Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Direktor: Univ.-Prof. Dr. K. Pfeffer

„Einfluss der Indolamin 2,3-Dioxygenase auf das Zellwachstum von T-Zellen, Tumorzellen und Staphylokokken“

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der

Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Stephan Siebel

(2007)

Widmung

Zugeeignet meinen Eltern Brigitte und Joachim Siebel
sowie meinen beiden Brüdern Michael und Christian

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Das Immunsystem 1
1.1.1 Allgemeines 1
1.1.2 Einführung in die Entwicklung der Immunabwehr 2
1.1.3 Einteilung der Immunabwehr 3
1.1.4 Spezifische Immunität 3
1.1.5 T-Zellen 4
1.1.6 Strukturelle und funktionelle Einteilung der T-Zellen 5
1.1.7 T-Zell-Subpopulationen 6
1.1.8 T-Zellrezeptor und T-Zellaktivierung 6
1.1.9 Verschiedene Methoden der T-Zellaktivierung 8
1.1.10 Zytokine 10
1.1.11 T-Zellen im Kontext von Allergien, Autoimmunerkrankungen und 13
Transplantatabstossung....13
1.2 Staphylokokken als Krankheitserreger 16
1.3 Indolamin 2,3-dioxygenase 18
1.3.1 Tryptophan und seine physiologische Bedeutung 18
1.3.2 Der Kynurenin-Weg 19....19
1.3.3 Das IDO-Gen und die Regulation der Gentranskription 21
1.3.4 Bedeutung der IDO als Effektor und Modulator im Immunsystem 22
1.4 Konzeption der Arbeit 25
2. Material und Methoden....26
2.1 Material....26
2.1.1 Laborgeräte....27
2.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel....28
2.1.3 Chemikalien....28
2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen für die Zellkulturen....30
2.1.3.2 Zytokine....30
2.1.3.4 Bakterien-Medien und Antibiotikum....30
2.2 Methoden....31
2.2.1 Herstellen und Lagerung von 3HT, Mitogenen, Metaboliten,....31
Zytokinen und dialysiertem FCS....31
2.2.1.1 Methyl-3H-Thymidine....31
2.2.1.2 Metabolite....32
2.2.1.3 Dialyse des FCS....32
2.2.1.4 Mitogene....33
2.2.2 Herstellung von Überständen stimulierter und nicht-stimulierter Zellen....33
2.2.3 Zellen....34
2.2.3.1 Periphere Blutleukozyten/lymphozyten....34
2.2.3.2 Tumorzellen....35
2.2.3.3 Bakterien....36
2.2.4 Zellernte....36
2.2.4.1 PBL-Präparation aus venösem Vollblut....36
2.2.4.2 Kultivierung und Ernte der Zelllinien HBMEC, A549, 86HG39....37
2.2.4.2.1 Bestrahlen der Tumorzellen....38
2.2.5 IDO-Aktivitätsmessung....39
2.2.6 Bakterienwachstum im Testsystem....41
2.2.7 Bestimmung der Zellproliferation in Testsytemen stimulierter bzw. nicht-....3

2.2.7 Bestimmung der Zellproliferation in Testsytemen stimulierter bzw. nicht-.....41
stimulierter Tumorzellmedien.....41
2.2.7.1 T-Zellen.....41
2.2.7.2 Tumorzellen.....42
2.2.8 Messung der Zellproliferation.....43
2.2.9 T-Zellen und Metabolite.....44
2.2.10 Bakterien und Kynurenin.....44
2.2.11 Metabolitentitration.....45
2.2.12 Antagonisieren des Metaboliteneffekts.....45
2.2.13 Vorinkubation.....46
2.2.14 Zugabekinetik.....47
2.2.15 Tumorzellen und Metabolite.....48
2.2.16 Tumorzellproliferation in Überständen (un-) stimulierter Zellen.....49
3. Ergebnisse.....50
3.1 IDO-Aktivität und Kynureninproduktion in A549-, 86HG39- und HBME-Zellen.....50
3.2 Bedeutung der IDO-Aktivität und der Tryptophan-Degradation in der.....54
Hemmung von Zellwachstum.....54
3.3 Einfluss des Kynurenins auf das Zellwachstum.....59
3.4 Bedeutung der übrigen Tryptophanmetabolite auf das T-Zellwachstum.....65
3.5 Einfluss der Tryptophanmetabolite auf die Tumorzellproliferation.....76
4. Diskussion.....80
5. Literaturverzeichnis.....100
6. Abkürzungen.....114
7. Lebenslauf.....115
8. Eidesstattliche Erklärung.....116
9. Danksagung.....117

der Immunabwehr genauer erläutert, die die Grundlage für den Arbeitsansatz dieser Arbeit darstellen.

Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus aureus*, als bedeutende Krankheitserreger und der Tryptophanabbau durch die IDO werden in getrennten Abschnitten ausführlich erläutert.

1.1.2 Einführung in die Entwicklung der Immunabwehr

Die Immunabwehr wird durch unterschiedliche Leukozyten vermittelt. Sie alle stammen von pluripotenten haematopoietischen Stammzellen im Knochenmark ab. Die pluripotenten Stammzellen teilen sich und bilden zwei Arten von Vorläuferzellen, die lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen. Während der Myelopoese entwickeln sich aus den myeloiden Vorläuferzellen die Monozyten und die Granulozyten. Die Granulozyten werden aufgrund ihres Färbeverhaltens weiter in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt. Aus den lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln sich während der Lymphopoese die Natürlichen Killerzellen (NK) sowie die T- und B-Lymphozyten. T- und B-Lymphozyten unterscheiden sich unter anderem durch den Ort ihrer Reifung. B-Lymphozyten differenzieren sich zu ihrer funktionellen Form vor allem im Knochenmark und teilweise in den Lymphknoten. Die funktionelle Differenzierung der T-Zellen findet vor allem im Thymus statt. Weil die naiven Lymphozyten im Thymus bzw im Knochenmark zu reifen Lymphozyten differenzieren, zählt man diese Organe auch zu den zentralen lymphatischen Organen. Lymphozyten, die keine B- oder T-Zelltypischen Oberflächenmerker exprimieren, werden als Null-Zellen bezeichnet. Hierzu zählen die Natürlichen Killerzellen.

1.1.3 Einteilung der Immunabwehr

Zur Abwehr pathogener Erreger stehen dem Körper zunächst einmal zwei Systeme zur Verfügung: die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunabwehr. Beide Systeme arbeiten nicht unabhängig von einander, sondern ergänzen sich. Hauptträger der zellulären Abwehr sind die Granulozyten, Monozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und z.T. Natürliche Killerzellen. Die unspezifische Abwehr erkennt und eliminiert schnell Fremdkörper, ohne spezifische Oberflächenstrukturen zu erkennen. Die mangelnde Antigenspezifität und die fehlende Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis dieser unmittelbaren Immunantwort sind ein wesentlicher Nachteil, durch den es leicht zur wirtseigenen Gewebeschädigung kommen kann.

Antigenspezifischer und mit einem immunologischen Gedächtnis ausgestattet sind die T- und B-Lymphozyten (Ahmed et al., 1996), die zu der spezifischen Immunität gehören (siehe unten).

Da im Rahmen dieser Arbeit der Effekt der Tryptophanmetabolite vor allem auf T-Zellen untersucht wird, werde ich im Folgenden ein stärkeres Gewicht auf die Beschreibung der spezifischen Abwehr und hier besonders auf die T-Zellen legen.

1.1.4 Spezifische Immunität

Die spezifische Immunabwehr besteht aus zwei Effektorsystemen:

Der zellulären Komponente, bestehend aus den T-Zellen und der humoralen Komponente (lat. humor = Flüssigkeit), bestehend aus den von den B-Zellen gebildeten Antikörpern. Im Unterschied zur unspezifischen Immunabwehr ist es den Lymphozyten durch das Tragen antigenspezifischer Rezeptoren möglich, unterschiedliche pathogene Keime anhand ihrer Antigenstruktur zu erkennen bzw wiederzuerkennen. Durch die Bindung zwischen Antigen und dem antigenspezifischen Rezeptor kommt es zur klonalen Expansion des entsprechenden (Rezeptor-tragenden) Lymphozyten und der gezielten Eliminierung des Pathogens. Ein weiterer wichtiger Aspekt der erworbenen Immunabwehr ist die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Hierdurch sollen Reinfektionen effektiver bekämpft werden: bei erneutem Kontakt mit einem bekannten Antigen reagiert das Immunsystem stärker und schneller als beim Primärkontakt.

1.1.5 T-Zellen

Die T-Lymphozyten bilden den zellulären Teil der spezifischen Immunabwehr. Nach den Reifungsprozessen im Thymus zirkulieren die reifen T-Zellen hauptsächlich zwischen Blut und peripheren lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten und der Milz. T-Zellen erkennen Antigene mithilfe von speziellen T-Zellrezeptoren. Durch zufällige genetische Rekombination der Genelemente, die für die variablen antigenbindenden Rezeptorstrukturen kodieren, werden eine Vielzahl unterschiedlicher T-Zellrezeptoren produziert, so dass es für jedes erdenkliche Antigen einen spezifischen T-Zellrezeptor gibt. Damit ein T-Zellrezeptor ein Antigen erkennt muss dieses vorher prozessiert werden, d.h. antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) zerlegen das Antigen in antigene Peptidfragmente und präsentieren diese den T-Zellen über Moleküle, die im Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) kodiert sind (siehe unten). Zu den APC gehören u.a. dendritische Zellen, sessile

Makrophagen, Mikroglia und Astrozyten (Kayser et al., 1998; Janeway 2005). Nach Bindung des passenden T-Zell-Rezeptors an das präsentierte Antigenfragment kommt es zur klonalen Expansion der entsprechenden T-Zelle.

1.1.6 Strukturelle und funktionelle Einteilung der T-Zellen

Anhand der Reaktivität monoklonaler Antikörper mit bestimmten membranständigen Glykoproteinen, wurden die Oberflächenmoleküle verschiedener Zellen klassifiziert. Hierbei bilden Antikörper, die dasselbe Oberfächenmolkül binden, ein sogenanntes Cluster. Diese werden nach konventioneller internationaler Nomenklatur CD (cluster of differentiation) benannt und nummeriert (Lai et al., 1998). T-Zellen werden anhand dieser Nomenklatur entsprechend ihren Oberflächenmolekülen in zwei Klassen unterteilt. Zum einen in die $CD4^+$ T-Helferzellen (Th-Zellen) und die $CD8^+$ T-Zellen. Beide Klassen sind zusätzlich $CD2^+$ und $CD3^+$. Durch Bestimmung dieser Rezeptoren können spezifische Zellgruppen identifiziert werden. Außerdem gelingt hierdurch eine Zuordnung der T-Lymphozyten zu bestimmten Subpopulationen. Zwar ist die biologische Funktion jeder dieser verschiedenen Rezeptoren nicht vollständig aufgeklärt, dennoch weiss man, dass sie unter anderem als Rezeptoren für Antigene, Botenstoffe, wie z.B. Zytokine und für Strukturmoleküle, zur Interaktion mit den Umgebungszellen, dienen.

1.1.7 T-Zell-Subpopulationen

T-Suppressorzellen ($CD8^+$) hemmen die Immunantwort, z.B. nach Heilung einer Infektion und verhindern somit eine überschiessende Immunreaktion. Die zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) erkennen intra- und extrazelluläre Pathogene und eliminieren diese mithilfe von Perforinen, TFN oder den Fas-Liganden und induzieren in der Zielzelle einen programmierten Zelltod. Ein Teil der T-Zellen differenzieren sich nach Antigenkontakt in Gedächtniszellen ($CD4^+$), die nach erneutem Antigenkontakt eine schnelle Immunabwehr ermöglichen.
Die T4-Helferzellen ($CD4^+$) unterstützen die Antikörperproduktion von B-Zellen und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen. Unabhängig von ihrer CD-Klassifikation werden die T-Helferzellen anhand ihres Zytokinmusters in TH_1- und TH_2-Zellen unterteilt. Die TH_1-Zellen exprimieren hauptsächlich IL 2, IFN γ und TFN β, wodurch sie vornehmlich Makrophagen, zytotoxische T-Zellen und IgG-produzierende Plasmazellen stimuliert. TH_2-Zellen produzieren hauptsächlich IL 4, 5, 9 und 10, wodurch sie vor allem Mastzellen, Eosinophile und IgE-produzierende Plasmazellen stimuliert (Janeway 2005).

1.1.8 T-Zellrezeptor und T-Zellaktivierung

Jeder T-Lymphozyt besitzt auf seiner Oberfläche viele identische Kopien eines individuellen Antigenrezeptors, dem T-Zellrezeptor (TZR). Der TZR setzt sich zusammen aus zwei

Aminosäureketten, dem CD3-Komplex und einem Kalziumkanalprotein. In der Mehrzahl der Fälle ist der TZR ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Polypeptidette. In einigen wenigen Fällen setzt sich der TZR aus einer γ- und einer δ-Polypeptidkette zusammen. Aufgrund der unterschiedlichen Polypeptidketten unterscheiden sich die Funktion und die Eigenschaft der TZRs (Bluestone et al., 1995)

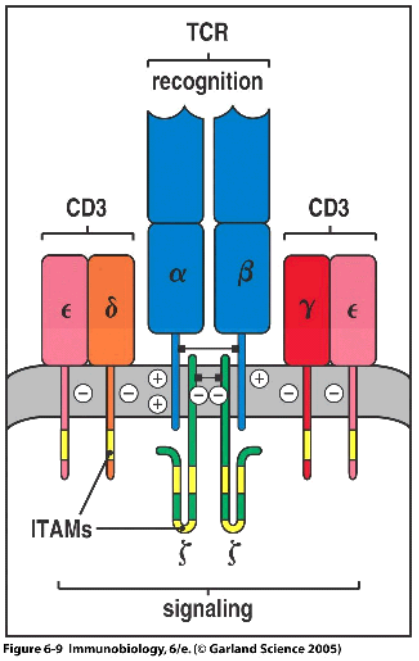


Abb.1: Der TZR ist ein Heterodimer aus α- und β-Poloypeptidketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Der TZR ist mit den CD3-Hetreodimeren ε/δ und γ/ε und dem CD3-Homodimer ζ/ζ assoziiert und in der Zellmembran eingelagert. Die CD3-Dimere sind an der Expression der Antigen-bindendenen Oberflächenmoleküle und an der Signaltransduktion ins Zellinnere beteiligt. Entnommen aus Immunbiology (Elsevier 2005)

Eine T-Zelle wird stimuliert, wenn ein Antigen von einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) vorprozessiert und das entsprechende antigenspezifische Peptidfragment über bestimmte Oberflächenstrukturen, sogenannte MHC-Moleküle, der T-Zelle präsentiert wird, so dass der TZR daran binden kann.

Die Gruppe der Haupthistokompatibilitätskomplex (Abk. MHC von engl. Major Histocompatibility Complex) wird in zwei Klassen eingeteilt. Die MHC-Klasse-1 Moleküle kommen auf der Oberfläche fast aller kernhaltiger Zellen vor und stimulieren vornehmlich CD8+ Zellen. Die MHC-Klasse II Moleküle werden nur auf antigenpräsentierenden Zellen, wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymohzyten exprimiert und stimulieren hauptsächlich CD4+ Zellen. Die MHC-Gene unterliegen einem starken Polymorphismus, die Genorte werden als HLA (Human Leucocyte Antigen) bezeichnet.
Nach Bindung des Antigens an den TZR wird das Ligandenbindungssignal über das CD3 Molekül in das Zellinnere weitergeleitet (Van Wauve et al., 1980). Durch Bindung des Antigenpeptids werden die T-Zellen zwar aktiviert, aber nicht zur klonalen Expansion stimuliert. Hierzu bedarf es eines kostimulatorischen Signals, welches ein von anderen Abwehrzellen gebildetes Zytokin sein kann oder aus Zell-zu-Zell-Kontakten der Oberflächenmoleküle von T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle besteht, z.B. meist B7-CD28.

1.1.9 Verschiedene Methoden der T-Zellaktivierung

Superantigene

Eine Reihe von bakteriellen oder retroviralen Peptidantigenen besitzen die Fähigkeit, die MHC Klasse II-Moleküle antigenpräsentierender Zellen mit dem T-Zellrezeptor von T-Lymphozyten direkt zu verbinden, ohne dass ein vorprozessiertes Peptid in der MHC II Tasche vorhanden sein muss (Fleischer et al., 1988). Hierdurch ist es diesen sogenannten Superantigenen möglich, gleichzeitig eine große Zahl an CD4+ T-Lymphozyten zu aktivieren. Die durch Superantigene induzierte Immunantwort ist jedoch nicht spezifisch und führt oftmals zu überschiessenden und autoimmunen Immunreaktionen. Ein Beispiel für

Superantigene ist das Staphylokokken Enterotoxin B (SEB), ein Exotoxin, das für schwere Lebensmittelvergiftungen verantwortlich ist oder das toxic shock syndrom toxin-1, welches zu einem letalen septischen Schock führen kann.

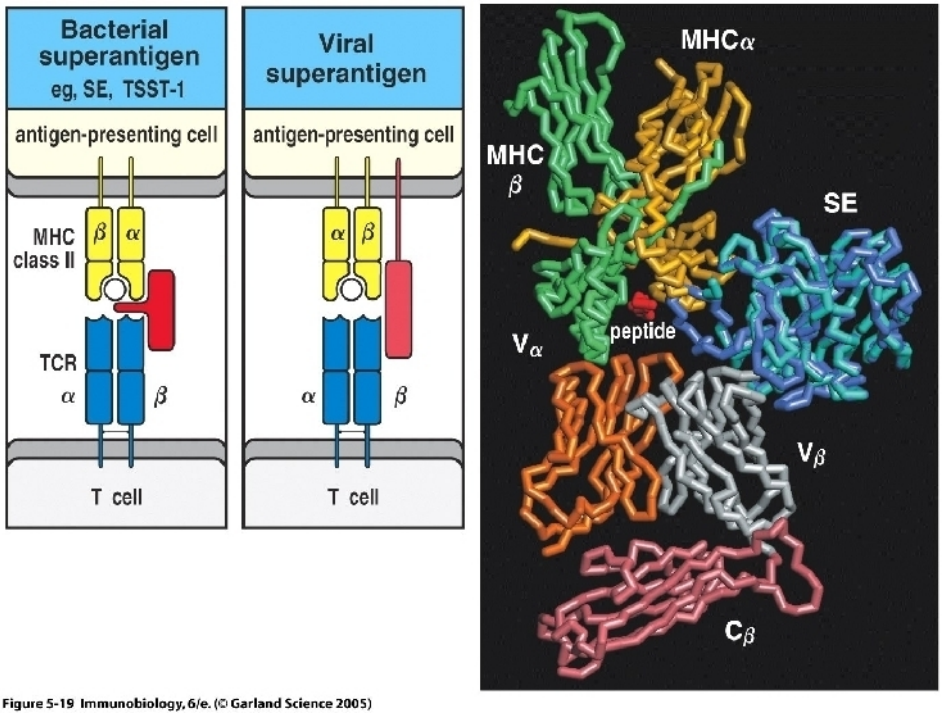


Abb.4: Superantigene binden unabhängig an MHC-Klasse II-Moleküle und den entsprechenden T-Zellrezeptor. Entnommen aus Immunbiology (Elsevier 2005)

Lektine

Lektine sind Proteine pflanzlicher oder tierischer Herkunft, die spezifisch an bestimmte Zuckerstrukturen von Oberflächenmolekülen binden. In dieser Arbeit spielt das Phytohaemagglutinin (PHA) eine wichtige Rolle. PHA stammt aus roten Kidney Bohnen und gehört zu den polyklonalen Mitogenen, die T-Zellen stimulieren. Durch Bindung an den TZR triggern sie denselben Mechanismus wie andere Antigene (Meuer et alt., 1984), jedoch beschränkt sich die Stimulation nicht nur auf eine Subpopulation der T-Zellen, sondern auf T-Zellen vieler verschiedener Gruppen und klonalen Ursprungs. Dadurch wirken Lektine stärker polyklonal als z.B. SEB.

OKT3

OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der gegen das CD3 Molekül humaner T-Lymphozyten gerichtet ist. Durch die agonistische Wirkung auf das CD3-Molekül übt OKT3 seine mitogene Wirkung aus, so dass es zur polyklonalen Expansion von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen kommt (Smith, 1997) und gleichzeitig die Freisetzung verschiedener Zytokine induziert wird (Van Wauve et alt., 1980; von Wussow et alt., 1981)

TLA

Das Toxoplasma Lysat Antigen wirkt als klassisches T-Zellantigen. Der TZR wird dabei durch den MHC Antigen-Komplex (Denkers et alt., 1998) stimuliert und vornehmlich $CD8^+$ T-Zelle zur klonalen Expansion gebracht.

1.1.10 Zytokine

Die Zytokine sind eine Gruppe kleiner Proteine (25 kD), die von verschiedenen Zellen *de novo* gebildet und sezerniert werden. Zytokine können sowohl autokrin, parakrin und endokrin wirken, abhängig davon, ob sie an die Zytokin-sezernierende Zelle selbst, eine Nachbarzelle oder an entferntere Zellen binden. Die Hauptaufgabe der Zytokine liegt in der Regulation des Immunsytems, von Entzündungsreaktionen und in der Haematopoese. Zytokine binden an speziesspezifische Oberflächenrezeptoren und beeinflussen über bestimmte Signalwege die Genexpression der Zielzelle. Bis heute sind alleine über 200 Gene

bekannt, deren Expression durch IFN γ induziert wird und deren Genprodukte Aufgaben in der Immunregulation und Infektionsabwehr haben.

Zu den Zytokinen zählen die Lymphokine, die von Lymphozyten gebildet werden, die Chemokine, die als chemotaktische Moleküle für die Leukozytenmigration verantwortlich sind, die Interleukine, die als Signalmoleküle zwischen verschiedenen Lymphozyten vermitteln, die Tumornekrosefaktoren, die u.a. Zellproliferation und Zelltod induzieren und die Interferone.

Die Interferone werden in zwei Gruppen eingeteilt (Finter 1996; Biron et al., 2001):

Typ 1 Interferone haben vornehmlich eine antivirale Wirkung und werden in fast allen virusinfizierten Zellen gebildet. Zu ihnen gehören IFN α, IFN β und IFN ω. Zu den Typ2 Interferonen zählt IFNγ, das von aktivierten $CD4^+$ Th1-Zellen, $CD8^+$ zytotoxische Suppressorzellen und natürlichen Killerzellen (Young 1996; Bach et al., 1997) produziert wird.

IFN γ spielt eine entscheidende Rolle in der angeborenen (unspezifischen) und in der erworbenen (spezifischen) frühen Abwehr (Boehm et al., 1997; Biron et al., 2001). Durch seine immunregulatorischen, antiinfektiösen und antiproliferativen Effektormechanismen, wie der Tryptophan-Depletion durch Induktion der IDO, der Hemmung viraler Replikation, der Aktivierung von und der Verstärkung der Expression von MHC-Molekülen auf Makrophagen und Unterstützung des Ig-Klassen-switch zu IgG_{2a}, ist IFN γ vor allem an der Immunabwehr von Tumorzellen und bakteriellen Infektionen beteiligt (Cantin, et alt., 1999; Dalton et al., 1993; Huang et al., 1993; Vilcek et al., 1985). Interferone binden an speziesspezifische Oberflächenrezeptoren (Farrar et al., 1993; Bach et al., 1997; Mogensen et al., 1999; Heim, 1999) die das Signal über second messenger in das Innere der Effektorzelle weitergeben und die entsprechende Genexpression induzieren. Der IFN γ-Rezeptor setzt sich aus einer IFNGR-1 und einer IFNGR-2 Untereinheit zusammen, die beide auf Chromosom 21 des

menschlichen Genoms kodiert sind (Bach et al., 1997). Nach Binden von IFN γ an den Oberflächen-Rezeptorkomplex bilden die beiden Untereinheiten IFNGR-1 und -2 ein Heterodimer (Bach et al., 1997; Farrar et al., 1993) woraufhin die JAK-STAT Signalkaskade aktiviert wird (Darnell et al., 1994). Hierbei wird die rezeptorassoziierte Janus Tyrosin Kinase (JAK) durch Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren (aktivieren) wiederum das STAT-Protein (signal transducer and activator of transcription). STAT ist ein Transkriptionsfaktor, der als inaktives Monomer latent im Zytoplasma vorliegt. Die Entstehung des STAT 1 alpha Proteins führt zur Bildung eines STAT 1 alpha Proteinkomplexes. Dieses als GAF (gamma activator factor), bezeichnetes Homodimer wandert in den Zellkern ein und bindet dort an seine entsprechende Promotorregion, der gamma aktivierte DNA-Sequenz (GAS), wodurch die Transkription IFN γ abhängiger Gene induziert wird (Baglioni et al., 1979; Bandyopadhyay et al., 1995).

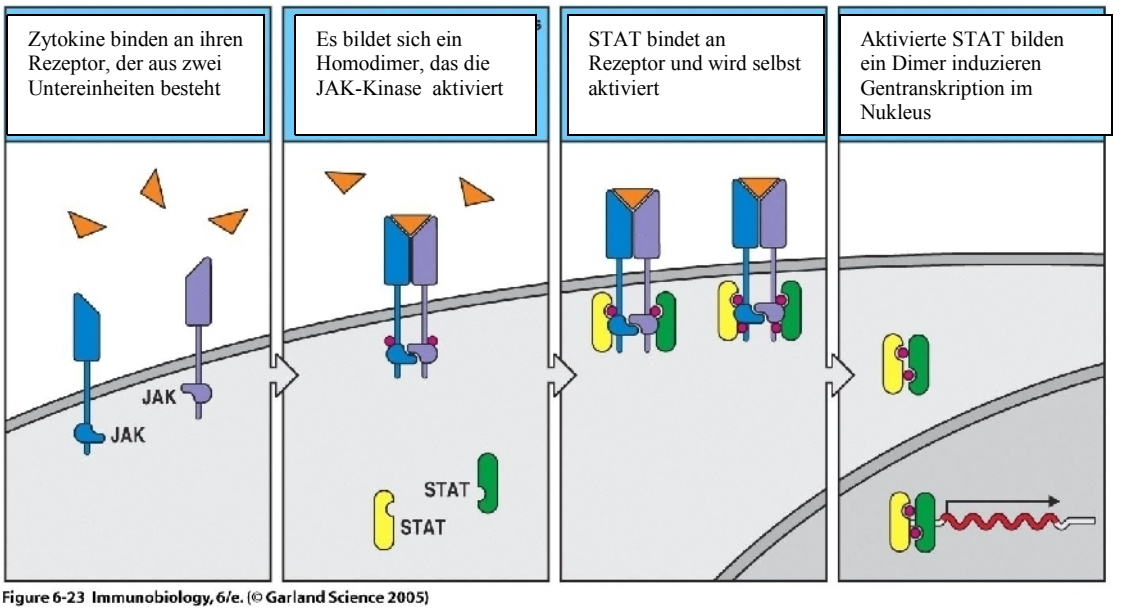


Abb.5: Schematische Darstellung der Signalkaskade nach Binden von IFN γ an seinen Zytokinrezeptor. Entnommen aus Immunology (Elsevier 2005)

Die Aktivierung von STAT und die folgende Transkription von Genen wird als primäre Antwort auf IFN γ bezeichnet.

Die sekundäre Antwort beschreibt die Aktivierung von STAT und die Transkription von Genen, die selber Transkriptionsfaktoren kodieren. Maßgeblich beteiligt an der sekundären Immunantwort sind die IFN Regulatory Factor (IRF), die aus neun verschiedenen Vertretern bestehen. Diese Faktoren, hauptsächlich durch IFN y induzierbar, binden an IFN stimulated response elements (ISRE) –Sequenzen der DNA und sind zusammen mit STAT-1 a an der Regulation vieler Gene beteiligt, deren Genprodukte wichtige Funktionen im Rahmen des Immunsystems übernehmen (Bach et al., 1997).

In dieser Arbeit soll v.a. die Induktion der Indolamin 2,3-dioxygenase durch IFN γ und deren Effekte auf das Immunsystem und das Tumorzellwachstum untersucht werden.

1.1.11 T-Zellen im Kontext von Allergien, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstossung

T-Zellen sind ein wichtiger Bestandteile des Immunsystems und an der Immunabwehr verschiedenster Genese beteiligt. Doch nicht immer schützen die Zellen den Wirtsorganismus. In einigen Fällen schaden sie ihm vielmehr, wie z.B. bei Allergien. Unter Allergien versteht man überschießende Abwehrreaktion des Immunsystems auf bestimmte und normalerweise harmlose Umweltstoffe (Allergene), die sich in typischen, durch entzündliche Prozesse ausgelösten Symptomen äußert. T-Zellvermittelt sind vor allem die Typ-4 Spät-Reaktionen. Diese treten 12-72 Stunden nach Allergenkontakt auf. Allergische Reaktionen vom Spättyp sind maßgeblich dominiert von der Aktivierung allergen-spezifischer T-Zellen und dem nachfolgenden Einwandern von Eosinophilen, Basophilen und Monozyten in die betroffenen

Gewebe (Lunge, Haut). Typische Symptome sind erhöhte vaskuläre Permeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur, Stimulierung der kutanen Nervenendigungen (führt zu Juckreiz), kurz die Auslösung der Symptome einer allergischen Reaktion (Jäger et al., 2000)

Eine andere Form von überschießender Immunantwort stellt die Autoimmunerkrankung dar: T-Zellen sind für die Erkennung von körperfremden Stoffen verantwortlich. Bei Autoimmunkrankheiten greifen sie, anstatt eindringende Fremdkörper, jedoch körpereigene Strukturen an. Dieser Angriff des Immunsystems setzt sich ohne Behandlung in der Regel lebenslang oder bis zur vollständigen Zerstörung des Organs fort. Ursachen für Autoimmunerkrankung sind meist vielfälltig (erbliche Disposition, Umwelteinflüsse, aber auch virale oder bakterielle Infektion, z.B. das rheumatische Fieber nach einer Infektion mit β-hämolysierenden Streptokokken) (Janeway 2005).

