

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf

Direktor : Univ. - Prof. Dr. Ulrich Hadding

**Regulation IFN- γ vermittelter antiparasitärer Effektormechanismen:
Einfluß von Cytokinen und Glukokortikoiden
auf die Aktivierung der Indolamin 2,3-Dioxygenase**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jochen Türck

2002

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Dr. Labisch

Referent: Prof. Dr. W. Däubener

Korreferent: PD Dr. H. Köller

Vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. Däubener, möchte ich für die Überlassung des Themas, seine immerwährende Unterstützung und wertvollen Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit recht herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	1
<u>1. Biologie von <i>Toxoplasma gondii</i></u>	1
1.1 Morphologie und Entwicklungszyklus	1
1.2 Klinisches Bild und Diagnose	3
1.3 Therapie und Prophylaxe	4
1.4 Immunologische Reaktionen im Zentralen Nervensystem	6
1.5 Immunologische Abwehrmechanismen bei einer Infektion mit Toxoplasmen	8
1.6 Antiparasitäre Effektormechanismen	11
1.6.1 Produktion von Stickoxid (NO)	11
1.6.2 Produktion toxischer Sauerstoffradikale	12
1.6.3 Abbau von Tryptophan durch die IDO	13
1.7 Fragestellung	16
B. Material und Methoden	21
<u>1. Herkunft der verwendeten Zelllinien</u>	21
1.1 Herkunft der Glioblastomzelllinien	21
1.1.1 Herkunft der Zelllinien 86HG39, 87HG31	21
1.1.2 Herkunft der Zelllinie U373MG	21
1.2 Herkunft der Raw – Zellen	21
1.3 Herkunft der B9-Zellen	21
1.4 Herkunft des <i>Toxoplasma gondii</i> - Stammes BK	21
1.5 Herkunft der Mausfibroblasten L 929	22

<u>2. Zellkulturtechniken</u>	22
2.1 Medien, Puffer, Zytokine Chemikalien und Antikörper	22
2.2 Kultivierung und Ernte der Glioblastomzellreihen	25
2.3 Kultivierung und Ernte der Raw – Zellen	26
2.4 Kultivierung und Ernte der Mausfibroblasten L929	27
2.5 Kultivierung und Ernte der Toxoplasmen	27
2.6 Einfrieren bzw. Auftauen von Zellen	28
<u>3. Testsysteme</u>	29
3.1 Kynureninnachweis im Überstand stimulierter Zellen	29
3.2 Indirekter Nachweis der intrazellulären Indolamin 2,3- Dioxygenase	30
3.3 Toxoplasmenproliferationstest	31
3.4 Nachweis von Stickoxiden	32
3.5 IL-6 Bioassay	32
3.6 Proteinpräparation und Bestimmung der Konzentration	33
3.7 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	33
3.8 Western-Blot	34
3.9 Ponceau S-Färbung	34
3.10 Immunologischer Nachweis der IDO	35
C. Ergebnisse	36
<u>1. Wirkung von Interferon γ auf Glioblastomzellen</u>	36

2. <u>Effekte von Zytokinen auf die Interferonγ vermittelte</u>	
<u>IDO-Aktivität</u>	40
2.1 Wirkung von IL-1 auf die IDO Aktivität	40
2.2 Effekte der spontanen und induzierten IL-6 Produktion auf die IDO	44
2.3 Wirkung von TGF β auf die IDO Aktivität	47
2.4 Wirkung von IL-10 auf die IDO-Aktivität	48
3. <u>Beeinflussung der IDO-Aktivität durch das Medikament</u>	
<u>Dexamethason</u>	51
3.1 Effekte von Dexamethason auf die IDO	51
3.2 Effekte von Dexamethason auf das Toxoplasmen- wachstum	54
3.3 Effekte von Dexamethason auf die intrazelluläre IDO	55
3.4 Effekte von Dexamethason auf die TNF α -verstärkte IFN γ vermittelte IDO-Induktion	56
3.5 TNF α -Antikörper vermittelte Effekte auf die IDO	58
3.6 Nachweis des IDO-Proteins mittels Western-Blot	60
D. Diskussion	62
1. <u>Effekte des Zytokin IL-1 auf die IDO</u>	64
2. <u>Effekte des Zytokin IL-6 auf die IDO</u>	67
3. <u>Effekte des Zytokin TGFβ auf die IDO</u>	69
4. <u>Effekte von Dexamethason auf die IDO</u>	71

E. Zusammenfassung	77
F. Literaturverzeichnis	79
G. Abkürzungsverzeichnis	87

A. Einleitung

1. Biologie von *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazellulär parasitierendes Protozoon und wird zur Klasse der Sporozoa gezählt. Es wurde erstmalig 1908 von Nicolle und Manceaux in einem afrikanischen Nagetier, dem Gundi, entdeckt und ist weltweit verbreitet. Aufgrund seiner geringen Wirtsspezifität ist *Toxoplasma gondii* in der Lage ein breites Spektrum warmblütiger Vertebraten, so z.B. viele Säugetierarten (Katze, Schaf, Schwein, Hund), einige Vogelarten und nicht zuletzt den Menschen zu infizieren. Serologische Untersuchungen ergaben bei Mensch und Tier hohe Durchseuchungsraten. Diese steigen beim Menschen mit wachsendem Lebensalter und erreichen bei über 65-jährigen nahezu 80%. Die Morbidität ist allgemein gering. Bei immunkompromitierten Patienten (HIV-Infektion) sowie bei Infektion des Fetus kann es jedoch zu schwerwiegenden Komplikationen wie zerebrale und generalisierte Toxoplasmose sowie zur konnatalen Toxoplasmose kommen.

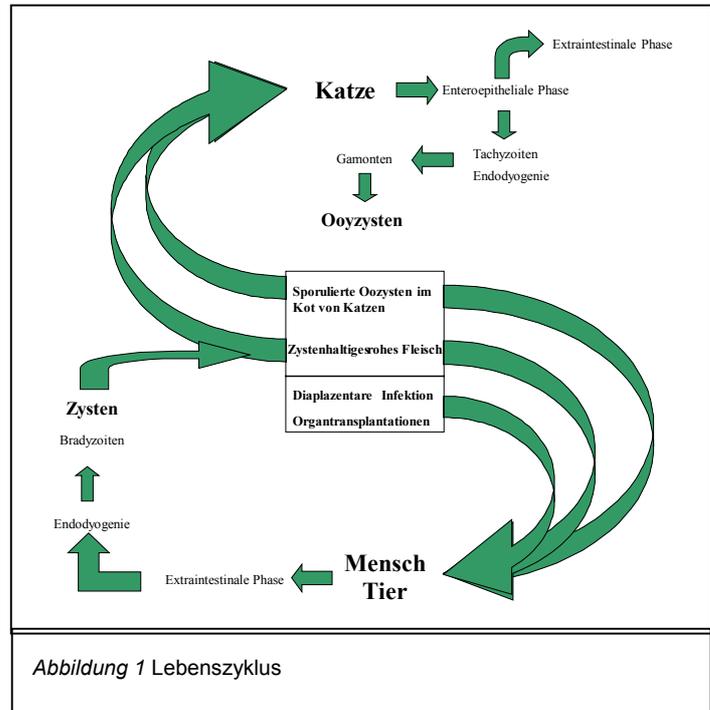
Einzigster Endwirt der Toxoplasmen ist die Katze und katzenartige Tiere wobei letztere epidemiologisch unbedeutend sind. Hier laufen sowohl sexuelle als auch asexuelle Entwicklungsphasen ab. Die Infektion von Zwischenwirten zu denen auch der Mensch gehört, erfolgt über die Aufnahme zystenhaltigen rohen Fleisches (Schweinefleisch/ Mett/ Tartar), durch die orale Aufnahme von infektiösen sporulierten Oozysten im Kot von Katzen (der direkte Kontakt zu Katzen ist ungefährlich) sowie über diaplazentare Infektion des Fetus bei erstmalig infizierten Schwangeren.

1.1. Morphologie und Entwicklungszyklus

Das wichtigste taxonomische Merkmal des 6µm langen und 2µm breiten Protozoons ist der Apikalkomplex, der bei der aktiven Penetration in die Wirtszelle eine entscheidende Rolle spielt (1). Nach dem Eindringen in die Wirtszelle ist der Parasit in eine parasitophore Vakuole eingelagert, in der er sich durch Endodyogenie vermehrt.

Im Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii* unterscheidet man verschiedenen Phasen:

Die **enteroepitheliale Phase** mit der Ausbildung von Geschlechtsformen vollzieht sich nur in Endwirten. Katzen infizieren sich durch Aufnahme zystenhaltigen Fleisches. Nach Einwanderung in das Dünndarmepithel (Die Penetration der Wirtszellen erfolgt über die dem Apikomplex angehörenden Strukturen.) erfolgt zuerst nur die Entwicklung ungeschlechtlicher Vermehrungsformen. Sie werden als **Endozoiten** (wegen der schnellen Vermehrung auch Tachyzoiten genannt) bezeichnet und entstehen innerhalb der Zellen durch eine asexuelle Vermehrung. Dabei entstehen innerhalb einer Mutterzelle zwei Tochterindividuen (Endodyogenie). Ein Teil der Endozoiten



gelangt über den Blutkreislauf in die inneren Organe, wo die ungeschlechtliche Vermehrung wie beim Zwischenwirt fortgesetzt wird (extraintestinale Phase).

Bei einem anderen Teil erfolgt die Entwicklung geschlechtlich differenzierter **Gamonten**. Diese Phase endet mit der Entstehung von **Oozyzen**, die eine Zygote enthalten und mit dem Kot an die Außenwelt gelangen. Dort sporulieren sie innerhalb von 2-4 Tagen und werden somit infektiös.

