

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase als
antimikrobieller und immunregulatorischer
Effektormechanismus:
Bedeutung in der Infektions- und
Transplantationsimmunologie

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Kathrin Heseler

aus Werdohl

Düsseldorf, März 2009

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Korreferent: Prof. Dr. J. H. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2009

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	i
II. Abbildungsverzeichnis	iii
III. Tabellenverzeichnis	v
IV. Abkürzungsverzeichnis	vi
1. Einleitung	1
1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten	1
1.1.1. Interferon- γ	2
1.1.2. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)	3
1.1.3. Interleukin-1 beta (IL-1 β)	4
1.2. Infektionsmodelle <i>in vitro</i>	5
1.2.1. Bakterien	6
1.2.2. Viren	7
1.2.3. Parasiten	9
1.3. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen Tryptophankonzentration	10
1.3.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)	10
1.3.2. Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2)	13
1.4. L-Tryptophan und seine physiologische Bedeutung	14
1.5. Funktionelle Bedeutung der IDO bei immunregulatorischen und antimikrobiellen Effekten	17
1.5.1. IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte	17
1.5.2. IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte	19
1.6. Zielsetzung der eigenen Arbeit	21
2. Material & Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Zellen	23
2.1.2. Erreger für Infektionsversuche	23
2.1.3. Medien, Lösungen und Puffer	24
2.1.4. Antibiotika	26
2.1.5. Primer	27
2.1.6. Sonden	27
2.1.7. Bakterien in der Molekularbiologie	28
2.1.8. Plasmide	28
2.1.9. Zytokine	28
2.1.10. Antikörper	29
2.1.11. Größenstandards	29
2.1.12. Enzyme	30
2.1.13. Kits	30
2.1.14. Chemikalien	31
2.1.15. Verbrauchsmaterialien	32
2.1.16. Geräte und sonstige Materialien	33

2.2. Methoden	34
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.2. Mikrobiologische Methoden.....	39
2.2.3. Zellbiologische Methoden.....	40
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.5. Computergestützte Arbeiten	50
3. Ergebnisse	51
3.1. IDO-vermittelte Effekte in humanen Lungenzellen	51
3.1.1. IDO-Aktivität in der humanen Lungenzelllinie A549.....	51
3.1.2. Immunregulatorische IDO-vermittelte Effekte in A549.....	53
3.1.3. Antimikrobielle Effektermechanismen in A549	55
3.1.4. IFN- γ induzierter L-Tryptophan-Abbau in primären Lungenzellen.....	59
3.1.5. Antibakterielle Effekte in primären Lungenzellen	60
3.2. IFN-γ unabhängige Expression der humanen Indolamin 2,3-Dioxygenase in HeLa T-RExTM Zellen	60
3.2.1. Tryptophan-Abbau nach IFN- γ unabhängiger IDO-Aktivierung.....	63
3.2.2. Induktion antibakterieller Effekte durch eine IFN- γ unabhängig induzierte IDO- Aktivität.....	64
3.3. IDO-2 als weiteres L-Tryptophan abbauendes Enzym	65
3.3.1. Klonierung m-IDO-2 überexprimierender Zellen	66
3.3.2. Tryptophanabbau in IDO-2 überexprimierenden Zellen	68
3.3.3. IDO-2 überexprimierende Zellen: Substratverwertung und Enzyminhibition	69
3.3.4. Antimikrobielle Funktion von IDO-2.....	71
3.4. Beeinflussung der IDO-Aktivität durch humanes Cytomegalievirus	72
3.4.1. Einfluß von hCMV auf IDO-vermittelte antibakterielle Effekte.....	75
3.4.2. Einfluss von hCMV auf IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte.....	77
3.5. HSV und sein Einfluss auf die IFN-γ vermittelte IDO-Aktivität in Astrozytomzellen	78
4. Diskussion	82
4.1. Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase bei der Abwehr von Pathogenen.....	82
4.2. Untersuchungen von immunregulatorischen Effekten in humanen Lungenzellen.....	89
4.3. Untersuchungen zur Indolamin 2,3-Dioxygenase-2.....	92
4.4. Herpesviren: Blockade antimikrobieller Effekte durch Hemmung der IDO-Aktivität.....	94
4.5. hCMV in der Immunregulation	99
5. Zusammenfassung	103
6. Summary	104
7. Literaturverzeichnis	105
8. Danksagung	120
9. Eidesstattliche Erklärung	121

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.:	Reaktionsschema des Abbaus von L-Tryptophan zu L-Kynurenin.	11
Abb. 1.2.:	Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel.	15
Abb. 2.1.:	Gradientenverlauf bei HPLC –Messung.	49
Abb. 3.1.:	Synergistischer Effekt von IL-1 β oder TNF- α auf die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität von A549 Zellen.	52
Abb. 3.2.:	Inhibition der IDO-Aktivität durch den IDO-Inhibitor 1-L-MT in A549 Zellen.	53
Abb. 3.3.:	Aufhebung des IFN- γ /IL-1 β vermittelten inhibitorischen Effektes von A549 Zellen auf die T-Zell-Proliferation.	54
Abb. 3.4.:	Aufhebung der IFN- γ induzierten Toxoplasmostase in A549 Zellen durch den IDO-Inhibitor 1-L-MT.	55
Abb. 3.5.:	Aufhebung des IFN- γ induzierten bakteriostatischen Effektes durch 1-L-MT in A549 Zellen.	56
Abb. 3.6.:	Aufhebung des IFN- γ -vermittelten antibakteriellen Effektes durch verschiedene 1-L-MT Konzentrationen in A549 Zellen.	57
Abb. 3.7.:	Vermittlung von antiviralen Effekten durch IFN- γ und IFN- γ /IL-1 β und deren Aufhebung durch 1-L-MT.	58
Abb. 3.8.:	Induktion der IDO-Aktivität in primären Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7).	59
Abb. 3.9.:	Aufhebung des IFN- γ -induzierten bakteriostatischen Effektes durch 1-L-MT in primären Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7).	60
Abb. 3.10.:	IFN- γ unabhängige, durch Tetrazyklin induzierte h-IDO _{myc} -Expression in HeLa T-REx TM Zellen.	61
Abb. 3.11.:	Immunfluoreszenzanalyse der h-IDO _{myc} -Expression in unstimulierten und Tetrazyklin-stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen.	62
Abb. 3.12.:	Western Blot-Analyse von unstimulierten und Tetrazyklin-stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen.	62
Abb. 3.13.:	IDO-Aktivität in IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen.	63
Abb. 3.14.:	Antibakterielle Effekte IFN- γ - oder Tetrazyklin-stimulierter HeLa T-REx h-IDO Zellen.	64
Abb. 3.15.:	Exon-Intron-Struktur von <i>h-ido</i> , <i>m-ido</i> und <i>m-ido-2</i>	65
Abb. 3.16.:	Aminosäureabgleich zwischen m-IDO und m-IDO-2.	66
Abb. 3.17.:	Konsensus-Sequenz der Häm-Domäne und deren Abgleich mit der humanen IDO, der murinen IDO und der murinen IDO-2.	66
Abb. 3.18.:	Immunfluoreszenzanalyse der pcDNA4 <i>m-ido</i> oder pcDNA4 <i>m-ido-2</i> transfizierten HEK 293T Zellen.	67
Abb. 3.19.:	Western Blot-Analyse der pcDNA4 <i>m-ido</i> oder pcDNA4 <i>m-ido-2</i> transfizierten HEK 293T Zellen.	68

Abb. 3.20.: Kinetik des Tryptophanabbaus durch pcDNA4 <i>m-ido</i> (HEK + m-IDO) oder pcDNA4 <i>m-ido-2</i> (HEK + m-IDO-2) transfizierte HEK 293T Zellen. ...	68
Abb. 3.21.: Unterschiedliche Substratumsetzung durch m-IDO-2-Aktivität.	69
Abb. 3.22.: Beeinflussung der m-IDO-2-Aktivität durch IDO-Inhibitoren.	70
Abb. 3.23.: Antibakterielle Effekte von pcDNA4 <i>m-ido-2</i> transfizierten HEK 293T Zellen.	71
Abb. 3.24.: IFN- γ -vermittelter antiviraler Effekt gegen hCMV in HFF-Zellen.	72
Abb. 3.25.: Einfluss einer hCMV-Infektion auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen.	73
Abb. 3.26.: Western-Blot-Analyse hCMV-infizierter HFF-Zellen.	74
Abb. 3.27.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt.	75
Abb. 3.28.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt.	76
Abb. 3.29.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekt.	78
Abb. 3.30.: Einfluss IFN- γ induzierter IDO-Aktivität auf eine HSV-Infektion in 86HG39 Zellen.	79
Abb. 3.31.: Einfluss einer HSV-Infektion auf die IDO-Aktivität in 86HG39-Zellen.	79
Abb. 3.32.: Einfluss der HSV-Infektion auf den IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt.	80
Abb. 4.1.: Die IFN- γ induzierte <i>ido</i> -Transkription wird durch den JAK-STAT-Weg vermittelt.	96

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1.:	Verwendete Zelllinien	23
Tab. 2.2.:	Verwendetes Zellkulturmedium	24
Tab. 2.3.:	Verwendete Primer für Klonierungen	27
Tab. 2.4.:	Verwendete Primer für Real-time PCR	27
Tab. 2.5.:	Verwendete Sonden für Real-time PCR.....	27
Tab. 2.6.:	Verwendete Plasmide	28
Tab. 2.7.:	Verwendete Primärantikörper	29
Tab. 2.8.:	Verwendete Sekundärantikörper	29
Tab. 2.9.:	Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus2	30
Tab. 2.10.:	Verwendete Restriktionsenzyme	30
Tab. 2.11.:	Verwendete Enzyme	30

IV. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APZ	Antigen präsentierende Zellen
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BES	(N,N-Bis-(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bp	Basenpaar(e)
BPE	Rinderhypophysenextrakt (<i>bovine pituitary extract</i>)
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 (<i>cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
cy ²	Cyanin
cy ³	Indocarbocyanin
d	Tag
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EtOH	Ethanol
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma aktivierte Sequenz
GCN2	<i>general control non-derepressible</i>
GTP	Guanosintriphosphat
GvHR	Transplantat-versus-Wirt-Reaktion (<i>Graft-versus-host-Reaktion</i>)
³ H	Tritium
h	Stunde(n)
h-IDO	humane Indolamin 2,3-Dioxygenase
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HFF	humane Vorhaut Fibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HSV	Herpes simplex Virus Typ I
ICE	IL- β konvertierendes Enzym (<i>IL-1β converting enzyme</i>)
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
I.E.	Internationale Einheit
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Interferon regulatorische Faktoren (<i>Interferon regulatory factors</i>)
ISS-ODN	immunstimulierende Oligodesoxynukleotide
ISRE	<i>Interferon stimulated response elements</i>
JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
k.o.	<i>knock out</i>
LB	Luria-Bertani-Medium
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar

m-IDO	murine Indolamin 2,3-Dioxygenase
m-IDO-2	murine Indolamin 2,3-Dioxygenase-2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Vielfachheit der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)
MOPS	3-[N-Norpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Molekulargewicht
NADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
p.i.	nach Infektion (<i>post infection</i>)
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP2	<i>src homology region 2 domain-containing phosphatase2</i>
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat Lösung
STAT	Signalüberträger und –aktivator der Transkription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer

TCA	Trichloressigsäure
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TRADD	<i>TNF-Rezeptor I associated death domain protein</i>
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
ü. N.	über Nacht
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewicht/Gewicht
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Die Funktion des Immunsystems besteht im Schutz des Körpers vor der Schädigung durch Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Grundsätzlich kann die immunologische Abwehr infektiöser Erreger in das unspezifische, angeborene Immunsystem und in die spezifische, adaptive Immunabwehr unterteilt werden. Die angeborene Immunabwehr stellt eine unspezifische, aber sehr schnelle Abwehrmaßnahme gegen infektiöse Erreger dar, d.h. es findet nur eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd statt, ohne dass der Erreger als solcher identifiziert wird. Für die adaptive Immunantwort ist das spezifische Erkennen des Erregers notwendig. Der Erkennungsprozess führt zur Differenzierung besonderer immunologischer Effektorzellen und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei erneutem Kontakt mit dem gleichen oder ähnlichen Infektionserreger eine deutlich beschleunigte Rekrutierung spezifischer Effektorzellen erlaubt. Es stellt damit eine Basis für eine oft lebenslange, spezifische Immunität dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Teilaspekt der Immunabwehr, nämlich die Rolle derIDO-vermittelten Tryptophan-Depletion als antimikrobieller und immunregulatorischer Effektormechanismus genauer untersucht werden. Induziert wird dieser Effekt durch immunregulatorische Zytokine, wobei hier besonders $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ eine Rolle spielen. Dabei ist zudem interessant, dass diese Effektormechanismen nicht nur von Zellen des Immunsystems, sondern nahezu von jeder Körperzelle vermittelt werden können. So wurde bereits gezeigt, dass Zellen, wie Epithelzellen oder Fibroblasten, nach IDO-Induktion das Wachstum von Pathogenen und die Proliferation von T-Zellen hemmen können (Mackenzie *et al.*, 2007).

1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten

Bei der Induktion von Effektormechanismen gegen verschiedene Pathogene sind viele Zytokine beteiligt, die sowohl im Rahmen der angeborenen Immunität als auch im Verlauf der adaptiven Immunantwort von unterschiedlichen Zellen produziert werden können. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von drei proinflammatorischen Zytokinen analysiert, die im Folgenden kurz charakterisiert werden.

1.1.1. Interferon- γ

Interferone sind Zytokine, die in der frühen immunologischen Abwehr von Pathogenen eine entscheidende Rolle spielen. Man unterteilt die Interferone in zwei Gruppen. Zum einen gibt es die Typ I-Interferone, zu denen IFN- α und IFN- β gehören, zum anderen das Typ II-Interferon mit IFN- γ als einzigen Vertreter. IFN- γ , ein Glykoprotein, das 1965 (Wheelock, 1965) entdeckt wurde, besteht aus 143 Aminosäuren, ist strukturell nicht mit den Typ I Interferonen verwandt und bindet an einen eigenen Rezeptor (IFNGR). Obwohl zunächst vermutet wurde, dass IFN- γ ausschließlich von CD4⁺ TH1-Lymphozyten, CD8⁺ zytotoxischen Lymphozyten und NK-Zellen produziert wird, konnten neuere Studien zeigen, dass weitere Zellen, wie B-Zellen, NK-T-Zellen und professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ), wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen, ebenfalls in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren (Schröder *et al.*, 2004). Es ist ein zentrales Molekül in der Immunantwort und kann die Transkription von mehr als zweihundert Genen regulieren (Boehm *et al.*, 1997). Die IFN- γ induzierte Transkription dieser Gene wird durch den JAK-STAT-Signalweg vermittelt (Darnell *et al.*, 1994). Durch die Bindung von IFN- γ an seinen Rezeptor erfahren die intrazellulären Rezeptordomänen eine Konformationsänderung, was zu einer Autophosphorylierung der an den Rezeptor gebundenen Janus-Kinasen führt, die wiederum zytosolische STAT1 Moleküle phosphorylieren, die als Homodimer in den Nukleus translozieren. Dort binden diese an definierte DNA-Sequenzen (GAS = gamma-aktivierte Sequenz) und induzieren so die Transkription der sogenannten primär-responsiven Gene. Zu den Genprodukten, die im Zuge dieser Signaltransduktionskaskade exprimiert werden, gehören neben der Indolamin-2,3-Dioxygenase z. B. die MHC Klasse-I- und -II-Moleküle (*major histocompatibility complex*), die GTP-bindenden Proteine (GTPasen) und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Einige der aktivierten Gene kodieren jedoch selbst wieder für Transkriptionsfaktoren, welche dann als eine Antwort auf IFN- γ weitere sekundär-responsive Gene regulieren, wodurch die Anzahl der IFN- γ beeinflussten Gene noch einmal steigt. Als wichtige Vermittler dieser sekundären Antwort sind die Mitglieder der IRF-Familie (Interferon regulatorische Faktoren, *interferon regulatory factors*) zu nennen (Nguyen *et al.*, 1997). Ihr wichtigster Vertreter ist IRF-1, das neben IFN- γ auch noch durch IL-1 β und TNF- α induzierbar ist, und an sogenannte ISRE (*Interferon stimulated response element*) Sequenzen der DNA bindet. Die Produktion von IFN- γ wird von Zytokinen gesteuert, die von APZ sezerniert werden, wobei IL-12 und IL-18 eine wichtige Rolle spielen (Munder *et al.*, 1998; Otani *et al.*, 1999). Beispielsweise führt die Erkennung von Pathogenen durch Makrophagen zur Sekretion von IL-12 und auch von

Chemokinen. Durch Chemoattraktion werden NK-Zellen zum Ort der Entzündung geführt und das sezernierte IL-12 kann die IFN- γ Sekretion in diesen Zellen stimulieren (Gazzinelli *et al.*, 1993). Die zellulären Effekte von IFN- γ sind äußerst vielfältig und sowohl für die angeborene als auch für die adaptive Immunantwort von essentieller Bedeutung. Dabei steht die IFN- γ -vermittelte Aktivierung von Makrophagen im Vordergrund. In dieser Eigenschaft induziert IFN- γ die Oberflächenexpression von MHC-Molekülen sowie von Fc-Rezeptoren und stellt die für die Immunantwort wichtigen proinflammatorischen Zytokine und Chemokine bereit (Collins *et al.*, 1984; Kårehed *et al.*, 2007). Zudem fördert IFN- γ in den Makrophagen der Maus die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) und damit die zytotoxische Aktivität dieser Zellen gegenüber intrazellulären Pathogenen (Stuehr *et al.*, 1989). Makrophagen sind aber nicht die einzigen Zellen, welche durch IFN- γ zu einer Abwehrleistung stimuliert werden können, denn IFN- γ aktiviert auch neutrophile Granulozyten und NK-Zellen und fördert die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (Gattoni *et al.*, 2006; Plate *et al.*, 1988). Im Tiermodell konnte die zentrale Rolle von IFN- γ bei Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. Das Fehlen des IFN- γ -Rezeptors führt zu einer massiv eingeschränkten Immunabwehr, was sich z.B. bei einer Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* bemerkbar macht (Deckert-Schlüter *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wird besonders die lokale L-Tryptophan-Depletion durch IFN- γ -vermittelte Aktivierung der Indolamin 2,3-Dioxygenase untersucht, ein Mechanismus dem antimikrobielle, aber auch immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden (Pfefferkorn, 1984; Mellor *et al.*, 1998).

1.1.2. Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α)

TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zur TNF-Superfamilie gehört, deren Mitglieder viele essentielle biologische Funktionen in Säugetieren übernehmen (Locklsey *et al.*, 2001). Es wird vor allem von Makrophagen, T-Zellen und Monozyten, aber auch von Endothelzellen, Fibroblasten und Gliazellen produziert und induziert viele inflammatorische Effekte. Die Aktivierung der TNF- α Synthese erfolgt in Antwort auf unterschiedliche Stimuli, wie z.B. durch LPS, Sauerstoffmetabolite, Zytokine (IL-1 β , IL-2) oder durch die Anwesenheit der Pathogene selbst. Andererseits kann die Synthese von TNF- α durch z.B. Prostaglandin E₂, IL-4 und IL-6 gehemmt werden. Die Aktivität von TNF- α wird durch die zwei Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) vermittelt, die auf allen Zellen außer auf Erythrozyten nachgewiesen werden konnten. Die Bindung von TNF- α an TNFR1 führt zur Rekrutierung des Adapterproteins

TRADD (*TNF receptor 1 associated death domain protein*), welches an die sogenannte Todesdomäne des Rezeptors bindet. Das führt zu einer zur Auslösung von proapoptischen Signalen durch die Aktivierung der Caspase-8, zum anderen zur Initiierung der Transkriptionsfaktoren c-Jun und NF- κ B (Chen *et al.*, 2002; Hehlhans *et al.*, 2005). Die Bindung von TNF- α an TNFR2 führt ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B, allerdings fehlt dem TNFR2 die Todesdomäne, die für die Bindung von TRADD erforderlich ist. Das natürliche Immunsystem wird ebenfalls in seiner Funktion durch TNF- α stimuliert, da TNF- α z.B. die Synthese von IFN- γ über die Hochregulation von IL-12 und IL-18 fördert (Holländer, 2006). TNF- α vermittelt zudem die Apoptose von virusinfizierten Zellen (Ohno *et al.*, 1993). Auch das hämatopoetische System wird durch TNF- α beeinflusst. So wird die Bildung, Ausschüttung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark reguliert. Bei dendritischen Zellen verbessert TNF- α die Fähigkeit T-Zellen zu stimulieren und begünstigt somit die Entstehung einer spezifischen Immunantwort (Blanco *et al.*, 2008). Neben den vielen positiven Effekten von TNF- α kann eine überschießende Produktion dieses Zytokins auch negative Auswirkungen auf den Organismus und die Immunabwehr vermitteln. So ist z.B. TNF- α wesentlich an der Entstehung der Kachexie bei Tumorpatienten beteiligt (Steffen *et al.*, 2008). Ferner führen hohe Serumkonzentrationen von TNF- α zu einer Verstärkung der intravaskulären Gerinnung, zu einem ausgeprägten Hypotonus und zu einer verminderten Kontraktibilität des Myokards, was zusammen bei der Pathogenese des septischen Schocks bedeutsam ist und häufig zum Tode führt (Dinarello, 1997).

1.1.3. Interleukin-1 beta (IL-1 β)

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem von Makrophagen, aber unter anderem auch von Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten oder Keratinozyten gebildet werden kann. Es wird zunächst als inaktives Vorläuferprotein gebildet, und vor der Sekretion durch das IL-1 β konvertierende Enzym (ICE = *IL-1 β converting enzyme*) aktiviert (Howard *et al.*, 1991; Estrov, *et al.*, 1996). Die Synthese und Sekretion von IL-1 β erfolgt als Antwort auf exogene mikrobielle Stimuli (LPS, Exotoxine, Lektine) und als Reaktion auf endogene Moleküle, die bei Entzündungsprozessen freigesetzt werden (z.B. Komplementfaktor C5a, IFN- γ). IL-1 β fördert die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen, ein wichtiger Schritt, der die Diapedese von Leukozyten in entzündliches Gewebe fördert. Im weiteren Verlauf der Entzündungskaskade werden Entzündungsmediatoren wie IL-6, IFN- γ und TNF- α durch die proinflammatorische

Wirkung von IL-1 β bereitgestellt (Holländer, 2006). Zudem wird die transkriptionelle Regulation von z.B. der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) beeinflusst, wodurch es zur Produktion von Entzündungsmolekülen kommt (Prostaglandin E₂, NO) (Corbett *et al.*, 1993). Das bei Entzündungsvorgängen sezernierte IL-1 β besitzt zudem eine systemische Wirkung, die sich unter anderem durch Fieber und Muskel- bzw. Gelenkschmerzen manifestiert (Holländer, 2006). IL-1 β übt eine direkte Wirkung auf Lymphozyten aus: unreife B-Zellen werden zur Differenzierung und zur Expression von IgM angeregt, während bei reifen B-Zellen IL-1 β als Kofaktor für die Proliferation und die Immunglobulinsynthese von Bedeutung ist (Hoffmann, 1980). Bei peripheren T-Zellen bewirkt IL-1 β die Expression weiterer Interleukine, wie z.B. IL-2, IL-3, IL-4 und IL-5. Bei Monozyten und neutrophilen Granulozyten wird durch IL-1 β die Synthese von IL-6 und IL-8 aktiviert, was zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion führt (Holländer, 2006). Auf das hämatopoetische System hat IL-1 β eine wachstumsfördernde Wirkung, daher kann durch Gabe von IL-1 β während einer Chemotherapie die Phase der Leukozytopenie verkürzt werden (Gershanovich *et al.*, 2001).

1. 2. Infektionsmodelle *in vitro*

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, antimikrobielle Effektormechanismen in humanen Zellen funktionell zu analysieren. Dabei sind die Anforderungen an das Abwehrsystem abhängig von der Art der invadierenden Mikroorganismen. Allgemein gilt, dass zur Abwehr von extrazellulären Bakterien Fresszellen aktiviert werden müssen, wobei besonders die neutrophilen Granulozyten von Bedeutung sind. So treten bei immunsupprimierten Patienten bakterielle Infektionen häufig in der Frühphase der Neutropenie auf, die ohne massive therapeutische Intervention in der Regel tödlich verlaufen. Im Verlauf von viralen Erkrankungen sind insbesondere Typ 1 Interferone und natürliche Killerzellen von entscheidender Bedeutung, während bei intrazellulären Parasiten T Helferzellen vom Typ 1 in der Initialphase für die Entwicklung einer protektiven Immunantwort notwendig sind. Unabhängig von den verschiedenen Bedeutungen der einzelnen Komponenten des Immunsystems in der Initialphase, ist das Überstehen von Infektionskrankheiten nur durch ein koordiniertes Zusammenwirken aller Bestandteile des Immunsystems möglich. Um ein besseres Verständnis der Wirkung von antimikrobiellen Effektormechanismen zu erzielen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Pathogene in Infektionsmodellen verwendet, die im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen.

1.2.1. Bakterien

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus ist ein fakultativ anaerobes gram-positives Bakterium und gehört zu der Familie der *Micrococcaceae*. Diese Haufenkokken sind ubiquitär verbreitet und kommen sehr häufig als Kommensalen auf der Haut oder in den oberen Atemwegen vor. Bekommt der Keim durch Störung der Barrierefunktion der Haut oder Schleimhaut günstige Bedingungen, kann es einerseits zu lokalen pyogenen Infektionen kommen, andererseits kann die Infektion systemisch werden und zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis und Sepsis führen. *Staphylococcus aureus* zählt zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen (Starnes *et al.*, 2008). Der Erreger ist äußerst widerstandsfähig gegen Umwelteinflüsse wie Austrocknung oder Temperaturschwankungen und kann zusätzlich eine Reihe von Resistenzen gegenüber Antibiotika aufweisen. Als wichtigster Vertreter ist hier der Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* zu nennen (MRSA), der eine Mutation des Penicillin-bindenden Proteins aufweist und somit gegen penicillinasefeste Penicilline und gegen Cephalosporine resistent ist. MRSA-Infektionen sind oftmals nur noch mit sogenannten Reserveantibiotika z.B. den Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin oder dem Oxazolidinon Linezolid zu behandeln (Herrmann *et al.*, 2008). *Staphylococcus aureus* besitzt eine große Anzahl von Pathogenitätsfaktoren, darunter beispielsweise die Koagulase und den Clumping-Faktor, die beide zu einer lokalen Gerinnung von Fibrin führen und das Bakterium so vor einer Immunreaktion des Körpers schützen. Erst wenn der Keim sich stark vermehrt hat, wird mit Hilfe der Staphylokinase Fibrin lysiert und die Abszeßkapsel aufgebrochen (Bokarewa *et al.*, 2006). Mittels der bakteriellen Enzyme Hyaluronidase, DNase, Lipase und dem Hämolyisin sind Staphylokokken dann im Stande, die extrazelluläre Matrix und Parenchymzellen zu lysieren und invasiv in den Wirtsorganismus vorzudringen. Die Ausbreitung des Erregers wird zusätzlich durch das bakterielle Leukozidin begünstigt, welches Granulozyten und Makrophagen lysiert und damit die zelluläre Immunantwort inhibiert (Nishiyama *et al.*, 2006).

Streptococcus agalactiae

Streptococcus agalactiae ist ein gram-positives, pyogenes Bakterium und zählt serologisch zu den Streptokokken der Gruppe B. Der Erreger ist primär tierpathogen, gehört aber auch zur physiologischen Flora des Gastrointestinal- und Genitaltraktes. *Streptococcus agalactiae* kann aber auch beim Menschen zu Infektionen führen. Der Keim ist z.B. für eine

lebensbedrohliche invasive Erkrankung bei Neugeborenen verantwortlich, die sich als Meningitis, aber auch als Sepsis manifestieren kann (Berner, 2004). Diese Infektion mit *Streptococcus agalactiae* tritt überwiegend in den ersten sechs Lebenstagen auf und wird daher als Frühform oder *Early Onset Disease* bezeichnet. Die Übertragung auf das Kind erfolgt vor oder während der Geburt, häufig bei der Passage durch den besiedelten Geburtskanal (Berardi *et al.*, 2007). Aufgrund des unzureichend ausgeprägten Immunsystems sind vor allem Frühgeborene betroffen. Die Erkrankung tritt mit einer Häufigkeit von 1/1000 Geburten auf und ist ohne Therapie zu 50 % letal (Hamada *et al.*, 2008). Einige Infektionen werden erst nach der ersten Lebenswoche manifest und verlaufen klinisch milder. Diese Spätform der Infektion (*Late Onset Disease*) kann häufig auf eine postpartale Übertragung durch Kontakt mit dem Krankenhauspersonal oder den Eltern zurückgeführt werden.

1.2.2. Viren

Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (hCMV) gehört zu den Herpesviren und wird auch Humanes Herpes Virus 5 genannt. Wie alle Herpesviren ist es ein DNA-Virus und persistiert nach der Primärinfektion lebenslang im Körper. Leukozyten und Epithelzellen dienen dabei als Wirtszellen in der Latenz. hCMV ist weltweit verbreitet, die Durchseuchungsrate variiert je nach Bevölkerungsdichte und hygienischen Umständen und liegt in Industrieländern bei 40-60 % (Ljungman *et al.*, 2007). Die Übertragung des Virus erfolgt meistens durch Speichel, aber auch durch Blut oder andere Körperflüssigkeiten. Charakteristisch für dieses Virus ist, wie für alle Mitglieder der Unterfamilie *Betaherpesvirinae*, ein enges Wirtsspektrum und ein vergleichsweise langsamer Replikationszyklus (Hof *et al.*, 2005). Die infizierten Zellen, mit charakteristischen Einschlusskörperchen, zeigen sich stark vergrößert, was auch zur Namensgebung des Virus führte (Weller *et al.*, 1960). Die Primärinfektion verläuft bei immunkompetenten Menschen fast immer subklinisch oder mit sehr milden Krankheitssymptomen, wie Fieber und erhöhten Leberwerten. In seltenen Fällen kann es zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild kommen (Cohen *et al.*, 1985). Anders verläuft diese Infektion bei Patienten mit Immunschwäche, z.B. nach Organtransplantationen. Hier kommt es zu Augeninfektionen, Pneumonien und schwersten generalisierten Infektionen, die letal enden können. Desweiteren ist die Übertragung von hCMV von der Mutter auf das ungeborene Kind *in utero* von großer klinischer Bedeutung und stellt die häufigste infektiöse Ursache für Geburtsdefekte dar (Malm *et al.*, 2007). Die

Primärinfektion der Mutter oder die Reaktivierung des Virus während der Schwangerschaft kann zu schweren Spätschäden, wie z.B. Schwerhörigkeit oder zentralnervösen Schädigungen des Kindes führen (Harris *et al.*, 1984; Pass, 2002; Damato *et al.*, 2002).

Eine besondere Rolle spielt das Cytomegalievirus im Falle einer Transplantation. Zum einen führen Transplantate von einem hCMV-positiven Spender bei einem hCMV-negativen Organempfänger zu einem sehr großen Erkrankungsrisiko. Da Patienten nach der Transplantation stark immunsuppressiv behandelt werden, kommt es aus dem Transplantat heraus zu einer Reaktivierung und einer Infektion des Empfängers. Aber auch bereits hCMV-positive Empfänger können sich mit einem im Spenderorgan reaktivierenden neuen hCMV-Stamm infizieren. Darüber hinaus kann es aber auch Transplantat-unabhängig, während der Immunsuppression, zu einer endogenen Reaktivierung von hCMV kommen, wenn der Empfänger vorher bereits hCMV-positiv war. In der Transplantationsmedizin ist es ein wichtiges Ziel, die manifeste hCMV-Erkrankung zu verhindern. Neben den schweren Symptomen der Virusinfektion, die eine vitale Gefahr für die transplantierten Patienten darstellt, ist es außerdem belegt, dass eine hCMV-Erkrankung die Transplantatfunktion verschlechtert und eine Abstoßungsreaktion begünstigt. So ist bekannt, dass bei nierentransplantierten Patienten durch eine aktive Cytomegalie eine Infektion der glomerulären Mesangialzellen erfolgen kann (Heieren *et al.*, 1988), was einerseits eine Verschlechterung der Nierenfunktion zur Folge hat und andererseits eine Abstoßungsreaktion auslöst oder verstärkt (Sagedal *et al.*, 2002). Daher muss der Transplantationspatient, dessen Immunsystem in der ersten Zeit nach der Transplantation iatrogen stark inhibiert wird, engmaschig überwacht werden. Bei ansteigender hCMV-Viruslast wird dann, zur Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion, mit Virostatika (Gancyclovir) und auch mit hCMV-Immunglobulin behandelt (Doyle *et al.*, 2006; Zamora, 2001).

Herpes simplex Virus Typ I

Auch beim Herpes simplex Virus Typ I (HSV) handelt es sich um ein DNA-Virus, welches nach Primärinfektion im Körper persistiert. Diese Persistenz findet in diesem Fall in den neuronalen Ganglien statt. HSV ist ein Mitglied der Unterfamilie der *Alphaherpesvirinae*, welche sich durch einen kurzen Replikationszyklus, ein breites Wirtsspektrum und zytopathische Effekte auszeichnen.

HSV wird zum einen durch Tröpfcheninfektion aus dem Rachensekret, zum anderen durch Kontamination mit dem Vesikelinhalt aus Effloreszenzen der Haut und Schleimhaut übertragen. Die Ausbreitung des Virus erfolgt nicht nur über akut kranke, sondern auch über

asymptomatische Personen (Wald *et al.*, 2002). Herpes simplex Viren sind weltweit verbreitet und gehören mit zu den häufigsten Krankheitserregern. In Deutschland haben etwa 80 % aller Erwachsenen Antikörper gegen HSV (Hellenbrand *et al.*, 2005). Primärinfektionen verlaufen häufig inapparent, nur in wenigen Fällen kommt es nach einwöchiger Inkubationszeit zu einer klinisch manifesten HSV Primärinfektion. Diese äußert sich meist durch eine Gingivostomatitis und eher selten durch klassische Symptome des Herpes labialis (ulzerierende und vesikuläre Läsionen an den Lippen und an der Mundschleimhaut) (Hellenbrand *et al.*, 2005). Rezidive entstehen aufgrund verschiedener Faktoren, wie z.B. hormonelle Veränderungen oder Immunsuppression. Im Falle der Immunsuppression manifestiert sich die HSV Infektion auch in inneren Organen, wie z.B. der Lunge, wodurch schwere Pneumonien ausgelöst werden können (Flückinger *et al.*, 2001). Desweiteren kann es als Komplikation einer Herpes Infektion zu einer Herpes simplex Enzephalitis kommen, die sich meist im Temporallappen manifestiert und ohne Therapie zu 70 % letal verläuft (Mertens, 1986; Whitley, 2006).

1.2.3. Parasiten

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulärer Parasit, von dem bekannt ist, dass er über 200 Vogel- und Säugetierarten infizieren kann (Hof *et al.*, 2005). Taxonomisch gehört *T. gondii* zu den Protozoen und wird der Ordnung der Coccidien zugeordnet. Da er ein breites Wirtsspektrum hat, zu dem viele Haustiere gehören, ist die menschliche Infektion mit Toxoplasmen häufig. So wird in Europa die Durchseuchungsrate auf 70 % geschätzt (Hermentin *et al.*, 1987). Hauptwirt des Erregers ist die Katze (sexuelle Vermehrung), der Mensch fungiert als Nebewirt (asexuelle Vermehrung). Der Mensch kann sich auf verschiedenen Wegen mit *T. gondii* infizieren. Zum einen durch die orale Aufnahme von Oozysten, die sich primär im Katzenkot befinden, zum anderen durch den Verzehr von rohem Fleisch, das mit Zysten kontaminiert ist. Einmal infiziert zeigt sich eine lebenslange Persistenz des Parasiten im menschlichen Körper, insbesondere in der Skelettmuskulatur und im ZNS. Zwar ist die Infektion mit *T. gondii* sehr häufig, eine apparente Erkrankung an einer Toxoplasmose ist aber eher selten. Jedoch kann es im Fall einer Immunsuppression, z.B. AIDS, zu einer endogenen Reinfektion und einer klinisch manifesten Erkrankung kommen, die als Enzephalitis, Myokarditis oder auch als Pneumonie verläuft (Eza *et al.*, 2006). Auch die Neuinfektion während einer Schwangerschaft birgt große Gefahren. Besonders im ersten Schwangerschaftstrimenon sind die Folgen der konnatalen

Toxoplasmose sehr schwerwiegend. Wenn sie nicht sofort zum Abort führen, sind schwerste Erkrankungen des Fetus die Folge. Das Kind leidet an einer Enzephalitis mit späterem Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und geistiger Retardierung. Auch eine Beteiligung des Auges im Rahmen einer Chorioretinitis ist sehr häufig.

1.3. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen

Tryptophankonzentration

Neben Effektormechanismen, die gegen einzelne, spezielle Erreger gerichtet sind, gibt es im Organismus einige antimikrobielle Effekte, die gleichermaßen gegen ein ganzes Spektrum von verschiedenen Erregern wirksam sind. Einer der bekanntesten Mechanismen in dieser Art ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS). In *in vivo* Modellen mit Rodentia aber auch in *in vitro* Modellen konnte zweifelsfrei gezeigt werden, dass NO wesentlich an der Abwehr gegen verschiedene Bakterien, Viren und Pilze beteiligt ist. Beim Menschen hingegen gibt es nur vereinzelt Daten zu einer Beteiligung von NO bei der Bekämpfung von invadierenden Mikroorganismen. Umgekehrt ist in humanen Zellen die Induktion eines Tryptophan-abbauenden Enzyms, der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als ein wichtiger antimikrobieller Effektormechanismus beschrieben, während die IDO bei Nagetieren kaum an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt ist und dort hauptsächlich immunregulatorische Aufgaben übernimmt. Da sich diese Arbeit mit antimikrobiellen Effektormechanismen in humanen Zellen beschäftigt, werden im Folgenden die bisher bekannten Tryptophan-abbauenden Enzyme im Detail vorgestellt.

1.3.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase wurde 1975 zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe um Hayaishi beschrieben (Hayaishi *et al.*, 1975). Es handelt sich um ein etwa 43 kDa großes, glykosyliertes Enzym, das als Monomer vorliegt und ein Häm als prosthetische Gruppe trägt. Zudem zeigt die Indolamin 2,3-Dioxygenase Ähnlichkeiten zu anderen Häm-bindenden Proteinen auf, z.B. dem Myoglobin der Mollusken, was auf einen gemeinsamen Entstehungsweg hinweist (Suzuki *et al.*, 2003). Die Expression und Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) ist durch das Immunsystem reguliert. Durch die Stimulation mit IFN- γ und TNF- α ist in nahezu allen humanen Zellen eine Expression der IDO messbar. Aber auch durch andere immunologische Mediatoren wie z.B. Prostaglandin oder membranständige Rezeptoren wie CTLA4 (Fallarino *et al.*, 2005), CD40 (Hwu *et al.*, 2000) oder Toll-like-Rezeptoren (Hayashi *et al.*, 2004) können die IDO-Expression regulieren.

Damit grenzt sich die IDO von dem zweiten Tryptophan-abbauenden Enzym im Säugetierorganismus, der Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), ab. Im Gegensatz zur IDO wird die TDO eher metabolisch, durch Kortison, Glucagon oder die Tryptophankonzentration reguliert (Schutz *et al.*, 1973; Stone, 1993). Die TDO verstoffwechselt ebenfalls L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin, ist aber, im Gegensatz zur ubiquitär verteilten IDO, hauptsächlich in der Leber exprimiert. Beide Enzyme sind Häm-abhängig, unterscheiden sich jedoch bei der Substraterkennung. Während die IDO eine wesentlich geringere Substratspezifität aufweist und neben L-Tryptophan auch andere Indolamine wie 5-Hydroxytryptophan, D-Tryptophan, Tryptamin und Serotonin als Substrat erkennt (Shimizu *et al.*, 1978), akzeptiert die TDO diese Substrate nicht. *In vivo* erfüllen diese beiden Enzyme sehr unterschiedliche Aufgaben. Die TDO bestimmt hauptsächlich die systemische L-Tryptophankonzentration im Serum und regelt damit die allgemeine Verfügbarkeit dieser Aminosäure für die später dargestellten verschiedenen Stoffwechselwege, welche in vielen Bereichen des Organismus eine essentielle Rolle spielen. Durch die IDO-Aktivität, die durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IFN- γ , oder auch durch inflammatorische Stoffe wie LPS in fast allen Zellen induziert werden kann, wird hingegen eine lokale Depletion von L-Tryptophan vermittelt, die einen wirksamen Schutz gegen L-Tryptophan abhängige Krankheitserreger darstellt.

