

Antimikrobielle und immunregulatorische
Eigenschaften der Tryptophan 2,3-
Dioxygenase und die Analyse der
funktionellen Effekte des Tryptophan-
Analogons 1-Methyl-Tryptophan

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dipl. Biol.

Silvia Kathrin Schmidt

aus Solingen

Düsseldorf, August 2010

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. F. Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2010

I. Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten	1
1.2. <i>In vitro</i> Infektionsmodelle.....	3
1.2.1. Bakterien am Beispiel von <i>Staphylococcus aureus</i>	4
1.2.2. Viren am Beispiel von HSV-1	5
1.2.3. Parasiten am Beispiel von <i>Toxoplasma gondii</i>	5
1.3. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen Tryptophan- konzentration	6
1.4. Tryptophan und seine physiologische Bedeutung.....	7
1.5. Tryptophan oxydierende Enzyme.....	12
1.5.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (EC 1.13.11.42).....	12
1.5.2. Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) (EC 1.13.11.52).....	16
1.5.3. Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) (EC 1.13.11.11)	18
1.6. Pharmakologische Beeinflussung der IDO- und TDO-Aktivität.....	21
1.7. Zielsetzung der eigenen Arbeit.....	22
2. MATERIAL & METHODEN	24
2.1. Material	24
2.1.1. Zellen und Versuchstiere.....	24
2.1.2. Erreger für Infektionsversuche.....	25
2.1.3. Medien, Lösungen und Puffer	26
2.1.4. Primer	28
2.1.5. Sonden.....	29
2.1.6. Zytokine	29
2.1.7. Antikörper	29
2.1.8. Größenstandards.....	29
2.1.9. Enzyme.....	30
2.1.10. Chemikalien	30
2.1.11. Verbrauchsmaterialien	31
2.1.12. Geräte und sonstige Materialien.....	32
2.2. Methoden	33
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	33
2.2.2. Zellbiologische Methoden.....	36
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	42
2.2.4. Statistische Auswertung	47
3. ERGEBNISSE	48
3.1. TDO-vermittelte Effekte in HeLa-TDO Zellen	48
3.1.1. TDO _{myc} Expression und Aktivität in HeLa-TDO Zellen	48

3.1.2.	Charakterisierung der Substratspezifität von nativer IDO und rekombinanter TDO in HeLa-TDO Zellen	52
3.1.3.	Antimikrobielle Effekte rekombinanter humaner TDO in HeLa-TDO Zellen	53
3.1.4.	Immunregulatorische Effekte rekombinanter humaner TDO in HeLa-TDO Zellen	61
3.2.	Pharmakologische Beeinflussung der IDO und TDO Aktivität in HeLa-TDO Zellen	67
3.2.1.	Analyse der Beeinflussung der IDO und TDO Enzymaktivität durch 1-MT	68
3.2.2.	<i>Ex vivo</i> Analyse der TDO Enzymaktivität in murinem Lebergewebe	72
3.2.3.	Analyse der Beeinflussung der IDO und TDO vermittelten antibakteriellen Effekte durch 1-L-MT	77
3.2.4.	Analyse der Beeinflussung des IDO und TDO vermittelten antiproliferativen Effektes auf humane Zellen durch 1-L-MT	81
4.	DISKUSSION	89
4.1.	<i>In vitro</i> Charakterisierung der IDO und der TDO in HeLa-TDO Zellen.....	91
4.2.	Antimikrobielle Effekte der TDO-Aktivität	92
4.3.	Regulation der antimikrobiellen TDO-Aktivität durch Sauerstoff.....	94
4.4.	Immunregulatorische Effekte der TDO-Aktivität	96
4.5.	IDO und TDO: Unterschiede in der Substrat- und Stereospezifität.....	100
4.6.	Effekt von 1-MT auf TDO- und IDO-Aktivität in HeLa-TDO Zellen	103
4.7.	Ein neuer, zusätzlicher Wirkmechanismus von 1-L-MT	108
5.	ZUSAMMENFASSUNG	114
6.	SUMMARY	115
7.	LITERATURVERZEICHNIS	116
8.	DANKSAGUNG	129
9.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	131

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel.....	8
Abbildung 1.2:	Schematische Darstellung des Kynurenin Stoffwechselweges.	11
Abbildung 1.3:	Strukturformel von (A) Tryptophan und (B) 1-Methyl-Tryptophan.	22
Abbildung 2.1:	Tetrazyklin-induzierte Expression der humanen TDO in HeLa T-RExTM TDO Zellen.	24
Abbildung 2.2:	Gradientenverlauf bei HPLC –Messung.....	46
Abbildung 3.1:	HeLa-TDO Klone metabolisieren Tryptophan zu Kynurenin.	49
Abbildung 3.2:	Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-TDO Zellen.	50
Abbildung 3.3:	Western Blot-Analyse der HeLa-TDO Zellen.	51
Abbildung 3.4:	HPLC Analyse der Tryptophan und Kynurenin Menge in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.	52
Abbildung 3.5:	Analyse der Kynurenin-Produktion nach L-Tryptophan oder D-Tryptophan Supplementation in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.	53
Abbildung 3.6:	Antiparasitischer Effekt in Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen. ...	55
Abbildung 3.7:	Antiviraler Effekt in Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.	56
Abbildung 3.8:	Antibakterieller Effekt von Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen. ..	57
Abbildung 3.9:	Kynurenin Produktion durch stimulierte oder unstimulierte HeLa-TDO Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen.	59
Abbildung 3.10:	Bakterienwachstum in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen. ...	60
Abbildung 3.11:	Immunregulatorischer Effekt vermittelt durch IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierte HeLa-TDO Zellen.	62
Abbildung 3.12:	Verminderte IFN- γ Produktion von T-Zellen in konditioniertem Medium von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.	63
Abbildung 3.13:	Immunregulatorischer Effekt vermittelt durch konditioniertes Medium von IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.	64
Abbildung 3.14:	Synergismus in IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.....	65
Abbildung 3.15:	Analyse der immunregulatorischen Effekte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Metabolisierung von L-Tryptophan oder D-Tryptophan.	67
Abbildung 3.16:	Abbauprodukte in Überständen von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation verschiedener 1-Methyl-Tryptophan Chargen.	69
Abbildung 3.17:	Analyse der Abbauprodukte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation von L-Tryptophan oder 1-Methyl-Tryptophan.....	70
Abbildung 3.18:	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (MALDI MS) Analyse der Überstände von unstimulierten oder Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation von L-Tryptophan oder 1-L-MT.	72
Abbildung 3.19:	PCR Analyse muriner Leber.....	73
Abbildung 3.20:	Kynureninproduktion in Überständen verschiedener muriner Gewebekulturen nach L-Tryptophan Supplementation.....	73
Abbildung 3.21:	Kinetik der Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter L-Tryptophan Supplementation.	74
Abbildung 3.22:	Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter L-Tryptophan Supplementation in WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen. .	75
Abbildung 3.23:	Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter	

Supplementation verschiedener Substrate.....	76
Abbildung 3.24: Metabolisierung von 1-L-MT in Lebergewebe von WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen.	77
Abbildung 3.25: Bakterienwachstum in konditioniertem, Tryptophan-freiem Medium von IFN- γ -stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.....	78
Abbildung 3.26: Bakterienwachstum in Tryptophan-freiem, konditioniertem Kulturmedium nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-MT-Konzentrationen.	80
Abbildung 3.27: <i>Toxoplasma gondii</i> Proliferation in IFN- γ -stimulierten 86HG39 Zellen nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-MT-Konzentrationen.	81
Abbildung 3.28: Wachstum von HeLa-TDO Zellen in Tryptophan-freiem Kulturmedium unter Supplementation verschiedener Substrate mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen.	82
Abbildung 3.29: Analyse der immunregulatorischen Effekte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation des Inhibitors 1-MT.	83
Abbildung 3.30: T-Zell Proliferation in Tryptophan-freiem Kulturmedium nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-MT Konzentrationen.....	84
Abbildung 3.31: Kompetitive Inkorporation von L-Tryptophan und 1-L-MT in humane T-Zellen.	85
Abbildung 3.32: Kompetitive Inkorporation von L-Tryptophan und 1-L-MT in humane T-Zell Proteine.....	86
Abbildung 3.33: Beeinflussung des antibakterieller Effekt durch 1-L-MT in TDO ⁺ oder IDO ⁺ Zellen.	88

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien.....	25
Tabelle 2.2: für <i>ex vivo</i> Experimente verwendete Mauslinien	25
Tabelle 2.3: verwendete Zellkulturmedien.....	26
Tabelle 2.4: verwendete Lösungen.....	27
Tabelle 2.5: verwendete Puffer	27
Tabelle 2.6: verwendete Primer.....	28
Tabelle 2.7: verwendete Primer für Real-time PCR.....	28
Tabelle 2.8: verwendete Sonde für Real-time PCR	29
Tabelle 2.9: verwendete Antikörper	29
Tabelle 2.10: Radiochemikalien.....	31

IV. Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
1-D-MT	1-Methyl-D-Tryptophan
1-DL-MT	1-Methyl-DL-Tryptophan
1-L-MT	1-Methyl-L-Tryptophan
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
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
cm ²	Quadratzentimeter
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
d	Tag
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
D-Trp	D-Tryptophan
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
FasL	Fas Ligand
FCS	fötales Kälberserum
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	Gamma aktivierte Sequenz
GCN2	<i>general control non-derepressible</i>
GRE	<i>glucocorticoid response elements</i>
GTP	Guanosintriphosphat
³ H	Tritium
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HFH	humane Vorhaut Fibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSV	Herpes simplex Virus Typ I
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IDO ⁺	Indolamin 2,3-Dioxygenase-positiv
IDO-2	Indolamin 2,3-Dioxygenase-2
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α -Rezeptor
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves' s Modified Dulbecco' s Medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Interferon regulatorische Faktoren (<i>Interferon regulatory factors</i>)
ISRE	<i>Interferon stimulated response elements</i>
JAK	Janus-Kinase
KAT	Kynurenin Aminotransferase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton

K_i	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K_m	Michaeliskonstante
k.o.	<i>knock out</i>
KynA	Kynureninsäure
LB	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
mA	Milliampere
Maldi MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie
mg	Milligramm
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
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Rezeptor von T-Zellen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBST	PBS + 0,05% Tween
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-L1	<i>programmed death ligand-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PHH	primäre humane Hepatozyten
PLP	Pyridoxalphosphat
pM	Pikomolar

POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ss	einzelsträngig
STAT	Signalüberträger und –aktivator der Transkription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TDO ⁺	Tryptophan 2,3-Dioxygenase-positiv
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TetR	Tetrazyklin Repressor
TLR	Toll-like Rezeptor
TMT	<i>tandem mass tag</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
Tregs	regulatorische T-Zellen
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Uracil
U/mL	Units pro Milliliter
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

Der Körper ist ständig einer Vielzahl von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Um Erkrankungen zu verhindern, die durch diese Pathogene ausgelöst werden, stehen dem Organismus zwei immunologische Abwehrsysteme zur Verfügung. Sie werden als angeborene und als adaptive Immunität bezeichnet. In der Frühphase einer Abwehrreaktion kann die angeborene Immunität die Krankheitserreger erkennen und auf deren Anwesenheit reagieren. Die Abwehr verläuft dabei „unspezifisch“, d. h., es findet nur eine Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd statt, wobei der Erreger als solcher nicht identifiziert wird. Im adaptiven Immunsystem (erworbene Immunität) muss der Erreger spezifisch erkannt werden. Der Erkennungsprozess über Antigen-spezifische Rezeptoren führt dann zur Ausbildung von Effektorzellen, die einen erregerspezifischen Abwehrmechanismus vermitteln. Des Weiteren entsteht ein immunologisches Gedächtnis, d. h. dass bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen oder einem ähnlichen Erreger eine beschleunigte Immunabwehr stattfindet. Somit stellt das immunologische Gedächtnis die Grundlage für eine lebenslange, spezifische Immunität dar.

In dieser Arbeit wird ein antibakterieller und immunregulatorischer Effektormechanismus untersucht, der auf einem Enzym-vermittelten Abbau der essenziellen Aminosäure Tryptophan basiert. Die dabei zu untersuchenden Enzyme Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) unterscheiden sich in einigen Eigenschaften stark. So kann die IDO in nahezu allen Körperzellen durch immunologische Signale induziert werden, während die TDO konstitutiv in der Leber exprimiert wird. Außerdem war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, dass die IDO-Aktivität eine große Rolle bei der Abwehr von Bakterien, Viren und Parasiten spielt und zusätzlich die Proliferation von T-Zellen beeinflusst (MacKenzie *et al.*, 2007; Adams *et al.*, 2004; Pfefferkorn, 1984; Munn *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu wurde der TDO bisher ausschließlich eine Funktion im Tryptophan Stoffwechsel zugeschrieben.

1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten

Proinflammatorische Zytokine sind wichtige Botenstoffe sowohl im Rahmen der angeborenen als auch der adaptiven Immunität. Sie induzieren eine Vielzahl von Effektormechanismen, die dem Körper helfen, unterschiedliche Pathogene zu bekämpfen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interferon- γ -stimulierte humane Wirtszellen in Infektionsmodellen verwendet. Aus

diesem Grunde soll das proinflammatorische Interferon- γ (IFN- γ) im Folgenden genauer charakterisiert werden.

IFN- γ zählt zur Familie der Interferone, deren Name von der Beobachtung abgeleitet wurde, dass die Mitglieder dieser Zytokinfamilie mit dem Wachstum von Viren interferieren. Funktionell lassen sich zwei Gruppen von Interferonen unterscheiden: Zu den Typ I-Interferonen zählen IFN- α und IFN- β , zu den Typ II-Interferonen zählt allein das IFN- γ . IFN- α und IFN- β bestehen jeweils aus einem Monomer mit einer Größe von 166 Aminosäuren und werden vom IFNAR2 Rezeptor erkannt. Typ I-Interferone werden in unterschiedlichen Zellen exprimiert. So wird das IFN- α hauptsächlich von Leukozyten, das IFN- β hingegen von Fibroblasten produziert (Kadowaki *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu Typ I-Interferonen besteht das IFN- γ aus nur 143 Aminosäuren und bildet Homodimere. Es wurde 1965 in humanen Leukozyten von Wheelock entdeckt (Wheelock, 1965) und als Glykoprotein beschrieben. Es bindet an den spezifischen IFN- γ Rezeptor (IFN- γ R = CD119). Exprimiert wird das IFN- γ von unterschiedlichen Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems. Hierunter fallen CD4⁺ T-Helferzellen vom Typ 1 (T_H1), CD8⁺ zytotoxische Lymphozyten, Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und B-Zellen, aber auch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) wie Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen (Schröder *et al.*, 2004). Die IFN- γ Produktion wird durch die Anwesenheit von anderen Zytokinen wie IL-12 und IL-18 gesteuert, die nach einem Pathogen-Kontakt von APZ ausgeschüttet werden (Munder *et al.*, 1998; Otani *et al.*, 1999). Die Bindung des IFN- γ an seinen Rezeptor führt zu einer Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges (Darnell *et al.*, 1994). Hierbei bilden die IFN- γ R Dimere, sodass die zytoplasmatische Janus-Kinasen (JAKs), bedingt durch eine Konformationsänderung in der Lage sind, sich gegenseitig zu aktivieren. Der Rezeptor wird phosphoryliert und vom Transkriptionsfaktor STAT1 gebunden, der ebenfalls phosphoryliert wird. Nun bilden STAT1 Moleküle Homodimere und translozieren in den Nukleus. Dort binden sie an definierte Abschnitte der DNA, die als GAS (gamma-aktivierte Sequenz) bezeichnet werden und regulieren die Transkription von mehr als zweihundert Genen (Boehm *et al.*, 1997). Diese Regulation ist dabei ein mehrstufiger Prozess. In einem ersten Schritt werden so genannte primär-responsive Gene transkribiert. Zu ihnen zählen unter anderem die IDO, MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse-I und -II-Moleküle, GTP-bindende Proteine (GTPasen) und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Andere aktivierte Gene aber kodieren direkt für Transkriptionsfaktoren, die dann in einem zweiten Schritt weitere sekundär-responsive Gene regulieren und somit die Anzahl der IFN- γ -induzierten Genprodukte maximieren. Zu diesen Transkriptionsfaktoren zählt die Gruppe der IRF-Familie

(Interferon regulatorische Faktoren), die an so genannte ISRE (*Interferon stimulated response element*) Sequenzen der DNA binden (Nguyen *et al.*, 1997). Somit kommt es nach einer IFN- γ Sekretion zur Regulation vieler Genprodukte, die einen vielfältigen Einfluss auf zelluläre Effekte haben. Besonders gut erforscht ist dabei die IFN- γ -abhängige Aktivierung von Makrophagen. Hier wird durch die Anwesenheit von IFN- γ die Expression von MHC-Molekülen und anderer Komponenten des Antigenprozessierungssystems erhöht und ebenso die Responsivität auf wichtige proinflammatorische Zytokine und Chemokine (Collins *et al.*, 1984; Kårehed *et al.*, 2007). Weiterhin hat IFN- γ auch einen aktivierenden Einfluss auf neutrophile Granulozyten und NK-Zellen und fördert die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen, während eine T_H2-Zell-Antwort gehemmt wird (Gattoni *et al.*, 2006; Plate *et al.*, 1988). Dass dem IFN- γ eine wichtige Funktion bei der Erregerabwehr zukommt, wird dadurch deutlich, dass IFN- γ oder IFN γ R *knock-out* Mäuse eine deutlich verringerte Resistenz gegenüber bakteriellen Infektionen (besonders durch Mykobakterien), bestimmten Viren oder Parasiten wie *Toxoplasma gondii* besitzen (Jouanguy *et al.*, 1999; Newport *et al.*, 1996; Deckert-Schlüter *et al.*, 1996).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass IFN- γ eine Expression unterschiedlicher Genprodukte in verschiedenen Zellen bewirken kann. Die in dieser Arbeit untersuchte Expression derIDO macht einen wesentlichen Teil des IFN- γ -abhängigen antimikrobiellen und immunregulatorischen Effektorsystems aus.

1.2. *In vitro* Infektionsmodelle

Im Rahmen dieser Arbeit werden in *in vitro* Infektionsmodellen antimikrobielle Effektormechanismen in humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen) funktionell analysiert. Dabei ist zu beachten, dass die untersuchten Erreger sich erheblich in ihren Replikationsformen und ihren Pathogenitätsfaktoren unterscheiden. Allgemein gilt, dass die Abwehr extrazellulärer Erreger von Fresszellen übernommen wird, wobei besonders die neutrophilen Granulozyten von Bedeutung sind. Zusätzlich sind extrazelluläre Erreger jedoch auch zugänglich für Wirtsantikörper und das Komplementsystem. Intrazelluläre Krankheitserreger hingegen, wie zum Beispiel Viren oder bestimmte Parasiten, sind diesen Abwehrmechanismen allerdings nicht zugänglich. Sie werden hauptsächlich durch eine Wirtszell-vermittelte Immunantwort bekämpft, bei der zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen und aktivierte Makrophagen von entscheidender Bedeutung sind. Dabei ist in allen Fällen das korrekte Zusammenspiel aller an der Abwehr beteiligten Effektorfunktionen ausschlaggebend

für das Überstehen der Infektion. Dieses Zusammenspiel ist jedoch sehr komplex und bis heute nicht vollends geklärt. Um ein besseres Verständnis von antimikrobiellen Effektormechanismen zu erzielen, wurden in dieser Arbeit verschiedene Pathogene in Infektionsmodellen analysiert. Diese Pathogene werden im Nachfolgenden kurz vorgestellt.

1.2.1. Bakterien am Beispiel von *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus ist ein fakultativ anaerobes, gram-positives Bakterium aus der Familie der *Micrococcaceae*, das häufig in Traubenform angeordnet ist (Haufenkokken). Es ist ubiquitär verbreitet und oft auf der Haut oder den oberen Atemwegen zu finden. Diese normalerweise asymptomatische Besiedelung kann bei einem geschwächten Immunsystem oder anderen begünstigten Bedingungen Hautinfektionen (Karbunkel, Furunkel) oder andere zum Teil lebensbedrohliche Infektionen (Pneumonie, Endokarditis, Toxisches Schock-Syndrom und Sepsis) hervorrufen. *Staphylococcus aureus* ist sehr widerstandsfähig gegenüber Umwelteinflüssen wie Temperaturschwankungen und Austrocknung und kann außerdem eine Reihe von Resistenzen gegen einige wichtige Antibiotika erwerben. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Dieser Erreger trägt eine Mutation im Penicillin-bindenden Protein und ist infolgedessen resistent gegenüber allen Penicillinen und Cephalosporinen. Oftmals können MRSA-Infektionen deshalb nur mit Reserveantibiotika wie den Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin oder dem Oxazolidinon Linezolid behandelt werden (Herrmann *et al.*, 2008). Gerade wegen der erworbenen Resistenzen ist *Staphylococcus aureus* einer der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen. Zudem besitzt *Staphylococcus aureus* eine Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren wie das bakterielle Leukozidin, welches Granulozyten und Makrophagen lysiert und somit die zelluläre Immunantwort inhibiert (Nishiyama *et al.*, 2006). Des Weiteren weist *Staphylococcus aureus* ein besonderes Zellwandantigen (Protein A) auf, das in der Lage ist, an den Fc-Teil von Immunglobulinen zu binden und somit eine Oponisierung verhindert. Auch das Vorhandensein des Clumping Faktors und der Koagulase machen wichtige Pathogenitätsfaktoren der Haufenkokken aus. Beide Faktoren aktivieren Prothrombin, was zu einer Ausfällung des Fibrins führt, so dass das Bakterium lokal vor einer Immunreaktion geschützt ist. Hierdurch kann sich der Erreger lokal stark vermehren und dann, mittels der Staphylokinase, das Fibrin lysieren und die gebildete Abszesskapsel aufbrechen (Bokarewa *et al.*, 2006). Im Anschluss können dann mit Hilfe der bakteriellen Enzyme Hyaluronidase, DNase, Lipase und dem Hämolyisin die extrazelluläre Matrix und die

Parenchymzellen des Wirtsorganismus lysiert werden und so eine systemische Ausbreitung des Erregers erfolgen.

1.2.2. Viren am Beispiel von HSV-1

Das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) gehört zusammen mit seinem engen verwandten Herpes simplex Virus Typ 2 zur Gattung *Simplexvirus* der Familie *Herpesviridae*. Die Besonderheit der Viren aus der Herpesgruppe ist deren lebenslange Persistenz im Wirtsorganismus. Das HSV-1 Virus ist gut an den Menschen als Wirt angepasst, artverwandte Vertreter der Familie befallen allerdings auch eine Reihe von Tierarten wie zum Beispiel Rinder oder Affen. HSV-1 gehört mit einem Durchmesser von bis zu 180nm zu den großen Viren und trägt als Genom doppelsträngige, lineare DNA. Das Virus ist weltweit anzutreffen und ist durch die einfache Übertragung über Speichelkontakt und Schmierinfektion in der Bevölkerung weit verbreitet. Zusätzlich wird das Virus nicht nur über kranke, sondern auch über asymptomatische Personen weitergegeben (Wald *et al.*, 2002). In Deutschland können bei ca. 80% der Bevölkerung Antikörper gegen HSV-1 nachgewiesen werden (Hellenbrand *et al.*, 2005). Primärinfektionen verlaufen meist inapparent, nur selten kommt es nach circa einer Woche Inkubationszeit zu einer klinisch manifesten HSV-1 Infektion (*Gingivostomatitis*). Es dringt über die Schleimhautzellen im Mund ein und vermehrt sich in den Epithelzellen. Diese werden dabei zerstört, was sich in der klinischen Entzündungsreaktion (Ulkus- und Bläschenbildung) äußert. Gelangt das HSV-1 Virus dann an die Nervenzellfortsätze von Neuronen, so findet eine retrograde axonale Wanderung zu den Ganglien statt, wo das Virus anschließend persistiert. Aufgrund verschiedener Faktoren wie zum Beispiel Stress, Umwelteinflüssen oder hormonellen Umstellungen kann es dann zu endogenen Rezidiven kommen, die symptomatisch als *Herpes labialis* (ulzerierende und vesikuläre Läsionen an den Lippen und an der Mundschleimhaut) auffallen. Besonders schwere Folgen hat eine Infektion oder auch eine Exazerbation im Falle einer Immunsuppression. Hier manifestiert sich die Infektion auch an inneren Organen und löst zum Beispiel schwere Pneumonien oder die oft tödlich verlaufende Herpes-Enzephalitis aus (Flückinger *et al.*, 2001; Whitley, 2006).

1.2.3. Parasiten am Beispiel von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein bogenförmiges Protozoon mit parasitischer Lebensweise. Taxonomisch gehört *T. gondii* zum Stamm der Apikomplexa, der Klasse der *Coccidia* und der Ordnung *Eimeriida*. Es ist nahe verwandt mit Plasmodium, dem Erreger der Malaria, und

Cryptosporidium, einem bekannten Tierpathogen, dass jedoch auch bei immunsupprimierten Patienten klinisch relevant ist. *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Erreger, der Menschen und Tiere infizieren kann und dabei eine chronisch persistierende Erkrankung namens Toxoplasmose verursacht. Der Parasit ist weltweit verbreitet und die Bevölkerung weist eine hohe Durchseuchungsrate auf. So besitzen in Europa ca. 70% der Menschen Antikörper gegen die Toxoplasmen (Hermentin *et al.*, 1987). Dabei steigt die Prävalenz pro Lebensjahr um etwa 1%. Aufgrund des breiten Wirtsspektrums können aber auch über 200 Vogel- und Säugetierarten infiziert werden (Hof *et al.*, 2005). Der Endwirt des Erregers sind dabei Katzenartige, besonders jedoch die Hauskatze. In ihnen findet die sexuelle Vermehrung der Toxoplasmen statt. Die Oozysten werden mit dem Fäzes ausgeschieden und infizieren dann den Zwischenwirt (zum Beispiel den Menschen), wo eine asexuelle Vermehrung erfolgt. Im Zwischenwirt durchdringt der Parasit die Darmwand und befällt die Muskulatur, das ZNS und andere Organe, wo er Zysten bildet, die lebenslang persistieren können. Der Mensch infiziert sich dabei oftmals nicht durch den infektiösen Katzenkot, sondern auch durch rohes, zystenhaltiges Fleisch. Eine Infektion verläuft meist asymptomatisch, kann sich jedoch auch durch grippeähnliche Symptome äußern. Klinisch schwer verlaufende Toxoplasmosen ereignen sich dagegen nur selten. Diese treten im Falle einer Immunsuppression, zum Beispiel bei AIDS, auf und basieren auf einer endogenen Reinfektion. Klinisch treten dann Enzephalitiden, Myokarditiden und Pneumonien auf (Eza *et al.*, 2006). Ebenfalls besonders schwerwiegende Folgen kann eine Toxoplasmeninfektion während einer Schwangerschaft haben. Kommt es im ersten Schwangerschaftstrimenon zu einer Erstinfektion, kann dies zum Abort oder zu schwersten Erkrankungen des Fetus führen. Neugeborene leiden dann typischerweise an Chorioretinitis oder Enzephalitis mit späterem Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und geistiger Retardierung.

1.3. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen Tryptophan-konzentration

Wie bereits in Abschnitt 1.1. beschrieben, reguliert das Zytokin IFN- γ eine Vielzahl von Genprodukten, die an einem antimikrobiellen Prozess beteiligt sind. Oftmals sind die induzierten Effektormechanismen dabei gegen ein ganzes Spektrum von Erregern gerichtet. Diese Art einer umfassenden Immunität ist nur dadurch zu erreichen, dass grundlegende metabolische Prozesse der Mikroorganismen gestört werden. Einer der bekanntesten Mechanismen ist auf diesem Gebiet die IFN- γ -abhängige Regulation der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS), die durch die Produktion von NO z. B. DNA-Brüche verursacht und

wesentlich an der Abwehr von verschiedenen Bakterien, Pilzen und Viren beteiligt ist (Vazquez-Torres *et al.*, 2008). Es konnte dabei gezeigt werden, dass die iNOS in murinen *in vitro* und *in vivo* Infektionsmodellen eine große Rolle spielt, jedoch gibt es nur vereinzelte Daten über eine Beteiligung der iNOS bei der Abwehr von Mikroben beim Menschen. Im Gegensatz dazu ist beim Menschen die IFN- γ -abhängige Induktion des Tryptophan-abbauenden Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als potenter antimikrobieller Effektormechanismus beschrieben, während die IDO wiederum in murinen Infektionsmodellen nur selten an der Abwehr von Pathogenen beteiligt zu sein scheint. In diesem Zusammenhang gibt es lediglich eine Veröffentlichung, die eine direkte Beteiligung der IDO als Abwehrmechanismus bei einer pulmonalen *Francisella tularensis* Infektion beschreibt (Peng *et al.*, 2010). Bei der Interpretation dieser Daten ist darüber hinaus zu beachten, dass die iNOS Induktion in murinen und auch humanen Zellen zu einer Inhibition der IDO-Aktivität führt (Thomas *et al.*, 1994; Hucke *et al.*, 2004). Da sich diese Arbeit mit antimikrobiellen und immunregulatorischen Effektormechanismen in humanen Zellen beschäftigt, die von Tryptophan-abbauenden Enzymen vermittelt werden, sollen der Tryptophan Stoffwechsel und die beteiligten Enzyme im Folgenden genauer charakterisiert werden.

1.4. Tryptophan und seine physiologische Bedeutung

Die lokale Regulation der Aminosäure Tryptophan ist ein wichtiger antimikrobieller und immunregulatorischer Effektormechanismus. Als Basis dafür ist die Tatsache anzusehen, dass Tryptophan eine zentrale Bedeutung im Stoffwechsel hat und somit starke Auswirkungen auf lebensnotwendige zelluläre Prozesse aufweist.

Tryptophan kommt in der Natur als L-Tryptophan und als D-Tryptophan vor, wobei jedoch nur das L-Tryptophan von physiologischem Belang ist. Es ist eine α -Aminosäure mit einem aromatischen Indol-Ringsystem und befindet sich daher gemeinsam mit Phenylalanin, Tyrosin und Histidin in der Gruppe der aromatischen Aminosäuren. Für diese Arbeit von großem Interesse ist die Tatsache, dass Tryptophan eine für Säugetiere und manche Mikroorganismen essenzielle Aminosäure darstellt. Das heißt, dass die betroffenen Spezies nicht in der Lage sind, Tryptophan zu synthetisieren. Im Gegensatz dazu können Pflanzen und einigen Mikroorganismen selbst Tryptophan herstellen. So können zum Beispiel Bakterien wie *E. coli* in einem mehrstufigen Prozess Tryptophan aus Shikimisäure beziehungsweise Anthranilsäure synthetisieren. Hierbei ist durch den mehrstufigen Prozess eine koordinierte

Funktion mehrerer Genprodukte entscheidend, was zur Entwicklung eines Tryptophan-Operons bei *E. coli* beigetragen hat, durch welches alle fünf der an der Tryptophansynthese beteiligten Enzyme gleichzeitig reguliert werden. Das Endprodukt Tryptophan dient in diesem Zusammenhang als Ko-Repressor, der die Produktionsrate der Biosyntheseenzyme bei Bedarf um das 700fache verändert (Stryer, 1999).

Menschen hingegen müssen Tryptophan über die Nahrung aufnehmen. Der Tagesbedarf für einen Erwachsenen beträgt dabei pro kg Körpergewicht 3,5 bis 6 mg Tryptophan (Young *et al.*, 1996), kann aber in Einzelfällen oder während der Schwangerschaft auch höher ausfallen (Lazaris-Brunner *et al.*, 1998). Nahrungsmittel, die besonders reichhaltige Mengen an Tryptophan enthalten, sind dabei Kakao, Nüsse, Hülsenfrüchte und Fleisch. In Milch ist Tryptophan in Lactalbumin enthalten. L-Tryptophan ist eine proteinogene Aminosäure, d. h. es wird zum Aufbau diverser Proteine benötigt. Zudem ist es Provitamin für Vitamin B3 und dient als Vorläufer für diverse Neurotransmitter wie Serotonin und Melatonin. Die essenzielle Rolle von Tryptophan im Stoffwechsel ist in der Abb. 1. 1. schematisch dargestellt.

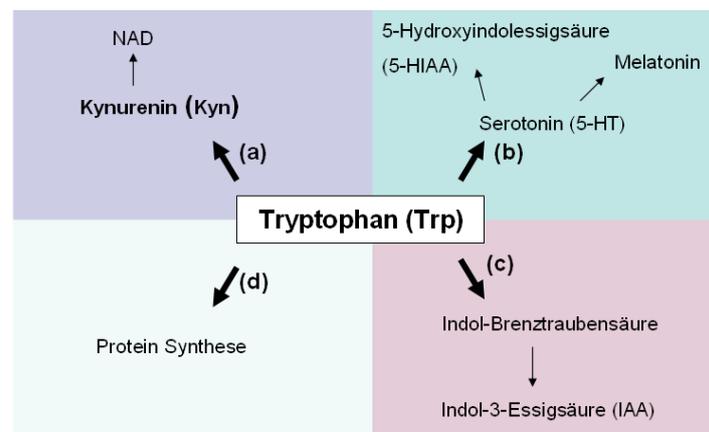


Abbildung 1.1 Schematische Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel.

(a) Kynurenin Stoffwechselweg. 95% des Tryptophans werden zu Kynurenin umgebaut und ausgeschieden. (b) Serotonin Stoffwechselweg (c) Transaminasen Stoffwechselweg (d) Protein Synthese

Im Serotonin Stoffwechselweg wird Tryptophan durch das Enzym Tryptophan Hydroxylase zu Hydroxytryptophan umgewandelt. Dieses wird anschließend durch die 5-Hydroxytryptophan Decarboxylase zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT) decarboxyliert. Serotonin ist ein Monoamin, welches als Gewebshormon und Neurotransmitter eine wichtige Funktion erfüllt. Es liegt im Nervensystem des Darmes, im Zentralnervensystem und Blut vor, wo es die Magen-Darm-Tätigkeit reguliert und das Herz-Kreislaufsystem kontrolliert.

Zudem hat es im Zentralnervensystem Auswirkungen auf viele Gehirnfunktionen, weil es zum Beispiel die Wahrnehmung, den Schlaf, die Temperaturregulation, die Sensorik, das Schmerzempfinden, das Angstempfinden und die Hormonsekretion beeinflusst (Descarries *et al.*, 1990). Diese Vielzahl an Funktionen wird mit Hilfe von mindestens 14 verschiedenen Serotonin-Rezeptoren (5-HT-Rezeptoren) ermöglicht, die in 7 Familien zusammengefasst werden (5-HT₁ – 5-HT₇). Dabei sind fast alle 5-HT-Rezeptoren G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, lediglich der 5-HT₃ Rezeptor stellt einen Ionenkanal dar (Millan *et al.*, 2008).

Das Serotonin wird zusätzlich durch die N-Acetyl Transferase und 5-Hydroxyindol-O-Methyltransferase über N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin zu Melatonin abgebaut. Dieser Abbau findet im Darm, in der Netzhaut und den Pinealocyten der Zirbeldrüse (Epiphyse) statt, von wo aus das Melatonin den Tag-Nacht-Rhythmus des Körpers steuert. Es wird nachts, bei fehlender Lichteinstrahlung freigesetzt und induziert Müdigkeit und Schlaf. Im Winter können Veränderungen des Melatoninspiegels zu vermehrter Müdigkeit, Schlafstörungen und Depression führen. Ähnliche Folgen können jedoch auch durch Schichtarbeit und Jet-Lag-bedingte Abweichungen im Melatoninhaushalt auftreten (Konturek *et al.*, 2007). Ausgeschieden wird Melatonin über den Urin, nachdem es in der Leber mit Hilfe von Cytochrom P450-Monooxygenasen zu 6-Hydroxymelatonin verstoffwechselt und anschließend weiter modifiziert wurde.

Des Weiteren wird Tryptophan von der Tryptophan Transaminase benötigt, die es als Donor für die Übertragung der α -Aminogruppe auf α -Ketosäuren einsetzt. Hierbei werden Tryptophan und 2-Oxoglutarat zu (Indol-3-yl)-Pyruvat und L-Glutamat umgesetzt (O'Neil *et al.*, 1968). Pyridoxalphosphat (PLP), auch bekannt als Vitamin B6, dient bei dieser chemischen Reaktion als Koenzym.

Circa 95% des mit der Nahrung aufgenommenen Tryptophans werden allerdings im Kynurenin Stoffwechselweg abgebaut. Der erste und limitierende Schritt kann dabei von drei Enzymen, der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), der Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und der Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) katalysiert werden. Diese Enzyme werden ausführlich in Kapitel 1. 5 behandelt. Wichtig ist hierbei, dass die Regulation dieses Stoffwechselweges abhängig von den Zellen oder Geweben ist, in denen er stattfindet (Takikawa, 2005), weil nicht in allen Zellen die Enzyme für einen vollständigen Kynurenin Stoffwechsel vorhanden sind (Stone, 1993). Prinzipiell gilt jedoch, dass alle drei Enzyme in der Lage sind den Pyrrolring des Tryptophans zu oxydieren, was zur Synthese von *N*-Formyl-Kynurenin führt. In der Zugrunde liegenden chemischen Reaktion kann sowohl Superoxid als auch molekularer Sauerstoff in das Molekül eingebaut werden. Der verantwortliche

Reaktionsmechanismus ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt (Rafice *et al.*, 2009). In einem weiteren Schritt wird dann durch die Formyl-Kynurenin Formidase die Abspaltung von Ameisensäure katalysiert, wodurch Kynurenin entsteht. Dieses Kynurenin dient in Folge als Ausgangsstoff für eine ganze Reihe von weiteren Abbauprodukten. Es wird durch die Enzyme Kynureninase, Kynurenin Aminotransferase (KAT) oder Kynurenin 3-Hydroxylase zu Metaboliten wie Anthranilsäure, Kynureninsäure, Chinolinsäure und Nicotinamid umgewandelt. Einige dieser Abbauprodukte erweisen sich dabei als neuroregulierend, d. h. sie haben entweder einen neuroprotektiven oder einen neurodegenerativen Einfluss. Neuroprotektiv verhält sich dabei beispielsweise die Kynureninsäure, die einen antikonvulsiven Effekt vermitteln kann. Neurotoxisch hingegen wirken sich 3-Hydroxykynurenin und Chinolinsäure aus (Schwarcz *et al.*, 1983; Stone *et al.*, 2003). Zudem wurde gezeigt, dass nicht nur Neurone, sondern auch T-Zellen von toxisch wirkenden Metaboliten des Kynurenin Stoffwechselweges beeinflusst werden. So können Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure *in vitro* und *in vivo* die T-Zell Antworten von Rattenzellen hemmen (Bauer *et al.*, 2005) und auch menschliche T-Zellen können in der Anwesenheit von toxischen Kynureninmetaboliten nicht mehr proliferieren (MacKenzie *et al.*, 2007). Am Ende des Kynurenin Stoffwechselweges entstehen Nicotinsäure und Nicotinamid, die zusammenfassend als Niacin oder auch Vitamin B3 bezeichnet werden. Beide Produkte haben eine wichtige physiologische Bedeutung, denn sie sind Baustein verschiedener Coenzyme wie zum Beispiel dem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid oder dem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotidphosphat ($\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$). Diese Moleküle und ihre reduzierten Formen ($\text{NADH} / \text{NADPH}$) sind an zahlreichen Redoxreaktionen des Zellstoffwechsel (Citratzyklus, Atmungskette) beteiligt. Um diese Beteiligung am Eiweiß-, Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel erfüllen zu können, muss sichergestellt werden, dass dem Körper ausreichend Niacin zur Verfügung steht. Dies kann zum einen durch die Synthese des Niacins aus Tryptophan erfolgen, zum anderen kann das Niacin jedoch auch aus Nahrungsmitteln aufgenommen werden. Besonders reich an Niacin sind Fleisch, Milchprodukte, Eier, Obst und Gemüse. Ist im Körper nicht ausreichend Niacin vorhanden, so kann sich dies in Appetitlosigkeit, Konzentrations- und Schlafstörungen äußern, die von Hautveränderungen (Dermatitis), Durchfällen, Depressionen und Schleimhautentzündungen begleitet werden. Im schlimmsten Fall führt ein Mangel an Niacin zur tödlich verlaufenden Krankheit Pellagra (rauhe Haut), die meist in Gebieten auftritt, in denen sich Menschen ausschließlich von Mais ernähren. Dieser enthält kaum Tryptophan und nur gebundenes und stoffwechsellinaktives Niacytin. Ähnliche Mangelerscheinungen können jedoch auch durch

krankheitsassoziierte Unternährung (z.B. bei Leberzirrhose, Magersucht oder Malabsorption bei chronischen Durchfällen) in Erscheinung treten.

Abbildung 1. 2. zeigt schematisch den Kynurenin Stoffwechselweg, in dem L-Tryptophan abgebaut wird. Zur Vereinfachung wurden einige Metabolite, sowie die jeweils beteiligten Enzyme ausgelassen. Im folgenden Abschnitt 1. 5 sollen dann die drei Tryptophan abbauenden Enzyme IDO, IDO-2 und TDO genauer charakterisiert werden.

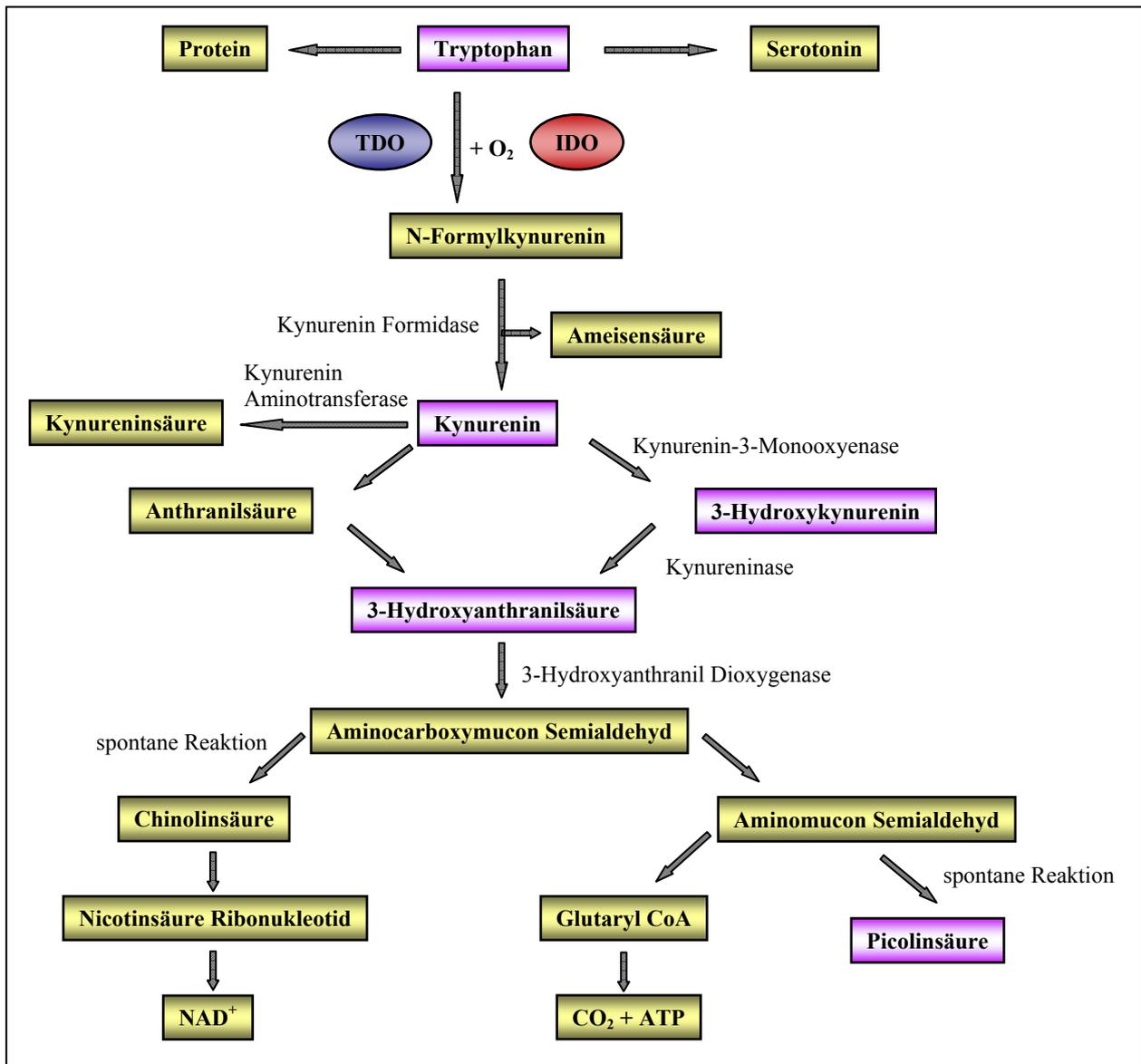


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Kynurenin Stoffwechselweges.

Zur Vereinfachung sind nicht alle beteiligten Enzyme und Metabolite gezeigt. Immunologisch relevante Metabolite sind purpur markiert.

1.5. Tryptophan oxydierende Enzyme

Wie bereits erwähnt kann der erste und limitierende Schritt des Tryptophanabbaus durch die drei Enzyme Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) katalysiert werden. In diesem Kapitel werden diese Enzyme nun genauer charakterisiert.

1.5.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (EC 1.13.11.42)

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase ist das bisher am meisten untersuchte Enzym in der Reihe der Tryptophan oxydierenden Enzyme. Der Hauptgrund für die in den letzten Jahren verstärkte Forschung an der IDO ist dabei die Tatsache, dass die Aktivität der IDO starke antimikrobielle und immunregulatorische Effekte vermittelt. Das Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen könnte zur Entwicklung neuer Medikamente im Bereich der Tumor- und Transplantationsmedizin führen.

1.5.1.1. Entdeckung der IDO

1937 beschrieben Kotake und Ito, dass Kaninchen, denen man D-Tryptophan eingeflößt hatte, D-Kynurenin im Urin ausscheiden (Kotake *et al.*, 1937). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch kein D-Tryptophan abbauendes Enzym bekannt. Erst 30 Jahre später wurde die IDO als das verantwortliche Enzym von Yamamoto und Hayaishi im Darm von Kaninchen entdeckt (Yamamoto *et al.*, 1967) und 1978 erstmals isoliert und beschrieben (Shimizu *et al.*, 1978). Später wurde dann aber festgestellt, dass die IDO in vielen Organen exprimiert werden kann. Die höchste IDO-Aktivität findet man in der Lunge, dem Darm und der Plazenta (Sono *et al.*, 1996; Takikawa, 2005).

