

Expression und Aktivität der Indolamin 2,3-dioxygenase
in humanen Epithelzellen: Regulation durch
Stickstoffmonoxid

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von
Christian Hucke
aus Bad Oeynhausen

Düsseldorf 2003

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

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2003

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf in der Zeit von März 1999 bis November 2002.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Immunantwort und Immunmodulation	8
1.1.1	Allgemeines	8
1.1.2	Die zelluläre Immunabwehr	8
1.1.3	Aktivierung von T-Zellen und Zytokin-Sekretion	9
1.2	Die Zytokine	10
1.2.1	Interferon gamma (IFN γ)	10
1.2.2	Interleukin-1 beta (IL-1 β)	12
1.2.3	Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)	12
1.3	Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen	13
1.3.1	Geschichte	13
1.4	Produktion von NO in zellulären Systemen: die NO-Synthasen	14
1.4.1	Allgemeines	14
1.4.2	Die chemische Reaktion der NO-Produktion	15
1.4.3	Die endotheliale NO-Synthase (eNOS)	17
1.4.4	Die neuronale NO-Synthase (nNOS)	18
1.4.5	Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)	19
1.4.5.1	Regulation der iNOS-Gentranskription	20
1.4.5.2	Die Regulation der iNOS durch Zytokine	21
1.4.6	Die Dauer der NO-Produktion: Regulation <i>versus</i> nitrosativer Stress	22
1.5	Die Chemie von NO in biologischen Systemen	23
1.5.1	NO in verschiedenen Oxidationsstufen	23
1.5.2	Eigenschaften und Reaktionen von NO	24
1.5.3	NO-induzierte Signaltransduktion	25
1.6	Der zelluläre Proteinabbau	26
1.6.1	Das Lysosom	26
1.6.2	Das Proteasom	27
1.6.3	Substraterkennung und Ubiquitinierung	29
1.7	Die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)	30
1.7.1	Die physiologische Bedeutung von Tryptophan	30
1.7.2	Der Kynurenin-Weg	30

1.7.3	Katalytische Eigenschaften derIDO	31
1.7.4	Regulation derIDO-Gentranskription	32
1.7.5	Bedeutung derIDO als Effektor und Modulator im Immunsystem	33
1.7.6	Regulation derIDO durch NO	35
1.8	Konzeption der Arbeit	35
2	Material und Methoden	37
2.1	Material	37
2.1.1	Zellkultur	37
2.1.1.1	Puffer und Medien für die Zellkultur	37
2.1.1.2	Zelllinien	37
2.1.2	Zytokine	37
2.1.3	Antikörper	38
2.1.3.1	Primäre Antikörper	38
2.1.3.2	Sekundäre Antikörper, Peroxidase-gekoppelt	38
2.1.4	Enzyme	38
2.1.5	Größenstandards	39
2.1.5.1	Größenstandards für Proteine	39
2.1.5.2	Größenstandards für Nukleinsäuren	39
2.1.6	Molekularbiologische Kits	39
2.1.7	Oligonukleotide	39
2.1.8	Allgemeine Chemikalien	40
2.1.9	Feinchemikalien	40
2.1.10	Radiochemikalien	41
2.1.11	Allgemeine Lösungen und Puffer	41
2.1.12	Verschiedenes	44
2.2	Methoden	44
2.2.1	Kultivierung und Sicherung von Zelllinien	44
2.2.2	Zellernte und Lebendzellzählung	44
2.2.3	Zellstimulation	45
2.2.4	Nukleinsäure-Untersuchungen	45
2.2.4.1	Präparation von RNA	45
2.2.4.2	Gelelektrophorese von RNA	46
2.2.4.3	Northern Blot	47
2.2.4.4	Sondenherstellung und Hybridisierung	47

2.2.4.5	Gelelektrophorese von DNA.....	48
2.2.4.6	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	48
2.2.5	Untersuchungen von Proteinen	49
2.2.5.1	Präparation von Zellextrakten.....	49
2.2.5.2	Zellextrakte für die Gelelektrophorese.....	50
2.2.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten	50
2.2.5.4	Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	50
2.2.5.5	Western Blot.....	51
2.2.5.6	Antikörpernachweis von Proteinen	51
2.2.6	Bestimmung der IDO-Aktivität im Zellassay	51
2.2.7	Bestimmung der IDO-Aktivität im Zellextrakt	52
2.2.8	Bakterienwachstum im Testsystem	53
2.2.9	Bestimmung der iNOS-Aktivität im Zellassay	54
2.2.10	Bestimmung der iNOS-Aktivität im Zellextrakt.....	55
2.2.11	Realtime-PCR (TaqMan™-Technik).....	56
2.2.12	Chemische NO-Donoren	58
2.2.12.1	Allgemeines	58
2.2.12.2	Diazeniumdiolate (NONOate)	58
2.2.12.3	S-Nitrosothiole (RSNOs).....	59
2.2.13	Eigenschaften und Herstellung der verwendeten NO-Donoren.....	60
2.2.13.1	Diethylentriamin-NONOat (DETA/NO).....	60
2.2.13.2	MAMA/NO.....	60
2.2.13.3	S-nitroso-L-glutathion (GSNO).....	60
2.2.13.4	S-nitroso-L-cystein (SNOC)	60
2.2.13.5	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP).....	61
2.2.14	Bestimmung der zellulären Proteinsyntheserate	62
2.2.15	Pulse-Chase-Experimente und Immunpräzipitation (IP).....	63
2.2.16	Inhibition von zellulären Funktionen	64
2.2.17	Inhibition der Protein- und RNA-Synthese.....	64
2.2.18	Inhibition des lysosomalen Proteinabbaus	65
2.2.19	Inhibition des Proteinabbaus im Proteasom	65
2.2.20	Bestimmung der Proteasom-Aktivität im Zellextrakt	66
3	Ergebnisse	68
3.1	IDO-Aktivität und NO-Produktion in RT4- und A549-Zellen.....	68

3.2	Konsequenzen der IDO-Inhibition für die Erregerabwehr	71
3.3	Qualitative Analyse der Transkription der IDO- und iNOS-Gene	73
3.4	Inhibition der IDO-Enzymaktivität durch chemische NO-Donoren	76
3.5	Einfluss von NO auf das IDO-Protein	78
3.6	Quantitative Untersuchungen zur IDO-Gentranskription	83
3.7	Untersuchungen zur Proteinbiosynthese	92
3.8	Untersuchungen zum Proteinabbau	95
3.9	Inhibition des zellulären Proteinabbaus	97
4	Diskussion	107
4.1	Die Inhibition der IDO-Aktivität durch Stickstoffmonoxid	107
4.2	Funktionelle Konsequenzen der NO-Produktion	109
4.3	Wirkung der Zytokine auf die Transkription des IDO-Gens	110
4.4	Wirkung von NO auf das IDO-Protein	112
4.5	Die IDO-Gentranskription wird durch NO nicht reguliert	113
4.6	Beschleunigter Abbau des IDO-Proteins durch NO	115
4.7	Das Proteasom degradiert das IDO-Protein	116
4.8	NO und die Degradation von Proteinen durch das Proteasom	118
4.9	Situation <i>in vivo</i>	122
5	Referenzen	124
6	Abkürzungsverzeichnis	137
7	Danksagung	141
8	Eidesstattliche Erklärung	142

1 Einleitung

1.1 Immunantwort und Immunmodulation

1.1.1 Allgemeines

Auf eine Infektion mit einem Krankheitserreger reagiert der Körper mit einer sehr komplexen, konzertierten Aktion von verschiedenen Effektorzellen und Effektormolekülen, die allgemein als Immunantwort bezeichnet wird. Sie hat zum Ziel, die Vermehrung des Pathogens im Körper zu unterbinden und, wenn möglich, den Erreger komplett zu eliminieren.

Eine Immunantwort ist ein sehr komplexer Vorgang, und die Wissenschaft ist noch weit davon entfernt ein einheitliches Bild zu liefern. Im Rahmen dieser Arbeit waren zwei Elemente der Immunreaktion von besonderer Bedeutung: die Rolle derIDO-vermittelten Tryptophan-Depletion als antimikrobieller Effektormechanismus und die Produktion von Stickstoffmonoxid als immunmodulatorischer Mechanismus. Die Besonderheit dieser beiden Effekte ist, dass sie nicht nur von Immunzellen wie T- und B-Zellen ausgelöst werden können, sondern von nahezu jeder Körperzelle. Induziert werden beide Effekte durch immunregulatorische Proteine, die Zytokine, wobei hier besonders Interferon gamma ($IFN\gamma$), Interleukin-1 beta ($IL-1\beta$) und der Tumornekrosefaktor alpha ($TNF\alpha$) eine Rolle spielen. Diese Zytokine werden von Zellen produziert, die Bestandteil der zellulären Immunabwehr sind.

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Aspekte der zellulären Immunabwehr erläutert. Dann sollen die drei Zytokine, die für diese Arbeit von Bedeutung waren, näher vorgestellt werden und schließlich werden die Tryptophan-Depletion und die NO-Produktion ausführlich besprochen.

1.1.2 Die zelluläre Immunabwehr

Die Reaktionen des Immunsystems werden grob unterteilt in die humorale und die zelluläre Abwehr. Bei der humoralen Abwehr sind die Effektoren, die gegen ein Pathogen wirken, lösliche Moleküle (lat. „humor“ = Flüssigkeit). Die humorale

Immunabwehr wird durch aktivierte B-Lymphozyten (B-Zellen) vermittelt, welche lösliche Antikörper mit hoher Spezifität gegen ein bestimmtes Pathogen sezernieren. Ein weiterer Bestandteil der humoralen Abwehr ist das Komplementsystem. Es handelt sich dabei um eine Reihe von Plasmaproteinen, welche verschiedene Aufgaben erfüllen (Verstärkung von Phagozytose, Chemotaktik, Lyse von Pathogenen).

Die zelluläre Abwehr ist dadurch gekennzeichnet, dass die Effektoren gegen das Pathogen die Zellen selber sind. Sie wird vor allem getragen von T-Lymphozyten und Makrophagen. Die Wirkungsweise der verschiedenen Zellen ist dabei unterschiedlich: entweder unterstützen oder aktivieren sie andere Zellen durch die Sekretion von Zytokinen (dies ist die Aufgabe von sog. T-Helferzellen, T_H -Zellen), oder sie lysieren infizierte Körperzellen direkt, um eine Vermehrung von Krankheitserregern zu verhindern (zytotoxische T-Zellen und Makrophagen).

1.1.3 Aktivierung von T-Zellen und Zytokin-Sekretion

T-Zellen sind die wichtigsten Produzenten von Zytokinen im Immunsystem. Sie differenzieren sich aus Stammzellen im Knochenmark und reifen in einem anderen primären lymphatischen Organ, dem Thymus (daher die Bezeichnung T-Zelle). Naive (nicht aktivierte) T-Zellen zirkulieren im Blut und in lymphatischen Geweben (Milz, Lymphknoten). Sie können diese Kompartimente verlassen und in andere Gewebe auswandern, wenn sie aktiviert worden sind. Aktivierung bedeutet, dass eine T-Zelle Kontakt mit einem Antigen bekommen hat, welches von ihrem T-Zell-Rezeptor („T cell receptor“, TCR) spezifisch erkannt wird. Diese Aktivierung geschieht durch antigenpräsentierende Zellen („antigen presenting cells“, APC): in lymphatischen Geweben durch die sog. dendritischen Zellen, in anderen Geweben durch dendritische Zellen und sessile Makrophagen, und im zentralen Nervensystem (ZNS) durch Astrozyten und Mikroglia [1]. Diese APC präsentieren die Antigene auf Molekülen, die im Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“, MHC) kodiert sind, sog. MHC-Moleküle. Diese werden in drei verschiedene Klassen (I-III) eingeteilt, wobei für die Antigenpräsentation nur die Moleküle der Klassen I und II zuständig sind. MHC-Moleküle der Klasse I werden auf allen Zellen exprimiert und präsentieren Antigene, die aus der präsentierenden Zelle

selbst stammen. Das können Peptide von zelleigenen Molekülen sein, aber auch Peptide von Pathogenen die eine Körperzelle infiziert haben. MHC-Moleküle der Klasse I interagieren mit sog. zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$ -Zellen, CTL). Nach Bindung des Antigens tötet die T-Zelle die präsentierende Zelle durch Ausschüttung von zytotoxischen Stoffen (z. B. Perforin), um eine Vermehrung des Pathogens einzudämmen. Neben dieser zytotoxischen Wirkung spielen $CD8^+$ -Zellen aber auch noch eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort durch die Produktion von Zytokinen, wobei hier vor allem $IFN\gamma$ zu nennen ist.

MHC-Moleküle der Klasse II, welche nur auf professionellen APC exprimiert werden, bedienen eine andere T-Zell-Population, die sog. T-Helferzellen (T_H -Zellen) oder $CD4^+$ -Zellen. Die von ihnen präsentierten Antigene stammen aus dem extrazellulären Raum und wurden durch Phagozytose von der präsentierenden Zelle aufgenommen. Nach ihrer Aktivierung beginnen T_H -Zellen mit der Produktion von Zytokinen. Je nach Zytokin-Sekretionsprofil unterscheidet man zwei Arten von T_H -Zellen: T_H1 -Zellen produzieren vor allem $IFN\gamma$, T_H2 -Zellen vor allem die Interleukine 4 und 5 (IL-4 und IL-5). Die T_H -Zellen sind damit die wichtigsten Modulatoren einer Immunantwort, denn die Zytokin-Umgebung am Infektionsort steuert die Aktionen aller beteiligten Zellen. Daher spricht man auch, je nach dem dominanten Zytokin-Sekretionsprofil, von einer T_H1 -Antwort oder einer T_H2 -Antwort [2].

Die in dieser Arbeit untersuchten Effektormechanismen spielen bei einer T_H1 -Antwort eine Rolle, denn die Zytokine, welche die hier untersuchten Mechanismen induzieren, gehören zum Sekretionsprofil einer T_H1 -Zelle bzw. werden im Laufe einer T_H1 -Antwort gebildet. Die drei wichtigsten Induktoren der Tryptophan-Depletion und der NO-Produktion sollen hier kurz beschrieben werden.

1.2 Die Zytokine

1.2.1 Interferon gamma ($IFN\gamma$)

$IFN\gamma$ wurde 1965 von E. F. Wheelock als antivirale Substanz entdeckt [3]. Es handelt sich um ein Zytokin mit immunregulatorischer, antiinfektiöser und antiproliferativer Wirkung. $IFN\gamma$ wird produziert von aktivierten T_H1 -Zellen, aktivierten $CD8^+$ -Zellen und einer bestimmten Art von zytotoxischen Zellen, deren Abstammung noch nicht genau

geklärt ist (sog. „natürliche Killerzellen“, NK-Zellen). Bis heute sind über 200 Gene bekannt, deren Expression durch $\text{IFN}\gamma$ reguliert wird. Es existiert also eine sehr komplexe Zellantwort auf $\text{IFN}\gamma$, wobei aber jede Funktion als eine Regulation des Immunsystems und als schützende Kontrolle von Infektionen interpretiert werden kann. Zu den bedeutendsten von $\text{IFN}\gamma$ induzierten Mechanismen zählen die Tryptophan-Depletion, die Produktion von NO, die Verstärkung der Expression von MHC-Molekülen und die Aktivierung von Makrophagen (Review [4]).

$\text{IFN}\gamma$ reagiert mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche (CD119, Review [5]), der auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird [6]. Die Bindung von $\text{IFN}\gamma$ an den Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die als Jak-STAT-Signalweg bekannt wurde (Reviews [7,8]). Dieser Signalweg spielt nicht nur bei $\text{IFN}\gamma$ eine Rolle, sondern auch bei anderen Zytokinen. Nach Bindung von $\text{IFN}\gamma$ werden zwei Mitglieder der Familie der Janus-Kinasen (Jaks, hier Jak1 und Jak2), die mit dem $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor assoziiert sind, durch gegenseitige Phosphorylierung aktiviert. Die aktivierten Kinasen phosphorylieren dann einen als inaktives Monomer latent im Zytoplasma vorliegenden Transkriptionsfaktor, den $\text{STAT1}\alpha$ (STAT steht für „signal transducer and activator of transcription“). Diese Phosphorylierung führt zur Bildung von $\text{STAT1}\alpha$ -Homodimeren, welche in den Nukleus einwandern und dort durch Bindung an definierte DNA-Sequenzen („gamma activated site“, GAS) die Transkription einer Reihe von Genen initiieren.

Die Aktivierung von STATs wird als eine primäre Antwort auf $\text{IFN}\gamma$ bezeichnet. Einige der durch die STATs aktivierten Gene kodieren jedoch selbst wieder für Transkriptionsfaktoren, welche dann als eine sekundäre Antwort auf $\text{IFN}\gamma$ weitere Gene regulieren, wodurch die Zahl der durch $\text{IFN}\gamma$ beeinflussten Gene immens steigt. Träger einer solchen sekundären Antwort ist vor allem die Familie der „interferon regulatory factors“ (IRFs, Review [9]). Ihr wichtigster Vertreter ist IRF-1, welcher außer durch $\text{IFN}\gamma$ auch noch durch $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ induzierbar ist und an sog. ISRE-Sequenzen in der DNA bindet („Interferon stimulated response element“). Die Regulation vieler Gene wird sowohl durch $\text{STAT1}\alpha$ als auch durch IRF-1 beeinflusst, so auch das Gen für die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) und das Gen für die induzierbare NO-Synthase (iNOS).

1.2.2 Interleukin-1 beta (IL-1 β)

Interleukin 1 β wird vor allem von Makrophagen und T_H1-Zellen produziert, aber u. a. auch von Keratinozyten, Astrozyten und Endothelzellen. Es ist das wichtigste proinflammatorische Zytokin: so steigert es u. a. die Produktion von IFN γ und Prostaglandinen in Makrophagen, ist wichtig für die Reifung von Prä-B-Zellen und steigert die Fähigkeit von APC, T-Zellen zu aktivieren [10].

IL-1 β bindet auf Zielzellen an den IL-1-Rezeptor Typ I (IL-1RI, CD120). Der Rezeptor vom Typ II bindet zwar auch IL-1 β , transduziert aufgrund einer fehlenden zytoplasmatischen Domäne aber kein Signal und wird daher als „Köder-Rezeptor“ („decoy receptor“) bezeichnet, welcher die Wirkung von IL-1 β abschwächt.

Die vom IL-1RI ausgelöste Signaltransduktion vollzieht sich auf mindestens zwei unabhängigen Wegen. Der erste Weg läuft über die Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K) und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Der zweite Weg läuft über Mitglieder der Familie der „IL-1 receptor associated kinases“ (IRAKs) und führt sowohl zur Aktivierung von NF- κ B als auch zur Rekrutierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), welche ihrerseits wieder verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren (Review [11]). Die Anzahl der durch IL-1 β direkt oder indirekt regulierten Gene ist daher sehr hoch und macht das IL-1 β zu einem der wichtigsten Modulatoren des Immunsystems.

1.2.3 Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

Der TNF α wurde bekannt als ein Molekül, welches bei der Abtötung von Tumoren in Mäusen eine wichtige Rolle spielt. TNF α induziert viele inflammatorische Effekte, z. B. die IL-1 β -Produktion in Makrophagen, die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel und die Expression von MHC Klasse I und II Molekülen. Produziert wird TNF α vor allem von T-Zellen, Monozyten und Makrophagen [10].

Der TNF α war das erste bekannte Mitglied einer Proteinfamilie, die als TNF-Superfamilie bezeichnet wird. Sie besteht aus (heute bekannten) 19 Mitgliedern, von denen fast alle membrangebunden vorkommen (TNF-Liganden, Review [12]) und deren biologisch aktive Form immer ein Trimer ist. Zu ihnen gehört u. a. der

wichtigste Vermittler der ligandenabhängigen Apoptose, der Fas-Ligand (FasL, CD95L).

TNF α bindet an zwei Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, wobei aber der TNFR1 die meisten der biologischen Effekte des TNF α vermittelt. Der TNFR2 scheint nur einige spezielle Signale in Lymphozyten zu transduzieren. Die von dem TNFR1 vermittelte Signaltransduktion vollzieht sich auf drei Wegen (Review [13]). Der erste führt über die Aktivierung der Caspase-8 zur Apoptose einer dafür empfänglichen Zelle, der zweite über eine Kaskade von MAP-Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun. Der dritte Weg rekrutiert den I κ B-Kinase-Komplex und führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Da sich diese drei Signalwege zusätzlich gegenseitig beeinflussen, ist die zelluläre Antwort auf TNF α sehr komplex und auch zelltyp-spezifisch.

Die oben beschriebenen Zytokine sind die wichtigsten Modulatoren einer Immunantwort. Sie regulieren auf Transkriptionsebene viele Gene, deren Produkte selbst Effekte auf Krankheitserreger ausüben oder diese Effekte regulieren. Zu den beeinflussten Effekten gehören auch die Mechanismen, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt: die Tryptophan-Depletion und die NO-Produktion. Diese beiden Mechanismen sollen im folgenden näher erläutert werden.

1.3 Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen

1.3.1 Geschichte

Die Geschichte des Stickstoffmonoxid (NO) als bioaktives Molekül beginnt bereits im 19. Jahrhundert. Schon zu dieser Zeit wurde Nitroglyzerin als Medikament verschrieben, welches bei Angina pectoris sofortige Linderung verschafft. Etwa 150 Jahre später begannen Pharmakologen, die Wirkungsweise solcher gefäßerweiternden (vasodilatatorischen) Stoffe zu untersuchen.

Ferid Murad fand 1977 heraus, dass Nitroglyzerin NO freisetzt und dass dieses Gas glatte Muskelzellen relaxiert [14] Er stellte die These auf, dass auch endogene Faktoren, z.B. Hormone, über NO wirken könnten. Dafür gab es zu der Zeit aber keinen experimentellen Beweis.

Etwa zu der gleichen Zeit erforschte der New Yorker Pharmakologe Robert Furchgott die Wirkung verschiedener Substanzen auf Blutgefäße. Er fand heraus, dass Acetylcholin Blutgefäße nur entspannt, wenn das unter den glatten Muskeln liegende Endothel intakt ist [15]. Er postulierte, dass das Endothel einen unbekanntem Botenstoff produziert, welcher für die Relaxation der Muskelzellen sorgt („endothelium derived relaxing factor“, EDRF) und regte die Suche nach diesem Botenstoff an.

An dieser Suche beteiligte sich auch Louis Ignarro. Er fand 1986, zeitgleich mit und unabhängig von Furchgott heraus, dass der EDRF identisch ist mit NO [16].

Für ihre Entdeckungen zu dem Thema „Stickstoffmonoxid als Signalmolekül im kardiovaskulären System“ erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin.

Heute ist bekannt, dass NO eines der wichtigsten Signal- und Effektormoleküle in Säugetierzellen ist. In nahezu jedem Organismus wird eine Vielzahl von Prozessen durch NO ausgelöst oder reguliert. Im Folgenden soll nun über die Aspekte, die im Rahmen dieser Arbeit eine Rolle gespielt haben, ein Überblick präsentiert werden.

1.4 Produktion von NO in zellulären Systemen: die NO-Synthasen

1.4.1 Allgemeines

In Zellen wird NO von den Mitgliedern einer Enzymfamilie produziert, die als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden. Bis heute wurden drei Isoformen der NOS identifiziert: sie sind Produkte verschiedener Gene, sind unterschiedlich lokalisiert und reguliert und haben unterschiedliche katalytische Eigenschaften (Review [17]). Diese drei Isoformen werden nach der gebräuchlichsten Nomenklatur folgendermaßen bezeichnet:

- neuronale NOS oder nNOS (auch NOS-I)
- induzierbare NOS oder iNOS (auch NOS-II)
- endotheliale NOS oder eNOS (auch NOS-III)

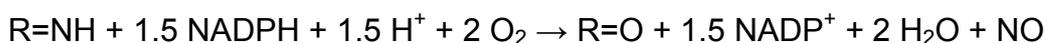
Die Sequenzen der einzelnen Isoformen sind durch alle Spezies hindurch hoch konserviert (80-94% Identität), aber die Sequenzidentität zwischen den Isoformen ist relativ gering (50-57%). Alle Isoformen haben folgende strukturelle und katalytische Gemeinsamkeiten:

1. Die aktive Form wird vereinfacht als Homodimer bezeichnet. Dabei wird allerdings außer acht gelassen, dass jede Untereinheit noch ein Molekül Calmodulin (CaM) gebunden hat. Streng gesehen ist die aktive Form einer NOS daher ein Heterotetramer, bestehend aus zwei Monomeren der NOS und zwei Molekülen Calmodulin.
2. Die NOS benötigen für die Katalyse eine Reihe von fest gebundenen Kofaktoren. Diese sind (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Eisen-Protoporphyrin IX (Häm).
3. Alle NOS katalysieren eine Reaktion von L-Arginin (L-Arg), reduziertem β-Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) und Sauerstoff (O₂) zu NADP⁺, L-Citrullin und NO.

1.4.2 Die chemische Reaktion der NO-Produktion

Die NOS-Monomere zeigen eine Zwei-Domänen-Struktur. Dabei spricht man von einer N-terminalen Oxygenase-Domäne, welche die Bindestellen für Häm, BH₄ und L-Arginin sowie ein Zink-Tetrathiolat-Cluster (Zink koordiniert von je zwei Cysteinen aus jeder Untereinheit) beinhaltet. Sie wird über die CaM-Interaktionsstelle verbunden mit einer C-terminalen Reduktase-Domäne, in welcher die Bindestellen für FAD, FMN und NADPH lokalisiert sind.

Die Struktur der NOS-Enzyme (und die Nomenklatur der Domänen) kann erklärt werden durch die von ihnen katalysierte Reaktion. Dies ist die Oxidation von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin, NO und Wasser. Der Elektronendonator dieser Reaktion ist das NADPH. Die komplette Reaktionsgleichung lautet:



Dabei bezeichnet R=NH L-Arginin und R=O L-Citrullin.

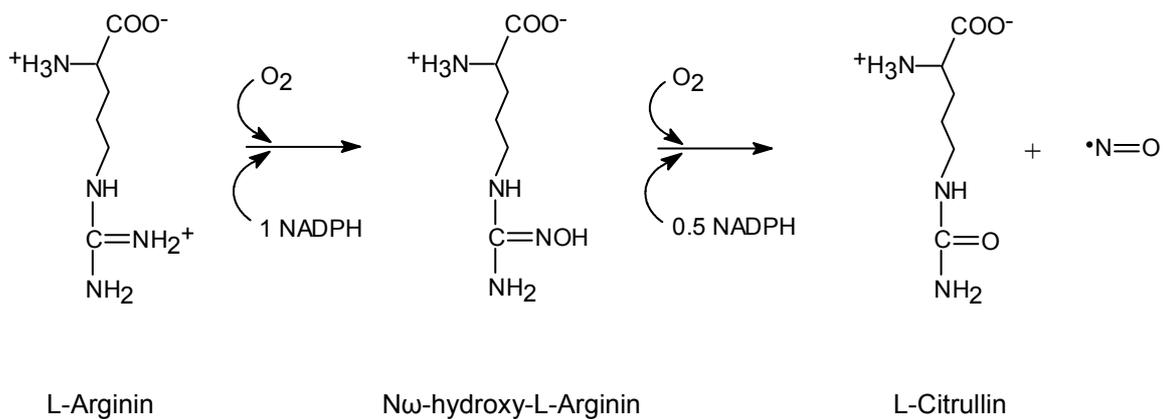
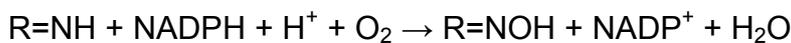
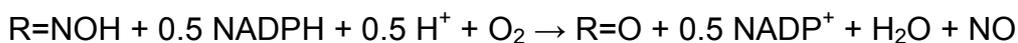


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO

Bei dieser Reaktion entsteht ein stabiles, isolierbares Zwischenprodukt, das N^ω-hydroxy-L-arginin (R=NOH, NAH) [18]. Daher wird die Gesamtreaktion formal in zwei einzelne „Monooxygenase-Reaktionen“ unterteilt, wobei die erste bis zu diesem Zwischenprodukt läuft („Monooxygenase I“):



Dies ist formal eine typische Monooxygenase-Reaktion, bei der von dem Substrat O₂ ein Atom in ein (Zwischen-)Produkt eingebaut wird, das andere bildet zusammen mit zwei Protonen Wasser. Dies ist auch bei der zweiten Teilreaktion der Fall („Monooxygenase II“):



Diese Reaktionen laufen an der Oxygenase-Domäne der NOS ab, daher der Name. Die Reduktase-Domäne hat große strukturelle Ähnlichkeit mit der Proteinfamilie der Cytochrom P-450 Reduktasen [19]. Die in der Reduktase-Domäne gebundenen Flavine dienen der Kopplung des Zwei-Elektronen-Donators NADPH an den Ein-Elektronen-Akzeptor Häm durch die Bildung stabiler Semichinon-Radikale [20]. Der Elektronenfluß läuft von NADPH über FAD zu FMN und weiter zum Häm. Dabei gibt die Reduktase-Domäne der einen Untereinheit die Elektronen an die Oxygenase-Domäne der anderen Untereinheit weiter. Dies scheint der Hauptgrund dafür zu sein, dass ein NOS-Monomer katalytisch inaktiv ist. Die Rollen des Zink, des BH₄ und des

CaM bei dieser Reaktion, sowie auch der genaue Reaktionsmechanismus, sind noch nicht vollständig geklärt.

Die drei Isoformen der NOS-Enzyme sind bezüglich ihrer Regulation und ihrer Verteilung in Zellen und Geweben sehr verschieden. Da für diese Arbeit nur die iNOS eine Bedeutung hatte, soll vor allem ihre Regulation und Aktivierung genauer besprochen werden. Die Eigenschaften und Funktionen der anderen beiden NOS-Enzyme wird nur kurz erläutert.

1.4.3 Die endotheliale NO-Synthase (eNOS)

Die humane eNOS ist ein Protein mit einer Größe von 133 kD, bestehend aus 1203 Aminosäuren. Das kodierende Gen liegt auf Chromosom 7 und besteht aus 26 Exons und 25 Introns [17].

Die eNOS kommt hauptsächlich im vaskulären Endothel vor, und das von ihr produzierte NO bewirkt u. a. die Relaxation der darunter liegenden Gefäßmuskulatur. Die eNOS wird aber auch in mehreren anderen Geweben exprimiert, u. a. in Fibroblasten und Keratinozyten (Review [21]). Die eNOS kommt ausschließlich membrangebunden vor. Der Grund dafür ist, dass sie als einzige NOS myristoyliert und palmitoyliert wird, und über diese Fettsäure-Reste ist sie mit detergent-unlöslichen Mikrodomänen der Plasmamembran assoziiert, den Caveolae [22].

Die Aktivität der eNOS und der nNOS sind von einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels abhängig. Diese Kalzium-Abhängigkeit wird über das Calmodulin vermittelt. Die nNOS und die eNOS unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur von der iNOS durch eine Insertion von 40-50 Aminosäuren in der Mitte der FMN-bindenden Subdomäne, die sog. autoinhibitorische Schleife. Diese verhindert bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration die Bindung von CaM an die NOS, und damit eine Aktivierung des Enzyms [17]. Da die iNOS eine solche autoinhibitorische Schleife nicht besitzt, kann CaM auch bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen an die iNOS binden, und die iNOS-Aktivität ist daher nicht von einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels abhängig.

Obwohl die eNOS als konstitutiv exprimiertes Protein bekannt wurde, ist heute klar dass die Transkription des eNOS-Gens auch reguliert ist. So verstärken z. B. Östrogene die Transkription des Gens in humanen Endothelzellen etwa zweifach [23]

und $\text{TNF}\alpha$ verringert die Halbwertszeit der eNOS-mRNA [24]. Auch scheint die Aktivität der eNOS von induzierbaren Mechanismen abhängig zu sein: $\text{IFN}\gamma$ verstärkt die eNOS-Aktivität in humanen Endothelzellen durch Induktion der GTP-Cyclohydrolase I, des ersten Enzyms des Syntheseweges von BH_4 [25]. Für die eNOS sind auch Interaktionspartner auf Proteinebene bekannt: So verstärkt eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase Akt die Aktivität der eNOS [26], und den gleichen Effekt hat eine Interaktion der eNOS mit dem molekularen Chaperon Hsp90 [27].

1.4.4 Die neuronale NO-Synthase (nNOS)

Die nNOS ist, in ihrer am häufigsten vorkommenden Form, das größte der NOS-Enzyme. Ein Monomer hat ein Molekulargewicht von 161 kD und besteht aus 1434 Aminosäuren [17].

Die nNOS kommt hauptsächlich in Neuronen vor, wo NO als Neurotransmitter wirkt [28]. Die nNOS aus dem Cerebellum der Ratte war die erste klonierte und exprimierte NOS-Isoform überhaupt [19]. Bei der Klonierung der humanen nNOS fiel auf, dass sie nicht nur in Neuronen, sondern auch in Skelettmuskeln stark exprimiert wird [29], und sie wurde bei anderen Spezies auch noch in weiteren Geweben gefunden (Review [21]).

Die nNOS ist an vielen lebenswichtigen Prozessen beteiligt, so im zentralen Nervensystem (ZNS) an der Gedächtnisbildung [30] und im peripheren Nervensystem (PNS) an der Peniserektion [31]. Die Rolle von NO im Nervensystem wird kontrovers diskutiert, es scheinen neben der Neurotransmitter-Funktion auch neuroprotektive und neurodestruktive Effekte aufzutreten [32,33].

Das nNOS-Protein, welches wie die eNOS zu den kalzium-abhängigen Isoformen zählt, weist einige Besonderheiten auf. Zum einen besitzt es als einzige NOS eine N-terminale PDZ-Domäne (PSD-95 discs large / ZO-1 homology domain), über die es mit dem Neuron-spezifischen Protein PSD-95 (post synaptic density protein 95) interagiert. Diese Interaktion dient wahrscheinlich der Kopplung der nNOS an N-methyl-D-aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), die ebenfalls an PSD-95 binden [34]. Zum anderen existieren von der nNOS mehrere Spleißvarianten, bezeichnet als nNOS- β , - γ , - μ und nNOS-2 [17]. Von diesen besitzen zwei (nNOS- β und - γ) keine

PDZ-Domäne, so daß von der nNOS membranständige (mit PDZ-Domäne) und lösliche Formen (ohne PDZ-Domäne) auftreten.

Eine weitere Besonderheit der nNOS bezieht sich auf ihr eigenes Reaktionsprodukt: sie scheint durch NO effizient inhibiert zu werden [35]. Dieses Phänomen wurde bisher noch bei der iNOS beobachtet, allerdings in stark abgeschwächter Form [36], und bei der eNOS überhaupt nicht. Der genaue Mechanismus dieser Regulation und ihre Bedeutung *in vivo* sind noch unklar. Auch für die nNOS sind Interaktionspartner auf Proteinebene bekannt. Sie wird durch Phosphorylierung reguliert, durch die Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaM-Kinase II), aber anders als bei der eNOS wirkt die Phosphorylierung hier inhibitorisch [37].

1.4.5 Die induzierbare NO-Synthase (iNOS)

Das iNOS-Gen liegt auf Chromosom 17 und kodiert für ein Protein von 1153 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 131 kD [17]. Die genomische Struktur des Gens ist der Struktur der anderen NOS-Gene sehr ähnlich, was die Abstammung von einem gemeinsamen Vorläufer-Gen vermuten lässt.

1992 gelangen die ersten Klonierungen und Expressionen einer iNOS-cDNA aus Makrophagen der Maus durch die Arbeitsgruppen von Snyder [38], Cunningham [39] und Nathan [40]. Ein Jahr später konnten auch die Enzyme aus der Ratte [41] und dem Menschen [42,43] dargestellt werden. Bei den Untersuchungen zur iNOS fiel zunächst auf, dass die Aktivität des Enzyms im Gegensatz zu den anderen NOS nicht von einer Erhöhung des zellulären Kalziumspiegels abhängig ist und die iNOS immer Calmodulin als fest gebundene Untereinheit mit sich führt [44]. Der Grund dafür wurde bereits genannt: aufgrund des Fehlens einer autoinhibitorischen Schleife kann CaM auch bei niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen an die iNOS binden.

Bis vor kurzem wurde allgemein angenommen, dass die iNOS ausschließlich auf Transkriptionsebene reguliert wird. Dann entdeckte die Arbeitsgruppe von Lowenstein, dass die iNOS im ZNS mit dem Protein Kalirin interagiert, welches anscheinend die Dimerisierung des Enzyms verhindert und somit evtl. eine neuroprotektive Rolle bei Infektionen des ZNS spielen könnte [45]. Weiterhin entdeckten Musial *et al.* bei Untersuchungen an humanen Epithelzellen (RT4 und HEK293), dass die iNOS durch das Proteasom degradiert wird [46]. Felley-Bosco *et al.* konnten zeigen, dass dieser Abbau an der Zellmembran stattfindet und eine

kurzzeitige Bindung der iNOS an das Caveolae-Protein Caveolin-1 voraussetzt [47]. Damit sind erste Interaktionspartner des iNOS-Proteins identifiziert worden.

1.4.5.1 Regulation der iNOS-Gentranskription

So wie heute klar ist, dass die „konstitutiven“ Isoformen auch auf Transkriptionsebene reguliert werden, so sind auch Zellen und Gewebe gefunden worden, in denen die „induzierbare“ Isoform konstitutiv exprimiert wird. Dies sind vor allem das humane respiratorische Epithel [48], aber auch virus-infizierte B-Zellen [49]. In den meisten Zellen und Geweben wird die iNOS aber erst nach einer Induktion der Gentranskription durch Zytokine oder inflammatorische Stoffe wie das Lipopolysaccharid (LPS) der bakteriellen Zellwände exprimiert.

Die ersten Untersuchungen zu der Gentranskription wurden an Maus-Makrophagen gemacht. Nach Arbeiten von Xie [50] und Lowenstein [51] wurden zwei diskrete Regionen (I und II) im iNOS-Promotor identifiziert, welche die Induktion durch LPS und $\text{IFN}\gamma$ vermitteln und Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren enthalten. Lowenstein *et al.* deletierten die Region I und fanden, dass die Region II alleine nicht ausreicht, um eine Gentranskription zu induzieren. Sie wirkt wahrscheinlich vor allem als Enhancer. Spätere genauere Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe von Nathan zeigten, dass ein NF- κ B-Element bei -86 bp in der Region I für die Aktivierung durch LPS essentiell ist [52], und dass eine weiter stromaufwärts gelegene Bindestelle für IRF-1 zu der Aktivierung durch $\text{IFN}\gamma$ beiträgt [53]. Die Erfordernis von IRF-1 wurde von einer anderen Gruppe durch Experimente mit Makrophagen, bei denen das IRF-1-Gen ausgeschaltet wurde, bestätigt [54]. Für eine volle Expression des iNOS-Gens ist außerdem ein GAS-Element (Bindestelle für STAT1) in der Region II wichtig [55].

Den humanen iNOS-Promotor untersuchte vor allem die Arbeitsgruppe von Geller. Die Situation ist hier ähnlich wie bei der Maus, die gleichen Zytokine wirken über die gleichen Transkriptionsfaktoren stimulatorisch. Der Promotor scheint aber wesentlich komplizierter aufgebaut zu sein: während sich bei dem Maus-Promotor alle relevanten Elemente für eine Induktion innerhalb der ersten 1 kb der 5'-flankierenden Region befinden, sind beim menschlichen Promotor für eine volle Induktion 16 kb 5'-flankierende Region notwendig [56].

1.4.5.2 Die Regulation der iNOS durch Zytokine

Die Regulation der iNOS durch Zytokine wurde vor allem indirekt untersucht, über den Effekt der als erster von der iNOS bekannt war: das Abtöten intrazellulärer Parasiten durch Maus-Makrophagen. Hibbs *et al.* entdeckten 1987, dass die Anti-Tumor-Aktivität von Nagetier-Makrophagen L-Arginin-abhängig ist [57]. Die zytotoxische Substanz stellte sich später als NO heraus [58]. Dann wurde erkannt, dass die iNOS-Aktivität in diesen Zellen auch zur Abwehr gegen verschiedene Parasiten beiträgt (Review [59]). Zu diesen NO-sensitiven Parasiten zählen *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma mansoni* [60] und *Leishmania spec.* [61]. Für diesen antiparasitären Effekt müssen die Makrophagen aber erst durch Zytokine aktiviert werden, d. h. es muss eine Induktion der iNOS-Aktivität erfolgen. Zu dieser Regulation kann allgemein gesagt werden, dass T_H1-Zytokine (IFN γ , TNF α) die iNOS-Induktion stimulieren [62], während die T_H2-Zytokine (u. a. IL-4, IL-10) negativ regulatorisch wirken und die Fähigkeit von Makrophagen, NO-sensitive Parasiten zu töten, unterdrücken können [63]. Auch von dieser Regel gibt es allerdings Ausnahmen. So kann IL-4, wenn es nach einer Aktivierung durch IFN γ verabreicht wird, die NO-Produktion von murinen Makrophagen *in vitro* verstärken [63] und auch humane Monozyten produzieren *in vitro* NO nach Gabe von IFN γ und IL-4 [64]. Ähnlich kontroverse Berichte liegen vor für IL-10 [61,65] und den transformierende Wachstumsfaktor beta („transforming growth factor beta“, TGF- β). TGF- β hemmt die iNOS-Induktion in murinen Makrophagen durch Destabilisierung der mRNA und verstärkten Abbau des Enzyms [66], während er in murinen Fibroblasten die Induktion verstärkt [67].