1.3.1.1. Katalytische Eigenschaften der Indolamin 2,3-Dioxygenase

Die IDO ist das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym im sogenannten Kynurenin-Stoffwechselweg. Dieser wird durch die Umsetzung von L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin initiiert, welche durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase katalysiert wird (Abb. 1.1.).

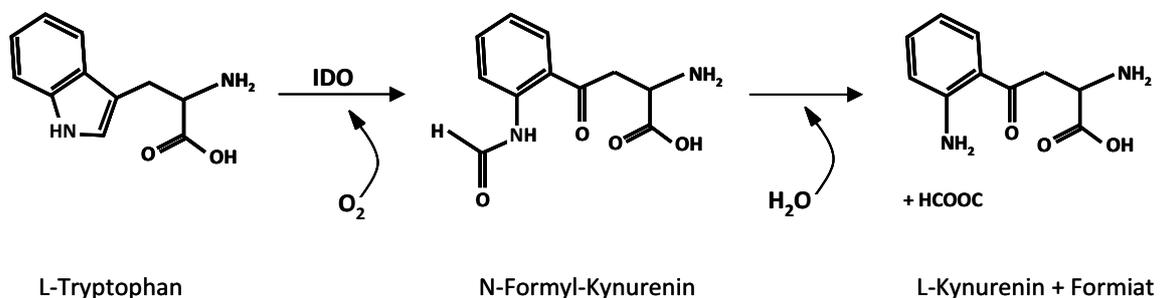


Abb. 1.1. Reaktionsschema des Abbaus von L-Tryptophan zu L-Kynurenin

Es handelt sich hierbei um die oxidative Spaltung des Indolringes. Dabei dient molekularer Sauerstoff als Substrat und, anders als bei den Monooxygenasen, werden auch zwei

Sauerstoffmoleküle eingebaut. Durch die Aktivität der Formyl-Kynurenin Formidase entsteht schließlich L-Kynurenin und als Nebenprodukt wird Formiat abgespalten. Durch den Einsatz des kompetitiven Inhibitors 1-Methyl-L-Tryptophan kann die Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase gehemmt werden (Sakurai *et al.*, 2002.).

1.3.1.2. Regulation der *ido*-Gentranskription

Das die humane Indolamin 2,3-Dioxygenase kodierende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8p12-p11) (Burkin *et al.*, 1993). Es besteht aus 10 Exons und kodiert durch ein offenes Leseraster von 1209 Nukleotiden für ein Protein mit 403 Aminosäuren. Die Regulation der *ido*-Transkription wurde bereits eingehend untersucht. Vier Jahre nachdem Pfefferkorn *et al.* (Pfefferkorn *et al.*, 1986) in humanen Fibroblasten beobachtet hatten, dass die Stimulation mit IFN- γ zu einer Aktivierung der Indolamin 2,3-Dioxygenase führt, konnte dieses auch für die Induktion der *ido*-Transkription gezeigt werden (Dai *et al.*, 1990). Die *ido*-Transkription wird durch die Aktivierung des bereits beschriebenen JAK-STAT-Signalweges durch IFN- γ vermittelt (Shuai *et al.*, 1993). Dabei bindet IFN- γ an einen Rezeptor-Komplex, der schließlich die Phosphorylierung von STAT1 bewirkt, welches danach in den Nukleus wandert und die Transkription durch Bindung an ein GAS-Motiv (gamma-aktivierte Sequenz) initiiert (siehe Kapitel 1.1.1.). Durch eine sekundäre Antwort auf IFN- γ wird die *ido*-Transkription zusätzlich beeinflusst: IFN- γ initiiert, ebenfalls durch den JAK-STAT-Signalweg, die Transkription von IRF-1 (*interferon regulated factors*), der seinerseits an ISRE Sequenzen (*IFN-stimulated response elements*) im *ido*-Promotor bindet und damit zusätzlich zur direkten Aktivierung der *ido* Transkription durch IFN- γ die Transkription verstärken kann (Schröder *et al.*, 2004). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass durch die Stimulation mit Typ I Interferonen (IFN- α , IFN- β), im Gegensatz zu der Stimulation mit dem Typ II Interferon (IFN- γ), nur eine sehr schwache Transkriptionsinduktion stattfindet und es zu keiner Produktion des IDO-Proteins kommt (Hassanain *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2004). Dabei ist bekannt, dass auch die Typ I Interferone an ISRE Sequenzen im *ido*-Promotor binden (Dai *et al.*, 1990). So ist es wahrscheinlich, dass es zur effektiven Initiation der *ido*-Transkription einer Aktivierung im GAS Element bedarf.

Desweiteren sind andere proinflammatorische Zytokine an der Transkription von *ido* beteiligt (Däubener *et al.*, 1996). So können IL-1 β und TNF- α die IFN- γ induzierte *ido*-Transkription durch die Erhöhung der transkriptionalen Aktivität der *ido*-Promotor Region verstärken (Babcock *et al.*, 2000). Die erhöhte transkriptionale Aktivität im *ido*-Promotor ist möglicherweise auf eine zusätzliche Stimulation durch IRF-1 zurückzuführen, denn in

dessen Promotorbereich befinden sich sowohl ein GAS- als auch ein κ B-Motiv. Dabei ist bekannt, dass IL-1 β und auch TNF- α in der Lage sind NF- κ B zu aktivieren und so zusätzlich zu IFN- γ eine IRF-1 Aktivierung verstärken. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass IL-1 β und TNF- α in der Lage sind, die Expression der IFN- γ Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu erhöhen (Shirey *et al.*, 2006). Auch hier scheint bei der Kostimulation mit IL-1 der NF- κ B-Weg involviert zu sein. Zudem wurde gezeigt, dass die TNF- α Expression zu einer verstärkten Rekrutierung von STAT1 in den Nukleus führt, was durch die vermehrte Präsenz der IFN- γ Rezeptoren, also der Phosphorylierungsstellen für STAT1 zu erklären ist. (Robinson *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2003).

1.3.2. Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2)

Im Jahr 2003 wurde eine mRNA Sequenz für ein 3923 bp langes Transkript der NCBI Datenbank hinzugefügt, welches aus einer humanen Uterus cDNA Bibliothek entnommen und kloniert wurde (AK128691). Diese mRNA beinhaltet eine kodierende Sequenz für ein damals noch unbekanntes Protein mit 172 Aminosäuren, welches Ähnlichkeit zur Indolamin 2,3-Dioxygenase zeigte (Murray, 2007). Der genomische Locus befindet sich in 3'-Richtung hinter dem der Indolamin 2,3-Dioxygenase. Die wahrscheinlich zur IDO paraloge, durch eine Duplikation innerhalb des Genoms entstandene, Sequenz ist zudem als Ortholog, also als funktionell verwandtes Gen mit einem gemeinsamen Vorläufer, in vielen anderen Säugetiergenomen vorhanden.

Später zeigte sich, dass es sich bei der publizierten Proteinsequenz, die mittlerweile den Namen IDO-2 bekommen hat, nur um einen kleinen Teil des Proteins handelte. Die kompletten Sequenzen der humanen IDO-2 und der murinen IDO-2 wurden 2007 veröffentlicht (Ball *et al.*, 2007). Die höchste Proteinexpression der murinen IDO-2 wurde durch Western-Blot Analysen in der Leber und Niere und auch noch in Epididymis und Testis nachgewiesen. Die humane IDO-2 zeigte sich vor allem in der Plazenta, im Uterus und im Gehirn. Desweiteren konnte durch eine rekombinante Expression gezeigt werden, dass die murine IDO-2 in der Lage ist, L-Tryptophan zu Kynurenin zu verstoffwechseln (Ball *et al.*, 2009). Zusätzliche Publikationen belegen, dass sowohl die humane als auch die murine IDO-2 in einer Anzahl von Spleiß-Varianten zu finden sind, die sich auch in ihrer enzymatischen Aktivität unterscheiden (Metz *et al.*, 2007). Zwar wurde in murinen und humanen Zellen, sowie auch in Tumorzellen die Expression der Proteine nachgewiesen, allerdings gibt es bis heute keine Aussage über die Aktivität der IDO-2 *in vivo* (Löb *et al.*, 2009; Löb *et al.*, 2008). Darüber hinaus wurde in Infektionsmodellen beschrieben, dass die

murine *ido-2* im Gegensatz zur *ido* z.B. im Rahmen einer Plasmodieninfektion in ihrer Expression nicht hochreguliert wird.

1.4. L-Tryptophan und seine physiologische Bedeutung

In humanen Zellen ist eine präzise Regulation der lokalen Tryptophankonzentration für die Ausprägung von antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten verantwortlich. Im Vergleich zu anderen Aminosäuren kommt dem Tryptophan eine zentrale Bedeutung im Stoffwechsel zu, die im Folgenden beschrieben wird:

L-Tryptophan wurde 1901 von Hopkins und Cole bei der Spaltung von Casein mit Trypsin entdeckt (Hopkins *et al.*, 1901). Es ist eine aromatische α -Aminosäure, die von Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert werden kann, aber für Säugetiere essentiell ist. Die Synthese von L-Tryptophan erfolgt, wie die Synthese der anderen aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, durch die Kondensation von Phosphoenolpyruvat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse, und Erythrose-4-phosphat, einem Zwischenprodukt des Pentosephosphatweges. Der hierbei gebildete C₇-Zucker wird nach mehreren Schritten unter Beteiligung von NADPH zu Shikimat reduziert. Nach Phosphorylierung durch ATP und Kondensation mit Phosphoenolpyruvat entsteht Chorismat, welches durch die Beteiligung von Glutamin zu Anthranilat wird. Durch weitere verschiedene Schritte wird Indol-3-glycerinphosphat gebildet, das schließlich mit Serin unter Bildung von Tryptophan reagiert. Um diese energieaufwändige Produktion von L-Tryptophan regulieren zu können, sind z.B. in *E. coli* alle Gene für die fünf Enzyme, die zur Bildung von L-Tryptophan aus Chorismat nötig sind, in einem Tryptophan-Operon angeordnet, indem das Endprodukt L-Tryptophan als Ko-Repressor agiert. So kann die Produktionsrate der Biosyntheseenzyme bei Bedarf um das 700fache verändert werden (Stryer, 1999).

Um seinen Bedarf an L-Tryptophan zu decken, sollte ein Erwachsener täglich ca. 250 mg L-Tryptophan durch die Nahrung zu sich nehmen (Horwitt, 1986). Vor allem in Milch und Milchprodukten kommt es in hoher Konzentration in Form von Lactalbumin vor. Es findet sich aber auch reichlich in Fleisch oder Hülsenfrüchten. L-Tryptophan ist als Baustein der Proteinbiosynthese, als Provitamin und für viele Stoffwechselwege essentiell. Verschiedene Abbauwege des L-Tryptophans sind in Abbildung 1.2. dargestellt.

Zum einen kann L-Tryptophan in den Melatonin-Stoffwechselweg überführt werden. Dieser Weg wird durch die Tryptophan-Hydrolase initiiert, die die Reaktion von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan katalysiert. Durch eine weitere Decarboxylierung entsteht Serotonin (5-Hydroxytryptamin). Serotonin ist ein Monoamin, das im Organismus als Gewebshormon

und als Neurotransmitter im zentralen sowie peripheren Nervensystem benötigt wird. Gespeichert wird Serotonin in den Vesikeln innerhalb der Präsynapse, bzw. in den Thrombozyten und in Mastzellen. Außerhalb des ZNS vermittelt es z.B. die Regulation des Gefäßtonus, führt zu einer verstärkten Thrombozytenaktivität und zu verstärkter Darmperistaltik. Im ZNS ist Serotonin unter anderem an der Schmerzempfindung und an der Gedächtnisleistung beteiligt. Weiterhin beeinflusst es eine Vielzahl von emotionalen Prozessen wie Angst und Aggression.

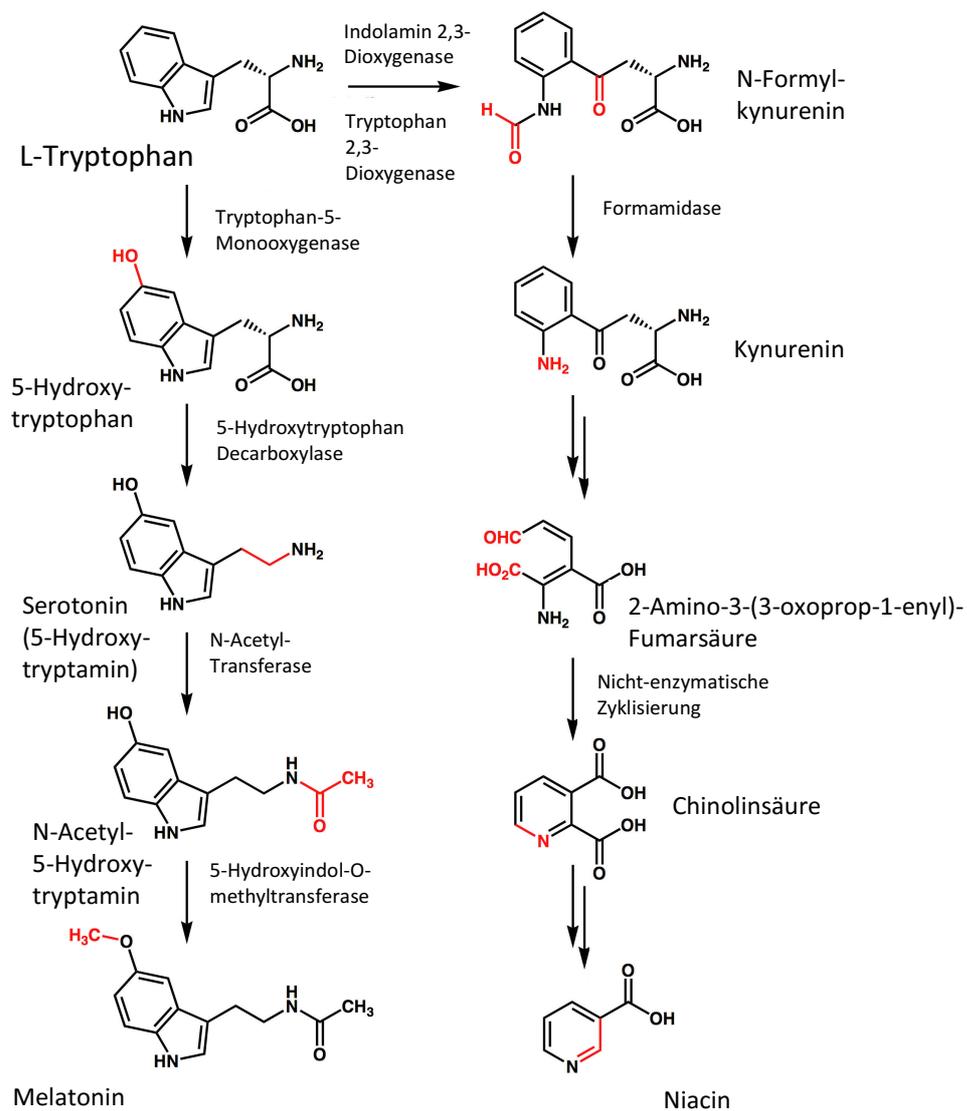


Abb. 1.2. Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel. Mehrere Pfeile bedeuten, dass in der Grafik einige Zwischenstufen nicht dargestellt wurden.

Serotonin wird zudem weiter über N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin in den Pinealozyten der Zirbeldrüse zu Melatonin verstoffwechselt, durch dessen Ausschüttung der Tag-Nacht-

Rhythmus des Körpers gesteuert wird. Durch das Tageslicht wird die Ausschüttung des Hormons ins Blut gehemmt, erst nachts, bei fehlender Lichteinstrahlung, wird Melatonin aus den Speichern abgegeben und kann seine schlaffördernde Wirkung entfalten. Im Winter, wenn das Tageslicht nur wenige Stunden vorhält, bleibt der Melatoninspiegel auch tagsüber erhöht. Als Folge davon können Müdigkeit, Schlafstörungen und Winterdepressionen auftreten. Ein Großteil des Melatonins wird durch Cytochrom P450-Monooxygenasen zu 6-Hydroxymelatonin verstoffwechselt und in Derivaten über den Urin ausgeschieden.

Über 90 % des Gesamt-Tryptophans wird über den Kynurenin-Stoffwechselweg abgebaut. Die Regulation dieses Stoffwechselweges ist abhängig von den Zellen oder von Geweben, in denen er stattfindet (Takikawa, 2005). Nicht in allen Zellen sind die Enzyme für den vollständigen Kynurenin-Stoffwechselweg vorhanden (Stone, 1993). In jedem Fall beginnt dieser jedoch mit der Oxidation des Indolrings durch die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) oder durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und der Entstehung von N-Formyl-Tryptophan. Durch die Formyl-Kynurenin Formidase wird anschließend Kynurenin gebildet. Im weiteren Verlauf entstehen viele Zwischen- und Nebenprodukte, die zum Teil neuroregulierende Eigenschaften haben. So ist für die Kynurensäure, die direkt aus dem Kynurenin entsteht, bekannt, dass sie antikonvulsive Effekte vermittelt, während Chinolinsäure und 3-Hydroxykynurenin beide für neurodegenerative Prozesse verantwortlich sind (Schwarz *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 2003). Verschiedene Metabolite im Kynureninweg, wie z.B. Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure vermitteln zudem toxische Wirkungen, insbesondere auf Lymphozyten, und können somit immunmodulatorisch wirken (Bauer *et al.*, 2005). Am Ende des Kynurenin-Stoffwechselweges steht das Niacin, welches durch die Decarboxylierung der Chinolinsäure entsteht. L-Tryptophan ist die einzige endogene Quelle für Niacin, das veraltet auch unter dem Namen Vitamin B₃ bekannt ist. Niacin ist der Sammelbegriff für die Nicotinsäure und ihr Amid (Nicotinamid) und ist ein wichtiger Baustein verschiedener Coenzyme, wie z.B. dem Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid oder dem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NAD⁺ / NADP⁺) und ihren reduzierten Formen (NADH / NADPH), die an zahlreichen Redoxreaktionen des Zellstoffwechsel (Citratzyklus, Atmungskette) beteiligt sind. Niacin kann antioxidative Wirkungen vermitteln und ist wichtig für die Regeneration von Haut, Muskeln, Nerven und DNA. Neben der Synthese aus L-Tryptophan kann Niacin auch durch Nahrungsmittel, wie z.B. Milchprodukte, Gemüse oder Fleisch aufgenommen werden. Niacin ist in allen lebenden Zellen nachzuweisen und wird in der Leber gespeichert. Ein Mangel an Niacin führt zur Ausbildung der Krankheit Pellagra (=

raue Haut), die durch Diarrhö, Hautveränderungen und Störungen des Zentralnervensystems charakterisiert ist. Unbehandelt führt Pellagra nach drei bis fünf Jahren zum Tod. Pellagra kann durch eine ausschließliche Ernährung mit Mais entstehen. Im Mais liegt Niacin in einer gebundenen Form (Niacytin) vor, die der Körper nicht verwerten kann. Aber auch in Fällen, in denen eine ausgewogene Ernährung möglich ist, tritt Pellagra im Rahmen von krankheitsassoziiertem Unterernährung (z.B. bei Leberzirrhose oder Malabsorption bei chronischer Diarrhö) auf.

1.5. Funktionelle Bedeutung derIDO bei immunregulatorischen und antimikrobiellen Effekten

DieIDO ist im Nagetiermodell, wie bereits erwähnt, wesentlich an der Vermittlung von immunregulatorischen Effekten, die zur Toleranzentstehung von T-Zellen beitragen, beteiligt.

Im humanen System kommt derIDO darüber hinaus noch eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen zu. Diese unterschiedlichenIDO-vermittelten Effekte werden im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

1.5.1. IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte

Dass dieIDO eine Schlüsselrolle in der Immunregulation besitzt, wurde erstmals 1998 durch Mellor und Munn gezeigt (Munn *et al.*, 1998). Durch die systemische Inhibition derIDO-Aktivität in trächtigen Mäusen konnte die T-Zell-vermittelte Abstoßung allogener, aber nicht syngener Feten nachgewiesen werden. Anscheinend schaffen Zellen in der Plazenta aufgrund einer möglicherweise konstitutivenIDO-Aktivität eine tryptophanverarmte Umgebung, in der die maternalen T-Zellen nicht proliferieren können. Somit entsteht eine Toleranz gegenüber dem Fetus. DerIDO-Aktivität kommt daher eine entscheidende Rolle in der Schwangerschaft zu. Zudem sind besonders Dendritische Zellen (Hwu *et al.*, 2000; Fallarino *et al.*, 2002), aber auch Makrophagen (Munn *et al.*, 1999), undIDO exprimierende, nicht-hämatopoetische Zellen, also nicht professionell Antigen-präsentierende Zellen, in der Lage, eine Mitogen, Alloantigen oder Protein-antigen induzierte T-Zell Aktivierung zu inhibieren (Adam *et al.*, 2005; Logan *et al.*, 2002; Meisel *et al.*, 2004). Dabei wurde entdeckt, dass die T-Zell-Proliferation durch einen Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus blockiert ist. Dieser Effekt wird durch GCN2 (*general control non-derepressible*) vermittelt, einer Stress-Response Kinase, die aufgrund einer Tryptophanverarmung und der daraus resultierenden erhöhten Anzahl nicht beladener tRNA

aktiviert wird (Munn *et al.*, 2005; Munn *et al.*, 1999). Es wurde zudem gezeigt, dass die IDO-vermittelte Inhibition der T-Zell-Proliferation *in vitro* auch durch Tryptophan-Metabolite ausgelöst werden kann. Dieser Effekt war auch gegenüber NK- und B-Zellen zu beobachten (Frumento *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002). Die immunregulatorische Rolle der IDO wird also nicht nur durch die Tryptophanverarmung hervorgerufen, es konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass die Apoptose in T-Helfer-Zellen auch durch Tryptophanmetabolite wie Hydroxykynurenin oder Hydroxyanthranilinsäure verursacht wird (Fallarino *et al.*, 2002).

Die dadurch entstehende IDO-induzierte Toleranz machen sich auch Tumoren zunutze, die dieses Enzym häufig konstitutiv exprimieren. So wird angenommen, dass durch die Tryptophanverarmung des umgebenden Gewebes die Antitumor-T-Zellantwort inhibiert wird und sich der Tumor dann ungehindert ausbreiten kann (Uyttenhove *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2004). Ähnliches wurde auch für die Akute myeloische Leukämie (AML) gezeigt, bei der festgestellt wurde, dass konstitutiv IDO-exprimierende Tumorzellen durch die Expansion von regulatorischen T-Zellen in der Lage sind, die T-Zellantwort zu inhibieren, also eine Toleranz gegenüber den Krebszellen hervorzurufen (Curti *et al.*, 2007).

Aber auch in andere immunologische Funktionen bzw. Dysfunktionen ist die IDO involviert. So wurde bereits gezeigt, dass durch die Aktivität der IDO in Lungenzellen ein induziertes experimentelles allergisches Asthma aufgehoben werden kann, und zudem die Entzündungsreaktion in der Lunge und die Hyperreaktivität der Atemwege verringert wird (Hayashi *et al.*, 2004). Desweiteren spielt die IDO auch bei einer anderen Autoimmunerkrankung eine Rolle. Im Tiermodell der Multiplen Sklerose (Entzündung in bestimmten Bereichen des Gehirns oder des Rückenmarks, die zu einer Zerstörung der Myelinscheiden führt), der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), zeigte sich während der präklinischen Phase eine erhöhte IDO-Aktivität in der Milz. Zu Beginn der Symptome war in den Makrophagen und der Mikroglia im ZNS eine IDO-Aktivität nachweisbar. Durch Gabe des IDO-Inhibitors 1-MT in der Frühphase der Erkrankung stieg der Schweregrad der EAE deutlich an (Kwidzinski *et al.*, 2005; Sakurai *et al.*, 2002). Da die EAE eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist, belegen diese Daten, dass durch den Wegfall der IDO-induzierten Immunregulation eine Intensivierung des Krankheitsbildes erfolgt.

Eine besondere Rolle kommt der IDO durch ihre Fähigkeit, die T-Zell Proliferation zu unterdrücken, im Rahmen der Organtransplantation zu. So wurde im Tiermodell gezeigt, dass durch Hochregulation der *ido* mRNA eine Transplantatabstoßungsreaktion inhibiert

wird (Beutelspacher *et al.*, 2006). Neuere Studien konnten zeigen, dass die Hemmung der T-Zellfunktion nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) auf die Induktion derIDO in den Monozyten der Patienten zurückzuführen ist. Dabei zeigen die Monozyten schon nach einer geringen Dosis IFN- γ eine ausgeprägte IDO-Expression. Das von den Monozyten produzierte Kynurenin löst in den T-Zellen eine Apoptose aus (Hainz *et al.*, 2005). Desweiteren scheint die Ausprägung der GvHR (*Graft-versus-host-Reaktion*, Transplantat-versus-Wirt-Reaktion) nach einer HSCT mit der IDO-Expression zusammenzuhängen. Die IFN- γ -vermittelte IDO-Aktivität von Monozyten bzw. Dendritischen Zellen in Patienten nach einer Stammzelltransplantation, ist umgekehrt proportional zur initialen Ausprägung der GvHR. Patienten, die an einer GvHR höheren Grades litten, konnten durch IFN- γ -Stimulation keine IDO-Aktivität zeigen und so auch keine IDO-vermittelte Immuntoleranz entwickeln. Umgekehrt waren die Dendritischen Zellen und Monozyten aus Patienten mit einer gering ausgeprägten GvHR in der Lage eine starke IFN- γ induzierbare IDO-Aktivität zu entwickeln (Steckel *et al.*, 2003). Ein weiterer Ansatz zur Nutzung der immunsuppressiven Funktionen der IDO ergibt sich im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Es ist bekannt, dass IFN- γ stimulierte humane MSC (mesenchymale Stammzellen) eine allogene T-Zellantwort inhibieren können (Meisel *et al.*, 2004). So werden MSC bei der hämatopoetischen Stammzelltransplantation verwendet, um einer *Graft-versus-host-Reaktion* entgegen zu wirken.

Desweiteren zeichnet sich die immunregulatorische Rolle der IDO auch in der Transplantation von Leber und Niere ab (Laurence *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2008). So konnte in einem Rattenmodell der Lebertransplantation gezeigt werden, dass eine spontane Toleranz durch IFN- γ vermittelt ist, und eine IDO-Inhibition die Überlebenszeit nach der Transplantation verkürzt.

1.5.2. IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte

Während die 1998 erstmals beschriebenen IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekte heute in vielen Arbeitsgruppen weiter untersucht werden, ist bereits seit 1984 bekannt, dass die IDO einen antimikrobiellen Effektormechanismus gegen verschiedene Erreger darstellt.

1.5.2.1. IDO-vermittelte antibakterielle Effekte

Die ersten Daten, die eine antibakterielle Wirkung der Indolamin 2,3-Dioxygenase belegten, wurden durch Infektionsexperimente mit obligat intrazellulären Bakterien, den Chlamydien, erzielt. Es wurde gezeigt, dass die Proliferation des Pneumonieerregers *Chlamydia psittaci*,

durch die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität in humanen T24 Zellen gehemmt ist (Byrne *et al.*, 1986). Aber auch andere Chlamydien zeigten sich sensitiv gegenüber einer L-Tryptophan Depletion. So wurde das Wachstum von *C. trachomatis* und *C. muridarum* in verschiedenen humanen Zellen durch eine IFN- γ induzierte IDO-Aktivität gehemmt und konnte durch Zugabe von L-Tryptophan wieder aufgehoben werden (Beatty *et al.*, 1994; Roshick *et al.*, 2006). Es gibt aber auch Chlamydien, die in der Lage sind, der IFN- γ vermittelten Tryptophan-Depletion durch die Wirtszellen und dem damit verbundenen antibakteriellen Effekt zu entgehen. So kann ein *Chlamydia psittacci* Stamm der IFN- γ induzierten Kontrolle durch den Wirt entkommen, indem er aus Metaboliten wie z.B. Anthranilinsäure oder Kynurenin Tryptophan synthetisieren kann (Wood *et al.*, 2004). Auch für manche *Chlamydia trachomatis* Isolate stellt diese Fähigkeit einen weiteren Virulenzfaktor dar (Mc Clarty *et al.*, 2007).

Die IDO ist aber nicht nur gegen intrazelluläre Erreger aktiv, sondern unterdrückt auch das Wachstum von extrazellulären Bakterien, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, Streptokokken der Gruppe B oder Enterokokken in verschiedenen humanen Zellen wie z.B. Endothelzellen, Makrophagen, Uroepithelzellen und Hirntumoren (Däubener *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 1999; Schrotten *et al.*, 2001).

1.5.2.2. IDO-vermittelte antivirale Effekte

Antivirale Effekte werden durch Typ I Interferone, wie auch durch das Typ II Interferon vermittelt. So wurde z.B. für native Retinaepithelzellen gezeigt, dass durch die Stimulation mit IFN- γ und IFN- β die Replikation des Cytomegalievirus gehemmt werden kann. Aber nur im Falle der IFN- γ Stimulation konnte dieser antivirale Effekt durch Zugabe von L-Tryptophan wieder aufgehoben werden, was auf eine IDO-vermittelte antivirale Funktion schließen lässt. Die Inhibition der Virusreplikation durch das Typ I Interferon IFN- β blieb durch die Zugabe von L-Tryptophan unbeeinflusst (Bodaghi *et al.*, 1999). Im Laufe der Zeit wurde auch für andere Herpes Viren (Herpes simplex Virus Typ I und II) gezeigt, dass sie durch IDO-Aktivität in ihrer Replikation gehemmt werden. Dieser antivirale Effekt ist nicht nur auf die Familie der Herpesviren beschränkt, sondern konnte auch für das Masernvirus und Vacciniavirus nachgewiesen werden (Obojes *et al.*, 2005; Terajima *et al.*, 2005).

1.5.2.3. IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte

Die antiparasitären Effekte der IDO wurden zu einem großen Teil am intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* untersucht. Es gibt nur wenige Publikationen, die eine Rolle der IDO bei der Abwehr anderer Parasiten diskutieren (Murray *et al.*, 1989; Ceravolo *et al.*,

1999; Hunt *et al.*, 2006). 1984 konnte erstmals gezeigt werden, dass die IFN- γ abhängige Induktion der IDO zu einer Toxoplasmostase in Fibroblasten führt (Pfefferkorn *et al.*, 1984). Im Gegensatz zu den antibakteriellen und antiviralen Effektormechanismen ist der Einfluss der IDO-Aktivität auf die Abwehr von *Toxoplasma gondii* sehr gut untersucht. Neben der Aufhebung des antiparasitären Effekts durch die Zugabe von L-Tryptophan, wurde auch gezeigt, dass die Expression von rekombinanter IDO in humanen Fibroblasten für eine Inhibition des Parasitenwachstums ausreicht (Dai *et al.*, 1994; Habara-Ohkubo *et al.*, 1993). Desweiteren ist bekannt, dass die Proliferation von *Toxoplasma gondii* durch die Transfektion mit dem *trpB* Gen aus *E. coli* und der damit verbundenen Tryptophan-Prototrophie nicht durch die IDO-Aktivität der Wirtszellen zu inhibieren ist (Sibley *et al.*, 1994).

In den letzten Jahren wurde für viele humane Zellen, wie Epithelzellen, Astrozyten, und Endothelzellen (Däubener *et al.*, 1999; Oberdörfer *et al.*, 2003; Däubener *et al.*, 1993; Däubener *et al.*, 2001) gezeigt, dass die IFN- γ induzierte IDO-Expression einen effektiven antiparasitären Effektormechanismus darstellt. Zudem wurden weitere Zytokine bekannt, die durch Kostimulation diese antiparasitären Funktionen verstärken. Zum Beispiel sind IL-1 β und TNF- α in der Lage, die IFN- γ induzierten antimikrobiellen Effekte zu verstärken (Däubener *et al.*, 1996).

1.6. Zielsetzung der eigenen Arbeit

Der Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase kommt bei der Abwehr von Mikroorganismen und bei der Vermittlung immunregulatorischer Effekte eine zentrale Bedeutung zu. Auffallend ist hierbei der große Speziesunterschied. Während die IDO in Nagetieren hauptsächlich immunregulatorische Effekte vermittelt, besitzt dieses Enzym im humanen System sowohl immunregulatorische als auch antimikrobielle Funktionen. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen Nagetieren und dem Menschen ist, dass bei Ersteren die induzierbare NO-Synthase wesentlich zur Abwehr von Mikroorganismen beiträgt, die im humanen System wiederum nur sehr schwach exprimiert wird. In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass die iNOS zu einer drastischen Hemmung der IDO-Aktivität führen kann. Diese Interaktion der beiden Effektormechanismen könnte zum Teil die verschiedenen funktionellen Befunde in den unterschiedlichen Spezies erklären.

Dieser Sachverhalt macht aber die Etablierung eines *in vivo* Modellsystems zur funktionellen Analyse der antimikrobiellen Effekte der IDO schwierig. Aus

Literaturbefunden ist jedoch bekannt, dass im Rahmen einer Toxoplasmenpneumonie bei Mäusen die IDO, insbesondere in der Lunge, verstärkt exprimiert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die IDO-Aktivität im Rahmen der Toxoplasmenpneumonie bei Mäusen zu einer vollständigen Depletion des Tryptophans in der Lunge führt und dass im Gegenzug eine äquimolare Menge an Kynurenin entsteht. Dies ist einer der wenigen Hinweise darauf, dass die IDO auch bei Mäusen *in vivo* eine antimikrobielle Funktion übernehmen könnte. Daher war es im ersten Teil dieser Arbeit ein Ziel im Modell mit humanen Lungenzellen die funktionelle Bedeutung der IDO bei der Abwehr verschiedener Pneumonieerreger *in vitro* zu analysieren.

Die Erkenntnis, dass IDO in humanen Zellen an der Abwehr verschiedener Mikroorganismen beteiligt ist, beruht hauptsächlich auf dem Befund, dass die IFN- γ induzierten, IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte durch eine Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden können. Damit kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die IDO, zusätzlich zu ihrer enzymatischen Funktion, weitere an das IDO-Protein selbst gekoppelte Effekte vermittelt. Um diese zu analysieren, wurde in dieser Arbeit der IDO-Inhibitor 1-L-Methyl-Tryptophan eingesetzt, um die IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte zu hemmen. In der Literatur werden zumeist IFN- γ aktivierte Zellen untersucht, um die IDO-vermittelten Effekte zu analysieren. Dabei ist nicht ausgeschlossen, dass weitere IFN- γ induzierbare Proteine eine Rolle bei den IFN- γ vermittelten antimikrobiellen Funktionen spielen, oder auch erst ein Zusammenspiel mehrerer Effektormechanismen zu einer gemeinsamen antimikrobiellen Funktion führt. Um diesen möglichen Interaktionseffekt weitestgehend auszuschließen, wurden in dieser Arbeit zudem Zellen eingesetzt, bei denen die IDO-Expression IFN- γ unabhängig induziert wird.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wird darüber hinaus die Regulation der IDO-Aktivität durch die Infektionserreger selbst analysiert. Es ist bekannt, dass Krankheitserreger Mechanismen entwickeln, die es ihnen erlauben, sich dem Zugriff antimikrobieller Effektormechanismen zu entziehen. Hierbei zeigt sich, dass insbesondere das humane Cytomegalievirus in der Lage ist, viele IFN- γ induzierte Effekte zu antagonisieren. Als Schwerpunkt dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob eine hCMV-Infektion die Aktivität der IDO in humanen Zellen unterdrückt. Dies hätte dann *in vivo* massive Konsequenzen, z.B. im Rahmen der Koinfektion mit anderen Erregern oder auch bei der Toleranzentstehung im Rahmen der Transplantationsmedizin.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellen

Tab. 2.1.: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Quelle (Referenz)
HFF	humane Vorhautfibroblasten	ATCC
A549	humanes Lungenadenokarzinom (Alveolarzellen Typ II)	DSMZ Braunschweig, (Lieber <i>et al.</i> , 1976)
HBE4-E6/E7	humane primäre Brochialepithelzellen, mit Papillomavirus Typ 16 immortalisiert	ATCC (Viallet <i>et al.</i> , 1994)
HEK 293T	humane embryonale Nierenzellen	ATCC (Graham <i>et al.</i> , 1977)
86HG39	humane Astrozytomzellen	Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf (Bilzer <i>et al.</i> , 1991)
HeLa T-REx™	humanes Zervixkarzinom (Epithelzellen), mit pcDNA™6/TR transformiert	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.2. Erreger für Infektionsversuche

2.1.2.1. Bakterien

Staphylococcus aureus und *Streptococcus agalactiae* dienten als Erreger in Infektionsversuchen. Beide Bakterienstämme wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial identifiziert und isoliert.

2.1.2.2. Viren

Humanes Herpes simplex Virus Typ I (HSV) ist von Prof. K.E. Schneweis (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) erhalten worden.

Humanes Cytomegalievirus AD 169 (hCMV) wurde von Prof. Dr. Ortwin Adams und Dr. Albert Zimmermann (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) sowie Prof. Dr. Christian Sinzger (Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten, Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt.

2.1.3.3. Lösungen

dNTP-Mix	1 mM dATP 1 mM dCTP 1 mM dTTP 1 mM dGTP
BBS (2 x)	280 mM NaCl 50 mM BES 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6.96
Proteinase K-Lösung	6.6 µg/mL in PBS
Kryokonservierungslösung	12 % DMSO 88 % FCS

2.1.3.4. Puffer

PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	13.7 mM NaCl 2.7 mM KCl 80.9 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
Laufpuffer (Western-Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7.7
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 7 89 mM Borsäure 2.5 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA
5 x DNA-Probenpuffer	15 % Ficoll Typ 400 0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylenyanol in 5 x TBE Puffer

RF1-Lösung	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 5.8
RF2-Lösung	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin pH 6.8
Ehrlich´s Reagenz	1.2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig
SDS-Probenpuffer	45 % Glyzerin 25 % β -Mercaptoethanol 10 % SDS 0.15 % Bromphenolblau 30 mM Tris/HCl pH 6.8
Blotting-Puffer	50 mL NuPage-Blot-Puffer (20x) (Invitrogen) 200 mL Methanol 750 mL Reinstwasser

2.1.4. Antibiotika

Plasmid-transformierte Bakterien wurden in Medien mit Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 μ g/mL angezogen. Die Ampicillin-Stammlösung wurde in einer Konzentration von 50 mg/mL in Reinstwasser angesetzt und anschließend sterilfiltriert.

2.1.5. Primer

Tab. 2.3.: Verwendete Primer für Klonierungen

Primer	Sequenz (5'→3')	Verwendung
<i>KpnI</i> -h-ido-for	ATA ATA <u>GGT ACC</u> ATG GCA CAC GCT ATG GAA	Amplifizierung von <i>h-ido</i> mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
<i>XhoI</i> -h-ido-rev	ATA ATA <u>CTC GAG</u> ACC TTC CTT CAA AAG GGA T	Amplifizierung von <i>h-ido</i> mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
<i>KpnI</i> -m-ido-for	ATA ATA <u>GGT ACC</u> ATG GCA CTC AGT AAA ATA TCT	Amplifizierung von <i>m-ido</i> mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
<i>XhoI</i> -m-ido-rev	ATA ATA <u>CTC GAG</u> AGG CCA ACT CAG AAG AGC	Amplifizierung von <i>m-ido</i> mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle
<i>KpnI</i> -m-ido-2-for	ATA ATA <u>GGT ACC</u> ATG GAG CCT CAA AGT CAG	Amplifizierung von <i>m-ido-2</i> mit <i>KpnI</i> -Schnittstelle
<i>XhoI</i> -m-ido-2-rev	ATA ATA <u>CTC GAG</u> AGC ACC AGG ACA CAG GAG	Amplifizierung von <i>m-ido-2</i> mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle

Tab. 2.4.: Verwendete Primer für Real-time PCR

Primer	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HSV-for	ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA	Detektion von HSV-Replikation
HSV-rev	AGA AGC GGA AGG AGC CGC	Detektion von HSV-Replikation
hCMV-for	TCT GCA GGA CGC CGT ATT	Detektion von hCMV-Replikation
hCMV-rev	GCC CCG GCC TCG TAG	Detektion von hCMV-Replikation

2.1.6. Sonden

Die Sonden, die in der Real-time PCR zur Detektion der Virusreplikation eingesetzt wurden, wurden von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Beide Sonden waren am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Tab. 2.5.: Verwendete Sonden für Real-time PCR

Sonde	Sequenz (5'→3')	Verwendung
S-HSV	FAM-CGG AGC GCA GCA TCT CGT CCA- TAMRA	Detektion von HSV
S-hCMV	FAM-TGC GCG ATC TGT TCA ACA CCA TTA AAT TTT-TAMRA	Detektion von hCMV

2.1.7. Bakterien in der Molekularbiologie

E. coli JM109

K-12 derivative, *recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdr17*,
gyrA96, *relA1*, *thi* (*lac-proAB*)

2.1.8. Plasmide

Tab. 2.6.: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Verwendung	Referenz
pcDNA™ 4/TO/myc-His A		Ausgangsvektor zur Klonierung von h-IDO-, m-IDO- und m-IDO-2-Expressionsvektoren	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA™ 6/TR		Expression von Tetrazyklin-Repressor-Molekülen	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA4 <i>h-ido</i>	<i>h-ido</i> über <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> -Schnittstellen in pcDNA™4/TO/myc-His A eingebracht	Expression von h-IDO _{myc}	In dieser Arbeit hergestellt
pcDNA4 <i>m-ido</i>	<i>m-ido</i> über <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> -Schnittstellen in pcDNA™4/TO/myc-His A eingebracht	Expression von m-IDO _{myc}	In dieser Arbeit hergestellt
pcDNA4 <i>m-ido-2</i>	<i>m-ido-2</i> über <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> -Schnittstellen in pcDNA™4/TO/myc-His A eingebracht	Expression von m-IDO-2 _{myc}	In dieser Arbeit hergestellt

2.1.9. Zytokine

Humanes IFN- γ wurde von R&D (Wiesbaden) bezogen, in einer Konzentration von 2×10^5 U/mL in IMDM gelöst und in Aliquots von 100 μ L bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert. TNF- α und IL-1 β wurden von Tebu-Bio (Offenbach) bezogen, in einer Konzentration von 2×10^4 U/mL in IMDM gelöst und in Aliquots von 100 μ L bis zum Gebrauch bei -70 °C gelagert.