Ein letzter wichtiger Aspekt in dieser Reihe ist die Abstoßung von Transplantaten.
Hier unterscheidet man drei Formen:

1. Die "perakute Abstoßung" tritt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der erfolgten Transplantation und der Wiederherstellung des Blutflusses auf. Sie wird durch allospezifische Antikörper oder durch blutgruppenspezifische Antikörper verursacht.
2. Die "akute Abstoßung" beginnt meist innerhalb von Tagen bis Wochen. Meist beruht sie auf zellulärer interstitieller Abstoßung.
3. Die "chronische Abstoßung" kann einige Wochen bis Jahre dauern. CD4-T-Effektorzellen vom TH_1-Typ wandern in die Gefäßwände ein und stimulieren dort Makrophagen und Endothelzellen. Weitere Monozyten wandern ein und differenzieren zu Makrophagen, die TNF-α und IL-1 sezernieren. Es entsteht eine chronische Entzündung der Gefäßwand (Müller 2004/05).

Die Wissenschaft ist ständig auf der Suche nach neuen Möglichkeiten der Immunmodulation, um die negativen Effekte des Immunsystems zu beseitigen. In dieser Arbeit soll ein möglicher Weg der Beeinflussung des T-Zell vermittelten Immunsystems durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase aufgezeigt werden. Ebenso soll in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die IDO nicht nur eine Rolle in der Modulation der körpereigenen Abwehr spielt, sondern, dass sie andererseits einen wichtigen Effektormechanismus in der Bekämpfung pathogener Keime einleitet. Mithilfe der IDO vermittelten Tryptophan-Depletion können Bakterien wie *Staphylococcus aureus* effektiv an ihrer Proliferation und somit der Ausbreitung im Körper gehemmt werden. Unter den Staphylokokken hat *Staphylococcus aureus* nicht nur eine besondere Bedeutung weil er zu den häufigsten Erregern nosokomialer Erkrankungen zählt, sondern auch weil sie immer häufiger Resistenzen gegen Antibiotika aufweisen (Kayser et al., 1997). Diese sogenannten MRSA- bzw ORSA-Stämme stellen ein grosses Problem dar.

Vielleicht bietet an dieser Stelle die IDO einen Lösungsansatz.

1.2 Staphylokokken als Krankheitserreger

Staphylokokken sind grampositive, amotile, nichtsporenbildende und zum Großteil fakultativ anaerobe Kugelbakterien, die sich in dichten Haufen anordnen. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Produktion von Plasmakoagulase werden die Staphylokokken in die stark pathogenen koagulasepositiven und die weniger pathogenen koagulasenegativen Spezies eingeteilt.
Der wichtigste Vertreter der koagulasepositiven Spezies ist *Staphylococcus aureus*. Zu den koagulasenegativen Spezies gehören unter anderem *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* und viele mehr. Bereits 1926 beschrieb J. V. Daranyi den Zusammenhang zwischen der Plasmakoagulaseaktivität der Staphylokokken und ihrer Pathogenität. Das extrazelluläre Enzym Koagulase bindet an Prothrombin und katalysiert somit die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen. Eine ähnliche Wirkung hat der an der Zelloberfläche gebunden Clumpingfaktor. Ein Enzym, das ebenfalls Fibriongen in Fibrin umwandelt. Mithilfe dieser Fibrinausfällung bildet das Bakterium einen Schutzwall und ist so für das Immunsystem nicht angreifbar. Im Rahmen dieser Arbeit soll vor allem der Effekt der IDO auf *Staphylococcus aureus* untersucht werden.

Staphylococcus aureus ist ein in der Natur ubiquitär vorkommendes Bakterium. Als Kolonisationskeim ist er beim Menschen vor allem auf der Haut und in den Atemwegen zu finden, ohne Krankheitssymptome auszulösen, weil das intakte Immunsystem die pathogene Potenz dieses Erregers eindämmt. Zu gefährlichen Erkrankungen kommt es, wenn *Staphylococcus aureus* günstige Bedingungen zum Wachstum und zur Ausbreitung findet, wie z.B. einen immundefizienten Wirtsorganismus. Neben lokalen Haut- und Schleimhautinfektionen, wie z.B. der Impetigo follicularis können sich lebensbedrohliche Pneumonien, Meningitiden, Endokarditiden oder Sepsen entwickeln. Für diese Erkrankungen

stehen dem Bakterium verschiedene Virulenzfaktoren zur Verfügung, wie z.B. eine Polysaccharidkapsel mit Protein A, die das Bakterium vor der Phagozytose schützt oder Enzyme wie Hyaluronidase und Hämolysin, die eine bakterielle Ausbreitung im Gewebe ermöglichen. Darüber hinaus bildet es noch verschiedene Toxine, die z.B. zu Enteritis oder zum Toxic Shock Syndrom führen können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, ob neben den zellulären und humoralen Abwehrmechanismen des Immunsystems IDO vermittelte Abwehrstrategien bestehen, wie z.B. ein zytotoxischer Effekt von Tryptophanmetaboliten auf das Staphylokokkenwachstum. Dies geschah mit der Absicht, neue Erklärungsansätze zum Verständnis der Immunabwehr zu liefern und zusätzlich einen Beitrag in Hinblick auf alternative Behandlungs- bzw Bekämpfungsmöglichkeiten antibiotikaresistenter Staphylokokken zu leisten. Verschiedene Arbeiten haben bereits gezeigt, dass durch IFN γ -aktvierte Tumorzellen Bakterienwachstum gehemmt werden kann (MacKenzie et al., 1998). Dieser bakteriostatische Effekt beruht auf dem Abbau von Tryptophan in der Umgebung des Bakteriums. Durch die IFN γ vermittelte Aktivität des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase wird die essentielle Aminosäure Tryptophan abgebaut und steht den Bakterien nicht mehr für deren Stoffwechsel zur Verfügung. Folge ist eine Hemmung der Proliferation. Dieser antimikrobielle Wirkmechanismus der Tryptophandegradation wurde auch an anderen pathogenen Mikroorganismen nachgewiesen, wie z.B. *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn et al., 1984) und Clamydia psittaci (Byrne et al., 1986).

In dieser Arbeit wurde der Hemmechanismus auf *Staphylococcus aureus* untersucht. Hierfür wurden Entzündungsmodelle angesetzt, in denen *Staphylococcus aureus* als Erreger und Astrozyten als Zielzelle dienten. Anhand dieser Infektionsmodelle wurde die Wirksamkeit des Effektormechanismus IDO gegenüber *Staphylococcus aureus* quantifiziert. Der Mechanismus wird unter 2.2.6 genauer erläutert.

1.3 Indolamin 2,3-dioxygenase

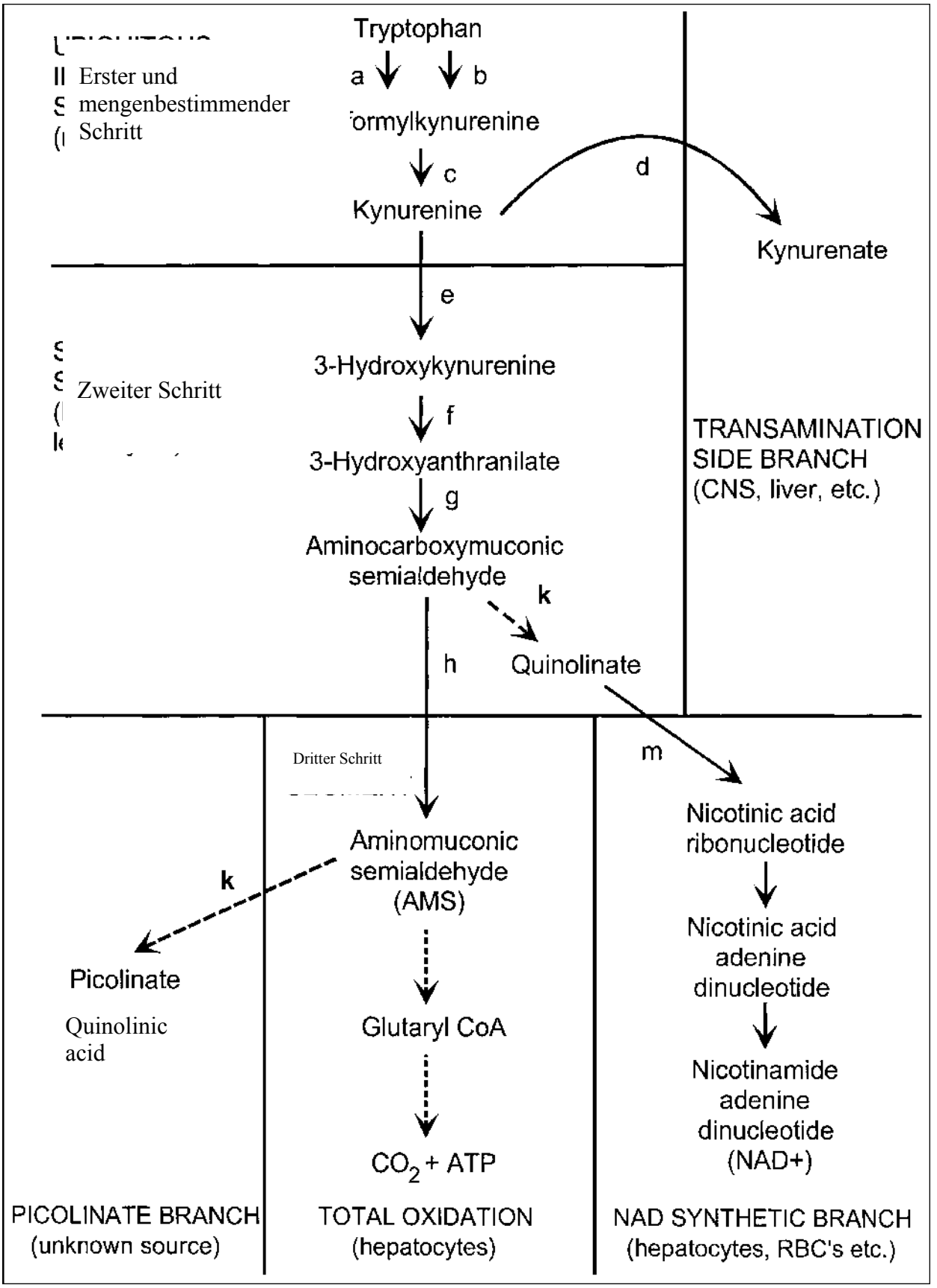
1.3.1 Tryptophan und seine physiologische Bedeutung

L-Tryptophan ist eine Aminosäure, die von allen lebenden Organismen zur Proteinbiosynthese benötigt wird, jedoch nur von einigen wenigen, wie z.B. Pilzen, einigen Bakterien und Pflanzen synthetisiert werden kann. Säugetiere besitzen diese Fähigkeit nicht und sind auf die Aufnahme von Tryptophan durch die Nahrung angewiesen. Aus diesem Grund zählt Tryptophan zu den essentiellen Aminosäuren. Nach der Aufnahme mit der Nahrung wird das Tryptophan von der Leber aufgenommen und zur Proteinbiosynthese verwendet. Überschüssiges Tryptophan, das nicht zur Proteinbiosynthese in der Leber benötigt wird, wird in den Hepatozyten mithilfe der Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) über den Kynurenin-Weg vollständig zu ATP und CO_2 oxidiert oder über das Blutsystem, weiter im Körper verteilt, um in Stoffwechselprozessen außerhalb der Leber genutzt zu werden. Denn Tryptophan ist ein wichtiges Substrat zur Bildung vieler anderer Moleküle im Körper, wie z.B. Serotonin, ein Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem, Melatonin, ein Hormon der Zirbeldrüse und NAD^+ (Nikotinamid Adenin Dinukleotid), ein Kofaktor vieler enzymatischer Prozesse, wie z.B. ATP-Synthese oder DNA-Reparatur (Moffett et al., 2003). Neben seiner Bedeutung in der Proteinbiosynthese und als Substratquelle wurde auch immer häufiger der Einfluß des Tryptophanstoffwechsels auf das Immunsystem und dessen Zusammenhang mit Gesundheit und Erkrankung untersucht.

1.3.2 Der Kynurenin-Weg

Der Abbau von Tryptophan wird von zwei Enzymen bestimmt: der Tryptophan 2,3-dioxygenase und der Indoleamin 2,3-dioxygenase. TDO und IDO unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Struktur, ihre Substratspezifität und ihr Verteilungsmuster im Körper. Die TDO wird nur in der Leber exprimiert und weil Tryptophan ihr einziges Substrat ist, ist die TDO hauptsächlich an der Tryptophan-Homöostase und -Verteilung im Körper beteiligt (s.o.). Im Gegensatz zur IDO, die in unterschiedlichen Geweben und Zellen, z.B. Lunge, Milz, Gehirn, Leukozyten, Endothelzellen, Tumorzellen, u.v.m. exprimiert wird, ist die TDO nicht durch immunologische oder inflammatorische Signale, wie z.B. IFN γ oder LPS induzierbar. Stattdessen kann die TDO durch Tryptophan, verschiedene Glukokortikoide und Insulin aktiviert werden (Salter et al., 1985; Bender et al., 1989). Im Gegensatz zur TDO katalysiert die IDO auch den Abbau von anderen Indolaminen. Dazu gehören Tryptamin, Serotonin und Hydroxytryptophan. Im Tryptophanstoffwechsel katalysieren beide Enzyme den ersten und mengenbestimmenden Schritt im Kynurenin-Weg (Grohmann et al., 2003; Stone et al., 2002). Durch oxidative Spaltung des Indolaminrings des Tryptophans entsteht N-Formyl-Kynurenine (Stone et al., 2002), das durch die Kynurenin-Formylase zu Kynurenin abgebaut wird. Der weitere Abbau von Kynurenin und welche Metabolite nachfolgend entstehen ist abhängig davon, welche Enzyme die unterschiedlichen Gewebe exprimieren in denen der Tryptophanstoffwechsel stattfindet (Saito et al., 1993; Bertazzo et al., 2001; Alberati-Giani et al., 1996).

Entscheidend für diese Arbeit ist jedoch, dass die IFN γ stimulierte IDO-Aktivität zu einer Tryptophanverarmung in der Umgebung führt (Yoshida et al., 1986) und die Entstehung von Metaboliten wie v.a. Kynurenin, Hydroxkynurenin und Hydroxyanthranilsäure fördert.



Erster und mengenbestimmender Schritt

Zweiter Schritt

1.3.3 Das IDO-Gen und die Regulation der Gentranskription

Die IDO ist ein 42 kD großes Enzym mit Häm als prosthetischer Gruppe. Es wird von einem einzigen Gen auf Chromosom 8 kodiert, das sich aus 10 Exons zusammensetzt und sich über 15 kbp DNA erstreckt. Die Gentranskription dieses Enzyms unterliegt starken Kontrollmechanismen und bleibt auf bestimmte Zellen beschränkt. Dazu gehören Fibroblasten, Monozyten, Dendritische Zellen, Endothelzellen und einige Tumorzellen (Taylor et al., 1994). Die IDO Expression wird durch IFN α/β und stärker durch IFN γ vermittelt (Yoshida et al., 1982 und 1986), wobei die Induktion durch IFN γ die Synthese eines Transkriptionsfaktors erfordert, nämlich IRF-1. Diese binden an die entsprechende IDO-Promotorregion, die sich aus ISRE (interferon stimulatory response elements)- und GAS (γ-activating sequences)-Elementen zusammensetzt (Mellor et al., 2004). IFN γ stellt zwar den stärksten Stimulus für die IDO-Expression dar, ist jedoch nicht der einzige und wichtigste. Lipopolysaccharide (LPS), inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF wirken synergistisch mit IFN γ bei der IDO-Expression *in vitro* (Babcock et al., 2000; Robinson et al., 2003).

Da eine konstitutive Expression der IDO durch den Verbrauch der essentiellen Aminosäure Tryptophan toxisch für den Wirtsorganismus wäre, muss die Steuerung des Enzyms strikt geregelt sein. Ob das durch post-translationale Modifikationen des Enzyms, alternatives Splicen, Enzyminhibitoren oder anderen Mechanismen geschieht ist noch nicht vollständig geklärt. Klar ist aber, dass es einen engen Zusammenhang zwischen entzündlichen Reaktionen, IFN γ und der IDO-Expression gibt. Daher soll im Folgenden die Rolle der IDO im Rahmen von Immunreaktionen beschrieben werden.

1.3.4 Bedeutung der IDO als Effektor und Modulator im Immunsystem

Ein signifikanter Unterschied zwischen der IDO und der TDO ist, dass die IDO vor allem durch das pro-inflammatorische Zytokin IFN γ induzierbar ist, während die Aktivität der TDO durch die alimentäre Zufuhr von Tryptophan reguliert wird. Diese verschiedenen Regulationsmechanismen der beiden Enzyme, immunologisch bei der IDO und substrat-spezifisch dietätisch bei der TDO, führten zu der Annahme, dass es physiologischerweise zwei Kontrollmechanismen des Tryptophanstoffwechsel gibt: Den für die Tryptophanhomöostase zuständigen TDO gesteuerten und den immunregulatorischen IDO gesteuerten Mechanismus.

In verschiedenen Studien wurde die Rolle der IDO bei der Abwehr pathogener Erreger untersucht. So zeigte sich, dass eine IFN γ vermittelte IDO-Aktivität das Wachstum von *Toxoplasma gondii in vitro* hemmen konnte (Pfefferkorn et alt., 1984). Erklärt wurde der antimikrobielle Effekt der IDO 1986 von Pfefferkorn mit einer Tryptophanverarmung in der Umgebung des Parasiten. Durch die Induktion der IDO wird das vorhandene Tryptophan abgebaut und steht somit den tryptophan-abhängigen Organismen nicht mehr zur Verfügung. Durch Supplementation mit L-Tryptophan konnte der antiparasitäre Effekt antagonisiert werden.

Weitere Beispiele für Erreger auf die die IDO vermittelte Tryptophan-Depletion einen biostatischen Effekt ausübt sind Chlamydia pneumoniae (Byrne et al., 1986), B-Streptokokken (MacKenzie et al., 1998), Enterokokken (Däubener et al., 1999) und Mykobakterien (Hayashi et al., 2001). Gemeinsam ist diesen pathogenen Keimen, dass sie entweder intrazellulär oder in engem Verhältnis mit der Wirtszelle leben und die Expression der IDO in der Wirtszelle die *in vitro* Replikation des Keims hemmen kann. Ähnliche Mechanismen laufen bei der Abwehr viraler Infektion in einer Wirtszelle ab. Durch Stimulation der IDO konnte *in vitro* die Replikation von Zytomegalie- und Herpesviren

gehemmt werden (Bodaghi et alt., 1999; Adams et alt., 2004). In allen beschriebenen Fällen ist die antiproliferative Wirkung der IDO mit dem Abbau von Tryptophan zu erklären, da durch Zuführen supra-physiologischer Mengen an Tryptophan dieser Effekt aufgehoben werden konnte und die Mikroorganismen wieder proliferierten bzw. sich replizierten (Byrne et al., 1986; MacKenzie et al., 1998; Däubener et al., 1999; Hayashi et al., 2001).

Um sich selber vor dem Effekt der Tryptophan-Depletion zu schützen, exprimiert die Wirtszelle WRS (tryptophanyl-transfer RNA synthetase). WRS ist die einzige RNA Synthetase, die unabhängig vom Tryptophanabbau direkt durch IFN γ induzierbar ist (Frovola et al., 1993) und Tryptophan intrazellulär bindet. Es wurde postuliert, dass eine Überexpression von WRS in Zellen mit hoher IDO-Aktivität einen Kompensationsmechanismus der Wirtszelle für die lokale Tryptophanverarmung darstellt. Tryptophan wird intrazellulär gebunden und steht der Wirtszelle, nicht aber dem Erreger, bei Bedarf zur Verfügung (Frolova et al., 1993; Fleckner, et al., 1995).

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass der biostatische Effekt der IFN γ vermittelten IDO-Aktivität und der konsekutiven Tryptophanverarmung nicht allein auf pathogene Keime beschränkt ist, sondern auch das Wachstum von Tumorzellen hemmt. Auch hier wirkt der Mangel an der essentiellen Aminosäure antiproliferativ (Byrne et al., 1986; Brown et al., 1991). Bestätigt wird diese Tryptophanmangel-These als biostatischer Effekt auf Tumorzellen, indem durch Gabe von Tryptophan dieser Hemmmechanismus wieder aufgehoben werden kann.

Ein anderer entscheidender Schritt in der IDO-Forschung war die Entdeckung von Mellor und Munn, dass die Induktion der IDO nötig ist, um eine T-Zell-vermittelte Abstossung allogener Föten in trächtigen Mäusen zu verhindern (Munn et al., 1998). Durch Expression der IDO in der Plazenta wurde ein tryptophanarmes Umfeld schaffen, in dem T-Zellen nicht proliferieren

können. Eine T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion ist folglich nicht möglich. Bestätigt wurde die Theorie durch Studien, in denen Mellor und Munn den schwangeren Mäusen einen IDO-Inhibitor zufütterten. Dies führte zur T-Zell-vermittelte Abstoßungsreaktion des allogenen Fötus (Mellor et al., 1999). Weitere Studien zeigten daraufhin, dass die IFN γ vermittelte Induktion der IDO in Makrophagen und die resultierende Tryptophan-Depletion antigen-spezifische T-Zellproliferation *in vitro* hemmt (Munn et al., 1999). Ein ähnlicher Effekt konnte bei Tumorzellen beobachtet werden, die eine hohe IDO-Aktivität aufwiesen. Durch exprimieren der IDO konnten Tumorzellen einer T-Zellvermittelten Immunantwort entgehen (Pardoll et al., 2003) und darüber hinaus eine Immuntoleranz gegenüber den tumorspezifischen Antigene induzieren (Taylor et al., 1991; Logan et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003). Da *in vivo* viele humane Tumorzellen IDO exprimieren (Taylor et al., 1991; Uyttenhove et al., 2003; Logan et al., 2002) wurde dieser Mechanismus als Schutz vor der Infiltration und Zerstörung des Tumorgewebes durch T-Zellen postuliert.

Mit ihren Studien hatten Mellor und Munn (1999, 2005) als auch Uyttenhove (2003) gezeigt, dass die IDO sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beteiligt ist an der Suppression der zellulären erworbenen Immunabwehr und der Entwicklung von Immuntoleranz (Mellor et al., 2002).

Da während des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus hohe Konzentrationen von Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure entstehen (Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002), wird in neueren Studien zusätzlich postuliert, dass nicht allein die Tryptophan-Depletion für die Immunsuppression und –toleranz verantwortlich ist, sondern dass auch die entstehenden Tryptophanmetabolite entscheidend beteiligt sind an der Regulation des Immunsystems (Espey et al., 1996; Namboodiri et al., 1996; Frumento et al., 2002; Terness et al., 2002). Diese Beobachtung unterstreicht die Theorie eines Metaboliteneffekts auf das Immunsystems (Fallarino et al., 2002). Ebenso die Entdeckung, dass sich vermehrt toxische IDO-abhängige Metabolite im Gehirn HIV-infizierte Personen finden, ließ die Schlussfolgerung zu, dass Tryptophanmetabolite eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung

von Immuntoleranz spielen (Fuchs et al., 1995; Zangerle et al., 2002) und der Entstehung der AIDS-typischen Neuropathologie beteiligt sind (Kerr et al., 1997; Heyes et al., 1998; Burudi et al., 2002)

1.4 Konzeption der Arbeit

Die in dieser Arbeit untersuchten enzymatischen Aktivitäten, die IDO vermittelte Tryptophan-Depletion und die Entstehung toxischer Metabolite, sind als biostatische und immunregulatorische Mechanismen beschrieben. Ebenso ist die Induzierbarkeit der IDO durch IFN γ bekannt. Mein Interesse ist es, die IDO-Aktivität in verschiedenen Tumorzellreihen nachzuweisen und zum ersten Mal in einer Arbeit die Tryptophan-Depletion als biostatischen Effektormechanismus auf Tumor-, T-Zellen und Bakterien zusammenhängend zu vergleichen. Außerdem soll in Inkubationsversuchen, die Wirkung der Tryptophanmetabolite auf T-Zellen, Bakterien und Tumorzellen beschrieben und anhand von Kinetik- und Vorinkubationsexperimenten dieser Metaboliteneffekt genauer untersucht werden.

Das Hauptziel dieser Arbeit soll sein, einen Überblick über die IDO vermittelten Effekte auf verschiedene Zellreihen zu geben und mithilfe von *in vitro* Untersuchungen, eine theoretische Grundlage für mögliche *in vivo* Abläufe zu liefern. Ich hoffe mit meiner Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der IDO und seiner Metabolite leisten zu können und vielleicht einige Denkanstöße zu weiteren Arbeitshypothesen für die zukünftige Forschung zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Autoklav	Dampf-Autoklav, Melag
CO_2-begaste Brutschränke	B5060 EK/CO_2, Heraeus Binder
Kühlzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Biofuge 13, Heraeus Biofuge fresco
Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
Pipetten	Finnpipetten, Labsystems
Pipettierhilfe	Pipetboy, Biosciences
Schüttler	Polymax 1040, Heidolph
Sterile Werkbank	BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories
Ultrazentrifuge	Optima-L60, Beckmann
Wasserbad	Laktotherm 1, Dinkelberg; W 6, Preiss-Daimler
Zählkammer	Neubauer
Liquid Scintillation Counter Basic96 Harvester	LKB Wallac, 1205 Betaplate Skatron
Waage	Chyo JL-180 von Balance Corp. Japan

2.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Combitips	10 µl Dispensertips: Eppendorf 100 µl Dispensertips: Brand
Cryotube	Nunc
Multiwellplatten steril	Costar
Multiwellplatten unsteril	Greiner
Petrischalen	Greiner
Pipettenspitzen gestopft	Biozym
Pipettenspitzen ungestopft	Polylab

Reaktionsgefäße 1,0 u. 1,5 ml	Eppendorf
Sterilfilter	Millipore, Sterivex
Zellkulturflaschen 25 u. 75 cm^2	Costar
Zellschaber	Greiner
Zentrifugenröhrchen 15 u. 50 ml	Greiner
Dialyseschlauch (Vol.: 2ml/cm; Flat Width: 25+/- 2mm; Diameter: 16 mm)	Spectrum (Spectra/Por molecularepоrous membrane)
Butterfly	Venofix Luer Lock 19 G von Braun
Spritzen 20 ml 50 ml	 Omnifix Luer Lock Solo von Brand Perfusor-Spritze OPS Luer Lock von Brand

2.1.3 Chemikalien

2.1.3.1 Chemikalien und Lösungen für die Zellkulturen

Alle prozentualen Angaben sind, wenn nicht anders erwähnt, (w/v)-Angaben Laborchemikalien und Farbstoffe wurden erhalten von: Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma-Aldrich, Steinheimen; Moravek Biochemicals, Brea, California; GE Healthcare Uppsala, Schweden.

Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	BioWhittaker/ Cambrex, Potsdam
Fetales-Kälber-Serum (FCS)	BioWhittaker / Cambrex, Potsdam
Trypsin/EDTA-Lösung 0.05/0.02% (w/v)	 Gibco (Invitrogen), Karlsruhe

RPMI 1640-Medium w/o Tryptophan	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Trypsin/EDTA-Lösung 0,05/0,02% (w/v)	Seromed, Berlin
Heparin	Boehringer Ingelheim
Ficoll-Hypaque	Amersham Pharmacia Biotech
Tritium	Moravek Biochemicals
Methyl-Thymidine	Moravek Biochemicals
Toxoplasma Lysat Antigen (TLA) (1000 µg/ml)	Sigma-Aldrich , Steinheim
Humaner Anti CD3 (OKT3)	Sigma-Aldrich , Steinheim
Phytohämagglutinin (PHA) (100ug/ml)	Sigma-Aldrich , Steinheim
Staphylococcus aureus Enterotoxin B (SEB) (1000 ng/ml)	Sigma-Aldrich , Steinheim

Ehrlich's Reagenz	p-Dimethylaminobenzaldehyd (Sigma-Aldrich , Steinheim) gelöst in 96% Essigsäure (12 mg/ml)
Methylenblau-Lösung	0,5 M Natriumacetat pH 5,2; 0,04% Methylenblau Sigma-Aldrich , Steinheim
PBS pH 7.3	0,8% Natriumchlorid; 0,02% Kaliumchlorid; 0,135% Dinatriumhydrogenphosphat; 0,025% Kaliumhydrogenphosphat Gibco (Invitrogen), Karlsruhe
Trypanblau	0,16% Trypanblau; 0,85% Natriumchlorid in Aqua dest. Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3.2 Zytokine

Rekombinantes humanes Interferon γ wurde von R&D Systems, Wiesbaden bezogen.