Die zellulären Antworten auf die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen sind in Bezug auf die iNOS-Induktion also sehr komplex und außerdem zelltyp-spezifisch. Dies gilt auch im humanen System und auch für die aktivierenden Zytokine. Ganster *et al.* untersuchten die Bedeutung von STAT1 und NF- κ B für die iNOS-Induktion in A549-Zellen und in Fibroblasten. Sie fanden, dass STAT1 in A549 der wichtigste Induktor der iNOS-Gentranskription ist, während er in Fibroblasten sowohl die basale als auch die NF- κ B-stimulierte Transkription inhibiert [68]. Diese zelltyp-spezifischen Antworten auf Zytokine zeigen deutlich, dass eine lokale Immunantwort, an der notwendiger Weise immer verschiedene Zellen und Gewebe beteiligt sind, sehr fein ausbalanciert sein muss. Wie dies *in vivo* genau bewerkstelligt wird ist noch unklar. Es ist jedoch unbestritten, dass während einer Krankheit im menschlichen Körper

eine erhöhte NO-Produktion stattfindet. Die stabilen Reaktionsprodukte von NO mit Wasser, Nitrit und Nitrat, sind im Körper nachweisbar, und erhöhte Nitrit / Nitrat-Werte in Urin und Plasma wurden u. a. bei Krebspatienten während einer IL-2-Therapie [69] und bei Patienten mit einer Sepsis [70] nachgewiesen. Dabei ist NO im Menschen, anders als bei Nagetieren, wahrscheinlich kein Bestandteil der direkten Erregerabwehr. Zwar exprimieren fast alle menschlichen Zellen nach einem geeigneten Stimulus die iNOS, aber die NO-Produktion ist in allen Fällen geringer als bei Nagetier-Makrophagen. Vor allem humane Makrophagen sind eher schwache NO-Produzenten. Der iNOS kommt daher im menschlichen Immunsystem wohl keine antimikrobielle, sondern eher eine immunmodulatorische Rolle zu.

1.4.6 Die Dauer der NO-Produktion: Regulation versus nitrosativer Stress

Die wichtigste Eigenschaft, in der sich die NOS-Isoformen unterscheiden, hat auch direkten Einfluss auf die biologischen Effekte: die Dauer der NO-Produktion. Die eNOS und die nNOS werden auf Proteinebene stark reguliert, vor allem durch die Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und Phosphorylierung. Diese konstitutiven Enzyme produzieren daher NO in kurzen Pulsen, wobei zwar kurzzeitig genug NO entsteht um eine Signalkaskade auszulösen, aber es bildet sich keine dauerhaft hohe steady-state-Konzentration an NO. Für die iNOS ist aber kein Faktor bekannt, der ein einmal gebildetes, aktives Dimer wieder inaktiviert. Die iNOS bildet daher so lange NO, wie das Enzym funktionstüchtig ist und Substrat sowie Kofaktoren zur Verfügung stehen [71]. *In vitro* können iNOS-exprimierende murine Makrophagen eine steady-state-Konzentration von bis zu $4\mu\text{M}$ NO für 24 Stunden oder länger erzeugen [72]. Diese langfristige Anwesenheit von hohen Mengen NO hat auf Zellen einen Effekt, der als „nitrosativer Stress“ bezeichnet wird und bis zur Apoptose bzw. Nekrose von Zellen führen kann. Dieser nitrosative Stress steht im Verdacht, am Verlauf mehrerer Krankheiten beteiligt zu sein bzw. die Krankheiten direkt auszulösen. So wird eine langfristig erhöhte NO-Produktion in Verbindung gebracht mit einem schwierigen Verlauf von Infektionen, mit einigen Autoimmunkrankheiten und mit chronisch entzündlichen Erkrankungen (Review [71]).

Es gibt zwei Arten von Effekten, die NO auf Zellen hat: die Auslösung einer oder mehrerer Signalkaskaden und die Erzeugung von nitrosativem Stress. Während für die Aktivierung der Signalkaskaden nur geringe NO-Konzentrationen notwendig sind,

die von allen drei NOS-Isoformen produziert werden können, wird nitrosativer Stress nur durch die iNOS erzeugt bzw. nur durch eine andauernde NO-Produktion. Während die Signalkaskaden zelluläre Funktionen steuern, hat nitrosativer Stress oft einen schädigenden Charakter. Beiden Effekten liegen aber prinzipiell die gleichen chemischen Reaktionen von NO mit Zielmolekülen zugrunde.

1.5 Die Chemie von NO in biologischen Systemen

1.5.1 NO in verschiedenen Oxidationsstufen

Das Molekül Stickstoffmonoxid kann in drei verschiedenen Oxidationsstufen vorliegen [73]. Im Allgemeinen bezeichnet man mit „NO“ das NO-Radikal mit einem freien, antibindenden Elektron (Oxidationszahl des Stickstoffs: +2). Dieses freie Elektron wird relativ leicht abgegeben. Das Produkt einer solchen Oxidation ist das Nitrosonium-Ion NO^+ (Oxidationsstufe: +3). Das NO-Radikal kann auch reduziert werden zum Nitroxyl-Ion NO^- (Oxidationsstufe: +1). In dieser Arbeit wird die Bezeichnung NO stellvertretend für alle drei Spezies verwendet, wenn nicht explizit auf den genauen Charakter einer bestimmten Verbindung hingewiesen wird.

Wie Laborversuche zeigten, ist die Oxidationsstufe eines NO-Moleküls entscheidend für seine chemische Reaktivität, und damit auch für die Effekte die es in biologischen Systemen ausübt. Desweiteren sind der lipophile Charakter und die relativ lange Halbwertszeit im Bereich von Sekunden [74] von Bedeutung, denn diese Eigenschaften erlauben dem Molekül über eine gewisse Strecke zu diffundieren und so Effekte auf Zellen auszuüben, die selbst kein NO produzieren.

Das NO-Radikal reagiert gut mit Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer und ist wahrscheinlich die Spezies, welche für die Interaktion von NO mit Häm-Eisen verantwortlich ist. Dies ist ein wichtiger Effekt in lebenden Systemen, denn eine Reihe von Enzymen mit Häm als prosthetischer Gruppe werden durch NO reguliert. Das Nitroxyl-Ion NO^- ist extrem instabil und wird *in vivo* wahrscheinlich nicht gebildet, bzw. vermittelt *in vivo* aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit keine biologischen Effekte. Das Nitrosonium-Ion NO^+ ist sehr kurzlebig (Halbwertszeit in Wasser ca. 3×10^{-10} s) und existiert nur in saurer Lösung in seiner reinen Form. Durch die Reaktion des NO-Radikals mit Sauerstoff entstehen jedoch höhere Stickoxide, die ebenfalls NO^+ -Charakter haben [73]. Diese Spezies sind wahrscheinlich für einen

anderen wichtigen Effekt verantwortlich, welcher die Aktivität von zellulären Proteinen reguliert: die S-Nitrosierung von Cystein. Diese Reaktion bezeichnet die Oxidation der Thiolgruppe von Cystein (R-SH) zu einer S-Nitrosothiolgruppe (R-SNO) in Anwesenheit von NO und Sauerstoff:



Diese Reaktion findet unter anaeroben Bedingungen nicht statt. Daher wird vermutet, dass nicht NO selbst das nitrosierende Agens ist, sondern ein Reaktionsprodukt von NO und O₂ (Reviews [75,76]). Die wichtigsten Reaktionen von NO mit Sauerstoff-Spezies sind in Abbildung 2 dargestellt. Das Distickstofftrioxid N₂O₃ gilt als wahrscheinlichster Kandidat für ein S-nitrosierendes Agens, da es langlebiger ist als N₂O₄.

1.5.2 Eigenschaften und Reaktionen von NO

NO reagiert sehr gut mit Sauerstoff und wird daher in biologischen Systemen leicht oxidiert. Die Produkte solcher Oxidationen sind höhere Stickoxide (NO_x), welche auch als reaktive Stickstoff-Intermediate („reactive nitrogen intermediates“, RNIs) bezeichnet werden.

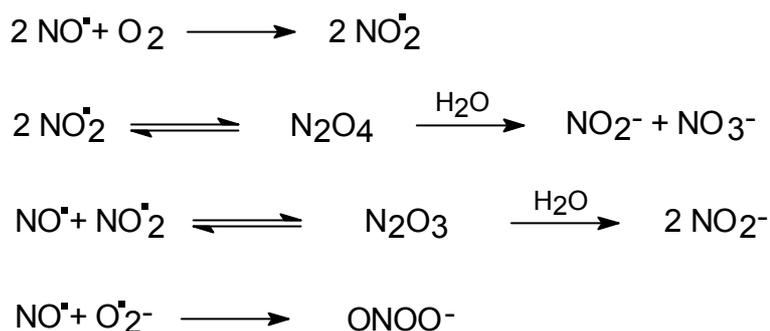


Abb. 2: Die wichtigsten Reaktionen von NO mit Sauerstoff (O₂). NO₂ = Stickstoffdioxid, N₂O₄ = Distickstofftetroxid, NO₂⁻ = Nitrit, NO₃⁻ = Nitrat, N₂O₃ = Distickstofftrioxid, ONOO⁻ = Peroxynitrit. Adaptiert nach [71].

Da bei dieser Reaktion zwei Moleküle NO mit einem Molekül Sauerstoff reagieren, hängt die Halbwertszeit von NO fast ausschließlich von der NO-Konzentration ab. Anders ausgedrückt: je höher die NO-Konzentration ist, desto wahrscheinlicher ist

eine Reaktion von NO mit Sauerstoff. Da sowohl NO als auch O₂ lipophil sind, läuft die Reaktion von NO mit O₂ in hydrophoben Milieus wie der Zellmembran stark beschleunigt ab [77].

RNIs sind sehr reaktive und kurzlebige Spezies. Sie haben ein viel breiteres Reaktionsspektrum mit Biomolekülen als NO selbst. Die chemische Wirkung von NO in biologischen Systemen hängt daher von der NO-Konzentration und der resultierenden NO_x-Konzentration ab. Eine starke und lange andauernde NO-Produktion ist räumlich kaum begrenzt, da NO sehr schnell und über relativ weite Strecken diffundiert [78]. An jeder Stelle innerhalb dieses Diffusionsradius, an der die NO-Konzentration hoch genug ist, können dann die oben beschriebenen Reaktionen mit Sauerstoff, Metallen und Proteinen unkontrolliert ablaufen. Diese unkontrollierten Reaktionen von NO sind Kennzeichen von nitrosativem Stress.

Im Gegensatz dazu ist für die Aktivierung der NO-sensitiven signalvermittelnden Moleküle nur eine geringe NO-Konzentration notwendig. Daher läuft die NO-Produktion durch die nNOS und die eNOS streng kontrolliert und zeitlich begrenzt ab. Neueste Erkenntnisse zeigen zudem, dass in diesen Fällen der regulierten Signaltransduktion die Effektormoleküle in enge räumliche Nähe der NO-Synthasen gebracht werden [79,80]. So können die Signalmoleküle auf engem Raum durch nur wenige Moleküle der NO-Synthasen effektiv aktiviert werden, ohne dass hohe, evtl. schädliche Konzentrationen von NO gebildet werden müssen. Für die bei dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen spielten die durch NO ausgelösten Signaltransduktionsmechanismen jedoch keine Rolle, diese werden deshalb hier nur kurz erwähnt.

1.5.3 NO-induzierte Signaltransduktion

Es existieren zwei bekannte Signaltransduktionsmechanismen, die durch NO aktiviert werden können. Der zuerst von Ferid Murad entdeckte und am besten untersuchte Mechanismus ist die Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase („soluble Guanylate Cyclase“, sGC). Dieses Enzym enthält Häm als prosthetische Gruppe und wird durch die Bindung von NO an dieses Häm aktiviert (Review [81]). Die sGC katalysiert die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Das cGMP wirkt als Botenstoff („second messenger“)

durch die Beeinflussung der Aktivität von Ionenkanälen, Phosphodiesterasen (PDEs) und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKGs).

Außer der sGC gibt es eine weitere Gruppe von signalvermittelnden Molekülen, die durch NO aktiviert werden können: die Ras-Proteine, welche zur Superfamilie der „kleinen GTP-bindenden Proteine“ gehören (Review [82]). Diese kleinen, monomeren Proteine transduzieren ein Signal, wenn sie in GTP-gebundener Form vorliegen. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-Proteine wird dieses GTP zu GDP hydrolysiert und das Ras inaktiviert. GDP dissoziiert von dem Protein, welches dann erneut ein GTP-Molekül binden kann für einen weiteren Aktivierungszyklus. Die schwache GTPase-Aktivität der Ras-Proteine wird gesteigert durch sog. „GTPase aktivierende Proteine“ (GAPs), die eigentlich langsame Dissoziation des GDP wird beschleunigt durch eine Interaktion mit den „guanine nucleotide exchange factors“ (GEFs). Die GAPs inaktivieren also Ras-Proteine, während GEFs aktivierend wirken. Lander *et al.* fanden 1995 heraus, dass Ras-Proteine in dem humanen T-Zell Tumor Jurkat auch durch NO aktiviert werden können [83]. NO wirkt dabei als GEF, indem es die Ablösung von GDP vom Ras-Protein beschleunigt.

Die durch Ras-Proteine initiierten Signaltransduktionswege sind zum einen eine Kaskade von MAP-Kinasen (Review [84]), zum anderen der Weg über die Phosphatidylinositol 3'-Kinase (PI3K-Weg, Review [85]). Beide beeinflussen eine Vielzahl von zellulären Molekülen, darunter weitere Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren.

Zu der von NO ausgelösten Signaltransduktion sind im Rahmen dieser Arbeit keine direkten Versuche ausgeführt worden. Eine wichtige Rolle spielte jedoch der zelluläre Proteinabbau, dessen Funktionen daher im Folgenden erläutert werden sollen.

1.6 Der zelluläre Proteinabbau

1.6.1 Das Lysosom

Die Gesamtheit der Proteine einer Zelle (das Proteom) unterliegt einem ständigen „turnover“, Proteine werden also ständig neu gebildet und wieder zu Aminosäuren abgebaut. Jedes einzelne Protein hat eine gewisse Halbwertszeit, die einen Zeitraum

von wenigen Minuten (z. B. im Falle des Transkriptionsfaktors p53) bis zu mehreren Tagen (z. B. im Falle des Muskelproteins Myosin) betragen kann.

Eine eukaryotische Zelle hat zwei Maschinerien, die für den Abbau von Proteinen zuständig sind: das Lysosom und das Proteasom. Das Lysosom ist ein membranumschlossenes Kompartiment, welches sog. „saure Proteasen“ enthält, die Cathepsine (Reviews [86,87]). Diese Proteasen entfalten ihre volle Aktivität erst bei einem sauren pH-Wert, welcher durch Protonenpumpen in der lysosomalen Membran hergestellt wird. Das Lysosom ist hauptsächlich für den Abbau von Proteinen zuständig, die durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wurden, also aus dem extrazellulären Raum stammen. Es stellt weiterhin die Grundversorgung an Aminosäuren sicher, indem ständig durch Invaginationen der lysosomalen Membran kleine Bereiche des Zytoplasmas internalisiert und die darin enthaltenen Proteine hydrolysiert werden (Mikroautophagie). Im Hungerzustand können auch sehr große Teile des Zytoplasmas auf diese Weise „verdaut“ werden, um das Überleben der Zelle zu sichern (Makroautophagie). Während der lysosomale Abbau von Proteinen also hauptsächlich für die erwähnten Grundfunktionen zuständig ist, obliegt der zielgerichtete, spezifische Abbau von intrazellulären Proteinen zum größten Teil dem Proteasom.

1.6.2 Das Proteasom

Beim Proteasom handelt es sich nicht um ein zelluläres Kompartiment, sondern um einen Multienzymkomplex mit einer Größe von etwa 2500 kD (Review [88]). Es stellt wahrscheinlich den am stärksten konservierten Enzymkomplex dar, denn seine Grundstruktur hat sich während der Evolution kaum verändert und er kommt von den Archae-Bakterien bis zum Menschen in jedem Organismus vor. In Zellen von Säugetieren ist er im Zytoplasma, im Nukleus und an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert. Die genaue Struktur des Proteasoms ist sehr komplex und soll hier nur in vereinfachter Form wiedergegeben werden.

Das Proteasom ist zusammengesetzt aus einem 20S-Partikel („core particle“, CP), welcher aus vier Ringen mit je sieben Untereinheiten besteht, die zusammen einen hohlen Zylinder bilden. Die beiden äußeren Ringe bestehen aus sieben α -Untereinheiten, die beiden inneren Ringe aus sieben β -Untereinheiten ($\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Struktur). Drei der sieben β -Untereinheiten (β_1 , 2 und 5) besitzen unterschiedliche

Protease-Aktivitäten, so dass insgesamt sechs proteolytisch aktive Zentren mit drei verschiedenen Spezifitäten zur Verfügung stehen. Die Spezifitäten für die Peptid-Hydrolyse sind wie folgt:

β 1: hinter sauren und kleinen hydrophoben Aminosäuren („peptidylglutamyl-peptide hydrolyzing activity“, PGPH-Aktivität)

β 2: hinter basischen und kleinen hydrophoben Aminosäuren („trypsin-like activity“)

β 5: hinter allen hydrophoben Aminosäuren („chymotrypsin-like activity“)

Prinzipiell ist dem Proteasom damit die Spaltung einer Peptidbindung hinter jeder Aminosäure eines Proteins möglich. Die primären Produkte einer Protein-Degradation im Proteasom sind aber keine Aminosäuren, sondern Peptide mit einer Länge von 3-23 Aminosäuren (im Mittel 7-9, die meisten weniger als 8). Die Affinität der katalytisch aktiven Untereinheiten zu einer gegebenen Peptidbindung wird durch die flankierenden Aminosäuren beeinflusst.

Der CP wird auf beiden Seiten des Zylinders flankiert von einem 19S-Partikel („regulatory particle“, RP), welcher wiederum in Basis („base“) und Deckel („lid“) eingeteilt wird. Der RP ist wichtig für die Substraterkennung und für die Entfaltung des Substrats, sowie für die Stimulation der proteolytischen Aktivität des CP. Sechs der Untereinheiten des RP sind ATPasen vom AAA-Typ („ATPases Associated with a variety of cellular Activities“), die wahrscheinlich als Chaperone wirken, das Substrat entfalten und in den engen, von dem CP gebildeten Kanal „einfädeln“. Die Protein-Degradation im Proteasom ist daher ATP-abhängig. RP und CP bilden zusammen den 26S-Partikel, die häufigste Form des Proteasoms. Die vom Proteasom generierten Peptide werden wahrscheinlich von Proteasen und Aminopeptidasen zu Aminosäuren hydrolysiert. Die Peptide werden aber auch für die Präsentation auf MHC-Molekülen der Klasse I genutzt, womit dem Proteasom immunologische Bedeutung zukommt. Dafür werden die Peptide durch einen speziellen Transporter ins Lumen des ER transportiert, wo sie auf MHC-Moleküle „geladen“ werden. Dabei ist zu erwähnen, dass die von MHC-Molekülen präsentierten Peptide mit 8-12 Aminosäuren größer sind als die vom Proteasom bevorzugt hergestellten Peptide mit weniger als 8 Aminosäuren. Vielleicht deshalb werden nach Stimulation einer Zelle mit $\text{IFN}\gamma$ drei neue katalytische Untereinheiten gebildet, welche als β i-Einheiten bezeichnet werden und die drei „normalen“ Untereinheiten in neu gebildeten

Proteasomen ersetzen. Dieser Austausch geht mit einem veränderten Profil der entstehenden Peptide einher: es wird zu größeren Peptiden hin verschoben.

1.6.3 Substraterkennung und Ubiquitinierung

Wie erkennt ein Proteasom sein Substrat? Da das Proteasom und die Zielproteine in demselben zellulären Kompartiment vorkommen, muss der Abbau der Proteine streng kontrolliert sein. Die Markierung für den Abbau erfolgt durch die Übertragung des kleinen Proteins Ubiquitin (Ub) auf das Zielprotein. Dabei wird das C-terminale Glycin des Ubiquitins mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes im Zielprotein über eine Isopeptidbindung verknüpft. Über das Lysin an Position 48 des ersten Ub werden weitere Ubiquitin-Moleküle an dieses angehängt, bis eine Poly-Ubiquitin-Kette an dem Zielprotein entsteht. Diese wird vom RP des Proteasoms erkannt und das Protein der Hydrolyse zugeführt [89].

Für die Ubiquitinierung von Proteinen sind drei Gruppen von Enzymen zuständig, die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden. Die E1 sind sog. Ubiquitin-aktivierende Enzyme, die unter ATP-Verbrauch eine energiereiche Thioester-Bindung mit dem Ub eingehen. Die E1 geben das Ub weiter an die E2, die sog. Ubiquitin-konjugierenden Enzyme („ubiquitin conjugating enzymes“, UBCs). Diese übertragen das Ub dann auf das Substrat, welches dafür an ein E3 (Ubiquitin-Protein Ligase) gebunden sein muss. Die Hierarchie dieses Übertragungsprozesses hat eine pyramidale Struktur: ein einzelnes E1 kann mit vielen E2 interagieren, von denen wiederum jedes mit mehreren E3 wechselwirken kann. Die Spezifität des Prozesses wird daher hauptsächlich durch die E3-Enzyme vermittelt, welche ein Substrat und ein „passendes“ E2 gleichzeitig erkennen müssen. E3s sind häufig Komplexe aus mehreren Proteinen, von denen eines das Substrat bindet, eines das E2 und ein weiteres das Gerüst („scaffold“) für diese Interaktion bildet (Review [90]).

1.7 Die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO)

1.7.1 Die physiologische Bedeutung von Tryptophan

L-Tryptophan (L-Trp, W) wurde 1902 von Hopkins und Cole bei der Spaltung von Casein mit Trypsin entdeckt, der Name bedeutet etwa „das tryptisch Offenbarte“ (griech. phaneros = offenbar). L-Tryptophan kann von Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert werden, ist aber für Säugetiere die am wenigsten verfügbare essentielle Aminosäure. Es ist die Grundsubstanz für eine Reihe von physiologisch relevanten Molekülen (mehr als 40 aromatische Metabolite sind beschrieben). Bekannte Tryptophan-Derivate sind z. B. die Seh-Pigmente der Krebse und Insekten, die Ommochrome. Ein bedeutender Weg des Tryptophan-Stoffwechsels, eingeleitet durch das Enzym Tryptophan-5-Monooxygenase, führt zur Bildung von Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT). Serotonin wirkt als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem sowie als Gewebshormon, welches u. a. die Darmperistaltik anregt und Gefäßmuskeln kontrahiert. Serotonin ist selbst wieder Vorstufe für Melatonin, ein Hormon aus der Zirbeldrüse von Wirbeltieren. Melatonin ist u. a. an der Regelung des circadianen Rhythmus beteiligt.

1.7.2 Der Kynurenin-Weg

Der zweite wichtige, vom Tryptophan ausgehende Stoffwechselweg ist der sog. Kynurenin-Weg. Der erste und mengenbestimmende Schritt dieses Weges wird katalysiert von den Enzymen Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) und Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO). Beide Enzyme weisen Unterschiede betreffend ihrer Struktur und Gewebeverteilung auf, katalysieren aber die gleiche Reaktion: die oxidative Spaltung des Indolringes von L-Tryptophan. Das Produkt dieser Reaktion ist N-Formylkynurenin, welches durch die Kynurenin-Formylase weiter umgewandelt wird zu Kynurenin. Endprodukte dieses Stoffwechselweges sind Nikotinsäure bzw. Nikotinsäureamid, welche für die Produktion von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) verwendet werden. Einige Zwischen- und Nebenprodukte des Kynurenin-Weges (Kynurensäure, Picolinsäure, Chinolinsäure) sind von pharmakologischer Bedeutung, da sie anscheinend neurotoxisch wirken (Review [91]).

Die IDO und die TDO katalysieren zwar die gleiche Reaktion, erfüllen *in vivo* aber sehr unterschiedliche Aufgaben. Die TDO bestimmt hauptsächlich die systemische Tryptophan-Konzentration im gesunden menschlichen Körper. Sie wird nur in der Leber exprimiert und akzeptiert als Substrat nur L-Tryptophan. Ihre Expression kann durch verschiedene Aminosäuren (Tryptophan, Tyrosin, Histidin, Phenylalanin) und Glukokortikoide gesteigert werden (Review [92]). Die TDO regelt damit die allgemeine Verfügbarkeit von L-Trp für die oben genannten Stoffwechselwege, welche in vielen Bereichen der Physiologie eines Organismus von Bedeutung sind.

Eine lokale Verarmung an L-Trp (Tryptophan-Depletion) stellt aber auch einen sehr effektiven Schutz gegen verschiedene tryptophanabhängige Krankheitserreger dar. Eine Tryptophan-Depletion wird ausgelöst durch eine starke IDO-Aktivität, welche in allen bisher darauf untersuchten Geweben durch Zytokine (vor allem $\text{IFN}\gamma$) und inflammatorische Stoffe (LPS) induziert werden kann. Die IDO spielt daher wohl keine entscheidende Rolle im normalen Tryptophan-Stoffwechsel, sondern viel mehr in der Erregerabwehr. Die Aktivierung der IDO kann als Teil einer Immunantwort, der nicht an Immunzellen gebunden ist, interpretiert werden.

In den nächsten beiden Abschnitten sollen die IDO und ihre Regulation, sowie die Bedeutung der von ihr induzierten Tryptophan-Depletion als antimikrobieller Effektormechanismus näher erläutert werden.

1.7.3 Katalytische Eigenschaften der IDO

Das IDO-Protein wurde zuerst Ende der siebziger Jahre von der Arbeitsgruppe um Osamu Hayaishi aus dem Dünndarm von Kaninchen gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die IDO ist ein etwa 42 kD großes, glykosyliertes, monomeres Enzym mit Häm als prosthetischer Gruppe. Anders als die TDO akzeptiert die IDO außer L-Tryptophan auch andere Indolamine wie 5-Hydroxytryptophan, D-Tryptophan, Tryptamin und Serotonin als Substrat [93]. Auf diesen Befund gründen sich die Namen der beiden Dioxygenasen.

Bei den von Dioxygenasen katalysierten Reaktionen handelt es sich fast immer um die oxidative Spaltung von aromatischen Ringsystemen. Dabei dient molekularer Sauerstoff als zweites Substrat, und anders als bei den Monooxygenasen werden hier beide Atome des Sauerstoffes in das Produkt eingebaut [20]. Die IDO katalysiert die oxidative Spaltung des Indolringes des Tryptophans. Das Produkt dieser

Reaktion ist N-Formylkynurenin, welches durch die Kynurenin-Formylase weiter umgesetzt wird zu Kynurenin und Formiat.

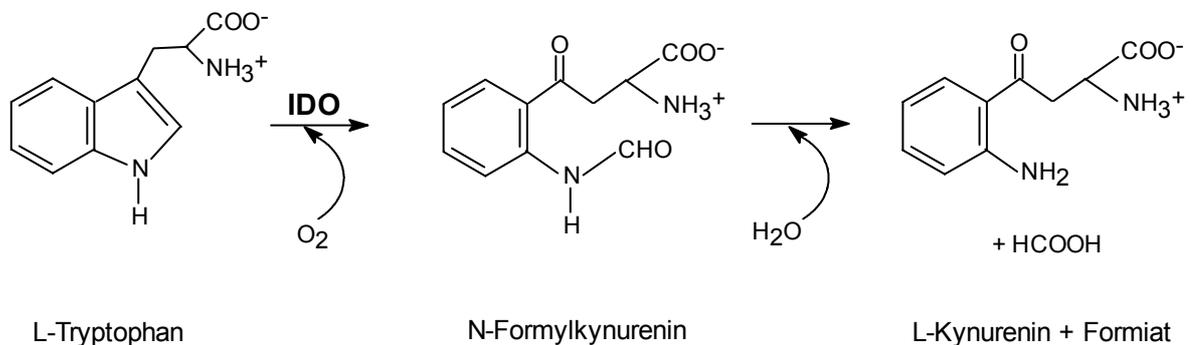


Abb. 3: Die Reaktion von L-Tryptophan zu L-Kynurenin

Die IDO zeigt bei der Wahl der Substrate eine für Dioxygenasen ungewöhnliche Eigenschaft: sie kann *in vitro* als zweites Substrat nicht nur Sauerstoff, sondern auch (anscheinend sogar bevorzugt) das Superoxid-Anion O_2^- verwenden. Aufgrund dieses Umstands wird die IDO teilweise durch Superoxid-Dismutase (SOD) inhibiert, solange Sauerstoff vorhanden ist aber nicht komplett. Ein weiterer Inhibitor der IDO ist das Wasserstoffperoxid H_2O_2 [94,95]. Ob die Verwendung von O_2^- als Substrat *in vivo* tatsächlich auftritt ist nicht bekannt und auch der genaue Katalysemechanismus wird gerade erst erforscht [96].

1.7.4 Regulation der IDO-Gentranskription

Das Gen, welches die IDO kodiert, befindet sich auf Chromosom 8 [97], ist etwa 15 kb groß und besteht aus 10 Exons und 9 Introns. Von ihm wird eine 1.7 kb mRNA transkribiert, mit einem offenen Leseraster von 1209 Nukleotiden, welche in ein Protein mit 403 Aminosäuren translatiert wird [98,99]. Das IDO-Protein hat große Ähnlichkeit mit dem Myoglobin von Gastropoden der Familien Trochidae, Turbinidae und Haliotiidae (27% Identität auf Aminosäure-Ebene), was auf ein gemeinsames Vorläufer-Gen schließen lässt [100,101].

Die Regulation der Transkription des IDO-Gens wurde zuerst von Gupta und Mitarbeitern an humanen Fibroblasten eingehend untersucht. Sie fanden zunächst heraus, dass die Transkription durch $IFN\gamma$ stark induziert werden konnte, durch $IFN\alpha/\beta$ aber nur sehr schwach, und dass die Induktion durch $IFN\gamma$ die *de novo*-

Proteinbiosynthese eines Mediators erfordert, die Induktion durch $\text{IFN}\alpha/\beta$ aber nicht. Im Promotor des IDO-Gens finden sich mehrere regulatorische Elemente, darunter u. a. eine TATA- und eine CCAAT-Box sowie GAS- und ISRE-Elemente [102]. Weitere Promotorstudien zeigten, dass die ISRE-Elemente die wichtigste Rolle bei der Transkription des IDO-Gens spielen [103,104], womit dem Transkriptionsfaktor IRF-1 eine besondere Bedeutung zukommt. Dieser Befund erklärt auch die Notwendigkeit einer Proteinbiosynthese für die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Induktion, denn IRF-1 wird nach einem $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus *de novo* gebildet.

$\text{IFN}\gamma$ ist der wichtigste Induktor der IDO-Gentranskription, die anderen Interferone sind nur schwache Induktoren. Die Transkription des IDO-Gens wird aber noch von weiteren Zytokinen und LPS beeinflusst. $\text{IL-1}\beta$ und LPS verstärken die IDO-Induktion durch $\text{IFN}\gamma$ (und $\text{IFN}\beta$) in humanen Makrophagen, und LPS kann auch alleine induzierend wirken [105]. Der LPS-Effekt ist direkt und beruht nicht auf einer Produktion von $\text{IL-1}\beta$ oder $\text{TNF}\alpha$ durch die aktivierten Makrophagen [106]. Diese Effekte wurden sowohl an *in vitro* aus Monozyten differenzierten Makrophagen, als auch an *ex vivo* präparierten Alveolar-Makrophagen gemessen [107]. Negativ regulatorisch wirken die $\text{T}_\text{H}2$ -Zytokine: Musso *et al.* fanden 1994, dass IL-4 die IDO-Gentranskription in Monozyten hemmt [108]. Ähnliche Ergebnisse erhielten Chaves *et al.* später bei Untersuchungen an humanen Fibroblasten: in der Zelllinie 2C4 verstärkt $\text{TNF}\alpha$ die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Transkription des IDO-Gens (und kann auch alleine schwach induzieren), während IL-4 und IL-13 diese hemmen. Die Induktion durch $\text{IFN}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ wird in 2C4-Zellen aber nicht durch IL-4 und IL-13 beeinflusst [109].

1.7.5 Bedeutung der IDO als Effektor und Modulator im Immunsystem

Die antimikrobielle Wirkung der IDO wurde zuerst 1984 von Pfefferkorn beschrieben. Er zeigte, dass $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte humane Fibroblasten das Wachstum von *Toxoplasma gondii*, einem obligat intrazellulären Erreger, *in vitro* hemmen konnten. Durch Supplementation mit L-Tryptophan konnte die antiparasitäre Wirkung wieder aufgehoben werden [110]. Später wurde demonstriert, dass der antiparasitäre Effekt direkt auf der Verarmung an Tryptophan beruht und nicht auf einem Abbauprodukt des Tryptophan-Katabolismus [111]. Diese Beobachtungen wurden später auch an

Makrophagen [112], Astrozyten [113] und Glioblastomzellen [114] gemacht. Die Wirksamkeit der Tryptophan-Verarmung als antimikrobieller Mechanismus konnte auch an prokaryotischen intrazellulären Erregern, z. B. an *Chlamydia psittaci* gezeigt werden [115]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die zelluläre IDO-Aktivität das Wachstum von Enterokokken [116] und Streptokokken der Gruppe B [117] effizient hemmt.

Eine starke IDO-Aktivität führt intrazellulär und in der unmittelbaren Umgebung der aktivierten Zellen zu einer vollständigen Verarmung an Tryptophan, so dass sich die Zellen selbst vor diesem Mechanismus schützen müssen. Vielleicht zu diesem Zweck induziert IFN γ auch die Synthese der Tryptophanyl-tRNA-Synthetase (WRS) [118]. Dies ist ein direkter IFN γ -induzierter Effekt und beruht nicht auf der später einsetzenden Tryptophan-Depletion [119]. Es wird vermutet, dass nach Stimulation mit IFN γ möglichst viel des in der Zelle verfügbaren Tryptophans an die entsprechende tRNA gebunden wird. Dieses gebundene Tryptophan sollte dann nur noch der Wirtszelle zur Verfügung stehen, aber nicht mehr dem Parasiten.

Den vielleicht wichtigsten Aspekt der IDO-Aktivität im Immunsystem entdeckte 1998 die Arbeitsgruppe von Mellor. Sie fand, dass schwangere Mäuse, die mit einem Inhibitor der IDO gefüttert wurden, den allogenen Fötus abstoßen. Dieser Effekt war abhängig von der Entwicklung und Aktivität der T-Zellen der Mutter [120]. Anscheinend schaffen Zellen in der Plazenta aufgrund einer konstitutiven IDO-Aktivität eine tryptophanverarmte Mikroumgebung, in der T-Zellen nicht proliferieren und daher auch nicht gegen den „fremden“ Fötus agieren können. Der IDO-Aktivität in der Plazenta kommt damit eine entscheidende Rolle für den normalen Verlauf einer Schwangerschaft zu. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte später zeigen, dass IFN γ -aktivierte Makrophagen die Proliferation von T-Zellen *in vitro* hemmen können [121], und dass T-Zellen, die in Abwesenheit von Tryptophan durch Antigen-Kontakt aktiviert wurden, sogar eine Toleranz gegen das entsprechende Antigen entwickeln können [122]. Jüngst konnten eine deutsche und eine italienische Arbeitsgruppe unabhängig voneinander zeigen, dass die IDO-vermittelte Inhibition der Proliferation *in vitro* durch Tryptophan-Metabolite ausgelöst wird. Der Effekt war nicht nur bei T-Zellen zu beobachten, sondern auch bei NK- und B-Zellen [123,124]. Diese Befunde führten zu der anhaltenden Diskussion, ob die Verfügbarkeit von Aminosäuren einen allgemeinen Faktor darstellt, mit dem die Aktivität von Immunzellen reguliert werden kann.

1.7.6 Regulation der IDO durch NO

Im Jahre 1994 konnten Thomas *et al.* zeigen, dass die IDO-Aktivität in IFN γ -stimulierten Monozyten durch NO gehemmt wird [125]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die funktionellen Folgen dieser Inhibition. Humane Zellen sind nach einem IFN γ -Stimulus in der Lage, einen IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekt auszuüben, der tryptophanabhängige Krankheitserreger im Wachstum hemmt. Dieser Effekt wird durch NO komplett blockiert, unabhängig davon ob die IDO-aktive Zelle das NO selbst produziert oder eine benachbarte Zelle [116,126]. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen der IDO und NO weiter untersucht.

1.8 **Konzeption der Arbeit**

Die in dieser Arbeit untersuchten zellulären Aktivitäten, die NO-Produktion durch die iNOS und die Tryptophan-Depletion durch die IDO, sind beide als antimikrobiell und immunregulatorisch beschrieben. Daher ist es interessant zu untersuchen, ob sich diese Mechanismen bei gleichzeitiger Induktion in derselben Zelle gegenseitig beeinflussen und ob eine solche Beeinflussung funktionelle Konsequenzen hat. Es war bekannt, dass NO die Aktivität der IDO *in vitro* inhibiert. Bis auf diesen reinen Fakt, der nur an einem einzigen Zelltyp gezeigt wurde, ist dieser immunologisch sehr bedeutsame Effekt nicht weiter charakterisiert worden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und NO auf die Aktivität und die Expression der IDO untersucht. Als zelluläre Systeme wurden die humanen epithelialen Tumore A549 und RT4 verwendet. Von der Zelllinie RT4 war bekannt, dass sie in der Lage ist nach einer Stimulation durch Zytokine NO zu produzieren. Die A549-Zelllinie wurde zwar schon verwendet, um die Transkription des iNOS-Gens in humanen Zellen zu untersuchen, aber eine Produktion von NO ist dabei nicht gezeigt worden und Daten zur IDO-Expression wurden in diesen Zellen noch nie erhoben. Für Untersuchungen an beiden Zelllinien wurden auch chemische NO-Donoren eingesetzt, um die Effekte von endogen produziertem und exogen appliziertem NO vergleichen zu können. Die Applikation von exogenem NO repräsentierte eine reine NO-Wirkung auf zelluläre Funktionen, unabhängig von Zytokinen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die IDO-Inhibition durch NO in Zellaassays und in Enzymtests untersucht, sowie die Regulation der Transkription des IDO-Gens durch Zytokine. Dabei konnte gezeigt werden, dass für eine Inhibition der IDO relativ hohe NO-Konzentrationen notwendig waren und dass Zytokine die Transkription des IDO-Gens in beiden verwendeten Zelllinien auf die gleiche Art und Weise regulierten, die Transkription des iNOS-Gens aber leicht unterschiedlich. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen von Zytokinen und NO auf die Expression des IDO-Proteins untersucht. Hier zeigte sich, dass sowohl endogenes als auch exogenes NO den Gehalt an IDO-Protein in beiden Zelllinien zeit- und dosisabhängig verminderte. Dieser Effekt war rein NO-abhängig und beruhte nicht auf einer Wirkung der Zytokine. Eine Transkriptionskontrolle des IDO-Gens durch NO konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Im dritten Teil der Arbeit wurde der gefundene Effekt durch den Einsatz von Inhibitoren der Proteinbiosynthese und des Proteinabbaus näher charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass NO einen beschleunigten Abbau des IDO-Proteins durch das Proteasom induzierte. Dieser Aspekt der Regulation des IDO-Proteins war bisher nicht bekannt und wird in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellkultur

2.1.1.1 Puffer und Medien für die Zellkultur

Glutamin	BioWhittaker, Belgien
Fötales Kälberserum (FCS)	BioWhittaker, Belgien
RPMI 1640 Medium	BioWhittaker, Belgien
RPMI 1640 w/o L-Cys und L-Met	PAN Biotech, Aidenbach
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin

2.1.1.2 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

Die Zelllinie 86HG39 ist ein humanes Glioblastom. Sie wurde im Institut für Neuropathologie der HHU Düsseldorf isoliert und von T. Bilzer und Mitarbeitern immunhistologisch und morphologisch untersucht [127]. Die Zelllinie 86HG39 wurde als Astrozytom charakterisiert, denn ca. 80% der Zellen exprimieren den spezifischen Astrozytenmarker „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP).

Die Zelllinie RT4 wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen (ATCC-Number HTB-2). Sie wurde aus dem Blasenkarzinom eines 63 jährigen Kaukasiers isoliert und zeigt alle Merkmale einer epithelialen Zelle.

Die Zelllinie A549 stammt aus einem Lungentumor eines 58 jährigen Kaukasiers. Sie ist ebenfalls eine epitheliale Zelle und wurde von Lieber et al. charakterisiert. Bezogen wurde diese Zelllinie von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

2.1.2 Zytokine

Alle Zytokine wurden bezogen von PeproTech Inc. (USA) oder R&D Systems GmbH (Wiesbaden). Die Zytokine wurden in RPMI 1640 Medium gelöst und als Stocklösung

bei -80°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden sie für maximal eine Woche bei 4°C gelagert.