2.1.10. Antikörper

2.1.10.1. Primärantikörper

Tab. 2.7.: Verwendete Primärantikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Eingesetzte Verdünnung
Maus-anti-myc	Serotec Morphosys AbD, Düsseldorf	1:500
Maus-anti-beta-aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000
Maus-anti-hCMV-pp65	Abcam, Cambridge, USA	1:10000
Kaninchen-anti-IDO	Chemicon, Temecula, USA	1:7500

2.1.10.2. Sekundärantikörper

Tab. 2.8.: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundäre Antikörper	Quelle	Eingesetzte Verdünnung
POX-anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:10000
POX-anti-Kaninchen-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:10000
Cy ² -anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:500

2.1.11. Größenstandards

2.1.11.1. Größenstandards für DNA

Für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde die 1-kb-DNA-Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe) als Standard eingesetzt, die DNA-Fragmente von 10000 bp bis 250 bp beinhaltet. Die Lagerung des Größenstandards erfolgte bei einer Temperatur von -20°C .

2.1.11.2. Größenstandards für Proteine

Zur Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteingrößenstandards der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. In der folgenden Tabelle sind die molekularen Massen der SeeBlue Plus2 Pre-stained Standardproteine aufgelistet.

Tab. 2.9.: Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue Plus2

Proteine des Größenstandards	in MOPS-Puffer [kDa]
Myosin	191
Phosphorylase B	97
BSA	64
Glutamat-Dehydrogenase	51
Alkohol-Dehydrogenase	39
Carboanhydrase	28
Myoglobin Rot	19
Lysozym	14
Aprotinin	n/a
Insulin, B-Kette	n/a

2.1.12. Enzyme

2.1.12.1. Restriktionsenzyme

Tab. 2.10.: Verwendete Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI (10 U/mL)	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Hind</i> III (10 U/mL)	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Kpn</i> I (10 U/mL)	NEB, Beverly, USA
<i>Pst</i> I (10 U/mL)	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Pvu</i> II (10 U/mL)	NEB, Beverly, USA
<i>Xho</i> I (10 U/mL)	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Xmn</i> I (10 U/mL)	Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.12.2. Sonstige Enzyme

Tab. 2.11.: Verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Expand-High-Fidelity-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNAse Out	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Promega, Mannheim

2.1.13. Kits

QIAExII	Qiagen (Hilden)
High Pure Plasmid Isolation Kit:	Roche (Mannheim)
Plasmid-Maxi-Kit:	Qiagen (Hilden)

2.1.14. Chemikalien

2.1.14.1. Allgemeine Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Biozym, Oldendorf
Ampicillin-Natriumsalz	Boehringer, Mannheim
BES	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
BPE	Gibco, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
6-Chloro-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Choleratoxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
D-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Boehringer, Mannheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Roth
4-(Dimethylamin)benzaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
EGF	Gibco, Karlsruhe
Eisessig (Essigsäure 96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol 97 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Fluoromount-G SBA	SouthernBiotech, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	BioChrom, Berlin
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
1-Methyl-L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-D-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Oxoid Wesel
MOPS	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt

Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	DaKoCytomation, Hamburg
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Schuchard, Hohenbrunn
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin
Tween-20	Merck, Darmstadt
Xylenoxyanol	Merck, Darmstadt

2.1.14.2. Radiochemikalien

[³H]-Thymidin, 0.74 MBq/mL

[³H]-Uracil, 1.23 MBq/mL

Die Reagenzien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen, in RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan, ohne Glutamin) gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.15. Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, Glas, ø 13 mm	Hecht-Assistent, Sondheim
Einmalspitzen	Polylab, Seoul, Korea
Kryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Reaktionsgefäße, 0.5-2.0 mL	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen, 1-20 mL	Polylab Seoul, Korea
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier Whatman 3MM	VWR, Darmstadt
Kanülen; Microlance, verschiedene Größen	BD Becton Dickinson, Heidelberg
96-well Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
96-well Platten Real-time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen, 25-175 cm ²	Costar, Bodenheim
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Greiner, Frickenhausen

2.1.16. Geräte und sonstige Materialien

Analysenwaage	Chyo JL-180, Welabo, Düsseldorf
Bestrahlungsgerät, Gammacell 1000 Elite	Nordion, Ottawa, Kanada
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Blottingkammer	Semidry, Bio-Rad, München
Brutschränke	B5060 EK/CO ₂ , Heraeus, Hanau,
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammern	AGS, Heidelberg
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Photomikroskop II, Zeiss, Köln
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze, Biometram, Göttingen
HPLC Anlage	BeckmanCoulter, Krefeld
Kippschüttler	Duomax 1030, Heidolph, Nürnberg
Kodak X-OMAT, AR Film,	Rochester, USA
Mikroskope: Axiovert 25, TE2000	Zeiss, Oberkochen; Nikon, Düsseldorf
Nitrozellulosemembran „Protran“ (0.45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipetten	Finnpipette Labsystems, München
Plattenphotometer	Tecan, Crailsheim
Quarzküvetten, 100 µL	Hellma, Jena
Real-time PCR Gerät iQ5	iCycler, Biorad, München
Röntgenfilmkammer	REGO, Haan
Filme Hyperfilm TM -ECL	GE Healthcare, München
SDS-Gelelektrophoresekammer	XCell, Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsgeber	Electrophoresis constant Power Supply EPS 500/400, Amersham Biosciences, Braunschweig
Photometer	DU 640, Beckman-Coulter, München
GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A)	Flow Laboratories, Meckenheim
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Perkin Elmer, Thermal Cycler 480 Biometra Göttingen, UNO Thermoblock
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät	Harvester Basic 96, Satron Instruments Tampere, Finnland
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau, Heraeus Biofuge fresco, Hanau

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Durch die alkalische Lyse der Bakterienzellen wird Plasmid-DNA freigesetzt, während chromosomale DNA in einem Präzipitat aus Zellwandbestandteilen und Proteinen eingeschlossen bleibt. In Anwesenheit eines chaotropen Salzes in hoher Konzentration bindet die freigesetzte DNA an die Glasfasermatrix der Trennsäulchen und kann so aus der Lösung isoliert werden. Die Matrix-assoziierte Plasmid-DNA wird gewaschen und anschließend durch die Zugabe von Reinstwasser bzw. Niedrigsalzpuffer eluiert. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert. Eine Isolierung größerer Plasmid-DNA-Mengen erfolgte nach Vorschrift des QIAGEN Plasmid Maxi Kits (Qiagen, Hilden) mit einer Bakterienkultur von 200 mL.

2.2.1.2. Gelelektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Negativ geladene Nukleinsäuren wandern im elektrischen Feld zur Anode. So erfolgt eine Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe, wobei die Migrationsgeschwindigkeit antiproportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes ist. Durch Variation der Agarosekonzentration (0.5 – 2.0 %) kann die Porengröße und somit der Größenbereich, der besonders präzise aufgetrennt werden soll, verändert werden.

Zur Herstellung von Agarosegelen wurde die entsprechende Menge Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer aufgekocht, bis eine homogene Flüssigkeit entstand. Anschließend wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von $0.3\ \mu\text{g}/\text{mL}$ versehen und in einen Gelschlitten mit den erforderlichen Kämmen gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer eingesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet. Die mit DNA-Probenpuffer in einem Verhältnis von 1:5 versetzten DNA-Proben wurden in die Probentaschen pipettiert und bei 50 bis 90 Volt aufgetrennt. Das in die doppelsträngige DNA eingelagerte Ethidiumbromid machte eine Detektion der DNA-Fragmente bei UV-Bestrahlung (340 nm) durch seine Fluoreszenz-Emission möglich (Transilluminator, Bio Doc Analyze, Biometra, Göttingen). Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde stets die 1 Kb-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Größenstandard verwendet.

2.2.1.3. Restriktionsverdau von DNA

Bei Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) handelt es sich um eine Gruppe von Enzymen, die DNA-Moleküle spalten können. Die ausschließlich verwendeten sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen vom Typ II erkennen palindromische Erkennungssequenzen von vier bis acht Basenpaaren doppelsträngiger DNA. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNA-Moleküle mit definierten Enden entstehen. So kann ein Restriktionsverdau zum einen zur Überprüfung der erzeugten Expressionsvektoren genutzt werden, in dem ein spezifisches Bandenmuster erzeugt wird. Zum anderen dient er durch die Erzeugung von definierten Enden an DNA-Molekülen der Vorbereitung der Ligation. Für den Verdau von DNA-Molekülen wurden 2-10 Units Enzym pro μg DNA eingesetzt.

Allgemeiner Ansatz

10 x Probenpuffer	2 μL
Enzym	2-10 Units/ μg DNA
DNA	x μL
Reinstwasser	ad 20 μL

Die Zusammensetzung des Ansatzes wurde gegebenenfalls entsprechend der Herstellerangaben verändert.

2.2.1.4. Ligation von DNA-Molekülen

Durch die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 (Roche, Mannheim) wird in ATP- und Mg^{2+} -Abhängigkeit die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende doppelsträngiger DNA katalysiert. Die Ligase kann sowohl komplementär überstehende Enden (*sticky ends*) als auch glatte Enden (*blunt ends*) miteinander verbinden. In einem Ligationsansatz wurden Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt, mit 2 μL 10-fach Reaktionspuffer sowie einem Unit T4-Ligase versetzt und mit H_2O ad 20 μL aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 30 – 45 min bei RT inkubiert und im Anschluss ohne weitere Behandlung zur Transformation eingesetzt.

2.2.1.5. Isolierung von gesamtzellulärer RNA

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA wurde TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung der

Guanidiniumthiocyanat Methode (Chomczynski *et al.*, 1987). Die Vorgehensweise erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.6. cDNA Synthese aus gesamtzellulärer RNA

Bei der cDNA Synthese wird mRNA von Zellen bzw. Gewebeproben enzymatisch in DNA umgeschrieben. Hierbei werden die molekularen Verhältnisse der Transkripte nicht verändert. Daher kann die entstehende cDNA zur Expressionsquantifizierung genutzt werden. Desweiteren diente die cDNA als Ausgangsmaterial zur Klonierung von Expressionskonstrukten.

Ansatz

1 µg RNA in 10 µL DEPC-H₂O

- + 1 µL Oligo-dT Primer (10 µM)
- + 1 µL dNTP-Mix (10 mM)

Inkubation des Ansatzes bei 65 °C für 5 Minuten und anschließende Abkühlung auf Eis.

- + 4 µL 5 x First Strand Puffer
- + 2 µL (0.1 M DTT)
- + 1 µL RNase OUT

Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für 2 min.

- + 1 µL (200 Units) M-MLV RT

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 50 min. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 min gestoppt.

2.2.1.7. Amplifikation von DNA Molekülen mittels PCR

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = *polymerase-chain-reaction*) ist eine *in vitro* Amplifizierung eines bestimmten Genfragments definierter Länge und Sequenz möglich. Die doppelsträngige DNA wird zunächst durch Hitze (95 °C) denaturiert. Anschließend können während der Abkühlung spezifische Primer jeweils mit der 5'- oder 3'-flankierenden Sequenz hybridisieren. Durch eine Temperaturerhöhung auf 72 °C kann nun die thermostabile Polymerase den jeweiligen Komplementärstrang synthetisieren. Eine 30-fache zyklische Wiederholung der Temperaturänderungen führt zu einem exponentiellen Anstieg der Konzentration des Amplifikats. Es wurde die „expand high fidelity“ DNA-

Polymerase (aus *Pyranococcus furiosus*) verwendet, die im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität (*proofreading*) besitzt und dadurch eine geringere Fehlerrate aufweist.

PCR-Ansatz

10 – 500 ng	Template-DNA
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
5 µL	10 x Reaktionspuffer
40 nmol	dNTP-Mix
2.5 Units	DNA-Polymerase
ad 50 µL	Reinstwasser

Thermoprofil des Reaktionszyklus:

95 °C	5 min	} 30 Zyklen
95 °C	30 sec	
53-64 °C	60 sec	
72 °C	1 min / kb des Produkts	
72 °C	7 min	
4 °C	unendlich	

2.2.1.8. Real-time PCR

Die Real-time PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und darüberhinaus die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Zusätzlich zu den Primern wird eine sequenzspezifische Sonde eingesetzt, die zwischen den Primern am Template bindet. Durch die Anwendung der Sonde, die an ihrem einen Ende mit einem Quencher, an ihrem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, ist es möglich eine Fluoreszenz, die proportional mit der Menge des gebildeten PCR-Produktes zunimmt, während der PCR-Zyklen zu detektieren. In der intakten Sonde unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters aufgrund der räumlichen Nähe durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Die *Taq*-Polymerase, die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonuclease-Aktivität besitzt, kann die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbauen, dadurch entfernen sich Quencher (6-Carboxytetramethylrodamin) und Fluorophor (6-Carboxyfluorescein) voneinander, und eine steigende Reporter-Fluoreszenz kann gemessen werden. In dieser Arbeit wurde die Virusreplikation in Zellkulturen mittels

Real-time PCR detektiert. Als Standard dienten Plasmide, die die zu amplifizierende Region der Viren enthielten. Die Real-time PCR wurde in einem iCycler (Biorad, München) durchgeführt und mit der Biorad iQ5 Software ausgewertet.

Real-time PCR-Ansatz

5.0 µL	Template-DNA
12.5 µL	qPCR Mastermix-No ROX (Eurogentec, Köln)
2.5 µL	Primer 1 (Endkonzentration 0.3 µM)
2.5 µL	Primer 2 (Endkonzentration 0.3 µM)
2.5 µL	Sonde (Endkonzentration 0.2 µM)

Thermoprofil des Reaktionszyklus

50 °C	10 min	
95 °C	10 min	
95 °C	15 sec	} 45 Zyklen
60 °C	1 min	
4 °C	unendlich	

2.2.1.9. Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die zu isolierende Bande mit einem Skalpell auf dem UV-Schirm bei 340 nm aus dem Gel ausgeschnitten. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die DNA anschließend mittels des Gel-Extraktion-Kits QIAEX II (Qiagen) aus dem Gel eluiert. Die Aufreinigung basiert auf einer Bindung der DNA an Silika, wie z.B. Glasmilch, unter hohen Salzkonzentrationen. Nach mehrmaligem Waschen mit ethanolischer Lösung wurde die DNA unter Niedrig-Salz-Bedingungen von der Glasmilch-Matrix eluiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.1.10. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurden die Proben 1:100 in Reinstwasser verdünnt, in eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm im Spektralphotometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus, Pharmacia, Freiburg) gemessen. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder Reinstwasser.). Das Verhältnis der ermittelten Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) gibt Auskunft über

Verunreinigungen der Nukleinsäuren. Eine Absorption von 1.0 bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm entspricht einem DNA-Gehalt von 50 $\mu\text{g/mL}$ doppelsträngiger DNA und 40 $\mu\text{g/mL}$ bei einzelsträngiger DNA und RNA. Bei sauberen Präparationen sollten die Werte des A260/A280-Quotienten zwischen 1.7-2.0 liegen. Bei Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol liegt der Quotient deutlich niedriger, bei Verunreinigungen mit Salzen deutlich höher.

2.2.1.11. Herstellung von IDO-/ IDO-2-Expressionsplasmiden

Zur Herstellung der Expressionsplasmide wurde als Ausgangsvektor pcDNATM4/TO/*myc*-His A (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dieser wurde mit *Kpn*I und *Xho*I verdaut. *h-ido*, *m-ido* und *m-ido-2* wurden mit Primern, die diese Schnittstellen (*Kpn*I-Sequenz im 5'-Primer / *Xho*I-Sequenz im 3'-Primer) beinhalteten, mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden anschließend mit *Kpn*I und *Xho*I verdaut und über ein Agarosegel aufgereinigt. Anschließend konnte eine Ligation des geschnittenen Ausgangsvektors und dem PCR-Fragment durchgeführt werden.

2.2.1.12. DNA Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten und klonierter Vektoren wurde von der Firma GATC (Konstanz, Deutschland) mittels spezifischer Primer und fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotiden mit einem ABI 3700 Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt.

2.2.2. Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von Bakterien

Die im Rahmen dieser Arbeit für molekularbiologischen Arbeiten verwendeten Bakterienstämme wurden aus Glycerinkulturen oder von Einzelkolonien auf einer LB-Agarplatte in steriles LB-Medium überimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. Das LB-Medium wurde zusätzlich mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt. Für eine kurzfristige Lagerung wurden die Bakterienstämme auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Eine Inkubation der Bakterien erfolgte bis zum sichtbaren Wachstum von Einzelkolonien im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C. Die Platten konnten anschließend bei 4 °C für 3-4 Wochen gelagert werden.

2.2.2.2. Stammerhaltung

Eine längerfristige Lagerung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen. Dazu wurden 800 µL einer Übernachtskultur (LB-Medium) mit 200 µL sterilem 87 %-igem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3. Herstellung von transformations-kompetenten *E. coli*

Zur Herstellung transformations-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde 200 mL LB-Medium mit 1 mL einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft und bei einer Temperatur von 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600 nm}) von 0.5-0.6 angezogen. Die *E. coli*-Kultur wurde in sterilen 50 ml-Röhrchen für 20 min auf Eis gelagert und anschließend für 5 min bei 4000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 mL RF1-Lösung aufgenommen und für 1-2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Resuspension wurden die Zellen erneut für 5 min abzentrifugiert und das Pellet vorsichtig in 4 ml RF2-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden 15 min auf Eis gelagert und als 200 µL Aliquots in sterile Kryotubes überführt. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.2.2.4. Transformation von *E. coli*

Die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte mittels der Hitzeschockmethode (Cohen *et al.*, 1972). Die RbCl behandelten, transformations-kompetenten *E. coli*-Zellen, die bei -70 °C in 200 µL Aliquots gelagert waren, wurden für die Transformation langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes oder mit ca. 100 bis 500 ng Plasmid-DNA versetzt. Der Transformationsansatz wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C unterzogen. Die *E. coli*-Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis gekühlt, anschließend mit 800 µL LB-Medium versetzt und für 2 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Jeweils 50 µL und 300 µL Suspension wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3. Zellbiologische Methoden

2.2.3.1. Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und sowie bei einer CO₂-Konzentration von 10 % bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Arbeiten in der Zellkultur erfolgten in der Sterilbank und mittels steriler Materialien.

2.2.3.2. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von A549, HeLa T-REx™, 86HG39, HFF und HEK 293T Zellen erfolgte in IMDM, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C) fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert wurde. Die Zellkultur erfolgte in 75 cm² oder 162 cm² großen Zellkulturflaschen. Zum Splitten oder Ernten der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und mit 0.25 % Trypsin-EDTA abgelöst. Durch Zugabe von 10 mL Kulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:6 (bei HFF-Zellen 1:3) in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium gegeben.

HBE4-E6/E7 Zellen wurden in KSF Medium (Keratinocyte-serum-free Medium) mit 5 ng/mL humanem, rekombinantem, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), 50 µg/mL bovinem Hypophysenextrakt (BPE) und 10 ng/mL Cholera toxin kultiviert. Die Zellkultur erfolgte in 75 cm² großen Zellkulturflaschen. Zum Splitten der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit 0.25 % Trypsin-EDTA abgelöst und mit 20 mL ihres Zellkulturmediums versetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 1800 rpm (Megafuge 1.0 R, Hanau) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in der gewünschten Menge frischem Medium aufgenommen.

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders erwähnt, ebenfalls in dem entsprechenden Kulturmedium durchgeführt.

2.2.3.3. Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung von Zellen wurden diese in einer Konzentration von 1×10^7 /mL in Kryokonservierungslösung aufgenommen und in ca. 1 mL in Kryotubes aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen rasch auf – 80 °C heruntergekühlt und am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.4. Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii (BK-Stamm) wurden in HFF-Zellen kultiviert. Die Wirtszellen, die in einer 25 cm² Zellkulturflasche in einem Monolayer vorlagen, wurden in einem Wirtszell-Parasiten-Verhältnis von ca. 2:1 infiziert. Nach drei Tagen waren nahezu alle Wirtszellen durch die Parasiten lysiert. Die freigesetzten, extrazellulären Tachyzoiten wurden geerntet und mittels 10-minütiger Zentrifugation von verbliebenen Wirtszellbestandteilen getrennt (600 rpm für 10 Minuten). Um die Tachyzoiten aus dem Überstand zu pelletieren, wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 2800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet mit den Tachyzoiten wurde in 5 mL PBS aufgenommen und

entweder für Infektionsversuche oder zur Infektion eines neuen HFF-Monolayers genutzt. Die Anzahl der isolierten Tachyzoiten wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.3.5. Kalzium-Phosphat-Transfektion

Zur transienten Transfektion wurden 1×10^6 Zellen (HEK 293T) in 10 mL IMDM + 10 % FCS am Vortag in einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert. Nach 16 Stunden wurden in einem sterilen Röhrchen (Falcon) 16 µg Expressionsplasmid und 80 µL 1 M CaCl_2 gemischt und mit Reinstwasser auf 400 µL aufgefüllt. Unter Vortexen wurden tropfenweise 400 µL 2 x BBS zugegeben, für 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf die vorbereitete Zellkultur gegeben. 16 Stunden später wurde das Medium gewechselt, die Transfektionseffizienz ermittelt und die Zellen für Experimente eingesetzt.

2.2.3.6. Lipofektion

Die Lipofektion von HeLa T-REx™-Zellen erfolgte in einer 96-well Platte. 6×10^4 Zellen wurden am Vortag in ihrem Kulturmedium ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch je 100 µL DMEM ohne FCS ersetzt. Anschließend wurde 0.2 µg Plasmid-DNA in 25 µL DMEM gelöst, sowie parallel 0.5 µL Lipofectamin 2000 (Invitrogen) mit 25 µL DMEM vermischt. Das verdünnte Lipofectamin wurde nach 5 Minuten Inkubationszeit der verdünnten DNA zugegeben, damit sich Komplexe, bestehend aus DNA und Lipofectamin, ausbilden konnten. Nach 20 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Ansatz zu den Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken in dem restlichen DMEM verteilt. Nach 18 Stunden wurde der Überstand abgesaugt, durch IMDM + 10 % FCS ersetzt und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen 1:6 gesplittet. Durch die anschließende Zugabe von Zeocin (Endkonzentration 100 µg/mL) konnten transfizierte Zellen selektioniert werden. Nach 5 Tagen wurden die Zellen geerntet und in 96-well Platten ausgesät. Dabei wurde eine Konzentration von 0.1 Zelle/Vertiefung berechnet. Die Zellen wurden expandiert und die dadurch erhaltenen Klone auf Tetrazyklin-induzierten Tryptophanabbau getestet. Der Klon, der durch Zugabe von 0.1 µg/mL Tetrazyklin die größte Menge an Kynurenin produzierte, wurde für weitere Experimente verwendet.

2.2.3.7. Verwendung von L-Tryptophan

L-Tryptophan wurde in einer Konzentration von 20 mM in einer Stocklösung angesetzt. Dazu wurde das L-Tryptophan in 50 mL RPMI 1640 (ohne Tryptophanzusatz) bei einer

zweistündigen Inkubation bei 56 °C gelöst. Anschließend wurde es zur Verwendung in der Zellkultur steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.3.8. Verwendung von 1-L-Methyl-Tryptophan

1-L-Methyl-Tryptophan wurde in einer Konzentration von 20 mM in einer Stocklösung angesetzt. Dazu wurde das 1-L-MT in 1 mL 1 M NaOH gelöst und anschließend mit 50 mL RPMI 1640 (ohne Tryptophanzusatz) bei einer zweistündigen Inkubation bei 56 °C gelöst. Anschließend wurde es zur Verwendung in der Zellkultur steril filtriert. Sofern nicht anders erwähnt, wurde 1-L-MT in einer Konzentration von 1.5 mM verwendet.

2.2.3.9. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl von Zelllinien, Toxoplasmen und PBL wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellen wurden mit Trypanblau vermischt (je nach Ausgangskonzentration in verschiedenen Verdünnungsstufen) und im Mikroskop ausgezählt. Es wurden nur ungefärbte Zellen gezählt, da diese in der Lage sind, den Farbstoff aktiv aus der Zelle zu transportieren und sich damit nicht anfärben.

2.2.3.10. Stimulation von Zellen

Die Experimente wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3×10^4 Zellen/Vertiefung eingesetzt und für 72 Stunden mit verschiedenen Zytokinen bzw. Tetrazyklin, wie in den einzelnen Experimenten angegeben, stimuliert. Diese Ansätze wurden danach für die Messung der IDO-Aktivität sowie für Infektionsexperimente gleichermaßen genutzt.

2.2.3.11. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut

PBL (periphere Blutlymphozyten) wurden aus dem Blut von gesunden Spendern gewonnen. Dazu wurden 50 mL Blut entnommen, mit 2000 I.E. Heparin vermischt und mit 50 mL PBS verdünnt. Die Anreicherung der T-Zellen erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biototech, Uppsala, Schweden). 15 mL Ficoll-Paque wurden mit 35 mL des heparinisierten, verdünnten Blutes überschichtet und 30 min bei Raumtemperatur ungebremst bei 2400 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau). Die sich in der Interphase sammelnden Lymphozyten wurden mit einer Pipette abgenommen und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Zwischen diesen Waschschritten wurden die Zellen jeweils für 10 Minuten bei 800, 1200 und 1800 rpm zentrifugiert, um diese von Ficoll und Thrombozyten zu befreien. Anschließend wurden die

Zellen in 5 mL PBS aufgenommen und gezählt. Die Zellen wurden für jeden Versuch frisch präpariert.

2.2.3.12. Bestimmung der *Toxoplasma gondii* Proliferation

Die Proliferation von *Toxoplasma gondii* wurde durch den Einbau von [³H]-Uracil (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977) detektiert. Nur in Anwesenheit der Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kann Uracil direkt in die RNA eingebaut werden. Da Toxoplasmen eine 100-fach höhere Aktivität dieses Enzymes aufweisen als die Wirtszellen, wird Uracil bevorzugt in die sich vermehrenden Parasiten aufgenommen. Die unter 2.2.3.10. beschriebenden Stimulationsansätze wurden mit 2×10^4 Toxoplasmen infiziert, nach 48 Stunden mit 0.012 MBq [³H]-Uracil markiert und nach einer Inkubationszeit von weiteren 24 Stunden bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert. Die aufgetauten radioaktiv markierten Versuchsansätze wurden mit Hilfe eines Zellerntegeräts (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht. Die Filter wurden im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet, mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) getränkt und in Plastikfolien eingeschweißt. Danach wurden die Filter in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgewertet. Bei der Messung wurde die durch einen radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung erfasst und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt.

2.2.3.13. Bestimmung von T-Zell Proliferation

1.5×10^5 PBL wurden den unter 2.2.3.10. beschriebenen Stimulationsansätzen zugegeben, nach 72 Stunden mit dem CD3-Antikörper OKT3 in einer Endverdünnung von 1:3000 stimuliert und für ca. 24 Stunden mit 7.4 kBq [³H]-Thymidin inkubiert. Für diese Analysen war es vor Ansatz der Stimulationsexperimente notwendig, die in diesen Experimenten verwendeten A549 Zellen durch Bestrahlung (siehe 2.2.3.17.) in ihrer Proliferation zu hemmen. Anschließend wurden die Ansätze bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert. Die aufgetauten radioaktiv markierten Versuchsansätze wurden mit Hilfe eines Zellerntegeräts (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht. Die Filter wurden im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet, mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) getränkt und in Plastikfolien eingeschweißt. Danach wurden die Filter in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, LKB Wallac) ausgewertet. Bei der Messung wurde die durch

einen radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung erfasst und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt.

In einigen T-Zell-Proliferationsexperimenten wurden die Zellkulturüberstände von HFF-Zellen nach 72-stündiger Stimulation der Zellen mit IFN- γ als Kulturmedium für die T-Zellen genutzt. Dazu wurden je 180 μ L des Zellkulturüberstandes in einer 96-well Platte mit den PBL in 10 μ L PBS versetzt.

2.2.3.14. *In vitro* Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae*

Die Infektion von Zellen mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae* erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, unter Verwendung der in 2.2.3.10. beschriebenen Stimulationsansätze. Dazu wurde eine Bakterienkolonie, die über Nacht auf einer Blutagarplatte gewachsen war, in 1 mL PBS aufgelöst und 1: 100 000 in PBS verdünnt. Jeweils 10 μ L dieser Bakteriensuspension mit je ca. 10 – 100 Kolonie-erzeugenden Einheiten (cfu = colony forming units) wurden zu den 200 μ L Kulturvolumen gegeben und der Ansatz für weitere 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Zellkulturen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend wurde deren optische Dichte bei einer Wellenlänge von 620 nm in einem Photometer gemessen (Tecan, Crailsheim). In einigen Experimenten wurde das Bakterienwachstum zusätzlich durch das Ermitteln der cfu bestimmt. Dazu wurde der resuspendierte Überstand seriell 1:10 verdünnt und je 5 μ L auf einer Blutagarplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C konnten die Kolonien in den verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt werden.

2.2.3.15. *In vitro* Infektion mit humanem Herpesviren

Die Infektion mit dem humanen Herpes simplex Virus Typ I (HSV) und dem humanen Cytomegalievirus erfolgte unter Verwendung der in den unter 2.2.3.10. beschriebenen Stimulationsansätze. Dazu wurden die Viren in PBS bis zur gewünschten MOI verdünnt und zu den Zellkulturen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die Kulturen bis zur Messung der Virusreplikation bei -20 °C gelagert.

In manchen Experimenten wurde die Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus zu Beginn, sowie nach 24 Stunden und 48 Stunden nach Stimulation mit IFN- γ und anderen Zytokinen bzw. Reagenzien durchgeführt.

2.2.3.16. Bestimmung der Virusreplikation

Für die Bestimmung der Virusreplikation wurden die zuvor in 96-well Platten eingefrorenen Kulturen bei Raumtemperatur aufgetaut und kurz zentrifugiert. Anschließend wurden die in

Zweifachbestimmungen durchgeführten Versuche in einem Eppendorf-Gefäß vereinigt und bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 75 µL 5 µg Proteinase K, gelöst in 75 µL PBS, resuspendiert. Der Proteinase K-Verdau erfolgte bei 56 °C für 60 Minuten und wurde durch Erhitzen auf 96 °C für 20 Minuten beendet. Die Messung der Virusreplikation wurde mittels Real-time PCR (2.2.1.8.) durchgeführt. Als Standard dienten Plasmide, die die zu amplifizierende Region der Viren enthielten.

2.2.3.17. Bestrahlung von Zellen

Frisch geerntete A549 wurden in einem 50 mL Röhrchen in 10 mL Medium aufgenommen und mit 50 Gray bestrahlt (Gammacell 1000 Elite, Nordion, Ottawa, Kanada). Anschließend wurden die Zellen bei 1800 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und für T-Zell-Proliferationsexperimente genutzt.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Herstellung von Zelllysaten

Für die Analyse der Proteinexpression wurden Zellen durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen mechanisch aufgetrennt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber geerntet, zweimal in PBS gewaschen und für 10 min bei 2800 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Die gewonnenen Sedimente wurden in Proteaseinhibitor-haltigem PBS aufgenommen und auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Die Suspension (ca. 1-2 mL) wurde dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zwischen jedem Schritt bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde sie bei 13000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um Membranbestandteile und nicht aufgeschlossene Zellen abzutrennen. Die Zelllysate wurden in kleinen Mengen aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die, wie unter 2.2.4.1. beschriebenen Zelllysate verwendet. Bevor die Proteinproben in einem Volumen von 10 – 20 µL auf das Gel aufgetragen wurden, wurden sie 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100 °C denaturiert. Im Gel werden die zu analysierenden Proteine zunächst in

einem Sammelgel fokussiert und dann in einem Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 Volt über einen Zeitraum von 1-2 h. Durch Mitführen des Markers SeeBlue™Plus2 konnten molekulare Massen der Proteine bestimmt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Es wurden ausschließlich 10 %-ige NuPage-Polyacrylamidgele der Firma Invitrogen verwendet.

2.2.4.3. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wurden gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Semidry-Blotting auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran transferiert. Für den Transfer wurden drei in Blotting-Puffer getränkte 3 MM²-Whatman-Papiere, die der Größe des Gels entsprachen, auf die mit Blotting-Puffer angefeuchtete Kathodenplatte der Blotting-Kammer gelegt. Anschließend wurden das Gel, sowie die ebenfalls mit Blotting-Puffer befeuchtete Membran luftblasenfrei aufgebracht, um den späteren Proteintransfer nicht zu behindern. Auf die Membran wurden weitere sechs in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere gelegt und mit dem Anodendeckel der Blotting-Kammer verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² Gelfläche über einen Zeitraum von 120 Minuten.

Durch den immunchemischen Nachweis konnten dann die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine durch spezifische Primärantikörper und enzymgekoppelte Sekundärantikörper detektiert werden. Dazu wurden die Nitrozellulosemembranen zur Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindestellen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung (5 %-iges fettfreies Milchpulver in PBS) unter leichtem Schütteln inkubiert. Primäre sowie Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurden in der Blocklösung verdünnt und nacheinander für jeweils mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Im Anschluss an jede Inkubation wurde die Membran zweimal für 10 min mit PBS gewaschen. Durch die Peroxidase am Sekundärantikörper wurde das verwendete Chemilumineszenz-Substrat umgewandelt und die daraus resultierende Lichtemission schließlich mit einem Röntgenfilm (Kodak) detektiert. Dabei wurde das „Enhanced Chemiluminescence (ECL)“-System entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die Expositionszeit des Röntgenfilms wurde der Stärke der Signale angepasst. Der Film wurde anschließend mit der Entwicklermaschine entwickelt und die Proteinbanden durch Vergleich mit der Markerbande für die Proteingröße auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet.

2.2.4.4. Immunofluoreszenzanalyse IDO_{myc} oder IDO-2_{myc} exprimierender Zellen

Zur Analyse der Expression von IDO_{myc} und IDO-2_{myc} in HEK 293T bzw. HeLa T-REx™-Zellen wurde eine Immunofluoreszenzanalyse durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen auf Glasplättchen in 24-well Platten bis zur Konfluenz inkubiert und, wenn es das Experiment erforderte, auch darin stimuliert. Die auf den Glasplättchen adhären Zellen wurden zunächst vorsichtig mit 37 °C warmen PBS (RT) gewaschen und anschließend mit jeweils 1 mL 3 % Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen für 15 min mit je 1 mL 0.25 % (v/v) Triton-X-100 in PBS behandelt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Zellen auf den Glasplättchen mit 1 mL 2 % Pferdeserum in PBS für 30 Minuten bei RT inkubiert. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten auf einem Kippschüttler. Die Markierung der Proteine erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern, verdünnt in 0.2 % Pferdeserum. Nach einem 3 x 10-minütigen Waschschrift mit PBS (RT) erfolgte die Inkubation mit den sekundären, Fluoreszenz-markierten Antikörpern für eine Stunde. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde erneut 3 x 10 min mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 2 min mit 1.5 µg/mL DAPI in PBS gefärbt. Der Farbstoff DAPI interkaliert dabei in die DNA und erzeugt bei der Anregung ein blaues Fluoreszenzlicht. Die Glasplättchen wurden nochmals mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in einem Tropfen Fluoromont G eingebettet. In Kartonmappen wurden die Präparate bis zur vollständigen Trocknung über Nacht bei 4 °C abgedunkelt gelagert und konnten schließlich mit einem Fluoreszenzmikroskop (Photomikroskop II, Zeiss) analysiert werden. Die Fluoreszenzpräparate wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und dokumentiert.

2.2.4.5. IDO-Aktivitätstest

Zur Messung der IDO-Aktivität mittels Ehrlich's Reagenz wurden die unter 2.2.3.10. beschriebenen Stimulationsansätze (supplementiert mit L-Tryptophan, Endkonzentration 0.6 mM) verwendet. Die Messung der IDO-Aktivität basiert auf dem Nachweis von L-Kynurenin im Zellüberstand. Die Aktivität von IDO korreliert mit der Konzentration von N-Formyl-Kynurenin in den Überständen der Zellkulturen (Däubener *et al.*, 1994). 160 µL der Kulturüberstände wurden in 96-well Platten mit V-förmigen Boden gegeben und zur Proteinpräzipitation mit 10 µL 30 % TCA versetzt. Durch die anschließende Inkubation für 30 min bei 50 °C hydrolysierte N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin. Nach Zentrifugation bei 1800 rpm für 10 min (Heraeus Megafuge 1.0, Hanau) wurden je 100 µL der Überstände in

96-well Platten mit Flachboden überführt und mit 100 μL Ehrlich's Reagenz (1.2 % (w/v) 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig) vermischt. Ehrlich's Reagenz reagiert mit Kynurenin zu einem gelben Azofarbstoff, dessen Absorption anschließend bei 492 nm im Photometer (Tecan, Crailsheim) gemessen wurde. Die Stärke der Absorption bei 492 nm repräsentiert die Menge an gebildetem Kynurenin, wobei die Überstände der unstimulierten Zellen als Negativkontrollen dienen. Das Ehrlich's Reagenz wurde für jede Messung frisch angesetzt und in jeder Messung ein Standard mit verdünntem Kynurenin mitgeführt.

2.2.4.6. Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC

Zur gemeinsamen Detektion von L-Tryptophan- und Kynureninkonzentrationen wurden Überstände stimulierter Zellen mittels Umkehrphasen-HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) analysiert. Dafür wurden diese Zellkulturüberstände zunächst 1:10 mit 25 % Sulfosalizylsäure versetzt, um Proteine, die die HPLC-Messung stören würden, zu fällen. Durch einen Zentrifugationsschritt (10 min bei 13000 rpm) wurden die ausgefallenen Proteine pelletiert. 500 μL des Überstandes wurden durch Zugabe von 85 μL 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7.2 eingestellt. Der L-Tryptophan- und Kynureningehalt wurde mit dem Gold-Universal-Grad System (BeckmanCoulter, Krefeld) und einer Umkehrphasensäule (Grom-Sil FMOC-2, 100 mm x 4 mm) bestimmt. Die Trennung erfolgte in einem Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4.2) mit einem ansteigenden Gehalt an Acetonitril bei einer Durchflussrate von 1.0 mL/min (Abb. 3.1.). L-Tryptophan mit einer Retentionszeit von ca. 14 min und Kynurenin mit einer Retentionszeit von ca. 7 min wurden mit Hilfe von Standardmessungen quantifiziert.

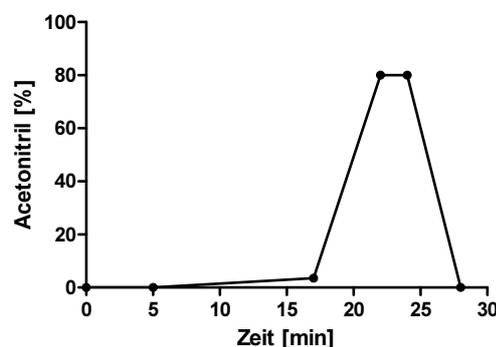


Abb. 2.1. : Gradientenverlauf bei HPLC –Messung.

2.2.5. Computergestützte Arbeiten

2.2.5.1. Sequenzanalysen

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm SeqMan von DNASTar durchgeführt.

2.2.5.2. Sequenzvergleiche

Der Aminosäuresequenzvergleich von IDO und IDO-2 wurde mit der ClustalW Software durchgeführt.

