

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

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Klaus Pfeffer

Antimikrobieller und immunmodulatorischer Effekt von Tryptophanmetaboliten des Kynureninpfades

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Winterstein

2012

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. W. Däubener

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Sorg

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	- 7 -
1.1	Tryptophanabbau und die Indolamin 2,3-Dioxygenase	- 7 -
1.2	Die Metaboliten des Kynurenin-Pfades	- 10 -
1.3	<i>Toxoplasma gondii</i> und die Toxoplasmose	- 12 -
1.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	- 13 -
1.5	Zielsetzung der eigenen Arbeit	- 14 -
2	Material und Methoden	- 16 -
2.1	Material	- 16 -
2.1.1	Geräte	- 16 -
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	- 16 -
2.1.3	Medien und Puffer	- 17 -
2.1.4	Chemikalien	- 17 -
2.1.5	Zelllinien	- 18 -
2.1.6	Mikroorganismen	- 18 -
2.2	Methoden	- 19 -
2.2.1	Kultivierung von Zelllinien	- 19 -
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl für Experimente	- 19 -
2.2.3	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut	- 19 -
2.2.4	Bestimmung der Zellproliferation	- 20 -
2.2.5	Kryokonservierung von Zellen	- 20 -
2.2.6	Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> BK	- 21 -
2.2.7	Bestimmung der <i>Toxoplasma gondii</i> Proliferation	- 21 -
2.2.8	Bestimmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i>	- 22 -
2.2.9	Verwendung von Tryptophanmetaboliten	- 22 -
3	Ergebnisse	- 23 -
3.1	Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf die T-Zellaktivierung	- 23 -
3.2	Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von Tumorzellen	- 28 -
3.3	Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von <i>Toxoplasma gondii</i>	- 38 -

3.4	Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i>	- 45 -
4	Diskussion	- 47 -
5	Zusammenfassung	- 55 -
6	Literaturverzeichnis	- 56 -
7	Danksagung	- 64 -
8	Eidesstattliche Erklärung	- 65 -

II Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
AA	Antranilsäure (<i>Anthranilic acid</i>)
APC	Antigen-präsentierende Zellen, (<i>antigen presenting cells</i>)
Bq	Bequerel
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cfu	Kolonie-bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
engl.	englisch
FCS	fötales Kälberserum
GCN2	<i>general control non-derepressible</i>

ggf.	gegebenenfalls
^3H	Tritium
HAA	3-Hydroxyantranilsäure (<i>3-Hydroxyanthranilic acid</i>)
HKYN	3-Hydroxykynurenin
HSV	Herpes simplex Virus Typ I
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IDO-2	Indolamin 2,3-Dioxygenase-2
I. E.	Internationale Einheit
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves's Modified Dulbecco's Medium
ISR	Integrierte Stressantwort (<i>Integrated Stress Response</i>)
kDa	Kilodalton
KA	Kynureninsäure (<i>Kynurenic acid</i>)
KYN	Kynurenin
LK	Lymphknoten
M	Molar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
mL	Milliliter
NAD^+	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Rezeptor von T-Zellen
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
QA	Chinolinsäure (<i>Quinolinic acid</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler

sog.	sogenannt
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TCR	T-Zell Rezeptor (<i>engl. T Cell receptor</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
tRNA	Transfer-RNA
u. a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Weltweit sind Infektionskrankheiten wie z. B. Tuberkulose, Durchfallerkrankungen und AIDS die Todesursache Nummer Eins. Auslöser dieser Erkrankungen sind in erster Linie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Besonders von Infektionen betroffen sind Menschen mit geschwächtem Immunsystem, beispielsweise HIV-Infizierte oder Kinder mit angeborenen Immundefiziten, denn eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor Krankheitserregern zu schützen. Weitere immunologische Funktionen sind z. B. die Erkennung und Abstoßung von Tumoren und Transplantaten. Es gibt aber auch pathologische Immunantworten im Sinne von Allergien und Autoimmunkrankheiten. Grundsätzlich kann die Abwehr infektiöser Erreger in zwei Kategorien eingeteilt werden. Die angeborene Abwehr oder „innate immunity“ entspricht einer unspezifischen, schnellen Antwort auf körperfremde Substanzen. Elemente der „innate immunity“ sind beispielsweise das Komplementsystem auf humoraler sowie Phagozyten auf zellulärer Ebene. Wichtigste Bestandteile der erworbenen Abwehr oder „adaptive immunity“ sind Antikörper und Lymphozyten. Diese sind in der Lage, Pathogene spezifisch zu erkennen und zu eliminieren und bilden weiterhin das so genannte immunologische Gedächtnis, so dass bei erneutem Eindringen desselben Erregers dieser rascher erkannt und eliminiert werden kann. Diesen Mechanismus macht man sich bei Impfungen zu Nutze, indem man dem Immunsystem abgeschwächte Erreger, Oberflächenantigene von Mikroorganismen oder inaktivierte Giftstoffe präsentiert. Kommt es dann im späteren Leben zu einer Invasion durch den entsprechenden Erreger, kann das Immunsystem diesen meist schon vor Ausbruch der Erkrankung beseitigen bzw. sein Toxin unschädlich machen. Wichtig ist, dass diese beiden Systeme der Immunabwehr nicht losgelöst voneinander funktionieren, sondern stets zusammenarbeiten. So würden beispielsweise bei einer bakteriellen Infektion unspezifische Makrophagen die Erreger als fremd erkennen und phagozytieren, gleichzeitig aber auch die Fremdantigene den Zellen der „adaptive immunity“ präsentieren. Spezifische B-Lymphozyten würden dann im späteren Verlauf Antikörper gegen die bakteriellen Antigene produzieren, und dergestalt markierte Erreger könnten dann gezielt von Granulozyten beseitigt werden.

1.1 Tryptophanabbau und die Indolamin 2,3-Dioxygenase

Eine plausible Methode, das Wachstum von Mikroorganismen oder Zellen zu kontrollieren, ist der Entzug wichtiger Nähr- und Baustoffe. Ohne die Zufuhr von essenziellen Aminosäuren ist beispielsweise eine Bakterie nicht mehr zur Proteinbiosynthese fähig, und ohne die Synthese

von Zellproteinen ist keine Vermehrung durch Zellteilung möglich. Durch einen *in vitro* erzeugten Mangel der Aminosäure Tryptophan konnte bereits ein antimikrobieller Effekt auf diverse Krankheitserreger (z.B. Mackenzie *et al.*, 1998, Däubener *et al.*, 1993), aber auch eine Wachstumshemmung von Zellen des Immunsystems gezeigt werden (Munn *et al.*, 1998). Tryptophan ist eine aromatische Aminosäure und für Menschen essentiell. Außer zur Proteinbiosynthese dient es im menschlichen Körper noch zur Synthese der Neurotransmitter Serotonin und Melatonin; wegen seiner stimmungsaufhellenden Wirkung wird es als Antidepressivum eingesetzt (Sarris *et al.*, 2009). Das mit der Nahrung aufgenommene Tryptophan, welches nicht zur Synthese von Proteinen oder Neurotransmittern dient, wird im Wesentlichen von 3 Enzymen verstoffwechselt, der Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) und der Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2).

Die Tryptophan 2,3-Dioxygenase war das erste induzierbare Enzymsystem, welches bei Säugetieren entdeckt wurde (Knox und Mehler, 1951). Die TDO wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und katabolisiert, wie auch die IDO, die Oxidation von Tryptophan zu N-Formylkynurenin. Diese Reaktion stellt den ersten Schritt im so genannten Kynurenin-Pfad dar, dessen Produkte im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen. Die Hauptaufgabe der TDO ist die Homöostase des Tryptophanspiegels im Blut, sie wird u. a. induziert durch Tyrosin, Hydrokortison und Tryptophan (Taylor *et al.*, 1991). Darüber hinaus konnten auch, analog zur IDO, für die TDO antimikrobielle und immunregulative Wirkungsweisen nachgewiesen werden. So zeigten Schmidt *et al.* 2009, dass TDO-transfizierte HeLa-Zellen in der Lage waren, das Wachstum von Staphylokokken, *Toxoplasma gondii* und Herpes-Simplex-Virus Typ 1 zu hemmen. Des Weiteren konnten sie einen hemmenden Einfluss der TDO-positiven HeLa-Zellen auf die Proliferation von anti-CD3-stimulierten T-Zellen nachweisen.

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase wurde 1963 erstmals von Hayaishi *et al.* beschrieben. Sie besitzt wie die TDO eine Hämgruppe, die beiden Enzyme unterscheiden sich aber in diversen Punkten. Im Gegensatz zur TDO, welche ausschließlich Tryptophan katabolisiert, akzeptiert die IDO auch andere Stoffe wie z. B. Serotonin und Tryptamin als Substrat (Taylor *et al.*, 1991). Während die TDO bei Menschen vor allem in der Leber exprimiert wird, findet sich die IDO in nahezu allen humanen Zellen und in vielen Tumorzellen. Induziert wird die IDO-Expression durch das Zytokin Interferon Gamma (IFN- γ) (Pfefferkorn *et al.*, 1986). Die IDO-Aktivierung durch IFN- γ kann *in vitro* durch Addition von Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- α) im Sinne eines Synergismus noch erhöht werden, wie Däubener *et al.* 1996 in Versuchen mit Glioblastomzellen und Astrozyten zeigten, während die alleinige Behandlung mit TNF- α keine gesteigerte Enzymaktivität zur Folge hatte. Auch für Interleukin 1 (IL-1) und IFN- γ

konnte ein solcher synergistischer Effekt gezeigt werden (Babcock und Carlin, 2000 sowie Heseler *et al.*, 2008). Die katalytische Aktivität der IDO kann durch die Substitution von 1-Methyl-Tryptophan, einem kompetitiven Inhibitor der IDO, gehemmt werden (Sakurai *et al.*, 2002).

2007 entdeckten Ball *et al.* ein weiteres Enzym, welches die Reaktion von Tryptophan zu N-Formylkynurenin katabolisiert und eine der IDO ähnliche Genstruktur und -lokalisation aufweist. Dieses heute als Indolamin 2,3 Dioxygenase-2 (IDO-2) bezeichnete Enzym wird sowohl in humanen, als auch in murinen Zellen exprimiert. Die Expression der murinen IDO-2 ist in Niere, Leber, Hoden und Nebenhoden am höchsten, in humanen Zellen wird sie vorrangig in Plazenta, Gehirn und Uterus exprimiert (Ball *et al.*, 2007). Die Regulation der IDO-2 Expression sowie deren physiologische Funktion sind bis heute ungeklärt.

Der antimikrobielle Effekt der IDO wurde schon an vielen Mikroorganismen untersucht. So zeigte Pfefferkorn bereits 1984 und in den folgenden Jahren (Pfefferkorn *et al.*, 1986), dass IFN- γ stimulierte Fibroblasten das Wachstum von *Toxoplasma gondii* hemmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Tryptophan im Medium nahezu vollständig zu Kynurenin und anderen Metaboliten des Kynurenin-Pfades umgewandelt wurde. Dieser antiparasitäre Effekt der IDO konnte für viele weitere Zellen gezeigt werden. So wiesen Däubener *et al.* 1999 nach, dass IFN- γ stimulierte RT4-Zellen (Humanes Harnblasenkarzinom) das Wachstum von *Toxoplasma gondii* hemmen konnten, während die Zugabe von Tryptophan diesen Effekt aufhob. Auch in IFN- γ stimulierten Astrozyten konnten Oberdörfer *et al.* 2003 eine erhöhte IDO-Aktivität nachweisen, die eine Wachstumshemmung von *Toxoplasma gondii* zur Folge hatte. In Versuchen mit menschlichen Hirnendothelzellen (HBMEC) konnten Däubener *et al.* 2001 ebenfalls eine durch IFN- γ induzierte, erhöhte IDO-Aktivität und eine Toxoplasmostase nachweisen, welche durch Kostimulation mit TNF- α noch verstärkt wurden. Auch hier wurde der antiparasitäre Effekt durch die Zugabe von Tryptophan aufgehoben. Der antimikrobielle Effekt der IDO beschränkt sich nicht nur auf Parasiten. Auch das Wachstum von Bakterien wie *Chlamydia psittaci* (Byrne *et al.*, 1986), dem obligat intrazellulären Erreger der Ornithose, und den extrazellulären Bakterien *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001) und Streptokokken der Gruppe B (Mackenzie *et al.*, 1998) wird durch IFN- γ induzierte IDO-Aktivierung gehemmt. Des Weiteren besitzt die IDO einen antiviralen Effekt, wie beispielsweise Bodaghi *et al.* 1999 an einem *in vitro* Modell einer Cytomegalie-Virus-Retinitis zeigen konnten. Bei ihren Experimenten konnte eine Stimulation von Pigmentepithelzellen der Retina mit IFN- γ oder IFN- β eine starke Hemmung der Replikation von CMV hervorrufen. Die Zugabe von Tryptophan konnte die Replikationshemmung aufheben. Ähnliche Ergebnisse konnten Adams

et al. 2004 bei Versuchen mit dem Herpes Simplex Virus Typ 2 vorweisen. Durch IFN- γ stimulierte HeLa- und 86HG39-Zellen waren in der Lage, das Wachstum von HSV-2 signifikant zu hemmen. Durch Zusatz von TNF- α wurde dieser Effekt nochmals verstärkt. Die Zugabe von Tryptophan konnte auch hier den antimikrobiellen Effekt der IDO komplett aufheben. Darüber hinaus war ein starker Anstieg der Kynureninproduktion und der IDO-mRNA in den stimulierten Zellen messbar, wodurch ein Zusammenhang zwischen IDO-Aktivität und antiviraler Wirkung von IFN- γ gezeigt wurde.

Neben den geschilderten antimikrobiellen Effekten greift die IDO auch regulierend in Prozesse des Immunsystems ein. 1998 beobachteten Munn *et al.*, dass allogene befruchtete Mäuse, die mit dem IDO-Antagonisten 1-Methyl-Tryptophan behandelt wurden, sämtlich ihren Fötus abgestoßen hatten. Weiterhin zeigten sie, dass der Fötus ca. 1 Woche nach der Konzeption beginnt, IDO zu produzieren. Auch in der mütterlichen Plazenta konnte eine IDO-Aktivität nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass die systemische Tryptophankonzentration während der Schwangerschaft abfällt (Schröcksnadel *et al.*, 1996) entstand die Theorie, dass die lokale IDO-Aktivität und somit die lokale Tryptophanverarmung in der Plazenta notwendig sei, um eine Abstoßung des immunologisch fremden Fötus zu verhindern. Eine Theorie der immunregulativen Wirkung durch Tryptophanverarmung lieferten Munn *et al.* 2005. Durch die lokale Tryptophanverarmung kommt es zu einem Anstieg unbeladener Transfer-Ribonukleinsäure (t-RNA) in der Zelle, wodurch das Enzym GCN-2-Kinase aktiviert wird. Dieses Enzym startet ein Zellprogramm, welches „*integrated stress response*“ (ISR) genannt wird, und je nach Zelltyp unterschiedliche Effekte auslöst, z. B. Zelltod oder Zellzyklusarrest.

Andere Autoren postulierten wiederum, dass die IDO-vermittelte Immunsuppression auf die Wirkung von Tryptophanmetaboliten zurückzuführen sei. Terness *et al.* zeigten 2002, dass die Tryptophanmetabolite 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Kynurenin einen toxischen Effekt auf T-Zellen haben.

1.2 Die Metaboliten des Kynurenin-Pfades

Wie bereits erwähnt, wird der Großteil des mit der Nahrung aufgenommenen Tryptophan über die Enzyme TDO, IDO und IDO-2 zu L-Formylkynurenin abgebaut, und dann über weitere Enzyme zu diversen Metaboliten verstoffwechselt. Am Ende des sogenannten Kynurenin-Pfades steht unter anderem die Bildung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺). NAD⁺

ist ein sehr wichtiges Koenzym und spielt eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel als Oxidationsmittel (Berger *et al.*, 2004). Der Kynurenin-Pfad wird in Abbildung 1 dargestellt.

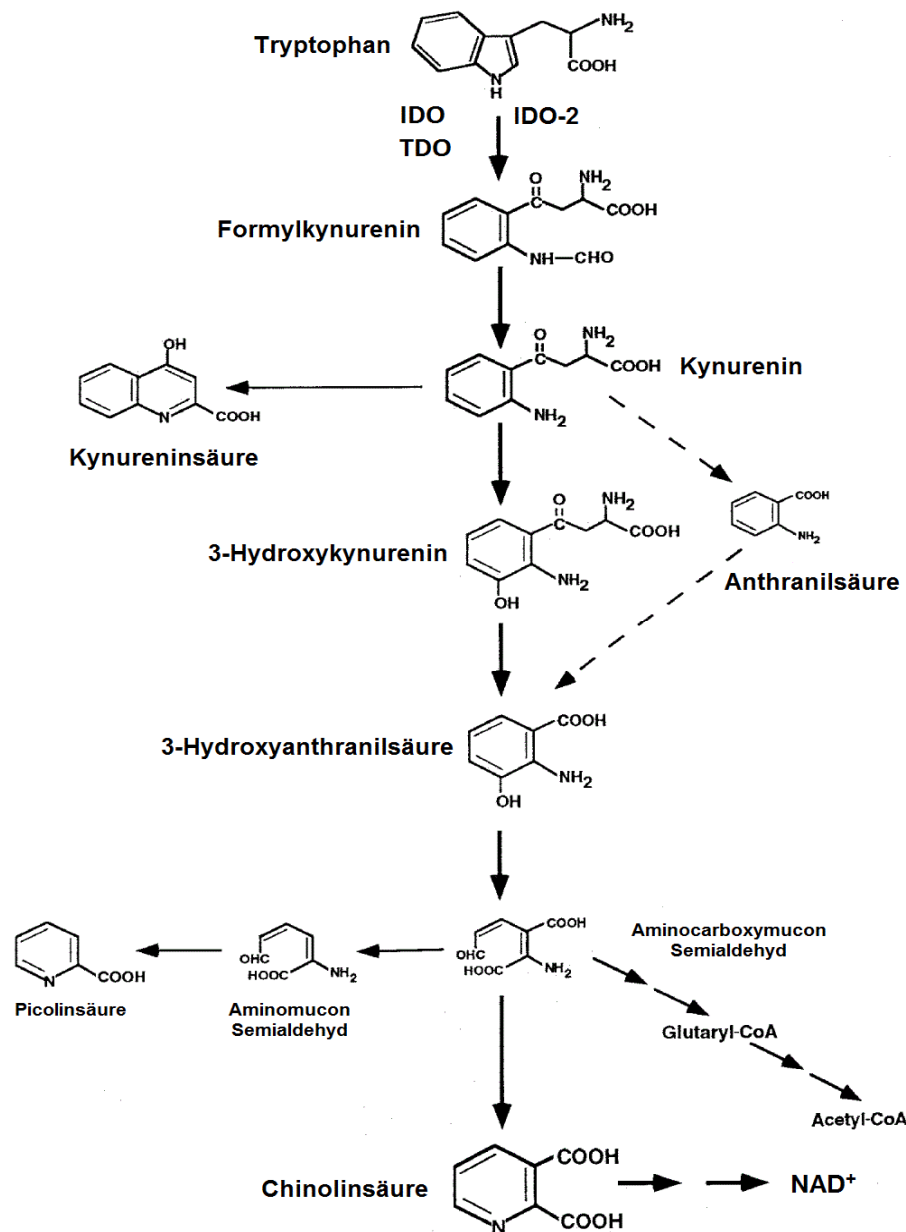


Abbildung 1: Der Kynurenin-Pfad

Durch IDO und TDO (und durch die IDO-2) wird Tryptophan zu N-Formylkynurenin abgebaut. In weiteren Reaktionen entstehen dann Kynurenin und andere Metaboliten, wie z. B. Chinolinsäure, welches zur Bildung von Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) benötigt wird. (Modifiziert nach Heyes *et al.*, 1992)

Einige der Tryptophanmetabolite, wie z. B. Chinolinsäure (QA), 3-Hydroxykynurenin (HKYN), 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA) und Kynureninsäure (KA), stehen im Mittelpunkt neurobiologischer und pharmakologischer Forschung. Sie spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen Prozessen wie Verhalten, Schlaf, Lernen und Gedächtnis, aber auch in der Pathophysiologie neurologischer Krankheiten wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und amyotropher Lateralsklerose (Stone *et al.*, 1993). So wirken HKYN und HAA

zelltoxisch auf Neurone, und bei diversen neurologischen Krankheiten wie z. B. der Huntington'schen Krankheit finden sich erhöhte Konzentrationen dieser Metaboliten im Gehirn (Okuda *et al.*, 1996). Auch Chinolinsäure besitzt eine neurotoxische Wirkung, welche auf ihrer Eigenschaft als N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-Agonist (Stone *et al.*, 1993) beruht. Chinolinsäure ist an der Pathogenese von diversen neurologischen Krankheiten beteiligt, so zeigen z. B. Patienten mit amyotropher Lateralsklerose, einer unheilbaren, degenerativen Motorneuronenerkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters, erhöhte Konzentrationen von Chinolinsäure in Serum und Liquor (Guillemin *et al.*, 2005). Die Neurotoxizität mit akutem Zelltod oder progredienter, neuronaler Fehlfunktion beruht laut Guillemin *et al.* auf diversen Wirkungsweisen, darunter einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt. Kynureninsäure hingegen wirkt als NMDA-Rezeptor-Antagonist neuroprotektiv und somit der neurotoxischen Wirkung von Chinolinsäure entgegen. (Stone *et al.*, 1993). Die Tatsache, dass diese Tryptophanmetabolite in die Pathophysiologie vieler Krankheiten involviert sind, erklärt auch die Forschung nach möglichen Medikamenten, welche das Gleichgewicht zugunsten der Neuroprotektion verschieben könnten (Stone *et al.*, 2000).