2.1.3.3 Chemikalien

L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Kynurenine	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Hydroxy-DL-Kynurenine	Sigma-Aldrich, Steinheim
3-Hydroxyanthralinic acid	Sigma-Aldrich, Steinheim
2,3-Pyridinedicarboxylic acid (Quinolinic acid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Anthranilic acid	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.3.4 Bakterien-Medien und Antibiotikum

LB Broth Base	1%(w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,5% (w/v) Natriumchlorid, pH 7-7,5; (Gibco BRL)
LB-Agar	LB-Medium + 1,5% Agar für feste Nährboden
Ampicillin	Sigma (Endkonzentration von 50mg/ml)

2.2 Methoden

Es wurde grundsätzlich unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden. Die verwendeten Medien wurden steril geliefert und die Materialien vor Gebrauch autoklaviert (121°C, 100 kPa für 25 min) oder trockensterilisiert (200 °C). Gearbeitet wurde an einer sterilen Werkbank (BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories). Alle funktionellen Tests wurden in 96-Well Rundboden-Mikrotiterplatten (Costar) angesetzt. Das Endvolumen in den Vertiefungen betrug, wenn nicht anders angegeben, immer 200 µl. Alle Cytokine und Chemikalien wurden in Iskove`s Medium suspendiert. Ausnahme waren Tryptophan und seine Metabolite als auch die verschiedenen Mitogene, die in RPMI-Medium (w/o Tryptophan) suspendiert wurden. Die Suspension der Cytokine, Chemikalien und Mitogene wurden in einem Volumen von 50 µl, die der Tumorzellen und PBLs in 100 µl in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten zugegeben. Wurde das Volumen von 200 µl pro Well nicht erreicht, wurde das fehlende Volumen mit entsprechendem Medium aufgefüllt. Bei den angegebenen Konzentrationen von Cytokinen und Chemikalien handelt es sich um Endkonzentrationen.

2.2.1 Herstellen und Lagerung von 3HT, Mitogenen, Metaboliten, Zytokinen und dialysiertem FCS

2.2.1.1 Methyl-^{3}H-Thymidine

Methyl-^{3}H-Thymidine wird in einem Verhältnis von 1:50 mit IMDM-Medium verdünnt und in 25ml Röhrchen der Firma Greiner aliquotiert. Gelagert wurde das ^{3}HT bei -20°C im Gefrierschrank. Zum Gebrauch wurde es bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurde

es bei 4 °C im Kühlschrank gelagert Die Konzentration von ^{3}HT beträgt 1.0 mCi/ml; 4 µg/ml in einer Verdünnung von 1:50. Das Zugabevolumen pro Well betrug 10 µl.

2.2.1.2 Metabolite

Die in Pulverform vorliegenden Metabolite wurden in RPMI-Medium (w/o Tryptophan) im Wärmebad bei 50°C aufgelöst und anschließend in 25 ml Spritzen aufgezogen, über Sterilfilter steril in 15 ml Greiner Röhrchen aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Konzentration im Röhrchen betrug für Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3 Hydroxy-Anthralinsäure 1mg/ml; für Anthralinsäure und Quinolinsäure 2mg/ml und für Tryptophan 4 mg/ml. Für entsprechende Versuche wurden die Metabolite bei Raumtemperatur aufgetaut und auf die nötigen Endkonzentrationen im Well verdünnt. Zur Verdünnung und Zugabe der Metabolite wurde RPMI-Medium (w/o Tryptophan) verwendet.

2.2.1.3 Dialyse des FCS

Zur Dialyse des FCS wird der Dialyseschlauch der Firma Spectrum mit FCS gefüllt und in PBS gelegt. Das PBS wird dreimal gewechselt. Anschließend wird das FCS durch Millipore Sterilfilter der Firma Sterivex filtriert und in 15ml Röhrchen der Firma Greiner steril aliquotiert.

2.2.1.4 Mitogene

Die Mitogene wurden bei -70°C in Cryotubes der Firma Nunc gelagert. Für jeden Versuch wurde das benötigte Volumen bei Raumtemperatur aufgetaut und auf die nötige Endkonzentration verdünnt. Die Konzentration im Cryotube betrug von SEB 1000 ng/ml, von PHA 100 µg/ml und von TLA 1000 µg/ml. Wenn nicht anders angegeben wurden die Mitogene in 50 µl RPMI-Medium (w/o Tryptophan) in die Vertiefung der Multiwellplatten pipettiert. Die Endkonzentration im Well betrug von OKT3 1:3000; von SEB 10 ng/ml; von PHA 2 µg/ml und von TLA 1 µg/ml.

2.2.2 Herstellung von Überständen stimulierter und nicht-stimulierter Zellen

Zur Herstellung der Überstände wurden $5x10^6$ Tumorzellen pro $75cm^2$ Zellkulturflaschen der Firma Costar eingesetzt. Insgesamt wurden drei Flaschen angesetzt. In die erste Flasche wurden nur die Zellen mit 20 ml Medium (IMDM + 5% FCS) kultiviert. In der zweiten Flasche wurde 20 ml Medium (IMDM + 5% FCS) zu den Tumorzellen gegeben und anschließend mit IFN γ (500 U/ml) stimuliert. In einer dritten Flasche wurde 20 ml Medium (IMDM + 5% FCS) zu den Tumorzellen gegeben. Danach wurde dieses Medium zusätzlich mit Tryptophan (100 µg/ml) supplementiert und anschließend mit IFN γ (500 U/ml) stimuliert. Danach wurden alle drei Flaschen im Brutschrank inkubiert. Durch die Zugabe von IFN γ in die zweite Zellkulturflasche wurde die IDO-Aktivität der Tumorzellen stimuliert und das Tryptophan in der Kultur abgebaut. Hierbei entstand der Tryptophanmetabolit Kynurenin. Um eine höhere Konzentration von Kynurenin zu erhalten wurde die dritte

Flasche zusätzlich mit Tryptophan supplementiert. Hierdurch erhielten wir drei verschiedene Überstände: In der ersten Flasche Überstand unstimulierter Zellen, in dem sich normales tryptophanhaltiges Medium befand. In der zweiten Flasche Überstand stimulierter Zellen, in dem das gesamte Tryptophan abgebaut ist und in der dritten Flasche Überstand stimulierter Zellen, in dem das gesamte Tryptophan abgebaut ist und zusätzlich eine hohe Konzentration des Tryptophanmetaboliten Kynurenin erzeugt wurde. Erst als das Tryptophan in der zweiten und dritten Flasche vollständig zu Kynurenin abgebaut war, wurden die drei Überstände aus den Flaschen pipettiert und in separate 50 ml Röhrchen der Firma Greiner überführt. Die Röhrchen wurden anschliessend im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Überstände wurden für die unter 2.2.16 beschriebenen Proliferationsversuche verwendet. Die Messung des Tryptophanabbaus anhand des entstandenen Kynurenins erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.
Als Kontrollen wurde eine Flasche nur mit Medium ohne Zellen, eine Flasche mit Medium ohne Zellen und mit 500 U/ml INF γ und eine Flasche nur mit Medium mit INF γ und 100 mg L-Tryp / ml ohne Zellen

2.2.3 Zellen

2.2.3 Periphere Blutleukozyten/lymphozyten

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PBLs wurden aus venösem Vollblut von gesunden Spendern gewonnen. Diese Zellen dienten zur Untersuchung, ob der Abbau von Tryptophan in der Zellkultur und die dabei entstehenden Reaktionsprodukte einen antiproliferativen Effekt auf das Zellwachstum haben.

2.2.3.2 Tumorzellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Zelllinien verwendet. Die 86HG39-Zellen sind humane Glioblastomzellen, die im Institut für Neuropathologie der HHU Düsseldorf isoliert wurden. Die Zell-Linie wurde von T. Bilzer und Mitarbeitern immunhistologisch und morphologisch charakterisiert (Bilzer et al, 1991). Im Rahmen dieser Arbeit war wichtig, dass diese Zelle nach Stimulation mit IFN γ eine starke IDO-Aktivität entwickelt und es wurde untersucht, ob Tryptophanmetabolite einen antiproliferativen Effekt auf diese Zelle haben. Die HBMEC (human brain microvascular endothelial cells) wurden uns von Professor Kwang Sik Kim (John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden aus einer Hirnbiopsieprobe, die bei einer Patientin nach Epilepsiechirurgie entnommen wurde, isoliert. Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften dieser Zelllinie wurden bereits ausreichend beschrieben (Stins et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit war wichtig, dass diese Zelle nach Stimulation mit IFN γ eine starke IDO-Aktivität entwickelt und es wurde untersucht, ob Tryptophanmetabolite einen antiproliferativen Effekt auf diese Zelle haben.

Die Zelllinie A 549 (ATCC CCL 185) stammt aus einem humanen Lungenkarzinom und wurde 1973 von *D.J. Giard* et al. etabliert und 1976 von *M. Lieber et al.* eingehend beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit war wichtig, dass diese Zelle nach Stimulation mit IFN γ eine starke IDO-Aktivität entwickelt und es wurde das Verhalten der Zellen nach Inkubation mit Tryptophanmetaboliten untersucht.

2.2.3.3 Bakterien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterien waren Staphylokokken des Stammes *Staphylococcus aureus*. Es handelte sich bei allen Bakterien um Isolate aus der Uniklinik Düsseldorf. Sie wurden auf „brain heart infusion agar“ (Difco, Hamburg) mit 5% Schafblut bei 37°C kultiviert und auf Hemmbarkeit durch Tryptophanabwesenheit getestet.

2.2.4 Zellernte

2.2.4.1 PBL-Präparation aus venösem Vollblut

60 ml venöses Vollblut wurde in Perfusor-Spritzen der Firma Braun aufgezogen und durch Zugabe von 0.5 ml Heparin ungerinnbar gemacht. Danach wurde das Blut aus der Spritze auf vier 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Die 15 ml Vollblut in jedem Röhrchen wurden mit jeweils 15 ml PBS aufgefüllt und anschließend mit 15ml Ficoll- Hypaque unterschichtet. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 2400 U/min und 19°C wurde der Überstand in den Röhrchen bis zur Interphase mit einer Pasteurpipette abgesaugt und verworfen. Mit einer 5ml Pipette wurde dann die Interphase, die sichtbare weiße Schicht mit den mononukleären Zellen, bis zum Blutkuchen abgesaugt und in ein 50 ml Röhrchen überführt, mit 40 ml PBS resuspendiert und bei 1800 U/min bei 19°C für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment aller vier Röhrchen in PBS resuspendiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 U/min und 19°C für 10 min zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgesaugt und das Sediment erneut mit 50 ml PBS resuspendiert und 800 U/min und 19°C für 10 min zentrifugiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in 5-10 ml Medium resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit Trypanblau geeignet verdünnt und das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.

2.2.4.2 Kultivierung und Ernte der Zelllinien HBMEC, A549, 86HG39

Die Zellen dieser Linien wurden in liegenden 75cm^2 Zellkulturflaschen der Firma Costar in Heraeus-Brutschränken bei 37 °C in befeuchteter und mit 10% CO_2 angereicherter Atmosphäre in 15 ml Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium kultiviert. Das Medium wurde zudem mit 5% FCS (v/v) angereichert. Durch das Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem des Kulturmediums wird eine pH-Konstanz gewährleistet. Die Teilungsrate der Zellen betrug, unter der Voraussetzung eines ausreichenden Nährstoffangebots und Nichterreichens einer konfluierenden Einzelschicht, 1-3 pro Tag. War durch das Wachstum der Zellen eine konfluierende Einzelschicht erreicht, wurden die Zellen geerntet. Da die starke Adhärenz der Zellen ein Ablösen dieser durch Resuspendieren des Kulturmediums verhinderte, wurden nach Entfernung des Kulturmediums und einmaligen Spülens mit PBS ca. 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für etwa 5 Minuten zu den Zellen gegeben. Das Trypsin bewirkt ein Andauen und Ablösen der Zellfortsätze vom Flaschenboden und ein Abrunden der Zellen. Anschließend wurden sie unter Verdünnung und Neutralisierung des Trypsins mit 10 ml Iscove's Medium mit FCS aus der Kulturflasche geerntet und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation für 10 min. bei 1200 U/min und 4 °C und zwei Wasch-Schritten mit PBS wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5-10 ml Medium resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit Trypanblau geeignet

verdünnt und das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden 1-2 ml der Zelllösung in die alte Kulturflasche mit 15 ml frischem Medium überführt.

2.2.4.2.1 Bestrahlen der Tumorzellen

Um die Tumorzellen am Wachstum zu hindern und somit die Zahl der Tumorzellen bei $3x10^4$ Zellen pro Well konstant zu halten, wurden die Zellen durch γ-Strahlung (Caesium ^{137}) in ihrer Eigenproliferation unterdrückt. Hierfür wurden die Zellen wie oben beschrieben geerntet und anschließend in ein 15ml Röhrchen überführt und mit 100 Gy im Gammacell 1000 Elite der Firma MDS Nordion für 36,16 min. bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 U/min. für 10 min. und bei 4˚ Grad zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit Trypanblau geeignet verdünnt und das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden $3x10^4$ Zellen pro Vertiefung in 96 Multiwellplatten ausgesäht. Jeweils ein Viertel der Zellen wurden dann nur mit Tryptophan, nur mit 500 U/ml IFN γ oder mit IFN γ und L-Tryptophan stimuliert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde den unterschiedlich stimulierten Zellen jeweils in 50 µl Zugabevolumen entweder PBLs oder Tumorzellen der Reihe A549, 86HG39 oder HBMEC hinzupipettiert. Dabei wurden die Tumorzellen jeweils zu $3x10^4$ Zellen pro Well und die PBLs zu jeweils $1.5x10^5$ Zellen pro Well ausgesäht. Außerdem wurden die PBLs zusätzlich mit OKT3 zur Proliferation stimuliert. Nach drei Tagen Inkubation wurde das Wachstum der zugegebenen Zellen, wie unter 2.2.8 beschrieben, bestimmt.

2.2.5 IDO-Aktivitätsmessung

Alle funktionellen Tests wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Costar) angesetzt. Das Endvolumen in den Vertiefungen betrug, wenn nicht anders erwähnt, immer 200 µl. Alle eingesetzten Cytokine und Chemikalien wurden in Iscove's Medium gelöst. Bei den angegebenen Konzentrationen von Cytokinen und Chemikalien handelt es sich immer um die für den Test erforderlichen Endkonzentrationen. Für die IDO-Aktivitätsmessung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von rekombinantem humanen Interferon γ von 1000 U/ml bis 0 U/ml (Kontrolle) vorgelegt, jeder Wert als Dreifachbestimmung. Dann wurden 3x 10^4 Zellen pro Vertiefung in 50 µl Medium zugegeben. Um den Test mit Substrat anzureichern, wurde noch L-Tryptophan in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Das Kulturmedium selbst enthielt ca. 15 µg/ml Tryptophan. Die Anreicherung diente dem Zweck, möglichst viel von dem Endprodukt Kynurenin zu erhalten, um die IDO-Aktivität gut darstellen zu können und die photometrische Auswertung zu erleichtern. Die Testansätze wurden für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 160 µl des Überstandes in eine Spitzbodenplatte pipettiert und 10 µl Trichloressigsäure (30%) zugesetzt, um vorhandene Proteine auszufällen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in einem 50 °C warmen Wasserbad. Die ausgefällten Proteine wurden 10 Minuten bei 1800 U/min abzentrifugiert. Dann wurden 100 µl des Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt und mit 100 µl Ehrlich's Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 492 nm im ELISA-Photometer (SLT Labinstruments, Crailsheim) gemessen.

Ehrlich's Reagenz reagiert mit Kynurenin zu einem gelben Azofarbstoff. Die Stärke der Absorption bei 492 nm repräsentiert die Menge an gebildetem Kynurenin (Däubener et al., 1994) Um die Absorptionswerte in eine Kynureninkonzentration umrechnen zu können, wurde ein Kynureninstandard erstellt. Zu diesem Zweck wurde Kynurenin in Iscove's Medium gelöst und in einer Flachbodenplatte eine Verdünnungsreihe erstellt, beginnend bei

200 µg/ml Kynurenin bis 0 µg/ml Kynurenin (Kontrolle). Das Volumen pro Vertiefung betrug 200 µl und die einzelnen Konzentrationen wurden wiederum als Dreifachbestimmung vorgelegt. Je 160 µl der einzelnen Ansätze wurden nun in eine Spitzbodenplatte übertragen. Nach dem Zusatz von 10 µl Trichloressigsäure (30%) erfolgte die 30 minütige Inkubation in einem 50 °C warmen Wasserbad. Nach einer Zentrifugation der Ansätze bei 1800 U/min konnten 100 µl des gewonnenen Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt werden und mit 100 µl Ehrlich's Reagenz versetzt werden. Die Auswertung erfolgte wiederum im ELISA-Photometer. Anhand der gewonnenen Standardkurve konnten nun die Ergebnisse der einzelnen IDO-Aktivitätstests in Kynureninkonzentrationen umgerechnet werden.

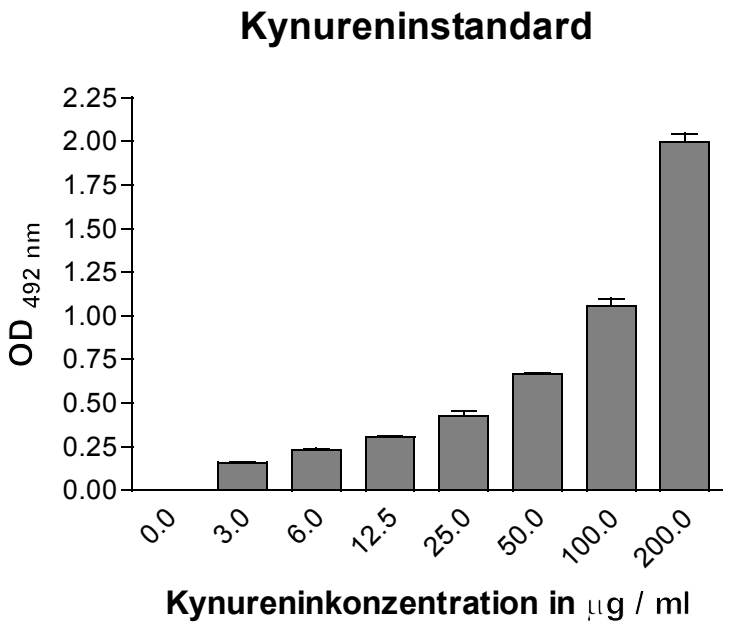


Abb. A1: Kynureninstandard
Durch eine Verdünnungsreihe von Kynurenin und anschließende Behandlung wie bei einer IDO-Aktivitätsmessung konnte der hier abgebildete Standard erstellt werden. Mit seiner Hilfe war es möglich, die Werte für die optische Dichte, die bei den IDO-Aktivitätstests anfielen, in die Konzentration an produziertem Kynurenin, angegeben in µg/ml, umzurechnen

2.2.6 Bakterienwachstum im Testsystem

Um festzustellen wie sich die IDO Aktivität auf das Wachstum von Bakterien auswirkt, wurden die in der IDO-Aktivitätsmessung beschriebenen Testsysteme, jedoch ohne Zusatz von Tryptophan, nach dreitägiger Inkubation mit *Staphylococcus aureus* versetzt. Dazu wurden zwei Kolonien in 1 ml RPMI 1640 Medium (w/o Tryptophan) suspendiert. Diese Suspension wurde in 5 Schritten jeweils 1:10 verdünnt, ebenfalls in RPMI Medium (w/o Tryptophan), um den Test nicht nachträglich Tryptophan zuzuführen.Von der vierten Verdünnungsstufe wurden 10 µl in jede Vertiefung der Testplatte pipettiert. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Bakterienwachstum bei 620 nm im ELISA-Photometer bestimmt. Um die Anzahl der eingesetzten Bakterien zu ermitteln, wurden 10ul aus jeder Verdünnungsstufe als Doppelbestimmung auf einer Blutagarplatte pipettiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die gebildeten Kolonien ausgezählt. Die Bakterienzahl in der Verdünnungsstufe 4 lag immer zwischen 5 und 50 cfu.

2.2.7 Bestimmung der Zellproliferation in Testsytemen stimulierter bzw. nicht-stimulierter Tumorzellmedien

2.2.7.1 T-Zellen

Zur Bestimmung des T-Zellwachstums in stimulierten tryptophanarmen Medien wurden pro Vertiefung einer 96 Wellplatte $3x10^4$ Tumorzellen der Linie A549 in IMDM-Medium gelöst vorgelegt. Die A549-Zellen wurden zuvor durch Bestrahlung mit 100 Gy am Wachstum gehemmt (siehe 2.2.4.2.1). Anschließend wurden in zwei drittel der angesetzten Wells die A549 jeweils mit 500 U/ml IFN γ inkubiert, so dass durch Stimulation deren IDO-Aktivität

das im Well vorhandene Tryptophan abgebaut wurde. Um den Zeitpunkt festzustellen an dem das Tryptophan in den Wells durch die IDO vollständig abgebaut ist, wurde eine Reihe für die Messung der IDO-Aktivität angelegt und wie unter 2.2.5 beschrieben gemessen. Nach Abbau des Tryptophans wurde zu den stimulierten und unstimulierten Ansätzen jeweils $1.5x10^5$ PBL-Zellen hinzupipetiert. Um eine mögliche Reversibilität des antiproliferativen Effekts zu untersuchen, wurde die Hälfte der Wells mit PBLs in den IFN γ stimulierten Medien zusätzlich mit Tryptophan supplementiert. Als Proliferationsstimulus für die T-Zellen diente OKT3, TLA, PHA bzw. SEB, die jeweils in den oben beschriebenen Endkonzentrationen zugegeben wurden. Es wurden Dreifachwerte angesetzt. Als Positivkontrolle diente das OKT3, TLA, SEB bzw. PHA induzierte Wachstum von T-Zellen in unstimuliertem Medium. Nach dreitägiger Inkubation wurde das T-Zellwachstum wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

2.2.7.2 Tumorzellen

Zur Bestimmung des Tumorzellwachstums wurden wie oben beschrieben $3x10^4$ Tumorzellen der Linie A549 vorgelegt, die zuvor durch Bestrahlung mit 100 Gy am Wachstum gehemmt wurden (siehe 2.2.4.2.1) . Jeweils ein Drittel der Zellen in der Mikrotiterplatte wurde nur in IMDM-Medium angesetzt. Zwei drittel wurden in IMDM-Medium angesetzt und zusätzlich mit 500 U/ml IFN γ stimuliert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde den unterschiedlich stimulierten Zellen jeweils $3x10^4$ Tumorzellen hinzupipettiert. Zusätzlich wurde die Hälfte der Tumorzellen, die in IFN γ stimulierten Medium ausgesäht wurden, mit Tryptophan supplementiert. Es wurden Dreifachwerte angesetzt. Als Kontrolle wurde das Tumorzellwachstum in mit 5% FCS

angereichertem Iscoves Modified Dulbecco's Medium (IMDM) gemessen. Nach dreitägiger Inkubation wurde das Tumorzell-Wachstum wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

2.2.8 Messung der Zellproliferation

Im Folgenden wird die Messung des Zellwachstums aller in dieser Arbeit verwendeten Zellen beschrieben, insofern es keine Abweichungen unter den einzelnen Zellarten gibt. Nach 72 stündiger Inkubation der Zellen im Brutschrank wurden jeweils 10 µl ^{3}HT (1.0 mCi/ml; 4 µg/ ml) der Firma Moravek Biochemicals pro Vertiefung der Multiwellplatte zu den Zellen pipettiert. Dann wurden die Platten mit den markierten Zellen für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschliessend bei -20°C tiefgefroren. Nach 24 Stunden wurden die Platten bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut. Durch die Verbindung von Tritium(^{3}H) mit Methyl-Thymidine zu ^{3}HT kann der schwache β-Strahler Tritium mit Thymidine als DNA-Prekursor in die DNA proliferierender Zellen während der Inkubation im Brutschrank eingebaut werden. Durch das Tieffrieren und anschließende Auftauen brechen die Zellen auf, was zur Folge hat, dass nun die ^{3}HT-haltige DNA frei im Well vorliegt. Lässt man den Inhalt der Wells über den Harvester durch einen Glasfaserfilter laufen, bleibt die freiliegende DNA im Filter hängen und die β-Strahlung des in der DNA gebundenen Tritium kann mit Hilfe der Szintilisationsflüssigkeit, die das Signal verstärkt, im Counter gemessen werden. Anhand der Strahlung wurde im ß-Counter die Zellproliferation gemessen.

2.2.9 T-Zellen und Metabolite

Für diesen Test wurden die PBLs wie unter 2.2.4.1 beschrieben gewonnen. Anschließend wurden $1.5x10^5$ Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht und mit OKT3, SEB, PHA oder TLA zur Proliferation stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit jeweils einer Titrationsreihe von Tryptophan, Kynurenin, Hydroxykynurenin, Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure inkubiert. Hierzu wurden Dreifachwerte angelegt, in denen jeweils einer der sechs Metabolite in drei waagerecht aufeinanderfolgende Wells angesetzt und dann in einer Verdünnungsreihe von 1:2 auspipettiert wurde, so dass der Metabolit jeweils in folgenden Endkonzentration vorlag: 400/200/100/50/25/12/6 bzw. 3 µM. Als Kontrolle wurde eine Reihe Zellen nur in Medium und eine Reihe mit Medium und Stimulus supplementiert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zellproliferationsmessung wie unter 2.2.8 beschrieben.

2.2.10 Bakterien und Kynurenin

Kynurenin wurde in IMDM mit 5% FCS gelöst. In einer 96er Well Platte wurde Kynurenin in unterschiedlichen Endkonzentrationen von (400 µg/ml) bis (6 µg/ml) in einem Endvolumen von 200 µl pro Well eingesetzt. Es wurden Dreifachwerte angesetzt. Als Positivkontrolle wurde ein Dreierwert nur mit Staphylokokken ohne Kynurenin angesetzt. Anschließend wurde *Staphyloccocus aureus* in einer Verdünnung von 1:100.000 in 10 µl (zwei Kolonien von einer Agarplatte in 1 ml Medium, resuspendieren, Verdünnungsreihe) zugegeben. Nach 24 stündiger Inkubation bei 37 Grad Celsius im Brutschrank, erfolgte die Proliferationsmessung im ELISA-Reader bei 620 nm.

2.2.11 Metabolitentitration

Um die minimale Hemmkonzentration der Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthralinsäure zu bestimmen wurden diese Metabolite von 3 bis 400 µM auf einer Mikrotiterplatte austitriert. Auf einer zweiten Platte wurde zum Vergleich eine Titrationsreihe von Tryptophan, Anthranilsäure und Quinolinsäure angesetzt. Für diesen Versuch wurden PBLs wie unter 2.2.4.1 beschrieben gewonnen und ausgezählt. Anschliessend wurden $1.5x10^5$ Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht und mit OKT3 stimuliert. Es wurden dreifach Ansätze angelegt, indem jeweils einer der sechs Metabolite in drei waagerecht aufeinander folgende Wells auspipettiert wurde. Die Metabolite wurden senkrecht von der höchsten Konzentration (400 µM) bis zur niedrigsten Konzentration (3 µM) auspipettiert. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter T-Zellen gemessen. Danach wurden die Platten für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Zellwachstum wurde wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

2.2.12 Antagonisieren des Metaboliteneffekts

In diesem Versuch wurde untersucht, ob der Hemmefekt der Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthralinic Acid durch Zugabe von Tryptophan aufgehoben werden kann. Hierfür wurden die PBLs gewonnen, gezählt, auspipettiert und stimuliert wie unter 2.2.11 beschrieben. Es wurden insgesamt drei Mikrotiterplatten mit stimulierten T-Zellen angesetzt. Jede Platte wurde in zwei Hälften geteilt. Es wurden dreifach Ansätze angelegt. Auf der linken Hälfte wurden alle stimulierten Zellen nur mit der Titrationsreihe

eines der hemmenden Metaboliten angesetzt. Auf der rechten Hälfte wurde zusätzlich zu der Titrationsreihe des jeweiligen Metaboliten noch 100 µg/ml Tryptophan in jedes Well pipettiert. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter T-Zellen gemessen. Danach wurden die Platten für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Das Zellwachstum wurde wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

2.2.13 Vorinkubation

Für diesen Versuch wurden die PBLs gewonnen wie unter 2.2.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die PBLs auf sieben 50ml Röhrchen der Firma Greiner verteilt. In jedes Röhrchen wurden $5x10^6$ PBL-Zellen in 1.5ml IMDM-Medium pipettiert und die Zellen mit jeweils einem Tryptophanmetaboliten (400 µM) inkubiert. Der jeweilige Metabolit wurde in 0.5 ml RPMI-Medium hinzugegeben, so dass das Endvolumen im Röhrchen 2ml betrug. Als Kontrolle wurde ein Röhrchen nur mit $5x10^6$ Zellen in 2 ml IMDM-Medium angesetzt. Als zweite Kontrolle wurde eine 96 Mikrotiterplatte wie unter 2.2.11 beschrieben angesetzt. Dann wurden die Zellen in den Röhrchen jeweils für 1 Stunde, 6 oder 12 Stunden mit dem Metaboliten im Brutschrank vorinkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die entsprechenden Röhrchen aus dem Brutschrank genommen und mit IMDM-Medium auf 10 ml aufgefüllt und bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschliessend wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in frischem IMDM-Medium resuspendiert und wieder bei 1200 U/min für 10 min zentrifugiert. Nach dem dritten und letzten Waschschritt wurde das Medium abpipettiert und das Pellet in 2ml IMDM-Medium aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit Trypanblau geeignet verdünnt und das Gemisch in eine Neubauer-

Zählkammer pipettiert. Danach wurden die Zellen zu je $1.5x10^5$ Zellen in 100 µl IMDM-Medium pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht. Als Wachstumstimulus wurde OKT3 (1:3000) oder SEB (10 ng/ml) in 100 µl IMDM die Vertiefungen zu den Zellen pipettiert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit ^{3}HT gepulst und nach 24stunden bei -20°C weggefroren. Die Messung erfolgte wie unter 2.2.8 erläutert.