2.2.5.3. Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mittels des Standard t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben. Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler aufgeführt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob dieIDO in humanen Lungenzellen einen antimikrobiellen und immunregulatorischen Effektormechanismus darstellt. Darüber hinaus wird überprüft, ob allein die enzymatische Aktivität derIDO für die beobachteten infektionsimmunologischen Funktionen von Bedeutung ist. Im dritten Teil der Arbeit wird zudem analysiert, ob verschiedene Infektionserreger, die das Lungengewebe befallen können, den koordinierten Ablauf von antimikrobiellen Effekten verhindern.

3.1. IDO-vermittelte Effekte in humanen Lungenzellen

Die Infektion der unteren Atemwege, verursacht durch Bakterien, Parasiten und Viren stellt ein großes klinisches Problem dar. So führt eine Infektion mit dem gram-positiven Bakterium *Staphylococcus aureus* häufig zu Lungenabszessen und gerade bei immunsupprimierten Patienten können Herpes simplex Virus Typ I und *Toxoplasma gondii* zu schweren Pneumonien führen. Zudem ist aus *in vivo* Experimenten mit Mäusen bekannt, dass es kurz nach einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* besonders in der Lunge zur Aktivierung des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) kommt, welches L-Tryptophan vollständig zu Kynurenin verstoffwechselt (Fujigaki *et al.*, 2002). Im ersten Teil dieser Arbeit sollen daher die antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte, die durch die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität in humanen Lungenzellen vermittelt werden können, in einem *in vitro* Modell näher untersucht werden.

3.1.1. IDO-Aktivität in der humanen Lungenzelllinie A549

Um die IDO-Aktivität in Lungenzellen zu analysieren, wurde zunächst die humane Lungenadenokarzinomzelllinie A549 (Alveolarepithelzelle) verwendet. Die Induktion der IDO-Aktivität wurde durch IFN- γ vermittelt. Dazu wurden je 3×10^4 A549 Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten gegeben und die Zellen mit IFN- γ Konzentrationen von 0 – 1000 U/mL stimuliert. Nach 72-stündiger Inkubation wurde die IDO-Aktivität der Zellen durch den Nachweis von Kynurenin im Zellkulturüberstand gemessen. Das hierbei verwendete Medium enthielt L-Tryptophan in einer Konzentration von 600 μ M, um eine maximale Kynurenin-Produktion zu erlauben. Wie in Abbildung 3.1. gezeigt, führt die Stimulation der Zellen mit 500 U/mL IFN- γ nach 72 Stunden zu einer Kynurenin-Produktion. Im Zellkulturüberstand wurde eine Kynureninkonzentration von 130 μ M nachgewiesen. Durch die Zugabe des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β konnte die

Kynurenin-Produktion um das Vierfache gesteigert werden. Ein gleichstarker Effekt wurde durch die Zugabe des ebenfalls proinflammatorisch wirkenden TNF- α erzielt, so dass in beiden Fällen eine Kynureninkonzentration von 540 μ M gemessen werden konnte.

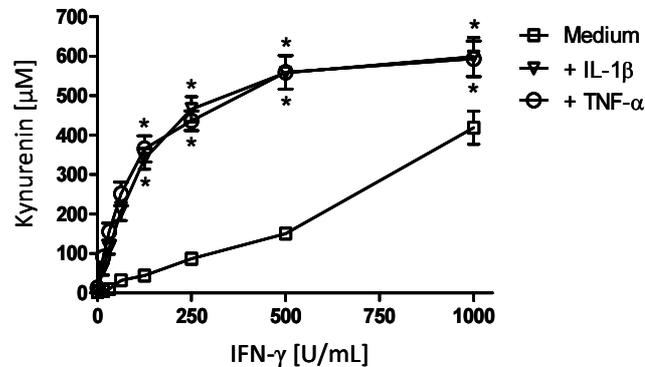


Abb. 3.1.: Synergistischer Effekt von IL-1 β oder TNF- α auf die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität von A549 Zellen. Frisch geerntete A549-Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- γ / IL-1 β / TNF- α stimuliert. IFN- γ wurde in Konzentrationen von 0 – 1000 U /mL, IL-1 β und TNF- α in einer Konzentration von 100 U/mL eingesetzt. Anschließend wurde das Tryptophan-Abbauprodukt Kynurenin im Zellkulturüberstand photometrisch quantitativ erfasst. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Signifikante Erhöhungen ($P < 0.01$) der IFN- γ -induzierten IDO-Aktivität durch IL-1 β oder TNF- α , bezogen auf die nur mit IFN- γ stimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (*).

Eine alleinige Stimulation mit IL-1 β oder TNF- α führte nicht zu einer Kynurenin-Produktion. So zeigten A549 Zellen nur in Anwesenheit von IFN- γ IDO-Aktivität, die aber durch die Gegenwart von IL-1 β oder TNF- α synergistisch verstärkt wurde. Die eingesetzte Menge an L-Tryptophan (0.6 mM) wurde bei einer Stimulation mit 1000 U/mL IFN- γ in Anwesenheit von IL-1 β oder TNF- α nach 72 Stunden nahezu komplett zu Kynurenin umgesetzt. Die mittlere Konzentration von L-Tryptophan im Serum beträgt ca. 60 μ M, damit belegen die in Abb. 3.1. gezeigten Daten, dass die IDO-Aktivität in A549 Zellen ausreicht, um mehr als das 10-fache des physiologisch vorhandenen Tryptophans abzubauen. In weiteren Experimenten wurde der Einfluß des IDO-spezifischen Inhibitors 1-Methyl-L-Tryptophan (1-L-MT) auf die IFN- γ -vermittelte IDO-Aktivität in A549 Zellen untersucht (Abb. 3.2.). Dazu wurden die Zellen in An- bzw. Abwesenheit von 1-L-MT mit einer IFN- γ Konzentration von 250 U/mL für 72 Stunden in L-Tryptophan-supplementiertem Medium stimuliert. Ohne den IDO-Inhibitor wurde im Zellkulturüberstand eine Kynureninkonzentration von 85 μ M erreicht. Durch den Einsatz von 1-L-MT konnte die IDO-Aktivität signifikant inhibiert werden, was die Kynurenin-Konzentration auf ca. die Hälfte reduzierte. Wurde zusätzlich zum IFN- γ auch mit IL-1 β oder TNF- α stimuliert, so konnte in den Kulturüberständen eine Kynureninkonzentration von 450 bzw. 425 μ M

detektiert werden, die ebenfalls durch 1-L-MT signifikant inhibiert werden konnte. In beiden Fällen betrug die Kynurenin-Konzentration dann nur noch 190 μM . Diese Daten belegen, dass A549 Zellen nach IFN- γ Stimulation Kynurenin produzieren, wobei die Kynurenin-Produktion durch den Einsatz des IDO-spezifischen Inhibitors 1-L-MT reduziert werden kann.

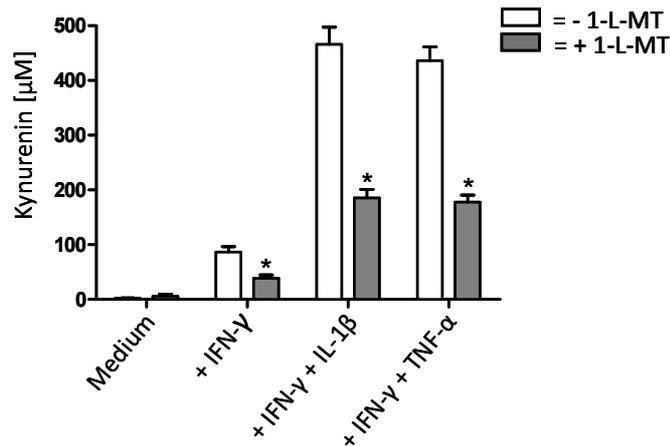


Abb. 3.2.: Inhibition der IDO-Aktivität durch den IDO-Inhibitor 1-L-MT in A549 Zellen. Frisch geerntete A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- γ in einer Konzentration von 250 U/mL in An- oder Abwesenheit von IL-1 β oder TNF- α (100 U/mL) stimuliert. Anschließend wurde das Tryptophan-Abbauprodukt Kynurenin im Zellkulturüberstand quantitativ erfasst. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Signifikante Inhibitionen ($P < 0.01$) durch 1-L-MT, bezogen auf den jeweiligen Ansatz ohne 1-L-MT, wurden gekennzeichnet (*).

3.1.2. Immunregulatorische IDO-vermittelte Effekte in A549

Da in A549 Zellen IFN- γ induzierte IDO-Aktivität nachgewiesen werden konnte, sollte nun geklärt werden, ob diese Zellen auch einen IFN- γ induzierten immunregulatorischen Effekt vermitteln konnten, wie es schon für andere Zellen beschrieben war. Durch den Einsatz von 1-L-MT als Inhibitor der Indolamin 2,3-Dioxygenase und auch durch die Zugabe von L-Tryptophan zur Aufhebung der IDO-vermittelten Tryptophan-Depletion sollte zudem die IDO-Spezifität dieses Effektes nachgewiesen werden. Der immunregulatorische Effekt wurde über die Messung der mit [^3H]-Thymidin detektierbaren Proliferation der T-Zellen erfasst. Damit kein Einbau von [^3H]-Thymidin in die im Experimentalsystem anwesenden A549 Zellen erfolgen konnte, wurden diese vor dem Experiment bestrahlt. Nach 72-stündiger IFN- γ -Stimulation von 3×10^4 A549 Zellen/Vertiefung, wurden 1.5×10^5 periphere Blutlymphozyten (PBL) zugegeben und diese durch Zugabe des anti-CD3-Antikörpers OKT3 aktiviert. Nach weiteren 72 Stunden wurde die T-Zell-Proliferation über

die Inkorporation von [³H]-Thymidin gemessen. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Abbildung 3.3.A dargestellt. Es konnte eine deutliche, IFN- γ abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation festgestellt werden. In Anwesenheit von IFN- γ stimulierten A549 Zellen (500 U/mL) wurde im Vergleich zur unstimulierten Situation die T-Zell-Proliferation auf unter 20 % gesenkt. Eine signifikante Aufhebung dieses IFN- γ vermittelten Effektes konnte einerseits durch die Zugabe von L-Tryptophan erreicht werden, andererseits aber auch durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT.

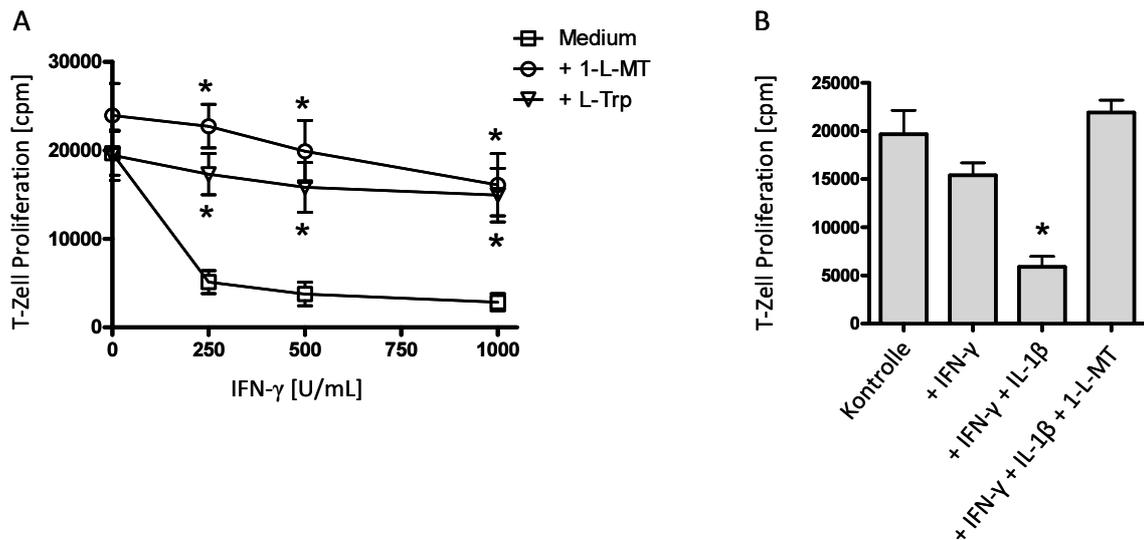


Abb. 3.3.: Aufhebung des IFN- γ /IL-1 β vermittelten inhibitorischen Effektes von A549 Zellen auf die T-Zell-Proliferation. **A)** Bestrahlte A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ stimuliert. Nach Stimulation wurden PBL (1.5×10^5 /Vertiefung) hinzugegeben (mit bzw. ohne zusätzliches L-Tryptophan in einer Konzentration von 0.5 mM) und mit OKT3 stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die T-Zell-Proliferation durch den Einbau von [³H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Signifikante Aufhebungen ($P < 0.01$) des inhibitorischen Effektes durch 1-L-MT oder L-Tryptophan, bezogen auf den jeweiligen Ansatz, der nur mit IFN- γ behandelt wurde, wurden gekennzeichnet (*). **B)** Bestrahlte A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in An- oder Abwesenheit von 1-L-MT (1.5 mM) und IL-1 β (100 U/mL) mit einer niedrigen Dosis IFN- γ (60 U/mL) stimuliert. Nach Stimulation wurden PBL (1.5×10^5 /Vertiefung) hinzugegeben und mit OKT3 stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die T-Zell-Proliferation durch den Einbau von [³H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Als Positivkontrolle wurden T-Zellen in Anwesenheit von bestrahlten, unstimulierten A549 Zellen mit OKT3 stimuliert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ($P < 0.01$) der T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Kontrolle, wurde gekennzeichnet (*).

Diese Daten belegen, dass durch Lungenzellen eine IDO-abhängige Inhibition der T-Zell-Proliferation vermittelt wird. Dieser hemmende Effekt wird nicht durch toxische Tryptophanmetabolite wie z.B. Kynurenin vermittelt, da eine Supplementation von Tryptophan den inhibitorischen Effekt nahezu völlig antagonisiert.

Der Einfluss von IL-1 β in diesem Proliferationsexperiment, das nur in Anwesenheit von IFN- γ die IDO-Aktivität erhöhen kann (siehe Abb. 3.1.), ist in Abbildung 3.3. B dargestellt. Die A549 Zellen wurden hier mit einer niedrigen Dosis IFN- γ (60 U/mL) stimuliert, damit

der synergistische Effekt von IL-1 β deutlicher zu erkennen ist. IFN- γ allein war in dieser Konzentration nicht ausreichend, um einen immunregulatorischen Effekt zu vermitteln. Erst durch die Zugabe von IL-1 β konnte die T-Zell-Proliferation signifikant auf ca. 40 % inhibiert werden. Die Zugabe von 1-L-MT bewirkte die Aufhebung des IFN- γ - und IL-1 β -vermittelten immunregulatorischen Effektes. Die Stärke der Proliferation der T-Zellen in dieser Experimentalgruppe entsprach der Positivkontrolle, in der die T-Zellen zu den nicht stimulierten Lungenzellen gegeben wurden.

3.1.3. Antimikrobielle Effektormechanismen in A549

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass A549 Zellen nach der Stimulation mit IFN- γ in der Lage sind, eineIDO-Aktivität zu zeigen und so das Wachstum von T-Zellen inhibieren können. In weiteren Experimenten sollte nun geklärt werden, ob diese IDO-Aktivität in den A549 Zellen auch ausreicht, um antimikrobielle Effekte zu vermitteln.

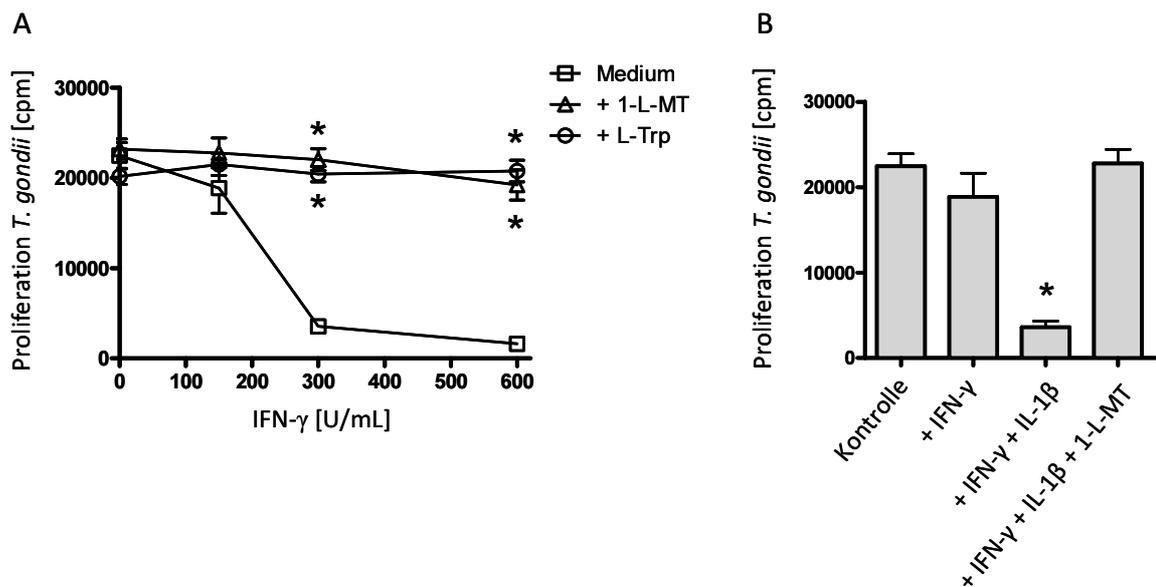


Abb. 3.4.: Aufhebung der IFN- γ induzierten Toxoplasmostase in A549 Zellen durch den IDO-Inhibitor 1-L-MT. **A)** A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Parasiten (2×10^4 /Vertiefung) hinzugefügt (mit bzw. ohne zusätzliches L-Tryptophan in einer Endkonzentration von 0.5 mM). Die Proliferation der Parasiten wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [3 H]-Uracil gemessen. Diese Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Signifikante Aufhebungen ($P < 0.01$) des antiparasitären Effektes durch 1-L-MT oder L-Tryptophan, bezogen auf den jeweiligen Ansatz, der nur mit IFN- γ behandelt wurde, wurden gekennzeichnet (*). **B)** A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit einer niedrigen Dosis IFN- γ (150 U/mL) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Parasiten (2×10^4 /Vertiefung) hinzugefügt. Die Proliferation der Parasiten wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [3 H]-Uracil gemessen. Als Positivkontrolle dienten Parasiten, die in unstimulierten Zellen proliferierten. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Die signifikante Hemmung ($P < 0.01$) des Parasitenwachstums, bezogen auf die Kontrolle, wurde gekennzeichnet (*).

Dazu wurden IFN- γ stimulierte Lungenzellen mit verschiedenen Pathogenen (Parasiten, Bakterien, Viren) infiziert, die beim Menschen Pneumonien hervorrufen können. Die Untersuchung des IFN- γ vermittelten antiparasitären Effektes in den Lungenzellen wurde in einem Modellsystem mit dem obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* durchgeführt (Abb. 3.4.). A549 Zellen wurden für 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert und anschließend mit *T. gondii* infiziert. Der Nachweis der Parasitenproliferation erfolgte durch die Messung des [3 H]-Uracil-Einbaus in die RNA des Parasiten.

Durch den Einsatz von 300 U/mL IFN- γ konnte eine deutliche Hemmung des Parasitenwachstums auf ca. 20 % des Ausgangswertes erzielt werden. Durch die Zugabe von L-Tryptophan oder des IDO-Inhibitors 1-L-MT wurde dieser antiparasitäre Effekt komplett aufgehoben. Um den synergistischen Effekt von IL-1 β verdeutlichen zu können, wurden die A549 Zellen in einem weiteren Experiment lediglich mit einer geringeren Dosis (150 U/mL) IFN- γ stimuliert. Die Stimulation mit IFN- γ allein reichte in diesem Fall nicht aus, einen IDO-vermittelten toxoplasmostatischen Effekt zu induzieren. Erst durch die Zugabe von IL-1 β konnte das Parasitenwachstum deutlich um ca. 85 % reduziert werden. Der IDO-Inhibitor 1-L-MT konnte diesen synergistischen Effekt ebenfalls komplett aufheben.

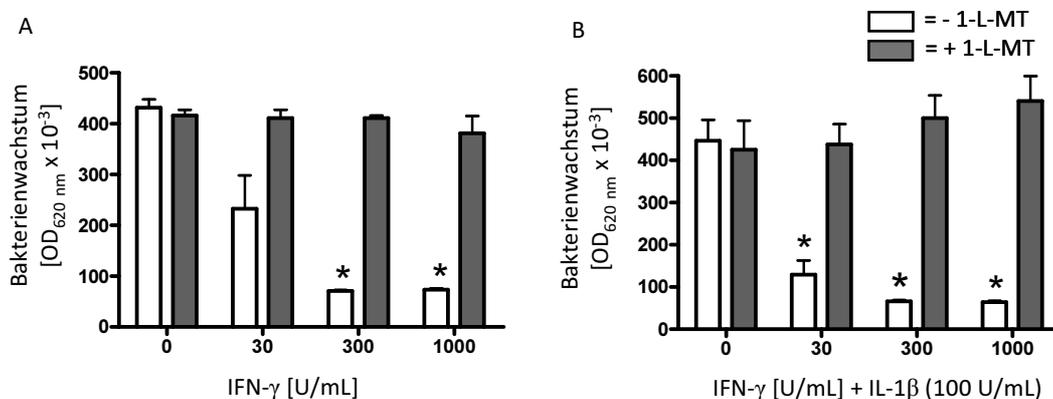


Abb. 3.5.: Aufhebung des IFN- γ induzierten bakteriostatischen Effektes durch 1-L-MT in A549 Zellen. A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ (A) bzw. IFN- γ + IL-1 β (B) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und das Bakterienwachstum nach weiteren 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ($P < 0.01$) durch IFN- γ -vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf die Werte bei unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (*).

Der Nachweis des IFN- γ vermittelten antibakteriellen Effektes erfolgte durch eine Infektion mit *Staphylococcus aureus*, einem häufigen Erreger von Lungenabzessen und nosokomialen

Pneumonien. Lungenzellen, die zuvor 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert wurden, wurden mit Bakterien infiziert. Das Wachstum von *Staphylococcus aureus* wurde nach 24 Stunden durch die Messung der optischen Dichte detektiert und ist in Abbildung 3.5. dargestellt. Durch die Stimulation der Lungenzellen mit IFN- γ konnte zwar schon bei einer Konzentration von 30 U/mL eine Reduktion des Bakterienwachstums erzielt werden, eine signifikante Hemmung erfolgte bei einer Stimulation mit einer Konzentration von 300 U/mL (Abb. 3.5.A). Durch die Zugabe von IL-1 β konnte der IFN- γ vermittelte antibakterielle Effekt verstärkt werden und das Bakterienwachstum war bereits bei einer IFN- γ Konzentration von 30 U/mL signifikant gehemmt (3.5.B). Durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT konnte der antibakterielle Effekt in beiden Experimenten stets komplett aufgehoben werden.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, welche Dosis des IDO-Inhibitors 1-L-MT nötig ist, um die IFN- γ induzierte Bakteriostase zu inhibieren. Dazu wurden die Zellen maximal (1000 U/mL) mit IFN- γ stimuliert, um einen kompletten Tryptophanabbau zu erzielen, der durch die gleichzeitige Anwesenheit von verschiedenen 1-L-MT Konzentrationen (0.1 bis 2.0 mM) aufgehoben werden sollte. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.6. dargestellt.

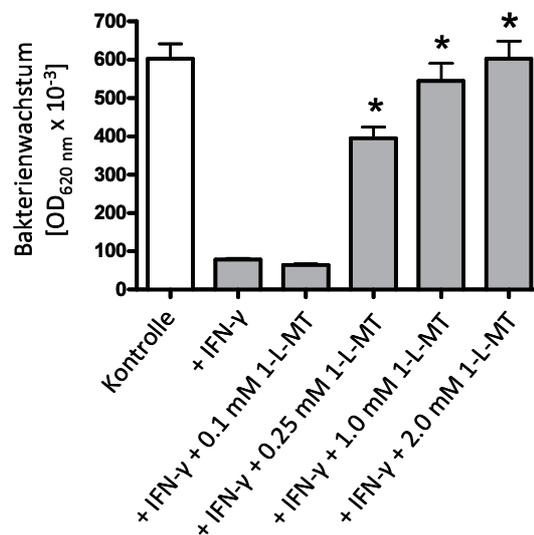


Abb. 3.6.: Aufhebung des IFN- γ -vermittelten antibakteriellen Effektes durch verschiedene 1-L-MT Konzentrationen in A549 Zellen. A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1-L-MT mit einer hohen Dosis IFN- γ (1000 U/mL) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. 1-L-MT Konzentrationen, die zu einer signifikanten Aufhebung ($P < 0.01$) des IFN- γ vermittelten antibakteriellen Effektes führten, wurden gekennzeichnet (*).

Die Anwesenheit von 0.1 mM 1-L-MT konnte die IFN- γ vermittelte Hemmung des Bakterienwachstums nicht aufheben, obwohl der IDO-Inhibitor (0.1 mM) in einer höheren Konzentration als das Substrat L-Tryptophan (0.08 mM) vorlag. Ab einer Konzentration von 0.25 mM 1-L-MT konnte die IFN- γ -vermittelte Hemmung des Bakterienwachstums signifikant inhibiert werden. Höhere Konzentrationen des Inhibitors im Bereich von 1.0 mM bis 2.0 mM führten zu einer vollständigen Aufhebung der IFN- γ -induzierten Bakteriostase. Nachdem nun die Fähigkeit von IDO-positiven A549 Zellen zur Kontrolle des Parasiten- und Bakterienwachstums nachgewiesen worden war, sollte in abschließenden Experimenten geklärt werden, ob auch antivirale Effekte durch die A549 Zellen vermittelt werden können. Als Pathogen wurde hierzu das Herpes simplex Virus Typ I gewählt (HSV), wobei bekannt ist, dass Menschen, die von einer Immunsuppression betroffen sind (z. B. HIV-Infizierte oder Patienten nach einer Organtransplantation), an einer disseminierten HSV-Pneumonie erkranken können.

Zur Analyse des antiviralen Effektes von A549 Zellen wurden diese für 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert und anschließend mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0.25 mit HSV infiziert. Die Replikation des Virus wurde nach 48 Stunden durch eine Real-time PCR detektiert.

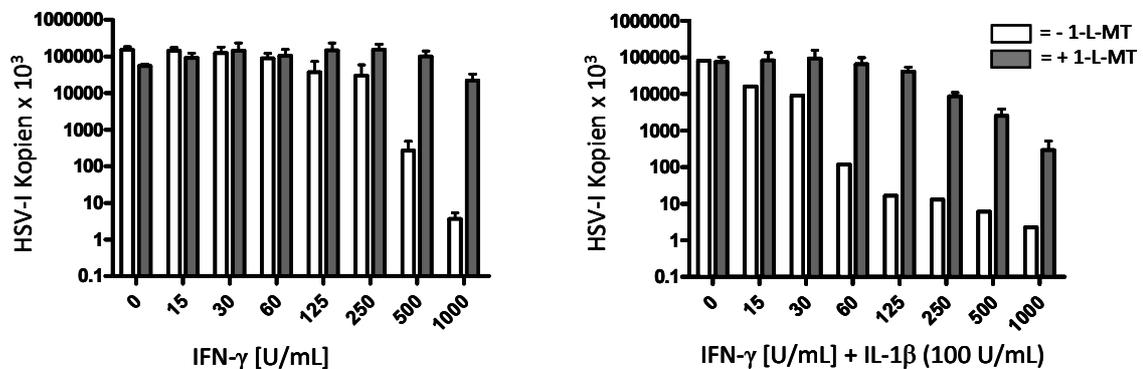


Abb. 3.7.: Vermittlung von antiviralen Effekten durch IFN- γ und IFN- γ /IL-1 β und deren Aufhebung durch 1-L-MT. A549 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ (A) bzw. IFN- γ /IL-1 β (B) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit HSV (MOI 0.25) infiziert und nach weiteren 48 Stunden die Virusreplikation mittels quantitativer real-time PCR detektiert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Verstärkung ($P < 0.01$) des IFN- γ -vermittelten antiviralen Effektes durch IL-1 β (bezogen auf die jeweilige IFN- γ -Konzentration ohne zusätzliches IL-1 β) konnte bei niedrigen IFN- γ Dosen (30 – 250 U/mL) verzeichnet werden.

Durch die Stimulation mit 1000 U/mL IFN- γ konnte die HSV-Replikation um das 20.000 fache gesenkt werden. Durch die Kostimulation mit IL-1 β konnte der antivirale Effekt im Bereich der niedrigen bis mittleren IFN- γ Dosen signifikant verstärkt werden (30 – 250

U/mL). Während z.B. die Stimulation mit 60 U/mL IFN- γ allein zu keinem antiviralen Effekt führte, konnte die gleichzeitige Anwesenheit von IL-1 β eine Reduktion der Viruslast um das 1000-fache verursachen. In allen Fällen konnte der, durch IFN- γ vermittelte, antivirale Effekt durch die Zugabe des IDO-Inhibitors 1-L-MT aufgehoben werden.

3.1.4. IFN- γ induzierter L-Tryptophan-Abbau in primären Lungenzellen

Die bisher gezeigten Daten wurden durch die Untersuchungen der IDO-Aktivität und deren Effekte in einem Modell mit Lungenkarzinomzellen erhalten. Um die Gültigkeit der mit den Tumorzellen erhobenen Befunde auch für native Lungenparenchymzellen zu zeigen, wurden im Folgenden primäre Lungenepithelzellen verwendet. Auch in diesen Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7) wurde zunächst die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität untersucht.

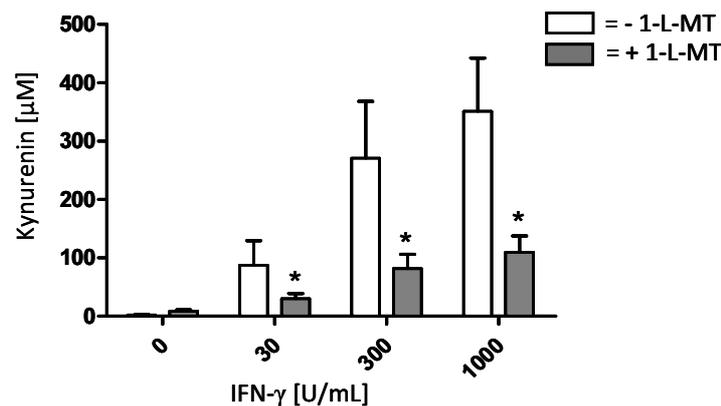


Abb. 3.8.: Induktion der IDO-Aktivität in primären Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7). Frisch geerntete HBE4-E6/E7 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (0.6 mM Tryptophan) mit IFN- γ stimuliert. 1-L-MT zu Stimulationsbeginn in einer Konzentration von 1.5 mM eingesetzt. Als Nachweis der IDO-Aktivität wurde anschließend die Kynureninkonzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Signifikante Inhibitionen ($P < 0.01$) durch 1-L-MT, bezogen auf die jeweilige IFN- γ -Konzentration ohne 1-L-MT, wurden gekennzeichnet (*).

Auch in den HBE4-E6/E7 Zellen wurde eine IDO-Aktivität nachgewiesen. 72 Stunden nach einer Stimulation mit 1000 U/mL IFN- γ konnte im Zellkulturüberstand eine Kynureninkonzentration von 350 μ M gemessen werden. Durch die Zugabe des IDO-Inhibitors 1-L-MT konnte die Kynurenin-Produktion signifikant inhibiert werden. Diese Daten bestätigen, dass auch primäre Lungenzellen eine IFN- γ -abhängige IDO-Aktivität besitzen.

3.1.5. Antibakterielle Effekte in primären Lungenzellen

Auch in den primären Lungenzellen wurden die antimikrobiellen IFN- γ -vermittelten Effekte untersucht. Dazu wurden die Zellen, die zuvor für 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert wurden, mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Nach 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch die Messung der optischen Dichte ermittelt (Abb. 3.9.). Auch hier zeigte sich deutlich, dass es IFN- γ -abhängig zu einer Inhibition des Bakterienwachstums kommt. Dieser Effekt war bei einer Konzentration von 300 U/mL signifikant und konnte durch höhere Dosen IFN- γ noch verstärkt werden. Durch die Zugabe des IDO-spezifischen Inhibitors 1-L-MT wurde die Inhibition des Bakterienwachstums in allen Fällen komplett aufgehoben.

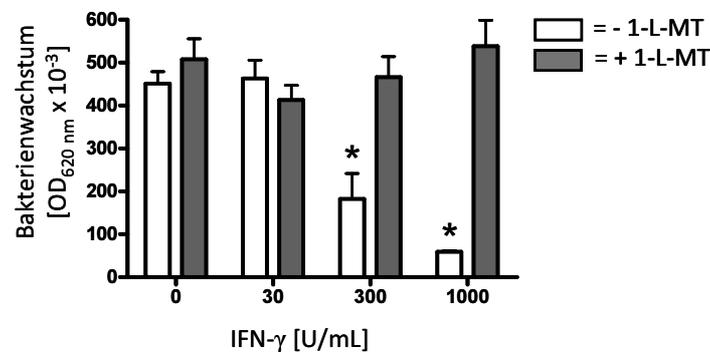


Abb. 3.9.: Aufhebung des IFN- γ -induzierten bakteriostatischen Effektes durch 1-L-MT in primären Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7). HBE4-E6/E7 Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ($P < 0.01$), durch IFN- γ -vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf die Werte bei unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (*).

3.2. IFN- γ unabhängige Expression der humanen Indolamin 2,3-Dioxygenase in HeLa T-RExTM Zellen

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass humane Lungenzellen nach geeigneter Stimulation in der Lage sind, IDO-Aktivität zu zeigen. Als Nachweis für den Einfluss der IDO-Funktion auf die beobachteten immunologischen und antimikrobiellen Effekte, wurden diese durch supplementiertes L-Tryptophan bzw. durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT aufgehoben. Da durch die Stimulation mit IFN- γ die Transkription von vielen Genen induziert wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die IDO-Aktivität durch die Transkription eines dieser Gene verstärkt wird. Alternativ ist es denkbar, dass einer der anderen bekannten IFN- γ -induzierbaren, antimikrobiellen Effektormechanismen, z.B. die Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase oder der GTPasen (Panaro *et al.*, 2001;

Degrandi *et al.*, 2007) Auswirkungen auf dieIDO-vermittelte Pathogenabwehr hat. Daher wird im Folgenden die Funktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase nach einer IFN- γ -unabhängigen Induktion untersucht. Dazu wurden HeLa T-RExTM Zellen verwendet, die konstitutiv durch das Plasmid pcDNATM6/TR Tetrazyklin-Repressor-Moleküle exprimieren. Diese Zellen wurden mit einem Plasmid, welches die komplette Sequenz der humanen Indolamin 2,3-Dioxygenase (h-IDO), exklusive des Stop-Kodons, beinhaltet, mittels Lipofectamin transfiziert (pcDNA4 *h-ido*). Als Ausgangsvektor dieses Konstruktes wurde pcDNATM4/TO/*myc*-His A (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet, der ein Tetrazyklin-Repressor-Operator beinhaltet. Durch Bereiche im Ausgangsvektor wurde *h-ido* die Sequenz für einen *myc*-tag angefügt, die sich anschließend im C-terminalen Bereich von h-IDO befand.

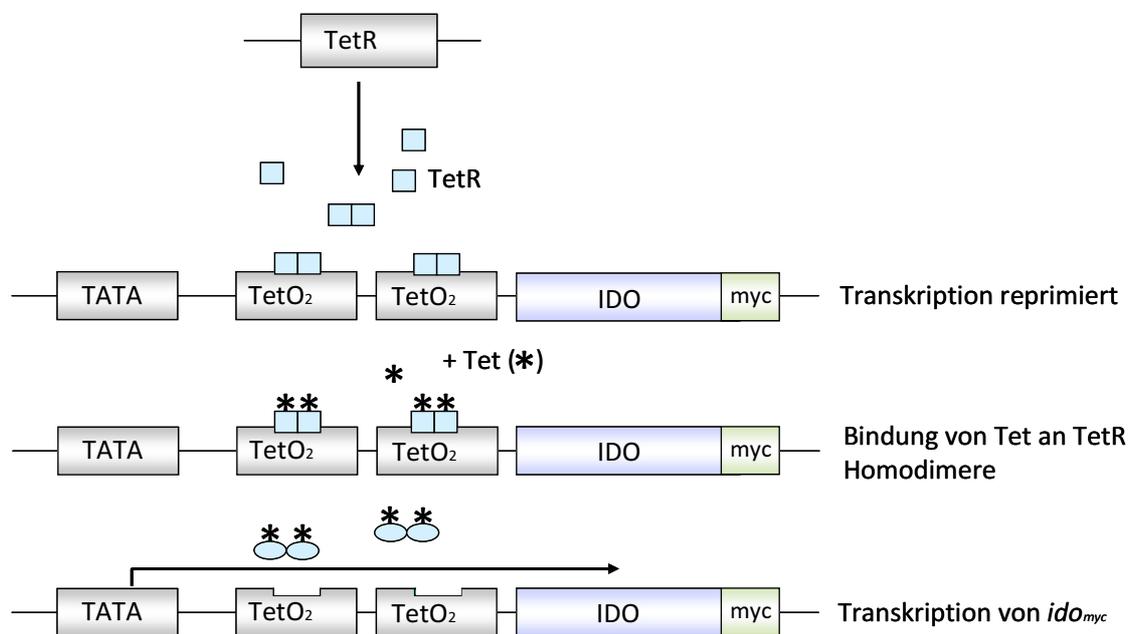


Abb. 3.10.: IFN- γ unabhängige, durch Tetrazyklin induzierte, h-IDO_{myc}-Expression in HeLa T-RExTM Zellen. HeLa T-RExTM Zellen, die konstitutiv Tetrazyklin-Repressor-Moleküle (TetR) exprimieren, wurden mit pcDNA4 *h-ido* transfiziert (HeLa T-REx h-IDO). In Abwesenheit von Tetrazyklin (Tet) wird die Transkription von *h-ido_{myc}* durch die Anlagerung von Tetrazyklin-Repressor-Dimeren an die Operatorsequenz (TetO₂) im Promotor unterbunden. Nach Zugabe bindet Tetrazyklin an die Tetrazyklin-Repressor-Dimere, die so eine Konformationsänderung erfahren und nicht mehr an die Operatorsequenz binden können. Der Tetrazyklin-Repressor/Tetrazyklin-Komplex löst sich so vom Operator und ermöglicht die Transkription von *ido_{myc}*. TATA = TATA-Box.

Wie in Abbildung 3.10. schematisch dargestellt, wurde durch die Zugabe von Tetrazyklin und die dadurch resultierende Konformationsänderung der Tetrazyklin-Repressor-Moleküle die Inhibition der *h-ido*-Transkription aufgehoben und h-IDO_{myc} exprimiert. Die klonierten HeLa T-REx h-IDO Zellen wurden zunächst in einer Immunfluoreszenzanalyse auf die Tetrazyklin-induzierte h-IDO_{myc}-Expression überprüft. Dafür wurden die Zellen 72 Stunden

auf Deckgläschen in 12-well Mikrotiterplatten inkubiert und für 72 Stunden mit Tetrazyklin stimuliert.

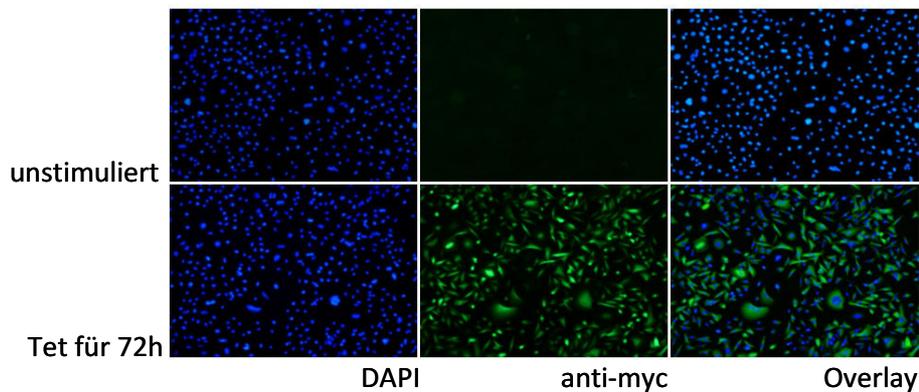


Abb. 3.11.: Immunfluoreszenzanalyse der h-IDO_{myc}-Expression in unstimulierten und Tetrazyklin-stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit Tetrazyklin (0.1 µg/mL) inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Anfärbung von DNA im Zellkern ist in der linken Spalte durch die Interkalation von DAPI zu erkennen. Die mittlere Spalte zeigt die Expression von h-IDO_{myc} durch den Nachweis des myc-tags durch einen anti-myc-Antikörper und anschließender Färbung mit cy³-markiertem Sekundärantikörper. Die rechte Spalte zeigt den Overlay der beiden Färbungen.

