

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. U. Hadding

**Hemmung des Wachstums extrazellulärer Bakterien durch Induktion der  
Indolamin 2,3-Dioxygenase in IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Dorothee Müller

2002

Als Inauguraldissertation  
gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger  
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Däubener

Korreferent: Prof. Dr. Schrotten

# **INHALTSVERZEICHNIS**

## **I. EINLEITUNG**

- I.1 Die körpereigene Abwehr gegen bakterielle Infektionen**
- I.2 IDO-vermittelte antibakterielle Effekte**
- I.3 Infektionen durch grampositive und gramnegative Bakterien**
- I.4 IDO-Induktion in Glioblastomzellen, Fibroblasten und Harnwegsepithelzellen**
- I.5 Ziel der Arbeit**

## **II. MATERIAL UND METHODEN**

### **II.1 MATERIAL**

- II.1.1 Laborgeräte**
- II.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel**
- II.1.3 Chemikalien**
- II.1.4 Enzyme**
- II.1.5 Puffer und Stammlösungen**
- II.1.6 Medien für Bakterien und Zusätze**
- II.1.7 Bakterien**
- II.1.8 Systeme zur Bakterienidentifizierung**
- II.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze**
- II.1.10 Zellen und Zellkultur**

### **II.2 METHODEN**

- II.2.1 Zellernte und Lebendzellzählung**
- II.2.2 Testsysteme**
  - II.2.2a IDO-Aktivitätsmessung**
  - II.2.2b Messung von Bakterienwachstum (OD-Messung, CFU-Bestimmung)**
  - II.2.2c Bakterienwachstum in Antibiotikaverdünnungsreihen (MHK-Bestimmung)**

## **III. ERGEBNISSE**

- III.1 IDO-vermittelte Effekte gegen grampositive Bakterien**
- III.2. Vergleich der IFN $\gamma$ -vermittelten Wachstumshemmung bei verschiedenen Bakterienstämmen**
- III.3. IDO-vermittelte Effekte gegen gramnegative Bakterien**
- III.4 Antibakterielle Effekte durch Fibroblasten**
- III.5 Antibakterielle Effekte durch uroepitheliale Zellen**
- III.6 Kinetik der IDO-Induktion**

## **IV. DISKUSSION**

**V. LITERATURVERZEICHNIS**

**VI. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

**DANKSAGUNG**

**LEBENS LAUF**

**ZUSAMMENFASSUNG**

# I. Einleitung

Weltweit sind Infektionskrankheiten die häufigste Todesursache der Menschen. Zwar hat das Wissen über ihre Ausbreitung und über die Möglichkeiten, sich vor ihnen zu schützen, welches vor allem im Verlauf der letzten hundert Jahre gewonnen wurde, dazu geführt, dass nicht mehr ganze Völkergruppen durch Seuchen ausgerottet werden, dennoch gehören Infektionen weiterhin zum Alltag.

In dieser Dissertation geht es um bakterielle Infektionen.

Auf welche Weise die körpereigene Abwehr bakterielle Infektionen verhindert, wird im Folgenden kurz vorgestellt.

## I.1 Die körpereigene Abwehr gegen bakterielle Infektionen

Bei der körpereigenen Abwehr unterscheidet man die spezifische von der unspezifischen Abwehr.

Die **unspezifische Abwehr** ist angeboren. Zu ihr gehören das Komplementsystem, Monozyten/Makrophagen und Granulozyten, aber auch Vorrichtungen des Körpers, die es eindringenden Erregern schwer machen zu persistieren. Beispiele dafür sind der niedrige pH-Wert des Magens, die Peristaltik des Darmes und die Bewegung der Zilien des Flimmerepithels der Bronchien, welche eingeatmete Erreger wieder aus dem Körper schafft.

Das Komplementsystem ist ein Kaskadensystem, bei dem mindestens 20 verschiedene Plasmaproteine mitwirken, ein Antigen, z.B. Bakterium, aufzulösen. Dabei gibt es zwei Möglichkeiten. Die eine Möglichkeit ist, dass sich das Komplement direkt an das Bakterium bindet und es auflöst. Dies wird als alternativer Weg bezeichnet. Der klassische Weg ist die Aktivierung des Komplementsystems durch Immunkomplexe, z.B. durch ein mit Antikörpern (s.u.) beladenes Bakterium.

Makrophagen und Granulozyten phagozytieren Bakterien. Sie werden dazu in verschiedener Weise angeregt, z.B. indem sich das Bakterium an eine unspezifische Bindungsstelle anlagert, oder indem ein Antigen-Antikörper-Komplex, bestehend aus z.B. einem mit Immunglobulin beladenem Bakterium, von einem spezifischen Rezeptor erkannt wird, oder sie werden zunächst chemotaktisch angelockt und interagieren dann mit auf der Oberfläche des Bakteriums gebundenen Komplementfragmenten. Auch manche bakterielle Peptide, wie z.B. Peptidoglycan, wirken auf die Phagozyten chemotaktisch. Nach Anlagerung wird das Bakterium ins Zellinnere aufgenommen und dort abgetötet und lysiert. Dabei spielen Enzyme, Wasserstoffsuperoxid und Sauerstoffradikale eine große Rolle.

Die **spezifische Abwehr** wird auch als **adaptives Immunsystem** bezeichnet. Dieses System wird von Lymphozyten aufgebaut. Lymphozyten werden in T- (darunter zytotoxische T-Zellen = CD8-Zellen und T-Helferzellen= CD4-Zellen) und B-Lymphozyten eingeteilt.

Im Knochenmark reifen unzählige verschiedene B-Lymphozyten heran, die je nach Art der Rekombination von den zu Antikörperproduktion bestimmten Genen, unterschiedliche Antikörper, z.B. gegen bakterielle Toxine, produzieren können. Um aktiviert zu werden, zu proliferieren und den Antikörper zu produzieren und zu sezernieren, müssen die B-Lymphozyten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen bekommen und von den Cytokinen der T- Helferzellen stimuliert werden.

Ein Cytokin der T-Helferzellen ist z.B. das IFN $\gamma$ , das in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielt.

Die Sekretion der Cytokine durch die THelferzellen setzt voraus, dass den T-Helferzellen das Antigen durch Monozyten/Makrophagen oder auch B-Lymphozyten präsentiert wurde. Dazu nehmen diese das Antigen durch Endozytose auf, fragmentieren es proteolytisch und präsentieren es an der Zelloberfläche zusammen mit dem sogenannten MHC-II-Komplex (= major histocompatibility complex), oder auch HLA-II-Komplex ( human leucocyte antigen) genannt. Den MHC-II-Komplex/ HLA-II-Komplex besitzen nur die Monozyten/ Makrophagen und die B-Lymphozyten.

Es existiert auch noch ein MHC-I-Komplex, den alle kernhaltigen Zellen besitzen. Wird das Antigen mit diesem präsentiert, werden die zytotoxischen T-Lymphozyten aktiviert, die über viele Mechanismen, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, die antigenträgenden Zellen lysieren bzw. Lymphokine produzieren.

Nach erfolgter Aktivierung der B-Lymphozyten und Sekretion von Antikörpern binden sich die Antikörper an die Antigene und bilden sogenannte Antigen-Antikörperkomplexe. Sind diese löslich, werden sie von Granulozyten aufgenommen und abgebaut. Handelt es sich um größere Strukturen, z.B. einen an ein Bakterium gebundenen Antikörper, werden diese ebenfalls phagozytiert, oder das Komplementsystem wird aktiviert, welches den Antigen-Antikörper-Komplex lysiert.

Mit Impfungen macht man sich die körpereigene Bildung von Antikörpern gegen Bakterientoxine (z.B. Tetanusimpfung und Diphtherieimpfung) oder Zellwandbestandteile (z.B. Pneumokokkenimpfung) von Bakterien zunutze. Dazu werden entgiftete Toxine (Toxoide), abgetötete Bakterien, lebende Bakterien mit abgeschwächter Virulenz ( attenuierte Bakterien) oder gereinigte Proteine oder Polysaccharide von Bakterien injiziert. Der Körper bildet dann auf die oben beschriebene Weise Antikörper gegen das entsprechende

Bakterientoxin oder das Bakterium selber. Dieser Vorgang wird aktive Immunisierung genannt. Der dadurch entstandene Schutz kann teilweise lebenslang anhalten. Wegen großer Antigenvariabilitäten gibt es jedoch nur gegen verhältnismäßig wenige für den Menschen pathogene Bakterien einen Impfstoff.

Bei der passiven Immunisierung werden Antikörper in den Organismus injiziert. Dieser Schutz hält nur kurz an und ist nur für den Krankheitsfall, also therapeutisch und nicht prophylaktisch, geeignet.

## **I.2 IDO-vermittelte antibakterielle Effekte**

Pfefferkorn beobachtete 1984, dass die Stimulation von humanen Fibroblasten mit  $\text{IFN}\gamma$ , ein von humanen CD4- und CD8 T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziertes Zytokin, eine intrazelluläre Vermehrung von Toxoplasmen verhindert. Er konnte zeigen, dass dieser Effekt ganz allein auf einer Verarmung an Tryptophan beruht, da sich die Toxoplasmen durch Supplementation von Tryptophan weiterhin vermehren konnten (Pfefferkorn et al., 1984). Verantwortlich für den Tryptophanabbau, der nach Stimulation der Fibroblasten mit  $\text{IFN}\gamma$  in Gang gesetzt worden war, konnte er das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) machen (Pfefferkorn et al., 1986). Dieses ca. 42kDa schwere Enzym, welches Häm als prosthetische Gruppe enthält, katalysiert die sauerstoffabhängige Spaltung des Pyrrolringes von Indolaminen wie z.B. Tryptophan, Serotonin oder Melatonin (Hirata et al., 1972; Hirata et al., 1974). Es wurde 1963 erstmals isoliert (Higushi et al., 1963) und 1977 beschrieben (Hayashi et al., 1977; Ohnishi et al., 1977). IDO-Aktivität konnte bisher außer in humanen Fibroblasten in vielen jedoch nicht allen daraufhin untersuchten menschlichen Geweben nachgewiesen werden. Darunter waren Monozyten (Carlin et al., 1989), Makrophagen (Murray et al., 1989), Astrozyten (Däubener et al., 1996) und diverse Tumorzelllinien wie z.B. Glioblastomzellen (Däubener et al., 1993), Blasenkarzinomzellen (Byrne et al., 1986), Harnwegsepithel- und Nierenkarzinomzellen und Neuroblastomzellen (Werner-Felmayer et al., 1989). Dabei zeigte sich auch, dass der IDO-bedingte Tryptophanmangel nicht nur Parasitenwachstum hemmt, sondern auch das Wachstum der Tumorzellen einschränkt (Takikawa et al., 1988; Carlin et al., 1989).

Neben *Toxoplasma gondii* konnte auch *Chlamydia psittaci* (Byrne et al., 1986; Carlin et al., 1989; Paguirigan et al., 1994; Shemer et al., 1985; Rothermel et al., 1983), ebenfalls ein obligat intrazellulärer Erreger, durch eine  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion daran gehindert werden, sich zu vermehren. *Chlamydia trachomatis* (De La Maza et al., 1985) und *Rickettsia prowazekii* (Turco et al., 1986) hingegen waren gegen den IDO-Mechanismus resistent.

Dass dieser Mechanismus auch das Wachstum von extrazellulär lebenden Bakterien hemmt, konnte an Streptokokken der Gruppe B (GBS) gezeigt werden ( MacKenzie et al., 1998).

Im Folgenden werden weitere extrazellulär lebende Bakterien vorgestellt, die in dieser Arbeit daraufhin untersucht werden sollten, ob sie ebenfalls durch den durch dieIDO katalysierten Tryptophanabbau beeinflusst werden konnten.

### **1.3 Infektionen durch grampositive und gramnegative Bakterien**

Zunächst sollten grampositive Bakterien untersucht werden. Grampositive Bakterien haben eine Zellwand, die sich in der Gram-Färbung - der wichtigsten Differenzierungsfärbung – blau anfärbt. Gramnegative Bakterien hingegen haben in ihrer Zellwand eine dünnere Mureinschicht und eine zweite Membran; sie werden in der Gram-Färbung rot gefärbt.

Staphylokokken sind grampositive Kokken, die sich in Haufen bzw. Trauben anordnen. Die für den Menschen als Krankheitserreger wichtigsten Arten sind Staphylokokkus aureus, Staphylokokkus epidermidis und Staphylokokkus saprophyticus. Staphylokokkus aureus bildet neben einer Vielzahl von pathogenen Enzymen das Enzym Koagulase, welches Fibrinogen in Fibrin umwandelt. Mit Hilfe dieses Enzyms kann Staphylokokkus aureus bei lokalen Infektionen eine sogenannte Abszessmembran bilden, die den Keim vor einer körpereigenen Abwehr oder Antibiotika schützt. Da bis zu 90% des Krankenhauspersonals von Staphylokokkus aureus besiedelt ist, ist dieser Keim als Erreger nosokomialer Infekte bedeutungsvoll. Besonders gefürchtet sind die sogenannten ORSA. Das sind Staphylokokkus aureus Stämme, die gegen Oxacillin, dem Mittel der Wahl bei Infektionen mit  $\beta$ -Laktamase bildenden Staphylokokken, resistent sind. Bei ORSA-Infektionen bleibt als letzte Therapiemöglichkeit die Gabe von Reserveantibiotika wie Teicoplanin oder Vancomycin, die viele Nebenwirkungen haben und sehr teuer sind.

Staphylokokkus epidermidis gehört mit Staphylokokkus saprophyticus zur Gruppe der koagulase negativen Staphylokokken und spielt eine große Rolle bei sogenannten fremdkörperassoziierten Infekten, da diese Staphylokokken die Fähigkeit haben, sich an der Oberfläche von Fremdkörpern wie z.B. Kathetern, Herzklappen, Prothesen usw. festzusetzen und einen Biofilm auszubilden. Dieser Biofilm bietet den Staphylokokken Schutz gegen Abwehrmechanismen des Körpers, gegen Antibiotika und Chemotherapeutika.

Streptokokken sind unbewegliche, fakultativ anaerobe Kokken, die sich im Gegensatz zu den Staphylokokken in Ketten oder Pärchen anordnen. Man unterscheidet sie anhand



unterschiedlichen Hämolyseverhaltens ihrer Kolonien auf Blutagar und anhand unterschiedlicher Zellwandantigene, sogenannter Lancefield-Antigene.

Unter Alphahämolyse versteht man einen Partialabbau, die sogenannte Vergrünung des Hämoglobins im Blutagar. Die Kolonien sind von einem grünen Hof umgeben. Betahämolyse bezeichnet Abbau der Erythrozyten und des Hämoglobins im Blutagar. Die Kolonien sind von einem großen, durchsichtigen, gelblichen Hof umgeben. Gammahämolyse bezeichnet unsinnigerweise die fehlende Hämolyse.

B-Streptokokken sind  $\beta$ -hämolisierend und tragen das Lancefield-Antigen B. Sie sind eine häufige Ursache für Neugeborenenmeningitiden, da sie die Geburtswege besiedeln und somit intra partum zu einer Infektion führen können.

Experimente mit der Glioblastomzelllinie 86HG39 ergaben, dass eine dreitägige Stimulation der Zellen mit 200U/ml IFN $\gamma$  genügt, um eine Hemmung des Wachstums von Streptokokken der Gruppe B zu erreichen ( Däubener et al., 1993). Hierfür konnte der durch die IDO katalysierte Tryptophanabbau verantwortlich gemacht werden (MacKenzie et al., 1998).

Enterokokken kommen physiologisch im Dickdarm von Säugetieren, Vögeln und Menschen vor. Sie können im Darm überleben, weil sie gegen Galle resistent sind ( H. Hahn, K. Miksits, S. Gatermann). Sie sind wichtige Erreger von Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen, Gallenblasenentzündungen, Endocarditiden sowie nosokomialen Infektionen wie Sepsis und Peritonitis ( Wade, J.J. et al., 1995; Jones, R.N. et al., 1995; Handwerger, S. et al., 1993; Stroud, L. et al., 1996). In dieser Arbeit wurden vor allem Enterokokken untersucht, die gegen Vancomycin, einem ausgesprochenen Reserveantibiotikum, resistent sind. Glykopeptide wie Vancomycin und Teicoplanin sollten nur eingesetzt werden, wenn die Enterokokken gegen Aminopenicilline, Ureidopenicilline und Cotrimoxazol resistent sind. Sind sie auch noch gegen Vancomycin und Teicoplanin resistent, gelten sie als schwer therapierbar. Vancomycinresistente Enterokokken stellen somit Mediziner bisher vor ein großes Problem.

Natürlich sollten auch gramnegative Bakterien auf ihre Hemmbarkeit durch den IDO-bedingten Tryptophanmangel untersucht werden. Als wichtigste Vertreter der untersuchten gramnegativen Bakterien sind hier *Hämophilus influenza*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* zu nennen.

*Hämophilus influenza* ist ein gramnegatives Stäbchen, welches bekapselt sein kann oder nicht. Bedeutungsvoll als Krankheitserreger sind die bekapselten *Hämophili influenzae*, da sie durch die Kapsel vor Phagozytose geschützt werden. Je nach Beschaffenheit der Kapsel werden die Serovare a bis f unterschieden. *Hämophilus influenza* des Serovars b (=Hib)

verursacht z.B. die Epiglottitis im Kindesalter und eine Form der bakteriellen Meningitis, die unbehandelt in fast 100% der Fälle zum Tode führt. Mittlerweile gibt es einen Impfstoff gegen *Hämophilus influenzae* b, der nach den Empfehlungen der Ständigen Impfkommission ab dem 3. Lebensmonat eingesetzt werden sollte.

*Pseudomonas aeruginosa* ist ebenfalls ein gramnegatives Stäbchen. Es verursacht bei Abwehrgeschwächten Infektionen wie Pneumonien, Wundinfekte etc. Bei Mukoviszidosepatienten ist die Kolonialisierung der Lunge durch *Pseudomonas aeruginosa* ein entscheidender Prognosefaktor. Der Keim vermehrt sich leicht in feuchtem Milieu, wie z.B. in Beatmungsmaschinen, so dass er als Erreger nosokomialer Infekte eine beträchtliche Rolle spielt.

Ein häufiger Erreger nosokomialer Infektionen ist auch *Escherichia coli*, dessen natürlicher Lebensraum der Darm von Menschen und Tieren ist. Durch *E. coli* verursachte Infektionen sind Enteritiden, Gallenwegsinfektionen, Wundinfekte und Peritonitiden. Für eine Sepsis kann ebenfalls häufig *E. coli* verantwortlich gemacht werden.