1.3 *Toxoplasma gondii* und die Toxoplasmose

Toxoplasma gondii (*T. gondii*) ist ein obligat intrazellulärer Parasit, welcher zu den Protozoen (Einzellern) gehört. Er ist einer der am weitesten verbreiteten Parasiten weltweit und hat auch in Industrieländern eine hohe Durchseuchungsrate. Dabei sind Menschen und andere Säugetiere wie z. B. Schafe und Ziegen die Zwischenwirte, Katzen und Katzenartige der eigentliche Endwirt. Aus dem Entwicklungszyklus werden an dieser Stelle drei Stadien genannt, welche auch in der Pathogenese der Toxoplasmose, der durch Infektion mit *T. gondii* ausgelösten Krankheit, eine Rolle spielen. Oozysten werden mit dem Fäzes von Katzen ausgeschieden, sind sehr umweltresistent und behalten ihre Infektiosität lange bei. Die Infektion erfolgt durch die orale Aufnahme kontaminierter Lebensmittel und über den Kontakt zu Hauskatzen. Nach dem Eindringen der Oozysten in Wirtszellen vermehrt sich der Parasit durch ungeschlechtliche Teilung bis die Wirtszelle zerstört wird, und die so freigesetzten Tachyzoiten in die Blutbahn freigegeben werden. Dabei kann es zur diaplazentaren Übertragung auf ein ungeborenes Kind kommen. Bei immunkompetenten Wirten wird der Parasit weitestgehend eliminiert und überlebt als abgekapselte Bradyzoiten vor allem im Muskel- und Nervengewebe. Eine Infektion durch Bradyzoiten erfolgt, wenn rohes oder ungenügend gegartes Fleisch von infizierten Tieren verzehrt wird. Die rasche Eindämmung der Erreger erklärt den meist inapparenten Ver-

lauf der Infektion beim Immunkompetenten, bisweilen treten unspezifische Symptome auf, wie Lymphknotenschwellung, Fieber und allgemeines Krankheitsgefühl. Die Gefahr dieser chronischen Infektion besteht in einer endogenen Reaktivierung bei kompromittiertem Immunsystem, wie AIDS oder im Rahmen einer Immunsuppression oder Chemotherapie. Dann kann es zu schwerwiegenden und letalen Krankheitsverläufen, häufig im Sinne einer Enzephalitis und/oder Pneumonie, kommen. Besonders gefährdet sind auch ungeborene Kinder, wenn es während der Schwangerschaft zur Erstinfektion der Mutter kommt. Während dies im ersten Trimenon meist zum Abort führt, kann eine Infektion im zweiten oder dritten Trimenon zu einer schweren Fetopathie, der konnatalen Toxoplasmose, führen. Die in der Regel Frühgeborenen leiden an Pneumonie, Hepatitis, Gastroenteritis und/oder Myokarditis. Die klassische Trias aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis liegt nur selten vor. In der weiteren Entwicklung treten bei den Kindern häufig Epilepsien, geistige Retardierung und Erblindung auf. Die Diagnose der Toxoplasmose stützt sich neben klinischen Untersuchungsbefunden vor allem auf Serologie und Erregernachweis via Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die Therapie besteht in einer Dreifachkombination aus Pyrimethamin, Sulfadiazin und Folinsäure, vor der 16. Schwangerschaftswoche wird eine Monotherapie mit Spiramycin empfohlen (Harrisons Innere Medizin, 2003). Zur Prophylaxe der konnatalen Toxoplasmose sollten Schwangere kein rohes oder ungenügend gegartes Fleisch verzehren und Hauskatzen nur mit Dosen- oder Trockenfutter gefüttert werden; Katzenklos sollten täglich durch eine andere Person geleert und mit heißem Wasser gereinigt werden.

1.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist ein grampositives, unbewegliches und traubenartig angeordnetes Kugelbakterium von erheblicher klinischer Bedeutung. Viele Menschen beherbergen *S. aureus* auf der Haut und können es daher leicht auf Andere übertragen. Seine hohe Virulenz als klassischer Eitererreger verdankt es zahlreichen Pathogenitätsfaktoren, von denen die wichtigsten im Folgenden genannt werden sollen. Die Koagulase, ein Enzym welches ähnlich wie der „clumping factor“ durch Bindung an Prothrombin letztlich eine Fibrinbildung bewirkt, dient, wie auch interzelluläres Adhäsins, zur Abkapselung vor dem Immunsystem und der Abszessbildung. Durch Fibrinolysin ist der Erreger aber auch in der Lage, sich zur weiteren Verbreitung im Organismus aus einem selbst gebildeten Fibringerinnsel zu befreien. Hyaluronidase, ein Enzym zur Auflösung von Interzellularmatrix, und Hämolysin erklären die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe. Gelegentlich vorkommende Enterotoxine bedingen die Staphylokokken-Lebensmittelvergiftung. Häufige, durch *S. aureus* hervorgerufene Er-

krankungen sind Hautinfektionen, wie Follikulitis, Furunkel und Karbunkel, aber auch Osteomyelitiden und Sepsis, letztere häufig Katheter-assoziiert. Erkrankungen, welche durch *S. aureus* ausgelöst werden, gehen häufig mit erheblicher Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes und hohem Fieber einher, lokale Infektionen zeichnen sich meist durch klassische Entzündungszeichen wie Rötung, Schmerz und Schwellung aus. Der Erregernachweis erfolgt durch Kultivierung aus geeignetem Untersuchungsmaterial, wie Blutkulturen und Wundabstrichen, und ist immer assoziiert mit einer Resistenztestung. (Medizinische Mikrobiologie, Hof *et al.*, 3. Auflage) Denn durch unsachgemäßen und verschwenderischen Antibiotikagebrauch in den vergangenen Jahrzehnten sind viele Bakterienstämme gegen diverse Antibiotika resistent geworden. Ein Beispiel hierfür ist die β -Laktamase, ein Enzym, welches Penicillin und Penicillinderivate unwirksam macht, indem es deren charakteristischen Betalaktamring spaltet. Des Weiteren gibt es *Staphylococcus aureus*-Stämme, welche eine Veränderung des Enzyms Transpeptidase (oder Penicillin-Bindeprotein) hervorgebracht haben. Dieses Protein bewirkt eine regelrechte Verknüpfung der Zellwandbestandteile, dient aber auch als Angriffspunkt der β -Laktam-Antibiotika wie z.B. Penicillin oder Cephalosporine. Dieser so genannte Oxacillin-resistente *Staphylococcus aureus* (ORSA) ist daher gegen alle β -Laktamantibiotika resistent und daher einer der „Problemkeime“ in Krankenhäusern. Er ruft, vor allem auf Intensivstationen, schwere nosokomiale Infektionen hervor, welche nur noch mit wenigen und sehr teuren Reserveantibiotika behandelt werden können. Neben der antibiotischen hat auch die symptomatische Therapie einen hohen Stellenwert, so sollte beispielsweise bei einer Lebensmittelvergiftung der Flüssigkeitsverlust durch Infusionen ausgeglichen werden, und bei lokalen Infektionen neben einer chirurgischen Therapie stets die antipyretische und analgetische Medikation nicht außen vor gelassen werden.

1.5 Zielsetzung der eigenen Arbeit

Wie bereits ausführlich dargestellt wurde, ist die IDO aufgrund ihrer antimikrobiellen und immunmodulatorischen Wirkungsweise Mittelpunkt der Forschung vieler Arbeitsgruppen weltweit. Durch die Erzeugung eines lokalen Tryptophanmangels begründet sich der wachstumshemmende Effekt auf Bakterien, Viren und Parasiten, wie vielfach in Kontrollversuchen mit Tryptophansupplementation bewiesen werden konnte. Seit der Entdeckung, dass die Applikation von 1-Methyltryptophan, einem kompetitiven Inhibitor der IDO, an allogenen befruchteten Mäusen zur Abstoßung des Fetus führte (Munn *et al.*, 1998), weiß man auch von den immunregulatorischen Effekten der IDO. Über ihre Rolle während der Schwangerschaft hinaus spielt die IDO eine wichtige Rolle bei Autoimmunkrankheiten wie der experimentellen

Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), einer laborchemisch erzeugten und der Multiplen Sklerose sehr ähnlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems (Kwidzinski *et al.*, 2005), aber auch in der Transplantationsmedizin (Ingelsten *et al.*, 2009) und der Tumorforschung. Dabei ging man lange Zeit von einer tumorprotektiven Wirkung der IDO aus, begründet durch die Hemmung von T-Zellen (Munn *et al.*, 2007). Neuere Untersuchungen zeigten allerdings bei Patienten mit Nierenzellkarzinom eine hohe Korrelation zwischen der IDO-Aktivität von Endothelzellen der Tumorgefäße und der Überlebensrate (Riesenberg *et al.*, 2007), so dass in diesem Fall von einem tumorhemmenden Effekt die Rede sein muss. Diese zum Teil kontroversen Ergebnisse zeigen, dass die genaue Bedeutung der IDO *in vivo* noch lange nicht geklärt ist, und bis zur therapeutischen Beeinflussung der IDO-Aktivität von Patienten mit Toxoplasmose oder Tumorleiden noch Jahre vergehen werden.

Die vorliegende Arbeit behandelt abseits der Tryptophanverarmung ausschließlich die Wirkung der Tryptophanmetabolite oder auch Kynurenine (siehe Abbildung 1). Die untersuchten Metaboliten sind Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure, Chinolinsäure und Kynureninsäure. Wie schon erwähnt, sind einige der Metaboliten, wie z. B. Chinolinsäure und 3-Hydroxykynurenin, in die Pathogenese etlicher neurologischer Erkrankungen eingebunden. Auch konnte ein direkter Effekt einiger Metaboliten auf die Proliferation von T-Lymphozyten gezeigt werden (Terness *et al.*, 2002). Beginnend mit der Re-Evaluation des antiproliferativen Effektes auf T-Zellen wurden die Versuche auf einige Tumorzelllinien ausgeweitet. Die Frage hinter diesen Experimenten war, ob die oben genannte tumorprotektive Wirkung der IDO nicht mitunter auch auf die direkte, toxische Wirkung der Metaboliten des Kynurenin-Pfades zurückzuführen sein könnte. Des Weiteren war es das Ziel herauszufinden, ob für eine eventuelle Tumorzellinhibition vergleichbare Metabolitkonzentrationen benötigt würden, wie zur Proliferationshemmung von T-Zellen. Eine erhöhte Resistenz der Tumorzellen würde in dem Fall einen Hinweis auf einen „immune-escape“-Mechanismus via IDO liefern können. Untersucht wurden daher zum einen solide Tumorzellen, 86HG39 (Glioblastom) und A549 (Humanes Alveolarzellkarzinom), aber auch die entarteten Lymphozyten Jurkat und Raji. Der andere Teil der Arbeit widmet sich der antimikrobiellen Aktivität der genannten Kynurenine, untersucht wurden Staphylokokken und *Toxoplasma gondii*. Zwar wurde der Effekt der IDO auf Krankheitserreger schon untersucht, die Effekte der Tryptophanmetabolite auf Mikroorganismen sind allerdings weitgehend unbekannt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysewaage	Chyo JL-180, Welabo, Düsseldorf
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Brutschränke	B5060 EK/CO ₂ , Heraeus, Hanau
Kühlzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau
Mikroskope: Axiovert 25, TE2000	Zeiss, Oberkochen; Nikon, Düsseldorf
Pipetten	Finnpipette Labsystems, München
Pipettierhilfe	Pipetboy acu, Integra Biosciences Ag, Chur, Schweiz
Plattenphotometer	Tecan, Crailsheim
Steril-Werkbank	Flow Laboratories, Meckenheim
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer
Zellerntegerät	Harvester Basic 96, Satron Instruments Tampere, Finnland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Vertiefung Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Einmalspitzen	Polylab, Seoul, Korea
Einmalspritzen	Polylab, Seoul, Korea
Glasfilter	Preprint Filtermat, LKB Wallac
Kanülen, versch. Größen	BD Becton Dickinson, Heidelberg

Kryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen	Costar, Bodenheim
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Greiner, Frickenhausen

2.1.3 Medien und Puffer

Blutagar	Difco, Hamburg
IMDM	Cambrex, München
PBS (Phosphate buffered saline)	Gibco, Paisley, Schottland
RPMI 1640-Medium	Gibco, Paisley, Schottland

2.1.4 Chemikalien

[³ H]-Thymidin	Amersham, Braunschweig
[³ H]-Uracil	Amersham, Braunschweig
3-Hydroxyanthranilsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Hydroxykynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anthranilsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chinolinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (Fetales Kälberserum)	PAN-Biotech, Aidenbach
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm, Ulm
Kynureninsäure	Fluka Chemika, Buchs, Schweiz
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kryokonservierungslösung	12 % DMSO und 88 % FCS
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
OKT3	American Type Culture Collection, Rockville
Szintillationsflüssigkeit	Beta Plate Scint, LKB Wallac
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Charakteristika	Quelle
86HG39	Humane Glioblastomzelle	Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf (Bilzer et al, 1991)
A549	Humanes Alveolarzellkarzinom	DSMZ Braunschweig
Jurkat	Humane T-Zell Leukämiezelle	ATCC Wesel
L929	Mausfibroblasten	ATCC Wesel
Raji	Burkitt Lymphomzelle	ATCC Wesel

2.1.6 Mikroorganismen

2.1.6.1 *Staphylococcus aureus*

Die in dieser Arbeit verwendeten Staphylokokken (*S. aureus*) entstammen aus diagnostischem Material aus der Uniklinik Düsseldorf.

2.1.6.2 *Toxoplasma gondii*

Die verwendeten *Toxoplasma gondii* vom BK-Stamm wurden von Dres. Saathoff und Seitz aus dem Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zelllinien

Alle in Tabelle 1 genannten Zellen wurden in Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 10% CO₂-Konzentration gelagert. Als Nährmedium wurde IMDM (Iscoves's Modified Dulbecco's Medium), welches mit 5% FCS angereichert wurde, verwendet. Sämtliche Arbeiten mit den Zellen wurden unter der Sterilbank und mit sterilen Materialien durchgeführt. Jurkat- und Raji-Zellen, welche als Lymphozytenderivate nicht adhären, konnten für Versuche bzw. zum Splitten einfach aus der Flasche geerntet und für Experimente verwendet oder verworfen werden; ein Rest von 1ml wurde mit 20 ml neuem Medium versetzt. A549- und 86HG39-Zellen wachsen adhären, daher mussten sie nach Absaugen des alten Mediums und Spülen mit PBS zunächst mit 0,25% Trypsin-EDTA gelöst werden. Dabei wurden 5 ml Trypsin-EDTA in die Zellkulturflasche gegeben und nach 10 min. Einwirkzeit konnten die Zellen geerntet werden, da sich die Zellkontakte gelöst hatten. Zum Schutz vor Lyse wurden die in Trypsin gelösten Zellen sofort mit 10 ml IMDM verdünnt und konnten dann zentrifugiert werden. Auch hier wurde ein Rest von 1 ml in der Flasche gelassen und mit 10ml IMDM aufgefüllt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl für Experimente

Die geernteten Zellen wurden 10 Minuten bei 263 g zentrifugiert, der Überstand im Anschluss bis auf das Pellet mit den Zellen abgesaugt. Die Zellen wurden mit 10 ml Medium verdünnt und zum Vermischen mehrfach resuspendiert und konnten dann mit Trypanblau nach Bedarf verdünnt und unter dem Mikroskop in der Zählkammer gezählt werden.

2.2.3 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut

Nachdem einem gesunden Spender 50 ml Vollblut entnommen und mit 2000 I.E. Heparin versetzt wurde, musste das Blut zunächst 1:1 mit PBS verdünnt werden. Das verdünnte Blut wurde dann vorsichtig auf 50 ml-Röhrchen mit 15 ml Ficoll-Paque pipettiert, so dass die Blutphase auf der Ficoll-Phase stand und es nicht vermischt wurde. Nach 30 min. zentrifugieren bei 1052 g bei minimaler Beschleunigung und Bremse sowie Raumtemperatur konnten die peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus der Interphase abgesaugt und in ein neues Röhrchen

überführt werden. Um die PBL von Ficoll und Thrombozyten zu befreien, wurde im Anschluss drei Mal mit PBS gewaschen und die Zellen zwischen den Waschschritten bei 591, 263 und 117 g jeweils 10 min. zentrifugiert. Die so gewonnenen Zellen wurden im Anschluss in Medium gelöst und konnten unter dem Mikroskop gezählt werden.

2.2.4 Bestimmung der Zellproliferation

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Proliferation von PBL oder Tumorzellen bzw. deren Hemmbarkeit durch Tryptophanmetabolite wurden 96-Vertiefung-Flachbodenplatten mit einem Volumen von 200 µl pro Vertiefung benutzt. Für die Experimente wurde stets das gleiche Medium genutzt wie zur Pflege der Zellen. Die Zellzahl pro Vertiefung betrug 1×10^4 für Tumorzellen und $1,5 \times 10^5$ für PBL. Die Proliferation von T-Zellen musste mit dem anti-CD3 Antikörper OKT3 in einer Endkonzentration von 1:3000 angeregt werden und wurde immer mit nicht stimulierten T-Zellen verglichen. Nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin zugegeben und weitere 24 h inkubiert, im Anschluss daran konnten die Platten bis zur Auswertung bei -20 °C aufbewahrt werden. Zur Auswertung wurden die Platten aufgetaut und mit dem Zellerntegerät die radioaktiv markierten Zellen auf einen Glasfaserfilter übertragen und dann bei 100 °C ca. 30 min. getrocknet. Die Filter wurden dann in Folien eingeschweißt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit befeuchtet. Schließlich wurde im Beta-Counter die durch einen radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung erfasst und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt. Die gespeicherten Daten konnten am PC mit Microsoft Excel 2003 und GraphPad Prism 4 ausgewertet werden.

2.2.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur längeren Aufbewahrung von Zellen wurden diese aus den Flaschen wie gewohnt geerntet und zentrifugiert. 1×10^7 Zellen/ml wurden in 1 ml Kryokonservierungslösung aus 12 % DMSO und 88 % FCS gelöst und in einem Kryotube für 1 Tag bei -80 °C und dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren aufbewahrt.

2.2.6 Kultivierung von *Toxoplasma gondii* BK

Die *Toxoplasma gondii* vom BK-Stamm wurden in L929-Zellen kultiviert. Nach 3-4 Tagen waren die Zellen durch die Toxoplasmen lysiert und die freischwimmenden Tachyzoiten konnten geerntet werden. Um die Parasiten von verbliebenen L929-Zellen zu trennen, wurde zunächst 10 min. bei 66 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die hierin enthaltenen Tachyzoiten konnten nach erneuter Zentrifugation bei 1431 g für 10 min. und Absaugen des Überstandes in Medium gelöst und unter dem Mikroskop gezählt werden.