Nach Färbung der Zellen, die auf den Deckgläschen durch Paraformaldehyd fixiert waren, wurden diese mit Fluoramount G auf Objektträger befestigt und mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.11. dargestellt. Während die Zellkerne in beiden Ansätzen gleichmäßig durch DAPI angefärbt waren, ließ sich in den unstimulierten Zellen keine myc-Immunoreaktivität nachweisen.

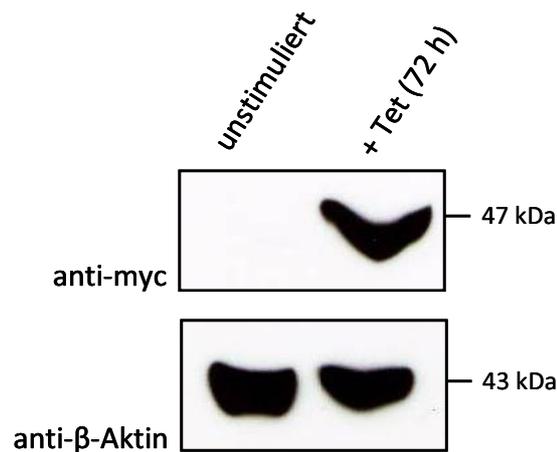


Abb. 3.12.: Western Blot-Analyse von unstimulierten und Tetrazyklin stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen. 1×10^6 Zellen wurden 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von Tetrazyklin (0.1 µg/mL) inkubiert. Die Zelllysate wurden in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Expression des h-IDO_{myc} Proteins über eine Western Blot-Analyse detektiert. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von β-Aktin.

Nach einer 72- stündigen Tetrazyklin-Stimulation konnte ein deutliches anti-myc Signal detektiert werden. Um das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse zu bestätigen, wurden Lysate von Tetrazyklin-stimulierten Zellen mittels eines Western-Blots analysiert (Abb. 3.12.). Hier konnte nur durch die Stimulation von Tetrazyklin eine deutliche Bande auf der Höhe von h-IDO_{myc} (47 kDa) detektiert werden. Unstimulierte Zellen lieferten kein myc-Signal. Die Detektion von β -Aktin konnte den Einsatz einer ungefähr gleichen Proteinmenge in beiden Proben nachweisen.

3.2.1. Tryptophan-Abbau nach IFN- γ unabhängiger IDO-Aktivierung

In den folgenden Experimenten wurde die h-IDO_{myc}-Enzymaktivität in HeLa T-REx h-IDO untersucht.

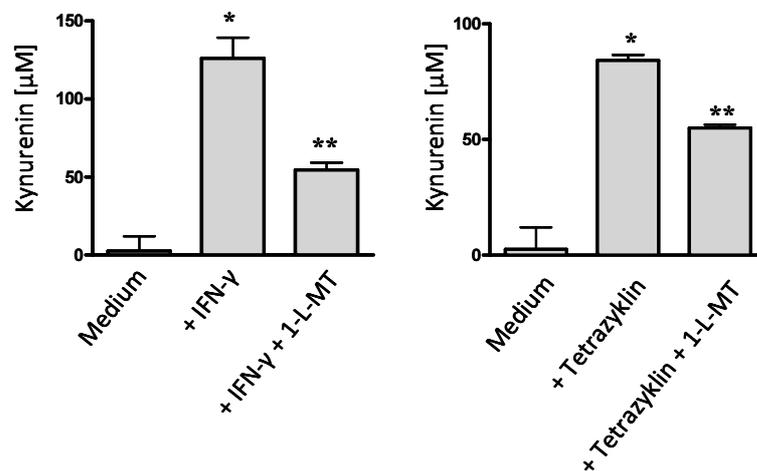


Abb. 3.13.: IDO-Aktivität in IFN- γ oder Tetrazyklin stimulierten HeLa T-REx h-IDO Zellen. Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (0.6 mM Tryptophan) in An- bzw. Abwesenheit von 1-L-MT (1.5 mM) mit IFN- γ (500 U/mL) oder Tetrazyklin (0.1 μ g/mL) stimuliert. Anschließend wurde der Kynureningehalt im Zellkulturüberstand gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Die signifikante Produktion von Kynurenin durch IFN- γ oder Tetrazyklin wurde gekennzeichnet (*), ebenso die signifikante Inhibition ($p > 0.01$) der IDO-Aktivität durch 1-L-MT bezogen auf die mit IFN- γ oder Tetrazyklin induzierten Ansätze (**).

Dazu wurden HeLa T-REx h-IDO Zellen in Tryptophan-supplementiertem Medium (0.6 mM) mit Tetrazyklin und zum Vergleich auch mit IFN- γ stimuliert. Die Messungen der Kynurenin-Produktion sind in Abbildung 3.13. dargestellt. In beiden Ansätzen wurde die IDO-Aktivität durch die Detektion von Kynurenin nachgewiesen. Nach IFN- γ -Stimulation (500 U/mL) wurden nach 72 Stunden eine Kynureninkonzentration von 125 μ M im Überstand detektiert. Nach der h-IDO_{myc}-Induktion durch Tetrazyklin-Stimulation (0.1 μ g/mL) wurde eine quantitativ vergleichbare Menge an Kynurenin (80 μ M) gebildet. Der

Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT führte in beiden Ansätzen zu einer deutlichen Hemmung der Kynurenin-Produktion.

3.2.2. Induktion antibakterieller Effekte durch eine IFN- γ unabhängig induzierte IDO-Aktivität

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass es durch die Tetrazyklin-induzierte h-IDO_{myc}-Aktivität in HeLa T-REx-h-IDO Zellen zu einem L-Tryptophan-Abbau kommt. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die HeLa T-REx h-IDO Zellen nach IFN- γ unabhängiger IDO-Induktion auch antibakterielle Effekte vermitteln können.

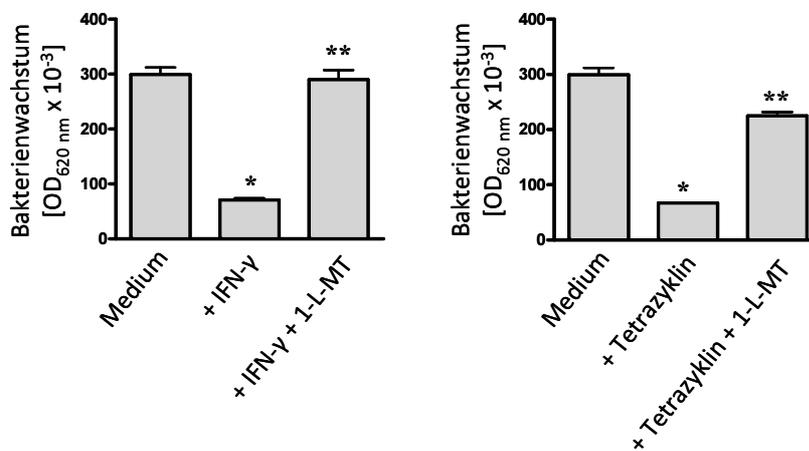


Abb. 3.14.: Antibakterielle Effekte IFN- γ - oder Tetrazyklin-stimulierter HeLa T-REx h-IDO Zellen. HeLa T-REx h-IDO Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden in An- bzw. Abwesenheit von 1-L-MT (1.5 mM) mit IFN- γ (500 U/mL) oder Tetrazyklin (0.1 μ g/mL) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Die signifikante Inhibition des Bakterienwachstums durch IFN- γ oder Tetrazyklin wurde gekennzeichnet (*), ebenso die signifikante Aufhebung ($p > 0.01$) der antibakteriellen Effekte durch 1-L-MT bezogen auf die mit IFN- γ oder Tetrazyklin induzierten Ansätze (**).

Dazu wurden HeLa T-REx h-IDO Zellen nach 72-stündiger Stimulation durch IFN- γ oder Tetrazyklin mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.14. dargestellt. Man erkennt deutlich, dass IFN- γ -stimulierte und Tetrazyklin-stimulierte HeLa T-REx h-IDO Zellen gleichermaßen in der Lage sind, das Wachstum von Bakterien zu inhibieren. Als Kontrolle wurde auch in diesen Ansätzen der IDO-Inhibitor 1-L-MT eingesetzt, der in beiden Fällen zu einer deutlichen Aufhebung des antibakteriellen Effektes führte.

3.3. IDO-2 als weiteres L-Tryptophan abbauendes Enzym

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass die enzymatische Aktivität der IDO, unabhängig von der Aktivierung weiterer IFN- γ -abhängiger Gene, antimikrobielle Effekte vermitteln kann.

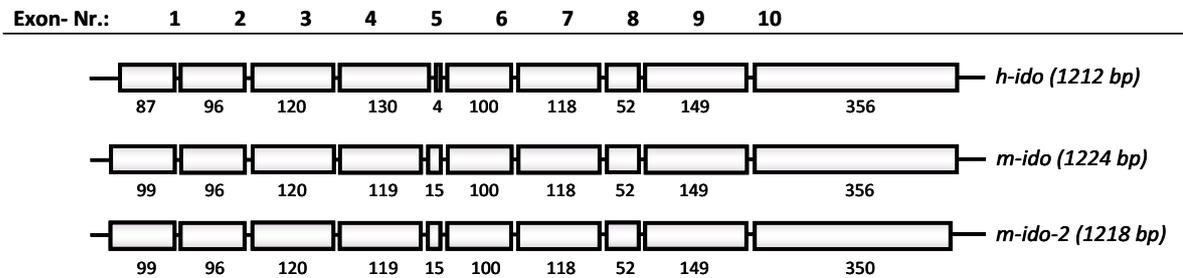


Abb. 3.15.: Exon-Intron-Struktur von *h-ido*, *m-ido* und *m-ido-2*. *h-ido* = humane Indolamin 2,3-Dioxygenase, *m-ido* = murine Indolamin 2,3-Dioxygenase, *m-ido-2* murine Indolamin 2,3-Dioxygenase 2.

Es war daher interessant, ob andere Enzyme, die ebenfalls L-Tryptophan zu Kynurenin abbauen, ähnliche antimikrobielle Effekte vermitteln können. Im Genom vieler Eukaryonten ist in 3'-Richtung hinter der Sequenz für die Indolamin 2,3-Dioxygenase eine weitere Sequenz lokalisiert, die dieser sehr ähnelt und daher Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) genannt wurde.

In Abbildung 3.15. wurden die Exon-Intron-Strukturen der humanen und der murinen Indolamin 2,3-Dioxygenase sowie der murinen Indolamin 2,3-Dioxygenase 2 miteinander verglichen. Auf die Darstellung der humanen Indolamin 2,3-Dioxygenase 2 wurde hier verzichtet, da bis heute die Expression dieses Enzymes *in vivo* unklar ist. In dem Vergleich der in Abb. 3.15. dargestellten Strukturen konnte eine große Übereinstimmung festgestellt werden, lediglich in den Exons 1, 4, 5 und 10 waren Unterschiede in der Länge zu verzeichnen. Ein Aminosäurenabgleich von m-IDO mit 407 Aminosäuren und m-IDO-2 mit 405 Aminosäuren, dargestellt in Abbildung 3.16., ergab einen Anteil von 46 % identischer Aminosäuren. In dieser Abbildung wurde zudem die Häm-Domäne, die für die Bindung der prosthetischen Gruppe Häm durch sein Porphyrin essentiell ist, gekennzeichnet. Der Vergleich mit der Konsensus-Sequenz für Häm-Domänen ergab im Fall von m-IDO-2 an Position 3 und 4 der Konsensus-Sequenz einen Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung. Dabei wurden Asparaginsäure bzw. Glutamin an Position 3 durch Histidin, sowie Asparaginsäure bzw. Glutaminsäure durch Arginin ersetzt. Histidin und Arginin ähneln allerdings den Aminosäuren der beschriebenen Konsensus-Sequenz (Vergleich durch das

Programm clustalw). Der Häm-Ligand Histidin an Position 13 ist in allen drei Proteinen konserviert.

```

m-IDO      MALSKISSPTEGSRRILEDHHIDEDVGFALPHPLVELPDAYSPWVLVARNLPVLIENGQLR
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    MEPQSQSMTLEVPLSLGRYHTSEEYGFLLPNPLEALPDHYKPWMEIALRLPHLIENRQLR
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      EEVEKLPTLSTDGLRGHRLQRLAHLALGYITMAYVWNRGDDDVRKVLPRNIAVPYCELSE
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    AHVYRMFLLDCRFLKSYREQRLAHMALAAITMGFVWQEGEGQPKVLPRSLAIPFVEVSR
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      KLGLPPILSYADCVLANWKKDPNGMTYENMDILFSFPGGDCDKGFFLVSLVEIAASP
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    NLGLPPILVHSDLVLTNWTKRNEGPLEISNLETIISFPGGESLRGFILVTVLVEKAAVP
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      AIKAIPTVSSAVERQDLKALEKALHDIATSLEKAKEIFKRMRDFVDPDTFFHVLRIYLSG
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    GLKALVQGMEAIRQHSQDTLLEALQQLRLSIQDITRALAQMHDYVDPDIFYSVIRIFLSG
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      WKCSSKLPEGLLYEGVWDTPKMFSGGSAGOSSIFQSLDVLLGIKHEAGKESPAEFLQEMR
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    WKDNPAMPEVGLVYEGAATEPLKYSGGSAAQSSVLHAFDEFLGIEHC--KES-VGFLHRMR
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      EYMPPAHRNFLFFESAPPVREFVISRHNEDLTKAYNECVNGLVSVRKFHLAIVDTYIMK
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    DYMPPSHKAFEDLHVAPSLRDYILASGPGDCLMAYNQCVEALGELRSYHINVARYIIS
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO      PSKKKPTDGDKSEEPSNVESRGTGGTNPMTFLRSVKDTTEKALLSWP-
           :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
m-IDO-2    AATRARSRGLTNPSEHALEDRGTGGTAMLSFLKSVREKTMEALLCPGA
           :   :   :   :   :   :   :

```

Abb. 3.16.: Aminosäureabgleich zwischen m-IDO und m-IDO-2. m-IDO besteht aus 407, m-IDO-2 aus 405 Aminosäuren. Grau hinterlegt wurden identische Aminosäuren, zusätzlich wurde die Häm-Domäne unterstrichen.

[FY]-L-[DQ]-[DE]-[LIVM]-x-x-Y-M-x-x-x-H-[KR]

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Humane IDO	F	L	Q	D	M	R	R	Y	M	P	P	A	H	R
Murine IDO	F	L	Q	E	M	R	E	Y	M	P	P	A	H	R
Murine IDO-2	F	L	H	R	M	R	D	Y	M	P	P	S	H	K

Abb. 3.17.: Konsensus-Sequenz der Häm-Domäne und deren Abgleich mit der humanen IDO, der murinen IDO und der murinen IDO-2. Die rot dargestellten Aminosäuren stimmen nicht mit der Konsensus-Sequenz überein. Das grün dargestellte Histidin stellt den Häm-Liganden dar.

3.3.1. Klonierung m-IDO-2 überexprimierender Zellen

Da der physiologische Induktor der IDO-2 noch unbekannt ist, war es für die Untersuchungen der enzymatischen Aktivität von IDO-2 notwendig, Zellen herzustellen, die

IDO-2 rekombinant exprimieren. Dazu wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293T) transient mittels Calcium-Phosphat mit dem Plasmid pcDNA4 *m-ido-2* und zum Vergleich mit dem Plasmid pcDNA4 *m-ido* transfiziert. Beide Plasmide enthielten jeweils die gesamte *m-ido* bzw. *m-ido-2* Sequenz, versehen mit einem C-terminalen myc-tag. Die Expression von m-IDO und m-IDO-2 erfolgte in diesem Fall konstitutiv. Für die Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in 12-well Mikrotiterplatten umgesetzt und nach weiteren 24 Stunden auf die Expression von m-IDO_{myc} und m-IDO-2_{myc} hin untersucht. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzanalyse ist in Abbildung 3.18. dargestellt.

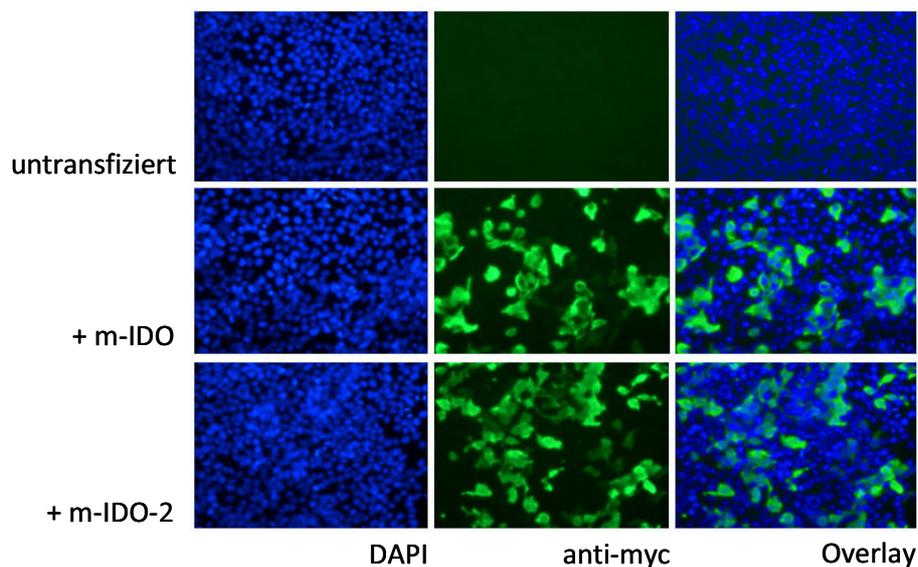


Abb. 3.18.: Immunfluoreszenzanalyse der pcDNA4 *m-ido* oder pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten HEK 293T Zellen. 48 Stunden nach Transfektion von 1×10^6 HEK 293T Zellen wurde die Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten untransfizierte HEK 293T-Zellen. Die Anfärbung von DNA im Zellkern ist in der linken Spalte durch die Interkalation von DAPI zu erkennen. Die mittlere Spalte zeigt die Expression von m-IDO_{myc} bzw. m-IDO-2_{myc} durch den Nachweis des myc-tags mittels eines anti-myc-Antikörper und anschließender Färbung mit einem cy^2 -markiertem Sekundärantikörper. Die rechte Spalte zeigt den Overlay der beiden Färbungen.

Durch die Färbung mit dem anti-myc Antikörper konnte in der Kontrolle, die mit untransfizierten Zellen durchgeführt wurde kein Signal detektiert werden. Die Färbung der pcDNA4 *m-ido* und pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten Zellen zeigt eine in etwa gleichstarke Expression der beiden Proteine. Zusätzlich wurde die Expression der beiden Proteine durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Dazu wurden Zelllysate von untransfizierten, pcDNA4 *m-ido* und pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten Zellen hergestellt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. In untransfizierten Zellen konnte kein myc-Signal nachgewiesen werden, während m-IDO_{myc} und m-IDO-2_{myc} auf einer Höhe von 47 bzw. 45 kDa eindeutig detektiert werden konnten (Abb. 3.19.).

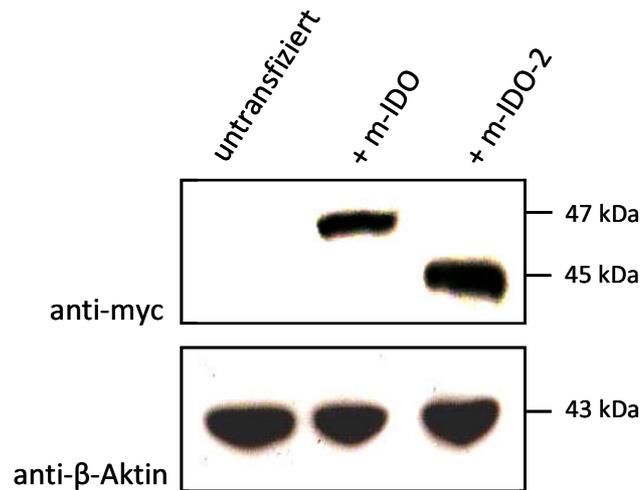


Abb. 3.19.: Western Blot-Analyse der pcDNA4 *m-ido* oder pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten HEK 293T Zellen. 48 Stunden nach Transfektion der 1×10^6 Zellen wurden diese geerntet und deren Lysate in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Über eine Western Blot-Analyse wurden die Expressionen des $m\text{-IDO}_{\text{myc}}$ und $m\text{-IDO-2}_{\text{myc}}$ Proteins durch einen anti-myc-Antikörper und einen Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin, welches durch einen anti- β -aktin-Antikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

Durch die quantitativ vergleichbare Detektion von β -Actin in allen drei Ansätzen, konnte der Einsatz einer ungefähr gleichen Proteinmenge in allen drei Proben bestätigt werden.

3.3.2. Tryptophanabbau in IDO-2 überexprimierenden Zellen

Um den $m\text{-IDO}$ - bzw. $m\text{-IDO-2}$ -vermittelten L-Tryptophanabbau, sowie die Bildung von Kynurenin in den transfizierten HEK 293T Zellen gleichzeitig messen zu können, wurden die Zellkulturüberstände mittels HPLC analysiert.

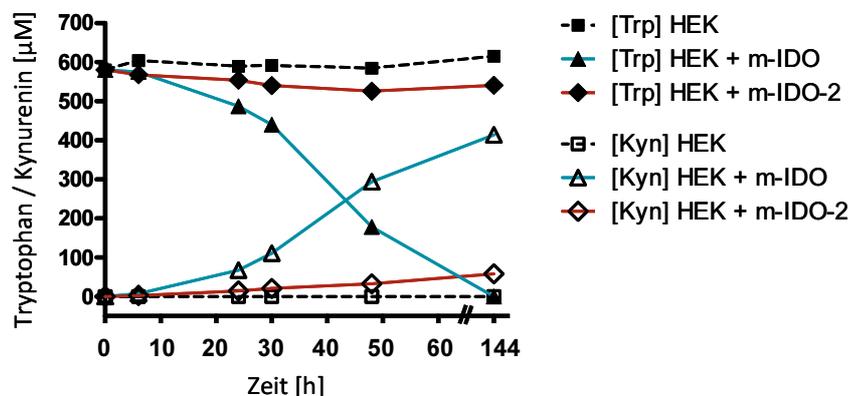


Abb. 3.20.: Kinetik des Tryptophanabbaus durch pcDNA4 *m-ido* (HEK + m-IDO) oder pcDNA4 *m-ido-2* (HEK + m-IDO-2) transfizierte HEK 293T Zellen. 24 Stunden nach Transfektion wurden die HEK 293T Zellen (1×10^6) in 10 mL Medium mit 0.6 mM L-Tryptophan überführt und der L-Tryptophan- und Kynureningehalt des Überstandes mittels HPLC-Messung über einen Zeitraum von 144 Stunden verfolgt. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK 293T Zellen (HEK). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) der ermittelten Konzentrationen aus zwei verschiedenen Experimenten angegeben.

Dazu wurden die Zellen 24 Stunden nach Transfektion in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (0.6 mM) für 144 Stunden inkubiert und zwischenzeitlich Proben der Überstände entnommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.20. dargestellt. Während untransfizierte HEK 293T Zellen erwartungsgemäß kein L-Tryptophan abbauten, war im Fall der m-IDO-exprimierenden Zellen nach 144 Stunden kein L-Tryptophan im Zellkulturüberstand mehr nachweisbar. Die mit pcDNA4 *m-ido-2* transfizierte Zellen erniedrigten die L-Tryptophankonzentration in der gleichen Zeit lediglich um ca. 50 μ M. Gleichzeitig erhöhte sich die Kynureninkonzentration im Zellkulturüberstand der pcDNA4 *m-ido* transfizierten Zellen auf ca. 400 μ M, während die Kynureninkonzentration der m-IDO-2 exprimierenden Zellen nur um 50 μ M anstieg.

3.3.3. IDO-2 überexprimierende Zellen: Substratverwertung und Enzyminhibition

Um zu klären, welche Substrate m-IDO-2 erkennt und abbaut, wurden m-IDO-2 exprimierende HEK 293T Zellen 24 Stunden nach ihrer Transfektion in Anwesenheit von L-Tryptophan oder seiner Derivaten für 144 Stunden inkubiert.

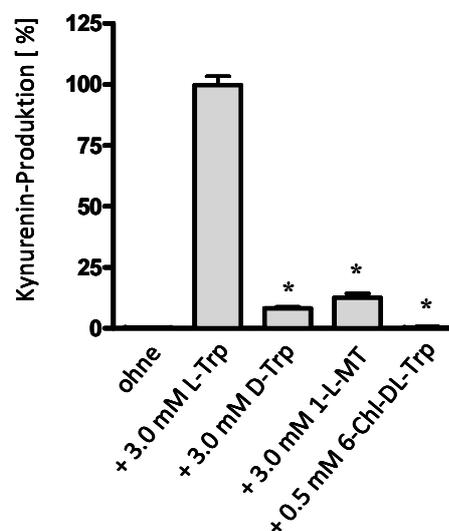


Abb. 3.21.: Unterschiedliche Substratumsetzung durch m-IDO-2-Aktivität. 1×10^6 HEK 293T Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit pcDNA4 *m-ido-2* in L-Tryptophan freies Medium gegeben, das mit verschiedenen Substraten supplementiert wurde (in einer Konzentration von 3.0 mM, bei 6-Chloro-DL-Tryptophan wurden aufgrund seiner Toxizität in höheren Dosen eine Konzentration von 0.5 mM gewählt). Nach 144 Stunden wurde die Kynurenin-Produktion photometrisch bestimmt. Die Kynureninkonzentration in dem mit L-Tryptophan supplementierten Zellkulturüberstand diente als Positivkontrolle (=100 %). Als Negativkontrolle dienten transfizierte Zellen, die in Abwesenheit von L-Tryptophan und seinen Derivaten kultiviert wurden. Die Daten wurden als normalisierte Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikant geringere Substratverwertung als in der Positivkontrolle ($P < 0.01$) wurde gekennzeichnet (*). L-Trp = L-Tryptophan, D-Trp = D-Tryptophan, 1-L-MT = 1-L-Methyl-Tryptophan, 6-Chl-DL-Trp = 6-Chloro-DL-Tryptophan

Abbildung 3.21. zeigt deutlich, dass L-Tryptophan (L-Trp) als bevorzugtes Substrat zu Kynurenin verstoffwechselt wurde. Während in dem mit 6-Chloro-DL-Tryptophan supplementierten Kulturüberstand kein Kynurenin detektiert wurde, waren in den Kulturüberständen, die mit D-Tryptophan (D-Trp) bzw. 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) supplementiert wurden, geringe Konzentrationen von Kynurenin detektierbar. Um festzustellen, ob sich die m-IDO-2-Aktivität durch bekannte Inhibitoren der IDO beeinflussen lässt, wurden pcDNA4 *m-ido-2* transfizierte Zellen in Anwesenheit von L-Tryptophan als Substrat mit verschiedenen IDO-Inhibitoren für 144 Stunden inkubiert (Abb. 3.22).

Es zeigte sich, dass die IDO-Inhibitoren 1-L-MT und 6-Chloro-DL-Tryptophan die enzymatische Aktivität der m-IDO-2 signifikant hemmen, die Kynurenin-Produktion in den Ansätzen wurde um 60 bzw. 65 % reduziert. Der IDO-Inhibitor 1-D-MT konnte dahingegen die m-IDO-2-Aktivität nicht signifikant hemmen.

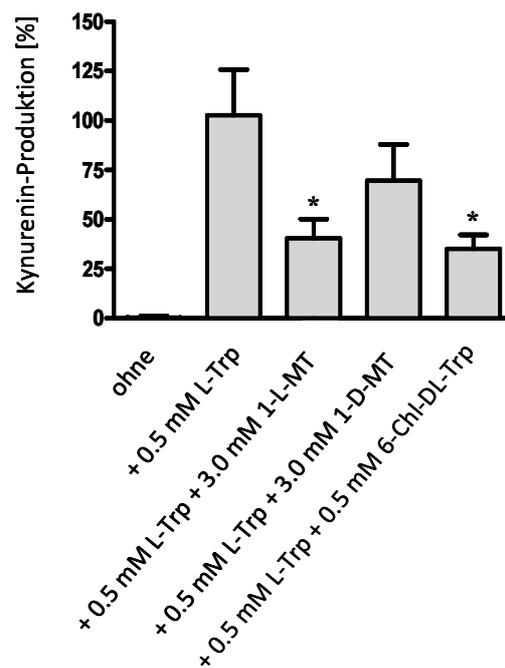


Abb. 3.22.: Beeinflussung der m-IDO-2-Aktivität durch IDO-Inhibitoren. 1×10^6 HEK 293T Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit pcDNA4 *m-ido-2* in L-Tryptophan-freies Medium gegeben, das mit 0.5 mM L-Tryptophan als Substrat und verschiedenen putativen Inhibitoren (3.0 mM bei 1-L-MT und 1-D-MT, bzw. 0.5 mM bei 6-Chloro-DL-Tryptophan) supplementiert wurde. Nach 144 Stunden wurde die Kynurenin-Produktion photometrisch ermittelt. Die Kynurenin-Produktion der Zellen, die mit 0.5 mM L-Tryptophan kultiviert wurden, diente als Positivkontrolle (=100 %). Als Negativkontrolle dienten transfizierte Zellen, die in Abwesenheit von L-Tryptophan und seinen Derivaten kultiviert wurden. Die Daten wurden als normalisierte Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ($P < 0.01$) der IDO-2-Aktivität, bezogen auf den Ansatz mit 0.5 mM L-Tryptophan, wurde gekennzeichnet (*).
L-Trp = L-Tryptophan, 1-L-MT = 1-L-Methyl-Tryptophan, 1-D-MT = 1-D-Methyl-Tryptophan, 6-Chl-DL-Trp = 6-Chloro-DL-Tryptophan.

3.3.4. Antimikrobielle Funktion von IDO-2

Die bisher gezeigten Daten belegen, dass die m-IDO-2 in der Lage ist, L-Tryptophan zu Kynurenin abzubauen. Dies erfolgt jedoch, im Vergleich zur m-IDO, mit einer geringen Effizienz. Um zu analysieren, ob durch die IDO-2 eine Reduktion der L-Tryptophankonzentration erreicht werden kann, die ausreicht, um antibakterielle Effekte zu vermitteln, wurde das Kultursystem optimiert, um auch einen relativ geringen Tryptophanabbau erkennbar zu machen. Dazu wurde die Anzahl der Zellen im Kulturansatz erhöht und die initial vorhandene Tryptophanmenge reduziert. 1×10^6 mit pcDNA4 *m-ido-2* transfizierte HEK 293T Zellen wurden in 4 mL RPMI 1640 Medium (mit einem L-Tryptophangehalt von 25 μM) für 144 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Als Positivkontrolle wurde der Überstand von nicht transfizierten HEK-Zellen verwendet. Abb. 3.23. zeigt eindeutig, dass die pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten Zellen unter diesen Bedingungen in der Lage sind, die Tryptophankonzentration soweit zu erniedrigen, dass das Bakterienwachstum gehemmt wird. Durch die Zugabe von L-Tryptophan konnte dieser antibakterielle Effekt wieder aufgehoben werden.

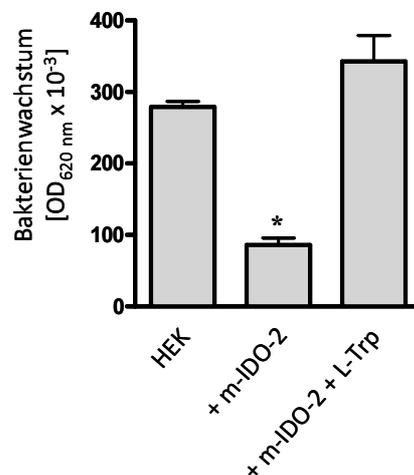


Abb. 3.23.: Antibakterielle Effekte von pcDNA4 *ido2m* transfizierten HEK 293T Zellen. 1×10^6 HEK 293T Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit pcDNA4 *m-ido-2* in 4 mL RPMI (25 μM L-Tryptophan) inkubiert. Nach 144 Stunden wurden 180 μL des Kulturüberstandes mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt (+ m-IDO-2). Als Kontrolle diente die Infektion des Kulturüberstandes untransfizierter HEK 293T Zellen (HEK) sowie der L-Tryptophan-supplementierte (0.6 mM Endkonzentration) Überstand der pcDNA4 *m-ido-2* transfizierten HEK 293T Zellen (+ m-IDO-2 + L-Trp). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition des Bakterienwachstums, bezogen auf die Kontrolle mit untransfizierten Zellen, wurde gekennzeichnet (*).

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass die m-IDO-2 eine enzymatische Aktivität zeigt und ihre Substratspezifität der der m-IDO ähnelt. Im Vergleich zur m-IDO ist diese enzymatische Aktivität jedoch wesentlich geringer. Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass diesem Enzym *in vivo* eine große antimikrobielle Bedeutung zukommt.

3.4. Beeinflussung der IDO-Aktivität durch humanes Cytomegalievirus

In den bisher gezeigten *in vitro* Experimenten wurden Zellen in verschiedenen Experimentalansätzen jeweils vor der Infektion mit den unterschiedlichen Erregern mit Zytokinen vorinkubiert. Dies entspricht der Situation, die man *in vivo* bei einer bereits fortgeschrittenen Infektion findet. Zu Beginn einer Infektion treffen die Pathogene jedoch nicht auf bereits voraktivierte Zellen, sondern die Aktivierung der Wirtszellen erfolgt, während die ersten Zytokine gerade produziert werden. Im letzten Teil dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob eine bestehende Infektion die Ausprägung des antimikrobiellen Effektes beeinflusst. Als Modellsystem wurde die Infektion von Fibroblasten mit dem humanen Cytomegalievirus gewählt, da hCMV ist in der Lage ist, wie bereits in anderen Kultursystemen beschrieben, die IFN- γ Antwort zu beeinflussen.

In einem ersten Schritt sollte überprüft werden, ob humane Fibroblasten das Wachstum von hCMV IDO-abhängig kontrollieren können.

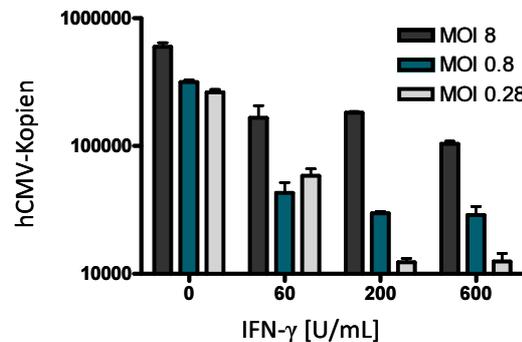


Abb. 3.24.: IFN- γ -vermittelter antiviraler Effekt gegen hCMV in HFF-Zellen. HFF-Zellen (3×10^4 /Vertiefung) wurden mit IFN- γ stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit hCMV infiziert und nach weiteren 48 Stunden die Virusreplikation mittels quantitativer Real-time PCR detektiert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten angegeben. Ab einer IFN- γ Konzentration von 200 U/mL war der Unterschied der Virusreplikation in den einzelnen Infektionsdosen, bezogen auf den unstimulierten Ansatz, signifikant ($P < 0.01$).

Dazu wurden HFF-Zellen für 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert und anschließend mit verschiedenen hCMV Konzentrationen infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die Virusreplikation mittels Real-time PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.24. dargestellt. Bei einer hohen Infektionsdosis (MOI von 8) wurde die Replikation des Virus

kaum durch die IFN- γ -vermittelte IDO-Aktivität (Abb. 3.24.) beeinflusst. Wurde die MOI jedoch auf 0.8 oder 0.28 reduziert, konnte eine Hemmung der Virusreplikation in Abhängigkeit von der IFN- γ -Konzentration verzeichnet werden. Bei einer IFN- γ -Konzentration von 600 U/mL war die Menge der detektierten Viruskopien im Falle einer Infektion mit einer MOI von 0.28 zweihundertfach geringer als ohne Stimulation. Somit ist, durch die IFN- γ vermittelte Aktivierung der Indolamin 2,3-Dioxygenase, eine Inhibition der Virusreplikation möglich, wenn die initiale Viruslast nicht allzu hoch ist.

Die von der Infektionsdosis abhängige, unterschiedliche Effizienz des IFN- γ induzierten antiviralen Effektes ist überraschend, da z.B. die antibakteriellen Effekte völlig unabhängig von der Infektionsdosis sind. Als Erklärung bietet sich an, dass der IFN- γ induzierte antivirale Effekt durch eine hohe Virusmenge blockiert wird. Da bekannt ist, das hCMV mit dem IFN- γ Signalweg interferiert, sollte in folgenden Experimenten geklärt werden, welchen Einfluss eine hCMV-Infektion auf die IFN- γ -vermittelte IDO-Aktivität und zusätzlich auf die IDO-abhängige Pathogenabwehr hat.

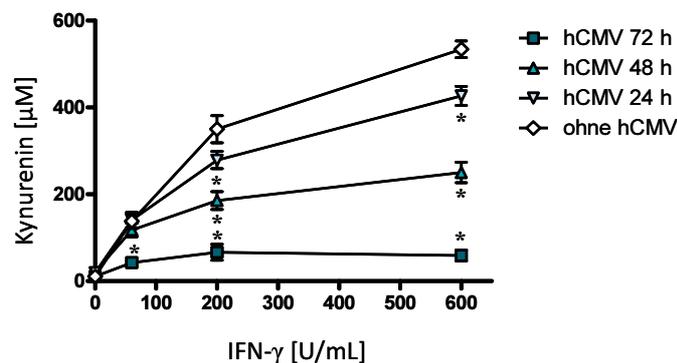


Abb. 3.25.: Einfluss einer hCMV-Infektion auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen. 3×10^4 HFF-Zellen wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hCMV (MOI 2.5) in L-Tryptophan-supplementiertem Medium mit IFN- γ stimuliert. Dabei teilte sich der Versuch in vier verschiedene Parallelansätze auf: Bei der Infektion mit hCMV für 72 Stunden (hCMV 72 h) wurden die Zellen zu Beginn des Experimentes, zeitgleich mit der IFN- γ -Zugabe, infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 48 Stunden (hCMV 48 h), wurden die Zellen nach 24 Stunden für 48 Stunden infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 24 Stunden (hCMV 24 h) wurden die Zellen nach 48 Stunden für 24 Stunden infiziert; ein Ansatz blieb uninfiziert (ohne hCMV). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) der photometrisch ermittelten Kynurenin-Produktion aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ($P < 0.01$) der IDO-Aktivität, bezogen auf die jeweilige IFN- γ -Konzentration ohne hCMV-Infektion, wurde gekennzeichnet (*).

Dazu wurde zunächst der Einfluss einer Cytomegalieinfektion auf die IDO-Aktivität in IFN- γ stimulierten HFF-Zellen überprüft. Dabei wurden die IFN- γ stimulierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit hCMV (MOI 2.5) infiziert. Die IDO-Aktivität, gemessen durch das produzierte Kynurenin, wurde nach 72-stündiger Inkubation ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.25. dargestellt. Zellen, die zum Zeitpunkt der IFN- γ

Stimulation parallel mit hCMV infiziert wurden, zeigten nur eine sehr geringeIDO-Aktivität. So wurde bei einer IFN- γ Konzentration von 600 U/mL nach 72 Stunden lediglich eine Kynureninkonzentration von 60 μ M gemessen. Ohne hCMV-Infektion lag die im gleichen Zeitraum produzierte Kynureninkonzentration bei 530 μ M. In Zellkulturüberständen von Zellen, die 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach IFN- γ Stimulation infiziert wurden, waren Kynureninkonzentrationen von 210 μ M bzw. 410 μ M nachweisbar. So ist die messbare IDO-Aktivität abhängig vom Zeitpunkt der hCMV Infektion: eine frühe Infektion mit dem Virus kann die Kynurenin-Produktion fast vollständig inhibieren.

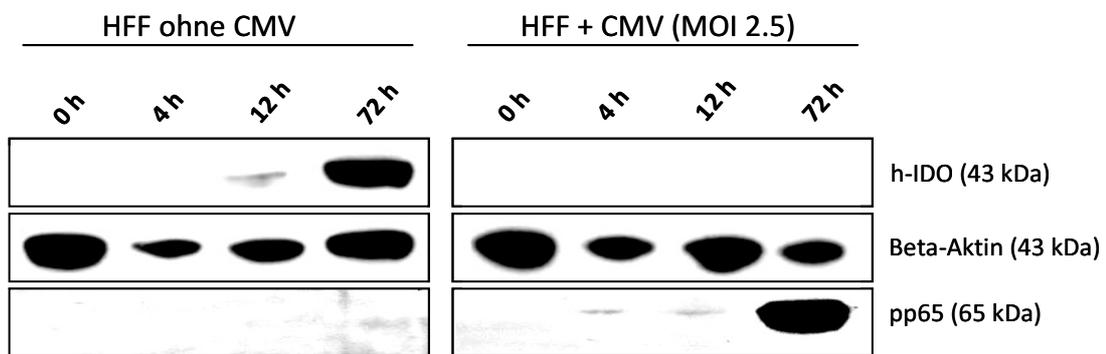


Abb. 3.26.: Western-Blot-Analyse hCMV-infizierter HFF-Zellen. 1×10^6 Fibroblasten wurden mit IFN- γ (600 U/mL) stimuliert und zeitgleich mit hCMV (MOI 2.5) infiziert. Als Kontrolle dienten stimulierte, nicht infizierte Zellen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Dabei wurde h-IDO durch einen Anti-IDO-Antikörper und eine erfolgreiche hCMV-Infektion durch einen Anti-hCMV-pp65-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Beta-Aktin detektiert. Als Sekundärantikörper diente beim Nachweis aller drei Proteine ein POX-gekoppelter IgG Antikörper.

