2058738418787991>
- Sundaram, G., Brew, B. J., Jones, S. P., Adams, S., Lim, C. K., & Guillemin, G. J. (2014). Quinolinic acid toxicity on oligodendroglial cells: Relevance for multiple sclerosis and therapeutic strategies. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12974-014-0204-5>
- Sundaram, G., Lim, C. K., Brew, B. J., & Guillemin, G. J. (2020). *Kynurenine pathway modulation reverses the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse disease progression*. 1–14.
- Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., & Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(4), 447–457. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020052>
- Tintore, M., Arrambide, G., Otero-Romero, S., Carbonell-Mirabent, P., Río, J., Tur, C., Comabella, M., Nos, C., Arévalo, M. J., Anglada, E., Menendez, R., Midaglia, L., Galán, I., Vidal-Jordana, A., Castelló, J., Muleró, P., Zabalza, A., Rodríguez-Acevedo, B., Rodríguez, M., ... Montalban, X. (2020). The long-term outcomes of CIS patients in the Barcelona inception cohort: Looking back to recognize aggressive MS. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 26(13), 1658–1669. <https://doi.org/10.1177/1352458519877810>
- Tokumoto, M., Tanaka, H., Tauchi, Y., Tamura, T., Toyokawa, T., Kimura, K., Murguruma, K., Yashiro, M., Maeda, K., Hirakawa, K., & Ohira, M. (2017). Immunoregulatory Function of Lymphatic Endothelial Cells in Tumor-draining Lymph Nodes of Human Gastric Cancer. *Anticancer Research*, 37(6), 2875–2883. <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.11640>
- Tokunaga, R., Zhang, W., Naseem, M., Puccini, A., Berger, M. D., Soni, S., McSkane, M., Baba, H., & Lenz, H. J. (2018). CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy. *Cancer Treatment Reviews*, 63, 40–47. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2017.11.007>

- Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., & Toldi, J. (2013). Kynurenines in the CNS : recent advances and new questions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(January). <https://doi.org/10.1038/nrd3793>
- Viglietta, V., Miller, D., Bar-Or, A., Phillips, J. T., Arnold, D. L., Selmaj, K., Kita, M., Hutchinson, M., Yang, M., Zhang, R., Dawson, K. T., Sheikh, S. I., Fox, R. J., & Gold, R. (2015). Efficacy of delayed-release dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis: integrated analysis of the phase 3 trials. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(2), 103–118. <https://doi.org/10.1002/ACN3.148>
- Wainwright, D. A., Balyasnikova, I. V., Chang, A. L., Ahmed, A. U., Moon, K. S., Auffinger, B., Tobias, A. L., Han, Y., & Lesniak, M. S. (2012). IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. *Clinical Cancer Research*, 18(22), 6110–6121. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2130>
- Walters, M. J., Ebsworth, K., Berahovich, R. D., Penfold, M. E. T., Liu, S. C., Al Omran, R., Kioi, M., Chernikova, S. B., Tseng, D., Mulkearns-Hubert, E. E., Sinyuk, M., Ransohoff, R. M., Lathia, J. D., Karamchandani, J., Kohrt, H. E. K., Zhang, P., Powers, J. P., Jaen, J. C., Schall, T. J., ... Brown, J. M. (2014). Inhibition of CXCR7 extends survival following irradiation of brain tumours in mice and rats. *British Journal of Cancer*, 110(5), 1179–1188. <https://doi.org/10.1038/BJC.2013.830>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L. C., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H. T., Ma, X. J., & Luo, Y. (2012). RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>
- Wang, X., Zhang, J., & Zhou, G. (2020). The CXCL11-CXCR3A axis influences the infiltration of CD274 and IDO1 in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, April 2020, 362–370. <https://doi.org/10.1111/jop.13130>
- Watowich, M. B., Gilbert, M. R., & Larion, M. (2023). T cell exhaustion in malignant gliomas. In *Trends in Cancer* (Vol. 9, Issue 4, pp. 270–292). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2022.12.008>
- Wei, J., Wu, A., Kong, L. Y., Wang, Y., Fuller, G., Fokt, I., Melillo, G., Priebe, W., & Heimberger, A. B. (2011). Hypoxia potentiates glioma-mediated immunosuppression. *PloS One*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0016195>
- Wei, S., Egenti, M. U., Teitz-Tennenbaum, S., Zou, W., & Chang, A. E. (2013). Effects of tumor irradiation on host T regulatory cells and systemic immunity in the context of adoptive T cell therapy in mice. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 36(2), 124. <https://doi.org/10.1097/CJI.0B013E31828298E6>
- Weideman, A. M., Tapia-Maltos, M. A., Johnson, K., Greenwood, M., & Bielekova, B. (2017). Meta-analysis of the age-dependent efficacy of multiple sclerosis treatments. *Frontiers in Neurology*, 8(NOV), 577. <https://doi.org/10.3389/FNEUR.2017.00577/FULL>