#### **I.4 IDO-Induktion in Glioblastomzellen, Fibroblasten und Harnwegsepithelzellen**

In dieser Arbeit wurden als IDO-exprimierende Zellen Gliazellen, Fibroblasten und uroepitheliale Zellen verwendet.

Gliazellen bilden die sogenannte Neuroglia, das Hüll- und Stützgewebe des ZNS. Die in den Experimenten dieser Arbeit verwendeten Gliazellen entstammen einem humanen Glioblastom, einem besonders schnell wachsendem ZNS-Tumor. Dass diese Zelllinie in der Lage ist, IDO zu exprimieren, konnte schon 1994 gezeigt werden (Däubener et al., 1994).

Fibroblasten sind Vorstufen von Fibrozyten, Zellen des Bindegewebes. Das Bindegewebe dient der Umhüllung und Unterteilung der Organe und bettet die Organe in die Umgebung ein. Bindegewebe und somit Fibroblasten finden sich auch in unserer Haut, was der Grund dafür ist, dass Staphylokokken als typische Hautkeime an Fibroblasten hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch Tryptophanmangel untersucht werden sollten. Fibroblasten sind die ersten Zellen, an denen der antimikrobielle Effekt des IDO-bedingten Tryptophanabbaus beschrieben wurde (Pfefferkorn et al., 1984). Die hier verwendeten Fibroblasten entstammen aus der Vorhaut eines Jungen.

Uroepitheliale Zellen kleiden die ableitenden Harnwege aus; dazu gehören Nierenbecken, Harnleiter, Harnblase und der Anfang der Harnröhre. Die Nähe der Harnröhrenmündung zum After erklärt, warum die meisten Harnwegsinfektionen durch Keime der Darmflora z.B. *Escherichia coli*, Enterokokken, Enterobakterien u.a. verursacht werden, die durch die Harnröhre aufsteigen.

Aus einem uroepithelialen Karzinom entstammt die RT4-Zelllinie, die die Harnwegsepithelzellen dieser Arbeit repräsentieren. Dass diese Zelllinie über den IDO-Mechanismus verfügt, konnte 1998 gezeigt werden.

### **I.5 Ziel der Arbeit**

Nachdem der antimikrobielle Effekt des IDO-bedingten Tryptophanabbaus bei Toxoplasmen, Chlamydien und B-Streptokokken bekannt war, sollten in dieser Arbeit weitere extrazellulär lebende Bakterien auf ihre Hemmbarkeit durch diesen Mechanismus untersucht werden. Besonders multiresistente Bakterien wie oxacillinresistente Staphylokokken und vancomycinresistente Enterokokken waren dabei von Interesse. Wenn bei diesen Bakterien ebenfalls allein durch Tryptophanmangel eine Bakteriostase zu erreichen wäre, wäre die IDO-Induktion durch IFN $\gamma$  bei einer Infektion mit diesen Problemkeimen als mögliche Therapie in Betracht zu ziehen.

Neben dem Bakterienscreening lag der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit auf Kinetikuntersuchungen mit der Glioblastomzelllinie 86HG39. Bei diesen sollten verschiedenste Konzentrationen von IFN $\gamma$  und Stimulationszeiten ausgetestet werden, um zu klären, wie lang die Zellen mit einer bestimmten Konzentration von IFN $\gamma$  stimuliert werden müssen, damit deren IDO-Aktivität antimikrobiell wirksam ist.

## II. Material und Methoden

### II.1 Material

#### II.1.1 Laborgeräte

Brutschrank	Heraeus (Hanau), Incudrive-S
CO <sub>2</sub> -begaster Brutschrank	Heraeus (Hanau), B5060 EK/CO <sub>2</sub>
ELISA-Reader	SLT (Crailsheim), Spectra
Kühlzentrifugen	Heraeus (Osterode), Megafuge 1.0 R
Mikroskop	Zeiss (Köln), Axiovert 100
Pipetten	Hirschmann
Pipettierhilfe	Hirschmann, pipettus-akku
Sterile Werkbank	Clean Air, Biohazard
Zählkammer	Neubauer

#### II.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Einmalspitzen	Polylab
Einmalspritzen	Luer/Dahlhausen (Köln)
Kanülen, versch. Größen	Microlance, Terumo
Multiwellplatten	Costar (Bodenheim)
Microbank	Mast-Diagnostika
Petrischalen	Greiner
Plastikpipetten	Greiner
Sterilfilter	Millipore (Eschborn), Sterivex
Zellkulturflaschen, 25- u. 75cm <sup>2</sup>	Costar (Bodenheim)
Zellschaber	Greiner (Nürtingen)
Zentrifugenröhrchen, Polypropylen	Greiner, 15ml; 50ml

#### II.1.3 Chemikalien

Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco (Grand Island, N.Y.)
Interferon $\gamma$ (IFN $\gamma$ )	Rentschler; Thomae
L-Glutamin	Gibco
P-Dimethylaminobenzaldehyd	Sigma (Deisenhofen)

Essigsäure, 96% Merck (Darmstadt)

#### **II.1.4 Enzyme**

Trypsin/EDTA-Lösung: Seromed ( Berlin)  
0,05/0,02% (w/v)

#### **II.1.5 Puffer und Stammlösungen**

PBS pH 7,3: Serag Wiessner( Naila): 0,8% Natriumchlorid; 0,02%  
Kaliumchlorid;0,025% Kaliumdihydrogenphosphat; 0,135%  
Dinatriumhydrogenphosphat  
Trypanblau: 0,16% Trypanblau; 0,85% Natriumchlorid in A.dest.  
Ehrlich´s Reagenz: p- Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 96% Essigsäure,  
12mg/ml

#### **II.1.6 Medien für Bakterien und Zusätze**

Blutagar Difco ( Hamburg):„brain heart diffusion agar“ mit 5% Schafblut  
Kochblutagar 10g Proteose Pepton; 10g Fleischextrakt; 5g NaCl; 15g Agar;  
1000ml Aqua dest.; 100ml Pferdeblut  
Columbia-Agar + Blut Columbia-Agar 44g/l; Hefeextrakt 3,0g/l; L-Cysteiniumchlorid  
0,1g/l; Natriumpyrovat 0,5g/l; Agar 3,0g/l; Glutamin 0,1g/l;  
Schafblut 100ml ( versetzt mit 0,6g Glucose)  
Müller -Hinton Brühe 3,0g Rindfleischextrakt; 17,5g säurehydrolysiertes Casein,  
1,5g Stärke  
RPMI 1640-Medium: Gibco  
w/o Tryptophan  
Tryptophan Sigma (Deisenhofen)  
Vancomycin 500: Lederle:512,6-520,1mg Trockensubstanz enthält 512,6mg  
Vancomycinhydrochlorid entsprechend 500mg Vancomycin  
Antibiotika Stempel-Pads Becton Dickinson Europe

#### **II.1.7 Bakterien**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterien stammten zum größten Teil aus zu diagnostischen Zwecken eingesandten Proben von Patienten der Universitätsklinik Düsseldorf. Einige Bakterienstämme wurden von der ATCC erhalten.

## II.1.8 Systeme zur Bakterienidentifizierung

### 1. API-Teststreifen:

( bioMerieux, Lyon, France) Streifen mit Mikroröhrchen, in denen sich Substrate in dehydratisierter Form befinden, mit deren Hilfe sich Enzymaktivität und die Fermentation von Kohlenhydraten nachweisen lassen. Beimpft werden die Streifen mit einer aus einer Reinkultur hergestellten, dichten Suspension. Die biochemischen Reaktionen können anhand von Farbumschlägen abgelesen werden , die entweder spontan während der Inkubation oder nach Zugabe von Reagenzien entstehen. Die Ablesung der Reaktionen erfolgt mit einer Ablesetabelle. Die Identifizierung erhält man mit Hilfe der Prozenttabelle,des *Analytischen-Profil-Indexes* oder der Identifizierungssoftware.

### 2. DADE-Microscan:

System zur Identifizierung von Bakterien, das im Prinzip wie die API-Teststreifen funktioniert; Inkubation und Identifizierung erfolgen automatisch.

## II.1.9 Zellkulturmedien und Zusätze

### Iscove`s Medium:

Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s Medium mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in Aqua dest. und versetzt mit 3g  $\text{NaHCO}_3$ /l, 5% FCS, 50mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 2mM L-Glutamin

Komplementkomponenten im FCS wurden durch 30minütiges Erhitzen auf 56°C im Wasserbad inaktiviert. Aliquots lagerten bis zum Gebrauch bei -20°C.

## II.1.10 Zellen und Zellkultur

Alle Zellen wurden in Iscove`s modifiziertem Dulbecco`s Medium kultiviert. Sie wurden in 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen (Costar, Bodenheim) bei 37°C in befeuchteter, mit 10% CO<sub>2</sub> versetzter Luft gehalten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Zelllinien verwendet.

Die Zelle 86HG39 ist eine humane Glioblastomzelle, die im Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf isoliert wurde. Die Zelllinie wurde von T. Bilzer und Mitarbeitern immunhistochemisch und morphologisch charakterisiert (Bilzer et al, 1991).

Die Zelllinie RT4 (ATCC-Number HTB-2) stammt aus einem humanem uroepithelalem Karzinom und wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland) bezogen. Sie wurde von Rigby und Franks (1970) etabliert und von O`Toole (1972) eingehend untersucht.

Die Fibroblasten Zelllinie HS27 stammt aus humanen Vorhautzellen (Suss-Toby et al.,1996) und wurde ebenfalls von ATCC bezogen.

## II.2 Methoden

### II.2.1 Zellernte und Lebendzellzählung

Für alle funktionellen Tests wurden die Zellen aus den Kulturflaschen geerntet. Dazu wurde zunächst das Medium mit einer Pipette entfernt. Daraufhin wurden 5ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche gegeben. Nach 5 Minuten wurden 9ml FCS-haltiges Medium hinzugegeben, und die Zellen konnten mit einem Zellschaber (Costar) abgelöst werden. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 Minuten bei 1200rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5-10ml Medium resuspendiert. Die Anzahl der lebenden Zellen konnte dann in der Neubauer-Zählkammer festgestellt werden. Dazu wurden die Zellen mit Trypanblau verdünnt.

### II.2.2 Testsysteme

In dieser Arbeit wurden folgende funktionelle Tests durchgeführt:

- a) IDO-Aktivitätsmessung
- b) Messung des Bakterienwachstums ( OD, CFU)
- c) Messung des Bakterienwachstums in Antibiotikaitrationen

Die ersten beiden Tests wurden in 96-well Mikrotiterplatten (Costar) angesetzt. Das Endvolumen in den Vertiefungen betrug in der Regel 200µl. Wurde ein Test mit 86HG39- oder RT4-Zellen angesetzt, kamen in jede Vertiefung  $3 \times 10^4$  Zellen; handelte es sich um einen Test mit Fibroblasten, so wurden in jede Vertiefung  $2 \times 10^4$  Zellen pipettiert. Bei der Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  gab es verschiedene Varianten. Bei den meisten Tests wurde zuerst das IFN $\gamma$  in Iscove`s Medium gelöst in die Vertiefungen gegeben. Es wurde sowohl in Verdünnungsreihen als auch in konstanten Konzentrationen eingesetzt. Danach wurden die Zellen in Iscove`s Medium hinzupipettiert. Bei einigen dieser Tests wurden die Zellen nach bestimmten Inkubationszeiten mit PBS gewaschen, um die IFN $\gamma$ -Stimulation zu stoppen. Diese in dieser Arbeit als Kinetikexperimente bezeichneten Tests wurden folgendermaßen durchgeführt. Zuerst wurden die Zellen in die Testplatten ausgesät und über 24 Stunden bebrütet, um sie adhärent werden zu lassen. Danach wurde das IFN $\gamma$ -haltige Medium hinzugegeben. Nach bestimmten Inkubationszeiten wurde das gesamte Medium von den Zellen mit einer feinen Nadel abgesaugt und, nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen worden waren, durch Iscov`s Medium ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin über 72 Stunden in den Brutschrank getan, wonach sie entweder mit einem Bakterienstamm infiziert wurden oder die IDO-Aktivität nach der unter II.2.2.a beschriebenen Methode gemessen wurde.



Eine andere Möglichkeit war die Stimulation der Zellen mit IFN $\gamma$  in der Kulturflasche vor der Zellernte und -zählung.

Bei allen Versuchen wurde immer eine Kontrolle ohne IFN $\gamma$  mitgeführt und immer eine Dreifachbestimmung von jedem Wert durchgeführt.

### **II.2.2a IDO-Aktivitätsmessung**

Das Prinzip der IDO-Aktivitätsmessung ist die photometrische Messung des Tryptophanabbauproduktes Kynurenin, das mit dem Ehrlich's Reagenz zu einem gelben Azofarbstoff reagiert.

Um die IDO-Aktivität bei den oben beschriebenen Testsystemen zu messen, wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten 160 $\mu$ l des Überstandes in eine Spitzbodenplatte pipettiert und 10 $\mu$ l Trichloressigsäure (30%) zugesetzt, um vorhandene Proteine auszufällen. Es folgte eine dreißigminutige Inkubation im Wasserbad bei 50°C. Die ausgefallenen Proteine wurden 10 Minuten bei 1800rpm abzentrifugiert. Dann wurden 100 $\mu$ l des Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt und mit 100 $\mu$ l Ehrlich's Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 492nm im ELISA-Photometer (SLT Labinstrumente, Crailsheim) gemessen. Die Stärke der Absorption bei 492nm repräsentiert die Menge an gebildetem Kynurenin (Däubener et al.,1994).

### **II.2.2b Messung von Bakterienwachstum (OD-Messung, CFU-Bestimmung)**

Um festzustellen, wie sich die IDO-Aktivität auf das Wachstum von Bakterien auswirkt, wurden die oben beschriebenen Testsysteme nach ihrer Inkubation mit Bakterien versetzt.

Dazu wurde eine Einzelkolonie in 1ml RPMI 1640 Medium (ohne Tryptophan) suspendiert. Diese Suspension wurde in 5 Schritten jeweils 1:10 verdünnt, ebenfalls in RPMI 1640 Medium, um dem Test nachträglich kein Tryptophan zuzuführen. Von einer - meist der vierten - Verdünnungsstufe wurden 10 $\mu$ l in jede Vertiefung der Testplatte pipettiert. Um die Anzahl der eingesetzten Bakterien (Einsaat) zu ermitteln, wurden 10 $\mu$ l aus jeder Verdünnungsstufe als Doppelbestimmung auf eine Blutagarplatte pipettiert. Nach Inkubation über Nacht wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Anzahl der Kolonien entsprach der der eingesetzten Bakterien.

Um zu sehen, ob sich der das Bakterienwachstum hemmende Effekt des IFN $\gamma$  durch Tryptophan aufheben lässt, wurden zusätzlich Testreihen angesetzt, bei denen nach den Bakterien noch Tryptophan in einer Endkonzentration von 75 $\mu$ g hinzupipettiert wurde.

**OD-Messung:** Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde das Bakterienwachstum im ELISA-Photometer gemessen. Dabei entsprach die Stärke der Absorption bei 620nm der Dichte (Menge) der gewachsenen Bakterien.

**CFU-Bestimmung:** Eine andere Methode zur Bakterienwachstumsbestimmung als die der Dichtemessung im Photometer war die Colony-forming-Units-Bestimmung (CFU). Dabei wurde aus den zu bestimmenden Testreihen aus drei Vertiefungen gleichen Inhalts (Dreifachbestimmung) jeweils nach Resuspension 10µl entnommen und die insgesamt 30µl in 1ml Iscov`s Medium gemischt. Davon wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe angefertigt und wie bei der oben beschriebenen Einsaatbestimmung von jeder Verdünnungsstufe zweimal 10µl auf Agar pipettiert und über Nacht bebrütet. Anhand der gewachsenen Kolonien konnte ausgerechnet werden, wie viele Bakterien sich in den Vertiefungen befanden.

### **II.2.2c Bakterienwachstum in Antibiotikaverdünnungsreihen (MHK-Bestimmung)**

Mit Hilfe dieses Tests kann man die minimale Konzentration eines Antibiotikums bestimmen, die ausreicht, um das Wachstum eines Bakterienstammes zu hemmen. Dazu wird zunächst eine Kolonie des Bakterienstammes über 18 Stunden in Medium inkubiert. Die entstandene Bakteriensuspension enthält ca.  $10^9$  Keime/ml. 1 ml davon wird mit 9ml Medium verdünnt, sodass eine Konzentration von ca.  $10^8$  Keimen/ml entsteht. Um die für die Einsaat gewünschte Konzentration von ca.  $10^6$  Keimen/ml zu erreichen, verdünnt man 0,2ml der Bakteriensuspension mit 19,8ml Medium.

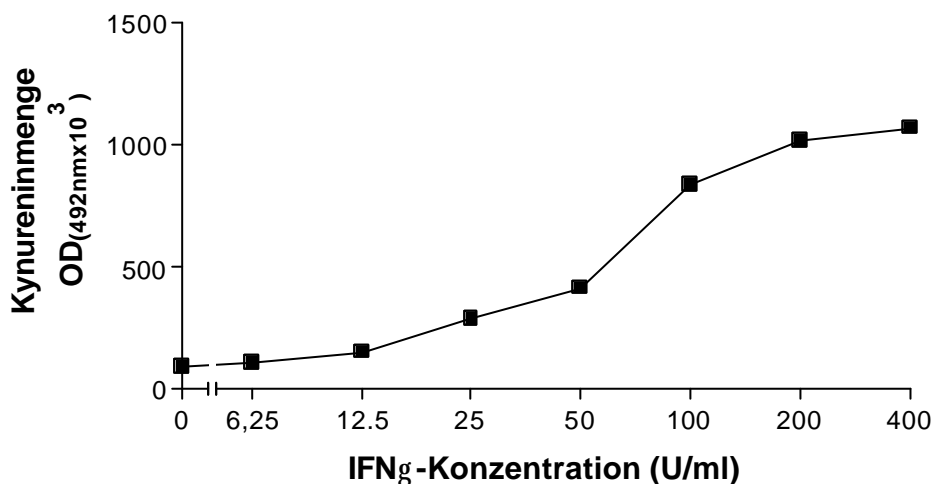
Dann wird eine Verdünnungsreihe des Antibiotikums mit mindestens 15 Verdünnungsstufen und eine Kontrollreihe, die nur Medium enthält, angefertigt. Das Volumen jeder Antibiotikaverdünnung ist 1ml. Von der Bakteriensuspension wird 1ml hinzupipettiert, sodass das Endvolumen 2ml ist. Es folgt eine Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C, wonach das Ergebnis abgelesen wird. Die minimale Hemmkonzentration ist die Konzentration, bei der noch keine Trübung eingetreten ist, nach der aber alle niedrigeren Konzentrationsstufen getrübt sind.