1.5.1.2. Struktur der IDO

Das für die humane IDO kodierende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8p12-p11) (Burkin *et al.*, 1993). Es besteht aus 10 Exons, die für ein offenes Leseraster von 1209 Nukleotiden und somit 403 Aminosäuren kodieren. Das IDO Protein ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa und trägt ein Häm als prosthetische Gruppe. Es ähnelt anderen Häm-bindenden Proteinen wie zum Beispiel dem Myoglobin der Mollusken, was auf einen gemeinsamen Ursprung hinweist (Yuasa *et al.*, 2003). Anhand der im Jahre 2006 veröffentlichten Kristallstruktur der IDO sind eine kleine und eine große Untereinheit zu

erkennen, die durch eine Schleife verbunden sind und das Häm umgeben (Sugimoto *et al.*, 2006).

1.5.1.3. Katalytische Aktivität der IDO

Die IDO hat eine hohe Affinität für L-Tryptophan ($K_m \sim 0,02$ mM) (King *et al.*, 2007). Zusätzlich ist sie jedoch auch in der Lage D-Tryptophan und andere Metabolite des Kynurenin Stoffwechselweges wie zum Beispiel Serotonin, Tryptamin und L-5-Hydroxykynurenin zu oxydieren (Shimizu *et al.*, 1978). Die Aktivität der IDO kann durch den Einsatz verschiedener Inhibitoren gehemmt werden. Der bekannteste Inhibitor ist dabei das 1-Methyl-Tryptophan, das 1991 als IDO-spezifischer Inhibitor beschrieben wurde (Cady *et al.*, 1991) (siehe Kapitel 1.6).

1.5.1.4. Expression der IDO

Die Expression der IDO wird durch immunologische Mediatoren wie zum Beispiel das Prostaglandin oder membranständige Rezeptoren wie CTLA4 (Fallarino *et al.*, 2005), CD40 (Hwu *et al.*, 2000) oder Toll-like Rezeptoren (Hayaishi *et al.*, 2004) reguliert. Die wichtigste Rolle spielt jedoch die Induktion der IDO-Expression in nahezu allen Säugerzellen durch das Zytokin IFN- γ (Taylor *et al.*, 1991), die durch die Anwesenheit der Zytokine TNF- α und/oder IL-1 β verstärkt wird (Heseler *et al.*, 2008). Dabei wird die *ido*-Transkription durch die Aktivierung des in Kapitel 1.1. beschriebenen JAK-STAT-Signalweges kontrolliert (Shuai *et al.*, 1993). Das IFN- γ bindet dabei an einen Rezeptorkomplex, der nach Aktivierung eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 bewirkt, welcher dann in den Nukleus wandert und dort an GAS-Motive (gamma-aktivierte Sequenz) bindet. Somit kommt es zu einer ersten Transkription der *ido*, die durch eine sekundäre Antwort auf IFN- γ verstärkt wird, denn gleichzeitig wird auch die Expression von IRF-1 (*interferon regulated factors*) initiiert. Dieses bindet dann an so genannte ISRE Sequenzen (*IFN-stimulated response elements*) in der *ido* Promotorregion, was sich in einer verstärkten *ido*-Expression auswirkt (Schröder *et al.*, 2004). Die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α erhöhen ebenfalls die transkriptionelle Aktivität der *ido* Promotorregion (Babcock *et al.*, 2000). Der zugrunde liegende Mechanismus scheint in diesem Fall eine zusätzliche Stimulation des IRF-1 zu sein, in dessen Promotorbereich zusätzlich zu GAS Motiven auch κ B-Motive liegen (Saha *et al.*, 2010). Diese werden wahrscheinlich von NF- κ B erkannt, welches wiederum durch die

Zytokine IL-1 β und TNF- α aktiviert wird. Außerdem können die beiden Zytokine auch die Expression der IFN- γ Rezeptoren auf der Zelloberfläche erhöhen (Shirey *et al.*, 2006). Schließlich ist noch zu erwähnen, dass auch Infektionen mit Mikroben (wie beispielsweise Viren oder andere intrazelluläre Pathogene) eineIDO-Induktion *in vivo* in einigen Zelltypen hervorrufen. So ist zum Beispiel gezeigt worden, dass in humanen Seren Zeichen einer erhöhten IDO-Aktivität nach einer Infektion mit dem Dengue Virus nachweisbar waren (Becerra *et al.*, 2009). Zudem scheint auch eine posttranslationale Kontrolle der IDO stattzufinden, die durch die Verfügbarkeit und den Einbau des Häms und durch Änderungen des intrazellulären Redoxstatus hervorgerufen wird (Thomas *et al.*, 2001). So wird auch in einigen Dendritischen Zellpopulationen inaktives IDO Protein exprimiert, die Enzymaktivität kann aber erst nach Stimulation mit IFN- γ hervorgerufen werden (Mellor *et al.*, 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus ist hierbei jedoch noch ungeklärt.

Eine IDO-Expression findet sich in immunhistologischen Untersuchungen konstitutiv oder auf induzierbare Art und Weise in vielen Organen wie Plazenta, Lunge, Darm, Leber, Milz, Niere, Magen und Gehirn. Durch IFN- γ kann die IDO *in vitro* in myeloiden Zelllinien (Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen), Epithelzellen, Fibroblasten, Muskelzellen, Endothelzellen und einigen Tumorzelllinien induziert werden (Grohmann *et al.*, 2003; Mellor *et al.*, 2004; Takikawa, 2005; Thomas *et al.*, 1999).

1.5.1.5. Biologische Funktion der IDO

Einmal exprimiert, führt IDO zur lokalen Depletion von L-Tryptophan in der Mikroumgebung der Gewebe, wobei Metabolite des Kynurenin Stoffwechsels gebildet werden. Dadurch kommt der IDO eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr zu, weil sie die Fähigkeit besitzt das Wachstum einer großen Bandbreite von Mikroorganismen zu hemmen und weil dieser inhibitorische Effekt auf einer allgemeinen Wirkungsweise, nämlich der Depletion der essenziellen Aminosäure Tryptophan beruht (Taylor *et al.*, 1991). Nichtsdestotrotz treten auch Wechselwirkungen mit dem adaptiven Immunsystem auf, weil die IDO einerseits durch das von T-Zellen produzierte IFN- γ induziert wird, andererseits aber auch selbst eine T-Zell Antwort durch die Produktion von Kynurenin Metaboliten oder durch eine Tryptophandepletion beeinflusst. Sowohl der antimikrobielle- als auch der immunregulatorische Effekt der IDO sollen im Folgenden genauer erläutert werden.

1.5.1.5.1. Antimikrobielle Effekte der IDO-Aktivität

Bereits Ende der 70er Jahre wurde bekannt, dass in Lungen von Mäusen, denen bakterielles Lipopolysaccharid intraperitoneal verabreicht wurde, eine erhöhte IDO-Expression anzutreffen ist (Yoshida *et al.*, 1978), was ein Hinweis darauf ist, dass eine Aktivität der IDO im Zusammenhang mit der Bekämpfung von Infektionen steht. Ein weiterer Beweis für diese Theorie wurde dann 1984 von Pfefferkorn erbracht, der zeigen konnte, dass eine IFN- γ induzierte IDO-Aktivität in humanen Fibroblasten zu einer Hemmung des obligat intrazellulär wachsenden Parasiten *Toxoplasma gondii* führt (Pfefferkorn, 1984). Als Wirkmechanismus wurde dabei die IDO-vermittelte Depletion der Aminosäure Tryptophan beschrieben, da sich der Effekt durch die Zugabe von Tryptophan wieder aufheben ließ. Weitere Analysen zeigten in den folgenden Jahren, dass auch andere Tryptophan-auxotrophe Mikroorganismen durch einen IDO-vermittelten Tryptophanabbau in ihrem Wachstum gehemmt werden können. Dazu zählen Bakterien wie zum Beispiel Chlamydien (Pantoja *et al.*, 2000), Gruppe B Streptokokken (MacKenzie *et al.*, 1998), Enterokokken (MacKenzie *et al.*, 1999) und *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001), außerdem Viren wie Herpes simplex Virus (Adams *et al.*, 2004), Cytomegalievirus (Bodaghi *et al.*, 1999) und Masern Virus (Obojes *et al.*, 2005) und neben *Toxoplasma gondii* auch andere Parasiten wie *Neospora caninum* (Spekker *et al.*, 2009). Hierbei war der IDO-vermittelte antimikrobielle Effekt in einer Vielzahl verschiedener humaner Zellen wie zum Beispiel Endothelzellen (Däubener *et al.*, 1999), Makrophagen (MacKenzie *et al.*, 1998), Uroepithelzellen (MacKenzie *et al.*, 1999) und Hirntumoren (Schroten *et al.*, 2001) nachweisbar.

1.5.1.5.2. Immunregulatorische Effekte der IDO-Aktivität

Dass die IDO nicht nur antimikrobielle, sondern auch immunregulatorische Funktion erfüllen kann, wurde erstmals 1998 von Munn und Mitarbeitern gezeigt (Munn *et al.*, 1998). Diese Arbeitsgruppe fand heraus, dass trächtige Mäuse, denen der IDO Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan systemisch zugeführt wurde, allogene, nicht aber syngene Feten abstießen. Daraus ging die Hypothese hervor, dass der IDO eine zentrale Rolle in der Schwangerschaft zukommt, weil sie in der Plazenta einen lokalen Tryptophanmangel verursacht, der die Proliferation maternaler T-Zellen hemmt. Somit wird eine Abstoßung des allogenen Fetus verhindert. Dass ein solcher Einfluss des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus auf T-Zellen erfolgen kann, wurde kurze Zeit später auch direkt gezeigt. *In vitro* Experimente konnten belegen, dass Makrophagen und auch bestimmte Dendritische Zellen, die IDO exprimierten, eine T-Zell Antwort unterdrücken konnten, indem sie den T-Zellen das für sie notwendige

Tryptophan entzogen (Munn *et al.*, 1999; Mellor *et al.*, 2004). Zusätzlich wurde auch herausgefunden, dass nicht nur der IDO-vermittelte Tryptophanmangel, sondern auch die Produkte des Tryptophan Katabolismus wie zum Beispiel Kynurenin das Wachstum der T-Zellen und deren Vitalität regulieren (Mellor *et al.*, 1999; Grohmann *et al.*, 2003).

Die IDO-vermittelte Hemmung des T-Zell Wachstums ist auch im Bereich der Tumorummunologie von großem Interesse. So zeigten *in vitro* Studien, dass naive CD4⁺CD25⁻ T-Zellen sich IDO-abhängig zu CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen differenzieren (Fallarino *et al.*, 2006) und somit die Entstehung tumorspezifischer Effektorzellen hemmen können. In *ex vivo* Experimenten wurde eine IDO-Expression in Dendritischen Zellen in Tumor-drainierenden Lymphknoten nachgewiesen, die eine Entwicklung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Tregs) begünstigen (Liu *et al.*, 2009).

Die immunregulatorische Funktion der IDO wird darüber hinaus im Rahmen von Organtransplantationen untersucht. Hier konnte in murinen Tiermodellen gezeigt werden, dass eine spezifische Inhibition der IDO eine beschleunigte Abstoßungsreaktion auslöst. Ferner kann eine IFN- γ -induzierte IDO-Expression zu einer verbesserten Toleranz gegenüber allogenen Nieren- und Lebertransplantaten führen (Laurence *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2008).

1.5.2. Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) (EC 1.13.11.52)

Der am besten untersuchte Vertreter aus der Gruppe Tryptophan oxydierenden Enzyme ist die IDO. Erst kürzlich wurde jedoch ein zweites Protein entdeckt, das starke Ähnlichkeiten zur IDO aufweist und somit als IDO-2 bezeichnet wurde.

1.5.2.1. Entdeckung der IDO-2

Im Jahre 2007 wurde bekannt, dass ein IDO Gen in Menschen und Mäusen existiert, welches eine orthologe, also funktionelle Verwandtschaft mit der IDO aufweist. Die so genannte IDO-2 wurde in Nieren-, Epididymis- und Lebergewebe von Mäusen nachgewiesen (Ball *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnte die humane IDO-2 vor allem in der Plazenta, im Uterus und im Gehirn aufgefunden werden (Ball *et al.*, 2007).

1.5.2.2. Struktur der IDO-2

Die kompletten Sequenzen der murinen und der humanen IDO-2 wurde 2007 veröffentlicht (Ball *et al.*, 2007). Die betreffenden Gene besitzen eine ähnliche genomische Struktur wie die IDO und befinden sich jeweils in der Nähe des IDO Locus auf Chromosom 8. Daher ist es wahrscheinlich, dass die IDO-2 durch eine Duplikation der IDO entstanden ist. Die murine IDO-2 besteht aus 405 Aminosäuren, die zu 46% mit denen der murinen IDO identisch sind. Auch die Häm Domänen der beiden Enzyme ähneln sich stark und sind bis auf 2 Aminosäuren konserviert.

1.5.2.3. Katalytische Aktivität der IDO-2

Bereits in der Erstbeschreibung der IDO-2 konnte gezeigt werden, dass sie ebenfalls den ersten und limitierenden Schritt beim Abbau von L-Tryptophan katalysieren kann (Ball *et al.*, 2007). Außerdem können beide Enzyme eine ähnlich Bandbreite an Substraten metabolisieren (Ball *et al.*, 2009). Ein genauere Vergleich zwischen den katalytischen Aktivitäten der IDO und IDO-2 zeigte dann aber, dass sie sehr verschiedene biochemische Charakteristika aufweisen (z. B. unterschiedliches pH-Optimum), was ein Hinweis auf unterschiedliche physiologische Funktionen sein könnte (Austin *et al.*, 2009).

1.5.2.4. Expression der IDO-2

Über die Expression der IDO-2 sind bisher nur wenige Daten veröffentlicht. Es wurde lediglich gezeigt, dass IDO-2 Protein in murinen und humanen Zellen und auch in Tumorzellen anzutreffen ist (Löb *et al.*, 2009; Löb *et al.*, 2008). In diesem Kontext wurden zudem auch unterschiedliche Spleiß-Varianten beschrieben, die sich in ihrer enzymatischen Aktivität unterscheiden (Metz *et al.*, 2009). Zudem ist zurzeit noch unbekannt, wie die Expression der IDO-2 reguliert wird. Erste Ergebnisse belegen, dass IFN- γ keinen Induktor der IDO-2 darstellt.

1.5.2.5. Biologische Funktion der IDO-2

Bisher konnte keine Aussage über eine mögliche biologische Funktion der IDO-2 *in vivo* getroffen werden. Im Gegensatz zur IDO scheint die IDO-2 bei Infektionskrankheiten keine Rolle zu spielen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass in einem murinen *in vivo*

Malaria Infektionsmodell zwar dieIDO, nicht aber dieIDO-2-Expression aufgrund der zirkulierenden Zytokine erhöht war (Ball *et al.*, 2009).

1.5.3. Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) (EC 1.13.11.11)

Das dritte Enzym in der Reihe der Tryptophan oxydierenden Enzyme ist die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO bzw. TDO2), die auch als „Tryptophan Oxygenase“ oder „Tryptophan Pyrrolase“ bezeichnet wird.

1.5.3.1. Entdeckung der TDO

Die TDO wurde bereits im Jahre 1936 als erstes Enzym beschrieben, das Tryptophan zu Kynurenin in Säugern metabolisiert (Kotake *et al.*, 1936). Eine genauere Charakterisierung erfolgte dann 1955 anhand von TDO Enzym, das aus der Leber von Ratten isoliert wurde (Knox *et al.*, 1955).

Eine TDO-Expression wurde jedoch nicht nur in Säugern nachgewiesen, sondern auch in vielen anderen Spezies wie zum Beispiel Insekten (*Drosophila melanogaster*), über 50 verschiedenen Bakterienarten (u. a. *Xanthomonas campestris*, *Ralstonia metallidurans*) und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Searles *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2007; Iwamoto *et al.*, 1995). Die weite Verbreitung der TDO unter den unterschiedlichen Lebensformen und die dabei auffällige Konservierung der jeweiligen Sequenzen, lässt darauf schließen, dass die TDO ein evolutionär sehr altes Enzym ist, das sich schon früh während der Evolution entwickelt hat (Yuasa *et al.*, 2007). So weisen zum Beispiel die TDO Sequenzen in der Ratte und im Menschen eine 88%ige Homologie und die TDO Sequenzen im Bakterium *Xanthomonas campestris* und im Menschen eine ca. 40%ige Homologie auf (Comings *et al.*, 1995).

1.5.3.2. Struktur der TDO

Das für die humane TDO kodierende Gen befindet sich auf dem 4. Chromosom (4q31.3) (Comings *et al.*, 1991). Es besteht aus 12 Exons, die für eine mRNA mit einer Länge von 1221 Nukleotiden und für 406 Aminosäuren kodieren (Comings *et al.*, 1995). Das TDO Protein ist ein Häm-bindendes Homotetramer mit einem Molekulargewicht von ~ 190 kDa in Eukaryonten und ~ 120 kDa in Prokaryonten. Dabei besitzt jede Untereinheit eine Größe von ca. 45kDa, was in etwa der Größe derIDO in Säugern entspricht (Rafice *et al.*, 2009). Da die

Sequenz der TDO und IDO nur eine Homologie von 10% aufweist, ist ein Vergleich nur aufgrund der jeweiligen Struktur möglich. Dabei ergibt sich, dass das aktive Zentrum stark konserviert ist (Forouhar *et al.*, 2007). Dies wird besonders auch anhand der Kristallstrukturen deutlich (Zhang *et al.*, 2007). Aus diesem Grunde wird diskutiert, ob der Bindemodus an das Substrat Tryptophan bei beiden Enzymen ähnlich verläuft (Zhang *et al.*, 2007; Sugimoto *et al.*, 2006; Thackray *et al.*, 2008). Der genaue katalytische Mechanismus der beiden Enzyme ist allerdings noch nicht endgültig geklärt (Rafice *et al.*, 2009).

1.5.3.3. Katalytische Aktivität der TDO

Die TDO ist ebenso wie die IDO und die IDO-2 in der Lage, Tryptophan zu *N*-Formylkynurenin zu metabolisieren. Ein entscheidender Unterschied zwischen den drei Enzymen ist allerdings die Substratspezifität. Während die IDO und die IDO-2 vergleichsweise substratunspezifisch arbeiten, ist die TDO lediglich in der Lage stereospezifisch L-Tryptophan (bakterielle TDO $K_m \sim 0,14$ mM; humane TDO $K_m \sim 0,19$ mM) zu spalten (Forouhar *et al.*, 2007, Batabyal *et al.*, 2007). Die strukturelle Basis dieser Stereospezifität ist dabei die Tatsache, dass die Carboxylat- und Ammonium-Hälften des Tryptophans durch elektrostatische Interaktionen sowie Wasserstoffbrücken von dem Enzym erkannt werden. Diese Bindungsstrukturen sind in IDO / IDO-2 und TDO auf andere Art und Weise ausgebildet (Forouhar *et al.*, 2007). Analysen mit anderen Tryptophan-Analoga zeigten jedoch auch, dass die TDO in seltenen Fällen dazu in der Lage ist, Derivate zu spalten, die an der 5' oder 6' Position substituiert sind, wie beispielsweise 5-Fluorotryptophan und 6-Fluorotryptophan (Basran *et al.*, 2008).

1.5.3.4. Expression der TDO

Die TDO ist das erste Enzym, bei dem eine Regulation der Enzymaktivität durch hormonelle Einflüsse gezeigt werden konnte (Knox *et al.*, 1955). Zu diesen Hormonen zählen Epinephrin, Histamin und Corticosteroide wie Cortison (Knox *et al.*, 1955; Wood *et al.*, 1954; Geschwind *et al.*, 1953). Eine genaue Analyse ergab, dass die Glucocorticoid-abhängige Induktion der *tdo* in der Ratte von zwei separaten, partiell palindromischen Sequenzen vermittelt wird, die ca. 450 bp und 1200bp in 5' Richtung der *tdo* liegen. Diese so genannten *Glucocorticoid Response Elements* (GRE) werden vom aktivierten Glucocorticoid-Rezeptor gebunden, was in einer ca. 10fach erhöhten Transkriptionsrate von TDO mRNA resultiert (Danesch *et al.*, 1987, Kröger *et al.*, 1966). Zudem findet sich ebenfalls in 5' Richtung der TDO eine Sequenz, die

eine starke Homologie zum CACCC Element des Globin Promotors aufweist. Da Globine wie zum Beispiel Hämoglobin und Myoglobin Sauerstoff reversibel binden können, weist diese strukturelle Ähnlichkeit darauf hin, dass zusätzliche, unbekannte, bindende Faktoren eine TDO Expression induzieren (Danesch *et al.*, 1987). Obwohl im Menschen die TDO-Expression ebenfalls nach einer Stimulation mit Glucocorticoiden erhöht ist, weisen die regulatorischen Regionen der TDO von Ratte und Mensch einige Unterschiede auf. So ist im Menschen ein GRE durch Insertionen verschoben, während das proximale GRE und die Globin Promotor Sequenz vollkommen fehlen. Stattdessen finden sich beim Menschen GRE-ähnliche Mikrosatelliten Regionen mit multiplen GTT Wiederholungen und zusätzliche GT(n)-reiche Sequenzen, die für die Glucocorticoid-induzierte TDO-Expression verantwortlich sind (Comings *et al.*, 1995).

Sehr früh konnte gezeigt werden, dass die TDO eine hohe *Turnover* Rate besitzt und durch das Substrat L-Tryptophan stabilisiert wird (Schimke *et al.*, 1965). Eine weitere Regulation der TDO resultiert aus der intrazellulären Konkurrenz um verfügbares Häm mit anderen Häm-bindenden Proteinen (Feigelson *et al.*, 1974).

Die TDO wird in Säugern hauptsächlich in der Leber exprimiert. Es gibt aber auch einige wenige Beschreibungen einer TDO-Expression im Gehirn, der Haut oder während der frühen Schwangerschaft in Feten (Haber *et al.*, 1993; Ishiguro *et al.*, 1993, Suzuki *et al.*, 2001). Während ein funktionell relevanter, synergistischer, durch IDO- und TDO-vermittelter Tryptophanabbau in Feten diskutiert wird, steht der Beweis für eine enzymatische Aktivität der TDO im Gehirn und in der Haut aus (Tatsumi *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001).

1.5.3.5. Biologische Funktion der TDO

Bedingt durch die Tatsache, dass in Säugern eine TDO-Aktivität hauptsächlich in der Leber beobachtet wird und dass diese Aktivität durch den Einfluss von Hormonen, vor allem aber durch die Anwesenheit des Substrates L-Tryptophan gesteuert wird, war zu Beginn dieser Arbeit davon auszugehen, dass die TDO eine hauptsächliche Rolle in der Tryptophan Homöostase spielt. Da sie somit einen Großteil des Tryptophans dem Kynurenin Stoffwechselweg zuführt, steht weniger Tryptophan für die Synthese des Neurotransmitters Serotonin zur Verfügung. Daher wird die TDO-Aktivität auch mit neuropsychiatrischen Erkrankungen assoziiert. So konnte etwa gezeigt werden, dass Polymorphismen in humanen TDO Genen mit dem Auftreten von Autismus korrelierten (Nabi *et al.*, 2003).

Ob die TDO darüber hinaus jedoch, ebenso wie die IDO, antimikrobielle und immunregulatorische Einflüsse haben kann, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt.

1.6. Pharmakologische Beeinflussung der IDO- und TDO-Aktivität

1-Methyl-Tryptophan (1-MT) ist ein synthetisches Tryptophan-Analogon, das bereits seit Anfang der 90er Jahre eingesetzt wird, um eine Aktivität der IDO zu hemmen (Cady *et al.*, 1991). Es kann als 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT), 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) oder als Razemat 1-DL-Methyl-Tryptophan (1-DL-MT) verwendet werden. Funktionell konnte die katalytische Aktivität der IDO und auch die IDO-vermittelten antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte (besonders im Bereich der Tumorthherapie) durch 1-MT in allen experimentellen Systemen aufgehoben werden. Im Laufe der letzten Jahre zeigte sich jedoch immer wieder, dass die unterschiedlichen Isoformen verschiedene Charakteristika aufweisen, wenn es um die Inhibition der IDO geht. So war beispielsweise 1-L-MT, nicht aber 1-D-MT, in der Lage, den IDO-vermittelten Arrest einer T-Zell Proliferation in verschiedenen humanen *in vitro* Systemen mit unterschiedlichen Zelllinien und Krebszellen aufzuheben (Qian *et al.*, 2009). Gleichermäßen konnte auch die IDO-Aktivität in Protein Isolaten von primären humanen Darmkrebs-Zellen nur durch 1-L-MT gehemmt werden (Lüb *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu wurde aber von Hou *et al.* im Jahre 2007 gezeigt, dass 1-D-MT, nicht 1-L-MT, viel effektiver eine IDO-vermittelte Suppression von T-Zellen *in vivo* verhinderte. In diesem Zusammenhang wurde auch die Aktivität der IDO in humanen Dendritischen Zellen und murinen Dendritischen Zellen untersucht. In beiden Fällen konnten beide Isoformen des 1-MT die IDO-vermittelten Effekte überraschenderweise auch *in vitro* aufheben (Hou *et al.*, 2007). Zusammenfassend belegen viele Publikationen jedoch, dass 1-L-MT als starker Inhibitor der IDO in biochemisch basierten *in vitro* Studien anzusehen ist, während das 1-D-MT *in vivo* der überragende IDO Inhibitor im Bereich der murinen Tumorforschung ist (Liu *et al.*, 2010). Bis heute konnte keine Erklärung für diese entgegensätzlichen Beobachtungen gefunden werden. Oftmals wurde zwar diskutiert, ob in diesem Zusammenhang der IDO-2 eine Rolle zukommt, weil sie ebenfalls in einigen humanen Tumoren exprimiert wird und zudem von der Arbeitsgruppe um Metz initial beschrieben wurde, dass die IDO-2 sehr effektiv von 1-D-MT gehemmt wird (Lüb *et al.*, 2009; Metz *et al.*, 2007). Diese Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden, da Studien mit IDO-defizienten Mäusen zeigten, dass 1-D-MT in Abwesenheit der IDO keinen antitumorösen Effekt vermittelt (Hou *et al.*, 2007). Zudem wurde erst vor kurzem von Yuasa *et al.* veröffentlicht, dass die Aktivität der IDO-2 in allen untersuchten Vertebraten (Maus, Opossum, Schnabeltier, Huhn, Fisch) viel besser durch 1-L-MT als durch 1-D-MT gehemmt wird (Yuasa *et al.*, 2010). Andere Arbeiten belegen zudem, dass humane Dendritische Zellen

und Tumorzellen eine IDO-2 mRNA exprimieren, ohne dass eine enzymatische Aktivität der IDO-2 nachweisbar ist (Löb *et al.*, 2008, Löb *et al.*, 2009).

Ein inhibitorischer Einfluss des 1-Methyl-Tryptophans auf die TDO wurde bereits zu Beginn der 1-MT Forschung ausgeschlossen, weil das 1-MT die katalytische Aktivität der TDO nicht hemmen konnte (Cady *et al.*, 1991). Als Beweis wurde zudem ein Strukturvergleich zwischen der IDO und der TDO herangezogen, der zeigte, dass die Wechselwirkungen des Tryptophans mit dem IDO Enzym zur Formation einer Tasche führen, die die Methylgruppe mit aufnehmen kann. Eine solche Tasche scheint im Aktiven Zentrum des TDO Moleküls nicht aufzutreten, da hier das Stickstoffatom des Tryptophans, an welchem bei 1-MT die Methylgruppe sitzt, direkt eine Wasserstoffbrücke zum Histidin 55 der TDO eingeht (Forouhar *et al.*, 2007).

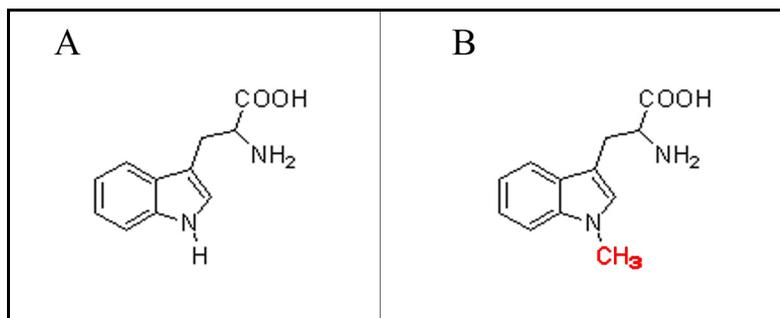


Abbildung 1.3 Strukturformel von (A) Tryptophan und (B) 1-Methyl-Tryptophan. Die zusätzliche Methylgruppe im 1-Methyl-Tryptophan Molekül ist rot markiert

1.7. Zielsetzung der eigenen Arbeit

Der erste und limitierende Schritt beim Abbau der essenziellen Aminosäure Tryptophan kann durch drei unterschiedliche Enzyme katalysiert werden. Sowohl die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), als auch die Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) sind in der Lage, Tryptophan zu *N*-Formylkynurenin zu metabolisieren. Während der IDO-2 bislang keine biologische Funktion *in vivo* zugeschrieben werden konnte, wurde der IDO eine Rolle bei der Immunabwehr gegen verschiedene Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten zugesprochen. Dieser antimikrobielle Effekt wird durch die Depletion der Aminosäure Tryptophan verursacht, denn er kann durch eine Zugabe von Tryptophan aufgehoben werden. Außerdem kann eine IDO-Aktivität immunregulatorische Effekte vermitteln, indem sie das Wachstum, das Überleben oder die Aktivierung von T-Zellen beeinflusst. In diesem Zusammenhang ist die Basis für die

immunregulatorischen Effekte nicht ausschließlich die Depletion der Aminosäure Tryptophan, sondern auch die Produktion toxischer Metabolite.

Die Erkenntnis, dass die IDO antimikrobielle und immunregulatorische Effekte vermitteln kann, wurde in den letzten Jahren immer weiter vertieft. Nichtsdestotrotz konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, dass nicht nur die enzymatische Aktivität der IDO, sondern auch das IDO Protein selbst für diese Effekte verantwortlich ist. Zudem wird die Funktion der IDO zumeist in IFN- γ -aktivierten Zellen untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass das IFN- γ ein sehr potentes Zytokin darstellt, welches einen Einfluss auf über 200 unterschiedliche Genprodukte haben kann. Aus diesem Grunde muss geklärt werden, ob die wichtigen antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte ausschließlich der IDO zugesprochen werden können, oder ob auch zusätzliche IFN- γ -vermittelte Effekte einen Beitrag zu den Befunden leisten.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher überprüft werden, ob die TDO, die die gleiche enzymatische Funktion wie die IDO, nämlich den Abbau von Tryptophan, leistet, ebenfalls antimikrobielle und immunregulatorische Effekte vermitteln kann. Zu diesem Zweck wurde ein Expressionssystem entwickelt, welches IFN- γ -unabhängig eine TDO-Aktivität in humanen Zellen erlaubt. Gleichzeitig ergibt sich aus diesem Testsystem der Vorteil, dass sich in den Zellen entweder die IDO, die TDO oder sogar beide Enzyme gleichzeitig induzieren lassen.

Anhand von *in vitro* und *ex vivo* Testsystemen mit IDO- und TDO-exprimierenden Zellen wurde in einem zweiten Teil der Arbeit die funktionelle Aktivität des therapeutisch relevanten pharmakologischen Inhibitors 1-Methyl-Tryptophan analysiert. Es wurde dabei untersucht, ob das 1-MT als Analogon der Aminosäure Tryptophan selbst einen Einfluss auf zelluläre Funktionen hat, von der TDO/IDO enzymatisch umgesetzt wird, oder bei der Proteinbiosynthese als Tryptophanersatz verwendet wird.

2. Material & Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellen und Versuchstiere

2.1.1.1. Zellen

Die in dieser Arbeit vorgestellten *in vitro* Experimente wurden zu einem großen Teil mit humanen Zervixkarzinomzellen HeLa T-RExTM Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt, die durch das pcDNATM6/TR Plasmid konstitutiv Tetrazyklin-Repressor-Moleküle exprimieren. Diese Zellen wurden stabil mit einem Plasmid transfiziert, das für die komplette humane TDO (*tdo*) Sequenz inklusive eines myc-tags kodiert. Eine Expression der *tdo* wird verhindert, indem die Tetrazyklin-Repressor-Moleküle, die Homodimere bilden, an die Operatorsequenz der humanen TDO binden. Wird den Zellen jedoch Tetrazyklin in der Zellkultur zugefügt, so bindet das Tetrazyklin an die Tetrazyklin-Repressor-Moleküle, was zu einer Konformationsänderung der Dimere führt. Somit geben sie die Promotorregion der *tdo* frei und es findet eine Expression der *tdo_{myc}* statt.

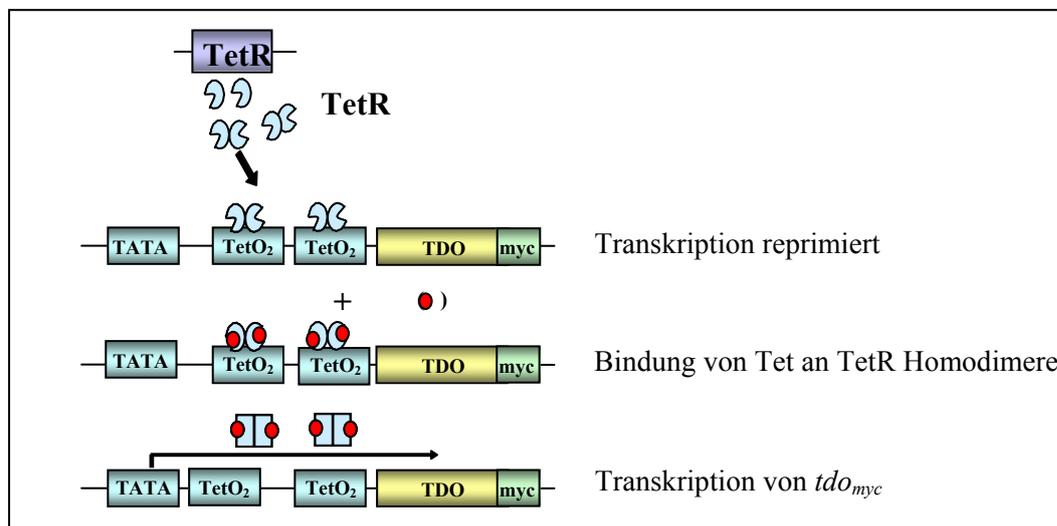


Abbildung 2.1 Tetrazyklin-induzierte Expression der humanen TDO in HeLa T-RExTM TDO Zellen.

HeLa T-RExTM Zellen exprimieren konstitutiv Tetrazyklin-Repressor-Dimere (TetR). Diese binden an die Operatorsequenz (TetO₂) im Promotor der *tdo*. Bei Zugabe von Tetrazyklin (Tet) bindet dieses an die Tetrazyklin-Repressor-Dimere. Das Ergebnis ist eine Konformationsänderung der Dimere, die zur Ablösung der Dimere von der Operatorsequenz führt. Dadurch kann *tdo_{myc}* transkribiert werden.

Tabelle 2.1 Zusammenfassung der verwendeten Zelllinien

Zelllinie (Eigenschaften)	Quelle	Verwendung
86HG39 (humane Glioblastomzellen)	Dr. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf	Wirtszellen für <i>T. gondii</i>
HeLa TDO (<i>tdo_{myc}</i> transfizierte HeLa T-REX TM Zellen)	selbst hergestellt	Experimente
HFF (humane Vorhautfibroblasten)	ATCC, Wesel	Wirtszellen für <i>T. gondii</i>
PBL (humane Blutlymphozyten)	selbst isoliert	Experimente

2.1.1.2. Versuchstiere

Tabelle 2.2 Für *ex vivo* Experimente verwendete Mauslinien

Mauslinie	Herkunft
BALB/c WT	Tierversuchsanlage Universität Düsseldorf
IDO ^{-/-}	Jackson Laboratory, Maine, USA
TDO ^{-/-}	Dr. T. Nakamura, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Osaka, Japan

BALB/c WT und IDO^{-/-} Mäuse wurden bis zum Tag ihrer Tötung in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf gehalten. TDO^{-/-} Mäuse wurden aus Osaka, Japan zugesandt und umgehend verwendet.

2.1.2. Erreger für Infektionsversuche

2.1.2.1. Bakterien

Die bakteriellen Infektionsversuche wurden mit *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Die eingesetzten Bakterienstämme wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und

Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial isoliert und identifiziert.

2.1.2.2. Viren

Humanes Herpes simplex Virus Typ I (HSV) wurde von Prof. K. E. Schneweis (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.1.2.3. Parasiten

Der *Toxoplasma gondii* BK-Stamm wurde von Dr. Seitz und Dr. Saathoff (Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn) erhalten.

2.1.3. Medien, Lösungen und Puffer

2.1.3.1. Medien für die Zellkultur

Tabelle 2.3 Verwendete Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	L-Tryptophan-konzentration	Zusätze	Verwendung	Hersteller
IMDM (Iscoves's Modified Dulbecco's Medium)	15 µg/mL	5 % FCS	HeLa T-REx™, Experimente	Cambrex, München
RPMI 1640 ohne L-Tryptophan, ohne L-Glutamin	0 µg/mL	580 µg/mL L-Glutamin +/- 5% FCS	Experimente	Gibco, Karlsruhe
Konditioniertes Medium: IMDM Medium, in welchem IDO ⁺ HeLa Zellen für 72h das im Medium vorhandene Tryptophan abgebaut hatten	0 µg/mL		Experimente	selbst hergestellt

2.1.3.2. Lösungen

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Diese wurden, wenn nicht anders vermerkt, ausschließlich mit hochreinem Wasser einer Aufbereitungsanlage Direct-Q™ (Millipore GmbH, Schwalmbach) hergestellt, welches im weiteren Verlauf als dH₂O bezeichnet wird.

Tabelle 2.4 Verwendete Lösungen

Lösung	Bestandteile
dNTP-Mix	1mM dATP 1mM dCTP 1mM dTTP 1mM dGTP
Proteinase K-Lösung	6.6 µg/mL in PBS
Kryokonservierungslösung	12 % DMSO 88% FCS

2.1.3.3. Puffer

Tabelle 2.5 Verwendete Puffer

Puffer	Bestandteile
5 x DNA-Probenpuffer	15 % Ficoll Typ 400 0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylenyanol in 5 x TBE Puffer
Blotting-Puffer	50 mL NuPage-Blot-Puffer (20x) (Invitrogen) 200 mL Methanol 750 mL dH ₂ O
Ehrlich's Reagenz	1.2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig
Laufpuffer (Western-Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7.7
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
SDS-Probenpuffer	45 % Glyzerin 25 % β-Mercaptoethanol 10 % SDS 0.15 % Bromphenolblau 30 mM Tris/HCl pH 6.8
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

2.1.4. Primer

Tabelle 2.6 Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Verwendung
m-TDO for	ATGAGTGGGTGCCCGTTTGCAGGAAACAGTGTA	Analyse muriner Leber cDNA
m-TDO rev	ATCGCTGCTGAAGTAAGAGCTGTCACTGTACTCC	Analyse muriner Leber cDNA
m-IDO for	TCAGTAAAATATCTCCTACAGAAGGTTCTAGAAG	Analyse muriner Leber cDNA
m-IDO rev	GACCACTCAGAAGAGCTTTCTCGGTTGTAT	Analyse muriner Leber cDNA
m-Aktin for	GTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAA	Analyse muriner Leber cDNA
m-Aktin rev	CGGTGCACGATGGAGGGGCGGACTCAT	Analyse muriner Leber cDNA
h-Aktin for	ATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTCGA	Analyse muriner Leber cDNA
h-Aktin rev	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGGG	Analyse muriner Leber cDNA
m-IDO for	TGGAGCTGCCCGACGC	Genotypisierung IDO ^{-/-} Maus
m-IDO rev	TACCTTCCGAGCCCAGACAC	Genotypisierung IDO ^{-/-} Maus
m-IDO Neo for	CTTGGGTGGAGAGGCTATTC	Genotypisierung IDO ^{-/-} Maus
m-IDO Neo rev	AGGTGAGATGACAGGAGATC	Genotypisierung IDO ^{-/-} Maus
m-TDO Promotor for	ATGCCATTCTCTTTAAGGATT	Genotypisierung TDO ^{-/-} Maus
m-TDO Exon 1 for	AGCAAACCTGTGTGGTCCTG	Genotypisierung TDO ^{-/-} Maus
m-TDO Exon 2 rev	CTGCAAGTAATTGCCATAG	Genotypisierung TDO ^{-/-} Maus
m-TDO neo for	CTCTTCAGCAATATCACGGG	Genotypisierung TDO ^{-/-} Maus
m-TDO neo rev	TCCGGTGCCCTGAATGAACT	Genotypisierung TDO ^{-/-} Maus

Tabelle 2.7 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

2.1.5. Sonden

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

Tabelle 2.8 Verwendete Sonde für Real-time PCR

Sonde	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
S-HSV	FAM-CGG AGC GCA GCA TCT CGT CCA-TAMRA	Detektion von HSV

2.1.6. Zytokine

Humanes IFN- γ wurde von R&D (Wiesbaden) bezogen, in einer Konzentration von 2×10^5 U/mL in Tryptophan-freiem RPMI gelöst und in Aliquots von 100 μ L bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.7. Antikörper

Tabelle 2.9 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung
Maus-anti-myc	Serotec, Düsseldorf	1:500
Maus-anti-beta-aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000
Kaninchen-anti-IDO	Chemikon, Hofheim	1:3000
Kaninchen-anti-TDO	Dr. C. Miller, Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA	1:750
Sekundäre Antikörper		
POX-anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK / Dianova, Hamburg	1:10000 – 1:70000
Cy ² -anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:500

2.1.8. Größenstandards

2.1.8.1. Größenstandards für DNA

Für den Größenvergleich von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde die „1-kb-DNA-Leiter“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) als Standard eingesetzt. Die Lagerung des Größenstandards erfolgte bei einer Temperatur von -20 °C.

2.1.8.2. Größenstandards für Proteine

Bei Analysen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden zur Bestimmung der molekularen Masse der Proteine in jedem Gel 10µL des Proteingrößenstandards „SeeBlue Plus2 Pre-stained“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) aufgetragen.

2.1.9. Enzyme

Tab. 2.10.:Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Expand-High-Fidelity-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNAse Out	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10. Chemikalien

2.1.10.1. Allgemeine Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Biozym, Oldendorf
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
6-Chloro-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
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
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
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
1-Methyl-L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-D-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-DL-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
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

2.1.10.2. Radiochemikalien

Tabelle 2.10 Radiochemikalien

Radiochemikalie	Aktivität	Bezugsquelle
(L-5-)[³ H]-Tryptophan	1 MBq/mL	Hartmann Analytic, Braunschweig
[³ H]-Thymidin	0.74 MBq/mL	Amersham, Braunschweig
[³ H]-Uracil	1.23 MBq/mL	Amersham, Braunschweig

Die Radiochemikalien wurden in Tryptophan-freiem RPMI 1640 gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.11. 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

2.1.12. 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
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 gesamtzellulärer RNA

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Hepatozyten oder aus eukaryotischen Zelllinien wurden ca. $5-10 \times 10^6$ der betreffenden Zellen geerntet und mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 mL TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen (Karlsruhe) resuspendiert. Bei dem Reagenz handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidiniumthiocyanat Methode. Es folgte ein Zerkleinern der Zellen mit einem Ultraturrax. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden dann 200 μ L Chloroform zugegeben und die Suspension geschüttelt. Nach weiteren 3 Minuten wurde die Suspension bei 13.000 rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde die obere Phase vorsichtig mit einer Pipette in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 500 μ L Isopropanol wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert. Es folgte eine erneute Inkubationszeit von 10 Minuten, der eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 rpm und 4°C folgte. Das Pellet wurde anschließend mit 75%igem Ethanol gewaschen und erneut wie zuvor für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet, in 100 μ L DEPC-H₂O resuspendiert und die RNA Konzentration mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

2.2.1.2. cDNA Synthese aus gesamtzellulärer RNA

Bei der cDNA Synthese wird mRNA von Zellen oder Gewebeproben enzymatisch in DNA umgeschrieben. Hierbei werden die molekularen Verhältnisse der Transkripte nicht verändert. Daher kann die entstehende cDNA zur Expressionsquantifizierung genutzt werden.

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem *M-MLV Reverse Transcriptase Kit* von Invitrogen, Karlsruhe. Dazu wurde zu 1 μ g RNA je 1 μ L Oligo-dT Primer (10 μ M) und 1 μ L dNTP-Mix (10 mM) zugegeben und der Ansatz auf 12 μ L mit dH₂O aufgefüllt. Dann wurde der Ansatz für 5 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend sofort in Eiswasser abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 4 μ L 5 x First Strand Puffer, 2 μ L (0,1 M) DTT und 1 μ L RNase OUT. Dann wurde der Ansatz weitere 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 μ L (200 Units) M-MLV Reverse Transkriptase zugeben und für weitere 50 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 Minuten gestoppt.

2.2.1.3. Amplifikation von DNA Molekülen mittels PCR

Der Ablauf einer PCR entsprach immer dem folgenden Schema: Zuerst wurde die DNA-Doppelhelix bei 94 °C in Einzelstränge denaturiert. Anschließend hybridisierten bei reduzierter Temperatur spezifische Oligonukleotide – sogenannte Primer – an das 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz, was geläufig als 'annealing' bezeichnet wird. Ausgehend von den hybridisierten Primern erfolgte dann die Synthese neuer DNA in 5'→3' Richtung (Elongation) unter Verwendung einer hitzestabilen Polymerase. Die aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isolierte *Taq*-DNA-Polymerase ist das bekannteste Enzym seiner Art, welches selbst bei Temperaturen von über 90 °C stabil ist. Diese Thermostabilität gewährleistet, dass die Polymerase während des Denaturierungsschrittes nicht zerstört wird. Ein Nachteil der *Taq*-Polymerase liegt in der fehlenden 3'→5' Exonukleaseaktivität (*proofreading*), so dass bei der DNA-Synthese eingebaute Fehler rückwirkend nicht korrigiert werden können. Mittlerweile sind jedoch weitere Polymerasen bekannt, die neben der Thermostabilität eine 'proofreading'-Funktion besitzen, wie zum Beispiel die Enzyme *Pfx* und *Pfu* aus *Pyrococcus sp.*. Heute findet der Einsatz von Enzym-Mixen großen Anklang, da man sich bei der Anwendung eines Enzym-Mixes die verschiedenen Eigenschaften unterschiedlicher Enzyme zu Nutze machen kann. Die 'annealing'-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer (T_m) und sollte einige Grad niedriger als der T_m -Wert gewählt werden. Bei Primerpaaren, die eine deutliche Differenz im T_m -Wert aufwiesen, gilt es, die optimale 'annealing'-Temperatur zu ermitteln, bei der beide Primer effizient zum gewünschten Produkt führten. Dafür wurde bei der PCR ein Temperaturgradient angelegt, so dass mehrere Reaktionsansätze parallel unterschiedlichen 'annealing'-Temperaturen ausgesetzt werden konnten.