Nach Aufnahme von sporulierten Oozyzen oder zystenhaltigen Fleisches durch den Zwischenwirt (Endwirt), beginnt nach Penetration der Darmwand die **extraintestinale Phase**. Die Vermehrung der Toxoplasmen erfolgt vorzugsweise im retikuloendothelialen System, in der Muskulatur und vor allem im ZNS. Im Zytoplasma der infizierten Zellen vermehren sich die Tachyzoiten durch Endodyogenie bis zum Platzen der Zellwand wodurch sie frei werden und benachbarte Zellen befallen. Durch Wiederholung dieses Vorgangs entstehen lokale Gewebsschädigungen die eine entzündliche Reaktion sowie einen Gewebsuntergang hervorrufen. Die einsetzende Immunreaktion des befallenen Organismus verhindert

eine weitere intrazelluläre Vermehrung; des Weiteren werden die noch freien Erreger eliminiert. Durch die entzündlichen Reaktionen bilden sich dann neue Zysten aus, in denen die **Zystozoen** (wegen der langsamen Vermehrung auch Bradyzoiten genannt) lebenslang persistieren können. Die Zysten (150-300 µm im Durchmesser) können sich in verschiedenen Organen und Geweben insbesondere in Muskel und Gehirn entwickeln und enthalten bis zu mehrere tausend Zystozoen. Diese rufen keine entzündliche Umgebungsreaktionen mehr hervor, sind aber für Mensch und Tier durch orale Aufnahme infektiös. Des Weiteren sind sie Ausgangspunkt für eine Reaktivierung bei einer Schwächung des Immunsystems des Wirtes.

1.2. Klinisches Bild und Diagnose

Es gibt zwei Erscheinungsformen der Toxoplasmose:

Die **postnatale Toxoplasmose** verläuft beim immunkompetenten Menschen meist harmlos oder gänzlich unbemerkt. Es handelt es sich um eine chronisch latente Infektion ohne Symptome. Bei 1% der Infizierten kommt eine symptomatische Toxoplasmose in Form einer Lymphknoten-Toxoplasmose mit Schwellung von Lymphknoten (häufig nuchal und zervikal), Fieber, Kopf- und Muskelschmerzen vor. Die Diagnose ist nur über die Bestimmung der Antikörper im Blut möglich. Bei immunsupprimierten Patienten (z.B. nach Organtransplantation) und bei AIDS (ca. 30% aller AIDS Kranken) kann eine chronische Toxoplasmose reaktiviert werden. In diesem Fall kann eine Toxoplasmenencephalitis entstehen. Dieses Krankheitsbild kann einen schweren Verlauf, mit fokalneurologischen Defiziten (Hemiparesen, Sensibilitätsstörungen, Aphasie) und Wesensänderungen sowie ev. septischer Streuung in Herz, Leber und Milz, nehmen.

Bei der **konnatale Toxoplasmose** unterscheidet man eine relativ seltene frühe Fetusinfektion mit einem schweren Verlauf von einer häufigeren späteren Fetusinfektion. Bei der frühen Form kommt es u.a. zu Hepatosplenomegalie, Ikterus, Myokarditis und Aborten sowie zur Enzephalitis mit der Trias Hydrozephalus, Chorioretinitis und intrazerebralen Verkalkungen. Bei der späten Form beobachtet man einen leichteren Krankheitsverlauf wobei es zu späteren postenzephalitischen Schäden (Intelligenzdefekte) kommen kann. Zur Infektion des Feten kann es nur bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft kommen. In Deutschland rechnet man mit 0,7% Erstinfektionen in der Schwangerschaft. Man

schätzt, dass pro Jahr etwa 300 Kinder schwere und 1400 Kinder leichtere Spätschäden entwickeln.

Nach einer Inkubationszeit von Tagen bis Wochen kann die Diagnose anhand eines serologischen parasitenspezifischen Antikörpernachweises (KBR, Sabin-Feldman-Test, IFT, Elisa) gestellt werden. Der Nachweis von IgM-Antikörpern gelingt nach einer Woche und zeigt die frische Infektion an. IgG-Antikörper treten etwas später auf und persistieren über viele Jahre. Bei immunsupprimierten Patienten sind serologische Verfahren meist nicht aussagekräftig da IgM-Antikörper sowie ein signifikanter IgG-Titeranstieg oft fehlen. Außerdem kann man den Erreger im Liquor oder Blut nachweisen. Bei Verdacht auf eine Hirntoxoplasmose sollte ein CT/MRT erfolgen. Hier kann man die relativ kleinen ring- oder fleckförmigen Verkalkungsstrukturen erkennen (siehe Abb. 2). In der Pränataldiagnostik bieten sich Ultraschallkontrollen (granulomatische Veränderungen) sowie der Nachweis von Toxoplasmen-DNA aus Fruchtwasser und fetalem Blut an (nach der 20. Schwangerschaftswoche).

1.3. Therapie und Prophylaxe

Die Therapie erfolgt bei der Toxoplasmose mit klinischen Symptomen, bei Immunsupprimierten mit akuter Toxoplasmose sowie bei Erstinfektion

während der Schwangerschaft und kongenitaler Toxoplasmose. Das Mittel der 1. Wahl ist Pyrimethamin (50-100mg/d p.o.) + Sulfadiazin (3-4 x 2g/d p.o.) + Folinsäure (15-30mg/d p.o.) für 4-6 Wochen oder statt Sulfadiazin Clindamycin (4 x 600-900mg/d p.o.). Vor der 20. Schwangerschaftswoche ist diese Therapie kontraindiziert; hier empfiehlt sich stattdessen eine Monotherapie mit Spiramycin. Bei der Therapie kongenital infizierter Neugeborener haben sich auch Spiramycin (100mg/kgKG) und Prednison (1mg/kgKG) als wirksam erwiesen (2. Wahl; dann auch wenn möglich in Kombination mit Pyrimethamin).

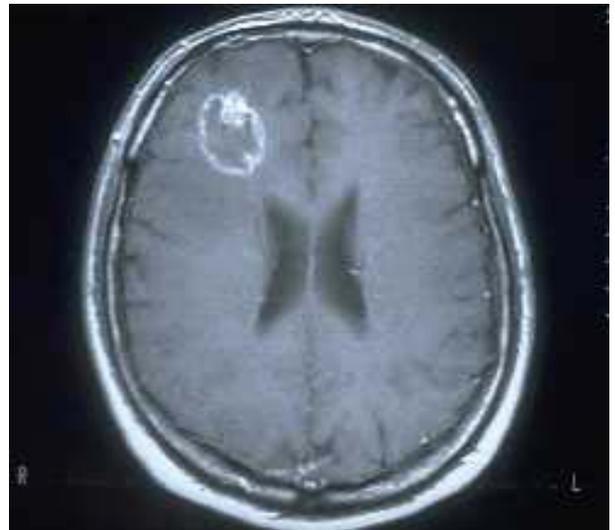


Abbildung 2 Hirntoxoplasmose,

Darstellung mittels Computertomographie (mit Kontrastmittel). Quelle: hivinfo.de

Eine Prophylaxe ist für Immunsupprimierte, AIDS-Patienten und seronegative Schwangere indiziert. Diese besteht in peinlichster Hygiene bei Katzenkontakt und Meidung von Genuss rohen Fleisches. Frauen und Schwangere sollten sich serologisch untersuchen lassen. Die Kosten dieses Testes werden jedoch nicht von den Krankenkassen übernommen.

Bei AIDS-Patienten sollte eine Primärprophylaxe mit Cotrimoxazol (960mg/d) (bei CD4-Zellzahl < 150/µl) erfolgen, um eine Reaktivierung der Toxoplasmose zu vermeiden. Eine Sekundärprophylaxe (nach erfolgreich behandelter Infektion) ist immer indiziert und sollte mit einer Kombination aus Pyrimethamin und Sulfadiazin mit täglich 25-50% der Akutdosis erfolgen. Glukokortikoide können hier für die Therapie des intrazerebralen Ödems empfohlen werden (Initialdosis 40-100mg i.v. danach 3x8mg/d i.v. über 4 Tage).

1.4. Immunologische Reaktionen im Zentralen Nervensystem

Das zentrale Nervensystem nimmt in Bezug auf immunologische Vorgänge eine Sonderstellung ein. Bei einer Beteiligung des zentralen Nervensystems im Rahmen einer Toxoplasmose kann eine fokale wie auch diffuse Meningoenzephalitis mit Nekrosen und Mikrogliaknötchen beobachtet werden. Angrenzend an das nekrotische Gewebe finden sich häufig bradyzoitenhaltige Zysten. Es gibt eine Reihe von strukturellen und funktionellen Voraussetzungen, die besondere Schwierigkeiten bei der Bekämpfung der Parasiten im ZNS darstellen: Dazu gehört die Blut-Hirn-Schranke. Sie besteht aus einem System von sogenannten „tight junctions“ im Kapillarnetz des ZNS ohne das jedoch Fenestrationsstellen vorkommen. Auf diese Weise wird die Passage der im Blut zirkulierenden Zellen des Immunsystems sowie auch von Pathogenen und von großen Molekülen in den Subarachnoidalraum erschwert. Vollständig entwickelt ist die Blut-Hirn-Schranke erst am Ende des 1. Lebensjahres, was eine praktische Bedeutung bei postnatalen Hyperbilirubinämien hat. Interessant wäre die Frage zu klären, inwieweit eine Infektion durch Toxoplasmen in dieser Zeit zur Ausbildung von Zysten im ZNS führt (nicht ausgebildete Blut-Hirn-Schranke vs. unreifes Abwehrsystem). Aktivierte T-Zellen können jedoch im Gegensatz zu ruhenden Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Ein weiteres Erschwernis stellt die im ZNS reduzierte Expression von MHC-Klasse I und II Antigenen dar. Diese ist erforderlich bei der Antigenpräsentation und Induktion von Abwehrvorgängen, kann jedoch auch im ZNS in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli gesteigert werden. Weiterhin besitzt das ZNS kein Lymphdrainagesystem welches für die antigeninduzierte Differenzierung und Proliferation von Lymphozyten wichtig ist (2). Zusätzlich scheint es genetische Faktoren zu geben (insbesondere bei immunkompromitierten Patienten), die die Pathogenität einer Toxoplasmenenzephalitis beeinflussen (3/4).