### III. Ergebnisse

#### III.1 IDO-vermittelte Effekte gegen grampositive Bakterien

Die zunächst vorgestellten Experimente wurden mit der Glioblastomzelllinie 39HG86 durchgeführt. Dass auch bei den in dieser Arbeit verwendeten Generationen dieser Zelllinie nach Stimulation mit IFN $\gamma$  das Enzym Indolamin 2,3 Dioxygenase induziert wird, wird aus den Abbildungen 1a und b deutlich. Wie bereits in der Einleitung erklärt, katalysiert die IDO den sauerstoffabhängigen Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin. In vitro zerfällt N-Formylkynurenin spontan zu Kynurenin und Formiat. Dieses Kynurenin wurde bei dem Experiment zu Abb.1a mit der in Material und Methoden unter II.2.2 vorgestellten Methode gemessen. Es dient als Parameter für die induzierte IDO-Aktivität.

Abbildung 1a

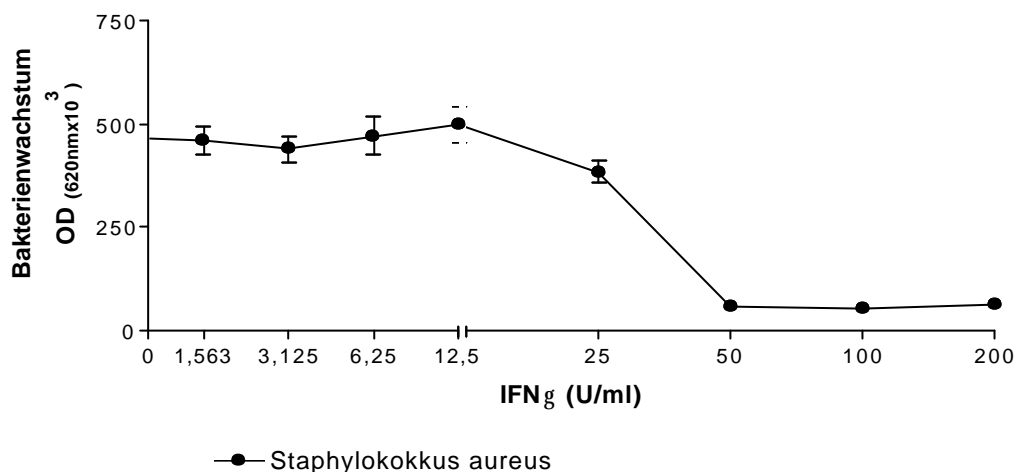


**Abb.1a:** Bei dem Experiment zu dieser Abbildung wurden 86HG39-Zellen über 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  inkubiert. Dabei wurde das Medium mit 50 $\mu$ g/ml Tryptophan supplementiert, um genügend Substrat bereitzustellen. Nach der Inkubationszeit wurde die IDO-Aktivität gemessen. Die hierbei verwendete Methode, bei der die Menge des Tryptophanabbauproduktes Kynurenin photometrisch gemessen wird, wird unter II.2.2a beschrieben.

Die Abbildung 1b zeigt, dass die Vermehrung von Staphylokokken durch vorherige Stimulation der 86HG39-Zellen mit IFN $\gamma$  verhindert werden kann. Anstatt wie bei dem Experiment zu Abb.1a nach der Stimulationszeit Kynurenin im Überstand zu messen, wurden bei diesem Experiment nach der Stimulationszeit Staphylokokken hinzupipettiert. Das Bakterienwachstum wurde nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden nach der in

Material und Methoden unter II.2.2. erläuterten Methode gemessen. Es zeigt sich, dass bei einer 72stündigen Stimulation der Zellen mit 25U/ml IFN $\gamma$  die Bakteriendichte bereits abnimmt, bei einer Konzentration von 50U/ml ist praktisch nur noch die Dichte der eukaryontischen Zellen im Testsystem zu messen. Das heißt, das Bakterienwachstum ist hier vollständig gehemmt.

**Abbildung 1b**

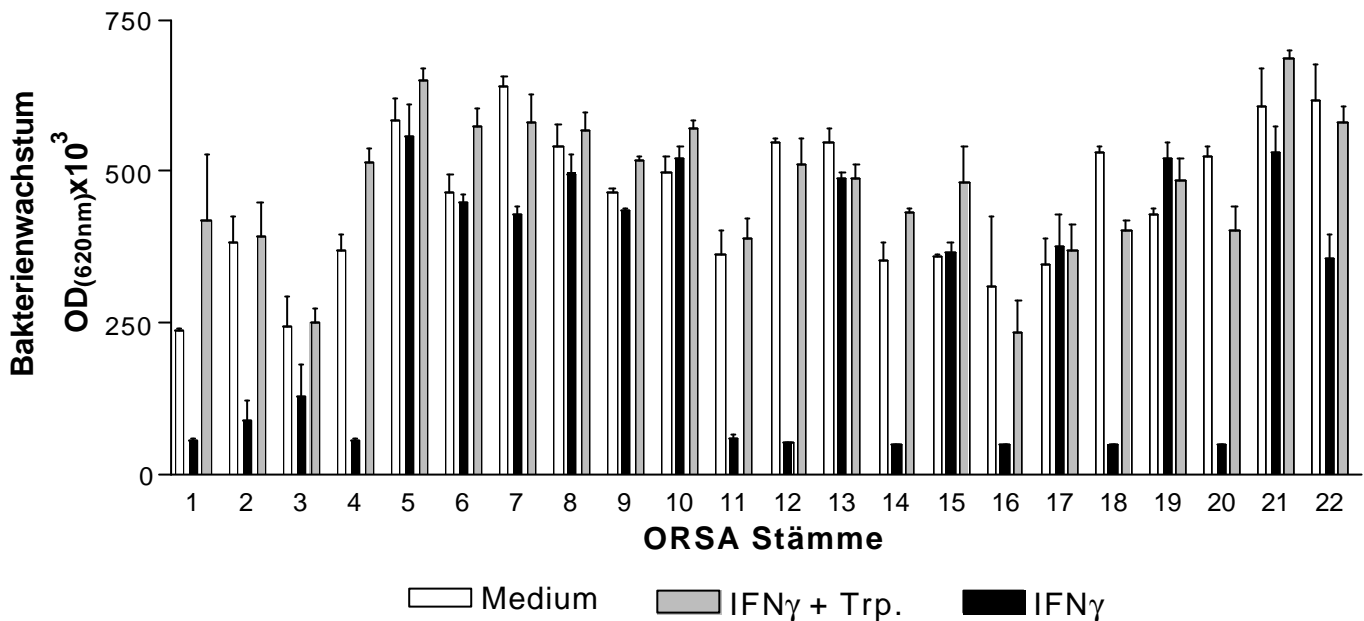


**Abb. 1b:** Auch bei dem Experiment dieser Abbildung wurden 86HG39-Zellen mit verschiedenen IFN $\gamma$ -Konzentrationen von 200 U/ml bis 0 U/ml stimuliert. Nach 3 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit einem Staphylokokkus aureus Stamm infiziert. Nach einem weiteren Tag Inkubation wurde das Bakterienwachstum nach der unter II.2.2b beschriebenen Methode, bei der die Bakteriendichte photometrisch gemessen wird, bestimmt.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 37 Staphylokokkus aureus Stämme auf ihre Hemmbarkeit durch IDO-bedingten Tryptophanmangel untersucht. Davon ließen sich 15 in ihrem Wachstum unterdrücken (ohne Abbildung).

Das Verhältnis von hemmbaren zu nicht hemmbaren Stämmen von ca. 40:60 war auch bei den insgesamt 22 besonders resistenten ORSA (Oxacillin resistente Staphylokokkus aureus Stämme) vorhanden. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis eines Experimentes, das mit ORSA durchgeführt wurde.

Abbildung 2



**Abb.2:** Bei diesem Experiment wurden 86HG39-Zellen über 72 Stunden mit 200 U/ml IFN $\gamma$  inkubiert und anschließend mit den verschiedenen Oxacillin resistenten Staphylokokkus aureus Stämmen versetzt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde das Bakterienwachstum nach der unter II.2.2 beschriebenen Methode gemessen. In der Balkengraphik ist das Wachstum von 22 verschiedenen ORSA mit je 3 Balken dargestellt. Der schwarze Balken zeigt das Bakterienwachstum in Kulturen von IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen ohne Tryptophansupplementation, der graue Balken das Wachstum mit Tryptophansupplementation, und der weiße Balken stellt die Kontrollgruppe dar, bei der unstimulierte Zellen mit den Staphylokokken versetzt wurden.

Von 24 getesteten Staphylokokkus epidermidis Stämmen waren sogar 21 Stämme durch IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität hemmbar. Da koagulasenegative Staphylokokken wie Staphylokokkus epidermidis besonders häufig Antibiotikaresistenzen aufweisen und somit schwer zu therapieren sind, ist das Ergebnis der Experimente, die in Abbildung 3 dargestellt sind, besonders beachtlich.

Abbildung 3a

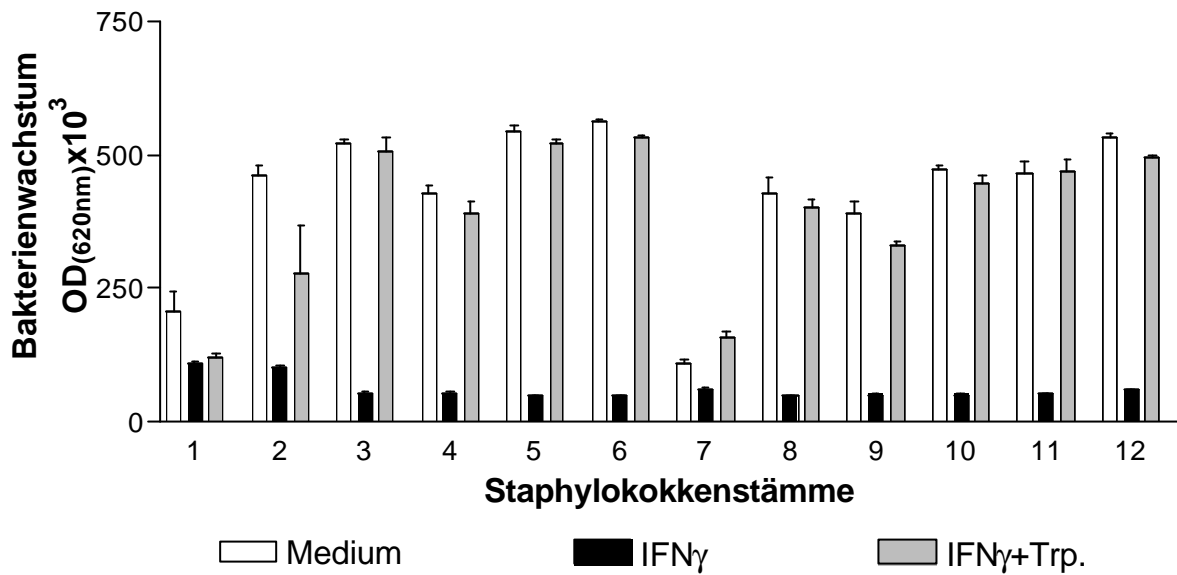
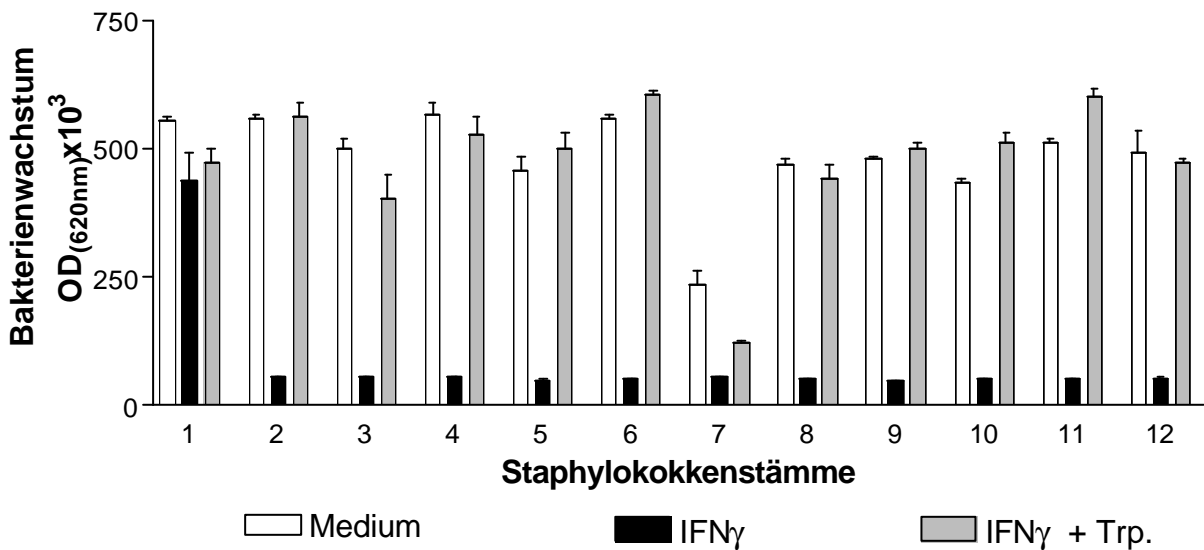


Abbildung 3b



**Abbildungen 3a und 3b:** Für diese Experimente wurden 86HG39-Zellen über 72 Stunden mit 200U/ml IFN<sub>γ</sub> stimuliert und anschließend mit den verschiedenen Staphylokokkus epidermidis Stämmen infiziert. Für das Experiment der Abbildung 3a wurden 12 Methicillin- bzw. Oxacillin- sensible Staphylokokkus epidermidis Stämme eingesetzt, für das Experiment der Abbildung 3b 12 Methicillin-resistente Staphylokokkus epidermidis Stämme. Nach 24 Stunden wurde das Bakterienwachstum nach der unter II.2.2 beschriebenen Methode gemessen. Die Ergebnisse sind in Form einer Balkengraphik dargestellt, bei der jedem Bakterienstamm drei Balken zugeordnet sind. Der schwarze Balken zeigt das Bakterienwachstum ohne Tryptophansupplementation, der graue Balken das Bakterienwachstum mit Tryptophanzusatz, und der weiße Balken stellt die Kontrollgruppe dar, bei der unstimulierte 86HG39-Zellen mit Bakterien infiziert wurden.

Nun wurden verschiedene Streptokokken auf ihre Hemmbarkeit durch den IDO-Mechanismus untersucht.

Alle 5 getesteten Stämme von B-Streptokokken waren in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten durch den IDO-Mechanismus hemmbar. Von den 8 getesteten Streptokokken der Gruppe A, die wie die B-Streptokokken  $\beta$ -hämolisierend sind, waren 6 Stämme gegen den IDO-Mechanismus resistent. Ein Stamm war hemmbar, und einer zeigte auch ohne IFN $\gamma$  photometrisch kein Wachstum. Die 2 getesteten Pneumokokkenstämme waren dem IDO-Mechanismus gegenüber resistent, und der einzige untersuchte G-Streptokokkus zeigte sich hemmbar (ohne Abbildung).

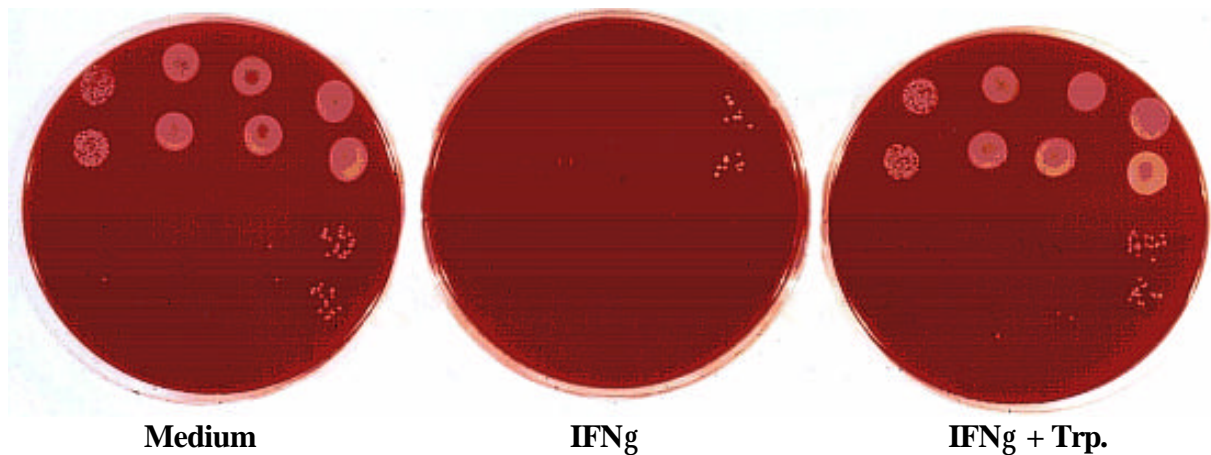
Als nächste Gruppe wurden Enterokokken untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente werden gesondert in Kapitel 3.3 vorgestellt.

### **III.2. Vergleich der IFN $\gamma$ -vermittelten Wachstumshemmung bei verschiedenen Bakterienstämmen**

Das Bakterienwachstum der verschiedenen getesteten Bakterien wurde nicht nur anhand der Dichtemessung überprüft, sondern auch mit der Bestimmung der sogenannten Colony forming Units (CFU). Diese Methode, die im Kapitel „Material und Methoden“ unter dem Punkt II.2.2 vorgestellt wird, erlaubt eine präzise Bestimmung der im Medium vorhandenen Bakterienanzahl. Mit der CFU-Bestimmung kann ebenfalls wie mit der Dichtemessung die bakterienwachstumshemmende Wirkung der IDO-Aktivität nachgewiesen werden.