2.2.7 Bestimmung der *Toxoplasma gondii* Proliferation

Nach drei- bis viertägiger Inkubation im Brutschrank haben die Toxoplasma-Tachyzoiten fast alle Wirtszellen lysiert und schwimmen frei im Medium. Wie oben beschrieben konnten sie zu Versuchszwecken gewonnen werden und lagen bei allen hier beschriebenen Experimenten in einer Konzentration von 2×10^4 pro Vertiefung vor. Bei den Versuchen wurden 96-Vertiefungs-Flachbodenplatten benutzt, der Inhalt jeder Vertiefung betrug 200 μ L. Die Parasiten wurden in verschiedene Wirtszellen eingebracht und die Beeinflussung der Proliferation sowohl der Wirtszellen als auch der Toxoplasmen in den Zellen durch Tryptophanmetabolite untersucht. Nach 72-stündiger Inkubation wurden den Vertiefungen mit Toxoplasmen 12 KBq [3 H]-Uracil zugegeben und für weitere 24 h inkubiert, im Anschluss daran wurden die Platten bei -20 °C eingefroren. Da die intrazellulären Toxoplasmen das [3 H]-Uracil aufgrund einer im Vergleich zu den Wirtszellen hundert Mal höheren Aktivität des Enzyms Uridin-Phosphorylase beinahe komplett metabolisieren (Pfefferkorn *et* Pfefferkorn, 1977), ist diese Methode zur Bestimmung der *Toxoplasma gondii* Proliferation sehr gut geeignet. Zur Auswertung wurden die Platten aufgetaut und mit dem Zellerntegerät die radioaktiv markierten Zellen auf einen Glasfaserfilter übertragen und dann bei 100 °C ca. 30 min. getrocknet. Die Filter wurden dann in Folien eingeschweißt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit befeuchtet. Schließlich wurde im Beta-Counter die durch einen radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung erfasst und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt. Die gespeicherten Daten konnten am PC mit Microsoft Excel 2003 und GraphPad Prism 4 ausgewertet werden.

2.2.8 Bestimmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus*

Bakterienkolonien von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wurden auf Blutagarplatten kultiviert. Für *Staphylococcus aureus* Experimente wurde eine Bakterienkolonie, die über Nacht auf einer Blutagarplatte im Brutschrank bei 37°C gewachsen war, in 5 mL PBS resuspendiert und mit PBS auf 1:100000 weiter verdünnt. 10 µL des Bakteriengemisches (je ca. 10 – 100 Kolonie-bildende Einheiten) wurden dann zu 180 µL RPMI Medium sowie 10 µl Metabolitlösung gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Bakterienwachstum im ELISA-Photometer gemessen. Dabei entsprach die Stärke der Absorption bei 620 nm der Dichte (Menge) der gewachsenen Bakterien.

2.2.9 Verwendung von Tryptophanmetaboliten

In dieser Arbeit wird die Wirkung von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von Zellen und Mikroorganismen untersucht. Die eingesetzten Metaboliten sind Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure, Chinolinsäure und Kynureininsäure (siehe Abbildung 1). Die Metaboliten wurden zunächst in einem Röhrchen abgewogen, in 1 mL 1M NaOH gelöst und mit Medium auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt, wobei die Konzentration dieser Stocklösung 10 mM betrug. Nach 1-2 h im Wasserbad bei 37 °C konnte die Stocklösung steril filtriert und je nach Metabolit im Kühlschrank oder bei -20 °C gelagert werden. Die für die einzelnen Versuche benötigten Konzentrationen konnten dann aus der Stocklösung und Medium erstellt werden. Bei dem für die Herstellung der Stocklösung und später benötigten Konzentrationen benutztem Medium handelt es sich immer um IMDM mit 5 % FCS.

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die immunmodulatorische und antimikrobielle Wirkung der Metaboliten des Kynurenin-Pfades näher untersucht. Zum Einsatz kamen Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Kynureninsäure, Chinolinsäure und Anthranilsäure.

3.1 Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf die T-Zellaktivierung

Die IDO katalysiert die Reaktion von Tryptophan zu N-Formylkynurenin, welches von dem konstitutiv exprimierten Enzym Formidase zu Kynurenin und Ameisensäure gespalten wird. Die IDO vermittelt neben einem antimikrobiellen auch einen immunmodulatorischen Effekt, wie Munn *et. al* 1998 erstmals aufzeigen konnten. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit steht der Effekt der Tryptophanmetabolite auf periphere Blutlymphozyten (PBL) im Mittelpunkt. PBL wurden von einem gesunden Spender via Blutentnahme gewonnen, durch Zentrifugation isoliert und in IMDM mit 5% FCS resuspendiert. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung pipettiert und mit dem T-Zell-spezifischen anti-CD3-Antikörper (OKT3) stimuliert. Bei jedem Experiment wurde stets auch eine Kontrolle ohne anti-CD3-Stimulation durchgeführt. Da es in der Kontrollgruppe jedoch nie zu einer signifikanten Proliferation der PBL kam, wurde aus Übersichtsgründen ab Abbildung 3 auf die Darstellung der Negativkontrolle verzichtet. Die PBL wurden den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Ermittlung der Proliferation im Beta-Counter erfolgte nach Addition von 7,4 kBq [^3H]-Thymidin sowie weiterer Inkubation für 24 Stunden. Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse eines Einzelexperimentes mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen und Kynurenin (KYN). Es zeigt sich eine lineare, dosisabhängige Hemmung der T-Zell-Proliferation. Die unstimulierten PBL zeigen, wie erwähnt, keine signifikante Proliferation.

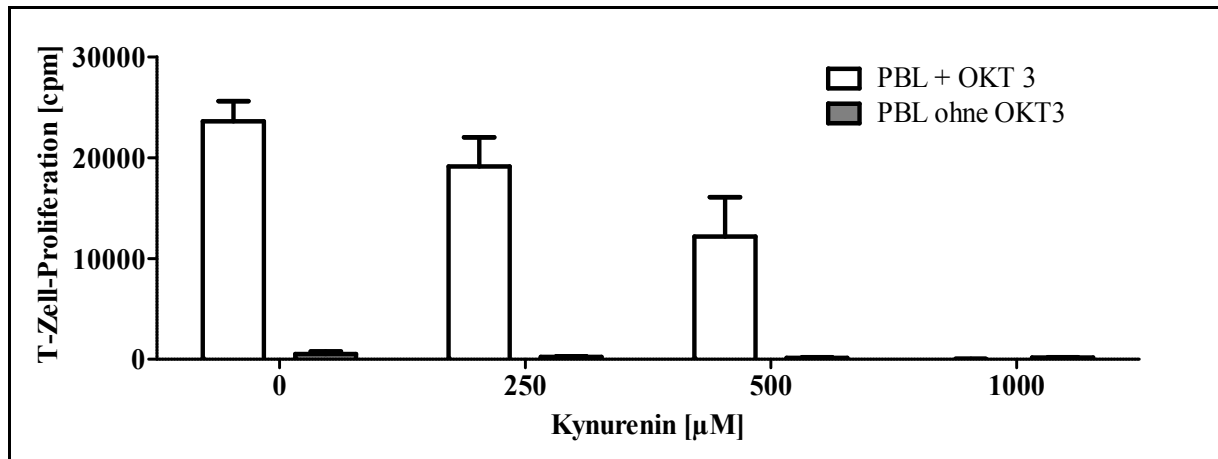


Abbildung 2: Hemmung der Proliferation von T-Zellen durch L-Kynurenin im Einzelversuch

Durch Blutentnahme und mehrfache Zentrifugation gewonnene PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) wurden durch anti-CD3 (OKT3) stimuliert, Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 1000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Gleichzeitig erfolgte eine Wachstumskontrolle ohne anti-CD3-Stimulation. Die Abbildung zeigt einen Einzelversuch mit dreifachen Ansätzen, die Daten werden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben.

In Abbildung 3 sind die Daten aus insgesamt 6 verschiedenen Experimenten mit PBL und Kynurenin dargestellt. Hier wird der lineare Zusammenhang zwischen Kynureninkonzentration und Proliferationshemmung untermauert. Es findet sich eine 50%-ige Proliferationshemmung (I_{50}) bei einer Konzentration von ca. 375 μM , eine 90%-ige Hemmung (I_{90}) bei ca. 750 μM .

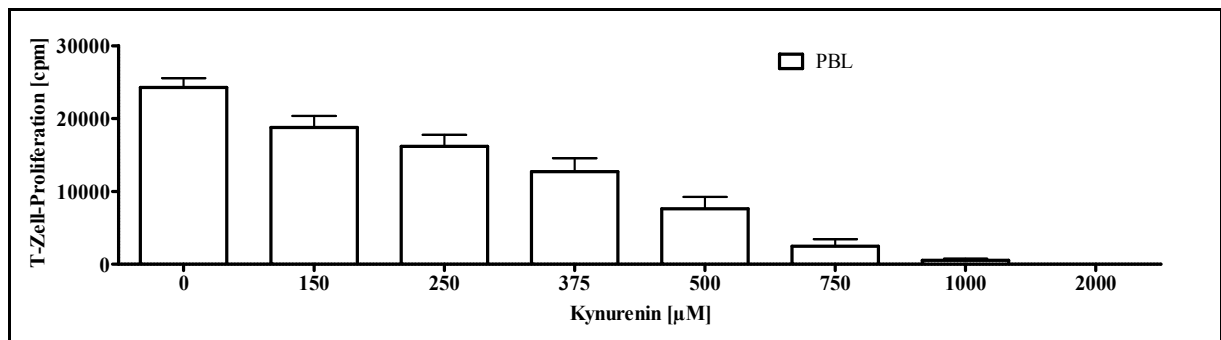


Abbildung 3: Dosisabhängige Hemmung der Proliferation von T-Zellen durch Kynurenin

Frisch gewonnene PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) wurden durch anti-CD3 (OKT3) stimuliert, Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus sechs verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Weiterhin wurden die 50%-ige Proliferationsinhibition mit ca. 375 μM sowie die 90%-ige Proliferationsinhibition mit ca. 750 μM graphisch und rechnerisch bestimmt. Auf die Darstellung der unauffälligen Kontrolle ohne anti-CD3-Stimulation wurde verzichtet.

Ein weiterer Metabolit des Kynurenin-Pfades (siehe auch Abbildung 1) ist 3-Hydroxykynurenin (HKYN), eine neurotoxische Substanz (Stone *et al.*, 1993). Analog zu den oben beschriebenen Versuchen mit KYN weist auch HKYN einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation anti-CD3 stimulierter T-Zellen auf. Abbildung 4 zeigt die Daten aus 4 verschiedenen Experimenten. Es ergibt sich eine I_{50} bei einer Konzentration von ca. 150 μM und eine I_{90} bei ca. 500 μM , somit also ein signifikant stärkerer Hemmeffekt auf die T-Zell-Proliferation als durch KYN.

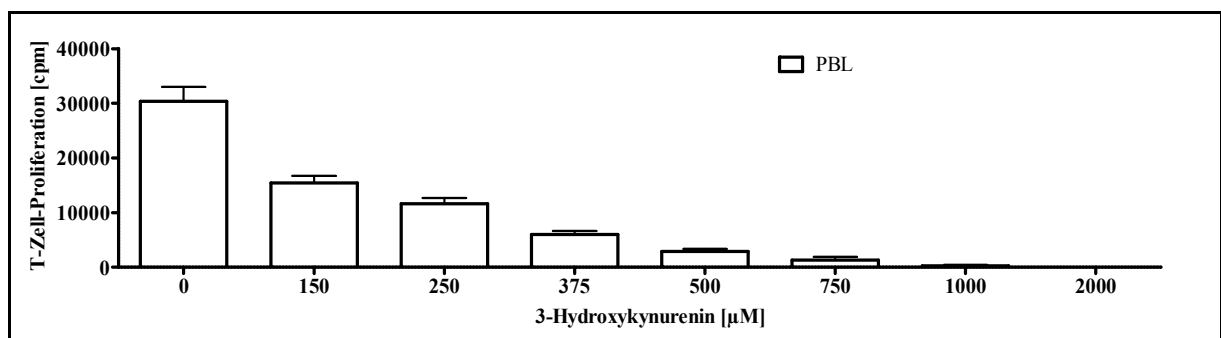


Abbildung 4: Proliferationshemmung von T-Zellen durch 3-Hydroxykynurenin

Frisch gewonnene PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) wurden durch anti-CD3 (OKT3) stimuliert, 3-Hydroxykynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Weiterhin wurden die 50%-ige Proliferationsinhibition mit 150 μM sowie die 90%-ige Proliferationsinhibition mit 500 μM graphisch und rechnerisch bestimmt. Auf die Darstellung der unauffälligen Kontrolle ohne anti-CD3-Stimulation wurde verzichtet.

Der dritte Metabolit des Kynurenin-Pfades mit antiproliferativem Effekt auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen ist 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA), welche, wie auch HKYN, eine neurobiologisch und neuropathologisch aktive Substanz ist (Okuda *et al.*, 1996). Bei gleichem Versuchsaufbau wie bei den Experimenten mit KYN und HKYN zeigt HAA von allen drei Metaboliten die stärkste Hemmung von anti-CD3 stimulierten T-Zellen. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen zusammengefasst dargestellt. Die 50%-ige Proliferationsinhibition wurde mit ca. 175 μM , die I_{90} mit ca. 275 μM graphisch und rechnerisch ermittelt.

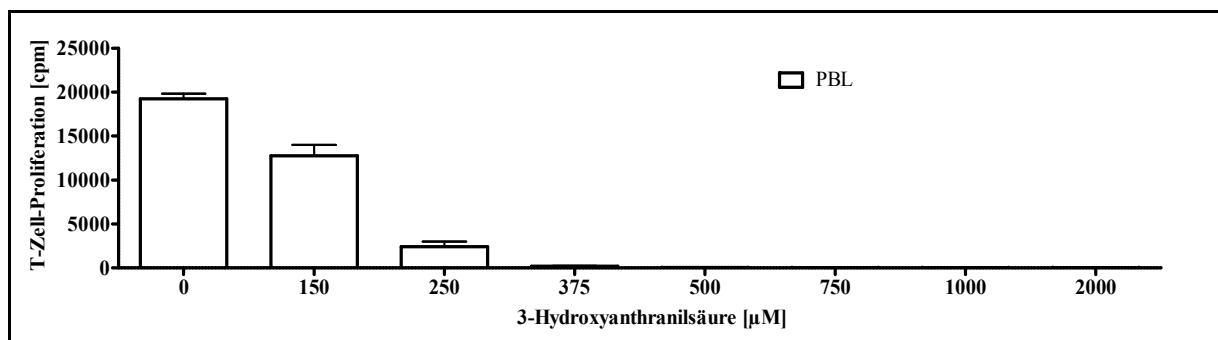


Abbildung 5: Wachstumshemmung von T-Zellen durch 3-Hydroxyanthranilsäure

Frisch gewonnene PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) wurden durch anti-CD3 (OKT3) stimuliert, 3-Hydroxyanthranilsäure in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Weiterhin wurden die 50%-ige Proliferationsinhibition mit ca. 175 μM sowie die 90%-ige Proliferationsinhibition mit ca. 275 μM graphisch und rechnerisch bestimmt. Auf die Darstellung der unauffälligen Kontrolle ohne anti-CD3-Stimulation wurde verzichtet.

Drei weitere Metaboliten des Kynurenin-Pfades wurden hinsichtlich ihrer antiproliferativen Potenz auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen untersucht. Bei gleichem Versuchsaufbau wie in den weiter oben beschriebenen Experimenten konnte weder für Kynureninsäure (KA) noch für

Chinolinsäure (QA) und Anthranilsäure (AA) eine Proliferationshemmung, auch nicht durch die höchste eingesetzte Konzentration von 2000 μM , nachgewiesen werden. Abbildung 6 zeigt die Daten von jeweils drei unabhängigen Versuchen.

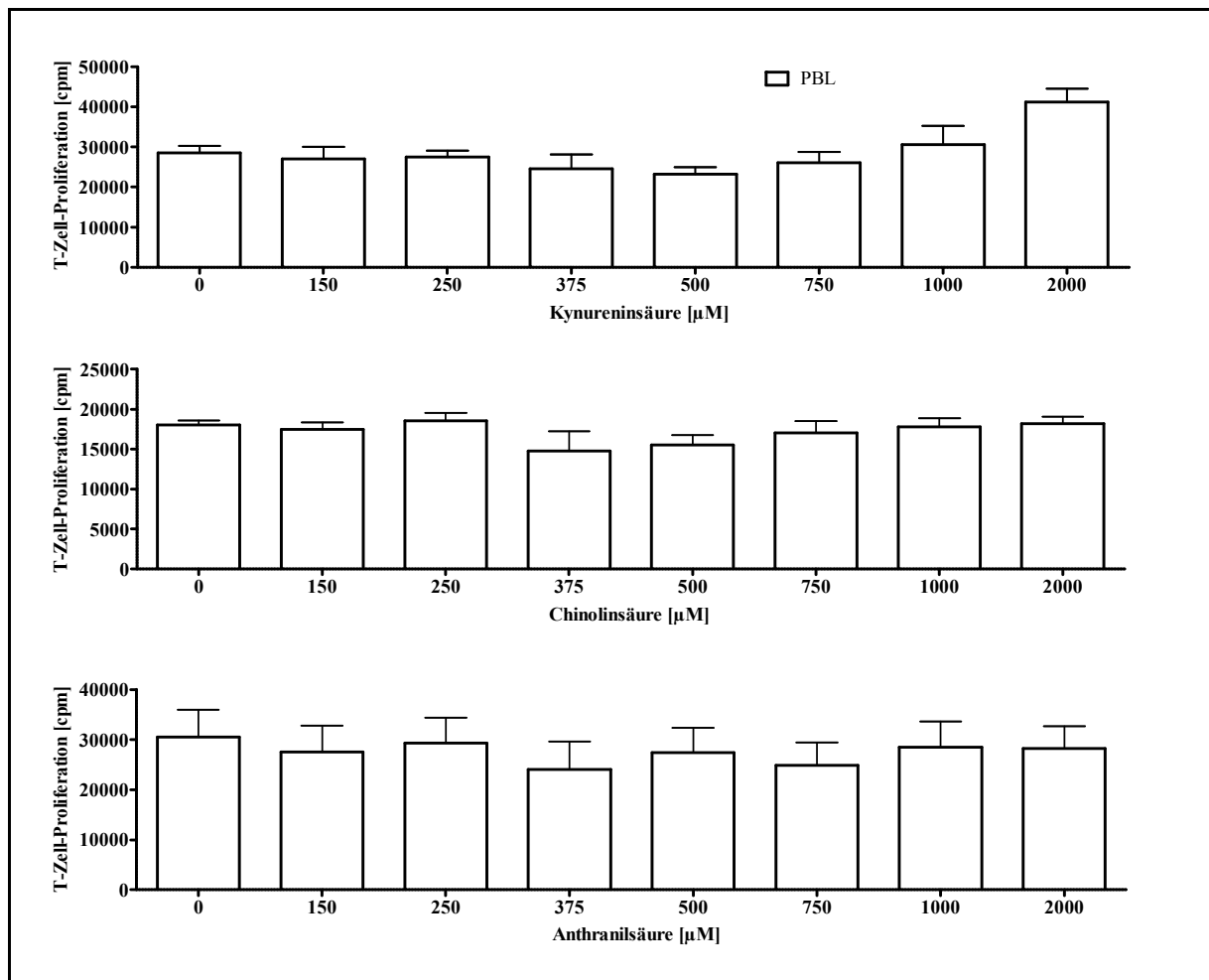


Abbildung 6: Keine Proliferationshemmung von T-Zellen durch Kynureninsäure, Chinolinsäure und Anthranilsäure

Frisch gewonnene PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) wurden durch anti-CD3 (OKT3) stimuliert, den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der T-Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Auf die Darstellung der unauffälligen Kontrolle ohne anti-CD3-Stimulation wurde verzichtet.

Abbildung 7 zeigt noch einmal vergleichend den antiproliferativen Effekt von KYN, HKYN und HAA auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen. Dargestellt ist die normalisierte Analyse, dabei wird die Proliferation der T-Zellen auf die Positivkontrolle ohne Zugabe von Metaboliten be-

zogen. Hier wird deutlich, dass der antiproliferative Effekt von KYN über HKYN zu HAA zunimmt. Auch Tabelle 2 zeigt diesen Sachverhalt noch einmal anhand der I_{50} und I_{90} .