In dieser Arbeit wurden als Modell für humane native Astrozyten die Glioblastomzellreihen 86HG39, U373MG und 87HG31 benutzt, da die Gewinnung von humanen Astrozyten aus ethischen Gründen schwierig ist. Die verwendeten Zellreihen ähneln den Astrozyten in Bezug auf deren immunologische Verhaltensmuster sowie akzessorischen Zellfunktionen und exprimieren auch das für Astrozyten typische „glial fibrillar acid protein“ Antigen (5).

Die hier verwendeten Glioblastomzellen sind entartete Astrozyten (Makroglia) eines schnell proliferierenden infiltrativ wachsenden und stets rezidivierenden Tumors. Astrozyten gehören wie die Oligodendrozyten und die Ependymzellen zur Makroglia (aus der Neuralanlage hervorgehend) und zusammen mit der Mesoglia (Mikrogliazellen/Mortegazellen)(aus dem Blut- und Abwehrzellen bildendem Mesenchym) zur Neuroglia (6). Die Neuroglia ist das vom Ektoderm abgeleitete Hüll- und Stützgewebe des Zentralen Nervensystems. Die Neurogliazellen sind wesentlich kleiner als die Nervenzellen und nehmen ca. die Hälfte des Gesamtvolumens des Gehirnvolumens ein. Das funktionelle Pendant der Neuroglia im peripheren Nervensystem stellen die Mantel- und Schwannzellen dar.

Im ZNS bilden die Astrozyten die Gliagrenzmembran, die das Hirngewebe gegen Hirnhäute und Blutgefäße geweblich abgrenzt sowie die funktionelle Integrität des ZNS bewahrt. Sie sind jedoch nicht am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt. Außerdem sind die Astrozyten zur Bildung von Zytokinen (IL-1 (7/8), IL-3, IL-6, TNF α und Prostaglandine), zur Antigenpräsentation mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle (anhand von Astrozytomzellen gezeigt (9)) und zur Phagozytose (10) befähigt.

Entscheidend bei der Abwehr von Mikroorganismen im zentralen Nervensystem sind Makrophagen und T-Zellen sowie Astrozyten und Mikrogliazellen (als antigenpräsentierende Zellen). Besondere Bedeutung kommt hier den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu. Das wichtigste dabei involvierte und von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen sowie NK-Zellen (11) produzierte Zytokin ist IFN γ (12). Seine antiparasitäre bzw. antibakterielle Wirkung konnte nicht nur bei der Toxoplasmose sondern auch z.B. bei *Leishmania donovani* (13), *Schistosoma mansoni* (14), und *Chlamydia psittaci* (11), respektive bei Gruppe B-Streptokokken (15) gezeigt werden. Einige andere Zytokine (TNF α / IL-1/ IL-2/ IL-7/ IL-12/ IFN β und GM-CSF) sind ebenfalls in der Lage die Immunantwort zu beeinflussen. IFN γ , ein als Typ II Interferon bezeichnetes Glykoprotein, führt unter anderem zu einer Erhöhung der MHC-Klasse I/II Expression auf verschiedenen Zelltypen. Dabei sind die Astrozyten (Glioblastomzellen 86HG39) in der Lage in einer MHC-Klasse II abhängigen Weise über eine Antigenpräsentation wiederum humane T-Zellen zu aktivieren. Diese, einmal aktiviert, induzieren über die Bildung von IFN γ in den Glioblastomzellen, humanen Fibroblasten bzw. humanen Makrophagen das Tryptophan degradierende Enzym die Indolamin 2,3-dioxygenase. Über diese Enzyminduktion erfolgt die Abwehr gegen Toxoplasmen. Das die Induktion derIDO und damit die Tryptophandepletion eine Toxoplasmostase bewirkt,

zeigt sich dadurch, dass durch die Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ -Antikörpern bzw. durch eine Tryptophansupplementation der toxoplasmostatische Effekt vollständig wieder aufgehoben werden kann (16).

In murinen in vivo Experimenten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass T-Zellen einerseits in der Lage sind infizierte Zellen zu lysieren und damit die Erreger selbst abzutöten, andererseits durch die Lyse die vorher intrazellulär lokalisierten Parasiten freizusetzen und dadurch eine Bekämpfung der Parasiten durch Antikörper und Komplement möglich machen (17/18).

1.5. Immunologische Abwehrmechanismen bei einer Infektion mit Toxoplasmen

Nach oraler Aufnahme zystenhaltigen rohen Fleisches (Schweinefleisch/ Mett/ Tartar) oder infektiösen sporulierten Oozysten im Kot von Katzen kommt es durch Einwirkung von Verdauungsenzymen im Magen zur Freisetzung aus den Zysten und Vermehrung der Parasiten. Hier kommt es auch zur ersten Auseinandersetzung mit dem Wirtsorganismus mit der Bildung von gegen SAG-I gerichteten IgA-Antikörpern. SAG-I ist eines von 5 wichtigen Oberflächenproteinen welches bei der Zelladhäsion der Toxoplasmen eine Rolle spielt (19). Im Gegensatz zum Menschen konnte hier bereits im murinen System durch eine intranasale Immunisierung mit SAG-I eine Protektion erreicht werden (20). Die Bradyzoiten, selbst weniger empfindlich gegenüber Verdauungsenzymen als Tachyzoiten, transformieren in Darmzellen zu invasiven Tachyzoiten. Diese asexuellen Parasiten sprengen durch Endodyogenie schnell die Wirtszelle und verteilen sich im gesamten Organismus, bevorzugt im Zentralen Nervensystem. Die Verbreitung im Organismus scheint über Subpopulationen von Monozyten (21)(hämatogen) bzw. über das Lymphsystem zu erfolgen. Anschließend infiziert der Erreger weitere Zellen, teilt sich durch Endodyogenie, sprengt sie und befällt benachbarte Zellen. Im Rahmen dieses Geschehens zeigen sich die Merkmale der akuten Entzündung und Nekrosen bilden sich aus. Die Bevorzugung des ZNS scheint an den dort bestehenden besonderen Voraussetzungen (siehe oben) zu liegen.

Bei immunkompetenten Wirten spielen nun die humorale und die zelluläre Immunantwort eine wichtige Rolle. Die Parasiten bewirken einen Anstieg von parasitenspezifischen IgM- (nach ca. 1 Woche) und IgG- (nach ca. 1-2 Wochen)

Antikörpern im Serum. Diese Immunkomplexe können nach Antigenkontakt über das Fc-Fragment C1 fixieren und somit eine kaskadenartige Aktivierung des Klassischen Reaktionsweges des Komplementsystems induzieren und damit die Parasiten abtöten. (Dies ist auch die Basis für den diagnostisch wichtigen Sabin-Feldmann-Test)(22). Der alternative Reaktionsweg der Komplement Aktivierung hingegen zeigt keine effiziente Toxoplasmostase. Dabei bricht der Reaktionsweg nach Spaltung des C3-Fragmentes in ein inaktives iC3-Fragment an der Toxoplasmenmembran ab; ein lytischer Komplex C5b-9 kann nicht mehr ausgebildet werden (23).

Die zellvermittelte Immunantwort bildet den Hauptmechanismus gegen die Infektion, insbesondere ist hier eine Abwehr gegen intrazellulär parasitierende Erreger möglich. Makrophagen sowie Monozyten und Granulozyten phagozytieren die durch Antikörper markierten Parasiten und vernichten sie in den Phagolysosomen. Im Gegensatz dazu vermögen aktiv in die Zelle eingedrungenen Erreger in einer parasitophoren Vakuole zu überleben; hier ist dann auch eine Toxoplasmenreplikation in diesen Zelltypen möglich (24/25/21). Weiterhin führen membrangebundene oder zytoplasmatische Antikörper zu einer verstärkten Immunantwort der CD4⁺/ CD8⁺ T-Zellen. Diese besteht in der Produktion von Zytokinen die wiederum eine Reihe von Effektormechanismen auslösen.

Im immunkompromitierten oder fetalen Wirt sind diese Abwehrmechanismen abgeschwächt, so dass es zu einer unkontrollierten Ausbreitung der Tachyzoiten kommt.

Die Reaktivierung der Toxoplasmen bei vormals immunkompetenten und nun immunkompromitierten Wirten (AIDS, Transplantierte) erfolgt am ehesten aus Bradyzoiten. Bei einem intaktem Immunsystem besteht eine Art Gleichgewicht zwischen den enzystierten Bradyzoiten und der körpereigenen Abwehr (IFN γ /CD8⁺ T-Zellen): Rezidivierend kommt es zur Ruptur einiger Zysten mit einer entsprechenden Reaktion der körpereigenen Abwehr und in der Folge zu Veränderungen der Oberflächenantigenexpression der Toxoplasmen. Diese ständige Auseinandersetzung ist wohl auch als Ursache für die lebenslang erhöhten Antikörpertiter zu sehen.

Ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage die zufällig freiwerdenden Parasiten zu bekämpfen kommt es zu einem Aufflackern der Infektion.

Die Tachyzoiten werden durch Antikörperbildung, Aktivierung von Makrophagen, Produktion von $\text{IFN}\gamma$ sowie von zytotoxischen T-Zellen vom CD8^+ -Typ unter Kontrolle gehalten. Die CD8^+ T-Lymphozyten scheinen entscheidend bei der Induktion von Abwehrmechanismen zu sein (26). Diese antigenspezifischen Lymphozyten sind in der Lage sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre Parasiten abzutöten. Kommt es zur Ausbildung von Zysten mit Bradyzoiten wird die Immunantwort von Antikörpern, $\text{IFN}\gamma$ sowie CD4^+ und CD8^+ T-Zellen moduliert. Bei Versagen dieser Immunantwort kommt es zu einer Reaktivierung einer chronischen Infektion (27/28/29). So kommt es im Endstadium der Immunschwäche AIDS im Zuge der Verringerung von T-Lymphozyten (30) insbesondere der CD8^+ T-Zellen, die die Exazerbation einer chronische Toxoplasmose im Normalfall verhindern (29), zur Entwicklung einer Enzephalitis. Des weiteren scheint für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber opportunistischen Erkrankungen ein Wechsel der protektiven TH1- zu einer nicht protektiven TH2 – Antwort verantwortlich zu sein.