Bei der Bestimmung der CFU fiel jedoch auf, dass der Einfluss der IDO-Induktion bei verschiedenen Bakterienarten ein unterschiedliches Ausmaß hatte. So war die Bakterienanzahl von Staphylokokkus aureus im Testsystem mit IFN $\gamma$ -stimulierten Zellen um bis zu 6 Zehnerpotenzen niedriger als in der Kontrollgruppe mit nichtstimulierten Zellen, während bei Enterokokken und Gruppe B Streptokokken dieser Unterschied nur bis zu 2 Zehnerpotenzen ausmachte. Abbildung 4 zeigt die CFU-Bestimmung eines Staphylokokkenstammes. Bei dem Experiment zu dieser Abbildung wurden 86HG39-Zellen über 3 Tage mit 200U/ml IFN $\gamma$  stimuliert, danach mit dem Staphylokokkenstamm infiziert und für einen Tag weiter inkubiert. Aus dem Überstand wurden Proben entnommen und 1:10 verdünnt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 2 x 10 $\mu$ l entnommen und auf Blutagar einen weiteren Tag bebrütet. Die in den Verdünnungsstufen gewachsenen Kolonien sind auf den Blutagarplatten in der Abbildung 4 zu sehen. Man sieht an der mittleren Agarplatte, dass das Bakterienwachstum im Medium der mit IFN $\gamma$  stimulierten Zellen um 5 Zehnerpotenzen reduziert wurde.

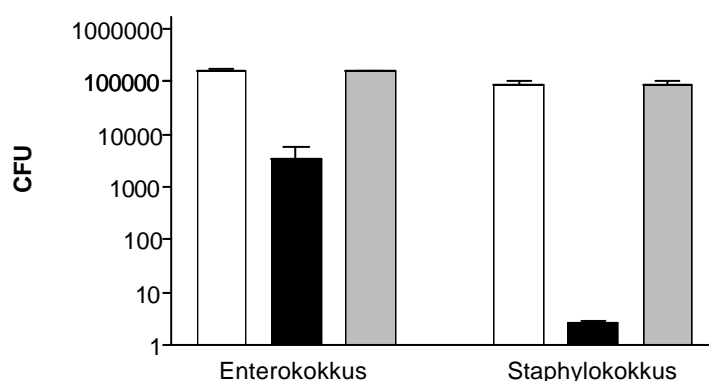
**Abbildung 4**



**Abb. 4:** 86HG39-Zellen wurden über 3 Tage mit 200U/ml IFN $\gamma$  stimuliert und dann mit einem Staphylokokkus aureus Stamm infiziert. Nach einem weiteren Inkubationstag wurde das Bakterienwachstum nach der Methode der CFU-Bestimmung ( s. II.2.2.b) gemessen. Auf den Agarplatten sieht man in der oberen Hälfte von rechts nach links die Verdünnungsstufen 1-4, in der unteren Hälfte von rechts nach links die Verdünnungsstufen 5-8. Pro Verdünnungsstufe sind in einer Doppelbestimmung die Kolonien zu sehen, die in 10 $\mu$ l der Verdünnungsstufe gewachsen waren. Auf der mittleren Agarplatte sind die Kolonien zu sehen, die aus dem Überstand der mit IFN $\gamma$  stimulierten Zellen angezüchtet werden konnten. Auf der linken Agarplatte befinden sich die Kolonien, die aus dem Überstand von nur mit Iscov's Medium inkubierten Zellen stammen. Die rechte Agarplatte zeigt die Kolonien der Staphylokokken, die nach Tryptophansupplementation im Überstand der mit IFN $\gamma$  stimulierten Zellen gewachsen waren.

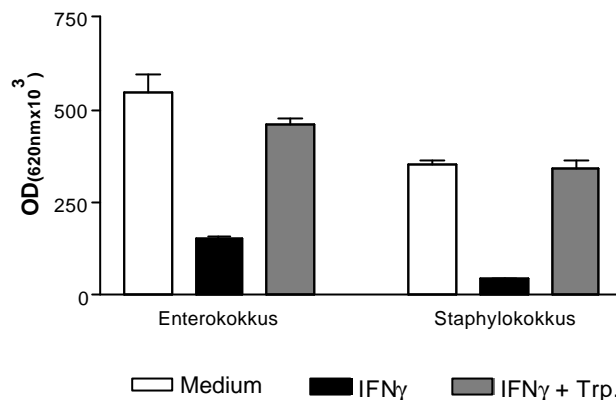
In Abbildung 5 ist der Unterschied zwischen Bakteriengattungen hinsichtlich der IDO-Wirkung am Beispiel eines Enterokokkenstammes und eines Staphylokokkenstammes dargestellt.

**Abbildung 5a**





## Abbildung 5b

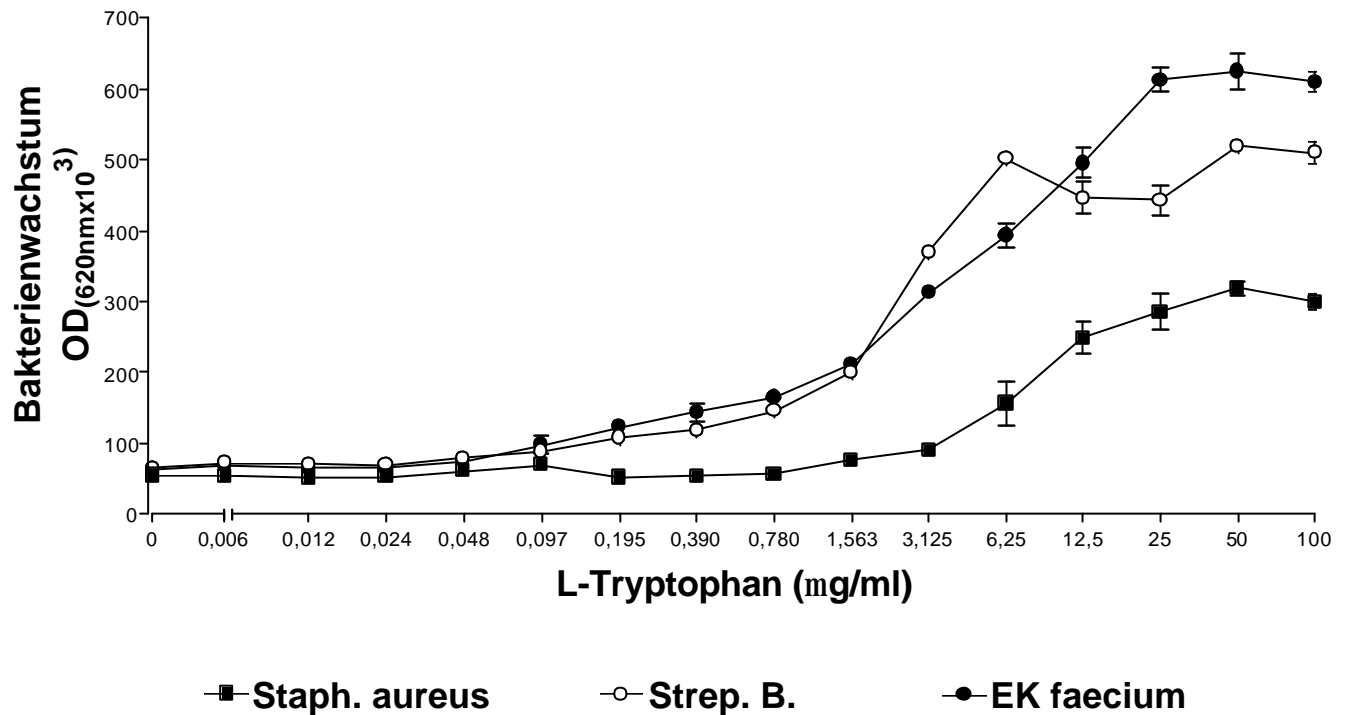


**Abb.5:** RT4-Zellen wurden nach 4tägiger Stimulation mit 200U/ml IFN $\gamma$  mit einem Enterokokkenstamm ( *E. durans*) und 86HG39-Zellen nach 4tägiger Stimulation mit ebenfalls 200U/ml IFN $\gamma$  mit einem Staphylokokkenstamm ( *Staph. aureus*) infiziert. Ein Teil der Zellen wurde mit 75 $\mu$ g/ml Tryptophan supplementiert. Nach einem weiteren Inkubationstag wurde das Bakterienwachstum mittels CFU-Bestimmung (Abb.5a) und Dichtemessung (Abb.5b) ermittelt. Die Balken in Abb.5a zeigen die Anzahl der Kolonien, die in 10 $\mu$ l des Überstandes gewachsen waren. Die Balken in Abb. 5b stellen die optische Dichte dar.

Dass im interferonhaltigen Medium viel weniger vermehrungsfähige Staphylokokken als Enterokokken vorhanden waren, ließ annehmen, dass diese Bakterien einen unterschiedlichen Tryptophanbedarf haben. Um zu zeigen, ab welcher Konzentration von Tryptophan der Effekt der IDO-Induktion antagonisiert wird, wurden Experimente mit verschiedenen Konzentrationen von Tryptophan durchgeführt. Es wurden 3 verschiedene Bakterienarten eingesetzt, die aus den Ergebnissen der CFU-Bestimmungen auf einen unterschiedlichen Tryptophanbedarf schließen ließen: *Staphylokokkus aureus*, *Enterokokkus faecium* und *Streptokokkus* der Gruppe B. Als IDO-exprimierende Zelllinie wurden 86HG39-Zellen über 3 Tage mit 300U/ml IFN $\gamma$  inkubiert und anschließend mit den Bakterien und den Titrationsstufen von Tryptophan versetzt. Zunächst wurden 8 Titrationsstufen von 100 $\mu$ g/ml bis 0 $\mu$ g/ml Tryptophan gewählt, da in bisherigen Experimenten 75 $\mu$ g/ml Tryptophan sicher ausgereicht hatten, um die Wirkung der IDO-Induktion zu antagonisieren und ein Bakterienwachstum zu ermöglichen. In diesem Experiment ( ohne Abbildung) zeigte sich, dass der entscheidende Bereich, in dem der Tryptophanantagonismus wirksam ist, unterhalb von 6,25 $\mu$ g/ml Tryptophan liegt. Um diesen Bereich besser zu untersuchen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, bei dem insgesamt 16 Titrationsstufen von Tryptophan

verwendet wurden. Diesmal wurden die Zellen mit einer IFN $\gamma$ -Konzentration von 200U/ml stimuliert. Abbildung 6 gibt das Ergebnis dieses Experimentes wieder.

**Abbildung 6**



**Abb. 6:** In diesem Experiment wurden 86HG39-Zellen über 72 Stunden mit 200U/ml IFN $\gamma$  inkubiert. Anschließend wurden die 3 Bakterienarten Staph. aureus, Strep.B und Enterokokkus faecium getrennt in die dafür vorgesehenen Testreihen pipettiert und jeweils die 16 Titrationsstufen von Tryptophan hinzugegeben. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation erfolgte die Messung der Bakteriendichte im Photometer bei 620 nm.

Der Bereich unter 6,25  $\mu$ g/ml Tryptophan ist in dieser Kurvengraphik besser zu beurteilen. Sowohl die Streptokokken als auch die Enterokokken fangen bei einer Tryptophansupplementation von ca. 0,097  $\mu$ g/ml an zu wachsen, während Staphylokokken dazu erst bei einer Supplementation von ca. 3,125  $\mu$ g/ml in der Lage sind.

### III.3. IDO-vermittelte Effekte gegen gramnegative Bakterien

Bei den Experimenten, die durchgeführt wurden um zu erfahren, welche Bakterien durch die IDO-Induktion hemmbar seien, lag der Schwerpunkt in dieser Arbeit auf der Untersuchung grampositiver Bakterien. Zwar wurden auch Experimente mit gramnegativen Bakterien

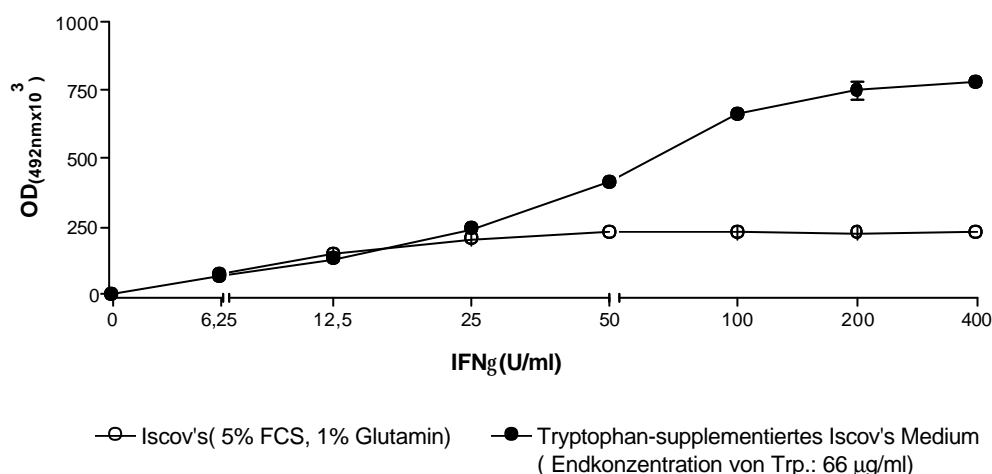
durchgeführt, jedoch in geringerem Umfang. Insgesamt wurden 59 gramnegative Bakterienstämme ( darunter größtenteils Enterobacteriaceae) nach dem unter II.2.2 beschriebenen Verfahren getestet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte darunter kein reproduzierbar hemmbarer Keim gefunden werden.

### III.4 Antibakterielle Effekte durch Fibroblasten

Nachdem bisher in dieser Arbeit die meisten Experimente mit der Glioblastomzelllinie 86HG39 durchgeführt worden waren, sollten nun weitere Versuche mit Zellen anderen Ursprungs erfolgen. Diese Zellen sollten mit Bakterien infiziert werden, mit denen sie sich auch in vivo auseinandersetzen müssen.

Die Abbildungen 7 a und b zeigen, dass auch humane Fibroblasten in der Lage sind, nach Stimulation mit IFN $\gamma$  IDO zu bilden. Bei diesem Experiment wurde die IDO-Aktivität sowohl anhand des Tryptophanabbauproduktes Kynurenin bestimmt, als auch an der Fähigkeit, einen bekannt hemmbaren Keim im Wachstum zu unterdrücken. Die Fibroblasten wurden mit verschiedenen Titrationstufen von humanem IFN $\gamma$  stimuliert. Auf diese Art und Weise sollte geklärt werden, ab welcher Konzentration von IFN $\gamma$  die IDO der Fibroblasten meßbar Tryptophan abbaut und welche Konzentration von IFN $\gamma$  zur Stimulation dieser Zellen nötig ist, um das Bakterienwachstum zu hemmen.

**Abbildung 7a**



**Abb. 7a:** Humane Fibroblasten wurden mit IFN $\gamma$  in Konzentrationen von 400 U/ml bis 0 U/ml stimuliert. Ein Teil der Zellen wurde zusätzlich mit Tryptophan in einer Konzentration von 50µg/ml supplementiert, sodass zusammen mit dem in Iscov`s Medium enthaltenem Tryptophan eine Endkonzentration von 66µg/ml erreicht wurde. Nach drei Tagen Inkubation wurde das Tryptophanabbauprodukt Kynurenin nach der Methode, die unter II.2.a beschrieben ist, gemessen. Die untere Kurve zeigt die photometrisch bestimmte Menge an Kynurenin, die ohne Tryptophansupplementation gebildet wurde, die obere Kurve stellt die Kynureninmenge dar, die nach zusätzlicher Tryptophangabe gewonnen wurde.

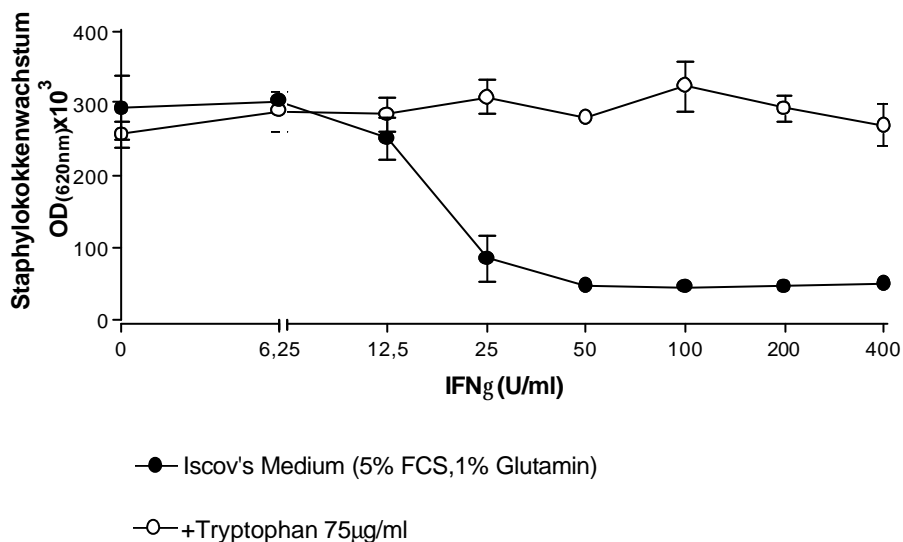
In der Abbildung 7 a kann man erkennen, dass bereits bei einer Stimulation mit IFN $\gamma$  in einer Konzentration von 6,25 U/ml Kynurenin im Überstand messbar wird. Das entspricht dem Ergebnis, das bei einem äquivalenten Experiment mit der Glioblastomzelllinie 86HG39 erzielt wurde.

Weiterhin sieht man an der unteren der beiden Kurven in dieser Abbildung, dass in diesem Testsystem bei 50 U/ml IFN $\gamma$  sämtliches im Medium vorhanden gewesenes Tryptophan zu Kynurenin abgebaut wurde, da die Kurve ab hier ein Plateau erreicht. Selbst bei einer Stimulationsdosis von 400 U/ml IFN $\gamma$  bleibt die Menge an gebildeten Kynurenin gleich. Dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität aber in der Lage ist noch mehr Tryptophan als in Iscov`s Medium enthalten ist abzubauen, sieht man an der oberen Kurve. Dort wurden zu dem Tryptophangehalt von ca. 16  $\mu$ g/ml, der normalerweise im Iscov`s Medium enthalten ist, noch weitere 50  $\mu$ g/ml Tryptophan hinzugegeben.

Als nächstes wurde getestet, ab welcher zur Stimulation eingesetzten Konzentration von IFN $\gamma$ , die IDO-Aktivität der Fibroblasten ausreichend ist, das Bakterienwachstum zu hemmen.