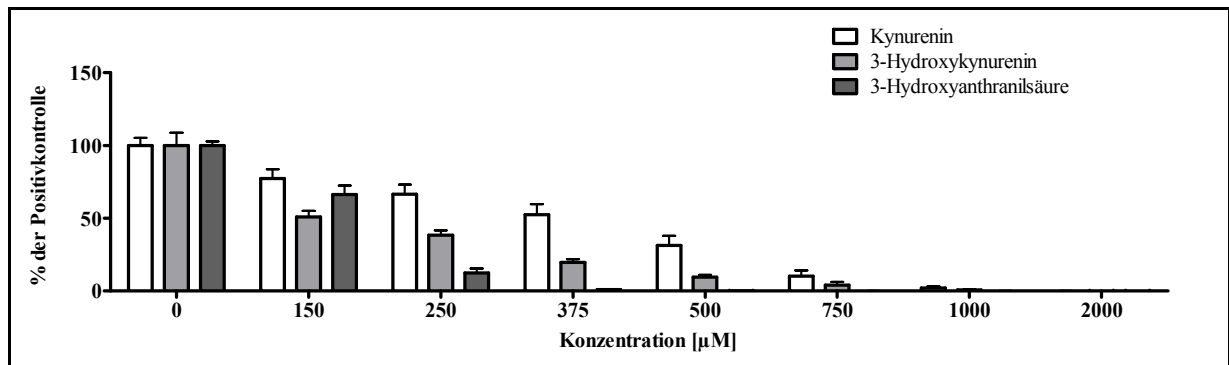


Abbildung 7: Vergleich der Hemmung von T-Zellen durch Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure

Die Daten der oben beschriebenen Versuche wurden in dieser Abbildung zusammengefasst. Dargestellt ist die prozentuale Hemmung der T-Zellen. Als Referenz dient der jeweilige Ansatz ohne Metabolitzugabe (Positivkontrolle). Es zeigt sich bei 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure eine stärkere Proliferationsinhibition der stimulierten T-Zellen als durch Kynurenin.

Tabelle 2: Vergleich der Wachstumsinhibition der Metaboliten auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen anhand der I_{50} und I_{90}

Metabolit	I_{50} [µM]	I_{90} [µM]
KYN	375	750
HKYN	150	500
HAA	175	275
KA	-	-
QA	-	-
AA	-	-

3.2 Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von Tumorzellen

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als Immunmodulator beschäftigt viele Forschergruppen weltweit. Ein interessanter Aspekt ist die tumorinduzierte Immuntoleranz, d. h. durch

IDO-Expression kann sich ein Tumor lokal der Elimination durch das Immunsystem entziehen (Munn *et al.*, 2007). In diesem Teil der Arbeit wird untersucht, inwieweit sich ausgewählte Tumorzellen durch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades in ihrem Wachstum hemmen lassen, und ob ein Unterschied zu der Proliferationsinhibition anti-CD3 stimulierter T-Zellen besteht. Zunächst wird beispielhaft der Effekt der Metaboliten auf die humane Glioblastomzelle 86HG39 und anti-CD3 stimulierte T-Zellen dargestellt. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse eines Einzelversuches mit dreifachen Ansätzen. Die Tumorzellen wurden in IMDM Medium mit 5% FCS gelöst und 1×10^4 Zellen pro Vertiefung pipettiert. Die via Blutentnahme und Zentrifugation gewonnenen peripheren Blutlymphozyten wurden ebenfalls in IMDM Medium mit 5% FCS gelöst, $1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung pipettiert und mit anti-CD3 (OKT3) stimuliert. Nach Zugabe von Kynurenin in den Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM wurden die Platten 72 Stunden bei 37° C inkubiert, [^3H]-Thymidin hinzugegeben und für weitere 24 Stunden inkubiert. Die Proliferation wurde mittels Beta-Counter als Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Es wird deutlich, dass die stimulierten T-Zellen stärker gehemmt werden als die Glioblastomzellen.

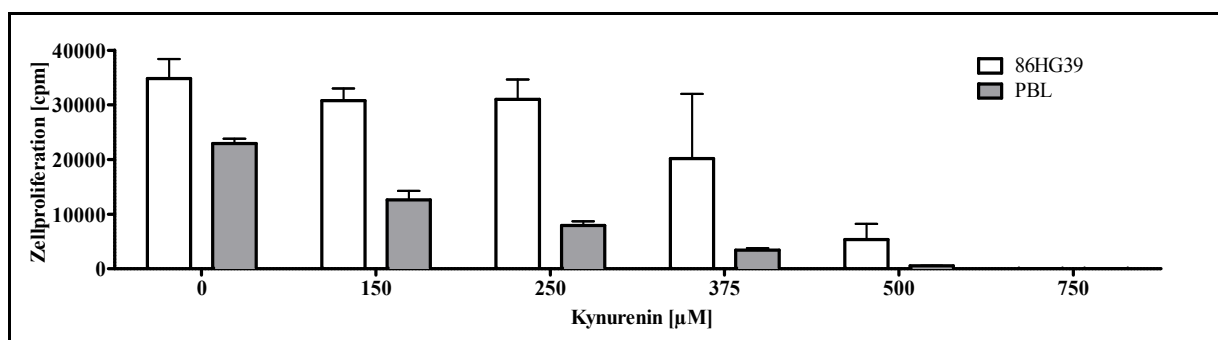


Abbildung 8: Vergleich der Proliferationshemmung von T-Zellen und 86HG39 durch Kynurenin

In diesem Einzelversuch mit dreifachen Ansätzen wurde der proliferationshemmende Effekt von Kynurenin auf anti-CD3-stimulierte T-Zellen und 86HG39-Zellen (Humane Glioblastomzelle) untersucht. PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten werden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse aus insgesamt sechs unabhängigen Versuchen mit stimulierten T-Zellen, humanen Glioblastomzellen 86HG39 sowie Kynurenin dargestellt. Es wird deutlich, dass die T-Zellen durch geringere Konzentrationen von Kynurenin gehemmt werden als die Tumorzellen. Die 50%-ige Proliferationsinhibition (I_{50}) für die T-Zellen beträgt ca. 375 μM , für 86HG39 liegt sie zwischen 750 μM und 1000 μM .

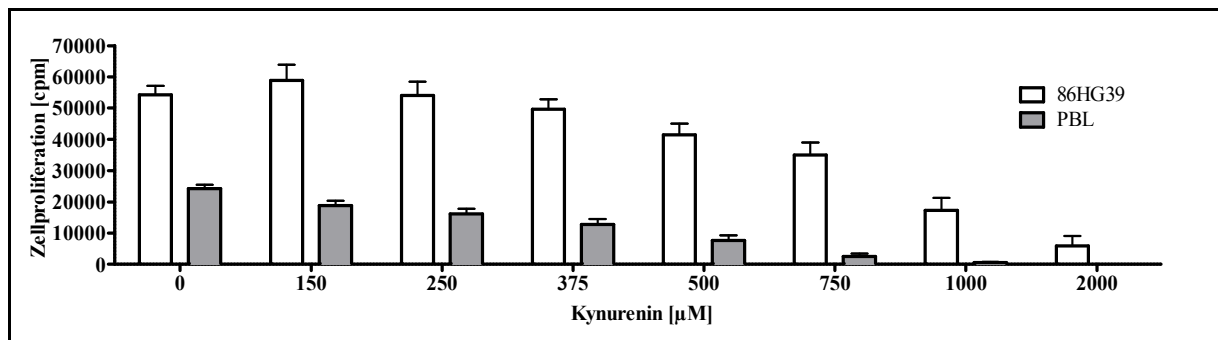


Abbildung 9: Vergleich der Proliferationshemmung von T-Zellen und 86HG39 durch Kynurenin

Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus sechs unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Die I_{50} für die T-Zellen beträgt 375 μM , für 86HG39 liegt sie zwischen 750 μM und 1000 μM .

Als nächstes wurde der wachstumshemmende Effekt von HKYN auf 86HG39-Zellen im Vergleich mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen untersucht. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen. Während beide Zellen insgesamt stärker inhibiert werden als durch KYN, zeigt sich auch hier eine höhere Empfindlichkeit der T-Zellen auf HKYN gegenüber den Tumorzellen. Die 50%-ige Proliferationsinhibition (I_{50}) für die T-Zellen beträgt 150 μM , für die Glioblastomzellen 500 μM .

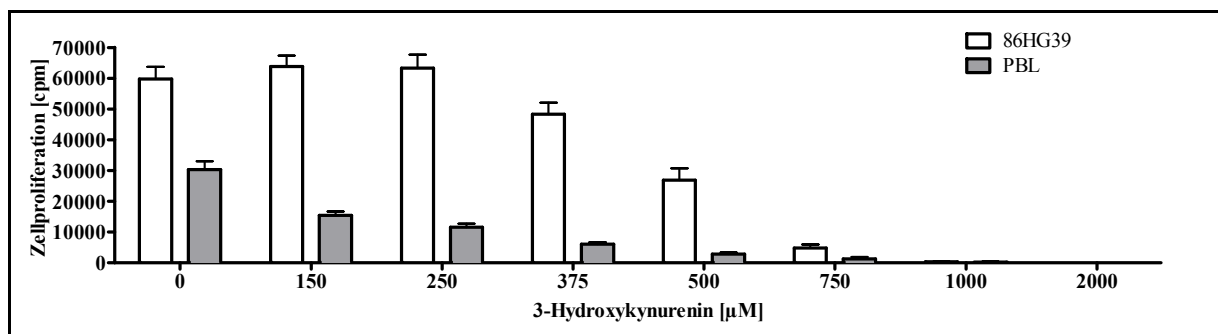


Abbildung 10: Vergleich der Proliferationshemmung von T-Zellen und 86HG39 durch HKYN

Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden 3-Hydroxykynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Die 50%-ige Proliferationsinhibition (I_{50}) für die T-Zellen beträgt ca. 150 μM , für die Glioblastomzellen ca. 500 μM .

Weitere Versuche mit gleichem Aufbau und Ablauf erfolgten mit dem Metabolit 3-Hydroxyanthranilsäure. In Abbildung 11 sind die Resultate aus vier unabhängigen Versuchen mit je dreifachen Ansätzen graphisch dargestellt. Die Wachstumshemmung ist sowohl bei den anti-CD3 stimulierten T-Zellen als auch bei den Glioblastomzellen stärker ausgeprägt als die Inhibition durch Kynurenin und 3-Hydroxykynurenin. Bereits bei 375 μM ist kein T-Zellwachstum mehr nachweisbar, die 50%-ige Proliferationsinhibition (I_{50}) liegt zwischen 150 μM und 250 μM , die I_{50} der Tumorzellen etwa bei ca. 250 μM .

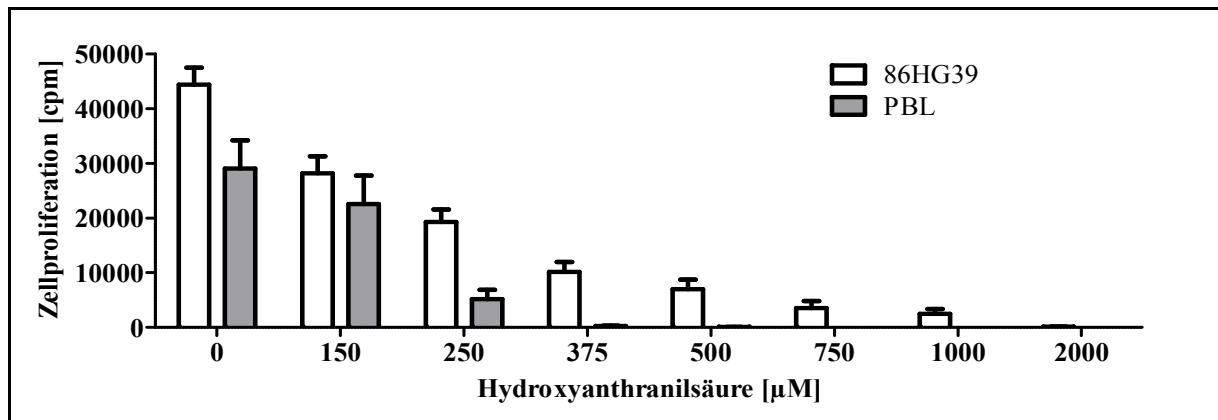


Abbildung 11: Vergleich der Proliferationshemmung von T-Zellen und 86HG39 durch 3-Hydroxyanthranilsäure

Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden 3-Hydroxyanthranilsäure in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt. Die 50%ige Proliferationsinhibition (I_{50}) der T-Zellen liegt zwischen 150 μM und 250 μM , die I_{50} der Tumorzellen etwa bei ca. 250 μM .

Die oben genannten Ergebnisse lassen erkennen, dass durchaus Unterschiede in der Wachstumshemmung von anti-CD3 stimulierten T-Zellen und Glioblastomzellen als Vertreter der Tumorzellen existieren. Es ist ersichtlich, dass T-Zellen durch jeden der genannten Metaboliten bereits durch niedrigere Konzentrationen gehemmt werden als die untersuchten Tumorzellen.

Die oben beschriebenen Versuche wurden auf die Tumorzelllinien A549 (Humane Alveolarzellkarzinomlinie), Jurkat (Humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie) und Raji (Burkitt-Lymphom-Zelllinie) ausgeweitet. Ziel dieser Versuche war es herauszufinden, ob auch hier eine unterschiedliche Sensitivität der Zellen für Tryptophanmetabolite vorliegt. Weiterhin wurde untersucht, ob sich solide Tumorzellen, wie A549 und 86HG39, und entartete lymphatische Zellen, wie Jurkat und Raji bezüglich ihrer Inhibition durch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades

unterscheiden. Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen sowie den genannten Tumorzellen und Kynurenin. Die Graphik A zeigt die Proliferation als Absolutwerte in Zerfällen pro Minute (cpm), die Graphik B die normalisierte Analyse, wobei die Positivkontrolle ohne Kynureninzugabe als jeweilige Referenz dient. Die A549-Zelle wird auch nicht durch die höchste Konzentration Kynurenin (2000 μM) gehemmt, während Jurkat und Raji als lymphatische Tumorzellen stärker inhibiert werden als die bereits bekannte Glioblastomzelllinie. Während die T-Zellen schon durch niedrige Konzentrationen von 150 μM und 250 μM deutlich beeinträchtigt werden, zeigt sich hier bei keiner der Tumorzellen eine signifikante Beeinträchtigung des Wachstums.

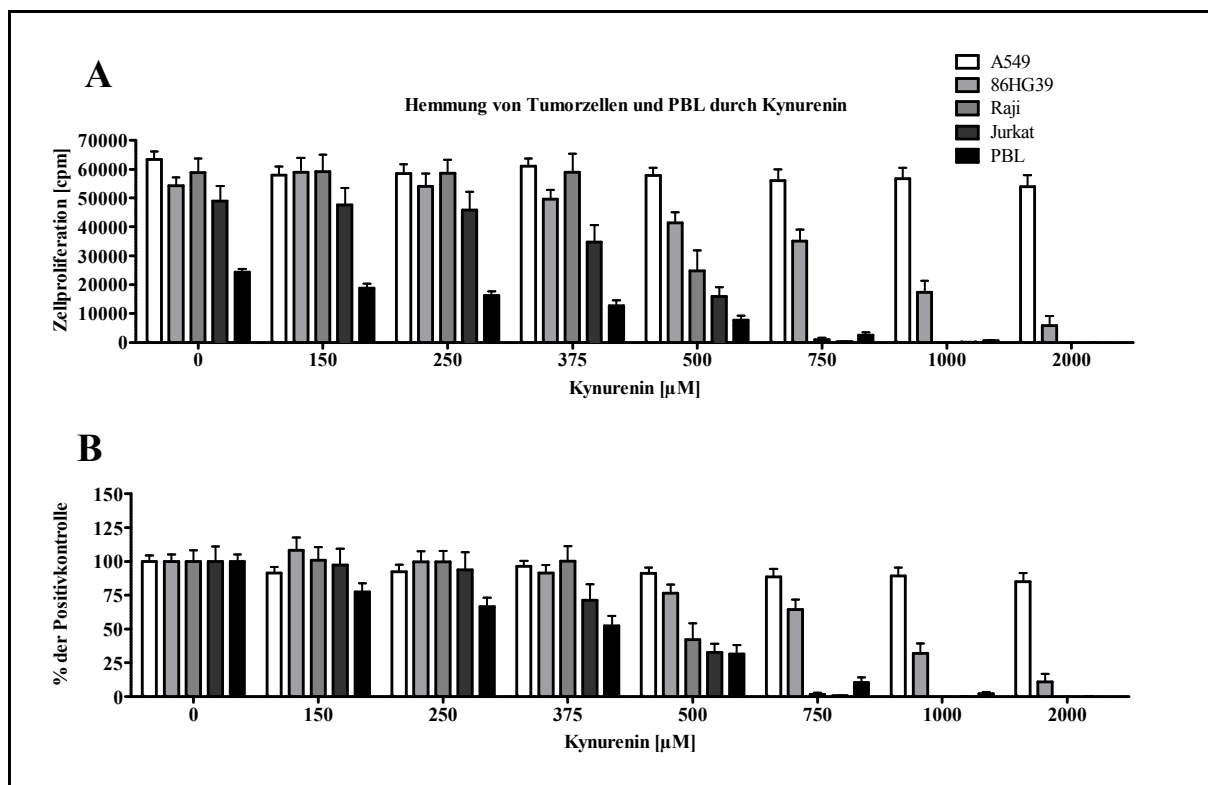


Abbildung 12: Vergleich der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch Kynurenin
Darstellung der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch Kynurenin in Absolutwerten und prozentual, als Referenz dient der jeweilige Ansatz ohne Metabolitzugabe. Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Graphik A zeigt die Proliferation als Absolutwerte in Zerfällen pro Minute (cpm), die Graphik B die normalisierte Analyse, wobei die Positivkontrolle ohne Kynureninzugabe als jeweilige Referenz dient. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Als nächstes wurden identische Versuche mit dem Metabolit 3-Hydroxykynurenin durchgeführt. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifa-

chen Ansätzen. Generell zeigt sich ein stärkerer antiproliferativer Effekt auf alle Zellen als im Vorversuch mit Kynurenin (siehe Abbildung 12). Des Weiteren wird eine Hemmung der anti-CD3 stimulierten T-Zellen bei einer Konzentration von 150 μM um 50 % deutlich, während die Tumorzellen nicht wesentlich inhibiert werden. Es fällt außerdem auf, dass die soliden Tumorzelllinien A549 und 86HG39 im Vergleich zu den lymphatischen Zelllinien Jurkat und Raji weniger stark gehemmt werden, wenngleich der Unterschied nicht so deutlich ist wie in den Versuchen mit KYN (s. Abbildung 12).

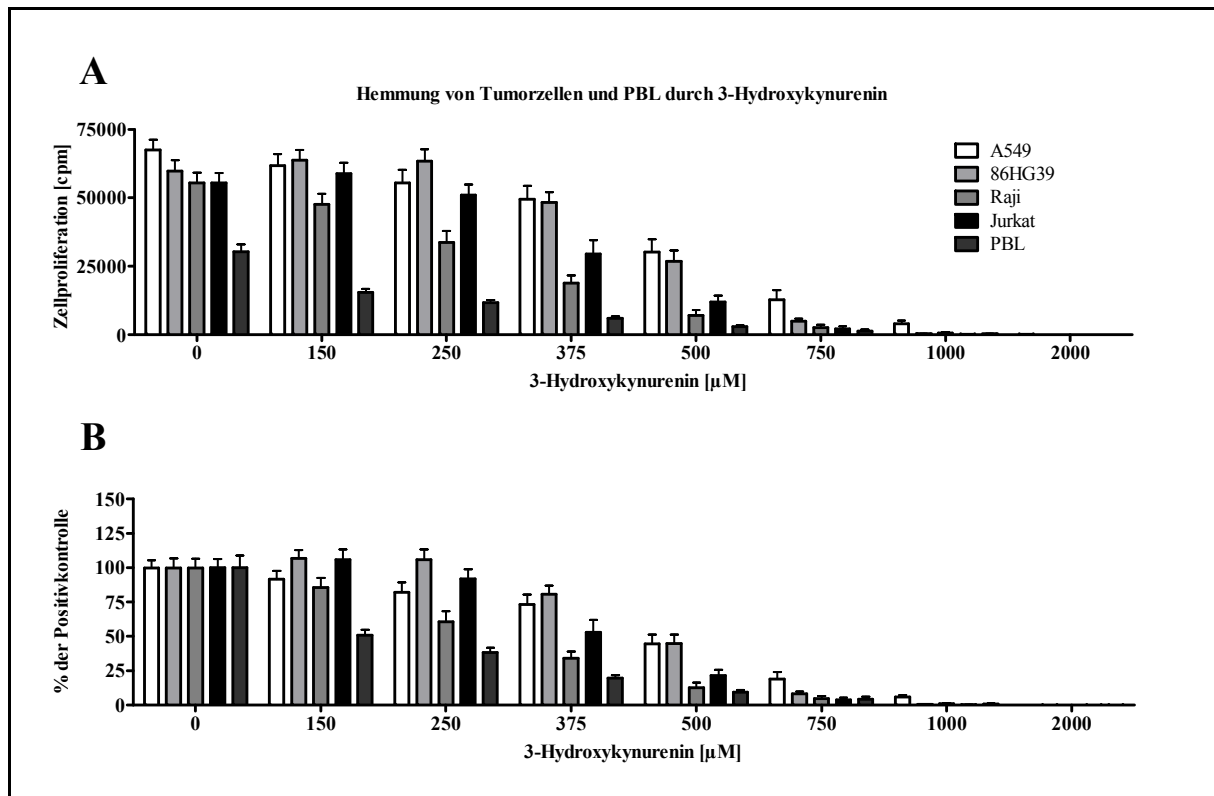


Abbildung 13: Vergleich der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch 3-Hydroxykynurenin

Darstellung der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch 3-Hydroxykynurenin in Absolutwerten und prozentual, als Referenz dient der jeweilige Ansatz ohne Metabolitzugabe. Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden 3-Hydroxykynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Graphik A zeigt die Proliferation als Absolutwerte in Zerfällen pro Minute (cpm), die Graphik B die normalisierte Analyse, wobei die Positivkontrolle ohne 3-Hydroxykynureninzugabe als jeweilige Referenz dient. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Auch bei Versuchen mit 3-Hydroxyanthranilsäure wird keine der Tumorzelllinien so stark inhibiert wie die anti-CD3 stimulierten T-Zellen (Abbildung 14). Insgesamt wird auch hier jede Zelllinie stärker in ihrem Wachstum gehemmt als durch Kynurenin. Eine eindeutige Abstufung der Empfindlichkeit für solide Zellen, lymphatische Tumorzellen und stimulierte T-Zellen zeigt sich hier jedoch nicht, gleichwohl die A549-Zelle am wenigsten in ihrer Proliferation beeinträchtigt wird. Die Daten stammen aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen.