Verwendete Zytokine:

Rekombinantes humanes Interferon gamma (IFN γ)

Rekombinantes humanes Interleukin-1 beta (IL-1 β)

Rekombinanter humaner Tumornekrosefaktor alpha (TNF α)

2.1.3 Antikörper

2.1.3.1 *Primäre Antikörper*

Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben rekonstituiert und gelagert. Folgende Antikörper wurden verwendet:

Anti-IDO (monoklonal, Maus)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von O. Takikawa (Hokkaido University, Japan)
Anti-GAPDH (monoklonal, Maus)	HyTest, Finnland
Anti-Ubiquitin (monoklonal, Maus)	Zymed Laboratories, USA

2.1.3.2 *Sekundäre Antikörper, Peroxidase-gekoppelt*

Ziege-anti-Maus, HRP	Dianova, Hamburg
Maus-anti-Kaninchen, HRP (HRP = horseradish peroxidase)	Dianova, Hamburg

2.1.4 Enzyme

Expand High Fidelity DNA Polymerase	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> Turbo DNA Polymerase	Stratagene, USA
Herculase™ Enhanced DNA Polymerase	Stratagene, USA
DNase I	Roche, Mannheim
Klenow Enzym	Roche, Mannheim
Katalase	Sigma, Deisenhofen

2.1.5 Größenstandards

2.1.5.1 *Größenstandards für Proteine*

SeeBlue Plus 2 Pre-stained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Mark12™ Standard	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5.2 *Größenstandards für Nukleinsäuren*

Lambda DNA / EcoR I + Hind III Marker	Promega, USA
1kb DNA Leiter	BRL, Eggenstein
100bp DNA Leiter	BRL, Eggenstein
0,24-9,5kb RNA Leiter	BRL, Eggenstein

2.1.6 Molekularbiologische Kits

Advantage RT-for-PCR Kit	BD Biosciences, USA
NOSdetect™ Assay Kit	Stratagene, USA
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche, Mannheim

2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifikation von cDNA mittels PCR

Alle hier aufgeführten Oligonukleotide dienen als PCR-Primer dem spezifischen Nachweis und der Amplifikation von bestimmten mRNA-Transkripten, die in cDNA revers transkribiert wurden. Sie wurden synthetisiert von MWG Biotech, Eberling.

GAPDH forward 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC

GAPDH reverse 5'-CAG CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG

Das Primer-Paar ist spezifisch für das Transkript der GAPDH. Es liefert Amplifikate mit einer Größe von 892bp.

IDO forward 5'-GCA AAT GCA AGA ACG GGA CAC T

IDO reverse 5'-TCA GGG AGA CCA GAG CTT TCA CAC

Das Primer-Paar ist spezifisch für das Transkript der IDO. Es liefert Amplifikate mit einer Größe von 464bp.

iNOS forward 5'-AT AGA ATT CTG GGG CAG CGG GAT GAC TTT

iNOS reverse 5'-AT AGA ATT CGT GAT GGC CGA CCT GAT GTT GC

Das Primer-Paar ist spezifisch für das Transkript der iNOS und liefert Amplifikate mit einer Größe von 467bp. Unterstrichen ist eine zusätzlich eingefügte Restriktionsschnittstelle für EcoRI.

2.1.8 Allgemeine Chemikalien

Zum Ansetzen aller Lösungen und Medien wurde hoch reines Wasser benutzt, welches im folgenden als Aqua dest. bezeichnet wird (Elix-System, Millipore GmbH, Neu Isenburg). Alle allgemeinen Chemikalien (Salze und Säuren), die nicht unter dem Punkt „Feinchemikalien“ aufgeführt sind, besaßen den Reinheitsgrad „pro analysis“ und wurden bezogen von der Firma Merck (Darmstadt).

2.1.9 Feinchemikalien

Alle hier aufgelisteten Chemikalien waren Bestandteil von Lösungen und Puffern. Chemikalien, die als aktive Substanz in Zellassays eingesetzt wurden, sind bei den entsprechenden Methoden gesondert aufgeführt.

p-Aminobenzensulfonamid (Sulfanilamid)	Sigma, Deisenhofen
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Sigma, Deisenhofen
Blocking-Reagenz	Roche, Mannheim
Cäsiumchlorid, technical grade	ICN Biomedicals, USA
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma, Deisenhofen
L-Cystein	US Biochemicals, USA
Deoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisenhofen
p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagenz)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt

Formamid	Sigma, Deisenhofen
Glycin	ICN Biomedicals, USA
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Guanidinthiocyanat (GSCN)	Merck, Darmstadt
Igepal CA-630	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver (Skim milk powder)	Oxoid, England
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methylenblau	Merck, Darmstadt
L-Methionin	US Biochemicals, USA
2-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Sigma, Deisenhofen
N-(1-Naphtyl)ethylendiamin	Sigma, Deisenhofen
Natriumascorbat	Sigma, Deisenhofen
Natriumnitrit	Sigma, Deisenhofen
Natrium-N-Lauroylsarcosinat	Sigma, Deisenhofen
β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid Phosphat, reduziert (NADPH)	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

2.1.10 Radiochemikalien

L-[2,3,4,5- ³ H] Arginin Hydrochlorid	apbiotech, Freiburg
[α - ³² P] dCTP	apbiotech, Freiburg
L- ³⁵ S-Methionin / L- ³⁵ S-Cystein (Tran ³⁵ S Label)	ICN Biomedicals, USA

2.1.11 Allgemeine Lösungen und Puffer

Alle prozentualen Angaben sind, wenn nicht anders angegeben, w/v-Angaben

Acrylamid-Stocklösung	29.2% Acrylamid
(Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe)	0.8% N.N'-Methylenbisacrylamid

Anodenpuffer 1 für Proteintransfer	30mM Tris 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2 für Proteintransfer	0.3M Tris 20% (v/v) Methanol
Bradford-Reagenz	50ml Ethanol absolut 100ml Phosphorsäure 85% 100mg Coomassie Blue G
Cäsiumchlorid-Dichtekissen	5.7M Cäsiumchlorid 10mM EDTA pH 7.5
6x DNA-Ladepuffer	0.25% Bromphenolblau 0.25% Xylencyanol 30% Glyzerin
Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE	50mM Tris 0.4M Glycin 0.1% SDS
GSCN-Lösung	4M GSCN 20mM Natriumacetat pH 5.2 0.1mM DTT 0.5% Natrium-N-Laurylsarcosinat
High-SDS-Puffer	7% SDS 50mM Natriumphosphat pH 7 50% Formamid 2% Blocking Reagenz (Roche) 50µg/ml Hefe-RNA 5x SSC 0.1% N-Laurylsarcosinat
Kathodenpuffer für Proteintransfer	25mM Tris 40mM 6-Aminohexansäure 20% (v/v) Methanol
Methylenblau-Lösung	0.5M Natriumacetat pH 5.2 0.04% Methylenblau

10x MOPS	0.2M MOPS 0.08M Natriumacetat pH 7.4 0.01M EDTA
5x Protein-Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	10% SDS 0.4M Tris-HCl pH 6.8 25% (v/v)Glyzerin 0.1% Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
PBS pH 7.3 (Serag Wiessner, Naila)	0.8% Natriumchlorid 0.02% Kaliumchlorid 0.025% Kaliumdihydrogenphosphat; 0.135% Dinatriumhydrogenphosphat
RNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glyzerin 1mM EDTA 0.4% Bromphenolblau 0.4% Xylencyanol
Sammelgelpuffer für Proteingele	0,5M Tris-HCl pH 6.8 0.1% SDS
20x SSC, pH 7.0	0,3M Natriumcitrat; 3M Natriumchlorid
10x TBE-Puffer	0.9M Tris 0.9M Borsäure 20mM EDTA pH 8.0
TBS pH 7.4	10mM Tris 150mM NaCl
Trenngelpuffer für Proteingele	1.5M Tris-HCl pH 8.8 0,1% SDS
Trypanblau-Lösung	0.16% Trypanblau 0.85% Natriumchlorid
Waschpuffer Northern	2x SSC, 0.5% SDS 2x SSC, 0.1% SDS 0.1x SSC, 0.5% SDS

2.1.12 Verschiedenes

Dialyseschläuche MWCO 12-14 kD	Medicell Ltd., England
Filterpapier Whatman 3MM	Merck, Darmstad
Gelfiltrationssäulen (Sephadex G-25)	apbiotech, Freiburg
Glasfasermikrofilter Whatman GF/C	Merck, Darmstadt
Kulturflaschen	Costar, Bodenheim
Mikrotiterplatten	Costar, Bodenheim
Mikrotiterplatten Fluorotrac	Greiner, Nürtingen
Nitrocellulosemembran Protran	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Hybond N+	apbiotech, Freiburg
Röntgenfilme Kodak X-OMAT AR	Kodak, USA
Sterilfilter Sterivex™-HV, 0,45µM	Millipore, USA
Sterilfilter Dynagard® 0,2µM	Microgon Inc., USA

2.2 **Methoden**

2.2.1 Kultivierung und Sicherung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in RPMI1640 Medium, supplementiert mit 5% FCS und 2mM Glutamin, kultiviert. Das FCS wurde vor Verwendung im Kulturmedium für 30 Minuten auf 56°C erhitzt, um Komplementproteine zu inaktivieren. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in 75cm²-Kulturflaschen im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C in befeuchteter, mit 10% CO₂ versetzter Luft.

Für die Sicherung der Zelllinien wurden ca. 10⁷ Zellen in 1ml FCS / 10% DMSO aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Zellernte und Lebendzellzählung

Alle Arbeiten mit Zellen wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt, deren Arbeitsfläche zuvor mit 70% Ethanol gereinigt wurde. Alle für diese Arbeiten verwendeten Lösungen wurden entweder steril geliefert oder durch Autoklavieren (121°C, 2 bar) bzw. Sterilfiltration sterilisiert.

Um Zellen zu splitten oder um sie für Tests in Mikrotiterplatten zu überführen, wurde zunächst das Kulturmedium entfernt. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 5 bis 10 Minuten mit 5ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um die adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Nach Zugabe von 8ml Medium wurden 10ml der erhaltenen Zellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation (1200rpm, 10min, 4°C, Heraeus Megafuge 1.0 R) pelletiert. Den in der Kulturlasche verbliebenen 3ml Zellsuspension wurden 12ml Medium zugegeben, und die Zellen wurden weiter kultiviert.

Von dem Zellpellet wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5-10ml Medium resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen festgestellt. Dazu wurden 50µl der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung geeignet verdünnt und die lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde dann auf die geeignete Anzahl Zellen/ml eingestellt und für Zellassays verwendet.

2.2.3 Zellstimulation

Für die Behandlung von Zellen mit Zytokinen, Inhibitoren oder anderen aktiven Substanzen wurde zunächst das Medium entfernt. Dann wurde frisches Medium, das zuvor mit den entsprechenden Substanzen in geeigneter Konzentration versetzt wurde, auf die Zellen gegeben und diese für verschiedene Zeiträume im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Nukleinsäure-Untersuchungen

2.2.4.1 *Präparation von RNA*

Lösungen, die für Experimente mit RNA bestimmt waren, wurden immer mit 0,1% DEPC versetzt und nach Inkubation über Nacht autoklaviert bzw. mit DEPC-behandeltem Wasser (DEPC-Wasser) angesetzt.

Gesamt-RNA wurde durch Lyse der Zellen mit Guanidinthiocyanat (GSCN) und anschließender Ultrazentrifugation des Lysats auf einem Cäsiumchlorid-Dichtekissen gewonnen [128]. Diese Methode nutzt die Tatsache aus, daß RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebedichte hat als andere Zellbestandteile und deshalb bei der

Zentrifugation pelletiert wird, während DNA, Lipide und Proteine im Überstand verbleiben.

Nach geeigneter Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 4ml GSCN-Lösung lysiert. Das Lysat wurde in Greiner-Röhrchen überführt und die Flaschen mit 3ml DEPC-Wasser ausgespült, um das restliche Lysat quantitativ entfernen zu können. Diese 3ml wurden mit den 4ml Lysat vereinigt.

In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) wurden 3ml des Cäsiumchlorid-Dichtekissens vorgelegt und dieses mit dem gesamten Lysat überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckman Optima L60) bei 33000rpm und 23°C für 16 Stunden (Rotor SW41Ti, Beckman). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und der Boden des Röhrchens mit einem heißen Skalpell abgeschnitten. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und dann in 40µl 10mM Tris / DEPC-Wasser, pH 7.5 gelöst. Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden photometrisch bei 260nm bzw. 280nm bestimmt (DNA/RNA Calculator II, Pharmacia). Die RNA wurde für weitere Versuche nur verwendet, wenn der Quotient der Absorptionen bei 260nm und 280nm $\geq 1,9$ war. Für die Konzentration galt vereinfacht: $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40\mu\text{g RNA/ml}$.

2.2.4.2 Gelelektrophorese von RNA

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA wurden Formaldehyd-Gele (1% Agarose, 6% (v/v) Formaldehyd, 1x MOPS) verwendet, mit 1x MOPS als Elektrophorese-Puffer [128].

Auftrennungsansatz:

- 9µl Probe (30-50µg Gesamt-RNA)
- 20µl Formamid
- 7µl 37% Formaldehyd
- 4µl 10x MOPS

Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Dann wurden 4µl RNA-Auftragungspuffer zugegeben. Die RNA-Auftrennung erfolgte für 16-24h über Nacht, bei 30-40V und Raumtemperatur.

2.2.4.3 Northern Blot

Für den Transfer von RNA auf Nylonmembran wurde das RNA-Gel 10 Minuten in DEPC-Wasser gewaschen und anschließend 15 Minuten in 20x SSC äquibriert.

Der Transfer erfolgte in einer Kapillar-Blotkammer (Scotlab Ltd. / Herolab, Wiesloch) für 2-3 Stunden.

Als Transferpuffer diente 10x SSC. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran bei Raumtemperatur getrocknet, dann folgte das Fixieren der RNA durch UV-Licht bei $0,6\text{J}/\text{cm}^2$ für eine Minute.

Zur Visualisierung des RNA-Standards wurde dieser nach dem Transfer mit Methylenblau gefärbt. Nach 15-minütiger Fixierung in 5% Essigsäure wurde die Membran 5 Minuten lang in Methylenblau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde die Membran gewässert, bis die gewünschte Färbung erreicht war.

2.2.4.4 Sondenherstellung und Hybridisierung

Für den spezifischen Nachweis der mRNAs derIDO und der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH, Ladekontrolle) wurden die mittels PCR mit den unter Punkt 2.1.7 angegebenen Primern amplifizierten Bereiche der jeweiligen cDNA als Sonde verwendet. Die PCR-Produkte wurden dafür mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) gereinigt und ihre Konzentration photometrisch bestimmt ($1\text{OD}_{260\text{nm}} = 50\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA). Für eine Sondenherstellung wurden 500ng dieser Produkte mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ mittels „Random Priming“ markiert. Die Amplifikate wurden zunächst in 9 μl Aqua dest. aufgenommen, im kochenden Wasserbad denaturiert (10min), kurz zentrifugiert und für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Dann wurde der Labeling-Ansatz komplett zusammengestellt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Random-Priming Ansatz: 9 μl Template (500ng)
je 1 μl 0.5mM dATP, dGTP und dTTP
2 μl Hexanukleotid-Mix (Roche)
5 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ (apbiotech)
1U Klenow-Enzym

Die markierten Sonden wurden mittels Gelfiltration auf einer Sephadex G50-Säule (apbiotech) von freien radioaktiven Nukleotiden getrennt und die Fraktionen mit der höchsten gemessenen Radioaktivität vereinigt

Die Membran mit den transferierten RNA-Molekülen wurde für 1-2 Stunden in High-SDS-Puffer bei 50°C im Wasserbad prähybridisiert. Anschließend folgte die Hybridisierung mit frisch hergestellter Sonde in High-SDS-Puffer bei 50°C über Nacht. Danach wurden die Membranen so lange mit Waschpuffer gewaschen, bis der Hintergrund strahlungsfrei war. Es folgte die Exposition mit Röntgenfilm bei -80°C für 1-2 Tage sowie die quantitative Auswertung im Phosphorimager (Fuji) des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf mit TINA 2.09-Software.

2.2.4.5 Gelelektrophorese von DNA

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurde in 1% Agarosegelen mit 0.5µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Als Puffer diente 0.5x TBE, die Auftrennung erfolgte bei 70-100V. Für die Dokumentation wurden die Gele anschließend mit dem Gelaufnahmegerät „Modul Digit-Store Duo“ (Intas, Göttingen) bei 340nm fotografiert.

2.2.4.6 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um bestimmte mRNA-Transkripte in Gesamt-RNA qualitativ nachzuweisen, wurde die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dazu wurde der Advantage RT-for-PCR Kit (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Anschließend wurden 5µl des Erststrang-Ansatzes für eine nachfolgende PCR (Thermocycler PTC200, MJ Research) mit den unter Punkt 2.1.7 angegebenen Primern eingesetzt. Die PCR-Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

5µl Template
5µl Polymerase-Puffer
400µM dNTP-Mix
0.4µM Primer
2.5 U DNA-Polymerase
Aqua dest. ad 50µl

Die Polymerasen waren Expand High Fidelity DNA Polymerase (Roche) oder Herculase™ Enhanced DNA Polymerase (Stratagene). Die Cycling-Programme sahen wie folgt aus:

95°C 5min
95°C 30sec
62°C 30-60sec
72°C 60sec
72°C 4min

} 30 Zyklen

2.2.5 Untersuchungen von Proteinen

2.2.5.1 *Präparation von Zellextrakten*

Alle Lösungen, die bei der Präparation von Zellextrakten eingesetzt wurden (z.B. Aqua dest. für SDS-PAGE, IP-Lysepuffer für Immunpräzipitationen) oder in denen Zellextrakte inkubiert wurden enthielten einen Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC), um die zu untersuchenden Proteine vor dem Abbau durch freigesetzte Proteasen zu schützen. Dieser PIC bestand, wenn nicht anders erwähnt, aus folgenden Komponenten:

PIC: 2µg/ml Leupeptin
2µg/ml Aprotinin
2µg/ml Pepstatin
1mM AEBSF (Pefabloc) oder PMSF
1mM EDTA pH 7.5

Alle Protease-Inhibitoren bis auf PMSF wurden bezogen von Roche (Mannheim), EDTA von Merck (Darmstadt). Sie wurden als Stocklösung bei -25°C gelagert (Leupeptin und Aprotinin 1mg/ml in Aqua dest., AEBSF 100mM in Aqua dest., Pepstatin 1mg/ml in DMSO). Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) wurde bezogen von Sigma (Deisenhofen) und als 200mM-Stocklösung in Isopropanol bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.5.2 Zellextrakte für die Gelelektrophorese

Nach geeigneter Stimulation von $3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen in 25cm^2 -Flaschen wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 3ml PBS mit einem Zellschaber geerntet (ohne Einsatz von Trypsin) und durch Zentrifugation pelletiert (2000rpm, 5min, 4°C). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in 200 μl Aqua dest. / PIC resuspendiert und vollständig lysiert durch 3-5 Zyklen von Schock-Gefrieren in flüssigem Stickstoff und schnellem Auftauen im Wasserbad bei Raumtemperatur (freeze-thaw). Das erhaltene Lysat wurde anschließend zentrifugiert (10000rpm, 10min, 4°C , Heraeus Labofuge fresco) und der Überstand als Zellextrakt verwendet. Zellextrakte wurden bei -80°C gelagert.

2.2.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellextrakten

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode von Bradford angewendet [129]. Dazu wurden in einer Mikrotiterplatte serielle Verdünnungen der Zellextrakte in PBS hergestellt (Volumen 20 μl , Doppelbestimmungen). Als Standard dienten verschiedene Konzentrationen von BSA in PBS (Dreifachbestimmungen). Nach Zugabe von 200 μl Bradford-Reagenz wurde die Absorption bei 595nm in einem ELISA-Reader (Tecan Rainbow, SLT Labinstruments, Crailsheim) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software EasyWin Fitting (Tecan).

2.2.5.4 Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurden Laemmli-Gele verwendet [128], wobei 10-20 μg Gesamtprotein aufgetragen wurden. Bei großen

Gelen erfolgte die Auftrennung bei 100V im Sammelgel und bei 200V im Trenngel, bei Minigelen mit einer konstanten Stromstärke von 20mA pro Gel.

2.2.5.5 *Western Blot*

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulose-Membranen wurde mittels „semidry-transfer“ ausgeführt [128]. Dabei wurde ein Gel-Membran-Sandwich mit puffergetränkten Filterpapieren zwischen die Elektroden einer Western Blot-Kammer (CarboGlas, Schleicher & Schuell, Dassel) plaziert und die Proteine durch Elektroblothing transferiert (0.8mA/cm², 30-60min).

2.2.5.6 *Antikörpernachweis von Proteinen*

Für den Nachweis von immobilisierten Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels spezifischer Antikörper wurde die Membran zunächst für 1h mit 5% Magermilchpulver in PBS blockiert. Die primären Antikörper wurden in geeigneter Verdünnung in Puffer aufgenommen (1:5000 in PBS / 5% Milchpulver) und die Membran für 1h bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht damit inkubiert. Es folgten drei Waschungen mit PBS (5min), dann wurde für 1h mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert (1:10000 in PBS / 5% Milchpulver). Nach drei weiteren Waschungen in PBS folgte eine Inkubation mit Chemilumineszenz-Substrat (ECL, apbiotech) für 5min. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch Exposition mit Röntgenfilm.

Die Filme wurden digitalisiert (Aufnahmegerät „Modul Digit-Store Duo“, Intas, Göttingen) und densitometrisch ausgewertet mit dem Programm ScionImage (Scion Corp., USA).

2.2.6 Bestimmung der IDO-Aktivität im Zellassay

Die Messung der IDO-Aktivität basiert auf dem Nachweis des Endprodukts der von der IDO katalysierten Reaktion, L-Kynurenin, im Zellüberstand. Die Tests wurden in 96-well Mikrotiterplatten angesetzt, mit 3×10^4 Zellen in einem Endvolumen von 200µl. Um den Test mit Substrat anzureichern wurde L-Tryptophan auf eine

Endkonzentration von 100µg/ml zugesetzt (Stocklösung 4mg/ml in RPMI 1640, aufbewahrt bei -25°C). Das Kulturmedium selbst enthielt 15µg/ml Tryptophan.

Die Zellen wurden für 72h mit einer Verdünnungsreihe von IFN γ und einer konstanten Konzentration von weiteren Zytokinen stimuliert, jeder Messwert als Dreifachbestimmung. Dann wurden 160µl des Überstandes in eine Spitzbodenplatte pipettiert und 10µl 30% Trichloressigsäure (TCA) zugesetzt, um Proteine auszufällen. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad bei 50°C für 30min, um das Zwischenprodukt N-Formylkynurenin zu L-Kynurenin zu hydrolysieren. Anschließend wurden die ausgefallenen Proteine 10 Minuten bei 1800rpm abzentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0). Dann wurden 100µl des Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt, mit 100µl Ehrlich's Reagenz versetzt und die Absorption bei 492nm im ELISA-Photometer (SLT Labinstruments, Crailsheim) gemessen.

Ehrlich's Reagenz reagiert mit Kynurenin zu einem gelben Azofarbstoff. Das Reagenz wurde für jede Messung frisch angesetzt. Die Stärke der Absorption bei 492nm repräsentiert die Menge an gebildetem Kynurenin [130].

Ehrlich's Reagenz: p-Dimethylaminobenzaldehyd, 12mg/ml in 96% Essigsäure

2.2.7 Bestimmung der IDO-Aktivität im Zellextrakt

Bei diesem Test wurde nicht die Akkumulation von L-Kynurenin über einen langen Zeitraum nachgewiesen, sondern die momentane IDO-Aktivität im Zellextrakt. Dafür wurden Zellen für 24 Stunden mit IFN γ stimuliert und anschließend geerntet. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden für jede Probe 2×10^6 lebende Zellen in 200µl PBS (mit PIC) aufgenommen und durch 3-5 Zyklen freeze-thaw lysiert. Die nach einer Zentrifugation (10000rpm, 10min, 4°C) erhaltenen Überstände wurden als Zellextrakte eingesetzt. Für eine Messung wurden 200µl Extrakt mit 200µl 2x IDO-Reaktionspuffer vereinigt und für 30min bei 37°C inkubiert. Jede Messung wurde als Doppelbestimmung ausgeführt (je zwei Extrakte von je 2×10^6 Zellen pro Messwert). Um den Einfluss von NO auf die hier gemessene IDO-Aktivität zu untersuchen, wurden chemische NO-Donoren eingesetzt (s. Punkt 2.2.12). Diese wurden in verschiedenen Konzentrationen direkt vor Zugabe des Zellextraktes in den Reaktionspuffer gegeben.

Nach der Inkubation bei 37°C wurden den Ansätzen 30µl 30% TCA zugegeben, gefolgt von einer weiteren Inkubation bei 50°C (30min, Hydrolyse des N-Formylkynurenin zu L-Kynurenin). In den nach der anschließenden Zentrifugation (10000rpm, 10min, RT) erhaltenen Überständen wurde das L-Kynurenin durch Reaktion mit Ehrlich's Reagenz wie unter Punkt 2.2.6 beschreiben nachgewiesen.

2x IDO-Reaktionspuffer: 100mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5
40mM Ascorbat
20µM Methylenblau
200µg/ml Katalase
800µM L-Tryptophan

Der Reaktionspuffer wurde angesetzt nach der Vorgabe von Feng und Taylor [131]. Dem Puffer werden Ascorbat (Antioxidationsmittel) und Methylenblau zugesetzt, um die IDO in der aktiven Fe²⁺-Form zu bewahren. Freie IDO oxidiert sehr schnell unter Bildung von katalytisch inaktivem Fe³⁺-Häm. Die Katalase ist notwendig um das im Zellextrakt entstehende Wasserstoffperoxid zu eliminieren, da Peroxid-Ionen die IDO inhibieren. Sie wurde direkt vor Verwendung des Puffers frisch zugegeben, die restlichen Komponenten wurden vorgemischt und bei -25°C gelagert.

2.2.8 Bakterienwachstum im Testsystem

Um die bakteriostatische Wirkung der IDO-vermittelten Tryptophan-Depletion zu messen, wurden Testsysteme analog denen zur IDO-Aktivitätsbestimmung (Punkt 2.2.6) eingesetzt. 3×10^4 A549-Zellen pro well wurden für 72h mit einer Verdünnungsreihe von IFN γ , teilweise zusammen mit einer konstanten Konzentration von IL-1 β (100U/ml), stimuliert. Dabei wurde jeder Messwert als Dreifachbestimmung angesetzt. Anschließend wurden die Zellüberstände mit einer konstanten Anzahl Streptokokken der Gruppe B infiziert, wobei die Bakterien entweder nur in tryptophanfreiem Medium oder gleichzeitig mit einer frischen Tryptophan-Lösung (auf eine Endkonzentration von 100µg/ml L-Trp im Test) zugegeben wurden. Die Tests wurden anschließend für weitere 24h inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung des Bakterienwachstums durch Messung der Trübung des Zellüberstandes bei 620nm im ELISA-Photometer.

NOS-Inhibitor: AMT Hydrochlorid (Calbiochem)

AMT (2-Amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazin) wirkt als Substratanalogon und ist ein selektiver iNOS-Inhibitor (IC_{50} 3.6nM). Es wurde mit einer Konzentration von 100µg/ml eingesetzt. Stocklösungen von 2mg/ml wurden in Medium hergestellt und bei $-25^{\circ}C$ gelagert.

Da die Griess-Reaktion in der vereinfachten Form, wie sie hier durchgeführt wurde, nur Nitrit aber kein Nitrat nachweist, unterschätzt dieser Test die tatsächlich entstandene Menge NO. Für einen genaueren Nachweis wird vor der Messung eine Nitrat-Reduktase-Reaktion durchgeführt, um Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Dieser Test diente aber nur dem vergleichenden Nachweis einer NO-Produktion und musste daher nicht quantitativ genau sein.

2.2.10 Bestimmung der iNOS-Aktivität im Zellextrakt

Während die Messung von akkumuliertem Nitrit im Zellüberstand eine NOS-Aktivität über einen langen Zeitraum anzeigt, kann mit der hier beschriebenen Methode eine momentane NOS-Aktivität im Zellextrakt gemessen werden. Dazu wurde der NOSdetect-Kit von Stratagene verwendet. Für den Test wurden Zellextrakte mit Tritium-markiertem Arginin ($[^3H]$ -Arginin) inkubiert. War im Extrakt eine NOS-Aktivität vorhanden, so wurde das $[^3H]$ -Arginin zu NO und $[^3H]$ -Citruillin umgesetzt. Das $[^3H]$ -Citruillin wurde dann auf einer Säulenmatrix von überschüssigem $[^3H]$ -Arginin getrennt und im Szintillationszähler gemessen.

Für einen Test wurden Zellen in 25cm²-Kulturflaschen über verschiedene Zeiträume geeignet stimuliert. Dann wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im 2ml PBS / PIC mit einem Zellschaber geerntet, in 2ml-Eppendorfgefäße überführt und für 2min bei 13000rpm und 4°C abzentrifugiert (Heraeus Labofuge fresco). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet in 100µl 1x Homogenization buffer (im Kit enthalten) / PIC aufgenommen und durch drei Zyklen freeze-thaw lysiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (13000rpm, 5min, 4°C) wurde eine Bestimmung der Proteinkonzentration im Überstand durchgeführt und 50-100µg Gesamtprotein für den Assay eingesetzt. Dieser wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Jede Probe wurde zweifach angesetzt. Die Inkubationszeit der Proben betrug 20 Minuten bei 37°C. Als Kontrollen dienten Extrakte von nicht stimulierten Zellen und Ansätze, die mit dem NOS-Inhibitor N-Nitro-Arginin versetzt wurden (war im Kit enthalten).

Nach Aufreinigung der Proben über die Säulenmatrix wurde der Durchfluss mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (ReadySafe, Beckman) gemischt und im Szintillationszähler (LS 3801, Beckman) gemessen.

2.2.11 Realtime-PCR (TaqMan™-Technik)

Zur Quantifizierung des zellulären Gehaltes an IDO-mRNA unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wurde zunächst die Gesamt-RNA der Zellen präpariert. Ein Teil der RNA (1µg) wurde anschließend für die Synthese von cDNA-Einzelsträngen unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern verwendet (Advantage RT-for-PCR Kit, BD Biosciences). Die cDNA wurde in der nachfolgenden Realtime-PCR als Template für die Quantifizierung eingesetzt.

Die Sequenzen der in der Realtime-PCR verwendeten Oligonukleotide für die Amplifikation und Quantifizierung der IDO-mRNA lauteten:

IDO forward real: 5'-CGC CTT GCA CGT CTA GTT CTG

IDO reverse real: 5'-CGG ACA TCT CCA TGA CCT TTG

IDO Sonde: 5'-(FAM) ATG CAT CAC CAT GGC ATA TGT GTG GG (TAMRA)

Generiert wird ein Amplicon der Basenpaare 868-938 der IDO-mRNA (GeneBank Accession-Nr. M34455). Die Primer wurden von MWG Biotech (Eberling) synthetisiert, die Sonde von Eurogentec (Seraing, Belgien).

Als Standard für die Quantifizierung diente eine Verdünnungsreihe des Konstruktes aus dem Plasmid pMEP4 mit der vollständigen Sequenz des kodierenden Bereiches der IDO-mRNA (hergestellt von Ralf Langen, Institut für Med. Mikrobiologie). Die Berechnung der Anzahl der Moleküle in diesem Standard erfolgte durch Messung der optischen Dichte einer Lösung des Konstruktes ($1OD_{260nm} = 50\mu\text{g/ml DNA}$). Aus der bekannten Größe des Plasmids (11612bp mit Insert) konnte sein Molekulargewicht berechnet werden, wobei das Molekulargewicht eines Basenpaares näherungsweise als 660g/mol angenommen wurde. Die nun bekannte

molare Konzentration der Standardlösung wurde mit Hilfe der Avogadro-Zahl ($6,022 \times 10^{23}$ Moleküle pro Mol) in eine absolute Molekülzahl umgerechnet.

Als interner Standard für jede Probe wurde gleichzeitig der Gehalt an GAPDH-mRNA quantifiziert. Dazu wurde der „GAPDH TaqMan™ Endogenous Control Kit“ von Eurogentec nach Angaben des Herstellers verwendet.

Ein Ansatz für die Realtime-PCR bestand aus folgenden Komponenten:

5µl Template
25µl qPCR™ Mastermix
0.3µM Primer
3µM Sonde
Aqua dest. ad 50µl

Der „qPCR™ Mastermix“ (Eurogentec) enthält dNTPs, Magnesiumchlorid, Uracil-N-Glykosylase und eine Hotstart-DNA-Polymerase. Jeder einzelne Ansatz wurde in eine Vertiefung auf einer optischen 96well-Platte pipettiert, die Standard-Ansätze wurden als Doppelbestimmung gemessen. Die Reaktion wurde im ABI Prism 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems) ausgeführt.

Cycling-Programm: 50°C, 2min
 95°C, 10min
 95°C, 15sec } x40
 60°C, 1min

Die Taqman-Technik unterscheidet sich von einer konventionellen PCR dadurch, dass zusätzlich zu den Primern noch eine sequenz-spezifische Sonde eingesetzt wird, die zwischen den Primern am Template bindet. Diese Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Farbstoff (6-Carboxy-fluorescein, FAM), am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) modifiziert. Zusätzlich ist das 3'-Ende chemisch phosphoryliert, damit hier keine Extension der Sonde erfolgen kann. In der intakten Sonde unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporters aufgrund der räumlichen Nähe durch „Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer“ (FRET). In der Extensionsphase der PCR, wenn beide

Primer und die Sonde am Template gebunden haben, trifft die Polymerase auf die Sonde und beginnt sie zu verdrängen. Es bildet sich eine Y-förmige Struktur, durch welche die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase aktiviert wird. Daraufhin wird die Sonde hydrolysiert, der Reporterfarbstoff befindet sich nicht mehr in räumlicher Nähe des Quenchers und kann mit Licht einer spezifischen Wellenlänge (488nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Dieses Signal ist strikt sequenzspezifisch, weil eine nicht exakt gebundene Sonde von der Polymerase verdrängt wird, bevor die Exonuklease-Aktivität einsetzt. Die Zunahme der Fluoreszenz wird bei jedem Zyklus von einer CCD-Kamera erfasst. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit der zum Cycler gehörenden ABI SDS-Software.

2.2.12 Chemische NO-Donoren

2.2.12.1 *Allgemeines*

Um Zellen auch ohne eine Induktion der iNOS mit NO inkubieren zu können, wurden in dieser Arbeit chemische NO-Donoren verschiedener Substanzklassen eingesetzt (Produktion von exogenem NO). Alle NO-Donoren wurden als Feststoff bei -25°C gelagert und entsprechende Lösungen erst direkt vor dem Einsatz in der Zellkultur hergestellt. Alle diese Donoren zerfallen in Lösung mit einer bestimmten Halbwertszeit ($t_{1/2}$), wobei sich NO und, je nach Donor, ein zweites Reaktionsprodukt bilden. Dieses zweite Reaktionsprodukt sollte im Test keinen Einfluß auf die Zellen haben. Daher wurden als Kontrollen stets „entgaste“ Formen der Donoren mitgeführt, die in dieser Arbeit stets als –NO-Form bezeichnet werden (so ist DETA_{NO} die entgaste Form von DETA/NO). Für ihre Herstellung wurde der entsprechende Donor nach Protokoll in Lösung gebracht und diese Lösung dann für 3-7 Tage bei 37°C inkubiert. Dabei wurde die Lösung immer wieder geschüttelt und das Reaktionsgefäß geöffnet, um entstandenes NO entweichen zu lassen. Nach der Inkubation wurden die Kontrollen bei -25°C gelagert, für einen Test aufgetaut und in der höchsten verwendeten Konzentration des Donors eingesetzt.

2.2.12.2 *Diazeniumdiolate (NONOate)*

Bei diesen Substanzen handelt es sich um Polyamine, die eine funktionelle $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^{-}$ Gruppe tragen. Sie sind als Feststoff und in basischer Lösung stabil, zerfallen bei neutralem oder saurem pH aber nach der folgenden Reaktion

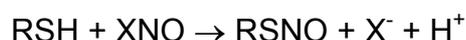


Dabei handelt es sich um einen spontanen Zerfall, dessen Geschwindigkeit nur von der Temperatur abhängt. Diese Stoffe sind als NO-Donoren sehr variabel, denn die Struktur der Grundsubstanz X beeinflusst die Halbwertszeit des Stoffes. So können für verschiedene Versuche, je nachdem ob eine stetige oder eine kurzlebige NO-Freisetzung erforderlich ist, Substanzen mit einer passenden Halbwertszeit eingesetzt werden. Von NONOaten sind Halbwertszeiten von 1 Minute bis 1 Tag gemessen worden [133].

Synthetisiert und untersucht wurden diese Substanzen vor allem von dem amerikanischen Chemiker L. K. Keefer [134]. Da für die NONOate keine einheitliche internationale Nomenklatur besteht, werden die in dieser Arbeit verwendeten Stoffe durchgehend mit ihren Kürzeln DETA/NO und MAMA/NO bezeichnet.

2.2.12.3 S-Nitrosothiole (RSNOs)

S-Nitrosothiole sind Verbindungen, die eine oder mehrere S-nitrosierte Thiolgruppen beinhalten. Das können Aminosäuren, Peptide oder Proteine sein. Sie entstehen durch die Reaktion der Grundsubstanz mit einem NO-Donor einer anderen Substanzklasse oder saurem Nitrit in Gegenwart von Sauerstoff nach der Formel



Diese Reaktion wird als S-Nitrosierung bezeichnet. Wie die NONOate unterscheiden sich die S-Nitrosothiole auch in ihren Halbwertszeiten. S-Nitroso-Gruppen in Proteinen können sehr stabil sein, während niedermolekulare Verbindungen (z.B. S-Nitrosocystein) kurzlebig sind. Im Gegensatz zu den NONOaten ist die Halbwertszeit der S-Nitrosothiole aber nicht nur durch die Temperatur beeinflusst. Der Zerfall wird katalysiert und hängt ab von der Konzentration an Eisen, Kupfer und anderen SH-Gruppen in der jeweiligen Lösung. Außerdem ist die S-NO-Bindung lichtempfindlich. Der Zerfall der S-Nitrosothiole ist im Einzelfall nicht genau untersucht. Häufig entstehen jedoch NO und das entsprechende Disulfid durch homolytische Spaltung der S-N-Bindung:



Klar ist jedoch, dass auch heterolytische Spaltungen vorkommen, wobei dann getrennte Ladungen entstehen. Die genauen Regeln des Zerfalls einzelner S-Nitrosothiole sind aber nicht bekannt.

2.2.13 Eigenschaften und Herstellung der verwendeten NO-Donoren

2.2.13.1 *Diethylentriamin-NONOat (DETA/NO)*

DETA/NO wurde synthetisiert und zur Verfügung gestellt von K.-D. Kröncke (Arbeitsgruppe Immunbiologie, HHU Düsseldorf). Die Grundsubstanz ist Diethylentriamin (DETA). DETA/NO gehört zur Klasse der NONOate und zerfällt bei 37°C in PBS mit einer Halbwertszeit von etwa 8 Stunden. Dabei entstehen pro mol zerfallenem DETA/NO 1mol DETA und 2mol NO.

Für eine 50mM Gebrauchslösung wurden 1.64mg DETA/NO in 194µl eiskaltem Aqua dest. gelöst und mit 6µl 1M HCl auf einen neutralen pH eingestellt.

2.2.13.2 *MAMA/NO*

Als zweites NONOat wurde MAMA/NO eingesetzt, ein Derivat des N,N'-Bismethyl-1,6-hexendiamins. Es wurde ebenfalls synthetisiert und zur Verfügung gestellt von K.-D. Kröncke. Wie bei allen NONOaten entstehen beim Zerfall MAMA und NO im molaren Verhältnis 1:2. MAMA/NO hat bei 37°C in PBS eine Halbwertszeit von 2 Minuten.

Für eine 50mM Gebrauchslösung wurden 1.09mg MAMA/NO in 100µl PBS gelöst.

2.2.13.3 *S-nitroso-L-glutathion (GSNO)*

Hierbei handelt es sich um Glutathion, bei dem die SH-Gruppe des enthaltenen Cysteins S-nitrosiert ist (RSNO-Verbindung). Es wurde bezogen von Alexis Biochemicals, die Halbwertszeit liegt im Bereich von mehreren Stunden. Beim Zerfall entstehen äquimolare Mengen NO und oxidiertes Glutathion (GSSG).

Für eine 50mM Gebrauchslösung wurden 1.68mg GSNO in eiskaltem PBS gelöst und direkt eingesetzt.

2.2.13.4 *S-nitroso-L-cystein (SNOC)*

SNOC ist S-nitrosiertes Cystein. Es hat in PBS bei 37°C eine Halbwertszeit von 25 Minuten, beim Zerfall entstehen NO und Cystin (dimerisiertes Cystein).

Für eine 100mM Gebrauchslösung wurden 0.69mg Natriumnitrit und 1.76mg L-Cystein (Hydrochlorid) jeweils in 48µl eiskaltem Aqua dest. gelöst. Die beiden

Lösungen wurden vereinigt und mit 2µl 1M HCl angesäuert, anschließend mit 1-2µl 1M NaOH neutralisiert [135].

2.2.13.5 *S*-nitroso-*N*-acetyl-*D,L*-penicillamin (SNAP)

SNAP wurde von Alexis Biochemicals bezogen. Es handelt sich um eine *S*-Nitroso-Verbindung (ein Derivat des Penicillins) mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde in PBS bei 37°C.

Für eine 100mM Gebrauchslösung wurden 2.1mg SNAP in 100µl DMSO gelöst, für eine 9mM Lösung 2mg in 1ml Aqua dest.