Abbildung 7 b zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

### Abbildung 7b



**Abb.7b:** Humane Fibroblasten wurden über drei Tage mit Titrationsstufen von humanem IFN $\gamma$  inkubiert. Anschließend wurden sie, wie es unter II.2.b beschrieben ist, mit einem bekannt hemmbaren Staphylokokkus aureus Stamm infiziert. Dabei wurde zu einem Teil der Zellen noch zusätzlich Tryptophan in einer Konzentration von 75 $\mu$ g/ml gegeben. Nach einem weiteren Tag Inkubation wurde die Bakteriendichte bei 620nm photometrisch gemessen.

Passend zu dem Ergebnis, dass bereits ab einer IFN $\gamma$ -Konzentration von 6,25 U/ml messbar IDO induziert wird, sieht man in der Abbildung 7 b, dass auch die Bakteriendichte ab dieser Konzentration von IFN $\gamma$  abzunehmen beginnt. Bei einer IFN $\gamma$ -Konzentration von 50 U/ml ist die Vermehrung des Staphylokokkenstammes gänzlich unterdrückt.

Diese Ergebnisse mit Fibroblasten entsprechen denen, die mit der Glioblastomzelllinie 86HG39 gewonnen wurden ( siehe Kapitel III.1, Abbildungen 1a und b ). Die Fibroblasten reagieren auf IFN $\gamma$ -Stimulation mit der gleichen Intensität an IDO-Induktion wie die Glioblastomzelllinie 86HG39 und damit mit dem gleichen daraus resultierenden Tryptophanabbau und der Möglichkeit, dadurch Bakterien in ihrem Wachstum zu hemmen.

### **III.5 Antibakterielle Effekte durch uroepitheliale Zellen**

Als nächstes wurde die RT4-Zelllinie untersucht, eine Zelllinie, die ihren Ursprung in einem humanem uroepitheliale Karzinom nimmt. Auch diese uroepithelialen Zellen, von denen bereits bekannt war, dass sie über IDO-Aktivität verfügen, sollten mit Bakterien in Kontakt gebracht werden, mit denen sie sich auch in vivo auseinandersetzen müssen.

Die getesteten Isolate von *Escherichia coli* und *Enterobacter* waren gegenüber dem IDO-Mechanismus resistent (siehe Kapitel III.3).

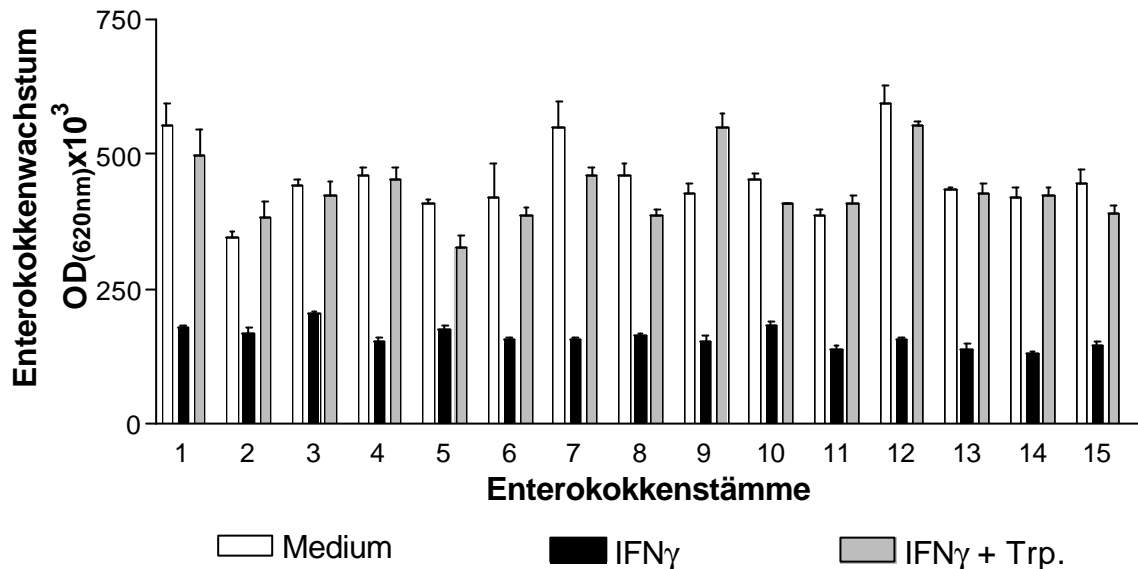
Experimente mit Enterokokken, die in Testsystemen mit Glioblastomzellen auf ihre Hemmbarkeit durch IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität untersucht wurden, ergaben, dass 27 von 29 Enterokokkenstämmen durch diesen Mechanismus im Wachstum unterdrückt wurden. 2 Isolate ließen sich im Kulturmedium nicht vermehren (ohne Abbildung). Bei den Enterokokkenstämmen handelte es sich um multiresistente Stämme. 14 von ihnen waren sogar gegen Vancomycin resistent. Dass auch diese besonders gefürchteten vancomycinresistenten Enterokokken durch den IDO-Mechanismus im Wachstum hemmbar waren, macht die Ergebnisse besonders bemerkenswert.

Nun sollte geprüft werden, ob diese Ergebnisse, die mit IFN $\gamma$ -stimulierten Glioblastomzellen gewonnen worden waren, auch auf die Harnwegsepithelzellen übertragbar waren. Es wurden also äquivalente Experimente mit RT4-Zellen und den bereits getesteten Enterokokken durchgeführt.

Die Abbildung 8 zeigt das Ergebnis eines solchen Experimentes, bei dem IFN $\gamma$ -stimulierte RT4-Zellen mit 15 bereits bekannt hemmbaren Enterokokkenstämmen infiziert wurden. Bei 12 dieser Enterokokkenstämmen ( alle außer Nr. 2, 4 und 15) handelte es sich um vancomycinresistente Stämme. Ihre Vancomycinresistenz wurde durch einen Reihenverdünnungstest bestätigt (ohne Abbildung). Alle 15 Enterokokkenstämmen konnten in

dem Experiment mit den uroepithelialen Zellen genauso wie in den Experimenten mit den Glioblastomzellen in ihrem Wachstum unterdrückt werden.

**Abbildung 8**



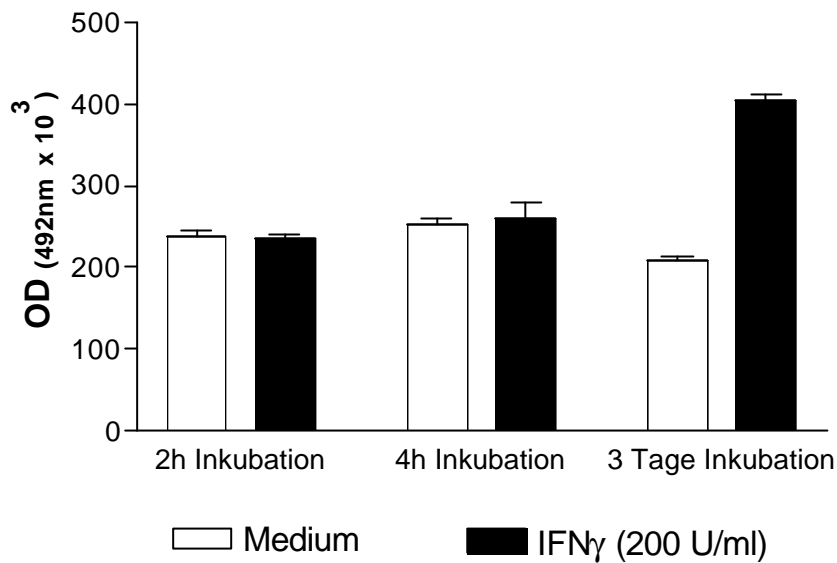
**Abb.8:** RT4-Zellen wurden über 4 Tage mit 200 U/ml humanem IFN $\gamma$  stimuliert und anschließend mit den Enterokokkenstämmen 1-15 infiziert. Bis auf die Stämme 2, 4 und 15 sind alle Stämme vancomycinresistent. Das Bakterienwachstum wurde nach einem weiteren Inkubationstag nach der unter II.2.2 beschriebenen Methode gemessen. In der Balkengraphik zeigen die schwarzen Balken die Bakteriendichte der Enterokokken, die in den Testfeldern mit IFN $\gamma$ -stimulierten RT4-Zellen gewachsen sind. Die grauen Balken stellen die Bakteriendichte dar, die nach Tryptophansupplementation gewachsen sind, und die weißen Balken zeigen die Kontrollgruppe, d.h. die Bakteriendichte der Enterokokken, die in Testfeldern mit nur in Iscov's Medium kultivierten RT4-Zellen gewachsen sind.

### III.6 Kinetik der IDO-Induktion

Die Abhängigkeit der IDO-Induktion von der zur Zellstimulation eingesetzten IFN $\gamma$ -Konzentration wurde bereits in Kapitel III.1 dargestellt. Nun sollte herausgefunden werden, wie lange die Zellen mindestens mit den verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  inkubiert werden müssen, damit eine IDO-Induktion stattfindet.

Eine erste Testmethode war, die Zellen in der Kulturflasche über verschiedene Zeiträume mit IFN $\gamma$  zu inkubieren. Anschließend wurden sie auf die übliche Weise geerntet, wodurch das interferonhaltige Medium entfernt wurde, und in die Testplatten pipettiert. Nach einer weiteren Inkubationszeit wurde die IDO-Aktivität anhand der Kynureninmenge im Überstand gemessen. Das erste Experiment, das nach dieser Methode durchgeführt wurde, wird in der folgenden Abbildung vorgestellt.

## Abbildung 9



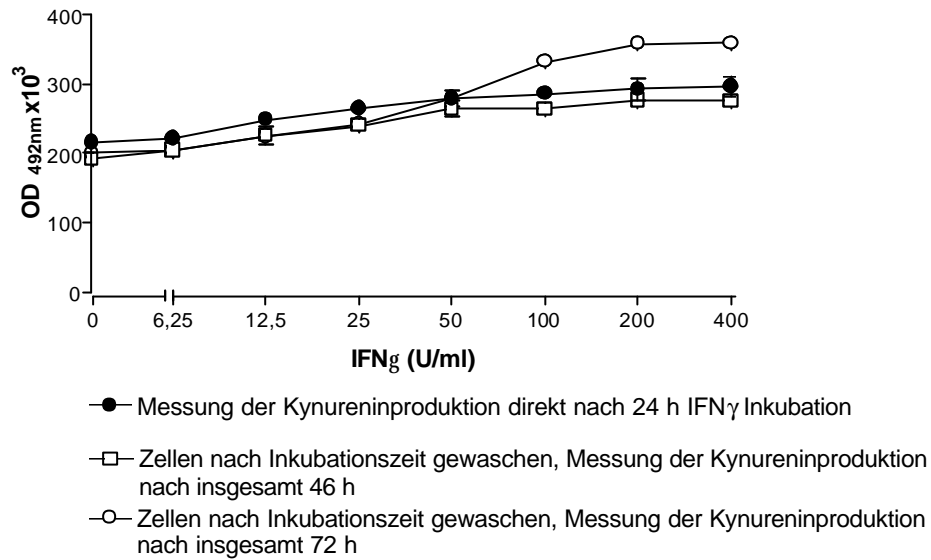
**Abb.9:** Bei diesem Experiment wurden 86HG39-Zellen in den Kulturflaschen, in denen sie gewachsen waren, mit IFN $\gamma$  in einer Konzentration von 200U/ml oder nur Medium über 2 bzw. 4 Stunden inkubiert, anschließend mit Trypsin wie in II.2.1 beschrieben geerntet und in die Testplatten pipettiert. Die Zellen, die 72 Stunden lang mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden, wurden wie in den vorhergehenden Experimenten zunächst geerntet und in die Testplatten pipettiert und dann bis zur Kynurenin-Messung mit IFN $\gamma$  versetzt inkubiert. Die schwarzen Balken in dieser Graphik zeigen die Kynureninmenge, die im Medium nach 2- und 4stündiger bzw. 3tägiger Inkubation der 86HG39-Zellen mit 200U/ml IFN $\gamma$  photometrisch gemessen wurde. Die weißen Balken zeigen die Kontrolle, bei der die Zellen nur in Medium inkubiert wurden.

In diesem Experiment konnte noch kein wesentlicher Unterschied in der Kynureninkonzentration im Medium von mit IFN $\gamma$  stimulierten zu nicht stimulierten Zellen, die über 2 bzw. 4 Stunden in den Kulturflaschen inkubiert worden waren, gefunden werden.

Als nächstes wurde eine andere Methode getestet. Die Zellen wurden dazu zunächst geerntet, in die Testplatten pipettiert und mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  inkubiert. Nach bestimmten Stimulationszeiten wurde zum einen die IDO-Aktivität anhand der Kynureninkonzentration im Überstand gemessen, zum anderen wurde das IFN $\gamma$ -haltige Medium mit der Pasteurpipette abgesaugt, und die Zellen wurden zweimal gewaschen, indem ihnen PBS hinzugesetzt wurde, welches dann wieder mit der Pasteurpipette abgesaugt wurde. Anschließend wurden diese Zellen wieder mit Iscov's Medium versetzt weiter inkubiert bis insgesamt 72 Stunden vergangen waren. Dann wurde die Kynureninmenge im Überstand gemessen.

Die Abbildungen 10 a, b und c zeigen das Ergebnis dieses Experimentes.

**Abbildung 10a**



**Abbildung 10b**

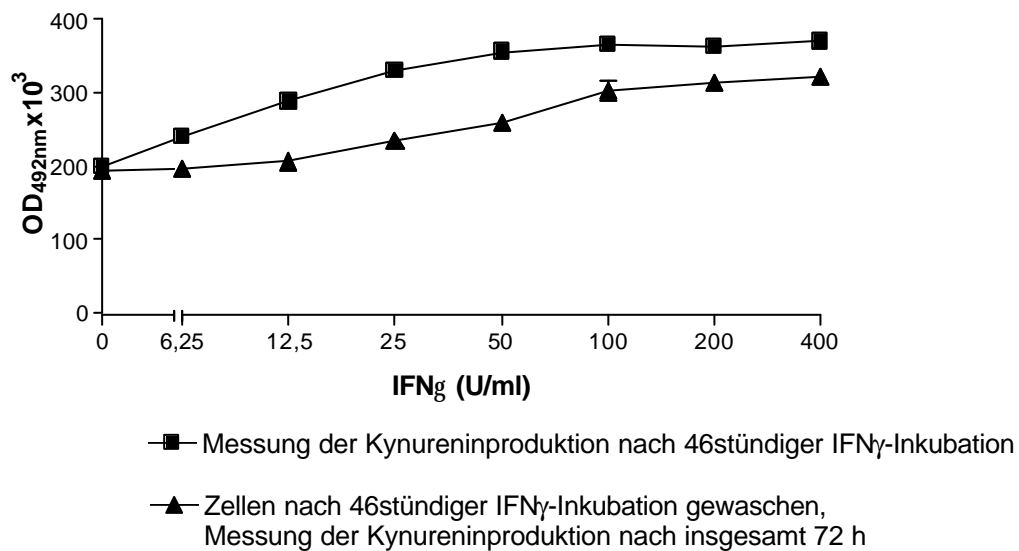
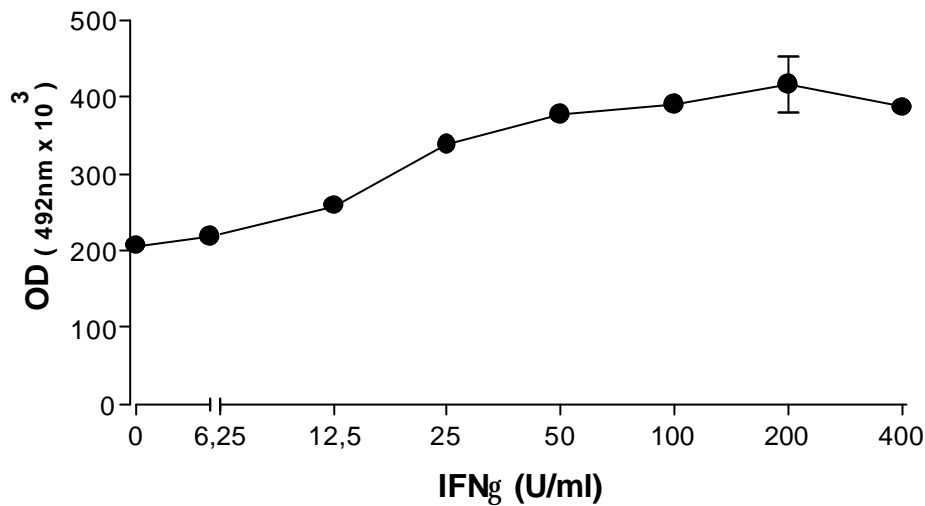




Abbildung 10c



● Messung der Kynureninproduktion direkt nach 72stündiger IFN $\gamma$ -Inkubation

**Abb. 10a,b und c:** 86HG39-Zellen wurden, nachdem sie aus den Kulturflaschen geerntet und in die Testplatten pipettiert worden waren, mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  inkubiert. Nach 24 Stunden wurde bei einem Teil der Zellen die Kynureninkonzentration nach der unter II.2.2 beschriebenen Methode gemessen, ein weiterer Teil der Zellen wurde mit der Pasteurpipette vom IFN $\gamma$ -haltigen Medium befreit und zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit Iscov's Medium weiter inkubiert wurden. Bei diesen Zellen wurde nach insgesamt 46 bzw. 72 Stunden die Kynureninkonzentration im Überstand gemessen (siehe Abbildung 10a). Auch bei Zellen, die 46 Stunden mit IFN $\gamma$  inkubiert worden waren, wurde bei einem Teil die Kynureninmenge im Überstand bestimmt; der andere Teil wurde gewaschen und mit Iscov's Medium weiter inkubiert, bevor nach insgesamt 72 Stunden die Kynureninmenge im Überstand bestimmt wurde (siehe Abb. 10b). Außerdem wurden Zellen über 72 Stunden mit IFN $\gamma$  inkubiert und dann die Kynureninkonzentration im Überstand gemessen (siehe Abb. 10c).

Man erkennt, dass sowohl nach 72stündiger, 46stündiger als auch nach 24stündiger Inkubation IDO induziert wurde.