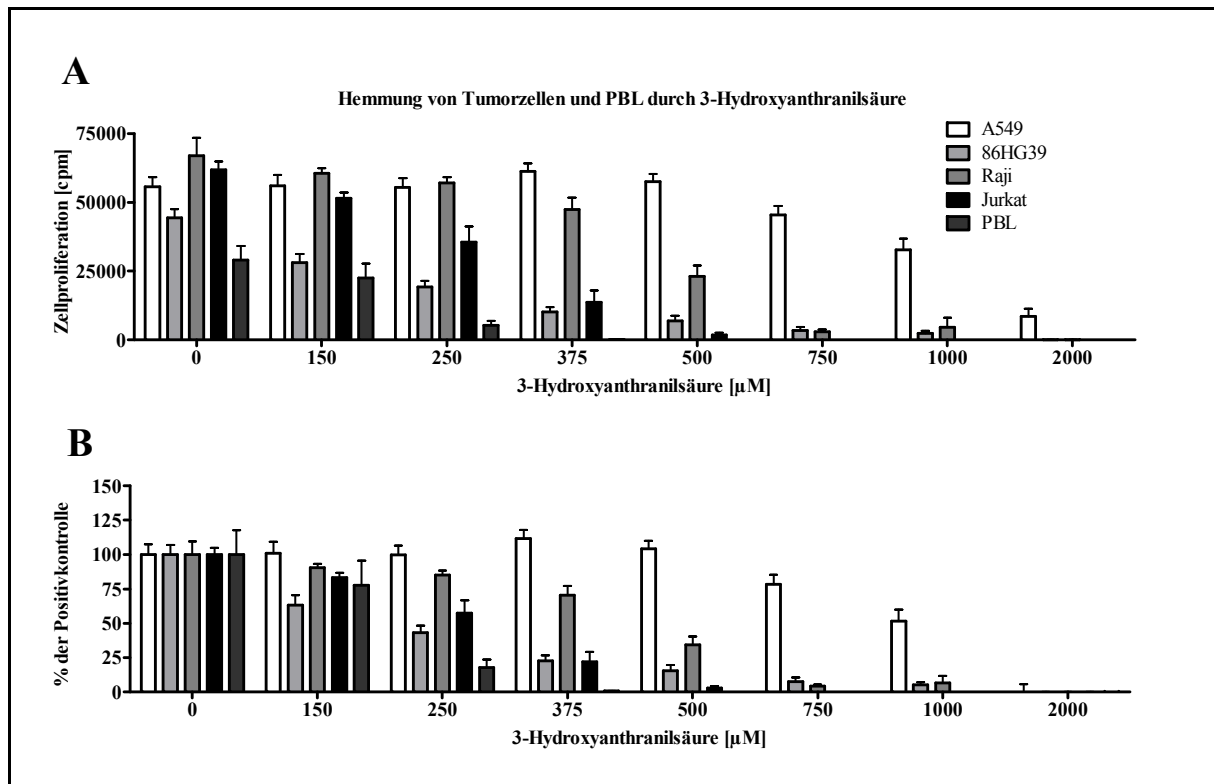


Abbildung 14: Vergleich der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch 3-Hydroxyanthranilsäure

Darstellung der Proliferationshemmung von Tumorzellen und T-Zellen durch 3-Hydroxyanthranilsäure in Absolutwerten und prozentual, als Referenz dient der jeweilige Ansatz ohne Metabolitzugabe. Anti-CD3-stimulierte PBL ($1,5 \times 10^5$ pro Vertiefung) und Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden 3-Hydroxyanthranilsäure in steigenden Konzentrationen von 150 μ M bis 2000 μ M ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [3 H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Graphik A zeigt die Proliferation als Absolutwerte in Zerfällen pro Minute (cpm), die Graphik B die normalisierte Analyse, wobei die Positivkontrolle ohne 3-Hydroxyanthranilzugabe als jeweilige Referenz dient. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus vier unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Für Kynureninsäure (KA), einen weiteren Metaboliten des Kynurenin-Pfades, wurde kein antiproliferativer Effekt auf das Wachstum von anti-CD3 stimulierten T-Zellen nachgewiesen (siehe Abbildung 6). In drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen wurde untersucht, ob durch KA das Wachstum der soliden Tumorzellen A549 und 86HG39 sowie der lymphatischen Zellen Raji und Jurkat gehemmt werden kann. Für keine der genannten Tumorzellen konnte ein wachstumshemmender Effekt durch KA gezeigt werden, wie Abbildung 15 zeigt.

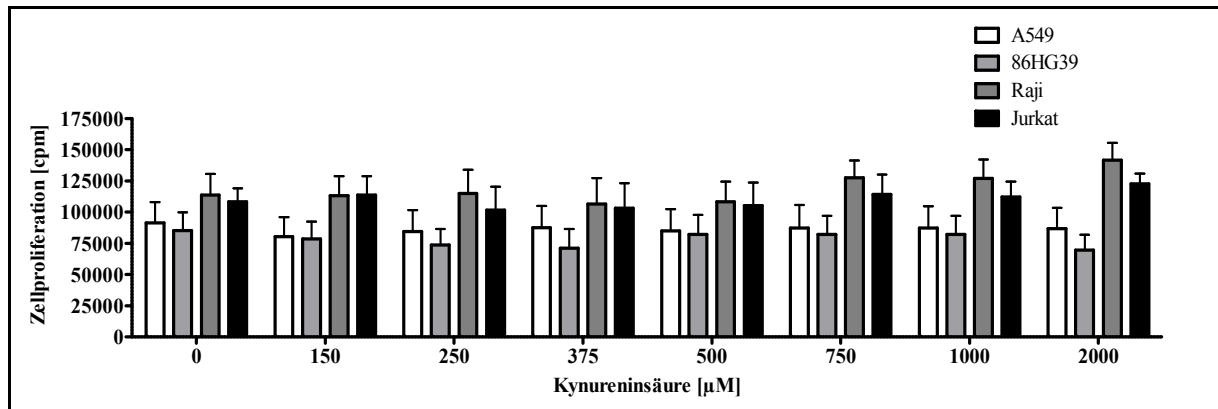


Abbildung 15: Keine Proliferationshemmung von Tumorzellen durch Kynureninsäure

Die Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden KA in steigenden Konzentrationen von 150 µM bis 2000 µM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Auch für Chinolinsäure (QA) konnte kein antiproliferativer Effekt auf die Tumorzelllinien A549, 86HG39, Jurkat und Raji nachgewiesen werden. Ebenso wenig wie anti-CD3-stimulierte T-Zellen (siehe Abbildung 6) lassen sich auch die genannten Tumorzelllinien nicht durch QA in ihrem Wachstum hemmen. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit je dreifachen Ansätzen.

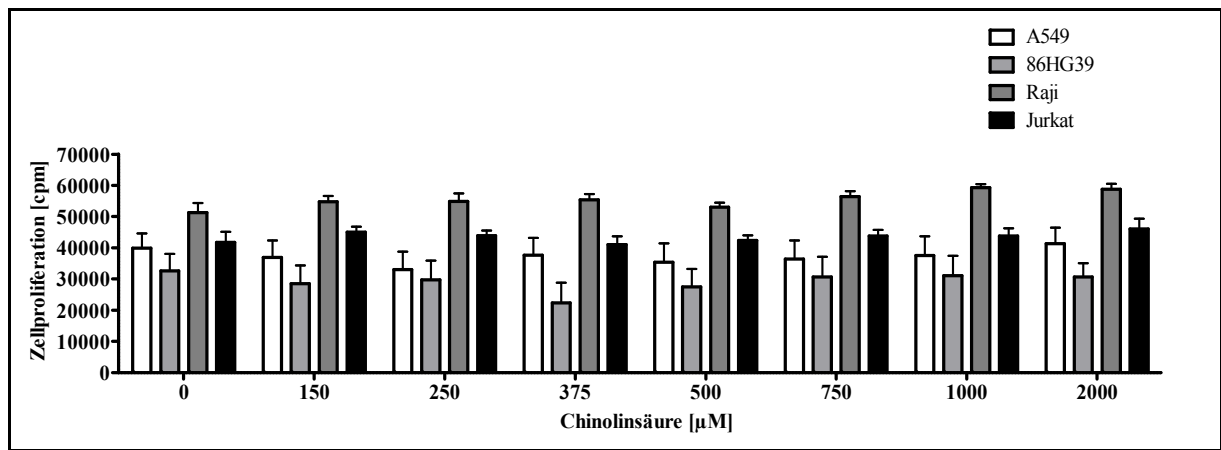


Abbildung 16: Keine Proliferationshemmung von Tumorzellen durch Chinolinsäure

Die Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden QA in steigenden Konzentrationen von 150 µM bis 2000 µM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Anthranilsäure (AA) ist der letzte Metabolit, der hinsichtlich einer wachstumshemmenden Potenz auf Tumorzellen untersucht wurde. In Versuchen mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen konnte keine Wirkung auf die Proliferation gezeigt werden (siehe Abbildung 6). Abbildung 17 zeigt die Daten aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen. Untersucht wurde der Effekt von AA auf das Wachstum von A549, 86HG39, Jurkat und Raji. Weder bei den soliden, noch bei den lymphatischen Tumorzelllinien konnte eine Beeinträchtigung des Zellwachstums, auch nicht durch die höchste Konzentration von 2000 µM, nachgewiesen werden.

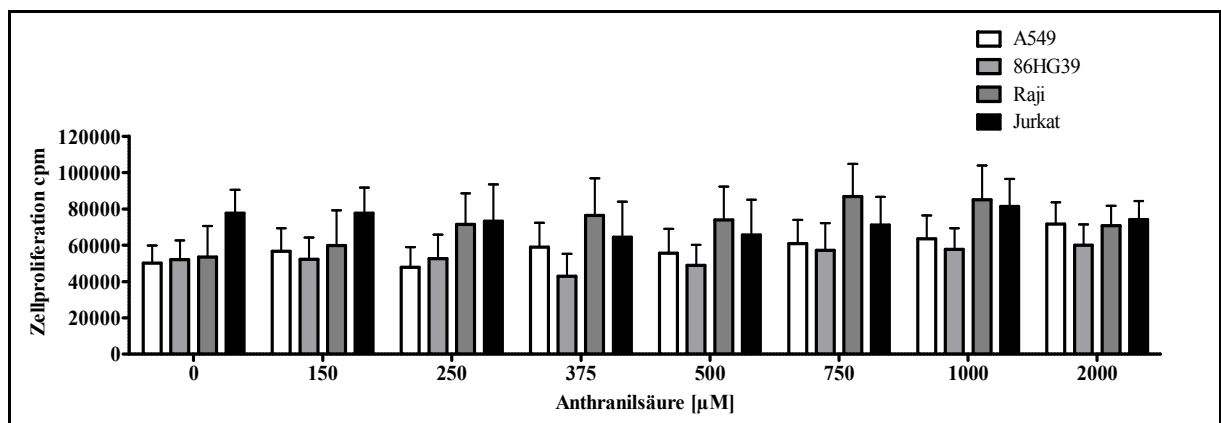


Abbildung 17: Keine Proliferationshemmung von Tumorzellen durch Anthranilsäure

Die Tumorzellen (1×10^4 pro Vertiefung) wurden Anthranilsäure in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen ermittelt.

Die Ergebnisse der Versuche mit Tumorzelllinien, anti-CD3 stimulierten T-Zellen und den Metaboliten des Kynurenin-Pfades werden im Folgenden noch einmal kurz zusammengefasst. Die Metaboliten mit antiproliferativem Effekt auf Tumorzelllinien und stimulierte T-Zellen sind KYN, HKYN und HAA, wohingegen KA, QA und AA keinen Einfluss auf das Wachstum der genannten Zellen zeigen. Die Wachstumshemmung ist für KYN, HKYN und HAA auf die stimulierten T-Zellen am stärksten. Bei den Versuchen mit KYN und HKYN zeigt sich ein stärkerer antiproliferativer Effekt auf die lymphatischen Tumorzelllinien Jurkat und Raji als auf die soliden Tumorzelllinien A549 und 86HG39. Versuche mit HAA lassen keine Abstufung der Sensitivität zwischen soliden und lymphatischen Tumorzelllinien erkennen, lediglich A549 wird weniger stark gehemmt. Tabelle 3 zeigt einen semi-quantitativen Vergleich der Wachstumsinhibition der genannten Zellen durch alle sechs untersuchten Metaboliten.

Tabelle 3: Semi-quantitativer Vergleich der Wachstumsinhibition der untersuchten Tumorzellen durch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades

Metabolit	A549	86HG39	Jurkat	Raji	T-Zellen
KYN	-	+	++	++	+++
HKYN	+	+	++	++	+++
HAA	+	++	++	++	+++
KA	-	-	-	-	-
QA	-	-	-	-	-
AA	-	-	-	-	-

3.3 Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von *Toxoplasma gondii*

Neben der immunmodulatorischen Wirkung vermittelt die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) auch antimikrobielle Effekte, wie beispielsweise Pfefferkorn *et al.* bereits 1986 an Versuchen mit dem intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* zeigen konnten. Auch B-Streptokokken als extrazelluläre Erreger werden durch die IDO in ihrer Proliferation gehemmt (Mackenzie *et al.*, 1998). Beide Arbeitsgruppen nannten die lokale Tryptophanverarmung durch die Induktion der IDO als Ursache des antimikrobiellen Effektes. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse von Experimenten mit den Metaboliten des Kynurenin-Pfades und *Toxoplasma gondii* vom BK-Stamm dargestellt. Als Wirtszellen für den intrazellulären Parasiten dienen die Glioblastomzelle 86HG39 und Zellen des Humanen Alveolarzellkarzinoms A549. Es wurden 1×10^4 Zellen pro Vertiefung und 2×10^4 Toxoplasmen pro Vertiefung in IMDM Medium mit 5%-igem FCS gelöst und die Metaboliten in den üblichen Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM hinzugegeben. Bei dreifachen Ansätzen wurde jeder Versuch zusätzlich noch doppelt angesetzt, um das Wachstum sowohl der Zellen als auch der Parasiten gleichzeitig messen zu können. Nach 72-stündiger Inkubation bei 37° C wurde daher jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin zur Bestimmung der Zellproliferation bzw. 12 KBq [^3H]-Uracil zur Bestimmung der Toxoplasmenproliferation hinzugegeben. Nach weiterer Inkubation für 24 Stunden bei 37° C konnten die Platten eingefroren und ausgewertet werden. Die folgende Abbildung 18 zeigt zunächst die Ergebnisse eines Einzelversuches mit 86HG39-Zellen und BK-Toxoplasmen. Neben dem schon aus Kapitel 3.2 bekanntem Effekt auf die Proliferation der Tumorzelle 86HG39 zeigt sich auch eine Wachstumshemmung von *T. gondii*, welche weitestgehend analog zur Inhibition der Wirtszellproliferation verläuft.

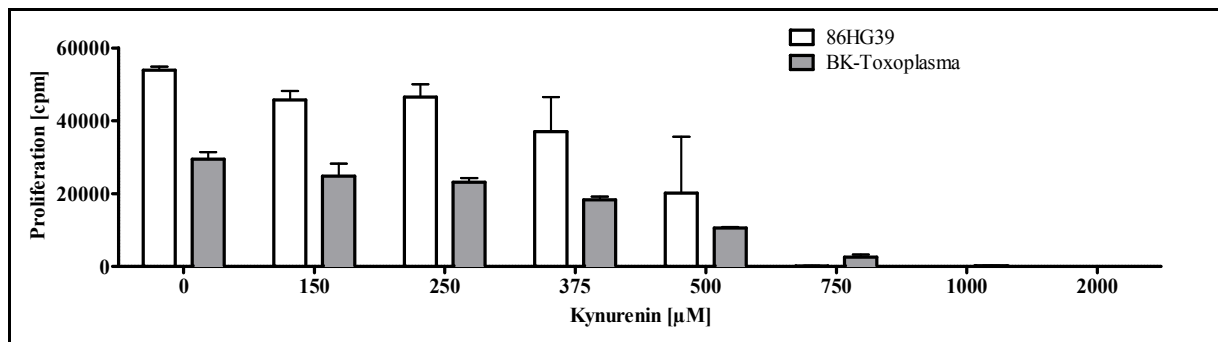


Abbildung 18: Vergleich der Proliferationshemmung von 86HG39 und *Toxoplasma gondii* durch Kynurenin

Die 86HG39-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden Kynurenin in steigenden Konzentrationen von 150 µM bis 2000 µM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardabweichung (SD) aus einem Einzelversuch mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

Diese Korrelation konnte auch in weiteren Experimenten bestätigt werden. Graphik A von Abbildung 19 zeigt die zusammengefassten Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen mit KYN und BK-Toxoplasmen sowie 86HG39-Zellen. Hier wird noch einmal deutlich, dass Zellen und *T. gondii* gleichmäßig in ihrer Proliferation gehemmt werden. Weiterhin zeigt Abbildung 19B die Resultate von jeweils drei unabhängigen Versuchen mit 3-Hydroxykynurenin (HKYN). Analog zu den Vorversuchen mit Tumorzellen zeigt sich auch hier eine stärkere Proliferationsinhibition der Zellen durch HKYN als durch KYN. Die Wachstumshemmung der Toxoplasmen erfolgt auch in dieser Versuchsreihe in gleichem Ausmaß wie die Inhibition des Wirtszellwachstums. Graphik C aus Abbildung 19 zeigt die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit 86HG39-Zellen, BK-Toxoplasmen und HAA. Wie auch bei Versuchen mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen ist die Proliferationsinhibition der Glioblastomzellen durch diesen Metaboliten stärker ausgeprägt als durch KYN und HKYN. Die intrazellulären Parasiten werden in gleichem Ausmaß wie ihre Wirtszellen in ihrer Proliferation gehemmt.