Um zu analysieren, ob die beobachtete Reduktion der IDO-vermittelten Kynurenin-Produktion auf einer reduzierten Enzymaktivität oder auf einer reduzierten Menge des IDO-Proteins beruht, wurden im Folgenden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Dabei wurden HFF-Zellen mit IFN- γ stimuliert und mit hCMV infiziert (als Negativkontrolle dienten stimulierte uninfizierte Zellen). Nach unterschiedlichen Zeiten wurden die Zellen lysiert und das IDO-Protein im Westernblot quantitativ erfasst (Abb. 3.26.). Als Kontrollen wurden neben dem IDO-Protein auch Beta-Aktin als Beladungskontrolle und das hCMV-Phosphoprotein pp65 zum Nachweis der hCMV Infektion detektiert. Es zeigte sich, dass in IFN- γ stimulierten uninfizierten Zellen nach 12 Stunden IDO nachweisbar war. Die Proteinmenge nahm mit der Stimulationsdauer zu. Waren die Zellen parallel zur IFN- γ Stimulation mit hCMV infiziert worden, war kein IDO-Protein nachweisbar. Die erfolgreiche akute Infektion der Fibroblasten mit hCMV wurde durch die Detektion des hCMV-Phosphoproteins pp65 nachgewiesen, welches bereits 4 Stunden nach Infektion im

Western Blot detektierbar war. Durch das quantitativ gleichstarke Signal von Beta-Aktin in allen Zelllysaten konnte das Auftragen einer gleichen Proteinmenge bestätigt werden.

3.4.1. Einfluß von hCMV auf IDO-vermittelte antibakterielle Effekte

Da nun nachgewiesen wurde, dass eine hCMV-Infektion humaner Zellen dazu führt, dass die IFN- γ vermittelte IDO-Aktivität gehemmt wird, war es im Folgenden interessant zu untersuchen, ob dieser inhibitorische Effekt stark genug ist, um die IFN- γ -vermittelten antimikrobiellen Effekte zu beeinträchtigen. Dazu wurden zunächst hCMV-infizierte, IFN- γ stimulierte Fibroblasten nach 72-stündiger Inkubation mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Als Kontrolle wurden IFN- γ stimulierte humane Fibroblasten verwendet. Wie erwartet, vermittelten die Zellen in dieser Kontrollgruppe einen starken antimikrobiellen Effekt. Fibroblasten, die parallel zur IFN- γ Stimulation mit hCMV infiziert wurden, konnten, trotz einer Aktivierung mit hohen Dosen von IFN- γ , keinen antibakteriellen Effekt vermitteln, sodass die Staphylokokken sich in diesen Kulturen ungehemmt vermehren konnten. Das Ausmaß der Hemmung des antibakteriellen Effektes ist dabei abhängig von der Dauer der Infektion mit hCMV.

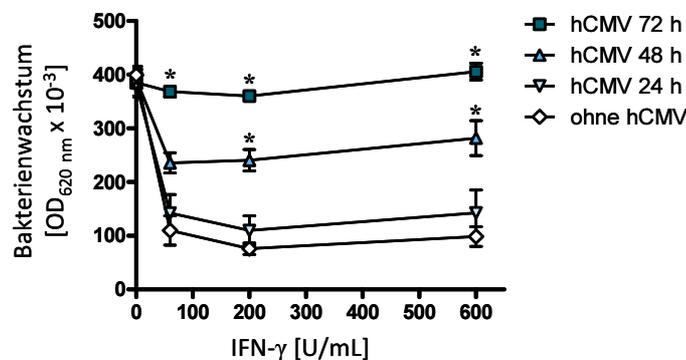


Abb. 3.27.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt. 3×10^4 HFF-Zellen wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hCMV (MOI 2.5) mit IFN- γ stimuliert. Dabei teilte sich der Versuch in vier verschiedene Parallelansätze auf: Bei der Infektion mit hCMV für 72 Stunden (hCMV 72 h) wurden die Zellen zu Beginn des Experimentes, zeitgleich mit der IFN- γ -Zugabe, infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 48 Stunden (hCMV 48 h), wurden die Zellen nach 24 Stunden für 48 Stunden infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 24 Stunden (hCMV 24 h) wurden die Zellen nach 48 Stunden für 24 Stunden infiziert; ein Ansatz blieb uninfiziert (ohne hCMV). Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante ($P < 0.01$) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hCMV-Infektion, wurde gekennzeichnet (*).

Während, wie oben beschrieben, die Virusinfektion drei Tage vor der Zweitinfektion mit Bakterien zu einer nahezu vollständige Inhibition des IFN- γ vermittelten antibakteriellen Effekt führt, wurde durch eine Infektion mit hCMV 48 bzw. 24 Stunden vor der Zweitinfektion der antibakterielle,IDO-vermittelte Effekt in einem geringeren Ausmaß abgeschwächt.

Eine aktive hCMV Infektion findet man generell nur bei immunsupprimierten Patienten. Diese Patienten sind jedoch auch diejenigen, bei denen eine aktive Toxoplasmose beobachtet wird. Es war daher interessant zu untersuchen, ob eine aktive hCMV Infektion die IDO-vermittelte Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii* beeinflusst. Dazu wurden, ähnlich wie in dem oben geschilderten Experimentalansatz mit Staphylokokken, zunächst humane Fibroblasten mit IFN- γ aktiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit hCMV infiziert. Nach einer 72-stündigen Vorinkubation wurden die verschiedenen Ansätze dann zusätzlich mit Toxoplasmen infiziert. Das Parasitenwachstum wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [3 H]-Uracil gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.28. dargestellt. In Zellen der Kontrollgruppe, die nicht mit hCMV infiziert wurden, konnte eine IFN- γ -abhängige Inhibition des Wachstums von *T. gondii* gemessen werden. Die Parasitenproliferation wurde durch 600 U/mL IFN- γ um ca. 80 % reduziert.

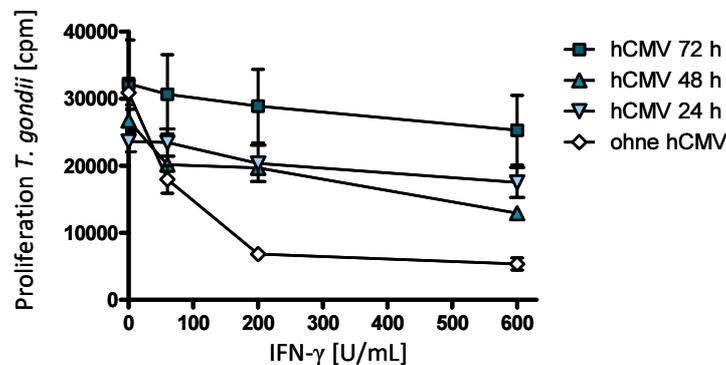


Abb. 3.28.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt. 3×10^4 HFF-Zellen wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hCMV (MOI 2.5) mit IFN- γ stimuliert. Dabei teilte sich der Versuch in vier verschiedene Parallelansätze auf: Bei der Infektion mit hCMV für 72 Stunden (hCMV 72 h) wurden die Zellen zu Beginn des Experimentes, zeitgleich mit der IFN- γ -Zugabe, infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 48 Stunden (hCMV 48 h), wurden die Zellen nach 24 Stunden für 48 Stunden infiziert; bei der Infektion mit hCMV für 24 Stunden (hCMV 24 h) wurden die Zellen nach 48 Stunden für 24 Stunden infiziert; ein Ansatz blieb uninfiziert (ohne hCMV). Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Toxoplasma gondii* (2×10^4 /Vertiefung) infiziert. Die Proliferation der Parasiten wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [3 H]-Uracil gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte der Uracilinkorporation \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Ab einer IFN- γ -Konzentration von 200 U/mL zeigte sich in allen mit hCMV-infizierten Versuchsansätzen, jeweils bezogen auf den uninfizierten Ansatz, eine signifikante ($P < 0.01$) Aufhebung des antiparasitären Effektes.

Durch eine frühe hCMV-Infektion (hCMV für 72 h), gleichzeitig mit der IFN- γ -Stimulation, konnte dieser IDO-vermittelte antiparasitäre Effekt komplett aufgehoben werden. In Zellen, die erst 24 Stunden bzw. 48 Stunden nach der IFN- γ -Zugabe mit hCMV infiziert wurden, war der Einfluss auf den antiparasitären Effekt abgeschwächt. Damit ähneln die im Parasitenmodell erhaltenen Daten denen, die vorher schon bei einer Infektion mit Bakterien erhalten wurden. Ein wichtiger Befund kann jedoch zusätzlich aus der Tatsache abgeleitet werden, dass das Parasitenwachstum in den hCMV infizierten, IFN- γ stimulierten Zellen nicht beeinflusst ist. Das bedeutet, dass diese Zellen noch vital sind, da Toxoplasmen sich in abgestorbenen Wirtszellen nicht vermehren können. Daher scheiden virusvermittelte zytolytische Effekte als Erklärung für die reduzierte IDO-Aktivität (Abb. 3.25.), die reduzierte IDO-Proteinexpression (Abb. 3.26) und die verminderte Bakteriostase (Abb. 3.27.) aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Aufhebung der IFN- γ -vermittelten antimikrobiellen Effekte in Fibroblasten durch eine vorausgegangene hCMV-Infektion zu einer unkontrollierten Vermehrung von Toxoplasmen und Staphylokokken führt. Damit hat eine hCMV-Infektion einen drastischen Effekt auf den Verlauf einer gleichzeitigen Zweitinfektion mit diesen Pathogenen.

3.4.2. Einfluss von hCMV auf IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte

Die aktive hCMV-Infektion erhöht das Risiko einer Transplantatabstoßung deutlich. In diesem Zusammenhang muss beachtet werden, dass die IDO-Aktivität *in vivo* einen wichtigen Mechanismus bei der Toleranzentwicklung darstellt und, wie hier bereits nachgewiesen, durch eine hCMV-Infektion inhibiert wird.

Daher besteht die Möglichkeit, dass die hCMV-vermittelte Beeinflussung der IDO-Aktivität an dem erhöhten Risiko an einer *Host-versus-graft*-Reaktion zu erkranken, ursächlich beteiligt ist. Diese Hypothese wurde experimentell überprüft. Dazu wurden HFF-Zellen für 72 Stunden mit IFN- γ stimuliert und parallel mit hCMV infiziert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und als Kulturmedium für PBL verwendet. Dabei wurden T-Zellen durch die Zugabe des CD3-Antikörpers OKT3 aktiviert und die darauf erfolgende Zellproliferation durch die Messung des [3 H]-Thymidin-Einbaus gemessen. In der nicht infizierten Kontrollgruppe ergab sich, wie erwartet, eine sehr starke Inhibition der T-Zellproliferation im Zellkulturüberstand der IFN- γ -stimulierten Fibroblasten. Die Anwesenheit von hCMV in der primären HFF-Zellkultur während der IFN- γ Stimulation führte zu einer völligen Blockade dieses immunregulatorischen Effekts.

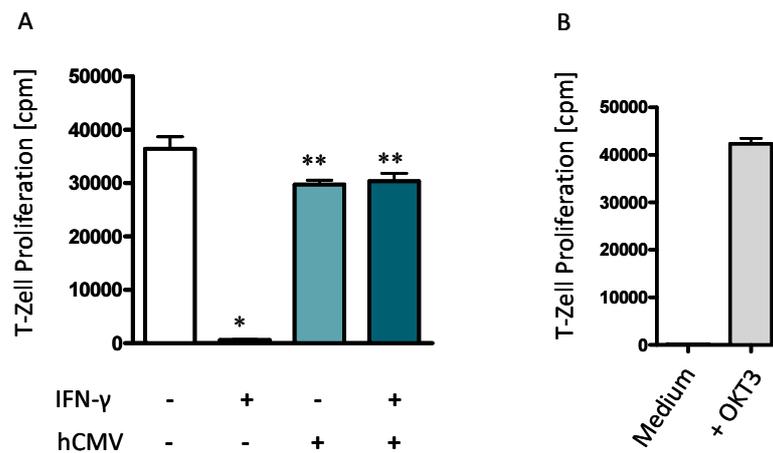


Abb. 3.29.: Einfluss der hCMV-Infektion auf den IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekt. **A)** 1×10^6 HFF-Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von IFN- γ (600 U/mL) und hCMV (MOI 2.5) in 5 mL Medium inkubiert. Nach 72 Stunden wurden je 180 μ L der Überstände als Kulturmedium für 1.5×10^5 OKT3 stimulierte PBL verwendet. Nach weiteren 48 Stunden wurde die T-Zell-Proliferation durch den Einbau von [3 H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des [3 H]-Thymidineinbaus \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. **B)** Proliferationskontrolle der verwendeten T-Zellen. 1.5×10^5 PBL wurden ohne (Medium) oder mit OKT3 (+ OKT3) für 48 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Die T-Zell-Proliferation wurde durch den Einbau von [3 H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des [3 H]-Thymidineinbaus \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ($p < 0.01$) der T-Zell-Proliferation, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne IFN- γ und ohne hCMV, wurde gekennzeichnet (*). Auch die signifikante Aufhebung ($p < 0.01$) der T-Zell-Proliferation wurde markiert (**).

Als Positivkontrolle wurde das T-Zellwachstum in Überständen von unstimulierten bzw. nicht infizierten HFF- Zellen bestimmt (Abb. 3.29 A). Zum Ausschluss unspezifischer, HFF vermittelter Effekte wurde zusätzlich in das Wachstum der T-Zellen in unbehandeltem Kulturedium überprüft (Abb.3.29 B). Als Negativkontrolle wurde das Wachstum von T-Zellen ohne die Zugabe des mitogenen anti-CD3 Antikörpers bestimmt.

Die Daten belegen eindeutig, dass hCMV nicht nur die in Fibroblasten induzierbaren, antibakteriellen Effekte blockiert, sondern auch die immunregulatorischen Fähigkeiten dieser Zellen deutlich einschränkt.

3.5. HSV und sein Einfluss auf die IFN- γ vermittelte IDO-Aktivität in Astrozytomzellen

Die bisherigen Ergebnisse zur Beeinflussung der IDO-Aktivität durch eine Virusinfektion wurden alle in einem Kultursystem mit hCMV und Fibroblasten gewonnen. Um nachzuweisen, dass die beobachteten Effekte eine allgemeinere Gültigkeit besitzen und nicht nur auf das verwendete Kultursystem beschränkt sind, wurde ein zweites

Modellsystem mit Astrozytomzellen als Wirtszellen und Herpes simplex Virus Typ I verwendet.

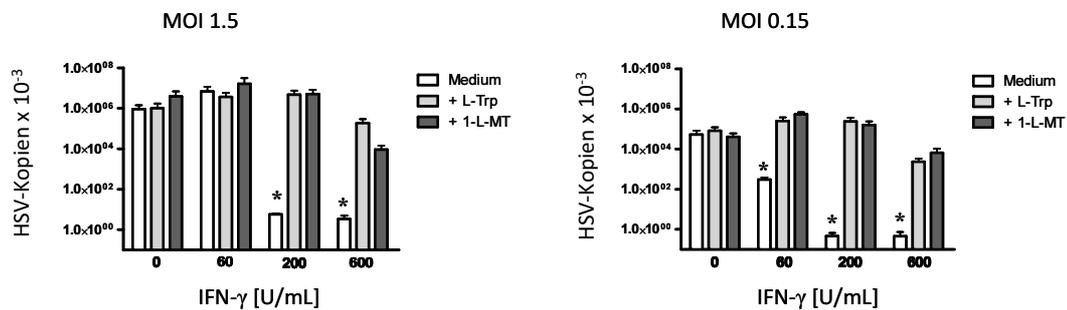


Abb. 3.30.: Einfluss IFN- γ induzierter IDO-Aktivität auf eine HSV-Infektion in 86HG39 Zellen. 86HG39 Zellen (2.5×10^4 /Vertiefung) wurden in An- oder Abwesenheit von 1.5 mM 1-L-MT mit IFN- γ stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit HSV in einer MOI von 1.5 bzw. 0.15 (mit oder ohne zusätzlichem L-Tryptophan in einer Endkonzentration von 0.5 mM) infiziert und nach weiteren 48 Stunden die Virusreplikation mittels quantitativer real-time PCR detektiert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte der Virusreplikation \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ($P < 0.01$) der HSV-Replikation, jeweils bezogen auf die Kontrollgruppe ohne IFN- γ , wurde gekennzeichnet (*).

Zunächst wurde analysiert, inwieweit der IDO-vermittelte antivirale Effekt von der Infektionsdosis abhängt. Die Daten in Abb. 3.30. zeigen eindeutig, dass, wie bereits für hCMV beschrieben, die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität einen antiviralen Effekt vermittelt, der durch den IDO-Inhibitor 1-L-MT komplett aufgehoben werden konnte.

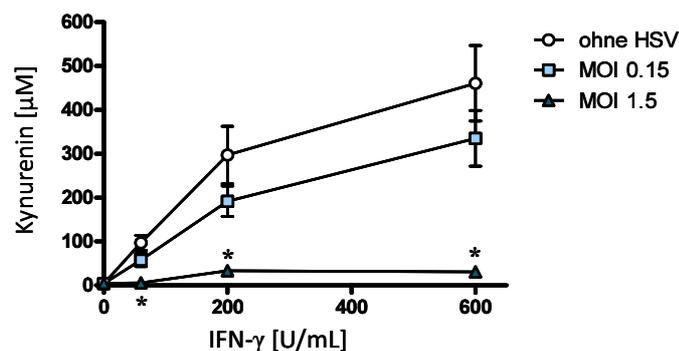


Abb. 3.31.: Einfluss einer HSV-Infektion auf die IDO-Aktivität in 86HG39-Zellen. 2.5×10^4 86HG39 Zellen wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von verschiedenen HSV-Konzentrationen (MOI von 1.5 bzw. 0.15) in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (0.6 mM) mit IFN- γ stimuliert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte der Kynureninkonzentration \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Aufhebung ($P < 0.01$) der IDO-Aktivität, bezogen auf den Ansatz ohne HSV, wurde gekennzeichnet (*).

Ferner zeigt die Abbildung 3.30., dass der IFN- γ induzierte antivirale Effekt bei einer hohen Infektionsdosis nicht so effektiv ist, wie bei einer niedrigeren Infektionsdosis. Damit ist

auch in einem Infektionsmodell der Herpes-Enzephalitis gezeigt, dass der IFN- γ -vermittelte antivirale Effekt von der Infektionsdosis abhängt.

Um zu überprüfen, ob die Infektion mit HSV, ähnlich wie vorher mit hCMV beschrieben, die IFN- γ induzierbareIDO-Aktivität hemmt, wurden IFN- γ -stimulierte 86HG39 Zellen mit unterschiedlichen Mengen an HSV infiziert. Wie in Abbildung 3.31. zu erkennen, ist HSV in der Lage, die IFN- γ -vermittelteIDO-Aktivität zu inhibieren. Dabei ist der negative Einfluss auf dieIDO-Aktivität ausreichend, um den IFN- γ -vermittelten antibakteriellen Effekt von 86HG39 Zellen gegenüber Streptokokken der Gruppe B komplett aufzuheben (Abb. 3.32.).

Dabei ist zu bemerken, dass in diesem Experiment zur Analyse des antibakteriellen Effektes nicht wie in bisher beschriebenen Experimenten Staphylokokken sondern Streptokokken der Gruppe B verwendet wurden. Zusätzlich wurde in diesen Experimenten das Bakterienwachstum nicht nur über die Bestimmung der optischen Dichte ermittelt, sondern es wurde zudem die Anzahl lebender Bakterien in der Kultur als sogenannte Koloniebildende Einheiten (cfu) bestimmt. Beide Messsysteme führten zu ähnlichen Ergebnissen.

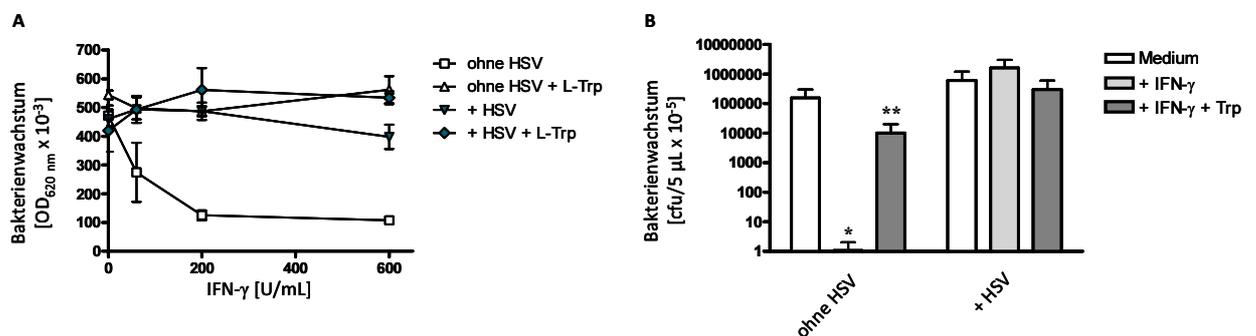


Abb. 3.32.: Einfluss der HSV-Infektion auf den IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt. 2.5×10^4 86HG39 Zellen wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von HSV (MOI 1.5) mit IFN- γ stimuliert. **A)** Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des Bakterienwachstums \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen angegeben. Ab einer Konzentration von 200 U/mL IFN- γ war der antibakterielle Effekt, bezogen auf die Kontrolle ohne HSV und ohne L-Tryptophanzugabe, signifikant inhibiert ($p < 0.01$) **B)** Nach 72 Stunden wurden die mit 200 U/mL IFN- γ stimulierten Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden dessen Wachstum durch das Auszählen der cfu bestimmt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des Bakterienwachstums \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten angegeben. Die signifikante Hemmung ($P < 0.01$) des Bakterienwachstums, bezogen auf die Mediumkontrolle, wurde gekennzeichnet (*). Die signifikante Aufhebung des antibakteriellen Effektes ($P < 0.01$) durch die Virusinfektion, bezogen auf die Versuchsgruppe mit IFN- γ , wurde ebenfalls gekennzeichnet (**).

Zusammenfassend belegen diese Daten, dass die negative Wirkung einer Virusinfektion auf IDO-vermittelten Effekte nicht nur auf das Infektionsmodell mit hCMV und Fibroblasten beschränkt ist, sondern gleichermaßen in einem Infektionsmodell mit Astrozytomzellen, HSV und Streptokokken der Gruppe B nachweisbar ist.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden die immunregulatorischen und antimikrobiellen Eigenschaften der Indolamin 2,3-Dioxygenase in verschiedenen Infektionsmodellen analysiert. Dabei war der Nachweis, dass die enzymatische Spaltung von L-Tryptophan zu Kynurenin und die dadurch verursachte L-Tryptophanverarmung ausreichend sind, die Funktion der IDO in der Infektionsimmunologie zu erklären, ein Schwerpunkt der Arbeit. In einem zweiten Teil wurde gezeigt, dass eine Virusinfektion in der Lage ist, die IDO-Aktivierung zu inhibieren. Dieser hier erstmals beschriebene Effekt kann *in vivo*, insbesondere in der Transplantationsmedizin, von großer funktioneller Bedeutung sein.

4.1. Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase bei der Abwehr von Pathogenen

Die Rolle der Tryptophandegradation bei der Abwehr von Pathogenen ist am Besten in Infektionsmodellen mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* untersucht. Bereits 1984 (Pfefferkorn, 1984) wurde zum ersten Mal gezeigt, dass eine, nach IFN- γ Aktivierung erfolgende, Tryptophandepletion einen Effektormechanismus gegen diesen Parasiten darstellt. Es zeigte sich, dass die Stärke des IFN- γ induzierten antiparasitären Effekts von der Tryptophankonzentration im Kultursystem abhängt. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass eine Tryptophansupplementation in *in vitro* Kulturen den IFN- γ vermittelten antiparasitären Effekt antagonisiert. In späteren Publikationen wurde die Beteiligung der IDO an dem antiparasitären Effekt gegen Toxoplasmen weiter belegt. So wurde z.B. gezeigt, dass IDO-defiziente Wirtszellen trotz IFN- γ Stimulation nicht mehr in der Lage sind, die Proliferation von *T. gondii* zu inhibieren, obwohl andere IFN- γ induzierte Mechanismen, wie z.B. die Induktion der Expression von MHC Klasse II Molekülen in diesen Zellen nicht beeinträchtigt waren (Thomas *et al.*, 1993). Desweiteren wurde bei der Untersuchung der Rolle der IDO in der Immunabwehr nachgewiesen, dass *T. gondii* Stämme, die mit dem Tryptophan-Synthese-Gen *trpB* aus *E. coli* transfiziert waren, und somit ihre Tryptophanauxotrophie verloren hatten, nicht länger durch IFN- γ aktivierte Wirtszellen zu inhibieren waren (Sibley *et al.*, 1994). Weiterhin zeigte sich, dass IDO-überexprimierende Wirtszellen durch IFN- γ -unabhängige IDO-Expression in der Lage waren, das Toxoplasmenwachstum zu inhibieren (Dai *et al.*, 1994; Habara-Ohkubo *et al.*, 1993). Zur Vervollständigung der Literaturdaten zum Nachweis der IDO als antiparasitärem Effektormechanismus, konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass der

IDO-spezifische Inhibitor 1-L-MT nicht nur die Enzymaktivität der IDO hemmt, sondern gleichzeitig auch den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt aufhebt.

In dieser Arbeit wurde ein Infektionsmodell mit humanen Lungenzellen und Toxoplasmen etabliert, da bei immunsupprimierten Patienten die Toxoplasmenpneumonie eine häufige opportunistische Infektion darstellt. Ferner war im Vorfeld der Arbeit in einem *in vivo* Modellsystem der Toxoplasmenpneumonie bei Mäusen gezeigt worden, dass während einer Infektion mit *T. gondii* die Tryptophankonzentration im Lungengewebe stark herabgesetzt wird, während der Kynureningehalt im Lungengewebe ansteigt (Silva *et al.*, 2002). Weitere Hinweise auf eine besonders starke IDO-Aktivität in murinen Lungenzellen ergaben sich aus Analysen verschiedener muriner Gewebe nach einer Behandlung mit CpG DNA (Hayashi *et al.*, 2004). Neben dem Kolon war die Lunge das Organ, in welchem mit Abstand die höchste IDO-Induktion nach ISS-ODN-Behandlung (immunstimulierende Oligodesoxynukleotide) gemessen werden konnte.

Um nachzuweisen, dass die im Modell mit Lungentumorzellen erhaltenen Daten auch auf native humane Lungenzellen zu übertragen sind, wurden in dieser Arbeit auch HBE4-E6/E7 Zellen verwendet, die von einem normalen humanen Bronchialepithel abstammen. Auch in diesen „nativen“ Lungenzellen konnte die starke Induzierbarkeit der IDO nachgewiesen werden. Damit stimmen die in dieser Arbeit *in vitro* mit humanen Lungenzellen erhobenen Daten mit der Beobachtung in verschiedenen murinen *in vivo* Systemen überein, in denen eine starke IDO-Induktion besonders in der Lunge nachgewiesen wurde.

Neben den hier beschriebenen antiparasitären Effekten ist die IDO auch in der Lage antibakterielle Wirkungen zu vermitteln. Der erste Nachweis einer Beteiligung der IDO an IFN- γ -vermittelten antibakteriellen Effekten gelang in einem Infektionsmodell mit *Chlamydia psittacci* (Byrne *et al.*, 1986). In weiteren Arbeiten konnte dieses Ergebnis auch in Infektionsmodellen mit *Chlamydia pneumoniae* erzielt werden. Zur Bestätigung der ursächlichen Bedeutung der IDO bei der Vermittlung des antibakteriellen Effektes wurde in den zitierten Arbeiten der antagonistische Effekt einer Tryptophansupplementation genutzt. In einer weiteren Arbeit wurde dann gezeigt, dass durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-DL-MT der IFN- γ induzierte Effekt gegen *Chlamydia pneumoniae* in Muskelzellen der Aorta aufgehoben werden kann (Pantoja *et al.*, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass Chlamydienisolate, die nicht durch die IFN- γ -induzierten antimikrobiellen Effektormechanismen ihrer Wirtszellen zu inhibieren waren, in der Lage sind, aus Produkten des Tryptophanstoffwechselweges, wie Anthranilinsäure oder auch Kynurenin die ansonsten essentielle Aminosäure Tryptophan zu synthetisieren (Wood *et al.*, 2004).

Lange Zeit galten nur obligat intrazelluläre Bakterien als empfindlich gegenüber einer IDO-vermittelten Tryptophanverarmung. In den letzten Jahren konnte jedoch nachgewiesen werden, dass auch *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Streptokokken der Gruppe B und Enterokokken durch IDO-positive Zellen in ihrem Wachstum gehemmt werden (Schroten *et al.*, 2001; Mackenzie *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 1999). In Bezug auf die extrazellulären Bakterien wurde die ursächliche Rolle der IDO bei der Vermittlung des antibakteriellen Effektes lediglich durch eine Supplementation der Kultursysteme mit L-Tryptophan nachgewiesen. Dabei bleibt unklar, ob zusätzlich zur enzymatischen Funktion der IDO weitere IFN- γ induzierte Effektormechanismen, oder andere, nicht enzymatische Eigenschaften des IDO-Proteins bei der Abwehr dieser Bakterien eine Rolle spielen. Um diese nicht enzymatischen Effekte bei der Abwehr der Bakterien auszuschließen, wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass die IFN- γ unabhängige Expression von rekombinanter IDO in HeLa T-REx h-IDO Zellen ausreicht, um einen antibakteriellen Effekt auszulösen. Damit ist klar, dass die Bakteriostase auch ohne zusätzliche IFN- γ -induzierte Mechanismen vermittelt werden kann. Ferner konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass durch den IDO-Inhibitor 1-L-Methyl-Tryptophan der IDO-vermittelte antibakterielle Effekt komplett aufgehoben werden kann. In einem weiteren Experimentalsystem konnte zusätzlich nachgewiesen werden, dass ein weiteres Tryptophan-abbauendes Enzym, die Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2), bei einer rekombinanten, konstitutiven und IFN- γ -unabhängigen Expression in HEK 293T Zellen ebenfalls einen antibakteriellen Effekt gegen *Staphylococcus aureus* vermittelt. Zusammenfassend belegen diese Daten, dass allein die enzymatische Spaltung von L-Tryptophan zu Kynurenin ausreichend ist, bakteriostatische Effekte zu erzielen.

Die Daten zur antibakteriellen Wirkung der IDO wurden zum einen in einem Pneumoniemodell mit Lungentumorzellen (A549) und nativen Bronchialepithelzellen (HBE4-E6/E7) durch die Infektion mit *Staphylococcus aureus* erhalten. Zum anderen wurde zusätzlich der antibakterielle Effekt der Tryptophandepletion in einem Meningitismodell mit Astrozytomzellen (86HG39) und Streptokokken der Gruppe B bestätigt. Diese Infektionsmodelle sind für die *in vivo* Situation relevant, da *Staphylococcus aureus* in der Lage ist, eine schwere hämorrhagische Pneumonie auszulösen (Turtle *et al.*, 2008) und Streptokokken der Gruppe B die häufigsten Erreger einer bakteriellen Meningitis bei Neugeborenen sind (Gibson *et al.*, 1999).

Im Jahr 1999 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass die IDO-Aktivität neben antibakteriellen und antiparasitären auch antivirale Effekte vermittelt. In einem

Infektionsmodell zur Retinitis wurde erstmals eine Inhibition des Wachstums von humanen Cytomegalieviren (hCMV) in humanen Retinaepithelzellen in Abhängigkeit von der IFN- γ induziertenIDO-Aktivität gezeigt (Bodaghi *et al.*, 1999). In den folgenden Jahren konnte dieserIDO-vermittelte antivirale Effekt auch für andere Viren, wie z.B. den Herpes simplex Viren Typ I und II, (Adams *et al.*, 2004 A/B), nachgewiesen werden. Im Modell mit HSV konnte zudem gezeigt werden, dass auch Typ I Interferone einen antiviralen Effekt erzielen können, der aber durch die Supplementation von L-Tryptophan, im Gegensatz zur IFN- γ -Stimulation, nicht mehr aufzuheben war. Aber auch die Hemmung der Replikation des Vacciniavirus (Terajima *et al.*, 2005) oder des Masernvirus (Obojes *et al.*, 2005) zeigte sichIDO-abhängig, denn auch diese IFN- γ -abhängigen antiviralen Effekte konnten durch die Zugabe von L-Tryptophan wieder aufgehoben werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine IFN- γ -vermittelte, IDO-abhängige Inhibition der Virusreplikation in humanen Lungenzellen am Beispiel der Herpes simplex Virus-Infektion nachgewiesen werden. Anders als bei den oben erwähnten Publikationen wurde hier, zusätzlich zur Tryptophansupplementation, durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT gezeigt, dass die beobachtete Inhibition der Virusreplikation IDO-abhängig ist. Identische Ergebnisse zur IDO-Abhängigkeit des IFN- γ -vermittelten antiviralen Effektes wurden auch mit Cytomegalieviren infizierten Fibroblasten erhalten.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Bedeutung der IFN- γ -induzierten IDO-Aktivität als antibakterieller, antiparasitärer und antiviraler Effektormechanismus in einem Pneumonie- bzw. Meningitismodell nachgewiesen werden. *In vivo* muss man jedoch davon ausgehen, dass die an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligten Zellen nicht nur durch IFN- γ aktiviert werden, sondern dass am Infektionsort ein Cocktail aus verschiedenen Botenstoffen auf die Zellen einwirkt. So konnte z.B. in *in vivo* Modellen nachgewiesen werden, dass es während einer bakteriellen Lungeninfektion zu einer deutlichen Erhöhung der IL-1 β und TNF- α Konzentrationen in der Alveolarflüssigkeit kommt (Wu *et al.*, 2003). TNF- α verfügt, ebenso wie IL-1 β , über ein breites Spektrum von biologischen Funktionen, die für die Ausbildung von entzündlichen Reaktionen von großer Bedeutung sind. Ferner wird die Produktion beider Zytokine durch bakterielles LPS über LBP, CD14 und TLR-4 induziert. Passend zu diesen Befunden *in vivo*, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass TNF- α die IDO-Aktivität synergistisch verstärkt. Zusätzlich ist in dieser Arbeit gezeigt, dass IL-1 β die IFN- γ -induzierten antiviralen, antiparasitären und insbesondere auch antibakteriellen Effekte potenziert.

Der hier nachgewiesene Synergismus in derIDO-Aktivierung durch IL-1 β oder TNF- α , zusammen mit IFN- γ , könnte durch die Erhöhung der transkriptionellen Aktivität der IDO-Promotor Regionen, durch die Erhöhung des IRF-1 Signals entstehen (Babcock *et al.*, 2000). Denn zusätzlich zu IFN- γ sind IL-1 β und TNF- α in der Lage, durch die Aktivierung von NF- κ B die Expression von IRF-1 zu erhöhen. Zusätzlich kann über den IL-1 β - und TNF- α -induzierten NF- κ B-Weg die Expression der IFN- γ Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöht werden, was ebenfalls zu einem synergistischen Effekt führt (Shirey *et al.*, 2006). Alle publizierten Mechanismen, die die Synergie zwischen IFN- γ und TNF- α / IL-1 β erklären, passen gut zu der Beobachtung, dass TNF- α und IL-1 β allein oder in Kombination nicht in der Lage sind, die IDO zu induzieren.

Es besteht kein Zweifel, dass professionelle Phagozyten wie Granulozyten und Makrophagen als antimikrobielle Effektorzellen einen großen Beitrag zur Abwehr von Mikroorganismen leisten. Dabei gilt IFN- γ als der klassische Induktor der antimikrobiellen Effektormechanismen. Neben diesen bekannten antimikrobiellen Effektorzellen spielen aber auch normale Gewebszellen eine wesentliche Rolle bei der IFN- γ -vermittelten Abwehr gegen verschiedene Pathogene, was sich z. B. in einem *in vivo* Modell zeigte, in dem eine IFN- γ -Rezeptor knock-out Maus das Wachstum von *T. gondii* nicht inhibieren konnte. Wenn diesen IFN- γ -Rezeptor-defizienten Tieren Stammzellen aus dem Knochenmark von Wildtyp-Mäusen transplantiert wurden, konnten diese Chimären ebenfalls keine suffiziente Abwehr gegen Toxoplasmen aufbauen, obwohl alle Zellen, die aus dem Knochenmark abstammten, normal auf die Aktivierung durch IFN- γ reagierten. Dieser Umstand beweist eindeutig, dass neben den professionellen Phagozyten auch die IFN- γ -Antwort der normalen Körperzellen benötigt wird, um eine Parasiteninfektion einzudämmen (Yap *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die antimikrobiellen Eigenschaften dieser nicht professionellen Phagozyten am Beispiel der Lungenzelle A549, der Lungenepithelzelle HBE4-E6/E7, der Astrozytomzelle 86HG39 und nativer humaner Fibroblasten (HFF) untersucht. Alle vier Zelllinien sind in der Lage, nach IFN- γ Stimulation, das Wachstum von Pathogen, wie *Toxoplasma gondii*, *Staphylococcus aureus*, Streptokokken der Gruppe B, Herpes simplex Virus Typ I oder Cytomegalieviren zu inhibieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass in diesen Infektionsmodellen mit humanen Zellen allein die Aktivierung der IDO der verantwortliche Effektormechanismus ist.

Im Gegensatz dazu scheint die IDO Enzymaktivität in Gewebszellen der Maus keine oder nur eine untergeordnete Rolle als antimikrobieller Effektormechanismus zu besitzen. So ist die IDO in murinen Fibroblasten im Gegensatz zu humanen Fibroblasten nicht in die

Abwehr von Toxoplasmen involviert (Schwartzman *et al.*, 1990; Pfefferkorn *et al.*, 1984). In murinen Zellen scheinen daher andere Effektormechanismen bei der Pathogenabwehr beteiligt zu sein; dazu gehört vornehmlich die IFN- γ -induzierbare NO-Synthase (Roshick *et al.*, 2006; Livonesi *et al.*, 2008; Bogdan, 2001). Obwohl die iNOS durch IFN- γ induziert werden kann, ist zur maximalen NO-Produktion in den meisten Zelltypen, zusätzlich zur Aktivierung mit IFN- γ , eine Kostimulation mit TNF- α und IL-1 β wichtig. Damit ist die iNOS-Aktivität in den murinen Zellen, ähnlich wie die IDO-Aktivität in humanen Zellen, durch das Zusammenspiel mehrerer proinflammatorische Zytokine gemeinsam reguliert (Ding *et al.*, 1988). In unserer Arbeitsgruppe konnte zudem gezeigt werden, dass die iNOS zu einer Inhibition der IDO-Aktivität führt. Dies ist zum einen auf eine direkte Interaktion von NO mit dem IDO-Protein, zum anderen auf einen durch NO verstärkten proteasomalen Abbau der IDO zurückzuführen (Hucke *et al.*, 2004). Damit scheinen die IDO und die iNOS funktionelle Gegenspieler zu sein. *In vivo* erscheint es daher sinnvoll, dass in unterschiedlichen Zelltypen primär entweder die iNOS oder die IDO aktiviert wird, da eine gleichzeitige Aktivierung beider Effektorsysteme zu einer Aufhebung der IFN- γ -vermittelten antimikrobiellen Effekte führen kann. Tatsächlich findet man z.B. in Epithelzellen der Maus eine iNOS Aktivierung (Kelley *et al.*, 1998) während diese in der Regel in humanen Zellen nicht oder nur in sehr geringem Umfang beschrieben ist. Somit verhalten sich die IDO bzw. iNOS Aktivierung in Gewebszellen des Menschen oder der Maus gegenläufig.