Die Strukturformeln der oben beschriebenen chemischen NO-Donoren sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

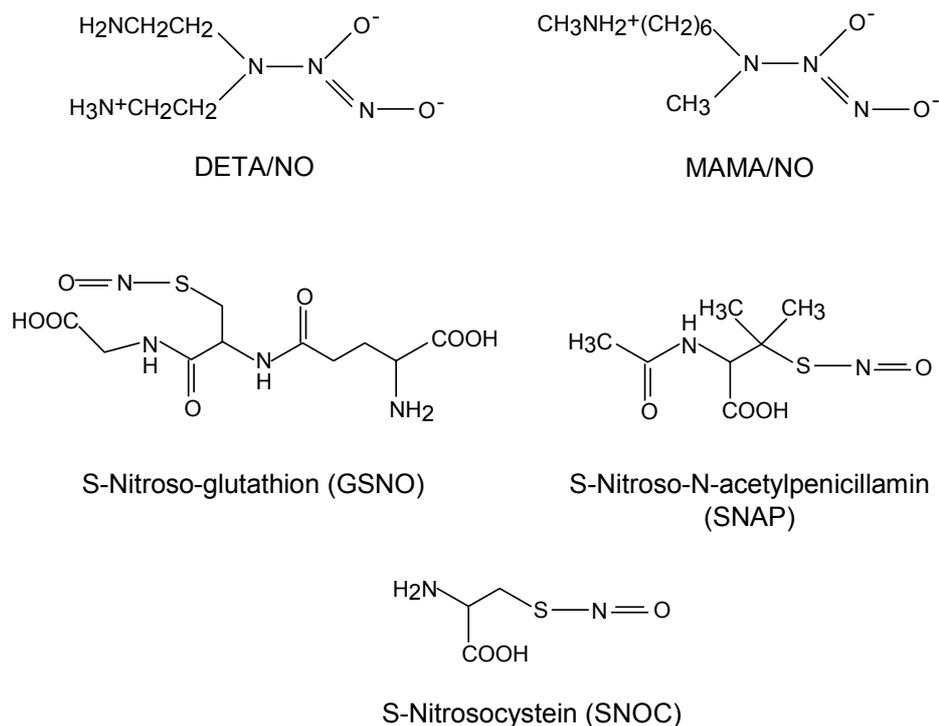


Abb. 4: Die chemische Struktur der NO-Donoren, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

2.2.14 Bestimmung der zellulären Proteinsyntheserate

Um zu untersuchen, ob IFN γ oder DETA/NO einen Einfluß auf die generelle Proteinsyntheserate der Zellen haben, wurde der Anteil TCA-präzipitierbarer counts aus Zellen gemessen, die für kurze Zeit mit radioaktiv markiertem L-Cystein und L-Methionin (Tran³⁵S-Label, ICN Biomedicals) inkubiert wurden. Für die Messungen wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen in 24well-Platten für verschiedene Zeiträume mit IFN γ , DETA/NO oder beidem stimuliert (jeweils Doppelbestimmungen). Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen und Zellen, die mit einem Inhibitor der Proteinsynthese, Cycloheximid (CHX, Calbiochem), inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit vorgewärmtem Puls-Medium gewaschen und anschließend für 15 Minuten in Puls-Medium inkubiert, um den intrazellulären Cystein- und Methionin-Pool zu depletieren. Dem Medium wurden dabei die Substanzen zugesetzt, mit denen zuvor stimuliert wurde. Nach den 15 Minuten wurde 0.1 μ Ci/ml Tran³⁵S Label zugegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten gepulst, dann zweimal mit PBS gewaschen und in 500 μ l Lysepuffer für die Immunpräzipitation (IP-Lysepuffer) lysiert (30min, 4°C). Das Lysat wurde in Eppendorfgefäße überführt, 10 Minuten zentrifugiert (10000rpm, 4°C) und der Überstand für die Bestimmung der Syntheserate verwendet.

IP-Lysepuffer: 50mM Tris-Cl pH 7.5
 150mM NaCl
 1% Igepal CA-630
 0.5% Deoxycholat

Jeweils 10 μ l der Überstände wurden auf Glasfasermikrofilter (Whatman GF/C) pipettiert und 10 Minuten an der Luft getrocknet. Dann wurden die Filter in 10% TCA getaucht und auf Papiertüchern getrocknet. Der Vorgang wurde wiederholt und die Filter beim Trocknen auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Filter noch zweimal in TCA getaucht und getrocknet und zweimal in Ethanol. Die jetzt vorhandene Radioaktivität wurde als TCA-präzipitierbarer Anteil angesehen. Die Mikrofilter wurden nach Zugabe von 5ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler gemessen. Die dabei messbare Radioaktivität ist ein Maß für die Effektivität der Proteinsynthese während der 30 Minuten, in denen die Zellen mit radioaktiven Aminosäuren inkubiert wurden.

Puls-Medium bestand aus RPMI 1640 ohne L-Cys und L-Met, zugesetzt wurden 5% FCS und 2mM L-Glutamin. Chase-Medium bestand aus den gleichen Komponenten, wurde aber zusätzlich mit 20mg/l L-Cys und 20mg/l L-Met angereichert. Das für beide Medien verwendete FCS wurde über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert, um im Serum vorhandene Aminosäuren zu entfernen.

2.2.15 Pulse-Chase-Experimente und Immunpräzipitation (IP)

Diese Experimente sollten die Wirkung von NO auf bereits gebildetes IDO-Protein deutlich machen. Für eine Probe wurden 2×10^6 Zellen in 6well-Platten für 16h mit 100U/ml IFN γ stimuliert. Dann wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit Puls-Medium gewaschen und anschließend in Puls-Medium mit 100U/ml IFN γ inkubiert, um den intrazellulären Pool an Cystein und Methionin zu depletieren. Nach 15 Minuten wurden 0.1 μ Ci Tran³⁵S Label zugegeben und die Zellen für weitere 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt, die Zellen dreimal mit Chase-Medium gewaschen und für verschiedene Zeiträume in Chase-Medium mit oder ohne Zusatz von 750 μ M DETA/NO inkubiert.

Nach dem Chase wurde der Überstand abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 1ml IP-Lysepuffer (mit PIC) bei 4°C für 20-30min lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10min, 10000rpm, 4°C) und der resultierende Überstand für eine Immunpräzipitation der IDO sowie für eine Bestimmung der gesamten TCA-präzipitierbaren Radioaktivität (s. Punkt 2.2.14) verwendet.

Für die Bestimmung der Menge des radioaktiv markierten IDO-Proteins wurde dieses mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat aufgereinigt. Dazu wurde das Lysat zunächst mit 100 μ l Protein A-Sepharose (UltraLink™, Pierce) versetzt und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses „Precleaning“ diente der Entfernung von Proteinen, die unspezifisch an Protein A-Sepharose binden. Die Sepharose wurde anschließend abzentrifugiert (13000rpm, 5min, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden dem Lysat 5 μ l monoklonaler IDO-Antikörper zugegeben, gefolgt von einer Inkubation auf dem Drehrad (4°C, 8-16h). Nach Zusatz von 120 μ l Protein A-Sepharose folgte eine weitere Inkubation für 8-16h bei 4°C oder für 2h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Sepharose mit den Immunkomplexen abzentrifugiert (13000rpm, 5min 4°C), dreimal mit IP-Lysepuffer

gewaschen und in 40µl Protein-Probenpuffer aufgenommen. Nach Erhitzen auf 95°C für 5min wurde die Sepharose nochmals abzentrifugiert (13000rpm, 2min) und der Überstand auf einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, gefolgt von einer Autoradiografie mit Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) bei -80°C für drei Tage. Die entstandenen Filmschwärzungen wurden densitometrisch ausgewertet (Software ScionImage).

2.2.16 Inhibition von zellulären Funktionen

Um die Auswirkungen einer NO-Produktion auf das IDO-Protein zu untersuchen, wurden Inhibitoren und Aktivatoren gegen verschiedene Zielmoleküle eingesetzt. Dies betraf die Proteinbiosynthese, die RNA-Synthese und den Proteinabbau. Die Ausführung der Versuche war bei allen Untersuchungen gleich. Die Zellen wurden für 8-16h mit IFN γ stimuliert. Dann wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium mit den entsprechenden Inhibitoren (ohne IFN γ) zugegeben. Eine Stunde später wurde ein NO-Donor zugegeben und die Zellen für weitere 16h inkubiert. Anschließend folgte die Lyse der Zellen und die Untersuchung des Gehaltes an IDO-Protein im Western Blot.

2.2.17 Inhibition der Protein- und RNA-Synthese

Um zu untersuchen, ob für den NO-vermittelten Effekt eine Neusynthese von RNA oder Proteinen notwendig ist, wurden Inhibitoren der Proteinsynthese (Cycloheximid, CHX) und der RNA-Synthese (Actinomycin D, ActD) eingesetzt. Stocklösungen von CHX (10mg/ml in Ethanol) und ActD (5mg/ml in Methanol) wurden bei -25°C gelagert. Cycloheximid wurde bezogen von Calbiochem (Bad Soden), Actinomycin D von US Biochemicals (USA). Die eingesetzten Konzentrationen waren 10µg/ml CHX und 5µg/ml ActD.

2.2.18 Inhibition des lysosomalen Proteinabbaus

Um eine Beteiligung des Lysosoms am Abbau desIDO-Proteins zu testen, wurden Chemikalien eingesetzt welche die Einstellung des sauren pH-Wertes im Lysosom verhindern. Unter diesen Bedingungen sind die lysosomalen Proteasen nicht oder nur schwach aktiv. Eingesetzt wurde Chloroquin (CQ), eine zellpermeable, schwach basische Substanz, die sich in sauren Kompartimenten anreichert und diese alkalisiert. Chloroquin (Sigma, Deisenhofen) wurde als 100mM-Stock in PBS gelöst und bei -80°C gelagert. Als weiterer Inhibitor wurde Bafilomycin A₁ (BA₁) eingesetzt, ein spezifischer Inhibitor der lysosomalen v-ATPase [136]. Diese wirkt als Protonenpumpe in der Membran des Lysosoms und ist maßgeblich an der Ansäuerung beteiligt. Bafilomycin A₁ (Calbiochem, Bad Soden) wurde als 0.1mM-Stock in Methanol angelegt und bei -80°C gelagert.

2.2.19 Inhibition des Proteinabbaus im Proteasom

Mit zellpermeablen Inhibitoren des Proteasoms wurde die Beteiligung dieses Protease-Komplexes am Abbau desIDO-Proteins untersucht. Die eingesetzten Inhibitoren waren:

MG-132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO)

Proteasom-Inhibitor I (PSI, Z-Ile-Glu(OBut)-Ala-Leu-CHO)

Clasto-Lactacystin β -Lacton

MG-132 und PSI sind synthetische, chemisch modifizierte Peptide. Sie inhibieren nicht nur die proteolytische Aktivität des Proteasoms, sondern *in vitro* auch noch andere zelluläre Proteasen wie Cathepsine und Calpain. *Clasto*-Lactacystin β -Lacton (Omuralid) ist kein Peptid, sondern ein zyklischer Ester. Es ist ein spezifischer Inhibitor aller proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms und inhibiert in wesentlich höheren Konzentrationen nur noch Cathepsin A [137].

Alle Inhibitoren wurden bezogen von Calbiochem (Bad Soden). Sie wurden als Stocklösungen in DMSO angelegt (21mM für MG-132, 16mM für PSI, 4.7mM für *clasto*-Lactacystin β -Lacton) und bei -25°C gelagert.

2.2.20 Bestimmung der Proteasom-Aktivität im Zellextrakt

Bei diesen Versuchen wurde die Aktivität des Proteasoms in Zellextrakten unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Sie wurden modifiziert nach Rivett *et al.* durchgeführt [138]. Bei diesen Tests wurden fluorogene Substrate für das Proteasom eingesetzt. Dabei handelt es sich um Peptide, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) modifiziert wurden. Dessen Fluoreszenz wird durch das Peptid unterdrückt. Wird das Peptid durch eine proteasomale Aktivität hydrolysiert entsteht freies AMC, welches in einem Fluoreszenz-Photometer nachgewiesen und gegen einen Standard von freiem AMC quantifiziert werden kann.

RT4-Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen bzw. einem NO-Donor für 16h inkubiert. Dann erfolgte die Lyse der Zellen und eine Proteinbestimmung. Für einen Testansatz wurden 50µg Gesamtprotein mit TBS pH 7.4 / PIC auf 98µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von fluorogenem Proteasom-Substrat auf eine Endkonzentration von 20µM. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 90 Minuten. Dann wurden 50µl Stopplösung und 50µl Aqua dest. zugegeben, die Ansätze in eine schwarze Mikrotiterplatte (Fluorotrac, Greiner) überführt und die entstandene Menge an freiem Fluoreszenzfarbstoff in einem Fluoreszenz-Photometer (FluoStar Optima, BMG) bei einer Excitation von 365nm und einer Emission von 450nm gemessen. Als Standard diente ein Verdünnungsreihe von freiem AMC (Sigma) in TBS, die ebenfalls vor der Messung mit Stopplösung und Aqua dest. verdünnt wurde. Die Messungen wurden mit der zum Photometer gehörenden Software (FluoStar) ausgewertet. Das Gerät wurde freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Immunbiologie (Leiterin: Prof. V. Kolb-Bachofen) zur Verfügung gestellt.

AMC wurde als 2mM-Stocklösung in DMSO bei -25°C gelagert. Die Endkonzentrationen in den Standardlösungen betragen 10µM bis 0.1µM.

Die eingesetzten fluorogenen Substrate waren:

Proteasom-Substrat II Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC

Proteasom-Substrat III (Z)-Leu-Leu-Glu-AMC

Das Substrat II weist die „chymotrypsin-like“-Aktivität des Proteasoms nach, das Substrat III die „peptidylglutamyl-peptide hydrolizing“ (PGPH)-Aktivität. Beide Substrate wurden als 20mM-Stock in DMSO gelöst und bei -80°C gelagert.

Stopplösung: 0,25g Natriumacetat-Trihydrat in 4.375ml 100%
Essigsäure gelöst und mit Aqua dest. auf 25ml
aufgefüllt

3 Ergebnisse

3.1 IDO-Aktivität und NO-Produktion in RT4- und A549-Zellen

Zunächst wurde das Verhalten der beiden epithelialen Zelllinien RT4 und A549 bezüglich der NO-Produktion und der Tryptophan-Depletion bei Stimulation mit verschiedenen Zytokinen untersucht. Sowohl die NOS-Aktivität als auch die IDO-Aktivität dieser Zellen wurde in einem funktionellen Test gemessen, bei dem nach einer 72stündigen Stimulation die stabilen Endprodukte der jeweiligen Reaktion (L-Kynurenin bzw. Nitrit) im Zellüberstand nachgewiesen wurden. Die Abb. 5 und 6 zeigen repräsentative Experimente.

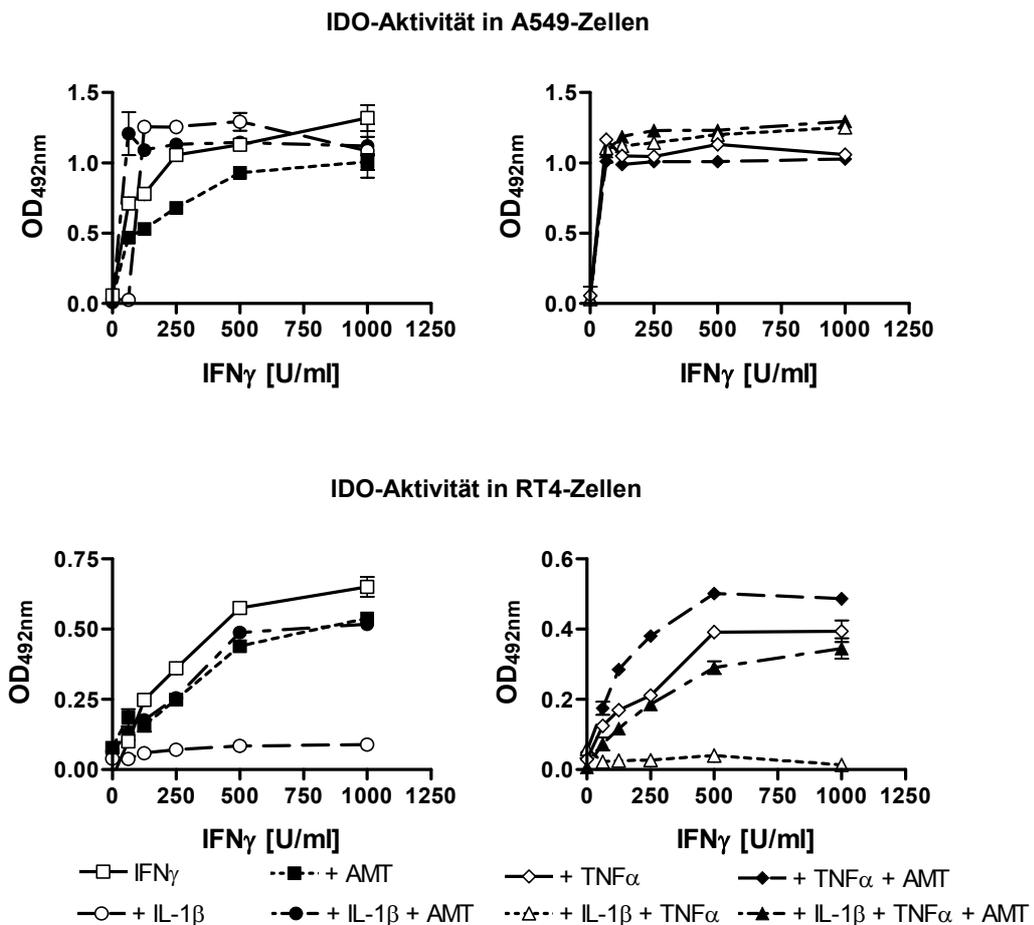


Abb. 5: Bestimmung der IDO-Aktivität in A549- und RT4-Zellen. 3×10^4 Zellen wurden für 72h mit einer Verdünnungsreihe von IFN γ und den zusätzlich angegebenen Zytokinen (100U/ml IL-1 β , 100U/ml

TNF α) bzw. einem NOS-Inhibitor (100 μ g/ml AMT) stimuliert, jeder Wert als Dreifachbestimmung. Anschließend erfolgte der Nachweis von L-Kynurenin im Zellüberstand wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben.

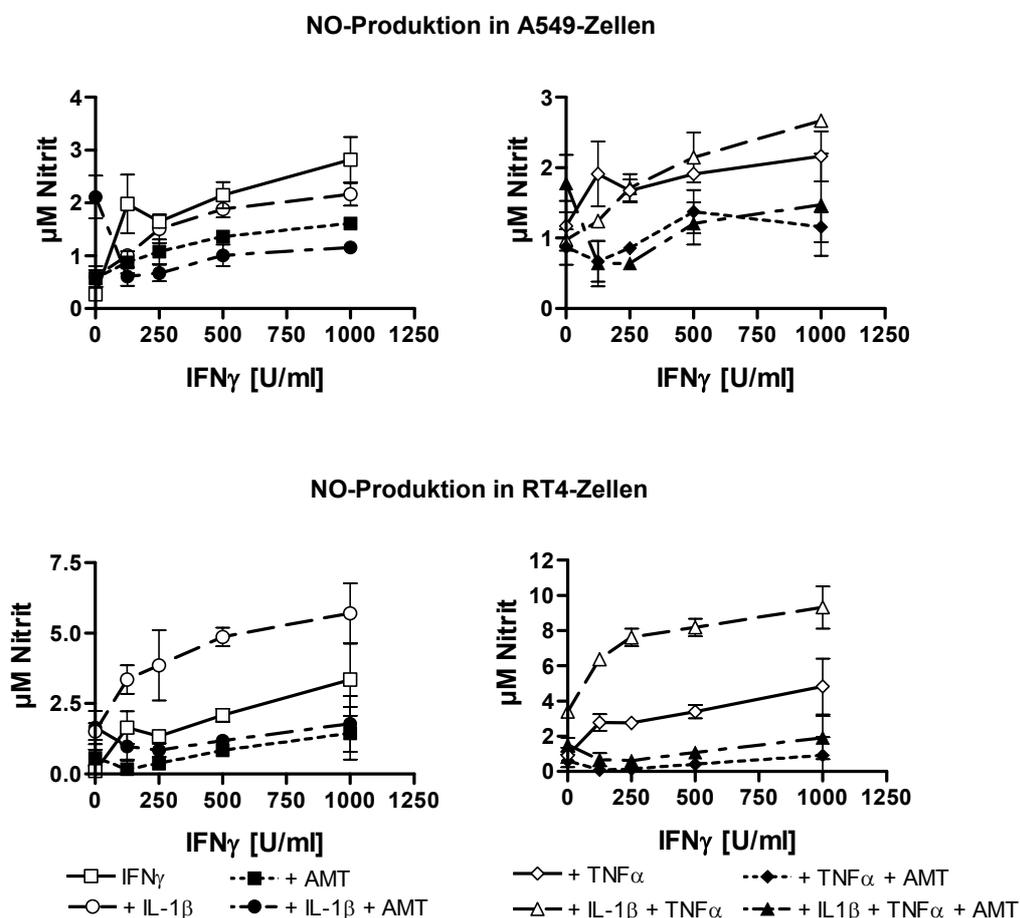


Abb. 6: Bestimmung der NO-Produktion in A549- und RT4-Zellen. 3×10^4 Zellen wurden für 72h mit einer Verdünnungsreihe von IFN γ und den zusätzlich angegebenen Zytokinen (100U/ml IL-1 β , 100U/ml TNF α) bzw. einem NOS-Inhibitor (100 μ g/ml AMT) stimuliert, jeder Wert als Dreifachbestimmung. Anschließend erfolgte der Nachweis von Nitrit-Ionen im Zellüberstand wie unter Punkt 2.2.9 beschrieben.

In diesen Experimenten zeigten die beiden Zelllinien A549 und RT4 bei identischer Stimulation ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der IDO-Aktivität. Bei A549-Zellen bewirkten die Zytokine IL-1 β und TNF α eine Steigerung der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität, die vor allem im Bereich niedriger IFN γ -Konzentrationen deutlich sichtbar war. Der selektive iNOS-Inhibitor AMT beeinflusste die IDO-Aktivität in diesen Zellen in keinem Fall. Bei den RT4-Zellen führte die Gabe von IL-1 β bzw. IL-

1β und $TNF\alpha$ zu einer kompletten Inhibition der $IFN\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität (der Zusatz von $TNF\alpha$ alleine in schwächerem Maße). Dieser Effekt wurde durch den Zusatz von AMT aufgehoben, wobei AMT keinen Einfluss auf die nur durch $IFN\gamma$ induzierte Aktivität hatte.

Auch bezüglich der NO-Produktion unterschieden sich die Zellen deutlich. Bei A549-Zellen war mit steigender $IFN\gamma$ -Konzentration eine leichte Steigerung der Nitrit-Konzentration im Zellüberstand feststellbar. Der Messwert bei einer gegebenen $IFN\gamma$ -Konzentration konnte hier durch Zugabe von $IL-1\beta$ und / oder $TNF\alpha$ nicht weiter gesteigert werden, lag aber bei Gabe des iNOS-Inhibitors AMT bei jeder Zytokin-Konzentration etwa $0.5-1\mu M$ niedriger als ohne Inhibitor (Abb. 6). Der letzte Punkt spricht dafür, dass in A549-Zellen mit sehr hohen $IFN\gamma$ -Konzentrationen ($500-1000U/ml$) eine schwache iNOS-Aktivität induzierbar ist. Ob die schwache Akkumulation von Nitrit bei niedrigen $IFN\gamma$ -Konzentrationen auf eine iNOS-Aktivität zurückzuführen ist kann nicht gesichert behauptet werden, da sich die Messwerte im Bereich von $1\mu M$ Nitrit bewegen und damit nahe an der Nachweisgrenze des Griess-Assays ($1-2\mu M$) liegen. Geringe Änderungen in der Nitrit-Konzentration können in diesem Messbereich nicht erfasst werden. Wenn unter diesen Bedingungen eine iNOS-Aktivität in A549-Zellen vorhanden ist, so ist diese auf jeden Fall so schwach, dass sie die IDO-Aktivität in den A549-Zellen bei keiner getesteten Zytokin-Konzentration beeinflusst.

RT4-Zellen produzierten im gleichen Zeitraum bei jeder gegebenen Kombination von Zytokinen wesentlich mehr NO als A549-Zellen. Bei einer Stimulation mit $IFN\gamma + IL-1\beta$ waren nach 72 Stunden etwa $5-6\mu M$ Nitrit im Zellüberstand nachweisbar, mit $IFN\gamma + IL-1\beta + TNF\alpha$ $8-9\mu M$. Die Akkumulation von Nitrit wurde durch AMT blockiert (Abb. 6). Diese Daten korrelieren gut mit denen der IDO-Aktivität in RT4-Zellen, welche bei eben diesen Zytokin-Kombinationen komplett inhibiert war, wobei die Inhibition durch AMT aufgehoben wurde (Abb. 5).

Die hier gezeigten Daten bestätigen die von unserer Arbeitsgruppe publizierten Ergebnisse, dass NO die Aktivität der IDO inhibiert [116]. Sie erweitern die vorherigen Ergebnisse um den Punkt, dass hier zum ersten Mal ein selektiver iNOS-Inhibitor eingesetzt wurde, um den hemmenden Effekt aufzuheben. Damit wird die Aussage bekräftigt, dass die NO-Produktion tatsächlich auf einer induzierten iNOS-Aktivität beruht. Die Existenz einer anderen möglichen Quelle des NO, etwa eine

latent vorhandene aber sehr schwache eNOS-Aktivität, welche durch die Inkubation mit inflammatorischen Zytokinen gesteigert wird, wird damit sehr unwahrscheinlich.

3.2 Konsequenzen der IDO-Inhibition für die Erregerabwehr

Der in den oben beschriebenen Messungen gezeigte Unterschied des Verhaltens der beiden Zelllinien hinsichtlich der NO-Produktion sollte auch funktionelle Konsequenzen für die Fähigkeit der Zellen haben, tryptophanabhängige Erreger im Wachstum zu hemmen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass RT4-Zellen nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ in der Lage sind, das Wachstum von Bakterien im Zellüberstand zu inhibieren. Diese Bakteriostase war durch Zugabe von L-Tryptophan komplett aufzuheben, was eine Tryptophan-Depletion durch die IDO als verantwortlichen Mechanismus identifizierte. Eine Stimulation der RT4-Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ + $\text{IL-1}\beta$ führte jedoch zu keiner Bakteriostase, weil das unter diesen Bedingungen von den Zellen gebildete NO die IDO-Aktivität und damit den antibakteriellen Effekt hemmt [116]. Bei den A549-Zellen war bei den hier dargestellten Untersuchungen jedoch keine starke NO-Produktion messbar und bei Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ + $\text{IL-1}\beta$ zeigte sich keine Hemmung, sondern eine Steigerung der IDO-Aktivität (Abb. 5). Diese gesteigerte Aktivität sollte sich in einem Test auch auf die IDO-vermittelte Bakteriostase auswirken.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden A549-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von $\text{IFN}\gamma$, mit und ohne Zusatz von $\text{IL-1}\beta$ für 72 Stunden stimuliert. Anschließend wurden Streptokokken der Gruppe B (häufigste Erreger einer Meningitis bei Neugeborenen) in den Zellüberstand gegeben. Dabei wurden die Bakterien alleine oder gemeinsam mit L-Tryptophan zugegeben. Nach 24 Stunden wurde das Wachstum der Bakterien im Zellüberstand photometrisch gemessen.

Innerhalb der 72 Stunden Stimulation sollten die Zellen das Tryptophan im Zellüberstand vollständig abgebaut haben, was zu einer Wachstumshemmung bei tryptophan-abhängigen Bakterien führte. Werden die Bakterien jedoch zeitgleich mit neuem L-Tryptophan zugegeben, konnte wiederum ein Wachstum der Bakterien erfolgen. Die Abb. 7 zeigt ein repräsentatives Experiment.

Hemmung des Wachstums von Gruppe B-Streptokokken In A549-Zellen

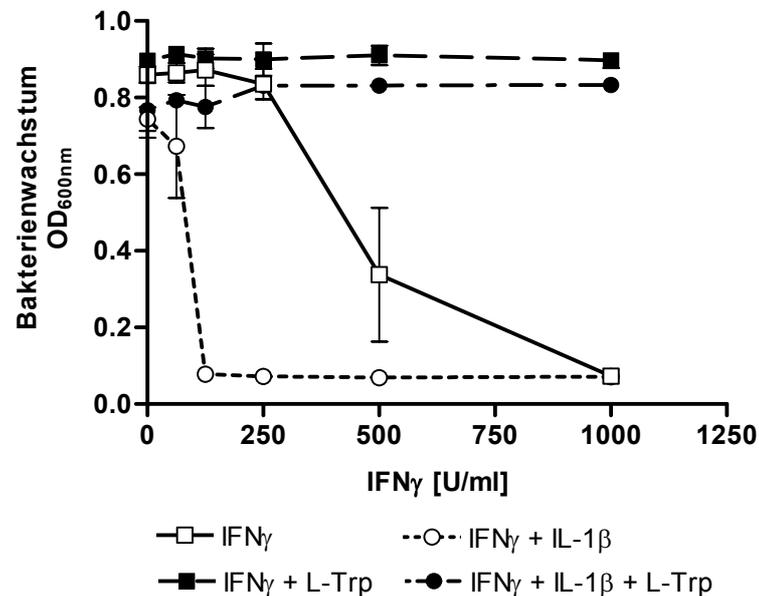


Abb. 7: IL-1 β verstärkt den IFN γ -induzierten bakteriostatischen Effekt in A549-Zellen. 3×10^4 Zellen/well wurden mit einer Verdünnungsreihe von IFN γ bzw. mit IFN γ + 100U/ml IL-1 β für 72h stimuliert. Dann wurden 40cfu Gruppe B-Streptokokken pro well zugegeben, mit oder ohne Zusatz von 100 μ g/ml L-Tryptophan. Nach einer weiteren Inkubation über 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum bei einer Wellenlänge von 600nm im ELISA-Reader gemessen.

Das Experiment zeigte eine deutliche Verstärkung des IFN γ -induzierten bakteriostatischen Effektes durch IL-1 β in A549-Zellen. Während für eine effiziente Hemmung des bakteriellen Wachstums bei Stimulation mit IFN γ alleine ein IFN γ -Konzentration von 500-1000U/ml notwendig war, so wurde bei Zusatz von 100U/ml IL-1 β diese Hemmung schon mit 125U/ml IFN γ erreicht. Wurden die Bakterien zusammen mit Tryptophan zugegeben, so konnte in beiden Fällen mit keiner der verwendeten IFN γ -Konzentrationen eine Bakteriostase erreicht werden. Das zeigt, dass in beiden Fällen der antibakterielle Mechanismus eineIDO-vermittelte Tryptophan-Depletion des Zellüberstandes war. Die Möglichkeit der Induktion eines zweiten, nicht IDO-vermittelten bakteriostatischen Mechanismus durch IFN γ + IL-1 β wurde damit ausgeschlossen.

Dieser Versuch unterstützte die Messungen der NO-Produktion und der IDO-Aktivität in den A549-Zellen: die gemessene Verstärkung der IDO-Aktivität durch IL-1 β spiegelte sich wider in einer verstärkten Bakteriostase als funktionelle Konsequenz (Abb. 5, 7). Dies stand im klaren Gegensatz zu der Situation in RT4-Zellen, wo die

gleiche Kombination von Zytokinen aufgrund der stärkeren NO-Produktion in diesen Zellen eine Inhibition der IDO-Aktivität bewirkte (Abb. 5). Eine IDO-Inhibition hat ein ungehindertes Wachstum von pathogenen Bakterien in einem Testsystem, wie es in dem oben beschriebenen Experiment verwendet wurde, zur Folge [116]. Diese Experimente zeigten die Bedeutung der IDO-vermittelten Tryptophan-Depletion als antibakterieller Effektormechanismus und die Rolle von NO als Regulator dieses Mechanismus.

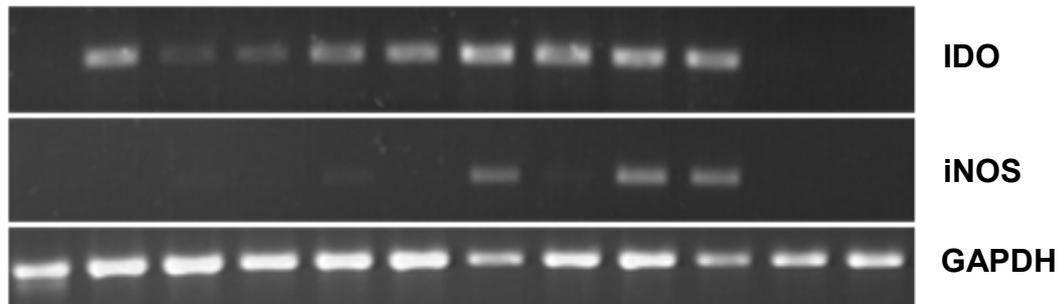
3.3 Qualitative Analyse der Transkription der IDO- und iNOS-Gene

Um die oben gezeigten funktionellen Daten zu unterstützen, wurde die initiale Induktion der IDO und der iNOS durch die verschiedenen Zytokine auf mRNA-Ebene mittels Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) verfolgt. Die Regulation der Transkription der Gene für die IDO und die iNOS durch Zytokine ist in den beiden hier verwendeten Zelllinien noch nicht eingehend untersucht worden. Bis auf die Experimente von Ganster *et al.*, welche die Struktur des iNOS-Promotors in A549-Zellen untersuchten (s. 1.4.5.2), stammen alle verfügbaren Daten zu der Regulation der iNOS und der IDO aus Zellen von anderen Geweben oder Spezies und sind aufgrund der häufig auftretenden zelltyp-spezifischen Zytokin-Effekte nicht ohne weiteres übertragbar.

Für diese Experimente wurden A549- und RT4-Zellen für 8 Stunden mit den verschiedenen Zytokinen inkubiert. Anschließend wurde von diesen Zellen die Gesamt-RNA präpariert und für eine cDNA-Synthese mittels reverser Transkription verwendet. Durch eine anschließende PCR mit spezifischen Primern wurden die cDNA-Transkripte der IDO- und iNOS-mRNA amplifiziert. Als Positiv-Kontrolle diente der Nachweis der mRNA des Glykolyse-Enzyms Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH). Die Transkription des GAPDH-Gens sollte durch die verwendeten Zytokine nicht beeinflusst werden. Repräsentative Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 8 gezeigt.

A549

--	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	IFN γ
--	--	+	--	+	--	+	--	+	+	--	--	IL-1 β
--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	--	--	TNF α
--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	--	--	AMT
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	CHX
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	ActD

**RT4**

--	+	--	--	--	+	+	+	+	+	+	+	IFN γ
--	--	+	--	+	--	+	--	+	+	--	--	IL-1 β
--	--	--	+	+	--	--	+	+	+	--	--	TNF α
--	--	--	--	--	+	--	--	--	+	--	--	AMT
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	--	CHX
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	+	ActD

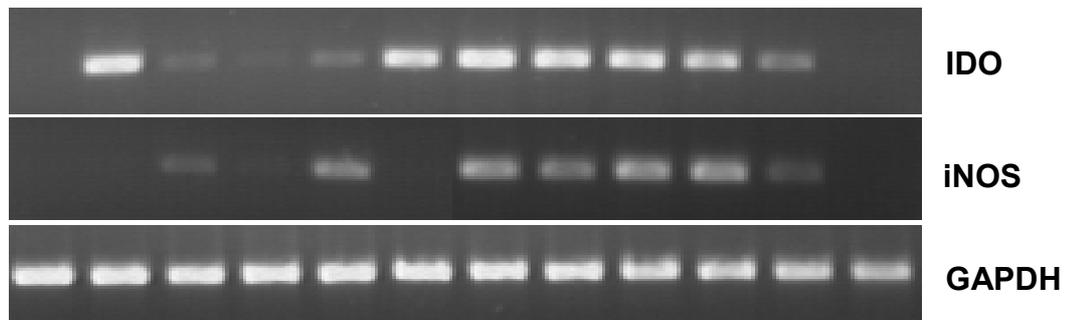


Abb. 8: Nachweis der GAPDH-, IDO- und iNOS-mRNA in unterschiedlich stimulierten Zellen mittels RT-PCR. A549- und RT4-Zellen wurden 8 Stunden mit verschiedenen Zytokin-Kombinationen stimuliert. Weiterhin wurden der selektive iNOS-Inhibitor AMT, der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) und der RNA-Synthese-Inhibitor Actinomycin D (ActD) eingesetzt, wobei CHX und ActD 30min vor den Zytokinen zugegeben wurden. Die eingesetzten Konzentrationen waren 100U/ml für jedes Zytokin, 100 μ g/ml für AMT, 10 μ g/ml für CHX und 5 μ g/ml für ActD. Die von den Zellen präparierte Gesamt-RNA wurde revers transkribiert und die erhaltenen Einzelstränge in einer anschließenden PCR amplifiziert. Die für die einzelnen Proben verwendeten Zytokin-Kombinationen sind in der Tabelle abzulesen. Die Amplifikate haben eine Größe von 464bp (IDO), 467bp (iNOS) und 892bp (GAPDH).

Die gezeigten Ergebnisse sind als rein qualitativer Nachweis der Transkripte des IDO-, iNOS- und GAPDH-Gens zu verstehen, da eine konventionelle PCR kein geeignetes Instrument für eine Quantifizierung ist. Der Nachweis mittels PCR ist jedoch aufgrund der Amplifikation sehr sensitiv: so war z. B. in beiden Zellen die IDO-mRNA bei Stimulation mit IL-1 β und TNF α ohne IFN γ nachweisbar, aber eine Enzymaktivität war unter diesen Bedingungen in unserem Testsystem nicht messbar (Abb. 5). Wichtig sind an den oberen Abbildungen zwei Fakten: erstens war in beiden Zellen bei Anwesenheit von IFN γ IDO-mRNA nachweisbar, unabhängig davon welche weiteren Zytokine eingesetzt wurden. Dies bestätigte die Rolle des IFN γ als Hauptinduktor der IDO und zeigte, dass keines der anderen Zytokine die Transkription des IDO-Gens negativ reguliert. Zweitens war in beiden Zellen iNOS-mRNA nachweisbar, in RT4-Zellen aber häufiger als in A549. So war in RT4-Zellen die Kombination von IL-1 β und TNF α ausreichend, um eine iNOS-Genexpression und eine funktionell messbare iNOS-Aktivität zu induzieren (Abb. 8, 6). Diese Kombination war bei A549-Zellen wirkungslos, hier mussten bei den in diesem Experiment verwendeten Zytokin-Konzentrationen auf jeden Fall IFN γ und IL-1 β beteiligt sein. Insgesamt schien die Induktion der iNOS in RT4-Zellen leichter und auf vielfältigere Art und Weise möglich zu sein als in A549-Zellen. Diese Ergebnisse zeigten aber auch, dass die geringfügige Akkumulation von Nitrit im Zellüberstand von A549-Zellen bei hohen Zytokin-Dosen, auch mit IFN γ alleine, wahrscheinlich auf einer iNOS-Aktivität beruhte.

Als weitere Kontrollen wurden Inhibitoren der RNA-Synthese (Actinomycin D, ActD) und der Proteinbiosynthese (Cycloheximid, CHX) eingesetzt. Der Zusatz von CHX zu IFN γ -stimulierten Zellen inhibierte die Transkription des IDO-Gens sehr stark, bei A549-Zellen vollständig. Dieser Befund bestätigte die Abhängigkeit der Transkription von der Proteinbiosynthese und wurde so erwartet. Nach heutigem Kenntnisstand ist an der IDO-Genexpression der Transkriptionsfaktor IRF-1 maßgeblich beteiligt, welcher nach Stimulation der Zellen mit Zytokinen *de novo* gebildet wird (s. 1.7.4). Die Transkription des IDO-Gens in RT4- und A549-Zellen scheint also nach den bisher in der Literatur beschriebenen Mechanismen zu erfolgen.

Insgesamt bestätigten die hier gezeigten Daten die funktionellen Messungen in der Hinsicht, dass in RT4-Zellen die iNOS durch mehrere Zytokin-Kombinationen induziert werden konnte und dass die eingesetzten Zytokine die initiale Transkription

des IDO-Gens nicht negativ regulierten. Die Hemmung der IDO-Aktivität schien also ausschließlich auf NO zu beruhen.

3.4 Inhibition der IDO-Enzymaktivität durch chemische NO-Donoren

Um den direkten hemmenden Einfluss von NO auf die Aktivität des IDO-Proteins weiter zu verifizieren, wurden Messungen der IDO-Aktivität in Zellextrakten durchgeführt. Für diese Messungen, bei denen die IDO-Aktivität über einen kurzen Zeitraum erfasst wird, wurde die humane Zelllinie 86HG39 eingesetzt. Diese hat bei gleichen IFN γ -Konzentrationen eine noch höhere IDO-Aktivität als die A549-Zelle und ist deshalb sehr gut für Versuche geeignet, bei denen nicht die Akkumulation des Endproduktes über einen langen Zeitraum, sondern die kurzzeitige Bildung dieses Produktes nachgewiesen wird. Zudem ist bei 86HG39-Zellen unter keinen Bedingungen eine NO-Produktion messbar, welche die IDO-Aktivität während der Stimulation beeinflussen könnte (Daten unserer Arbeitsgruppe, hier nicht gezeigt). Für diese Tests wurden die Zellen über 24 Stunden mit 300U/ml IFN γ stimuliert. Anschließend erfolgte die Präparation von Zellextrakten und der Nachweis der IDO-Aktivität in diesen Extrakten wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben. Als NO-Quelle wurden verschiedene chemische Donoren verwendet, die mit einer bestimmten Halbwertszeit in NO und die entsprechende Grundsubstanz zerfallen. Bei den hier eingesetzten Donoren ist die Grundsubstanz immer ein (Poly-)Amin (bei DETA/NO Diethylentriamin) oder eine Verbindung mit einer Thiolgruppe (z. B. Glutathion). Diese Grundsubstanz wurde erhalten durch Herstellen einer Gebrauchslösung des Donors, die anschließend mehrere Tage bei 37°C inkubiert wurde. Dabei bilden sich als Reaktionsprodukte die Grundsubstanz (bei Thiol-Verbindungen meistens die entsprechenden Disulfide) sowie Nitrit und Nitrat (die Reaktionsprodukte von NO mit Wasser). Wenn eine solche „entgaste“ Gebrauchslösung in einem Test unwirksam war, ein frisch angesetzte Lösung aber einen Effekt erzielte, so konnte dieser Effekt nur auf dem entstandenen NO beruhen. (s. Material und Methoden, 2.2.12).