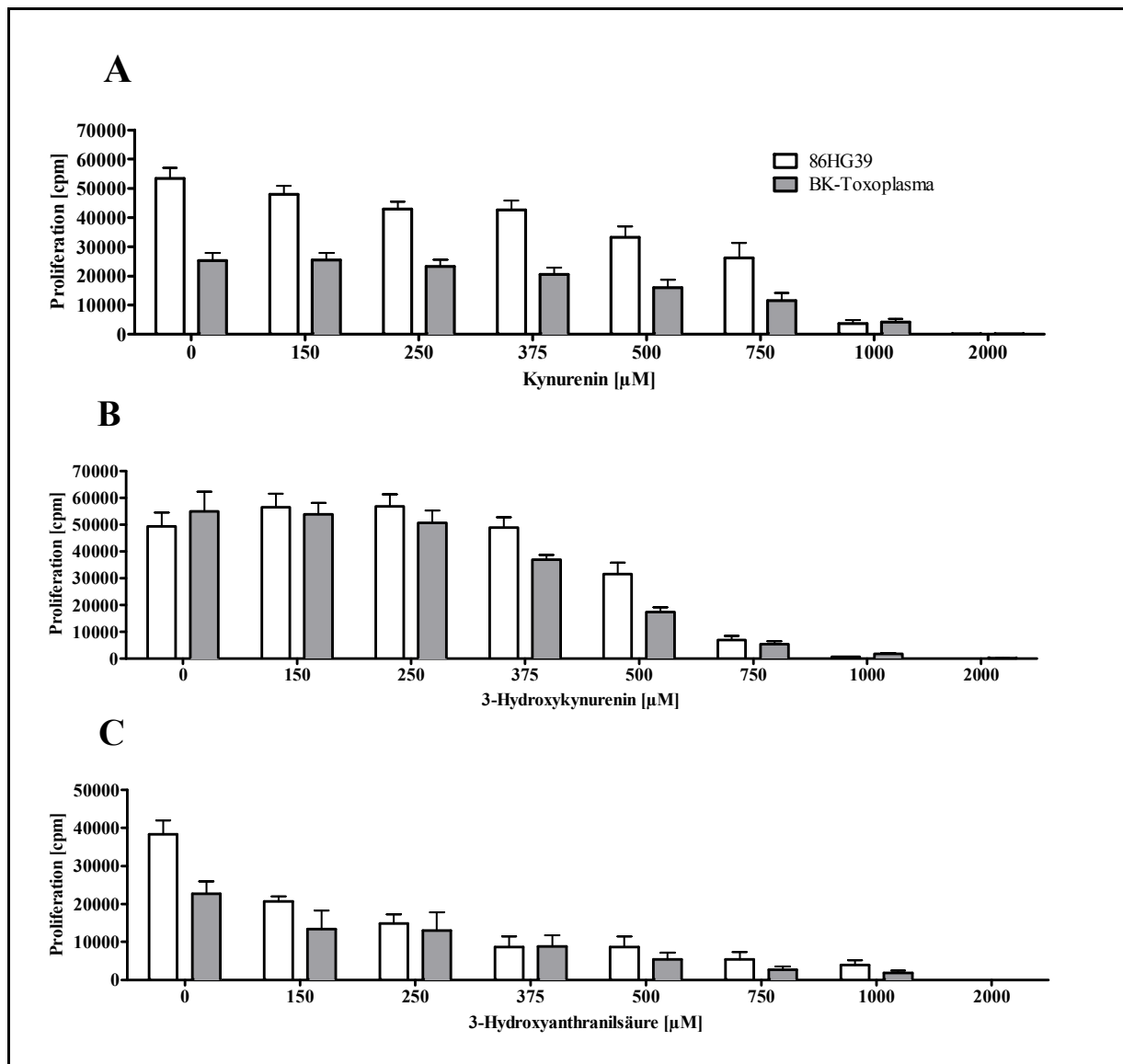


Abbildung 19: Vergleich der Proliferationshemmung von 86HG39 und *Toxoplasma gondii* durch Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure

Die 86HG39-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

Abbildung 20 stellt die Ergebnisse aus jeweils drei unabhängigen Versuchen mit 86HG39-Zellen, BK-Toxoplasmen und den Metaboliten Kynureninsäure (Graphik A), Chinolinsäure (Graphik B) und Anthranilsäure (Graphik C) dar. Analog zu den Experimenten mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen (siehe Abbildung 6) zeigt sich auch in dieser Versuchsreihe für keinen

der genannten Metaboliten ein antiproliferativer Effekt auf die Glioblastomzellen oder die Toxoplasmen, auch nicht bei der verwendeten Höchstkonzentration von 2000 μM .

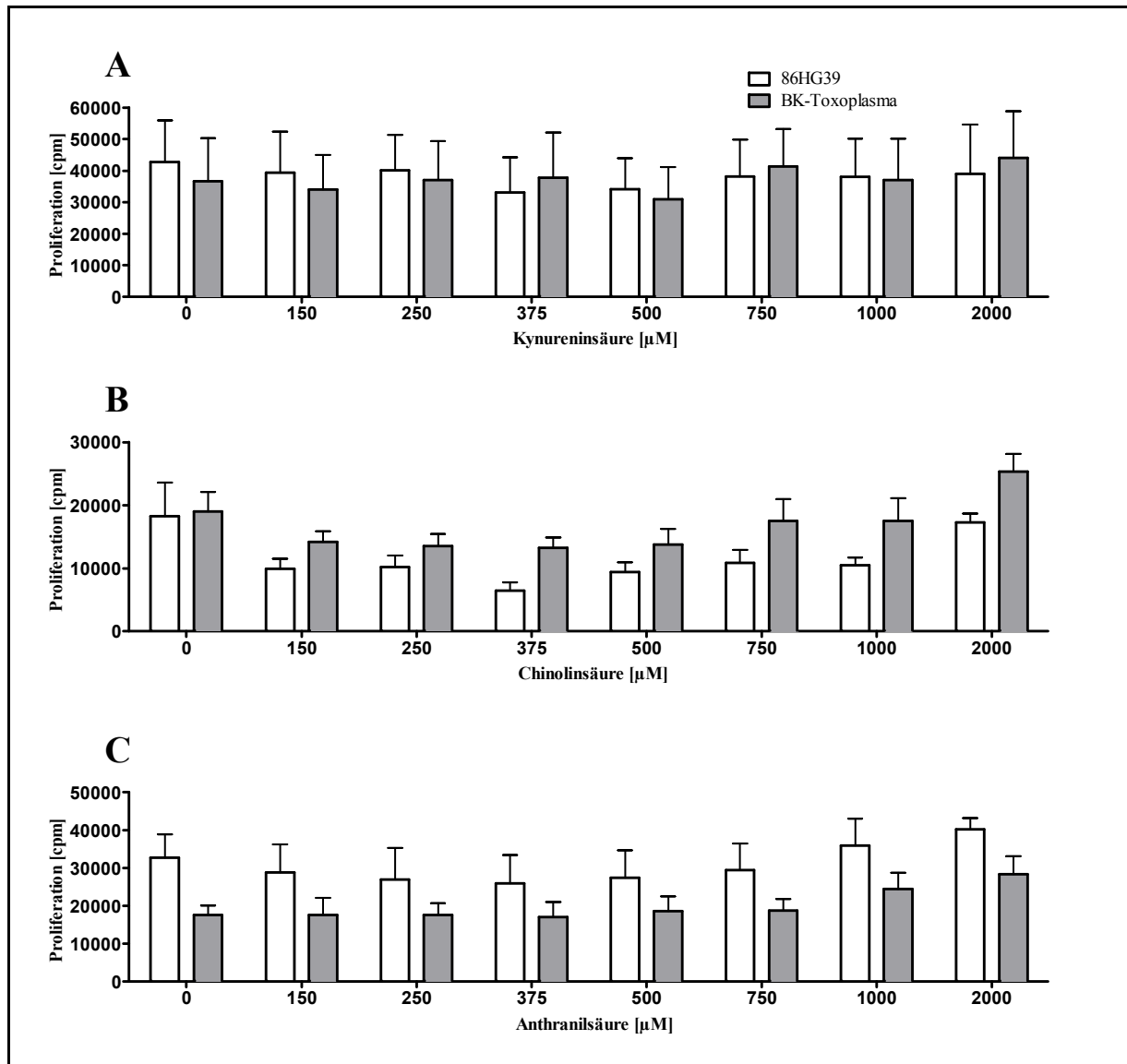


Abbildung 20: : Keine Proliferationshemmung von 86HG39 und *Toxoplasma gondii* durch Kynureninsäure, Chinolinsäure und Anthranilsäure

Die 86HG39-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

Als zweite Wirtszelle für die BK-Toxoplasmen wurden die Zellen des Humanen Alveolarzellkarzinoms A549 gewählt, welche bereits zuvor hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit durch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades untersucht wurden (siehe Kapitel 3.2). Abbildung 21 zeigt die

Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen, der Versuchsaufbau und Ablauf ist analog zu den Versuchen mit 86HG39-Zellen und BK-Toxoplasmen (siehe Abbildung 19). Graphik A zeigt die Ergebnisse der Versuche mit KYN. Es wird deutlich, dass weder die A549-Zellen noch die intrazellulären *T. gondii*, auch nicht durch die Höchstkonzentration von 2000 μM KYN, in ihrem Wachstum gehemmt werden. Graphik B gibt die Ergebnisse der Experimente mit HKYN wieder. Es zeigt sich eine deutliche Wachstumsinhibition der Tumorzellen und Toxoplasmen mit steigender Konzentration von HKYN. Auch hier werden Wirtszelle und Parasit gleichermaßen in ihrem Wachstum gehemmt. In Graphik C werden die Resultate von Experimenten mit HAA und A549-Zellen sowie BK-Toxoplasmen dargestellt. Das Ausmaß der Proliferationsinhibition ist nicht so stark ausgeprägt wie bei HKYN, jedoch zeigt sich eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums bei noch nicht beeinträchtigter Tumorzellproliferation durch niedrige Konzentrationen.

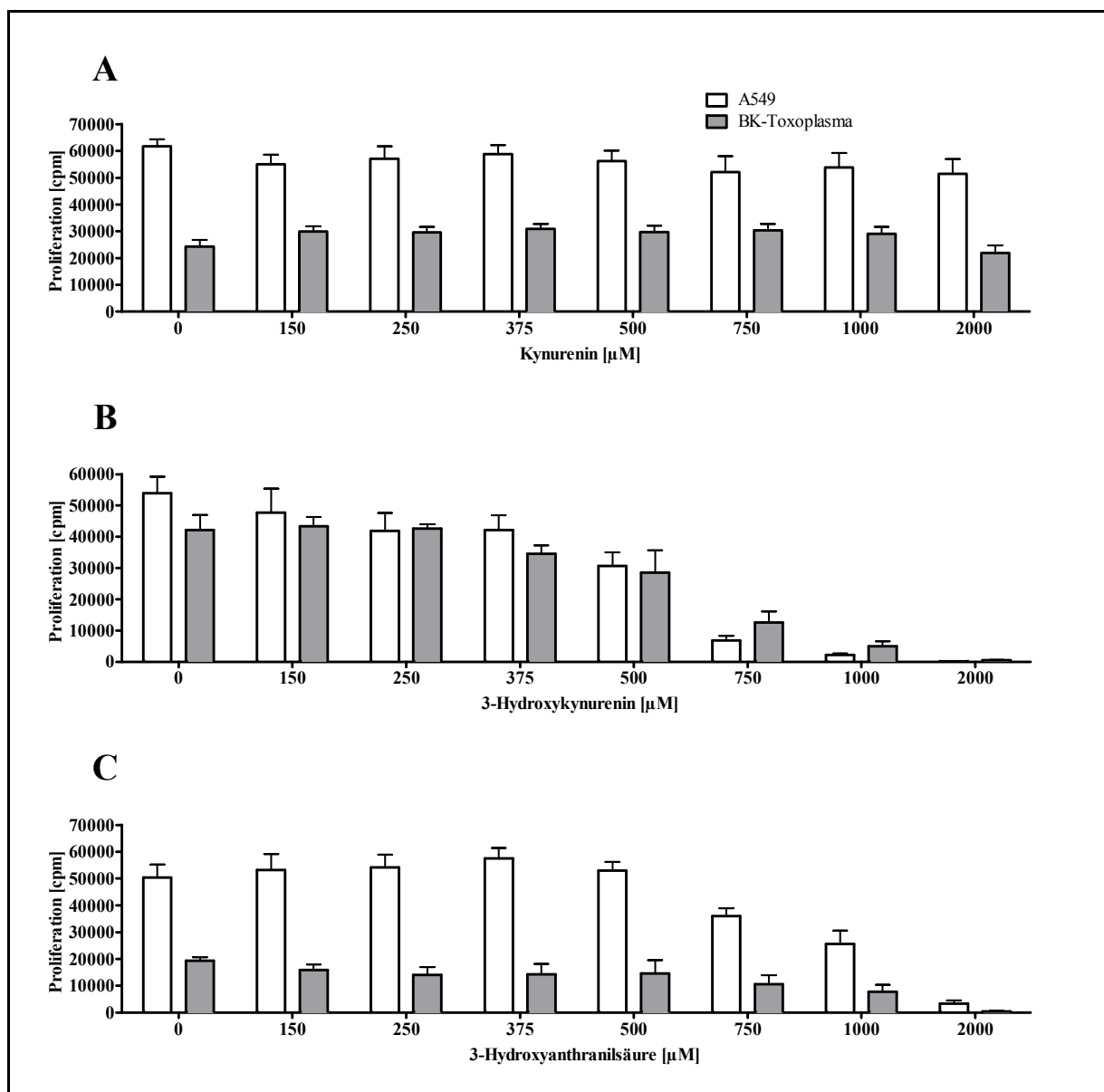


Abbildung 21: Vergleich der Proliferationshemmung von A549 und *Toxoplasma gondii* durch Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyantranilsäure

Die A549-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

Anschaulicher wird dieser Unterschied in der normalisierten Analyse in Abbildung 22. Dabei wird die Proliferation der Zellen und Parasiten stets auf die jeweilige Positivkontrolle ohne Zugabe von HAA bezogen. Bei HAA-Konzentrationen von 150 μM bis 500 μM wird jetzt eine unterschiedlich starke Inhibition der Proliferation von Wirtszelle und Parasit deutlich. Während bei Konzentrationen von 150 bis 500 μM die Tumorzelle A549 noch nicht beeinträchtigt wird, zeigt sich bei den *T. gondii* vom BK-Stamm schon eine deutliche Wachstums-
hemmung, die für die Konzentrationen 150 μM und 250 μM im Vergleich zur Tumorzellproliferation signifikant ist. Abbildung 22 gibt die Analyse von Daten aus 5 unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen wieder.

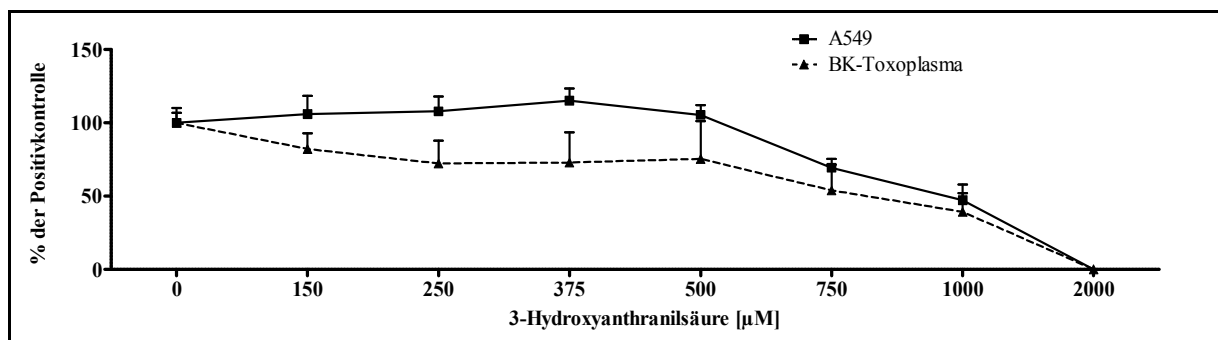


Abbildung 22: Prozentuale Hemmung der Proliferation von A549-Zellen und *Toxoplasma gondii* durch 3-Hydroxyanthranilsäure, prozentuale Darstellung der Inhibition

Die A549-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden 3-Hydroxyanthranilsäure in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Dargestellt sind die Analysen als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) von 5 unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen. Es zeigt sich in Konzentrationen von 150 μM bis 500 μM eine Inhibition der Toxoplasma-Proliferation bei noch unbeeinträchtigtem Tumorzellwachstum.

Die Tryptophanmetabolite KA, QA und AA wurden ebenfalls hinsichtlich eines antimikrobiellen Effektes auf das Wachstum von *Toxoplasma gondii* vom BK-Stamm untersucht. Für kei-

nen der genannten Metaboliten konnte ein antiproliferativer Effekt gezeigt werden, weder auf A549-Zellen noch auf die intrazellulären Toxoplasmen. Beide wurden auch nicht durch die höchste verwendete Konzentration von 2000 μM in ihrem Wachstum gehemmt. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse von je drei unabhängigen Versuchen mit jeweils dreifachen Ansätzen.

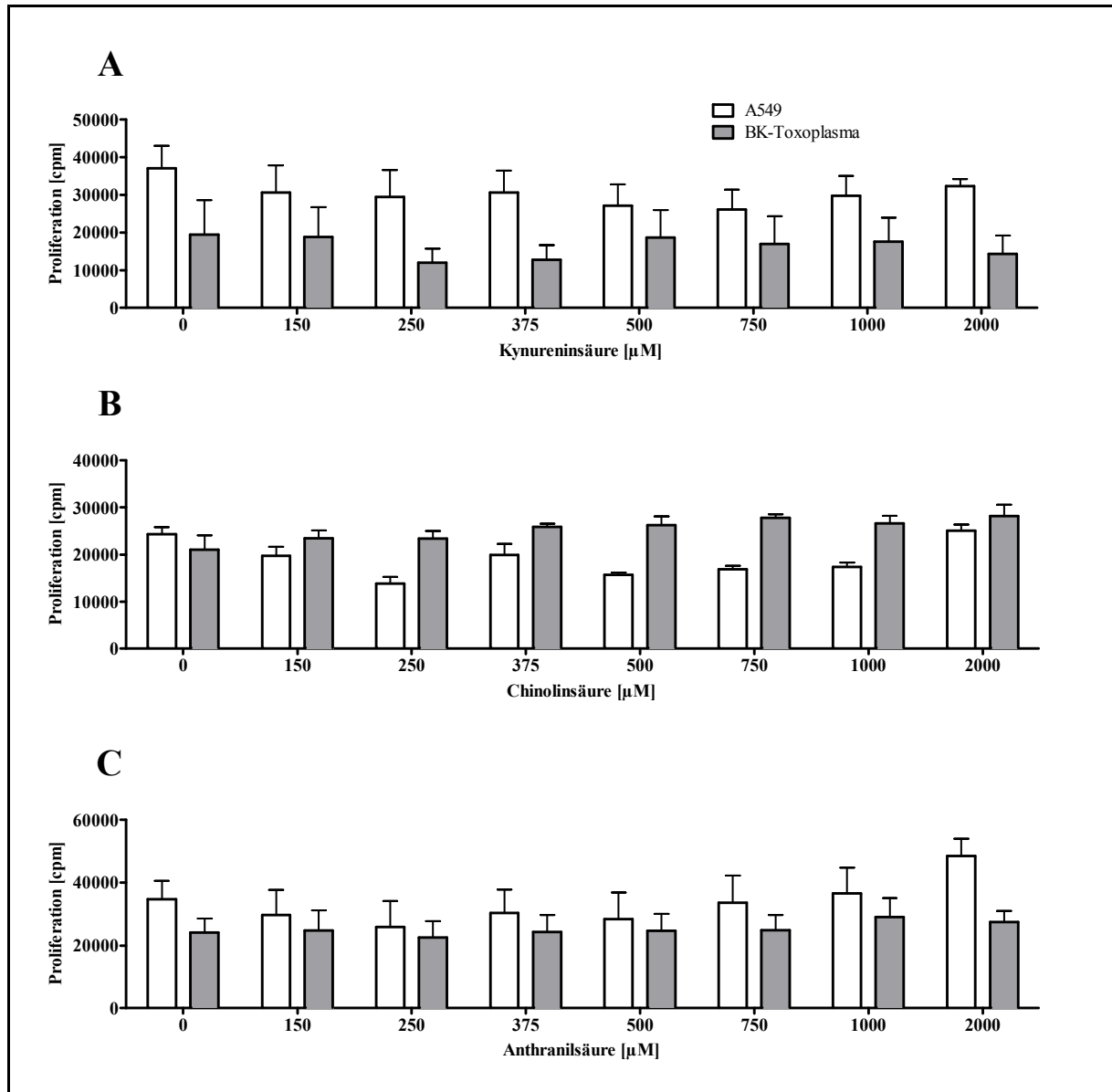


Abbildung 23: Keine Proliferationshemmung von A549 und *Toxoplasma gondii* durch Kynureninsäure, Chinolinsäure und Anthranilsäure

Die A549-Zellen (1×10^4 pro Vertiefung) und BK-Toxoplasmen (2×10^4 pro Vertiefung) wurden den Metaboliten in steigenden Konzentrationen von 150 μM bis 2000 μM ausgesetzt und 72 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde jeder Vertiefung 7,4 kBq [^3H]-Thymidin oder 12 KBq [^3H]-Uracil hinzugegeben und weitere 24 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Proliferation der Zellen und Toxoplasmen wurde im Beta-Counter anhand der radioaktiven Zerfälle pro Minute (cpm) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte $\pm$ Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

In den dargestellten Versuchen mit *Toxoplasma gondii*, den Tumorzelllinien A549 und 86HG39 sowie den Metaboliten des Kynurenin-Pfades zeigte sich erneut ein antiproliferativer Effekt der Metaboliten KYN, HKYN und HAA. Dabei wurden sowohl die Wirtszellen als auch die intrazellulären Toxoplasmen in ihrem Wachstum gehemmt. Es zeigte sich jedoch, dass die Wachstumshemmung von Zellen und Toxoplasmen bei den meisten Versuchen gleichermaßen erfolgt. Dieser Zusammenhang lässt vermuten, dass die intrazellulären Parasiten lediglich nicht mehr wachsen, weil ihre Wirtszellen durch die Metaboliten gehemmt werden. Nur die Versuche mit HAA und A549-Zellen zeigen andere Ergebnisse (siehe Abbildungen 21C und 22). In dieser Konstellation zeigte sich bei fünf unabhängigen Experimenten eine spezifische Hemmung des Toxoplasmenwachstums. Bei HAA-Konzentrationen von 150 μM bis 500 μM werden die Parasiten bereits signifikant gehemmt, während die A549-Zellen noch nicht beeinträchtigt wird.