2.2.14 Zugabekinetik

In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurden jeweils $1.5x10^5$ PBLs ausgesäht. Insgesamt wurden vier Platten angesetzt. Anschließend wurde das Wachstum der Zellen mit OKT3 (1:3000) stimuliert. Die Platten mit den stimulierten Zellen wurden zur Inkubation in den Brutschrank gestellt und nur für die Zugabe der Metabolite herausgenommen. Als wachstumshemmende Metabolite wurden in diesem Versuch Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilic Acid eingesetzt. Zusätzlich wurde jeweils eine Reihe für Tryptophan, Anthranilic Acid und Quinoloinic Acid angesetzt. Die erste Platte wurde direkt am Tag des Ansatzes nach der Stimulation mit OKT3 (d0) mit der Titrationsreihe der sechs Metabolite versetzt. Die zweite Platte am ersten Tag (d1), die dritte am zweiten Tag (d2) und die vierte am dritten Tag (d3) nach Stimulation mit OKT3. Es wurden dreifach Ansätze angelegt, indem jeweils einer der sechs Metabolite in drei waagerecht aufeinander folgende Wells auspipettiert wurden: von der höchsten Konzentration(400 µM) bis zur niedrigsten Konzentration (50 µM). Um Abweichungen beim Ansatz der Metabolite zu vermeiden, wurden die Titrationsreihen der Metabolite Tryptophan, Kynurenin, Hydroxykynurenin, Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure für alle Platten am selben Tag in separaten 15 ml Röhrchen der Firma Greiner angesetzt und bei 5°C im Kühlschrank gelagert. Als Negativkontrolle auf jeder Platte wurde eine Reihe Zellen nur in Medium und eine zweite als Positivkontrolle nur

mit Medium und OKT3 angesetzt. An d3 wurden alle Zellen mit ^{3}HT gepulst und nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank bei -20°C eingefroren. Anschließend wurde wie unter 2.2.8 beschrieben das Zellwachstum gemessen

2.2.15 Tumorzellen und Metabolite

Für diesen Versuch wurden die Tumorzellen der Reihe A549, 86HG39 und HBMEC wie unter 2.2.4.2 beschrieben geerntet und kultiviert. Anschließend wurden $3x10^{4}$ Zellen pro Vertiefung in 96 Mikrotiterplatten eingesetzt. Danach wurden die Zellen mit jeweils der Titrationsreihe von 50 bis 400 µM der Metabolite Tryptophan, Kynurenin, Hydroxykynurenin, Hdroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure am Tag des Ansatzes supplementiert, um zu untersuchen, ob sie einen Einfluß aus das Zellwachstum haben. Es wurden dreifach Ansätze angelegt, in denen jeweils einer der sechs Metabolite in zwölf waagerecht aufeinander folgende Wells austitriert wurde: von der höchsten Konzentration (400 µM) in den ersten drei Wells bis zur niedrigsten Konzentration (50 µM) in den letzten drei. So wurden in jeder senkrecht aufeinander folgenden Reihe die jeweiligen Metaboliten austitriert. Als Positivkontrolle wurde eine Reihe Zellen nur in IMDM-Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Proliferationsmessung erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

2.2.16 Tumorzellproliferation in Überständen (un-) stimulierter Zellen

Für diesen Versuch wurden die Tumorzellen wie unter 2.2.4.2 beschrieben geerntet und kultiviert. Die hierfür verwendeten Überstände wurden wie unter 2.2.2 beschrieben hergestellt. Es wurden vierfach Bestimmungen angesetzt. In die ersten vier waagerecht aufeinander folgenden Wells der Mikrotiterplatten wurden 150 µl des Überstandes der unstimulierten Zellen pipettiert. Diese Reihe diente als Positivkontrolle. In die darunter liegenden vier Wells wurden 150 µl des Überstandes der mit IFN γ stimulierten Zellen pipettiert. In die darunter liegenden vier Wells wurden 140 µl des Überstandes der mit IFN γ stimulierten Zellen pipettiert und diese zusätzlich mit 10 µl Tryptophan (100 µg/ml) supplementiert. In die darunter folgenden vier Wells wurden 150 µl des Überstandes der mit Tryptophan supplementierten und IFN γ stimulierten Zellen pipettiert. In die untersten vier Wells wurden 140 µl des Überstandes der mit Tryptophan supplementierten und mit IFN γ stimulierten Zellen pipettiert und zusätzlich 10 µl Tryptophan (100 µg/ml) hinzugegeben. Anschließend wurde in jedes mit dem Überstand angereicherte Well $3x10^4$ Tumorzellen eingesetzt. Das Zugabevolumen der Tumorzellen pro Well betrug 50 µl RPMI-Medium (w/o Tryptophan). Nach Zugabe der Tumorzellen wurden die Mikrotiterplatten für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Tumorzellproliferation wurde wie unter 2.2.8 beschrieben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 IDO-Aktivität und Kynureninproduktion in A549-, 86HG39- und HBME-Zellen

Die IFN γ vermittelte IDO-Aktivität und die konsekutive Tryptpohan-Degradation wurde bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben. Um auch vergleichend die IDO-Aktivität der drei Tumorzellreihen A549, 86HG39 und HBMEC quantitativ zu erfassen, wurden diese Tumorzellen mit unterschiedlichen Mengen an IFN γ (0 – 1000 U/ml) stimuliert. Anschließend wurde die IDO-Aktivität gemessen. Hierbei wurde nach 72 stündiger Stimulation der angegebenen Tumorzellen das stabile Endprodukt L-Kynurenin im Zellüberstand mittels Ehrlich-Reagenz nachgewiesen. Das intrazellulär aus Tryptophan gebildete Kynurenin wird nach extrazellulär freigesetzt und kann somit photometrisch gemessen werden. Unter Mitführung eines Kynurenin-Standards, wie in Material und Methoden beschrieben, wurde die IDO-Aktivitätsmessung durchgeführt. Rechnet man die in Abb.1 gezeigten Werte um, so ergibt sich bei maximaler Stimulation, dass das im Ansatz vorhandene Tryptophan (15 µg/ml) innerhalb von 72 Stunden vollständig zu Kynurenin umgesetzt wird. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist in Abb.1 dargestellt.

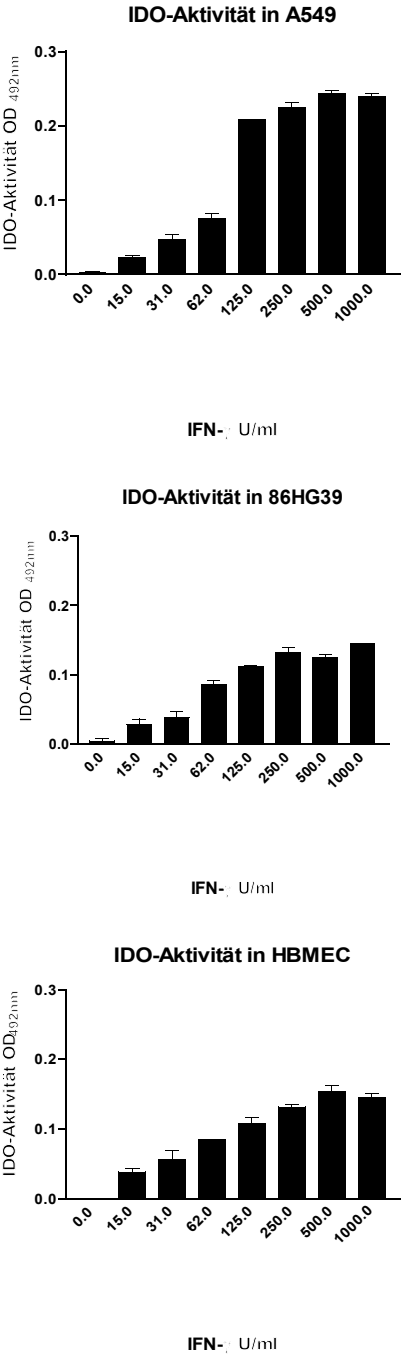


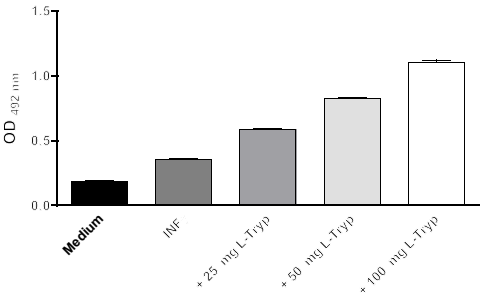
Abb.1:**Ab einer IFN γ -Dosis von 250U/ml ist die IDO-Aktivität in Tumorzellen maximal stimuliert und lässt sich nicht weiter durch höhere Zytokin-Dosierungen steigern.** Für diesen Test wurden $3x10^4$ Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht und mit einer Titrationsreihe von humanem IFN γ stimuliert, so dass das im Medium vorhandene Tryptophan abgebaut wurde. Für diesen Test wurde das Medium nicht mit zusätzlichem Tryptophan supplementiert. Der Nachweis des Kynurenins erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.

In diesem Experiment zeigen alle drei Tumorzellreihen nach identischer Stimulation mit IFN γ eine ähnliche IDO-Aktivität: eine IFN γ Dosis von 250 U/ml induziert in A549-, 86HG39- und HBMEC-Zellen eine maximale IDO-Aktivität, bei der das gesamte in der Kultur vorhandene Tryptophan zu Kynurenin abgebaut wird. Erhöht man die Zytokin-Dosis auf Werte über 250 U/ml hat dies keinen steigernden Einfluß auf die IDO-Aktivität. Die Menge des entstandenen Kynurenins verändert sich nicht weiter.

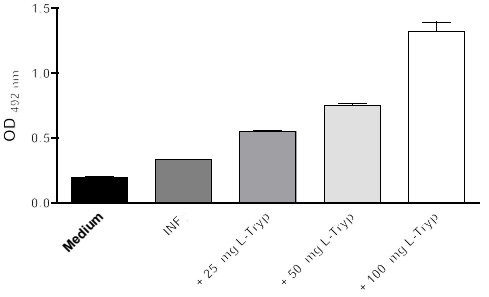
Die Beobachtung, dass ab einer IFN γ -Dosis von 250 U/ml das gesamte Tryptophan im Testansatz zu Kynurenin abgebaut wird und dass keine weitere Steigerung der IDO-Aktivität in den angegebenen Tumorzellen durch höhere Konzentrationen an IFN γ möglich ist, führte zu der Überlegung, dass nicht die IFN γ –Dosis der limitierende Faktor beim Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin ist, sondern vielmehr die im Testansatz vorliegende Menge an Tryptophan entscheidend ist, wie viel Kynurenin durch die IDO entsteht. Um diese Überlegung quantitativ zu belegen, wurde ein weiterer Versuch angesetzt.

Hierfür wurden die unter 2.2.2 beschriebenen Medien mit unterschiedlichen Mengen an Tryptophan (25-100 µg/ml) angereichert. Anschließend wurde die IDO-Aktivität der Tumorzellen mit IFN γ maximal stimuliert. Nach dreitägiger Stimulation wurde das Endprodukt Kynurenin, wie oben beschrieben, gemessen. Das Ergebnis repräsentativer Experimente ist in Abb.2 dargestellt

Kynureninkonzentration im Überstand stimulierter A549-Zellen



Kynureninkonzentration im Überstand stimulierter 86HG39-Zellen



Kynureninkonzentration im Überstand stimulierter HBMEC-Zellen

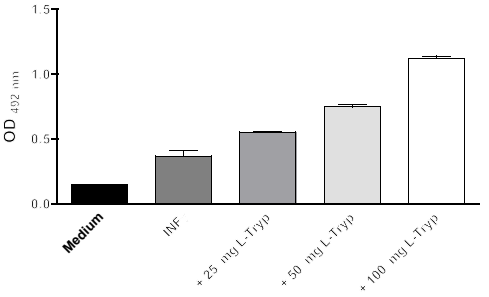


Abb.2: **Durch maximale Stimulation der IDO-Aktivität in Tumorzellen wird das im Medium vorhandene Tryptophan zu Kynurenin abgebaut.** In diesem Experimenten wurden $3x10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgsäht und mit einer konstanten Menge IFN γ (500 U/ml) stimuliert. Um möglichst hohe Konzentrationen des Reaktionsproduktes Kynurenin zu erhalten, wurden die Tests mit unterschiedlichen Mengen an Tryptophan angereichert und anschließend die IDO der Tumorzellen maximal mit IFN γ stimuliert. Der Nachweis des Kynurenins erfolgte wie unter 2.2.5 beschrieben.

.

Die Grafiken zeigen deutlich den Zusammenhang zwischen der Ausgangskonzentration von Tryptophan im Testansatz und der anschließenden Kynureninkonzentration im Testansatz nach maximaler Stimulation mit IFN γ. Bei identischer (maximaler) Stimulation der IDO-Aktivität aller drei Tumorzellen mit IFN γ ist die entstehende Menge an Kynurenin im Testansatz abhängig von der Tryptophankonzentration im Überstand vor Stimulation der Zellen: Je mehr Tryptophan im Überstand vorhanden ist desto mehr Kynurenin entsteht bei maximaler Stimulation der IDO.

Betrachtet man Abbildung 1 und 2 zusammen, so wird deutlich, dass im Kynurenin-Weg, d.h. beim Abbau des Tryptophans, in meinem Testsytem nicht die Aktivität des IDO-Enzyms, sondern allein die Menge ihres Substrats Tryptophan den limitierenden Faktor darstellt.
Ab einer IFN γ -Dosis von 250 U/ml ist die IDO-Aktivität in den Tumorzellen maximal stimuliert und es lässt sich keine weitere Steigerung der Enzymaktivität erzielen (siehe Abb.1). Eine Steigerung der Kynureninentstehung ist nur durch grössere Mengen an Tryptophan im Überstand möglich (siehe Abb.2). Diese Ergebnisse bestätigen, dass der Abbau von Tryptophan zu Kynurenin ein entscheidender mengenbestimmender Schritt im Kynurenin-Weg ist und die Konzentration an Substrat im Testansatz ein wichtiger Faktor für die Menge an entstehenden Metaboliten ist.

3.2 Bedeutung der IDO-Aktivität und der Tryptophan-Degradation in der Hemmung von Zellwachstum

Nachdem gezeigt wurde, dass auch die A549-, 86HG39- und HBMEC-Zellen durch IFN γ induziert eine starke IDO-Aktivität exprimieren und es dadurch zum Abbau von Tryptophan

im Testansatz kommt, wurde als nächstes in den folgenden Versuchen quantitativ erfasst, ob die Zellen durch ihre IDO-Aktivität und den konsekutiven Tryptophanabbau zur Hemmung von Bakterienwachstum fähig sind. Hierfür wurden die Tumorzellen wie in Abb.1 beschrieben stimuliert und anschließend, nach 72stündiger Stimulation, mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Das Ergebnis der Bakterienhemmung eines repräsentativen Experiments zeigt Abb.3. (nächste Seite)

Die drei Grafiken zeigen eine deutliche Inhibition der Bakterienproliferation durch die Aktivierung der IDO in den Tumorzellen mit IFN γ. Ab einer IFN γ -Dosis von 250 U/ml wird das Bakterienwachstum maximal gehemmt. Durch höhere Zytokin-Konzentrationen kann das Bakterienwachstum nicht stärker inhibiert werden. Die Wachstumskurven in der Grafik erreichen ihr Plateau. Gibt man die Bakterien zusätzlich mit 100 µg/ml Tryptophan zu den stimulierten Kulturen, wird die IFN γ induzierte Wachstumshemmung aufgehoben.
Ergebnis dieses Versuches ist, dass durch die Aktivität der IDO und der daraus resultierenden Tryptophandegradation das Bakterienwachstum gehemmt wird. Ersetzt man das abgebaute Tryptophan in der Kultur durch zusätzliche Tryptophangabe, so kann der bakteriostatische Effekt antagonisiert werden und die Staphylokokken proliferieren wieder. Der Grund für die Bakteriostase und die anschliessende Proliferation nach Zugabe von Tryptophan ist, dass den Bakterien in den mit IFN γ stimulierten Ansätzen Tryptophan als essentielle Aminosäure zur Proteinbiosynthese fehlt. Durch die IDO-Aktivität wird das gesamte Tryptophan in der Kultur zu Kynurenin abgebaut. Wird der Mangel an Tryptophan in den stimulierten Ansätzen behoben, indem man die Kulturen zusätzlich mit 100 µg/ml Tryptophan supplementiert, kann die Bakteriostase aufgehoben werden. Tryptophan ist wieder für die Proteinbiosynthese und folglich für die Bakterienproliferation vorhanden.

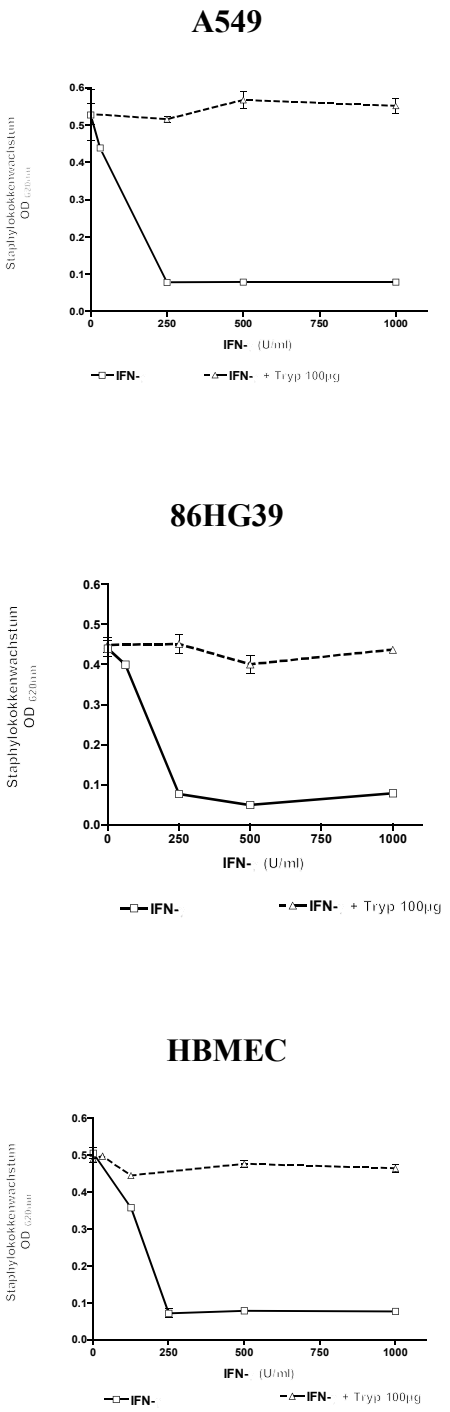


Abb.3: **Die IFN γ induzierte IDO-Aktivität in Tumorzellen übt einen bakteriostatischen Effekt aus, der durch Tryptophangabe aufhebbar ist.** Für diesen Test wurden $3x10^4$ Tumorzellen pro Vertiefung ausgesäht und für drei Tage mit einer Titration von humanem IFN γ inkubiert. Dann wurden etwa 50cfu *Staphylococcus aureus* (in 10 µl tryptophanfreiem Medium) pro Vertiefung zugesetzt. Auf einer zweiten Testplatte wurden die Bakterien zusammen mit 100 µg/ml Tryptophan zugegeben. Nach einer Inkubation über 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum wie unter 2.2.6 beschrieben gemessen.

Dieser Mechanismus ist nur bei auxotrophen Organismen möglich, d.h. die nicht zur Tryptophansynthese fähig und auf Tryptophanzufuhr mit der Nahrung angewiesen sind (siehe Einleitung). Der Abbau von Tryptophan durch die IFN γ vermittelte Stimulation der IDO hat sich somit in allen drei untersuchten Zelllinien als potenter antimikrobieller Effektomechanismus erwiesen. In den folgenden Versuchen wurde die antiproliferative Wirkung der IDO-vermittelten Tryptophan-Depletion sowohl auf das T-Zell- als auch auf das Tumorzellwachstum quantitativ erfasst. Hierfür wurde die IDO-Aktivität der A549-Zellen mit IFN γ stimuliert und anschließend das Wachstum der zugegebenen T- bzw Tumorzellen gemessen. Abb.4.1 zeigt die Ergebnisse für die T-Zellversuche und Abb.4.2 für die A549-, 86HG39- und HBMEC-Zellen.

T-Zellproliferation in stimulierten A549-Kulturen

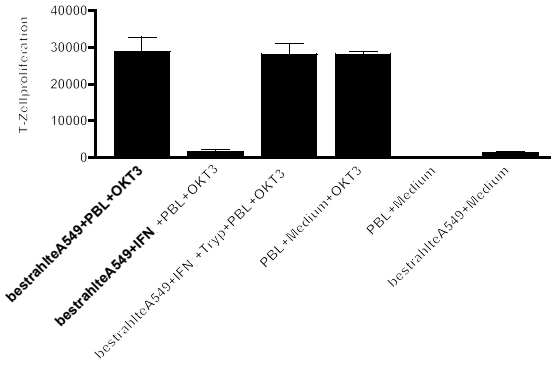
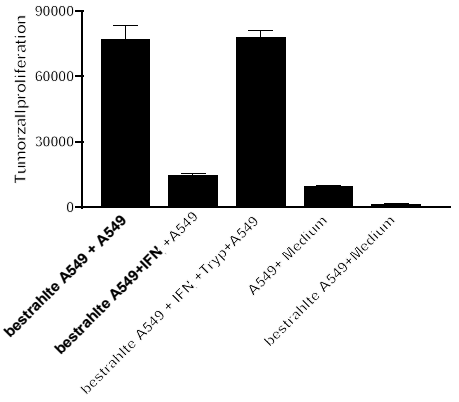


Abb.4.1: **Der IFN γ vermittelte Tryptophanabbau durch die IDO hat einen antiproliferativen Effekt auf das Zellwachstum von T-Zellen.** Für diesen Test wurdrden A549-Zellen durch Bestrahlung mit 100 Gy im Wachstum gehemmt und danach zu $3x10^4$ Zellen pro Well in Mikrotiterplatten ausgesäht. In zwei Drittel der Ansätze wurde die IDO mit IFN γ stimuliert und somit das vorhandene Tryptophan im Well abgebaut. Um den Einfluß der Tryptophan-Depletion auf das T-Zellwachstum zu untersuchen wurde nach Abbau des Tryptophans in den Wells mit stimulierten A549-Medium, zusätzlich jeweils $1.5x10^5$ PBLs hinzupipettiert . Die T-Zellen wurden mit einem monoklonalen anti-CD3-Antikörper stimuliert. Jeder Wert wurde als Dreifachbestimmung angelegt. Um zusätzlich zu untersuchen, ob eine IDO vermittelte Wachstumshemmung reversibel ist wurde die Hälfte der Ansätze, die im Anwesenheit stimulierter A549-Zellen angesetzt wurden mit 100 µg/ml Tryptophan supplementiert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Zellwachstum wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

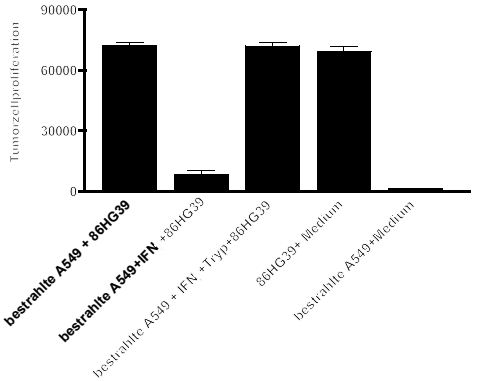
A549-Proliferation

in stimulierten A549-Kulturen



86HG39-Prolferation

in stimulierten A549-Kulturen



HBMEC-Proliferation

in stimulierten A549-Kulturen

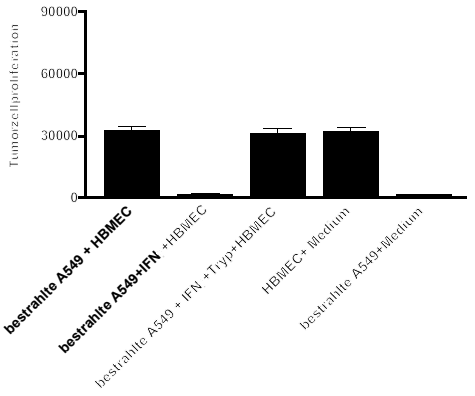


Abb.4.2: **Der IFNy vermittelte Tryptophanabbau durch die IDO hat eine antiproliferativen Effekt auf das Zellwachstum von Tumorzellen.** Testansatz wie unter 4.1 beschrieben. Anstelle der PBLs wurden jeweils $3x10^4$ Tumorzellen der Reihe A549/86HG39 bzw HBMEC ausgesäht und deren Wachstum gemessen. Um zusätzlich zu untersuchen, ob eine IDO vermittelte Wachstumshemmung reversibel ist, wurde die Hälfte der Ansätze mit 100 µg/ml Tryptophan supplementiert. Nach 72 stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Zellwachstum wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen. Als Positivkontrolle wurde das Tumorzellwachstum in unstimulierten Medium gemessen. Die IDO-Aktivität und damit der Abbau des Tryptophans wurde in gesonderten Wells wie unter 2.2.5 beschrieben gemessen.

Die vier Grafiken belegen, dass durch den Abbau von Tryptophan im Medium das Wachstum sowohl der T-Zellen als auch der drei Tumorzellreihen deutlich gehemmt ist. In Anwesenheit unstimulierter Zellen proliferieren die T-Zellen, die A549-, die 86HG39- und die HBMEC-Zellen ungehemmt. Die IDO ist nicht aktiviert, folglich ist das in der Kultur vorhandene Tryptophan nicht abgebaut und kann von den T- und Tumorzellen uneingeschränkt für den eigenen Stoffwechsel genutzt werden (Dieser Wert dient als Positivkontrolle). Stimuliert man hingegen die IDO der bestrahlten A549-Zellen mit IFN γ über drei Tage, wird das Tryptophan im Ansatz abgebaut. Pipettiert man anschliessend in diese tryptophanarmen Ansätze T-Zellen oder Tumorzellen zeigt sich, dass deren Proliferation stark gehemmt ist, nämlich um 80% der Ausgangswerte der Positivkontrolle. Daß der antiproliferative Effekt tatsächlich auf der Tryptophan-Depletion im Testansatz beruht, zeigt die Beobachtung, dass die Wachstumshemmung der eingesetzten T-Zellen und Tumorzellen durch Zufuhr von Tryptophan aufgehoben werden kann. Die Zellen erreichen wieder eine Proliferationsrate von 100% der Positivkontrolle. Aus diesen Beobachtungen lässt sich außerdem schliessen, dass

ein Mangel an Tryptophan zwar zytostatisch nicht aber zytotoxisch wirkt. Ansonsten wäre die Wachstumshemmung nicht antagonisierbar.

Zusammenfassend betrachtet zeigte sich die IFN γ induzierte IDO-Aktivität und die konsekutive Tryptophan-Degradation als potenter antiproliferativer Mechanismus auf Bakterien, T-Zellen und die Tumorzellen A549, 86HG39 und HBMEC.

3.3 Einfluss des Kynurenins auf das Zellwachstum

In den vorangegangenen Versuchen wurde der Abbau von Tryptophan als potenter Hemmmechanismus auf das Zellwachstum beschrieben (Abb.4). Da Tryptophan durch die IDO zu Kynurenin verstoffwechselt wird (Abb.1 und 2), stellt sich die Frage, welche Rolle das Reaktionsprodukt Kynurenin bei der Hemmung der Zellproliferation spielt.

Im Folgenden wird quantitativ untersucht, ob der Tryptophanmetabolit Kynurenin einen Effekt auf das Zellwachstum hat. Zuerst wurde der Einfluss von Kynurenin auf das Bakterienwachstum überprüft. Als Screeningversuch wurde eine hohe Konzentration von 400 µM Kynurenin gewählt mit der die Staphylokokken 24 Stunden inkubiert wurden.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Abb.5 dargestellt.

Einfluß von Kynurenin auf das Staphylokokkenwachstum

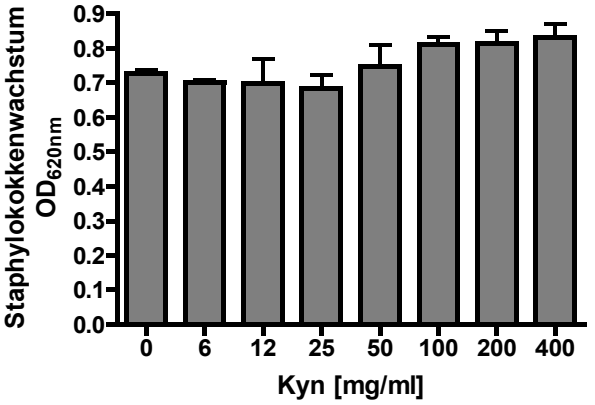


Abb.5:**Kynurenin hat keinen antiproliferativen Effekt auf das Bakterienwachstum.** Für diesen Versuch wurde Staphylokokkokus aureus aus zwei Kolonien in 1 ml Medium gegeben und nach einer Verdünnung von 1:100 000 in 10 µl pro Vertiefung in Mikrotiterplatten eingesetzt und anschließend mit Kynurenin inkubiert. Nach 72 stündiger Inkubation wurde das Bakterienwachstum im ELISA-Photometer gemessen, wie unter 2.2.10 beschrieben.

Nach 24 stündiger Inkubation mit einer hohen Konzentration Kynurenin wachsen die Staphylokokken ungehemmt. Sie erreichen dieselbe Wachstumsrate wie die Positivkontrolle. Kynurenin hat somit keinen antiproliferativen Effekt auf die Bakterien.

Im nächsten Versuch wurde der Kynurenineinfluss auf das T-Zellwachstum quantifiziert. Hierzu wurden die T-Zellen mit einem monoklonalen anti CD3-Antikörper stimuliert und für 72 Stunden mit Kynurenin in einer Endkonzentration von 400 µM im Well, ebenfalls als Screeningwert, inkubiert. Abb.6 zeigt das Ergebnis des Versuchs.