Die Abb. 9 zeigt ein repräsentatives Experiment.

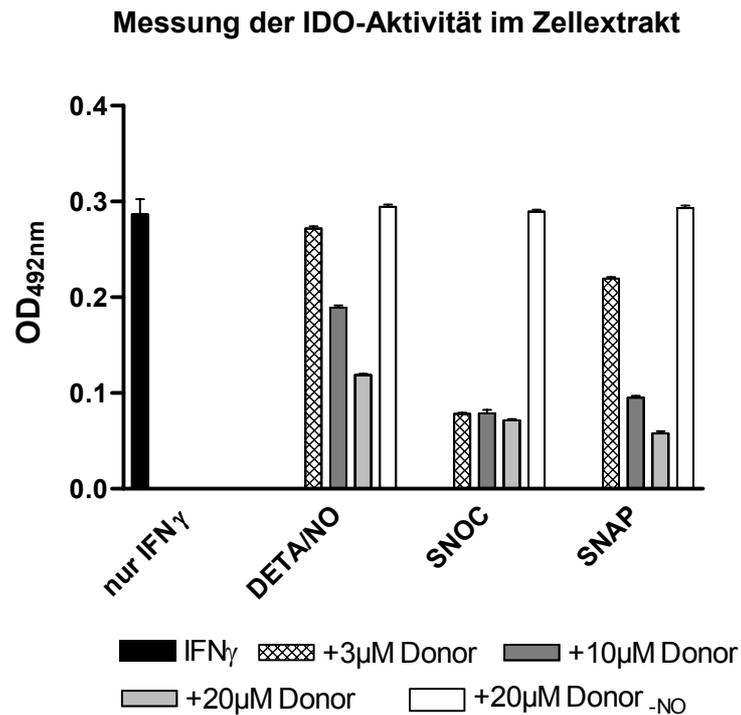


Abb. 9: Einfluss von NO auf die IDO-Aktivität in Zellextrakten von IFN γ -stimulierten Zellen. 2×10^6 86HG39-Zellen wurden für 24h mit 300U/ml IFN γ stimuliert und anschließend lysiert. Die Messungen wurden ausgeführt wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben, wobei die Ansätze für 30min bei 37°C inkubiert wurden. DETA/NO = Diethylentriamin-NONOat, SNOC = S-Nitroso-L-cystein, SNAP = S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin, „Donor $_{-NO}$ “ = entgaste Form des jeweiligen Donors.

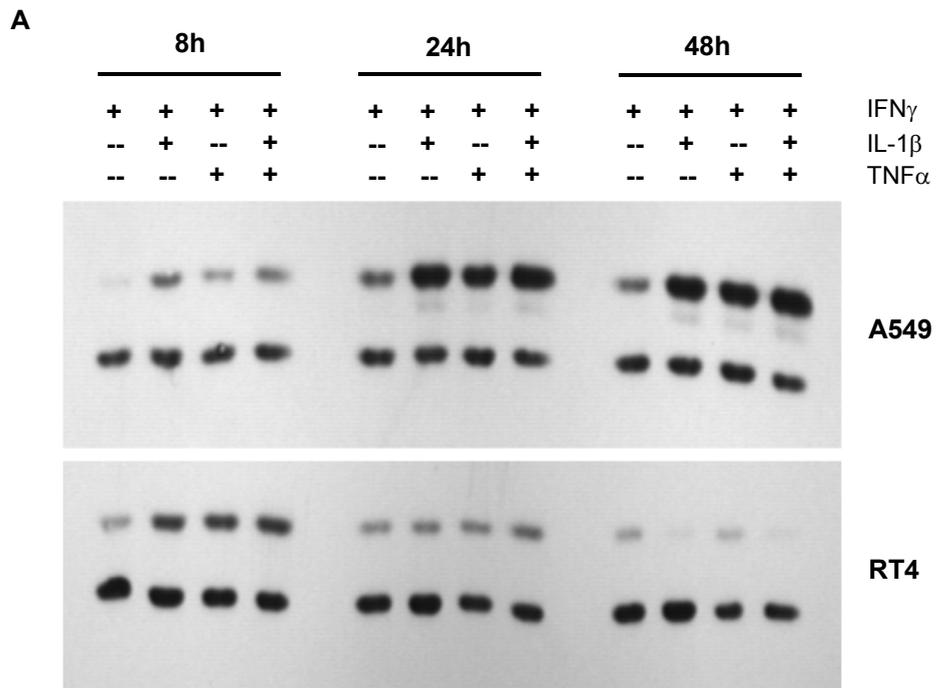
Dieses Experiment bestätigte die inhibitorische Wirkung von NO auf die IDO. Die im Extrakt von IFN γ -stimulierten Zellen nachweisbare IDO-Aktivität wurde durch Zugabe von chemischen NO-Donoren inhibiert. Das Ausmaß der Inhibition hing von der Konzentration des eingesetzten Donors und von der Halbwertszeit seines Zerfalls ab. Bei SNOC, dem Donor mit der kürzesten Halbwertszeit (ca. 25min bei 37°C), war die Stärke der Inhibition in dem verfolgten Zeitraum nicht mehr konzentrationsabhängig. Hier erzielte schon die kleinste eingesetzte Konzentration (3 μ M) die maximale inhibitorische Wirkung. Bei den Donoren mit längerer Halbwertszeit (SNAP ca. 1h, DETA/NO ca. 8h) stieg der inhibitorische Effekt mit der Konzentration. Die „entgaste“ Form der Donoren hatte in der höchsten eingesetzten Konzentration keinen Effekt auf die IDO-Aktivität. Diese Messung diente als Kontrolle und zeigte, dass die Inhibition auf dem entstehenden NO beruht und nicht auf dem zweiten Produkt des Zerfalls.

Die bisher präsentierten Experimente konnten zeigen, dass NO die Aktivität derIDO in humanen Zellen inhibiert. Die Inhibition ist konzentrationsabhängig und kann sowohl mit endogen produziertem (in intakten Zellen) als auch mit exogen appliziertem NO (im Zellextrakt) erreicht werden. Dieser Effekt konnte von anderen Arbeitsgruppen auch an anderen Zelltypen (zuerst von Thomas *et al.* an humanen Monozyten [125]) gezeigt werden und wird auf eine direkte Interaktion von NO mit dem Häm-Eisen derIDO zurückgeführt.

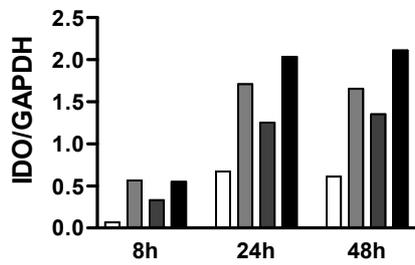
3.5 Einfluss von NO auf dasIDO-Protein

Uns hat weiterhin interessiert, ob NO noch andere Auswirkungen auf dieIDO hat. Vorbefunde lieferten Arbeiten mit der immortalisierten murinen Makrophagen-Zelllinie MT2. Makrophagen von Nagetieren besitzen eine sehr starke iNOS-Aktivität und können bei maximaler Stimulation nahezu zehnfach mehr NO produzieren als die hier verwendete RT4-Zelle. Alberati-Giani *et al.* fanden heraus, dass in IFN γ -stimulierten MT2 eineIDO-Aktivität messbar wird, wenn die Zellen zusätzlich mit einem iNOS-Inhibitor inkubiert werden. Darüber hinaus erhöht sich bei Gabe des Inhibitors auch der Gehalt anIDO-mRNA im Vergleich zu IFN γ -stimulierten Zellen [139]. In murinen Makrophagen scheint NO also auf die Transkription desIDO-Gens Einfluss zu nehmen.

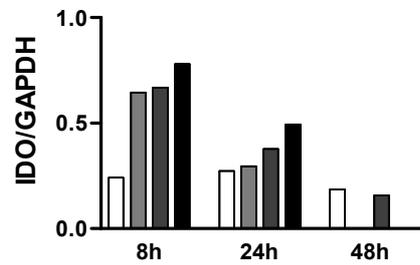
Wir haben untersucht, ob auch in RT4-Zellen NO-basierte Effekte auftreten, welche nicht nur die Aktivität, sondern auch die Expression derIDO beeinflussen. Dazu wurden RT4- und A549-Zellen mit verschiedenen Kombinationen von Zytokinen für 8, 24 und 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Gehalt anIDO-Protein in diesen Zellen im Western Blot überprüft. Die Abb. 10 zeigt ein solches Experiment.



B Densitometrie A549



C Densitometrie RT4



IFN γ
 IFN γ + IL-1 β
 IFN γ + TNF α
 IFN γ + IL-1 β + TNF α

D Densitometrie RT4 als Kinetik

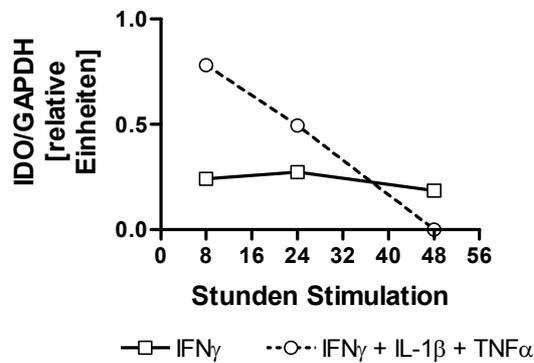


Abb. 10: Effekt der Zytokin-Stimulation auf die Expression der IDO. A549- und RT4-Zellen wurden für 8h, 24h und 48h mit $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma + \text{TNF}\alpha$ oder allen drei Zytokinen (jeweils 100U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zellextrakte im Western Blot auf den Gehalt an IDO-Protein (obere Bande) untersucht. Als Kontrolle diente der Nachweis der GAPDH (untere Bande) auf der gleichen Membran (Abb. A, 10 μg Gesamtprotein eingesetzt). Die Abb. B, C und D zeigen die densitometrische Auswertung der oben gezeigten Signale, wobei immer die Intensität der IDO-Banden auf die Intensität der GAPDH-Banden normalisiert wurde. Abb. B zeigt die Auswertung der Signalstärken der A549-Zellen, Abb. C die Auswertung der RT4-Zellen. Abb. D zeigt den zeitlichen Verlauf der normalisierten Signalstärken von RT4-Zellen bei Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta + \text{TNF}\alpha$.

Das oben dargestellte Experiment zeigte für A549-Zellen eine Steigerung der IDO-Expression durch die Zytokine $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ über den gesamten untersuchten Zeitraum. Die densitometrische Auswertung (Abb. 10 B) zeigte eine zweifache (bei Zugabe von $\text{TNF}\alpha$) bis dreifache ($\text{IL-1}\beta + \text{TNF}\alpha$) Steigerung des steady-state-Gehaltes an IDO-Protein im Vergleich zur Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ alleine. Für diese Auswertung wurden die Werte der Signalintensität der IDO-Banden auf die Werte der Signalintensität der GAPDH-Banden (Ladekontrolle) normalisiert, um Schwankungen der Werte durch eventuelle Unterschiede in der Beladung des Gels auszuschließen. Die Ergebnisse für die A549-Zellen befinden sich im Einklang mit den funktionellen Messungen in diesen Zellen, die zeigten dass $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität steigern, vor allem bei submaximaler Stimulation (hier 100U/ml $\text{IFN}\gamma$). Diese Steigerung der Aktivität scheint also auf einer stärkeren Expression des IDO-Gens zu beruhen. Bei sehr hohen $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen wird mit $\text{IFN}\gamma$ alleine eine maximale Aktivität und Genexpression induziert, welche durch andere Zytokine nicht messbar gesteigert werden kann (Daten hier nicht gezeigt).

In RT4-Zellen hingegen bewirkte die Zugabe von $\text{IL-1}\beta$ und / oder $\text{TNF}\alpha$ zunächst eine initiale Steigerung des steady-state-Gehaltes an IDO-Protein (8h-Wert, Abb. 10 A und C). Nach 24 Stunden war diese 2-3fache Steigerung jedoch nicht mehr sichtbar und nach 48 Stunden war in Zellen, die mit $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$ oder mit $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta + \text{TNF}\alpha$ stimuliert wurden, nahezu kein IDO-Protein mehr vorhanden. Die Abb. 10 D zeigt vergleichend den zeitlichen Verlauf der Signalstärke bei $\text{IFN}\gamma$ - und $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta + \text{TNF}\alpha$ -stimulierten RT4-Zellen: während der steady-state-Gehalt in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen über 48h nahezu gleich blieb, sank er bei Zugabe von $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ kontinuierlich. Bei Zugabe von $\text{TNF}\alpha$ alleine war dieser Effekt nicht so stark

wie bei IL-1 β oder der Kombination von IL-1 β und TNF α . Diese Daten korrelieren sehr gut mit den funktionellen Messungen der IDO-Aktivität und der NO-Produktion in den RT4-Zellen (Abb. 5, 6). Hier führten IL-1 β und die Kombination von IL-1 β und TNF α zu einer starken NO-Produktion und einer daraus resultierenden vollständigen Inhibition der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität, während die Zugabe von TNF α einen deutlich geringeren Effekt auf beide Prozesse hatte. Diese Korrelation ist ein erster Hinweis auf eine Verbindung zwischen der NO-Produktion in RT4-Zellen und dem steady-state-Level des IDO-Proteins.

Diese Verbindung wurde im Folgenden weiter untersucht. Wenn der beobachtete Effekt der Absenkung des Gehaltes an IDO-Protein ursächlich mit einer durch die Zytokin-Kombinationen induzierten iNOS-Aktivität zusammenhängt, sollte auch dieser Effekt durch den selektiven iNOS-Inhibitor AMT zu blockieren sein. Daher wurden in weiteren Experimenten RT4-Zellen über 48 Stunden mit den bekannten Zytokin-Kombinationen stimuliert, mit oder ohne Zusatz von 100 μ g/ml AMT. Ein repräsentatives Experiment zeigt Abb. 11.

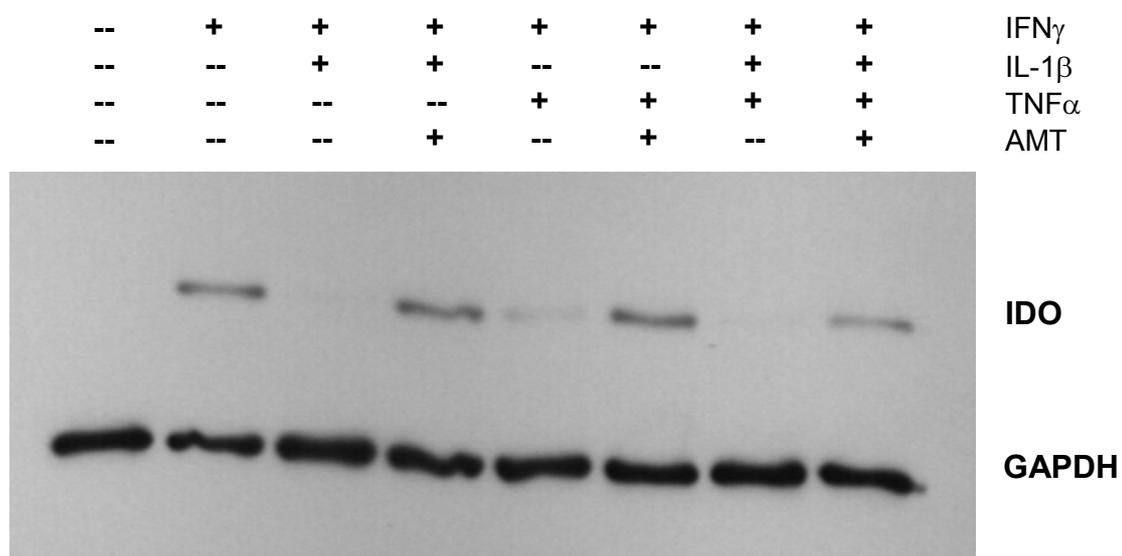


Abb. 11: Auswirkungen des iNOS-Inhibitors AMT auf den Gehalt an IDO-Protein in RT4-Zellen. Die Zellen wurden für 48h mit den angegebenen Zytokinen stimuliert (jeweils 100U/ml), in An- oder Abwesenheit von AMT (100 μ g/ml). Anschließend wurden die Proteine IDO und GAPDH (Ladekontrolle) im Western Blot nachgewiesen, wofür 10 μ g Gesamtprotein pro Probe eingesetzt wurden.

Dieses Experiment zeigte eine deutliche Abhängigkeit des IDO-Proteingehaltes von der zellulären NO-Produktion. In unstimulierten Zellen war keine IDO nachweisbar,

durch Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ wurde das Protein gebildet. Die weitere Zugabe von $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ oder beiden Zytokinen führte zu einer deutlichen Verringerung des zellulären Gehaltes an IDO-Protein, wobei $\text{TNF}\alpha$ auch hier wieder den schwächsten Effekt ausübte. In Anwesenheit des iNOS-Inhibitors AMT unterblieb die Verringerung des Proteingehaltes. Nur bei Stimulation mit allen drei Zytokinen war die iNOS-Induktion so stark, dass die hier eingesetzte Menge AMT nicht ausreichte, um den Effekt vollständig zu blockieren. Die Wirksamkeit von AMT in diesem Test ist ein starker Hinweis darauf, dass der beobachtete Effekt auf NO selbst beruht und nicht auf einer zeitlich verzögerten Wirkung der Zytokine. Letztere sollte von einem NOS-Inhibitor nicht beeinflusst werden. Damit ist zum ersten Mal gezeigt worden, dass NO nicht nur die Aktivität der IDO hemmt, sondern auch die Menge des IDO-Proteins in humanen Zellen regulieren kann.

Wenn der beobachtete Effekt ausschließlich auf NO beruht, sollte er auch durch Inkubation von $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen mit chemischen NO-Donoren zu erreichen sein. Die Abb. 12 zeigt ein Experiment, bei dem A549-Zellen (die selbst nur sehr wenig NO produzieren) für 8h mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert wurden. Anschließend wurde das Zytokin ausgewaschen und die Zellen für weitere 16h mit verschiedenen Konzentrationen von DETA/NO und S-Nitroso-Glutathion (GSNO) inkubiert.

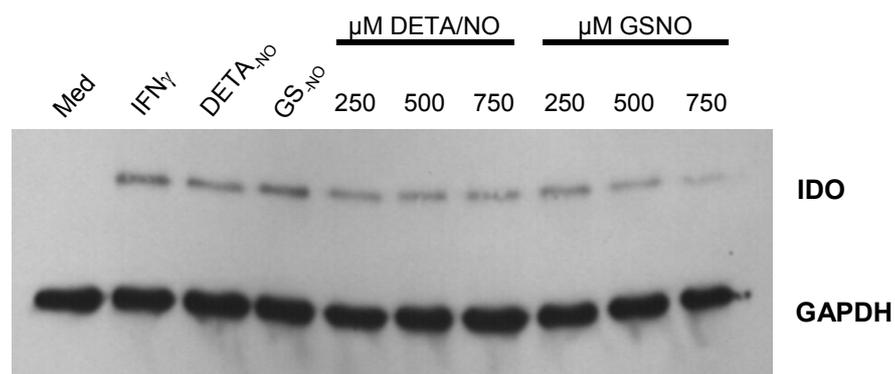


Abb. 12: Einfluss von exogenem NO auf das IDO-Protein. A549-Zellen wurden für 8h mit 50U/ml $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Nach Entfernung des Zytokins erfolgte eine weitere Inkubation für 16h mit NO-Donoren (frische bzw. entgaste Gebrauchslösungen) in Medium. Die IDO und die GAPDH wurden anschließend im Western Blot nachgewiesen. Eingesetzt wurden 10 μ g Gesamtprotein. Med = unstimulierte Zellen, $\text{IFN}\gamma$ = kein Zusatz von Donoren, DETA_{NO} = entgastes DETA/NO (750 μ M), GS_{NO} = entgastes GSNO (750 μ M).

Das Experiment zeigte einen deutlichen Einfluss von exogenem NO auf die IDO. In unstimulierten Zellen war kein IDO-Protein nachweisbar, in IFN γ -stimulierten Zellen war auch 16 Stunden nach Entfernen des Zytokins noch IDO-Protein vorhanden. Die Zugabe von entgasten Gebrauchslösungen in der höchsten eingesetzten Konzentration der frischen Donor-Lösungen hatte keinen Effekt auf den Gehalt an IDO-Protein. Bei Zugabe von frisch angesetzten Lösungen der Donoren war jedoch eine deutliche Abschwächung des Signals zu beobachten. Während DETA/NO in allen eingesetzten Konzentrationen einen etwa gleichen, nicht sehr ausgeprägten Effekt zeigte, war bei GSNO eine konzentrationsabhängige Verstärkung des Effektes zu sehen. Dieses unterschiedliche Verhalten kann mit den Halbwertszeiten der Donoren zusammenhängen, welche bei DETA/NO 8 Stunden beträgt (K.-D. Kröncke, persönliche Kommunikation) und bei GSNO ebenfalls im Bereich von mehreren Stunden liegt, hier aber nicht experimentell ermittelt wurde. Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Antwort auf eine Inkubation mit NO können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. So war DETA/NO z. B. bei RT4-Zellen wirksamer als bei A549-Zellen. Insgesamt erwiesen sich alle eingesetzten Donoren, unabhängig von der Substanzklasse und der Halbwertszeit, in diesen Tests als wirksam, wenn auch mit Unterschieden in der Stärke des Effektes. Aufgrund der besten Effektivität und der besten Verträglichkeit gegenüber den Zellen wurden in weiteren Versuchen RT4-Zellen meistens mit DETA/NO behandelt, A549-Zellen hingegen mit GSNO.

3.6 Quantitative Untersuchungen zur IDO-Gentranskription

Nachdem feststand, dass der beobachtete Effekt auf das IDO-Protein ausschließlich auf NO beruht, sollte der Mechanismus dieser NO-Wirkung weiter aufgeklärt werden. Da Alberati-Giani *et al.* in Maus-Makrophagen eine Regulation der IDO-mRNA durch NO feststellen konnten, wurde zunächst überprüft ob der Effekt in humanen Zellen ebenfalls auf einer solchen Kontrolle beruht. Dazu wurden RT4-Zellen mit verschiedenen Zytokin-Kombinationen für unterschiedliche Zeiträume stimuliert, dann die RNA aus diesen Zellen präpariert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach anschließendem Northern Blotting wurde die IDO-mRNA mit einer radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen und die entstehenden Signale in einem

Phosphorimager quantifiziert. Die Abb. 13 zeigt ein solches Experiment mit RNA aus IFN_γ - und $\text{IFN}_\gamma + \text{TNF}_\alpha$ -stimulierten RT4-Zellen.

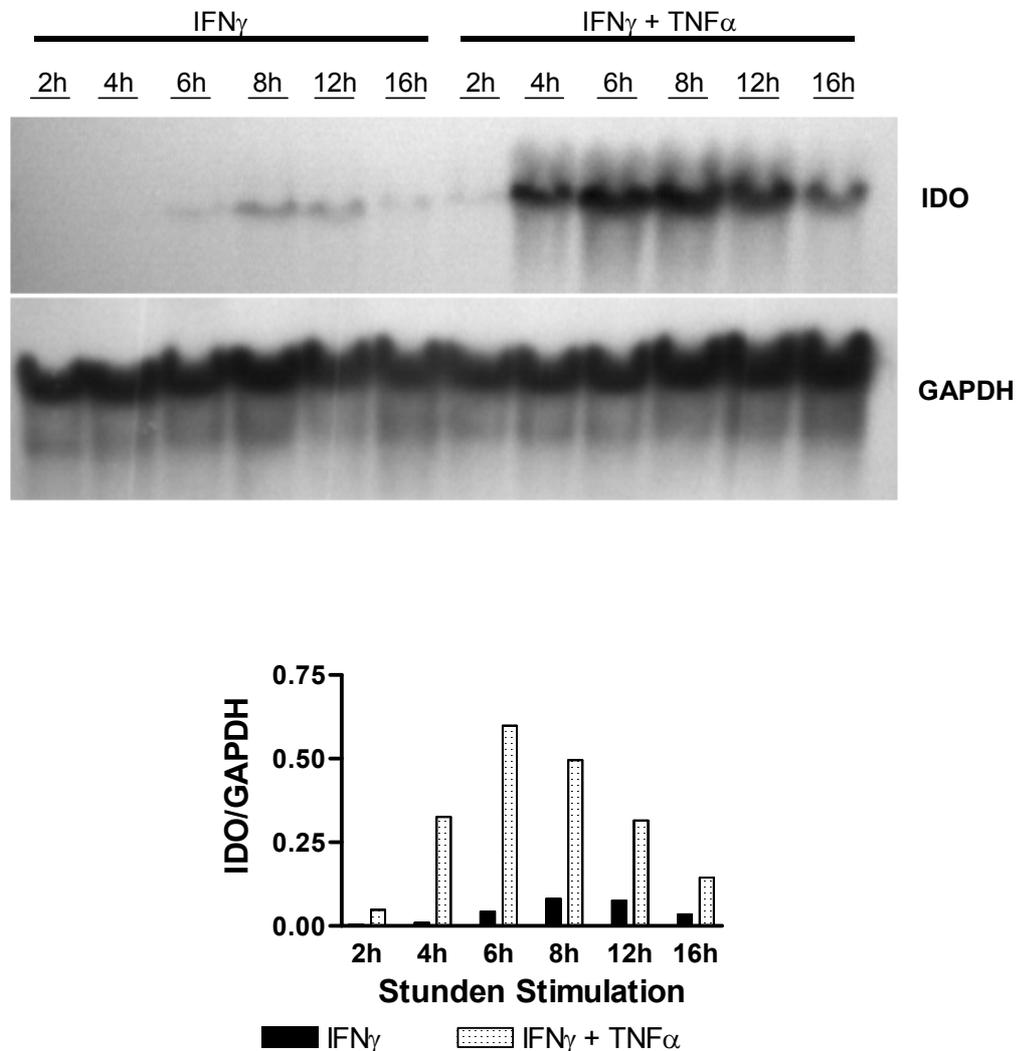


Abb. 13: Einfluss von TNF_α auf die IDO-Gentranskription. RT4-Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IFN_γ oder $\text{IFN}_\gamma + \text{TNF}_\alpha$ (jeweils 100U/ml) stimuliert. Dann folgten eine Präparation der zellulären RNA und der spezifische Nachweis der IDO- und GAPDH-mRNA im Northern Blot, wobei 40 μg Gesamt-RNA pro Spur eingesetzt wurden. Als Sonden wurden radioaktiv markierte PCR-Amplifikate verwendet (s. 2.2.4.3 und 2.2.4.4). Das Bild zeigt eine Röntgenfilmaufnahme der entstandenen Signale, wobei diese aber auch im Phosphorimager quantifiziert wurden. Die untere Grafik zeigt die Auswertung dieser Quantifizierung.

Wie in Abb. 13 zu sehen ist, steigerte TNF_α den Gehalt an IDO-mRNA zu jedem untersuchten Zeitpunkt. Der zeitliche Verlauf des mRNA-Gehaltes wurde nicht wesentlich beeinflusst, die höchste Konzentration wurde mit TNF_α nach 6 Stunden

erreicht, mit $\text{IFN}\gamma$ alleine nach 8 Stunden. Im Bereich von 6 Stunden liegt auch die größte Differenz zwischen den erhaltenen Signalen, hier steigerte $\text{TNF}\alpha$ die Menge an zellulärer IDO-mRNA etwa um das Achtfache. Dies ist allerdings der maximale Wert der in diesen Experimenten erhalten wurde. In allen Fällen wurde eine Steigerung des Gehaltes an IDO-mRNA beobachtet, diese war aber nur im gezeigten Experiment so stark ausgeprägt.

Wichtig bei diesem Experiment waren nicht die Unterschiede in der absoluten Menge an mRNA, sondern die Tatsache, dass bei einer Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, also bei Bedingungen unter denen die RT4-Zelle NO produziert, zu keinem Zeitpunkt weniger IDO-mRNA vorhanden war als bei einer Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ alleine. Der steady-state-Gehalt an IDO-mRNA stieg unter diesen Bedingungen, was im Einklang steht mit den anfänglich beobachteten höheren Mengen an IDO-Protein nach achtstündiger Stimulation. Das zeigt, dass NO innerhalb dieses Zeitraumes weder die IDO-Gentranskription noch die Stabilität der IDO-mRNA negativ reguliert, denn beides sollte einen erniedrigten steady-state-Gehalt zur Folge haben.

Da der Nachweis der IDO-mRNA bei Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ in diesen Experimenten nur schwache Banden erzeugte, wurden der Nachweis und die Quantifizierung im Folgenden mittels Realtime-PCR durchgeführt. Dabei wurde das Spektrum der Zytokin-Kombinationen erweitert. Zusätzlich wurden Versuche analog zu den in Abb. 10 und 12 gezeigten Protein-Experimenten durchgeführt: $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte RT4-Zellen wurden mit DETA/NO inkubiert (ohne Zusatz von weiteren Zytokinen), um die direkte Wirkung von NO auf die IDO-Gentranskription untersuchen zu können. Die Zeiträume betragen dabei bis zu 32 Stunden, weil nach dieser Zeit der Proteingehalt unter NO-Einfluss schon stark abgenommen hatte. Wenn der Effekt auf einer zeitlich verzögerten Regulation auf mRNA-Ebene beruht, so sollte bereits zwischen 8 und 24 Stunden ein Unterschied in der mRNA-Menge feststellbar sein. Repräsentative Experimente sind in der Abb. 14 gezeigt.

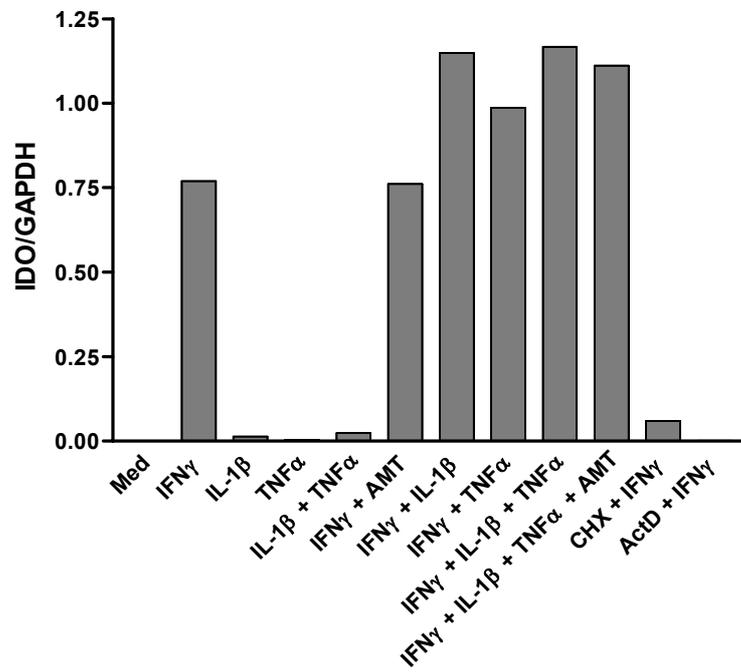
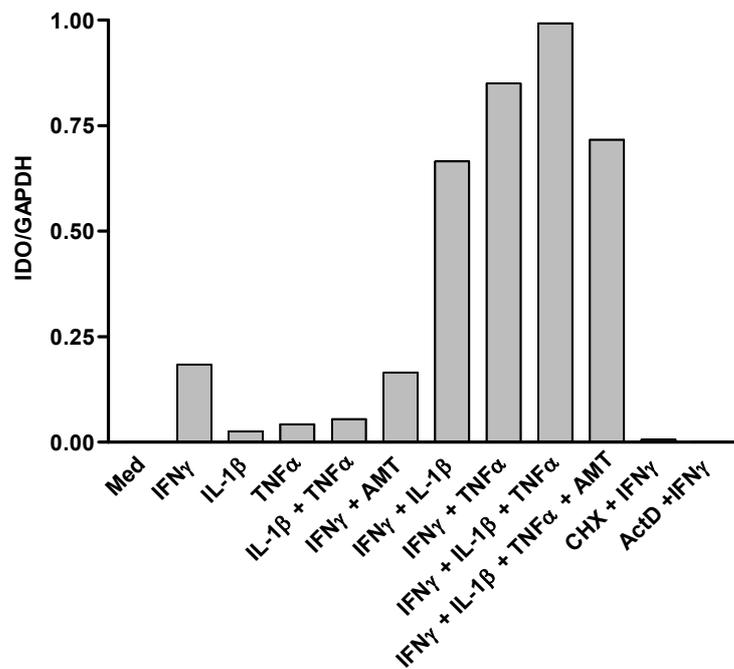
A Quantifizierung der IDO-mRNA aus RT4-Zellen
nach 8h Stimulation**B** Quantifizierung der IDO-mRNA aus A549-Zellen
nach 8h Stimulation

Abb. 14: Quantifizierung der IDO-mRNA in RT4- und A549-Zellen mittels Realtime-PCR. Die Zellen wurden für 8 Stunden mit den angegebenen Zytokinen (jeweils 100U/ml) und in zwei Fällen zusätzlich mit dem NOS-Inhibitor AMT (100µg/ml) stimuliert. Bei Einsatz der Inhibitoren Cycloheximid (CHX, 10µg/ml) und Actinomycin D (ActD, 5µg/ml) wurden diese eine Stunde vor den Zytokinen zugegeben. Für die Reaktion wurde von jeder Probe 1µg Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben. Jeweils 5µl des Erststrang-Ansatzes wurden dann als Template für eine Realtime-PCR verwendet (s. 2.2.11). Die erhaltenen Kopienzahlen für die IDO-mRNA wurden auf die Kopienzahlen der GAPDH-mRNA der gleichen Probe normalisiert. Abb. A zeigt die Quantifizierung der IDO-mRNA aus RT4-Zellen, Abb. B die Quantifizierung der IDO-mRNA aus A549-Zellen.

In Abb. 14 sind die normalisierten Daten der IDO-mRNA aus RT4- und A549-Zellen nach achtstündiger Inkubation mit den angegebenen Substanzen zu sehen. IL-1 β und TNF α induzierten die Gentranskription nur sehr schwach, verstärkten aber die IFN γ -induzierte Gentranskription in A549-Zellen um das drei- bis vierfache. Dieser Effekt fiel in RT4-Zellen schwächer aus. Er beruht auf einer Wirkung der Zytokine und ist NO-unabhängig, da der NOS-Inhibitor AMT diese Verstärkung nicht aufheben konnte. In Gegenwart von Cycloheximid oder Actinomycin D fand keine Transkription des IDO-Gens statt. Diese Befunde sind im Einklang mit den PCR-Daten aus Abb. 8 und bestätigen frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen. So konnten z. B. Hissong und Carlin eine Verstärkung der IDO-Gentranskription durch IL-1 β in humanen Monozyten beobachten [105]. Diese Ergebnisse sind aufgrund vieler zelltyp-spezifischer Antworten auf Zytokine, wie sie vor allem bei Immunzellen wie den Monozyten auftreten, nicht ohne weiteres auf andere Zellen übertragbar. In diesem Fall schienen jedoch die untersuchten Epithelzellen vergleichbar zu reagieren. Für die vorliegende Arbeit war von Bedeutung, dass bei keiner Zytokin-Kombination, die in den RT4-Zellen eine NO-Produktion auslöste, der Gehalt an IDO-mRNA geringer war als bei einer Stimulation mit IFN γ alleine. Damit wurden auch die Protein-Daten, die aus einer Stimulation der Zellen mit verschiedenen Zytokinen erhalten wurden, weiter bestätigt. In beiden verwendeten Zelllinien bewirkten IL-1 β und TNF α eine NO-unabhängige Verstärkung der Transkription des IDO-Gens, welche sich auch in erhöhten Proteinmengen widerspiegelte. In A549-Zellen, die nur sehr wenig NO produzierten, blieb diese Verstärkung über einen langen Zeitraum erhalten, während dieser Effekt in den RT4-Zellen NO-abhängig aufgehoben und sogar umgekehrt wurde.

Um einen Einfluss von NO auf die Gentranskription gänzlich auszuschließen, wurden IFN γ -stimulierte RT4-Zellen mit DETA/NO behandelt, ohne den Einsatz weiterer Zytokine. Dabei wurde der NO-Donor entweder zeitgleich mit dem IFN γ zugegeben, oder 16 Stunden nach Beginn der Stimulation mit IFN γ (ohne das Zytokin zu entfernen). Repräsentative Ergebnisse zeigt die Abb. 15.

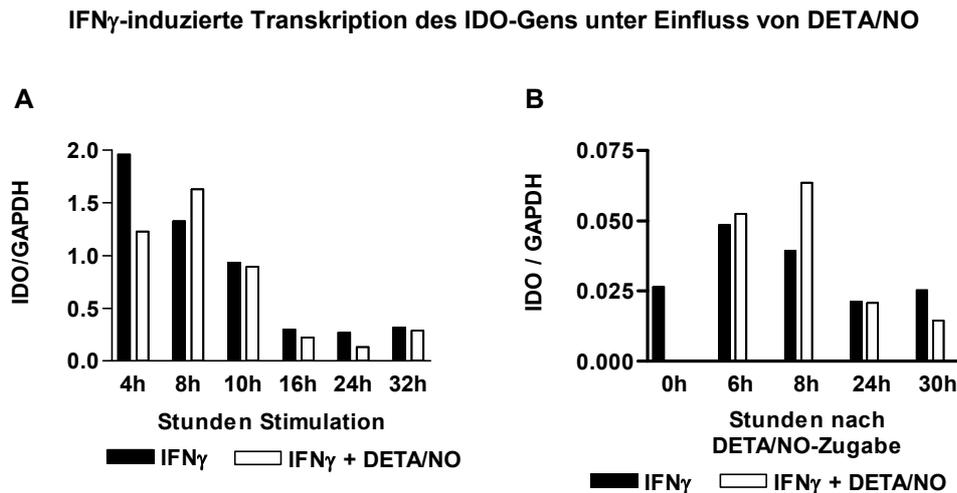


Abb. 15: Einfluss von DETA/NO auf die IDO-Gentranskription in IFN γ -stimulierten RT4-Zellen. Die Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit 100U/ml IFN γ und 750 μ M DETA/NO inkubiert. Dabei wurde der NO-Donor zeitgleich (A) oder 16h nach IFN γ (B) eingesetzt. Die absoluten IDO-mRNA-Mengen wurden wie beschrieben mittels Realtime-PCR quantifiziert (s. 2.2.11) und auf die Menge der GAPDH-mRNA in der gleichen Probe normalisiert.

Die Abb. 15 A zeigt den zeitlichen Verlauf des relativen Gehaltes an IDO-mRNA über 32 Stunden bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit DETA/NO und IFN γ . Da der Donor spontan zu zerfallen beginnt, das Zytokin jedoch erst an seinen Rezeptor binden muss, setzt in diesem Fall die NO-Wirkung vor der Zytokinwirkung ein. Sollten Einflüsse von NO auf IFN γ -regulierte Gene in der Zelle existieren, so müssten sie in diesem Fall auftreten. Hier war aber zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der mRNA-Menge zwischen IFN γ - und IFN γ + DETA/NO-behandelten Proben festzustellen. Das zweite Experiment (Abb. 15 B) stellte die Situation bei den Proteinversuchen nach: die Zellen wurden mit IFN γ vorstimuliert, nach 16 Stunden wurde der NO-Donor zugegeben und die Zellen für weitere Zeiträume bis zu 30 Stunden inkubiert. Diese Versuchsanordnung entsprach einem möglichen verzögerten NO-Effekt, denn die Verringerung des Proteingehaltes wurde bei einer

endogenen NO-Produktion erst nach etwa 24 Stunden sichtbar (Abb. 10). Auch bei diesen Experimenten war jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied zwischen den sich entsprechenden Proben festzustellen.