Auffallend ist, dass die Kynureninkonzentration im Überstand der Zellen, die nach 24stündiger Inkubation gewaschen und dann bis insgesamt 46 Stunden weiter inkubiert worden waren, niedriger ist als die Kynureninkonzentration, die nach 24 Stunden gemessen wurde. In den 22 Stunden nach dem Entfernen des IFN $\gamma$  und natürlich auch des durch Tryptophanabbau entstandenen Kynurenins konnte noch nicht wieder die gleiche Menge an Kynurenin entstehen. Bei den Zellen, die zwar nach 24 Stunden Inkubation gewaschen

worden waren, aber bis insgesamt 72 Stunden inkubiert wurden, verläuft die Kynureninkonzentrationskurve ab einer Konzentration von 50U/ml  $\text{INF}\gamma$  oberhalb der Kurve der Konzentrationen von Kynurenin, die nach 24 Stunden Inkubation gemessen wurden. In der Zeit, die diese Zellen mit ihrer während der Stimulationszeit induzierten IDO-Aktivität zusätzlich hatten, konnte noch wesentlich mehr Tryptophan zu Kynurenin abgebaut werden.

Die gleiche Beobachtung kann man in Abbildung 10b machen. Die Kurve, die die Kynureninkonzentrationen zeigt, die nach 72 Stunden im Überstand der nach 46 Stunden Stimulation gewaschenen Zellen gemessen worden waren, liegt unterhalb der Kynureninkonzentrationen, die direkt nach der 46stündigen Stimulation mit  $\text{INF}\gamma$  gemessen wurden. Trotz der fast doppelt so langen Stimulationszeit wie in Abbildung 10a, konnte in der weiteren Inkubationszeit von 26 Stunden nicht genauso viel Tryptophan zu Kynurenin abgebaut werden wie nach 24stündiger Stimulation mit  $\text{INF}\gamma$  und 46 Stunden weiterer Inkubation. Bei diesem Experiment wird ersichtlich, dass die Dauer vom Zeitpunkt der IDO-Induktion bis zum Entstehen von Kynureninmengen, die mit dem Ehrlichs Reagenz messbar sind, verglichen mit der zur IDO-Induktion benötigten Stimulationszeit mit  $\text{INF}\gamma$  recht lange ist.

In der Abbildung 10 c sieht man die Kynureninkonzentrationen, die im Überstand der über 72 Stunden mit  $\text{INF}\gamma$  stimulierten Zellen gemessen werden konnten. Hier wird wie bei der oberen Kurve in Abbildung 10 b und der höchsten Kurve in Abbildung 10 a ein Plateau erreicht, bei dem alles Tryptophan abgebaut wurde.

Es fiel bei dem Experiment auf, dass beim Absaugen des Überstandes mit der Pasteurpipette viele Zellen mit abgesaugt wurden. Um dies möglichst zu verhindern, wurden weitere Methoden erprobt. Bei dem nächsten Experiment wurde der Überstand mit der Multipipette abgesaugt. Der Nachteil dabei war, dass der Überstand nicht restlos entfernt werden konnte. Außerdem wurden ebenfalls recht viele Zellen mit abgesaugt. Die Kynureninkonzentrationen, die in diesem Experiment gemessen wurden, reichen daher auch nicht an die im vorhin dargestellten Experiment heran (ohne Abbildung). Bei einer weiteren Wiederholung des Experimentes wurde der Überstand mit einer dünnen Kanüle abgesaugt. Verglichen mit den beiden vorher dargestellten Methoden gingen dabei weniger Zellen beim Absaugen verloren. Das Ergebnis ist jedoch mit dem aus Abbildung 10 vergleichbar (ohne Abbildung). Diese Methode wurde in den weiteren Experimenten beibehalten.

Bei dem nächsten Kinetikexperiment wurde die IDO-Aktivität nicht nur anhand der Menge des gebildeten Kynurenins gemessen, sondern auch daran, ob Bakterienwachstum verhindert werden konnte oder nicht. Es wurden kürzere Stimulationszeiten ( 6, 12, 18 und 24 Stunden)

gewählt; und die Testreihen, bei denen später Kynurenin gemessen wurde, wurden nach jedem Waschen mit 50µg/ml Tryptophan supplementiert, um eine größere Menge an Substrat zur Verfügung zu stellen als in Iscov`s Medium enthalten ist. Da in den vorangegangenen Experimenten deutlich geworden war, dass die IDO allein für den Abbau des in Iscov`s Medium enthaltenen Tryptophans mindestens 24 Stunden braucht, wurden in diesem und den nächsten Experimenten 3 Tage nach der Stimulationszeit mit IFN $\gamma$  für den IDO-bedingten Katalysationschritt zur Verfügung gestellt. Die Abbildungen 11 a, b und c zeigen das Ergebnis des Experimentes.

**Abbildung 11a**

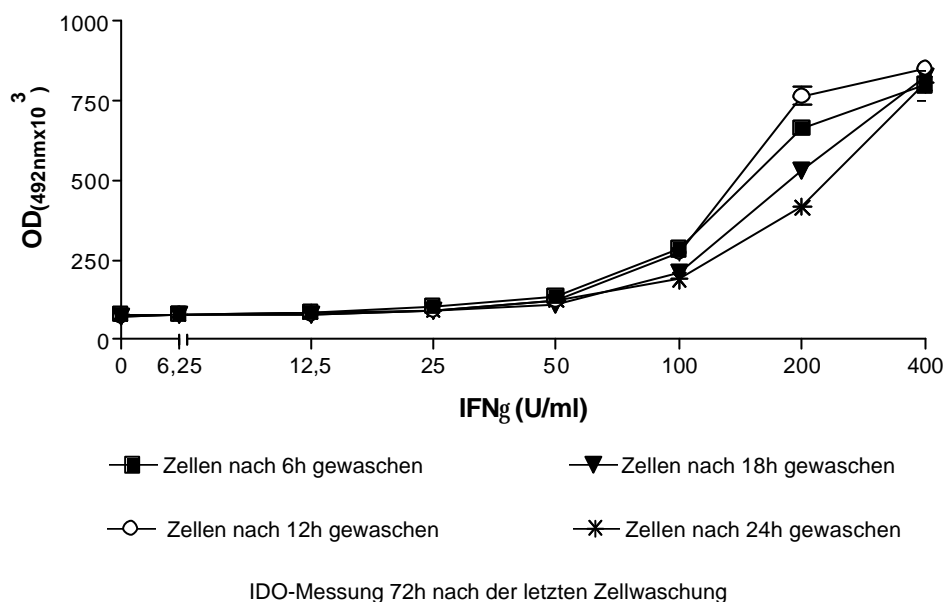
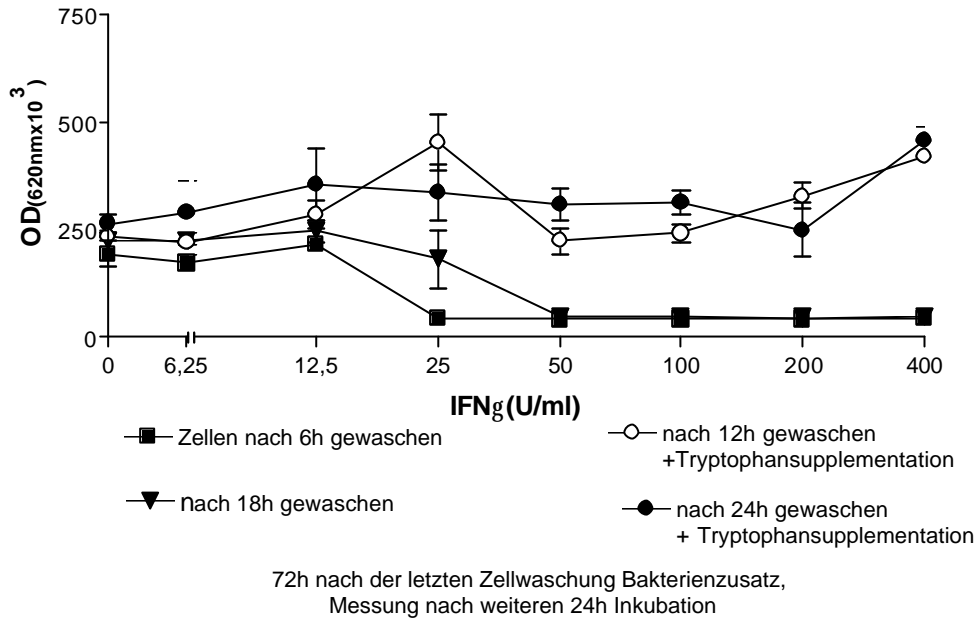


Abbildung 11b



**Abb. 11a+b:** 86HG39-Zellen wurden in Testplatten mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit weißem RPMI-Medium weiterinkubiert, bis 72 Stunden nach der letzten Zellwaschung vergangen waren. Ein Teil der Zellen wurde dabei mit inkubiert. Nach 6, 12, 18 bzw. 24 Stunden wurde das interferonhaltige Medium der Zellen entfernt, die Zellen 50 $\mu$ g/ml Tryptophan supplementiert. Bei diesen wurde dann die Menge des gebildeten Kynurenin photometrisch gemessen ( Abb.11a). Die anderen Zellen wurden nach den 72 Stunden mit einem Staphylokokkenstamm, von dem bereits bekannt war, dass er durch den IDO-bedingten Tryptophanmangel hemmbar ist, infiziert. Dabei erhielt die Hälfte dieser Zellen eine Supplementation mit 75 $\mu$ g/ml Tryptophan. Die Bakteriendichte wurde dann nach weiterer Inkubation von 24 Stunden photometrisch gemessen (Abb.11b).

Da das Experiment mit weißem RPMI Medium anstatt mit dem rötlich gefärbten Iscov's Medium durchgeführt worden war, beginnen in Abbildung 11 a die Kurven, die die Menge des gebildeten Kynurenins repräsentieren, welches im Überstand der nach verschiedenen Stimulationszeiten vom IFN $\gamma$  befreiten Zellen gebildet wurde, bei einer OD von ca. 0,078 anstatt wie in den vorherigen Experimenten mit ca. 0,190. Ab einer zur Stimulation verwendeten Konzentration von IFN $\gamma$  zwischen 12,5 und 25 U/ml erkennt man ein Ansteigen aller Kurven, jedoch noch ohne deutlichen Unterschied zwischen ihnen. Bei einer

Konzentration von 200 U/ml IFN $\gamma$  zeigt sich, dass im Überstand der Zellen, die nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden gewaschen worden waren, während der weiteren Inkubationszeit die größte Menge an Kynurenin entstanden war. Nach 6 stündiger Stimulation mit 200U/ml IFN $\gamma$  war in der weiteren Inkubationszeit weniger Tryptophan zu Kynurenin abgebaut worden. Unerwarteterweise liegen weiter darunter die Mengen des nach 18 und 24 Stunden Stimulationszeit gebildeten Kynurenins. In diesem Experiment reichte die 3tägige Inkubationszeit, die diese Zellen nach dem Entfernen des interferonhaltigen Mediums und der Hinzugabe von Tryptophan zur Verfügung hatten, um Tryptophan zu Kynurenin abzubauen, trotz längerer Stimulationszeit nicht aus, um ebensoviel Tryptophan abzubauen.

Bei einer Dosis von 400 U/ml IFN $\gamma$  gibt es jedoch keinen wesentlichen Unterschied mehr zwischen den Kynureninmengen, die nach den gewählten Stimulationszeiten gebildet wurden.

Bakterienwachstum wird bereits nach 6stündiger Stimulation mit 25 U/ml IFN $\gamma$  verhindert (Abb.11 b), nach 18stündiger Stimulation jedoch erst bei einer Dosis von 50U/ml. Die Wachstumshemmung konnte wie erwartet mit Tryptophan antagonisiert werden.

Es wurde ein weiteres Experiment mit noch kürzeren Stimulationszeiten durchgeführt. Bei diesem wurde das interferonhaltige Medium schon ca. 5 Minuten nach Hinzugabe entfernt. Der Effekt wurde wieder anhand der Menge des gebildeten Kynurenins und der Fähigkeit zur Hemmung von Bakterienwachstum gemessen. Die folgenden Abbildungen 12 a u. b zeigen das Ergebnis.

**Abbildung 12a**

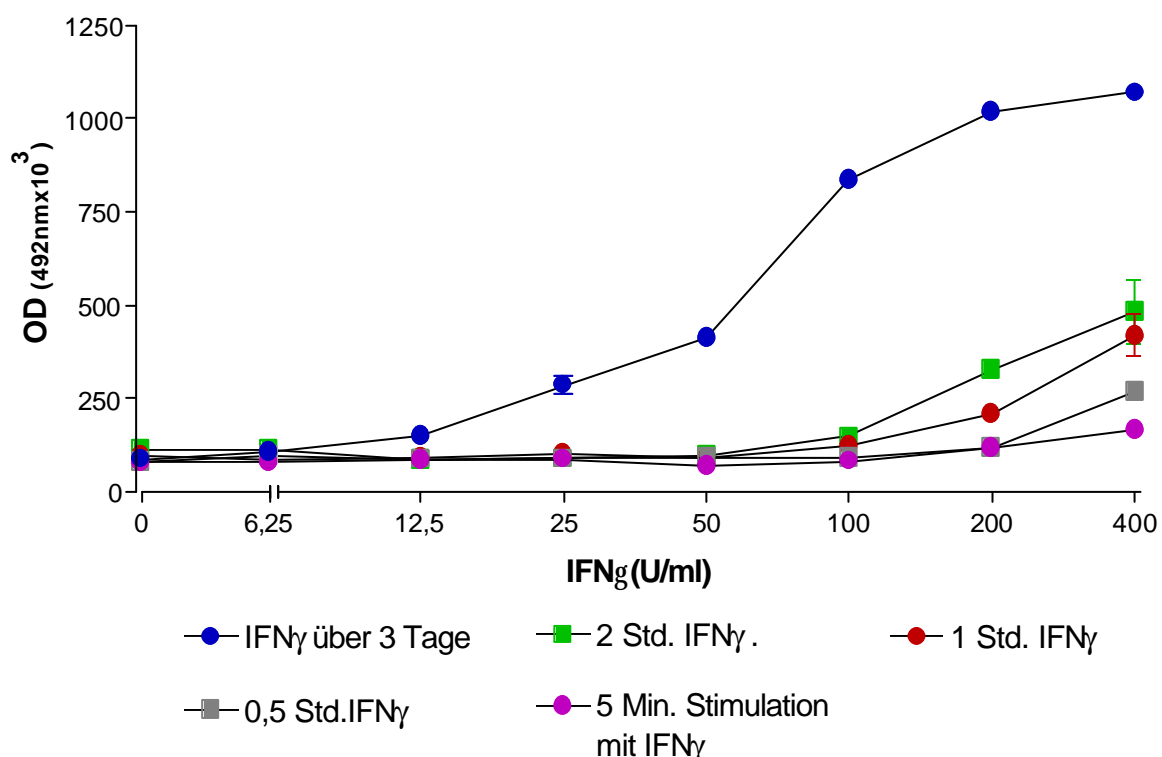
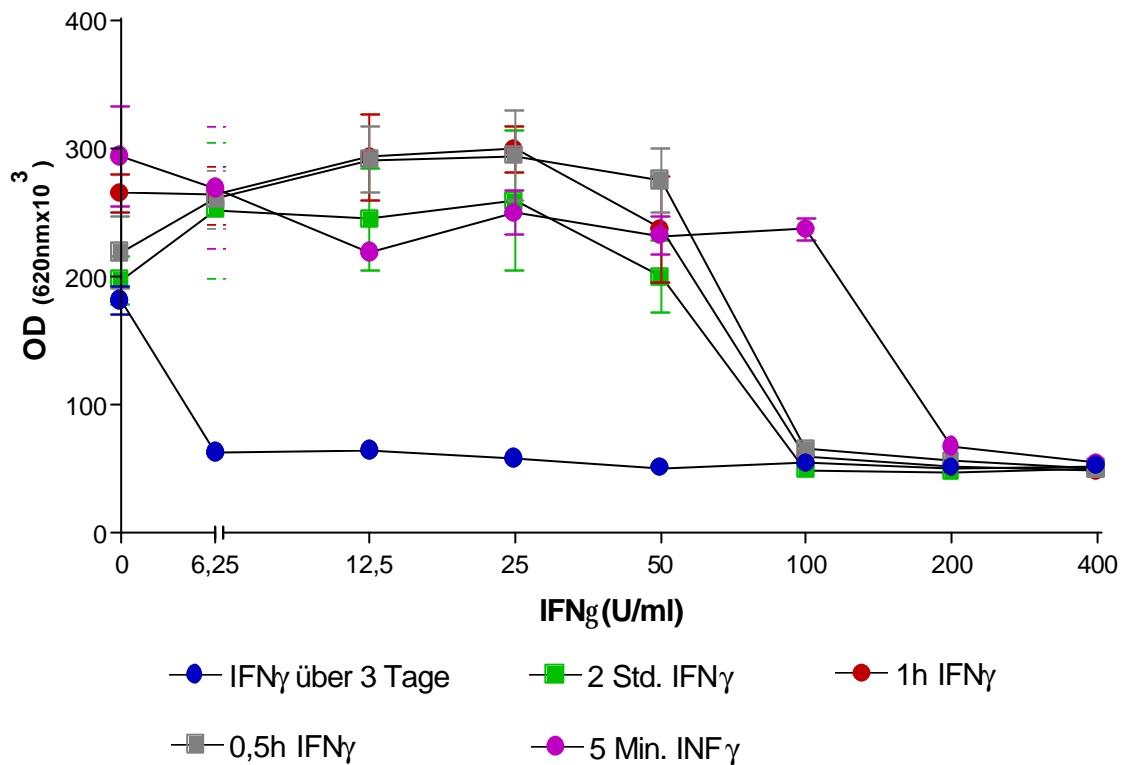


Abbildung 12b



**Abb. 12a und b:** 86HG39-Zellen wurden, nachdem sie in die Testplatten pipettiert worden waren, über 24 Stunden bebrütet, um sie adhären zu lassen. Dann wurden sie mit verschiedenen Konzentrationen von IFN $\gamma$  inkubiert. Nach 5 Minuten, 30 Minuten, 1 u. 2 Stunden wurde das interferonhaltige Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit weißem RPMI Medium weiterbebrütet, wobei zu den Zellreihen, in deren Überstand das Tryptophanabbauprodukt Kynurenin gemessen werden sollte, 50 $\mu$ g/ml Tryptophan hinzupipettiert wurden. Nach 3 Tagen wurde bei diesen das gebildete Kynurenin aus dem Überstand bei 492nm photometrisch gemessen ( Abb. 12a). Die anderen Zellreihen wurden mit einem bekannt hemmbaren Staphylokokkus aureus infiziert. Die Bakteriendichte wurde nach einem weiteren Inkubationstag bei 620nm photometrisch gemessen ( Abb. 12b).