1.6. Antiparasitäre Effektormechanismen

Bisher wurde beschrieben, welche Zellen und Zytokine, sowie welche Reaktionen die Immunantwort des Wirtsorganismus ausmachen. Bezüglich der Frage auf welche Weise die Abwehr intrazellulärer Parasiten erfolgt, wurden inzwischen 3 Effektormechanismen identifiziert, die durch T-Zell Zytokine ($\text{IFN}\gamma$) beeinflusst werden können. Im folgenden werden diese beschrieben und deren Wirkungsweise erläutert:

- **Produktion von Stickoxid (NO)**
- **Produktion toxischer Sauerstoffradikale**
- **Abbau von Tryptophan durch die Indolamin 2,3-dioxygenase**

1.6.1. Produktion von Stickoxid (NO):

NO besitzt, neben der Bedeutung im Herz-Kreislaufsystem (Vasodilatation), verschiedene Effekte als Mediator und Zellgift. So besitzt es tumorizide und antimikrobielle Wirkung oder fungiert z.B. als Neurotransmitter, oder bei der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr. NO wird durch eine enzymatische Umsetzung von L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin frei. Die Reaktion wird durch die NO-Synthase katalysiert und benötigt einige Kofaktoren und Kosubstrate wie NADPH, FAD und vor allem Tetrahydrobiopterin (BH_4) (Regulationsfunktion). Hierbei unterscheidet man 3 Isoformen, die in 2 Gruppen unterteilt werden: Ca^{2+} -abhängige und constitutive NOS (NOS-3/ NOS-1) sowie die Ca^{2+} -unabhängige und induzierbare NOS (NOS-2 oder iNOS). Die dabei produzierte NO-Spezies ist abhängig von dem herrschenden intra- und extrazellulären Milieu. Je nach Verfügbarkeit von Superoxiden (O_2^-), „oxidative burst“ kommt es zur Bildung von NO-Radikalen oder Peroxinitriten (ONOO^-) und anderen Stickstoffintermediaten die für die antimikrobielle Wirkung verantwortlich gemacht werden. Dabei ist besonders die Reaktion von NO mit SH-Gruppen von freien Aminosäuren, Peptiden oder Proteinen zu erwähnen. Hier kommt es zur Bildung von S-Nitrosothiolen (Nitrosylierung). Diese Reaktion ist die Basis für den Transport von und die Regulationsfunktion durch NO sowie auch für die antimikrobielle Wirkung (31). Für die zytotoxische Wirkung wird weiterhin eine Eisen (II) Depletion verantwortlich gemacht (so z.B. bei Enzymen, deren katalytisches Zentrum Fe_2+ enthält z.B. die IDO)(32).

In murinen Makrophagen ist die Bildung von Stickoxiden sicherlich der wichtigste antiparasitäre Effektormechanismus zur Abwehr von *Toxoplasma gondii* und anderer pathogener Keime (33).

Es wird kontrovers diskutiert inwieweit dieser Mechanismus im humanen System eine Rolle spielt. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass professionelle Phagozyten wie humane Monozyten oder Makrophagen zwar eine iNOS besitzen und auch NO produzieren, jedoch die freigesetzte NO-Menge für einen antimikrobiellen Effekt gegen Toxoplasmen nicht ausreichend ist (34/35); allerdings vermag NO hier eine immunregulatorische Funktion zu übernehmen. Es konnte der Nachweis der iNOS - mRNA (36) und der Nachweis entsprechender Proteine (37), die zur NO-Produktion notwendig sind, geführt werden.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass humane Makrophagen in der Lage sind NO in ausreichenden Mengen zur Wachstumshemmung z.B. von Leishmanien zu produzieren (38).

Bei sog. Nicht-Professionellen Phagozyten wie humane Astrozyten wurde gezeigt, dass deren iNOS nach Stimulation durch IL-1+IFN γ in der Lage ist, ausreichende Mengen an NO zu produzieren um das Toxoplasmenwachstum zu hemmen (39). Dieser Effekt konnte durch die Zugabe eines L-Arginin Antagonisten teilweise blockiert werden.

Auf der anderen Seite zeigten Experimente mit humanen Uroepithelzellen dass eine Stimulation mit IL-1+IFN γ und konsekutiver NO-Produktion nicht zu einer Verstärkung einerIDO-induzierten Toxoplasmostase, sondern zu einer Abschwächung dieses Effektes führte (40). Während also bei murinen Zellen die NO-Produktion sicherlich der entscheidende Mechanismus zur Infektabwehr darstellt, hat man bei humanen Zellen auch regulatorische bzw. hemmende Wirkungen beobachtet.

1.6.2. Produktion toxischer Sauerstoffradikale:

Grundlage der Produktion von Sauerstoffradikalen ist der sogenannte „Oxidative burst“, der durch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch charakterisiert ist. Er hat jedoch mitnichten etwas mit der Zellatmung zu tun. Experimente mit Substanzen, die blockierend auf mitochondriale Enzyme wirken, zeigen hier nämlich keine hemmende Wirkung.

Nach Stimulation eines Phagozyten (Makrophagen, Monozyten, Leukozyten) phosphoryliert die aktivierte Proteinkinase C Proteine des NADPH-Oxidase Systems. Diese Phosphorylierung führt zum Oxidative burst. Dabei wird die Reaktion



katalysiert. Bei dieser Reaktion wird molekularer Sauerstoff (O_2) bei Aufnahme eines Elektrons in das Superoxid-Anion O_2^- (hier gezeigt) und bei Aufnahme zweier Elektronen zu Sauerstoff-Peroxid (H_2O_2) reduziert. Die Sauerstoffradikale zeichnen sich, ähnlich wie das beschriebene NO, durch ihre Reaktionsfreudigkeit aus. Gerade deswegen spielen sie bei Entzündungsprozessen und pathologischen Zuständen eine große Rolle. Weitere entstehende reaktive Sauerstoffradikale sind Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) sowie Hydroxyl- ($\bullet\text{OH}$) und Alloxylradikale ($\text{RO}\bullet$). Sämtliche Radikale können von murinen (13) als auch von humanen (11) Phagozyten nach Aktivierung mit $\text{IFN}\gamma$ gebildet werden. Als Schutz gegen diese Sauerstoffradikale dienen sogenannte „scavenger“-Moleküle wie die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase sowie die Glutathion-Peroxidase. Diese Moleküle kommen in allen Organismen vor, die Sauerstoff zum Wachstum benötigen. Durch die Produktion von SOD sind z.B. die Toxoplasmen zumindest teilweise in der Lage sich diesem antiparasitären Effektormechanismus zu entziehen (41/42/43). Bei Organismen, die diese „scavenger“-Moleküle nicht enthalten, können die Sauerstoffintermediate u.a. bei *Trypanosoma cruzi* (34), *Staph. aureus* (35) oder *Candida* (33) eine mikrobizide Wirkung entfalten. Dies ist auch klinisch bedeutsam: So z.B. bei der chronischen Granulomatose des Menschen, bei der durch fehlende Bildung toxischer Sauerstoffmetaboliten in den Granulozyten, schwere rezidivierende Infektionen resultieren.

1.6.3. Abbau von Tryptophan durch die Indolamin 2,3-dioxygenase:

Nachdem dieIDO erstmalig Anfang der 60iger Jahre von Hayaishi et al. (44/45) als ein Haem enthaltendes Protein beschrieben wurde, konnten Pfefferkorn und Guyre 1984 (46) die Interferon γ induzierte IDO-Aktivierung in Fibroblasten und den damit

verbundenen antitoxoplasmatischen Effekt zeigen. Dieser Effekt wird durch einen Tryptophanabbau erzielt. Dieses Enzym katalysiert die O₂-abhängige Umsetzung von Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin, der ersten Schritt im Abbau von Tryptophan (47). Der zweite Schritt zu L-Kynurenin erfolgt über eine ubiquitäre Formaminidase (48)(siehe Abb. 3). Dabei wird nahezu sämtliches Tryptophan aus der Zellumgebung abgebaut.

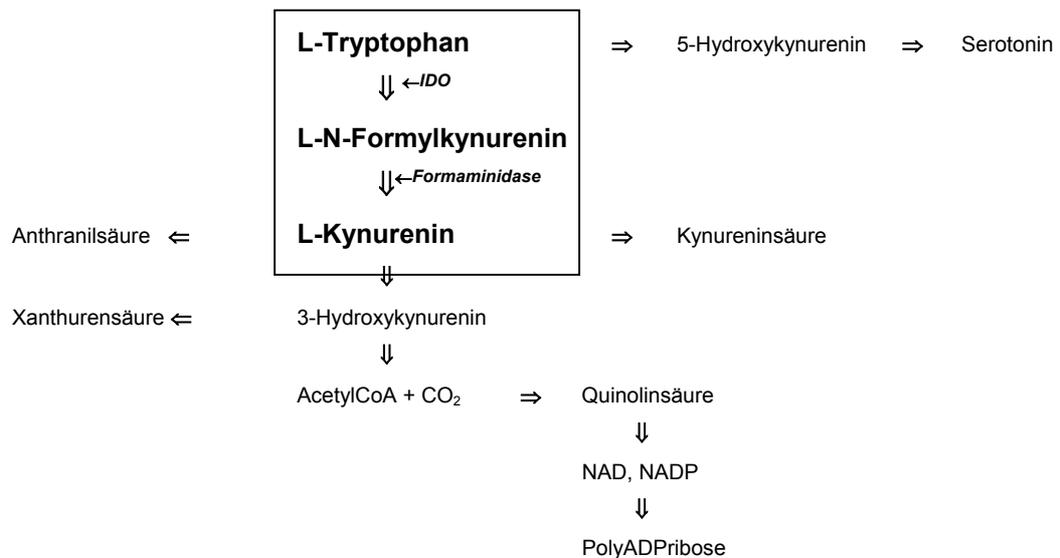


Abbildung 3 Tryptophanmetabolismus

In den folgenden Jahren konnte eine IDO Induktion bei weiteren Zelltypen wie Makrophagen (49), Monozyten (50) Astrozyten (51) und verschiedenen Tumorzelllinien (43) gezeigt werden. Da diese Aminosäure essentiell für Toxoplasmen ist, wird dadurch eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums erreicht. Der Abbau der Aminosäure korreliert dabei direkt mit der Hemmung des Toxoplasmenwachstums. Durch Supplementierung von Tryptophan kann die antiparasitäre Wirkung wieder aufgehoben werden. Dabei scheint die Wirkung alleine auf der Verarmung von Tryptophan zu beruhen, während Abbauprodukte, die im weiteren entstehen (siehe Abb. 3) keinen Einfluß auf die Proliferation der Parasiten ausüben (52). Dabei ist es unerheblich ob es sich um intrazelluläre Parasiten wie Toxoplasmen oder Chlamydien (53), oder extrazelluläre Bakterien wie Gruppe B Streptokokken handelt (15/54). Des weiteren besitzt die IDO eine schützende Wirkung beim oxidativen Stress, da es das Superoxidanion als Substrat und Cofaktor benötigt und die Tryptophanmetaboliten eine scavenger-Funktion in Bezug auf Sauerstoffradikale besitzen (55).