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	dH ₂ O

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	

2.2.1.4. quantitative Real-time PCR

Die quantitative Real-time PCR, auch Echtzeit PCR genannt, erlaubt eine Quantifizierung von Nukleinsäuren. In dieser Arbeit wurde die Real-time quantitative PCR zur Bestimmung der HSV-I Virusreplikation in der Zellkultur eingesetzt. Als Standard dienten Plasmide, die die zu amplifizierende Region der Viren enthielten. Das Prinzip der Real-time quantitativen PCR beruht auf der Methode der PCR, allerdings kann jedoch die Amplifikation einer bestimmten Nukleinsäure in Echtzeit erfolgen. Dies ist durch den Einsatz von sequenzspezifischen Sonden möglich, die zwischen den Primern an ein Template binden. Jede Sonde ist dabei mit einem Reporter (Fluoreszenzfarbstoff) und einem Quencher versehen. Durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters solange die Sonde vollständig ist. Während des PCR Vorgangs führt jedoch die 5'-3'-Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase zu einem Abbau der Sonde am 5'-Ende. Dies führt zu einer räumlichen Entfernung des Quenchers (6-Carboxy-tetramethylrodamin) vom Reporter (6-Carboxy-fluoresein) und die Fluoreszenz des Reporters kann gemessen werden. Da der frei werdende Reporter mit der Menge des gebildeten PCR-Produktes zunimmt, kann die Ermittlung der ebenfalls proportional ansteigenden Fluoreszenz anzeigen, wie viel Nukleinsäure im jeweiligen Zyklus gebildet worden ist. 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	

2.2.1.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und Gesamt-RNA-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. In dieser Arbeit erfolgte die Auftrennung durch eine Gelelektrophorese in horizontalen Flachbettkammern unter Verwendung von 0,8 – 1,5 %igen Agarosegelen. Zur Herstellung der Gele wurde die entsprechende Menge Agarose in 0,5× TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst, nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C mit 0,3 µg / mL Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und in eine Flachbettkammer gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde anschließend in eine Laufkammer überführt, die entsprechend dem hergestellten Gel mit 0,5× Laufpuffer (TBE-Puffer) befüllt wurde. Die aufzutrennenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6× Ladungspuffer (6×Loading Dye Solution, MBI Fermentas) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 50 bis 90 Volt aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde stets die 1 Kb-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) als Größenstandard verwendet. Durch die Fluoreszenz des Ethidiumbromids (bei 340nm), welches mit doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert, konnten die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren auf einem Transilluminator (Bio Doc Analyze, Biometra, Göttingen) durch Anregung mit UV-Licht visualisiert und mit einer Kamera mit UV-Filter dokumentiert werden.

2.2.2. Zellbiologische Methoden**2.2.2.1. Zellkulturmethoden**

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

2.2.2.2. Kultivierung von Zelllinien

Die Kultivierung von 86HG39, HeLa-TDO und HFF Zellen erfolgte in IMDM Medium, welches mit 5-10 % 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 Trypsin-EDTA (0.25 %) abgelöst. Durch Zugabe von 10 mL Kulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium gegeben.

2.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellen mit Trypanblau hergestellt. Je 10 µL der Verdünnung wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die durchsichtigen und somit lebenden Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.2.2.4. Stimulation von HeLa-TDO Zellen und A2 Zellen

Alle Experimente wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden jeweils 3×10^4 HeLa-TDO Zellen oder 86HG39 Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Zellen wurden mit IFN- γ oder Tetrazyklin (siehe jeweiliges Experiment) für 72 h stimuliert. Anschließend wurde ein Kynureninnachweis im Zellkulturüberstand erbracht und gegebenenfalls eine Infektion durchgeführt.

2.2.2.5. Herstellung von konditioniertem Medium

Um konditioniertes Medium zu erhalten, wurden je 3×10^6 HeLa-TDO Zellen in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm²) für 72 Stunden in 20 mL IMDM Medium mit 5% FCS inkubiert und dabei mit 500U/mL IFN- γ stimuliert. Der Nachweis, dass das Tryptophan im Medium abgebaut war, erfolgte durch eine photometrische Kynureninmessung, eine HPLC Analyse, oder durch den Nachweis der Inhibition des Staphylokokkenwachstums.

2.2.2.6. Verwendung von Tryptophan und 1-Methyl-Tryptophan

204 mg L-Tryptophan und D-Tryptophan wurden in 50 mL RPMI Medium im Wasserbad gelöst. Die so hergestellte 20 mM Stocklösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Jeweils 218 mg 1-L-Methyl-Tryptophan, 1-D-Methyl-Tryptophan und 1-DL-Methyl-Tryptophan wurden in 1 mL 1 M NaOH gelöst und auf 50 mL mit Tryptophan-freiem RPMI Medium aufgefüllt. Diese hergestellte 20 mM Stocklösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.7. Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung wurden die zu konservierenden Zellen geerntet und je 1×10^7 Zellen in 200 µl Kryokonservierungslösung aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Kryotubes pipettiert, auf – 80 °C heruntergekühlt und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.8. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut

Für jedes Experiment wurde PBL frisch aus jeweils 50 mL heparinisiertem (2000 I. E) Vollblut von gesunden Spendern gewonnen. Dazu wurde das Vollblut 1:1 mit PBS gemischt. Dann wurden 15 mL Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biototech, Uppsala, Schweden) in ein 50 mL Reaktionstube vorgelegt und langsam mit 35 mL PBS-Blutgemisch überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 2400 rpm und 6 °C (Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau), ohne eine starke Beschleunigung und ohne starkes bremsen, so dass sich die Blutbestandteile in der Dichtegradienten-Zentrifugation separierten. Das in der oberen Phase angesammelte Blutserum/PBS Gemisch wurde abgesaugt, so dass die PBL in der Interphase mit Hilfe einer Glaspipette in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt werden konnten. Die restlichen Bestandteile des Blutes (Erythrozyten) und das Ficoll wurden verworfen. Die PBL wurden anschließend bis auf 50 mL mit PBS versetzt (besser aufgefüllt) und zum Entfernen der Thrombozyten für 10 Minuten bei 1800 rpm und 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 5 mL abgesaugt und das Pellet mit PBS gewaschen, indem das Röhrchen erneut mit PBS aufgefüllt wurde. Nach einem 10 minütigen Inkubationsschritt bei 1200 rpm und 6 °C wurde das Pellet erneut mit PBS gewaschen. In einem letzten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 800 rpm und 6 °C wurden die PBL im Pellet in 5 mL Tryptophan-freiem RPMI Medium gelöst und ausgezählt.

2.2.2.9. Versuchsansätze mit PBL

Je $1,5 \times 10^5$ PBL wurden pro 96-well Vertiefung eingesetzt. Dazu wurden jeweils 10 μL PBL zu 180 μL Kulturmedium gegeben. Als Kulturmedium diente entweder konditioniertes Medium oder IMDM Medium mit 5% FCS. Den Medien wurden jeweils unterschiedliche Mengen L-Tryptophan oder 1-L-MT zugesetzt. Die Stimulation der T-Zell Proliferation erfolgte durch die Anwesenheit von allogenen T-Zellen oder durch die Zugabe von 10 μL monoklonalem anti-CD3 Antikörper OKT3 (1:3000 Endkonzentration), gewonnen als Überstand von Hybridomzellen (American Type Culture Collection, Rockville).

2.2.2.10. Bestrahlung von Zellen

Eine allogene T-Zell Proliferation wurde durch die Ko-Kultivierung von T-Zellen zweier verschiedener Spender erreicht. Dazu musste die Proliferation jeweils einer T-Zell Population verhindert werden. Frisch geerntete T-Zellen 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. Das Zellpellet wurde dann im gewünschten Medium aufgenommen und für Experimente eingesetzt.

2.2.2.11. Bestimmung der T-Zell Proliferation

Die T-Zell Proliferation wurde entweder durch den Einbau von [^3H]-Thymidin oder den Einbau von (L-5-)[^3H]-Tryptophan nachgewiesen.

Für den Nachweis mittels [^3H]-Thymidin wurden die PBL unter den gewünschten Inkubationsbedingungen (siehe Legende im Ergebnisteil) gehalten. Nach 72 Stunden wurden 7.4 kBq [^3H]-Thymidin zugegeben. 24 Stunden später wurden die Versuchsansätze eingefroren und bis zur Auswertung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Nach dem Auftauen wurden die T-Zellen in einem Zellerntegerät (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) geerntet und auf einen Glasfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Filter mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) versehen, in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgezählt. Hierzu wurde die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung gemessen und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt.

Für den Nachweis mit [³H]-Tryptophan wurden die PBL ebenfalls für 72 Stunden unter den gewünschten Inkubationsbedingungen gehalten. Es folgte eine radioaktive Markierung der Zellen mit 0,75 µg/mL [³H]-Tryptophan. 24 Stunden später wurde der Versuchsansatz eingefroren und der Einbau des [³H]-Tryptophans ebenfalls durch Flüssig-Szintillations Spektrometrie ermittelt (siehe [³H]-Thymidin Methode). Zusätzlich zu den T-Zell Lysaten wurde jedoch auch die [³H]-Tryptophan Inkorporation in die Proteine der T-Zellen gemessen. Dazu wurden die T-Zellen durch einfrieren und auftauen lysiert und die Proteinfraction nach Fällen mit 30% Trichloressigsäure und 3 anschließenden Waschschritten mit PBS analysiert.

2.2.2.12. Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Die Kultivierung des *Toxoplasma gondii* BK Stamm erfolgte in humanen Vorhautfibroblasten (HFF). Dazu wurden HFF Zellen in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²) angezüchtet und nach der Bildung eines Monolayers mit Toxoplasmen im Verhältnis 4:1 beimpft. Anschließend wurde mikroskopisch kontrolliert, inwieweit die Wirtszellen von den Toxoplasmen befallen und zerstört waren. War der größte Teil der Wirtszellen lysiert, so wurden die extrazellulären Tachyzoiten von *T. gondii* durch Zentrifugation geerntet oder auf neue HFF Zellen gegeben.

2.2.2.13. Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Für Infektionsexperimente wurden die Tachyzoiten des *Toxoplasma* BK Stammes samt Zellkulturüberstand von den HFF Zellen abpipettiert. Um die Toxoplasmen von den Wirtszellen zu befreien, wurde der Überstand für 10 Minuten bei 600 rpm zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die Toxoplasmen, die in einem nächsten Zentrifugationsschritt (2200 rpm für 10 Minuten) pelletiert wurden. Anschließend wurden die Toxoplasmen in Tryptophan-freiem RPMI Medium aufgenommen. Nach einer Verdünnung (zum Beispiel 1:10) mit Trypanblau wurde die Toxoplasmenkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Infektion erfolgte mit 2×10^4 Tachyzoiten pro 96-well Vertiefung.

2.2.2.14. Bestimmung der Toxoplasmenproliferation

Die Toxoplasmenproliferation wurde mit Hilfe von [³H]-Uracil detektiert (Pfefferkorn *et al.*, 1977). Dabei wurde die Tatsache zunutze gemacht, dass die Toxoplasmen das Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase besitzen. Dieses Enzym erlaubt die direkte Inkorporation von Uracil in die RNA. Zur Bestimmung des [³H]-Uracil Einbaus wurden die Toxoplasmen 48

Stunden nach der Infektion mit 0.012 MBq [³H]-Uracil markiert und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Toxoplasmen in einem Zellerntegerät (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) geerntet und auf einen Glasfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Filter mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) versehen, in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgezählt. Hierzu wurde die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung gemessen und in Zerfällen pro Minute (cpm = *counts per minute*) angezeigt.

2.2.2.15. Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Bakterienkolonien von *Staphylococcus aureus* wurden auf Blutagarplatten kultiviert. Für *Staphylococcus aureus* Infektionen wurden eine Bakterienkolonie, die über Nacht auf einer Blutagarplatten gewachsen war, in 5 mL PBS resuspendiert und mit PBS auf 1:100000 weiterverdünnt (je ca. 10 – 100 Kolonie-erzeugenden Einheiten [cfu = *colony forming units*]). 10 µL des Bakteriengemisches wurden dann zu 180 mL des zu untersuchenden Zellkulturüberstands gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.16. Bestimmung des *Staphylococcus aureus* Wachstums

Die mit *Staphylococcus aureus* infizierten Kulturen wurden durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren resuspendiert und deren optische Dichte im Photometer (Tecan, Crailsheim) bei 620 nm gemessen. Zusätzlich konnte das Bakterienwachstum durch eine Bestimmung der cfu ermittelt werden. Dazu wurde die infizierte Kultur resuspendiert, seriell 1:10 verdünnt und je 5 µL auf einer Blutagarplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C im Brutschrank konnte die Anzahl der Bakterienkolonien dann in den verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt werden.

2.2.2.17. Infektion mit Herpes simplex Virus Typ I (HSV-I)

Die zu untersuchenden Zellkulturen wurden mit HSV-I infiziert (MOI von $1,5 \times 10^5$ HSV-I Kopien pro Vertiefung), indem die Viren bis zu einer bestimmten MOI mit PBS verdünnt wurden und jeweils 10 µL des Virengemischs pro 96-well Vertiefung zu den Zellen

zugegeben wurde. Nach 48 Stunden wurden die Ansätze eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Auswertung gelagert.

2.2.2.18. Bestimmung der Virusreplikation

Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden die eingefrorenen Ansätze aufgetaut und für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in Eppendorf-Reaktionsgefäße umpipettiert und bei 13000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert. Da so gewonnene Pellet wurde in $75\text{ }\mu\text{L}$ $5\text{ }\mu\text{g}$ Proteinase K, gelöst in $75\text{ }\mu\text{L}$ PBS, resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 60 Minuten und wurde durch Erhitzen auf $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten beendet. Anschließend wurde die Virusreplikation mittels Real-time PCR bestimmt. Als Standard dienten Plasmide, die die zu amplifizierende Region der Viren enthielten.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von HeLa-TDO Zelllysaten wurden 3×10^6 HeLa-TDO in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm^2) für 24 Stunden unter unterschiedlichen Bedingungen (siehe Legende im Ergebnisteil) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und für 10 Minuten bei 1800 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde abermals mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 1 mL PBS mit Proteinaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gelöst und durch 5maliges einfrieren in flüssigem Stickstoff und auftauen im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad lysiert. Die Zelllysate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße umpipettiert und für 10 Minuten bei 13000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der so gewonnene Überstand wurde dann in $100\text{ }\mu\text{L}$ Aliquots aufgeteilt und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine in den Zelllysaten fand unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese statt. Dazu wurden die Lysate 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Heizblock denaturiert. Dann wurden je $20\text{ }\mu\text{L}$ der Lysate pro Probentasche auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel (NuPage-Polyacrylamidgel, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Der obere Teil des SDS-

Polyacrylamid-Gels enthält dabei ein Sammelgel, welches die zu analysierenden Proteine fokussiert, so dass sie im Trenngel durch Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 Volt für circa 2 Stunden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Anhand der Auftrennung des Markers SeeBlue™Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) konnte abgeschätzt werden, inwieweit die zu untersuchenden Proteine aufgetrennt waren.

2.2.3.3. Western-Blot-Analyse

Die geelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Semidry-Blotting auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran geblottet. Der Zusatz von Methanol zum Puffer diente der Aktivierung der Proteinbindestellen der Membran, so dass die Proteine folglich durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran gebunden werden konnten. Alle Komponenten des Systems wurden vor dem Aufbau in Transferpuffer getränkt, um ein durchgehendes Puffersystem zu bilden, wobei die getränkten Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England) als Puffersystem dienten. Auf die untere Graphitplatte (Anode) wurden drei Lagen Filterpapier gelegt, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, auf der dann direkt das SDS-Gel aufgelegt wurde. Anschließend erfolgte wiederum das Auflegen von 6 Lagen Filterpapier, sowie das Verschließen der Apparatur mit der zweiten Graphitplatte (Kathode). Der Proteintransfer erfolgte für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 Membran. Nach dem Transfer konnte die Membran entweder direkt weiter verwendet oder zwischen zwei Filterpapieren bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.2.3.4. Ponceau S Färbung

Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde eine Färbung mit Ponceau S durchgeführt. Ponceau S bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine, wobei ein sichtbarer, rötlicher Komplex entsteht. Für die Detektion wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung überschichtet, für ca. 2 min schwenkend inkubiert und die Färbelösung anschließend abgegossen. Durch Waschen der Membran mit dH_2O bzw. der Inkubation in Blocklösung konnte die Membran wieder leicht entfärbt werden. Die Lagerung der Membran erfolgte in Filterpapier eingeschlagen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.3.5. Immundetektion mit Antikörpern

Nach einem Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran konnte eine Immundetektion mit Antikörpern erfolgen. Eine solche Membran wurde zu Beginn der Detektion für 1 - 2 h in Blocklösung (3% Milchpulver in PBST [PBS + 0,05% Tween]) bei RT schwenkend inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Danach erfolgte die Zugabe des entsprechenden Primärantikörpers, der in Blocklösung verdünnt wurde und ein Einschweißen der Membran in Folie, so dass das Volumen so gering wie möglich gehalten werden konnte. Die eingeschweißte Membran wurde über Nacht schwenkend bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgten drei 10minütige Waschschriffe mit 0,05% PBST-Puffer, um unspezifisch gebundenen Primärantikörper zu entfernen. Als weiteres erfolgte die Zugabe des mit Peroxidase (POX) gekoppelten Sekundärantikörpers, welcher ebenfalls in Blocklösung verdünnt (in der Regel 1:10.000) und für 2 h schwenkend bei RT mit der Membran inkubiert wurde. Um unspezifisch gebundene Sekundärantikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut – wie zuvor beschrieben – dreimal gewaschen. Die an den Antikörper gekoppelte Peroxidase kann unter Zugabe des 'ECL Western Blotting' Substrats (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) Chemilumineszenz erzeugen, sodass die mittels Antikörper spezifisch detektierten Proteinbanden visualisiert werden. Gemäß den Herstellerangaben wurden die Detektionsreagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt, davon circa 1 mL pro Membran auf selbige gegeben und für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die ECL-Lösung entfernt und die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt. Die Exposition erfolgte in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm (Kodak, Deutschland) je nach Intensität für 30 Sekunden bis über Nacht. Die exponierten Filme wurden unter Rotlicht in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt und die Proteinbanden durch Vergleich mit der Markerbande für die Proteingröße auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet.

2.2.3.6. Immunfluoreszenzanalyse TDO_{myc} exprimierender Zellen

Eine Expressionskontrolle von TDO_{myc} in HeLa T-REx™-Zellen erfolgte mittels einer Immunfluoreszenzanalyse. Dazu wurden unstimulierte oder Tetrazyklin-stimulierte HeLa-TDO-Zellen (siehe Legende im Ergebnisteil) auf Glasplättchen in 24-well Platten für 72 Stunden inkubiert. Dadurch wurden die Zellen adhären und die Glasplättchen konnten zur weiteren Bearbeitung aus den Platten entnommen werden. Die Zellen wurden in 37 °C warmen PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 1 mL 3 % Paraformaldehyd in PBS für

20 Minuten fixiert. Um die Zellen für die Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Zellmembranen permeabilisiert. Dies erfolgte durch Zugabe von je 1 mL 0.25 % (v/v) Triton-X-100 in PBS für 10 Minuten. Unspezifische Bindungen wurden dann durch eine 30 minütige Inkubation mit je 1 mL 2 % Pferdeserum in PBS bei RT auf einem Kippschüttler. Anschließend wurde der jeweilige Antikörper, verdünnt in 0.2 % Pferdeserum, für eine Stunde zugegeben. Nach der Inkubation wurde der überschüssige Antikörper in einem dreimaligen Waschschrift mit PBS für je 10 Minuten abgewaschen. Es folgte die Zugabe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern für eine Stunde. Auch hier wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS für je 10 Minuten entfernt. Um die Zellkerne zu markieren, wurden die Zellen schließlich für 2 Minuten mit 1.5 µg/mL DAPI in PBS gefärbt. Dabei interkaliert das DAPI in die DNA und erzeugt bei der Anregung ein blaues Fluoreszenzlicht. Um überflüssiges DAPI zu entfernen, wurden die Zellen anschließend noch einmal mit PBS gewaschen und auf einem Objektträger in einem Tropfen Fluoromont G eingebettet. Dann wurden die Objektträger über Nacht abgedunkelt bei 4 °C getrocknet. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Photomikroskop II, Zeiss). Hierbei wurden die Zellen mit einer Digitalkamera aufgenommen und dokumentiert.

2.2.3.7. Kynureninmessung

Die Kynureninbestimmung in den Zellkultur- und Gewebeüberständen erfolgte mit Hilfe von Ehrlich's Reagenz (4-(Dimethylamin)benzaldehyd). Dieses bildet mit der aromatischen Aminogruppe des Kynurenins ein Imin, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 492nm gemessen werden kann. Mit Hilfe eines Standards lässt sich so die Kynurenin-Konzentration in der entsprechenden Probe berechnen (Takikawa *et al.*, 1988). Aus der produzierten Kynureninmenge im Zellkulturüberstand lässt sich darüber hinaus die Aktivität der IDO und der TDO bestimmen, da zumindest für die Aktivität der IDO klar gezeigt werden konnte, dass sie mit der Konzentration von N-Formyl-Kynurenin in den Überständen der Zellkulturen korreliert (Däubener *et al.*, 1994). Zur Kynureninmessung wurden 160 µL der zu untersuchenden Überstände in 96-well V-Boden Platten überpipettiert und mit 10 µL 30 % TCA versetzt, um die Proteine zu präzipitieren. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, so dass das N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin hydrolysiert werden konnte. Es folgte eine Zentrifugation bei 1800 rpm für 10 Minuten in einer Plattenzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0, Hanau). Dann wurden je 100 µL der Überstände in

96-well Platten mit Flachboden überpipettiert und mit je 100 μL Ehrlich's Reagenz (1.2 % (w/v) in Eisessig) vermischt. Nun konnte anhand der Produktion eines gelben Azofarbstoffs der Kynureningehalt in den Proben ermittelt werden. Dazu wurde die Absorption bei 492 nm im Photometer (Tecan, Crailsheim) gemessen. Als Negativkontrolle dienten jeweils Überstände unstimulierter Zellen.

2.2.3.8. Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC

Eine quantitative Bestimmung des Tryptophan- und Kynureningehalts in Zellkulturüberständen erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie). Dazu wurden störende Proteine gefällt, in dem die Proben 1:10 mit 25% Sulfosalizylsäure versetzt wurden. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und 500 μL des Überstand in ein HPLC-Glasröhrchen überpipettiert. Dann wurde der pH-Wert mit 85 μL 1 M NaOH auf 7.2 eingestellt. Die so vorbereiteten Proben wurden sofort in dem Gold-Universal-Grad System (BeckmanCoulter, Krefeld) und einer Umkehrphasensäule (Grom-Sil FMOC-2, 100 mm x 4 mm) gemessen. Als Puffer diente ein Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4.2). Die Trennung erfolgte in einem Gradienten mit einem ansteigenden Gehalt an Acetonitril bei einer Durchflussrate von 1.0 mL/min. Das Kynurenin wurde nach einer Retentionszeit von ca. 7 Minuten, das Tryptophan nach ca. 14 Minuten detektiert. In jeder Messung wurden unterschiedlich verdünnte Tryptophan- und Kynureninproben als Standards mitgemessen.

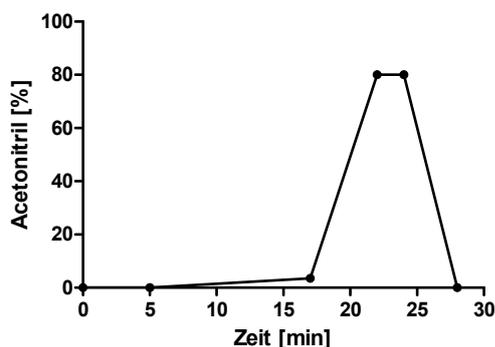


Abbildung 2.2 Gradientenverlauf bei HPLC –Messung.

2.2.4. 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 bei Einzelexperimenten als Mittelwerte \pm Standardfehler aufgeführt, bei einer Zusammenfassung mehrerer Experimente als Mittelwerte \pm SEM, bei einzelnen Experimenten als Mittelwerte \pm SD.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll mit Hilfe von HeLa Zellen untersucht werden, ob die rekombinant exprimierte humane TDO, ebenso wie die humane IDO, durch ihre enzymatische Aktivität *in vitro* einen antimikrobiellen- und immunregulatorischen Effekt hervorrufen kann. Darüber hinaus wird der Einfluss der beiden Enantiomere des IDO-spezifischen Inhibitors 1-Methyl-Tryptophan auf beide Enzyme *in vitro* und *ex vivo* überprüft. Im dritten Teil der Arbeit folgt eine Feinanalyse der Wirkweise von 1-Methyl-Tryptophan.

3.1. TDO-vermittelte Effekte in HeLa-TDO Zellen

Die Regulation lokaler Tryptophan-Konzentrationen durch das IFN- γ -induzierbare Enzym IDO ist ein wichtiger antimikrobieller und immunregulatorischer Effektormechanismus. So wurde bereits 1984 von Pfefferkorn gezeigt, dass das Wachstum des Parasiten *Toxoplasma gondii* in humanen Fibroblasten durch die enzymatische Aktivität der IDO gehemmt werden kann. Weitere Veröffentlichungen folgten, in denen eine Beteiligung der IDO auch an der Bekämpfung von bakteriellen und viralen Infektionen beschrieben wurde. Es wurde diskutiert, dass für die Abwehr dieser Erreger jeweils die IDO-vermittelte, lokale Tryptophan-Verarmung verantwortlich ist.

Zusätzlich wurde jedoch auch die IDO-vermittelte Generierung immunregulatorischer Metabolite analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass Kynurenin, ein Produkt des Tryptophan Katabolismus, sowohl das T-Zell Wachstum, als auch die Aktivierung von T-Zellen beeinflussen kann.

Im ersten Teil dieser Arbeit soll daher überprüft werden, ob die hepatische TDO, die ebenfalls den Abbau von Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin katalysiert, zusätzlich zu ihrer Rolle in der systemischen Tryptophan Homöostase auch antimikrobielle und immunregulatorische Effekte vermitteln kann.

3.1.1. TDO_{myc} Expression und Aktivität in HeLa-TDO Zellen

Zu Beginn dieser Arbeit lagen in der Arbeitsgruppe HeLa-TDO Zellen vor, in denen eine Tetrazyklin Stimulation zur Expression humaner TDO führt. Zur Herstellung wurden HeLa T-RExTM Zellen verwendet, die, bedingt durch das Plasmid pcDNATM6/TR, konstitutiv Tetrazyklin-Repressor-Moleküle exprimieren. Diese Zellen wurden stabil mit einem Plasmid

kodierend für einen Tetrazyklin-Repressor-Operator, sowie der kompletten humanen TDO (*tdo*) Sequenz inklusive eines myc-tags und eines HIS-tags transfiziert. In den Zellen wird normalerweise die Transkription der *tdo* durch die Anlagerung von Tetrazyklin-Repressor-Dimeren an die Operatorsequenz im Promotor unterbunden. Nach der Zugabe von Tetrazyklin bindet dieses an die Tetrazyklin-Repressor-Dimere. Das Resultat ist eine Konformationsänderung, sodass keine Bindung der Repressoren an den Operator mehr stattfinden kann. Es folgt dann die Transkription von *tdo_{myc}*.

Das Ergebnis eines Screenings nach der enzymatischen Aktivität der TDO ist in Abb. 3. 1. dargestellt. Hier wurde der Abbau von Tryptophan zu Kynurenin in Zellkulturüberständen einer Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Linie und deren Subklonen analysiert. Dazu wurden 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Mengen Tetrazyklin stimuliert (0-1000 ng/mL). Dem Medium wurde 1,5mM L-Tryptophan zugegeben, um eine maximale Kynurenin-Produktion zu erlauben. Nach 72 Stunden wurde die Kynureninmenge im Zellkulturüberstand quantitativ photometrisch erfasst. Die Abbildung 3.1 zeigt, dass sowohl von Linie 14, als auch in ihren Subklonen eine Tetrazyklin-dosisabhängige Menge Kynurenin gebildet wurde. Für alle nachfolgenden Experimente wurde der Subklon HeLa-TDO 14G3 (im Weiteren bezeichnet als HeLa-TDO) eingesetzt.

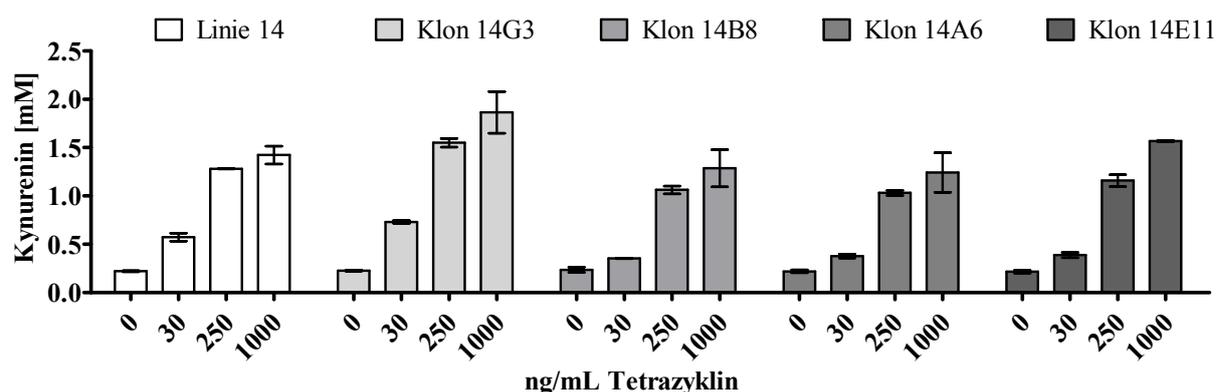


Abbildung 3.1 HeLa-TDO Klone metabolisieren Tryptophan zu Kynurenin.

3×10^4 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in Tryptophan-supplementiertem IMDM Medium (1,5mM) mit 0 – 1000 ng/mL Tetrazyklin stimuliert. Anschließend wurde das Tryptophan-Abbauprodukt Kynurenin im Zellkulturüberstand quantitativ erfasst. Die Linie 14 und deren Subklone zeichneten sich durch eine Tetrazyklin-dosisabhängige Kynurenin-Produktion aus. Die Daten wurden als durchschnittlicher Kynureninwert \pm Standardabweichung (SD) aus dreifacher Kultur angegeben.

Um die in Abb. 3. 1. beschriebene Kynurenin-Produktion einer TDO-, nicht aber einer IDO-Aktivität der HeLa-TDO Zellen zuzuschreiben, wurden die Zellen weiterhin in einer

Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Dazu wurden 2×10^5 HeLa-TDO Zellen in 24-well Mikrotiterplatten für 48 Stunden mit 100ng/mL Tetrazyklin stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend folgte eine Färbung der Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, sodass sie mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert werden konnten. Wie in Abb. 3. 2. zu erkennen ist, führte die Inkubation mit DAPI zu einer Anfärbung der Zellkerne sowohl in den Kontrollzellen, als auch in Zellen, die stimuliert worden waren. In beiden Experimentalgruppen war die Anzahl der Zellen annähernd gleich groß. Der Nachweis des myc-tags mittels eines anti-myc-Antikörpers hingegen zeigte eine deutliche Expression von TDO_{myc} in stimulierten, nicht aber in unstimulierten Zellen. Die Überlagerung der beiden Färbungen verdeutlicht, dass TDO_{myc} im Zytosol der Zellen detektiert wurde.

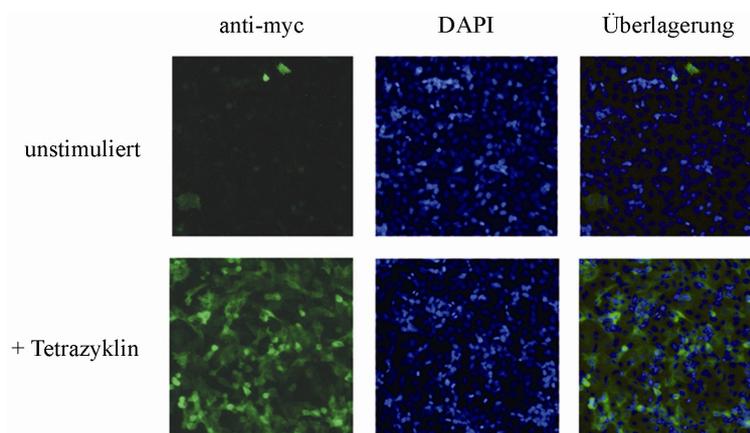


Abbildung 3.2 Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-TDO Zellen.

2×10^5 HeLa-TDO Zellen pro 24-well Vertiefung wurden für 48 Stunden mit 100ng/mL Tetrazyklin in IMDM Medium stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die linke Spalte zeigt die Expression von TDO_{myc} durch den Nachweis des myc-tags mittels eines anti-myc-Antikörpers nach anschließender Färbung mit einem cy²-markiertem Sekundärantikörper. In der mittleren Spalte wurde die DNA durch die Interkalation mit DAPI angefärbt. In der rechten Spalte ist die Überlagerung der beiden Färbungen zu sehen.

Weiterhin wurde die Expression des TDO_{myc} Proteins in HeLa-TDO Zellen mittels Western Blot-Analysen untersucht. Dabei wurde zusätzlich die Fähigkeit von HeLa Zellen, nach IFN- γ Stimulation IDO zu exprimieren, analysiert. Für die Western Blot-Analyse wurden 1×10^6 HeLa-TDO Zellen für 24 Stunden mit 30ng/mL Tetrazyklin oder 1000U/mL IFN- γ stimuliert oder blieben unstimuliert. Nach dem Ernten der Zellen mit Trypsin und mehreren Waschschrritten wurden die Zellen lysiert und mit SDS-Probenpuffer versehen in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Anschließend folgte das Aufblotzen der Proteine auf eine Nitrozellulose Membran, die danach mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert wurde.

Abb. 3. 3. zeigt deutlich, dass unstimulierte Zellen weder TDO noch IDO Protein exprimieren. Dahingegen führt eine Tetrazyklin Stimulation zur Anwesenheit von TDO, nicht aber IDO Protein, welches sowohl durch einen monoklonalen TDO-spezifischen, als auch durch einen anti-myc Antikörper nachgewiesen werden konnte. Das mit einem myc-tag versehene, rekombinante Protein war hierbei, wie erwartet, ca. 51 kDa groß. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation mit IFN- γ auch in HeLa-TDO Zellen zur Expression von IDO, nicht jedoch von TDO, mit einer ebenfalls erwarteten Größe von ca. 43 kDa. Eine Auftragskontrolle erfolgte mit Hilfe eines anti- β -Aktin Antikörpers.

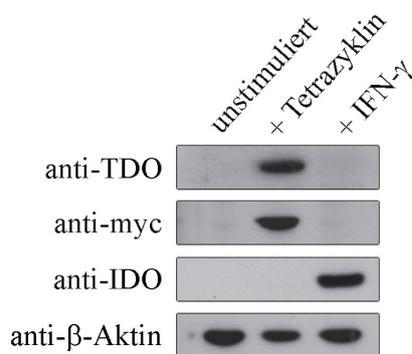


Abbildung 3.3 Western Blot-Analyse der HeLa-TDO Zellen.

1×10^6 HeLa-TDO Zellen wurden für 24 Stunden mit 30ng/mL Tetrazyklin oder 1000U/mL IFN- γ in IMDM Medium stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach Ernte der Zellen wurden diese lysiert und die Lysate in einem 10%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran geblottet. Die Detektion der rekombinanten TDO_{myc} bzw. der nativen IDO Proteine erfolgte mittels anti-TDO, anti-myc oder anti-IDO Antikörper. Als Auftragskontrolle diente β -Aktin, detektiert durch einen β -Aktin-Antikörper. Der Nachweis erfolgte in allen Fällen mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörpers.

Es folgte eine detaillierte Charakterisierung sowohl der IDO- als auch der TDO-Aktivität in HeLa-TDO Zellen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten mit 1000U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Als Medium diente IMDM Zellkulturmedium mit supplementiertem L-Tryptophan (insgesamt 0,6 mM Tryptophan). Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet, die darin vorhandenen Proteine präzipitiert und die Proben in der HPLC quantitativ auf das Vorhandensein von Tryptophan und Kynurenin getestet. Das Ergebnis (Abb. 3. 4.) zeigt, dass in Zellüberständen unstimulierter Zellen die ursprüngliche Menge Tryptophan (weißer Balken) erhalten war. Währenddessen hatten IFN- γ -stimulierte, IDO⁺, und auch Tetrazyklin-stimulierte, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen in signifikantem Maße Tryptophan abgebaut. Zur gleichen Zeit waren in beiden Experimentalgruppen die Mengen an Kynurenin signifikant erhöht und die aus Tryptophan- und Kynureninmenge berechnete Summe (dunkelgrauer Balken) zeigt, dass ein annähernd äquimolarer Abbau des Tryptophans zu Kynurenin stattgefunden hat.

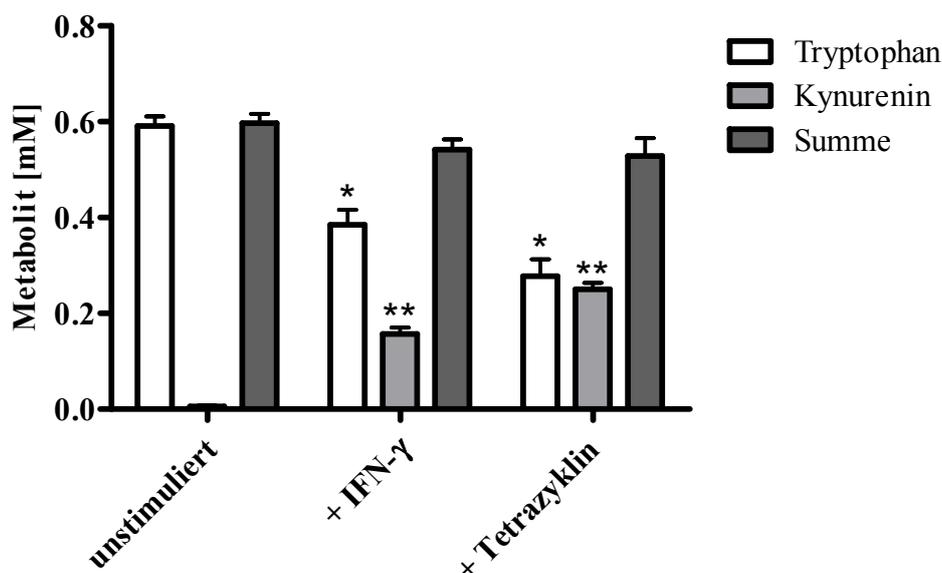


Abbildung 3.4 HPLC Analyse der Tryptophan- und Kynureninmenge in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 1000U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-supplementiertem IMDM Zellkulturmedium (0,6mM L-Tryptophan Endkonzentration = 120 μ g/mL) stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand geerntet, die Proteine mit 25%-iger Sulfosalicylsäure präzipitiert und nach einstellen des pH-Wertes auf 7,2 mit 1M NaOH, eine HPLC Messung durchgeführt. In Überständen von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen, nicht aber in Überständen von unstimulierten Zellen, ist eine äquimolare Umsetzung von Tryptophan zu Kynurenin zu beobachten. (*) gibt eine signifikante Erniedrigung der Tryptophankonzentration ($p < 0.01$), (**) eine signifikante Erhöhung der Kynureninkonzentration ($p < 0.01$) in Überständen stimulierter Zellen im Vergleich zu Überständen unstimulierter Zellen an. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten angegeben.

3.1.2. Charakterisierung der Substratspezifität von nativer IDO und rekombinanter TDO in HeLa-TDO Zellen

Aus vorherigen Veröffentlichungen war bekannt, dass die humane IDO ein breites Substrat-Spektrum besitzt und nicht nur L-Tryptophan, sondern auch D-Tryptophan, Serotonin und andere Stoffwechselprodukte des Tryptophan Stoffwechsels spaltet. Im Gegensatz dazu war beschrieben worden, dass die hepatische TDO nur L-Tryptophan spezifisch abbauen kann.

Als zusätzliche Charakterisierung der in 3.1. beschriebenen IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen wurde in dieser Arbeit daher ebenfalls die Substratspezifität der beiden Enzyme analysiert. Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten mit 500U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin stimuliert oder blieben unstimuliert. Die Inkubation erfolgte für 36 Stunden in RPMI Zellkulturmedium mit jeweils 0,5 mM L-Tryptophan oder D-Tryptophan. Anschließend wurde die Kynureninmenge im Zellüberstand photometrisch ermittelt. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3. 5. dargestellt.

In den Überständen IFN- γ -stimulierter, IDO⁺ HeLa-TDO Zellen wurde eine signifikant erhöhte Kynurenin-Produktion von je etwa 0,3mM aus L-Tryptophan und D-Tryptophan ermittelt. Im Unterschied dazu war im Überstand Tetrazyklin-stimulierter, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen nur nach L-Tryptophan Zugabe eine erhöhte Kynurenin-Produktion von etwa 0,4mM feststellbar. Damit konnte die in der Literatur beschriebene Substratspezifität der TDO auch in dem Zellkultursystem mit rekombinanter humaner TDO nachgewiesen werden.

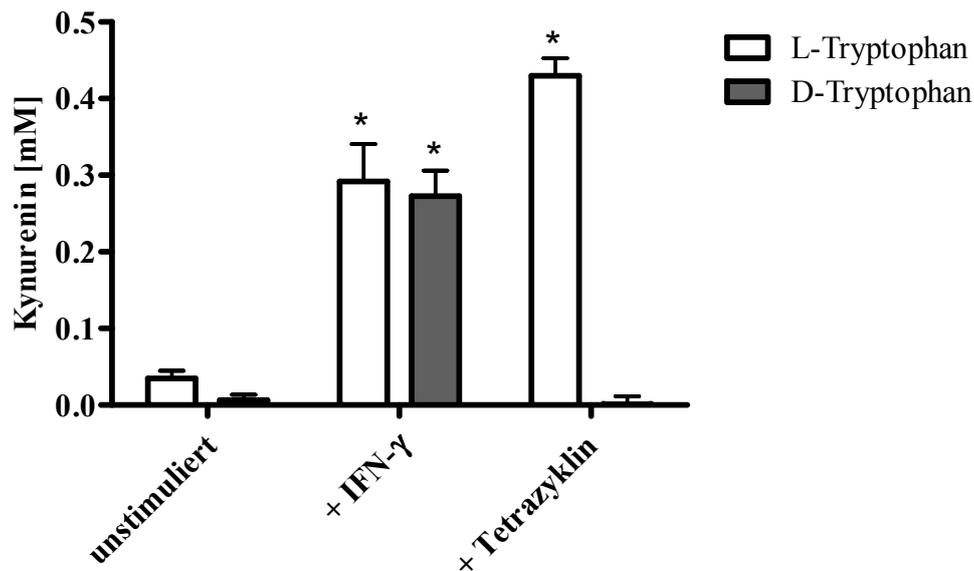


Abbildung 3.5 Analyse der Kynurenin-Produktion nach L-Tryptophan oder D-Tryptophan Supplementation in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 36 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-supplementiertem RPMI Zellkulturmedium (0,5mM L-Tryptophan oder D-Tryptophan) stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. In Überständen von IFN- γ -stimulierten HeLa-TDO Zellen wurde mittels Photometer eine signifikant erhöhte Kynurenin-Produktion nach Supplementation von L-Tryptophan und D-Tryptophan ermittelt ($p < 0.01$) (*). Im Gegensatz dazu wurde in Überständen Tetrazyklin-stimulierter HeLa-TDO Zellen nur nach L-Tryptophan Supplementation eine signifikante Kynureninzunahme gemessen ($p < 0.01$) (*). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

3.1.3. Antimikrobielle Effekte rekombinanter humaner TDO in HeLa-TDO Zellen

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass HeLa-TDO Zellen in der Lage sind, nach einer IFN- γ Stimulation IDO, sowie nach einer Tetrazyklin Stimulation TDO zu exprimieren. In beiden Fällen wird enzymatisch aktives Protein gebildet, welches zum Abbau von L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin führt. Im Weiteren sollte nun untersucht werden, ob die Aktivität beider Enzyme *in vitro* ausreicht, um einen Tryptophan-Mangel entstehen zu lassen, welcher das Wachstum von unterschiedlichen Krankheitserregern hemmen kann.

Seitdem bekannt wurde, dass durch eine IFN- γ -induzierte IDO-Aktivität das Wachstum des Parasiten *Toxoplasma gondii in vitro* gehemmt werden kann, kam es zur Veröffentlichung einer Reihe von Daten, die ebenfalls einen IDO-vermittelten, antiparasitären, antibakteriellen oder antiviralen Effekt in unterschiedlichen Zell-Linien und somit in unterschiedlichen Modellsystemen beschreiben. Die Grundannahme des IFN- γ -induzierten, IDO-vermittelten antimikrobiellen Effektormechanismus besteht dabei in einer lokalen Verarmung an der essenziellen Aminosäure Tryptophan.

Bis zum Beginn dieser Arbeit war dabei allerdings noch unklar, ob allein der Tryptophan-Mangel für den antimikrobiellen Effekt verantwortlich ist, oder ob andere, IFN- γ -induzierte Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die gleichfalls Tryptophan-abbauende TDO, die IFN- γ -unabhängig in HeLa-TDO Zellen exprimiert werden kann, ebenfalls antimikrobielle Funktionen erfüllt.

Um einen antiparasitären Effekt der TDO in HeLa-TDO Zellen zu analysieren wurden 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben und mit 50ng/mL Tetrazyklin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen jeweils mit 2×10^4 *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten pro Vertiefung infiziert. Um eine mögliche Tryptophan-Verarmung auszugleichen, wurde zum Zeitpunkt der Infektion einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL L-Tryptophan, der anderen Gruppe jeweils Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan zugefügt. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Proliferation der Toxoplasmen durch den Einbau von [3 H]-Uracil ermittelt. Abb. 3. 6. zeigt, dass die *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten in unstimulierten HeLa-TDO Zellen wachsen konnten, das Wachstum aber in Tetrazyklin-stimulierten Zellen um 75% verringert war. Des Weiteren konnte dieser antiparasitische Effekt durch die L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden.