Wirkung von Kynurenin auf das T-Zellwachstum

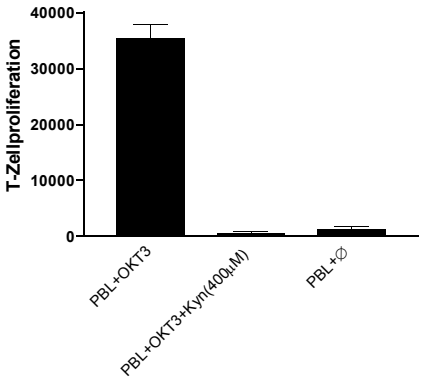


Abb.6: **Kynurenin hat einen starken Hemmeffekt auf das T-Zellwachstum. F**ür diesen Test wurden $1.5x10^5$ T-Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten eingesetzt. Anschliessend wurden die Zellen mit jeweils einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert. Danach wurden die stimulierten T-Zellen über drei Tage mit Kynurenin (400 µM) inkubiert. Jeder Wert wurde als Dreifachbestimmung angesetzt. Als Positivkontrolle wurden die T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper (PBL+OKT3) stimuliert und als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen. Die Messung erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

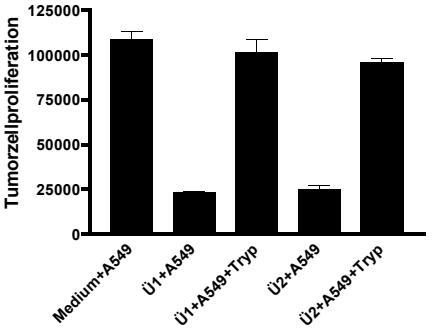
Im Gegensatz zu den Staphylokokken übt Kynurenin auf die T-Zellen eine starke Inhibition des Zellwachstums aus. Die T-Zellen werden im Vergleich zur Positivkontrolle um mehr als 80% in ihrem Wachstum gehemmt. Somit reagieren die T-Zellen gleichermaßen empfindlich auf einen Tryptophanmangel als auch auf die Anwesenheit großer Mengen an Kynurenin im Medium.

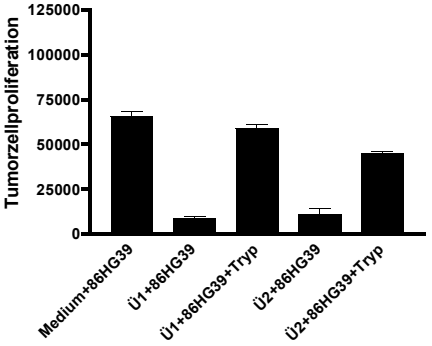
Zuletzt wurde noch der Einfluss von Kynurenin auf das Tumorzellwachstum quantitativ erfasst. Für dieses Experimentalsystem wurden spezielle Überstände, wie unter 2.2.2 und 2.2.16 beschrieben, etabliert: Um einen direkten Vergleich zwischen dem Einfluss des Tryptophanmangels und den Einfluss des Kynurenins auf die Tumorzellproliferation zu

haben, wurden zwei verschiedene Überstände angesetzt. In einer Zellkulturflasche wurde das im Medium bereits vorhandene Tryptophan mithilfe IDO-aktivierter Zellen abgebaut, so dass ein tryptophanarmer Überstand entstand. Um einen zweiten tryptophanarmen aber kynureninreichen Überstand herzustellen, wurde in einer weiteren Zellkulturflasche das Medium zuvor mit Tryptophan angereichert und anschliessend die IDO der Zellen mit IFN γ aktiviert, so dass das im Medium vorhandene Tryptophan abgebaut und Kynurenin angereichert wurde. Anschließend wurde das Tumorzellwachstum in den verschiedenen Überständen gemessen. Als Positivkontrolle wurde das Tumorzellwachstum in Überständen unstimulierter Zellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb.7 dargestellt.

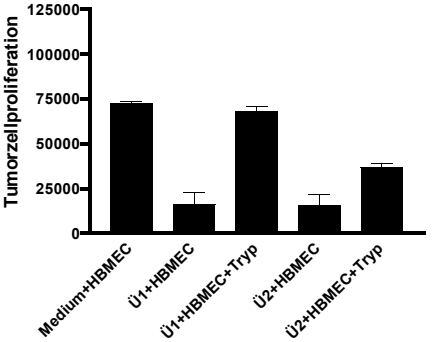
A549-Proliferation **86HG39-Proliferation**

in Überständen stimulierter und unstimulierter Tumorzellen





HBMEC-Proliferation in Überständen stimulierter und unstimulierter Tumorzellen



Ü1: Überstand des Mediums von mit IFN γ stimulierten Tumorzellen
Ü2: Überstand des tryptophanangereicherten Mediums von mit IFN γ stimulierten Tumorzellen

Abb.7: **Der Tryptophanmangel in den stimulierten Überständen hat einen wachstumshemmenden Effekt auf alle drei Tumorzellen, wohingegen das entstandene Kynurenin in den stimulierten Überständen nur eine eingeschränkte antiproliferative Wirkung auf die Tumorzellen ausübt.** Für diesen Test wurden $3x10^4$ Zellen pro Vertiefung in 96er-Mikrotiterplatten eingesetzt und das Tumorzellwachstum in den Überständen unstimulierter bzw mit IFN γ stimulierter Zellen gemessen. Um eine hohe Konzentration von Kynurenin in einem Teil der Überstände zu erhalten, wurde das Medium zuvor mit Tryptophan angereichert und anschließend die Zellen mit IFN γ stimuliert. Um zu untersuchen, ob der wachstumshemmenden Effekt in den stimulierten Überständen auf dem Mangel an Tryptophan oder der hohen Konzentration an Kynurenin beruht, wurde die Hälfte der Tumorzellen in den stimulierten Überständen zusätzlich mit Tryptophan supplementiert. Die Überstände wurden wie unter 2.2.2 beschrieben angesetzt und die Messung der Tumorzellproliferation wie unter 2.2.8 beschrieben gemessen.

Die Grafiken zeigen, dass die Tumorzellen sehr unterschiedlich und weitaus weniger empfindlich auf die Anwesenheit von Kynurenin reagieren als auf den Tryptophanmangel in den Überständen. Sowohl die A549- als auch die 86HG39- und HBMEC-Zellen reagieren in diesem Versuch und wie unter 3.2 bereits ausführlich beschrieben auf den Tryptophanmangel in den Überständen mit einer Hemmung ihrer Proliferation. Durch Gabe von Tryptophan lässt sich die Wachstumshemmung wieder aufheben, was belegt, dass der Effekt tatsächlich durch Tryptophanmangel induziert wurde. Ebenfalls ist das Wachstum der drei Tumorzellreihen in den tryptophanarmen und zusätzlich kynureninreichen Überständen gehemmt. Gibt man zusätzlich Tryptophan zu den Tumorzellen, so lässt sich dieser Hemmeffekt bei den A549-Zellen vollständig und bei den 86 HG39-Zellen zum Teil aufheben. Die A549-Zellen erreichen wieder eine Proliferationsrate von 100% der Positivkontrolle und die 86HG39-Zellen von 70%. Am stärksten beeinträchtigt sind die HBMEC-Zellen in kynureninreichen Überständen. Sie erreichen nach Tryptophanzugabe lediglich wieder eine Proliferationsrate von etwas über 50% der Positivkontrolle. Dieser Versuch belegt also deutlich, dass die Tumorzellen sehr empfindlich auf Tryptophanmangel reagieren, der Tryptophanmetabolit Kynurenin jedoch einen viel geringeren Effekt auf die Tumorzellproliferation ausübt: Die Hemmung des A549- und 86HG39- und HBMEC-Wachstums lässt sich selbst in den kynureninreichen Überständen durch Zufuhr von Tryptophan antagonisieren, so dass die

Wachstumshemmung eher auf den Tryptophanmangel als auf einen antiproliferativen Effekt des Kynurenins im Überstand zurückzuführen ist. Zwar zeigen die HBMEC-Zellen eine leichte Wachstumshemmung durch die Inkubation mit Kynurenin, die sich nicht vollständig antagonisieren läßt, doch fällt dieser antiproliferative Effekt weitaus geringer aus als bei den T-Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die T-Zellen am empfindlichsten auf Kynurenin reagieren. Auf das Wachstum der Staphylokokken hat Kynurenin jedoch keine Auswirkungen und die Tumorzellen werden durch diesen Tryptophanmetaboliten nur teilweise und weitaus geringer in ihrer Proliferationsrate beeinflusst als die T-Zellen.

3.4 Bedeutung der übrigen Tryptophanmetabolite auf das T-Zellwachstum

Kynurenin ist nicht der einzige Metabolit der beim Abbau von Tryptophan entsteht (siehe Einleitung), sondern abhängig von den vorhandenen Enzymen in den Zellen und Geweben entsteht eine Reihe von Metaboliten, deren Funktion noch nicht vollständig geklärt ist.
Aber nachdem nun gezeigt wurde, dass Kynurenin einen starken inhibitorischen Effekt auf das T-Zellwachstum hat, wurde untersucht, ob die nachfolgenden Metabolite des Kynurenin-Weges ebenfalls einen Effekt auf das T-Zellwachstum haben. Hierfür wurden als Screeningtest stimulierte T-Zellen für 72 Stunden mit den angegebenen Metaboliten in hohen Konzentrationen von 400 µM inkubiert. Abb.8 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche (nächste Seite).
Die verschiedenen Tryptophanmetabolite üben unterschiedliche Effekte auf das T-Zellwachstum aus. In einer Konzentration von 400 µM hemmen vor allem Kynurenin,

Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure die T-Zellproliferation um 90% der Positivkontrolle. Quinolinsäure und Anthranilsäure haben keinen antiproliferativen Effekt auf die T-Zellen. Unter Zugabe dieser beiden Metabolite ist die T-Zellproliferation ebenso unbeeinflusst wie die der Positivkontrolle oder in tryptophanreichen Medium.

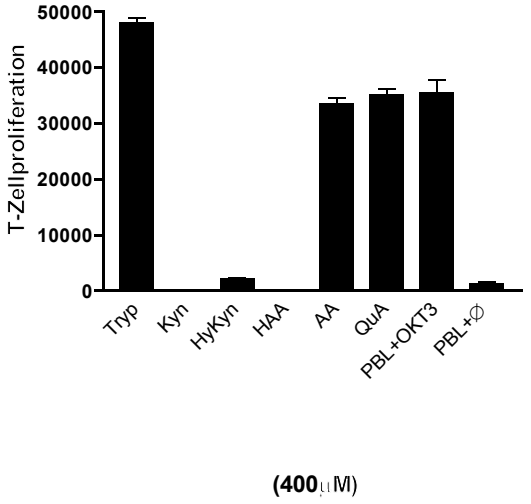


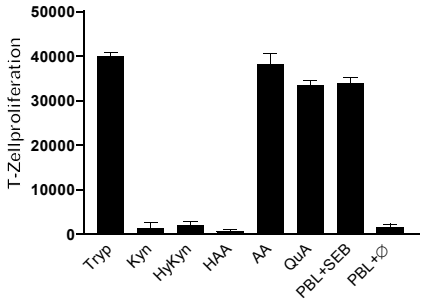
Abb.8:**Die Tryptophanmetabolite zeigen unterschiedliche Effekte auf das T-Zell-wachstum**. Für diesen Test wurden $1.5x10^5$ PBLs pro Vertiefung in vier Mikrotiter-platten eingesetzt. Die T-Zellen jeder Mikrotiterplatte wurden mit jeweils einem monoklonalen anti-CD3 Antikörper zur Proliferation stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen über drei Tage mit den angegebenen Tryptophanmetaboliten (400µM) inkubiert. Jeder Wert wurde als Dreifachbestimmung angesetzt. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper (PBL+OKT3) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen. Die Messung erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

Weil verschiedene Wachstumsstimuli über unterschiedliche Signalinduktionen die T-Zellproliferation stimulieren (siehe Einleitung), wurde im Folgenden untersucht, ob die Art des T-Zell-Stimulus einen Einfluß auf die Wirkung der Tryptophanmetabolite hat. Zu diesem

Zweck wurden die T-Zellen anstatt mit OKT3 mit SEB, PHA bzw TLA stimuliert und anschließend mit den Metaboliten inkubiert. Die Ergebnisse zeigt Abb.9

Metabolitenwirkung auf die T-Zellen

nach Stimulation mit SEB **nach Stimulation mit PHA**



nach Stimulation mit TLA

(400 µM)

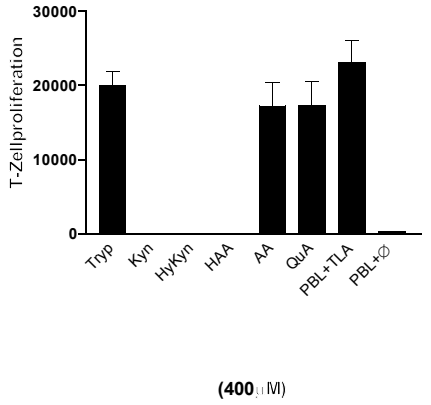


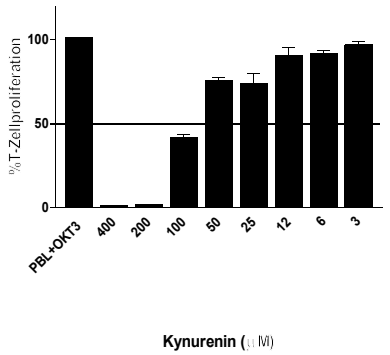
Abb.9:**Der Effekt der Metabolite auf das T-Zellwachstum ändert sich nicht durch Stimulation der T-Zellen mit unterschiedlichen Mitogenen.** Für diesen Test wurden $1.5x10^5$ PBLs pro Vertiefung in Mikrotiterplatten eingesetzt. Nach Stimulation der T-Zellen mit jeweils einem monoklonalen Antikörper wurden die T-Zellen über drei Tage mit den angegebenen Tryptophanmetaboliten (400 µM) inkubiert. Um zu untersuchen, ob die Wirkung der Metabolite abhängig von einem bestimmten Stimulus ist, wurden die T-Zellen in einem Ansatz mit OKT3, im zweiten mit SEB, im dritten mit TLA und im vierten mit PHA stimuliert. Jeder Wert wurde als Dreifachbestimmung angesetzt. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit jeweils dem entsprechenden monoklonalen Antikörper stimuliert, ohne mit einem Metaboliten inkubiert zu werden. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter T-Zellen gemessen Die Messung erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

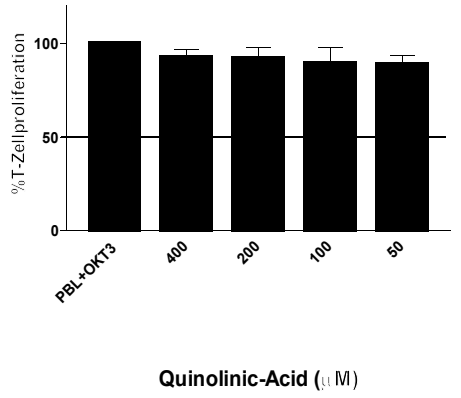
Auch diese Versuche zeigen, dass unabhängig vom Stimulus vor allem Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure die T-Zellproliferation um 90% der Positivkontrolle auf wenige 100 cpm hemmen. Ebenfalls unverändert, trotz verschiedener Stimuli, ist, dass Quinolinsäure und Anthranilsäure keinerlei Hemmwirkung auf das T-Zell Wachstum haben. Hier entspricht das T-Zellwachstum dem der Positivkontrolle. Diese Experimente belegen, dass die Art des Mitogens keine Rolle spielt. Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure üben auf alle stimulierten, d.h. proliferierenden T-Zellen einen wachstumshemmenden Effekt aus.

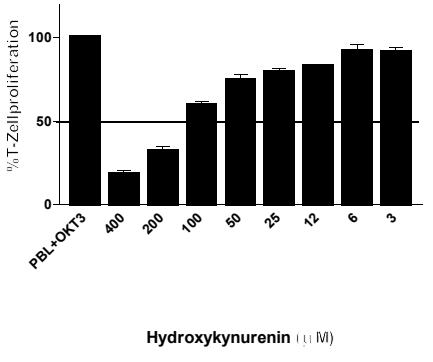
In den vorangegangenen Versuchen wurden Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure als Tryptophanmetabolite mit starkem antiproliferativen Effekt auf T-Zellen identifiziert. Um ein genaueres Wirkspektrum dieser Metabolite zu quantifizieren,

wurden in einem weiteren Versuch stimulierte T-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der angegebenen Metabolite für drei Tage inkubiert. Zum Vergleich wurden auch die nicht hemmenden Metabolite Quinolinsäure und Anthranilsäure austitriert. Das Ergebnis zeigt Abb.10 (nächste Seite).

Die Grafiken veranschaulichen noch einmal die starke Hemmwirkung der Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure, wobei Kynurenin und Hydroxyanthranilsäure das stärkste Hemmpotential aufweisen. Schon ab einer Konzentration von ca 75 µM im Testansatz hemmen sie das T-Zellwachstum auf 50% der Positivkontrolle, während Hydroxykynurenin erst ab einer Konzentration von 100 µM diese Hemmwirkung erreicht. Niedrigere Konzentrationen dieser Metabolite zeigen keinen antiproliferativen Effekt mehr auf das T-Zellwachstum.







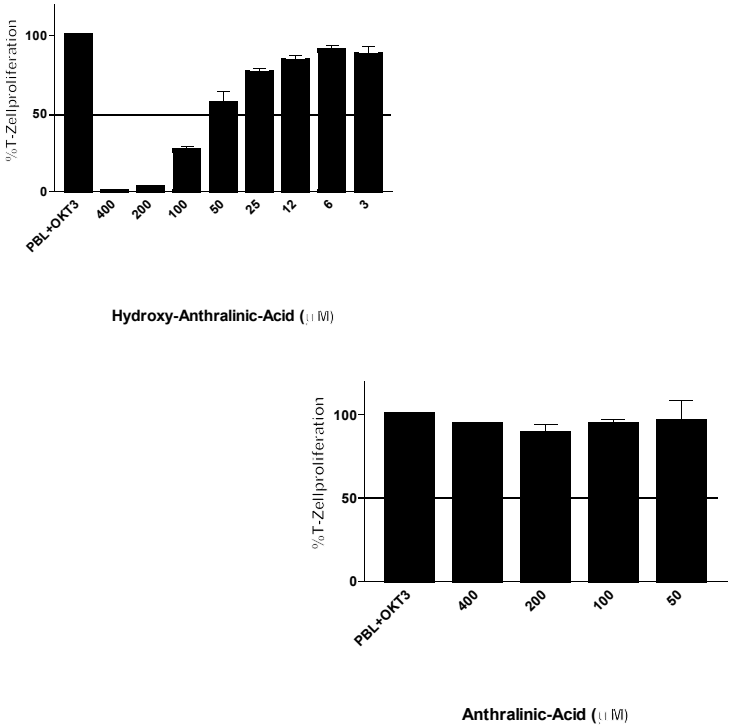
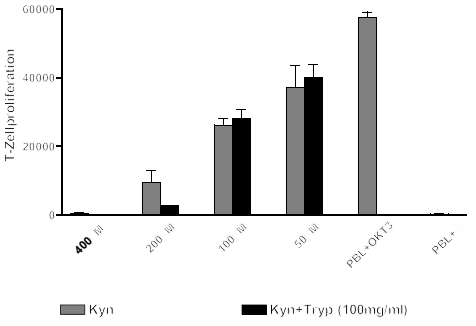


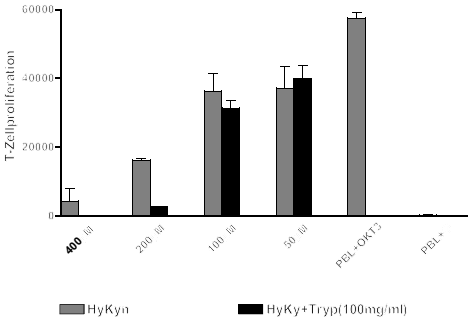
Abb.10: **Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure zeigen den stärksten antiproliferativen Effekt auf das T-Zellwachstum. I**n diesem Experiment wurden $1.5x10^5$ PBLs pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht und mit einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert. Um die minimale Hemmkonzentrationen von 50% der Metabolite zu ermitteln, wurden die Zellen pro Testplatte mit unterschiedlichen Mengen eines Tryptophanmetaboliten drei Tage inkubiert. Als Positivkontrolle wurden PBLs nur mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen Die Messung des Zellwachstums erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

Nachdem nun neben dem Abbau von Tryptophan auch für seine Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure ein wachstumshemmender Effekt auf die T-Zell-Proliferation nachgewiesen wurde, wurde im nächsten Versuch untersucht, ob die Hemmwirkung dieser Metabolite durch die Zugabe von Tryptophan zu den Zellen antagonisiert werden kann. Hierzu wurde die Hälfte der T-Zellen, die mit Metaboliten inkubiert wurden, zusätzlich mit Tryptophan supplementiert. Das Ergebnis repräsentativer Experimente zeigt Abb.11 (nächste Seite).

Wie erwartet zeigt sich in den Grafiken der wachstumshemmende Effekt der Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure auf das T-Zellwachstum. Dieser

hemmende Effekt ist nicht durch Tryptophanzugabe antagonisierbar. Im Gegenteil, die Zugabe von Tryptophan zu den Metaboliten hemmt das T-Zellwachstum zusätzlich in allen drei Ansätzen. V. a. in den hohen Konzentrationen der Metabolite von 100 bis 400 µM erreicht das T-Zellwachstum nach Zugabe von Tryptophan nicht die Proliferationsrate der T-Zellen, die nur mit dem angegebenen Meatboliten inkubiert wurden. Dieser zusätzliche Hemmeffekt des Tryptophans entsteht dadurch, dass das zugegebenen Tryptophan im Testsystem weiter zu seinen Metaboliten abgebaut wird. Die antiproliferative Wirkung der zusätzlich entstandenen Meatbolite addiert sich mit der des bereits vorhandenen Metabolite. Aus diesem Grund wird die T-Zellproliferation zusätzlich gehemmt.





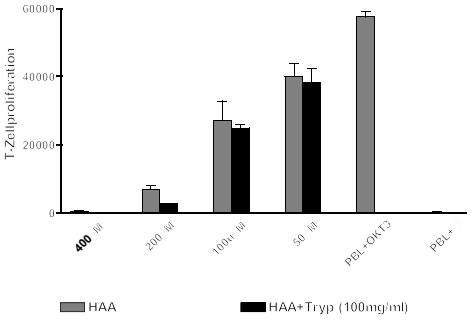


Abb.11:**Der antiproliferative Effekt von Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure auf das T-Zellwachstum lässt sich nicht durch Tryptophangabe antagonisieren.** In diesem Testansatz wurden $1.5x10^5$ Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten eingesetzt und mit einem monoklonalen anti-CD3 Antikörper zur Proliferation stimuliert. Anschließend wurden die T-Zellen mit unterschiedlichen Mengen eines der angegebenen Tryptophanmetaboliten inkubiert.Um zu untersuchen, ob der antiproliferative Effekt dieser Metabolite antagonisierbar ist, wurden in einem zweiten Ansatz die T-Zellen zusätzlich mit Tryptophan (100 µg/ml) supplementiert. Jeder Wert wurde als Dreifachbestimmung angesetzt. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert und als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen Die Messung des Zellwachstums erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben.

Nachdem nun in einer Reihe von Versuchen gezeigt wurde, dass sowohl der Tryptophanabbau (Abb.1 und 2) als auch die dabei entstehenden Reaktionsprodukte (siehe Abb.7 bis 11) eine wesentliche Rolle im antiproliferativen Effektormechanismus von T-Zellen spielen, wurde untersucht, ob dieser Effekt gleichermaßen auf stimulierte und unstimulierte T-Zellen zutrifft. Hierfür wurden ruhende PBLs mit den entsprechenden Metaboliten über unterschiedliche Zeiträume (1 Stunde, 6 Stunden oder 12 Stunden) vorinkubiert. Anschließend wurden die vorinkubierten PBLs in Mikrotiterplatten ausgesäht und entweder mit OKT3 (nächste Seite) oder SEB (übernächste Seite) stimuliert. Das Ergebnis dieser Vorinkubationsversuche zeigt Abb.12 (folgende Seiten).

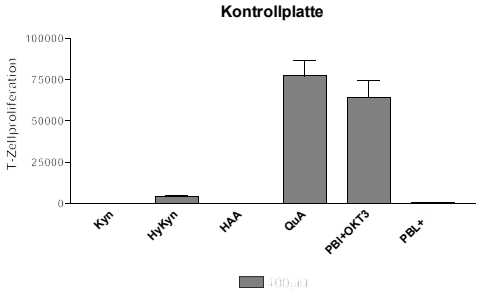
Die Grafiken zeigen deutlich, dass die Vorinkubation unstimulierter T-Zellen über eine Stunde, sechs oder zwölf Stunden mit jeweils einem Tryptophanmetaboliten keinen wachstumshemmenden Effekt auf die nachfolgend stimulierten T-Zellen hat. Weder die Dauer der Vorinkubation ruhender Zellen noch die Art des Metaboliten haben einen Einfluss

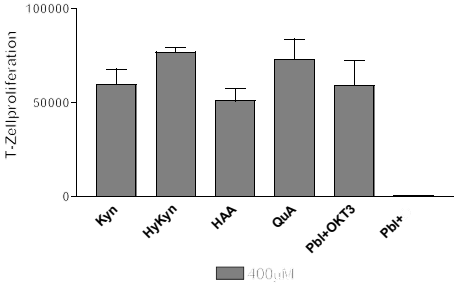
auf die Proliferation der nachfolgend mit einem monoklonalen Antikörper stimulierten T-Zellen. Selbst nach zwölfstündiger Vorinkubation mit den Metaboliten Kynurenin, Hydroxykynurenin oder Hydroxyanthranilsäure zeigt sich keine Beeinträchtigung des anschließend stimulierten T-Zellwachstums. Im Vergleich dazu hemmen die Metabolite auf der Kontrollplatte die stimulierten T-Zellen deutlich in ihrem Wachstum. In diesem Fall wurden die Metabolite nicht ruhenden, sondern proliferierenden T-Zellen zugegeben (Vergleiche Versuch 8). Folglich stellen die Metabolite nur einen potenten Hemmmechanismus auf T-Zellen in der Proliferationsphase und nicht in der Ruhe-(G0)-Phase dar.

Vorinkubation

1h

6h





12h

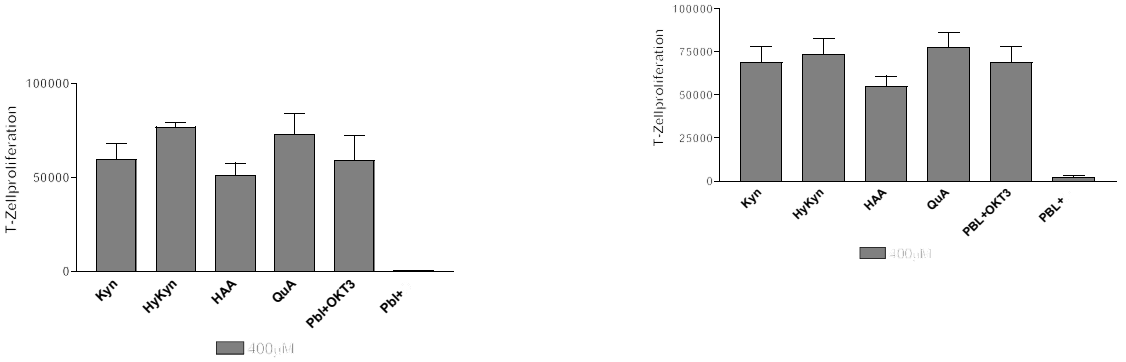
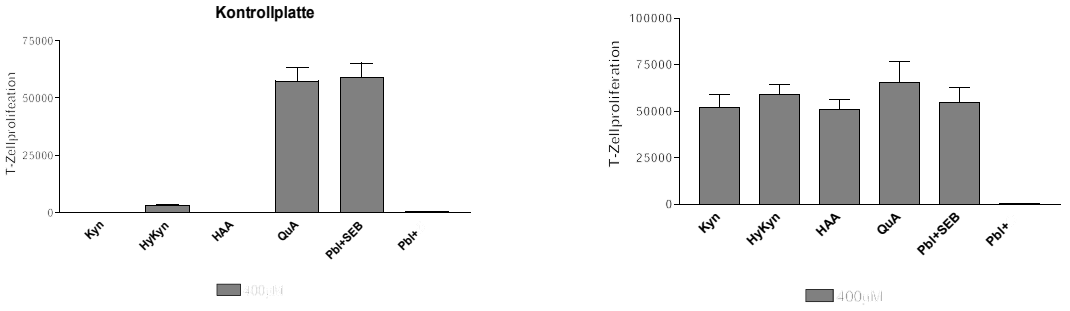


Abb.12.1:**Die Vorinkubation von PBLs mit einem Tryptophanmetaboliten beeinflusst nicht das Wachstum nachfolgend mit OKT3 stimulierter T-Zellen.**
Für dieses Experiment wurden 5x10^6 PBLs für 1Stunde, 6 bzw 12 Stunden mit Einen der angegebenen Tryptophanmetaboliten (400 µM) vorinkubiert. Anschliessend wurden die PBLs aus jeder Kultur in Mikrotiterplatten ausgesäht (1.5x10^5 Zellen proVertiefung) und mit einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert. Als Positivkontrolle (PBL+OKT3) dienten T-Zellen, die mit keinem Metaboliten vorinkubiert, sondern lediglich mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert wurden. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen. Nach dreitägiger Stimulation erfolgte die Proliferationsmessung wie unter 2.2.8 beschrieben.

.