In murinen Zellen kommt diesem Enzym im Gegensatz zu den humanen Zellen sicherlich keine tragende Rolle bei der antiparasitären Abwehr zu.

Es bestehen somit enge Verflechtungen zwischen der IDO, der Produktion von Stickoxiden sowie der Produktion toxische Sauerstoffradikale und auch der Myeloperoxidase im Rahmen der spezifischen und unspezifischen Immunität. Dabei scheinen die entscheidenden Einflüsse im murinen System von NO und toxischen Sauerstoffradikalen sowie im humanen System von der Indolamin 2,3-dioxygenase auszugehen.

1.7 Fragestellung

Eine Infektion mit dem Protozoon *Toxoplasma gondii* verläuft, wie bereits erwähnt, in der Regel inapparent und komplikationslos. Lediglich der plazentaren Infektion des Feten galt es entsprechende Aufmerksamkeit durch Prophylaxe, Diagnostik, und Therapie zu widmen. Die Prävalenz von Toxoplasma Infektionen im westeuropäischen Raum reicht dabei bis ca. 80% (56). Im Zuge der Immunschwäche AIDS und der damit zunehmenden Zahl an Reaktivierungstoxoplasmosen (Toxoplasmenenzephalitis) verstärkte sich das Interesse für die immunologischen Vorgänge insbesondere im zentralen Nervensystem (ZNS). Hinzu kam die zunehmende Zahl an immunkompromitierten Patienten durch Chemotherapie oder neoplastische Erkrankungen sowie Immunsuppression bei Organtransplantierten. Insbesondere die Vorgänge in bestimmten Kompartimenten wie z.B. dem ZNS, welches sich durch seinen strukturellen Aufbau und besonderer Milieubedingungen von den übrigen Geweben des Körpers unterscheidet, gewinnen gerade im Rahmen der Toxoplasmose eine herausragende Bedeutung.

Wichtigster Mechanismus bei der Abwehr von Toxoplasmen in humanen Zellen ist die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). Die IDO ist ein Enzym, das die Umsetzung der Aminosäure L-Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin O_2 abhängig katalysiert. L-N-Formylkynurenin wird dann in einem weiteren Schritt durch eine ubiquitär vorkommende Formaminidase zu Kynurenin hydrolisiert (siehe Abb. 3). Das entscheidende Zytokin bei der Induktion des tryptophan-degradierenden Enzym ist Interferon γ . Auf diese Weise gelingt es die für Toxoplasmen essentielle Aminosäure Tryptophan abzubauen und damit eine Toxoplasmose zu induzieren.

Eine Reihe von pro- und antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen, die bei der körpereigenen Abwehr wichtige Aufgaben übernehmen, sind bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Zytokine IL-1, IL-6, IL-10, TGF β sowie der wichtigsten antiinflammatorisch wirkenden körpereigenen Substanz Cortison, für die Modulation der IDO näher beleuchtet. In der Literatur ist bisher lediglich IFN γ als starker Induktor der IDO bekannt. In diesem Zusammenhang sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Zytokine auf deren Funktion im Hinblick auf eine IDO-Induktion bzw. Regulation untersucht werden. Bekannt ist weiterhin, dass TNF α zwar nicht

selbst die IDO induziert, jedoch in Glioblastomzellen (51) sowie z.B. in Makrophagen (57) den $\text{IFN}\gamma$ vermittelten Effekt verstärkt und damit eine Verstärkung der Toxoplasmostase bewirkt. Gibt es also weitere Zytokine, die in unserem Infektionsmodell in der Lage sind, die $\text{IFN}\gamma$ vermittelte IDO-Induktion zu verstärken oder zu hemmen. Falls ein Einfluss erkennbar wird ist die Frage zu klären auf welcher Ebene die Regulation der IDO erfolgt. Des weiteren galt es zu untersuchen inwieweit sich die Zytokingabe abhängig und unabhängig von der Induktion der IDO funktionell auf das Verhalten der Toxoplasmen auswirken würde. Dies insbesondere vor dem Hintergrund anderer möglicherweise vorhandener Abwehrmechanismen (Oxidative burst/ Sickoxide) wie z.B. im murinen Modell bzw. in anderen peripheren Zellarten (40).

Im folgenden werden die verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten Zytokine im Hinblick auf ihre bisher bekannten Funktionen kurz beleuchtet:

IL-1 :

Interleukin 1 (IL-1) ist ein Zytokin, dass u.a. von Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und Glioblastomzellen exprimiert wird. Es ist ein wichtiger Mediator im Rahmen von Entzündungsgeschehen und besitzt vorwiegend stimulierende Effekte auf das Immunsystem. So ist es für den ersten Schritt in der T-Zell Aktivierung und deren Lymphokinfreisetzung verantwortlich (7/8); des weiteren führt es zur Proliferation von T- und B-Zellen. Auf der anderen Seite induziert IL-1 die Freisetzung von sog. sekundären Mediatoren wie IL-2 (T-Zellen), IL-6 (Fibroblasten) oder Prostaglandinen (Makrophagen) und wirkt als endogenes Pyrogen bei der Fiebererzeugung im Hypothalamus. Es ist in der Lage in vivo die ACTH-Produktion zu stimulieren. Als Folge davon steigen die Plasmacortisolspiegel an. Da die Produktion von IL-1 durch Dexamethason, einem synthetischen Cortisolanalogon, gehemmt werden kann, ist eine Verbindung des Streßabwehrsystems mit dem Immunsystem denkbar (58/59). IL-1 induziert des weiteren einen Toxoplasmaschutz in Mäusen. Im murinen System ist IL-1 in der Lage die $\text{IFN}\gamma$ induzierte Toxoplasmostase in Astrozyten zu verstärken (60).

IL-6 :

Interleukin 6 (IL-6) wird durch T-/B-Zellen, Monozyten und Fibroblasten sowie verschiedenen Glioblastomzellen sezerniert. Letztere sind in der Lage Interleukin 6 nach Stimulation (86HG39) mit IL-1 oder sogar spontan (U373MG/ 87HG31) zu produzieren. Seine Effekte sind u.a. die Proliferation von T-Zellen/Thymozyten und die Induktion der Produktion von Akute-Phase-Proteine durch Hepatozyten; des weiteren wirkt es ähnlich wie IL-1 als endogenes Pyrogen (61). Es verstärkt ähnlich wie IL-1 die Immunglobulinsynthese, und stimuliert die Produktion eines neurotrophen Faktors durch in vitro kultivierte Astrozyten (62). IL-6 vermittelt auch inhibitorische Effekte. So resultiert im murinen System die Gabe von IL-6 zu toxoplasmeninfizierten Peritonealmakrophagen in einem verstärkten Toxoplasmenwachstum (63). Außerdem konnte gezeigt werden, das die Gabe eines Antikörpers gegen IL-6 zu höheren Serumkonzentrationen von $\text{IFN}\gamma$, zu einer verminderten Anzahl von zerebralen Zysten sowie zu einer verminderten Entzündungsreaktion führt (64). Im Gegensatz dazu konnte bei humanen Mikrogliazellen eine schützende Funktion gegen Toxoplasmen gezeigt werden (65).

IL-10 :

Interleukin 10 (IL-10) ist ein antiinflammatorisch wirkendes Zytokin welches die Synthese von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen (so z.B. $\text{IFN}\gamma$) und Chemokinen inhibiert. Es wird von Monozyten, Makrophagen (Hauptquelle (66)) sowie von CD4^+ Lymphozyten insbesondere TH2 T-Zellen und CD8^+ T-Zellen gebildet. So führt eine IL-10 Antikörpergabe bei einer Toxoplasmenenzephalitis im murinen System zu einer reduzierten intrazerebralen Parasitenanzahl sowie zu einer erhöhten Zahl von Immunzellen und Produktion von protektiven Cytokinen (67). Auf der einen Seite vermag IL-10 weiterhin die Oberflächenexpression vom MHC Klasse II Komplex auf der Zelloberfläche von Monocyten und Makrophagen zu vermindern und damit die antiinflammatorische Aktivität zu reduzieren (68), sowie die NO-Synthese in murinen Macrophagen zu hemmen (69). Auf der anderen Seite hat es auch immunstimulatorische Eigenschaften. IL-10 ist in der Lage die TH-2 regulierte humorale Immunantwort zu unterstützen, indem es die Proliferation und Differenzierung in humanen B-Zellen induziert (70), sowie die Synthese und Expression von $\text{FC}\gamma$ Typ I Rezeptoren auf Monozyten und NK-Zellen fördert. Hiermit

trägt es zur Antigenerkennung durch Entzündungszellen und zur Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität bei. Dabei wird IL-10 erst spät im Verlauf einer Infektion synthetisiert und scheint damit eine Wirkung bei der Begrenzung einer möglicherweise deletären Fortführung der körpereigenen Entzündungsreaktion zu besitzen (71/72). Diese Eigenschaft ist möglicherweise klinisch nutzbar bei der Begrenzung von Entzündungsherden, wie z.B. bei der Colitis ulzerosa (73/74).