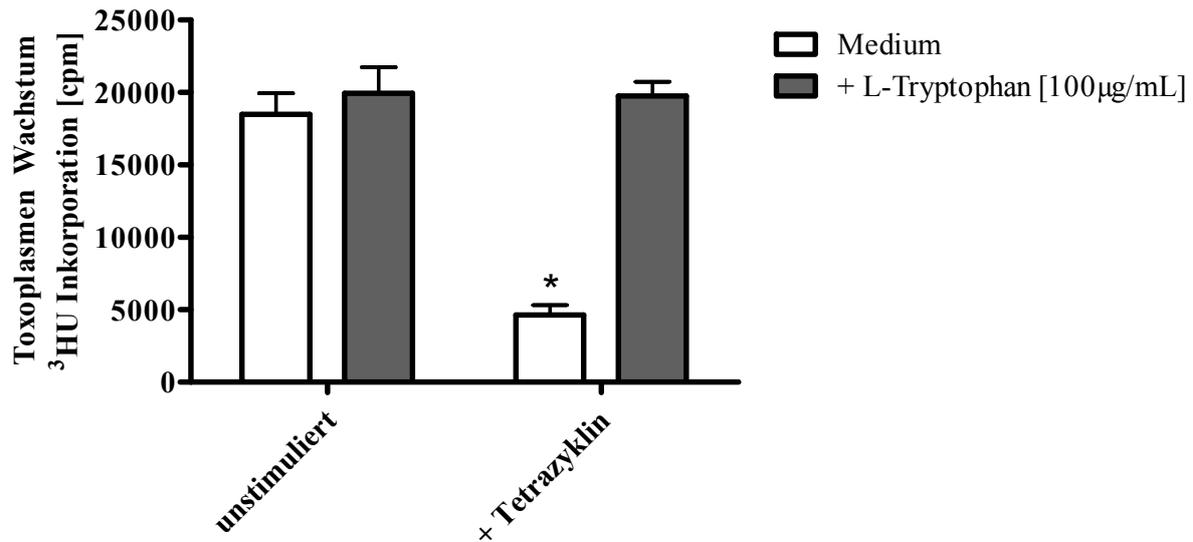


Abbildung 3.6 Antiparasitischer Effekt in Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 50ng/mL Tetrazyklin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 2×10^4 *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten pro Vertiefung infiziert. Gleichzeitig wurde 100µg/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan supplementiert. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Proliferation der Toxoplasmen durch den Einbau von [³H]-Uracil ermittelt. In Tetrazyklin-stimulierten Zellen wurde das Toxoplasmen Wachstum im Vergleich zum Wachstum in unstimulierten Zellen signifikant gehemmt ($p < 0.01$) (*). Der antiparasitische Effekt konnte durch die L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils zwei- oder dreifachen Ansätzen angegeben.

Um weitere antimikrobielle Fähigkeiten der TDO in HeLa-TDO Zellen zu charakterisieren, wurde überprüft, ob die TDO auch antivirale Effekte auslösen kann. Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben und mit 50ng/mL Tetrazyklin stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Zellen jeweils mit $1,5 \times 10^5$ HSV-1 Kopien pro Vertiefung infiziert. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde einer Kontrollgruppe 100µg/mL L-Tryptophan zugegeben. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Virusreplikation mit Hilfe einer Real-time PCR detektiert. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3. 7. dargestellt. Das HSV-1 konnte sich in unstimulierten HeLa-TDO Zellen ungehindert replizieren, während in Tetrazyklin-stimulierten Zellen die Virusreplikation um 5 Zehnerpotenzen erniedrigt war. Dieser antivirale Effekt konnte durch die L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden.

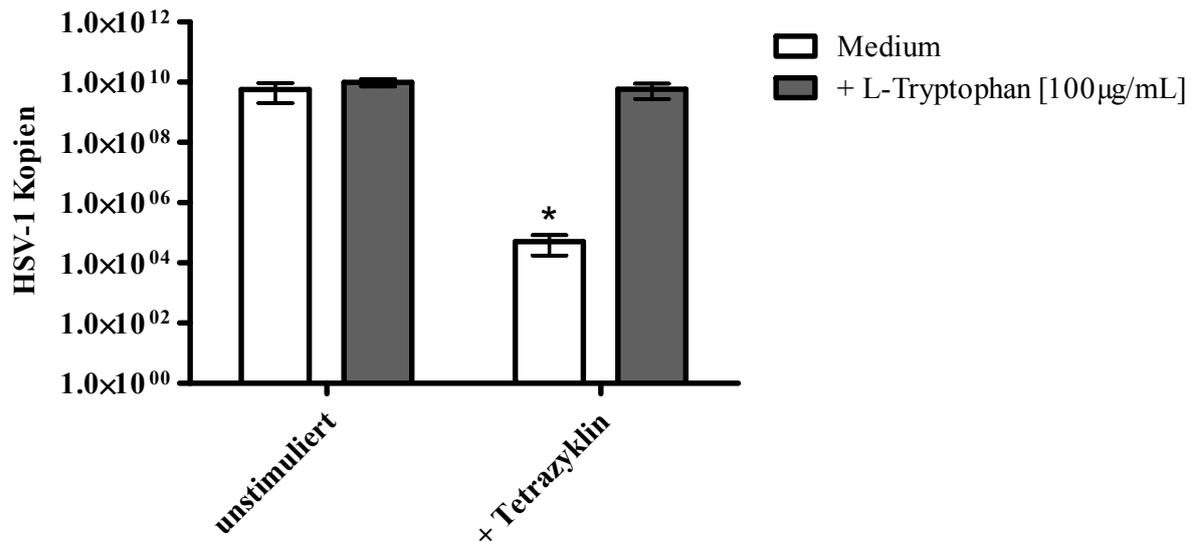


Abbildung 3.7 Antiviraler Effekt in Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

3 × 10⁴ HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 50ng/mL Tetrazyklin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit 1,5 × 10⁵ HSV-1 Kopien pro Vertiefung infiziert. Gleichzeitig wurde 100µg/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan supplementiert. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Virusreplikation mit Hilfe einer Real-time PCR detektiert. In Tetrazyklin-stimulierten Zellen wurde die Virusreplikation im Vergleich zur Replikation in unstimulierten Zellen signifikant gehemmt ($p < 0.01$) (*). Der antivirale Effekt konnte durch eine L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden. Die Daten wurden als Durchschnittswerte ± Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten angegeben.

Nun war bereits gezeigt worden, dass durch TDO-Aktivität in HeLa-TDO Zellen nachweislich das Wachstum des intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* und des HSV-1 Virus gehemmt werden kann. Als nächstes sollte analysiert werden, ob ein Wachstum von anderen Mikroorganismen im Zellkulturüberstand ebenfalls verhindert werden konnte. Einer dieser Mikroorganismen, der ebenfalls nachweislich durch IDO-Aktivität gehemmt wird, ist das Bakterium *Staphylococcus aureus*.

Zur Analyse der antibakteriellen TDO Eigenschaften wurden 3 × 10⁴ HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten gegeben und mit 50ng/mL Tetrazyklin stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach 72 Stunden wurden jeweils 200µL des Zellkulturüberstands als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Gleichzeitig wurde einer Kontrollgruppe 100µg/mL L-Tryptophan supplementiert. Das Wachstum der Bakterien wurde nach 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte bestimmt und ist in Abb. 3. 8. gezeigt. Im Überstand von unstimulierten HeLa-TDO Zellen konnten die Bakterien proliferieren, während das Bakterienwachstum durch eine vorherige Stimulation der HeLa-TDO Zellen mit Tetrazyklin signifikant inhibiert wurde. Dieser Effekt konnte aufgehoben werden, wenn gleichzeitig mit der Infektion eine L-Tryptophan-Gabe erfolgte.

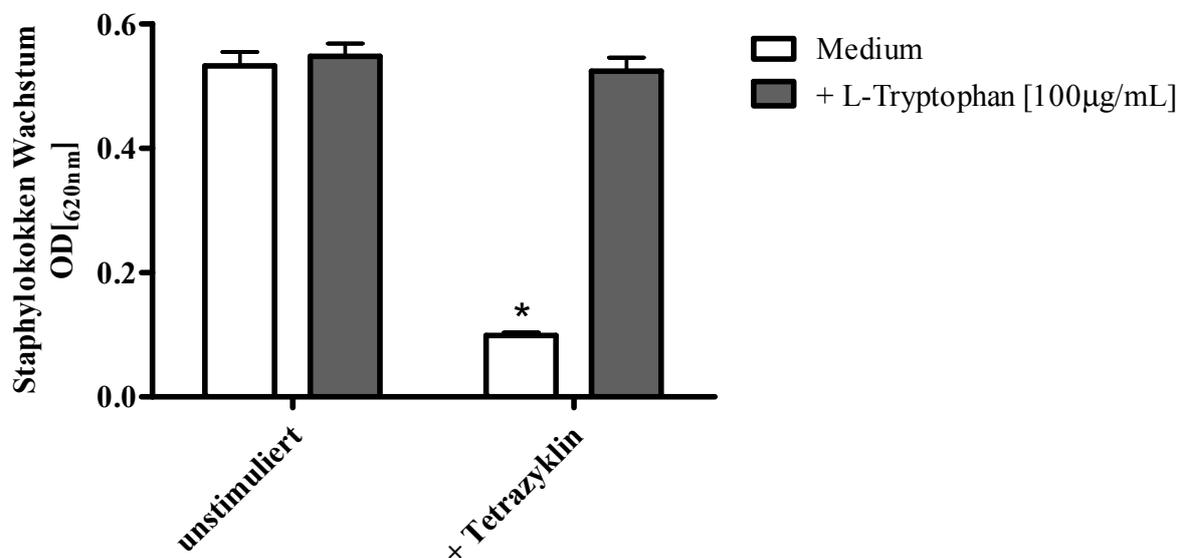


Abbildung 3.8 Antibakterieller Effekt von Tetracyclin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 50ng/mL Tetracyclin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden jeweils 200µL des Zellkulturüberstands als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Gleichzeitig wurden 100µg/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan supplementiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bestimmt. In Überständen von Tetracyclin-stimulierten Zellen wurde das Bakterienwachstum im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant gehemmt ($p < 0.01$) (*). Eine zusätzliche L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der Infektion konnte den antibakteriellen Effekt aufheben. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten angegeben.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei IDO und TDO um Dioxygenasen, d.h. beide Enzyme katalysieren eine oxidative Spaltung des Indolrings im Tryptophanmolekül. Folglich könnte die An- oder Abwesenheit von Sauerstoff einen Einfluss auf die Aktivität der beiden Enzyme haben. Die Sauerstoffkonzentrationen innerhalb des Körpers unterscheiden sich jedoch nach Gewebe und sind von der Durchblutung abhängig. Da viele Pathogene im Inneren des Körpers auf Wirtszellen treffen, wie zum Beispiel im Darm, findet sich oftmals an einem Infektionsherd ein besonders niedriger Sauerstoffgehalt. In dieser Arbeit sollte daher geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die TDO unter veränderten lokalen Sauerstoffbedingungen enzymatisch aktiv ist.

Abbildung 3. 9. zeigt den Vergleich der Kynureninbildung unter hypoxischen (A) und normoxischen (B) Kulturbedingungen. Zusätzlich wurden die Zellen erst für 72 Stunden unter hypoxischen und anschließend für weitere 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert (C). Für diese Versuchsreihe wurden jeweils 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro

Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten in Anwesenheit von 500U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte dabei entweder bei Hypoxie (1% O₂) oder bei Normoxie. Als Substrat wurden unterschiedliche Mengen L-Tryptophan (0, 6 oder 50 μ g/mL) supplementiert. Nach 72 (A, B) bzw. 120 (C) Stunden wurde die Kynureninmenge im Zellkulturüberstand photometrisch ermittelt. Das Ergebnis der Messung zeigt, dass unter hypoxischen Bedingungen (Abb. 3. 9. A) keine relevante Kynureninproduktion stattgefunden hatte. Im Vergleich dazu konnte unter normoxischen Bedingungen das vorhandene L-Tryptophan sowohl von IFN- γ -stimulierten, IDO⁺ als auch von Tetrazyklin-stimulierten, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen signifikant zu Kynurenin abgebaut werden (Abb. 3. 9. B). Wurden die Zellen zuerst für 72 Stunden in der Abwesenheit von Sauerstoff und anschließend unter normoxischen Bedingungen kultiviert, so war eine deutliche Kynureninproduktion durch IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen nachweisbar (Abb. 3. 9. C).

In einem zweiten Schritt wurden nun die IDO- und TDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte anhand einer Staphylokokken Infektion unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen analysiert. Hierzu wurden HeLa-TDO Zellen wie zuvor kultiviert. Anschließend wurden jedoch die Zellkulturüberstände geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3. 10. dargestellt. Wie erwartet konnten die Bakterien, unabhängig von der Sauerstoffkonzentration, in der Abwesenheit von L-Tryptophan nicht wachsen. Unter hypoxischen Bedingungen konnten weder IFN- γ -stimulierte, IDO⁺, noch Tetrazyklin-stimulierte, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen das Wachstum von Bakterien hemmen (A). Unter normoxischen Bedingungen konnten sowohl IFN- γ -stimulierte, IDO⁺, als auch Tetrazyklin-stimulierte, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen das Bakterienwachstum hemmen, wenn die Medien mit einer physiologischen Konzentration Tryptophan supplementiert waren (B). Die Anwesenheit größerer L-Tryptophanmengen hob den antibakteriellen Effekt beider Enzyme auf (B). Wurden die Zellen zuerst für 72 Stunden unter hypoxischen Bedingungen und anschließend für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert, so wurden die Bakterien in den Überständen der IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen wieder gehemmt (C). Auch hier wurde der IDO- und TDO-vermittelte antibakterielle Effekt nur dann beobachtet, wenn physiologische Tryptophanmengen verwendet wurden.

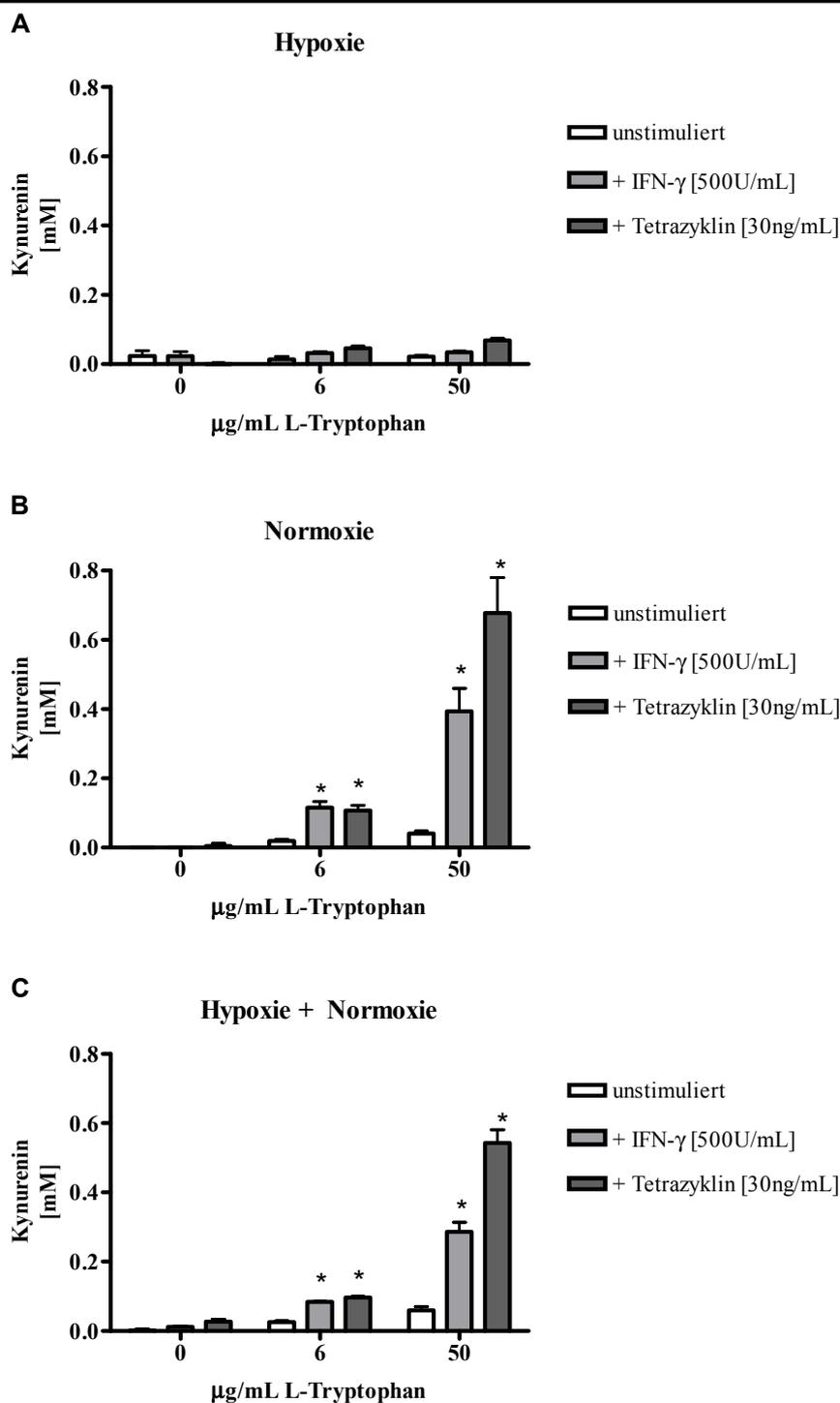


Abbildung 3.9 Kynurenin Produktion durch stimulierte oder unstimulierte HeLa-TDO Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Inkubation erfolgte unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) (A) oder bei Normoxie (20% O₂) (B). Außerdem wurde eine Kontrollgruppe zuerst für 72 Stunden unter hypoxischen Bedingungen und anschließend für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert (C). Allen Gruppen wurden unterschiedliche Mengen L-Tryptophan (0; 6 oder 50µg/mL) supplementiert. Nur unter normoxischen Bedingungen konnte das L-Tryptophan von IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen zu Kynurenin metabolisiert werden. Wurden die Zellen zuerst unter hypoxischen Bedingungen und anschließend unter normoxischen Bedingungen inkubiert, so waren auch hier IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierte HeLa-TDO Zellen dazu in der Lage, Kynurenin herzustellen. Statistisch signifikante Erhöhungen ($p < 0.01$) der Kynurenin Produktion im Vergleich zur jeweiligen hypoxischen Gruppe sind durch (*) gekennzeichnet. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zwei- oder dreifachen Ansätzen angegeben.

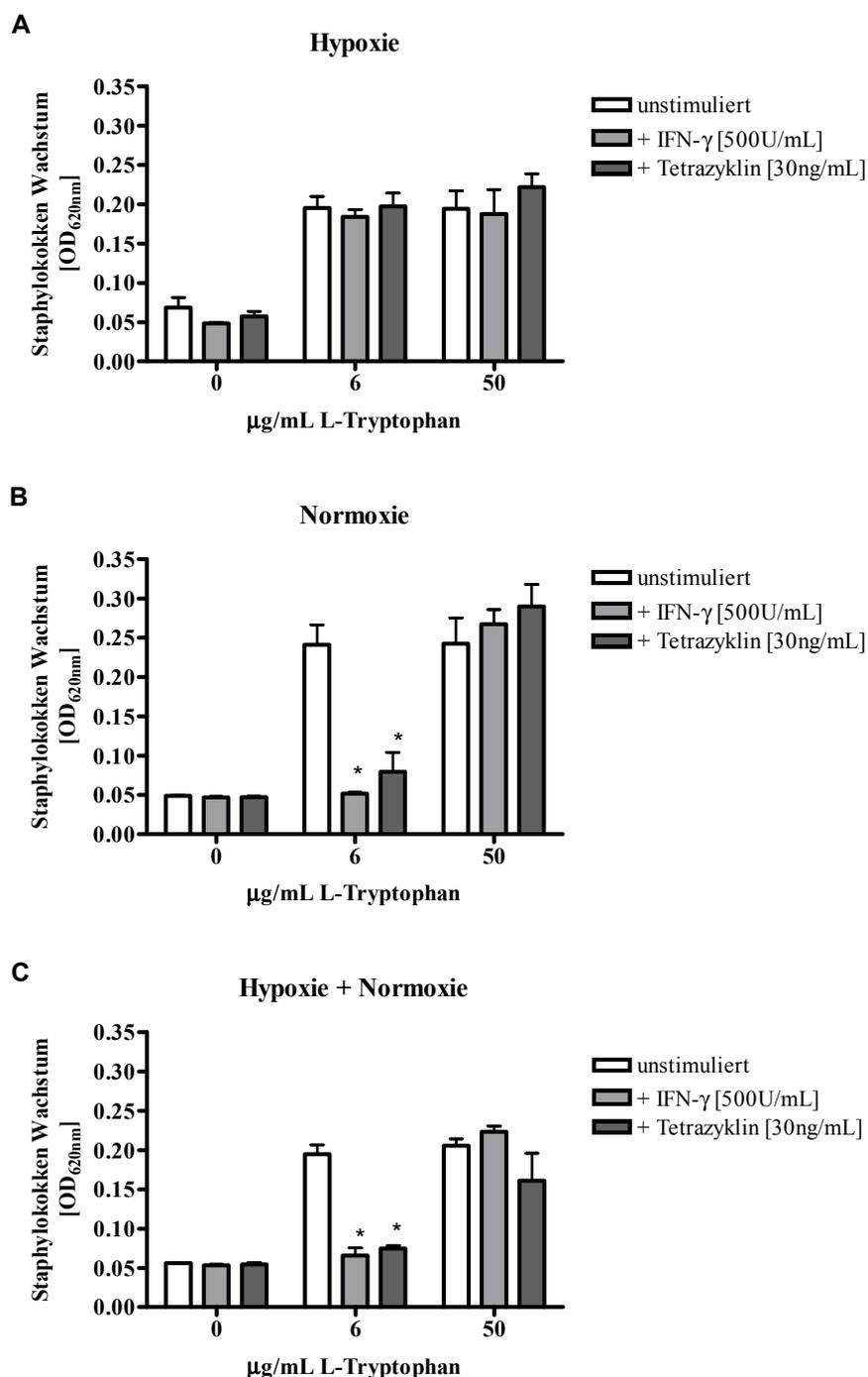


Abbildung 3.10 Bakterienwachstum in Überständen von stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen unter hypoxischen und normoxischen Bedingungen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Die Inkubation erfolgte bei Hypoxie (1% O₂) (A) oder bei Normoxie (20% O₂) (B). Eine Kontrollgruppe wurde zuerst für 72 Stunden unter hypoxischen und anschließend für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert (C). Zusätzlich wurden allen Gruppen unterschiedliche Mengen L-Tryptophan (0; 6 oder 50µg/mL) supplementiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Ein antibakterieller Effekt wurde nicht unter hypoxischen, aber unter normoxischen Bedingungen nach IFN- γ oder Tetrazyklin Stimulation der HeLa-TDO Zellen bei physiologischer L-Tryptophan Supplementation beobachtet. Folgte der hypoxischen- eine normoxische Phase, so wurde auch hier das Wachstum der Bakterien durch IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen verhindert. (*) kennzeichnet die signifikante Bakterienhemmung ($p < 0.01$). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zwei- oder dreifachen Ansätzen angegeben.

3.1.4. Immunregulatorische Effekte rekombinanter humaner TDO in HeLa-TDO Zellen

Nachdem nun herausgefunden war, dass die TDO in HeLa-TDO Zellen gleichfalls wie die IDO einen antimikrobiellen Status hervorrufen kann, wurde untersucht, ob die TDO ebenfalls als immunregulatorischer Effektormechanismus dienen kann.

Hierzu wurden unterschiedlich stimulierte HeLa-TDO Zellen zusammen mit peripheren Blutlymphozyten kultiviert. Eine T-Zell Proliferation wurde durch die Zugabe von monoklonalem anti-OKT3 Antikörper aktiviert. Die Bestimmung des T-Zell Wachstums erfolgte mit Hilfe von [³H]-Thymidin, welches in T-Zellen, nicht aber in HeLa-TDO Zellen eingebaut werden konnte, da letztere vorher bestrahlt worden waren. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3. 11. dargestellt. In der Anwesenheit von unstimulierten HeLa-TDO Zellen konnten die T-Zellen proliferieren. Die Proliferation wurde durch eine IFN- γ und auch eine Tetrazyklin Stimulation der HeLa-TDO Zellen verhindert. Um zu beweisen, dass dieser immunregulatorische Effekt auf eine IDO- beziehungsweise TDO-Aktivität zurück zu führen war, wurde zum Zeitpunkt der Ko-Inkubation der T-Zellen und der HeLa-TDO Zellen einer Kontrollgruppe zusätzliches L-Tryptophan zugegeben. Die Anwesenheit des L-Tryptophans hob den immunregulatorischen Effekt in allen Experimentalgruppen auf. Überraschenderweise war jedoch auch die T-Zell Proliferation in der Positivkontrolle durch die Zugabe von L-Tryptophan deutlich steigerbar. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass die Anwesenheit der HeLa-TDO Zellen selbst schon einen Einfluss auf die ko-kultivierten T-Zellen hat. Um einen solchen Effekt in weiteren Experimenten auszuschließen wurde ein neues Kultursystem eingeführt, in welchem die T-Zellen nicht mehr unter Anwesenheit der HeLa-TDO Zellen inkubiert wurden, sondern nur noch in konditioniertem Medium der HeLa-TDO Zellen.

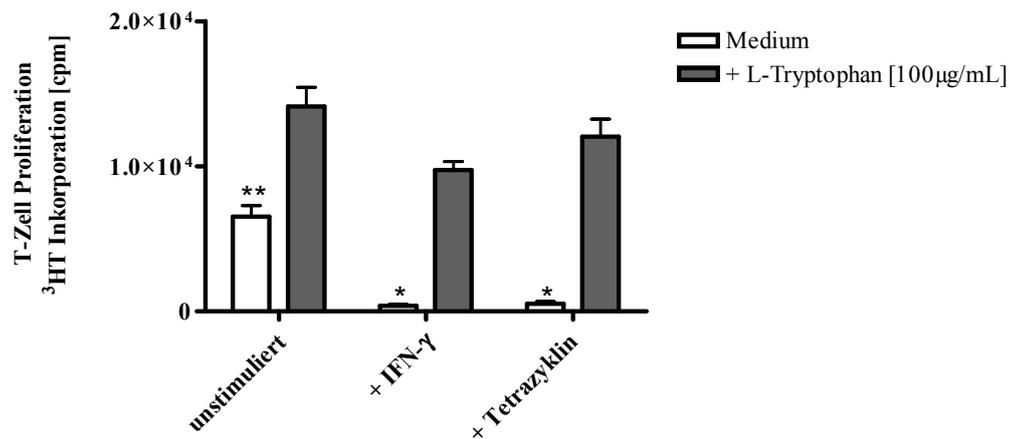


Abbildung 3.11 Immunregulatorischer Effekt vermittelt durch IFN- γ und Tetracyclin-stimulierte HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 bestrahlte HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 50ng/mL Tetracyclin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung zugegeben und mit monoklonalem anti-OKT3 Antikörper stimuliert. Gleichzeitig erfolgte eine Supplementation von 100 μ g/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan. Nach 72 Stunden wurde die T-Zell Proliferation durch Zugabe von [³H]-Thymidin für 14-18 Stunden analysiert. Die signifikante Inhibition ($p < 0.01$) des T-Zell Wachstums durch die Anwesenheit von IFN- γ oder Tetracyclin-stimulierten HeLa-TDO Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, ist mit (*) gekennzeichnet. Des Weiteren konnte der immunregulatorische Effekt durch die Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden. Auffällig ist, dass die T-Zell Proliferation in der Mediumkontrolle in der Anwesenheit unstimulierter HeLa-TDO Zellen signifikant niedriger war als in Medium mit zusätzlichem L-Tryptophan (**). Die Daten sind angegeben als durchschnittlicher [³H]-Thymidin Einbau \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

In einem nächsten Experiment wurden die T-Zellen dahingehend überprüft, ob nicht nur ihre Proliferation, sondern auch ihre IFN- γ Produktion in konditionierten Überständen von IFN- γ - oder Tetracyclin-stimulierten HeLa-TDO Zellkulturen beeinflusst ist. Hierzu wurden die HeLa-TDO Zellen wie zuvor für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 50ng/mL Tetracyclin stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nachdem der Zellüberstand geerntet wurde, diente er als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte und mit OKT3 stimulierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung. Nach 72 Stunden wurde dann die IFN- γ Produktion der T-Zellen mit Hilfe eines ELISA analysiert. Abb. 3. 12. zeigt, dass die T-Zellen in Kulturmedium von unstimulierten HeLa-TDO Zellen in der Lage waren ca. 350pg/mL IFN- γ zu produzieren. In konditioniertem Medium von IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen jedoch konnte kein IFN- γ von den T-Zellen produziert werden. Dieser Effekt war allerdings durch eine L-Tryptophan Supplementation zum Zeitpunkt der T-Zell Stimulation aufzuheben.

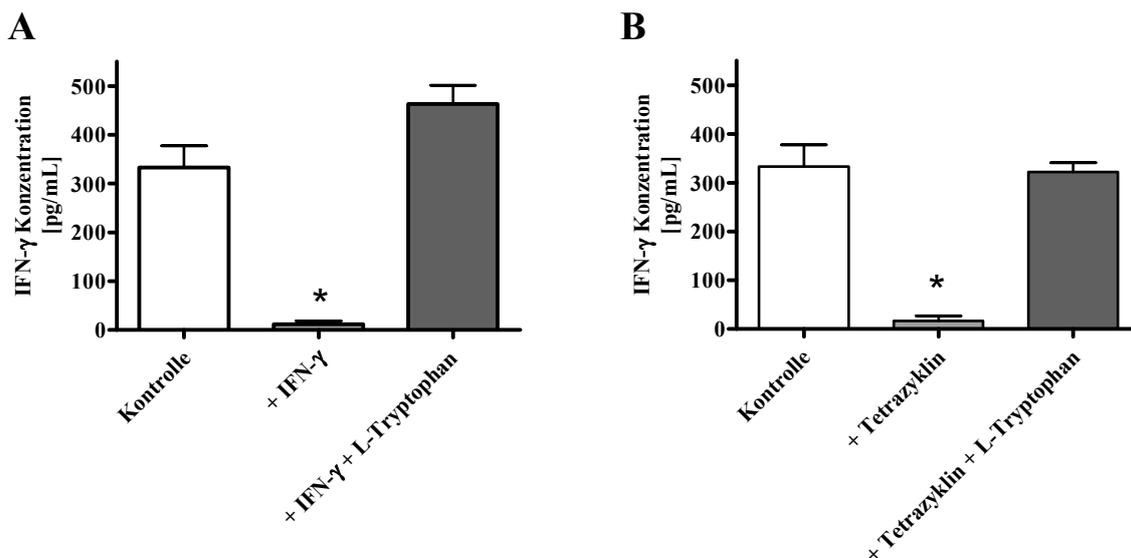


Abbildung 3.12 Verminderte IFN- γ Produktion von T-Zellen in konditioniertem Medium von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ oder 50ng/mL Tetrazyklin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung eingesetzt und diese mit monoklonalem anti-OKT3 Antikörper stimuliert. Gleichzeitig erfolgte eine Supplementation von 100 μ g/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan. Nach 72 Stunden wurde die IFN- γ Produktion mit Hilfe eines ELISA analysiert. Die signifikante Inhibition ($p < 0.01$) der IFN- γ Produktion in konditioniertem Medium von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, ist mit (*) gekennzeichnet. Des Weiteren konnte der inhibitorische Effekt durch die Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden. Die Daten wurden angegeben als durchschnittliche IFN- γ Produktion (pg/mL) \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen.

Bisher konnte gezeigt werden, dass sowohl die IDO- als auch die TDO-Aktivität in HeLa-TDO Zellen eine OKT3-aktivierte T-Zellantwort inhibiert. Weiterhin sollte jedoch geklärt werden, ob die beiden Enzyme jeweils auch eine physiologische T-Zell Antwort hemmen können. Deshalb wurden, im Folgenden, Experimente mit allogenen-stimulierten T-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden PBL von zwei unterschiedlichen Spendern frisch isoliert und jeweils eine Gruppe der PBL bestrahlt, um ein Wachstum dieser Zellen zu verhindern. Die Anwesenheit dieser bestrahlten Zellen führte dann zur Proliferation der unbestrahlten Zellen. Die Ko-Inkubation der allogenen PBL fand für 5 Tage in konditioniertem Medium von stimulierten HeLa-TDO Zellen statt und wurde mittels [3 H]-Thymidin bestimmt. Wie in Abb. 3. 13. dargestellt, fand in Kulturmedium von vorher unstimulierten HeLa-TDO Zellen eine ungehemmte T-Zell Proliferation entsprechend circa 10.000 *counts per minute* (cpm) statt. Diese Proliferation wurde in Medium von IDO $^+$ und TDO $^+$ HeLa-TDO Zellen auf ca. 3000-4000 cpm inhibiert. Des Weiteren führte die Zugabe von L-Tryptophan zum Zeitpunkt der Ko-Inkubation zu einer Aufhebung der Inhibition.

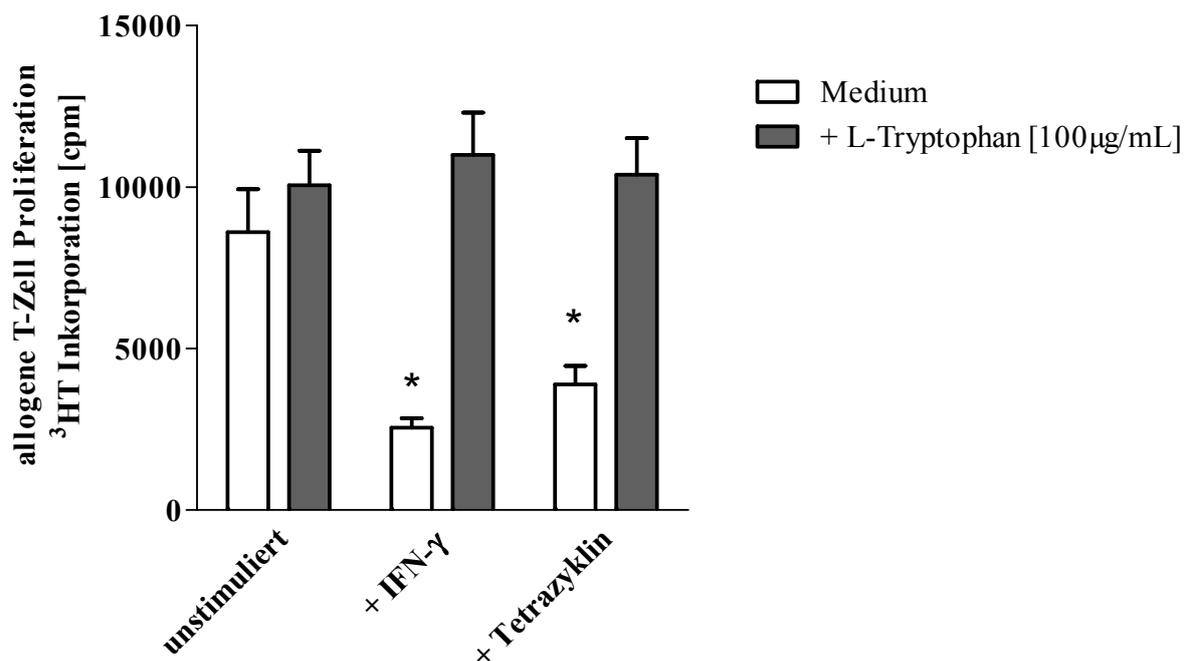


Abbildung 3.13 Immunregulatorischer Effekt vermittelt durch konditioniertes Medium von IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 1000U/mL IFN- γ oder 75ng/mL Tetrazyklin in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung eingesetzt. Die T-Zell Proliferation wurde durch die Zugabe allogener, bestrahlter PBL aktiviert. Gleichzeitig erfolgte eine Supplementation von 100µg/mL L-Tryptophan bzw. Medium ohne zusätzliches L-Tryptophan. Nach 5 Tagen wurde die T-Zell Proliferation durch Zugabe von [3 H]-Thymidin für 14-18 Stunden analysiert. Die signifikante Inhibition ($p < 0.01$) des T-Zell Wachstums in konditioniertem Medium von IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen, im Vergleich zu unstimulierten Zellen, ist mit (*) gekennzeichnet. Desweiteren konnte der immunregulatorische Effekt durch die Zugabe von L-Tryptophan aufgehoben werden. Die Daten sind angegeben als durchschnittlicher [3 H]-Thymidin Einbau \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

In Abb. 3. 11. wurde beobachtet, dass die Ko-Kultivierung von IDO⁺ und TDO⁺ HeLa-TDO Zellen und T-Zellen die Proliferation der T-Zellen beeinflusst. Um herauszufinden, ob die beiden Enzyme in der Lage sind, synergistische Effekte zu vermitteln, wurde in einem folgenden Schritt eine gemeinsame IDO- und TDO-vermittelte Kynureninproduktion analysiert. Hierzu wurden HeLa-TDO Zellen mit niedrigeren IFN- γ (250U/mL) und Tetrazyklin (7,5 ng/mL) Konzentrationen jeweils einzeln und auch in Kombination für 72 Stunden stimuliert. Abbildung 3. 14. zeigt (A) das Ergebnis einer anschließenden Kynureninmessung im Überstand der Zellen und (B) die Analyse einer Staphylokokken Infektion der Zellkulturüberstände.

Wie erwartet war in Überständen unstimulierter HeLa-TDO Zellen keine Kynureninproduktion erfolgt, jedoch eine signifikant erhöhte Menge Kynurenin von ca. 0,15mM nach IFN- γ oder Tetrazyklin Stimulation zu finden. Interessanterweise führte jedoch

die kombinierte Stimulation zur Produktion einer in etwa doppelt so hohen Kynureninmenge. Dieser synergistische Effekt der beiden Enzymaktivitäten war auch in den in Abb. 3. 14. B dargestellten Infektionsexperimenten mit Bakterien sichtbar. Hier wurde ebenfalls eine Stimulation der HeLa-TDO Zellen mit IFN- γ oder Tetrazyklin gewählt, die alleine keine Inhibition des Bakterienwachstums vermittelt. Die kombinierte Stimulation allerdings führte zu einem deutlichen antibakteriellen Effekt.

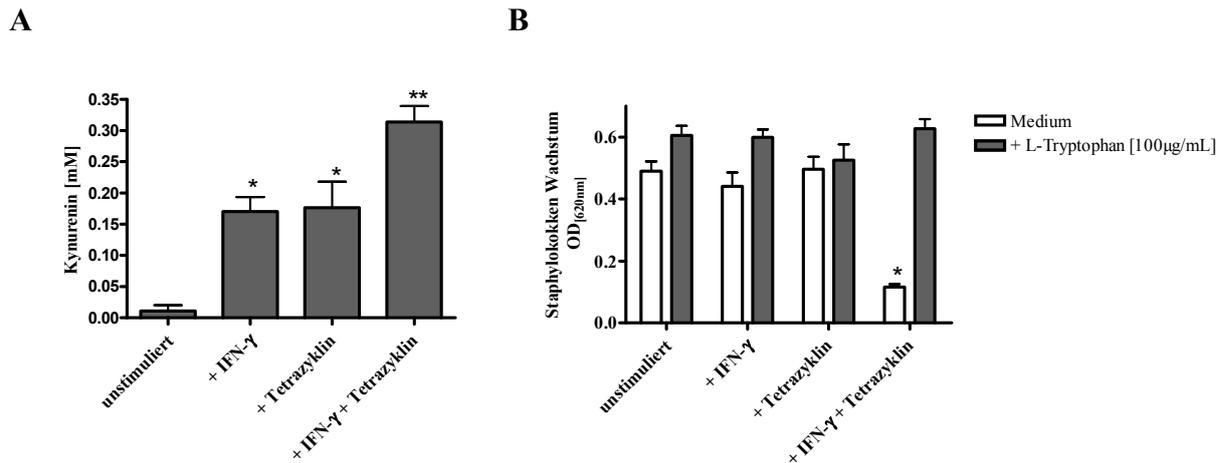


Abbildung 3.14 Synergismus in IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen.

(A) 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 250U/mL IFN- γ , 7,5ng/mL Tetrazyklin oder kombinierten Stimulationsbedingungen in IMDM Zellkulturmedium in An- oder Abwesenheit von 100 μ g/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan inkubiert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und es erfolgte eine photometrische Kynureninmessung. Die Kynurenin Messung zeigt an, dass IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierte HeLa-TDO Zellen signifikant ($p < 0.01$) erhöhte Kynurenin Mengen produzieren, verglichen mit unstimulierten Zellen (*). Auffallend ist jedoch der synergistische Effekt bei kombinierten Stimulationsbedingungen (**) ($p < 0.001$). (B) 3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 31U/mL IFN- γ , 3,75ng/mL Tetrazyklin oder kombinierten Stimulationsbedingungen in IMDM Zellkulturmedium in An- oder Abwesenheit von 100 μ g/mL (= 0,5mM) L-Tryptophan inkubiert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und das konditionierte Medium wurde als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bestimmt. Gleichermäßen zeigen jeweils IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierte HeLa-TDO Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen keinen antibakteriellen Effekt, die kombinierte Stimulation aber führt zu einem signifikant ($p < 0.001$) erniedrigten Bakterienwachstum (*). Die Daten wurden angegeben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

Bisher wurde beobachtet, dass eine T-Zell Proliferation durch IDO- und TDO-Aktivität gehemmt wurde. Ein Hinweis darauf, dass die Inhibition aufgrund Tryptophan-Mangels hervorgerufen wurde, ist die Tatsache, dass in allen Experimenten der immunregulatorische Effekt durch eine L-Tryptophan Zugabe aufgehoben werden konnte. Aus vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe und aus der Literatur ist allerdings auch bekannt, dass

nicht nur ein Tryptophan-Mangel, sondern auch die Generierung toxischer Metabolite eine Rolle bei der T-Zell Inhibition spielt.

Aus diesem Grunde wurde in einer weiteren Experimentalreihe (Abb. 3. 15.) untersucht, ob sowohl die IDO als auch die TDO in HeLa-TDO Zellen in der Lage sind, bei ausreichender Substratmenge (100µg/mL) toxische Mengen Kynurenin zu produzieren. Hierzu wurden wiederum 3×10^4 HeLa-TDO Zellen für 72 Stunden einer hohen IFN- γ (1000U/mL)(A, C) oder Tetrazyklin (30ng/mL)(B, D) Stimulation unterzogen. Die Zellaktivierung erfolgte dabei in Zellkulturmedium ohne bzw. mit zusätzlichem L-Tryptophan (A, B) oder D-Tryptophan (C, D) (100µg/mL). Anschließend wurden die konditionierten Medien geerntet und als Kulturmedium für PBL eingesetzt. Dabei wurde in einer Kontrollgruppe wiederum 100µg/mL L-Tryptophan supplementiert, um gegebenenfalls die Inhibition der T-Zell Proliferation aufzuheben. In allen Gruppen (A-D) war festzustellen, dass die T-Zellen in Überständen unstimulierter HeLa-TDO Zellen ungehemmt wachsen und [3 H]-Thymidin entsprechend ca. 30.000 cpm einbauen konnten. Gleichfalls war in allen Experimentalansätzen erkennbar, dass konditioniertes Medium von IFN- γ - oder eine Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen das T-Zell Wachstum vollständig inhibierte. In der Positivkontrolle (ohne Tryptophan in der Vorinkubation) wurde die T-Zell Inhibition durch eine L-Tryptophan-Zugabe zum Zeitpunkt der T-Zell Stimulation aufgehoben. War nun zu Beginn der Vorinkubation bereits 100µg/mL L-Tryptophan (A, B) anwesend, so war im Überstand von IDO⁺ und auch TDO⁺ Zellen das T-Zell Wachstum ebenfalls signifikant inhibiert. Interessanterweise war dieser inhibitorische Effekt nun aber nicht mehr durch eine erneute L-Tryptophan-Gabe aufzuheben. Dieser Effekt konnte auch in Überständen von IDO⁺ HeLa-TDO Zellen nach Zugabe von 100µg/mL D-Tryptophan beobachtet werden (C). Im Gegensatz dazu konnten T-Zellen im Überstand von TDO⁺ HeLa-TDO Zellen zwar auch nach anfänglicher D-Tryptophan Supplementation nicht mehr proliferieren, die erneute Gabe von L-Tryptophan erlaubte jedoch wieder ein vollständiges T-Zell Wachstum.