Vorinkubation

1h



6h

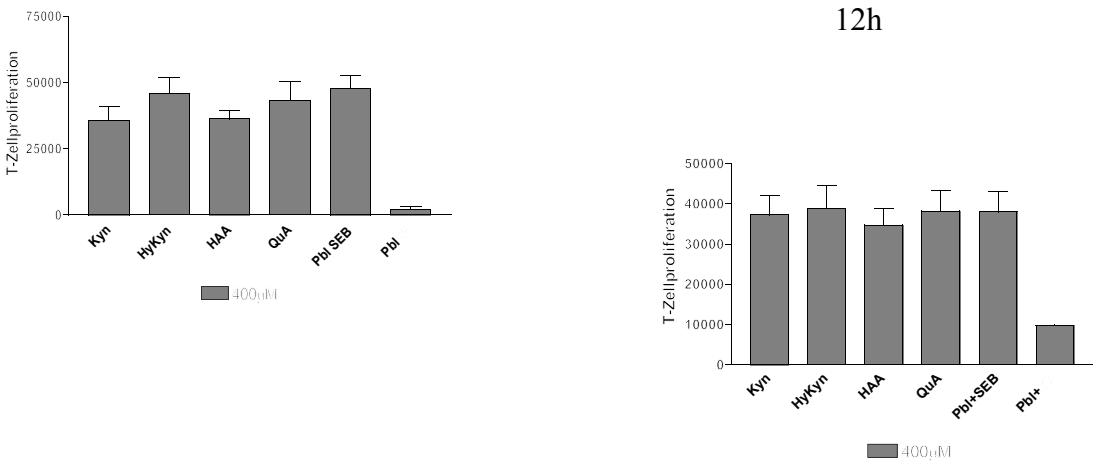


Abb.12.2:**Die Vorinkubation von PBLs mit einem Tryptophanmetaboliten beeinflusst nicht das Wachstum nachfolgend mit SEB stimulierter T-Zellen.**
Für dieses Experiment wurden $5x10^6$ PBLs für 1Stunde, 6 bzw 12 Stunden mit Einen der angegebenen Tryptophanmetaboliten (400 µM) vorinkubiert. Anschliessend wurden die PBLs aus jeder Kultur in Mikrotiterplatten ausgesäht ($1.5x10^5$ Zellen proVertiefung) und mit einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert. Als Positivkontrolle (PBL+SEB) dienten T-Zellen, die mit keinem Metaboliten vorinkubiert, sondern lediglich mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert wurden. Als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen. Nach dreitägiger Stimulation erfolgte die Proliferationsmessung wie unter 2.2.8 beschrieben.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Tryptophanmetabolite nur auf stimulierte T-Zellen wachstumshemmend wirken, wurde im folgenden Versuch untersucht, ob der Zeitpunkt der Proliferation, an dem die Metabolite zugegeben werden und der Zeitraum der Metaboliteninkubation eine Rolle spielen. Um die Metabolite zu unterschiedliche Zeitpunkten der T-Zellproliferation zuzugeben, wurden alle T-Zellen an Tag 0 mit einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert und anschließend an verschiedenen Tagen mit den angegebenen Metaboliten inkubiert. Ein Viertel der stimulierten Zellen wurde bereits am Tag der Stimulation (d0) mit den Metaboliten inkubiert. Das nächste Viertel einen Tag (d1) nach Stimulation, ein weiteres zwei(d2) bzw drei Tage(d3) nach Stimulation. Um gleichzeitig den Einfluss unterschiedlich langer Inkubationszeiten auf das T-Zellwachstum zu untersuchen, wurden alle stimulierten Zellen unabhängig vom Zeitpunkt der Metabolitenzugabe an d3

gepulst und ihr Wachstum gemessen, wie unter 2.2.8 beschrieben. Das Ergebnis dieser Zugabekinetik ist in Abb.13 dargestellt.

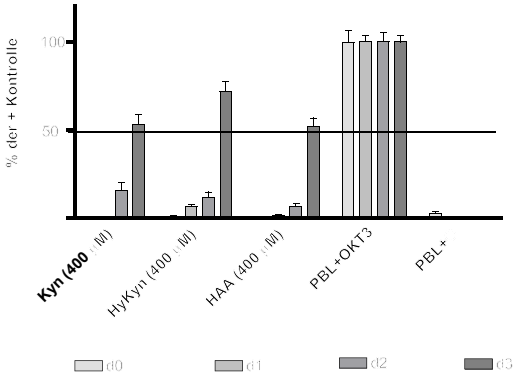


Abb.13:Bei Zugabe in der frühen Phase der Proliferation haben die Metabolite den stärksten wachstummshemmenden Effekt auf das T-Zellwachstum. In diesem Versuch wurden $1.5x10^5$ PBLs pro Vertiefung in Mikrotiterplatten eingesetzt und mit einem monoklonalen Antikörper zur Proliferation stimuliert. Anschließend wurden die Tryptophanmetabolite zu jeweils unterschiedlichen Zeitpunkten in die einzelnen Testplatten pipettiert: am Tag des Ansatzes (d0), an Tag 1(d1), Tag 2 (d2) oder Tag 3 (d3) nach Ansatz. Die Messung aller angesetzten Platten erfolgte an Tag3 wie unter 2.2.8 beschrieben. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen nur mit einem monoklonalen Antikörper stimuliert und als Negativkontrolle wurde das Wachstum unstimulierter PBLs gemessen.

Aus diesem Experimentalsystem wird deutlich, dass die angegebenen Metabolite vor allem in der frühen Phase der T-Zell-Proliferation ihre maximale Wirkung entfalten. Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure haben ihre stärkste antiproliferative Wirkung bei Zugabe am Tag 0 und an Tag 1. Bei Zugabe an diesen Tagen wird das T-Zellwachstum um mehr als 90% der Positivkontrolle gehemmt. Werden die Metabolite erst ab Tag 2 zugegeben, verringert sich der Hemmmeffekt auf die T-Zell-Proliferation auf 75% und erreicht nach Zugabe an Tag 3 nicht einmal mehr eine Hemmwirkung von 50%.

Der stärkste antiproliferative Effekt der Metabolite zeigt sich also in der frühen Phase der T-Zell-Proliferation, vor allem bei Zugabe an Tag 0 und Tag 1. Bei späterer Zugabe der Metabolite nimmt die antiproliferative Wirkung kontinuierlich ab. Ein anderer wichtiger

Aspekt in der Hemmung der T-Zellproliferation ist der Zeitraum der Metaboliteninkubation: Je länger die T-Zellen mit dem jeweiligen Metaboliten inkubiert werden desto stärker ist der Hemmeffekt des Metaboliten. Der antiproliferative Effekt z.B. von Hydroxykynurenin ist bei Zugabe am d0 am stärksten und nimmt mit Zugabe an d1, d2 und d3 ab. Folglich spielen Zeitpunkt und Zeitraum eine entscheidende Rolle in der inhibierenden Wirkung der Metabolite.

3.5 Einfluss der Tryptophanmetabolite auf die Tumorzellproliferation

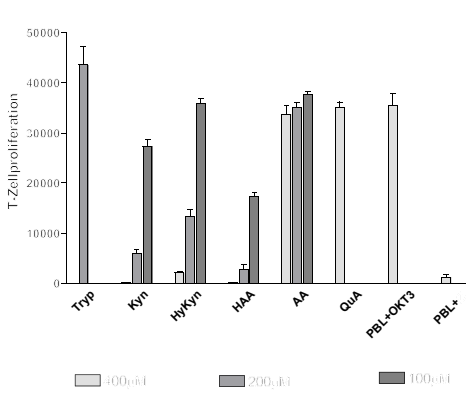
Die IDO-vermittelte Depletion von Tryptophan hat sich als potenter Effektormechanismus in der Hemmung des Wachstums von A549-, 86HG39- und HBMEC-Zellen erwiesen (siehe Versuch 4). Die Wirkung der beim tryptophanabbau entstehenden Tryptophanmetabolite wurde vor allem bei T-Zellen untersucht (siehe Versuch 10). Um die Wirkung dieser Metabolite auf die Tumorzellen näher zu untersuchen und weiter zu quantifizieren, wurden alle drei Tumorzellreihen für 72 Stunden mit den angegebenen Tryptophanmetaboliten in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Als Screeninguntersuchung wurden sehr hohe Konzentrationen der Metabolite gewählt, die sich bereits in der Hemmung der T-Zellproliferation bewährt haben. Das Ergebnis ist in Abb.14 dargestellt (nächste Seite).

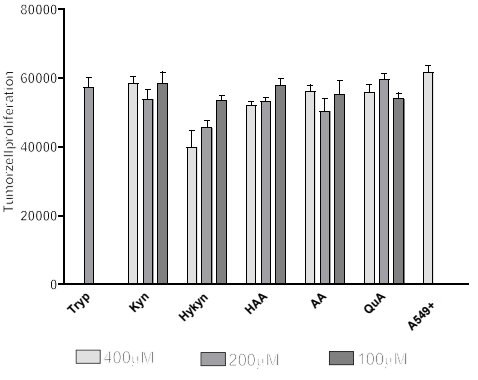
Die Metabolite üben unterschiedliche Effekte auf die drei Tumorzellreihen aus. Während das Wachstum der A549-Zellen unbeeinträchtigt von der Inkubation mit den Tryptophanmetaboliten bleibt, übt vor allem Hydroxyanthranilsäure in hoher Konzentration einen antiproliferativen Effekt auf die 89HG39- und HBMEC-Zellen aus. Kynurenin und Hydroxykynurenin entfalten lediglich einen leichten hemmenden Einfluß auf die Proliferation der HBMEC-Zellen. Die Grafiken zeigen deutlich, dass ein antiproliferativer Effekt der Metabolite auf die Tumorzellen deutlich geringer ausfällt als bei den T-Zellen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Tumorzellen zwar durch Stimulation mit IFN γ eine starke IDO-Aktivität aufweisen, wodurch sie effektiv am Abbau von Tryptophan und der Entstehung von Metaboliten beteiligt sind, selber aber weniger empfindlich gegenüber den Metaboliten sind als die T-Zellen. *In vivo* nutzen Tumorzellen ihre IDO-Aktivität, um sich gegen eine T-Zell vermittelte Immunabwehr zu schützen, ohne sich selbst zu schädigen. Die Bildung von Tryptophanmetaboliten, die hemmend auf T-Zellen nicht aber auf die Tumorzellen selbst wirken wäre eine „intelligente Überlebensstrategie“ der entarteten Zellen.

Effekt der Tryptophanmetabolite auf

T-Zellen (Kontrollplatte) **A549 -Zellen**





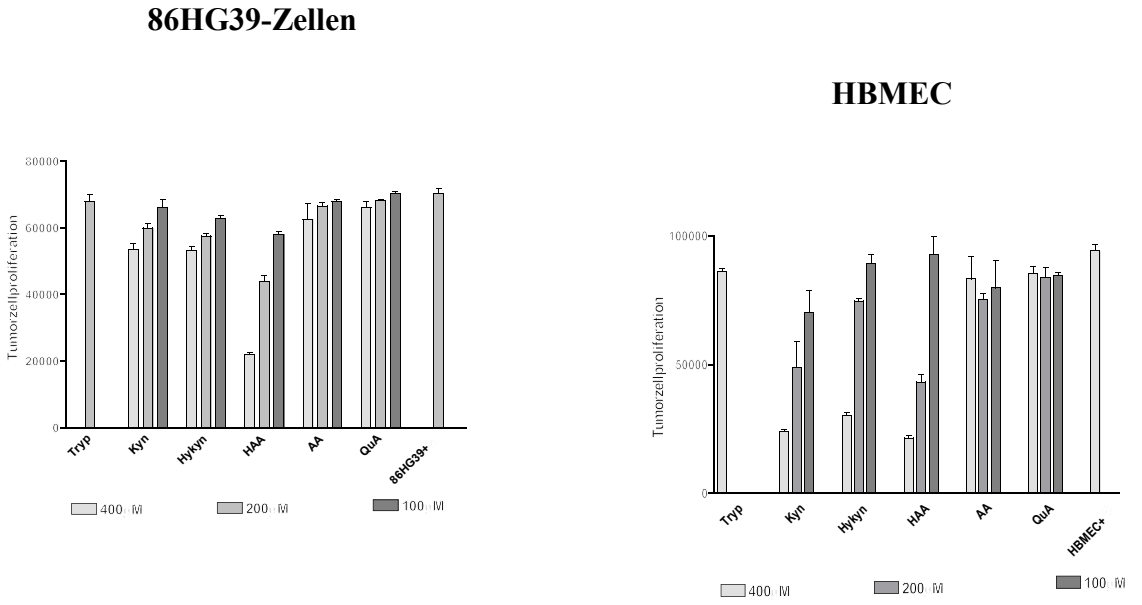


Abb.14:**Die Tryptophanmetabolite zeigen unterschiedliche Wirkungen auf das Tumorzellwachstum.** Für diesen Test wurden $3x10^4$ Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesäht und drei Tage mit unterschiedlichen Mengen der Tryptophanmetaboliten inkubiert. Zum Vergleich wurde eine Kontrollplatte mit T- Zellen angesetzt. Die Messung der Zellproliferation erfolgte wie unter 2.2.8 beschrieben

Ähnliches gilt für den in dieser Arbeit untersuchten *Staphylococcus aureus*-Stamm. Wird ihnen Tryptophan als Substrat entzogen, sind sie stark in ihrem Wachstum gehemmt. Keinen Einfluß auf die Staphylokokkenproliferation haben die Tryptophanmetabolite. Als einzige in dieser Arbeit untersuchte Zellreihe, zeigen proliferierende T-Zellen bei Inkubation mit den Metaboliten Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure eine starke Wachstumshemmung, die jedoch abhängig vom Zeitpunkt der Metabolitenzugabe ist.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei wichtige immunologische Aspekte des Tryptophanstoffwechsels untersucht: zum einen die Tryptophan-Degradation durch die IFN γ induzierte IDO-Aktivität und zum anderen die dabei entstehenden Tryptophanmetaboliten. Die Tryptophanverarmung vermittelt sowohl immunregulatorische, antiproliferative, antitumoröse und antimikrobielle Effekte, während die Tryptophanmetabolite vor allem an immunregulatorischen Prozessen der erworbenen Immunabwehr beteiligt sind.

Der Abbau von Tryptophan zu Kynurenin wird im sogenannten Kynurenin-Weg von der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) initiiert. Dieser erste und zugleich mengenbestimmende Schritt (Werner-Feldmeyer et al., 1989, Grohmann et al., 2003; Stone et al., 2002) im Katabolismus des Tryptophans ist ein Weichensteller für die Entstehung weiterer Tryptophanmetabolite (Werner et al., 1987, Widmer 2000). In der vorligenden Arbeit konnte dieser IDO katalysierte Schritt in Lungenkarzinomzellen (A549), Glioblastomzellen (86HG39) und Endothelzellen (HBMEC) nachgewiesen werden. Hierbei wurde das gesamte im Medium vorhandene Tryptophan durch die IDO der drei Tumorzellreihen zu Kynurenin abgebaut. Diese Untersuchungen machten auch deutlich, dass der limitierende Faktor beim Abbau von Tryptophan zu Kynurenin das im Testansatz vorhandene Tryptophan ist. Bei maximaler Stimulation der IDO mit IFN γ konnte der Umsatz an Kynurenin in den Kulturen nur durch höhere Konzentrationen an Tryptophan im Medium gesteigert werden. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich ein weiterer wichtiger Aspekt des IDO vermittelten Tryptophanabbaus: die Stimulierbarkeit der IDO mit IFN γ.

Ein Zusammenhang zwischen IFN γ und der Expression der IDO wurde bereits 1990 von Dai et al., beschrieben. Durch Stimulation mit IFN γ konnte die Expression der IDO in

Makrophagen, Dendritischen Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und einigen Tumorzellen induziert werden (Taylor et al., 1991, Burke et al., 1995, Varga et al., 1996, Munn et al., 1999, HWU et al., 2000). In dieser Arbeit wurde dieser Zusammenhang noch einmal für die Tumorzellreihen A549, 86HG39 und HBMEC nachvollzogen. Diese Untersuchungen belegten somit, dass IFN γ ein potenter Stimulus für die Aktivität der IDO darstellt, unabhängig von der Zellreihe, die dieses Enzym exprimiert.

IFN γ gehört zur Gruppe der Zytokine und ist maßgeblich an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt. Aus diesem Grund wurde auch für die IDO eine Beteiligung an Immunprozessen postuliert.

Bereits 1984 zeigten Pfefferkorn et al., dass tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der Induktion der IDO durch IFN γ und der Hemmung von intrazellulären Toxoplasmenwachstum besteht. Durch die Aktivität des IDO-Enzyms wird die Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin abgebaut und dem parasitären Stoffwechsel entzogen. Auxotrophe Organismen, wie die Toxoplasmen, sind nicht zur *de novo* Synthese von Tryptophan fähig. Aus diesem Grund sind sie auf die Zufuhr von Tryptophan als Substrat für ihre Stoffwechselprozesse angewiesen und können somit durch Entzug dieser essentiellen Aminosäure in ihrer Proliferation gehemmt werden.

In weiteren Studien an auxotrophen (eu- und) prokaryotischen Organismen, wie z.B. Chlamydien (Byrne et al., 1986), Streptokokken (MacKenzie et alt., 1998), Viren (Bodaghi et al., 1999), Enterokokken (Däubener et alt., 1999) und Mykobakterien (Hayashi et al., 2001) wurde die Theorie von der lokalen intra- und extrazellulären Tryptophanverarmung als inhibitorischer Effektormechanismus der Immunabwehr verifiziert. In der vorliegenden Arbeit wurde der IDO vermittelte biostatische Effekt an *Staphylococcus aureus* bestätigt. Anhand von Infektionsmodellen in den drei Tumorzellreihen A549, 86 HG39 und HBMEC konnte nach Induktion der IDO mit IFN γ das Staphylokokkenwachstum effektiv gehemmt

werden. Durch Supplementation der Kulturen mit Tryptophan konnte die Hemmung wieder aufgehoben werden, so dass die Staphylokokken erneut proliferierten. Aus diesem Experimentalsystem lässt sich schließen, dass der IDO vermittelte Abbau von Tryptophan in der Umgebung des Erregers einen potenten Abwehrmechanismus darstellt mit dem sich der Körper *in vivo* vor der Infektion bzw Ausbreitung dieses Krankheitserreger schützen kann. Dies ist jedoch nur möglich, solange das Bakterium nicht zur *de novo* Synthese von Tryptophan fähig ist. Staphylokokken spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Wundinfektionen, wie z.B. der Abszessen oder dem Stayphylokokken scaled skin syndrome und anderen Erkrankungen, wie Pneumonien und Endokarditiden. Nach der Invasion des Erregers greift zuerst die angeborene (innate), unspezifische und später die erworbene, spezifische Immunantwort. Während der angeworbenen Reaktion dringen Granulozyten und Makrophagen in das entzündete Gewebe ein, phagozytieren den Erreger und aktivieren die spezifische Abwehr. Im Zuge der erworbenen Immunantwort werden Zytokine, wie IFN γ, von aktivierten T-Zellen und NK-Zellen gebildet. Das sezernierte IFN γ stimuliert die Expression der IDO (Taylor et Feng, 1991; Dai et Gupta, 1990; Koida et Yoshida, 1994) in den umliegenden Endothelzellen, Gliazellen oder Lungenepithelzellen (Caplen et al., 1988). Die Aktivität der IDO führt zu einer (intra- und extrazellulären) Depletion des vorhandenen Tryptophans in der Umgebung des Erregers und folglich zur Hemmung von Wachstum und Ausbreitung der Staphylokokken. Um sich selbst vor dem Mangel an Tryptophan zu schützen, bilden die körpereigenen (Abwehr-) Zellen einen Tryptophanreservespeicher (Flohr et al., 1992): Dies geschieht, indem sie die Produktion der tryptophanyl-tRNA (WRS) hochregulieren (Frolova et al., 1993) und daran Tryptophan binden, das schließlich in den Zellen gespeichert wird. Dieser Mechanismus gewährleistet die Hemmung der Bakterienausbreitung, ohne dass sich die Immunzellen selbst die nötige Aminosäure entziehen. Aber nicht nur die körpereigenen Abwehrzellen verfügen über einen Schutzmechanismus vor Tryptophanmangel. Auch Bakterien haben Überlebenstrategien

entwickelt, die es ihnen möglich machen in einem tryptophanarmen Milieu zu überleben, wie diese Arbeit zeigt: Wird das im Medium vorhandene Tryptophan durch die IDO abgebaut, wachsen die Staphylokokken in der Kultur nicht mehr. Wird das Medium jedoch mit Tryptophan supplementiert proliferieren die Bakterien wieder. Das heißt, der Mangel an Tryptophan wirkt nicht zytotoxisch auf die Staphylokokken, sondern hemmt lediglich ihr Wachstum (zytostatisch). Eine Erklärung für die Fähigkeit der Staphylokokken für eine bestimmte Zeit ohne die Zufuhr der essentiellen Aminosäure zu überleben könnte das bereits beschriebene Modell der stringenten Kontrolle sein: Dies ist nichts anderes als die Fähigkeit des Bakteriums unter aminosäurearmen Bedingungen, seinen Stoffwechsel auf ein Minimum zu begrenzen, indem die Synthese bzw die Produktion von rRNA, tRNA und Ribosomen gestoppt wird (Knippers, 1997). Dieser Mechanismus ist vor allem bei Streptokokken (Whithead et al.) und *E. coli* ausführlich beschrieben. Der Abbau von Tryptophan stellt somit einen effektiven bakteriostatischen Mechanismus dar, der die Staphylokokken zwar nicht direkt abtötet, aber dennoch ein effektiver Schutz vor der Ausbreitung des Erregers bietet. Die vollständige Eliminierung der Staphylokokken obliegt dann weiteren Effektormechanismen im Immunsystem.

Mithilfe der tryptophanabbauenden Prozesse ist gewährleistet, dass nicht jeder Kontakt mit einem Pathogen/Krankheitserreger zu dessen Vermehrung und Ausbreitung im Körper und schlussendlich zu einer Infektion des Wirtsorganismus führt. Die IDO vermittelte Depletion des Tryptophans in der Umgebung eines Erregers stellt somit eine unkomplizierte T-Zell-mediierte spezifische Abwehrreaktion dar, die unter minimalen Aufwand einen potenten Schutz gegen pathogene Keime vermittelt mit denen der Organismus täglich konfrontiert wird.

Der Abbau von Tryptophan spielt aber nicht nur eine Rolle in der Hemmung des Bakterienwachstums. In dieser Arbeit wurde auch der IDO vermittelte antiproliferative Effekt auf T-Zellen und A549-, 86HG39- sowie HBMEC-Zellen untersucht. Hierbei wurde deutlich, dass sowohl die T-Zellen als auch die drei Tumorzellreihen auf Tryptophan als Substrat für ihren Stoffwechsel angewiesen sind:

Nach Stimulation der IDO mit IFN γ und dem konsekutiven Abbau des im Testansatz vorhandenen Tryptophans entstand ein tryptophanarmes Medium in dem sowohl die T-Zellen als auch die Tumorzellen nicht proliferierten. Gemeinsam ist diesen Zellen, dass sie für ihren Stoffwechsel Tryptophan benötigen und diese Aminosäure nicht *de novo* synthetisieren können. In einem tryptophanarmen Milieu fehlt die essentielle Aminosäure für die Proteinbiosynthese. Folglich kommt es zur Inhibition des Zellwachstums. Frumento et al. demonstrierten 2002, dass vor allem $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten durch die Tryptophan-Depletion gehemmt werden. Um zu beweisen, dass die Inhibition des Zellwachstums tatsächlich auf dem Mangel von Tryptophan beruht, wurden in dieser Arbeit Supplementationsversuche etabliert. In diesen Versuchen konnte die Wachstumshemmung der T-Zellen und Tumorzellen antagonisiert werden, indem man das tryptophanarme Medium mit Tryptophan supplementierte. Damit zeigen die Supplementationsversuche aber auch deutlich, dass das Wachstum der T-Zellen und Tumorzellen, ähnlich wie bei den oben beschriebenen Staphylokokkenversuchen, zwar gehemmt ist, dass die Tryptophan-Depletion aber nicht sofort zytotoxisch wird, sondern die Zellproliferation erstmal lediglich arretiert. Dieser Schluss wurde durch Studien von Lee et al., 2002 bestätigt. Lees Arbeitsgruppe fand heraus, dass trotz des Tryptophanmangels die T-Zellen noch in den Zellzyklus eintreten und erst in der mid-G1 Phase des Zellzyklus arretieren. Dauert der Tryptophanmangel an, werden die Zellen apoptotisch. Für den antiproliferativen und apoptotischen Effekt der Tryptophan-Depletion können zwei Erklärungsansätze herangezogen werden.

Als eine Möglichkeit kann der mTOR-Kinase-Weg postuliert werden (Fingar et al., 2004). Das Enzym mTOR (mammalian target of rapamycin) ist eine Kinase, dessen Funktion unter anderem in der Regulation des Zellzyklus, der Zellmotilität und Proteinsynthese liegt. Durch den Mangel an Aminosäuren wird mTOR gehemmt und und die proliferierende Zelle arretiert in der G1-Phase des Zellzyklus (Asnaghi L et al., 2004**).**

Diese Theorie wurde jedoch von Munn wie auch von Fox infrage gestellt, als deren Arbeitsgruppen zeigen konnte, dass die Hemmung des Zellwachstums nicht stattfindet, wenn mTOR durch seinen Inhibitor rapamycin gehemmt wird (Munn et al., 2005; Fox et al., 2005). Das bedeutet, dass der Tryptophanmangel nicht über die Hemmung des mTOR-Kinase-Wegs die Zellproliferation inhibiert, sondern dass ein alternativer Weg vorhanden sein muß. Aus Studien von Hinnebusch weiß man, dass bei Pilzen ein zweiter Aminosäure-sensitiver-Kinase-Weg besteht (Hinnebusch, 1994). In *Saccharomyces cerevisiae* löst ein Aminosäuremangel die Phosphorylierung des eIF2 (eukaryotischen Initiationsfaktors 2) aus, der wiederum die Translation GCN4 kodierender mRNA induziert. GCN4 (genral control nonderepressible 4) aktiviert bis zu 40 Genen, die für Aminosäure-synthetisierende Enzyme kodieren (Hinnebusch, 1992 und1997). Mithilfe dieses stress-induzierten Mechanismus schützt sich der Pilz vor dem Zelltod durch Substratmangel.

Einen ähnlichen Mechanismus fand man bei Toxoplasmen. Werden Toxoplasmen zellulärem Stress, wie z.B. einem Hitze-Schock oder einem alkalischen Medium ausgesetzt, wird auch in diesen Parasiten der Toxoplasma eIF2α (TgIF2α) durch die entsprechende Kinase phosphoryliert und es findet ein Wechsel von der aktiven infektiösen tachyzoiten Form in die ruhende bradyzoite Zytenform statt (Weiss et al., 2000; Sullivan et al., 2004). In anderen eukaryoten Säugetierzellen existiert ebenfalls ein derartiger stressinduzierter Mechanismus (Harding et al., 2000; Sood et al., 2000). Im Falle von Aminosäuremangel wird die sogenannte GCN2-Kinase durch unbeladene tRNA aktiviert. Die aktivierte GCN2-Kinase

phosphoryliert die α-Untereinheit des eIF2 (eukaryotischen Initiationsfaktors 2). Der eIF2 induziert einen noch nicht im Detail geklärten downstream-Mechanismus (Dong et al., 2000), der im weiteren Verlauf abhängig vom Zelltyp entweder zum Zellzyklus-Arrest, zur Zellanergie, Zellapoptose oder Zelldifferenzierung führen kann (Crosby et al., 2000; Harding et al., 2000; Niwa et Walter, 2000; Rao et al., 2004) (Anthony et al., 2004; Zhang et al., 2002). Bezeichnet wird dieses Modell als ISR (integrated stess response).

Zwar ist bis heute nicht viel über den Zusammenhang zwischen $CD4^+$ T-Zellen und ISR bekannt (Beretta, 2004) und die Forschung hat sich bis jetzt auf $CD8^+$ Zellen konzentriert (Munn et al., 2005), aber dennoch haben Studien von Hinnebusch gezeigt, dass die Induktion der ISR eine generelle, jedoch temporäre Hemmung der mRNA Translation in T-Zellen bewirkt (Hinnebusch, 2000), d.h. die T-Zellen in einen Zustand der Anergie überführen. Trotz der wenigen Studien hierzu, bietet das ISR Modell dennoch einen plausiblen Erklärungsansatz für die IDO vermittelte Hemmung des in dieser Arbeit gezeigten $CD4^+$ T-Zellwachstums: Durch Aktivierung der IDO wird das vorhandene Tryptophan in der Umgebung der T-Zellen abgebaut. Der Abbau des Tryptophans in der Zellumgebung hat zur Folge, das vermehrt unbeladene tryptophanyl tRNA in den Zellen entsteht, welche die GCN2-Kinase aktiviert. Die aktivierte GCN2-Kinase phosphoryliert den GCN2 Faktor, der auf der einen Seite die Synthese verschiedener Proteine hemmt und auf der anderen Seite die Expression spezifischer Gene hochreguliert, die eine wichtige Rolle in der Signalkaskade des GCN2-Weges spielen (Wek et al., 2006). Darüber hinaus führt der GCN2-Kinase-Weg über bis jetzt nicht vollständig geklärte Mechanismen zu einer Hemmung des Zellzyklus (Niwa et al., 2000). Durch Zufuhr von Tryptophan kann dieser Effekt wieder aufgehoben werden (Munn et al., 2005): die tryptophanyl tRNA ist wieder mit Tryptophan beladen und die GCN2-Kinase wird nicht weiter aktiviert. Dieses Modell würde den IDO vermittelten antiproliferativen Effekt auf

die T-Zellen und dessen Antagonisierbarkeit durch Tryptophanzufuhr erklären. Unterstützt wird diese These von der Tatsache, dass GCN2 defiziente T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* keine Hemmung der Proliferationsrate nach Stimulation der IDO zeigen (Munn et al., 2005).

Ein ähnlicher Mechanismus, die sogenannte stringente Kontrolle wurde bereits weiter oben für die Staphylokokken postuliert.