- Weiss, T., Weller, M., Guckenberger, M., Sentman, C. L., & Roth, P. (2018). NKG2D-Based CAR T Cells and Radiotherapy Exert Synergistic Efficacy in Glioblastoma. *Cancer Research*, *78*(4), 1031–1043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1788>
- Wetzel, L. A., Hurtado, M., MacDowell Kaswan, Z. A., McCusker, R. H., & Steelman, A. J. (2020). Deletion of indoleamine 2,3 dioxygenase (Ido)1 but not Ido2 exacerbates disease symptoms of MOG35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, *7*. <https://doi.org/10.1016/J.BBIH.2020.100116>
- Wiendl, H., Gold, R., Berger, T., Derfuss, T., Linker, R., Mäurer, M., Aktas, O., Baum, K., Berghoff, M., Bittner, S., Chan, A., Czaplinski, A., Deisenhammer, F., Di Pauli, F., Du Pasquier, R., Enzinger, C., Fertl, E., Gass, A., Gehring, K., ... Zipp, F. (2021). Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG): position statement on disease-modifying therapies for multiple sclerosis (white paper). *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *14*. <https://doi.org/10.1177/17562864211039648>
- Würth, R., Barbieri, F., Bajetto, A., Pattarozzi, A., Gatti, M., Porcile, C., Zona, G., Ravetti, J. L., Spaziante, R., & Florio, T. (2011). Expression of CXCR7 chemokine receptor in human meningioma cells and in intratumoral microvasculature. *Journal of Neuroimmunology*, *234*(1–2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUROIM.2011.01.006>
- Xu, J., Zhang, J., Zhang, Z., Gao, Z., Qi, Y., Qiu, W., Pan, Z., Guo, Q., Li, B., Zhao, S., Guo, X., Qian, M., Chen, Z., Wang, S., Gao, X., Zhang, S., Wang, H., Guo, X., Zhang, P., ... Li, G. (2021). Hypoxic glioma-derived exosomes promote M2-like macrophage polarization by enhancing autophagy induction. *Cell Death & Disease* *2021 12:4*, *12*(4), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03664-1>
- Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A. M., Cialic, R., Wu, P. M., Doykan, C. E., Lin, J., Cotleur, A. C., Kidd, G., Zorlu, M. M., Sun, N., Hu, W., Liu, L. P., Lee, J. C., Taylor, S. E., Uehlein, L., Dixon, D., ... Ransohoff, R. M. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(8), 1533–1549. <https://doi.org/10.1084/jem.20132477>
- Yan, Y., Zhang, G.-X., Gran, B., Fallarino, F., Yu, S., Li, H., Cullimore, M. L., Rostami, A., & Xu, H. (2010). IDO Upregulates Regulatory T Cells via Tryptophan Catabolite and Suppresses Encephalitogenic T Cell Responses in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, *185*(10), 5953–5961. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1001628>
- Yasuda, T., Tsumita, T., Nagai, Y., Mitsuzawa, E., & Ohtani, S. (1975). Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice. I. Induction of EAE with mouse spinal cord homogenate and myelin basic protein. *The Japanese journal of experimental medicine*, *45*(5), 423–427.
- Zarzecki, M. S., Cattelan Souza, L., Giacomeli, R., Silva, M. R. P., Prigol, M., Boeira, S. P., & Jesse, C. R. (2020). Involvement of Indoleamine-2,3-Dioxygenase and

Kynurenine Pathway in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice. *Neurochemical Research*, 45(12), 2959–2977. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03144-6>

Zhai, L., Ladomersky, E., Lenzen, A., Nguyen, B., Patel, R., Lauing, K. L., Wu, M., & Wainwright, D. A. (2018). IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cellular and Molecular Immunology*, 15(5), 447–457. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.143>

Zierfuss, B., Prat, A., Zierfuss, B., & Larochelle, C. (2024). Blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis: causes, consequences, and potential effects of therapies. In *Lancet Neurol* (Vol. 23). www.thelancet.com/neurology

7 EIGENE VERÖFFENTLICHUNG

Abu Hejleh, A. P., Huck, K., Jähne, K., Tan, C. L., Lanz, T. V., Epping, L., Sonner, J. K., Meuth, S. G., Henneberg, A., Opitz, C. A., Herold-Mende, C., Sahm, F., Platten, M., & Sahm, K. (2023). Endothelial Indoleamine-2,3-Dioxygenase-1 is not Critically Involved in Regulating Antitumor Immunity in the Central Nervous System. *International journal of tryptophan research: IJTR*, 16,11786469231153111. <https://doi.org/10.1177/11786469231153111>

8 LEBENS LAUF

Aus Datenschutzgründen ist der Lebenslauf nur in der gedruckten Version enthalten.

9 DANKSAGUNG

Diese Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Supervision vieler Personen nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Michael Platten sowie meiner Betreuerin Dr. Katharina Sahm danken. Sie haben mir das Projekt anvertraut und mich stets mit Rat, Anregungen und Korrekturen unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Katrin Huck für die geduldige Einarbeitung in die Methodik sowie die konstante Supervision vom ersten Tag im Labor bis zur Fertigstellung der Dissertation. Die experimentellen Arbeiten wären jedoch ohne die tatkräftige Unterstützung der Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Labor der Arbeitsgruppe Klinische Kooperationsseinheit Neuroimmunologie und Hirntumorimmunologie des DKFZ und der UMM nicht möglich gewesen. Insbesondere gilt hier mein Dank Kristine Jähne. Für die Unterstützung und Expertise bei der Auswertung der scRNA-seq Daten bedanke ich mich bei Dr. Chin Leng Tan.

Bedanken möchte ich mich auch bei unseren Kollaborationspartnern vom Institut für Translationale Neurologie der Uniklinik Münster, Prof. Sven Meuth und Dr. Lisa Epping, für den wertvollen wissenschaftlichen Austausch.

Darüber hinaus bin ich dem SFB 1366 des European Center for Angioscience für die finanzielle und ideelle Förderung dieses Projektes dankbar.

Die letzten Worte sind meinen Freunden und meiner Familie gewidmet. Danke Anton, danke Aram für Eure motivierenden Worte und den mentalen Beistand in guten wie in schlechten Zeiten.

Den größten Dank schulde ich meinen Eltern. Danke für die unerschütterliche und bedingungslose Unterstützung - ohne Euch wäre all dies nicht möglich gewesen.