3.4 Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*

Eine antiproliferative Wirkung der IDO auf extrazelluläre Erreger wie z. B. B-Streptokokken ist bereits bekannt (Mackenzie *et al.*, 1998). Die Autoren nannten die lokale Tryptophanverarmung als Ursache des antimikrobiellen Effektes. In einem letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der direkte Einfluss von Tryptophanmetaboliten auf das Wachstum von *S. aureus* untersucht. Eine Bakterienkolonie von *S. aureus*, welche über Nacht auf einer Blutagarplatte im Brutschrank bei 37°C gewachsen war, wurde in 5 mL PBS resuspendiert und mit PBS auf 1:100000 weiter verdünnt. 10 μL des Bakteriengemisches (je ca. 10 – 100 Koloniebildende Einheiten) wurden dann zu 180 μL RPMI Medium sowie 10 μL Metabolitlösung gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Untersucht wurde der Einfluss der Metaboliten KYN, HKYN, HAA und QA, die Konzentration der Metabolitlösung betrug 1000 $\mu\text{g/ml}$. Zum Vergleich dient die Positivkontrolle ohne Metabolitzugabe. Am folgenden Tag wurde das Bakterienwachstum im ELISA-Photometer gemessen. Dabei entsprach die Stärke der Absorption bei 620 nm der Dichte (Menge) der gewachsenen Bakterien. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen. Die Negativkontrolle zeigt lediglich die Trübung durch das FCS, welche ebenfalls gemessen wird.

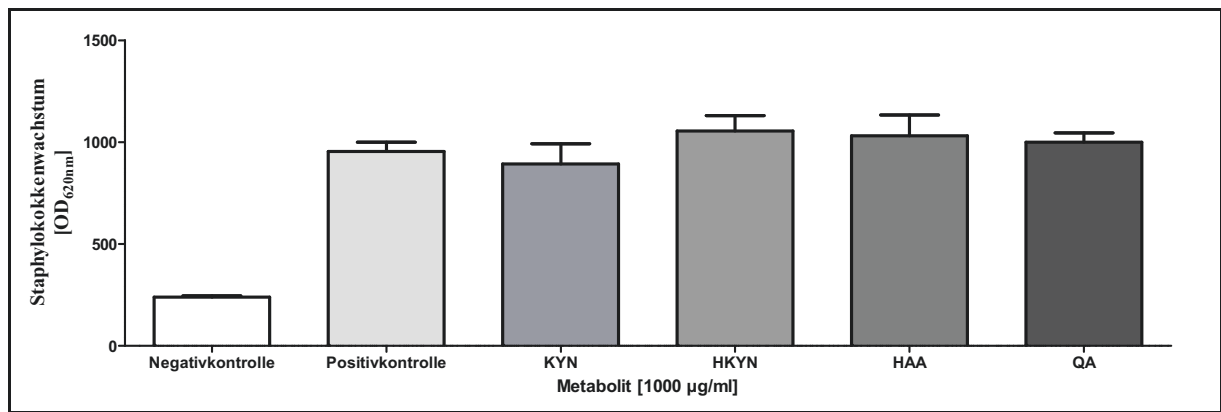


Abbildung 24: Keine Proliferationshemmung von *Staphylococcus aureus* durch Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Chinolinsäure.

Eine *S. aureus*-Kolonie, die über Nacht auf einer Blutagarplatte im Brutschrank bei 37°C gewachsen war, wurde in 5 mL PBS resuspendiert und mit PBS auf 1:100000 weiter verdünnt. 10 µL des Bakteriengemisches (je ca. 10 – 100 Kolonie-bildende Einheiten) wurden dann zu 180 µL RPMI Medium sowie 10 µl Metabolitlösung gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Konzentration der Metaboliten betrug 1000 µg/ml. Am folgenden Tag wurde das Bakterienwachstum im ELISA-Photometer gemessen. Dabei entsprach die Stärke der Absorption bei 620 nm der Dichte (Menge) der gewachsenen Bakterien. Die Daten wurden als Durchschnittswerte ± Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen mit dreifachen Ansätzen ermittelt.

Es zeigt sich, dass durch keinen der untersuchten Metaboliten eine Proliferationshemmung von *S. aureus* bei einer Metabolitkonzentration von 1000 µg/ml bewirkt wird. Das Ausmaß des Staphylokokkenwachstums war bei allen untersuchten Metaboliten mit der Positivkontrolle ohne Metabolitzugabe nahezu identisch.

4 Diskussion

Seit der Entdeckung, dass IFN- γ stimulierte Fibroblasten das Wachstum von *Toxoplasma gondii* durch Induktion des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) hemmen (Pfefferkorn *et al.*, 1986), steht die IDO im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses vieler Arbeitsgruppen. Als Ursache dieses antimikrobiellen Effektes beschrieben Pfefferkorn *et al.* die lokale Verarmung der essenziellen Aminosäure Tryptophan durch die Induktion der IDO, welche die Reaktion von Tryptophan zu Formylkynurenin katabolisiert (Taylor *et al.*, 1991). In ihren Experimenten stimulierten Pfefferkorn *et al.* humane Fibroblasten, welche mit *Toxoplasma gondii* infiziert wurden, mit IFN- γ . Dies führte zu einer Tryptophanverarmung und somit zur Toxoplasmose (Pfefferkorn, 1984). Erst zwei Jahre später entdeckten Pfefferkorn *et al.*, dass die IDO für die IFN- γ induzierte Tryptophanverarmung und somit Toxoplasmose verantwortlich ist (Pfefferkorn *et al.*, 1986 A und B). Es konnte zusätzlich für weitere Zytokine ein potenzierender oder inhibierender Effekt auf die IFN- γ induzierte antimikrobielle Wirkung gezeigt werden. So fanden Däubener *et al.* 1996 für TNF- α einen verstärkenden Effekt auf die IFN- γ induzierte Toxoplasmose in humanen Glioblastomzelllinien. Für Interleukin-4 (IL-4) und IL-10 hingegen konnte ein inhibierender Effekt auf die IFN- γ induzierte IDO-Aktivierung bei humanen Makrophagen gezeigt werden (Mackenzie *et al.*, 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die toxoplasmostatische Wirkung tatsächlich auf der IDO-abhängigen Tryptophanverarmung beruht, und nicht direkt oder zumindest teilweise durch IFN- γ selbst bedingt ist (Habara-Ohkubo *et al.*, 1993 und Dai *et al.*, 1994). So zeigten Dai *et al.*, dass humane Fibroblasten, welche mit rekombinanter IDO transfiziert wurden, auch ohne Stimulation mit IFN- γ in der Lage waren, das Wachstum von *Toxoplasma gondii* zu inhibieren. In den Versuchen von Habara-Ohkubo wurden murine Rektumkarzinomzellen mit einem IDO-exprimierendem Plasmid mit einem Schwermetall-responsivem Promoter transfiziert. In Anwesenheit von Zinksulfat wurde eine hohe IDO-Aktivität und konsekutiv eine niedrige Tryptophankonzentration im Medium gemessen. Dies führte auch ohne Zugabe von IFN- γ zur kompletten Wachstumsinhibition von *T. gondii* in murinen Rektumkarzinomzellen (Habara-Ohkubo *et al.*, 1993).

Auch für Bakterien konnte ein IDO-induzierter, antimikrobieller Effekt nachgewiesen werden. Bereits 1986 konnte ein antibakterieller Effekt von IFN- γ stimulierten T24-Zellen gegen den intrazellulären Erreger *Chlamydia psittaci* gezeigt werden (Byrne *et al.*, 1986). Da der antibakterielle Effekt durch Zugabe von Tryptophan aufgehoben wurde, nannten Byrne *et al.* die IDO-induzierte Tryptophanverarmung als Ursache. Auch für extrazelluläre Bakterien wurde eine antimikrobielle Wirksamkeit durch IDO-Induktion gefunden. Dies konnte u. a. gezeigt

werden für Streptokokken der Gruppe B (Mackenzie *et al.*, 1998), Enterokokken (Däubener *et al.*, 1999) sowie *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001). Als Ursache für den genannten antimikrobiellen Effekt wurde stets die lokale Tryptophanverarmung genannt. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen untersucht, ob auch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades einen wachstumshemmenden Effekt auf Mikroorganismen haben. Der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt des Kynurenin-Pfades, die Umsetzung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin, wird durch die IDO katalysiert. Durch weitere Reaktionen entstehen daraus die Metaboliten des Kynurenin-Pfades (siehe Abbildung 1). Für einige Metaboliten des Kynurenin-Pfades wurde bereits ein hemmender Effekt auf die Proliferation von anti-CD3 stimulierten T-Zellen nachgewiesen (siehe Kapitel 3.1, Terness *et al.*, 2002). Namentlich sind dies Kynurenin (KYN), 3-Hydroxykynurenin (HKYN) und 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA), während Kynureninsäure (KA), Chinolinsäure (QA) und Anthranilsäure (AA) keinen wachstumshemmenden Effekt auf T-Zellen zeigten. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse mit den Metaboliten des Kynurenin-Pfades und extrazellulären Erregern (siehe Kapitel 3.4) werden im Folgenden zusammengefasst. Es konnte für die untersuchten Staphylokokken kein wachstumshemmender Effekt durch die genannten Metaboliten gefunden werden. Somit unterstützen diese Ergebnisse einmal mehr die Hypothese, dass die bereits genannte, antibakterielle Wirkung der IDO vor allem auf der lokalen Tryptophanverarmung beruht. Ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit behandelt Versuche mit Tryptophanmetaboliten und dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* (Kapitel 3.3). Als Wirtszellen wurden die humane Glioblastomzelllinie 86HG39 und die Zelllinie des humanen Alveolarzellkarzinoms A549 gewählt, diese wurden infiziert mit *T. gondii* vom BK-Stamm. Die in Kapitel 3.3 dargestellten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen. Es ließ sich eine Inhibition des Parasitenwachstums, aber auch der Wirtszellen, durch die Metaboliten KYN, HKYN und HAA nachweisen. Das Ausmaß der Wachstumsinhibition für Wirtszelle und Parasit war in den meisten Fällen vergleichbar (siehe Abbildung 18-21), so dass die Parasitenhemmung durch die Inhibition der Wirtszelle begründet sein kann. Für die Metaboliten KA, QA und AA konnte weder eine Hemmung des Wirtszellwachstums noch der Toxoplasmenproliferation nachgewiesen werden (siehe Abbildung 20). Bei den Experimenten mit A549-Zellen, BK-Toxoplasmen und 3-Hydroxyanthranilsäure ergab sich jedoch eine bevorzugte Inhibition des Toxoplasmenwachstums (siehe Abbildung 3.21C und 3.22). Durch niedrige Konzentrationen von HAA von 150 μ M bis 500 μ M fand sich eine Wachstumshemmung von *Toxoplasma gondii*, wohingegen das Wachstum der A549-Zelllinie als Wirt noch völlig unbeeinträchtigt war. Diese Erkenntnis der spezifischen Parasitenhemmung kann allerdings zum jetzigen Zeitpunkt allenfalls zur Aufstellung höchst spekulativer Hypothesen dienen. Selbst die minimal benötigte Konzentra-

tion an 3-Hydroxyanthranilsäure zur Toxoplasmenhemmung von ca. 150 μM würde *in vivo* nur dann erreicht werden, wenn das zwei- bis dreifache des normalen Tryptophan-Serumspiegels von 50-100 μM (Terness *et al.*, 2006) via Kynurenin-Pfad vollständig zu HAA katabolisiert werden würde. Dass solch hohe, systemische Plasmaspiegel *in vivo* erreicht werden können, erscheint unwahrscheinlich. Wichtiger als der Plasmaspiegel ist jedoch die lokale Konzentration akkumulierender Metaboliten, beispielsweise im Entzündungsherd bei zerebraler Toxoplasmose. Aktuell liegen keine Daten über die lokal erreichten Metabolitkonzentrationen im Rahmen von Entzündungsprozessen *in vivo* vor. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, dass die im Versuch wirksamen Konzentrationen von 150 μM bis 500 μM , welche selektiv die Toxoplasmen inhibieren, *in vivo* nicht doch erreicht werden können. Ein weiterer Kritikpunkt an der Signifikanz des oben genannten Sensitivitätsunterschiedes zwischen Parasit und Wirtszelle gegen 3-HAA mag die Wahl der Wirtszelle sein. So ist die A549-Zelle, für die ja die beschriebene, selektive Hemmung der Toxoplasmen nur gilt, eine Tumorzelle (Humanes Alveolarzellkarzinom) und im Vergleich zu anderen Zelllinien wie 86HG39 (Humanes Glioblastom) oder T-Zellen (siehe Kapitel 3.2 und 3.1) äußerst resistent gegenüber den untersuchten Metaboliten.

Eine mögliche Wirkweise der Metaboliten, speziell HAA, ist die Induktion der Apoptose. Dies konnte für T-Zellen (Fallarino *et al.*, 2002) sowie Monozyten bzw. Makrophagen (Morita *et al.*, 2001) gezeigt werden. Da maligne Zellen häufig Resistenzmechanismen gegen die Induktion der Apoptose entwickeln, könnte dies ggf. auch für die höhere Resistenz der A549-Zellen gegenüber HAA verantwortlich sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen jedoch erkennen, dass auch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades *in vitro* eine antimikrobielle Wirkung erzielen können. Ob und wie weit diese Metaboliten eine Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitserregern *in vivo* spielen, muss noch genauer untersucht werden. Eine alleinige antimikrobielle Wirkung aufgrund der Erzeugung eines lokalen Tryptophanmangels wird jedoch mittlerweile angezweifelt, da *in vivo* kontinuierlich Tryptophan aus der Zirkulation nachgeliefert wird. Bei *in vitro* Experimenten handelt es sich dagegen um „statische“ Systeme in denen eine Tryptophandepletion wesentlich einfacher zu erreichen ist.

Neben der antimikrobiellen Aktivität der IDO entdeckten Munn *et al.* 1998 einen weiteren, physiologisch bedeutsamen Aspekt der IDO. Sie fanden heraus, dass die IDO die Abstoßung des Fötus bei allogenen trächtigen Mäusen verhindern kann, indem die T-Zell-Proliferation durch lokale Tryptophanverarmung gehemmt wird. Seitdem wird der IDO eine Rolle bei vielen immunologischen Vorgängen, wie Autoimmunerkrankungen und Transplantationen, zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass die IDO die Aktivität der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), eine der Multiplen Sklerose ähnlichen, experimentellen ZNS-

Erkrankung von Mäusen, herunterreguliert (Kwidzinski *et al.*, 2005). Die immunmodulatorische Funktion der IDO im Rahmen von Transplantationen zeigten Beutelspacher *et al.* 2006 im Tierexperiment. Sie fanden heraus, dass durch Hochregulation der IDO mRNA im Spenderorgan die Transplantatabstoßung nach Hornhautverpflanzung bei Mäusen inhibiert wurde. Auch *in vivo*-Studien untermauern die immunmodulatorische Wirkung der IDO im Rahmen von Transplantationen. So konnte der günstige Effekt von kombinierter Leber- und Nierentransplantation auf das Transplantatüberleben zumindest teilweise einer erhöhten IDO-Aktivität in der Spenderleber gutgeschrieben werden (Ingelsten *et al.*, 2009). Eine mögliche Erklärung für die immunmodulatorische Wirkung der Tryptophanverarmung lieferten Munn *et al.* 2005. Sie fanden heraus, dass durch den Anstieg unbeladener Transfer-RNA der sogenannte GCN2-Kinase-Pfad in T-Zellen aktiviert wird. Dadurch kommt es zu einer integrierten Stressantwort (*Integrated Stress Response*, ISR), welche zu Zellzyklusarrest, Apoptose oder Zelldifferenzierung führen kann (Munn *et al.*, 2005). Neben der Immunmodulation durch Tryptophanverarmung wird auch den Metaboliten des Kynurenin-Pfades (siehe Abbildung 1, Kapitel 1) immunologische Wirksamkeit zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass Kynurenin und Picolinsäure die Proliferation von alloreaktiven T-Zellen und natürlichen Killerzellen hemmen (Frumento *et al.*, 2002). Auch für anti-CD3 stimulierte T-Zellen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein antiproliferativer Effekt durch die Tryptophanmetabolite Kynurenin (KYN), 3-Hydroxykynurenin (HKYN) und 3-Hydroxyanthranilsäure (HAA) gezeigt werden (siehe Kapitel 3.1). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen der Arbeitsgruppe um Terness (Terness *et al.*, 2002) und dienten als Grundlage für die weiteren Versuche mit Tumorzellen, die in Kapitel 3.2 dargestellt sind.

Die Rolle der IDO in der Tumorummunologie ist ein weites Feld. Tumorzellen entwickeln sich durch genetische Mutation aus gesunden, körpereigenen Zellen. Zu den Charakteristika von malignen Zellen gehören Immortalisation, Resistenz gegen wachstumsinhibierende Signale und Apoptose, invasives und metastatisches Wachstum und Angiogenese. All diese Veränderungen führen zur Expression atypischer Antigene auf der Zelloberfläche, welches eine Erkennung und Bekämpfung durch das Immunsystem zur Folge hat. Es muss daher als ein weiteres Charakteristikum maligner Zellen eine Fähigkeit, sich dem Immunsystem zu entziehen, vorliegen (engl. *immune escape*). Dieses Phänomen wird als tumorinduzierte Toleranz bezeichnet, die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute weitestgehend unklar. Es gibt jedoch Hinweise, dass die IDO Tumorzellen zu einer solchen Immuntoleranz verhelfen kann. Zu nennen ist hier die Arbeit von Uyttenhove *et al.* (2003). Sie zeigt nicht nur, dass sehr viele Tumorzelllinien IDO exprimieren, sondern auch dass die IDO im Tierexperiment die Elimination von Tumoren durch das Immunsystem verhindert. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast

zu der früheren Meinung, dass die IDO einen anti-Tumoreffekt bewirkt (Ozaki *et al.*, 1988). Bei den Versuchen von Uyttenhove *et al.* wurden Mäuse zunächst gegen bestimmte Tumoran-tigene immunisiert. Vier Wochen später wurden den Mäusen dann die immunogenen Tumor-zellklone in die Bauchhöhle injiziert. Diese Klone unterschieden sich hinsichtlich ihrer IDO-Aktivität. Während die meisten IDO-negativen Tumoren abgestoßen wurden, starben fast alle Mäuse, denen IDO-positive Tumorzellklone injiziert wurden. Während es bei den Mäusen mit IDO-negativen Tumoren zu einer starken Vermehrung der intraperitonealen spezifischen T-Zellen kam, zeigten die Mäuse mit IDO-positiven Tumoren eine konstante bzw. abnehmende Zahl an spezifischen T-Zellen in der Bauchhöhle.