Dem Tryptophanabbau als Effektormechanismus in der Regulation der T-Zell- und Tumorzellproliferation kommt eine besondere Bedeutung zu. Neben der Abwehr von pathogenen Keimen sind T-Zellen an vielen überschiessenden Immunreaktionen beteiligt, wie z.B. Autoimmunreaktionen, Allergien und Transplantatabstoßungen. Mithilfe der IDO und der konsekutiven Tryptophankatalyse ist es dem Körper möglich eine überschießende Immunreaktion einzudämmen und eine periphere Immuntoleranz auszubilden (Munn et al., 2005), indem autoreaktiven Immunzellen durch Abbau des Tryptophans die Grundlage zur Proliferation genommen wird. Mellor und Munn zeigten dies an Versuchen mit trächtigen Mäusen. Durch Hemmung der IDO in Zellen der Plazenta kam es zur Abstoßung des allogenen Fötus, wohingegen es in Anwesenheit IDO-aktiver Plazentazellen zu keiner Abstoßungsreaktion kam. Ähnliche Studien zeigten, dass in Anwesenheit IDO-aktiver Zellen es zu einer negativen Selektion von autoreaktiven T-Zellen kommt und somit zu einer Toleranz-Entwichklung gegenüber körpereigenen Antigenen (Munn et al., 1999; HWU 2000). Fu (1996) und Rastellini (1995) berichteten, dass die Verabreichung von IDO^+ DC eines Organspenders an den designierten Empfänger einige Zeit vor der eigentlichen Transplantation zu einer Ausschaltung der Donor-reaktiven T-Zellen und so zum

Hinauszögern einer möglichen Transplantatabstoßung führte. Darüber hinaus konnte durch einen IDO-Gentransfer in für die Transplantation bestimmte Gewebe eine ektope Überexpression der IDO induziert werden. Die daraus resultierende Immunsuppression machte eine zusätzliche medikamentöse Therapie zum Schutz vor einer Abstoßungsreaktion des transplantierten Lungengewebes (Swanson et al., 2004; Liu et al., 2006) oder der Corneatransplantate (Beutelspacher et al., 2006) überflüssig.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des antiproliferativen Effekts des Tryptophanabbaus auf das T-Zellwachstum stützen diese Theorien und bieten zugleich ein *in vitro* Modell für das oben beschriebene und für mögliche Therapieansätze. Der IDO vermittelte Tryptophanabbau ist ein potenter Mechanismus, Zellwachstum zu hemmen und vor allem durch Inhibition der T-Zellproliferation einen entscheidenden Einfluß auf die erworbene Immunabwehr zu nehmen. Möglicherweise wären Autoimmunreaktionen, Allergien und Organabstoßungen viel häufiger, würde die T-Zell-vermittelte Immunreaktion nicht durch IDO aktive Zellen kontrolliert. So belegten zwei Studien, dass eine pharmakologische Inhibition der IDO zu einer signifikanten Verschlechterung von Entzündungsreaktionen bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Gurtner et al., 2003) und beim allergischen Asthma (Hayashi et al., 2004) führte.

Die Versuche mit den T-Zellen zeigen, dass der Effekt der IDO nicht nur als Abwehrmechanismus von pathogenen Erregern, wie z.B. Staphylokokken, betrachtet werden kann, sondern auch als ein negativer Feedbackmechanismus, der zu einer Selbstlimitierung der Immunreaktion führt und den Körper vor überschießenden Autoimmunreaktionen schützt.

Die Eindämmung und Abwehr von entarteten Zellen könnte *in vivo* wie folgt ablaufen: Sobald eine Zelle entartet werden deren Antigene von immunkompetenten Zellen als fremd erkannt. Nach der Phagozytose durch Makrophagen und Aktivierung von Immunzellen durch Präsentation von Tumorantigenen produzieren stimulierte T-Zellen und NK-Zellen IFN γ.

Ähnlich wie bei inflammatorischen Prozessen stimuliert das IFN γ wiederum die IDO in den umliegenden Zellen. Der darauf folgende konsekutive Abbau von Tryptophan entzieht den sich entwickelnden Tumorzellen die essentielle Aminosäure und hemmt damit bereits im Anfangsstadium deren Wachstum und Ausbreitung.

Ob diese Theorie eine Erklärung für mögliche *in vivo* Abläufe bei der Abwehr und Eindämmung entarteter Zellen darstellt, bleibt dennoch fraglich, da die Tumorzellen wie auch die T-Zellen über die oben beschriebenen intrazellulären Tryptophanspeicher verfügen. Wird das vorhandene Tryptophan in der Umgebung der T-Zellen und Tumorzellen abgebaut, können sie mithilfe der WRS (tryptophanyl tRNA) (Frolova et al., 1993) diese Speicher auffüllen und für kurze Zeit überleben. Erst wenn die Speicher aufgebraucht sind und die Tryptophan-Depletion weiter anhält könnte die Tumorzellproliferation nachhaltig in diesem Gewebe gehemmt werden. Das würde aber auch eine weitere Hemmung der ebenfalls tryptophanabhängigen T-Zellen bedeuten. Diese Folgerung macht also einen derartigen Mechanismus in der Immunabwehr von Tumorzellen *in vivo* nur schwer vorstellbar. Dennoch bieten diese Ergebnisse und Überlegungen zumindest neue Ansatzmöglichkeiten in der Bekämpfung von Tumorleiden *in vivo.*

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit den immunregulatorischen Effekten der Tryptophanmetabolite. Denn die Depletion von Tryptophan ist nicht das einzige Ergebnis einer IFN γ stimulierten IDO-Aktivität. Während des IDO vermittelten Abbaus von Tryptophan entstehen tryptophanabhängige Reaktionsprodukte im sogenannten Kynurenin-Weg. Wie die Versuche dieser Arbeit gezeigt haben wird an erster Stelle im Kynurenin-Weg das Tryptophan abgebaut. Hierbei entstehen äquimolaren Mengen an Kynurenin. Abhängig von den im entsprechenden Gewebe vorhandenen Enzymen entstehen nachfogend weitere Metabolite, wie z.B. Hydroxykynurenin, Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und als letztes Quinolinsäure.

Dass diese Metabolite eine Rolle im Zusammenhang mit Gesundheit und Krankheit spielen ist aus früheren Studien bekannt: So findet sich zum Beispiel bei Tumorpatienten mit Harnblasenkarzinom ein erhöhter Hydroxykynurenin- und Hydroxyanthranilsäure-Spiegel im Urin (Boyland et al., 1956; Dyer et al., 1961) und Benassi et al., postulierten, dass einige der Tryptophanmetabolite auch an Tumorerkrankungen der Prostata, der Nieren und sogar bei der Pathogenese des Hodgkinlymphoms beteiligt sind. Ebenso zeigten Studien an AIDS-Patienten, dass sich durch den IDO-induzierten Tryptophanabbau neurotoxische Metabolite im Gehirn ansammeln, die wesentlich zur HIV-assoziierten Neuropathologie beitragen (Fuchs et al., 1990; Kerr et al., 1997; Heyes et al., 1998; Burudi et al., 2002; Zangerle et al., 2002).

1996 fanden Espey und Namboodiri heraus, dass sich in Folge von Infektionen hohe Konzentrationen von Quinolinsäure, dem letzten Reaktionsprodukt im Kynurenin-Weg, in Leukozyten anhäufen. Moffett machte diese Beobachtung 1998 auch mit Kynurenin. Diese Entdeckungen legten die Vermutung nahe, dass auch die Tryptophanmetabolite eine wesentliche Rolle in Zusammenhang mit Erkrankungen und Immunprozessen spielen und die Tryptophan-Depletion nicht der einzige Effektormechanismus ist. Um zu untersuchen, ob neben dem Tryptophanabbau, auch die entstandenen Tryptophanmetabolite einen biostatischen Effekt auf das Zellwachstum ausüben, somit auch eine Rolle in der Immunabwehr bzw Modulation des Immunsystems spielen, wurden sowohl Staphylokokken, T-Zellen und Tumorzellen mit den Metaboliten inkubiert und anschließend deren Proliferationsrate bestimmt.

Der Ausgangspunkt der Metabolitenversuche war, dass in unseren Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass der IDO vermittelte Abbau von Tryptophan stets mit der Bildung äquimolarer Mengen von Kynurenin als erstes und direktes Reaktionsprodukt aus der Tryptophan-Depletion einhergeht. Je mehr Tryptophan im Testsystem vorhanden ist, umso mehr Kynurenin entstand bei maximaler IDO Stimulation mit IFN γ. Bei Infektionen und folgenden Antigenkontakt werden $CD4^+$ Immunzellen aktiviert und große Mengen IFN γ

produziert. Dieses Zytokin stimuliert die IDO-Aktivität IDO^+ Zellen. Folge ist nicht nur der Abbau des vorhandenen Tryptophans, sondern auch die Anhäufung von Kynurenin im Umfeld der Entzündungsreaktion. Frumento veröffentlichte 2002 Daten, in denen er zeigte, dass Kynurenin und Quinolinsäure als einzige Metabolite das Wachstum von T-Zellen hemmen. In dieser Arbeit konnte stattdessen gezeigt werden, dass neben Kynurenin auch Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure potente Inhibitoren der T-Zellproliferation sind. Für Anthranilsäure und Quinolinsäure konnte dagegen kein antiproliferativen Effekt auf das T-Zellwachstum fesgestellt werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Untersuchungen von Terness, in denen er ein ähnliches Wirkspektrum für die Metabolite beobachtete (Terness et al., 2002). Ein weiteres wichtiges Ergebnis in dieser Arbeit ist, dass der metaboliten-induzierte antiproliferative Effekt nicht durch Supplementation des Mediums mit Tryptophan aufgehoben werden konnte. Das bedeutet, dass die Hemmwirkung der Metabolite auf die T-Zellen ein anderer ist als bei der Tryptophanverarmung. Offensichtlich beruht der antiproliferative Effekt nicht lediglich auf dem Mangel eines essentiellen Substrats, sondern die Metabolite scheinen irreversibel in den Zellstoffwechsel und die Zellproliferation einzugreifen.

Von Hydroxyanthranilsäure ist bekannt, dass es durch Blockierung der Atmungskette an Mitochondrien in der Rattenleber hemmt und somit zum Zelltod führt (Quagliariello et al., 1963). Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei den T-Zellen zu Grunde liegen. Eine stoffwechselaktive Zelle ist auf die Energiegewinnung durch die Atmungskette stärker angewiesen. Ist die Atmungskette gestört, führt dies unweigerlich zum Zelltod.

Diese Beobachtung würde auch erklären, warum die Metabolite nicht auf ruhende T-Zellen hemmend wirken. Denn unabhängig von der Art des Stimulus werden nur proliferierende T-Zellen, vor allem in der frühen Phase der Zellzyklus, gehemmt. Stimulierte T-Zellen sind im Gegensatz zu ruhenden T-Zellen stoffwechselaktiv(er), d.h. sie sind auf die Energiegewinnung durch die Atmungskette angewiesen, um proliferieren zu können. Durch

Blockierung der Atmungskette durch die Metabolite möglicherweise über spezifische Rezeptoren wird die Zellproliferation inhibiert und die Zelle wird apoptotisch.

Eine andere Erklärung für die Wirkung der Metabolite ist der bereits genannte GCN2-Kinase-Weg. Nachdem die Metabolite über einen Aminosäure-spezifischen Transporter, wie z.B. GPR35 (orphan G protein-coupled receptor) (Wang et al., 2006) in die T-Zellen aufgenommen werden, binden sie als Enzymaktivatoren irreveribel an ein allosterisches Zentrum der GCN2-Kinase. Nach Aktivierung der GCN2-Kinase setzt dieselbe Signalkaskade ein wie bei Tryptophanmangel. Da die Metabolite jedoch an einem allosterischen Zentrum binden, kann die GCN2 induzierte Signalkaskade nicht wie oben beschrieben durch Tryptophanzufuhr und Beladen der tRNA mit Tryptophan antagonisiert werden. Durch die Irreversibilität dieses Metaboliten-induzierten Prozesses wird das Zellwachstum nicht nur kurzfristig gehemmt, sondern durch Andauern des GCN2 vermittelten Signals zusätzlich die Apoptose der Zelle initiiert.

Ein anderer Ansatz für die Hemmwirkung der Metabolite könnte die tryptophanyl-tRNA-Synthetase sein. Wird die Synthetase durch die Metabolite gehemmt und somit die Acetylierung geblockt, die für die Bindung von Tryptophan an die tryptophanyl-tRNA notwendig ist, bliebe diese unbeladen und wäre wieder ein potenter Stimulus für den oben beschriebenen GCN2-Kinase-Weg.

Durch irreversible Bindung an das allosterische Zentrum der tryptophanyl-tRNA-Synthetase kann dieser Effekt auch nicht durch Tryptophan antagonisiert werden.

Der wachstumshemmende Effekt von Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranil-säure hat sich in weiteren Untersuchungen dieser Arbeit als ein eher spezifischer Mechanismus herausgestellt, der vor allem T-Zellen hemmt: Staphylokokken zeigen keine Proliferationshemmung nach Inkubation mit Kynurenin und auch das Tumorzellwachstum der in dieser Arbeit getesteten Zellreihen bleibt weitgehend unbeeinflusst von den Metaboliten.

Nur bei sehr hohen unphysiologischen Dosierungen zeigen Kynurenin und Hydroxyanthranilsäure eine partielle Wachstumshemmung auf die HBMEC-Zellen, die aber im Vergleich mit den T-Zellen weitaus geringer ausfällt.

Ein Grund für die Spezifität der Metabolite kann sein, dass die Metabolite über spezifische Aminosäuretransporter erst in die Zelle aufgenommen werden müssen, um im Zellinneren die entsprechenden Enzyme aktivieren (GCN2-Kinase) oder hemmen (tryptophan tRNA-synthetase) (siehe oben) zu können. Vielleicht bedarf es auch spezifischer Rezeptoren, wie z.B. dem GPR35 (orphan G protein-coupled receptor), der vor allem in den Zellen des Immunsystems exprimiert werden (Wang et al., 2006) und dort einen downstream Mechanismus auslöst, ähnlich dem GCN2-Kinase-Weg.
Die Unwirksamkeit der Metabolite bei Staphylokokken und Tumorzellen kann dann auf das Fehlen dieser spezifischen Aminosäuretransporter oder Rezeptorsysteme für die Tryptophanmetabolite zurückgeführt werden.

Bleibt man bei der Theorie, dass die Metabolite an der Atmungskette ansetzten, wäre eine andere Erklärung, warum zumindest die Staphylokokken nicht durch die Metabolite gehemmt werden, die Tatsache, dass die Tryptophanmetabolite vor allem auf stoffwechselaktive Zellen wirken: durch das geringe Angebot an Tryptophan und der erhöhten Konzentration von Metaboliten im Testsystem aktivieren die Bakterien ihre stringente Kontrolle. Der Stoffwechsel und damit der Bedarf an Energiegewinnung durch die Atmungskette wird auf ein Minimum reduziert. Infolgedessen bleibt den Metaboliten kein Angriffspunkt im Bakterienstoffwechsel, der zum Zelltod führen kann. Die IDO vermittelte Bildung von Tryptophanmetaboliten ist in diesem Fall nutzlos in der Abwehr von

Staphylokokkeninfektionen, was u.a. in Versuch 5 eindrucksvoll gezeigt werden konnte. Weiterhin wird diese Theorie von der Tatsache unterstützt, dass in der Abwehr von *Staphylococcus aureus* das T-zelluläre Immunsystem eine untergeordnete Rolle spielt (Janeway 2005) und deren IDO vermittelte Abwehr *per se* lediglich eine erste Barriere gegen Staphylokokkeninfektionen darstellt. An der endgültigen Abwehr sind vor allem die B-Lymphozyten beteiligt. B-Lymphozyten weisen selber keine IDO-Aktivität auf und bilden somit auch keine toxischen Tryptophanmetabolite. Folglich spielen bei der B-Zell-vermittelten Staphylokokkenabwehr andere Effektormechanismen als die IDO-vermittlete Bildung von Tryptophanmetaboliten eine entscheidende Rolle spielen.

Für die Unwirksamkeit der Tryptophanmetabolite bei den Tumorzellen könnte neben dem Fehlen spezifischer Aminosäuretransporter oder Rezeptoren vor allem die hohe Proliferationsrate der Tumorzellen eine Rolle spielen. Die entstandenen Mengen an Metaboliten reichen einfach nicht aus, um wachstumshemmend auf die hier getesteten Tumorzellreihen zu wirken.

Was auch immer der Grund hierfür sein mag, so geben diese Ergebnisse dennoch wichtige Hinweise für mögliche *in vivo* Abläufe bei Infektion und Tumorerkrankung und die Rolle die die IDO dabei spielt.

In vivo kann sich der Organismus mithilfe der Tryptophan-Depletion und der Bildung zytotoxischer Metabolite z.B. vor überschiessenden Immunreaktionen schützen: Nach Ablauf einer Immunreaktion kann man die IDO vermittelte Katalyse von Tryptophan als einen negativen Rückkopplungsmechanismus betrachten, der eine überschiessende und mögliche autoreaktive Immunreaktion verhindern soll. Zum einen durch den IDO vermittelten Abbau von Tryptophan in der Umgebung der Immunreaktion wird den T-Zellen die essentielle

Aminosäure als Grundlage für ihre Proliferation genommen. Zum anderen können die bereits proliferierenden T-Zellen durch zytotoxische Metabolite inhibiert werden.

Ähnlich wie die Staphylokokken zeigen weder Kynurenin, Hydroxykynurenin noch Hydroxyanthranilsäure einen Effekt auf das A549-Zellwachstum und nur einen geringen antiproliferativen Effekt auf 86HG39- und HBMEC-Zellen. Dennoch ist diese Wachstumshemmung nicht annähernd so stark wie bei den T-Zellen, d.h. eine minimale Hemmwirkung von 50 % wurde mit den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen des Metaboliten bei den Tumorzellen nicht erreicht. Dies lässt den Schluß zu, dass Tumorzellen zwar durch Tryptophanentzug im Wachstum gehemmt werden können, nicht aber durch die tryptophanabhängigen Metabolite. In tryptophanarmen Kulturen können die Tumorzellen nicht proliferieren, weil ihnen die esssentiele Aminosäure Tryptophan fehlt. Supplementiert man die Tumorzellen aber mit Tryptophan stellt sich das Tumorzellwachstum wieder ein. Gleiches gilt für das Tumorzellwachstum in tryptophanarmen aber metabolitenangereicherten Medium. Durch Supplementation mit Tryptophan erreichen die Tumorzellen wieder ihre übliche Wachstumsrate.

Dies belegt, dass einzig und allein der Substratmangel der essentiellen Aminosäure und nicht die Wirkung toxischer Metabolite eine Rolle in der Hemmung von Tumorzellen spielt.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit deutlich gezeigt, dass die hier untersuchten A549-, 86HG39- und HBMEC-Zellen selbst eine starke IDO-Aktivität exprimieren und Tryptophan zu seinem Reaktionsprodukt Kynurenin abbauen. Sowohl der Tryptophanabbau als auch die folgenden Metabolite des Kynurenin-Wegs haben einen antiproliferativen Effekt auf stimulierte T-Zellen. T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung und Abwehr von Tumorzellen. Dennoch gelingt es Tumorzellen immer wieder der Abwehr zu entgehen und sich ungehemmt zu vermehren, so dass die Schlussfolgerung nahe liegt, dass die IDO *in vivo* weniger an der Abwehr von Tumorzellen beteiligt ist, als dass sich Tumorzellen vielmehr die

Effektormechanismen der IDO zu nutze machen, um der Immunabwehr des Körpers zu entgehen und eine Immuntoleranz gegenüber den körperfremden Tumorantigenen zu induzieren: Nach Erkennen der Tumorzelle, werden deren Antigene von APC prozessiert und den T-Zellen präsentiert. Dieser Stimulus führt zu klonalen Expansion der T-Zellen und gleichzeitig zur Ausschüttung von Zytokinen zur weiteren Regulation des Immunsystems. Das dabei ausgeschüttete IFN γ stimuliert aber nicht nur die IDO-Expression in körpereigenen (immunkompetenten) Zellen, sondern auch in den tumordrainierenden Lymphknoten und in den Tumorzellen selbst.

Somit kann die IDO an zwei Orten an der Toleranzentwicklung gegenüber Tumorantigenen beteiligt sein: in der Umgebung des Tumors oder in den tumor-drainierenden Lymphknoten (Munn et al., 2007).

Nach IFN γ-Stimulation der IDO in den Tumorzellen wird der erste Schritt des Kynurenin-Wegs katalysiert. Das vorhandene Tryptophan im Umfeld der Tumorzelle wird abgebaut und stattdessen mit Kynurenin angereichert. Der Mangel an Tryptophan unterbindet über den GCN2-Kinase-Weg eine effektive Immunantwort durch die T-Zellen und die entstandenen Mengen an Kynurenin reichen aus, bereits aktive T-Zellen zu hemmen, ohne jedoch die Proliferation der Tumorzelle zu beeinflussen. Auf diese Weise schafft es der Tumor mithilfe der IDO und des Kynurenins eine tumorantigen-spezifische Immunantwort zu unterbinden oder, wenn bereits eine Stimulation von T-Zellen stattgefunden hat, sie zu eliminieren. Dadurch gelingt es den Tumorzellen eine Immuntoleranz gegenüber spezifischen Tumorantigenen zu erzeugen und ungehindert zu wachsen. Den bei diesen IDO-vermittelten Prozessen entstandenen Tryptophanmangel kompensieren die Tumorzellen mithilfe des oben beschriebenen tryptophanyl-tRNA-Speichers.

Untersuchungen haben gezeigt, dass in einigen tumornahen Lymphknoten, die IDO exprimiert wird (Munn, D.H., et al. 2002; von Bergwelt-Baildon, M.S., et al. 2006; Lee, J.R., et al. 2003; Lee, J.H., et al. 2005) und das IDO^+ DC aus diesen Lymphknoten eindeutig die T-

Zell vermittelte Immunantwort in vitro hemmen und eine antigenspezifische T-Zellanergie/-toleranz induzieren (Munn, D.H., et al. 2004; Munn, D.H., et al. 2005). Ebenso zeigten weitere Studien, dass sich die Prognose einiger Tumoren mit der Anwesenheit IDO exprimierender Zellen in den tumor-drainiernden Lymphknoten verschlechterte (Munn, D.H., et al. 2004; Lee, J.H., et al. 2005).

Eine ähnliche Verschlechterung der Prognose fand man bei IDO-exprimierenden Tumorzellen (Uyttenhove et al. 2003), wie z.B. dem Kolonkarzinom (Brandacher et al. 2006), dem Endometriumkarzinom (Ino et al. 2006) und dem Ovarialkarzinom (Okamoto et al. 2005). Aber unabhängig vom Ort der IDO-Expression (im Tumor selbst oder im Lymphknoten) sind die zwei entscheidenen Wege in der Entstehung der antigenspezifischen Tumor-Toleranz zum einen die Blockierung des Primärkontakts zwischen dem Immunsystem und dem Tumorantigen (Staveley-O´Carroll et al., 1998; Cuenca et al., 2003) durch den antiproliferativen Effekt der Tryptophan-Depletion und zum anderen die Hemmung bereits aktivierter T-Zellen (Gajeweski et al., 2006) durch die Metabolite. Beides Mechanismen, die durch die IDO vermittelt werden.

Aus den Untersuchungen und der Diskussion geht deutlich hervor, dass die Tryprophan-Depletion und die Tryptophanmetabolite unterschiedliche Effektormechanismen ausüben. Der IDO vermittelte Abbau von Tryptophan stellt einen potenten Hemmechanismus tryptophanabhängigen Organismen, wie z.B. Bakterien, dar. Durch eine lokale Tryptophanverarmung kann sowohl die Ausbreitung auxotropher pathogener Erreger im Körper gehemmt werden als auch die Proliferation von T-Zellen. Durch diese Wirkung kommt der Tryprophan-Depletion *per se* eine entscheidende Bedeutung im Zusammenhang

mit Immunreaktionen zu. Die Wirkung der Metabolite ist viel zellspezifischer und zugleich ambivalenter. Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure wirken hauptsächlich auf stimulierte T-Zellen antiproliferativ und nicht auf pathogene Erreger. Daher scheint den Metaboliten eher eine Rolle in der Immunmodulation als in der Abwehr von Erregern zuzukommen. Zum einen könnten die Tryptophanmetabolite *in vivo* entscheidend an der Hemmung überschiessender T-Zellreaktionen beteiligt sein, wie Munn es für die IDO vermittelte Tryptophan-Depletion postulierte (Munn et al., 2002). Zum anderen könnten die Reaktionsprodukte des IDO vermittelten Typtophanabbaus aber auch entscheidend an der Ausbreitung von Tumorzellen *in vivo* mitwirken. So wäre die Bildung von Metaboliten *in vivo* ein potenter Effektormechanismus von Tumorzellen, der T-Zellvermittelten Immunabwehr des Körpers zu entgehen und sich ungehindert auszubreiten.

Ungeachtet dessen, ob der *in vivo* Effekt des Tryptophanabbaus und der Metabolitenenstehung dem Körper Nutzen oder Schaden zufügen, so bietet die IDO doch auch zahlreiche Ansatzpunkte für die weitere Forschung und für neue therapeutische Ansätze bei Allergien, Tumorerkrankungen, Autoimmunreaktionen und für die Transplantationschirurgie. Besonders das Wissen um die Beteiligung der IDO an der Toleranzentwicklung gegenüber Tumorantigenen und deren Mechanismen bietet einen interessanten Ansatzpunkt für die medikamentöse Tumortherapie. So könnte womöglich die Wirkung einiger Chemotherapeutika unterstützt werden, wenn man die IDO in Tumorgeweben effektiv hemmt. So konnte bereits eine Studie zeigen, dass durch die Kombination eines Chemotherapeutikums mit dem IDO-Inhibitor 1MT (1 Methyltryptophan) die Grösse einiger Tumoren konstant abnahm (Muller et al., 2005).

Wie diese Doktorarbeit hoffentlich zeigt, ist die Indolamin 2,3-Dioxygenase ein Enzym, das an vielen Prozessen beteiligt ist und deren Wirkung teilweise nur schwer zu erfassen ist. Ich

hoffe aber dennoch, einen umfassenden und aufschlussreichen Eindruck von dem so vielseitigen Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase und seinen Effekten auf verschiedenes Zellwachstum vermittelt und neue Denkanstösse für zukünftige Forschungsansätze gegeben zu haben.

5. Literaturverzeichnis

Ahmed R, Gray D: Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. Science 1996; 272: 54-60.

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Takikawa O, Däubener W: Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in α/β and γ-interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. J. Virol. 2004; 78: 2632–2636.

Alberati-Giani D, Ricciardi-Castagnoli P, Kohler C, Cesura AM: Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. J Neurochem. 1996; 66: 996-1004.

Anthony TG, McDaniel BJ, Byerley RL, McGrath BC, Cavener DR, McNurlan MA, Wek RC: Preservation of liver protein synthesis occurs during dietary leucine deprivation at the expense of skeletal muscle mass in mice deleted for eIF2 kinase GCN2. J. Biol. Chem. 2004; 279: 36553–36561.

Asnaghi L, Bruno P, Priulla M, Nicolin A: mTOR: a protein kinase switching between life and death. Pharmacol Res. 2004; 50: 545-549.

Babcock TA, Carlin JM: Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. Cytokine 2000; 12: 588-594.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD: The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu. Rev. Immunol 1997; 15: 563-591.

Baglioni C: Interferon-induced enzymatic activities and their role in the antriviral state. Cell 1979; 17: 255-264.

Balachandran S, Kim CN, Yeh WC, Mak TW, Bhalla K, Barber GN: Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling. EMBO J. 1998; 17: 6888-6902.

Bandyopadhyay SK, Leonard GT Jr, Bandyopadhyay T, Stark GR, Sen GC: Transcriptional induction by double-stranded RNA is mediated by interferon stimulated response elements without activation of interferon-stimulated gene factor 3.J Biol Chem. 1995; 270: 19624-19629.

Barcelo-Battlori S, Andre M, Servis C, Levy N, Takikawa O, Michetti P, Reymond M, Felley-Bosco E: Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. Proteomics. 2002; 2: 551-560

Beretta L: Translational control in T lymphocytes. Int. Rev. Immunol. 2004; 23: 347–363.

Bertazzo A, Ragazzi E, Biasiolo M, Costa CV, Allegri G: Enzyme activities involved in tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rabbits. Biochim Biophys Acta. 2001; 1527: 167-175.

Bender DA: The kynurenine pathway of tryptophan metabolism. In: Stone TW, ed. Quinolinic Acid and the Kynurenines. CRC Press. 1989; 4–38.

Benassi CA, Perissinotto B, Allergri G: The Metabolism of Tryptophan in Patients with Bladder Cancer and Other Urological Diseases. Clin. Chim. Acta, 1963; 8: 822-831.

Benassi CA, Perissinotto B: Aspects of the metabolism of tryptophan in patients with vesical tumors and other urinary diseases. Farmaco Sci. 1960 May; 15: 323-336.

Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO, George AJ, Larkin DF: Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by overexpression. Eur. J. Immunol. 2006; 36: 690–700.

Bianchi M, Bestini R, Grezzi P: Induction of indoleamine dioxygenase by interferon in mice: a study with different recombinant interferons and various cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988; 152:237–242.

Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI: TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. Annu Rev Cell Dev Biol. 1995; 11: 307-353.

Biron CA, Sen GC: Interferons and other cytokines, p. 321-351. In D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. Martin, B. Roizman, and S. E. Straus (ed.), Fields virology, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.

Biron CA, Brossay L: NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. Curr Opin Immunol. 2001; 13: 458-464.