Zuletzt wurde noch überprüft, ob die RT4-Zellen unter den bisher angewandten Stimulationsbedingungen auch wirklich über den gesamten beobachteten Zeitraum NO produzieren. Dies konnte nicht direkt aus den funktionellen Messungen mit dem Griess-Assay abgeleitet werden, da bei diesen Messungen nur das über einen gewissen Zeitraum akkumulierte stabile Endprodukt der Reaktion von NO mit Wasser, das Nitrit, nachgewiesen wurde. Es ist unwahrscheinlich, aber theoretisch möglich, dass das gesamte nachgewiesene Nitrit innerhalb eines kurzen Zeitraumes entsteht und die Zelle danach die NO-Produktion trotz andauernder Stimulation mit Zytokinen einstellt, etwa weil ein Kofaktor für die iNOS-Aktivität fehlt. Um die Frage der Dauer der NO-Produktion in den RT4-Zellen zu klären, wurden diese mit verschiedenen Kombinationen von Zytokinen stimuliert. Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden Zellen lysiert und die erhaltenen Zellextrakte auf ihre momentane iNOS-Aktivität überprüft (NOSdetect-Kit, Stratagene). Dafür wurden die Zellextrakte mit Tritium-markiertem L-Arginin (^3H -Arginin) inkubiert. War eine NOS-Aktivität vorhanden, wurde dieses zu ^3H -Citrullin und NO umgesetzt. Das ^3H -Citrullin konnte auf einer Säulenmatrix von nicht umgesetztem ^3H -Arginin getrennt und in einem Szintillationszähler gemessen werden. Die folgende Abbildung zeigt repräsentative Experimente.

Messung der momentanen iNOS-Aktivität in Zellextrakten von RT4-Zellen

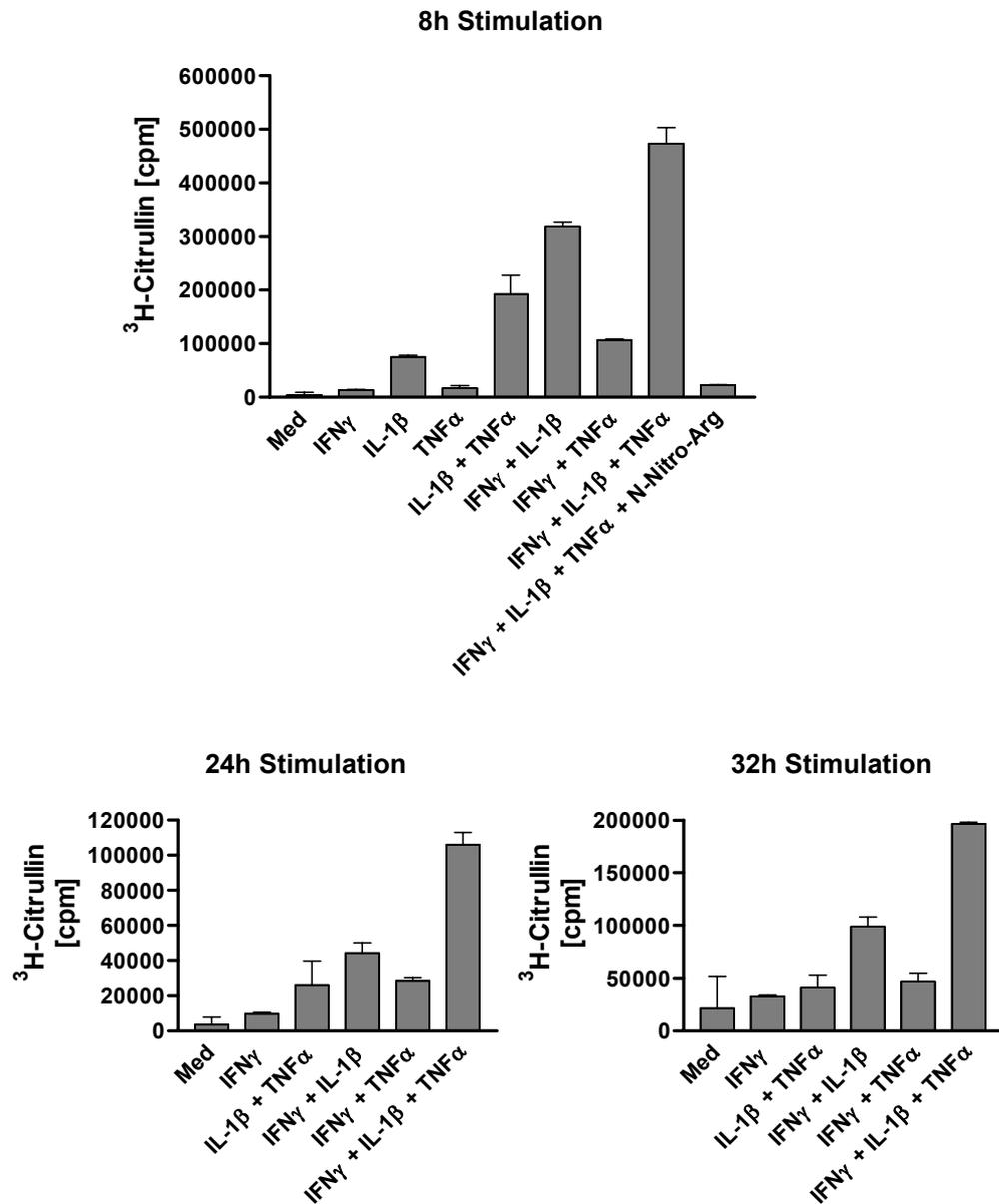


Abb. 16: Die iNOS-Aktivität im Lysat von RT4-Zellen nach Stimulation mit Zytokinen für unterschiedliche Zeiträume. Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit den Zytokinen (jeweils 100U/ml) stimuliert. Für den Nachweis der NOS-Aktivität wurden 100 μ g Gesamtprotein und 1 μ Ci ³H-Arginin pro Ansatz eingesetzt, wobei jede Probe als Doppelbestimmung angesetzt wurde. Der NOS-Inhibitor N-Nitro-Arginin (N-Nitro-Arg) wurde dem Reaktionspuffer direkt vor Zugabe des Zellextraktes in einer Konzentration von 20 μ M zugesetzt. Die Proben wurden für 20min bei 37°C inkubiert.

Die oberste Abbildung zeigt die iNOS-Aktivität in den RT4-Zellen nach 8 Stunden, also dem Zeitpunkt zu dem die RNA-Quantifizierungen in der Realtime-PCR nach

Stimulation mit den gleichen Zytokinen angefertigt wurden. Hier war von den drei untersuchten Zeitpunkten die höchste iNOS-Aktivität messbar. Dass die Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin in dem Assay tatsächlich auf einer NOS-Aktivität beruhte und nicht auf anderen chemischen Reaktionen, die evtl. in dem Zellextrakt abliefen, zeigte die Kontrolle mit dem NOS-Inhibitor N-Nitro-Arginin. Diese iNOS-Aktivität blieb über einen Zeitraum von 32 Stunden (etwas abgeschwächt) erhalten, ohne dass sich die Verhältnisse in der NO-Produktionsrate zwischen den einzelnen Arten der Stimulation veränderten. Daher kann davon ausgegangen werden dass sie so lange andauert, wie der Zytokin-Stimulus vorliegt. Die Abschwächung der iNOS-Aktivität zwischen 8 und 24 Stunden Stimulation kann mit einer limitierten Verfügbarkeit von Kofaktoren erklärt werden. Der Befund passt zum heutigen Wissensstand, nach dem kein Faktor bekannt ist, der ein einmal gebildetes, aktives iNOS-Dimer wieder inaktiviert. Daher sollte eine messbare Aktivität aufrecht erhalten werden, so lange die notwendigen Zytokine für die Bildung des Proteins und die notwendigen Kofaktoren für dessen Aktivität vorhanden sind. Im Gegensatz dazu werden die anderen NOS-Isoformen auf Proteinebene streng reguliert und sind nur für kurze Zeit aktiv.

Die Ergebnisse dieser Versuch passen zu den bisher erhobenen Daten. Das Verhältnis der momentanen NO-Produktionen bei unterschiedlicher Stimulation entsprach dem Verhältnis der funktionellen NO-Messungen. So war die iNOS-Aktivität bei Stimulation mit $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta + \text{TNF}\alpha$ am stärksten, gefolgt von einer Stimulation mit $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$. Bei diesen Stimulationen war auch die Abnahme des IDO-Proteingehaltes in den Zellen am deutlichsten (Abb. 10). Die Aktivität wurde mit der Zeit zwar etwas schwächer, die Verhältnisse zwischen den unterschiedlichen Stimulationen blieben aber erhalten. Diese Versuche schließen eine Regulation der Transkription des IDO-Gens durch NO endgültig aus. Die RT4-Zellen produzierten NO über den gesamten Zeitraum, über den auch die mRNA-Mengen gemessen wurden. Dabei konnte in keinem Fall eine Verringerung des steady-state-Gehaltes der IDO-mRNA im Vergleich zu $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen beobachtet werden. Auch durch exogenes NO in der gleichen Dosis, die zu einer Verringerung des Proteingehaltes führte, war keine Veränderung auf mRNA-Ebene festzustellen.

Zusammengefasst zeigten sich bisher folgende Ergebnisse: $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ verstärkten die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Transkription des IDO-Gens NO-unabhängig, was auch zu einer verstärkten Synthese des IDO-Proteins führte. Dieser Effekt hatte in

A549-Zellen Bestand, in RT4-Zellen fand aber eine NO-abhängige Verringerung des Gehaltes an IDO-Protein über die Zeit statt. Da NO selbst zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf die steady-state-Level der IDO-mRNA in diesen Zellen ausübte, konnte eine negative Regulation der Gentranskription oder der Stabilität der mRNA ausgeschlossen werden.

3.7 Untersuchungen zur Proteinbiosynthese

Nach den bisher erhobenen Daten übte NO den Effekt auf das IDO-Protein auf einer posttranskriptionellen Ebene aus. Prinzipiell können dafür zwei Mechanismen in Frage kommen: entweder wird in Anwesenheit von NO die IDO-mRNA nicht mehr effektiv translatiert, oder der Abbau des gebildeten IDO-Proteins wird beschleunigt. Um den vorliegenden Mechanismus genauer zu untersuchen, wurde zunächst überprüft ob NO einen generellen Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat. Dafür wurden RT4-Zellen für einen kurzen und einen längeren Zeitraum (1h bzw. 16h) mit $\text{IFN}\gamma$, DETA/NO oder beiden Substanzen inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurden die Zellen in Anwesenheit der entsprechenden Substanz mit radioaktiv markierten Aminosäuren gepulst und anschließend lysiert. Dann wurde die Menge der Radioaktivität in dem Anteil des Lysats, der durch Trichloressigsäure (TCA) präzipitierbar war, bestimmt. Dieser Anteil wurde als Gesamtprotein definiert und die gemessene Radioaktivität sollte die Effektivität des Einbaus der markierten Aminosäuren in zelluläre Proteine widerspiegeln. Wenn NO einen negativen Einfluss auf die Proteinbiosynthese hat, sollte die Radioaktivität in Proben von Zellen, die mit DETA/NO oder $\text{IFN}\gamma$ + DETA/NO inkubiert wurden, geringere Messwerte aufweisen als die übrigen Proben. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die eine Stunde vor dem Puls mit Cycloheximid behandelt wurden. Die Abb. 17 zeigt ein repräsentatives Experiment.

Messung der Proteinbiosynthese unter Einfluss von DETA/NO

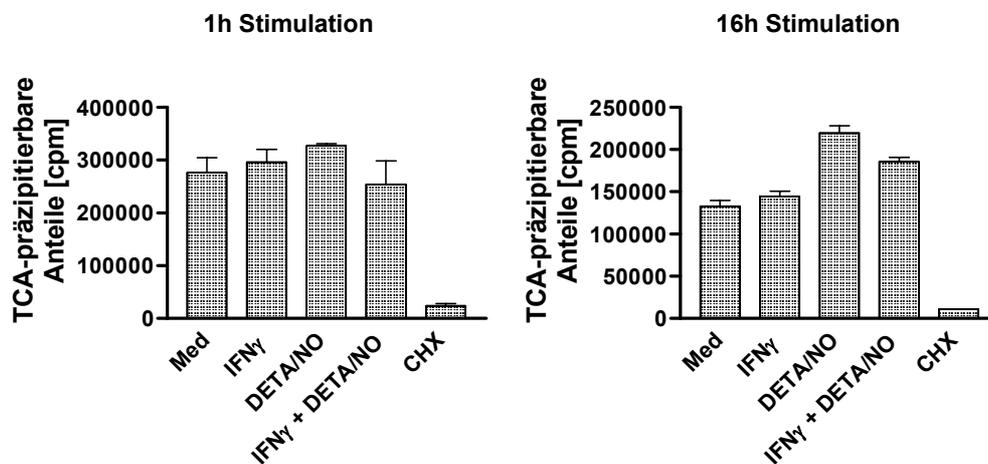


Abb. 17: Der Einfluss von NO auf die Proteinbiosynthese. Jeweils 5×10^5 RT4-Zellen wurden in 24well-Platten für den angegebenen Zeitraum mit 200U/ml IFN γ , 750 μ M DETA/NO oder beiden Substanzen inkubiert, jede Probe als Doppelbestimmung. Dann wurden die Zellen für 30min mit 0.1 μ Ci/ml Tran³⁵S-Label gepulst (in Anwesenheit der Substanzen, mit denen vorher inkubiert wurde) und in 500 μ l IP-Lysepuffer bei 4°C lysiert. Von jedem Lysat wurden 2x10 μ l für die Bestimmung der TCA-präzipitierbaren Anteile eingesetzt. Als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen (Med) und Zellen, die eine Stunde vor dem Puls mit 10 μ g/ml Cycloheximid (CHX) behandelt wurden.

In diesen Experimenten konnte kein genereller Einfluss von NO auf die Proteinbiosynthese in RT4-Zellen nachgewiesen werden. In Anwesenheit von NO wurde niemals weniger Radioaktivität in den Präzipitaten nachgewiesen als in unstimulierten Zellen oder IFN γ -stimulierten Zellen, während der Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid eine deutliche Wirkung zeigte. Damit erwies sich eine Regulation derIDO auf der Ebene der Translation als unwahrscheinlich, es sei denn NO würde spezifisch die Translation einer kleinen Gruppe von mRNAs verhindern, zu denen dann auch die derIDO gehören müsste. Ein solcher Mechanismus könnte mit dieser Versuchsanordnung, welche die generelle Proteinbiosynthese untersucht, vermutlich nicht nachgewiesen werden.

Weiterhin wurde untersucht, ob für den NO-basierten Effekt eine Neusynthese zellulärer Proteine notwendig ist. Dass NO keinen Einfluss auf die Transkription desIDO-Gens nimmt, konnte in den vorangegangenen Versuchen gezeigt werden (Abb.

14, 15). Es ist aber möglich, dass NO die Bildung eines oder mehrerer Proteinfaktoren induziert, welche direkt oder indirekt für die Verringerung des Gehaltes an IDO-Protein verantwortlich sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurden A549-Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ vorstimuliert. Dann wurde das Zytokin entfernt und Cycloheximid in frischem Medium zu allen Proben gegeben. Eine Stunde später wurde bei einem Teil der Proben GSNO zugesetzt und die Zellen für Zeiträume von 4, 8, 16 und 24 Stunden weiter inkubiert. Der andere Teil der Proben wurde nur mit Cycloheximid, ohne Zusatz eines NO-Donors, für den gleichen Zeitraum inkubiert. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten in der Inkubationsphase keine neuen Proteine gebildet werden. Wenn für den untersuchten Effekt eine Neusynthese von Proteinen notwendig ist, dann dürfte er in diesem Fall nicht auftreten. Der Gehalt an IDO-Protein sollte daher zu jedem Zeitpunkt in den entsprechenden Proben gleich sein, unabhängig von der Anwesenheit eines NO-Donors. Die nächste Abbildung zeigt ein solches Experiment:

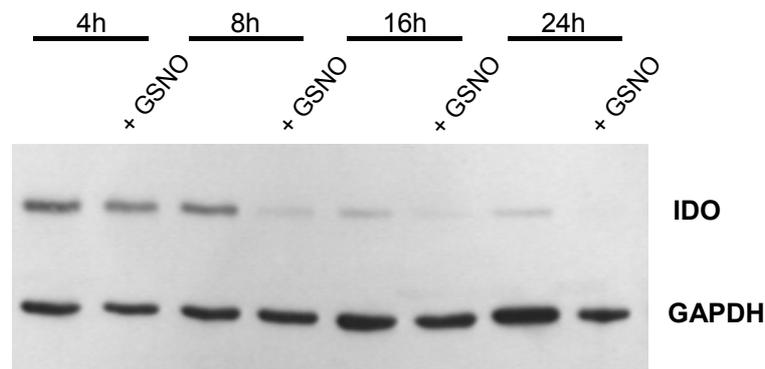


Abb. 18: Cycloheximid kann den NO-abhängigen Effekt auf das IDO-Protein nicht aufheben. A549-Zellen wurden mit 50U/ml $\text{IFN}\gamma$ für 16 Stunden stimuliert. Dann wurde das Zytokin entfernt und zu jeder Probe 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid in frischem Medium gegeben. Eine Stunde später wurden der Hälfte der Proben 750 μM GSNO zugesetzt und die Zellen für weitere 4-24h inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der IDO und der GAPDH im Western Blot, wofür 10 μg Gesamtprotein eingesetzt wurden.

Dieser Versuch zeigte deutlich, dass Cycloheximid (in allen dargestellten Spuren zugegeben) den NO-vermittelten Effekt auf die IDO nicht aufheben konnte. Unter diesen Versuchsbedingungen nahm der Gehalt an IDO-Protein auch ohne Einfluss eines NO-Donors schneller ab als gewöhnlich, weil evtl. noch vorhandene IDO-mRNAs nicht mehr translatiert werden konnten. Dass die eingesetzte Konzentration

von 10 µg/ml Cycloheximid die Proteinbiosynthese effizient hemmt haben die vorangegangenen Versuche zur Proteinsynthese gezeigt (Abb. 17). Der zelluläre Gehalt an IDO-Protein war in Anwesenheit von GSNO zu jedem Zeitpunkt geringer als ohne Donor, was sich besonders deutlich nach 8 Stunden Inkubationszeit zeigte. Der Effekt von NO auf die IDO bestand also auch, wenn schon vor Einsetzen der NO-Produktion eine Proteinsynthese in den Zellen nicht mehr möglich war. Damit konnte die Notwendigkeit einer Neusynthese von Proteinen für den beobachteten Effekt ausgeschlossen werden. NO konnte in diesem Zusammenhang nur auf die IDO direkt wirken oder auf andere bereits vorhandene Proteine, welche dann den NO-induzierten Mechanismus ausführen. Weiterhin machte dieser Versuch einen beschleunigten Abbau des IDO-Proteins unter NO-Einfluss wahrscheinlich, denn die Maschinerie des zellulären Proteinabbaus sollte unter diesen Versuchsbedingungen vollständig intakt sein.

3.8 Untersuchungen zum Proteinabbau

Um zu bestätigen, dass NO einen Effekt auf bereits gebildetes IDO-Protein ausübt, wurden Pulse-Chase-Experimente mit RT4-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit IFN γ vorstimuliert und dann in Anwesenheit von IFN γ gepulst. Anschließend erfolgte der Chase ohne IFN γ für 4, 8 oder 12 Stunden, mit oder ohne Zusatz von DETA/NO. Die Zellen wurden anschließend lysiert und die IDO mittels Immunpräzipitation aus dem Lysat aufgereinigt. Die präzipitierten Immunkomplexe wurden elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Membran transferiert und autoradiografisch nachgewiesen. Da bei dieser Methode nur die Menge an Protein radioaktiv markiert wird, die während der Zeitdauer des Pulses gebildet wird, konnte der zelluläre Gehalt der markierten Proteine über die Zeit verfolgt werden. Sollte NO einen Einfluss auf die Stabilität des IDO-Proteins haben, so müsste die Intensität des IDO-Signals in Zellen, die beim Chase mit DETA/NO inkubiert wurden, schneller zurück gehen als in Zellen die keinem NO ausgesetzt waren. Ein solches Experiment ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

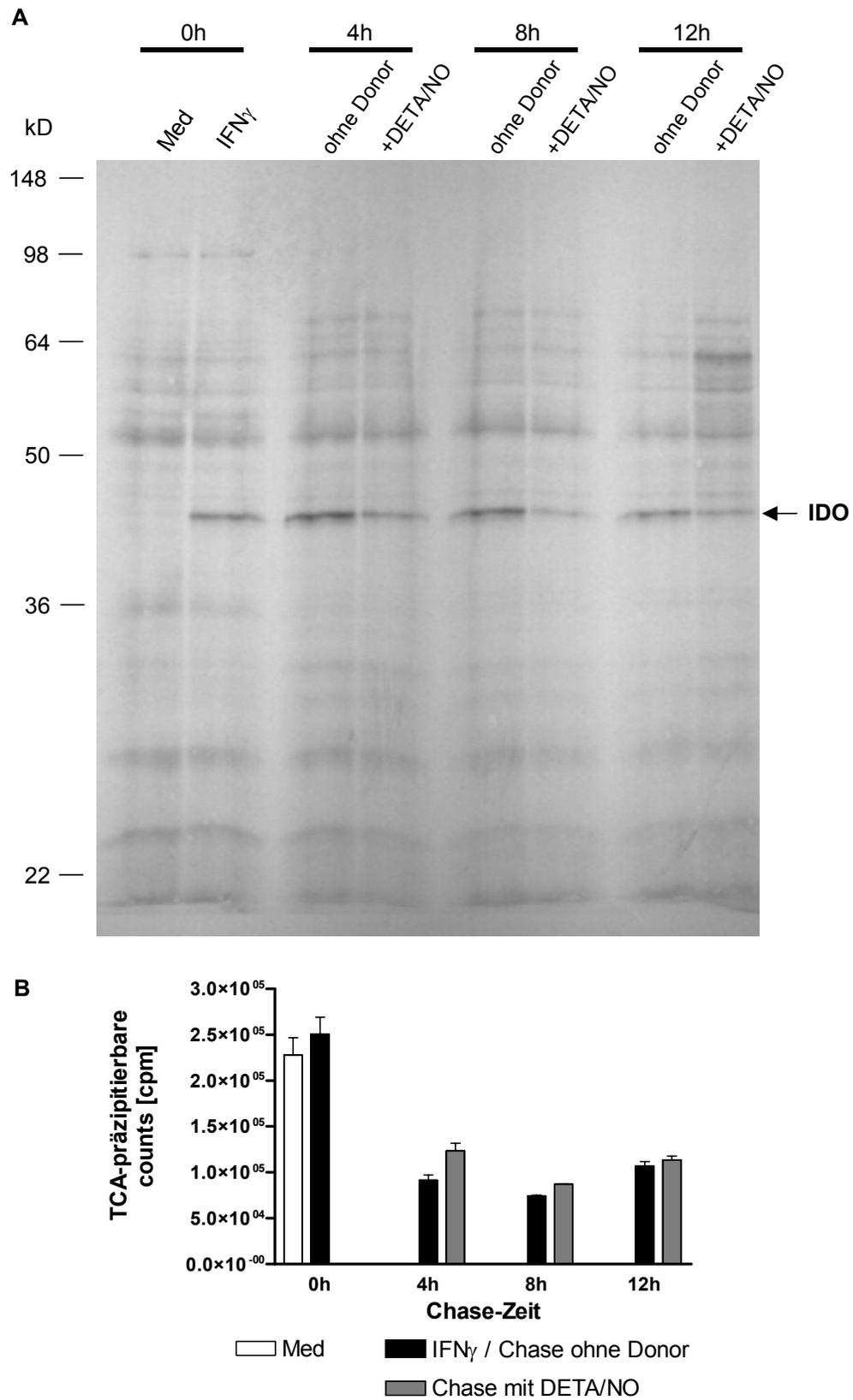


Abb. 19: Pulse-Chase-Experiment mit RT4-Zellen. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden für 16h mit 200U/ml IFN γ stimuliert, dann erfolgte der Puls mit $0.1 \mu\text{Ci/ml}$ Tran³⁵S-Label für 30min in Anwesenheit der gleichen Menge IFN γ . Die Zellen wurden danach entweder direkt lysiert (0h-Proben) oder es folgte ein

Chase für 4, 8 oder 12 Stunden ohne $\text{IFN}\gamma$, mit oder ohne Zusatz von $750\mu\text{M}$ DETA/NO. Jeweils $2 \times 10\mu\text{l}$ der Lysate wurde für eine Bestimmung der TCA-präzipitierbaren Anteile verwendet (Abb. B), mit dem restlichen Lysat wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dafür wurden $5\mu\text{l}$ IDO-mAk und $120\mu\text{l}$ Protein A-Sepharose pro Milliliter Lysat eingesetzt. Die Auftrennung der präzipitierten Immunkomplexe erfolgte in einem 12%igen Gel. Anschließend wurden die Proteine auf eine Membran transferiert und die markierten Proteine autoradiografisch durch Exposition mit Röntgenfilm bei -80°C für drei Tage nachgewiesen (Abb. A).

Die Autoradiografie (Abb. 19 A) zeigte einen deutlichen Einfluss von NO auf die Stabilität des IDO-Proteins. In unstimulierten Zellen (Med) konnte direkt nach dem Puls keine IDO nachgewiesen werden, in $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Zellen war IDO vorhanden. Während der Chase-Zeit, in Abwesenheit von $\text{IFN}\gamma$, wurde die Menge an IDO-Protein langsam verringert, weil das während des Pulses markierte Protein stetig abgebaut wird. Dieser Abbau wurde in Zellen, die während der Chase-Phase mit einem chemischen NO-Donor inkubiert wurden, offenbar beschleunigt. Die Intensität des IDO-Signals nahm in Extrakten aus diesen Zellen wesentlich schneller ab als in den entsprechenden Extrakten aus Zellen, die ohne Donor inkubiert wurden. Dies lag nicht an einer geringeren Effektivität der Markierung, was durch Kontrolle der TCA-präzipitierbaren Anteile in den Lysaten gezeigt wurde (Abb. 19 B). Auch wurde die Immunpräzipitation in Vorversuchen so eingestellt, dass die IDO quantitativ aus dem Lysat entfernt wurde. Nach der Immunpräzipitation war in den Lysaten keine IDO mehr im Western Blot nachweisbar (hier nicht gezeigt). Aufgrund dieser Kontrollen und der Tatsache, dass bei diesem Versuch nur die Wirkung von NO auf bereits gebildetes IDO-Protein nachgewiesen werden konnte, war die schnellere Abnahme der Signalintensität unter NO-Einfluss nur durch einen schnelleren Abbau des Proteins zu erklären. Diese Erklärung haben schon die Experimente mit Cycloheximid (Abb. 18) nahegelegt.

3.9 Inhibition des zellulären Proteinabbaus

Diesem Hinweis wurde in weiteren Experimenten nachgegangen. In eukaryotischen Zellen existieren zwei Systeme, die für den Abbau von Proteinen zuständig sind: das Lysosom und das Proteasom. Das Lysosom degradiert fast ausschließlich Proteine, die aus dem Extrazellulärraum aufgenommen wurden, während das Proteasom für

den Abbau der meisten zellulären Proteine zuständig ist. Beim Lysosom handelt es sich um ein membranumschlossenes zelluläres Kompartiment, das mit endozytotischen Vesikeln fusionieren kann (vor Fusion mit einem Vesikel spricht man von Endosomen). Das Lysosom ist angefüllt mit Proteasen, die für ihre Aktivität einen sauren pH-Wert benötigen. Dieser saure pH-Wert wird durch Protonenpumpen in der lysosomalen Membran gewährleistet.

Eine Beteiligung des Lysosoms an der Degradation der IDO erscheint aufgrund der Tatsache, dass nur sehr wenige zelluläre Proteine bekannt sind, die im Lysosom abgebaut werden, unwahrscheinlich. Um diese Möglichkeit jedoch ausschließen zu können, wurden Experimente mit Inhibitoren des lysosomalen Proteinabbaus durchgeführt. Als Inhibitoren wurden Chloroquin (CQ) und Bafilomycin A₁ (BA₁) eingesetzt. Chloroquin ist eine zellpermeable, schwache Base, die sich in sauren Kompartimenten wie dem Lysosom anreichert und den pH-Wert in diesen Kompartimenten anhebt. Bafilomycin A₁ ist ein spezifischer Inhibitor der lysosomalen v-ATPase, die hauptsächlich für die Einstellung des sauren pH-Wertes im Lysosom verantwortlich ist. Beide Substanzen bewirken eine Inhibition der lysosomalen Proteasen, die einen sauren pH-Wert für ihre optimale Aktivität brauchen. Für diese Versuche wurden RT4-Zellen mit IFN γ vorstimuliert, dann das Zytokin entfernt und die Inhibitoren in frischem Medium zugesetzt. Eine Stunde später wurde ein chemischer NO-Donor zugegeben und die Zellen für weitere 8-16 Stunden inkubiert. Wenn das Lysosom an dem beschleunigten Abbau der IDO beteiligt ist, sollten die Inhibitoren diesen Abbau ganz oder teilweise aufheben können. Ein repräsentatives Experiment ist in der folgenden Abbildung gezeigt.

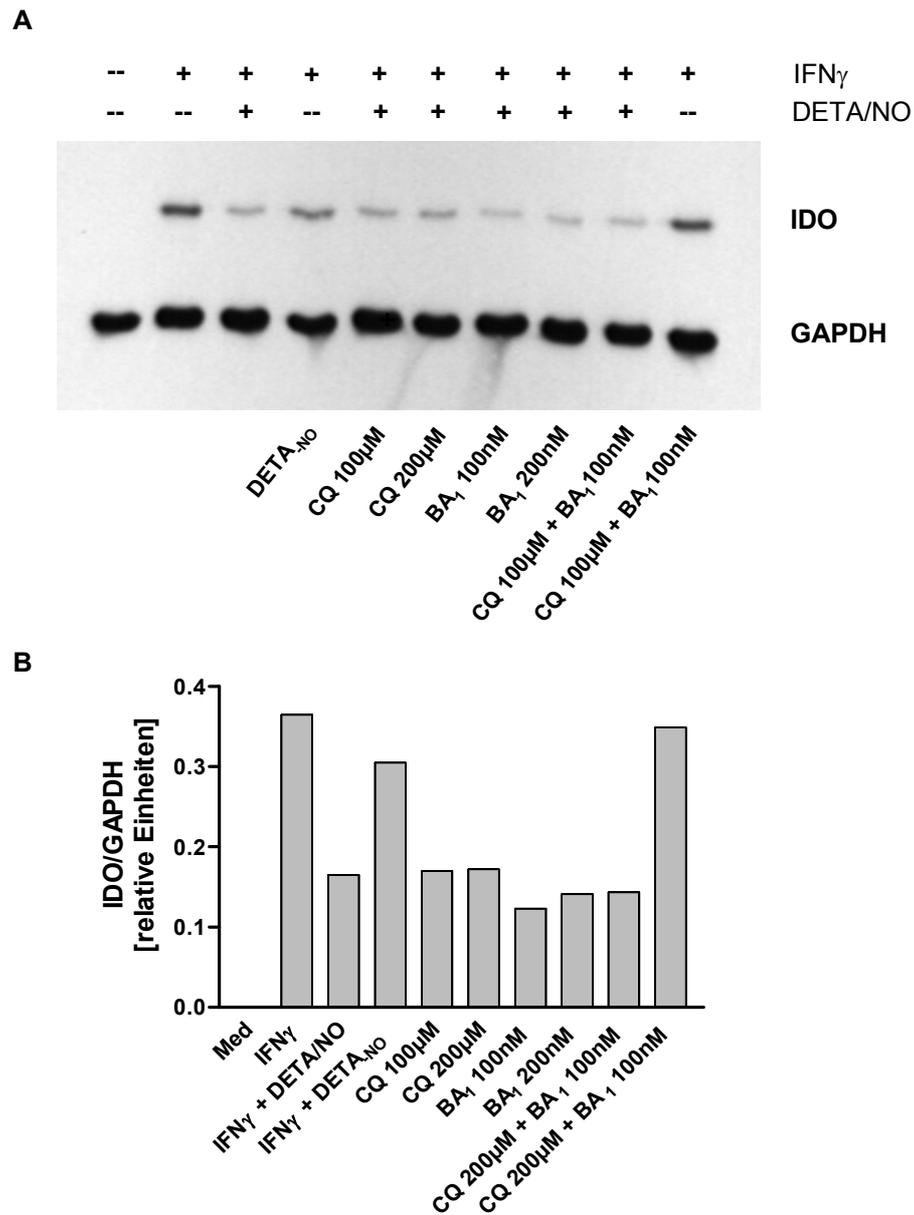


Abb. 20: Inhibitoren des Lysosoms haben keinen Einfluss auf den beschleunigten Abbau der IDO in RT4-Zellen. Die Zellen wurden für 9 Stunden mit 100U/ml IFN γ stimuliert. Dann wurde das Zytokin entfernt und die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen in frischem Medium zugegeben. Eine Stunde später wurden 750 μ M DETA/NO zugesetzt und die Zellen für weitere 16h inkubiert. Dann erfolgte der Nachweis der IDO und der GAPDH im Western Blot (10 μ g Gesamtprotein eingesetzt, Abb. A) und die densitometrische Auswertung der Signale (Abb. B), wobei die Signalintensität der IDO auf die Intensität der GAPDH-Banden normalisiert wurde. CQ = Chloroquin, BA $_1$ = Bafilomycin A $_1$.

Dieses Experiment zeigte deutlich, dass die eingesetzten Inhibitoren der lysosomalen Proteindegradation keinen Effekt auf den beschleunigten Abbau der IDO haben. Wie die densitometrische Auswertung (Abb. 20 B) zeigte, war unter

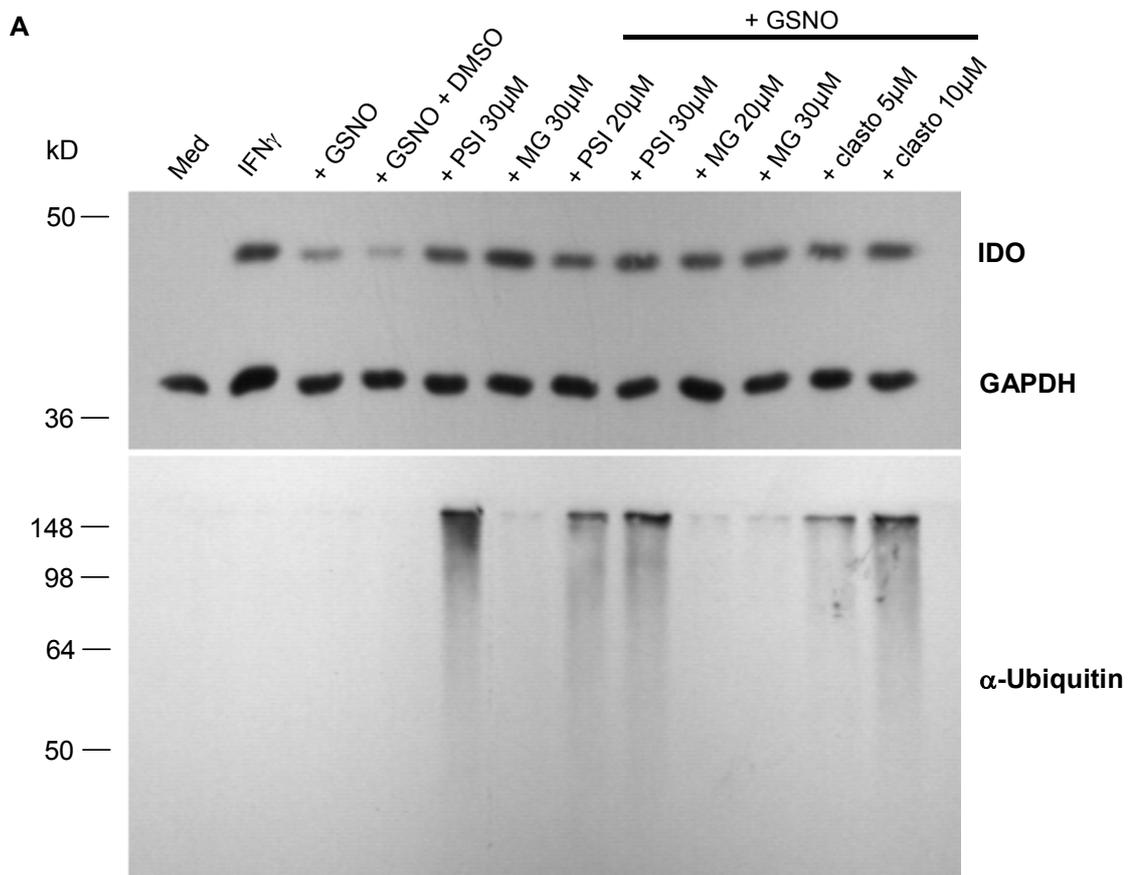
diesen Versuchsbedingungen unter NO-Einfluss der Gehalt an IDO-Protein etwa auf die Hälfte reduziert, wobei auch hier die „entgaste“ Form des NO-Donors (DETA_{NO}) keine Wirkung hatte. Beide eingesetzten Inhibitoren des Lysosoms, ob alleine oder in Kombination, konnten diesen NO-basierten Effekt auf die IDO nicht aufheben. Zudem stieg in Zellen, die nach Gabe der Inhibitoren ohne NO-Donor inkubiert wurden, die Menge an IDO nicht über ein Maß hinaus an, welches in Zellen vorhanden war die ohne NO-Donor und ohne Inhibitoren inkubiert wurden. Dies sollte, wenn auch nur in geringem Maße, der Fall sein wenn das Lysosom generell für den Abbau der IDO zuständig wäre. Aus diesem Experiment konnte daher geschlossen werden, dass das Lysosom nicht für die Degradation der IDO verantwortlich war, weder für den „normalen“ Abbau noch für den beschleunigten Abbau unter NO-Einfluss.

Der Hauptort des Abbaus zellulärer Proteine ist das Proteasom. Hierbei handelt es sich nicht um ein zelluläres Kompartiment, sondern um einen Multienzymkomplex von etwa 2500kD. Zwar ist die Zusammensetzung dieses Komplexes weitgehend bekannt, das Zusammenwirken der verschiedenen Untereinheiten ist aber noch zu großen Teilen unverstanden. Proteine, die vom Proteasom abgebaut werden, werden in den meisten Fällen zuvor für diesen Abbau markiert. Dies erfolgt durch Anhängen von mehreren Exemplaren des Proteins Ubiquitin. Eine Kette aus mehreren Ubiquitin-Molekülen wird vom Proteasom erkannt und das so markierte Protein hydrolysiert. Das Proteasom weist drei verschiedene proteolytische Aktivitäten unterschiedlicher Spezifität auf, durch welche die Proteine in Peptide von 3-23 Aminosäuren Länge zerlegt werden.

Im Folgenden wurde die Rolle des Proteasoms bei der Degradation der IDO untersucht. Die Versuche wurden genauso durchgeführt wie die Versuche mit den Lysosom-Inhibitoren, nur dass in diesen Experimenten Inhibitoren gegen das Proteasom eingesetzt wurden. Die eingesetzten Inhibitoren waren MG-132, Proteasom-Inhibitor I (PSI) und *clasto*-Lactacystin β -lacton (*clasto*). Die ersten beiden Substanzen sind chemisch modifizierte Peptide, die mit den proteolytisch aktiven Untereinheiten des Proteasoms interagieren, von diesen aber nicht hydrolysiert werden können. Die dritte Substanz ist ein zyklischer Ester, der als antibiotische Substanz aus *Streptomyces spec.* isoliert wurde. Während die modifizierten Peptide auch andere Proteasen hemmen können, ist *clasto*-Lactacystin β -lacton ein

spezifischer Inhibitor des Proteasoms. Außerdem ist eine Inhibition durch *clasto*-Lactacystin irreversibel, weil dabei die katalytisch aktiven Threonin-Reste in den Proteolyse-Untereinheiten kovalent modifiziert werden.

Ein repräsentativer Versuch mit diesen Inhibitoren ist in der nächsten Abbildung dargestellt. Da die Proteasom-Inhibitoren auf die RT4-Zellen nach kurzer Zeit toxisch wirkten, wurden diese Versuche mit A549-Zellen durchgeführt. Diese wurden mit IFN γ vorstimuliert, dann wurden die Inhibitoren in frischem Medium zugegeben. Der Zusatz des NO-Donors S-Nitroso-Glutathion (GSNO) erfolgte eine Stunde nach Gabe der Inhibitoren.



B

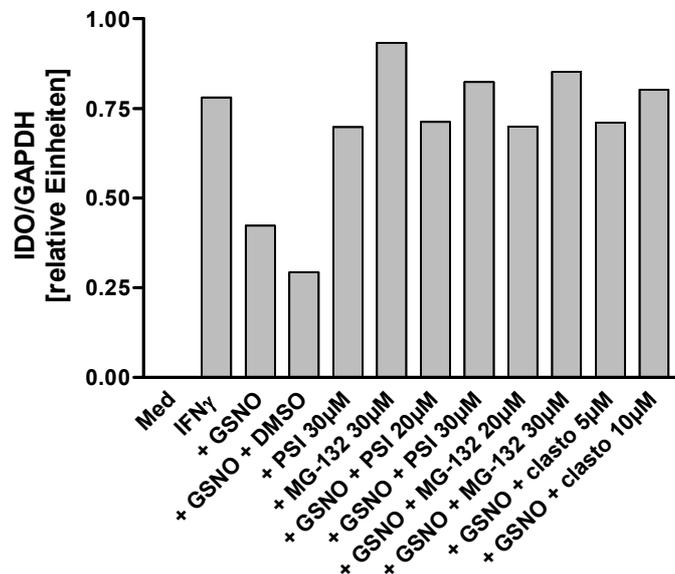


Abb. 21: Proteasom-Inhibitoren heben den Effekt von NO auf die IDO auf. A549-Zellen wurden für 9 Stunden mit 50U/ml IFN γ vorstimuliert, dann wurde das Zytokin entfernt und die Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen zugegeben, bzw. DMSO in einer Endkonzentration von 0.5% (Lösungsmittelkontrolle). Eine Stunde später wurden 750 μ M GSNO zugesetzt und die Zellen für weitere 16 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis der IDO und der GAPDH im Western Blot (Abb. A, oben), wofür 10 μ g Gesamtprotein eingesetzt wurden. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der Inhibitoren wurden Proben aus den gleichen Zellextrakten in einem zweiten Blot mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper inkubiert (Abb. A, unten). Für die densitometrische Auswertung des IDO-Blots wurde die Signalintensität der IDO-Banden auf die Intensität der entsprechenden GAPDH-Banden normalisiert (Abb. B).