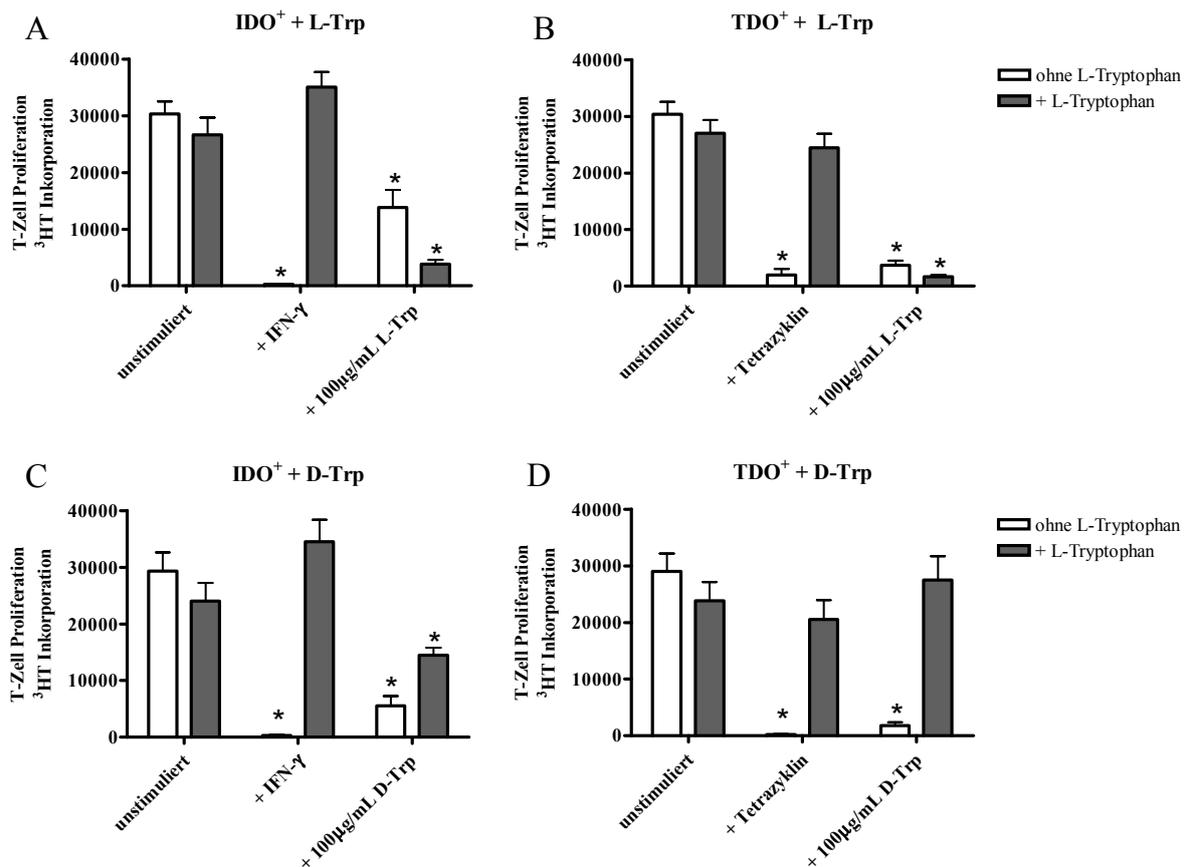


Abbildung 3.15 Analyse der immunregulatorischen Effekte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Metabolisierung von L-Tryptophan oder D-Tryptophan.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 1000U/mL IFN- γ (A, C) oder 30ng/mL Tetrazyklin (B, D) in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. In der Hälfte der IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten Gruppen erfolgte gleichzeitig eine Supplementation von 100 μ g/mL L-Tryptophan (A, B) oder 100 μ g/mL D-Tryptophan (C, D). Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung eingesetzt. Die T-Zell Proliferation wurde mit monoklonalem anti-OKT3 Antikörper (weiße Balken) induziert. Zusätzlich wurde einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL L-Tryptophan zugegeben (graue Balken). Nach 72 Stunden wurde die T-Zell Proliferation durch Zugabe von [3 H]-Thymidin für 14-18 Stunden analysiert. (*) kennzeichnen die signifikante ($p < 0.001$) Inhibition der T-Zell Proliferation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ohne Stimulation. Die Daten sind angegeben als durchschnittlicher [3 H]-Thymidin Einbau \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

3.2. Pharmakologische Beeinflussung der IDO und TDO Aktivität in HeLa-TDO Zellen

Bereits 1991 wurde von Cady *et al.* 1-MT als ein IDO-spezifischer kompetitiver Inhibitor beschrieben. Seit diesem Zeitpunkt wird 1-MT, beziehungsweise seine jeweiligen Enantiomere 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) und 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT), als Inhibitor der IDO in vielen verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimentalsystemen eingesetzt.

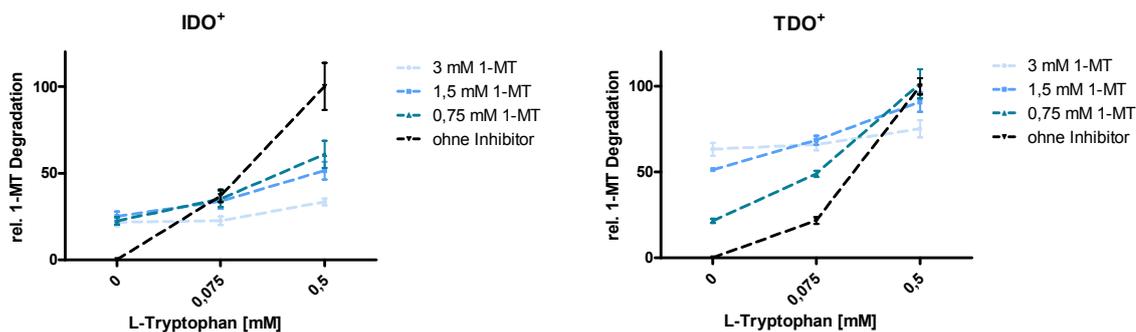
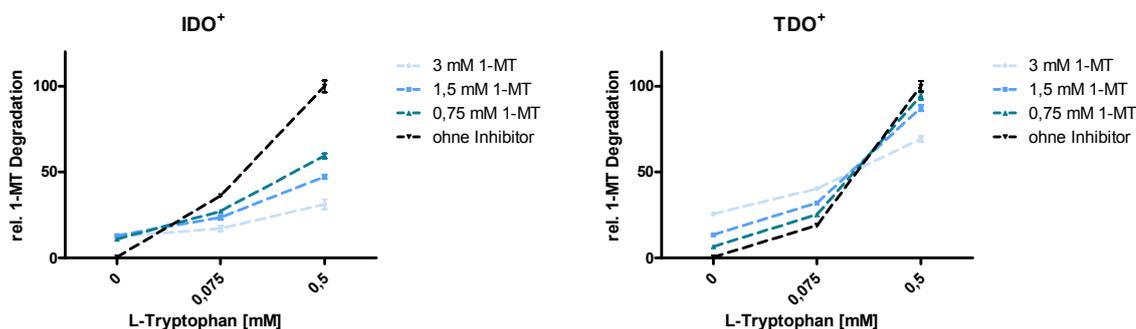
Es stellte sich die Frage, ob die beiden Enantiomere des 1-MT ebenfalls einen Einfluss auf die rekombinant exprimierte humane TDO in HeLa-TDO Zellen besitzen. Im Rahmen dieser

Arbeit wird untersucht welche der enzymatischen, antimikrobiellen oder immunregulatorischen Effekte von IDO⁺ oder TDO⁺ HeLa-TDO Zellen durch 1-MT beeinflusst werden.

3.2.1. Analyse der Beeinflussung der IDO- und TDO-Enzymaktivität durch 1-MT

Die Beeinflussung des Tryptophanabbaus in HeLa-TDO Zellen wurde zunächst in einem Zellkultursystem mit anschließender photometrischer Kynureninmessung untersucht. Zu diesem Zweck wurden 3×10^4 Zellen für 72 Stunden einer IFN- γ (1000U/mL) oder Tetrazyklin (30ng/mL) Stimulation unterzogen. Diese Stimulation erfolgte alternativ in Tryptophan-freiem Medium oder in Medium mit zusätzlich 0,075mM oder 0,5mM L-Tryptophan. Außerdem wurden den Zellen unterschiedliche Mengen (jeweils 0; 0,75; 1,5 oder 3mM) an Substrat (1-L-MT Chargen von 2007, 2008/2009 oder 1-D-MT) angeboten. Anschließend wurde eine photometrische Kynureninmessung in den Zellkulturüberständen durchgeführt. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 3. 16. abgebildet. Sowohl IDO⁺ als auch TDO⁺ HeLa-TDO Zellen konnten das jeweils vorhandene L-Tryptophan dosisabhängig in Kynurenin umwandeln (schwarze Linien). Beachtet man die IDO-vermittelte Kynureninbildung in dem mit L-Tryptophan supplementierten Medien so fällt auf, dass eine Zugabe von 1-L-MT die produzierte Kynureninmenge deutlich, aber nicht vollständig erniedrigte (blaue Linien). Dieser Effekt konnte mit allen 1-L-MT Chargen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war jedoch keine Inhibition der IDO-vermittelten Kynureninproduktion durch 1-D-MT erkennbar.

Im Falle der TDO⁺ HeLa-TDO Zellen konnte keine oder nur eine geringe Hemmung des TDO-vermittelten L-Tryptophan Abbaus durch 1-L-MT beobachtet werden. Jedoch fiel auf, dass auch in Abwesenheit des eigentlichen Substrates L-Tryptophan, abhängig von der jeweiligen 1-L-MT Konzentration, eine Kynureninproduktion nachweisbar war. Dieser Abbaueffekt war mit der 1-L-MT Charge von 2007 am Stärksten (bis ca. 0,4mM Abbauprodukt vorhanden), doch auch mit den anderen beiden 1-L-MT Chargen von 2008 und 2009 zu beobachten (bis ca. 0,2mM Abbauprodukt messbar). Eine solche Kynureninproduktion aus 1-L-MT in IDO⁺ HeLa-TDO Zellen war nur in geringem Ausmaß zu detektieren. Entsprechend der bekannten Stereospezifität von IDO und TDO konnte in den mit Tetrazyklin stimulierten, TDO⁺ HeLa-TDO Zellen keine Kynureninproduktion aus 1-D-MT nachgewiesen werden, während die IDO⁺ HeLa-TDO Zellen auch aus 1-D-MT kleine Mengen an Kynurenin produzierten.

1-L-MT
20071-L-MT
2008/2009

1-D-MT

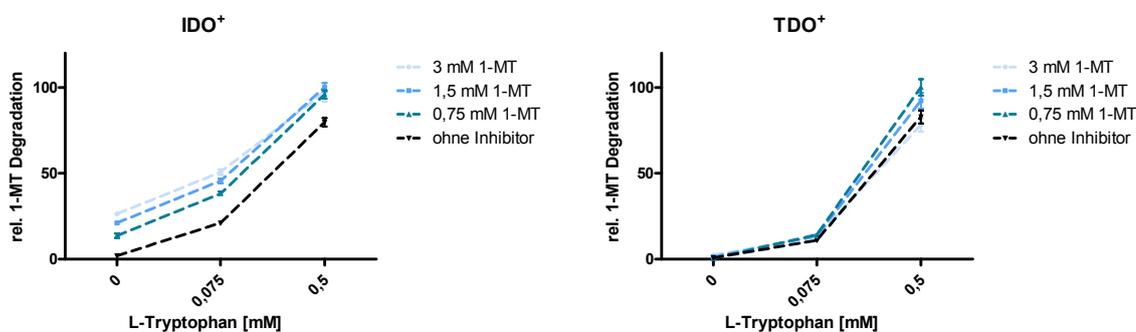


Abbildung 3.16 Abbauprodukte in Überständen von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation verschiedener 1-Methyl-Tryptophan Chargen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 1000U/mL IFN- γ (1. Spalte) oder 30ng/mL Tetrazyklin (2. Spalte) in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden den HeLa-TDO Zellen unterschiedliche Chargen 1-MT zugegeben: 1-L-MT 2007 (1. Reihe), 1-L-MT 2008/2009 (2. Reihe), oder 1-D-MT (3. Reihe). Dabei erfolgte eine Inkubation mit 4 verschiedenen 1-MT Konzentrationen (0; 0,75; 1,5 oder 3 mM, verschiedenfarbene blaue Linien). Die photometrische Erfassung der Abbauprodukte erfolgte in Anwesenheit unterschiedlicher L-Tryptophan Konzentrationen (0; 0,075 oder 0,5 mM). Die Daten wurden angegeben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

Die Daten in Abb. 3.16 deuten an dass sowohl die IDO als auch die TDO in der Lage sind, 1-MT zu einer kynureninähnlichen Substanz abzubauen. Um das Produkt genauer zu charakterisieren wurden die Überstände unstimulierter, IFN- γ - oder Tetrazyklin-stimulierter HeLa-TDO Zellen einem *Multiple Wavelength Scan* unterzogen. Die Stimulation erfolgte dabei jeweils in Tryptophan-freiem Medium in An- oder Abwesenheit von 1,5mM L- oder D-Tryptophan, bzw. 1,5mM 1-L-MT oder 1-D-MT. Als Referenz dienten L-Tryptophan und Kynurenin. Das Ergebnis des Scans war eine maximale Absorption bei 360nm im Kynurenin Standard. Auch das aus 1-L-MT bzw. 1-D-MT entstandene Abbauprodukt konnte bei der identischen Wellenlänge detektiert werden. Weitere potenzielle Abbauprodukte von 1-MT konnten im Wellenlängenbereich von 200 bis 800 nm nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Messung ist in Abb. 3. 17. als Balkendiagramm gezeigt.

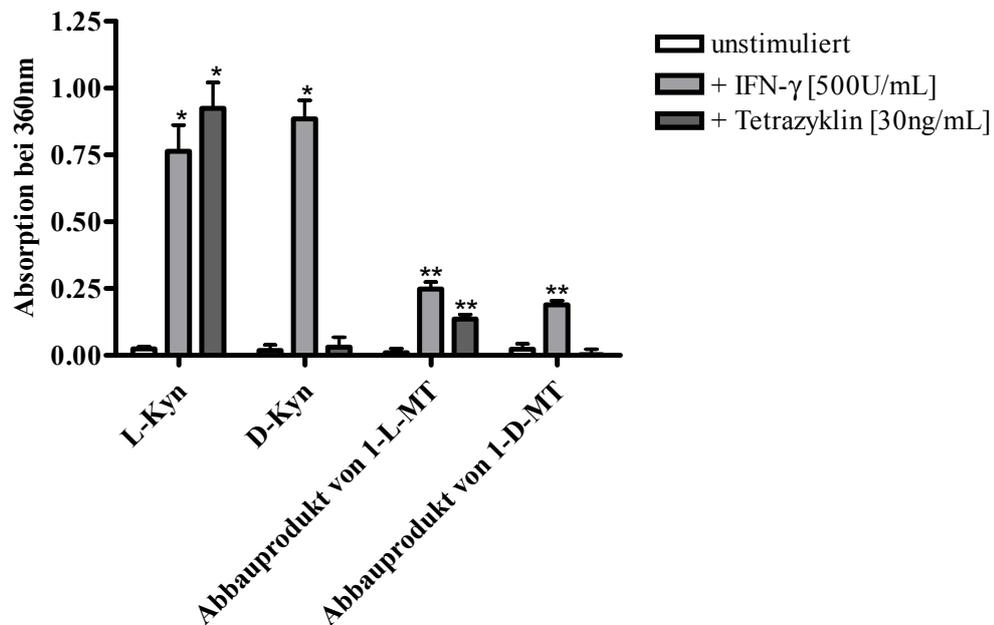


Abbildung 3.17 Analyse der Abbauprodukte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation von L-Tryptophan oder 1-Methyl-Tryptophan.

1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro 24-well Vertiefung wurden für 72 Stunden in Anwesenheit von je 1,5 mM Tryptophan oder 1-MT mit 1000U/mL IFN- γ oder 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellüberstände geerntet und deren Absorption in einem *multiple wavelength scan* gemessen. Der Graph fasst die Absorption aller Gruppen bei 360nm, der maximalen Absorption von Kynurenin, zusammen. In Überständen von sowohl IFN- γ -stimulierten, IDO⁺, als auch Tetrazyklin-stimulierten, TDO⁺, HeLa-TDO Zellen wurde eine signifikante Metabolisierung von L-Tryptophan zu L-Kynurenin beobachtet (*). IDO⁺, nicht aber TDO⁺ Zellen, konnten D-Tryptophan zu D-Kynurenin abbauen (*). Zu beachten ist, dass in Überständen von IDO⁺, als auch TDO⁺ HeLa-TDO Zellen nach 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) Supplementation eine ebenfalls signifikant höhere Absorption bei 360nm, im Vergleich mit unstimulierten Zellen, auftritt (**). Außerdem führt die Zugabe von 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT) nur in Überständen von IDO⁺ Zellen zu einer signifikant erhöhten Absorption (**). (*) und (**) kennzeichnen signifikante Erhöhungen im Vergleich zur Negativkontrolle (*p < 0.001) bzw. (**p < 0.01). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten angegeben.

In Abbildung. 3. 17. ist erkennbar, dass in Überständen unstimulierter HeLa-TDO Zellen kein Kynurenin vorhanden war. Die Stimulation der Zellen mit IFN- γ resultierte allerdings in einer Produktion von Kynurenin, wenn den Zellen L- oder D-Tryptophan als Substrat zur Verfügung gestellt wurde. TDO⁺ Zellen konnten aus L-Tryptophan ebenfalls Kynurenin herstellen und D-Tryptophan nicht metabolisieren. Diese Substratspezifität zeigte sich auch beim TDO-vermittelten Abbau von 1-MT, denn die TDO konnte 1-L-MT, nicht aber 1-D-MT zu einem Produkt umsetzen. Im Gegensatz dazu konnten IDO⁺ Zellen wiederum das L und das D Enantiomer von 1-MT abbauen. Vergleicht man allerdings die Menge des gebildeten Produktes aus Tryptophan bzw. 1-MT, so fällt auf, dass Tryptophan in etwa viermal besser abgebaut werden kann, als 1-MT.

Um das Abbauprodukt von 1-L-MT weiter zu charakterisieren, wurde eine Maldi MS Analyse durchgeführt. Hierbei wurden Überstände von unstimulierten oder Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen gemessen, die in initial Tryptophan-freiem Medium mit einer definierten Menge L-Tryptophan oder 1-L-MT (je 100 μ g/mL) inkubiert wurden. Nach 72 Stunden wurden die Überstände der MS Analyse unterzogen und es wurde auf das Vorhandensein von Tryptophan (Masse 205), Kynurenin (Masse 209) und 1-Methyl-Tryptophan (Masse 219) bzw. 1-Methyl-Kynurenin (Masse 223) geprüft. Bei der Messung wurde detektiert, dass in Überständen unstimulierter Zellen jeweils nur Tryptophan oder 1-Methyl-Tryptophan vorlag. Besonders wichtig bei dieser Kontrolle ist dabei die Tatsache, dass das 1-Methyl-Tryptophan nicht durch Tryptophan verunreinigt war. Bei einer Nachweisgrenze für Tryptophan in einer 1-MT reichen Lösung, die im pM Bereich liegt, kann ausgeschlossen werden, dass potenziell im 1-MT vorhandenes Tryptophan als Ursprung der beobachteten Kynureninproduktion in Frage kommt. Eine Stimulation der HeLa-TDO Zellen in Anwesenheit von L-Tryptophan ergab, dass das Tryptophan vollständig zu Kynurenin umgesetzt wurde. Weiterhin resultierte eine Inkubation der TDO⁺ Zellen mit 1-L-MT ebenfalls in einem Abbau des 1-L-MT und es wurde Kynurenin, nicht aber Methyl-Kynurenin mit einer berechneten Masse von 223 nachgewiesen.

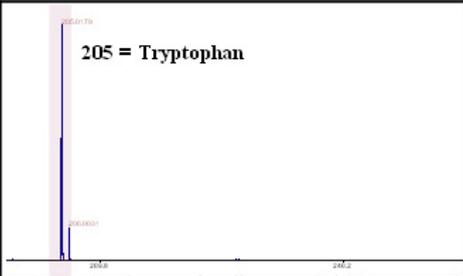
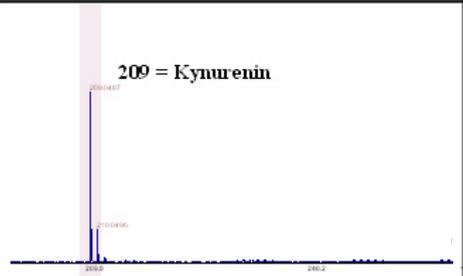
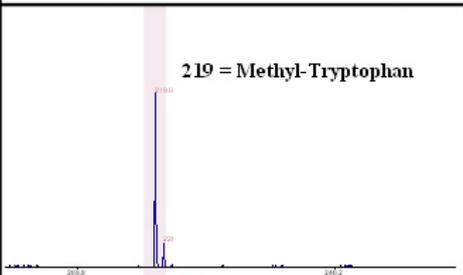
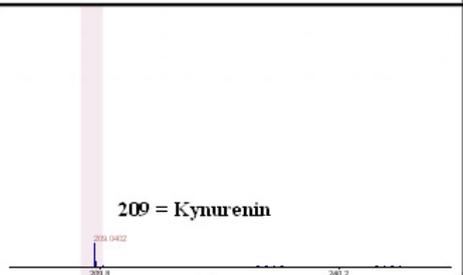
	unstimuliert	+ Tetrazyklin
+ L-Tryptophan		
Masse	210 240	210 240
+ 1-L-MT		
Masse	210 240	210 240

Abbildung 3.18 Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (Maldi MS) Analyse der Überstände von unstimulierten oder Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation von L-Tryptophan oder 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT).

1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 30ng/mL Tetrazyklin in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Als Substrat wurden jeweils 100 μ g/mL (= 0,5 mM) L-Tryptophan oder 1-L-MT zugegeben. Anschließend wurden die Zellüberstände geerntet und im Massenspektrometer analysiert. Im Überstand von unstimulierten Zellen lag nach Tryptophan Zugabe Tryptophan (Masse 205) vor, während nach 1-L-MT Zugabe Methyl-Tryptophan (Masse 219), nicht aber Tryptophan zu finden war. In den Überständen von Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen wurde das vorhandene Tryptophan zu Kynurenin (Masse 209) abgebaut, während in Anwesenheit von 1-L-MT ebenfalls Kynurenin, nicht mehr aber Methyl-Tryptophan oder Methyl-Kynurenin (Masse 223) nachzuweisen war.

3.2.2. *Ex vivo* Analyse der TDO-Enzymaktivität in murinem Lebergewebe

Bisher wurde in dieser Arbeit die Aktivität humaner TDO in rekombinanten HeLa Zellen analysiert. Um diese *in vitro* Daten zu stützen, wurden weiterhin *ex vivo* Daten erhoben, um einen Einblick in die physiologische TDO-Aktivität in der murinen Leber zu gewinnen.

Zuerst musste daher überprüft werden, ob unter physiologischen Umständen, d. h. ohne eine Infektion, ausschließlich eine TDO- oder auch eine IDO-Aktivität in Mäuseleber zu finden ist. Deshalb wurde in einem ersten Schritt RNA aus BALB/c Mäuseleber isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann in einer PCR mit Hilfe von TDO- oder IDO-spezifischen Primern auf das Vorhandensein von TDO und IDO analysiert. Als Kontrolle dienten sowohl β -Aktin-spezifische Primer, als auch cDNA aus HEK Zellen, die stabil mit muriner IDO transfiziert worden waren. Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 3. 19. gezeigt. In

muriner Leber fand sich ein TDO Transkript.IDO konnte im Gegensatz dazu nicht in der cDNA der murinen Leber, aber in den transfizierten Kontrollzellen nachgewiesen werden.

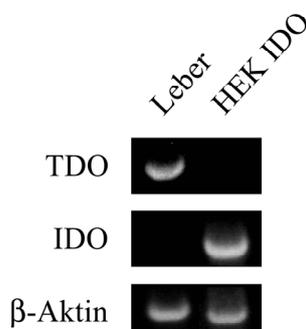


Abbildung 3.19 PCR Analyse muriner Leber.

RNA wurde aus Mäuseleber (BALB/c) extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Ein TDO-spezifisches, jedoch kein IDO-spezifisches PCR Produkt wurde mit den jeweiligen Primern in der Leberprobe erhalten. Als Kontrolle diente cDNA aus mit muriner IDO transfizierten humanen HEK Zellen, als auch eine murine, bzw. humane β -Aktin Auftragskontrolle.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Expression der TDO in der Mäuseleber zu einem funktionsfähigem Enzym führt, welches unter *ex vivo* Bedingungen Tryptophan zu Kynurenin abbauen kann. Aus diesem Grunde wurden BALB/c Mäusen unterschiedliche Organe entnommen und zerkleinert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Organfragmente in Tryptophan-freiem Medium mit oder ohne zusätzlich supplementiertem L-Tryptophan (100 μ g/mL). Nach 72 Stunden wurde der Gewebeüberstand gerntet und photometrisch auf das Vorhandensein von Kynurenin getestet. In Abb. 3. 20. ist das Ergebnis dieser Messung gezeigt.

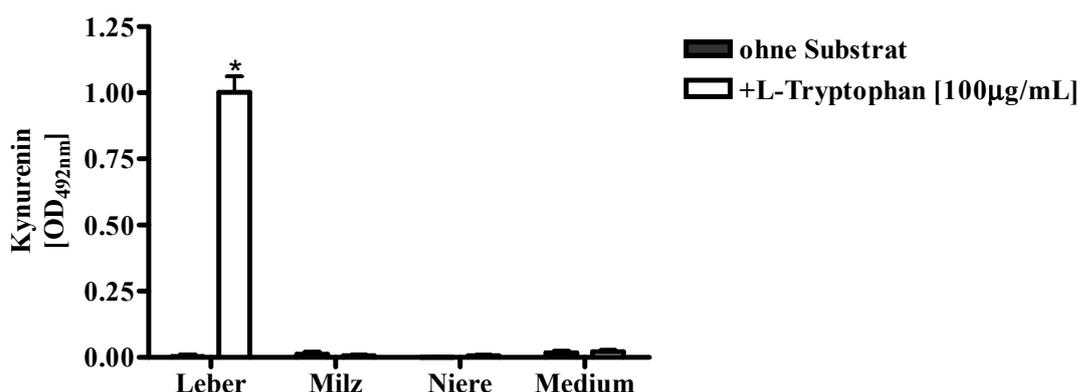


Abbildung 3.20 Kynureninproduktion in Überständen verschiedener muriner Gewebekulturen nach L-Tryptophan Supplementation.

Leber, Milz und Nieren von BALB/c Mäusen wurden frisch isoliert, in kleine Fragmente zerteilt und in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium entweder ohne zusätzliches Substrat oder mit 100 μ g/mL (=0,5 mM) L-Tryptophan für 72 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente Medium ohne Gewebe. Anschließend wurde der Überstand gerntet und die darin enthaltene Kynureninmenge photometrisch ermittelt. In den Überständen von Milz, Nieren und in der Negativkontrolle war kein Kynurenin messbar. Im Gegensatz dazu war in Überständen aus Mäuseleberkulturen eine signifikant erhöhte ($p < 0.001$) Menge Kynurenin nachzuweisen (*). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus 10 verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

In der Abwesenheit des Substrates L-Tryptophan war in keinem Gewebeüberstand Kynurenin nachweisbar. Wurde jedoch L-Tryptophan supplementiert, so konnte Kynurenin in den Überständen mit Mäuseleberfragmenten detektiert werden. In den Überständen der Organkulturen von Milz, Niere und in der Mediumkontrolle wurde hingegen wie erwartet kein Kynurenin gemessen. Auch in Überständen der Gewebekulturen von Herz, Lunge und Gehirn konnte kein Kynurenin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bisher wurde gezeigt, dass in Überständen von Mäuseleber Kynurenin detektiert werden konnte, sobald L-Tryptophan als Substrat im Medium vorhanden war. Damit kann man ausschließen, dass potenziell in der Leber vorhandenes Kynurenin freigesetzt wurde. Stattdessen fand ein TDO-vermittelter Abbau des L-Tryptophans zu Kynurenin statt. In einem nächsten Schritt wurde daher die Kinetik der Kynureninproduktion genauer analysiert. Hierfür wurde wiederum Lebergewebe von BALB/c Mäusen isoliert und zusammen mit 100 μ g/mL L-Tryptophan inkubiert. Nun erfolgte eine Kynureninmessung in den Gewebeüberständen nach einer Inkubationszeit von 1, 3, 9, 24 und 48 Stunden. Wie in Abb. 3. 21. gezeigt, nimmt die Menge des produzierten Kynurenins mit der Dauer der Inkubationszeit zu.

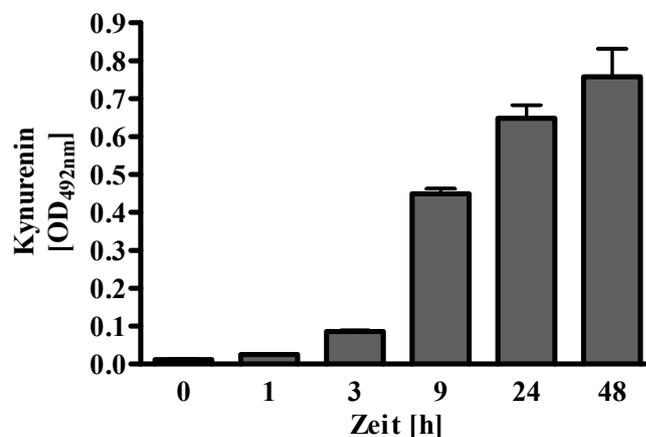


Abbildung 3.21 Kinetik der Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter L-Tryptophan Supplementation.

Lebergewebe von BALB/c Mäusen wurde frisch isoliert und in Anwesenheit von 100 μ g/mL (= 0,5 mM) L-Tryptophan in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium inkubiert. Nach jeweils 0, 1, 3, 9 und 24 Stunden wurde eine für die Kynureninmessung notwendige Menge Überstand geerntet und photometrisch analysiert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

In einem nächsten Experiment wurde die Tatsache genutzt, dass unserer Arbeitsgruppe sowohl IDO-KO als auch TDO-KO Mäuse zur Verfügung standen. Somit konnte mit einer weiteren Methode überprüft werden, ob die murine TDO für die zuvor in

Lebergewebeüberständen detektierte Kynureninproduktion verantwortlich war. Hierfür wurde Lebergewebe von C57BL/6 WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen isoliert, zerkleinert und in Medium mit oder ohne 300µg/mL L-Tryptophan 72 Stunden inkubiert. Es folgte eine photometrische Kynureninbestimmung in den Überständen. In Abwesenheit vom Substrat L-Tryptophan wurde in allen Gruppen keine Kynureninproduktion gemessen. Jedoch wurde bei Verfügbarkeit von L-Tryptophan im Überstand von Lebergewebekulturen von WT und IDO-KO Mäusen Kynurenin detektiert (*). Wie erwartet blieb eine Kynureninproduktion durch das Lebergewebe der TDO-KO Mäuse aus.

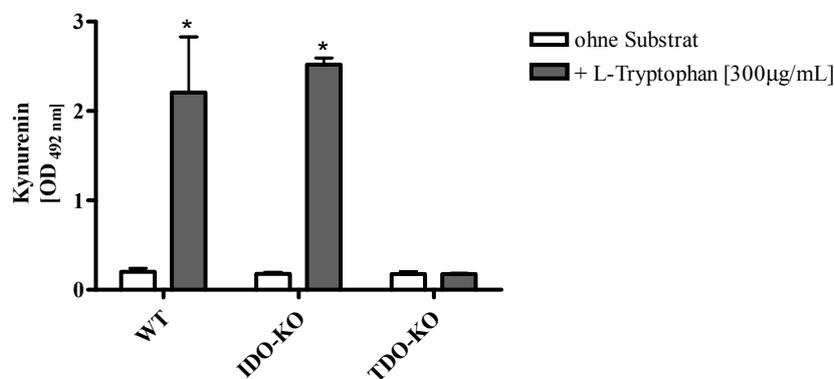


Abbildung 3.22 Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter L-Tryptophan Supplementation in WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen.

Lebergewebe von C57BL/6 WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen wurde frisch isoliert und ohne Substrat bzw. in Anwesenheit von 300µg/mL (= 1,5 mM) L-Tryptophan 72 Stunden in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Überstände geerntet und der Kynureningehalt photometrisch ermittelt. In Abwesenheit von Substrat wurde in allen Versuchsgruppen kein Kynurenin im Überstand nachgewiesen. In Anwesenheit von L-Tryptophan war die Kynurenin Menge in Lebergewebeüberständen von WT und IDO-KO Mäusen signifikant ($p < 0.001$) erhöht (*). Im Gegenteil dazu war in TDO-KO Lebergewebeüberständen kein Kynurenin nachzuweisen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung (SD) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

In den Abbildungen 3. 16. – 3. 18. war zuvor gezeigt worden, dass die humane TDO, exprimiert in rekombinanten HeLa-TDO Zellen die Fähigkeit besitzt, 1-L-MT abzubauen. Dieser Abbau sollte nun auch in *ex vivo* Experimenten verifiziert werden. Dazu wurde Lebergewebe von BALB/c Mäusen isoliert, zerteilt und inkubiert. Die Inkubation erfolgte unter Supplementation von L-Tryptophan, D-Tryptophan, 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) oder 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT) (jeweils 300µg/mL) für 72 Stunden. Anschließend wurde die Kynureninproduktion im Gewebekulturüberstand analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl L-Tryptophan als auch 1-L-MT zu Kynurenin oder einem ähnlichen

Produkt abgebaut werden konnten (* in Abb. 3. 23.). Hierbei wurde das L-Tryptophan circa dreimal besser als 1-L-MT abgebaut.

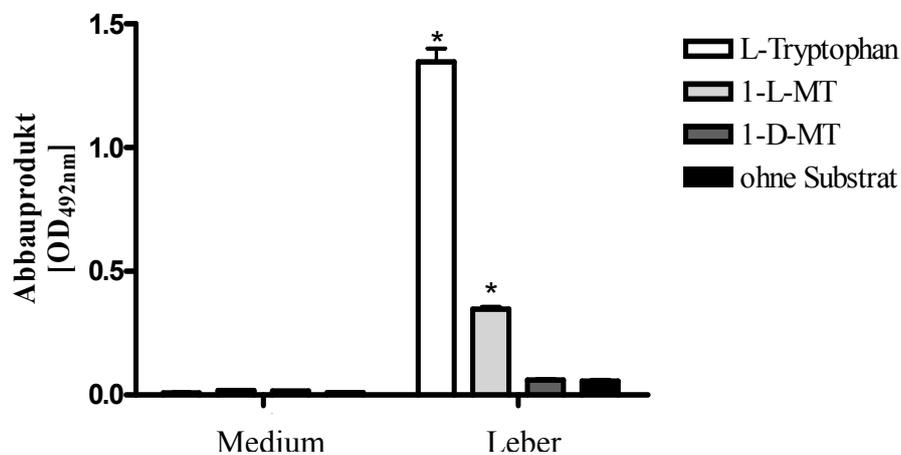


Abbildung 3.23 Kynurenin Produktion in Überständen muriner Lebergewebekultur unter Supplementation verschiedener Substrate.

Leber von BALB/c Mäusen wurden frisch isoliert, in Fragmente zerteilt und in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium entweder ohne zusätzliches Substrat oder mit L-Tryptophan, 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) oder 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT) (jeweils 300µg/mL (= 1,5mM)) für 72 Stunden inkubiert. Als Kontrolle diente Medium ohne Gewebe. Anschließend wurde der Überstand geerntet und die darin enthaltene Kynureninmenge photometrisch ermittelt. In der Negativkontrolle ohne Lebergewebe wurde kein Kynurenin im Überstand ermittelt. Bei Anwesenheit von Lebergewebe wurde L-Tryptophan zu Kynurenin abgebaut. Auch wenn 1-L-MT zur Mäuselebergewebe zugegeben wurde, konnte ein Abbauprodukt, welches ebenfalls, nach Zugabe von Ehrlich's Reagenz, bei einer OD von 492nm messbar war, detektiert werden. Die Daten wurden als Durchschnittswerte ± Standardfehler (SEM) aus 12 verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

Nachdem nun gezeigt war, dass 1-L-MT auch von murinen Leberzellen abgebaut werden konnte, wurde abschließend analysiert, ob dieser Abbau ebenfalls durch die TDO katalysiert wurde. Die Metabolisierung des 1-L-MT durch Lebergewebe von TDO-KO Mäusen wurde mit der durch Lebergewebe von WT oder IDO-KO Mäusen verglichen. Es zeigte sich in allen Gruppen wie erwartet keine Erzeugung eines Produktes bei Abwesenheit von 1-L-MT. In den Lebergewebeüberständen von WT und IDO-KO Mäusen war aber eine Zunahme der Produktmenge zu messen, wenn 1-L-MT (300µg/mL) supplementiert war. Im Gegensatz dazu konnten Leberzellen von TDO-KO Mäusen signifikant weniger 1-L-MT abbauen.

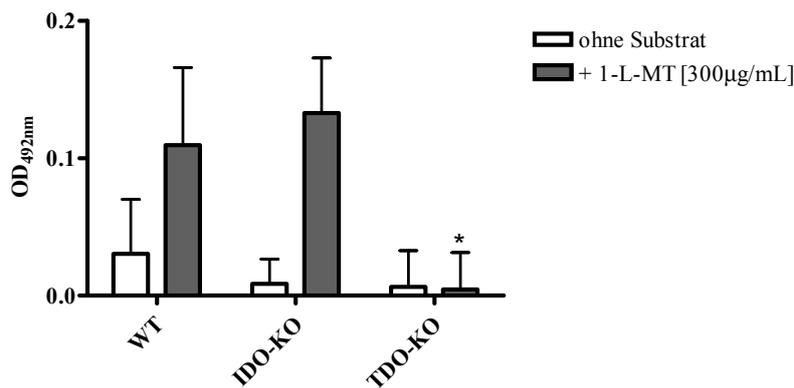


Abbildung 3.24 Metabolisierung von 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) in Lebergewebe von WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen.

Lebergewebe von C57BL/6 WT, IDO-KO und TDO-KO Mäusen wurde frisch isoliert und ohne Substrat bzw. in Anwesenheit von 300µg/mL (= 1,5mM) 1-L-MT 72 Stunden in Tryptophan-freiem RPMI Zellkulturmedium inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände geerntet und photometrisch analysiert. In Anwesenheit von 1-L-MT war das erwartete Abbauprodukt in Leberüberständen von WT und IDO-KO Mäusen nachweisbar. Im Gegenteil dazu war in TDO-KO Leberüberständen signifikant ($p < 0.01$) weniger Produkt nachzuweisen (*). Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardabweichung (SD) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

3.2.3. Analyse der Beeinflussung der IDO- und TDO-vermittelten antibakteriellen Effekte durch 1-L-MT

Bislang wurde dargestellt, dass das 1-L-MT nicht nur, wie in der Literatur beschrieben, als kompetitiver Inhibitor der IDO fungiert. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass die IDO und auch die hepatische TDO imstande sind, das 1-L-MT abzubauen. Dennoch konnte in einigen Experimentalansätzen beobachtet werden, dass ein IDO-vermittelter antimikrobieller oder immunregulatorischer Effekt vollständig durch 1-L-MT aufgehoben werden konnte. In allen Fällen wurde dabei aber gezeigt, dass die enzymatische Aktivität der IDO durch 1-L-MT nicht vollständig aufgehoben wurde, weil die Kynureninproduktion nicht gänzlich gehemmt war (z. B. in Abb. 3. 16). Dies führte zu der Annahme, dass das 1-L-MT selbst einen Effekt auf Mikroorganismen und T-Zellen, abseits von seiner IDO-inhibitorischen Funktion, hatte. Um einen solchen Einfluss zu analysieren wurden wieder HeLa-TDO Zellen eingesetzt und mit IFN- γ stimuliert, um eine IDO Expression zu erhalten. Zu Beginn der 72-stündigen Inkubation wurde entweder kein Inhibitor, 1,5mM 1-L-MT oder 1,5mM 1-D-MT supplementiert. Im Anschluss an die Stimulation wurde der Zellkulturüberstand geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (Abb. 3. 25. A), *Staphylococcus aureus* plus 1,5mM L-Tryptophan (Abb. 3. 25. B) oder *Staphylococcus aureus* plus 1,5mM 1-L-MT (Abb. 3. 25. C) benutzt.

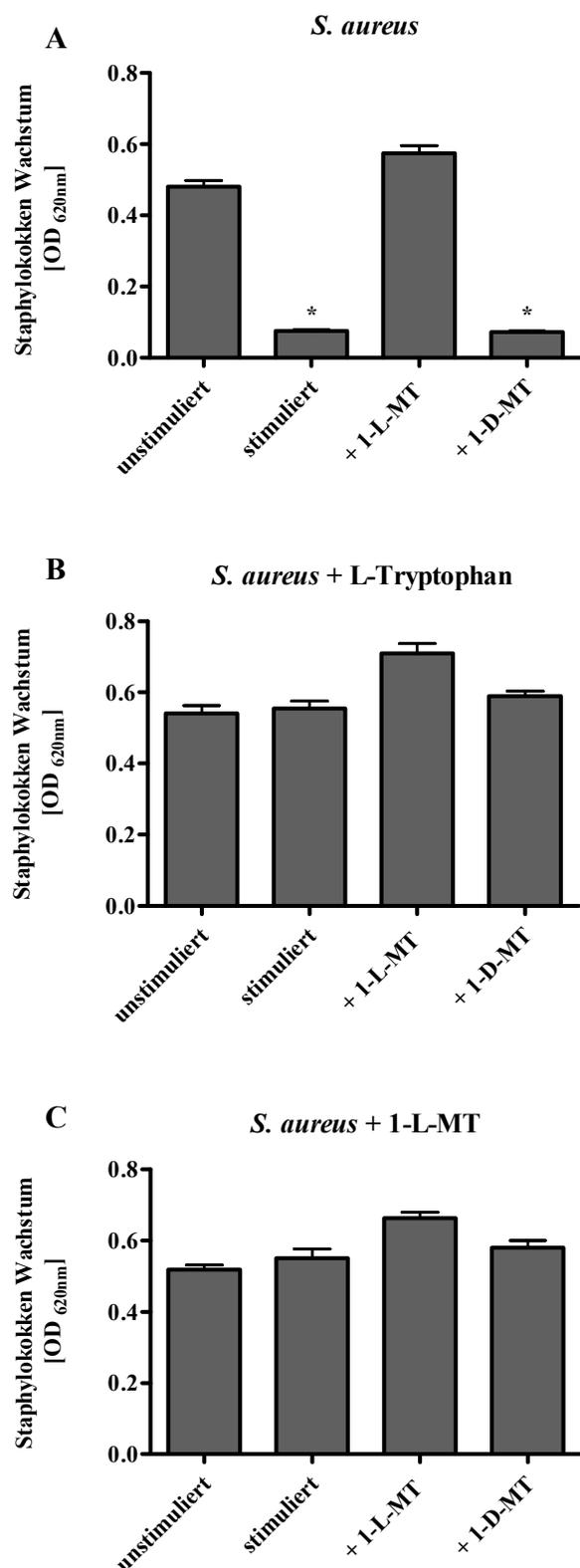


Abbildung 3.25 Bakterienwachstum in konditioniertem, Tryptophan-freiem Medium von IFN- γ -stimulierten oder unstimulierten HeLa-TDO Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500U/mL IFN- γ stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. Zusätzlich wurden 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) oder 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT) (jeweils 1,5mM [= 300 μ g/mL]) supplementiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) genutzt. Zeitgleich wurde entweder kein Substrat (A), 1,5mM L-Tryptophan (B) oder 1,5mM 1-L-MT (C) zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum durch Messung der optischen Dichte bestimmt. (A) Das Bakterienwachstum wurde in konditioniertem Medium von IFN- γ -stimulierten Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen signifikant ($p < 0.001$) gehemmt. 1-L-MT, nicht aber 1-D-MT, konnte den antibakteriellen Effekt (*) aufheben. (B) Die Supplementation von L-Tryptophan zum Zeitpunkt der Infektion erlaubte ein ungehindertes Wachstum der Bakterien in allen experimentellen Gruppen. (C) Bemerkenswert ist das Aufheben des antibakteriellen Effektes bei Zugabe von 1-L-MT zum Zeitpunkt der Infektion.

Die Daten wurden als Bakterienwachstum \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

Die Daten belegen, dass die Bakterien in Überständen von unstimulierten HeLa-TDO Zellen wachsen konnten, das Wachstum aber durch eine IFN- γ Stimulation und somit durchIDO-Aktivität gehemmt wurde (Abb. 3. 25. A). Wurde nun das Bakterienwachstum in Überständen

von stimulierten HeLa-TDO Zellen die mit 1-L-MT supplementiert wurden betrachtet, so fällt auf, dass das 1-L-MT, wie erwartet, den antibakteriellen Effekt aufheben konnte. Eine Inkubation mit 1-D-MT hingegen vermochte die IDO-vermittelte Inhibition des Bakterienwachstums nicht aufzuheben.

Das der Bakterienhemmung in Abb. 3. 25. A wirklich eine IDO-vermittelte Tryptophan-Depletion zugrunde lag, beweist Abb. 3. 25. B. Hier wurde zeitgleich mit der Infektion frisches L-Tryptophan zugegeben. Diese Zugabe konnte den antibakteriellen Effekt vollständig in allen Experimentalgruppen ausgleichen.

Überraschenderweise war aber auch eine Zugabe von 1-L-MT zum Zeitpunkt der Infektion imstande, die Hemmung des Bakterienwachstums aufzuheben (Abb. 3. 25. C). Auch hier konnten die Bakterien gleichermaßen in allen experimentellen Gruppen wachsen, ohne dass das natürliche Substrat L-Tryptophan zugegen war.

Um ein mögliches Wachstum der Bakterien mit 1-L-MT als Substrat genauer zu überprüfen, wurde in einem nächsten Schritt Tryptophan-freies Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen L-Tryptophan oder 1-L-MT (jeweils 0 – 200µg/mL) als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* eingesetzt. Das Wachstum der Bakterien wurde dann nach 24-stündiger Inkubation über eine Messung der optischen Dichte ermittelt. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abb. 3. 26. dargestellt. Ohne Substratzusatz konnten die Bakterien nicht wachsen. Die Zugabe von L-Tryptophan führte, wie erwartet, dosisabhängig zu einem deutlichen Bakterienwachstum (durchgezogene Linie). Überraschend ist aber, dass die Bakterien ebenfalls nach Supplementation von 1-L-MT wachsen konnten (gestrichelte Linie). Hierbei war allerdings ein quantitativer Unterschied in der Substrat-Konzentration festzustellen, die benötigt wurde, um ein halbmaximales Bakterienwachstum zu erlauben. Die Bakterien konnten mit 0,45µg/mL L-Tryptophan dieses halbmaximale Wachstum erreichen, wohingegen sie 13,64µg/mL 1-L-MT für ein vergleichbares Wachstum benötigten. Somit wurde L-Tryptophan von *S. aureus* ca. 30mal besser verwertet als 1-L-MT.

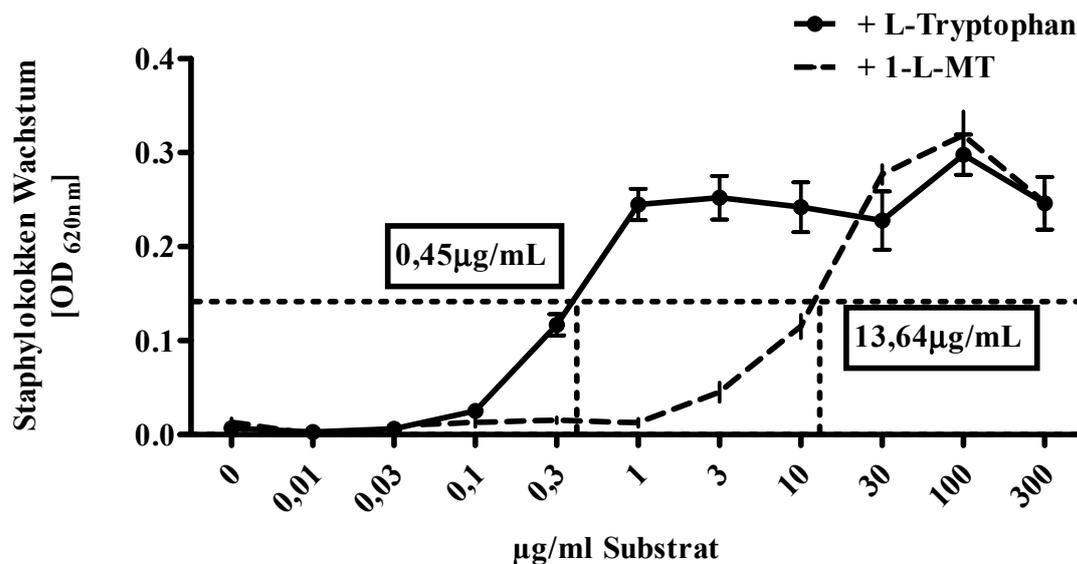


Abbildung 3.26 Bakterienwachstum in Tryptophan-freiem, konditioniertem Kulturmedium nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) Konzentrationen.