TGFβ :

TGFβ (Tumor-Growth-Faktor β) ist ein multifaktoriell wirkender Faktor, der eine hemmende Wirkung auf die Zellen des Immunsystems besitzt und als Antagonist vieler (Leukozyten-) stimulierender Zytokine (IL-1, IL-2, IFN γ , TNF α) dient. Auf der anderen Seite besitzt er eine kollageninduzierende, fibrosefördernde sowie angiogenesestimulierende Aktivität (\rightarrow traumatische Gewebeläsionen). Er bindet an einen Rezeptor, der praktisch auf allen normalen und malignen Zellen vorkommt. TGFβ wirkt als ein Antagonist von IL-2 und hemmt die IL-1 abhängige Proliferation von Lymphozyten. Weiterhin blockiert es die Funktion von NK-Zellen (75). Als Beispiele für die TGFβ Wirkung in Bezug auf dieIDO wurde eine Hemmung der IFN γ induziertenIDO bei humanen Makrophagen (76) und Fibroblasten (77) gefunden. Außerdem vermag TGFβ die IFN γ induzierte Expression von MHC Klasse II Antigenen auf humanen Astrozytomzellen oder Melanomzellen (78/79) sowie die NOS-Transkription in Makrophagen (80) zu antagonisieren. Desweiteren vermindert es die VCAM-1 Expression auf humanen Astrozyten die bei der Extravasation und Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle spielt (81). Im murinen System ist TGFβ in der Lage bei Toxoplasmose empfänglichen Mäusen die Aktivierung von CD4⁺/CD8⁺ T-Zellen zu reduzieren sowie die Anzahl von intrazerebralen Erregern dosisabhängig zu erhöhen. Dieser Effekt konnte durch Gabe von IFN γ antagonisiert werden (82).

Dexamethason :

Cortisol spielt eine wichtige Rolle als Regulator des Intermediärstoffwechsels und als Modulator des Immunsystems. Es wirkt antiphlogistisch (Hemmung der Biosynthese von Prostaglandinen, Leukotrienen und Thromboxanen), antiallergisch, hemmt die Produktion von Antikörpern und reduziert die immunologischen Abwehrreaktionen; ein erwünschter Effekt bei Organtransplantationen. Weiterhin hemmt es die Synthese

von TNF und IL-1 sowie die Aktivierung von T-Lymphozyten. Die Migration von Leukozyten und Mastzellen in das entzündliche Gebiet wird verringert. Da Glukokortikoide aufgrund ihrer Lipophilie frei durch die Zellmembran diffundieren können und Cortisolrezeptoren praktisch in allen Zellen im Zytoplasma existieren erklärt dies ihre vielfältige Wirkungsweise.

Die oben genannte Zytokine wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Wirkung auf die Indolamin 2,3-dioxygenase sowie auf ihren Einfluß auf das Toxoplasmenwachstum in Glioblastomzellen untersucht.

B. Material und Methoden

1. Herkunft der verwendeten Zelllinien

1.1 Herkunft der Glioblastomzellen

1.1.1 Herkunft der Zelllinie 86HG39 und 87HG31

Die Glioblastomzelllinien 86HG39, 87HG31 wurden von Prof. Dr. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Sie entstammen den Erstrezidiven verschiedener Glioblastome und wurden zwischen der 140. und 200. in vitro Passage (Passagedauer 5 – 7 Tage) in den Experimenten eingesetzt, und erwiesen sich auch nach Langzeit in vitro Kultur für den Astrozytenmarker GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) positiv (5).

1.1.2 Herkunft der Zelllinie U373MG

Diese Zelllinie wurde über ATCC, Rockville, Maryland (Katalognr. HTB17) bezogen (Acta Path. Microbiology Scand. 74, 1968). Bei einer Passagedauer von sieben bis acht Tagen wurde diese Linie in der 50. bis 100. in vitro Passage nach Erhalt von ATCC in den Experimenten eingesetzt.

1.2 Herkunft der Raw – Zellen

Die murinen Makrophagen wurden von ATCC-Rockville, Maryland, USA bezogen.

1.3. Herkunft der B9-Zellen

Die IL-6 Indikatorzellen der B-Zelllinie B9 wurden uns von Dr. Kiderlen, Robert-Koch-Institut, Berlin, zur Verfügung gestellt.

1.4 Herkunft des *Toxoplasma gondii* – Stammes BK

Der Toxoplasmenstamm BK wurde uns freundlicherweise von Drs. Saathoff und Seitz, Institut für Parasitologie, Bonn zur Verfügung gestellt.

1.5 Herkunft der Mausfibroblasten L929

Die Mausfibroblastenlinie L929 wurde vom Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität Mainz bezogen und stammt ursprünglich von ATCC, Rockville ,USA (Katalognr. CCI1). Es handelt sich hierbei um eine aus dem normalen subcutanen Gewebe einer Maus abstammenden Zelllinie, die 1940 als eine der ersten kontinuierlichen Zelllinien von W. R. Earle etabliert wurde (83).

2. Zellkulturtechniken

2.1 Medien, Puffer, Zytokine, Chemikalien, Antikörper

- I-Med5%

Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser und versetzt mit:

- 3g/l NaHCO₃ (Merck, Darmstadt)
- 5% (v/v) hitzeinaktiviertem, fetalen Kälberserum (FCS, Seromed)
- 1% Glutamin (Gibco, Grand Island, New York)
- 50µM β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)

- RPMI 5%

RPMI 1640 Medium wurde mit und ohne Phenolrot als Fertigmedium (Gibco) bezogen, und lediglich mit 5% hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum FCS sowie 1% Glutamin supplementiert.

- Einfriermedium

FCS mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck).

- PBS – Puffer

Steriler PBS- Puffer wurde als Waschmedium für die Zellen verwendet und von der Apotheke der Medizinischen Einrichtung der Heinrich Heine Universität Düsseldorf bezogen.

Er setzt sich zusammen aus:

- 8,0g NaCl
- 0,2g KCL
- 1,35g $\text{KH}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
- 0,25g KH_2PO_4

- 5x SDS-Probenpuffer für Proteingele

- 10% SDS; 0,4M Tris-HCl pH 6,8;
- 25% (v/v) Glycerin; 5% β -Mercaptoethanol
- 0,1% Bromphenolblau

- Trenngelpuffer

- 1,5M Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS

- Kathodenpuffer

- 0,025M Tris; 0,04M 6-Aminohexansäure;
- 20% (v/v) Methanol

- Anodenpuffer 1

- 0,03M Tris; 20% (v/v) Methanol

- Anodenpuffer 2

- 0,3M Tris; 20% (v/v) Methanol

- Gelfärbelösung

- 0,1% Coomassie Brilliantblau R 250;
- 7,5% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol

- Entfärbelösung

- 7,5% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Methanol

- Ponceau S-Stammlösung

- 2% Ponceau S; 30% Trichloressigsäure;
- 30% Sulfosalicylsäure

- Blocking-Lösung

- 1% Blocking Reagenz (Boehringer) gelöst in
- 1x Maleinsäurepuffer

Alle verwendeten Medien wurden mit 0,2µm MediaKap 5 Sterilfilter (Microgon, Laguna Hill, USA) sterilfiltriert.

Auf den Zusatz von Antibiotika in den Testsystemen wurde verzichtet, damit bakterielle Kontaminationen schnell erkannt werden konnten.

Die Inaktivierung des Kälberserums (FCS) erfolgte durch 30–minütiges Erhitzen auf 56°C

- Zytokine

human	IL-1	als rekombinante hu Proteine aus E.coli von der Firma Genzyme, Rüsselsheim, GER, bezogen
	IL-6	
	IL-10	
	IFN γ	
	TNFα	
	TGFβ	
murin	IFNγ	Firma Genzyme, Rüsselsheim, GER

- Chemikalien

- **L- Tryptophan:** Firma Sigma, Chemical CO., St. Louis, MO, USA.
- **Trypanblau:** Firma Sigma, Chemical CO., St. Louis, MO, USA.
- **Dexamethason (Cortison):** Firma Sigma, Chemical CO., St. Louis, MO, USA.
- **^3H -Uracil:** Amersham International, England.

- **Ehrlich-Reagenz:** 0,4% (w/v) Dimethylbenzaldehyd/Eisessig, Sigma, Chemical CO., St. Louis, MO, USA.
- **Gries-Reagenz:** Naphtylethylendiamin-Dihydrochlorid (0,3% in aqua dest.), Sulfanilamid (1% in 1,2N HCL), Firma Sigma, Chemical CO., St. Louis, MO, USA.

- Antikörper

- **anti – TNF α – Antikörper:** Dieses von Kaninchen stammende Serum kann die biologische Aktivität von TNF α blockieren, und wurde ebenfalls von Genzyme, Cambridge, MA, bezogen.
- **anti-IDO-Antikörper:** Ein monoklonaler Maus-anti-IDO-Antikörper (IDO-mAk) wurde zur Verfügung gestellt von Osamu Takikawa, Dept. of Chemistry and Australian Cataract Research Foundation, University of Wollongong, Australien. Nachweise des IDO-Proteins mit diesem Antikörper sind bereits publiziert (Heyes et al. 1992).

2.2 Kultivierung und Ernte der Zelllinien 86HG39, 87HG31, U373MG

Die Glioblastomzellen dieser Zelllinien wurden in liegenden 50ml Zellkulturflaschen der Firma Costar in Heraeus – Brutschränken bei 37°C und wasserdampfgesättigter und mit 10% CO₂ angereicherter Atmosphäre in 15ml I-Med5% kultiviert. Durch das Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem des Kulturmediums wird eine pH Konstanz gewährleistet. Die Teilungsrate der Zellen betrug, unter der Voraussetzung , eines ausreichenden Nährstoffangebotes und Nichterreichen einer konfluenten Einzelschicht, 1-1,5 pro die. War durch das Wachstum der Zellen eine konfluierende Einzelschicht erreicht, wurden die Zellen geerntet. Da die starke Adhärenz der Glioblastomzellen, insbesondere der Reihe 87HG31, ein Ablösen der Zellen durch Resuspendieren des Kulturmediums verhinderte, wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung (Seromed, Biochrom, Berlin) abgelöst. Dazu wurden nach Entfernung des Kulturmediums 2-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für ca. 3

min zu den Zellen gegeben. Das Trypsin bewirkt ein Andauen und Ablösen der Zellfortsätze vom Flaschenboden und ein Abrunden der Zellen. Anschließend wurden sie unter Verdünnung und Neutralisierung des Trypsins mit 10 ml I-Med5% aus der Kulturflasche geerntet und in ein 15ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200U/min und 4°C erfolgte die Aufnahme des Sediments in 10ml I-Med5% und die erneute Zentrifugation bei 1200U/min/4°C. Das resultierende Sediment wurde in 2ml Iscove´s-Med5% aufgenommen und eine Neubauer Zählkammer mit 50µl einer 1:2-fachen Verdünnung mit Trypanblau (Roth) beschickt. Trypanblau ermöglicht die Unterscheidung zwischen lebenden (ungefärbten) und toten (angefärbten) Zellen. In der Regel färben sich weniger als 5% der Zellen an.

Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden 5×10^5 Zellen in die alte Kulturflasche mit 15ml frischen I-Med5% überführt.

2.3 Kultivierung und Ernte der Raw – Zellen

Die Raw-Zellen wurden in liegenden 50 ml Zellkulturflaschen der Firma Costar in Heraeus – Brutschränken bei 37°C und wasserdampfgesättigter und mit 10% CO₂ angereicherter Atmosphäre in 15ml I-Med5% kultiviert. Durch das Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem des Kulturmediums wird eine pH Konstanz gewährleistet. Die Flaschen waren nach 3-5 Tagen dicht genug zur Ernte bewachsen. Hierzu wurden die Zellen mit Kulturmedium vom Flaschenboden gespült oder mit einem Zellschaber (Greiner) gelöst und mit Medium in ein 15ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden ca. 1ml der Zellsuspension in die alte Kulturflasche mit 15ml frischen I-Med5% überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit 1200rpm wurde das Pellet in 2-3ml I-Med5% resuspendiert, und die Zellzahl zur weiteren Verwendung in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4 Kultivierung und Ernte der Mausfibroblasten L929

Die Mausfibroblasten wurden in I-Med5% in liegenden 10ml Kulturflaschen in einer mit 10% CO₂ angereicherten und wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Alle 3-4 Tage war die Kulturflasche zur Ernte dicht genug bewachsen. Die adhärennten Mausfibroblasten wurden entweder mit Medium vom Boden gespült oder durch einen Zellschaber (Greiner) von der Oberfläche gelöst, und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Ca. 1ml wurde dabei in der Flasche zurückbehalten und diese zur Weiterkultivierung mit 5ml I-Med5% aufgefüllt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation mit 1200U/min. wurde das Sediment in 2ml I-Med5% resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden anschließend als Wirtszellen zur Kultivierung der Toxoplasmen verwendet.

2.5 Kultivierung und Ernte der Toxoplasmen

Toxoplasma gondii, als obligat intrazellulär parasitierendes Protozoon, benötigt zur Vermehrung eine Wirtszelle. Als solche dient die Mausfibroblastenlinie L929. Es wurden $1-1,5 \times 10^6$ L929-Zellen mit $3-10 \times 10^6$ Toxoplasmen in eine 10ml Kulturflasche gegeben und 3-4 Tage kultiviert. In dieser Zeit wurden nahezu alle Mausfibroblasten infiziert und zerstört. Die daraufhin wieder extrazellulär liegenden Toxoplasmen wurden dann vom Boden der Kulturflasche gespült und in ein 5ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei Raumtemperatur erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 600 U/min um die mitabgespülten Mausfibroblasten und deren Zelltrümmer sedimentieren zu lassen. Die im Überstand verbliebenen Toxoplasmen wurden in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert um die Toxoplasmen zu pelletieren. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5ml RPMI ohne Phenolrot resuspendiert. Nach entsprechender Verdünnung mit Trypanblau wurden die Toxoplasmen ausgezählt und für die entsprechenden Experimente weiterverdünnt.

Es hat sich als günstig erwiesen (84) die Toxoplasmen ohne Kühlung zu zentrifugieren und sofort für den Versuch zu verwenden oder wieder den Wirtszellen zuzuführen.

2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieren der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -196°C , bei der die Haltbarkeit der Zellen über Jahre gewährleistet ist. Bei einer Temperatur von -75°C sind die Zellen lediglich einige Monate haltbar. Bei dem Einfriervorgang muß darauf geachtet werden, daß eine Schädigung der Zellmembran durch Kristallisation des im Zytoplasma enthaltenen Wassers ausgeschlossen wird. Dazu dient das im Einfriermedium enthaltenen DMSO, welches die Permeabilität der Zellmembran steigert. Dadurch bedingt ist DMSO bei Raumtemperatur stark zytotoxisch, so daß die im Einfriermedium resuspendierten Zellen möglichst rasch eingefroren werden müssen.

Die Zellen werden, wie bereits ausgeführt, geerntet und das resultierende Sediment in eisgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Die Konzentration der Zellen beträgt hier mindestens 1×10^6 Zellen/ml, wobei jeweils 1ml in ein steriles Kunststoffröhrchen (1,8ml, Nunc) überführt und bei -78°C für 48 Stunden zwischengelagert wird, bevor es in den flüssigen Stickstoff getaucht wird.

Der Auftauvorgang wird beschleunigt, indem das Einfrierröhrchen nach der Entnahme mit etwas I-Med5% resuspendiert wird. Unverzüglich wird die Zellsuspension ad 50ml I-Med5% in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und bei 1200rpm bei 4°C abzentrifugiert. Zur Verringerung der Zytotoxizität ist ein möglichst rascher Auftauvorgang und die Ausverdünnung des DMSO erforderlich. Die Zellen werden nach nochmaligem Waschen in Kulturmedium wie gewohnt ausgesät.

3. Testsysteme

3.1 Kynureninnachweis im Überstand stimulierter Zellen

Der Kynureninnachweis im Überstand aktivierter Zellen bietet den Vorteil, im Gegensatz zu der von Feng und Taylor (1989) (85) beschriebenen Methode, daß bei diesem Verfahren zum indirekten Nachweis der Aktivität der Indolamin 2,3-dioxygenase die Zellen nicht aufgeschlossen werden müssen. Somit kann das während der gesamten Inkubationsdauer entstandene Kynurenin photometrisch nachgewiesen werden. Ferner können die, nach Entfernung des Überstandes, in den Kulturplatten verbliebenen, stimulierten Zellen z.B. für Toxoplasmenproliferationstests weiter verwendet werden (86).

Als Kulturmedium für diesen Test wurde I-Med5% verwendet, das zusätzlich mit 50µg/ml L-Tryptophan angereichert wurde. In den Vertiefungen einer 96-well-Platte (Flachboden) wurden je 50µl Kulturmedium mit unterschiedlichen IFN γ Konzentrationen (1000–0 U/ml, 1:2 Verdünnungsreihe) vorgelegt. Daraufhin folgte die Zugabe von Zytokinen in weiteren 50 – 100µl Kulturmedium in entsprechender Konzentration. Pro well wurden anschließend 3×10^4 Glioblastomzellen hinzugefügt. Nach einer 72-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden je 160µl den einzelnen Vertiefungen entnommen und in eine 96-well-Platte (Spitzbodenplatte) überführt. Nach Zugabe von 10µl 30%-iger Trichloressigsäure pro well wurden die Proben für 30min im Wasserbad bei 56°C inkubiert, um N-Formylkynurenin zu Kynurenin zu hydrolysieren.

Nach 10 minütiger Zentrifugation der Platten mit Hilfe eines Matched-Weight Microplate Carriers (Beckmann) bei 2500rpm in einer Beckman Model J-6-B-Zentrifuge wurden jeweils 100µl Überstand mit 100µl frisch angesetztem Ehrlich-Reagenz in den Vertiefungen einer 96-well-Platte (Flachboden) gemischt.

Die Absorbtion wurde bei 492nm gemessen. Als Negativkontrolle diente der Überstand unstimulierter Zellen, als Standart eine Kynureninverdünnung.

In dieser Arbeit wurden die Zellen mit IFN γ , TNF α , verschiedenen Interleukinen, Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren alleine oder in Kombination stimuliert.

3.2 Indirekter Nachweis der intrazellulären Indolamin 2,3-dioxygenase

Zum Nachweis der intrazellulären Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) wurde das von Takikawa (1988)(87) und Feng und Taylor (1989)(85) beschriebene Testverfahren in modifizierter Form angewandt. Es beruht auf dem Prinzip die im Intrazellularraum gelegene IDO herauszulösen die anschließend das im Reaktionspuffer zugesetzte Tryptophan zu N-Formylkynurenin umsetzt. Dieses wird in einem weiteren Schritt durch die Kynurenin-Formidase zu Kynurenin hydrolysiert. Die Menge an entstandenem Kynurenin kann anschließend photometrisch bestimmt werden, und dient somit dem indirekten Nachweis des Tryptophanabbauenden Enzyms Indolamin 2,3-dioxygenase. Die entstehende Menge an Kynurenin ist dabei direkt proportional zur Aktivität der Indolamin 2,3-dioxygenase.

Für die Bestimmung wurden die Glioblastomzelllinien 86HG39, 87HG31 und U373MG für 3 Tage in I-Med5% mit unterschiedlichen Dosen hIFN γ und verschiedenen Zusätzen inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert, in PBS aufgenommen und gezählt. Je $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden dann in 200 μ l PBS aufgenommen und durch dreimaliges Einfrieren bei -78°C und Auftauen im Wasserbad bei 37°C aufgeschlossen. Es folgte eine scharfe Zentrifugation in Eppendorff-Röhrchen bei 13000 U/min für 3-5 min. Der resultierende Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an Reaktionspuffer versetzt.

- Zusammensetzung des Reaktionspuffers:
 - 40mM Ascorbinsäure (Sigma, Deisenhofen)
 - 20 μ M Methylenblau (Sigma, Deisenhofen)
 - 800 μ M L-Tryptophan (Sigma, Deisenhofen)
 - in 100mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 6,5, Merck, Darmstadt)

Der Reaktionspuffer wurde aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Kurz vor dem Versuch wurde der Reaktionspuffer mit 200 μ g Katalase/ml (Sigma) versetzt. Für die enzymatische Reaktion ist ein reduzierendes System aus Ascorbinsäure und Methylenblau notwendig, um die Aktivität des Hämoproteins IDO aufrecht zu erhalten, da das aktive Eisen (Fe^{2+}) Enzym unter den in vitro Bedingungen schnell zum inaktiven Eisen (Fe^{3+}) Enzym oxidiert.