Diese Abbildung zeigt, dass die Proteasom-Inhibitoren den Effekt von NO auf die IDO aufheben können. Auch hier war bei Inkubation der Zellen mit einem NO-Donor (GSNO) nach 16 Stunden etwa 50% weniger IDO-Protein vorhanden als in Zellen, die keinem NO-Einfluss ausgesetzt waren (IFN γ). Dieser Effekt konnte durch alle drei eingesetzten Inhibitoren aufgehoben werden (Abb. 21 A oben und Abb. 21B). Da alle Inhibitoren in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst waren, wurde eine Lösungsmittelkontrolle angesetzt, um einen Einfluss des DMSO auf den NO-Effekt auszuschließen (Abb. 21 A Spur 4, GSNO + DMSO). Als weitere Kontrolle der Wirksamkeit der eingesetzten Inhibitoren wurde mit Gesamtprotein aus den gleichen Proben ein zweiter Blot gemacht, der mit einem anti-Ubiquitin-Antikörper behandelt

wurde (Abb. 21 A, unten). Bei einer effizienten Hemmung des Proteasoms sollten sich ubiquitinierte Proteine in der Zelle anreichern, da die Enzyme, die für die Ubiquitinierung von Proteinen zuständig sind, unabhängig vom Proteasom funktionieren. Ubiquitinierte Proteine sind aufgrund ihrer Kurzlebigkeit unter normalen Umständen nicht nachweisbar. Der untere Blot (Abb. 21 A) zeigt deutlich eine Anreicherung von ubiquitinierten Proteinen in Zellen, die mit PSI oder *clasto-Lactacystin* behandelt wurden. Interessanter Weise war dieser Effekt bei MG-132 wesentlich schwächer ausgeprägt, obwohl sich dieser Inhibitor bei der Inhibition des IDO-Abbaus genauso potent zeigte wie die beiden anderen Inhibitoren.

Dieses Experiment klärte mehrere Details. Zum einen handelte es sich bei dem Effekt, den NO auf die IDO ausübt, tatsächlich um einen beschleunigten Abbau. Anders waren die bisher gezeigten Daten nicht mehr zu interpretieren. Zweitens wurde das Proteasom als Ort der beschleunigten IDO-Degradation identifiziert. Darüber hinaus war bei Inkubation von Zellen mit Proteasom-Inhibitor (vor allem bei Einsatz von MG-132, Spur 6), aber ohne NO-Donor etwa 20% mehr IDO-Protein vorhanden als bei Inkubation in reinem Medium. Das bedeutete, dass die IDO wahrscheinlich auch unter „normalen“ Umständen, also ohne NO-Einfluss, vom Proteasom abgebaut wurde. Dieser Befund war aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der IDO um ein zelleigenes zytoplasmatisches Protein handelt, sehr wahrscheinlich, ist aber für die IDO noch nie untersucht worden und wurde hier zum ersten Mal gezeigt. NO induzierte also einen beschleunigten Abbau der IDO, wobei sich die verantwortliche Protease (bzw. der verantwortliche Enzymkomplex) aber nicht veränderte.

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine Inkubation der Zellen mit NO mit einer generellen gesteigerten Aktivität des Proteasoms einhergeht. Dazu wurde ein *in vitro*-Assay verwendet, bei dem Zellextrakte mit fluorogenen Modellsubstraten des Proteasoms inkubiert wurden. Dabei handelt es sich um Peptide, die mit 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) markiert sind. Dessen fluorogene Eigenschaften werden in intakten Peptiden durch die vorhandenen Aminosäuren unterdrückt. Werden die Peptide im Proteasom hydrolysiert, so wird AMC freigesetzt und kann durch Licht mit einer Wellenlänge von 350-380nm zur Fluoreszenz angeregt werden.

Um zu überprüfen, ob eine NO-Produktion einen stabilen Effekt auf die Proteasom-Aktivität in RT4-Zellen hat, wurden diese für 16 Stunden mit Zytokinen oder

DETA/NO inkubiert. Anschließend wurden Zellextrakte hergestellt, die für 90 Minuten mit fluorogenen Substraten inkubiert wurden. Um einen direkten Einfluss von NO auf die Aktivität des Proteasoms zu untersuchen, wurden Extrakte von unstimulierten Zellen genauso behandelt, aber dem Ansatz wurde zusätzlich ein NO-Donor zugegeben. Die bei diesen Versuchen frei gewordene Fluoreszenz wurde anschließend in einem Fluorometer gemessen und gegen einen Standard von freiem AMC quantifiziert. Die nächste Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment.

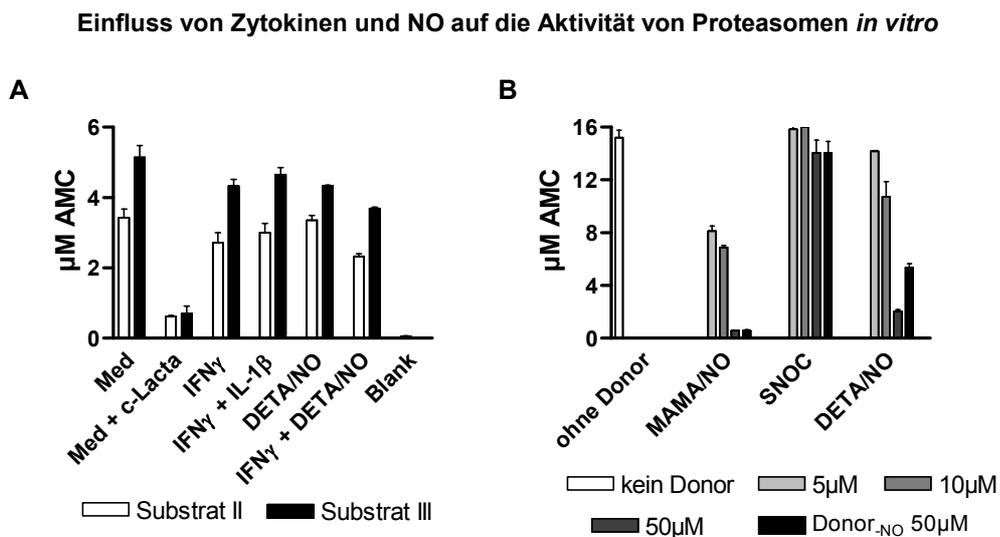


Abb. 22: Der Einfluss der Zytokin-Stimulation und der NO-Produktion auf die proteasomale Aktivität in Zellextrakten von RT4-Zellen. Abb. A zeigt die Aktivität in Zellextrakten von unterschiedlich stimulierten Zellen. RT4-Zellen wurden für 16h mit den angegebenen Zytokinen (jeweils 100U/ml) bzw. DETA/NO (750 μ M) inkubiert. Aus dem hergestellten Zellextrakt wurden 50 μ g Gesamtprotein mit 20 μ M Proteasom-Substrat II oder Proteasom-Substrat III für 90min bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Als Kontrollen dienten Proben, denen kein Zellextrakt zugesetzt wurde (Blank) und Proben, bei denen der Zellextrakt vor Start des Experiments für 10min mit 10 μ M *c/asto*-Lactacystin inkubiert wurde (c-Lacta). Jede Probe wurde als Doppelbestimmung angesetzt. Abb. B zeigt den direkten Einfluss von NO auf die proteasomale Aktivität im Zellextrakt. Hier wurden Zellextrakte von unstimulierten Zellen verwendet. Die Versuche wurden ausgeführt wie für Abb. A, hier wurden aber NO-Donoren in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und nur das Substrat III verwendet. Nach 90min wurden die Reaktionen gestoppt und die entstandene Fluoreszenz bei einer Excitation von 365nm und einer Emission von 450nm gegen einen Standard von freiem AMC gemessen.

Abb. 22 A zeigt die Aktivität des Proteasoms in Extrakten von unterschiedlich stimulierten RT4-Zellen. Die Aktivität war für Substrat III stets höher als für Substrat II, was dadurch erklärt werden kann, dass die Substrate unterschiedliche

proteolytische Aktivitäten des Proteasoms nachweisen. Zwischen den einzelnen Messgruppen waren jedoch keine Unterschiede in der Aktivität festzustellen. Diese war für das jeweilige Substrat etwa gleich, egal ob es sich um unstimulierte Zellen handelte oder um stimulierte. Die NO-Produktion hatte ebenfalls in diesem Assay keinen nachweisbaren Einfluss auf die Aktivität, weder endogen produziertes NO (bei Stimulation mit IFN γ und IL-1 β) noch exogen appliziertes (Inkubation mit DETA/NO). Als Kontrolle, dass tatsächlich eine Proteasom-Aktivität nachgewiesen wurde, dienten die Proben, die vor dem Start des Experimentes mit *clasto*-Lactacystin inkubiert wurden. Hier war eine deutliche Abnahme der detektierten Fluoreszenz zu beobachten. Aus diesen Daten konnte geschlossen werden, dass NO keinen stabilen Einfluss auf die zelluläre Aktivität des Proteasoms hat. Wenn *in vivo* ein solcher Einfluss vorliegen sollte, so war er reversibel und nach Lyse der Zellen bzw. nach Aussetzen der NO-Produktion nicht mehr nachweisbar.

Abb. 22 B klärt diese Frage etwas weiter. Hier wurde ein identischer Assay mit Lysaten von unstimulierten Zellen durchgeführt, aber den Ansätzen verschiedene Konzentrationen von NO-Donoren zugesetzt. Dieser Versuch stellte also eine momentane NO-Produktion in Zellen nach. Dazu wurden Donoren mit langer Halbwertszeit und kurzer Halbwertszeit (DETA/NO 8h, MAMA/NO 2min, SNOC 25min) eingesetzt, um eine starke bzw. schwache NO-Produktion zu imitieren. Auf den ersten Blick sah es so aus, als würden MAMA/NO und DETA/NO die Aktivität des Proteasoms konzentrationsabhängig hemmen, was aufgrund des beschleunigten, proteasom-abhängigen Abbaus derIDO unter NO-Bedingungen unerwartet gewesen wäre. Aber die Proben, die mit entgasten Donor-Lösungen inkubiert wurden, zeigten denselben Effekt. Bei SNOC, einem Donor aus einer anderen Substanzklasse, trat weder bei frischen Lösungen noch bei der entgasten Lösung ein messbarer Effekt auf die Proteasom-Aktivität auf. Daher muss davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Effekt bei MAMA/NO und DETA/NO nicht auf dem entstehenden NO beruhte, sondern auf den beim Zerfall entstehenden Polyaminen. Dies stimmt damit überein, dass bei dem Donor S-Nitroso-Cystein (SNOC) kein inhibitorischer Effekt beobachtet werden konnte, denn hier entstehen beim Zerfall NO und Cystin.

Insgesamt zeigten diese Versuche, dass NO *in vitro* und unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluss auf die Aktivität des Proteasoms hatte, weder einen transienten noch einen stabilen. Der beobachtete schnellere Abbau derIDO musste

daher ein Effekt sein, der spezifisch für die IDO oder eine Gruppe von Proteinen war, zu denen auch die IDO gehörte.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zweier zellulärer Mechanismen untersucht, die beide eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr bzw. der Immunregulation spielen. DieIDO wurde als Vermittler eines antimikrobiellen Effektormechanismus entdeckt, später zeigten die Arbeiten von Mellor und seiner Arbeitsgruppe die Bedeutung der Tryptophan-Depletion als regulatorischer Mechanismus im Immunsystem [120]. Auch die iNOS wurde zuerst aufgrund der antimikrobiellen Wirkung von NO in Makrophagen von Nagetieren entdeckt, wobei eine NO-Produktion im Menschen aber eher regulatorische Aufgaben hat. Uns interessierte die Frage nach der gegenseitigen Interaktion dieser regulatorischen Mechanismen, vor allem wenn sie gemeinsam in einer Zelle induziert werden.

4.1 Die Inhibition der IDO-Aktivität durch Stickstoffmonoxid

Die Interaktion der NO-Produktion mit der IDO-Aktivität wurde zuerst von Thomas *et al.* untersucht [125]. Sie zeigten, dass die Aktivität der IDO in humanen Monozyten durch Stickstoffmonoxid gehemmt wird. Unsere Arbeitsgruppe konnte funktionelle Konsequenzen dieser IDO-NO-Interaktion in einem vergleichbaren System zeigen. Zellen des humanen Blasenepithel-Karzinoms RT4 sind nach Stimulation mit IFN γ aufgrund der IDO-Induktion in der Lage, das Wachstum von extrazellulären, Tryptophan-abhängigen Bakterien zu hemmen. Bei zusätzlicher Gabe von IL-1 β wurde in diesen Zellen die iNOS induziert, deren Aktivität zu einer Inhibition der IDO führte und damit den bakteriostatischen Effekt aufhob [116]. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der RT4-Zelle gegenüber einer Stimulation mit Zytokinen mit dem Verhalten einer weiteren epithelialen Zelllinie, der A549 (Lungenepithel), bezüglich der IDO- und der iNOS-Aktivität verglichen. Die IDO-Aktivität in A549-Zellen ist bisher noch nicht untersucht worden, die Zelllinie wurde aber schon für Untersuchungen der iNOS-Gentranskription in humanen Zellen verwendet [68]. Allerdings wurde dabei keine tatsächliche NO-Produktion in diesen Zellen gezeigt. Die Untersuchungen zur IDO- und iNOS-Aktivität in dieser Zelle lieferten zunächst unerwartete Ergebnisse. Die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität war in A549-Zellen

wesentlich höher als in RT4-Zellen und konnte durch IL-1 β und TNF α vor allem im Bereich niedriger IFN γ -Konzentrationen gesteigert werden. Die NO-Produktion dieser Zellen war dagegen schwach und nur im Bereich sehr hoher IFN γ -Konzentrationen verlässlich messbar. Diese schwache NO-Produktion konnte die IDO-Aktivität der Zellen unter keiner der gewählten Stimulationsbedingungen beeinflussen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die mit den RT4-Zellen erhalten wurden. Die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität dieser Zelle war moderater im Vergleich zu A549 und sie wurde durch IL-1 β und TNF α ganz bzw. teilweise inhibiert. Diese Zellen produzierten auch wesentlich mehr NO als die A549 und die IDO-Inhibition war durch den selektiven iNOS-Inhibitor AMT aufhebbar (Abb. 5, 6). Diese beiden Epithelzellen reagierten also auf eine Stimulation mit inflammatorischen Zytokinen prinzipiell gleich, aber mit starker unterschiedlicher Ausprägung der zellulären Effekte.

Die Inhibition der IDO durch NO wurde von Thomas *et al.* auf eine Bindung von NO an das Häm-Eisen zurückgeführt. Eine direkte Wirkung von NO auf die IDO wurde auch in der vorliegenden Arbeit in einem zellfreien System nachgewiesen. Chemische NO-Donoren verschiedener Substanzklassen waren in der Lage, die IDO-Aktivität in Extrakten von IFN γ -stimulierten Zellen konzentrationsabhängig zu hemmen (Abb. 9). Für diese Arbeiten wurde die Zelllinie 86HG39 verwendet, ein humanes Glioblastom, das sich hauptsächlich aus Zellen zusammensetzt, die Marker von Astrozyten exprimieren. Diese Zelllinie produziert unter keiner der hier gewählten Stimulationsbedingungen messbare Mengen NO, daher sind während der Stimulation der Zellen keine Effekte auf das IDO-Protein zu erwarten. Die Inhibition der IDO in diesem Test beruhte allein auf NO, denn die anderen Reaktionsprodukte, die bei dem Zerfall der Donoren entstehen, hatten keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Zusammen mit den Messungen der zellulären IDO- und iNOS-Aktivität stellt dieser Test klar heraus, dass NO alleine verantwortlich war für die Inhibition der IDO und kein weiterer sekundärer Effekt, der möglicherweise durch Zytokine in den Zellen ausgelöst wurde.

Damit konnten wir also ähnlich wie Thomas *et al.* eine direkte Interaktion von NO mit der IDO nachweisen. Auch wir halten eine Bindung von NO an das Häm-Eisen der IDO für die Ursache der Aktivitätshemmung. Es ist bekannt, dass das NO-Radikal sehr gut mit Häm interagiert und die Aktivität von Enzymen mit Häm als prothetischer Gruppe regulieren kann (Review [140]). Eine direkte Bindung von NO an die IDO ist jedoch noch nie experimentell nachgewiesen worden. Denkbar ist auch eine

Konkurrenz zwischen derIDO und NO um die Verfügbarkeit von Sauerstoff, welchen dieIDO für die von ihr katalysierte Reaktion als zweites Substrat benötigt. NO reagiert sehr schnell mit Sauerstoff-Spezies (Abb. 2, Review [71]), und es reagiert mit oxygeniertem Hämoglobin diffusionskontrolliert zu Nitrat und Met-Hämoglobin (Fe^{3+} -Hämoglobin). Daher ist oxygeniertes Blut ein natürlicher „Abfluss“ für NO in biologischen Systemen und Nitrat das hauptsächlich stabile Endprodukt einer NO-Produktion *in vivo* (Review [75]). Der genaue biochemische Charakter der Interaktion zwischen derIDO und NO soll hier jedoch nicht weiter diskutiert werden, da ihm im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgegangen worden ist.

4.2 Funktionelle Konsequenzen der NO-Produktion

Das unterschiedliche Verhalten der beiden Zelllinien hinsichtlich der untersuchten Mechanismen hatte *in vitro* Konsequenzen für die Erregerabwehr. Beide Zelllinien sind in der Lage, nach einem $\text{IFN}\gamma$ -Stimulus das Wachstum extrazellulärer Bakterien durch einenIDO-vermittelten Abbau des Tryptophans im Zellüberstand zu hemmen. Ein weiterer antimikrobieller Effekt ist an der Etablierung dieser Bakteriostase nicht beteiligt, denn sie ist durch Zugabe von L-Tryptophan vollständig reversibel. Eine Stimulation mit $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$ führt in RT4-Zellen zu einer iNOS-Induktion, die eine deutlich messbare Produktion von NO zur Folge hat und als Konsequenz eine Inhibition derIDO und eine Aufhebung der Bakteriostase bewirkt. Diese funktionellen Befunde wurden von unsere Arbeitsgruppe bereits publiziert [116]. In A549-Zellen waren iNOS-Induktion und NO-Produktion unter gleichen Stimulationsbedingungen wesentlich schwächer ausgeprägt und führten nicht zu einerIDO-Inhibition. Im Gegenteil wurde dieIDO-Aktivität vor allem im Bereich niedriger $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ verstärkt. Als Folge davon war eine deutliche Steigerung der $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Bakteriostase durch $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ nachweisbar (Abb. 7).

4.3 Wirkung der Zytokine auf die Transkription des IDO-Gens

Wie bereits erwähnt steigerte $\text{TNF}\alpha$ in A549-Zellen die $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität. Dieser Effekt wurde von unserer Arbeitsgruppe auch in humanen Astrozyten beschrieben. Es ließ sich zeigen, dass die gleichzeitige Stimulation von 87HG32-Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ zu einer Erhöhung des IDO-mRNA-Levels führt [113]. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnte $\text{IL-1}\beta$ wie $\text{TNF}\alpha$ in A549-Zellen zu einer Verstärkung der IDO-Aktivität führen, während beide Zytokine in RT4-Zellen die IDO-Aktivität und die IDO-vermittelten Effekte aufhoben.

Um die Regulation der IDO-Gentranskription durch Zytokine und NO zu untersuchen, wurden RT-PCR-, Northern Blot- und Realtime-PCR-Experimente durchgeführt. Die Regulation des IDO-Gens wurde in RT4- und A549-Zellen bisher noch nicht untersucht. Mittels der RT-PCR wurde zunächst nur die rein qualitative Induktion der Gentranskription nach 8 Stunden Stimulation erfasst. Bezüglich der Regulation des IDO-Gens durch die verwendeten Zytokine verhielten sich beide Zellen identisch. Zwar waren auch bei Stimulation mit $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ alleine geringe Mengen an IDO-mRNA nachweisbar, aber eine Enzymaktivität war unter diesen Bedingungen nicht messbar. $\text{IFN}\gamma$ war der Hauptinduktor der Transkription, und weder $\text{IL-1}\beta$ noch $\text{TNF}\alpha$ regulierten diese Transkription negativ (Abb. 8). Mittels Northern Blot und Realtime-PCR wurden quantitative Bestimmungen der IDO-mRNA durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigten eine deutliche Verstärkung der Transkription des IDO-Gens durch diese beiden Zytokine (Abb. 13, 14). Diese Ergebnisse entsprechen bisher publizierten Daten über die Regulation des IDO-Gens. Die Arbeitsgruppe von Gupta führte Untersuchungen dazu in humanen Fibroblasten durch und identifizierte die durch $\text{IFN}\gamma$ aktivierten Transkriptionsfaktoren $\text{STAT1}\alpha$ und IRF-1 als die wichtigsten Regulatoren der Transkription des IDO-Gens, während ein anderer Transkriptionsfaktor der IRF-Familie, ISGF3, nur eine sehr schwache Transkriptionsrate initiieren konnte. ISGF3 wird durch die Interferone α und β aktiviert, die nur schwache Induktoren einer IDO-Aktivität sind [102,103]. Weiterhin konnten Hissong und Carlin eine Verstärkung der IDO-Gentranskription durch $\text{IL-1}\beta$ in humanen Monozyten nachweisen [105]. Diese Untersuchungen wurden jedoch nicht an den hier verwendeten Zelllinien durchgeführt, daher sind diese Ergebnisse nicht ohne weiteres übertragbar.

Die Quantifizierung der IDO-mRNA unter verschiedenen Stimulationsbedingungen durch Northern Blot und Realtime-PCR in RT4- und A549-Zellen bestätigte die PCR-Ergebnisse. IL-1 β und TNF α erhöhten den steady-state-Level an IDO-mRNA, wobei dieser Effekt in der Realtime-Messung in A549-Zellen deutlicher ausfiel als in RT4-Zellen. Der Effekt war NO-unabhängig, da er durch den Einsatz des selektiven iNOS-Inhibitors AMT nicht aufgehoben wurde. Es handelt sich dabei anscheinend um eine reine Zytokin-Wirkung. Aus diesen Ergebnissen kann die genaue Wirkungsweise der Zytokine nicht abgeleitet werden, da sowohl eine Verstärkung der Transkriptionsrate als auch eine Stabilisierung der mRNA zu den gemessenen erhöhten Werten des steady-state-Gehaltes an IDO-mRNA führen können. Die bekannten Daten zu der Regulation des IDO-Gens machen eine erhöhte Transkriptionsrate aber sehr wahrscheinlich (s. 1.7.4). Diese Analyse erklärt die beobachtete Verstärkung der IDO-Aktivität in A549-Zellen durch IL-1 β und TNF α sehr gut. Die Ursache für die Steigerung der Aktivität ist die erhöhte Menge an IDO-mRNA unter diesen Stimulationsbedingungen, die auch zu einer erhöhten Menge an IDO-Protein führt (Abb. 10).

Eine Erhöhung des IDO-mRNA-Gehaltes durch IL-1 β und TNF α wurde auch in RT4-Zellen beobachtet, wenn auch weniger deutlich. Dies führte aber nicht zu einer Steigerung der IDO-Aktivität, sondern zu einer Hemmung. Ursache dafür war, wie geschildert, eine wesentlich stärkere iNOS-Aktivität in RT4-Zellen im Vergleich zu A549-Zellen. Daher wurde auch die Regulation der iNOS auf mRNA-Ebene durch Zytokine in den beiden Zelllinien qualitativ mittels RT-PCR untersucht. Zelltyp-spezifische Antworten auf Zytokine werden oft beobachtet und sind z. B. auch für die Induktion der iNOS bekannt. Ganster *et al.* untersuchten die iNOS-Gentranskription in der bei dieser Arbeit verwendeten Zelllinie A549 und fanden eine maximale Induktion durch eine Kombination von IFN γ , IL-1 β und TNF α in hohen Konzentrationen (1000U/ml TNF α , 100U/ml IL-1 β , 250U/ml IFN γ). Sie identifizierten die Transkriptionsfaktoren STAT1 α und NF- κ B (welcher durch TNF α und IL-1 β aktiviert wird) als wichtigste Aktivatoren der Transkription in A549-Zellen. In der humanen Fibroblasten-Zelllinie 2fTGH unterdrückte STAT1 α jedoch sowohl eine schwache basale als auch die NF- κ B-induzierte Transkription: in dieser Zelllinie wirkte IFN γ negativ regulatorisch auf die iNOS-Gentranskription [68]. Die in dieser Arbeit verwendeten A549-Zellen verhielten sich hinsichtlich der iNOS-Induktion auf mRNA-Ebene wie von Ganster *et al.* beschrieben. Nur eine Kombination von IFN γ

mit IL-1 β (+ TNF α) führte zu einer nachweisbaren Transkription des iNOS-Gens bei den eingesetzten Zytokin-Konzentrationen von 100U/ml (Abb. 8). Bei hohen Dosen von IFN γ (1000U/ml) war allerdings auch mit IFN γ alleine eine schwache iNOS-Aktivität dieser Zellen im funktionellen Test messbar. Eventuell ist eine starke Aktivierung von STAT1 ausreichend, um auch ohne eine zusätzliche Aktivierung von NF- κ B die Transkription des iNOS-Gens einzuleiten.

Die Transkription des iNOS-Gens in RT4-Zellen ist zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht untersucht worden. Insgesamt regulierten die bei dieser Arbeit eingesetzten Zytokine die Gene der IDO und der iNOS in der prinzipiell gleichen Art und Weise, wenn auch mit unterschiedlicher Ausprägung in der Stärke der induzierten Gentranskription und Enzymaktivität. Bei der RT4-Zelle hatte TNF α eine stärkere Wirkung auf die Transkription als in der A549-Zelle: hier führte auch eine Stimulation mit IL-1 β + TNF α bzw. mit IFN γ + TNF α zu einer Induktion, was in A549-Zellen nicht der Fall war (Abb. 8) und unter diesen Bedingungen war auch eine NO-Produktion der RT4-Zellen messbar (Abb. 6, 16). Quantitative Daten zur Bestimmung des Gehaltes an iNOS-mRNA in den verwendeten Zelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erhoben. Die RT-PCR-Daten zeigten in RT4-Zellen jedoch eine deutlich effizientere Induktion der iNOS-Gentranskription durch die eingesetzten Zytokine als in A549-Zellen. Damit kann die höhere iNOS-Aktivität in RT4-Zellen erklärt werden. Aufgrund des eingesetzten Zytokin-Profiles und der damit erzielten Ergebnisse scheinen in RT4-Zellen aber die gleichen Mechanismen für die iNOS-Gentranskription verantwortlich zu sein, die auch in den A549-Zellen wirksam sind.

Damit ist der beobachtete unterschiedliche Effekt von IL-1 β und TNF α auf die IDO-Aktivität nicht durch eine unterschiedliche Regulation auf mRNA-Ebene zu erklären, sondern prägt sich rein NO-abhängig auf posttranskriptioneller Ebene aus.

4.4 Wirkung von NO auf das IDO-Protein

Eine vergleichende Analyse der Expression des IDO-Proteins in den Zelllinien A549 und RT4 bei unterschiedlicher Stimulation brachte ein unerwartetes Ergebnis. In A549-Zellen entsprach die Expression des IDO-Proteins den Ergebnissen der Untersuchungen zur Transkriptionsregulation. TNF α und IL-1 β steigerten den Gehalt an IDO-Protein in A549-Zellen zu jedem untersuchten Zeitpunkt (8-48 Stunden

Stimulation, Abb. 10). Dies wurde aufgrund der mRNA-Daten auch so erwartet. Für die RT4-Zellen wurde auf Proteinebene das gleiche Bild vermutet, da IL-1 β und TNF α auch in diesen Zellen die Transkription des IDO-Gens steigerten (Abb. 14). Zudem wurde als Mechanismus der Inhibition des Enzyms durch NO aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten (Abb. 9) und der Befunde von Thomas *et al.* eine direkte Interaktion auf Proteinebene vermutet, die nicht mit einer erniedrigten Expression der IDO korrelieren muss. Bei kurzzeitiger Stimulation (8 Stunden) war in RT4-Zellen auch eine verstärkte Expression der IDO unter Einfluss von IL-1 β und / oder TNF α zu beobachten, bei länger andauernder Stimulation (24 bis 48 Stunden) nahm der Gehalt an IDO-Protein unter diesen Bedingungen jedoch stetig ab, während er bei Stimulation mit IFN γ alleine über den gesamten untersuchten Zeitraum konstant blieb (Abb. 10). Bei einer gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit dem NOS-Inhibitor AMT wurde keine Verringerung des zellulären Gehaltes an IDO-Protein bei einer Stimulation mit IFN γ + IL-1 β (+ TNF α) beobachtet, was den Effekt als NO-abhängig kennzeichnet (Abb. 11). Da eine NO-Produktion in den Zellen erst nach der Zytokinwirkung, d. h. nach Bildung des iNOS-Proteins eintreten kann, wird dieser Effekt zeitlich verzögert ausgeprägt und wirkt dann der Zytokin-induzierten verstärkten IDO-Expression entgegen. Die Verringerung des IDO-Proteingehaltes konnte, wie in weiteren Experimenten gezeigt, auch durch exogenes NO ausgelöst werden, was weiterhin für einen monokausalen NO-Effekt sprach (Abb. 12).

Dieser Effekt von NO auf das IDO-Protein wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschrieben. NO wirkt also nicht nur durch eine Inhibition der Enzymaktivität, die evtl. eine Bindung des NO an das Häm-Eisen der IDO zur Ursache hat, sondern verringert auch den Gehalt an IDO-Protein. Dieser NO-bedingte Effekt stellt damit einen weiteren, bisher unbekanntem Regulationsweg der IDO durch NO dar. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde in dieser Arbeit weiter untersucht.

4.5 Die IDO-Gentranskription wird durch NO nicht reguliert

Um die Ursache der beobachteten NO-Wirkung aufzuklären, wurden weitere Experimente zur IDO-Gentranskription gemacht, bei denen ein direkter Einfluss von NO untersucht wurde. Dies geschah aus zweierlei Gründen: zum einen existieren die Arbeiten von Alberati-Giani *et al.*, die in murinen Makrophagen eine Regulation der

IDO durch NO auf mRNA-Ebene nachweisen konnten. Dieser Effekt war zelltypspezifisch, er trat in einer zweiten untersuchten Zelllinie (N11, Mikroglia) nicht auf [139]. Ein solches Verhältnis hätte auch in den hier untersuchten Zellen vorliegen können: RT4-Zellen produzieren wesentlich mehr NO als A549-Zellen und könnten daher NO-abhängige Effekte wie eine Genregulation ausprägen, die in A549-Zellen nicht auftreten. Zweitens ist bekannt, dass NO die Aktivität von mehreren Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann (Reviews [71,141]). Diese werden als „redox-sensitive“ Transkriptionsfaktoren bezeichnet, weil sie durch eine oxidative bzw. reduktive Umgebung in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Das bekannteste und am besten untersuchte Beispiel ist der Transkriptionsfaktor OxyR aus *E. coli*, der Gene reguliert, dessen Produkte protektiv bei oxidativem und nitrosativem Stress wirken. Er war das erste Molekül, von dem gezeigt werden konnte, dass es durch die S-Nitrosierung eines Cystein-Restes in der DNA-bindenden Domäne aktiviert werden kann und dessen S-nitrosierte Form auch *in vivo* gefunden wurde [142]. Transkriptionsfaktoren von Säugetieren sind bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber reaktiven Stickstoff- und Sauerstoff-Intermediaten noch nicht so gut untersucht, aber es liegen vermehrte Hinweise auf eine Inhibition der Transkriptionsfaktoren AP-1, Sp1 und NF- κ B durch S-Nitrosierung vor. Dabei existieren aber nur für NF- κ B Daten, die nahe legen, dass eine solche S-Nitrosierung tatsächlich *in vivo* auftritt [143]. Ein weiterer Mechanismus durch den NO die Aktivität von Transkriptionsfaktoren inhibieren kann, beruht auf einer Zerstörung von Zinkfinger-Strukturen durch S-Nitrosierung der Cysteine, welche das Zink komplexieren [144].

Eine Wirkung von NO auf NF- κ B könnte den beobachteten Effekt in RT4-Zellen jedoch nicht komplett erklären, da zwar IL-1 β und TNF α diesen Transkriptionsfaktor aktivieren, IFN γ aber nicht. Eine Inhibition von NF- κ B sollte daher nur die Steigerung der IDO-Expression durch IL-1 β und TNF α verhindern, aber nicht die Hauptinduktion durch IFN γ , d. h. der Gehalt an IDO-Protein in den Zellen dürfte nicht geringer werden als das Maß, welches durch IFN γ alleine induziert wird. Dies ist in den RT4-Zellen nach 48 Stunden Stimulation aber der Fall (Abb. 10). Daher wurde direkt untersucht, ob NO einen Einfluss auf die rein IFN γ -induzierte Gentranskription hat. Dafür wurden RT4-Zellen zeitgleich mit IFN γ und dem chemischen NO-Donor DETA/NO inkubiert, oder der Donor wurde 16 Stunden nach einer Stimulation mit IFN γ zugesetzt und die Zellen für einen weiteren Zeitraum (bis zu 30 Stunden) inkubiert. Bei diesen Experimenten konnte aber kein Unterschied in der Menge der

IDO-mRNA festgestellt werden (Abb. 15). Eine Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ alleine zeigte den gleichen zeitlichen Verlauf des Gehaltes an IDO-mRNA wie eine Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ + DETA/NO. Da auch die Zytokine keinen negativen Einfluss auf die Transkription des IDO-Gens hatten, konnte ein Regulation durch NO auf mRNA-Ebene, wie sie von Alberati-Giani et al. in Mauszellen gezeigt werden konnte, für die hier verwendeten humanen Zellen ausgeschlossen werden. Daher war zu vermuten, dass die NO-vermittelte Verringerung des Gehaltes an IDO-Protein auf posttranskriptioneller Ebene erfolgte.

4.6 Beschleunigter Abbau des IDO-Proteins durch NO

Der beobachtete Effekt von NO auf das IDO-Protein konnte im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit als eine beschleunigte Degradation durch das Proteasom identifiziert werden. Dabei wurde zunächst gezeigt, dass NO seinen Effekt auf bereits gebildetes IDO-Protein ausübt. In A549-Zellen, die mit $\text{IFN}\gamma$ vorstimuliert und anschließend ohne $\text{IFN}\gamma$, aber mit Cycloheximid weiter inkubiert wurden, nahm der Gehalt an IDO-Protein bei Anwesenheit eines NO-Donors schneller ab als ohne NO-Donor (Abb. 18). Unter diesen Versuchsbedingungen können während der Inkubationsphase keine neuen Proteine synthetisiert werden. Dieser Versuch zeigte, dass NO nicht auf die Synthese des IDO-Proteins wirkt, denn die konnte in diesem Fall auch in Abwesenheit von NO nicht stattfinden. Zudem konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass NO keinen messbaren Einfluss auf die Proteinbiosynthese in RT4-Zellen hat (Abb. 17). Ein Wirkmechanismus, welcher ganz oder zum Teil auf einer Inhibition der Translation der IDO-mRNA beruht, war damit sehr unwahrscheinlich.

Weiterhin zeigte der Versuch mit Cycloheximid, dass der NO-basierte Effekt nicht von einer Neusynthese zellulärer Proteine abhängt. Da NO sowohl die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren als auch Signaltransduktionsprozesse direkt auslösen kann (s. 1.5.3), war die Neubildung eines Proteins, welches anschließend mit der IDO interagiert und das Protein destabilisiert, ein denkbare Szenario. Dies scheint aufgrund der hier gezeigten Daten aber kein Teil des verantwortlichen Mechanismus zu sein. Dennoch kann eine Interaktion der IDO mit einem anderen Protein als Bestandteil des NO-induzierten Effektes nicht ausgeschlossen werden,

da NO theoretisch auch ein bereits gebildetes Protein direkt oder indirekt aktivieren könnte.

Da NO offenbar nicht die Synthese des IDO-Proteins beeinflusste, legten die bisher erhaltenen Ergebnisse einen beschleunigten Abbau des IDO-Proteins unter NO-Einfluss nahe. Pulse-Chase-Experimente, bei denen IFN γ -stimulierte RT4-Zellen für 30 Minuten mit radioaktiv markierten Aminosäuren gepulst wurden, konnten diesen Verdacht weiter bestätigen. Der Chase wurde ohne IFN γ , in An- oder Abwesenheit eines NO-Donors durchgeführt. Auch hier nahm die Menge des IDO-Proteins in den Zellen, die während des Chase mit einem NO-Donor inkubiert wurden, schneller ab als in Zellen, die nicht unter NO-Einfluss standen (Abb. 19). Da bei diesem Versuch nur Proteine markiert werden, die während des Pulses synthetisiert worden sind, kann eine schnellere Abschwächung des IDO-Signals nur mit einem schnelleren Abbau des Proteins begründet werden. Damit war der grundsätzliche Mechanismus der NO-vermittelten Verringerung des Gehaltes an IDO-Protein in den RT4-Zellen aufgeklärt: es handelte sich um eine beschleunigte Degradation der IDO.

4.7 Das Proteasom degradiert das IDO-Protein

Der Abbau des IDO-Proteins ist bisher noch nie untersucht worden. Um den Ort des beschleunigten Abbaus der IDO zu identifizieren, wurden Experimente mit Inhibitoren gegen den Proteinabbau im Lysosom und im Proteasom durchgeführt. Wie bereits geschildert ist das Lysosom in Zellen von Säugetieren hauptsächlich für den Abbau endozytotisch aufgenommener Proteine verantwortlich, während das Proteasom die große Mehrheit der intrazellulären Proteine degradiert (s. 1.6). Ein Abbau der IDO im Proteasom war daher sehr wahrscheinlich, dennoch sollte eine Beteiligung des Lysosoms experimentell ausgeschlossen werden. Dazu wurden RT4-Zellen mit IFN γ stimuliert, anschließend wurde das Zytokin entfernt und verschiedene Inhibitoren der lysosomalen proteolytischen Aktivität zugesetzt. Eine Stunde später wurde ein NO-Donor zugegeben und die Zellen für weitere 16 Stunden inkubiert. Wie erwartet, konnten die Inhibitoren den NO-induzierten beschleunigten Abbau der IDO nicht aufheben (Abb. 20). Sie hatten auch keinen Einfluss auf den Gehalt an IDO-Protein in Zellen, die ohne NO-Donor inkubiert wurden. In diesen hätte der Gehalt an IDO-

Protein im Vergleich zu Zellen, die ohne Inhibitoren und ohne NO-Donor inkubiert wurden, leicht ansteigen sollen, wenn das Lysosom für den Abbau der IDO unter „normalen“ Umständen zuständig wäre. Diese Ergebnisse zeigten, dass das Lysosom weder an der NO-induzierten noch an der basalen Degradation des IDO-Proteins beteiligt ist.

Diese Experimente wurden daraufhin mit Inhibitoren des Proteasoms durchgeführt. Die Versuchsdurchführungen waren dabei identisch, nur wurden für eine Inkubation mit Proteasom-Inhibitoren A549-Zellen verwendet, weil die Proteasom-Inhibitoren in RT4-Zellen nach wenigen Stunden einen Zelltod auslösten. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass alle eingesetzten Inhibitoren den NO-induzierten Abbau des IDO-Proteins aufheben konnten (Abb. 21). Auch in Zellen, die ohne NO-Donor inkubiert wurden, war eine leichte Verstärkung des IDO-Signals durch die Inhibitoren messbar. Die Wirksamkeit der Inhibitoren wurde überprüft, indem die intrazelluläre Anhäufung von ubiquitinierten Proteinen in den betroffenen Zellen gezeigt wurde. Damit wurde das Proteasom klar als Ort des intrazellulären Abbaus des IDO-Proteins identifiziert. Dieser Befund war bisher unbekannt und wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal beschrieben.