Konditionierte, Tryptophan-freie Überstände wurden durch eine 72-stündige IFN- γ Stimulation (500U/mL) von 1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro mittlere Kulturflasche gewonnen. Anschließend dienten die konditionierten Überstände als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung). Zum Zeitpunkt der Infektion wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen von L-Tryptophan oder 1-L-MT (0– 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) zugesetzt. Die Messung des Bakterienwachstums als optische Dichte zeigt, dass keine Bakterien in der Abwesenheit von Substrat wachsen konnten. Jedoch wurde ein Bakterienwachstum ermöglicht, wenn L-Tryptophan und 1-L-MT zugegeben wurde. Dabei wurde ein halbmaximales Bakterienwachstum jeweils mit $0,45\mu\text{g}/\text{mL}$ L-Tryptophan bzw. $13,64\mu\text{g}/\text{mL}$ 1-L-MT erreicht. Das Bakterienwachstum wurde als $\text{OD}_{(620\text{nm})} \pm$ Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angeben.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass *S. aureus* auch für längere Zeit mit 1-L-MT anstelle von Tryptophan wachsen konnte, ohne dass das Wachstum beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Ähnliche Daten wurden auch mit anderen Tryptophan-auxotrophen Kokken wie *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus agalactiae* erhoben (Daten nicht gezeigt).

Um sicherzustellen, dass das 1-L-MT nicht nur für Bakterien als Tryptophanersatz dienen kann, wurde *Toxoplasma gondii* als weiterer Mikroorganismus getestet. Dazu wurden zunächst Glioblastomzellen (86HG39) mit IFN- γ stimuliert und dann mit Toxoplasmen infiziert. Abb. 3. 27. zeigt, dass Toxoplasmen in der Abwesenheit von zusätzlichem Tryptophan nicht in stimulierten 86HG39 Zellen wachsen konnten. Erst die Zugabe von L-Tryptophan führte dosisabhängig, wie erwartet, zu einem Parasitenwachstum in den IFN- γ stimulierten Zellen. In Analogie zu den bereits geschilderten Bakteriendaten konnte aber auch eine Supplementation der Kulturen mit 1-L-MT zum Zeitpunkt der Infektion ein Parasitenwachstum ermöglichen. Sowohl mit L-Tryptophan als auch mit 1-L-MT konnte ein Parasitenwachstum erreicht werden, das quantitativ dem Wachstum in der unstimulierten Zellkultur entsprach (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Experimentalsystem erwies sich

L-Tryptophan wieder als das bessere Substrat, denn hier wurde für ein halbmaximales Toxoplasmenwachstum nur 30% der Substratmenge, im Vergleich zu 1-L-MT, benötigt.

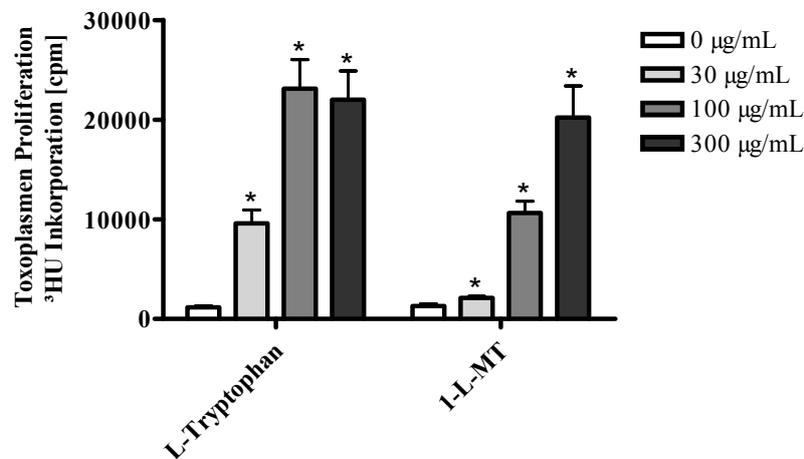


Abbildung 3.27 *Toxoplasma gondii* Proliferation in IFN- γ -stimulierten 86HG39 Zellen nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) Konzentrationen.

3×10^4 86HG39 Glioblastomzellen pro Vertiefung wurden 72 Stunden mit IFN- γ (300U/mL) in IMDM Zellkulturmedium stimuliert oder blieben unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 3×10^4 *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten pro Vertiefung infiziert. Gleichzeitig mit den Parasiten wurden unterschiedliche Konzentrationen L-Tryptophan oder 1-L-MT zugegeben (0, 30, 100 oder 300 $\mu\text{g/mL}$). Nach weiteren 72 Stunden wurde die Proliferation der Toxoplasmen durch den Einbau von [^3H]-Uracil ermittelt. Die Messung der Toxoplasmenproliferation zeigt, dass die Parasiten nicht in der Abwesenheit von Substraten wachsen konnten (weiße Balken). Jedoch wurde ein signifikantes ($p < 0.001$) Parasitenwachstum ermöglicht, wenn L-Tryptophan, aber auch 1-L-MT zugegeben wurde (*). Dabei wurde ein halbmaximales Toxoplasmen Wachstum jeweils mit ca. 30 $\mu\text{g/mL}$ L-Tryptophan bzw. 100 $\mu\text{g/mL}$ 1-L-MT erreicht. Die Daten wurden als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben.

3.2.4. Analyse der Beeinflussung desIDO- und TDO-vermittelten antiproliferativen Effektes auf humane Zellen durch 1-L-MT

Da nun gezeigt war, dass 1-L-MT als Substratersatz für bestimmte Bakterien und den Parasiten *T. gondii* dienen konnte, kam die Frage auf, ob humane Zellen ebenfalls das 1-L-MT als Substrat nutzen können. Dazu wurde zunächst der bekannte, durch Tryptophanentzug ausgelöste, antiproliferative Effekt auf humane Tumorzellen analysiert. Dabei wurde das Wachstum von HeLa-TDO Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen mikroskopisch verfolgt und fotografisch dokumentiert. Es ist klar zu erkennen, dass die Zellen in Medium ohne Tryptophan nicht proliferieren konnten und dass auch einige der normalerweise adhären Zellen sich vom Untergrund gelöst hatten (A). Wurde dem Medium allerdings L-Tryptophan zugesetzt (Positivkontrolle), so konnten die Zellen ungestört wachsen (B). Dieses deutliche Wachstum konnte auch nach Zugabe von 1-L-MT beobachtet werden (D). Dahingegen konnte nach Zugabe von D-Tryptophan (C) oder 1-D-MT (E) kein Wachstum ausgelöst werden.

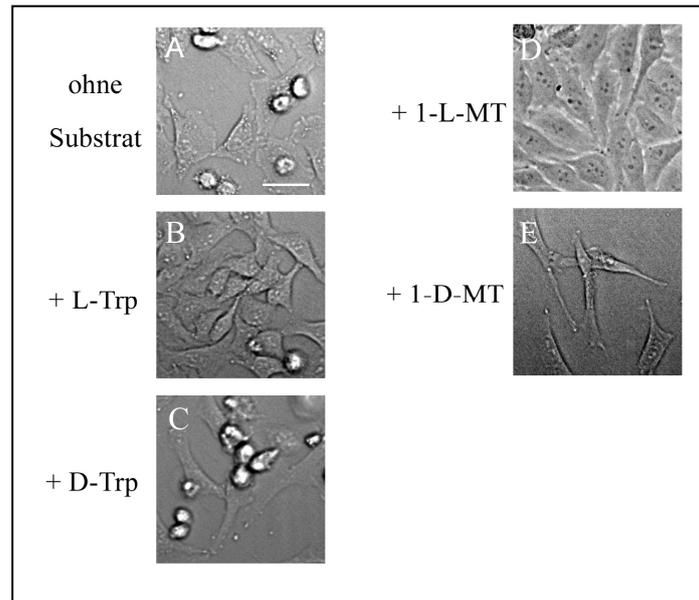


Abbildung 3.28 Wachstum von HeLa-TDO Zellen in Tryptophan-freiem Kulturmedium unter Supplementation verschiedener Substrate mit unterschiedlichen Stimulationsbedingungen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen wurden in Tryptophan-freiem RPMI Kulturmedium inkubiert (A). Einem Teil der Zellen wurde (B) L-Tryptophan (L-Trp), (C) D-Tryptophan (D-Trp), (D) 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) oder (E) 1-D-Methyl-Tryptophan (1-D-MT) in einer Konzentration von je 1,5mM zugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die adhärennten HeLa-TDO Zellen mit einem Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Der Eichstrich entspricht 10 Mikrometer.

Nach den bisher gezeigten Daten ist 1-L-MT ein guter Inhibitor der IDO Enzymaktivität, während es die TDO-Enzymaktivität kaum beeinflusst. Im Bezug auf die Inhibition der antimikrobiellen und der antiproliferativen Effekte der IDO scheint 1-L-MT aber eine zusätzliche antagonistische Funktion auszuüben, indem es als Tryptophanersatz dienen kann. Es ist daher wahrscheinlich, dass 1-L-MT auch einen Einfluss auf TDO-vermittelte antiproliferative Effekte ausüben kann. Um dies zu zeigen, wurden in einem ersten Experiment 3×10^4 Zellen HeLa-TDO Zellen für 72 Stunden mit einer maximalen IFN- γ (1000U/mL)(Abb. 3. 29.A) oder Tetrazyklin (30ng/mL)(Abb. 3. 29.B) Dosis stimuliert. Die Kulturen wurden dabei zum Teil schon zu Stimulationsbeginn mit 100 μ g/mL 1-L-MT inkubiert. Anschließend wurden die konditionierten Medien der Zellen gerntet und als Kulturmedium für T-Zellen eingesetzt. Dabei wurde in einer Kontrollgruppe wiederum 100 μ g/mL L-Tryptophan supplementiert, um gegebenenfalls die Inhibition der T-Zell Proliferation wieder aufzuheben.

Wiederum war in beiden Gruppen (A, B) festzustellen, dass die T-Zellen in Überständen unstimulierter HeLa-TDO Zellen ungehemmt wachsen konnten. In der Abwesenheit von 1-L-MT wurde durch eine IFN- γ oder eine Tetrazyklin Stimulation das T-Zell Wachstum

inhibiert. Dieser inhibitorische Effekt konnte ebenfalls wie erwartet durch eine L-Tryptophan Zugabe bei Beginn der T-Zell Aktivierung aufgehoben werden.

Das Vorhandensein von 100µg/mL 1-L-MT hatte einen massiven Einfluss auf die IDO-vermittelte T-Zell Inhibition. In dieser Gruppe kam es trotz IDO-Aktivität zu einem relevanten (ca. 25.000 cpm) Wachstum der T-Zellen (Abb. 3. 29.A) welches nicht durch eine erneute Gabe von L-Tryptophan übertroffen werden konnte.

Überraschenderweise hatte das 1-L-MT aber auch einen Einfluss auf den TDO-vermittelten immunregulatorischen Effekt. Zwar blieb die T-Zellproliferation noch signifikant auf ca. 9.000 cpm gehemmt, war jedoch signifikant höher als in der Gruppe ohne 1-L-MT. Wie erwartet führte auch in dieser Gruppe eine erneute L-Tryptophan Supplementation zu einem vollständigen Wachstum.

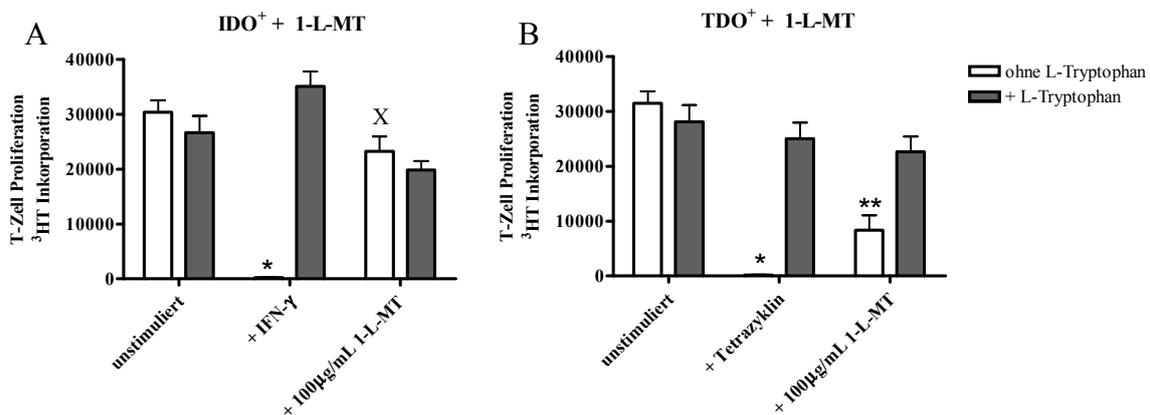


Abbildung 3.29 Analyse der immunregulatorischen Effekte von IFN- γ und Tetrazyklin-stimulierten HeLa-TDO Zellen nach Supplementation des Inhibitors 1-Methyl-Tryptophan.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 1000U/mL IFN- γ (A) oder 30ng/mL Tetrazyklin (B) in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Kontrollzellen blieben unstimuliert. In der Hälfte der IFN- γ oder Tetrazyklin-stimulierten Gruppen erfolgte gleichzeitig eine Supplementation von 100µg/mL (= 0,5mM) 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT). Anschließend wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung eingesetzt. Die T-Zell Proliferation wurde mit monoklonalem anti-OKT3 Antikörper aktiviert. Zusätzlich wurde einigen Experimentalansätzen 100µg/mL (= 0,5mM) (graue Balken) L-Tryptophan zugegeben. Nach 72 Stunden wurde die T-Zell Proliferation durch Zugabe von [3 H]-Thymidin für 14-18 Stunden analysiert. Eine IFN- γ oder Tetrazyklin Stimulation führte zu einer signifikanten Inhibition des T-Zell Wachstums, die durch Zugabe von L-Tryptophan aufzuheben war. Allerdings hatte die Zugabe von 1-L-MT in der Initialphase einen deutlichen Einfluss auf IFN- γ -stimulierte HeLa-TDO Zellen, denn in dieser Gruppe wurde der T-Zell inhibitorische Effekt nahezu vollständig aufgehoben (X). In der Tetrazyklin-stimulierten Gruppe konnte nach 1-L-MT Gabe zwar weiterhin eine T-Zell Inhibition nachgewiesen werden die jedoch signifikant schwächer war als in der Kontrollgruppe ohne 1-L-MT (**). In allen Fällen konnte die Inhibition des T-Zell Wachstums durch die Zugabe von L-Tryptophan wieder aufgehoben werden. (*) kennzeichnen die mit ($p < 0.001$) und (**) die mit ($p < 0.01$) signifikante Inhibition der T-Zell Proliferation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe ohne Stimulation. Die Daten wurden angegeben als durchschnittlicher [3 H]-Thymidin Einbau \pm Standardfehler (SEM) aus fünf verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

In einem nächsten Schritt wurde daher überprüft, ob auch humane T-Zellen 1-L-MT als Tryptophanersatz nutzen können. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen frisch isoliert und in Tryptophan-freiem, konditioniertem Medium unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen L-Tryptophan oder 1-L-MT (0; 0,75; 7,5 oder 75µg/mL) kultiviert. Nach 72 Stunden wurde dann die OKT3-induzierte T-Zell Proliferation mittels [³H]-Thymidin-Einbau ermittelt. Abbildung 3. 30. stellt das Ergebnis dieser Messung dar. Ohne die Zugabe eines Substrates konnte keine T-Zell Proliferation stattfinden (weißer Balken). Wie erwartet konnten die T-Zellen jedoch in der Gegenwart von L-Tryptophan als auch von 1-L-MT wachsen (*). Das L-Tryptophan erwies sich jedoch abermals als das bessere Substrat, denn die T-Zellen zeigten bereits in der Anwesenheit von 0,75µg/mL ein maximales Wachstum, bei der gleichen Konzentration an 1-L-MT jedoch nur ein halbmaximales Wachstum.

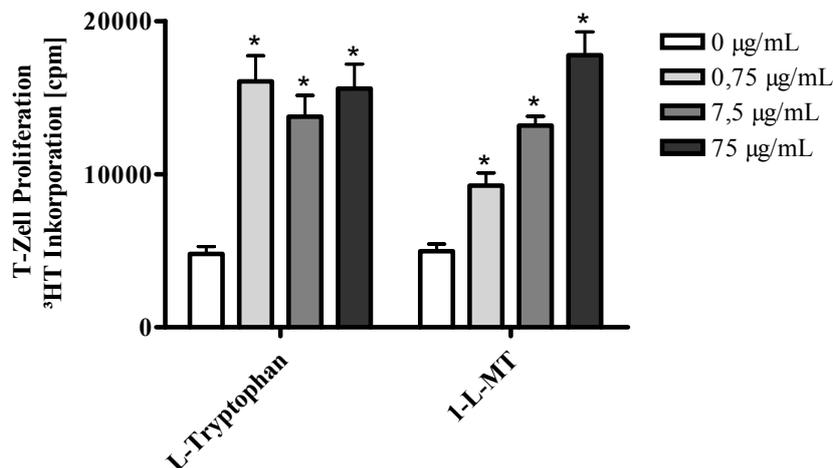


Abbildung 3.30 T-Zell Proliferation in Tryptophan-freiem Kulturmedium nach Supplementation verschiedener L-Tryptophan und 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) Konzentrationen.

Konditionierte, Tryptophan-freie Überstände wurden durch eine 72-stündige IFN- γ Stimulation (500U/mL) von 1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro mittelgroße (25cm²) Kulturflasche gewonnen. Anschließend dienten die konditionierten Überstände als Kulturmedium für $1,5 \times 10^5$ frisch isolierte periphere Blutlymphozyten pro Vertiefung. Die T-Zell Proliferation wurde durch die Zugabe von monoklonalem anti-OKT3 Antikörper aktiviert. Gleichzeitig erfolgte eine Supplementation von L-Tryptophan oder 1-L-MT (jeweils 0; 0,75; 7,5 oder 75 µg/mL). Nach weiteren 72 Stunden wurde die T-Zell Proliferation durch Zugabe von [³H]-Thymidin für 14-18 Stunden analysiert. T-Zellen waren in der Abwesenheit von Substrat nicht in der Lage zu proliferieren (weiße Balken). Allerdings erlaubte die Zugabe von L-Tryptophan und auch von 1-L-MT jeweils eine signifikant ($p < 0.01$) erhöhte T-Zell Proliferation (*). Die Daten wurden angegeben als durchschnittlicher [³H]-Thymidin Einbau \pm Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

In einem weiteren Schritt sollte dann überprüft werden, ob das 1-L-MT tatsächlich in die Proteine der Zellen eingebaut wird. Dazu wurde radioaktiv markiertes L-Tryptophan ([³H]-Tryptophan) eingesetzt, welches in T-Zellen eingebaut werden konnte. Dieser Einbau konnte dann im Beta-Counter als cpm detektiert werden. Wurde nun den Zellen zum Wachstum nicht

nur dieses radioaktiv markierte Tryptophan, sondern auch nicht markiertes, kaltes L-Tryptophan oder 1-L-MT zugegeben, so wurden die beiden unmarkierten Substrate kompetitiv in die Zellen eingebaut. Abb. 3. 31. beschreibt diese kompetitive Inkorporation in OKT3-stimulierte T-Zellen. Hierzu wurden die Zellen nach der 72-stündigen Inkubation in Anwesenheit der unterschiedlichen Substrate gewaschen, lysiert und auf einen Filter geblottet, welcher dann im Beta-Counter ausgewertet wurde. Als Ergebnis zeigt sich, dass die höchsten cpm in Abwesenheit von unmarkiertem Substrat auftraten, da hier das radioaktiv markierte Tryptophan als einziges Substrat vorlag und die Konzentration von 0,75µg/mL ein volles T-Zellwachstum erlaubte (weiße Balken). War sowohl markiertes als auch kaltes Tryptophan in der Kultur anwesend, so konnte das nicht markierte, kalte Tryptophan den Einbau von markiertem Tryptophan kompetitiv und dosisabhängig hemmen. Darüber hinaus konnte auch 1-L-MT dosisabhängig eine Reduktion des Einbaus von markiertem Tryptophan bewirken. Auch diese Experimente zeigten quantitative Unterschiede zwischen 1-MT und Tryptophan. In der Abbildung wird deutlich dass unmarkiertes Tryptophan das markierte Tryptophan wesentlich effektiver verdrängen konnte als 1-L-MT.

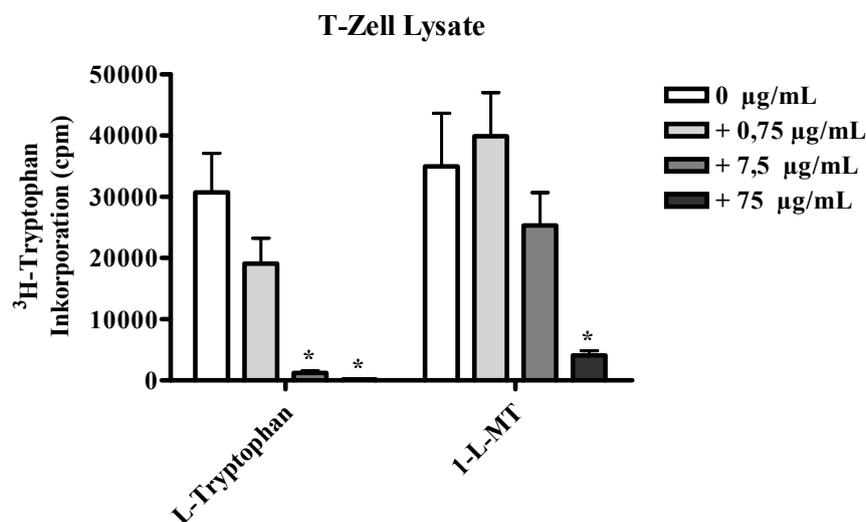


Abbildung 3.31 Kompetitive Inkorporation von L-Tryptophan und 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) in humane T-Zellen.

Konditionierte, Tryptophan-freie Überstände wurden durch eine 72-stündige IFN- γ Stimulation (500U/mL) von 1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro mittlere Kulturflasche gewonnen. Anschließend wurden $1,5 \times 10^5$ OKT3-stimulierte, frisch isolierte PBL pro Vertiefung in dem konditionierten Medium kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 0,75µg/mL radioaktiv markiertes [3 H]-Tryptophan, sowie 0; 0,75; 7,5 oder 75µg/mL zusätzliches L-Tryptophan oder 1-L-MT zugesetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurde die Inkorporation des [3 H]-Tryptophan in die T-Zellen mit Hilfe der Szintillations- Spektroskopie in *counts per minute* (cpm) gemessen. War nur radioaktiv markiertes [3 H]-Tryptophan als Substrat vorhanden, so war eine deutliche Inkorporation des [3 H]-Tryptophan in die T-Zellen nachweisbar. (weiße Balken). In den Gruppen mit zusätzlichem, nicht markiertem L-Tryptophan oder 1-L-MT fand jedoch ein kompetitiver Einbau dieser Substrate in die T-Zellen statt. Hier wurden folglich die [3 H]-Tryptophan Inkorporationsrate geringer. (*) kennzeichnet signifikant ($p < 0.01$) erniedrigte [3 H]-Tryptophan Einbauraten. Die Daten wurden angegeben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

Da das 1-L-MT in T-Zell Lysaten nachgewiesen werden konnte, kam die Frage auf, ob es auch in die Proteine der T-Zellen inkorporiert wurde. Um diese Frage zu beantworten wurden T-Zellen wie zuvor im Beisein von radioaktiv markiertem Tryptophan sowie unterschiedlichen Mengen kalten L-Tryptophans und 1-L-MTs kultiviert. Anschließend an die Lyse der T-Zellen wurde aber eine Fällung der Proteine mit Trichlor-Essigsäure durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden mehrmals gewaschen und danach wurde der Einbau von [^3H]-Tryptophan gemessen. Dann wurde wie zuvor der kompetitive Einbau von unmarkiertem L-Tryptophan und 1-L-MT anstelle des radioaktiv markierten Tryptophans ermittelt. Abb. 3. 32. stellt das Ergebnis der Messung dar. Auch in den Proteinen der T-Zellen hatte sowohl L-Tryptophan als auch 1-L-MT einen kompetitiven Effekt auf die Einbaurrate von radioaktiv markiertem [^3H]-Tryptophan. Wiederum war L-Tryptophan das 10mal bessere Substrat, da schon 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ für eine signifikant erniedrigte [^3H]-Tryptophan Einbaurrate ausreichten, während dafür 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 1-L-MT benötigt wurden.

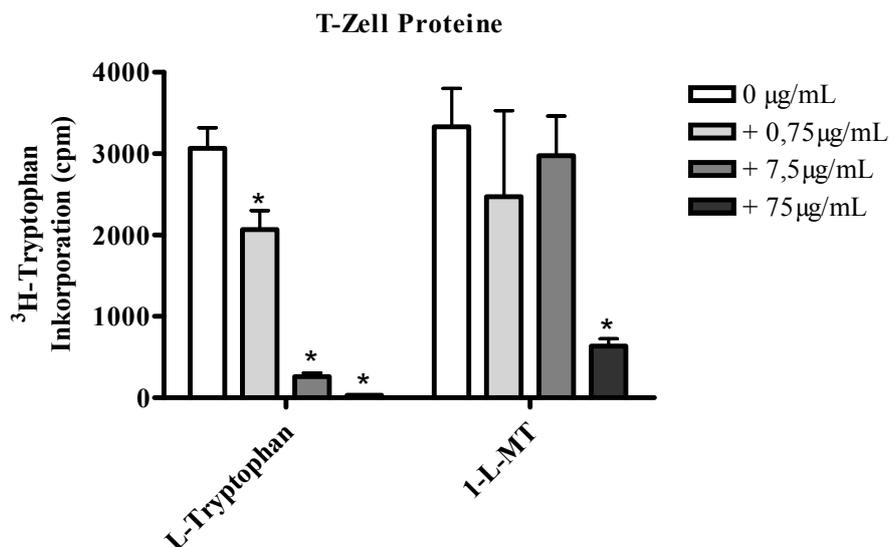


Abbildung 3.32 Kompetitive Inkorporation von L-Tryptophan und 1-L-Methyl-Tryptophan (1-L-MT) in humane T-Zell Proteine.

Konditionierte, Tryptophan-freie Überstände wurden durch eine 72-stündige IFN- γ Stimulation (500U/mL) von 1×10^6 HeLa-TDO Zellen pro mittlere Kulturflasche gewonnen. Anschließend wurden $1,5 \times 10^5$ OKT3-stimulierte, frisch isolierte T-Zellen pro Vertiefung in dem konditionierten Medium kultiviert. Dem Kulturmedium wurden 0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ radioaktiv markiertes [^3H]-Tryptophan, sowie 0; 0,75; 7,5 oder 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zusätzliches L-Tryptophan oder 1-L-MT zugesetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteine mit Trichlor-Essigsäure gefällt. Die Protein-Fraktion wurde daraufhin auf die Inkorporation des [^3H]-Tryptophan mit Hilfe der Szintillations-Spektroskopie in *counts per minute* (cpm) analysiert. Das [^3H]-Tryptophan wurde in die Proteine der T-Zellen inkorporiert (weiße Balken). Wurde den T-Zellen L-Tryptophan oder 1-L-MT als zusätzliches Substrat angeboten, so fand ein kompetitiver Einbau dieser Substrate in die T-Zell Proteine statt, denn hier wurden die cpm dosisabhängig reduziert. (*) kennzeichnet signifikant ($p < 0.01$) erniedrigte [^3H]-Tryptophan Einbauraten. Die Daten wurden angegeben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

In einem abschließenden Experiment wurden die beiden Beobachtungen über den Abbau und den Einbau des 1-L-MT gleichzeitig analysiert. Hierzu wurden HeLa-TDO Zellen eingesetzt und in Anwesenheit von 0-1600µg/mL L-Tryptophan oder 1-L-MT mit IFN-γ oder Tetrazyklin stimuliert. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* eingesetzt. 24 Stunden später wurde dann das Bakterienwachstum mittels der Bestimmung der optischen Dichte gemessen. Abbildung 3. 33. stellt das Ergebnis der Messung dar. Dabei ist in (A) das Bakterienwachstum in unstimulierten und IDO⁺ Zellüberständen und in (B) das Bakterienwachstum in unstimulierten und TDO⁺ Zellüberständen gezeigt. Ohne eine vorherige Stimulation der HeLa-TDO Zellen konnten Bakterien in Anwesenheit von L-Tryptophan oder 1-L-MT wachsen (schwarze Linien).

Nach einer Stimulation mit IFN-γ oder Tetrazyklin war das Wachstum der Bakterien inhibiert. Die zur Aufhebung dieses antibakteriellen Effektes benötigte Menge an L-Tryptophan war mit ca. 30 µg/mL deutlich höher als der in Abbildung 3. 26. ermittelte Tryptophanbedarf, der in der Abwesenheit der stimulierten Zellen bestimmt wurde. Dies ist ein guter Hinweis darauf, dass Tryptophan während der Kultur von den stimulierten Zellen abgebaut wurde.

Nach einer TDO-Induktion konnte ein ähnlicher Befund auch mit 1-L-MT erhalten werden. Hier war jetzt zur Erzielung des halbmaximalen Bakterienwachstums eine Supplementation von ca. 658 µg/mL nötig. Auch dieser Wert ist deutlich höher als der in Abbildung 3. 26. ermittelte 1-L-MT Bedarf in der Abwesenheit der stimulierten Zellen. Auch das ist ein guter Indikator für einen Abbau des 1-L-MT in den Kulturen mit TDO⁺ Zellen. Da in diesem von der TDO-Aktivität abhängigen System das 1-L-MT die TDO-Enzymaktivität nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung 3. 17.) ist der beobachtete antagonistische Effekt mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Verwertung von 1-L-MT als Substrat zu interpretieren.

Diese Interpretation der Wirksamkeit von 1-L-MT wird durch die Ergebnisse mit den IDO⁺ HeLa-TDO Zellen gestützt. Auch hier ist die, in Anwesenheit der stimulierten Zellen benötigte 1-L-MT Konzentration mit ca. 53 µg/mL deutlich höher als in dem vergleichbaren Kultursystem in der Abwesenheit der aktivierten Zellen, was auf einen Abbau des 1-L-MT in der Kultur hindeutet. Insgesamt ist die gemessene Steigerung der 1-L-MT Konzentration zur Erzielung eines halbmaximalen Bakterienwachstums jedoch deutlich niedriger als in den Kulturen mit den TDO⁺ HeLa-TDO Zellen. Dies ist gut dadurch zu begründen, dass in diesem IDO-abhängigen Kultursystem 1-L-MT im Gegensatz zum TDO-abhängigen Kultursystem einen doppelten Effekt vermittelt. Zwar wirkt 1-L-MT im IDO-abhängigen System ebenfalls

als Tryptophanersatz, zusätzlich beeinflusst das 1-L-MT in diesen System aber auch die Enzymaktivität der IDO.

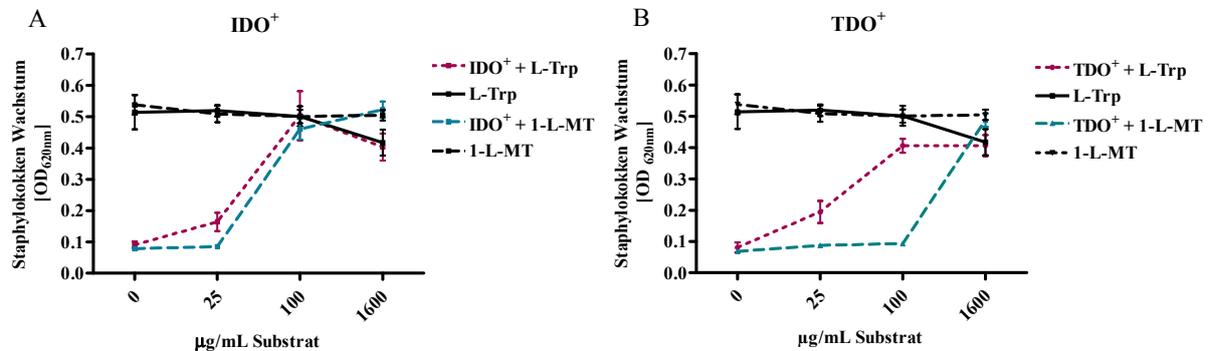


Abbildung 3.33 Beeinflussung des antibakteriellen Effektes durch 1-L-MT in TDO⁺ oder IDO⁺ Zellen.

3×10^4 HeLa-TDO Zellen wurden in der Anwesenheit von 0-1600 µg/mL L-Tryptophan oder 1-L-MT mit IFN- γ (500U/mL)(A) oder Tetrazyklin (30ng/mL)(B) in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu pro Vertiefung) eingesetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum photometrisch bestimmt. Die Bakterien konnten ungehemmt in Überständen von unstimulierten HeLa-TDO Zellen mit L-Tryptophan oder 1-L-MT Supplementation wachsen (schwarze Linien in A und B). Eine zuvor durchgeführte Stimulation der HeLa-TDO Zellen mit IFN- γ (IDO⁺ Zellen) oder Tetrazyklin (TDO⁺ Zellen) ohne zusätzliches Substrat induzierte einen antibakteriellen Effekt. Dieser konnte durch die Anwesenheit hoher 1-L-MT- bzw. Tryptophankonzentrationen in den Ausgangskulturen antagonisiert werden (purpurne und blaue Linien in A und B). Die Daten wurden angegeben als Durchschnittswerte \pm Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen.

Zusammenfassend belegen diese Daten dass die TDO, ebenso wie die IDO antimikrobielle Effekte vermitteln und immunregulatorisch wirken kann. Ferner zeigen die Daten deutlich dass die im Fokus des klinischen Interesses stehenden Inhibitoren der IDO-Aktivität, wie die verschiedenen 1-Methyl-Tryptophan Isoformen, die Enzymaktivität und die antimikrobiellen/immunregulatorischen Effekte über unterschiedliche Mechanismen beeinflussen.

4. Diskussion

Die Aminosäure Tryptophan hat eine zentrale Bedeutung im Stoffwechsel. Sie wird von allen Lebewesen zur Proteinbiosynthese benötigt, kann aber oftmals nicht selbst synthetisiert werden. Im Gegensatz zu einigen Bakterienspezies, die in der Lage sind, Tryptophan selbst herzustellen, sind der Mensch und andere Lebewesen Tryptophan-auxotroph und somit auf eine Zufuhr von Tryptophan durch die Nahrung angewiesen (Eagle, 1955). Das mit der Nahrung aufgenommene Tryptophan dient dabei einerseits als Baustein für die Proteinbiosynthese und als Grundstein für die Synthese von biologisch aktiven Neurotransmittern wie Serotonin. Andererseits werden circa 95% des Tryptophans im Kynurenin Stoffwechselweg zu Metaboliten abgebaut, die viele wichtige physiologische Funktionen erfüllen und renal eliminiert werden können. Der erste und limitierende Schritt des Kynurenin-Stoffwechsels kann von drei verschiedenen Enzymen katalysiert werden: Von der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), der Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und der Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO). Alle drei Enzyme können die gleiche enzymatische Reaktion, nämlich die Oxydation des Tryptophans zu *N*-Formylkynurenin, ausführen und somit die Verfügbarkeit des Substrates Tryptophan regulieren.

Eine präzise Regulation der lokalen Tryptophankonzentration im Gewebe wirkt sich dabei nicht nur auf den zellulären Stoffwechsel aus, sondern hat auch Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen, die den Körper infizieren.

Die letztere Annahme ergibt sich aus der Beobachtung, dass in *in vivo* Mausmodellen eine *T. gondii* Infektion zu einer erhöhten Expression von IDO mRNA in der Lunge der Mäuse führte und dadurch IDO-abhängig einen Abbau des vorhandenen Tryptophans in der Lunge, dem Gehirn und dem Plasma auslöste (Silva *et al.*, 2002). Dabei wurde insbesondere in der Lunge der Tryptophanspiegel so weit erniedrigt, dass er unterhalb der Nachweisgrenze gängiger HPLC Systeme lag (Silva *et al.*, 2002). In diesem Zusammenhang wurde ferner beschrieben, dass IFN- γ -defiziente Mäuse, in denen keine IDO Induktion erfolgen kann, extrem empfindlich gegenüber einer Toxoplasmeninfektion sind (Silva *et al.*, 2002). Auch *in vitro* wurde dieser durch Tryptophanmangel vermittelte antiparasitäre Effekt deutlich. IFN- γ -stimulierte humane Fibroblasten konnten das Wachstum von *T. gondii* hemmen und auch hier war der zugrunde liegende Mechanismus die Depletion von Tryptophan (Pfefferkorn, 1984). Dabei war die Stärke des IFN- γ -induzierten Effekts abhängig von der zur Verfügung stehenden Menge Tryptophan. Zusätzliche *in vitro* Daten ergaben, dass eine IFN- γ Stimulation in IDO-defizienten ME180 Wirtszellen nicht in der Lage ist, antiparasitäre

Effekte gegen Toxoplasmen zu vermitteln (Thomas *et al.*, 1993). Der Beweis dafür, dass die Tryptophanverarmung die Grundlage für den antiparasitären Effekt darstellte, erfolgte in unterschiedlichen Kultursystemen, die zeigen, dass der IFN- γ -vermittelte Effekt durch eine Zugabe von Tryptophan antagonisiert werden konnte (Heseler *et al.*, 2008). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Toxoplasmen, die das *trpb* Gen aus *Escherichia coli* besaßen und somit unabhängig von exogenem Tryptophan waren, in der Lage waren, in IDO⁺ Zellen zu replizieren (Sibley *et al.*, 1994).

Dass die IDO eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von Parasiten spielt, wurde nicht nur in Infektionsmodellen mit *T. gondii* gezeigt. Zusätzlich zu den Toxoplasmen konnte auch *Neospora caninum* als weiterer Erreger aus dem Stamm der Apikomplexa in humanen und bovinen Zellen durch einen IFN- γ -induzierten, IDO-vermittelten Tryptophanmangel gehemmt werden (Spekker *et al.*, 2009). Interessant ist in diesem Zusammenhang ebenfalls, dass der IDO sowohl in humanen- als auch in Rinderzellen eine große Rolle als antiparasitäres Effektormolekül zuzukommen scheint, was als Hinweis auf einen konservierten Mechanismus interpretiert werden kann.

Weiterhin gibt es auch einige Anzeichen dafür, dass eine IDO Expression ebenfalls als Antwort auf die Anwesenheit anderer Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, erfolgt. So ist in Mäusen, die keine Bakterien im Darm besitzen (gnotobiotische Mäuse) keine Expression der IDO im Darm feststellbar (Yoshida *et al.*, 1981). Zudem zeigen Mäuse, denen bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) injiziert wurde, eine erhöhte Expression der IDO im Darm und besonders in der Lunge (Liu *et al.*, 2009). Eine ganze Reihe von Publikationen berichtet zusätzlich von einer IDO-abhängigen Inhibition unterschiedlicher Bakterien wie zum Beispiel Chlamydien (Pantoja *et al.*, 2000), Gruppe B Streptokokken (MacKenzie *et al.*, 1998), Enterokokken (MacKenzie *et al.*, 1999) und *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001) *in vitro*. Zusätzlich wurde aber auch eine IDO-abhängige Hemmung von Viren wie Herpes simplex Virus Typ 1 (Adams *et al.*, 2004), Cytomegalievirus (Bodaghi *et al.*, 1999) und Masern Virus (Obojes *et al.*, 2005) beschrieben. Alle diese *in vitro* Daten wurden mit Hilfe vieler unterschiedlicher Zelllinien erhoben, hatten jedoch ein gemeinsames Merkmal: Die IDO-Aktivität wurde stets durch eine Stimulation mit IFN- γ induziert. Bei IFN- γ handelt es sich jedoch um ein sehr potentes Zytokin, das eine Vielzahl von zellulären Prozessen steuern kann und neben der IDO auch die Expression anderer antimikrobieller Effektormoleküle, wie beispielsweise die induzierbare NO-Synthase (iNOS), initiieren kann (Nathan, 1992). Zusammenfassend können alle diese Daten jedoch nicht beweisen, ob die antimikrobiellen Effekte ausschließlich durch den IDO-vermittelten Tryptophanmangel

entstehen, oder ob auch das IDO-Protein selbst eine bisher unbekannte Rolle bei der Vermittlung der Effekte spielt.

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit bestand somit darin, zu zeigen, dass der Tryptophanmangel tatsächlich als alleinige Ursache für die Inhibition von Bakterien, Viren und Parasiten anzusehen ist. Dazu wurde die IFN- γ -unabhängige Induktion der TDO als Modell analysiert.

Die IDO und die TDO sind beide in der Lage, die oxidative Spaltung von Tryptophan zu katalysieren. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht *N*-Formylkynurenin als Produkt, welches mit Hilfe des Enzyms Formidase *in vitro* und *in vivo* sofort zu Kynurenin hydrolysiert wird. Die Konzentration des gebildeten Kynurenins spiegelt dabei die enzymatische Aktivität des jeweiligen Tryptophan-abbauenden Enzyms wider und kann in einem Absorptionstest ermittelt werden. Somit konnten die Aktivitäten der beiden Enzyme in dem gleichen Testsystem verglichen werden und die Rolle des Tryptophan Abbaus im Hinblick auf antimikrobielle und immunregulatorische Effekte hin analysiert werden.

4.1. *In vitro* Charakterisierung der IDO und der TDO in HeLa-TDO Zellen

In dieser Arbeit wurden humane HeLa Zellen eingesetzt, die mit humaner TDO stabil und induzierbar transfiziert worden waren. Eine Expression der TDO erfolgte nach einer Stimulation mit Tetrazyklin. Der Beweis für die erfolgreiche TDO-Induktion erfolgte mit Hilfe einer Western Blot-Analyse, einer Immunfluoreszenzanalyse und anhand der Messung der TDO-Enzymaktivität. Diese Datensätze zeigten, dass TDO Protein und TDO-Aktivität nach der Tetrazyklin Stimulation vorhanden waren. So konnten die HeLa-TDO Zellen in Abhängigkeit von der gewählten Tetrazyklin-Konzentration das Produkt Kynurenin herstellen, wenn das Substrat Tryptophan zur Verfügung stand. Um zu beweisen, dass in den HeLa-TDO Zellen die TDO, nicht aber eine IDO-Aktivität für diese Kynureninbildung verantwortlich war, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Hierbei wurde die Tatsache ausgenutzt, dass HeLa Zellen wie beschrieben (Liu *et al.*, 2010) nach einer IFN- γ Stimulation IDO-, nicht aber IDO-2- oder TDO-Protein exprimieren. Diese IFN- γ -abhängige IDO Expression war auch in den in dieser Arbeit verwendeten transfizierten HeLa-TDO Zellen auszumachen. So konnte in einer ganzen Reihe von Experimenten der direkte Vergleich einer IFN- γ -stimulierten IDO- oder einer Tetrazyklin-stimulierten TDO-Enzymaktivität erfolgen. Im Gegensatz zu Literaturberichten mit Dendritischen Zellen (Munn

et al., 2004) war nach erfolgreicher Enzyminduktion stets auch eine enzymatische Aktivität messbar und das Substrat Tryptophan wurde äquimolar zum Produkt Kynurenin umgesetzt. Somit konnte analysiert werden, ob das jeweilige Ausmaß der Enzyminduktion ausreichte, um antimikrobielle und immunregulatorische Effekte zu vermitteln.

4.2. Antimikrobielle Effekte der TDO-Aktivität

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die TDO, ähnlich wie die IDO, dazu in der Lage ist, durch einen Abbau der Aminosäure Tryptophan das Wachstum von Parasiten, Viren und Bakterien zu inhibieren.

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass die Induktion einer TDO-Expression in HeLa-TDO Zellen das Wachstum von *Toxoplasma gondii* um 75% inhibiert. Die Ursache für das verminderte Parasitenwachstum war dabei der, durch die enzymatische Aktivität der TDO entstandene, Tryptophanmangel. Dies konnte bewiesen werden, indem dem Kultursystem zum Zeitpunkt der Infektion erneut Tryptophan zur Verfügung gestellt wurde. In diesem Fall konnte das zusätzliche Tryptophan den TDO-vermittelten Tryptophanmangel ausgleichen und es kam zu einer Aufhebung des antiparasitären Effektes.

Auch ein antiviraler Effekt der TDO konnte nachgewiesen werden. TDO-positive (TDO⁺), nicht aber unstimulierte Zellen waren dazu in der Lage, die Replikation von Herpes simplex Virus Typ I zu inhibieren. Dieser antivirale Effekt führte zu einer Reduktion der Viruslast um bis zu 5 Zehnerpotenzen. Eine Zugabe von Tryptophan zum Zeitpunkt der Infektion erlaubte auch in TDO⁺ Zellen eine vollständige Wiederherstellung der Virusreplikation, so dass auch in diesem Infektionsmodell ein Tryptophanmangel als Ursache für die Virushemmung angesehen werden kann.

In Analogie zu den publizierten Befunden mit IDO⁺ Zellen, konnte ein antibakterieller Effekt auch durch TDO⁺ Zellen vermittelt werden. Hierbei zeigte sich, dass das Wachstum von Tryptophan-auxotrophen *Staphylococcus aureus* Stämmen im Zellkulturüberstand von aktivierten HeLa-TDO Zellen signifikant inhibiert war. Der antibakterielle Effekt wurde dabei nicht durch das Antibiotikum Tetrazyklin ausgelöst, das als Induktor der TDO eingesetzt wurde, da die Hemmung des Bakterienwachstums durch eine Tryptophan Zugabe vollständig antagonisiert werden konnte.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass nicht nur die IDO, sondern auch die TDO in humanen Zellen antiparasitäre, antivirale und antibakterielle Effekte vermitteln kann. Beide Enzyme inhibieren das Wachstum der Pathogene über die Regulation der Konzentration der

Aminosäure Tryptophan. Ein zusätzlicher Einfluss von IFN- γ oder dem IDO-Protein selbst kann bei der Tetrazyklin-abhängigen TDO-Induktion in HeLa-TDO Zellen ausgeschlossen werden.