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S: Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. J Immunol. 1999;162:957-64.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC: Cellular responses to interferon-gamma. Annu. Rev. Immunol. 1997; 15: 749-795

Boyland E, Williams DC: The metabolism of tryptophan. 2. The metabolism of tryptophan in patients suffering from cancer of the bladder. Biochem J. 1956; 64: 578-82.

Brown RR, Ozaki Y, Datta SP, Borden EC, Sondel PM, Malone DG: Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, auto-immune diseases and AIDS. Adv. Exp. Med. Biol. 1991; 294: 425–435.

Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, Schneeberger S, Obrist P, Winkler C, Werner ER, Werner-Felmayer G, Weiss HG, Göbel G, Margreiter R, Königsrainer A, Fuchs D, Amberger A: Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. Clin. Cancer Res. 2006; 12: 1144–1151.

Burke F, Knowles RG, East N, Balkwill FR: The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the anti-tumour activity of human interferon-gamma in vivo. Int. J. Cancer 1995; 60: 115–122.

Burudi EM, Marcondes MC, Watry DD, Zandonatti M, Taffe MA, Fox HS: Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in simian immunodeficiency virus-infected monkey brains. J Virol. 2002;76: 12233-12241.

Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ: Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells. Infect Immun. 1986; 53: 347-351.

Cantin E, Tanamachi B, Openshaw H, Mann J, Clarke K: Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. J Virol. 1999; 73: 5196-5200.

Caplen HS, Guppla Sl: Differential regulation of a cellular gene by human interferon-gamma and interferon-alpha. J Biol Chem. 1988; 263: 332-339.

Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI: Biological-response-modifier-induced indoleamine 2,3- dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. J. Immunol. 1987; 139: 2414–2418.

Chakraborty NG, Li L, Sporn JR, Kurtzman SH, Ergin MT, Mukherji B: Emergence of regulatory CD4+ T cell response to repetitive stimulation with antigen-presenting cells in vitro: implications in designing antigen-presenting cell-based tumor vaccines. J. Immunol 1999; 162: 5576-5583.

Crosby JS, Chefalo PJ, Yeh I, Ying S, London IM, Leboulch P, Chen JJ: Regulation of hemoglobin synthesis and proliferation of differentiating erythroid cells by heme-regulated eIF-2alpha kinase. Blood 2000; 96: 3241–3248.

Cuenca A, Cheng F, Wang H, Brayer J, Horna P, Gu L, Bien H, Borrello IM, Levitsky HI, Sotomayor EM : Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy:
dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. Cancer Res. 2003; 63: 9007–9015.

Dai W, Gupta SL: Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-γ. J. Biol. Chem. 1990; 265: 19871–19877.

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994; 264: 1415-1421.

Däubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer HG, Hadding U.A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. J Immunol Methods. 1994; 12;168: 39-47.

Däubener W, MacKenzie CR: IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. Adv Exp Med Biol. 1999; 467: 517-524.

Däubener W, Remscheid C, Nockemann S, Pilz K, MacKenzie CR, Hadding U: Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Eur J Immunol. 1996; 26: 487-92.

Denkers EY, Gazzinelli RT:Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection.Clin Microbiol Rev. 1998; 11: 569-588.

Dong J, Qiu H, Garcia-Barrio M, Anderson J, Hinnebusch AG: Uncharged tRNA activates GCN2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite tRNA-binding domain. Mol.Cell. 6; 269–279.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nature Immunol. 2002; 3: 991–998.

Dunn GP, Koebel CM, Schreiber, RD: Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6: 836–848.

Dyer Morris: An effect of N-2-fluorenylacetamide on the metabolism of tryptophan in rats. J Natl Cancer Inst. 1961; 26: 315-329.

Espey MG, Tang Y, Morse HC 3rd, Moffett JR, Namboodiri MA: Localization of quinolinic acid in the murine AIDS model of retrovirus-induced immunodeficiency: implications for neurotoxicity and dendritic cell immunopathogenesis.AIDS. 1996; 10: 151-158.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P: T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death Differ.2002; 9: 1069–1077.

Farrar MA, Schreiber RD: The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. Annu Rev Immunol. 1993; 11: 571-611.

Fingar DC, Blenis J: Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of the cell growth and cell cycle progression. Oncogene. 2004; 23, 3151–3171.

Finter NB: The naming of cats--and alpha-interferons. Lancet. 1996; 348: 348-349.

Fleckner J, Martensen PM, Tolstrup AB, Kjeldgaard NO, Justesen J: Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. Cytokine. 1995; 7: 70-77.

Fleischer B, Schrezenmeier, H: T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins. Clonally variable response and requirement for major histocompatibility complex class II molecules on accessory or target cells. J Exp Med. 1988; 167:1697-1707.

Flohr T, Bange FC, von Euch A, Kiekenbeck M, Bottger EC: Depletion of tryptophan is not involved in expression of tryptophanyl-tRNA synthetase mediated by interferon. Infect Immun. 1992; 60: 4418-4421.

Fox C, Hammerman P, Thompson C: The Pim kinases control rapamycin-resistant T cell survival and activation. J. Exp. Med. 2005; 201: 259–266.

Frolova LY, Grigorieva AY, Sudomoina MA, Kisselev LL: The human gene encoding tryptophanyl-tRNA synthetase: interferon-response elements and exon-intron organization. Gene. 1993 ; 128 :237-245.

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB: Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. J Exp Med. 2002; 196: 459-468.

Fu F, Li Y, Qian S, Lu L, Chambers FG, Starzl TE, Fung JJ, Thomson AW: Costimulatory molecule-deficient dendritic cell progenitors (MHC class II^{+}, B7-1^{dim}, B7-2^{-}) prolong cardiac allograft survival in non-immunosuppressed recipients. Transplantation 1995; 62: 659–665.

Fuchs D, Baier-Bitterlich G, Wachter H:Nitric oxide and AIDS dementia. N Engl J Med. 1995; 333: 521-522.

Fuchs D, Forsman A, Hagberg L, Larsson M, Norkrans G, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H: Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. J. Interferon Res. 1990; 10: 599–603.

Fujigaki S, Saito K, Sekikawa K, Tone S, Takikawa O, Fujii H, Wada H, Noma A, Seishima M: Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an IFN-γ-independent mechanism. Eur. J. Immunol. 2001; 31: 2313–2318.

Gajewski TF, Meng Y, Blank C, Brown I, Kacha A, Kline J, Harlin H: Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. Immunol. Rev. 2006; 213: 131–145.

Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P: Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol. 2003; 24: 242-248.

Gurtner GJ, Newberry RD, Schloemann SR, McDonald KG, Stenson WF: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. Gastroenterology. 2003; 125: 1762–1773.

Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D: Regulated translation initiation controls. Mol. Cell 2000a; 6, 1099-1106

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D: Perk is essential for translational regulation and cell sur during the unfolded protein Mol. Cell 2000b; 5, 897–904.

Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, Sadri N, Yun C, Popko B, Paules R: An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. Mol. Cell. 2003; 11: 619–633.

Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL: Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene-expression by interferons-γ and -α. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-γ-inducible DNA-binding factor. J. Biol. Chem. 1993; 268, 5077–5084.

Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, Van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM, Taylor MW, Carson DA, Catanzaro A, Raz E: Enhancement of innate immunity against Mycobacterium avium infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. Infect. Immun. 2001; 69, 6156–6164.

Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E: Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. J. Clin. Invest. 2004; 114: 270–279.

Heim MH: The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. J. Receptor Signal Transduction Res. 1999; 19:75-120.

Heyes MP, Rubinow D, Lane C, Markey SP: Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. Ann. Neurol. 1989; 26: 275–277.

Heyes MP, Brew BJ, Martin A: Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. Ann. Neurol. 1991; 29: 202–209.

Heyes MP, Saito K, Jacobowitz D, Markey SP, Takikawa O, Vickers JH: Poliovirus induces indoleamine-2,3-dioxygenase and quinolinic acid synthesis in macaque brain. FASEB J. 1992; 6: 2977–2989.

Heyes MP, Saito K, Major EO, Milstien S, Markey SP, Vickers JH: A mechanism of quinolinic acid formation by brain in inflammatory neurological disease. Attenuation of synthesis from 1-tryptophan by 6-chlorotryptophan and 4-chloro-3-hydroxy anthrani -late. Brain 1993; 116: 1425–1450.

Heyes MP Saito K, Lackner A, Wiley CA, Achim CL, Markey SP: Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. FASEB J. 1998; 12: 881–896.

Hinnebusch AG: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Gene Expression (Broach, J. R., Jones, E. W., and Pringle, J. R. eds) 1992; pp. 319–414.

Hinnebusch AG: The eIF-2 alpha kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. Semin. Cell Biol. 1994; 5, 417–426.

Hinnebusch AG: Translational regulation of yeast GCN4. A window on factors
that control initiator-tRNA binding to the ribosome. J. Biol. Chem. 1997; 272: 21661-21664.

Hinnebusch AG: Mechanism and regulation of initiator methionyl-tRNA binding to ribosomes. In: Translational control of gene expression. N. Sonenberg, ed., Cold Spring Harbor: CSHL 2000.

Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek R, Zinkernagel RM, Aguet M: Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science 1993; 259: 1742-1745.

HWU P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young H: Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol. 2000; 164: 3596-3599.

Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, Shibata K, Yamamoto E, Kidokoro K, Takahashi N, Terauchi M, Nawa A, Nomura S, Nagasaka T, Takikawa O, Kikkawa F: Indoleamine 2,3-

dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. Br. J. Cancer 2006; 95: 1555–1561.

Jäger, Lothar: Allergien. Ursachen, Therapien, Vorbeugung. München: Beck 2000

Janeway, Charles A., Travers, Paul, Mark Walport: Immunolgy, 6th Edition, 2006, Garland Science.

Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Scheuner D, Kaufman RJ, Cavener DR, Wek RC: Phosphorylation of the alpha-subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kappaB in response to diverse cellular stresses. Mol. Cell. Biol. 2003; 23, 5651–5663.

Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I., : Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and downregulates autoimmune inflammation. FASEB J. 2005; 19: 1347–1349.

Kerr SJ, Armati PJ, Pemberton LA, Smythe G, Tattam B, Brew BJ: Kynurenine pathway inhibition reduces neurotoxicity of HIV-1-infected macrophages. Neurology. 1997; 49: 1671-1681.

Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin M, Roizman B, Straus SE: Interferons and other cytokines Fields virology 2001, 4th ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa. p. 321-351.

Knippers R: Molekulare Genetik, 7. Aufl., 1997. Thieme Verlag

Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC: Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping, J Immunol. 1998; 160:3861-8

Laura A, Bruno P, Priulla M , Nicolin A: mTOR: a protein kinase switching between life and death. Pharmacol Res. 2004; 50: 545-549.

Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL: Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. Immunology 2002; 107: 452-460.

Lee JR, Dalton RR, Messina JL, Sharma MD, Smith DM, Burgess RE, Mazzella F, Antonia SJ, Mellor AL, Munn DH: Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen presenting cells in malignant melanoma. Lab. Invest. 2003; 83: 1457–1466.

Lee JH, Torisu-Itakara H, Cochran AJ, Kadison A, Huynh Y, Morton DL, Essner R: Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes. Clin. Cancer Res. 2005; 11: 107–112.

Liu H, Liu L, Fletcher BS, Visner GA: Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. FASEB J. 2006; 20: 2384–2386.

Logan GJ, Smyth CMF, Earl JW, Zaikina I, Rowe PB, Smythe JA, Alexander IE: HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. Immunology. 2002;105: 478-487.

MacKenzie CR, Hadding U, Däubener W: Interferon-γ-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. J. Infect. Dis. 1998; 178: 875–878.

MacKenzie CR, Langen R, Takikawa O, Däubener W: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon-gamma-induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmastasis. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 3254–3261.

Mason D, Powrie F: Control of immune pathology by regulatory T cells. Curr. Opin. Immunol. 1998; 10: 649-655.

Meisel R: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenasemediated tryptophan degradation. Blood. 2004; 103: 4619–4621.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med. 1999; 189: 1363-1372.

Mellor AL, Munn DH: Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: Immunosuppression by starvation? Immunol Today. 1999; 20: 469-473.

Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. J Immunol. 2002; 168: 3771-3776.

Mellor AL: Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 338: 20-24.

Muller AJ, Duhadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. Nat. Med. 2005; 11: 312–319.

Moffett JR, Espey MG, Gaudet SJ, Namboodiri MA. Antibodies to quinolinic acid reveal localization in select immune cells rather than neurons or astroglia. Brain Res. 1993; 623: 337–340.

Moffett JR, Espey MG, Namboodiri MA. Antibodies to quinolinicacid and the determination of its cellular distribution within the rat immune system. Cell Tissue. Res. 1994; 278: 461–469.

Moffett JR, Blinder KL, Venkateshan CN, Namboodiri MA. Differential effects of kynurenine and tryptophan treatment on quinolinate imunoreactivity in rat lymphoid and non-lymphoid organs. Cell Tissue Res. 1998; 293: 525–534.

Moffett JR, Namboodiri MA: Tryptophan and the immune response. Immunol Cell Biology 2003; 81: 247-265.

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uzé G: The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. J. Interferon Cytokine Res. 1999; 19: 1069-1098.

Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL: Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med. 1999; 189: 1363-1372.

Munn DH Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL: Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. Science 2002; 297: 1867–1870.

Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL: Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J. Clin. Invest. 2004; 114: 280–290.

Munn DH, Sharma MD, Mellor AL: Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. J. Immunol. 2004; 172: 4100–4110.

Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL: GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunity. 2005;22: 633-642.

Munn DH, Mellor Al: Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. J Clin Invest. 2007; 117: 1147-1154.

Müller, Markus: Chirurgie. 7. Auflage. 2004/05 Medizinische Verlags- und Informationsdienste.

Namboodiri MA,Venkateshan CN. Narayanan R: Incresed quinolate immunoreactivity in the peripheral blodd monocytes/macrophages from SIV-infected monkeys. J. Neurovirol. 1996; 2: 433-438.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tanne SR: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89: 3030–3034.

Niwa M, Walter P: Pausing to decide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2000; 97, 12396–12397.

Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, Ishii N, Yanaihara N, Yamada K, Takikawa O, Kawaguchi R, Isonishi S, Tanaka T, Urashima M: Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. Clin Cancer Res. 2005;11: 6030-6039.

Pardoll D: Does the immune system see tumors as foreign or self? Annu. Rev. Immunol. 2003; 21, 807–839.

Peavy DL, Adler WH, Smith RT:The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. J Immunol. 1970; 105: 1453-1458.

Perissinotto B, Benassi CA, Allegri G:Urinary excretion of tryptophan metabolites in patients with renal pelvis and parenchyma tumors. Urol Int. 1964; 17: 175-182.

Pfefferkorn ER: Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1984; 81: 908–912.

Pfefferkorn ER, Eckel M, Rebhun S: Interferon-gamma suppresses the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts through starvation for tryptophan. Mol. Biochem. Parasitol. 1986; 20: 215–224.

Quagliariello E, Papa S, Saccone C, Alifano A : Effect of 3-Hydroxyanthranilic Acid on Mitochondrial Respiratory System. Biochem. J. 1964; 91: 137.

Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE: Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Cell Death Differ.J. Exp. Med. 2004; 191: 372–380.

Rastellini C, Lu L, Ricordi C, Starzl TE, Rao AS, Thomson AW: GM-CSF stimulated hepatic dendritic cell progenitors prolong pancreatic islet allograft survival. Transplantation 1995; 60: 1366–1370.

Robinson CM, Shirey KA, Carlin JM: Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-γ and tumor necrosis factor-α. J. Interferon Cytokine Res. 2003; 23: 413–421.

Rose DP: Aspects of tryptophan metabolism in health and disease. J Clin Pathol. 1972; 25: 17–25.

Saito K, Markey SP, Heyes MP: Effects of immune activation on quinolinic acid and neuroactive kynurenines in the mouse. Neurosci. 1992; 51: 25–39.

Saito K, Crowley JS, Markey SP, Heyes MP: A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. J. Biol. Chem. 1993; 268: 496–503.

Salter M, Pogson CI: The role of tryptophan 2,3-dioxygenase in the hormonal control of tryptophan metabolism in isolated rat liver cells. Effects of glucocorticoids and experimental diabetes. Biochem. J. 1985; 229: 499–504.

Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO Jr, Köhler C:Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. Life Sci.1984; 35: 19–32.

Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT: Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with Toxoplasma gondii: induction by endogenous γ interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. Infect. Immun. 2002; 70: 859–868.

Smith, J. A., Tso, J. Y., Clark, M. R., Cole, M. S. & Bluestone, J. A. (1997) J. Exp. Med. 185, 1413–1422.

Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC: A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. Genetics 2000; 154: 787–801.

Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, Levitsky HI : Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. Blood 2001; 98: 1070–1077.

Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H: Induction of antigen-specific T cell anergy: an early event in the course of tumor progression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1998; 95: 1178–1183.

Stins MF, Gilles F, Kim KSSelective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. J Neuroimmunol. 1997; 76: 81-90.

Stone TW, Darlington LG: Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. Nat. Rev. Drug Discov. 2002; 1: 609–620.

Sullivan WJ Jr, Narasimhan J, Bhatti MM, Wek RC: Parasite-specific eIF2 (eukaryotic initiation factor-2) kinase required for stress-induced translation control. Biochem J. 2004; 380: 523-31.

Swain SL: Helper T cell differentiation. Curr Opin Immunol. 1999; 2: 180-185.

Swanson KA, Zheng Y, Heidler KM, Mizobuchi,T, Wilkes DS: CDIIc+ cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3-dioxygenase. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 2004; 30: 311–318.

Taylor BS, Kim Y-M, Wang Q, Shapiro RA, Billiar TR, Geller DA: Nitric oxide down-regulates hepatocyte-inducible nitric oxide synthase gene expression. Arch. Surg. 1997; 132: 1177-1183.

Taylor MW, Feng G: Relationship between interferon-γ, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J. 1991; 5: 2516–2522.

Terness P, Bauer TM, Rose L: Inhibition of Allogeneic T: Cell Proliferation by Indoleamine 2,3-Dioxygenase-expressing Dendritic Cells: Mediation of Suppression by Tryptophan Metabolites. J. Exp. Med. 2002; 196: 447–457.

Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. Nat Med. 2003; 9: 1269-1274

Varga J, Yufit T, Hitraya E, Brown RR: Control of extracellular matrix degradation by interferon-γ. The tryptophan connection. Adv. Exp. Med. Biol. 1996; 398: 143–148.

Van Wauwe JP, De Mey JR, Goossens JG: OKT3: a monoclonal anti-human T lymphocyte antibody with potent mitogenic properties. J Immunol. 1980; 124: 2708-2713.

Varga J, Yufit T, Hitraya E, Brown RR: Control of extracellular matrix degradation by interferon-γ. The tryptophan connection. Adv. Exp. Med. Biol. 1996; 398: 143–148.

Varga J, Yufit T, Brown RR: Inhibition of collagenase and stromelysin gene expression by interferon-γ in human dermal fibroblasts is mediated in part via induction of tryptophan degradation. J. Clin. Invest. 1995; 96: 475–481.

Vilcek J, Henriksen-Destefano D, Siegel D, Klion A, Robb RJ, Le J: Regulation of IFN-gamma induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced

interleukin 2. JImmunol.1985; 135: 1851-1856.

von Bergwelt-Baildon MS, Popov A, Saric T, Chemnitz J, Classen S, Stoffel MS, Fiore F, Roth U, Beyer M, Debey S, Wickenhauser C, Hanisch FG, Schultze JL: CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. Blood. 2006; 108: 228–237.

von Wussow, Platsoucas CD, Wiranowska-Stewart M, Stewart WE 2nd: Human gamma interferon production by leukocytes induced with monoclonal antibodies recognizing T cells. J Immunol. 1981; 127: 1197-1200.

Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H, Ling L: Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. J. Biol. Chem. 2006; 281: 22021–22028.

Wek RC, Jiang HY, Anthony TG: Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. Biochem. Soc. Trans. 2006; 34:7–11.

Weiss LM, Kim K: The development and biology of bradyzoites of Toxoplasma gondii. Front. Biosci. 2000; 5: 391-405

Werner ER, Hirsch-Kauffmann M, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Schweiger M, Wachter H: Interferon-gamma-induced degradation of tryptophan by human cells in vitro. Biol Chem Hoppe Seyler. 1987; 368: 1407-1412.

Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H: Parallel induction of tetrahydrobiopterin biosynthesis and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells and cell lines by interferon-gamma. Biochem. J. 1989; 262: 861–866.

Werner-Feldmeyer G, Werner ER, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G,Wachter: Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. Biochim Biophys Acta. 1989; 1012: 140-147.

Whithead KE, Webber GM, Engla RR: Accumulation of ppGpp in Streptococcus pyogenes and Streptococcus rattus following amino acid starvation. FEMS Microbiol Lett. 1998; 159: 21-26.

Widner B, Fuchs D: Immune activation and degradation of tryptophan. Mod. Asp. Immunobiol. 2000; 1: 105–108.

Yoshida R, Hayaishi O: Rhythms and physiological significance of indoleamine 2,3-dioxygenase. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1982; 27:143-151,

Yoshida R, Oku T, Imanishi J, Kishida T, Hayaishi O: Interferon: a mediator of indoleamine 2,3-dioxygenase induction by lipopolysaccharide, poly (I), X poly (C), and pokeweed mitogen in mouse lung. Arch. Biochem. Biophys. 1986; 249: 596–604.

Young HA: Regulation of interferon-γ gene expression. J. Interferon Cytokine Res. 1996; 16: 563-568.

Yuan J Zhou L, Qin X :The relationship between LPS-induced apoptosis in hepatocyte, Kupffer cell and hepatocytic damage. 1998; 78: 423-425.

Yuan J: Molecular control of life and death, Current opinion. Cell Biology 1995; 7: 211-214.

Yuan W, Collado-Hidalgo A, Yufit T, Taylor M, Varga J: Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblasts by transforming growth factor-β: selective inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyltRNA synthetase gene expression. J. Cell. Physiol. 1998; 177: 174–186.

Zangerle R, Widner B, Quirchmair G, Neurauter G, Sarcletti M, Fuchs D: Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection. Clin Immunol. 2002; 104: 242-247.

Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattem KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR: The GCN2 eIF2α kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. Mol. Cell. Biol. 2002; 22: 6681–6688.

6. Abkürzungen

AA Anthranilic acid (Anthranilsäure)

cfu colony forming unit

eIF2 eukaryotischen Initiationsfaktors 2

GCN 2/4 genral control nonderepressible 2/4

HAA 3-Hydroxyanthralinic acid (Hydroxyanthranilsäure)

^{3}H T Methyl-^{3}H-Thymidine

HyKyn 3-Hydroxy-DL-Kynurenin

IDO Indolamin 2,3-Dioxygenase

IFN-α, -β, -γ Interferon-α, -β, -γ

ISR integrated stess response

Kyn L-Kynurenine

LPS Lipopolysaccharid

mRNA messenger Ribonucleinacid

mTOR mammalian target of rapamycin

OKT3 Humanes Anti CD3

PBL Periphere Blutlymphozyten

PBS Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

PHA Phytohämagglutinin

QuA 2, 3-Pyridinedicarboxylic acid (Quinolinic acid) (Quinolinsäure)

rpm Umdrehungen pro Minute

SEB ***Staphylococcus aureus*** Enterotoxin B

TDO Tryptophan 2,3-Dioxygenase

TLA Toxoplasma Lysat Antigen

Trp L-Tryptophan

tRNA transporter Ribonucleinacid

U Einheit der Enzym- und Cytokin-Aktivität

WRS Tryptophanyl-tRNA-Synthetase

7. Lebenslauf

Name:		Stephan Siebel
Anschrift:		An der Rennbahn 52 58332 Schwelm
Geburtsdatum/Ort:		11.Oktober 1979 in Schwelm
Eltern:		Joachim Siebel Brigitte Siebel, geb. Krause
Geschwister:		Christian Siebel, geb. 25.August 1981 Michael Siebel, geb. 20.Juli 1986
Schulbildung:	08/1986-07/1990	Städtische Gem. Grundschule Engelbert
	08/1990-05/1999	Märkische Gymnasium Schwelm
Hochschulausbildung:	04/2000-11/2006	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Facharztausbildung:	07/2007-06/2010	PCMH Children´s Hospital Eastern Carolina University/ Brody School of Medicine Greenville, NC, USA

Interessen: klassische Literatur, Musik, Filme

Sprachen: Deutsch (Muttersprache), Englisch, Französisch

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Schwelm, den 23.April 2007

9. Danksagung

Prof. Walter Däubner

Prof. Klaus Pfeffer

Silke Stuhlsatz

Tanja Vogel

Dr Jan Würthner

Winnie

Claudia

Dr rer nat Koku

Dr rer nat Aziz

PD Dr Collin MacKenzie

Ich danke besonders der Familie Siebel und Krause

Meinen Großeltern Walter und Wanda sowie meiner Großmutter Maria Magdalena

Desweiteren danke ich für ihre Unterstützung und Begleitung während meines persönlichen und beruflichen Weges

Dr Hans Jörg Lehr

Dr Michael Lehr

Für ihre Freundschaft danke ich besonders

Herrn Telemann

Sonja Schwartkopp

Daniel Rüßing

Niko Range

Eric Sander

Johannes Pinnel

Nicki L

Für seine Musik

Bruce Springsteen

Zusammenfassung

„Einfluss der Indolamin 2,3-Dioxygenase auf das Zellwachstum von T-Zellen, Tumorzellen und Staphylokokken“

Indolamin 2,3-Dioxygenase ist ein ubiquitär im Körper vorkommendes Enzym, das den ersten und mengenbestimmenden Schritt im sogenannten Kynurenin-Weg vermittelt. Hierbei verstoffwechselt die IDO, stimuliert durch IFN γ, die Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin.
Im Folgenden entstehen dann, abhängig von anderen (in dieser Arbeit nicht untersuchten) Enzymen, weitere Tryptophanabbauprodukte, wie z.B. Hydroxykynurenin, Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure. Da Tryptophan eine essentielle Aminosäure ist, hat ihr Abbau einen wesentlichen Einfluss auf den Stoffwechsel tryptophanabhängiger Organismen.
Diese Erkenntnisse stellten den Ausgangspunkt meinerer Arbeit dar, in der zuerst einmal das oben beschriebene praktisch nachvollzogen wurde. Die ersten Versuche zeigten eindrücklich die Stimulierbarkeit der IDO durch INF γ, den IDO vermittelten Tryptophanabbau und die Entstehung des Kynurenins als erstes Reaktionsprodukt im Kynurenin-Weg. Bei maximaler Stimulation der IDO mit IFN γ war die Menge des Kynurenins stets abhängig von der Konzentration des in der Kultur vorhandenen Tryptophans.
Bereits veröffentliche Studien beschrieben, dass der Mangel an Tryptophan einen potenten inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von Mykobakterien, Toxoplasmen. Chlamydien und Streptokokken darstellt. In meiner Arbeit wurde dieser antiproliferative Effekt vor allem auf *Staphylococcus aureus*, T-Zellen sowie den Tumorzellreihen A549, 86HG39 und HBMEC untersucht. Die Depletion von Tryptophan in den entsprechenden Ansätzen zeigte sich ebenfalls als effektiver Hemmmechanismus auf die Proliferation der hier getesteten Zellreihen. Was nebenbei bestätigte, dass die hier untersuchten T-Zellen, Tumorzellen und Staphylokokken zu den auxotrophen Organismen gehören, die auf die Zufuhr von Tryptophan für ihren Stoffwechsel angewiesen sind.
Der antiproliferative Effekt des Tryptophanabbaus, war aber stets nur ein zytostatischer und kein zytotoxischer, der durch erneute Supplementation der tryptophanarmen Ansätze mit Tryptophan antagonisiert werden konnte. Mithilfe der sogenannten WRS (tryptophanyl-transfer RNA synthetase) war es den Zellen möglich einen intrazellulären Tryptophanspeicher zu schaffen und somit zumindest zeitweise in den tryptophanarmen Medien zu überleben. Nach Zufuhr supra-physiologischer Mengen an Tryptophan konnten die Zellen ihre Stoffwechselaktivität wieder aufnehmen und erneut proliferieren.
Da aber *in vivo* nicht nur Tryptophan mithilfe der IDO abgebaut wird, sondern –wie bereits oben erläutert- Tryptophanmetabolite entstehen, wurde in folgenden Ansätzen untersucht, welche

Rolle die Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin, Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure und Quinolinsäure auf das Wachstum der genannten Zellen haben.
Hierbei zeigte sich deutlich, dass die Tumorzellen und Staphylokokken nur mässig bis gar nicht in ihrer Proliferation gehemmt werden, dass das T-Zellwachstum jedoch deutlich inhibiert wird. Die Metabolite Kynurenin, Hydroxykynurenin und Hydroxyanthranilsäure übten vor allem in der frühen Proliferationsphase stimulierter T-Zellen einen starken antiproliferativen Effekt auf das T-Zellwachstum aus, der nicht durch Zufuhr von Tryptophan antagonisiert werden konnte. Somit konnte von einem zytotoxischen Effekt der Metabolite auf die T-Zellen ausgegangen werden. Die Metabolite Anthralinsäure und Quinolinsäure übten keinen antiproliferativen Effekt auf das T-Zellwachstum aus. Ebenfalls unbeeinflusst, jedoch von allen fünf verwendeten Metaboliten, blieben unstimulierte T-Zellen.
Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass zwar alle in dieser Arbeit verwendeten Zellreihen auf die Zufuhr von Tryptophan als essentielle Aminosäure für ihren Stoffwechsel angewiesen sind, dass aber nur die T-Zellen durch die entstehenden Metabolite gehemmt werden. Diese *in vitro* Beobachtungen bieten eine Vielzahl von Möglichkeiten für zukünftige Forschung und darüber hinaus Erklärungansätze für immunologische Phänomene, wie z.B. der Ausbreitung von Tumorzellen in gesunden Geweben, die mithilfe der IDO und den toxischen Abbauprodukten die körpereigene intakte T-Zellvermittelte Immunabwehr hemmen und somit ungehindert proliferieren können.