Im Gegensatz zu diesen geschilderten funktionellen Daten, gibt es im Maussystem *in vivo* jedoch vielfältige Hinweise auf eine mögliche IDO-Expression in verschiedenen Gewebszellen und Infektionsmodellen. So konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen der Maus nach einer Infektion mit *Plasmodium berghei* eine deutliche IDO-Immunreaktivität aufweisen (Hansen *et al.*, 2004). Ferner konnte eine Induktion der IDO-Immunreaktivität und der *ido*-Expression in verschiedenen Infektionsmodellen mit Mäusen, insbesondere in der Lunge nachgewiesen werden (Silva *et al.*, 2002). Desweiteren zeigte sich, dass Tryptophan *in vivo* in der Lunge von toxoplasmeninfizierten Tieren nahezu vollständig depletiert wird und Kynurenin in vergleichbaren Mengen detektierbar ist (Fujigaki *et al.*, 2003). Trotzdem verliefen alle bisherigen Experimente zum Nachweis einer Rolle der IDO bei der Abwehr von Mikroorganismen im Maussystem negativ (Ramsey *et al.*, 2001). Unter Berücksichtigung der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Befunde, mit dem eindeutigen Nachweis, dass die enzymatische Aktivität der IDO einen antiparasitären Effekt gegen Toxoplasmen vermittelt, und den vorliegenden *in vivo* Daten aus dem Maussystem, bietet

sich jetzt eine erfolgversprechende Möglichkeit zum Nachweis einer Rolle der IDO bei der Abwehr von Toxoplasmen *in vivo* an. Im Jahr 1999 wurde ein Experimentalsystem der Lungentoxoplasmose bei Mäusen beschrieben (Filice *et al.*, 1999). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass BALB/c Mäuse, die mit Toxoplasmen infiziert wurden und initial mit Sulfadiazin behandelt wurden, die Infektion zunächst folgenlos überstehen. Wird die Antibiotikatherapie beendet, erleiden die Tiere eine Toxoplasmenpneumonie, die jedoch spontan, nach einigen Tagen, ausheilt. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass es im Maussystem im Rahmen einer *in vivo* Infektion mit Toxoplasmen insbesondere in der Lunge zu einer starken IDO-Expression kommt, und aus anderen Befunden klar hervor geht, dass im Laufe der Toxoplasmenpneumonie eine nahezu komplette Tryptophandepletion *in vivo* erfolgt, bieten sich jetzt ähnliche Analysen mit *ido* knock-out Tieren an. Wenn diese Tiere in dem Toxoplasmenpneumoniemodell, im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren, sterben oder schwerere Krankheitssymptome aufweisen, dann wäre eine *in vivo* Bedeutung der IDO bei der Parasitenabwehr nachgewiesen.

Die Rolle der iNOS ist in vielen Infektionsmodellen der Maus eindeutig charakterisiert. Dabei zeigte sich auch, dass die iNOS in der Maus nicht den einzigen antimikrobiellen Effektormechanismus gegen Toxoplasmen darstellt. So konnte in verschiedenen murinen Zellen, bei denen nach IFN- γ Stimulation die induzierbare NO-Synthase zwar das Wachstum von Chlamydien inhibierte, die Verwendung von iNOS-Inhibitoren diesen antibakteriellen Effekt aber nicht komplett aufgehoben werden (Roshick *et al.*, 2006). Weiterhin ergaben *in vivo* Befunde, dass IFN- γ defiziente Tiere unter einer Toxoplasmeninfektion stark erkranken, während die Toxoplasmose in iNOS-defizienten Tieren im Vergleich weniger akut und schwerwiegend verläuft (Scharton-Kersten *et al.*, 1997). Es erscheint daher sinnvoll, ähnliche Experimente mit *ido* knock-out Tieren durchzuführen. Zusammenfassend belegt das geschilderte Experiment mit iNOS knock-out Tieren eindeutig, dass es in der Maus einen iNOS unabhängigen IFN- γ -vermittelten Effektormechanismus gegen Toxoplasmen geben muss. In dieser Hinsicht gibt es mittlerweile viele *in vivo* Daten zur antiparasitären Wirkung der murinen p47 GTPasen (Taylor *et al.*, 2004) und es ist klar gezeigt, dass die Induktion dieser p47 GTPasen in murinen Astrozyten einen antiparasitären Effektormechanismus darstellt (Martens *et al.*, 2005). Diese p47 GTPasen sind im Humansystem nicht vorhanden, so dass diese wahrscheinlich einen speziesspezifischen antiparasitären Effektormechanismus darstellen. Im Gegensatz zu diesen „kleinen“ GTPasen gibt es im murinen und im humanen System sogenannte p65 GTPasen, die vielfach IFN- γ -reguliert sind, teilweise direkte antiparasitäre

Effekte vermitteln (Shenoy *et al.*, 2007) und somit als antiparasitäre Effektormoleküle, zusätzlich zurIDO und zur iNOS, in beiden Spezies aktiv sein könnten.

4.2. Untersuchungen von immunregulatorischen Effekten in humanen Lungenzellen

Nachdem die Rolle der IDO bei der Abwehr von verschiedenen Mikroorganismen von unterschiedlichen Arbeitsgruppen belegt worden war, wurde 1998 bekannt, dass die IDO auch einen immunregulatorischen Effekt in einem *in vivo* System vermittelt (Munn *et al.*, 1998). Dabei wurde schnell klar, dass der immunregulatorische Effekt der IDO, im Gegensatz zu ihrer antimikrobiellen Effektorfunktion, sowohl in humanen als auch in murinen Zellen nachweisbar ist. Angesichts der großen Bedeutung immunregulatorischer Effekte im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, bei Allergien, in der Transplantationsmedizin und bei der Kontrolle des Tumorwachstums ist verständlich, dass die immunregulatorische Wirkung der IDO für viele Arbeitsgruppen sehr interessant wurde. Trotz geringer Unterschiede in der Feinregulation ist es heute unstrittig, dass die IDO-Expression in humanen und murinen Dendritischen Zellen wesentlich an der Toleranzentstehung bei T-Zellen beteiligt ist. Jedoch ist der Mechanismus der Induktion der T-Zell-Toleranz durch Dendritischen Zellen (DC) im Detail noch unklar. Es gibt aber verschiedene Hypothesen, die die Auslösung einer IDO-vermittelten Toleranz erklären könnten. So erscheint es einerseits möglich, dass die IDO-positiven DC hauptsächlich regulatorische T-Zellen aktivieren (Hill *et al.*, 2007). Andererseits zeigt sich, dass IDO-exprimierende DC eine Apoptose von aktivierten T-Zellen vermitteln (Fallarino *et al.*, 2002). Es gibt auch Hinweise darauf, dass es durch eine IDO-Aktivierung zu einer Erniedrigung der Tryptophankonzentration in der immunologischen Synapse kommt, die wiederum eine Hemmung der T-Zellaktivierung vermittelt (Munn *et al.*, 2004). Andere Autoren machen die bei der Tryptophanspaltung entstehenden toxischen Metabolite für die Hemmung der T-Zellproliferation verantwortlich (Terness *et al.*, 2002; Frumento *et al.*, 2002). In neueren Untersuchungen wurde auch gezeigt, dass die Reduktion der Tryptophankonzentration zur Auslösung einer Stressreaktion in T-Zellen führt, bei der die unbeladene Tryptophanyl-tRNA eine GCN2 Kinase aktiviert, die für einen Zellarrest in der G1-Phase verantwortlich ist (Munn *et al.*, 2005). Es erscheint aus heutiger Sicht wahrscheinlich, dass mehrere dieser beschriebenen Mechanismen gleichzeitig an der Vermittlung der T-Zelltoleranz beteiligt sind.

Zusammenfassend gibt es in der Literatur viele Arbeiten, die belegen, dass die IDO Induktion in professionellen Antigen präsentierenden Zellen, insbesondere in Dendritischen

Zellen, einen wesentlichen immunregulatorischen Mechanismus darstellt. Die immunologische Bedeutung von Dendritischen Zellen liegt hauptsächlich darin, dass diese zu den wenigen Zellen im Organismus gehören, die in der Lage sind, eine primäre T-Zell-Antwort auszulösen. Nur reife Dendritische Zellen verfügen über eine Vielzahl von Rezeptoren, die als kostimulatorische Elemente bei der primären Aktivierung von T-Zellen unabdingbar sind. Diese primäre T-Zellaktivierung erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich in den Lymphknoten. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass DC, die im Gewebe unter dem Einfluß von „*danger signals*“ Antigene aufnehmen, in den Lymphknoten migrieren und dort das fremde Antigen an T-Zellen präsentieren (Holländer, 2006). Die nachfolgende T-Zellaktivierung führt dann zur Produktion von Effektorzellen, Gedächtniszellen und Effektorgedächtniszellen. Die Effektorzellen und auch die Effektorgedächtniszellen werden dann aus dem Lymphknoten ausgeschleust, invadieren in die Gewebe, erkennen dort die Fremdantigene, die auf den MHC-Antigenen exprimiert werden und vermitteln lokal ihre Effektorfunktion bzw. werden im Gewebe erneut aktiviert und proliferieren (Janeway, 2006). Diese sekundäre Aktivierung ist im Gegensatz zu der primären Aktivierung im Lymphknoten nicht mehr strikt kontrolliert und benötigt eine viel geringere Anzahl an kostimulatorischen Signalen. Diese sekundäre Immunantwort kann daher nicht nur von DC, sondern auch von Makrophagen oder normalen Gewebszellen, z.B. Fibroblasten und Endothelzellen (Hughes *et al.*, 1990) ausgelöst werden.

Während es in der Literatur viele Arbeiten gibt, die die Bedeutung derIDO in DC beschreiben, gibt es nur vergleichsweise wenig Arbeiten zur immunregulatorischen Rolle derIDO in nicht professionell Antigen-präsentierenden Zellen. So konnte unsere Arbeitsgruppe eine immunregulatorische Wirkung derIDO in Astrozytomzellen und Endothelzellen (Müller *et al.*, akzeptiert 2008; Adam *et al.*, 2005) nachweisen. Zudem wurde gezeigt, dass auchIDO-positive HeLa Zellen (Zervixkarzinomzellen) das Wachstum von T-Zellen hemmen (Logan *et al.*, 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch die Lungenkarzinomzelllinie A549 immunregulatorische Effekte vermitteln kann. Dieser immunregulatorische Effekt derIFN- γ -aktivierten A549 Zellen kann durch die Zugabe von IL-1 β , einem proinflammatorischen Zytokin, verstärkt werden. Weitere Daten belegen, dass die Supplementation mit L-Tryptophan, genauso wie die Verwendung desIDO-spezifischen Inhibitors 1-L-Methyl-Tryptophan, zu einer nahezu kompletten Aufhebung des immunregulatorischen Effektes führt. DiesemIDO-vermittelten immuninhibitorischen Effekt von normalen Körperzellen wird in der Literatur nur wenig Beachtung geschenkt. Er könnte jedoch wichtig sein, um das Gewebe vor einer

überschießenden Immunantwort zu schützen. Welche Bedeutung eineIDO-Expression auch in nicht professionell Antigen präsentierenden Zellen haben kann, geht aus verschiedenen Experimenten aus den Bereichen der Tumorimmunologie und der Transplantationsmedizin hervor. Es wurde beschrieben, dass HLA inkompatible Corneatransplantate, die dieIDO rekombinant exprimieren, *in vivo* länger toleriert werden (Beutelspacher *et al.*, 2006) als Transplantate ohne zusätzlicheIDO-Expression. Das ist zum einen auf einen direkten Effekt, möglicherweise auf die lokal zu aktivierenden Effektor T-Zellen, zurückzuführen. Gleichzeitig wird ein, wenn auch schwacher, systemischer Toleranzeffekt induziert. Das geht aus der Beobachtung hervor, dass zeitgleich transplantierte Corneatransplantate, die keineIDO exprimieren, am kontralateralen Auge länger toleriert werden. Desweiteren wurde auch bei Lungentransplantaten, die HLA-inkompatibel waren, nachgewiesen, dass diese nachIDO-Expression länger toleriert werden (Liu *et al.*, 2006). Weitere Hinweise auf eine immunregulatorische Rolle derIDO stammen aus der Tumorimmunologie. Hier wurde gezeigt, dass ein großer Prozentsatz von humanen Tumorzellen eine spontaneIDO-Immunreaktivität aufweist (Uyttenhoven *et al.*, 2003). Dabei ist gleichzeitig aus einem Maussystem bekannt, dass Tumorzellen, die normalerweise durch das Immunsystem eliminiert werden, nachIDO-Transfektion überleben und zur Entstehung einer Tumorerkrankung führen (Yoshida *et al.*, 2008). Damit ist deutlich gezeigt, dass dieIDO-Expression in nicht professionell Antigen präsentierenden Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Tumorentwicklung und Transplantatakzeptanz vermittelt. Schwerer ist es jedoch, die immunregulatorischen und antimikrobiellen Effekte derIDO in einem Infektionsmodell zu verstehen. Oberflächlich betrachtet ergibt sich hier ein Widerspruch. Einerseits ist die durchIFN- γ -induzierteIDO-Aktivität ein antimikrobieller Effektormechanismus, andererseits führt dieIDO-Induktion zu einer Hemmung der T-Zellantwort und damit auch zu einer Reduktion derIFN- γ Produktion. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe können diese scheinbar gegensätzlich wirkendenIDO-Effekte mit einer experimentell untermauerten Hypothese klären. Es konnte gezeigt werden, dass der Tryptophanbedarf von Bakterien ca. 10-20 fach höher ist, als der Tryptophanbedarf von T-Zellen. Das hieße für die Situation *in vivo*, dass es am Ort der Entzündung durch eine Aktivierung oder Reaktivierung von T-Zellen zu einerIFN- γ Produktion mit nachfolgenderIDO-Induktion kommt. Diese führt dann lokal zu einer Reduktion der Tryptophankonzentration. Dabei wird zunächst die für Bakterien notwendige Grenzkonzentration unterschritten und somit das bakterielle Wachstum gehemmt. Bei einer fortschreitenden Immunstimulation und weitererIFN- γ Produktion wird zudem auch die

Grenzkonzentration an Tryptophan unterschritten, die für eine Hemmung der T-Zellantwort notwendig ist. Dadurch wird das Wachstum und die IFN- γ Produktion der T-Zellen gehemmt und die Intensität der IDO-Aktivität nimmt ab. Dies kann als ein Regelkreis verstanden werden, der eine vollständige Tryptophandepletion verhindert und somit die Körperzellen vor einer ansonsten letalen Tryptophandepletion schützt (Müller *et al.*, akzeptiert 2008).

4.3. Untersuchungen zur Indolamin 2,3-Dioxygenase-2

Neben den L-Tryptophan abbauenden Enzymen Indolamin 2,3-dioxygenasae (IDO) und der Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), deren Funktionen in den Bereichen der Immunregulation und der Vermittlung von antimikrobiellen Effekten, bzw. deren Einfluss auf die L-Tryptophan Homöostase bereits gut untersucht waren, wurde 2005 ein weiteres Tryptophan abbauendes Enzym entdeckt. Dieses Enzym wurde aufgrund seiner Homologie zur Indolamin 2,3-Dioxygenase IDO-2 genannt. In der vorliegenden Arbeit wurden zum ersten Mal die antimikrobiellen Funktionen der IDO-2 dargestellt, sowie deren Substratspezifität und Inhibitoren in *in vitro* Assays untersucht. Hierzu gibt es in der Literatur hauptsächlich *in vitro* Daten zur Aktivität und Spezifität der rekombinant exprimierten murinen IDO-2. Es wurde beschrieben, dass die IDO-2 tatsächlich die oxidative Spaltung des Tryptophanringes katalysiert und zur Produktion von Kynurenin aus Tryptophan führt (Ball *et al.*, 2007). Weitere Experimente zeigten, dass durch 1-L-MT die enzymatische Aktivität der IDO-2 nicht gehemmt werden kann, während 1-D-MT einen potenten Inhibitor der IDO-2 darstellt. Durch die Beobachtung, dass 1-D-MT die IDO-2 hemmt und die IDO unbeeinträchtigt läßt, wird argumentiert, dass 1-D-MT die IDO-2 als bevorzugtes Ziel hat (Metz *et al.*, 2007). Jedoch wurde durch andere Arbeitsgruppen gezeigt, dass 1-D-MT *in vivo* durch eine Hemmung des Tryptophanabbaus zu einer verstärkten T-Zellproliferation und einer damit verbundenen stärkeren Antitumorantwort führt. Dieser 1-D-MT vermittelte Effekt bleibt in *ido*-k.o. Mäusen vollständig aus. Das bedeutet, dass in diesem *in vivo* Experimentalsystem 1-D-MT über eine Hemmung der IDO wirkt und die IDO-2 an den beobachteten Effekten nicht beteiligt ist (Hou *et al.*, 2007)).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die murine IDO-2 Tryptophan abbauen kann. Diese Ergebnisse wurden mit HEK 293T Zellen erhalten, die transient mit pcDNA4 *m-ido-2* transfiziert waren. Gleichzeitig zur pcDNA4 *m-ido-2* Transfektion wurden HEK 293T Zellen zum Vergleich auch mit pcDNA4 *m-ido* transfiziert. Beide Proteine waren mit einem myc-Tag versehen, durch den in Westernblot- und in

Immunfluoreszenzanalysen eine vergleichbar starke Expression beider Enzyme auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Funktionell ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede. Die murine IDO zeigte im Vergleich zur murinen IDO-2 eine deutlich stärkere enzymatische Aktivität. Weitere Analysen zur Spezifität der IDO-2 ergaben, dass, im Gegensatz zu publizierten Daten von Metz *et al.*, 1-D-MT nicht zu einer signifikanten Inhibition der IDO-2-Aktivität führte. Dahingegen lässt sich in unseren Experimenten die Aktivität der murinen IDO-2 sowohl mit 1-L-MT, als auch mit einem weiteren IDO-Inhibitor, 6-Chloro-DL-Tryptophan, blockieren.

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine antibakterielle Funktion der IDO-2 nachgewiesen. Zellen, die mit IDO-2 transfiziert waren, waren in der Lage, das Wachstum von *Staphylococcus aureus* zu verhindern. Dies erfolgte jedoch nur nach einer sehr langen Vorinkubationszeit von sieben Tagen in einem Kulturmedium mit einem vergleichsweise geringen Tryptophangehalt. Diese im Vergleich zur murinen IDO geringe Effektivität der antibakteriellen Wirkung passt gut zu der bereits hier beschriebenen niedrigen Enzymaktivität der IDO-2. Unter diesen Umständen scheint eine physiologische Bedeutung der IDO-2 in der Pathogenabwehr sehr unwahrscheinlich. Diese Vermutung wird durch Daten aus einem *in vivo* Infektionsmodell mit *Plasmodium berghei* infizierten Mäusen bestätigt. In diesen Experimenten wurde durch die Infektion mit dem Malaria-Erreger eine starke Induktion von *ido* detektiert, während *ido-2* nicht hochreguliert wurde. Auch in *ido* k.o. Mäusen konnte nach Infektion mit *P. berghei* keine Induktion von *ido-2* nachgewiesen werden (Ball *et al.*, 2007). Gegen eine Rolle der IDO-2 im Infektionsgeschehen spricht auch die Tatsache, dass, soweit bisher bekannt, die klassischen proinflammatorischen Zytokine an einer Regulation des *ido-2* Gens nicht beteiligt sind. Endgültige Aussagen zur funktionellen Bedeutung der IDO-2 in der Pathogenese von Infektionskrankheiten könnten Experimente mit IDO-2 k.o. Tieren erbringen, die momentan jedoch noch nicht zur Verfügung stehen.

Die Rolle der humanen IDO-2 in immunregulatorischen oder antimikrobiellen Effektorsystemen ist noch schwerer abzuschätzen. Zusätzlich zu den oben erwähnten Überlegungen zur Rolle der murinen IDO-2 gibt es weitere Beobachtungen, die eine physiologische Bedeutung dieses Enzyms einschränken. So konnte nachgewiesen werden, dass humane DC *ido* und *ido-2* exprimieren, die IDO-2 jedoch im Gegensatz zur IDO enzymatisch inaktiv ist (Löb *et al.*, 2008). Aus vergleichenden Studien ist ferner bekannt, dass es mindestens zwei verschiedene Mutationen in der humanen IDO-2 gibt, die mit einem Verlust der Enzymaktivität einhergehen. Diese SNP (*single nucleotide*

polymorphisms) sind sehr weit verbreitet und es wurde gezeigt, dass über die Hälfte aller Europäer und Asiaten, sowie ein Viertel aller Individuen afrikanischer Abstammung keine Allele für eine funktionell aktive IDO-2 besitzen (Metz *et al.*, 2007). Weiterhin gibt es keinen Hinweis auf eine häufigere Erkrankungsrate in diesen Populationen.

4.4. Herpesviren: Blockade antimikrobieller Effekte durch Hemmung der IDO-Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die antimikrobielle Effektorleistung von Zellen analysiert, die für unterschiedliche Zeiträume mit IFN- γ vorstimuliert wurden. Dieses entspricht *in vivo* einer fortgeschrittenen Infektion, bei der das Immunsystem bereits aktiviert ist und eine große Menge an Zytokinen produziert wird, der Erreger sich aber noch in seiner Expansionsphase befindet. Interferone im Allgemeinen induzieren viele antimikrobielle Effektorfunktionen und während der Koevolution von Pathogen und Wirt haben viele Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, um sich den IFN- γ induzierten antimikrobiellen Effekten zu entziehen. So produzieren z.B. einige Stämme von *Staphylococcus aureus* das sogenannte Staphylokokken Enterotoxin B, was neben seiner Wirkung im Magen-Darmtrakt auch als Superantigen wirkt und eine unkoordinierte Zytokinfreisetzung induziert (Spiekermann *et al.*, 1998). Somit wird der geregelte Ablauf der Immunantwort verhindert (Fleischer, 1994). Toxoplasmen wiederum sind in der Lage, z.B. das Enzym Superoxid-Dismutase zu produzieren und können so den Ablauf der IFN- γ induzierten Oxidative-Burst-Reaktion verhindern (Sibley *et al.*, 1986). Herpesviren hingegen haben Mechanismen entwickelt, die mit der IFN- γ Signalkaskade interagieren und so eine Signalvermittlung in den Zellkern blockieren (Le *et al.*, 2008).

Im Rahmen dieser Arbeit war besonders das Cytomegalievirus als Pathogen von Interesse. Für das Cytomegalievirus ist, ebenso wie für *Toxoplasma gondii* eine sehr hohe Durchseuchungsrate in der Bevölkerung beschrieben. Beide Mikroorganismen verursachen zumeist asymptomatische Infektionen und sind in der Humanmedizin bei immunkompetenten Patienten hauptsächlich während der Gravidität als Pathogene für das ungeborene Kind bekannt. Häufig findet man aber Toxoplasmen und Cytomegalieviren als Pathogene bei immunsupprimierten Patienten, wobei beide Pathogene sowohl die Lunge, als auch das ZNS und das Auge befallen können. Eine weitere Gemeinsamkeit von Cytomegalieviren und Toxoplasmen ist die Sensitivität gegenüber IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekten. So können z.B. retinale Pigmentepithelzellen nach IFN- γ Stimulation eine Toxoplasmen- bzw. Cytomegalievirusvermehrung inhibieren (Nagineni *et*

al., 1996; Bodaghi *et al.*, 1999) In diesen Publikationen wurden Pigmentepithelzellen als ein Modell für die CMV- bzw. Toxoplasmen-induzierte Retinitis benutzt, eine Erkrankung, die bei AIDS-Patienten nicht selten zur Degeneration der Netzhaut oder zur Blindheit führt. Es zeigte sich, dass der antivirale und der antiparasitäre Effekt in den IFN- γ -stimulierten retinalen Pigmentepithelzellen durch die Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass die IDO-Aktivität der hauptsächliche Vermittler der antimikrobiellen Effekte in den retinalen Pigmentepithelzellen ist.

Auch humane Fibroblasten können einen starken, IDO-abhängigen antiparasitären Effekt gegen Toxoplasmen vermitteln (Pfefferkorn, 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass humane Fibroblasten auch das Wachstum von hCMV, abhängig von Intensität der IDO-Aktivität, inhibieren. Die Sensitivität von hCMV gegenüber IDO-vermittelte Effekten konnte durch eine Zugabe von L-Tryptophan, als auch durch eine Zugabe des IDO-Inhibitors 1-L-MT aufgehoben werden (Bodaghi *et al.*, 1999; Meisel *et al.*, eingereicht 2009). Im Infektionsmodell mit Fibroblasten und hCMV war zudem, wie in dieser Arbeit bereits beschrieben, auffällig, dass die Stärke des IFN- γ -vermittelten Effektes von der hCMV-Infektionsdosis abhängig war. Aus der Literatur ist bekannt, dass hCMV den IFN- γ Signalweg inhibiert, insofern war der Befund, dass IFN- γ einen antiviralen Effekt gegen hCMV vermitteln kann, zunächst überraschend. Das IFN- γ -Signal in den Zellen wird über den JAK-STAT-Signalweg (Abb. 4.1.) vermittelt und es konnte gezeigt werden, dass hCMV in der Lage ist, diesen Signalweg zu inhibieren, indem es in der Anwesenheit von hCMV zu einer Degradation von JAK1 kommt (Miller *et al.*, 1998). Dieser JAK1-Mangel führt dazu, dass STAT1 Moleküle nicht mehr phosphoryliert werden können, die ansonsten, aktiviert durch die Phosphorylierung, durch ihre Translokation in den Nukleus die Transkription von *ido* initiieren.

In einer neueren Publikation wird ein zusätzlicher hCMV-induzierter Effekt auf den JAK-STAT-Signalweg beschrieben. Es zeigte sich, dass durch hCMV eine Aktivierung von SHP2 (*src homology region 2 domain-containing phosphatase2*), einer ubiquitär vorkommenden Tyrosin-Phosphatase, stattfindet. Diese Phosphatase ist in der Lage STAT1 zu dephosphorylieren (Wu *et al.*, 2002). Somit kommt es nicht zur IFN- γ -induzierten Bildung von STAT1 Homodimeren (Baron *et al.*, 2008) und auch nicht zur Translokation und anschließender Transkription GAS-abhängiger Gene, z. B. *ido*.

Die Beobachtung, dass die Stärke des IFN- γ -induzierten antiviralen Effektes abhängig von der Infektionsdosis mit hCMV ist, könnte zumindest zum Teil durch eine Hemmung des IFN- γ Signalweges durch die Virusinfektion zurückzuführen sein. Es ist also möglich, dass

die hohe Infektionsdosis in unserem Infektionsmodell zu einer Hemmung der IFN- γ induzierten IDO-Induktion und somit zu einer Hemmung des antiviralen Effektes führt. Um diese Hypothese weiter zu analysieren, wurde das bisher verwendete Kultursystem modifiziert. Die Vorinkubationszeit mit IFN- γ vor der Infektion mit hCMV wurde verkürzt, bzw. die Infektion der Fibroblasten als Wirts- bzw. Effektorzellen gleichzeitig mit der IFN- γ -Stimulation durchgeführt. *In vivo* findet sich eine solche Situation in der Frühphase einer Infektion, in der das Pathogen gerade in den Wirtsorganismus eingedrungen ist und IFN- γ von voraktivierten T-Zellen oder, im Rahmen der angeborenen Immunität, von NK-Zellen produziert wird.

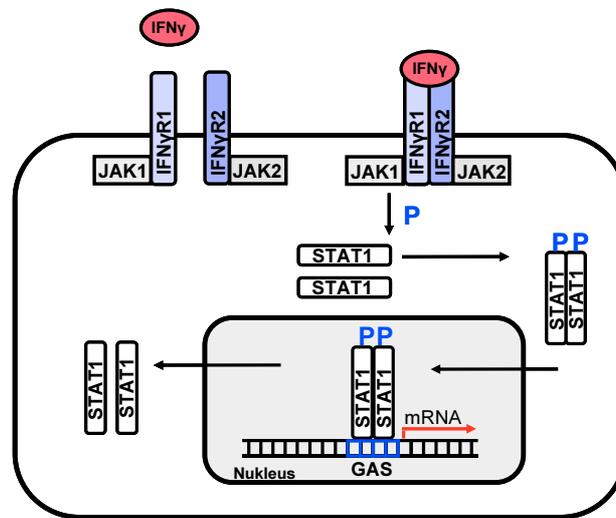


Abb. 4.1.: Die IFN- γ induzierte *ido*-Transkription wird durch den JAK-STAT-Weg vermittelt. Der humane Interferon- γ -Rezeptor Komplex besteht aus einem Heterodimer aus jeweils zwei IFN γ R1- und IFN γ R2-Untereinheiten (in Abbildung vereinfacht dargestellt). In unstimulierten Zellen sind diese beiden Untereinheiten nicht verbunden. Sie sind aber mit ihrer intrazellulären Domäne mit jeweils einer Janus-Kinase assoziiert. Die Bindung von IFN- γ an IFN γ R1 induziert eine rasche Dimerisierung der beiden IFN γ R-Untereinheiten. In diesem Komplex transaktivieren dann Janus-Kinase 1 und Janus-Kinase 2 und es kommt zu einer Phosphorylierung von STAT1. Diese Tyrosin-phosphorylierten STAT1 Moleküle dissoziieren vom Rezeptor und bilden Homodimere. Diese aktivierten Homodimere wandern in den Nucleus, um dort an induzierbare Promotor-Regionen zu binden, die ein GAS-Motiv besitzen. Dadurch wird die Transkription von *ido* induziert. Die STAT1-Homodimere werden durch Phosphatasen im Nucleus dephosphoryliert, was zur Inaktivierung und zum Rücktransport ins Zytoplasma führt.

IFN γ = Interferon- γ ; IFN γ R1 = Interferon- γ -Rezeptor 1; IFN γ R2 = Interferon- γ -Rezeptor 2; JAK1= Janus-Kinase 1 (zytoplasmatische Tyrosinkinase); JAK2 = Janus-Kinase 2 (zytoplasmatische Tyrosinkinase); STAT1 = *signal transducer and activator of transcription*; P = Phosphorylierung; GAS = gamma-aktivierte Sequenz.

In diesen Untersuchungen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit hCMV, die parallel zur IFN- γ -Stimulation erfolgte, in der Lage war, die IFN- γ -induzierte IDO-Aktivität komplett zu inhibieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um eine funktionelle Enzyminhibition handelt, sondern dass die hCMV Infektion die Produktion des IDO-Proteins unterbindet. Der inhibitorische Effekt von

hCMV ist vom Zeitpunkt der Infektion abhängig, und umso geringer, je später nach der IFN- γ Aktivierung die Infektion erfolgt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hCMV-Infektion und die IFN- γ induzierteIDO-Aktivität sich gegenseitig blockieren. Eine nicht zu hohe Infektionsdosis vorausgesetzt, können Fibroblasten, nach erfolgter IFN- γ Stimulation, das Viruswachstum hemmen. Trifft das Virus jedoch auf eine nicht aktivierte Wirtszelle, so kann hCMV dieIDO-Induktion inhibieren und sich erfolgreich, auch in der späteren Gegenwart von IFN- γ , replizieren. Es erscheint damit möglich, dass *in vivo* die Geschwindigkeit und das Ausmaß der IFN- γ Produktion sowie die Infektionsdosis für den Verlauf einer Infektion mit hCMV entscheidend sein können.

Wie bereits geschildert, kann dieIDO neben ihrer Aktivität gegen hCMV auch antibakterielle Effekte vermitteln. Wenn die hCMV Infektion zu einer Hemmung des IFN- γ Signalweges führt, dann hat dieses wahrscheinlich auch Folgen für den Ablauf einer zusätzlichen bakteriellen Infektion. Solche Zusammenhänge sind in der Literatur vielfältig beschrieben, so kann z.B. eine Maserninfektion zu einer Reaktivierung einer latenten Tuberkulose führen. In dieser Arbeit wurde daher zusätzlich der Einfluss einer hCMV-Infektion auf die Vermittlung von IFN- γ -induzierten antimikrobiellen Effekten untersucht. Dies ist *in vivo* von großer Relevanz, denn eine Reaktivierung von hCMV erfolgt in der Regel erst, wenn das bereits Immunsystem bereits geschwächt ist (AIDS, Chemotherapie, immunsuppressive Therapie). In diesen Fällen führt hCMV zu einer schweren Erkrankung, die in fast allen Organen zu schwersten generalisierten Entzündungen führt, die oftmals zusammen mit weiteren Komplikationen wie z.B. bakteriellen Infektionen lebensbedrohlich werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine hCMV Infektion in Fibroblasten die antibakterielle Kapazität dieser Zellen gegenüber Staphylokokken vollständig blockiert. Die hCMV-abhängige Aufhebung der antibakteriellen Effekte wurde geringer, je später nach IFN- γ -Stimulation die hCMV-Infektion erfolgte. Diese *in vitro* Daten lassen vermuten, dass durch eine hCMV-Infektion die Vermittlung antibakterieller Effekte durch dieIDO eingeschränkt wird, was insbesondere bei immunsupprimierten Patienten, die klinisch manifest an hCMV erkranken, eine weitere Verschlechterung der Abwehrlage bedeutet.

Neben hCMV wurde auch für andere Viren, wie für das Vaccinia Virus (Impfvirus gegen Pocken) (Najarro *et al.*, 2001), das Sendai Virus (murines Parainfluenza Virus Typ 1) (Komatsu *et al.*, 2002) oder das Nipah Virus (ein zoonotischer Erreger, der zu einer

Lungenentzündung und zur Enzephalitis führen kann) (Shaw *et al.*, 2004) gezeigt, dass diese sich ebenfalls durch den Eingriff in den JAK-STAT-Signalweg der IFN- γ -Wirkung entziehen. Um nun zu überprüfen, ob auch in anderen *in vitro* Infektionsmodellen eine Beeinflussung von antibakteriellen Effekten durch eine Virusinfektion zu beobachten ist, wurde in dieser Arbeit zusätzlich ein Modell der Virusenzephalitis genutzt. Dazu wurde der Effekt einer Herpes simplex Virus Typ 1 Infektion von Astrozytomzellen (86HG39) auf die IFN- γ -induzierteIDO-Aktivität und deren antibakterielle Effektorleistung gegen Streptokokken der Gruppe B analysiert. In Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass IFN- γ -stimulierte 86HG39 Zellen das Wachstum von Streptokokken der Gruppe B (Mackenzie *et al.*, 1998) und das Wachstum von Herpes simplex Virus Typ 1 (Adams *et al.*, 2004 B) inhibieren können. Die im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Daten belegen zusätzlich, dass, ähnlich wie bei hCMV, die antivirale Effektorleistung der Astrozytomzellen von der Infektionsdosis abhängt. Auch in diesem Modell der Virusenzephalitis war eine IDO-abhängige Hemmung des Viruswachstums nur bei einer Infektion mit einer geringen Virusmenge zu beobachten, während eine Infektion mit einer hohen Dosis HSV durch die IFN- γ -aktivierten Astrozytomzellen nicht kontrolliert werden konnte. Weitere Daten belegen, dass eine HSV-Infektion zeitgleich mit der IFN- γ Aktivierung auch in den Astrozytomzellen eine Hemmung der IDO-Aktivität bewirkt und somit die Vermittlung von antibakteriellen Effekten entweder behindert oder bei gleichzeitiger Infektion und IFN- γ -Stimulation komplett blockiert.

Klinisch ist nicht nur eine Koinfektion mit hCMV und Bakterien bedeutsam, sondern auch eine Koinfektion mit hCMV und Toxoplasmen. Dabei ist bekannt, dass sowohl Toxoplasmen als auch hCMV hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten eine klinische Erkrankung verursachen, wobei sich beide Erkrankungen häufig am Auge, dem ZNS und der Lunge manifestieren. Dabei ist eine gleichzeitige aktive Infektion mit beiden Erregern bei immunsupprimierten Patienten bei der bekannten hohen Durchseuchungsrate wahrscheinlich. Um eine Interaktion dieser beiden Erreger zu analysieren, wurden die IFN- γ -stimulierten und hCMV-infizierten Fibroblasten zusätzlich noch mit *Toxoplasma gondii* infiziert. Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde belegen eindeutig, dass eine aktive hCMV Infektion zu einer Abschwächung der antiparasitären Effektorleistung der humanen Fibroblasten gegen Toxoplasmen führt. Damit beeinflusst die hCMV-Infektion die antibakteriellen und antiparasitären Effekte gleichermaßen. Diese Befunde sind nicht einfach redundant, sondern die Ergebnisse in dem Parasitenmodell liefern zusätzliche Erkenntnisse. Während die hCMV-vermittelte Hemmung der IDO-Aktivität und der

antibakteriellen Effekte auch durch unspezifische zytolytische hCMV Effekte erklärt werden könnten, scheiden diese in dem Parasitenmodell aus. *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit und benötigt für seine Replikation lebende Wirtszellen. Da in dem hier durchgeführten Experiment die antiparasitäre Wirkung derIDO durch eine hCMV-Infektion aufgehoben werden konnte, wird deutlich, dass hCMV- infizierte Fibroblasten noch als Wirtszellen für Toxoplasmen dienen können und daher unzweifelhaft vital sind.

Auch hier sind der Zeitpunkt und das Ausmaß der IFN- γ -Stimulation für den Infektionsverlauf entscheidend. Eine frühe Produktion von IFN- γ durch T-Zellen oder NK-Zellen kann einerseits durch die antivirale Wirkung derIDO-Induktion die hCMV-Infektion eindämmen und andererseits gleichzeitig eine bestehende Infektion mit Bakterien oder Parasiten durch die Initiation weiterer antimikrobieller Effektormechanismen hemmen. Wenn es allerdings zu einer massiven Reaktivierung von oder Neuinfektion mit hCMV in Rahmen einer Immunsuppression kommt, so könnte das funktionell reduzierte Immunsystem durch die Anwesenheit von hCMV noch weiter eingeschränkt werden, indem auch IFN- γ -vermittelte antimikrobielle Effektormechanismen inhibiert werden können.

4.5. hCMV in der Immunregulation

Wie bereits erwähnt, kann hCMV durch einen Eingriff in den JAK-STAT-Signalweg einen Einfluss auf die IFN- γ -vermittelten Wirkungen nehmen und dadurch die antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte von IFN- γ dosis- und zeitabhängig modulieren. Daneben gibt es noch viele weitere Mechanismen, über die hCMV die Immunantwort beeinflusst. So kann hCMV beispielsweise ein virales Interleukin 10 bilden. Diese Zytokin beeinflusst die Entwicklung und Reifung von Dendritischen Zellen (Chang *et al.*, 2004), kann die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (z. B. IL-12) inhibieren und kann, neben dem adaptiven, auch das angeborene Immunsystem, beeinflussen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Migration von DC durch die hCMV-vermittelte Hemmung der cc Chemokin Rezeptoren CCR1 und CCR5 inhibiert wird (Varani *et al.*, 2005), was die Immunantwort der Wirtszellen verzögert. Zudem ist das Cytomegalievirus in der Lage, auch in die MHC Klasse I und MHC Klasse II vermittelte Antigen-Präsentation einzugreifen. So wird durch die Inhibition der Expression von MHC Klasse I Molekülen die Aktivierung von CD8-positiven T-Lymphozyten unterbunden, (Hosenpud *et al.*, 1991; Benz *et al.*, 2001). Zusätzlich wird durch eine hCMV Infektion auch die MHC Klasse II Expression auf den Zelloberflächen herunterreguliert und dadurch die Antwort von CD4-positiven Zellen behindert (Cebulla *et al.*, 2002). Somit verfügt hCMV über viele Möglichkeiten, die

Immunantwort zu inhibieren. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine aktive hCMV Infektion hauptsächlich bei immunsupprimierten Patienten beobachtet wird, bedeutet dieser negative Einfluss von hCMV auf die Immunreaktion eine weitere Reduktion der Abwehrleistung. Von besonderer Bedeutung ist dieser Zusammenhang auch bei einer Organtransplantation, während und nach der die Patienten auf eine iatrogene Immunsuppression angewiesen sind, um eine Abstoßung des transplantierten Organs zu vermeiden. Durch diese Immunsuppression steigt für den Patienten aber gleichzeitig die Gefahr eine hCMV-Infektion oder -Reaktivierung zu erleiden. So ist die hCMV-Infektion klinisch die wichtigste opportunistische Virusinfektion nach einer Nierentransplantation. Sie führt zu einer erhöhten Sterblichkeit, einer Reduktion der Nierenfunktion, einer erhöhten Infektionsrate und erniedrigt signifikant die Überlebenszeit des transplantierten Organs (Tian *et al.*, 2008; Kranz *et al.*, 2008). Die genauen Grundlagen, warum die hCMV-Infektion mit der Abstoßung des Organs assoziiert ist, sind noch unbekannt. Ein möglicher Mechanismus könnte die Hochregulation der Transkription und Expression von IL-2 und seines Rezeptors durch die Expression der hCMV Antigene sein (Geist *et al.*, 200). Dadurch erfolgt eine verstärkte T-Zellproliferation und gleichzeitig wird auch die hemmende Wirkung des Immunsuppressivums Cyclosporin (Calcineurin-Inhibitor) auf die IL-2 Sekretion aufgehoben. In der Summe wird dadurch eine verstärkte Immunreaktion bedingt, die zu einer vermehrten Aktivität von T-Zellen, aber auch von NK- und B-Zellen führt und dadurch eine Transplantatabstoßung begünstigt (Geist *et al.*, 1992).