Ob die TDO *in vivo* bei der Bekämpfung von Pathogenen in der Leber wie Hepatitis Viren oder *Plasmodium falciparum* Sporozoiteneine Rolle spielt, ist zurzeit völlig unklar. Infektionsstudien mit primären humanen Hepatozyten (PHH) sind jedoch aus verschiedenen Gründen noch immer schwierig durchzuführen. Zwar können PHH erfolgreich mit Hepatitis B Viren (Gripon *et al.*, 1988), Hepatitis C Viren (Fournier *et al.*, 1998) und Plasmodien (Mazier *et al.*, 1985) infiziert werden, sie wandeln sich aber bereits nach kurzer Zeit wieder in undifferenzierte Hepatozyten um (Brezillon *et al.*, 2008). Dadurch werden sie gegenüber Infektionen mit HBV und HCV resistent. Außerdem gibt es Probleme bei der Beschaffung von ausreichend PHH, die zusätzlich nach der Isolation auch schnell apoptotisch werden. Einfacher zu kultivierende Zellen aus Lebertumoren und käuflichen Leberzelllinien fehlen viele Differenzierungsmarker und eine TDO-Expression und Aktivität konnte bislang in keiner dieser Zelllinien nachgewiesen werden (Niimi *et al.*, 1983; eigene Beobachtungen). Die in dieser Arbeit vorgestellten HeLa-TDO Zellen wurden unserem Kooperationspartner Dr. Guo (Institute for Cancer Research, Drexel University College of Medicine, Doylestown, USA) für ein Infektionsmodell mit Hepatitis B Virus (HBV) zur Verfügung gestellt. Daten über einen antiviralen Effekt der TDO gegenüber HBV liegen zurzeit noch nicht vor. Die erst vor kurzem beschriebene Expression der TDO in nicht-hepatischen Geweben könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die TDO neben der Tryptophan Homöostase zusätzliche Aufgaben hat. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die TDO auch in der Haut von Ratten (Ishiguro *et al.*, 1993) und in menschlichem Gehirn (Miller *et al.*, 2006) exprimiert wird. Die Induktion und Funktion der TDO in diesen Geweben ist bislang jedoch noch ungeklärt und sollte mit Hilfe von TDO-*knockout* Mäusen genauer analysiert werden (Kanai *et al.*, 2009).

Die hier gezeigten Daten geben einen ersten Hinweis darauf, dass die TDO *in vivo* möglicherweise einen Effektormechanismus gegenüber eingedrungenen Mikroorganismen darstellen könnte. Bislang wurde der TDO lediglich eine Funktion bei der Tryptophan Homöostase zugesprochen. Diese Annahme entstand dadurch, dass die TDO hauptsächlich in der Leber exprimiert wird und dort für die Regulation der Tryptophankonzentration im Blut zuständig zu sein scheint. Ein Indiz dafür ist, dass die TDO hormonell durch beispielsweise Insulin oder Glukagon reguliert wird, und auch die Tryptophankonzentration selbst einen Einfluss auf die Stabilität und somit Aktivität der TDO hat (Nakamura *et al.*, 1980). Es ist

eine Tatsache, dass die Leber wegen ihrem Bezug zum Darm und wegen dem Pfortaderblut einem besonderen Kontakt zu Mikroorganismen und deren Produkte ausgesetzt ist. Um eine Überstimulation zu vermeiden, ist die Reaktionsfähigkeit in der Leber zum Beispiel auf LPS herabgesetzt. In diesem Zusammenhang könnte die Leber in der Lage dazu sein, das Wachstum von Mikroorganismen durch einen konstitutiven Abwehrmechanismus einzudämmen. Die leberspezifische TDO-Aktivität könnte nach unseren *in vitro* Befunden dazu einen Beitrag leisten. Eine endgültige Bewertung der Bedeutung der TDO bei der Abwehr, insbesondere von bakteriellen Infekten, kann jedoch wohl nur mit *in vivo* Experimenten zum Beispiel mit TDO-*knockout* Mäusen erbracht werden, die mittlerweile verfügbar sind.

Im Gegensatz dazu ist die antimikrobielle Wirkung derIDO allgemein akzeptiert. Die Induktion derIDO ist abhängig von Signalen des Immunsystems und wird zum Beispiel durch T-Zell Oberflächenantigene (CTLA4) oder proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , TNF- α) reguliert. Eine Expression derIDO findet sich in nahezu allen entzündeten Geweben und ist dort zumeist eine Antwort des Körpers auf die Anwesenheit von Pathogenen. Dabei ist es im Lebergewebe gut vorstellbar, dass zusätzlich zu einer infektionsbedingtenIDO Induktion die lokale TDO-Expression synergistisch zur Inhibition eines Bakterienwachstums beiträgt. Sehr interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass eine chronische, systemische Expression derIDO, etwa verursacht durch das Calmette-Guérin Bazillus, zu einer Reduktion der TDO-Aktivität führt (Moreau *et al.*, 2005).

4.3. Regulation der antimikrobiellen TDO-Aktivität durch Sauerstoff

Sowohl dieIDO als auch die TDO katalysieren die oxidative Spaltung von Tryptophan. Um diese enzymatische Reaktion auszuführen, ist die Anwesenheit von Sauerstoff essenziell (Rafice *et al.*, 2009). Während die TDO molekularen Sauerstoff benötigt, kann dieIDO molekularen Sauerstoff oder Superoxid in den Indolring einbauen (Dang *et al.*, 2000), wobei Sauerstoff das bevorzugte Substrat ist (Werner *et al.*, 2007). Folglich könnte die Regulation der lokalen Sauerstoffkonzentration einen Einfluss auf die Aktivität der beiden Enzyme haben. Der Sauerstoffpartialdruck ist Organ-spezifisch unterschiedlich und entsteht durch die Verfügbarkeit an sauerstoffreichem Blut, dem Sauerstoffverbrauch der Körperzellen und dem Sauerstoffverbrauch von Mikroorganismen, die die Körperhöhlen besiedeln (Ernst *et al.*, 2008). Infektionen finden häufig unter hypoxischen Bedingungen in Körperhöhlen statt. Antimikrobielle Effektormechanismen, die unter hypoxischen Bedingungen aktiv sind,

wurden aber bisher kaum analysiert. So tritt eine erhöhte IDO-Expression oftmals in entzündetem Gewebe im Zusammenhang mit einer bakteriellen Infektion auf, ihre lokale antibakterielle Wirksamkeit ist jedoch noch ungeklärt (Roth *et al.*, 2010). So führen Infektionen mit dem obligat intrazellulären Pathogen *Chlamydia trachomatis* im Urogenitaltrakt zu einer IDO Induktion. Neuere Studien konnten in diesem Zusammenhang jedoch zeigen, dass die Sauerstoffkonzentration im Urogenitaltrakt niedrig ist ($O_2 < 5\%$) und im Laufe eines Entzündungsprozesses noch weiter sinkt. Durch diese Hypoxie wird die IDO-Aktivität gehemmt und der antibakterielle Effekt gegen *C. trachomatis* reicht nicht mehr aus, um die bakterielle Besiedelung vollständig zu eliminieren (Roth *et al.*, 2010). Die Folge könnte eine chronische Infektion im Urogenitaltrakt, besonders bei Frauen, sein.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde der negative Einfluss der Hypoxie auf die IDO analysiert. Es zeigte sich, dass unter hypoxischen Bedingungen kein Tryptophanabbau durch die IDO erfolgte und dass der antibakterielle Effekt gegen *Staphylococcus aureus* aufgehoben wurde.

Roth *et al.* machten eine reduzierte Phosphorylierung des Tyr701 von Stat-1 für den Verlust der IDO-Aktivität unter Hypoxie verantwortlich, die eine IFN- γ -abhängige IDO Induktion verhinderte (Roth *et al.*, 2010). Um den Mechanismus, der unter Hypoxie auftretenden IDO Inhibition genauer zu analysieren, wurde auch der Einfluss der Hypoxie auf die TDO-Aktivität analysiert. Dazu fand ein Vergleich der TDO-Aktivität unter Hypoxie (1% O_2) und Normoxie (21% O_2) statt. Es konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen keine TDO-vermittelte Produktion von Kynurenin erfolgte. Unter Normoxie dagegen konnte eine Kynureninproduktion gemessen werden. Ebenso wurde der antibakterielle Effekt der TDO gegen *S. aureus* unter Hypoxie aufgehoben, während unter Normoxie ein Wachstum der Bakterien verhindert wurde. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die von Roth *et al.*, beschriebenen Vorgänge ausschließlich auf einer Störung des IFN- γ -Signalsweges basieren denn dieser Signalweg ist an der TDO-Induktion in HeLa-TDO Zellen nicht beteiligt. Die beobachtete Hemmung der TDO-Aktivität könnte das Resultat zweier anderer Prozesse sein: Entweder hatte die Hypoxie einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der TDO, oder die HeLa-TDO Zellen selbst waren betroffen, so dass sie nicht mehr in der Lage waren, funktionsfähige Enzyme zu exprimieren. Um dies zu überprüfen wurden die Zellen zunächst 72 Stunden unter hypoxischen- und anschließend für 48 Stunden unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Während am Ende der hypoxischen Kulturphase keine TDO-Aktivität nachweisbar war, führte die anschließende Weiterführung der Kultur unter normoxischen Bedingungen zu einer deutlich nachweisbaren TDO-Enzymaktivität. Auch das Wachstum von

Bakterien konnte durch die TDO wieder gehemmt werden. Somit ist auszuschließen, dass die HeLa-TDO Zellen durch die Inkubation unter hypoxischen Bedingungen abgetötet worden waren. Es ist daher davon auszugehen, dass die hypoxische Bedingungen zu einer direkten Beeinträchtigung der TDO führten. Obwohl Roth *et al.* gezeigt haben, dass die Hypoxie eine Störung im IFN- γ -Signalweg verursacht, können in dieser Arbeit direkte Auswirkungen der Hypoxie auf die IDO Enzymaktivität nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte in zukünftigen Experimenten unter der Verwendung von Zellen, die IDO rekombinant, unabhängig von einer IFN- γ Stimulation exprimieren, analysiert werden.

4.4. Immunregulatorische Effekte der TDO-Aktivität

Seitdem 1998 erstmals gezeigt wurde, dass die IDO während der Schwangerschaft eine Schlüsselrolle bei der Toleranz gegenüber dem allogenen Fetus spielt (Munn *et al.*, 1998), wurde die immunregulatorische Fähigkeit der IDO auch in vielen anderen Systemen untersucht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine IDO-Aktivität T-Zell Antworten reguliert und somit einen Einfluss auf Autoimmunerkrankungen, das Wachstum von Tumoren und in der Transplantationsmedizin hat. Als zugrunde liegende Mechanismen der beobachteten T-Zell Regulation wurden IDO-vermittelter Tryptophanmangel (Mellor *et al.*, 1999), die Induktion einer Stressantwort durch leere tRNAs, die das Ribosom erreichen (Mellor *et al.*, 1999), toxische Effekte der Tryptophanabbauprodukte (Frumento *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002), die Kynurenin-abhängige Generierung inhibitorischer Dendritische Zellen (DC) (Belladonna *et al.*, 2006) und die Induktion von regulatorischen T-Zellen (Fallarino *et al.*, 2006) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals gezeigt, dass die humane TDO, exprimiert in HeLa Zellen, ebenfalls T-Zell Antworten hemmen kann, unabhängig davon, ob die T-Zell Proliferation durch die Zugabe von monoklonalem anti-OKT3 Antikörper oder durch die Anwesenheit allogener T-Zellen aktiviert wurde.

Ein überraschender Befund war, dass das T-Zell Wachstum in der Gegenwart von HeLa-TDO Zellen nur suboptimal war und durch die Zugabe von L-Tryptophan deutlich gesteigert werden konnte. Da aus früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe bekannt ist, dass HeLa Zellen nach IFN- γ Stimulation IDO exprimieren und T-Zellen in ihrem Wachstum hemmen können (Däubener *et al.*, 2009), bietet sich folgende Erklärungsmöglichkeit an: Die durch OKT3 oder allogene PBL stimulierten T-Zellen produzieren IFN- γ . Innerhalb der PBL Fraktion gibt es üblicherweise nur wenige Zellen, wie z. B. Makrophagen, die nach IFN- γ

Stimulation IDO exprimieren können. Werden die T-Zellen jedoch in der Gegenwart von HeLa Zellen aktiviert, so führt die IFN- γ Produktion zu einer deutlichen und immunologisch relevanten IDO-Aktivität in den HeLa Zellen. Ähnlich Ergebnisse wurden bereits für die Stimulation von T-Zellen in der Gegenwart von mesenchymalen Stammzellen (Meisel *et al.*, 2004) oder Fibroblasten (Haniffa *et al.*, 2007) publiziert. Um diesen Effekt der Ko-Kultur zu umgehen, wurde die Proliferation der T-Zellen in folgenden Experimenten in der Abwesenheit von TDO⁺ HeLa-TDO Zellen ermittelt. Hierfür erfolgte die Inkubation der T-Zellen in konditioniertem Kulturmedium, das von Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen gewonnen wurde. Auch in diesem Experimentalsystem konnte eine TDO-vermittelte Hemmung der T-Zell Proliferation deutlich gemacht werden. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass in dem konditionierten Kulturmedium nicht nur das Wachstum der T-Zellen, sondern auch deren IFN- γ Produktion blockiert wurde.

Der TDO-vermittelte immunregulatorische Effekt konnte durch eine Tryptophan Supplementation wieder aufgehoben werden, was ein Hinweis darauf ist, dass auch hier ein Mangel an Tryptophan für die beobachteten Effekte verantwortlich war.

Aus der Literatur ist auch bekannt, dass neben dem Tryptophanmangel auch Abbauprodukte entlang des Kynurenin-Stoffwechselweges das Wachstum von T-Zellen inhibieren können. Dabei scheinen insbesondere Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure eine Rolle zu spielen (Frumento *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002). Aus Befunden unserer Arbeitsgruppe geht hervor, dass IDO⁺ Astrozytomzellen nur dann immunsuppressiv wirksame Konzentrationen der toxischen Metabolite produzieren, wenn in dem Stimulationsansatz große Mengen an Tryptophan vorliegen (Müller *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Befund mit IFN- γ -stimulierten HeLa-TDO Zellen reproduziert.

Zusätzliche Experimente konnten zeigen, dass auch die TDO dazu in der Lage war aus L-Tryptophan toxische Mengen an Kynurenin zu erzeugen. Die Anwesenheit dieses toxischen Metabolites führte dazu, dass die T-Zellen nicht mehr in der Lage waren zu proliferieren. Als Beweis für die toxische Wirkung der Metabolite wurde eine L-Tryptophan Supplementation durchgeführt. Im Gegensatz zu der durch einen Tryptophanmangel verursachten T-Zell Hemmung war die Inhibition durch die toxischen Metabolite durch eine zusätzliche Tryptophan Zugabe nicht mehr aufhebbar. Da die TDO-vermittelte T-Zell Hemmung unabhängig von einer IFN- γ Stimulation erfolgte, kann in diesem Fall ausgeschlossen werden, dass andere, durch IFN- γ -induzierte Enzyme des Kynurenin-Stoffwechselweges essenziell für die quantitativ ausreichende Bildung der toxischen Metabolite sind.

Ob die TDO *in vivo* immunregulatorische Effekte vermitteln kann, ist noch ungeklärt. Dies ist aber vorstellbar, denn Tatsumi und Suzuki fanden in den Jahren 2000 und 2001 eine unerwartete TDO-Expression in frühen Feten und in der Plazenta von Mäusen (Tatsumi *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). Ähnlich wie die IDO könnte somit auch die TDO eine immunregulatorische Rolle während der Embryonalentwicklung *in utero* übernehmen. Ein *in vivo* Beweis für diese Theorie muss allerdings noch erbracht werden. Ferner fehlen Angaben über das lokale Ausmaß der TDO-vermittelten Tryptophandegradation. Die Tatsache, dass die vor kurzem generierten TDO-*knockout* Mäuse (Kanai *et al.*, 2009) keine Auffälligkeiten während der Schwangerschaft zeigen, ist kein Beweis dafür, dass die TDO nicht an der maternalen Toleranz beteiligt ist. Denn auch IDO-*knockout* Mäuse können allogene Feten ohne eine Beeinträchtigung austragen, obwohl die IDO eine wesentliche Funktion in der maternalen Toleranz besitzt (Mellor *et al.*, 2003). Daher ist denkbar, dass die beiden Enzyme die Toleranz auf synergistische Art und Weise vermitteln. Es wäre darum sehr interessant zu erfahren, ob ein IDO/TDO Doppel-*knockout* eine allogene Schwangerschaft verhindert.

Die TDO wird in Mammalia hauptsächlich in der Leber exprimiert. Dieses Organ zeigt eine ganze Reihe von tolerogenen Eigenschaften, deren Ursachen bisher noch nicht vollständig geklärt sind. Zum Beispiel konnte in verschiedenen Tiermodellen beobachtet werden, dass Leber sogar über *major histocompatibility* (MHC) Grenzen hinweg erfolgreich transplantiert werden kann. Andererseits haben aber auch Lebertransplantate selbst auffällige tolerogene Eigenschaften (Benseler *et al.*, 2007). Dies ergibt sich aus Modellen in denen mehrere Organe gleichzeitig transplantiert wurden. Auffällig war hier, dass allogene Organe, die syngen zur transplantierten Leber waren, ebenfalls besser toleriert wurden (Qian *et al.*, 1994). In Zusammenhang mit Transplantationen beim Menschen wird dieser Effekt noch immer kontrovers diskutiert (Rasmussen *et al.*, 1995; Kotru *et al.*, 2006). Die grundlegenden Mechanismen für die beobachteten Effekte sind dabei noch nicht vollständig erfasst und viele Faktoren können eine Rolle spielen. So ist zum Beispiel beschrieben, dass lösliche MHC Klasse I Moleküle im Lebergewebe eine Toleranz induzieren. Alternativ wurde vorgeschlagen, dass Sinusendothelzellen zu einer inkompletten T-Zell Aktivierung führen und eine T-Zell Apoptose oder Anergie auslösen (Munn *et al.*, 2005).

Interessanterweise ist die Leber aber auch selbst dazu in der Lage, naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren und eine CD8-abhängige Toleranz zu verursachen (Limmer *et al.*, 2000). Diese Aufgabe wird normalerweise ausschließlich von DC in sekundären Lymphgeweben

ausgeführt (Benseler *et al.*, 2007). Aufgrund der Leberarchitektur können naive T-Zellen allerdings im Lebergewebe in Kontakt zu Kupfferschen Sternzellen, hepatischen DC und Hepatozyten kommen und von diesen Zellen aktiviert werden (Bertolino *et al.*, 2002). Außerdem können aktivierte T-Zellen, die bei einer Transplantation auftreten, innerhalb des Lebergewebes zerstört werden (Crispe *et al.*, 2000). Diese Zerstörung der T-Zellen kann zum Beispiel durch Hepatozyten erfolgen (Mehal *et al.*, 2001), der zugrunde liegende Mechanismus ist aber bis heute unbekannt, obwohl eine Beteiligung von vielen Molekülen, wie zum Beispiel Galectin-1, TNFR, PD-L1 und FasL diskutiert wird (Benseler *et al.*, 2007).

Daneben kann auch eine Reduktion der lokalen Tryptophankonzentration eine Ursache für die Induktion von lokaler Immunsuppression und systemischer Toleranz sein. Dies konnte von Beutelspacher *et al.* im Jahr 2006 mit Hilfe eines Cornea-Transplantationsmodells bewiesen werden. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine konstitutive Expression rekombinanterIDO in Cornea Zellen *in vivo* zu einem Tryptophanmangel führt und dadurch eine Toleranz gegenüber allogenen Cornea Transplantaten vermittelt. Diese Effekte entstehen einerseits durch die lokale Inhibition von T-Zellen, andererseits aber auch durch die Induktion systemischer Toleranz. Dass eineIDO-Aktivität bei der Lebertransplantation auch eine Rolle spielt, konnte dadurch gezeigt werden, dass es bei Mäusen, die mit demIDO-spezifischen Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan (1-MT) behandelt wurden, zu einer akuten Abstoßung des normalerweise tolerierten Transplantates kommt (Miki *et al.*, 2001). DieIDO-vermittelte Toleranz geht in diesem Fall wahrscheinlich von tolerogenen DC im transplantierten Lebergewebe aus (Miki *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten belegen, dass auch dieTDO einen Beitrag zum tolerogenen Effekt der Leber leisten könnte. DieTDO wird in den Hepatozyten exprimiert und kann in dem hier vorgestellten *in vitro* Modell zu einer Hemmung der T-Zell Proliferation und Aktivierung führen. Zudem hat eineTDO-Aktivität in der Leber Auswirkungen auf die systemische Tryptophan- bzw. Kynureninmenge (Nabi *et al.*, 2003). Einerseits könnte eine Aktivität derTDO, gegebenenfalls in Kombination mitIDO, die Verfügbarkeit von Tryptophan einschränken, so dass eine T-Zell Antwort im Leberparenchym ausbleibt. Andererseits könnten aber auch die Abbauprodukte des Tryptophans, wie zum Beispiel das Kynurenin, immunstimulatorische DC in tolerogene DC umwandeln (Belladonna *et al.*, 2006). Derartige in der Leber angesiedelte, immunkompetente DC wurden bereits mehrfach beschrieben (Sumpter *et al.*, 2007). Diese DC könnten dann nach einer Migration T-Zell Antworten in den regionalen Lymphknoten hemmen oder eine Entwicklung regulatorischer T-

Zellen begünstigen. Dieser Mechanismus wäre sowohl für die Regulation der Effektorphase der T-Zellen, als auch für die lokale Stimulation von Effektor-Memory T-Zellen von Bedeutung.

Ein weiterer Hinweis auf eine Rolle der TDO bei der Toleranz allogener Lebertransplantate ist die Effektivität der klassischen immunsuppressiven Therapie, die nach einer Lebertransplantation erfolgt. Um eine Abstoßung eines Transplantats zu verhindern, werden die Patienten im Allgemeinen mit Cortison behandelt (Benseler *et al.*, 2007). Da Cortison jedoch ein wesentlicher Induktor der TDO-Expression ist, könnte der protektive Effekt der Cortisontherapie, zumindest zum Teil, durch die Induktion einer immunsuppressiven TDO-Aktivität begründet sein. Um endgültig zu klären, ob die TDO auch *in vivo* einen immunregulatorischen Effekt vermitteln kann, wäre ein Tiermodell sinnvoll. Unserer Arbeitsgruppe stehen wildtypische Mäuse, *IDO-knockout* und *TDO-knockout* Mäuse zur Verfügung, deren Gewebe bei Transplantationsexperimenten die *in vivo* Bedeutung der IDO und TDO bei Abstoßungsreaktionen aufzeigen können. Da Lebertransplantationen bei Mäusen nur in wenigen Zentren ausgeführt werden, wollen wir uns in einem ersten Schritt auf ein Tumormodell konzentrieren. Dabei ist von Uyttenhove *et al.*, beschrieben, dass IDO-transfizierte Mastozytomzellen nicht von tumorspezifischen T-Zellen eliminiert werden können (Uyttenhove *et al.*, 2003). Es wäre interessant dieses Experiment mit TDO-transfizierten Mastozytomzellen (solide oder als einzelne Zellen) durchzuführen. Ein anderer Ansatz wäre die Verpflanzung von Tumorzellen in Mäuse, in denen man in den Tumorzellen *in vivo* die Expression der IDO und TDO durch zum Beispiel die Gabe von Tetrazyklin induzieren kann. Somit wäre eine Analyse der lokalen Tumorgröße ein Maß für die Effektivität der IDO und TDO bei der Inhibition einer tumorspezifischen T-Zell Antwort.

4.5. IDO und TDO: Unterschiede in der Substrat- und Stereospezifität

Ein Charakterisierungsmerkmal der IDO und der TDO ist deren Substratspezifität. Während die IDO in der Lage ist neben Tryptophan auch andere Indolamine wie Serotonin und Tryptamin zu spalten, akzeptiert die TDO nur Tryptophan als Substrat (Shimizu *et al.*, 1978). Neben den Unterschieden in der Substratspezifität gibt es aber auch große Unterschiede in der Stereospezifität. Es wurde festgestellt, dass die IDO in der Lage war, beide Enantiomere zu metabolisieren, während die TDO eine eindeutige Spezifität für L-Tryptophan aufwies (Batabyal *et al.*, 2007). Als Ursache für die hohe Stereospezifität der TDO wird die Art der Substratbindung an das Enzym diskutiert. In der TDO kommt es zu elektrostatischen Interaktionen und zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem L-Tryptophan und

dem Aktiven Zentrum des Enzyms, die mit einem anderen Substrat nicht möglich sind und in dieser Art nicht in der IDO auftreten (Forouhar *et al.*, 2007).

Diese unterschiedliche Stereospezifität wurde auch in dieser Arbeit zur Charakterisierung der IDO- und TDO-Expression ausgenutzt. Es konnte gezeigt werden dass TDO⁺, im Gegensatz zu IDO⁺ HeLa-TDO Zellen nur L-Tryptophan abbauen konnten. Zwar ist bekannt, dass die IDO stereounspezifisch arbeitet und sowohl L- als auch D-Tryptophan binden kann, das Enzym jedoch eine höhere Affinität gegenüber der L-Isoform besitzt (Yamamoto *et al.*, 1980) und diese auch viel effizienter abbauen kann (Yuasa *et al.*, 2007). Wie bereits geschildert, waren IDO⁺ HeLa-TDO Zellen in der Lage, aus L-Tryptophan Metabolite zu produzieren, die toxisch auf T-Zellen wirken. Um zu überprüfen, ob die IDO auch aus D-Tryptophan immunologisch wirksame Konzentrationen an toxischen Metaboliten herstellen kann, wurden die beiden Tryptophan Isomere einzeln in der Zellkultur eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die IDO im Gegensatz zur TDO, auch aus D-Tryptophan große Mengen toxischer Metabolite produziert.

Im Jahre 1991 veröffentlichten Cady und Sono einen Artikel über eine Reihe von IDO-spezifischen Inhibitoren, die eine detaillierte Charakterisierung der IDO Funktion ermöglichen sollten (Cady *et al.*, 1991). Alle Inhibitoren trugen am Indolring des Tryptophans Substitutionen (Sauerstoff, Schwefel, Methylgruppe) und waren in der Lage an IDO-Protein zu binden, welches aus dem Darm von Kaninchen isoliert wurde. Dabei konnten die Inhibitoren mit den Substraten L-Tryptophan und D-Tryptophan um die Bindestelle des Enzyms konkurrieren. Das 1-Methyl-DL-Tryptophan stellte sich als der effizienteste Inhibitor mit einem K_i von 6,6 μM heraus und wurde bald darauf weltweit als IDO Inhibitor genutzt. Das 1-MT entfaltet seine IDO-inhibierende Wirkung in vielen unterschiedlichen Testsystemen, *in vitro*, *in vivo*, mit menschlichen oder murinen Zellen.

Problematisch wurde es, als die beiden Enantiomere des 1-MT, das 1-L-MT und das 1-D-MT, einzeln auf ihre IDO-inhibierende Fähigkeit untersucht wurden. Hier kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen darüber, welche der beiden Isoformen den besseren Inhibitor der IDO darstellt. Die bereits beschriebene bevorzugte Bindung der L-Isoform an die IDO wurde auch bei Bindungsanalysen mit 1-MT bestätigt. Hier konnte das 1-L-MT zehnmal besser als das 1-D-MT gebunden werden, was den Schluss zuließ, dass das 1-L-MT der effektivere Inhibitor der IDO ist (Peterson *et al.*, 1994). So war es auch nicht verwunderlich, dass das 1-L-MT, nicht aber das 1-D-MT, in der Lage war, die enzymatische Aktivität von rekombinant exprimiertem, gereinigtem IDO-Protein, die IDO-Aktivität in IDO-transfizierten

Zelllinien und die physiologisch durch IFN- γ -induzierte IDO in Tumorzellen und zu hemmen (Hou *et al.*, 2007). Weiterhin war das 1-L-MT dazu fähig, den IDO-vermittelten Arrest der T-Zell Proliferation in unterschiedlichen humanen *in vitro* Systemen in der Gegenwart verschiedener Zelllinien oder Tumorzellen aufzuheben (Qian *et al.*, 2009). Bald kam es aber auch zu einer Reihe von Veröffentlichungen, die belegen konnten, dass das 1-D-MT als der effektivere Inhibitor der IDO *in vivo* anzusehen ist. Aber auch in *in vitro* Experimenten mit IDO⁺ humanen DC konnte gezeigt werden, dass das 1-D-MT die Suppression von T-Zellen aufheben konnte (Hou *et al.*, 2007). Dieser Effekt wurde nicht nur in Anwesenheit humaner DC beobachtet, sondern auch bei Experimenten mit murinen DC, die aus Tumor-ableitenden Lymphknoten isoliert worden waren (Hou *et al.*, 2007) und stimmte mit *in vivo* beobachteten Antitumor-Antworten überein.

Zusammenfassend scheint das 1-L-MT also der effizientere IDO Inhibitor der IDO Enzymaktivität in biochemisch-basierten *in vitro* Untersuchungen zu sein, während das 1-D-MT besser die IDO-vermittelten Effekte im Bereich der T-Zell Suppression *in vivo* aufheben kann.

Diese widersprüchlichen Ergebnisse wurden oftmals diskutiert und es wurde versucht, beide Aussagen in einen logischen Zusammenhang zu bringen. Als dann eine Publikation erschien, die beschrieb, dass das IDO-2 Enzym, das mit der IDO verwandt ist, ebenfalls in unterschiedlichen humanen Tumoren exprimiert wird (Löb *et al.*, 2009) und dessen Aktivität besser durch 1-D-MT als durch 1-L-MT inhibiert wird (Metz *et al.*, 2009), schien das Rätsel gelöst zu sein. Aber Studien mit IDO-*knockout* Mäusen, die nicht defizient für IDO-2 waren, belegten, dass der antitumor Effekt des 1-D-MT im Zusammenhang mit der Aktivität der IDO stehen muss (Hou *et al.*, 2007). Die gleiche Beobachtung wurde auch in humanen Modellsystemen gemacht. IDO und IDO-2 exprimierende DC, deren IDO-Aktivität mittels IDO-spezifischer siRNA geblockt wurde, konnten kein Tryptophan mehr abbauen (Löb *et al.*, 2009A), was ein Hinweis darauf war, dass die IDO-2 in humanen Zellen funktionell inaktiv ist. Auch die Tatsache, dass in humanen Tumorzellen der IDO-vermittelte Tryptophanabbau nicht durch 1-D-MT inhibiert werden konnte (Löb *et al.*, 2009B), lässt darauf schließen, dass das 1-D-MT *in vivo* zusätzliche, eventuell auch IDO-unabhängige Effekte vermittelt, die auch nicht durch eine Inhibition der IDO-2 zu erklären sind. Zudem zeigt eine vor kurzem veröffentlichte Arbeit, dass, im Gegensatz zu den Daten von Ball *et al.* die Aktivität der IDO-2 in allen dort untersuchten Vertebraten (Maus, Opossum, Schnabeltier, Huhn, Fisch) viel besser durch 1-L-MT als durch 1-D-MT gehemmt wird (Yuasa *et al.*, 2010). Die Daten der Arbeitsgruppe um Yuasa sind nicht nur in zellfreien Assaysystemen erhalten worden, sondern

wurden zusätzlich durch Aktivitätsstudien mit den IDO-2⁺ Säugerzellen bestätigt und sind daher gut auch auf *in vitro* Systeme zu beziehen.

Die Fragestellung, warum die verschiedenen Isoformen des 1-MT derart unterschiedliche Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie oder den Modellsystemen liefern, bleibt weiterhin ungeklärt. Vielleicht kann die zukünftige Analyse IDO-2-defizienter Tiere oder von IDO/IDO-2 Doppel-*knockout* Tieren zur Beantwortung der Frage beitragen.

4.6. Effekt von 1-MT auf TDO- und IDO-Aktivität in HeLa-TDO Zellen

Auch in dieser Arbeit wurden einige überraschende Eigenschaften von 1-L-MT und 1-D-MT beobachtet, die dazu beitragen sollen die in der Literatur beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären.

Die Daten mit IFN- γ -induzierten stimulierten HeLa-TDO Zellen belegen eindeutig, dass 1-L-MT, nicht aber 1-D-MT, einen inhibitorischen Einfluss auf die IDO Enzymaktivität besitzt. Ferner konnte gezeigt werden, dass 1-L-MT auch in der Lage war, eine IDO-vermittelte T-Zell Inhibition *in vitro* aufzuheben. Auffallend ist dabei aber, dass selbst die Zugabe großer Mengen an 1-L-MT zu IDO⁺ Zellen keine vollständige IDO Hemmung bewirken konnte. Es war in allen Ansätzen, auch in der Anwesenheit von 1-L-MT immer Kynurenin nachweisbar. Im Gegenzug dazu hatte weder 1-L-MT noch 1-D-MT einen nennenswerten Effekt auf die TDO-Enzymaktivität in den HeLa-TDO Zellen. Diese Beobachtung deckt sich mit einer Vielzahl an Publikationen, in denen ebenfalls kein Einfluss von 1-L-MT oder 1-D-MT auf die TDO-Enzymaktivität beschrieben wurde (Cady *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2001; Forouhar *et al.*, 2007).

Überraschend waren jedoch die Befunde die mit stimulierten HeLa-TDO Zellen mit Tryptophan-freiem Medium nach Zugabe von 1-MT erhalten wurden. In Abwesenheit des Substrats L-Tryptophan war erwartet worden, dass die Zugabe von 1-MT zu TDO⁺ Zellen keinen Effekt zeigt. Es wurde jedoch beobachtet, dass die Supplementation von 1-L-MT zur Produktion eines Abbauproduktes führte, welches photometrisch im Kynurenin-Assay ermittelt werden konnte. Dass es sich dabei tatsächlich um einen Abbau von 1-L-MT durch die TDO handelt, wird aus verschiedenen Befunden deutlich. Erstens war keine Zunahme des Abbauproduktes in unstimulierten, TDO-negativen Zellen zu beobachten. Zweitens war die Menge des gebildeten Abbauproduktes abhängig von der Menge des eingesetzten 1-L-MT und drittens konnte die TDO das 1-L-MT, nicht aber das 1-D-MT abbauen und offenbarte dadurch abermals ihre Stereospezifität.

Interessanterweise war auch die IDO dazu in der Lage, in der Abwesenheit des eigentlichen Substrates Tryptophan 1-MT zu metabolisieren. Die IDO konnte aber, im Gegensatz zur TDO, beide 1-MT Enantiomere spalten und besonders im Falle des 1-D-MT war die Produktion des Abbauproduktes dabei abhängig von der eingesetzten 1-D-MT Menge.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurden der Abbau von mehreren verschiedenen 1-MT Chargen getestet. Obwohl es chargenspezifische Unterschiede gab, zeigt sich, dass sowohl die IDO, also auch die TDO 1-MT aus allen erhältlichen Chargen metabolisieren konnten.

Laut Herstellerangaben ergibt eine Elementaranalyse eine 95%ige Reinheit des kommerziell erhältlichen 1-MT. Aus diesem Grunde musste ermittelt werden, ob das 1-MT eventuell mit Tryptophan verunreinigt ist. Zu diesem Zweck wurde eine Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie (Maldi MS) Analyse durchgeführt, die ergab, dass das 1-L-MT nicht mit Tryptophan verunreinigt war. In der Anwesenheit von 1-MT lag die Nachweisgrenze von L-Tryptophan im pM Bereich. Damit kann das gefundene Abbauprodukt nicht auf eine Degradation von kontaminierendem L-Tryptophan zurückgeführt werden. Wurde eine geringe Menge (6 µg/mL) 1-L-MT zu TDO⁺ Zellen gegeben, so befand sich nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden kein 1-L-MT mehr im Zellkulturüberstand. Stattdessen war nun Kynurenin in den Maldi MS Analysen der Proben zu finden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass das 1-L-MT durch bisher unbekannte Prozesse in der Zellkultur demethyliert worden ist und das entstandene Tryptophan durch die TDO zu Kynurenin umgesetzt wurde. Ein Hinweis darauf, dass das 1-L-MT selbst, und nicht das nach einem möglichen Demethylierungsprozess freigesetzte Tryptophan von der TDO und der IDO abgebaut wurde, ergibt sich jedoch aus der Arbeit von zwei anderen Arbeitsgruppen. Zum einen konnten Opitz *et al.* zeigen, dass IDO exprimierende Zellen 1-L-MT abbauen konnten. Dabei fand die Arbeitsgruppe, dass dabei Methyl-Kynurenin entstand (Opitz *et al.*, ISTRY Meeting, Florenz, 2009). Der Nachweis des Methyl-Kynurenins konnte dabei, wie auch hier beschrieben, nicht durch eine HPLC Analyse erfolgen. Lediglich durch eine MS Analyse, bei der Tryptophan, Kynurenin und 1-L-MT mit *tandem mass tags* (TMT) versehen wurden, konnte TMT-markiertes Methyl-Kynurenin nachgewiesen werden. Eine solche Analyse wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, und die von der Arbeitsgruppe Opitz verwendeten *tandem mass tags* (TMT) sind noch nicht kommerziell verfügbar. Der zweite Anhaltspunkt für den IDO- und TDO-vermittelten 1-L-MT und 1-D-MT Abbau ergibt sich aus einer Arbeit von Chauhan *et al.* Dort wurde ein enzymatischer Abbau von 1-L-MT durch humane IDO und bakterielle TDO beschrieben (Chauhan *et al.*, 2009). Die enzymatischen Reaktionen wurden, ähnlich wie in dieser Arbeit, photometrisch

ermittelt. Ein Teil der Abbauprodukte wurden zusätzlich über Flüssigchromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. Chauhan *et al.* konnten nachweisen, dass beim IDO-vermittelten Abbau von 1-L-MT Methyl-Kynurenin als Produkt entsteht. Vergleichbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit fanden sie heraus, dass das 1-L-MT ein wesentlich schlechteres Substrat als Tryptophan für die IDO und die TDO darstellt. Der K_M -Wert der nativen humanen IDO für 1-L-MT war zum Beispiel $150\mu\text{M}$ (K_m -Wert für L-Trp liegt bei ca. $7\mu\text{M}$; Basran *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten konnten Chauhan *et al.* jedoch keine TDO-vermittelte 1-L-MT Oxidation ermitteln, wenn die humane oder bakterielle TDO in ihrer jeweiligen nativen Form vorlagen. Nur TDO Varianten, in denen das Histidin im Aktiven Zentrum des Enzyms durch Serin ersetzt war, konnten, vergleichbar mit der IDO, 1-L-MT abbauen. Aus dieser Tatsache wurde geschlossen, dass das in allen TDO Molekülen konservierte Histidin im Aktiven Zentrum zu sterischen Behinderungen führt, die unter normalen Umständen eine 1-MT Anlagerung verhindern.

Chauhan *et al.* haben zusätzlich Hinweise dafür geliefert, dass speziesspezifische Unterschiede beim TDO-vermittelten 1-MT Abbau auftreten. Sie fanden, dass die bakterielle, nicht aber die humane TDO in zellfreien Assays 1-L-MT abbauen kann. In der hier vorliegenden Arbeit wurde aber herausgefunden, dass auch die humane TDO zu einem Abbau des 1-L-MTs fähig ist. Daher stellte sich für uns die Frage, ob auch die TDO anderer Spezies dazu in der Lage ist, 1-L-MT zu metabolisieren.

Wie bereits erwähnt, wird die TDO besonders stark in der Leber von Mäusen exprimiert. Um trotzdem etwaige Effekte einer ungewollten IDO Expression zu umgehen, wurde zuerst über PCR Untersuchungen nachgewiesen, dass in der Leber der Mäuse nur TDO mRNA, nicht aber IDO mRNA vorzufinden war. In dieser Arbeit wurde in Kulturüberständen von Mäuseleberzellen Kynurenin photometrisch nachgewiesen. Die Kynureninproduktion erfolgte zudem abhängig von der Inkubationszeit der Leberzellen im Medium und von der Anwesenheit des Substrates L-Tryptophan. In den Zellkulturüberständen anderer Organe wie zum Beispiel Milz, Niere, Herz, Gehirn oder Lunge war kein Kynurenin detektierbar. Dass das Kynurenin tatsächlich das Ergebnis einer *ex vivo* TDO-Aktivität war, konnte dadurch bewiesen werden, dass die Kynureninproduktion in Überständen von wildtypischen und IDO-*knockout* Leberzellen, nicht aber in Überständen von TDO-*knockout* Leberzellen nachzuweisen war. Wie erwartet konnte die TDO in den Leberzellen nur L-Tryptophan verwerten, D-Tryptophan wurde von den Leberzellen nicht zu Kynurenin umgesetzt.

Zudem ergab eine Analyse nach 1-L-MT und 1-D-MT Zugabe zu wildtypischen Leberzellen, dass das 1-L-MT von der murinen TDO umgesetzt werden konnte. Auch der Abbau von 1-L-

MT erfolgte nur durch wildtypische und *IDO-knockout* Leberzellen, nicht aber durch Leberzellen von *TDO-knockout* Tieren. Ein Vergleich zwischen dem TDO-vermittelten L-Tryptophan und 1-L-MT Abbau offenbarte jedoch, dass das L-Tryptophan ca. dreimal besser verwertet werden kann. So konnte auch in diesem *ex vivo* System mit murinen Zellen die Stereospezifität der TDO deutlich gemacht werden. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die *in vitro* bestimmte Aktivität der humanen TDO mit der *ex vivo* gemessenen Aktivität der murinen TDO übereinstimmt.

Die vorgestellten Daten belegen, dass 1-L-MT von der IDO und der TDO abgebaut werden kann. Diese Information wird nun im Zusammenhang mit den widersprüchlichen Daten über die IDO Inhibition durch die unterschiedlichen 1-MT Isoformen betrachtet und diskutiert. Es werden dringend Erklärungen für die diskrepanten *in vivo* und *in vitro* Befunde gesucht, da das 1-MT derzeit als Impfstoff-Adjuvans bei der Tumorthherapie und als Immuntherapeutikum in Kombination mit einer Chemotherapie bei Krebserkrankungen eingesetzt werden soll. In diesem Zusammenhang hat sich die D Isoform als das wirksamere antitumor Therapeutikum herausgestellt. Warum das 1-L-MT den immunsuppressiven Effekt der IDO *in vivo* nicht aufheben kann, konnte bislang nicht geklärt werden.

Das 1-D-MT befindet sich derzeit in Phase I Studien und soll danach auf seine Fähigkeit hin getestet zu werden, Metastasen oder solide Tumore zu behandeln, die nicht operiert werden können. Das Ziel dieser biologischen Therapie soll sein, dass das 1-D-MT das Wachstum der Tumorzellen stoppt, indem es die IDO inhibiert und dadurch eine bessere T-Zell Antwort gegen den Tumor erlaubt (z. B. Studie NCT00567931 des Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute an der Universität von Süd Florida, USA).

Geht man nun davon aus, dass das 1-MT oral als Therapeutikum eingesetzt werden soll, so muss man sich die Pharmakokinetik oral applizierter Medikamente vor Augen führen: Alle peroral verabreichten Arzneistoffe gelangen in den Verdauungstrakt und werden im Darm resorbiert. Dadurch gelangen sie in den Blutkreislauf und werden über die Pfortader zunächst in die Leber transportiert. Nach der Leberpassage werden sie mit dem Blutstrom weiter im Körper verteilt, bis sie ihre Wirkorte erreichen. Während der Leberpassage werden die Pharmaka zum Teil metabolisiert. Dies wird als *first pass effect* bezeichnet. Er ist sehr wichtig für die Wirkung vieler Medikamente, denn der größte Teil der Arzneistoffe entfaltet seine Wirkung erst nach dieser ersten Passage durch die Leber. Dort kommt es zur biochemischen Umwandlung der Arzneistoffe, die zur Produktion von wirksamen oder unwirksamen Metaboliten führt. An diesem Prozess sind viele Enzyme beteiligt, die die aufgenommenen Arzneistoffe spalten oder mit chemischen Gruppen versehen. Dadurch werden die

Arzneistoffe, die für den Körper meist Fremdstoffe sind, oftmals so modifiziert, dass sie inaktiviert werden und ihre Wasserlöslichkeit (Hydrophilie) so weit erhöht wird, dass eine beschleunigte Ausscheidung möglich ist. Ein ausgeprägter *first pass effect* führt somit oftmals zu einer niedrigeren Bioverfügbarkeit der Arzneistoffe.

Werden nun 1-L-MT und 1-D-MT oral aufgenommen, so können sie einerseits durch konstitutiv in der Leber exprimierte TDO metabolisiert werden. Es könnte zu einem ausgeprägten *first pass effect* kommen, der besonders die Bioverfügbarkeit von 1-L-MT erniedrigt, weil die TDO nur L stereospezifisch arbeiten kann. Unter physiologischen Bedingungen ist ein Abbau von 1-L-MT und 1-D-MT durch die IDO vernachlässigbar gering, denn die IDO muss erst im Rahmen pathologischer Vorgänge induziert werden und ist somit bei Gesunden kaum nachweisbar. Der verstärkte Abbau von 1-L-MT durch die TDO in der Leber wäre eine gute Erklärung für die Tatsache, dass das 1-L-MT *in vitro* ein guter IDO Inhibitor ist, *in vivo* aber nur einen sehr geringen Einfluss auf die Aktivität der IDO ausübt. Das 1-D-MT hingegen kann nicht von der TDO abgebaut werden, seine Bioverfügbarkeit ist damit höher und 1-D-MT könnte daher in der Lage sein, *in vivo* die IDO-vermittelten Effekte aufzuheben, obwohl es *in vitro* nur ein sehr schwacher Inhibitor der IDO ist.

Um diese Erklärungsansätze zu beweisen, müsste geklärt werden, ob die Metabolisierung des 1-L-MT durch die IDO und die TDO tatsächlich effektiv genug erfolgt um die Bioverfügbarkeit nennenswert zu beeinflussen. Ferner muss geklärt werden ob durch die Spaltung von 1-MT biologisch wirksame oder unwirksame Konzentrationen von Abbauprodukten entstehen, oder ob das Reaktionsprodukt prinzipiell unwirksam wird. Eine solche Studie wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Stattdessen wurden bisher lediglich Studien publiziert, in denen 1-D-MT ausgetestet wurde. Hierbei wurde das 1-D-MT z. B. Ratten und Hunden verabreicht, ohne dass toxische Effekte entstanden. Den Analysen zufolge besitzt das 1-D-MT eine ähnliche Biostabilität und Bioverfügbarkeit wie Tryptophan (Jia *et al.*, 2008). Trotzdem müsste weiterhin überprüft werden, ob aus 1-D-MT gegebenenfalls toxische Metabolite entstehen können, wenn es zu einem lokalen IDO-vermittelten Abbau, beispielsweise in Tumorgewebe, kommt.