Etliche Studien weisen darauf hin, dass eine IDO-Expression von Tumoren mit einer schlechten Prognose einhergeht. Dies wurde bspw. gezeigt für Ovarialkarzinome (Okamoto *et al.*, 2005), Endometriumkarzinome (Ino *et al.*, 2006) sowie kolorektale Karzinome (Brandacher *et al.*, 2006). Die von Uyttenhove *et al.* beschriebene IDO-Aktivität durch Tumorzellen selbst ist nur eine Hypothese für die tumorprotektive IDO-Wirkung. Ein weiterer Mechanismus der Immuntoleranz von Tumoren geht von körpereigenen Immunzellen aus. So kann die IDO-Produktion von Antigen-präsentierenden Zellen, (engl. *antigen presenting cells*, APC) wie dendritischen Zellen (engl. *dendritic cells* DC), in Tumor-drainierenden Lymphknoten (LK) ebenfalls eine lokale Proliferationsinhibition von T-Zellen im LK bewirken (Munn *et al.*, 2002). So konnte in einer retrospektiven Studie bei Patienten mit kutanem malignem Melanom in 45 % der Fälle eine hohe Zahl IDO-produzierender APC in Tumor-drainierenden Lymphknoten gefunden werden (Lee *et al.*, 2003). In dieser Studie ging IDO-Expression mit einer Verschlechterung der Prognose einher, wenngleich die Fallzahl nicht hoch genug war, um IDO-Expression in Tumor-drainierenden LK als unabhängigen Prognosemarker zu etablieren. Die beiden genannten Methoden, mit denen sich Tumoren lokal dem Immunsystem entziehen können, erklären noch nicht, wie es zu einer systemischen Toleranz des Immunsystems gegenüber tumoreigenen Antigenen kommen kann. Die Existenz spezifischer, regulatorischer T-Zellen (Tregs) stellt eine Möglichkeit dar, wie es zu einer solchen systemischen Immuntoleranz kommen kann. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Tregs den Tryptophanabbau durch DC initiieren (Fallarino *et al.*, 2003), woraus wiederum eine lokale Immunsuppression durch Hemmung von T-Zell-Proliferation folgen könnte. Da außerdem DC die Differenzierung von T-Zellen zu Tregs gegen definierte Antigene bewirken können (Wak-kach *et al.*, 2003), könnte rein hypothetisch ein positiver Feedback-Mechanismus vorliegen.

Ein IDO-produzierender Tumor kann durch die selbst verursachte Tryptophanverarmung die lokale Effektorleistung von T-Zellen inhibieren. Ferner wirken die durch IDO positive Tu-

morzellen erzeugten toxischen Metaboliten bevorzugt auf T-Zellen und lassen die Tumorzellen unbeeindruckt. Dies wäre dann ein zweiter IDO vermittelter *Immune Escape Mechanismus*. Ferner könnten Tryptophan Metaboliten auf DC wirken und zur Entstehung von „tolerogenen DC“ führen (Belladonna *et al.*, 2006). Diese würden dann im Lymphknoten die Entstehung von regulatorischen T-Zellen begünstigen, die ebenfalls eine T-Zellantwort auf Tumorantigene unterdrücken.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit behandeln zum Teil auch die Einwirkungen der Metaboliten des Kynurenin-Pfades auf das Wachstum von bestimmten Tumorzelllinien (siehe Kapitel 3.2). Über die Wirkweise der Tryptophanmetabolite ist bisher nicht viel bekannt. Für HAA konnte gezeigt werden, dass sie in bestimmten Zellen Apoptose induzieren kann (Fallarino *et al.*, 2002 und Morita *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kombination aus Tryptophanmangel und Tryptophanmetaboliten zu einer Herunterregulierung der ζ -Kette des T-Zell Rezeptors (TCR) CD8-positiver T-Zellen sowie zu einer Differenzierung von naiven, CD4-positiven T-Zellen zu Tregs führt (Fallarino *et al.*, 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die soliden Tumorzelllinien A549 (Humanes Alveolarzellkarzinom), 86HG39 (Humanes Glioblastom) sowie die lymphatischen Tumorzelllinien Jurkat (Humane T-Zell Leukämie) und Raji (Burkitt-Lymphom) untersucht. Die antiproliferative Wirkung von KYN, HKYN und HAA auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen (siehe Abbildung 2-5) wurde bereits erwähnt, ebenso die Tatsache, dass sich durch KA, QA und AA keine Wachstumshemmung auf T-Zellen erzielen lässt (siehe Abbildung 6). In ähnlichen Versuchen mit Tumorzelllinien, die in den Abbildungen 3.8 bis 3.17 sowie Tabelle 3 dargestellt sind, wurde herausgefunden, dass sich diese durch die Metaboliten des Kynurenin-Pfades in ihrem Wachstum hemmen lassen, und Unterschiede hinsichtlich ihrer Sensitivität auf die Metaboliten aufweisen. Des Weiteren wurde die Wachstumshemmung der Tumorzellen mit der Hemmung anti-CD3 stimulierter T-Zellen verglichen. Generell zeigt sich, dass die anti-CD3 stimulierten T-Zellen durch die Metaboliten KYN, HKYN und HAA stärker gehemmt werden als alle verwendeten Tumorzelllinien (siehe Tabelle 3.2). Bei den Versuchen mit KYN und HKYN, nicht jedoch HAA, fällt eine stärkere Inhibition der lymphatischen Tumorzelllinien Jurkat und Raji im Vergleich zu A549 und 86HG39 auf (siehe Abbildung 12-14). KA, QA und AA zeigten keine Hemmung der Tumorzellproliferation (siehe Abbildung 15-17). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass stimulierte T-Zellen im Vergleich zu Tumorzellen deutlich empfindlicher auf die Metaboliten des Kynurenin-Pfades reagieren. Beispielsweise wird die Proliferation der T-Zellen durch HKYN in der Konzentration 150 μ M bereits um 50 Prozent gehemmt, wohingegen die Tumorzellen nicht beeinträchtigt werden (siehe Abbildung 13). Da die Zelllinie A549, wie auch viele andere Tumorzelllinien (Opitz *et al.*, 2007), in der Lage ist, IDO zu exprimieren

(Werner-Felmayer *et al.*, 1989), könnte dies ein weiterer Mechanismus sein, mit dem sich die Tumorzellen dem Immunsystem entziehen, indem lokal die Proliferation von T-Zellen durch eine Akkumulation der Tryptophanmetabolite gehemmt wird, ohne dass es gleichzeitig zu einer Schädigung der Tumorzelle kommt. Dass die immunmodulatorische Wirkung der IDO allein auf der Erzeugung einer lokalen Tryptophanverarmung beruht, wird mittlerweile angezweifelt (Terness *et al.*, 2006). In Zahlen gesprochen würde eine Tryptophanverarmung ein längerfristiges Absinken der Konzentration auf unter $0,5 - 1 \mu\text{M}$ bedeuten. Da der Plasmaspiegel von Tryptophan beim Menschen einhundert Mal höher ist, und die Diffusionsgeschwindigkeit von Tryptophan höher ist als die lokale Abbaugeschwindigkeit (Terness *et al.*, 2006), erscheint das Erreichen einer lokalen Tryptophanverarmung *in vivo* als unwahrscheinlich. Vielmehr wird von verschiedenen Autoren die Hypothese vertreten, dass Tryptophanmetabolite und Tryptophanabbau via IDO synergistisch wirken (Belladonna *et al.*, 2006 und Falarino *et al.*, 2006). Die lokale *in vivo* Konzentration der Metaboliten im Rahmen von Immunprozessen wie bspw. Tumorerkrankungen ist z. Zt. noch unbekannt. Ausgeschlossen werden kann jedoch die Möglichkeit, dass systemische Plasmaspiegel eines Metaboliten die Konzentrationen erreicht, die *in vitro* einen antiproliferativen Effekt auf T-Zellen hat. Ob durch Akkumulation jedoch am Ort des Geschehens, beispielsweise im Tumorgewebe oder in einem Tumor-drainierenden Lymphknoten, eine höhere Konzentration erreicht wird, muss erst noch gezeigt werden. *In vivo* wird die immunmodulatorische Wirkung der IDO vermutlich durch das Zusammenwirken von Tryptophanmangel und Metaboliten des Kynurenin-Pfades erzeugt. Die *in vitro*-Versuche dieser Arbeit stellen jedoch allein den Effekt der Metaboliten auf das Wachstum von Tumorzellen und T-Zellen dar. Daher ist es durchaus möglich, dass *in vivo* bei synergistischer Wirkung von Tryptophanmangel und Tryptophanmetaboliten niedrigere Einzelkonzentrationen der Metaboliten für den antiproliferativen Effekt benötigt werden. Noch wahrscheinlicher wird die *in vivo*-Wirkung der Metaboliten, wenn man zusätzlich die synergistische Wirkung der Tryptophanmetabolite untereinander bedenkt (Terness *et al.*, 2002). Bei den Versuchen von Terness *et al.* mit anti-CD3 stimulierten T-Zellen und Tryptophanmetaboliten fanden sich I_{50} -Konzentrationen von $553 \mu\text{M}$ für KYN, $187 \mu\text{M}$ für HKYN und $96 \mu\text{M}$ für HAA. Wie bereits erwähnt, entsprechen diese Konzentrationen einem Vielfachen des Plasmaspiegels von Tryptophan, und lassen sich daher vermutlich nicht *in vivo* erreichen. Für eine Metabolitmischung aus KYN, HKYN und HAA jedoch fand sich eine I_{50} von lediglich $14 \mu\text{M}$ je Metabolit, die auch *in vivo* erreichbar zu sein scheint. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen einmal mehr die Tatsache, dass die IDO und die Tryptophanmetabolite mit Sicherheit eine wichtige Rolle bei entzündlichen Erkrankungen und Tumorleiden des Menschen spielt, wenngleich die exakten Mechanismen noch lange nicht verstanden sind.

Dies führt dazu, dass die Modulation der IDO-Aktivität mittlerweile einen neuen Angriffspunkt in der Tumorthherapie darstellt (Macchiarulo *et al.*, 2008). So gibt es erste Hinweise, dass eine Therapie mit 1-Methyltryptophan, einem kompetitiven Inhibitor der IDO, den Effekt einer Chemotherapie verstärken kann (Muller *et al.*, 2005). Aktuell laufen bereits klinische Studien bei Malignompatienten, welche als Grundlage für weitere Studien zunächst die Verträglichkeit, die pharmakokinetischen Eigenschaften sowie die Höchstdosis von 1 Methyl-D-Tryptophan (sog. Phase-1 Studie) zeigen sollen (z. B. Studie NCT00567931 des Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute an der Universität von Süd Florida, USA). Das Ergebnis dieser und darauf aufbauender Studien wird hoffentlich helfen können, Krebserkrankungen des Menschen in Zukunft besser behandeln zu können.

5 Zusammenfassung

Ein lokaler Mangel an Tryptophan erzeugt einen wachstumshemmenden Effekt auf verschiedene Krankheitserreger wie Bakterien und Protozoen. Zusätzlich zu der antimikrobiellen Wirkung konnte ein immunmodulatorischer Effekt einer lokalen Tryptophanverarmung im Sinne einer Wachstumsregulation von T-Zellen nachgewiesen werden. Ein solcher Tryptophanmangel kann u. a. durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase erzeugt werden, welches die Reaktion von Tryptophan zu N-Formylkynurenin katalysiert. In weiteren chemischen Reaktionen entstehen aus dieser Substanz die Metaboliten des sogenannten Kynureninpfades. Für diese Metaboliten wurde unabhängig von der Tryptophanverarmung ebenfalls eine immunregulatorische Wirksamkeit beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der antimikrobielle und immunmodulatorische Effekt der Metaboliten untersucht. Die ersten Versuche zeigten den wachstumshemmenden Effekt von Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure auf anti-CD3 stimulierte T-Zellen. Im Anschluss wurde die Wirkung der Tryptophanmetaboliten auf bestimmte Tumorzelllinien mit der Wirkung auf T-Zellen verglichen. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass T-Zellen durch die genannten Metaboliten insgesamt stärker in ihrem Wachstum gehemmt werden als die untersuchten Tumorzellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die soliden Tumorzelllinien im Vergleich zu Tumorzelllinien des lymphatischen Systems weniger stark in ihrer Proliferation inhibiert werden. Da viele Tumorzellen selbst die Indolamin 2,3-Dioxygenase exprimieren und somit vermehrt Tryptophanmetaboliten erzeugen, könnte dies ein möglicher *Immune escape* Mechanismus von Tumorzellen sein, indem sie die Proliferation von T-Zellen hemmen.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem antimikrobiellen Effekt der Tryptophanmetaboliten. Für das extrazelluläre Bakterium *Staphylococcus aureus* konnte kein wachstumshemmender Effekt durch die untersuchten Metaboliten nachgewiesen werden. Genauer untersucht wurde auch der antimikrobielle Effekt der Tryptophanmetaboliten auf den intrazellulären Krankheitserreger *Toxoplasma gondii*. Es konnte eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums, aber gleichzeitig auch der Wirtszellen, nachgewiesen werden für die Metaboliten Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure. Bei Versuchen mit A549-Zellen als Wirt für Toxoplasmen zeigte sich eine signifikante Wachstumsinhibition durch Konzentrationen von 3-Hydroxyanthranilsäure, welche die Wirtszelle nicht beeinträchtigten. Neben der bereits bekannten antimikrobiellen Wirkung der Indolamin 2,3 Dioxygenase könnte es sich hierbei um einen zusätzlichen toxoplasmostatischen Effekt der Tryptophanmetaboliten handeln.

6 Literaturverzeichnis

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, u. a. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 2004; 6:806-812.

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

Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, u. a. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.* 2006; 177:130-137.

Berger F, Ramírez-Hernández MH, Ziegler M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 2004; 29:111-118.

Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, u. a. Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:690-700.

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, u. a. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J. Immunol.* 1999; 162:957-964.

Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, u. a. Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:1144-1151.

Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24

cells. *Infect. Immun.* 1986; 53:347-351.

Dai W, Pan H, Kwok O, Dubey JP. Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J. Interferon Res.* 1994; 14:313-317.

Däubener W, Remscheid C, Nockemann S, u. a. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26:487-492.

Däubener W, Posdziech V, Hadding U, MacKenzie CR. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med. Microbiol. Immunol.* 1999; 187:143-147.

Däubener W, Hucke C, Seidel K, Hadding U, MacKenzie CR. Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infect. Immun.* 1999; 67:5615-5620.

Däubener W, Spors B, Hucke C, u. a. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001; 69:6527-31.

Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, u. a. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002; 9:1069-1077.

Fallarino F, Grohmann U, You S, u. a. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* 2006; 176:6752-6761.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, u. a. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2003;4:1206-12

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

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

Guillemin GJ, Meininger V, Brew BJ. Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis.* 2005; 2:166-76.

Habara-Ohkubo A, Shirahata T, Takikawa O, Yoshida R. Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* 1993; 61:1810-1813.

Harrisons Innere Medizin: Dt. Ausg. der 15. Aufl./in Zusammenarbeit mit der Charité. Hrsg. der dt. Ausg. Manfred Dietel. ABW, Wiss.-Verl., Berlin, Leiben. Einheitssacht: Harrison's principles of international medicine. 2003, S. 1349–1357

Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, u. a. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain.* 1992; 115:1249–73.

Higuchi K, Hayaishi O. Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. *Arch. Biochem. Biophys.* 1967; 120:397-403.

Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie, 3. Auflage. 2004; 297-305

Ingelsten M, Gustafsson K, Oltean M, u. a. Is indoleamine 2,3-dioxygenase important for graft acceptance in highly sensitized patients after combined auxiliary liver-kidney transplantation? *Transplantation*. 2009; 88:911-919.

Ino K, Yoshida N, Kajiyama H, u. a. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer. *Br. J. Cancer*. 2006; 95:1555-1561.

Knox W, Mehler A. The adaptive increase of the tryptophan peroxidase-oxidase system of liver. *Science*. 1951; 113:237-238.

Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, u. a. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J*. 2005; 19:1347-1349.

Lee JR, Dalton RR, Messina JL, u. a. Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab. Invest*. 2003; 83:1457-1466.

Macchiarulo A, Camaioni E, Nuti R, Pellicciari R. Highlights at the gate of tryptophan catabolism: a review on the mechanisms of activation and regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), a novel target in cancer disease. *Amino Acids*. 2008; 37:219-229

Mackenzie CR, Willberg CB, Däubener W. Inhibition of group B streptococcal growth by IFN gamma-activated human glioblastoma cells. *J. Neuroimmunol*. 1998; 89:191-197.

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

MacKenzie CR, González RG, Kniep E, Roch S, Däubener W. Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1999; 467:533-539.

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

Morita T, Saito K, Takemura M, u. a. 3-Hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cells stimulated by interferon-gamma. *Ann. Clin. Biochem.* 2001; 38:242-251.

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

Muller AJ, Malachowski WP, Prendergast GC. Indoleamine 2,3-dioxygenase in cancer: targeting pathological immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Expert Opin. Ther. Targets.* 2005; 9:831-849.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, u. a. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* 1998; 281:1191-1193.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, u. a. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002; 297:1867-1870.

Munn DH, Sharma MD, Baban B, u. a. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* 2005; 22:633-42.

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

Oberdörfer C, Adams O, MacKenzie CR, De Groot CJA, Däubener W. Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 527:15-26.

Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, u. a. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11:6030-6039.

Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93:12553-12558.

Opitz CA, Wick W, Steinman L, Platten M. Tryptophan degradation in autoimmune diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2007; 64:2542-2563.

Ozaki Y, Edelstein MP, Duch DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1988; 85:1242-1246.

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

Pfefferkorn ER, Rebhun S, Eckel M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res.* 1986; 6:267-79.
(A)

Pfefferkorn ER, Eckel M, Rebhun S. Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma*

gondii in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol.* 1986; 20:215-24. (B)

Riesenberg R, Weiler C, Spring O, u. a. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor endothelial cells correlates with long-term survival of patients with renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13:6993-7002.

Sakurai K, Zou J, Tschetter JR, Ward JM, Shearer GM. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2002; 129:186-196.

Sarris J, Schoendorfer N, Kavanagh DJ. Major depressive disorder and nutritional medicine: a review of monotherapies and adjuvant treatments. *Nutr. Rev.* 2009; 67:125-131.

Schmidt SK, Müller A, Heseler K, u. a. Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Eur. J. Immunol.* 2009; 39:2755-64

Schröcksnadel H, Baier-Bitterlich G, Dapunt O, Wachter H, Fuchs D. Decreased plasma tryptophan in pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1996; 88:47-50.

Schroten H, Spors B, Hucke C, u. a. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics.* 2001; 32:206-10.

Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 1993; 45:309-79.

Stone TW. Development and therapeutic potential of kynurenic acid and kynurenine derivatives for neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* 2000; 21:149-154.

Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 1991; 5:2516-22.

Terness P, Bauer TM, Röse L, u. a. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002; 196:447-57.

Terness P, Chuang J, Opelz G. The immunoregulatory role of IDO-producing human dendritic cells revisited. *Trends Immunol.* 2006; 27:68-73.

Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I u. a. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. med.* 2003; 9:1269-74.

Wakkach A, Fournier N, Brun V, u. a. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 2003; 18:605-617.

Werner-Felmayer G, Werner ER, Fuchs D, u. a. Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta.* 1989; 1012:140-147.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mir bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit beiseite gestanden haben.

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Walter Däubener für die Überlassung des Dissertationsthemas danken. Weiterhin danke ich Ihm für die stets gute Betreuung bei der Arbeit im Labor und bei der Anfertigung und Durchführung eines fachlichen Vortrages in einer mir nicht sonderlich vertrauten Sprache, sowie für die Geduld bei der Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Ich möchte mich weiterhin bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Möglichkeit bedanken, meine Doktorarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Universität Düsseldorf anzufertigen.

Für die unzähligen hilfreichen Ratschläge im Labor, die Urlaubsvertretung bei der Versorgung meiner Zellen und die stets freundliche und humorvolle Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei Silvia Schmidt, Silke Stuhlsatz, Kathrin Heseler, Katrin Spekker und Wilfried Schwippert bedanken.

Meiner Mutter danke ich dafür, dass sie mich hartnäckig an die Existenz meiner bisweilen brachliegenden Dissertation erinnert hat.

Meinen Schwiegereltern Ulrike und Gerd danke ich für freundliche Unterstützung bei korrekter Wortwahl und Zeichensetzung.

Mein größter Dank gilt meiner Frau Martina und meiner kleinen Tochter Merle. Da ich an dieser Stelle nicht alle Gründe dafür aufzählen kann und will, danke ich ihnen hier schlicht dafür, dass es sie gibt und dass sie mein Leben erfüllen.

8 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Hilden, den 09.02.2013

Stefan Winterstein