Wie im Rahmen dieser Arbeit bereits geschildert, stellt die Aktivierung der Indolamin 2,3-Dioxygenase einen wichtigen immunregulatorischen Effekt dar. Die immunologische Wirkung der Indolamin 2,3-Dioxygenase spielt in der Transplantationsimmunologie eine große Rolle. Eine der gefürchtetsten Komplikationen nach einer Stammzelltransplantation ist die *Graft-versus-Host-Reaktion* (GvHR). Bei dieser Erkrankung führt die Aktivierung immunkompetenter alloreaktiver T-Zellen des Spenders bei der Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen zu einer Gewebszerstörung beim Empfänger. Bei einer Transplantation von soliden Organen ist hingegen die *Host-versus-graft-Reaktion* von besonderer Bedeutung, die von alloreaktiven T-Zellen des Empfängers getragen wird und zu massiven entzündlichen Reaktionen im Spenderorgan führt.

Die Beteiligung vonIDO an der Verhinderung der GvHR konnte bereits in einem *in vivo* Modell nachgewiesen werden (Jasperson *et al.*, 2008). Dabei wurde gezeigt, dass die GvHR, die durch die Aktivierung von Donor T-Zellen durch die APZ des Wirtes entsteht, in *ido*-k.o. Mäusen stärker ausgeprägt war. Es konnte besonders im Kolon der IDO-defizienten Tiere

eine verstärkte Infiltration von proliferierenden CD4 und CD8 Zellen und eine verminderte Apoptoserate nachgewiesen werden, die mit einem kürzeren Überleben der Tiere einherging. Bei Wildtyptieren zeigte sich hingegen, dass eine besonders hoheIDO-Expression im Colon zu messen war, die eine T-Zell-Proliferation und damit Entzündungen und Abstoßungsreaktionen verhinderte.

Es konnte auch bestätigt werden, dass ein Mangel an IFN- γ -induzierterIDO-Expression mit einer hochgradigen GvHR assoziiert war (Steckel *et al.*, 2003). In dieser Studie wurde *in vitro* dieIDO-Expression nach IFN- γ Stimulation in DC von Patienten nach einer Stammzelltransplantation untersucht und mit der Schwere ihrer GvHR verglichen. Es konnte festgestellt werden, dass DC von Patienten mit einer schweren GvHR, im Gegensatz zu den DC von Patienten mit einer sehr milden GvHR, nicht in der Lage waren IFN- γ -induziertIDO zu exprimieren.

Zusammenfassend könnte die Modulation bzw. Verstärkung des Tryptophan-Stoffwechsels eine effektive Strategie sein, um den Komplikationen, die durch eine unerwünschte Immunstimulation während bzw. nach einer Transplantation entstehen, entgegen zu wirken. Wenn diese immunregulatorischen Effekte derIDO durch hCMV aufgehoben werden, dann ist ebenfalls eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems wahrscheinlich, was im Endeffekt auch zu einer verstärkten Transplantatabstoßung führen kann.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde zeigen eine neue Möglichkeit auf, wie eine hCMV Infektion im Rahmen einer Transplantation die Abstoßungsreaktion verstärkt. In der vorliegenden Arbeit wurde der immunregulatorische Einfluss der IFN- γ -induziertenIDO-Aktivierung auf das T-Zellwachstum genutzt, um den Einfluss einer hCMV-Infektion auf die T-Zellaktivierung zu untersuchen. Dabei konnte erstmals nachgewiesen werden, dass durch eine hCMV-Infektion in Parenchymzellen die IFN- γ -induzierte undIDO-vermittelte T-Zell-Toleranzinduktion völlig aufgehoben wurde. IFN- γ -stimulierte Fibroblasten könnenIDO-abhängig selbst eine polyklonale Aktivierung durch den CD3 Antikörper OKT3 inhibieren. Sie verlieren jedoch diese wichtige gewebsprotektive und immunsuppressive Eigenschaft nach einer hCMV Infektion völlig. In der *in vivo* Situation bedeutet die Ausschaltung eines immunsuppressiven Effektes eine verstärkte T-Zellaktivierung. Dies führt im Rahmen der Organtransplantation zu einer unerwünschten Verstärkung der Alloreaktion und könnte die klinische beobachtete Tatsache erklären, dass eine hCMV Infektion zu einer Verkürzung der Transplantatüberlebenszeit führt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass für die immunregulatorischen und antimikrobiellen Effektormechanismen derIDO, die

enzymatische Umsetzung von Tryptophan zu Kynurenin verantwortlich ist. Der Einfluss anderer IFN- γ -induzierbarer, IDO-unabhängiger Effekte konnte durch eine rekombinante Expression des Enzyms und die Verwendung des IDO-spezifischen Inhibitors 1-L-MT ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass ein weiteres Tryptophan-abbauendes Enzym, IDO-2, in der Lage ist, einen antimikrobiellen Effekt zu vermitteln. Weiterhin konnte hier nachgewiesen werden, dass die IDO-2 im Vergleich zur IDO nur eine geringe Enzymaktivität aufweist, sodass eine Rolle der IDO-2 bei der Pathogenabwehr *in vivo* eher unwahrscheinlich ist.

Von größerer potentieller *in vivo* Relevanz ist jedoch der Befund, dass eine Herpesvirusinfektion IFN- γ -induzierte IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte inhibiert, was den Verlauf opportunistischer Infektionen bei immunsupprimierten Patienten kompliziert. Von großer praktischer Bedeutung könnten die hier gezeigten Daten zur Beeinflussung der Immunantwort durch hCMV sein. Die hier beschriebene Aufhebung des immunsuppressiven Effektes der IDO durch die Virusinfektion ist für transplantationsimmunologische Fragestellungen relevant. Es ist denkbar, dass durch ein Eingreifen in die infektionsvermittelte Regulation der IDO-Aktivität das Risiko einer Transplantatabstoßungsreaktion vermindert werden kann.

5. Zusammenfassung

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein IFN- γ -induzierbares Enzym, das Tryptophan zu Kynurenin verstoffwechselt und immunregulatorische und antimikrobielle Aufgaben hat. Diese Eigenschaften wurden in dieser Arbeit in verschiedenen Infektionsmodellen zur Pneumonie, Meningitis und Enzephalitis untersucht. Dabei zeigte sich, durch die Verwendung eines IDO-spezifischen Inhibitors und der zusätzlichen rekombinanten, IFN- γ -unabhängigen IDO-Expression, dass die IDO-Enzymaktivität die alleinige Ursache für die beobachtete Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii*, Herpes simplex Virus Typ I und humanem Cytomegalievirus ist.

Funktionelle Untersuchungen der erst kürzlich entdeckten, Tryptophan-abbauenden, Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) in vergleichbaren *in vitro* Systemen ergaben, dass diese ebenfalls antibakterielle Effekte vermitteln kann, die aber aufgrund der geringen Enzymaktivität *in vivo* wahrscheinlich nicht relevant sind.

In weiteren Analysen wurde die in der Literatur in Makrophagen und Dendritischen Zellen beschriebene immunregulatorische Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase auch für Epithelzellen und Fibroblasten gezeigt. Unter Kombination der genannten Infektionsmodelle mit den Untersuchungen zur Immunregulation konnte erstmals nachgewiesen werden, dass eine Infektion mit Cytomegalieviren eine Hemmung der IDO-Aktivität bewirkt. Als Konsequenz zeigte sich, dass hCMV-infizierte Zellen nicht mehr in der Lage sind, das Wachstum von Bakterien und Parasiten zu unterbinden. Zudem hatten diese virusinfizierten Zellen auch ihre immunregulatorische Kapazität verloren. Für die *in vivo* Situation könnte dies bedeuten, dass die Infektion mit hCMV zu einer Aufhebung der antimikrobiellen Effektorleistungen von Parenchymzellen führt und zusätzlich überschießende Immunreaktionen begünstigt. Dieser Zusammenhang zwischen Virusinfektion und IDO-Induktion ist insbesondere bei Organtransplantationen von Bedeutung. Aus klinischen Beobachtungen ist bekannt, dass nach Nierentransplantationen, eine aktive hCMV Infektion sowohl ein erhöhtes Infektionsrisiko, als auch ein erhöhtes Risiko für eine Transplantatabstoßungsreaktion darstellt. Beide Effekte können durch diese hier geschilderten *in vitro* Beobachtungen zur Beeinflussungen der IDO-Aktivität durch eine hCMV-Infektion funktionell erklärt werden.

6. Summary

The IFN- γ -inducible enzyme Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) metabolizes Tryptophan to kynurenine. It also mediates immunoregulatory and antimicrobial properties which were examined in this work by establishing and investigating several infection models concerning pneumonia, meningitis and encephalitis. We showed that by the use of the specific IDO-inhibitor 1-L-MT and by the additional IFN- γ -independent IDO-expression the enzyme-activity is the only cause of the observed inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Toxoplasma gondii* growth and herpes simplex virus and Cytomegalovirus replication.

Further functional investigations of the recently discovered tryptophan-degrading enzyme Indoleamine 2,3-dioxygenase-2 (IDO-2) in comparable *in vitro* systems showed that this enzyme is also able to mediate antibacterial effects as well. However, due to its weak activity the *in vivo* function this effect might not be relevant.

Further analyses demonstrated the immunoregulatory properties of IDO in epithelial cells and fibroblasts, which have been described in the same manner for macrophages and dendritic cells in literature. It was shown for the first time that an infection with cytomegalovirus results in an inhibition of IDO-activity. Consequently, the hCMV-infected cells were no longer able to restrict the bacterial and parasitic growth and, furthermore, these hCMV-infected cells lost their IDO-mediated immunoregulatory capacity. For the *in vivo* situation these effects may indicate that an infection with hCMV results in an inhibition of antimicrobial effects in parenchymal cells and additionally promotes an excessive immunoreaction. This coherence between virus infection and IDO-induction still gains more importance in the case of organ transplantation. From clinical observations it is known that after kidney transplantations an active hCMV infection results in an increased risk of infection and in a higher risk of transplant rejection. Both effects could be explained by the observations of the hCMV-infection's influence on IDO-activity in the *in vitro* systems in this work.

7. Literaturverzeichnis

Adam R., Rüsing D., Adams O., Ailyati A., Sik Kim K., Schrotten H., Däubener W. (2005). Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb Haemost*; 94:341–6.

Adams O., Besken K., Oberdörfer C., MacKenzie C. R., Takikawa O., Däubener W. (2004 A). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol*; 78:2632–6.

Adams O., Besken K., Oberdörfer C., MacKenzie C. R., Rüsing D., Däubener W. (2004 B). Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect*; 6:806–12.

Babcock T. A., Carlin J. M. (2000). Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*; 12:588–94.

Ball H. J., Sanchez-Perez A., Weiser S., Austin C. J., Astelbauer F., Miu J., McQuillan J. A., Stocker R., Jermin L. S., Hunt N. H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*; 396:203–13.

Ball H. J., Yuasa H. J., Austin C. J., Weiser S., Hunt N. H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:467–71.

Baron M., Davignon J. L. (2008). Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol*; 181:5530–6.

Bauer T. M., Jiga L. P., Chuang J. J., Randazzo M., Opelz G., Terness P. (2005). Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int*. 18:95–100.

Beatty W. L., Morrison R. P., Byrne G. I. (1994). Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*; 58:686–99.

Benz C., Reusch U., Muranyi W., Brune W., Atalay R., Hengel H. (2001). Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol*; 82:2061–70.

Berardi A., Tzialla C., Riva M., Cerbo R. M., Creti R. (2007). Group B streptococcus: early- and late-onset infections. *J Chemother*; 2:24–7.

Berner R. (2004). Significance, management and prevention of Streptococcus agalactiae infection during the perinatal period. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 2:427–37.

- Beutelspacher S. C., Pillai R., Watson M. P., Tan P. H., Tsang J., McClure M.O., George A. J., Larkin D. F. (2006).** Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol*;36:690–700.
- Bilzer T., Stavrou D., Dahme E., Keiditsch E., Bürrig K. F., Anzil A. P., Wechsler W. (1991).** Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 418:281–93.
- Blanco P., Palucka A. K., Pascual V., Banchereau J. (2008).** Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev*; 19:41–52.
- Bodaghi B., Goureau O., Zipeto D., Laurent L., Virelizier J. L., Michelson S. (1999).** 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*; 162:957–64.
- Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. (1997).** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*; 15:749–95.
- Bogdan C. (2001).** Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol*; 2:907–16.
- Bokarewa M. I., Jin T., Tarkowski A. (2006).** Staphylococcus aureus: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol*;38:504–9.
- Burkin D. J., Kimbro K. S., Barr B. L., Jones C., Taylor M. W., Gupta S. L. (1993).** Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics*; 17:262–3.
- Byrne G. I., Lehmann L. K., Landry G. J. (1986).** Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells. *Infect Immun*; 53:347–51.
- Cebulla C. M., Miller D. M., Zhang Y., Rahill B. M., Zimmerman P., Robinson J. M., Sedmak D. D. (2002).** Human cytomegalovirus disrupts constitutive MHC class II expression. *J Immunol*; 169:167–76.
- Cerávolo I. P., Chaves A. C., Bonjardim C. A., Sibley D., Romanha A. J., Gazzinelli R. T. (1999).** Replication of Toxoplasma gondii, but not Trypanosoma cruzi, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. *Infect Immun*; 67:2233–40.
- Chang W. L., Baumgarth N., Yu D., Barry P. A. (2004).** Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *J Virol*; 78:8720–31.
- Chen G., Goeddel D. V. (2002).** TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*; 296:1634–5.

- Chomczynski P., Sacchi N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156–9.
- Cohen J. I., Corey G. R. (1985).** Cytomegalovirus infection in the normal host. *Medicine*; 64:100–14.
- Cohen S. N., Chang A. C., Hsu L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 69:2110–4.
- Collins T., Korman A. J., Wake C. T., Boss J. M., Kappes D. J., Fiers W., Ault K. A., Gimbrone M. A. Jr., Strominger J. L., Pober J. S. (1984).** Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81:4917–21.
- Cook C. H., Bickerstaff A. A., Wang J. J., Nadasdy T., Della Pelle P., Colvin R. B., Orosz C. G. (2008).** Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO. *J Immunol*; 180:3103–12.
- Corbett J. A., Kwon G., Turk J., McDaniel M. L. (1993).** IL-1 beta induces the coexpression of both nitric oxide synthase and cyclooxygenase by islets of Langerhans: activation of cyclooxygenase by nitric oxide. *Biochemistry*; 32:13767–70.
- Curti A., Pandolfi S., Valzasina B., Aluigi M., Isidori A., Ferri E., Salvestrini V., Bonanno G., Rutella S., Durelli I., Horenstein A. L., Fiore F., Massaia M., Colombo M. P., Baccarani M., Lemoli R. M. (2007).** Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood*; 109:2871–7.
- Däubener W., Hucke C., Seidel K., Hadding U., MacKenzie C. R. (1999).** Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infect Immun*; 67:5615–20.
- Däubener W., Pilz K., Seghrouchni Zennati S., Bilzer T., Fischer H. G., Hadding U. (1993).** Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol*; 43:31–8.
- Däubener W., Posdziech V., Hadding U., MacKenzie C. R. (1999).** Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol*; 187:143–7.
- Däubener W., Remscheid C., Nockemann S., Pilz K., Seghrouchni S., Mackenzie C., Hadding U. (1996).** Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol*; 26:487–92.
- Däubener W., Spors B., Hucke C., Adam R., Stins M., Kim K. S., Schrotten H. (2001).** Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 69:6527–31.

- Däubener W., Wanagat N., Pilz K., Seghrouchni S., Fischer H. G., Hadding U. (1994).** A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods*; 168:39–47.
- Dai W., Gupta S. L. (1990).** Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem*; 265:19871–7.
- Dai W., Pan H., Kwok O., Dubey J. P. (1994).** Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J Interferon Res*; 14:313–7.
- Damato E. G., Winnen C. W. (2002).** Cytomegalovirus infection: perinatal implications. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*; 31:86–92.
- Darnell J. E. Jr., Kerr I. M., Stark G. R. (1994).** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*; 264:1415–21.
- Deckert-Schlüter M., Rang A., Weiner D., Huang S., Wiestler O. D., Hof H., Schlüter D. (1996).** Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest*; 75:827–41.
- Degrandi D., Konermann C., Beuter-Gunia C., Kresse A., Würthner J., Kurig S., Beer S., Pfeffer K. (2007).** Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol*; 179:7729–40.
- Demetriades D. (2008).** Evolving pathogens in the surgical intensive care unit: a 6-year experience. *J Crit Care*; 23:507–12.
- Dinarello C. A. (1997).** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*; 112:321S–329S.
- Ding A. H., Nathan C. F., Stuehr D. J. (1988).** Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*; 141:2407–12.
- Doyle A. M., Warburton K. M., Goral S., Blumberg E., Grossman R. A., Bloom R. D. (2006).** 24-week oral ganciclovir prophylaxis in kidney recipients is associated with reduced symptomatic cytomegalovirus disease compared to a 12-week course. *Transplantation*. 81:1106–11.
- Estrov Z., Talpaz M. (1996).** Role of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) in leukemia. *Cytokines Mol Ther*; 2:1–11.
- Eza D. E., Lucas S. B. (2006).** Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Med*; 7:415–20.
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. (2002).** T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*; 9:1069–77.

- Fallarino F., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Gizzi S., Asselin-Paturel C., Fioretti M. C., Trinchieri G., Grohmann U., Puccetti P. (2005).** Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol*; 17:1429–38.
- Fallarino F., Vacca C., Orabona C., Belladonna M. L., Bianchi R., Marshall B., Keskin D. B., Mellor A. L., Fioretti M. C., Grohmann U., Puccetti P. (2002).** Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int Immunol*; 14:65–8.
- Filice G. A., Clabots C. R., Riciputi P. E., Goñi-Laguardia O., Pomeroy C. (1999).** Changes in cytokine levels during reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in lungs. *Infect Immun*; 67:2082–9.
- Fleischer B. (1994).** Superantigens produced by infectious pathogens: molecular mechanism of action and biological significance. *Int J Clin Lab Res.*;24:193–7.
- Flückiger U., Trampuz A. (2001).** Pneumonia in the immune compromised host. *Ther Umsch*; 58:614–9.
- Fujigaki S., Takemura M., Hamakawa H., Seishima M, Saito K. (2003).** The mechanism of interferon-gamma induced anti *Toxoplasma gondii* by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues. *Adv Exp Med Biol*; 527:97–103.
- Fujigaki S., Saito K., Takemura M., Maekawa N., Yamada Y., Wada H., Seishima M. (2002).** L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 70:779–86.
- Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G. B. (2002).** Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*; 196:459–68.
- Gattoni A., Parlato A., Vangieri B., Bresciani M., Derna R..** Interferon-gamma: biological functions and HCV therapy (type I/II). *Clin Ter*; 157:377–86.
- Gazzinelli R. T., Hieny S., Wynn T. A., Wolf S., Sher A. (1993).** Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90:6115–9.
- Geist L. J., Dai L. Y. (2000).** Immediate early gene 2 of human cytomegalovirus increases interleukin 2 receptor-alpha gene expression. *J Investig Med*; 48:60–5.
- Geist L. J., Monick M. M., Stinski M. F., Hunninghake G. W. (1992).** Cytomegalovirus immediate early genes prevent the inhibitory effect of cyclosporin A on interleukin 2 gene transcription. *J Clin Invest*; 90:2136–40.

- Gershanovich M. L., Filatova L. V., Ketlinsky S. A., Simbirtsev A. S. (2001).** Recombinant human interleukin-1 beta: new possibilities for the prophylaxis and correction of toxic myelodepression in patients with malignant tumors. I. Phase I-II clinical trials of recombinant human interleukin-1 beta as a leukopoiesis stimulator in cancer patients receiving combination chemotherapy. *Eur Cytokine Netw*; 12:664–70.
- Gibson R. L., Nizet V., Rubens C. E. (1999).** Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. *Pediatr Res*; 45:626–34.
- Graham F. L., Smiley J, Russell W. C., Nairn R. (1977).** Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*; 36:59–74.
- Habara-Ohkubo A., Shirahata T., Takikawa O., Yoshida R. (1993).** Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 61:1810–3.
- Hainz U., Obexer P., Winkler C., Sedlmayr P., Takikawa O., Greinix H., Lawitschka A., Pötschger U., Fuchs D., Ladisch S., Heitger A. (2005).** Monocyte-mediated T-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*; 105:4127–34.
- Hamada S., Vearncombe M., McGeer A., Shah P. S. (2008).** Neonatal group B streptococcal disease: incidence, presentation, and mortality. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 21:53–7.
- Hansen A. M., Ball H. J., Mitchell A. J., Miu J., Takikawa O., Hunt N. H. (2004).** Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *Int J Parasitol*; 34:1309–19.
- Harris S., Ahlfors K., Ivarsson S., Lernmark B., Svanberg L. (1984).** Congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. *Ear Hear*; 5:352–5.
- Hassanain H. H., Chon S. Y., Gupta S. L. (1993).** Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem*. 268:5077–84.
- Hayaishi O., Hirata F., Fujiwara M., Senoh S., Tokuyama T. (1975).** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol*; 29:291–3.
- Hayashi T., Beck L., Rossetto C., Gong X., Takikawa O., Takabayashi K., Broide D. H., Carson D. A., Raz E. (2004).** Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*; 114:270–9.
- Hehlgans T., Pfeffer K. (2005).** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*; 115:1–20.
- Heieren M. H., van der Woude F. J., Balfour H. H. Jr.(1988).** Cytomegalovirus replicates efficiently in human kidney mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 85:1642–6.

- Hellenbrand W., Thierfelder W., Müller-Pebody B., Hamouda O., Breuer T. (2005).** Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 24:131–5.
- Hermentin K., Aspöck H. (1987).** Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*; 267:272–6.
- Herrmann D. J., Peppard W. J., Ledebor N. A., Theesfeld M. L., Weigelt J. A., Buechel B. J. (2008).** Linezolid for the treatment of drug-resistant infections. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 6:825–48.
- Hill M., Tanguy-Royer S., Royer P., Chauveau C., Asghar K., Tesson L., Lavainne F., Rémy S., Brion R., Hubert F. X., Heslan M., Rimbert M., Berthelot L., Moffett J. R., Josien R., Grégoire M., Anegon I. (2007).** IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol*; 37:3054–62.
- Hof H., Dörries R. (2005).** *Medizinische Mikrobiologie*; 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Hoffmann M. K. (1980).** Macrophages and T cells control distinct phases of B cell differentiation in the humoral immune response in vitro. *J Immunol*; 125:2076–81.
- Holländer G. A. (2006).** *Immunologie*; Urban und Fischer Verlag Elsevier GmbH, München.
- Hopkins F. G., Cole S. W. (1901).** A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J Physiol*; 27:418–28.
- Horwitt M. K. (1986).** Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6. *Am J Clin Nutr*; 44:973–85.
- Hosenpud J. D., Chou S. W., Wagner C. R. (1991).** Cytomegalovirus-induced regulation of major histocompatibility complex class I antigen expression in human aortic smooth muscle cells. *Transplantation*; 52:896–903.
- Hou D. Y., Muller A. J., Sharma M. D., DuHadaway J., Banerjee T., Johnson M., Mellor A. L., Prendergast G. C., Munn D. H. (2007).** Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Res*; 67:792–801.
- Howard A. D., Chartrain N., Ding G. F., Kostura M. J., Limjuco G., Schmidt J. A., Tocci M. J. (1991).** Probing the role of interleukin-1 beta convertase in interleukin-1 beta secretion. *Agents Actions Suppl.* 35:77–83.
- Hucke C., MacKenzie C. R., Adjogble K. D., Takikawa O., Däubener W. (2004).** Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 72:2723–30.

Hughes C. C., Savage C. O., Pober J. S. (1990). The endothelial cell as a regulator of T-cell function. *Immunol Rev*; 117:85–102.

Hunt N. H., Golenser J., Chan-Ling T., Parekh S., Rae C., Potter S., Medana I. M., Miu J., Ball H. J. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*; 36:569–82.

Hwu P., Du M. X., Lapointe R., Do M., Taylor M. W., Young H. A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol*; 164:3596–9.

Janeway C. A. Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. (2005) Immunobiology. 6th edition new york and London: garland science.

Jaspersen L. K., Bucher C., Panoskaltsis-Mortari A., Taylor P. A., Mellor A. L., Munn D. H., Blazar B. R. (2008). Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood*; 111:3257–65.

Kårehed K., Dimberg A., Dahl S., Nilsson K., Oberg F. (2007). IFN-gamma-induced upregulation of Fcγ-receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NFκappaB pathways. *Mol Immunol*; 44:615–24.

Kelley T. J., Drumm M. L. (1998). Inducible nitric oxide synthase expression is reduced in cystic fibrosis murine and human airway epithelial cells. *J Clin Invest*; 102:1200–7.

Komatsu T., Takeuchi K., Yokoo J., Gotoh B. (2002). Sendai virus C protein impairs both phosphorylation and dephosphorylation processes of Stat1. *FEBS Lett*; 511:139–44.

Kranz B., Vester U., Wingen A. M., Nadalin S., Paul A., Broelsch C. E., Hoyer P. F. (2008). Acute rejection episodes in pediatric renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Pediatr Transplant*; 12:474–8.

Kwidzinski E., Bunse J., Aktas O., Richter D., Mutlu L., Zipp F., Nitsch R., Bechmann I. (2005). Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB*; 19:1347–9.

Laurence J. M., Wang C., Park E. T., Buchanan A., Clouston A., Allen R. D., Mccaughan G. W., Bishop G. A., Sharland A. F. (2008). Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection. *Transplantation*; 85:1357–61.

Le V. T., Trilling M., Wilborn M., Hengel H., Zimmermann A. (2008). Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *J Gen Virol*; 89:2416–26.

Lieber M., Smith B., Szakal A., Nelson-Rees W., Todaro G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer*; 17:62–70.

Lin Y. C., Goto S., Tateno C., Nakano T., Cheng Y. F., Jawan B., Kao Y. H., Hsu L. W., Lai C. Y., Yoshizato K., Chen C. L. (2008). Induction of indoleamine 2,3-

dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation. *Transplant Proc*; 40:2706–8.

Liu H., Liu L., Fletcher B. S., Visner G. A. (2006). Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J*; 20:2384–6.

Livonesi M. C., Rossi M. A., de Souto J. T., Campanelli A. P., de Sousa R. L., Maffei C. M., Ferreira B. R., Martinez R., da Silva J. S. (2009). Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect*; 11:123–32.

Ljungman P., Brandan R. (2007). Factors influencing cytomegalovirus seropositivity in stem cell transplant patients and donors. *Haematologica*; 92:1139–42.

Locksley R. M., Killeen N., Lenardo M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*; 104:487–501.

Löb S., Königsrainer A., Schafer R., Rammensee H. G., Opelz G., Terness P. (2008). Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood*; 111:2152–4.

Löb S., Königsrainer A., Zieker D., Brücher B. L., Rammensee H. G., Opelz G., Terness P. (2009). IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*; 58:153–7.

Logan G. J., Smyth C. M., Earl J. W., Zaikina I., Rowe P. B., Smythe J. A., Alexander I. E. (2002). HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology*; 105:478–87.

MacKenzie C. R., Hadding U., Däubener W. (1998). Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis*; 178:875–8.

MacKenzie C. R., Heseler K., Müller A., Däubener W. (2007). Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab*; 8:237–44.

Malm G., Engman M. L. (2007). Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med*; 12:154–9.

MacKenzie C. R., Hucke C., Müller D., Seidel K., Takikawa O., Däubener W. (1999). Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells. *J Med Microbiol*; 48:935–41.

Mackenzie C. R., Willberg C. B., Däubener W. (1998). Inhibition of group B streptococcal growth by IFN gamma-activated human glioblastoma cells. *J Neuroimmunol*; 89:191–7.

- Martens S., Parvanova I., Zerrahn J., Griffiths G., Schell G., Reichmann G., Howard JC. (2005).** Disruption of *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuoles by the mouse p47-resistance GTPases. *PLoS Pathog*; 1:e24.
- McClarty G., Caldwell H. D., Nelson D. E. (2007).** Chlamydial interferon gamma immune evasion influences infection tropism. *Curr Opin Microbiol*; 10:47–51.
- Meisel R., Heseler K., Bülle H., Brockers S., Woite C., Stuhlsatz S., Schwippert W., Henschler R., Seissler J., Dillo D., Däubener W. (2009).** Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Exhibit Broad Spectrum Antimicrobial Effector Functions Mediated by Indoleamine 2,3-dioxygenase. Eingereicht bei *Blood*.
- Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D. (2004).** Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*; 103:4619–21.
- Mertens T. (1986).** Chemotherapy of herpes encephalitis. *Immun Infekt*. 14:143–7.
- Metz R., Duhadaway J. B., Kamasani U., Laury-Kleintop L., Muller A. J., Prendergast G. C. (2007).** Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res*; 67:7082–7.
- Miller D. M., Rahill B. M., Boss J. M., Lairmore M. D., Durbin J. E., Waldman J. W., Sedmak D. D. (1998).** Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med*; 187:675–83.
- Müller A., Heseler K., Schmidt S. K., Spekker K., MacKenzie C. R., Däubener W. (2008).** The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med*; 12:1–11.
- Munder M., Mallo M., Eichmann K., Modolell M. (1998).** Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*; 187:2103–8.
- Munn D. H., Shafizadeh E., Attwood J. T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A. L. (1999).** Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*; 189:1363–72.
- Munn D. H., Sharma M. D., Baban B., Harding H. P., Zhang Y., Ron D., Mellor A. L. (2005).** GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*; 22:633–42.
- Munn D. H., Sharma M. D., Hou D., Baban B., Lee J. R., Antonia S. J., Messina J. L., Chandler P., Koni P. A., Mellor A. L. (2004).** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*; 114:280–90.
- Munn D. H., Sharma M. D., Mellor A. L. (2004).** Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol*; 172:4100–10.

- Munn D. H., Zhou M., Attwood J. T., Bondarev I., Conway S. J., Marshall B., Brown C., Mellor A. L. (1998).** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*; 281:1191–3.
- Murray H. W., Szuro-Sudol A., Wellner D., Oca M. J., Granger A. M., Libby D. M., Rothermel C. D., Rubin B. Y. (1989).** Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun*; 57:845–9.
- Murray M. F. (2007).** The human indoleamine 2,3-dioxygenase gene and related human genes. *Curr Drug Metab*; 8:197–200.
- Naginei C. N., Pardhasaradhi K., Martins M. C., Detrick B., Hooks J. J. (1996).** Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*; 64:4188–96.
- Najarro P., Traktman P., Lewis J. A. (2001).** Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J Virol*; 75:3185–96.
- Nguyen H., Hiscott J., Pitha P. M. (1997).** The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev*; 8:293–312.
- Nishiyama A., Kaneko J., Harata M., Kamio Y. (2006).** Assembly of staphylococcal leukocidin into a pore-forming oligomer on detergent-resistant membrane microdomains, lipid rafts, in human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*; 70:1300–7.
- Oberdörfer C., Adams O., MacKenzie C. R., De Groot C. J., Däubener W. (2003).** Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv Exp Med Bio*; 527:15–26.
- Obojes K., Andres O., Kim K. S., Däubener W., Schneider-Schaulies J. (2005).** Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol*; 79:7768–76.
- Ohno K., Nakano T., Matsumoto Y., Watari T., Goitsuka R., Nakayama H., Tsujimoto H., Hasegawa A. (1993).** Apoptosis induced by tumor necrosis factor in cells chronically infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol*; 67:2429–33.
- Otani T., Nakamura S., Toki M., Motoda R., Kurimoto M., Orita K. (1999).** Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cell Immunol*; 198:111–9.
- Panaro M. A., Brandonisio O., Sisto M., Acquafredda A., Leogrande D., Fumarola L., Mitolo V. (2001).** Nitric oxide production by Leishmania-infected macrophages and modulation by prostaglandin E2. *Clin Exp Med*; 1:137–43.
- Pantoja L. G., Miller R. D., Ramirez J. A., Molestina R. E., Summersgill J. T. (2000).** Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect Immun*; 68:6478–81.

- Pass R. F. (2002).** Cytomegalovirus infection. *Pediatr Rev.* 2002 May;23(5):163–70.
- Pfefferkorn E. R. (1984).** Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 81:908–12.
- Pfefferkorn E. R., Guyre P. M. (1984).** Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect Immun*; 44:211–6.
- Pfefferkorn E. R., Rebhun S., Eckel M. (1986).** Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res*; 6:267–79.
- Plate J. M., Lukaszewska T. L., Bustamante G., Hayes R. L. (1988).** Cytokines involved in the generation of cytolytic effector T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*; 532:149–57.
- Ramsey K. H., Miranpuri G. S., Sigar I. M., Ouellette S., Byrne G. I. (2001).** Chlamydia trachomatis persistence in the female mouse genital tract: inducible nitric oxide synthase and infection outcome. *Infect Immun*; 69:5131–7.
- Robinson C. M., Hale P. T., Carlin J. M. (2005).** The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res*; 25:20–30.
- Robinson C. M., Shirey K. A., Carlin J. M. (2003).** Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res*; 23:413–21.
- Roshick C., Wood H., Caldwell H. D., McClarty G. (2006).** Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun*; 74:225–38.
- Sagedal S., Nordal K. P., Hartmann A., Sund S., Scott H., Degré M., Foss A., Leivestad T., Osnes K., Fauchald P., Rollag H. (2002).** The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant*; 2:850–6.
- Sakurai K., Zou J. P., Tschetter J. R., Ward J. M., Shearer G. M. (2002).** Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 129:186–96.
- Scharton-Kersten T. M., Yap G., Magram J., Sher A. (1997).** Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*. *J Exp Med*; 185:1261–73.
- Schröder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004).** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*; 75:163–89.

- Schroten H., Spors B., Hucke C., Stins M., Kim K. S., Adam R., Däubener W. (2001).** Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*; 32:206–10.
- Schutz G., Beato M., Feigelson P. (1973).** Messenger RNA for hepatic tryptophan oxygenase: its partial purification, its translation in a heterologous cell-free system, and its control by glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 70:1218–21.
- Schwarcz R., Whetsell W. O. Jr., Mangano R. M. (1983).** Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*; 219:316–8.
- Schwartzman J. D., Gonias S. L., Pfefferkorn E. R. (1990).** Murine gamma interferon fails to inhibit *Toxoplasma gondii* growth in murine fibroblasts. *Infect Immun*; 58:833–4.
- Shaw M. L., García-Sastre A., Palese P., Basler C. F. (2004).** Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. *J Virol*; 78:5633–41.
- Shenoy A. R., Kim B. H., Choi H. P., Matsuzawa T., Tiwari S., MacMicking J. D. (2007).** Emerging themes in IFN-gamma-induced macrophage immunity by the p47 and p65 GTPase families. *Immunobiology*; 212:771–84.
- Shimizu T., Nomiya S., Hirata F., Hayaishi O. (1978).** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem*; 253:4700–6.
- Shirey K. A., Jung J. Y., Maeder G. S., Carlin J. M. (2006).** Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*; 26:53–62.
- Shuai K., Ziemiecki A., Wilks A. F., Harpur A. G., Sadowski H. B., Gilman M. Z., Darnell J. E. (1993).** Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*; 366:580–3.
- Sibley L. D., Lawson R., Weidner E. (1986).** Superoxide dismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*; 19:83–7.
- Sibley L. D., Messina M., Niesman I. R. (1994).** Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91:5508–12.
- Silva N. M., Rodrigues C. V., Santoro M. M., Reis L. F., Alvarez-Leite J. I., Gazzinelli R. T. (2002).** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun*; 70:859–68.
- Spiekermann G. M., Nagler-Anderson C. (1998).** Oral administration of the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B induces activation and cytokine production by T cells in murine gut-associated lymphoid tissue. *J Immunol*; 161:5825–31.

- Starnes M. J., Brown C. V., Morales I. R., Hadjizacharia P., Salim A., Inaba K., Rhee P., Suzuki T., Yokouchi K., Kawamichi H., Yamamoto Y., Uda K., Yuasa H. J. (2003).** Comparison of the sequences of Turbo and Sulculus indoleamine dioxygenase-like myoglobin genes. *Gene*; 308:89–94.
- Steffen B. T., Lees S. J., Booth F. W. (2008).** Anti-TNF treatment reduces rat skeletal muscle wasting in monocrotaline-induced cardiac cachexia. *J Appl Physiol*; 105:1950–8.
- Steckel N. K., Kuhn U., Beelen D. W., Elmaagacli A. H.(2003).** Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol*; 57:185–91.
- Stone T. W. (1993).** Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.*; 45:309–79
- Stone T. W., Mackay G. M., Forrest C. M., Clark C. J., Darlington L. G. (2003).** Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med*; 41:852–9.
- Stryer L. (1999).** *Biochemie*; 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Stuehr D.J., Nathan C.F. (1989).** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*; 169:1543–55.
- Takikawa O. (2005).** Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*; 338:12–9.
- Taylor G. A., Feng C. G., Sher A. (2004).** p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*; 4:100–9.
- Terajima M., Leporati A. M. (2005).** Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. *Viral Immunol*;18:722–9.
- Terness P., Bauer T. M., Röse L., Dufter C., Watzlik A., Simon H., Opelz G. (2002).** Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*; 196:447–57.
- Thomas S. M., Garrity L. F., Brandt C. R., Schobert C. S., Feng G. S., Taylor M. W., Carlin J. M., Byrne G. I. (1993).** IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular Chlamydia spp. or Toxoplasma growth. *J Immunol*; 150:5529–34.
- Tian Y. F., Liao C. H., Chen M. J. (2008).** Risk factors among donor characteristics which affect graft outcome in paired kidney transplantation. *Transplant Proc*; 40:2281–4.
- Uyttenhove C., Pilotte L., Théate I., Stroobant V., Colau D., Parmentier N., Boon T., Van den Eynde B. J. (2003).** Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*; 9:1269–74.

- Varani S., Frascaroli G., Homman-Loudiyi M., Feld S., Landini M. P., Söderberg-Nauclér C. J. (2005).** Human cytomegalovirus inhibits the migration of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR1 and CCR5. *Leukoc Biol*; 77:219–28.
- Viallet J., Liu C., Emond J., Tsao M. S. (1994).** Characterization of human bronchial epithelial cells immortalized by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16. *Exp Cell Res*; 212:36–41.
- Wald A., Ashley-Morrow R. (2002).** Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*; 35:S173–82.
- Weller T. H., Hanshaw J. B., Scott D. E. (1960).** Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology*; 12:130–2.
- Wheelock E. F. (1965).** Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*; 149:310–1.
- Whitley R. J. (2006).** Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res*; 71:141–8.
- Wood H., Roshick C., McClarty G. (2004).** Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of Chlamydia psittaci GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells. *Mol Microbiol*; 52:903–16.
- Wu T. R., Hong Y. K., Wang X. D., Ling M. Y., Dragoi A. M., Chung A. S., Campbell A. G., Han Z. Y., Feng G. S., Chin Y. E. (2002).** SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*; 277:47572–80.
- Wu C. L., Lee Y. L., Chang K. M., Chang G. C., King S. L., Chiang C. D., Niederman M. S. (2003).** Bronchoalveolar interleukin-1 beta: a marker of bacterial burden in mechanically ventilated patients with community-acquired pneumonia. *Crit Care Med*; 31:812–7.
- Yoshida N., Ino K., Ishida Y., Kajiyama H., Yamamoto E., Shibata K., Terauchi M., Nawa A., Akimoto H., Takikawa O., Isobe K., Kikkawa F. (2008).** Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res*; 14:7251–9.
- Yap G. S., Sher A. (1999).** Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma- and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii. *J Exp Med*; 189:1083–92.
- Zamora M. R. (2001).** Use of cytomegalovirus immune globulin and ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in lung transplantation. *Transpl Infect Dis*; 2:49–56.

8. Danksagung

Zum Abschluss ist es mir ein besonderes Anliegen, mich bei all den Menschen zu bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Walter Däubener für die Überlassung des Themas, die kontinuierliche fachliche Betreuung und die vertrauensvolle Zusammenarbeit in den letzten drei Jahren.

Herrn Prof. Dr. J. H. Hegemann danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit von Seiten der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für das nette Arbeitsklima, das wesentlich dazu beigetragen hat, dass ich diese Arbeit gerne am Institut angefertigt habe.

Ganz besonders danke ich den Mitgliedern meiner gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Vanessa Ince, Anika Müller, Silvia K. Schmidt, Katrin Spekker, Silke Stuhlsatz, Wilfried Schwippert und Claudia Woite, die mir immer mit Rat und Tat hilfsbereit zur Seite gestanden haben.

Prof. Dr. U. Hadding danke ich für das kritische Lesen dieser Arbeit und für die konstruktiven Anregungen zur Verbesserung.

Ulf Groote, Tina Müller und Daniel Derscheid danke ich für die technischen und sprachlichen Hilfeleistungen, die mich vor mehreren Krisen bewahrt haben.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern. Ohne ihre ständige und liebevolle Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Georg danke ich für sein großes Verständnis, seine unendliche Geduld und seine Ermutigungen, die mir während meiner Doktorarbeit besonders viel Kraft gegeben haben.

9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Düsseldorf, den

Kathrin Heseler