In Abbildung 12a wird die durch IFN $\gamma$ -Stimulation induzierteIDO-Aktivität anhand des Tryptophanabbauproduktes Kynurenin demonstriert. Eine besonders große Kynureninmenge entstand nach einer dreitägigen Stimulation mit IFN $\gamma$  (blaue Kurve). Dort sieht man schon ab einer Stimulationsdosis von 12,5 U/ml anhand des Kurvenanstiegs einen Beginn der Kynureninproduktion. Das heißt, dass bereits eine Stimulation der Glioblastomzellen über 3

Tage mit 12,5 U/ml IFN $\gamma$  genügte, um das Enzym Indolamin 2,3 Dioxygenase meßbar zu induzieren.

Aber auch während der wesentlich kürzeren Stimulationszeiten konnte die IDO induziert werden. Deutlich zu sehen ist bei der Stimulationsdosis von 100U/ml IFN $\gamma$  ein Anstieg der Kurven, die die gebildete Kynureninmenge nach 1- bzw. 2stündiger Stimulation repräsentieren. Bei einer Stimulation mit 200 U/ml IFN $\gamma$  erkennt man, dass auch nach 30minütiger und sogar nach 5minütiger Stimulation Kynurenin entstanden und somit auch hierbei IDO induziert worden ist.

Was das für die Hemmung von Bakterienwachstum bedeutet, sieht man in der Abbildung 12b. Bei einer Stimulation der Zellen über eine halbe, einer bzw. zwei Stunden mit einer Konzentration von 100U/ml IFN $\gamma$  konnte die IDO in ausreichender Menge induziert werden, um Bakterienwachstum zu verhindern. Bei einer Konzentration von 200U/ml IFN $\gamma$  reichte dazu sogar eine Stimulationszeit von 5 Minuten aus.

## IV. Diskussion

Das Cytokin IFN $\gamma$ , welches von humanen CD4- und CD8-T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert wird, spielt eine große Rolle in der körpereigenen Abwehr von Infektionen.

Als erstes wurde seine antivirale Wirksamkeit anhand der Fähigkeit, Virusreplikation in Fibroblasten zu verhindern, entdeckt ( Isaacs, 1957; Wheelock, 1965).

1966 wurde erstmals eine Produktion von IFN $\gamma$  während einer Infektion durch *Toxoplasma gondii* beobachtet ( Freshman et al., 1966; Rytel and Jones, 1966).

1974 wurde von Anderson und Remington die Entdeckung gemacht, dass humane Makrophagen eine Infektion mit Toxoplasmen überstanden, wenn sie zusammen mit Lymphozyten und Toxoplasmenantigenlysate (TLA) kultiviert wurden. Später wurde gezeigt, dass die Makrophagen auch die Infektion mit Toxoplasmen überstanden, wenn sie allein im Überstand der mit TLA stimulierten Lymphozyten kultiviert wurden ( Jones et al., 1975; Borges und Johnson, 1975; Sethi et al., 1975; Anderson et al., 1976; Shirihata et al., 1975).

IFN $\gamma$  konnte für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden, nachdem in Experimenten, in denen Fibroblasten mit IFN $\gamma$  stimuliert worden waren, eine intrazelluläre Vermehrung von Toxoplasmen verhindert werden konnte ( Shirihata u. Shimizu, 1980). In Experimenten mit humanen Makrophagen konnte dieser Effekt des IFN $\gamma$  ebenfalls gezeigt werden ( Nathan et al., 1983).

Einer der Mechanismen, der in den humanen Zellen nach Stimulation mit IFN $\gamma$  wirksam wird, konnte von Pfefferkorn geklärt werden. Wie schon in der Einleitung geschrieben, bewies er, dass ein nach Stimulation von humanen Fibroblasten mit IFN $\gamma$  entstandener Tryptophanmangel die intrazelluläre Vermehrung der Toxoplasmen verhinderte ( Pfefferkorn et al., 1984). Dass das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase diesen Tryptophanabbau katalysiert, zeigte er 1986 (Pfefferkorn et al., 1986). Bei humanen Makrophagen konnte noch ein anderer durch IFN $\gamma$  induzierter antimikrobieller Mechanismus nachgewiesen werden: die Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, auch als „oxidative burst“ bezeichnet ( Nathan et al., 1983). In murinen jedoch kaum in humanen Makrophagen/ Monozyten hat die Produktion von Stickstoffmonoxid nach Stimulation mit IFN $\gamma$  eine große Bedeutung ( Adams et al., 1990; Reiling et al., 1991; Weinberg et al., 1995; Cameron et al., 1990). Eine immunregulatorische Wirkung von IFN $\gamma$  ist die vermehrte Produktion von MHC-II-Antigenen ( Janeway et al., 1984; Däubener et al., 1992), deren Bedeutung bereits in der Einleitung erläutert wurde.



In dieser Arbeit ging es vor allem um die durch Stimulation mit IFN $\gamma$  hervorgerufene Induktion des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase und den dadurch bewirkten Abbau von Tryptophan zu Formylkynurenin. Auf die anderen durch IFN $\gamma$  induzierten antiparasitären Mechanismen sollte im Rahmen dieser Arbeit experimentell nicht näher eingegangen werden.

Nachdem nun schon für *Toxoplasma gondii* und *Chlamydia psittaci* als obligat intrazelluläre Erreger sowie für Streptokokken als einzige Vertreter extrazellulärer Erreger die Hemmbarkeit durch die IFN $\gamma$  induzierteIDO-Aktivität nachgewiesen wurde, lag der Schwerpunkt dieser Arbeit zunächst auf der Erforschung, welche weiteren extrazellulären Erreger durch denIDO-bedingten Tryptophanabbau an ihrer Vermehrung gehindert werden.

Bei dem zur Klärung dieser Frage durchgeführten Bakterienscreening wurden standardmäßig 86HG39-Zellen mit 200U/ml IFN $\gamma$  über 3 Tage stimuliert, bevor sie mit den zu untersuchenden Bakterien infiziert wurden. Die Glioblastomzelllinie 86HG39 wird seit 1992 in unserer Arbeitsgruppe verwendet. Die Fähigkeit,IDO zu exprimieren und dadurch tryptophanabhängige Erreger in ihrem Wachstum zu hemmen, verliert sie auch nach hunderten Passagen nicht ( Abb.1). Die zur Stimulation dieser Zellen verwendete Dosis von 200U/ml IFN $\gamma$  hatte sich als sichere Dosis erwiesen, die ausreicht,IDO zu induzieren

( Däubener et al., 1994) und um Bakterienwachstum zu unterdrücken ( MacKenzie et al., 1998;). Dies galt auch für die Stimulationszeit von 3 Tagen ( Däubener et al. 1994, 1996; MacKenzie et al., 1998). Als ausreichend, um die bei diesen Bedingungen erreichte Hemmung von Bakterienwachstum aufzuheben, erwies sich eine Supplementation mit 75 $\mu$ g/ml Tryptophan. In den Experimenten mit 20 Streptokokken der Gruppe B und 20 Pneumokokken, die 1998 durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden ( MacKenzie et al., 1998), wurden dazu 2mg/ml verwendet.

Zunächst wurden *Staphylokokkus aureus*- und *Staphylokokkus epidermidis* Stämme auf ihre Hemmbarkeit durch dieIDO-Aktivität untersucht. Verglichen mit den 1998 veröffentlichten Experimenten, bei denen alle 20 Stämme der B-Streptokokken jedoch nur einer von 20 Pneumokokkenstämmen durch denIDO-bedingten Tryptophanmangel gehemmt wurden, ließen sich nun ungefähr die Hälfte der *Staphylokokkus aureus* Stämme dafür aber fast alle *Staphylokokkus epidermidis* Stämme durch den Tryptophanmangel im Wachstum unterdrücken. Beeindruckend ist hierbei, dass Multiresistenzen gegen Antibiotika und Wachstumshemmung durch Tryptophanmangel in keiner Weise korrelieren: der Anteil der hemmbaren Stämme von ca. 50% war sowohl bei den oxacillinresistenten wie auch den oxacillinsensiblen *Staphylokokken* vorhanden. Und unter den jeweils 12 getesteten oxacillinresistenten bzw. oxacillinsensiblen *Staphylokokkus epidermidis* Stämmen befanden

sich je 1 bzw. 2 nicht hemmbare Stämme. Dass lediglich die Tryptophanverarmung eine so beachtliche Wirksamkeit hinsichtlich einer Infektion mit oxacillinresisten Staphylokokken hat, macht die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse so bemerkenswert. Infektionen mit oxacillinresisten Staphylokokken sind besonders gefürchtet, da sie kaum in den Griff zu bekommen sind. Krankenhauspatienten, die mit einem ORSA besiedelt sind, werden isoliert, und das Personal muss entsprechende Schutzkleidung tragen, um nicht ebenfalls mit ORSA besiedelt zu werden. ORSA Infektionen mit IFN $\gamma$  zu behandeln, zeigt hier neue Möglichkeiten auf.

Auch die im Rahmen dieser Arbeit entdeckte und 1998 veröffentlichte Tatsache ( MacKenzie et al., 1998), dass alle Enterokokken durch IDO-katalysierten Tryptophanabbau im Wachstum unterdrückt werden, ist besonders interessant. Vancomycinresistente Enterokokken galten lange Zeit als nicht therapierbar, da sie gegen alle Antibiotika/ Chemotherapeutika resistent waren. Seit kurzem existieren zwei Medikamentengruppen, die der Oxazolidinone und die der Streptogramine, die bei Infektionen mit vancomycinresistenten Enterokokken wirksam sind. Ob jedoch die vancomycinresistenten Enterokokken auch hier gegen Resistenzen entwickeln bleibt abzuwarten. In diesem Fall könnte allein die Tatsache, dass sie sich ausnahmslos alle allein durch Tryptophanmangel nicht mehr vermehren lassen, das Problem, vor dem Mediziner lange Zeit standen, möglicherweise lösen.

Da die Induzierbarkeit des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase in vielen humanen Geweben nachgewiesen werden konnte, liegt die Idee nahe, Infektionen mit IFN $\gamma$  zu behandeln. Allein in dieser Arbeit wurden 3 Zelltypen, die die IDO exprimieren können, verwendet: Fibroblasten, uroepitheliale Zellen und stellvertretend für Astrozyten, die ebenfalls IDO exprimieren, Glioblastomzellen. Im Vergleich zu professionellen Phagozyten sind diese Zellen in den entsprechenden Geweben in großer Anzahl vorhanden. Ihre Stimulation mit IFN $\gamma$  könnte einen potenten antimikrobiellen Mechanismus darstellen.

Bereits 1992 wurde von Miles der Einsatz von IFN $\gamma$  als Therapeutikum in Erwägung gezogen. Er diskutierte die Kombinationstherapie aus IFN $\gamma$  plus Antibiotika/ Chemotherapeutika.

Nicht außer Acht zu lassen sind natürlich auch die Nebenwirkungen von IFN $\gamma$  wie z.B. gastrointestinale und zentralnervöse Störungen.

Gänzlich wirkungslos jedoch scheint der Einsatz von IFN $\gamma$  bei Infektionen mit gramnegativen Erregern zu sein. Keines der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten gramnegativen Bakterien ließ sich durch IDO-bedingten Tryptophanabbau im Wachstum unterdrücken. Es ist zu vermuten, dass diese Bakterien wie bereits an *Escherichia coli* gezeigt, Tryptophan selber

synthetisieren können (Lane et al., 1983; Payne et al., 1987; Ashworth et al., 1986; Miles et al., 1987; Sibley et al., 1994).

Um jedoch eine Anwendung von IFN $\gamma$  in vivo zu diskutieren, muss erstmal die Wirkung von IFN $\gamma$  bezüglich IDO-Induktion in vitro genauer untersucht werden.

In der Literatur gibt es verschiedenste Angaben über zur effektiven IDO-Induktion benötigte IFN $\gamma$ - Konzentrationen und Stimulationszeiten. Des Weiteren wurden die Experimente hierzu an verschiedenen Zellen durchgeführt. Ebenfalls unterschiedlich sind die Methoden, mit denen das Ausmaß der IDO-Induktion gemessen wurde. Während einige Autoren den Tryptophanabbau oder die Kynureninproduktion bestimmten, wurde von anderen IDO-mRNA, das IDO-Protein selbst oder die Fähigkeit, Parasiten- bzw. Bakterienwachstum zu hemmen bestimmt.

Beispielsweise wurde schon 1986 von Byrne die Abhängigkeit der IDO-Induktion von der zur Stimulation eingesetzten IFN $\gamma$ -Konzentration und von der Stimulationsdauer anhand humaner Lungenfibroblasten demonstriert ( Byrne et al., 1986). Er inkubierte die Lungenfibroblasten über 20 und 44 Stunden mit 16-800U/ml IFN $\gamma$ . Anschließend wurden die Zellen mit tryptophansupplementiertem Medium über 4 Stunden weiterinkubiert. L-Tryptophan und Kynurenin wurden im Überstand chromatographisch gemessen. Dabei zeigte sich, dass bereits nach 20stündiger Stimulation mit 16U/ml IFN $\gamma$  die Menge an Tryptophan verglichen mit der Kontrolle abzunehmen und die Kynureninmenge zuzunehmen begann. Bemerkenswert war, dass nach 44stündiger Inkubation mit 160U/ml IFN $\gamma$  mehr Tryptophan zu Kynurenin abgebaut war als nach 20stündiger Inkubation mit 800U/ml IFN $\gamma$ . Bei diesem Ergebnis lässt sich vermuten, dass die Abhängigkeit der IDO-Induktion von der Stimulationszeit größer ist als von der zur Stimulation eingesetzten IFN $\gamma$  Konzentration.

Takikawa veröffentlichte 1988 Experimente, bei denen er 11 verschiedene humane Zelllinien mit 1000U/ml IFN $\gamma$  stimulierte. Eine Enzyminduktion konnte er in 7 der 11 Zelllinien nach 12-18 Stunden nach Hinzugabe des Interferons feststellen, indem er die Kynureninproduktion im Überstand bestimmte (Takikawa et al., 1988). In den anderen 4 Zelllinien wurde auch nach längerer Stimulationszeit mit 10000U/ml IFN $\gamma$  keine IDO induziert. In den Experimenten, die durch unsere Arbeitsgruppe veröffentlicht wurden, wurden die Zellen in der Regel 3 Tage lang mit IFN $\gamma$  stimuliert.

Diese und noch viele weitere verschiedene Angaben über IFN $\gamma$ -Konzentrationen und Stimulationsdauer, durch die IDO-Aktivität induziert wurde, waren der Anlass für die mit der Glioblastomzelllinie 86HG39 durchgeführten Kinetikexperimente.

Hierdurch sollten für die *in vitro* Bedingungen, in denen diese Zellen kultiviert wurden, genaue Aussagen darüber getroffen werden können, wie lange die Zellen mit bestimmten IFN $\gamma$ -Konzentrationen stimuliert werden müssen, umIDO zu induzieren und Bakterienwachstum im Umgebungsmilieu zu verhindern.

Bei diesen Experimenten wurden Stimulationszeiten von 5 Minuten bis hin zu 3 Tagen mit IFN $\gamma$ -Konzentrationen von 6,25 U/ml bis 400U/ml verwendet.

Mit Hilfe des Ehrlich`s Reagenz ließ sich Kynurenin bereits nach einer Stimulation der 86HG39-Zellen mit 6,25U/ml IFN $\gamma$  über 46 Stunden im Überstand nachweisen ( s. Abb. 10b). Ersetzte man nach dieser Zeit das Medium durch frisches Iscov`s Medium, so konnte in einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden nicht genauso viel Tryptophan zu Kynurenin abgebaut werden wie in den 46 Stunden zuvor. Hier lag deshalb die Vermutung nahe, dass Transkription in IDO-mRNA und Translation in soviel IDO-Protein, dass dessen Wirkung mit Hilfe des Ehrlich`s Reagenz nachgewiesen werden kann, eine recht lange Zeit von über 24 Stunden benötigen. Aus diesem Grunde wurden in den weiteren Experimenten 72 Stunden zusätzliche Inkubationszeit nach einem Mediumwechsel gewährleistet. Im Vergleich hierzu konnte in den vorhin erwähnten Experimenten von Byrne mittels Chromatographie ein deutlicher Tryptophanabbau während der 4stündigen Inkubationszeit der Lungenfibroblasten in tryptophansupplementiertem Medium nach Stimulation mit IFN $\gamma$  nachgewiesen werden.

Bezüglich der zur IDO-Induktion benötigten Stimulationszeiten und IFN $\gamma$ -Konzentrationen konnten jedoch in der vorliegenden Arbeit eindeutige Ergebnisse erzielt werden.

Aus Abbildung 12b wird ersichtlich, dass eine 5minutige Stimulation mit 200U/ml IFN $\gamma$  in den darauffolgenden 3 Tagen Inkubation einen derartigen Tryptophanabbau bewirkte, dass das Wachstum des nach den 3 Tagen hinzugegebenen Staphylokokkenstammes nicht mehr möglich war. Aus einem Tryptophantitrationsexperiment geht hervor, dass derselbe Staphylokokkenstamm erst ab einer im Medium vorhandenen Tryptophankonzentration von 6,25 $\mu$ g/ml wachsen konnte (s.Abb.6). Der Tryptophangehalt des Überstandes muß demnach von ca.16 $\mu$ g/ml, welche in Iscov`s Medium enthalten sind, auf unter 6,25 $\mu$ g/ml reduziert worden sein. Bei einer 3tägigen Stimulation reichten 6,25U/ml IFN $\gamma$  aus, um das Wachstum dieses Staphylokokkenstammes zu unterdrücken (s. Abb.12b). In einem weiteren Experiment mit einem anderen Staphylokokkenstamm mussten dafür 50U/ml IFN $\gamma$  eingesetzt werden ( s. Abb.1b). Auch Kynureninproduktion kann nach den genannten Stimulationsbedingungen gemessen werden (s.Abb 12a). Sie kann in allen drei in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien ( 86HG39, RT4, HS27) durch Tryptophansupplementation gesteigert werden ( s. z.B. Abb.7a). Diese Tatsache ist nicht selbstverständlich, wurde doch von Werner- Felmeyer in 7

von 9 IDO-induzierenden Zelllinien eine Verminderung der IDO-Aktivität nach Hinzugabe von Tryptophan beobachtet ( Werner-Felmeyer et al., 1989). Eine weitere Beobachtung in der vorliegenden Arbeit war, dass die Glioblastomzellen 86HG39 mit der gleichen Intensität bezüglich IDO-Induktion reagieren wie die Fibroblasten HS27.