Geht man von den Daten von Chauhan *et al.* aus, so wird das 1-D-MT durch die IDO zu D-Formyl-Methylkynurenin oxydiert. Dieses könnte durch die Formidase zu D-Methyl-Kynurenin umgewandelt werden, weil die Formidase auch stereounspezifisch arbeiten kann (Higuchi *et al.*, 1967). Natürlich ist in diesem Zusammenhang wichtig, ob die enzymatische Funktion bestehen bleibt, wenn sich an dem Substrat eine zusätzliche Methylgruppe befindet. Dies gilt dann auch für alle nachfolgenden Enzyme des Kynurenin Stoffwechselweges die

ebenfalls an der Produktion biologisch aktiver Metabolite beteiligt sind. Außerdem muss in Erwägung gezogen werden, dass nicht alle Enzyme des Kynurenin Stoffwechselweges stereospezifisch arbeiten. Aus der Literatur ist beispielsweise bekannt, dass das aus D-Tryptophan gebildete D-Kynurenin durch die D-Aminosäuren Oxidase (DAAO) zu Kynurensäure (KynA) umgewandelt wird (Ogaya *et al.*, 2009). Die Produktion von KynA aus L-Kynurenin wird hingegen von drei anderen Enzymen katalysiert: von der Kynurenin Aminotransferase I (KAT I) (Okuno *et al.*, 1991), der Kynurenin Aminotransferase II (KAT II) (Guidetti *et al.*, 1997) und der mitochondrialen Aspartat Aminotransferase (mitAAT) (Guidetti *et al.*, 2007). Diese drei Enzyme können nur L-Kynurenin, nicht aber D-Kynurenin abbauen. Die Stereoisomerie des Abbauproduktes spielt also eine große Rolle dabei, von welchen nachfolgenden Enzymen das Abbauprodukt weiterhin verstoffwechselt wird und welcher Metabolit dabei entsteht. Aus diesem Grunde ist es zukünftig wichtig, die Metabolisierung des 1-D-MT Abbauproduktes genau zu analysieren. Vielleicht findet sich hier ein Hinweis auf die anti-tumor Eigenschaften des 1-D-MT *in vivo*.

4.7. Ein neuer, zusätzlicher Wirkmechanismus von 1-Methyl-L-Tryptophan

In allen *in vitro* Studien, in denen 1-L-MT als IDO Inhibitor eingesetzt wurde, konnte zwar eine teilweise Hemmung der enzymatischen Aktivität beobachtet werden, eine vollständige Inhibition der Kynureninproduktion wurde allerdings nie erreicht (Cady *et al.*, 1991; Heseler *et al.*, 2008). Diese Beobachtung wurde auch gemacht, wenn HeLa-TDO Zellen mit IFN- γ stimuliert wurden und versucht wurde, die Aktivität der IDO zu hemmen (Schmidt *et al.*, 2009). Auch hier wurde die IDO-vermittelte Kynureninproduktion durch den Einsatz von großen Mengen an 1-L-MT (3mM) nur zu 65% inhibiert. Auffällig war jedoch, dass trotz der unvollständigen Inhibition der Enzymaktivität der antibakterielle Effekt der IDO schon mit geringeren 1-L-MT Dosen (0,5mM), nicht aber mit 1-D-MT, klar aufgehoben werden konnte. Noch unverständlicher wurde dieser Zusammenhang durch die Tatsache, dass eine 1-L-MT Zugabe gleichzeitig mit einer Staphylokokken Infektion des zellfreien Überstandes den antibakteriellen Effekt der IDO aufheben konnte. Zu diesem Zeitpunkt hatte aber die Aktivität der IDO bereits zum Abbau des Tryptophans geführt, so dass ein Effekt des 1-L-MT auf die IDO selbst ausgeschlossen werden konnte. Es stellte sich die Frage, ob das 1-L-MT einen Effekt auf die Bakterien, abseits von seiner IDO-inhibitorischen Funktion, hatte.

Eine Erklärung dieser Befunde könnte sein, dass das 1-L-MT, nicht aber das 1-D-MT, den IDO-vermittelten Tryptophanmangel ausgleichen konnte. Aus diesem Grund wurde

ausgetestet, ob Staphylokokken in Tryptophan-freiem Kulturmedium in Anwesenheit von 1-L-MT als einzigem Substrat wachsen können. Die erhobenen Daten belegen, dass Bakterien sowohl mit L-Tryptophan als auch mit 1-L-MT wachsen konnten. Das 1-L-MT konnte in diesem Zusammenhang als Tryptophanersatz dienen, allerdings wurde für ein halbmaximales Bakterienwachstum eine ca. 30fach höhere 1-L-MT Konzentration, im Vergleich mit L-Tryptophan, benötigt. Weiterhin wurde festgestellt, dass *S. aureus* auch für mehrere Tage mit 1-L-MT anstelle von Tryptophan wachsen konnte, ohne dass das Bakterienwachstum negativ beeinflusst wurde. Weitere Experimente mit anderen Tryptophan-auxotrophen Kokken (Enterokokken oder Streptokokken der Gruppe B) in Tryptophan-freiem Medium in Anwesenheit von 1-L-MT ergaben identische Befunde. In weiteren Studien wurde zudem gezeigt, dass auch der Parasit *Toxoplasma gondii* das 1-L-MT als Tryptophanersatz nutzen konnte. Die Toxoplasmen konnten in 86HG39 Zellen proliferieren, die in Tryptophan-depletiertem Medium gehalten wurden, sobald 1-L-MT, oder, als Kontrolle L-Tryptophan, zugegeben wurde. Ein Vergleich der beiden Substratkonzentrationen, die für ein halbmaximales Parasitenwachstum benötigt wurden, ergab jedoch abermals, dass das 1-L-MT das schlechtere Substrat war. Für ein halbmaximales Wachstum wurde ca. viermal so viel 1-L-MT wie L-Tryptophan benötigt.

Nicht nur Mikroorganismen, sondern auch humane Zellen konnten 1-L-MT als Tryptophanersatz nutzen. Dies konnte im Falle von HeLa Zellen durch mikroskopische Beobachtungen nachgewiesen werden, oder im Falle von T-Zellen dadurch, dass die T-Zellen in Tryptophan-freiem Kulturmedium nach Zusatz von 1-L-MT proliferieren konnten. Eine genaue Analyse ließ wiederum erkennen, dass das 1-L-MT auch für humane Zellen das schlechtere Substrat, verglichen mit L-Tryptophan, darstellt.

An dieser Stelle muss nochmals erwähnt werden, dass das 1-L-MT nicht mit Tryptophan verunreinigt war. Es gibt zwei Ideen dazu, wie 1-L-MT als Tryptophanersatz dienen kann: Das 1-L-MT könnte in der Zelle durch einen bisher unbekanntem Prozess erst demethyliert und das dann entstandene Tryptophan für das Wachstum der Organismen verwendet werden. Alternativ könnte das 1-L-MT samt der Methylgruppe in die Proteine eingebaut werden. Zur Klärung dieses Mechanismus sind weitere Analysen erforderlich. Besonders viel versprechend wären dabei Experimente mit 1-L-MT, welches sowohl an der Methylgruppe oder im Indolring radioaktiv markiert ist. Damit ließe sich die markierte Methylgruppe oder das gesamte Molekül durch einen Nachweis der erzeugten Strahlung innerhalb der Zellen verfolgen und man könnte nachweisen, ob die Methylgruppe vor Verwertung abgetrennt wird. Außerdem ließe sich beweisen, ob das 1-L-MT tatsächlich in die Proteine der Zellen

eingebaut wird. Leider ist die Synthese dieser radioaktiv markierten Substanzen mit einem nicht tragbaren größeren Kostenaufwand verbunden. Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit kein direkter Nachweis für den 1-L-MT Einbau erbracht. Es gibt aber indirekte Hinweise, dass 1-L-MT tatsächlich in die Wirtszellproteine eingebaut wird. Zu diesem Zweck wurde radioaktiv markiertes L-Tryptophan ($[^3\text{H}]$ -Tryptophan) eingesetzt, welches an der 5. Position mit ^3H markiert und kommerziell erhältlich ist. Dieses $[^3\text{H}]$ -Tryptophan ($0,75\mu\text{g/mL}$) wurde zu T-Zellen zugegeben, die in Tryptophan-freiem Kulturmedium proliferierten. Gleichzeitig wurde den Zellen aber auch unmarkiertes L-Tryptophan oder 1-L-MT zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde dann der Einbau des $[^3\text{H}]$ -Tryptophan in die Zellen per Szintillations-Spektroskopie ermittelt. Eine Kontrolle mit $[^3\text{H}]$ -Thymidin zeigte, dass das Wachstum der T-Zellen bei der entsprechenden Konzentration Tryptophan ($0,75\mu\text{g/mL}$) und der Zugabe der zu untersuchenden Substrate nicht eingeschränkt war. Betrachtete man aber statt der $[^3\text{H}]$ -Thymidin Inkorporation den Einbau $[^3\text{H}]$ -Tryptophans, so war zu erkennen, dass der Einbau des $[^3\text{H}]$ -Tryptophans in die T-Zellen abnahm, je mehr unmarkiertes Substrat (L-Tryptophan oder 1-L-MT) zugegeben worden war. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl das L-Tryptophan als auch das 1-L-MT das $[^3\text{H}]$ -Tryptophan kompetitiv ersetzt hatten. Somit wurde indirekt bewiesen, dass das 1-L-MT in humane T-Zellen aufgenommen werden kann. Um zusätzlich festzustellen, ob das 1-L-MT auch tatsächlich in die Proteine der T-Zellen eingebaut wird, wurde das Experiment abgeändert. Anstatt der T-Zell Lysate wurde die Proteinfraction der T-Zellen durch Fällung isoliert und getrennt analysiert. Die Daten ergaben, dass das 1-L-MT auch den Einbau von $[^3\text{H}]$ -Tryptophan in die Proteine der T-Zellen hemmen konnte.

Abschließend konnten mehrere der in dieser Arbeit neu gezeigten Beobachtungen (zum Beispiel der Abbau und Einbau des 1-L-MT) in einem Experiment vereint werden: Zuerst wurden HeLa-TDO Zellen mit Tetrazyklin oder $\text{IFN-}\gamma$ stimuliert, so dass die Zellen IDO^+ oder TDO^+ wurden. Durch die Aktivität der beiden Enzyme konnte dann 1-L-MT und, als Kontrolle, L-Tryptophan abgebaut werden. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände geerntet und mit Staphylokokken beimpft. Abhängig davon, wie hoch die Konzentration der beiden Substrate anfangs gewesen war und wie groß die Menge der Substrate war, die abgebaut worden ist, konnten die Staphylokokken nun im Zellkulturüberstand wachsen. Ein Vergleich zeigte auch hier wieder, dass etwa 30mal mehr 1-L-MT zum halbmaximalen Wachstum der Staphylokokken benötigt wurde, im Vergleich zur benötigten Menge L-Tryptophan. Neben dem überraschenden Befund, dass das 1-L-MT auch die TDO-vermittelte Bakteriostase hemmen konnte, ist auffallend, dass zur Antagonisierung der IDO Effekte

deutlich weniger 1-L-MT benötigt wird. Dieser quantitative Unterschied ist dadurch zu erklären, dass in den TDO Experimenten das 1-L-MT nur als Tryptophanersatz aktiv ist. Dieser Effekt tritt auch in der IDO Gruppe auf, jedoch erfolgt hier gleichzeitig eine Inhibition der IDO Enzymaktivität. Dieser doppelte Effekt erklärt die niedrige 1-L-MT Konzentration, die notwendig ist, um das Bakterienwachstum zu hemmen.

Ein Hinweis darauf, dass in beiden Kultursystemen 1-L-MT auch abgebaut wurde, ergibt sich aus dem Vergleich der wirksamen 1-L-MT Mengen in den Experimentalansätzen, in denen die IDO⁺ / TDO⁺ Zellen gleichzeitig mit 1-L-MT anwesend waren. In den Ansätzen, bei denen 1-L-MT erst zu den zellfreien, konditionierten Medien zugegeben wurde, war die zur Antagonisierung des antibakteriellen Effektes nötige 1-L-MT Konzentration deutlich niedriger, als in den Ansätzen, in denen die TDO⁺ / IDO⁺ Zellen anwesend waren. Somit ist der quantitative Unterschied zwischen den beiden Experimentalansätzen ein deutlicher Hinweis darauf, dass das 1-L-MT von den TDO⁺ / IDO⁺ Zellen degradiert wird.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass das 1-L-MT nicht nur ein kompetitiver Inhibitor der IDO ist, sondern auch als Tryptophanersatz das Wachstum von Tryptophan-auxotrophen Bakterien, dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* und von humanen Zellen erlaubt. Das 1-L-MT scheint hierbei, gleichfalls wie das L-Tryptophan, in die Proteine der Organismen eingebaut zu werden. Unklar ist dabei, ob das 1-L-MT vorher demethyliert wird. Zur Klärung dieser Frage müssten Proteine isoliert werden, die in Anwesenheit von 1-L-MT synthetisiert worden sind. Diese Proteine müssten dann in Peptide zerlegt werden und per MS Analyse darauf getestet werden, ob an den Tryptophanresten 1-L-MT oder Tryptophan ohne Methylgruppe vorliegt.

Nun soll der Befund, dass 1-L-MT, im Gegensatz zu 1-D-MT als Tryptophanersatz dienen kann, im Zusammenhang mit den widersprüchlichen Daten betrachtet werden, die bislang nicht erklären können, welche der beiden 1-MT Isoformen der effizientere IDO Inhibitor ist. Wie bereits erwähnt, ist das 1-D-MT dazu in der Lage, die IDO-vermittelte Immunsuppression *in vivo* aufzuheben. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass das 1-D-MT nicht proteinogen ist, im Blut verbleibt und somit lokal am Tumor die Aktivität der IDO inhibieren kann. Obwohl es nur ein sehr schwacher Inhibitor der IDO ist, könnte die inhibitorische Aktivität bei der erhöhten Bioverfügbarkeit in diesem Falle ausreichen. Andererseits konnte bisher gezeigt werden, dass das 1-L-MT *in vitro* viel effektiver als IDO Inhibitor fungiert, *in vivo* aber praktisch unwirksam ist. Dies könnte dadurch bedingt sein, dass das 1-L-MT zwar ein guter Inhibitor der IDO Enzymaktivität ist, *in vivo* jedoch in die Körperzellen eingebaut werden kann und nunmehr mit dem mit der Nahrung aufgenommenen

Tryptophan konkurriert. Dadurch könnte die verfügbare 1-L-MT Konzentration, die den zu untersuchenden Tumor erreicht, so niedrig sein, dass ein antitumor Effekt ausbleibt, zumal in dieser Arbeit ja auch gezeigt wurde, dass das 1-L-MT zusätzlich durch die IDO und die TDO abgebaut werden kann. Ob der Einbau des 1-L-MT *in vivo* in Tumorzellen eine Rolle spielt, ist fraglich. Tumorzellen haben zwar durch das stete Wachstum einen hohen Nährstoffverbrauch, ihnen steht jedoch unter normalen Ernährungsbedingungen mehr als ausreichend Tryptophan zur Verfügung. Sollte dennoch 1-L-MT in die Tumorzellen inkorporiert werden, so muss dies nicht unbedingt negative Auswirkungen auf das Tumorgewebe haben. Daten, die im Laufe dieser Arbeit angefertigt wurden, weisen nämlich darauf hin, dass der Einbau von 1-L-MT, zumindest für Bakterien, auch in Langzeitexperimenten nicht nachteilig zu sein scheint.

Zusätzlich müssen Datensätze aus der Literatur, die 1-L-MT ausschließlich als Enzyminhibitor der IDO betrachten einer kritischen Neubeurteilung unterzogen werden. Nach den Daten der vorliegenden Arbeit kann die TDO-Aktivität einerseits die Bioverfügbarkeit von 1-L-MT erniedrigen und zusätzlich als funktioneller Tryptophanersatz dienen. So kann eine *in vitro* Supplementation von 1-L-MT ebenfalls sowohl IDO- als auch TDO-vermittelte antimikrobielle und immunregulatorische Effekte aufheben, obwohl diese nicht alle auf einer Inhibition der Enzymaktivität beruhen.

Die Erkenntnisse über den Abbau von 1-L-MT und 1-D-MT und den Einbau von 1-L-MT sind zwei neue Erklärungsansätze, die dabei helfen können, die Funktion von 1-MT *in vivo* genauer zu verstehen. Diese beiden Prozesse können, zumindest teilweise, ohne eine Beteiligung der IDO Enzymaktivität im Körper ablaufen. Derartige, IDO-unabhängige Einflüsse von 1-MT *in vivo* stehen oftmals in Diskussion. In Experimenten mit gereinigten DC wurde beschrieben, dass das 1-DL-MT die Funktion von unterschiedlichen DC IDO-unabhängig modulieren kann. Inwiefern die Funktion der DC beeinflusst wurde, hing dabei vom Reifeprozess der DC ab. So waren LPS stimulierte DC in der Anwesenheit von 1-DL-MT zwar nach wie vor in der Lage, allogene und syngene T-Zellen zu aktivieren, die aktivierten T-Zellen produzierten jedoch anstelle von IFN- γ große Mengen an IL-5 und IL-13 (Agaugué *et al.*, 2006). DC spielen eine Hauptrolle bei der Immunabwehr gegen maligne Zellen (Steinman *et al.*, 2007). Aus diesem Grunde könnte 1-MT die Immunantwort auf Tumore durch eine IDO-unabhängige Wirkung auf DC beeinflussen (Löb *et al.*, 2009).

Zudem kann das 1-MT auch den Tryptophan-Transporter hemmen, der sich in der Zellmembran befindet (Kudo *et al.*, 2001). Der Aktivitätsverlust dieses Transporters führt zu

grundlegenden metabolischen Störungen in eukaryotischen Zellen. Ob ein solcher Effekt auch in Tumoren auftritt, die mit 1-MT in Kontakt geraten, muss noch untersucht werden.

2007 wurde publiziert, dass das 1-MT zudem nicht nur die enzymatische Aktivität der IDO inhibiert, sondern auch die Expression der IDO auf transkriptioneller und translationeller Ebene beeinflusst (Okamoto *et al.*, 2007). Wurden murine Rektumkarzinomzellen mit IFN- γ stimuliert, so führte dies zu einer IDO Expression. Eine Zugabe von 1-L-MT konnte die IDO mRNA und Protein Expression unterdrücken. Diese Tatsache gibt Anstoß zur Spekulation, dass durch das 1-L-MT auch die Expression anderer Proteine behindert wird und somit die Zellfunktion gestört wird, da chemische Substanzen selten nur ein Protein beeinflussen (Löb *et al.*, 2009).

Letztendlich tragen alle diese Daten dazu bei, den Wirkmechanismus von 1-L-MT und 1-D-MT verständlicher zu machen. Ob die Wirkweise der 1-MT Enantiomere nun IDO-unabhängig erfolgt, oder ob eine alleinige IDO Inhibition für die 1-MT-vermittelten Effekte verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Zudem muss ausgetestet werden, ob das 1-MT im humanen System *in vivo* ebenfalls das Wachstum von Tumoren unterdrücken kann. Sollte dies der Fall sein, dann wird es nochmals wichtiger die Mechanismen aufzuklären, die der therapeutischen Funktion des 1-MT zugrunde liegen.

5. Zusammenfassung

Eine Erniedrigung der lokalen Tryptophankonzentration im Gewebe hat einen Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen, die in den Körper eingedrungen sind. Dieser antimikrobielle Effekt kann in humanen Zellen durch das IFN- γ -induzierte Tryptophan-abbauende Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelt werden. Durch die lokale Aktivität der IDO kann das Wachstum von Bakterien, Viren und Parasiten verhindert werden. Zusätzliche Beobachtungen zeigen, dass die IDO auch immunregulatorische Aufgaben übernimmt, weil sie die Aktivierung und das Überleben von T-Zellen kontrolliert.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass diese antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte auch durch die Aktivität eines anderen Tryptophan-abbauenden Enzyms vermittelt werden können. Die rekombinante Expression der humanen Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) in HeLa Zellen bewirkt eine Wachstumsinhibition von *Staphylococcus aureus*, Herpes simplex Virus Typ I und *Toxoplasma gondii*. Auch die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen kann durch die Aktivität der TDO verhindert werden. In diesem Zusammenhang spielt nicht nur die lokale Tryptophanverarmung eine Rolle, sondern auch die TDO-abhängige Produktion von toxischen Tryptophan Metaboliten. Die IFN- γ -unabhängige Expression der TDO macht deutlich, dass sowohl die beobachteten antimikrobiellen als auch die immunregulatorischen Effekte allein auf die Enzymaktivität der IDO und der TDO zurückzuführen sind.

Zusätzlich wurden Analysen mit dem Tryptophan-Analogon 1-Methyl-Tryptophan durchgeführt, das bisher lediglich als Inhibitor der IDO beschrieben ist. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen beweisen, dass das L Isomer des 1-MT (1-L-MT) durch die IDO und die TDO verstoffwechselt werden kann, und auch das D Isomer des 1-MT (1-D-MT) der IDO als Substrat dienen kann. Dieser Befund könnte eine Rolle bei der möglichen therapeutischen Behandlung von Tumoren mit 1-MT spielen, die derzeit geplant ist. Einerseits könnte die Wirkung des 1-MT durch einen *first pass effect* eingeschränkt sein, andererseits könnten durch den Abbau von 1-MT toxische oder wirkungslose Metabolite entstehen.

Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das 1-L-MT in der Zellkultur als Tryptophan-Ersatz dienen kann. Eine Zugabe von 1-L-MT erlaubt das Wachstum von *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* oder humanen Zellen (HeLa Zellen, T-Zellen) in der Abwesenheit von Tryptophan. Inwiefern der Einbau von 1-L-MT *in vivo* einen Einfluss auf IDO- und TDO-vermittelte Effekte hat, muss noch geklärt werden.

6. Summary

The reduction of local tryptophan concentrations in the tissue has an impact on the growth of microorganisms, which have invaded the body. This antimicrobial effect can in human cells be mediated by the IFN- γ -inducible tryptophan-depleting enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Here, a local IDO activity can inhibit the growth of bacteria, viruses and parasites. Additional observations show that IDO is also able to function as an immunoregulatory molecule, because it controls the activation and survival of T-cells.

Here, it was shown for the first time that these antimicrobial and immunoregulatory effects can also be mediated by the activity of another tryptophan-degrading enzyme. The recombinant expression of human tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) in HeLa cells lead to a growth inhibition of *Staphylococcus aureus*, Herpes simplex Virus Typ I and *Toxoplasma gondii*. Furthermore, TDO activity could also inhibit the proliferation and activation of T-cells. In this context not only the local depletion of tryptophan, but also the production of toxic tryptophan metabolites played an important role. The IFN- γ -independent expression of TDO reveals that the enzyme activity of IDO and TDO are the only cause for the observed antimicrobial as well as the immunoregulatory effects.

Additional analyses with the tryptophan-analogue 1-Methyl-Tryptophan were conducted, which is up to now regarded as an IDO inhibitor only. The results of these studies show that the L isomer of 1-MT (1-L-MT) can be metabolized by IDO and TDO. The D isomer of 1-MT (1-D-MT) can serve as a substrate for IDO. These findings could play a role in a therapeutic treatment of tumours with 1-MT that is currently planned. On the one hand, the effect of a 1-MT treatment could be limited due to a first pass effect. On the other hand the degradation of 1-MT could lead to the generation of toxic or nonactive metabolites.

Furthermore, it could be shown that 1-L-MT can serve as a tryptophan-substitute in cell culture systems. The supplementation of 1-L-MT allowed the growth of *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* or human cells (HeLa cells, T-cells) in the absence of tryptophan. The impact of the 1-L-MT incorporation *in vitro* und *in vivo* on IDO- and TDO-mediated effects have to be determined.

7. Literaturverzeichnis

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., Rüssing 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.

Agaugué S., Perrin-Cocon L., Coutant F., André P., Lotteau V. (2006). 1-methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in Dendritic Cells independently of IDO activity. *J Immunol*; 177:2061-71.

Austin C. J. D., Mailu B. M., Maghzal G. J., Sanchez-Perez A., Rahlfs S., Zocher K., Yuasa H. J., Arthur J. W., Becker K., Stocker R., Hunt N. H., Ball H. J. (2009). Biochemical characteristics and inhibitor selectivity of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase-2. *Amino Acids*; DOI 10.1007/s00726-010-0475-9.

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., Jermini L. S., Hunt N. H. (2007). Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*; 396:203–13.

Basran J., Rafice S. A., Chauhan N, Efimov I., Cheesman M. R., Ghamsari L., Raven E. L. (2008). A kinetic, spectroscopic and redox study of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem*; 47:4752-60.

Batabyal D., Yeh S.-R. (2007). Human tryptophan dioxygenase: A comparison to indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Am Chem Soc*; 129:15690-701.

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.

Becerra A., Warke R. V., Khaja K., Evans B., Evans J., Martin K., de Bosch N., Rothman A. L., Bosch I. (2009). Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *J Gen Virol*; 90:810-7.

Belladonna M. L., Grohmann U., Guidetti P., Volpi C., Bianchi R., Fioretti M., Schwarcz R., Puccetti P. (2006). Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J Immunol*; 177:130-7.

Benseler V., McCaughan G. W., Schlitt H. J., Bishop G. A., Bowen D. G., Bertolino P. (2007). The liver: a special case in transplantation tolerance. *Semin Liver Dis*; 27:194-213.

- Bertolino P., McCaughan G. W., Bowen D. G. (2002).** Role of primary intrahepatic T-cell activation in the "liver tolerance effect". *Immunol Cell Biol*; 80:84-92.
- Beutelspacher S. C., Pillai R., Watsin 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.
- 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.
- Bokarewa M. I., Jin T., Tarkowski A. (2006).** Staphylococcus aureus: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol*; 38:504-9.
- Brezillon N. M., DaSilva L., L'Hote D., Bernex F., Piquet J., Binart N., Morosan S., Kremsdorf D. (2008).** Rescue of fertility in homozygous mice for the urokinase plasminogen activator transgene by the transplantation of mouse hepatocytes. *Cell Transplant*; 17:803-12.
- 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.
- Cady S. G., Sono M. (1991).** 1-Methyl-DL-tryptophan, β -(3-Benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β -[3-Benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Arch of Biochem Biophys*; 291:326-33
- Chauhan N., Thackray S. J., Rafice S. A., Eaton G., Lee M., Efimov I., Basran J., Jenkins P. R., Mowat C. G., Chapman S. K., Raven E. L. (2009).** Reassessment of the reaction mechanism in the heme dioxygenases. *J Am Chem Soc*; 131:4186-7.
- 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 USA*; 81:4917-21.
- Comings D. E., Muhlemann D., Dietz G. W., Donlon T. (1991).** Human tryptophan oxygenase localized to 4q31: possible implications on alcoholism and other behavioural disorders. *Genomics*; 9:301-8
- 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.
- Crispe I N., Dao T., Klugewitz K., Mehal W. Z., Metz D. P. (2000).** The liver as a site of T-cell apoptosis: graveyard or killing field? *Immunol Rev*; 174:47-62.

- Danesch U., Gloss B., Schmid W., Schütz G., Schüle R., Renkawitz R. (1987).** Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements. *EMBO J*; 6:625-30.
- Dang Y., Dale W. E., Brown O. R. (2000).** Comparative effects of oxygen on indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase of the kynurenine pathway. *Free Radical Biol and Med*; 28:615-24.
- 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., Schmidt S. K., Heseler K., Spekker K. H., MacKenzie C. R. (2009).** Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells – indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase. *Thromb Haemost*; 102:1110-6.
- 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
- Descarries L., Audet M. A., Doucet G., Garcia S., Oleskevich S., Séguéla P., Soghomonian J. J., Watkins K. C. (1990).** Morphology of central serotonin neurons. Brief review of quantified aspects of their distribution and ultrastructural relationships. *Annals New York Acad Scie*; 600:81-92.
- Eagle H. (1955).** Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*; 122:501-14.
- Ernst J. F., Tielker D. (2008).** Responses to hypoxia in fungal proteins. *Cell Microbiol*; 11:183-90
- Eza D. E., Lucas S. B. (2006).** Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Med*; 7:415–20.
- Fallarino F., Grohmann U., You S., McGrath B. C., Cavener D. R., Vacca C., Orabona C., Bianchi R., Belladonna M. L., Volpi C., Santamaria P., Fioretti M. C., Puccetti P. (2006).** The combined effects of tryptophan starvation and Tryptophan catabolites down-regulate T-cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naïve t-cells. *J Immunol*; 176:6752-61.
- 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.
- Feigelson P., Brady F. O. (1974).** Heme-containing dioxygenases. *Molecular Mechanisms of Oxygen Activation*. p.87, Academic Press, New York

- Flückiger U., Trampuz A. (2001).** Pneumonia in the immune compromised host. *Ther Umsch*; 58:614–9.
- Fournier C., Sureau C., Coste J., Ducos J., Pageaux G., Larrey D., Domergue J., Maurel P. (1998).** In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol*; 79:2367-74.
- Forouhar F., Anderson J. L., Mowat C. G., Vorobiev S. M., Hussain A., Abashidze M., Bruckmann C., Thackray S. J., Seetharaman J., Tucker T. Xiao R., Ma L-C. Zhao L., Acton T. B., Montelione G. T., Chapman S. K., Tong L. (2007).** Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 104:473-8.
- 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: biologic functions and HCV therapy (type I/II). *Clin Ter*; 157:377–86.
- Geschwind I. I., Li C. H. (1953).** Influence of Hypophysectomy and of adrenocorticotrophic hormone on a mammalian adaptive enzyme system. *Nature* 172; doi:10.1038/172732a0.
- Gripon P., Diot C., Theze N., Fourel I., Loreal O., Brechot C., Guguen-Guillouzo C. (1988).** Hepatitis B Virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol*; 62: 4136-43.
- Grohmann U., Fallarino F., Puccetti P. (2003).** Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*; 24:242-8
- Guidetti P., Amori L., Sapko M. T. et al. (2007).** Mitochondrial aspartate aminotransferase: a third kynurenate-producing enzyme in the mammalian brain. *J Neurochem*; 102:103-11.
- Guidetti P., Okuno E., Schwarcz R. (1997).** Characterization of rat brain kynurenine aminotransferases I and II. *J Neurosci Res*; 50:457-65.
- Haniffa M. A., Wang X. N., Holtick U., Rae M., Isaacs J. D., Dickinson A. M., Hilkens C. M., Collin M. P. (2007).** Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol*; 179:1595-04.
- 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.
- 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*. *Zentral Bakteriell Mikrobiol Hyg*; 267:272–6.
- Heseler K., Spekker K., Schmidt S. K., MacKenzie C. R., Däubener W. (2008).** Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN- γ -induced tryptophan degradation. *FEMS*; 52:273-81.
- Herrmann D. J., Peppard W. J., Ledebner 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.
- Higuchi K., Hayaishi O. (1967).** Enzymic formation of D-Kynurenine from D-Tryptophan. *Arch of Biochemistry and Biophysics*; 120:397-403.
- Hof H., Dörries R. (2005).** *Medizinische Mikrobiologie*; 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ishiguro I., Naito J., Saito K., Nagamura Y. (1993).** Skin L-tryptophan 2,3-dioxygenase and rat hair growth. *FEBS*; 329:178-82.
- Iwamoto Y., Lee I. S., Tsubaki M., Kido R. (1995).** Tryptophan 2,3-dioxygenase in *saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol*; 41:19-26.
- Jia L., Schweikart K., Tomaszewski J., Page J. G., Noker P. E., Buhrow S. A., Reid J. M., Ames M. M., Munn D. H. (2008).** Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-[D]-tryptophan: absence of toxicity due to saturating absorption. *Food Chem Toxicol*; 46:203-11.
- Jouanguy E., Doffinger R., Dupuis S., Pallier A., Altare F., Casanova J. L. (1999).** IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and Salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol*; 11:346-51.
- Kadowaki N., Antonenko S., Lau J. Y., Liu Y. J. (2000).** Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp Med*; 192:219-26.
- Kanai M., Funakoshi H., Takahashi H., Hayakawa T., Minuzo S., Matsumoto K., Nakamura T. (2009).** Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behaviour in mice. *Mol Brain*; 2: doi:10.1186/1756-6606-2-8.

- 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 NFκB pathways. *Mol Immunol*; 44:615–24.
- Knox W. E., Auerbach V. H. (1955).** The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat. *J Biol Chem*; 214:307-13.
- Konturek S. J., Konturek P. C., Brzozowski T., Bubenik G. A. (2007).** Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol*; 58:23-52.
- Kotake Y., Ito N. (1937).** Studien über den intermediären Stoffwechsel des Tryptophans. *J Biochem*; 25:71-7.
- Kotake Y., Masayama I. (1936).** The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan. *Z Physiol Chem*; 243:237-44.
- Kotru A., Sheperd R., Nadler M., Chapman W., Huddleston C., Lowell J. (2006).** Combined lung and liver transplantation: the United States experience. *Transplantation*; 82: 144-5.
- Kröger H., Greuer B. (1966).** Influence of Cortisone on the Substrate-induction of Enzymes in Rat liver. *Nature*; 210:200-1.
- Kudo Y., Boyd C. A. (2001).** Characterization of L-Tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. *J Physiol*; 531:405-16.
- 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.
- Lazaris-Brunner G., Rafii M., Ball R. O., Pencharz P. B. (1999).** Tryptophan requirement in young adult women as determined by indicator amino acid oxidation with L-[13C]phenylalanine. *Am J Clin Nutr*; 62:603-10.
- Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H. G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B., Knolle P. A. (2000).** Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med*; 6:1348-54.
- 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 X. Q., Wang X. (2009).** Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor induced tolerance. *Chin Med J*; 122:3072-7.
- Liu X., Shin N., Koblish H. K., Yang G., Wang Q., Wang K., Leffet L., Hansbury M. J., Thomas B., Rupar M., Waeltz P., Bowman K. J., Polam P., Sparks R. B., Yue E. W., Li Y., Wynn R., Fridman J. S., Burn T. C., Combs A. P., Newton R. C., Scherle P. A.**

- (2009). Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*; 115:3520-30.
- 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. (2009A).** IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*; 58:153-7.
- Löb S., Königsrainer A., Rammensee H. G., Opelz G., Terness P. (2009B).** Inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase for cancer therapy: Can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer*; 9: 445-52.
- 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., Hucke C., Müller D., Seidel K., Takikawa O., Däubener W. (1999).** Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uroepithelial cells. *J Med Microbiol*; 48:935-41.
- 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.
- Mazier D., Beaudoin RL., Mellouk S., Druilhe P., Texier B., Trospen J., Miltgen F., Landau I., Paul C., Brandicourt O. (1985).** Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* *in vitro*. *Science*; 227:440-2.
- Mehal W. Z., Azzaroli F., Crispe I. N. (2001).** Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T-cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T-cell apoptosis. *J Immunol*; 167:667-73.
- 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.
- Mellor A. L., Baban B., Chandler P., Marshall B., Jhaver K., Hansen A., Koni P., A. Munn D. H. (2003).** Cutting edge: induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol*; 171:1652-55.
- Mellor A. L., Munn D. H. (1999).** Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*; 20:469-73.
- Mellor A. L., Munn D. H. (2004).** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*; 4:762-74.

- Mellor A. L., Sivakumar J., Chandler P., Smith K., Molina H., Mao D., Munn D. H. (2001).** Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol*; 2:64-8.
- 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.
- Miki T., Sun H., Lee Y., Tandin A., Kovscek A. M., Subbotin V., Fung J. J., Valdivia L. A. (2001).** Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc*; 33:129-30.
- Millan M. J., Marin P., Bockaert J., la Cour C. M. (2008).** Signalling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends Pharmacol Scie*; 9:454-64.
- Miller C. L., Llenos I. C., Dulay J. R., Weis S. (2006).** Upregulation of the initiating step of the kynurenine pathway in post-mortem anterior cingulate cortex from individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *Brain Res*; 1073-1074:25-37.
- Moreau M., Lestage J., Verrier D., Mormede C., Kelley K. W., Dantzer R., Castanon N. (2005).** Bacille Calmette-Guérin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *J Infect Dis*; 192:537-44.
- Müller A., Heseler K., Schmidt S. K., Spekter 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., Mellor A. L. (2004).** Ligation of B7-1/B7-2 of 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.

- Nabi R., Serajee F. J., Chugani D. C., Zhong H., Huq A. H. M. M. (2003).** Association of the Tryptophan 2,3 Dioxygenase Gene Polymorphism With Autism. *Am J Med Gen Part B*; 125:63-8.
- Nakamura T., Shinno H., Ichihara A. (1980).** Insulin and glucagon as a new regulator system for tryptophan oxygenase activity demonstrated in primari cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem*; 255:7533-5.
- Nathan C. (1992).** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*; 6:3061-4.
- Newport M. J., Huxley C. M., Huston S., Hawrylowicz C. M., Oostra B. A., Williamson R., Levin M. (1996).** A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*; 335:1941-9.
- Nguyen H., Hiscott J., Pitha P. M. (1997).** The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev*; 8:293–312.
- Niimi S., Nakamura T., Nawa K., Ichihara A. (1983).** Hormonal regulation of translatable mRNA of tryptophan 2,3-dioxygenase in primary cultures of adult rat hepatocytes. *J Biochem*; 94:1697-706.
- 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.
- 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.
- Ogaya T., Song Z., Ishii K., Fukushima T. (2009).** Changes in Extracellular Kynurenin Acid Concentrations in Rat Prefrontal Cortex After D-Kynurenine Infusion: An *in vivo* Microdialysis Study. *Neurochem Res*; DOI 10.1007/s11064-009-0099-1.
- Okamoto T., Toné S., Kanouchi H., Miyawaki C., Ono S., Minatogawa Y. (2007).** Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue. *Cytotechnology*; 54:107-13.
- Okuno E., Schmidt W., Parks D. A. et al. (1991).** Measurement of rat brain kynurenine aminotransferase at physiological kynurenine concentrations. *J Neurochem*; 57:533-540.
- O'Neil S. R., DeMoss R. D. (1968).** Tryptophan transaminase from *clostridium sporogenes*. *Arch Biochem Biophys*; 127:361-9.
- 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.
- 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.

- Peng K., Monack, DM. (2010).** Indoleamine 2,3-dioxygenase-1 is a lung-specific innate immune defense mechanism that inhibits growth of *francisella tularensis* tryptophan auxotrophs. *Infect Immun*; 78:2723-33.
- Peterson, A.C., et al. (1994).** Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Med. Chem. Res.* 3:531-544.
- Pfefferkorn E. R., Pfefferkorn L. C. (1977).** Specific labeling of intracellular *toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool*; 24:449-53.
- 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.
- 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.
- Qian F., Vilella J., Wallace P. K., Mhawech-Fauceglia P., Tario J. D., Andrews C., Matsuzaki J, Valmori D., Ayyoub M., Frederick P. J., Beck A., Liao J., Cheney R., Moysich K., Lele S., Shrikant P., Old L. J., Odunsi K. (2009).** Efficacy of Levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*; 69:5498-504.
- Qian S., Demetris A. J., Murase N., Rao A. S., Fung J. J., Starzl T. E. (1994).** Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism. *Hepatology*; 19:916-24.
- Rafice S. A., Chauhan N., Efimov I., Basran J., Raven E. L. (2009).** Oxidation of l-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Transact*; 37:408-12.
- Rasmussen A., Davies H. F., Jamieson N. V., Evans D. B., Calne R. Y. (1995).** Combined transplantation of liver and kidney from the same donor protects the kidney from rejection and improves kidney graft survival. *Transplantation*; 59:919-21.
- Roth A., König P., van Zandbergen G., Klinger N., Hellwig-Burgel T., Däubener W., Bohlmann M., Rupp J. (2010).** Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN-gamma in human fallopian tube cells *in vitro* and *ex vivo*. unpublished data
- Saha B., Jyothi Prasanna S., Chandrasekar B., Nandi D. (2010).** Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*; 50:1-14.
- Schimke R. T., Sweeney E. W., Berlin C. M. (1965).** The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase. *J Biol Chem*; 240: 322-331.

- Schmidt S. K., Müller A., Heseler K., Woite C., Spekker K., MacKenzie C. R., Däubener W. (2009).** Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Eur J Immunol*; 39:2755-64.
- 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.
- 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.
- Searles L. L., Ruth R. S., Pret A. M., Fridell R. A., Ali A. J. (1990).** Structure and transcription of the *Drosophila melanogaster vermilion* gene and several mutant alleles. *Mol Cell Biol*; 10:1423-31.
- 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., 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 USA*; 91:5508-12.
- Silva N. M., Rodrigues C. V., Santoro M. M., Reis L. F. L., 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 regulatory factor 1. *Infect Immun*; 70:859-68.
- Spekker K., Czesla M., Ince V., Heseler K., Schmidt S. K., Schares G., Däubener W. (2009).** Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun*; 77:4496-501.
- Sono M., Roach M. P., Coulter E. D., Dawson J. H. (1996).** Heme-containing oxygenases. *Chem Rev*; 96:2841-87.
- Steinman R. M., Banchereau J. (2007).** Taking dendritic cells into medicine. *Nature*; 449:419-26.
- 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.
- Sugimoto H., Oda S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida T., Shiro, Y. (2006).** Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103:2611-6.
- Sumpter T. L., Abe M., Tokita D., Thomson A. W. (2007).** Dendritic cells, the liver, and transplantation. *Hepatology*; 46:2021-31.
- Suzuki S., Toné S., Takikawa O., Kubo T., Kohno I., Minatogawa Y. (2001).** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,-dioxygenase in early concepti. *Biochem J*; 355:425-9.
- Takikawa O., Nomiyama S., Hirata F., Hayaishi O. (1988).** Mechanism of interferon-gamma action. *J Biol Chem*; 263: 2041-8.
- Takikawa O. (2005).** Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*; 338:12–9.
- Tatsumi K., Higuchi T., Fujiwara H., Nakayama T., Egawa H., Itoh K., Fujii S., Fujita J. (2000).** Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. *Biochem Biophys Res Comm*; 274:166-170.
- Taylor M. W., Feng G. S. (1991).** Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*; 5:2516-22.
- 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.
- Thackray S. J., Bruckmann C., Anderson J. L., Campbell L. P., Xiao R., Zhao L., Mowar C. G., Forouhar F., Tong L., Chapman S. K. (2008).** Histidine 55 of tryptophan 2,3-dioxygenase is not an active site base but regulates catalysis by controlling substrate binding. *Biochem*; 47:10677-84.
- 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.
- Thomas S. R., Mohr D., Stocker R. (1994).** Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN- γ primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem*; 269:14457-64.
- Thomas S. R., Stocker R. (1999).** Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Report*; 4:199-220.

- Thomas S. R., Salahifar H., Mashima R., Hunt N. H., Richardson D. R., Stocker R. (2001).** Antioxidants inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase in IFN-gamma-activated human macrophages: Posttranslational regulation by pyrrolidine dithiocarbamate. *J Immunol*; 166:6332-40.
- Vazquez-Torres A., Stevanin T., Jones-Carson J., Castor M., Read R. C., Fang F. C. (2008).** Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice. *Methods Enzymol*; 437:521-38.
- Wald A., Ashley-Morrow R. (2002).** Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*; 35:S173-82.
- Werner E. R., Werner-Felmayer G. (2007).** Substrate and Cofactor Requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: Utilization of oxygen rather than superoxide. *Curr Drug Metabol*; 8:91-107.
- 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 S. J., Knox W. E. (1954).** Biphasic changes of tryptophan peroxidase level in tumor-bearing mice and in mice subjected to growth hormone and stress. *Cancer Res*; 16:1053-8.
- Yamamoto S., Hayaishi O. (1967).** Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem*; 242:2560-6.
- Yoshida R., Hayaishi O. (1978).** Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA*; 75:3998-4000.
- Yoshida R., Urade Y., Nakata K., Watanabe Y., Hayaishi O. (1981).** Specific induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide in the mouse lung. *Arch Biochem Biophys*; 212:629-37.
- Young V. R., El-Khoury A. E. (1996).** Human amino acid requirements: A re-evaluation. *United Nations University Press-Food and Nutrition bulletin*; 17.
- Yuasa H. J., Takubo M., Takahashi A., Hasegawa T., Noma H., Suzuki T. (2003).** Evolution of vertebrate Indoleamine 2,3-Dioxygenases. *J Mol Evol*; 65:705-14.
- Yuasa H. J., Ball H. J., Austin C. J., Hunt N. H. (2010).** 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*; Epub ahead of print.
- Zhang Y., Kang S. A., Mukherjee T., Bale S., Crane B. R., Begley T. P., Ealick S. E. (2007).** Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. *Biochem*; 46:145-55.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denjenigen danken, die mich bei der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift begleitet und unterstützt haben. Zusammen haben wir Zeiten erlebt, in denen gelacht wurde und Erfolge gefeiert wurden, wir haben aber auch gemeinsam Momente des Misserfolgs und des Haderns überstanden.

Ich danke aus tiefstem Herzen ...

... Herrn Prof. Dr. Walter Däubener, der eine hervorragende wissenschaftliche Betreuung dieses interessanten Dissertationsprojektes geleistet hat und mich auch im Hinblick auf meine fachliche, berufliche und persönliche Weiterentwicklung stets gefördert hat.

... Herrn Prof. Dr. J. Ernst, für die Übernahme des Koreferates und die freundliche Betreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

... Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer für die Möglichkeit, diese Dissertation im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in einem netten Arbeitsklima anzufertigen.

... Herrn Prof. Dr. U. Hadding für die sorgfältige Kontrolle dieser Arbeit.

... meinen Mentoren Dr. Stefanie Scheu und Dr. Albert Zimmermann.

... allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt hierbei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe: Stefanie Brockers, Stefanie Brunder, Kathrin Heseler, Vanessa Ince, Margret Leineweber, Marc Quambusch, Katrin Spekker, Silke Stuhlsatz, Wilfried Schwippert, und Claudia Woite, die mir alle jederzeit helfend beiseite gestanden haben.

... Stephan Siepman für die Zusammenarbeit bei den Experimenten zum Einbau des 1-MT.

... André Cohnen, für seine Hilfe und außerdem Oliver Pergher, Lord Florian, Sven Jansen, Katharina Jansen und Yvonne Dau. Ihr seid die besten Freunde, die man sich wünschen kann.

... Stefan Bierbaum und Angi Arendt, die mir in allen Lebenskrisen Halt gegeben haben.

... meiner lieben Familie dafür, dass sie mir zu jeder Zeit in allen meinen Vorhaben eine wichtige Stütze war. Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Vater und meine Mutter und auch an David, meinen lieben Bruder. Euch widme ich diese Arbeit von ganzem Herzen.

... meinem lieben Freund Tobias Eller, der mich stets ermutigt und unterstützt und auf den ich nie mehr verzichten mag.

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

Silvia Kathrin Schmidt