Um eine Aussage über die Spezifität des beschleunigten Abbaus der IDO machen zu können, wurde untersucht ob sich eine NO-Produktion direkt auf die Aktivität des Proteasoms ausübt. Dazu wurden Extrakte von unterschiedlich stimulierten RT4-Zellen mit fluorogenen Substraten des Proteasoms inkubiert. Sollte NO einen stabilen Effekt auf die Aktivität des Proteasoms haben, der auch nach Lyse der Zellen noch besteht, so könnte er in einem solchen Test nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen konnten aber keinen stabilen Effekt von Zytokinen oder NO auf die Proteasom-Aktivität zeigen. In Extrakten aus Zellen, die mit $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN}\gamma + \text{IL-1}\beta$ oder mit DETA/NO inkubiert wurden, ist die gemessene Menge hydrolysierter Peptide sowohl untereinander als auch mit den Messungen von Extrakten aus unstimulierten Zellen vergleichbar (Abb. 22 A). Ein transienter Effekt von NO auf die Aktivität des Proteasoms wurde untersucht, indem die Proteasom-Aktivität in Extrakten von unstimulierten RT4-Zellen bei gleichzeitiger Inkubation mit verschiedenen NO-Donoren gemessen wurde. Hier konnte zwar ein hemmender Effekt der Donoren DETA/NO und MAMA/NO festgestellt werden, dieser beruhte aber nicht auf dem entstandenen NO, sondern auf dem zweiten Produkt des Zerfalls

dieser Donoren, den Polyaminen. Dieser Befund wurde dadurch bekräftigt, dass ein NO-Donor aus einer anderen Substanzklasse, SNOC, keinen Einfluss auf die proteasomale Aktivität hatte (Abb. 22 B). Damit konnte gezeigt werden, dass der NO-induzierte beschleunigte Abbau des IDO-Proteins wahrscheinlich nicht mit einer generellen Steigerung der Aktivität des Proteasoms korreliert, da eine NO-Produktion *in vitro* keinen Effekt auf die Fähigkeit des Proteasoms hatte, Peptide zu hydrolysieren. Ein solcher Zusammenhang ist auch nicht erwartet worden, denn nach heutigem Wissensstand wird der Abbau eines bestimmten Proteins nicht durch das Proteasom selbst reguliert. Die Bedeutung der oben beschriebenen Ergebnisse in einem zellulären Kontext wird im folgenden Abschnitt genauer diskutiert.

4.8 NO und die Degradation von Proteinen durch das Proteasom

Durch die oben beschriebenen Experimente konnte klar gezeigt werden, dass das Proteasom für den Abbau des IDO-Proteins verantwortlich ist und dass dieser Abbau unter dem Einfluss von endogenem oder exogenem NO beschleunigt wurde. Dieser für die Proteinregulation wichtige Aspekt wurde für die IDO bisher nicht erforscht und wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt.

Der beschleunigte Abbau des IDO-Proteins beruhte ausschließlich auf NO, da er

- in A549-Zellen, die nur sehr wenig NO produzieren, nicht auftrat (Abb. 10)
- in NO-produzierenden RT4-Zellen durch den iNOS-Inhibitor AMT komplett aufhebbar war (Abb. 11)
- in den beiden verwendeten Zelllinien durch chemische NO-Donoren aus verschiedenen Substanzklassen ausgelöst werden konnte (Abb. 12, 20)

Ferner ist der NO-induzierte beschleunigte Abbau der IDO nicht Cycloheximid-sensitiv, was bedeutet, dass für seine Ausführung keine Neusynthese zellulärer Proteine notwendig ist (Abb. 18). NO bewirkt *in vitro* auch keine Steigerung der Aktivität des Proteasoms (Abb. 22), so dass ein allgemeiner Effekt auf die zellulären Proteine unwahrscheinlich ist. Da der genaue Weg, auf dem NO den beschleunigten Abbau der IDO durch das Proteasom auslöst, im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnte, sind Überlegungen zu diesem Problem spekulativ. Dennoch wird im Folgenden versucht, die verschiedenen Möglichkeiten für einen solchen Mechanismus zu erläutern.

Neueste Untersuchungen zeigen, dass anscheinend mehrere Proteine NO-abhängig degradiert werden. Vor drei Jahren wurden die ersten Beobachtungen zu diesem Thema von Kim und Ponka publiziert, welche die Regulation des Eisenhaushaltes in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 untersuchten. Sie fanden, dass das „iron regulatory protein 2“ (IRP-2) bei Inkubation der Zellen mit dem chemischen NO-Donor Natriumnitroprussid (SNP) beschleunigt abgebaut wird [145,146]. Erst 2002 wurden zwei weitere Arbeiten publiziert, die sich mit dem Phänomen des NO-induzierten Proteinabbaus beschäftigten. Bebok *et al.* zeigten, dass NO den Abbau des „cystic fibrosis transmembrane conductance regulators“ (CFTR), eines cAMP-kontrollierten Chloridkanals, in humanen und murinen Zellen beschleunigt [147]. Franzen *et al.* untersuchten die Regulation der Ceramid-Level in Zellen der Ratte und konnten eine NO-induzierte Degradation der neutralen Ceramidase beobachten [148]. Die hier genannten Publikationen sind unseres Wissens die einzigen, die für ein bestimmtes Protein eine NO-abhängige Verstärkung des Abbaus zeigen. In der vorliegenden Arbeit wird ein solcher Effekt auch für dieIDO gezeigt, welche damit erst das vierte Protein ist, von dem eine derartige NO-bedingte Regulation bekannt wird.

Alle oben genannten Publikationen wurden innerhalb der letzten drei Jahre verfasst. Das Wissen um einen NO-induzierten Proteinabbau ist also noch sehr jung, daher ist dieses Phänomen noch nicht gründlich erforscht. Alle bekannten Fälle, inklusive dem derIDO, zeigen bisher nur zwei grundsätzliche Gemeinsamkeiten:

- der Abbau des jeweiligen Proteins ist ausschließlich NO-abhängig, denn er ist durch exogene NO-Donoren induzierbar
- der Abbau erfolgt in allen untersuchten Fällen im Proteasom, denn er ist durch Inhibitoren des Proteasoms, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, blockierbar

Alle anderen bekannten Details ergeben kein einheitliches Bild. So ist die NO-induzierte Degradation von IRP-2 Cycloheximid-sensitiv, was im Falle derIDO nicht zutrifft (Abb. 18) und auch im Falle der Ceramidase nicht beobachtet wurde.

Der genaue Weg des NO-induzierten Abbaus ist in keinem der untersuchten Fälle bekannt. Die Suche nach einem solchen Weg führt zurück auf die allgemeine Frage wie das Proteasom ein Substrat erkennt. Die Tatsache, dass in Zellen von Säugetieren das Proteasom etwa 80-90% der zellulären Proteine abbaut, kann heute als gesichert angesehen werden. Bei der überwiegenden Mehrheit der betroffenen

Proteine ist für die Degradation eine Markierung mit Ubiquitin notwendig, und dieser Vorgang der Ubiquitinierung ist für die Spezifität des Abbaus entscheidend. Die Spezifität wird vor allem durch die Ubiquitin-Ligasen (E3-Enzyme) vermittelt, welche die Substrate des Proteasoms erkennen und die Ubiquitin-Moleküle auf das Substrat übertragen. Die Mechanismen der Substraterkennung sind aber sehr vielfältig und zum Teil noch unzureichend verstanden, so dass für einen konkreten Fall keine Vorhersagen gemacht werden können. Sie umfassen unter anderem die Erkennung der N-terminalen Aminosäure („N-end rule“), die Modifikation der Substrate durch Phosphorylierung, die Substraterkennung über Hilfsproteine und viele weitere (Review [88]). Da im Falle eines NO-induzierten Abbaus die Halbwertszeit von Proteinen verändert wird, ist davon auszugehen, dass die betroffenen Proteine irgendwie für einen beschleunigten Abbau markiert werden müssen, d. h. NO muss eine Aktion auslösen, welche diese Proteine destabilisiert. Es sind hierbei zwei mögliche Wege der Substratmarkierung denkbar. NO ist in der Lage, zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege direkt zu aktivieren, die Bildung von cGMP über die sGC sowie die Aktivierung von Ras-Proteinen (s. 1.5.3). Im Laufe dieser Signaltransduktionsprozesse werden u. a. Kinasen aktiviert, z. B. die PKG und die PI3K, welche eine Phosphorylierung von Substraten ausführen könnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit des NO-induzierten IDO-Abbaus von einem Signaltransduktionsprozess nicht untersucht, aber ein hier erhobener Befund spricht gegen eine solche Abhängigkeit: die Höhe der für den Effekt notwendigen NO-Konzentration. Beide NO-abhängigen Wege der Signaltransduktion sind mit geringen NO-Konzentrationen aktivierbar. So konnte bei den Arbeiten von Deora *et al.* eine Aktivierung von Ras in der humanen T-Zelllinie Jurkat bereits mit 30-100µM SNAP erreicht werden [149,150], und die sGC wird *in vitro* bereits durch nanomolare NO-Konzentrationen aktiviert (Review [81]). Im Gegensatz dazu fand der NO-induzierte Abbau des IDO-Proteins nur in Zellen mit einer hohen NO-Produktionsrate (den RT4-Zellen) statt, nicht aber in den A549-Zellen (Abb. 10). Außerdem waren für eine Induktion des Abbaus durch exogenes NO hohe Konzentrationen der NO-Donoren (750µM) notwendig. Diese Befunde machen eine Signaltransduktion als ausführenden Mechanismus unwahrscheinlich.

Die zweite Möglichkeit ist eine direkte Modifikation der betroffenen Proteine durch NO. Zwei Arten der NO-basierten Modifikation von Aminosäuren sind bekannt: die S-Nitrosierung von Cystein und die Nitrierung von Tyrosin. Die Bildung von 3-

Nitrotyrosin kann *in vitro* durch mehrere chemische Reaktionen erfolgen (Review [71]). Der Nachweis von nitrierten Tyrosinresten in zellulären Proteinen wurde bisher nur als ein Marker für nitrosativen Stress betrachtet (s. 1.4.6). Jüngste Untersuchungen zeigen jedoch die ersten Hinweise auf eine Regulation von Proteinfunktionen durch Tyrosin-Nitrierung: Lanone *et al.* konnten eine Inhibition von rekombinantem iNOS-Protein durch diese Modifikation *in vitro* zeigen [151]. Bebok *et al.* konnten bei den Untersuchungen zum NO-induzierten Abbau des CFTR eine Nitrierung dieses Proteins nachweisen, aber ein Zusammenhang mit der beschleunigten Degradation wurde dabei nicht hergestellt. Insgesamt liegen zum heutigen Zeitpunkt zu wenig Daten über die Auswirkungen einer Tyrosin-Nitrierung vor, um verlässliche Aussagen über einen Zusammenhang mit zellulären Effekten machen zu können.

Im Gegensatz zur Tyrosin-Nitrierung ist die S-Nitrosierung von reduziertem Cystein (s. 1.5.1) eine Modifikation, deren Auswirkung auf die Funktion von Proteinen in Einzelfällen bereits gut dokumentiert ist. Sie kann sowohl aktivierend als auch inhibierend auf ein Protein wirken, wie die bereits geschilderten Beispiele der Transkriptionsfaktoren zeigen (4.5). Weitere gut untersuchte Fälle sind die Aktivierung des Ryanodin-Rezeptors, eines Kalziumkanals im sarcoplasmatischen Retikulum von Muskelzellen, durch die S-Nitrosierung eines einzelnen Cysteins pro Untereinheit [152,153], die Inhibition des NMDA-Rezeptor-gekoppelten Ionenkanals im zentralen Nervensystem [154] und auch die Aktivierung von Ras-Proteinen [83]. In allen untersuchten Fällen findet dabei eine spezifische S-Nitrosierung eines einzigen Cysteins statt. Anhand der bekannten Fälle wurden allgemeine Regeln für die Begünstigung einer S-Nitrosierung an bestimmten Positionen innerhalb eines Proteins abgeleitet. Diese Regeln besagen, dass die Anwesenheit von sauren und basischen Aminosäuren in der direkten Nachbarschaft eines Cysteins sowie eine hydrophobe Umgebung eine S-Nitrosierung begünstigen [155]. Leider sind diese Motive nicht immer aus der Primärsequenz der Proteine ersichtlich, sondern können durch die tertiäre Struktur der Proteine entstehen. Das IDO-Protein enthält 8 Cysteinreste, von denen aber laut der Primärsequenz keines zwischen einer sauren und einer basischen Aminosäure positioniert ist (NCBI Accession-Nr. AAA36081, Proteinsequenz abgeleitet aus der mRNA mit Accession-Nr. M34455). Auch müssten diese Cysteine, um für eine S-Nitrosierung in Frage zu kommen, in reduziertem Zustand vorliegen, aber ob das IDO-Protein bei nativer Konformation Disulfidbrücken

ausbildet ist bisher nicht bekannt. Diese Tatsachen schließen jedoch die Möglichkeit einer S-Nitrosierung der IDO durch NO nicht aus, weil, wie schon erwähnt, die Voraussetzungen dafür auch durch die Faltung des Proteins entstehen können. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten, die einen klaren NO-basierten Effekt auf bereits gebildetes IDO-Protein zeigen (Abb. 18, 19) und aufgrund der Tatsache, dass die Beteiligung einer Signaltransduktion an der Ausführung dieses Effektes wegen der benötigten hohen NO-Konzentration relativ unwahrscheinlich ist, kann die S-Nitrosierung sogar als wahrscheinlichster Kandidat für den Mechanismus gelten, welcher die IDO für den beschleunigten Abbau markiert.

4.9 Situation *in vivo*

Epithelien sind die erste Barriere, die ein aus der Außenwelt kommender Erreger zu überwinden hat. Wenn diese Zellen eine starke IDO-Aktivität besitzen, können sie mittels einer Tryptophan-Verarmung im infizierten Gewebe eine Vermehrung des Erregers und damit eine systemische Infektion verhindern. Im Falle einer gleichzeitigen NO-Produktion in diesen Zellen oder in benachbarten Zellen wäre dieser Schutzmechanismus jedoch nicht mehr wirksam.

Überlegungen zur Rolle der Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Mechanismen *in vivo* müssen spekulativ bleiben, aber es gibt einige durchaus sinnvolle Denkansätze. Bezogen auf die Situation einer Infektion wäre eine gleichzeitige Induktion der IDO und der iNOS zum Nachteil des Organismus, weil der schützende Effekt der Tryptophan-Depletion durch das produzierte NO aufgehoben werden würde. Eine lang andauernde Tryptophan-Verarmung in einem Gewebe würde auf Dauer außerdem die körpereigenen Zellen schädigen, da Tryptophan eine essentielle Aminosäure ist und nicht selbst synthetisiert werden kann. Die Induktion der Tryptophanyl-tRNA-Synthetase durch IFN γ [156] wird als ein kurzzeitig wirksamer Schutz der Zellen vor dem Hungertod durch Tryptophanmangel interpretiert. Wenn nach einem IFN γ -Stimulus möglichst viel des verfügbaren Tryptophans an tRNA gebunden wird, kann möglicherweise ein intrazelluläres Reservoir dieser Aminosäure angelegt werden, das nicht mehr dem Abbau durch die IDO zugänglich ist und auch von keinem tryptophanabhängigen Erreger verwendet werden kann.

Eine verzögert einsetzende NO-Produktion könnte neben der Bindung von Tryptophan an die entsprechende tRNA ein weiterer Schutz vor einer zellschädigenden Auswirkung der IDO-Aktivität sein. Der Mechanismus der Tryptophan-Verarmung wird als eine Art „erste Verteidigungslinie“ angesehen, welche die Vermehrung eines eindringenden Erregers so lange hemmt, bis Immunzellen in das infizierte Gewebe eingedrungen sind und das Pathogen effektiv bekämpfen können (Review [157]). Diese Immunzellen könnten auch eine Veränderung der Zytokinumgebung am Infektionsort mit einer nachfolgenden Aktivierung der iNOS bewirken, welche dann die IDO inhibiert und so die Zellen vor den möglichen Schäden durch einen langfristigen Tryptophanmangel bewahrt. Bei Zellen wie den A549, die selbst nicht genug NO produzieren, um die Aktivität und die Expression der IDO zu regulieren und bei denen eine veränderte Zytokinumgebung zu einer noch stärkeren IDO-Aktivität führen kann, könnten benachbarte Zellen im gleichen Gewebe die Rolle des „NO-Donors“ übernehmen.

Abschließend sei noch erwähnt, dass die Interaktion zwischen der IDO und NO keine einseitige Regulation darstellt. So wie NO die IDO inhibiert, so können einige Tryptophan-Metabolite die Expression der iNOS regulieren. Picolinsäure verstärkt *in vitro* die iNOS-Aktivität in murinen Makrophagen [139], während 3-Hydroxyanthranilat die Expression der iNOS in diesen Zellen inhibieren kann [158]. Die einzigen bisher bekannten Produzenten dieser Metabolite sind Monozyten und Mikroglia, also Zellen, die bei der Erregerabwehr in der Peripherie bzw. im ZNS eine wichtige Rolle spielen (Review [157]). Es ist nicht genau bekannt, ob die für diese Effekte notwendigen Konzentrationen der Metabolite *in vivo* erreicht werden, dennoch bestätigen diese Daten die Komplexität der Interaktion zwischen der Tryptophan-Depletion und der NO-Produktion.

Von dieser Interaktion waren bisher nur die Aspekte der IDO-Inhibition durch NO und die Beeinflussung der iNOS-Expression durch Tryptophan-Metabolite *in vitro* bekannt. Die vorliegende Arbeit konnte durch die Untersuchungen zu den zelltyp-spezifischen Ausprägungen der Zytokineffekte bezüglich der IDO-Expression und die erstmalige Beschreibung der NO-induzierten Degradation des IDO-Proteins einen Beitrag dazu leisten, diese gegenseitige Regulation zweier bedeutender zellulärer Mechanismen besser zu verstehen.

5 Referenzen

1. Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M.: *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1998.
2. Janeway C.A. und Travers P.: *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1997.
3. Wheelock E.F.: Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 1965; 149: 310-1.
4. Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J.C.: Cellular responses to interferon- γ . *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 749-95.
5. Bach E.A., Aguet M., Schreiber R.D.: The IFN γ receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 563-91.
6. Valente G., Ozmen L., Novelli F., Geuna M., Palestro G., Forni G., Garotta G.: Distribution of interferon- γ receptor in human tissues. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2403-12.
7. Imada K. und Leonard W.J.: The Jak-STAT pathway. *Mol Immunol* 2000; 37: 1-11.
8. Leonard W.J. und O'Shea J.J.: Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 293-322.
9. Nguyen H., Hiscott J., Pitha P.M.: The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1997; 8: 293-312.
10. Durum S.K. und Oppenheim J.J.: Macrophage-derived mediators: interleukin 1, tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon, and related cytokines. In: *Fundamental Immunology*, Paul W.E. (Ed). 2. Raven Press Ltd., 1989: 639-661.
11. Auron P.E.: The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 1998; 9: 221-37.
12. Bodmer J.-L., Schneider P., Tschopp J.: The molecular architecture of the TNF superfamily. *TIBS* 2002; 27: 19-26.
13. Chen G. und Goeddel D.V.: TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296: 1634-5.
14. Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F.: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 3203-7.

15. Furchgott R.F. und Zawadzki J.V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288: 373-6.
16. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 9265-9.
17. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.: Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
18. Stuehr D.J., Kwon N.S., Nathan C.F., Griffith O.W., Feldman P.L., Wiseman J.: N^o-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 1991; 266: 6259-63.
19. Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C.J., Reed R.R., Snyder S.H.: Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351: 714-8.
20. Stryer L.: *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996.
21. Förstermann U., Boissel J.-P., Kleinert H.: Expressional control of the "constitutive" isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J* 1998; 12: 773-90.
22. Garcia-Cardena G., Oh P., Liu J., Schnitzer J.E., Sessa W.C.: Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6448-53.
23. Kleinert H., Wallerath T., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I., Li H., Förstermann U.: Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension* 1998; 31: 582-8.
24. Yoshizumi M., Perrella M.A., Burnett J.C., Jr., Lee M.E.: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res* 1993; 73: 205-9.
25. Werner-Felmayer G., Werner E.R., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Schmidt K., Weiss G., Wachter H.: Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP. *J Biol Chem* 1993; 268: 1842-6.
26. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B., Hermann C., Busse R., Zeiher A.M.: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399: 601-5.
27. Garcia-Cardena G., Fan R., Shah V., Sorrentino R., Cirino g., Papapetropoulos A., Sessa W.C.: Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998; 392: 821-4.

28. Bult H., Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Jordaens F.H., Van Maercke Y.M., Herman A.G.: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 1990; 345: 346-7.
29. Nakane M., Schmidt H.H., Pollock J.S., Förstermann U., Murad F.: Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316: 175-80.
30. Schuman E.M. und Madison D.V.: A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* 1991; 254: 1503-6.
31. Burnett A.L., Lowenstein C.J., Brecht D.S., Chang T.S., Snyder S.H.: Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science* 1992; 257: 401-3.
32. Digicaylioglu M. und Lipton S.A.: Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- κ B signalling cascades. *Nature* 2001; 412: 641-01.
33. Lipton S.A., Choi Y.-B., Pan Z.-H., Lei S.Z., Chen H.-S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J., Stamler J.S.: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626-32.
34. Christopherson K.S., Hillier B.J., Lim W.A., Brecht D.S.: PSD-95 assembles a ternary complex with the N-methyl-D-aspartic acid receptor and a bivalent neuronal NO synthase PDZ domain. *J Biol Chem* 1999; 274: 27467-73.
35. Abu-Soud H.M., Wang J., Rousseau D.L., Fukuto J.M., Ignarro L.J., Stuehr D.J.: Neuronal nitric oxide synthase self-inactivates by forming a ferrous-nitrosyl complex during aerobic catalysis. *J Biol Chem* 1995; 270: 22997-3006.
36. Hurshman A.R. und Marletta M.A.: Nitric oxide complexes of inducible nitric oxide synthase: spectral characterization and effect on catalytic activity. *Biochemistry* 1995; 34: 5627-34.
37. Komeima K., Hayashi Y., Naito Y., Watanabe Y.: Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha through Ser847 phosphorylation in NG108-NG115 neuronal cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 28139-43.
38. Lowenstein C.J., Glatt C.S., Brecht D.S., Snyder S.H.: Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6711-5.
39. Lyons C.R., Orloff G.J., Cunningham J.M.: Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1992; 267: 6370-4.
40. Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C.: Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-8.

41. Nunokawa Y., Ishida N., Tanaka S.: Cloning of inducible nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191: 89-94.
42. Charles I.G., Palmer R.M., Hickery M.S., Bayliss M.T., Chubb A.P., Hall V.S., Moss D.W., Moncada S.: Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11419-23.
43. Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Wang S.C., Nakayama D.K., Simmons R.L., Snyder S.H., Billiar T.R.: Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3491-5.
44. Cho H.J., Xie Q.W., Calaycay J., Mumford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Nathan C.: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992; 176: 599-604.
45. Ratovitski E.A., Alam M.R., Quick R.A., McMillan A., Bao C., Kozlovsky C., Hand T.A., Johnson R.C., Mains R.E., Eipper B.A., Lowenstein C.J.: Kalirin inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1999; 274: 993-9.
46. Musial A. und Eissa N.T.: Inducible nitric-oxide synthase is regulated by the proteasome degradation pathway. *J Biol Chem* 2001; 276: 24268-73.
47. Felley-Bosco E., Bender F.C., Courjault-Gautier F., Bron C., Quest A.F.G.: Caveolin-1 down-regulates inducible nitric oxide synthase via the proteasome pathway in human colon carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14334-9.
48. Guo F.H., Uetani K., Haque S.J., Williams B.R., Dweik R.A., Thunnissen F.B., Calhoun W., Erzurum S.C.: Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest* 1997; 100: 829-38.
49. Mannick J.B., Asano K., Izumi K., Kieff E., Stamler J.S.: Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994; 79: 1137-46.
50. Xie Q.W., Whisnant R., Nathan C.: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med* 1993; 177: 1779-84.
51. Lowenstein C.J., Alley E.W., Raval P., Snowman A.M., Snyder S.H., Russell S.W., Murphy W.J.: Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 9730-4.
52. Xie Q.W., Kashiwabara Y., Nathan C.: Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1994; 269: 4705-8.

53. Martin E., Nathan C., Xie Q.W.: Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1994; 180: 977-84.
54. Kamijo R., Harada H., Matsuyama T., Bosland M., Gerecitano J., Shapiro D., Le J., Koh S.I., Kimura T., Green S.J., .: Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. *Science* 1994; 263: 1612-5.
55. Gao J., Morrison D.C., Parmely T.J., Russell S.W., Murphy W.J.: An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1997; 272: 1226-30.
56. de Vera M.E., Shapiro R.A., Nussler A.K., Mudgett J.S., Simmons R.L., Morris S.M., Jr., Billiar T.R., Geller D.A.: Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1054-9.
57. Hibbs J.B.Jr., Vavrin Z., Taintor R.R.: L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol* 1987; 138: 550-65.
58. Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M.: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 87-94.
59. Liew F.Y. und Cox F.E.G.: Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunology today* 1991; 12: 17-21.
60. Gazzinelli R.T., Oswald I.P., James S.L., Sher A.: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- gamma-activated macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 1792-6.
61. Vouldoukis I., Becherel P.A., Riveros-Moreno V., Arock M., da Silva O., Debre P., Mazier D., Mossalayi M.D.: Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. *Eur J Immunol* 1997; 27: 860-5.
62. Ding A.H., Nathan C.F., Stuehr D.J.: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988; 141: 2407-12.
63. Liew F.Y., Li Y., Severn A., Millott S., Schmidt J., Salter M., Moncada S.: A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2489-94.
64. Kolb J.P., Paul-Eugene N., Damais C., Yamaoka K., Drapier J.C., Dugas B.: Interleukin-4 stimulates cGMP production by IFN-gamma-activated human monocytes. Involvement of the nitric oxide synthase pathway. *J Biol Chem* 1994; 269: 9811-6.

65. Perretti M., Szabo C., Thiernemann C.: Effect of interleukin-4 and interleukin-10 on leucocyte migration and nitric oxide production in the mouse. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 2251-7.
66. Vodovotz Y., Bogdan C., Paik J., Xie Q.W., Nathan C.: Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1993; 178: 605-13.
67. Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I., Förstermann U.: In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* 1996; 271: 6039-44.
68. Ganster R.W., Taylor B.S., Shao L., Geller D.A.: Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by STAT1 and NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 8638-43.
69. Hibbs J.B., Jr., Westenfelder C., Taintor R., Vavrin Z., Kablitz C., Baranowski R.L., Ward J.H., Menlove R.L., McMurry M.P., Kushner J.P., .: Evidence for cytokine-inducible nitric oxide synthesis from L-arginine in patients receiving interleukin-2 therapy. *J Clin Invest* 1992; 89: 867-77.
70. Ochoa J.B., Udekwu A.O., Billiar T.R., Curran R.D., Cerra F.B., Simmons R.L., Peitzman A.B.: Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; 214: 621-6.
71. Kröncke K.-D., Suschek C.V., Kolb-Bachofen V.: Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antiox Redox Signal* 2000; 2: 585-605.
72. Laurent M., Lepoivre M., Tenu J.-P.: Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated *in vitro* by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem J* 1996; 314: 109-13.
73. Bonner F.T. und Stedman G.: The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, Feelisch M. und Stamler J.S. (Eds). John Wiley & Sons Ltd., 1996: 3-18.
74. Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M., Rogers N.E., Byrns R.E.: Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8103-7.
75. Beckman J.S. und Koppenol W.H.: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C1424-C1437.
76. Gaston B.: Nitric oxide and thiol groups. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 323-33.
77. Liu X., Miller M.J., Joshi M.S., Thomas D.D., Lancaster J.R.: Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2175-9.

78. Lancaster J.R.: A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997; 1: 18-30.
79. Stamler J.S., Lamas S., Fang F.C.: Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 2001; 106: 675-83.
80. Zabel U., Kleinschnitz C., Oh P., Nedvetsky P., Smolenski A., Müller H., Kronich P., Kugler P., Walter U., Schnitzer J.E., Schmidt H.H.H.W.: Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 307-11.
81. Denninger J.W. und Marletta M.A.: Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 334-50.
82. Takai Y., Sasaki T., Matozaki T.: Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 2001; 81: 153-95.
83. Lander H.M., Ogiste J.S., Pearce S.F.A., Levi R., Novogrodsky A.: Nitric oxide-stimulated guanine nucleotide exchange on p21^{ras}. *J Biol Chem* 1995; 270: 7017-20.
84. Chang L. und Karin M.: Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001; 410: 37-40.
85. Cantley L.C.: The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002; 296: 1655-7.
86. Cuervo A.M. und Dice J.F.: Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med* 1998; 76: 6-12.
87. Knop M., Schiffer H.H., Rupp S., Wolf D.H.: Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 990-6.
88. Glickman M.H. und Ciechanover A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 2002; 82: 373-428.
89. Hochstrasser M.: Protein degradation or regulation: up the judge. *Cell* 1996; 84: 813-5.
90. Jackson P.K., Eldridge A.G., Freed E., Furstenthal L., Hsu J.Y., Kaiser B.K., Reimann J.D.R.: The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 429-39.
91. Stone T.W.: Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 309-69.
92. Taylor M.W. und Feng G.: Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan catabolism. *FASEB Journal* 1991; 5: 2516-22.

93. Shimizu T., Nomiyama S., Hirata F., Hayaishi O.: Indoleamine 2,3-dioxygenase: Purification and some properties. *J Biol Chem* 1978; 254: 4700-6.
94. Hayaishi O., Hirata F., Ohnishi T., Henry J.-P., Rosenthal I., Katoh A.: Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Incorporation of $^{18}\text{O}_2^-$ and $^{18}\text{O}_2$ into the reaction products. *J Biol Chem* 1977; 252: 3548-50.
95. Ohnishi T., Hirata F., Hayaishi O.: Indoleamine 2,3-Dioxygenase: Potassium superoxide as substrate. *J Biol Chem* 1977; 252: 4643-7.
96. Terentis A.C., Thomas S.R., Takikawa O., Littlejohn T.K., Truscott R.J.W., Armstrong R.S., Yeh S.-R., Stocker R.: The heme environment of recombinant human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 2002; 277: 15788-94.
97. Burkin D.J., Kimbro K.S., Barr B.L., Jones C., Taylor M.W., Gupta S.L.: Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics* 1993; 17: 262-3.
98. Kadoya A., Tone S., Maeda H., Minatogawa Y., Kido R.: Gene structure of human Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 530-6.
99. Tone S., Takikawa O., Habara-Ohkubo A., Kadoya A., Yoshida R., Kido R.: Primary structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase deduced from the nucleotide sequence of its cDNA. *Nucleic Acids Res* 1989; 18: 367.
100. Kawamichi H. und Suzuki T.: The cDNA-derived amino acid sequence of indoleamine dioxygenase like- myoglobin from the gastropod mollusc *Omphalius pfeifferi*. *J Protein Chem* 1998; 17: 651-6.
101. Suzuki T., Kawamichi H., Imai K.: Amino acid sequence, spectral, oxygen-binding, and autoxidation properties of indoleamine dioxygenase-like myoglobin from the gastropod mollusc *Turbo cornutus*. *J Protein Chem* 1998; 17: 817-26.
102. Dai W. und Gupta S.L.: Regulation of Indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon- γ . *J Biol Chem* 1990; 265: 19871-7.
103. Hassanain H.H., Chon S.Y., Gupta S.L.: Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons- γ and - α . *J Biol Chem* 1993; 268: 5077-84.
104. Konan K.V. und Taylor M.W.: Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 19140-5.
105. Hissong B.D. und Carlin J.M.: Potentiation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1. *J Interferon Cytokine Res* 1997; 17: 387-93.

106. Currier A.R., Ziegler M.H., Riley M.M., Babcock T.A., Telbis V.P., Carlin J.M.: Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon- induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 369-76.
107. Meyer K.C., Cornwell R., Carlin J.M., Powers C., Irizarry A., Byrne G.I., Borden E.C.: Effects of interferons beta or gamma on neopterin biosynthesis and tryptophan degradation by human alveolar macrophages in vitro: synergy with lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 6: 639-46.
108. Musso T., Gusella G.L., Brooks A., Longo D.L., Varesio L.: Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 1994; 83: 1408-11.
109. Chaves A.C.L., Ceravolo I.P., Gomes J.A.S., Zani C.L., Romanha A.J., Gazzinelli R.T.: IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN- γ . *Eur J Immunol* 2001; 31: 333-44.
110. Pfefferkorn E.R.: 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* 1984; 81: 908-12.
111. Pfefferkorn E.R., Eckel M., Rebhun S.: Interferon- γ suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 20: 215-24.
112. Murray H.W., Szuro-Sudol A., Wellner D., Oca M.J., Granger A.M., Libby D.M., Rothermel C.D., Rubin B.Y.: Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun* 1989; 57: 845-9.
113. Däubener W., Remscheid C., Nockemann S., Pilz K., Seghrouchni S., Mackenzie C., Hadding U.: Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 1996; 26: 487-92.
114. Däubener W., Pilz K., Seghrouchni S., Bilzer T., Fischer H.-G., Hadding U.: Induction of toxoplasmostasis in a human glioblastoma by interferon γ . *J Neuroimmunol* 1993; 43: 31-8.
115. Byrne G.I., Lehmann L.K., Landry G.J.: Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma interferon mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun* 1986; 53: 347-51.
116. Däubener W., Hucke C., Seidel K., Hadding U., MacKenzie C.R.: Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infect Immun* 1999; 67: 5615-20.
117. MacKenzie C.R., Hadding U., Däubener W.: Interferon- γ -induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived

- macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis* 1998; 178: 875-8.
118. Rubin B.Y., Anderson S.L., Xing L., Powell R.J., Tate W.P.: Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 24245-8.
 119. Flohr T., Bange F.C., von Euch A., Kiekenbeck M., Bottger E.C.: Depletion of tryptophan is not involved in expression of tryptophanyl-tRNA synthetase mediated by interferon. *Infect Immun* 1992; 60: 4418-21.
 120. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshall B., Brown C., Mellor A.L.: Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191-3.
 121. Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L.: Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999; 189: 1363-72.
 122. Mellor A.L., Keskin D.B., Johnson T., Chandler P., Munn D.H.: Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 2002; 168: 3771-6.
 123. Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B.: Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 2002; 196: 459-68.
 124. Terness P., Bauer T.M., Röse L., Dufter C., Watzlik A., Simon H., Opelz G.: Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 2002; 196: 447-57.
 125. Thomas S.R., Mohr D., Stocker R.: Nitric oxide inhibits Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in Interferon- γ -primed mononuclear phagocytes. *J Biol Chem* 1994; 269: 14457-64.
 126. Däubener W., Posdziech V., Hadding U., MacKenzie C.R.: Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol* 1999; 187: 143-7.
 127. Bilzer T., Stavrou D., Dahme E., Keiditsch E., Bürrig K.F., Anzil A.P., Wechsler W.: Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1991; 418: 281-93.
 128. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
 129. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.

130. Däubener W., Wanagat N., Pilz K., Seghrouchni S., Fischer H.-G., Hadding U.: A new, simple bioassay for human IFN- γ . *J Immunol Methods* 1994; 168: 39-47.
131. Feng G.S. und Taylor M.W.: Interferon gamma-resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7144-8.
132. Schmidt H.H.H.W. und Kelm M.: Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, Feelisch M. und Stamler J.S. (Eds). John Wiley & Sons Ltd, 1996: 491-497.
133. Feelisch M. und Stamler J.S.: Donors of nitrogen oxides. In: *Methods in Nitric Oxide Research*, Feelisch M. und Stamler J.S. (Eds). John Wiley & Sons Ltd, 1996: 71-115.
134. Keefer L.K., Nims R.W., Davies K.M., Wink D.A.: "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol* 1996; 268: 281-93.
135. Kröncke K.-D. und Kolb-Bachofen V.: Detection of nitric oxide interaction with zinc finger proteins. *Methods Enzymol* 1996; 269: 279-84.
136. Yoshimori T., Yamamoto A., Moriyama Y., Futai M., Tashiro Y.: Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem* 1991; 266: 17707-12.
137. Lee D.H. und Goldberg A.L.: Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 397-403.
138. Rivett A.J., Savory P.J., Djaballah H.: Multicatalytic endopeptidase complex: proteasome. *Methods Enzymol* 1994; 244: 331-50.
139. Alberati-Giani D., Malherbe P., Ricciardi-Castagnoli P., Köhler C., Denis-Donini S., Cesura A.M.: Differential regulation of Indoleamine-2,3-dioxygenase expression by nitric oxide and inflammatory mediators in IFN- γ -activated murine macrophages and microglial cells. *J Immunol* 1997; 159: 419-26.
140. Cooper C.E.: Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 290-309.
141. Marshall H.E., Merchant K., Stamler J.S.: Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J* 2000; 14: 1889-900.
142. Hausladen A., Privalle C.T., Keng T., DeAngelo J., Stamler J.S.: Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 1996; 86: 719-29.
143. Marshall H.E. und Stamler J.S.: Inhibition of NF- κ B by S-nitrosylation. *Biochemistry* 2001; 40: 1688-93.

144. Kröncke K.-D. und Carlberg C.: Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene-regulatory role of nitric oxide. *FASEB J* 2000; 13: 166-73.
145. Kim S. und Ponka P.: Control of transferrin receptor expression via nitric oxide-mediated modulation of iron-regulatory protein 2. *J Biol Chem* 1999; 274: 33035-42.
146. Kim S. und Ponka P.: Effects of interferon- γ and lipopolysaccharide on macrophage iron metabolism are mediated by nitric oxide-induced degradation of iron regulatory protein 2. *J Biol Chem* 2000; 275: 6220-6.
147. Bebok Z., Varga K., Hicks J.K., Venglarik C.J., Kovacs T., Chen L., Hardiman K.M., Collawn J.F., Sorscher E.J., Matalon S.: Reactive oxygen nitrogen species decrease cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and cAMP-mediated Cl⁻ secretion in airway epithelia. *J Biol Chem* 2002; 277: 43041-9.
148. Franzen R., Fabbro D., Aschrafi A., Pfeilschifter J., Huwiler A.: Nitric oxide induces degradation of the neutral ceramidase in rat renal mesangial cells and is counterregulated by protein kinase C. *J Biol Chem* 2002; 277: 46184-90.
149. Deora A.A., Win T., Vanhaesebroeck B., Lander H.M.: A redox-triggered Ras-effector interaction: recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to Ras by redox stress. *J Biol Chem* 1998; 273: 29923-8.
150. Deora A.A., Hajjar D.P., Lander H.M.: Recruitment and activation of Raf-1 kinase by nitric oxide-activated Ras. *Biochemistry* 2000; 39: 9901-8.
151. Lanone S., Manivet P., Callebert J., Launay J.-M., Payen D., Aubier M., Boczkowski J., Mebazaa A.: Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem J* 2002; 366: 399-404.
152. Sun J., Xin C., Eu J.P., Stamler J.S., Meissner G.: Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 11158-62.
153. Xu L., Eu J.P., Meissner G., Stamler J.S.: Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 1998; 279: 234-7.
154. Choi Y.-B., Tenneti L., Le D.A., Ortiz J., Bai G., Chen H.-S.V., Lipton S.A.: Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 2000; 3: 15-21.
155. Hess D.T., Matsumoto A., Nudelman R., Stamler J.S.: S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E1-E3.
156. Rubin B.Y., Anderson S.L., Xing L., Powell R.J., Tate W.P.: Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1991; 266: 24245-8.

157. Thomas S.R. und Stocker R.: Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep* 1999; 4: 199-220.
158. Sekkai D., Guittet O., Lemaire G., Tenu J.-P., Lepoivre M.: Inhibition of nitric oxide synthase expression and activity in macrophages by 3-hydroxyanthranilic acid, a tryptophan metabolite. *Arch Biochem Biophys* 1997; 340: 117-23.

6 Abkürzungsverzeichnis

ActD	Actinomycin D
AMC	7-Amino-4-methylcoumarin
AMT	2-Amino-5,6-dihydro-6-methyl-4H-1,3-thiazin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BA ₁	Bafilomycin A ₁
BH ₄	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CaM	Calmodulin
CaM-Kinase	Calmodulin-abhängige Kinase
CD	Cluster of Differentiation
cfu	colony forming units
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cDNA	copy DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHX	Cycloheximid
clasto	<i>clasto</i> -Lactacystin β-lacton
CQ	Chloroquin
d(A, C, G, T)TP	2'-Desoxyadenosin-, 2'-Desoxycytidin- 2'-Desoxyguanosin- 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

FCS	Fötale Kälberserum
FMN	Flavin Mononukleotid
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GAS	„gamma activated site“
GSCN	Guanidinthiocyanat
GSNO	S-Nitroso-L-glutathion
h	Stunde
³ H	Tritium
HRP	Meerrettich Peroxidase
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN α	Interferon alpha
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 beta
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IP	Immunpräzipitation
IRF-1	Interferon regulatory factor 1
ISRE	„Interferon stimulated response element“
Jak	Janus-Kinase
kb	Kilobasen(paare)
kD	Kilo-Dalton
L-Arg	L-Arginin
L-Cys	L-Cystein
L-Met	L-Methionin
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
M	molar
μ Ci	Mikrocurie
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mA	Milliampere

MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	2-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NAD	β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	β -Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nuclear Factor κ B
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NONOate	Diazeniumdiolate
NOS	NO-Synthase(n)
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSI	Proteasom-Inhibitor I
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute
RSNO	S-Nitroso-Verbindung
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche Guanylatcyclase
sec	Sekunde
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
SNOC	S-Nitroso-L-Cystein
sog.	so genannte, -r, -s
STAT	Signal transducer and activator of transcription

TCA	Trichloressigsäure
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
u. a.	unter anderem
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
z. B.	zum Beispiel

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener für die Betreuung der Arbeit und die Überlassung des Themas.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rolf Wagner danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich Heine-Universität.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Däubener möchte ich dafür danken, dass ich die letzten drei Jahre in einem sehr guten Arbeitsklima mit viel Witz und Humor verbringen konnte.

Weiterhin danke ich auch den anderen Mitarbeitern am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie für die gute Zusammenarbeit und den einen oder anderen guten Rat.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Klaus-Dietrich Kröncke von der Arbeitsgruppe Immunbiologie für die Bereitstellung von NO-Donoren, stete Bereitschaft zur Diskussion und eine vollkommen unkomplizierte Zusammenarbeit.

Ausdrücklich danken möchte ich auch allen Personen außerhalb des Instituts, die in den vergangenen Jahren in guten und in schlechten Zeiten stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

8 Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 6.1.2003