Wichtig für eine mögliche in vivo Behandlung mit IFN $\gamma$  ist es nun zu wissen, dass eine 5minütige Stimulationszeit von Glioblastomzellen und Fibroblasten mit 200U/ml IFN $\gamma$  ausreicht, um IDO-Induktion zu bewirken. Diese Tatsache scheint in vivo realisierbar zu sein. Was jedoch unbedingt noch erforscht werden muss, ist die Zeit, die die IDO nach Induktion benötigt, um entsprechende Tryptophanmengen abzubauen. Denn nur selten hat man es im Körper mit abgekapselten Prozessen z. B. Abszessen zu tun, bei denen das Umgebungsmilieu der Zellen nicht ständig im Austausch mit anderen Flüssigkeiten steht. Hier würde die Zeit zum Tryptophanabbau nicht so drängen, da nicht ständig neues Tryptophan von außen zugeführt wird. Weiterhin müssten noch Experimente zur Klärung der Frage durchgeführt werden, ob die genannten Stimulationszeiten und IFN $\gamma$ -Konzentrationen auf alle IDO exprimierenden Zellen übertragbar sind.

## V. Literaturverzeichnis

**Adams, L.B., Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Krahenbuhl, J.L.; 1990:**

Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine.

J. Immunol. 117: 381.

**Anderson, S. E. , Bautista, S., Remington, J. S., 1976:**

Induction of Resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocyte products.

J. Immunol. 117: 381.

**Anderson, S. E., Remington, J. S., 1972:**

Effect of normal and activated macrophages on *Toxoplasma gondii*.

J. Exp. Med. 139: 1154.

**Ashworth, D.J., Chen, C.S., Mascarenhas, D, 1986:**

Direct observation of tryptophan biosynthesis in *Escherichia coli* by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy.

Anal. Chem. 58(3): 526-32.

**Borges, J. S., Johnson, W. D., 1975:**

Inhibition of multiplication of *Toxoplasma gondii* by human monocytes exposed to T-lymphocyte products.

J. Exp. Med. 141:483.

**Byrne, G.I., Lehmann, L.K., Kirschbaum, J.G., Borden, E.C., Lee, C.M., Brown, R.R., 1986:**

Induction of Tryptophan Degradation In Vitro and In Vivo: A  $\gamma$ - Interferon-Stimulated Activity.

J. Interferon Res. 6: 389-396.

**Byrne, G.I., Lehmann, L.K., Landry, G.J., 1986:**

Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells.

Infect.Immun. 53: 347-351.

**Cameron, M.L., Granger, D.L., Weinberg, J.D., Kozumbo, W.J., Koren, H.S., 1990:**

Human alveolar and peritoneal macrophages mediate fungistasis independently of L-arginine oxidation to nitrite or nitrate.

Am. Rev. Respir. Dis. 142: 1313.

**Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., Byrne, G.I., 1987:**

Biologic response modifier-induced indolamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures.

J. Immunol. 139:2414-2418.

**Carlin, J.M., Borden, E.C., Byrne, G.I., 1989:**

Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages.

J. Interferon. Res. 9: 329-37.

**Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., Byrne, G.I., 1989:**

Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.

J. Leukoc.Biol. 45:29-34.

**Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M., Byrne, G.I., 1989:**

Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages.

J. Interferon Res. 9: 329-337.

**Carlin, J.M., Ozaki, Y., Byrne, G.I., Brown, R.R., Borden, E.C., 1989:**

Interferons and indoleamine 2,3-dioxygenase: Role in antimicrobial and antitumor effects.

Experientia 45: 535:

**Däubener, W., Seghroushni, S., Wernet, P., Bilzer, T., Fischer, H.G., Hadding, U.; 1992:**

Human glioblastoma cell line 86HG39 activates T cells in an antigen specific major histocompatibility complex class II-dependent manner.

J. Neuroimmunol. 41:21.

**Däubener, W., Pilz, K., Seghroushni Zennati, S., Bilzer, T., Fischer, H.G., Hadding, U., 1993:**

Induction of Toxoplasmosis in an human glioblastoma by interferon- $\gamma$ .

J. Neuroimmunol. 43: 31-38.

**Däubener, W., Wanagat, N., Pilz, K., Seghroushni- Zennati, S. Fischer, H.G., Hadding, U., 1994:**

A new, simple bioassay for human IFN $\gamma$ .

J. Immunol. Methods 168: 39-47.

**Däubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., et al., 1996:**

Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells- role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha.

Eur. J. Immunol. 26: 487-92.

**Däubener, W., Hadding, U., 1997:**

Cellular immune reactions directed against Toxoplasma gondii with special emphasis on the central nervous system.

Med. Microbiol. Immunol. 185: 195-206.

**De La Maza, L.M., Peterson, E.M., Fennie, C.W., Czarniecki, C.W., 1985:**

The antichlamydial and anti-proliferative activities of recombinant murine interferon- $\gamma$  are not dependent on tryptophan concentrations.

J. Immunol.135: 4198-4200.

**Freshman, M.M. et al. 1966:**

In vitro and in vivo antiviral action of an interferon-like substance induced by *Toxoplasma gondii*.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123: 862.

**Handwerger, S., Raucher, B., Altarac, D. et al., 1993:**

Nosocomial outbreak due to *Enterococcus faecium* highly resistant to vancomycin, penicillin and gentamycin.

Clin. Infect. Dis. 16: 750-755.

**Hayaishi, O., Hirata, F., Ohnishi, J.-P. H., Rosenthal, I., Katoh, A. 1977:**

Indoleamine 2,3-Dioxygenase.

J. of Biol. Chem. 252: 3548-3550.

**Higushi, K., Kuno, S., Hayashi, O., 1963:**

Enzymatic formation of D-kynurenine.

Federation Proc. 22: 243.

**Jones,R.N., Sader, H.S., Erwin, M.E., Anderson, S.C., 1995:**

Emerging multiply resistant enterococci among clinical isolates. I. Prevalence data from 97 medical center surveillance study in the United States. Enterococcus Study Group.

Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 21: 85-93.

**Jones, T. C., Len, L., Hirsch, 1975:**

Assessment in vitro of immunity against *Toxoplasma gondii*.

J. Exp. Med. 141:66

**Lane, A.N., Kirschner, K., 1983:**

The quaternary structure of tryptophan synthase from *Escherichia coli*. Fluorescence and hydrodynamic studies.

Eur. J. Biochem. 129(3): 675-84.

**MacKenzie, C. R., Hadding,U., Däubener, W., 1998:**

Interferon-Induced Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Cord Blood Monocyte-Derived Macrophages Inhibits the Growth of Group B Streptococci.

J.of Inf. Dis. 178: 875-878.

**MacKenzie, C.R., Willberg, C.B., Däubener,W., 1998:**

Inhibition of group B streptococcal growth by IFN $\gamma$ -activated human glioblastoma cells.

J.of Immunol. 89:191-197.

**MacKenzie, C.R., Hucke, C., Müller, D., Seidel, K., Takikawa, O., Däubener,W., 1999:**

Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon- $\gamma$ -activated human uro-epithelial cells

J.Med.Microbiol. 48: 935-941.

**Miles, E.W., Bauerle, R., Ahmed, S.A., 1987:**

Tryptophan synthase from *Escherichia coli* and *Salmonella thyphimurium*.

Methods Enzymol. 142: 398-414.



**Miles H. Beaman, Sin-Yew Wong, Jack S. Remington, 1992:**

Cytokines, Toxoplasma and Intracellular Parasitism.  
Immunological Revue 127: 97- 117

**Murray, H.W., Szuro-Sudo, A., Wellner, D., Oca, M.J., Granger, A.M., Libby, D.M., Rothermel, C.D., Rubin, B.Y.; 1989:**

Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages.  
Infect. Immun. 57: 845-849.

**Nathan, C.F., Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y.; 1983:**

Identification of interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.  
J. Exp. Med. 158: 670-689.

**Ohnishi, T., Hirata, F., Hayaishi, O., 1977:**

Indoleamine 2,3-Dioxygenase.  
J. of Biol. Chem. 252: 4643- 4647

**Payne, R.C., Nichols, B.P., Hecht, S.M., 1987:**

Escherichia coli tryptophan synthase: synthesis of catalytically competent alpha subunit in a cell-free system containing preacylated tRNAs.  
Biochemistry ( United States) 26(11): 3197-205.

**Paguirigan, A.M., Byrne, G.I., Becht, S., Carlin, J.M, 1994:**

Cytokine-Mediated Indoleamine 2,3-Dioxygenase Induction in Response to Chlamydia Infection in Human Macrophage Cultures.  
Inf. and Immun. 62: 1131-1136.

**Pfefferkorn, E.R., Guyre, P.M., 1984:**

Inhibition of growth of Toxoplasma gondii in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon.  
Infect. Immun. 44: 211.

**Pfefferkorn, E.R., 1984:**

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

**Pfefferkorn, E.R., Rebhun, S., Eckel, M., 1986:**

Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts.  
J. Interferon Res. 6: 267-279.

**Pfefferkorn, E.R., Eckel, M., Rebhuhn, S., 1986:**

Interferon- $\gamma$  suppresses the growth of Toxoplasma gondii through starvation for tryptophan.  
Mol. Biochem. Parasitol. 20: 215-224.

- Reiling, N., Ulmer, A.J., Duchrow, M., Ernst, M., Flad, H.-D., Hauschildt, S., 1994:**  
Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages.  
Eur. J. Immunol. 24: 1941-1944.
- Rytel, M.W. and Jones, T.C., 1966:**  
Induction of interferon in mice infected with *Toxoplasma gondii*.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123: 859.
- Sehti, K.K., Pelster, B., Suzuki, N., Pierkarski, G., Brandis, H., 1975:**  
Immunity to *Toxoplasma gondii* induced in vitro in non-immune mouse macrophages with specifically immune lymphocytes.  
J. Immunol. 115:1151.
- Shimizu, T., Nomiya, S., Hirata, F., Hayashi, O., 1978:**  
Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties.  
J. Biol. Chem. 253: 4700-4706.
- Shirihata, T., Shimizu, K., Suzuki, N., 1975:**  
An in-vitro study on lymphocyte-mediated immunity in mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*.  
Jpn. J. Vet. Sci. 37: 235.
- Shirihata, T., Shimizu, K., 1980:**  
Production and properties of immune interferon from spleen cell cultures of *Toxoplasma*-infected mice.  
Microbiol. Immunol. 24:1109.
- Shirihata, T., Mori, A., Ishikawa, H., Goto, H., 1986:**  
Strain differences of interferon-generating capacity and resistance in *Toxoplasma*-infected mice.  
Microbiol. Immunol. 30: 1307.
- Sibley, D., Messina, M., Niesman, I.R., 1994:**  
Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 5508-5512.
- Stroud, L., Edwards, J., Danzing, L., Culver, D., Gaynes, R., 1996:**  
Risk factors for mortality associated with enterococcal bloodstream infections.  
Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 17: 576-580.
- Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F., Kido, R., 1988:**  
Mechanism of Interferon- $\gamma$  Action.  
J. Biol. Chem. 263: 2041-2046.
- Turco, J., Winkler, H.H., 1986:**  
Gamma-interferon-induced inhibition of the growth *Rickettsia prowazekii* in fibroblasts cannot be explained by the degradation of tryptophan or other amino acids.  
Infect. Immun. 53: 38-46.

**Wade, J.J., Rolando, N., Williams, R., Casewell M.W., 1995:**  
Serious infections caused by multiply-resistant *Enterococcus faecium*.  
*Microb. Drug Resist.* 1: 241-243.

**Weinberg, J.B., Misukonis, M.A., Shami, P.J., Mason, S.N., Sauls, D.L., Dittman, W.A., Wood, E.R., Smith, G.K., McDonald, B., Bachus, K.E., Haney, A.F., Granger, D.L., 1995:**  
Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS): analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages.  
*Blood* 86: 1184–1195.

**Werner-Felmeyer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger G., Wachter, H., 1989:**  
Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro.  
*Biochem. Biophys. Acta* No. 1012: 140-147.

**Wheelock, E.F., 1965:**  
Interferon-like virus inhibitor induced in human leucocytes by phytohemagglutinin.  
*Science* 149: 310-311.

**Woodman, J. P., Dimier, I.H., Bout, D.T., 1991:**  
Human endothelial cells are activated by IFN $\gamma$  to inhibit *Toxoplasma gondii* replication.  
*J. of Immunol.* 147: 2019-2023.

## VI. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag.	Antigen
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CFU	colony forming units
Da	Dalton
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
GBS	Streptokokken der Gruppe B
h	Stunden
HLA	Human leucocyte antigen
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	major histocompatibility complex
OD	optische Dichte
ORSA	oxacillinresistenter Staphylokokkus aureus
PBS	phosphate buffered saline
rpm	rounds per minute
s.	siehe
s.o.	siehe oben
Stiko	ständige Impfkommision
TLA	Toxoplasma Lysate Antigen
TNF	Tumornekrosefaktor
Trp.	Tryptophan
U	unit(s)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. U. Hadding danke ich für die Aufnahme und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie sowie in besonderem Maße für seine motivierende Unterstützung und Anteilnahme, die zur Fertigstellung dieser Arbeit beitrugen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Däubener, der mir das Thema dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat, für die sehr gute Betreuung bei der Durchführung der Experimente, seine wertvollen Ratschläge und nicht zuletzt für die unendliche Geduld beim Zusammenschreiben dieser Arbeit.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Institutes, mit denen ich eine wunderschöne Zeit in der Mikrobiologie verbringen durfte. Besonders dankbar bin ich Frau C. Oberdörfer für wertvolle Tipps und Materialbeschaffung.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir dieses Studium ermöglicht haben. Bei meinen Geschwistern bedanke ich mich für die Lösung von Computerproblemen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

geboren am	25.01.1973 in Wuppertal
Eltern	Erich Müller, Sonderschulrektor i. R. Sigrid Müller, Dipl. Rechtspflegerin a.D.
Geschwister	Christian Müller-Tracht, Dipl. Ing. für Elektrotechnik Susanne Maka geb. Müller, staatl. geprüfte Motopädin
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch

## Ausbildungsdaten

Schulausbildung	1979- 1983	Grundschule Lindenstraße in Wülfrath
	1983- 1992	Städt. Gymnasium in Wülfrath
		Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Studium	1992 - 1999	Medizin, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
	Herbst 1994	Physikum
	Herbst 1995	1. Staatsexamen
	Frühjahr 1998	2. Staatsexamen
	Herbst 1999	3. Staatsexamen
		Gesamtnote: gut (2,16)

## Famulaturen

März 1995	Bethesda Krankenhaus in Wuppertal, Chirurgie
September 1995	Bethesda Krankenhaus in Wuppertal, Chirurgie
März 1996	Kinderklinik der Universitätsklinik Düsseldorf ( Frühgeborenenstation)

September 1996      Kinderklinik der Universitätsklinik Düsseldorf ( Ambulanz)

**Praktisches Jahr ( an der Universitätsklinik Düsseldorf)**

Okt. 1998 - Jan.1999      Innere Medizin: Kardiologie; Notaufnahme  
Feb.1999 - Mai 1999      Chirurgie: Kinderchirurgie; Allgemeine Chirurgie  
Mai 1999 - Sept. 1999      Pädiatrie (onkologische Ambulanz; Allgemeine  
Pädiatrie)

**AiP**

Dez.1999 – August 2000      Allg. Chirurgie und Unfallchirurgie;  
Städt. Klinikum Solingen  
September 2000- Mai 2001      Innere Medizin; St. Josefs Krankenhaus Hilden

**Assistenzärztin**

Juni 2001 - November 2001      Abteilung für Gastroenterologie; Kliniken Wuppertal  
seit Januar 2002      Innere Medizin; St. Josefs Krankenhaus Hilden

Wülfrath, den 19.06.2002

Dorothee Müller

## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der antimikrobiellen Wirkung des Enzyms Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO).

Dieses Enzym kann in fast allen humanen Zellen durch Stimulation mit IFN $\gamma$  induziert werden. Es katalysiert den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin.

Tryptophan ist für manche Mikroorganismen eine essentielle Aminosäure. Für *Toxoplasma gondii* und *Chlamydia psittaci* als intrazelluläre Erreger und B-Streptokokken als extrazelluläre Erreger konnte schon in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass sie durch den IDO-bedingten Tryptophanmangel, der nach Stimulation der Wirtszelle mit IFN $\gamma$  hervorgerufen wurde, nicht mehr wachsen konnten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere extrazelluläre Bakterien daraufhin untersucht, ob sie sich bei IDO-bedingtem Tryptophanmangel weiterhin vermehren können oder nicht. Dabei konnte festgestellt werden, daß ca. 40% aller *Staphylokokkus aureus* Stämme, ca. 90% aller *Staphylokokkus epidermidis* Stämme und alle Enterokokken durch diesen Mechanismus im Wachstum gehemmt werden. Selbst multiresistente Erreger wie oxacillinresistente *Staphylokokken* und vancomycinresistente Enterokokken waren gegenüber dem antimikrobiellen Effekt der IDO, welcher nach Stimulation mit IFN $\gamma$  in Gang gesetzt worden war, sensibel.

Bei dem Vergleich der hemmbaren Bakterienarten konnte ein unterschiedlicher Tryptophanbedarf festgestellt werden. *Staphylokokken* benötigen eine höhere Tryptophankonzentration als Streptokokken oder Enterokokken, um sich zu vermehren.

Eine Abhängigkeit von der Tryptophankonzentration im Medium konnte für keinen gramnegativen Bakterienstamm nachgewiesen werden. Wie es bereits für *Escherichia coli* gezeigt wurde, scheinen sämtliche gramnegative Bakterien Tryptophan selbst zu synthetisieren.

Ein wesentliches Thema in dieser Arbeit war zusätzlich die Abhängigkeit der IDO-Induktion von der Stimulationsdosis und der Stimulationszeit mit IFN $\gamma$ . Als wichtigstes konnte folgendes Ergebnis erzielt werden: Eine 5minutige Stimulation mit 200U/ml IFN $\gamma$  reicht aus, um die IDO zu induzieren und Bakterienwachstum zu hemmen. Dies könnte eine mögliche Einsetzbarkeit von IFN $\gamma$  bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen bedeuten. So ist es vorstellbar, dass in Zukunft Abszesse, die von multiresistenten Erregern verursacht wurden, durch lokale Spülung mit IFN $\gamma$  therapiert werden können. Ähnliches wäre bei Harnwegsinfekten mit vancomycinresistenten Enterokokken denkbar.