Während einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wird das im Reaktionspuffer befindliche L-Tryptophan zu N-Formylkynurenin umgesetzt. Das Abstoppen der

Reaktion erfolgt durch Zugabe von 40µl 30% Trichloressigsäure (Merck). Es schließt sich eine 30-minütige Inkubation der Proben bei 56°C an, um das entstandene N-Formylkynurenin zu Kynurenin zu hydrolysieren. Nach Zentrifugation bei 13000U/min für 5min in einer Eppendorf-Zentrifuge (Hettich Mikroliter) wurden jeweils 100µl Überstand mit dem gleichen Volumen an Ehrlich-Reagenz (0,4% p-Dimethylbenzaldehyd/Eisessig, Sigma, Merck) in den Vertiefungen einer 96-well-Platte vermischt, wobei sich der Testansatz bei Vorhandensein von Kynurenin gelb verfärbt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Die entstandene Farbreaktion wurde bei 492nm photometrisch mit einem Mikroplatten-Photometer gemessen. Als Nullwert wurde die Absorbtion von Proben unbehandelter Zellen herangezogen.

3.3 Toxoplasmenproliferationstest

In der vorliegenden Arbeit wurde der ³H-Uracil-Einbautest angewendet. Der Toxoplasmenproliferationstest eignet sich zur quantitativen Bestimmung der Toxoplasmenvermehrung. Toxoplasmen besitzen im Gegensatz z.B. zum Säugetier das Enzym Uracil-Phosphoribosyltransferase, das Uracil in das in der Nukleotidsynthese verwendete Uridylat überführt. So wird ³H-Uracil fast ausschließlich von *Toxoplasma gondii* in die DNA/RNA eingebaut (88).

Für diesen Test wurden die unterschiedlich vorbehandelten Glioblastomzellen (3×10^4 /well) mit Iscove's-Med5%, das je nach Fragestellung mit verschiedenen Additiven versetzt wird, unter Zugabe von L-Tryptophan (Endkonzentration 50µg/ml) in 96-well-Platten kultiviert. Im Normalfall erfolgte die Infektion der Zellen mit 1×10^4 Toxoplasmen pro well, die in RPMI-Med5% (um kein zusätzliches Tryptophan zuzusetzen) zugeführt wurden. Nach 2-4 Tagen Inkubation im Brutschrank war in der Mehrzahl der Versuche der erste Vermehrungszyklus der Toxoplasmen abgeschlossen, was mikroskopisch an erneutem Vorhandensein extrazellulärer Toxoplasmen zu erkennen war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Testansätze radioaktiv markiert. Hierzu wurden pro Vertiefung je 37kBq ³H-Uracil (Amerham) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 16-24 Stunden wurden die Platten bei -20°C eingefroren. Mit dem Einfrieren wird die Zellmembran zerstört und die DNA freigesetzt. Anschließend wurden die Testansätze wieder aufgetaut und der

Inhalt der einzelnen Vertiefungen mit Hilfe eines Zellerntegerätes (LKB Wallac) mit aqua dest. über einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) abgesaugt. Die mit ^3H -Uracil markierte DNA wird dabei im Glasfaserfilter zurückgehalten. Es folgt eine 20-minütige Trocknung der Filter bei ca. 100°C . Danach wurden die Filter unter Zugabe von 10ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) einzeln in Plastiktütchen eingeschweißt und in einem β -Counter (1205 Betaplate, LKB Wallac) ausgewertet. Dieser misst die durch den radioaktiven Zerfall des Uracil in der Szintillationsflüssigkeit erzeugten Lichtblitze und gibt sie als "counts per minute" (cpm) an. Die gemessenen cpm-Werte sind in diesem Test ein Maß für das Parasitenwachstum.

3.4 Nachweis von Stickoxiden

Der Nachweis von NO_2^- wird spektralphotometrisch mit dem Griess'schen Reagenz durchgeführt. Dieses Reagenz besteht zu gleichen Anteilen aus Naphtylethylendiamin - Dihydrochlorid (Sigma, 0,3% in destilliertem Wasser) und Sulfanilamid (Sigma, 1% in 1,2N HCL) und wird direkt vor der Testauswertung frisch angesetzt. Es bildet mit Nitrit einen pinkfarbenen Azofarbstoff (89), der bei einer Wellenlänge von 543nm absorbiert. Der Test wurde wie von Ding et al. (1988)(90) beschrieben durchgeführt. Dieser Test dient zum Nachweis einer NO-Produktion durch unbehandelte und stimulierte Raw-Zellen.

3.5 IL-6 Bioassay

Prinzip des verwendeten IL-6 Bioassays ist die Bestimmung der durch IL-6 induzierten Proliferation von B9 Zellen. IL-6 ist das einzige Zytokin, das in B9 Zellen eine Proliferation auslöst, wobei keine Kreuzreaktivität mit IL-1 existiert. Die zu untersuchenden Überstände der stimulierten Glioblastomzellen wurden beginnend mit einer 1:2-1:3 Verdünnung über 16 Stufen jeweils 1:2-1:3 in einer 96 well Platte (Greiner) weiter verdünnt. Zu den verschiedenen Verdünnungsstufen wurden pro Vertiefung $2-3 \times 10^3$ B9 Zellen hinzugegeben. Nach 48-72 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde die Proliferation der B9 Zellen als Maß für die Zytokinproduktion mit Hilfe der ^3H -Thymidineinbaumethode bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit $10\mu\text{l}$ ^3H -Thymidin pro Vertiefung markiert, für 16-20 Stunden im Brutschrank inkubiert und

anschließend bei -20°C eingefroren, um die Zellmembran zu zerstören und die DNA freizusetzen. Nach dem Auftauen der Testansätze wurden diese nun wie im Abschnitt 3.3 weiterbehandelt, um über die gemessenen cpm-Daten das Zellwachstum und das entstandene IL-6 bestimmen zu können.

Als Negativkontrolle diente der Überstand von unbehandelten Glioblastomzellen, und als Standard verwendeten wir eine Verdünnungsreihe von IL-6.

3.6 Proteinpräparation und Bestimmung der Konzentration

Für einen Nachweis der IDO auf Proteinebene wurden $1-2 \times 10^6$ Zellen in 25cm^2 -Flaschen überführt und für drei Tage mit 15, 30, 60 und 100U/ml hIFN γ 200mg/ml Cortison oder beidem stimuliert.

Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet für 5 Minuten in flüssigen Stickstoff getaucht. Durch anschließendes schnelles Auftauen und Aufnahme in $100\mu\text{l}$ A.dest. wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 10 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für nachfolgende Versuche verwendet.

Um die Konzentration der Proteine im Überstand zu bestimmen, wurde die Methode von Bradford angewendet (Bradford 1976). Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde BSA eingesetzt.

3.7 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 9,5- oder 12%igen Polyacrylamidgelen (Dicke $0,8\text{mm}$) mit 0,1% SDS nach der Methode von Laemmli (91). Vor dem Auftragen wurden 20 oder $40\mu\text{g}$ Protein für 10 Minuten bei 95°C in Probenpuffer denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte entweder bei 100V im Sammelgel und 250V im Trenngel oder bei 40V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Low Range Standard“ ($14,4-97,4\text{ kDA}$) der Firma Biorad (Hercules, CA).

Zur Visualisierung der Proteinbanden im Gel wurden die Trenngele für 1-2 Stunden in Gelfärbelösung inkubiert. Zur Entfärbung des proteinfreien Hintergrunds wurde die Entfärbelösung eingesetzt.

3.8 Western Blot

Der Transfer geoelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurde in Anlehnung an Kyhse-Andersen durchgeführt (92). Bei diesem „semidry-transfer“ wurde ein Gel-Membran-Sandwich mit puffergetränkten Filterpapieren (Whatman 3MM) zwischen die Elektroden einer Western Blot-Kammer (CarboGlas, Schleicher & Schuell, Dassel) platziert und die Proteine transferiert.

Direkt nach der Elektrophorese wurden Gel, Membran (Protran, Schleicher & Schuell) und Filterpapiere in der folgenden Reihenfolge auf der Kathode der Blot-Kammer übereinander geschichtet:

- 3 Filter, getränkt in Kathodenpuffer
- Polyacrylamidgel
- Nitrozellulosemembran, befeuchtet mit Anodenpuffer 1
- 3 Filter, getränkt in Anodenpuffer 1
- 3 Filter, getränkt in Anodenpuffer 2

Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8\text{mA/cm}^2$ Gelfläche für 30 bis 45 Minuten.

3.9 Ponceau S-Färbung

Um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen auf die Membran transferiert wurden, wurde die Membran direkt nach dem Transfer für 1-5 Minuten mit Ponceau S-Lösung gefärbt (Stammlösung 1:10 verdünnt mit A. dest.). Anschließend wurde die Membran solange gewässert, bis die gewünschte Färbung erreicht war.

3.10 Immunologischer Nachweis derIDO

Die Membran wurde für eine Stunde mit Blockpuffer (5% (w/v) Milchpulver in PBS) und anschließend für eine Stunde mit dem monoklonalen anti-IDO-Antikörper, 1:4000 verdünnt in Blockpuffer, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5 Minuten) wurden gebundene Antikörper mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus, IgG und IgM, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) markiert (1:5000 verdünnt in Blockpuffer, 1h). Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde für 1min ein Chemilumineszenzsubstrat (ECL, Amersham, Buckinghamshire, E) auf die Membran gegeben. Die Visualisierung erfolgte durch enzymatischen Umsatz des Substrats und Exposition mit Röntgenfilm.

C. Ergebnisse

1. Wirkung von Interferon γ auf Glioblastomzellen

Für die Abwehrfunktionen gegen Infektionen des Organismus erfüllen die sogenannten akzessorischen Zellen des Zentralen Nervensystems wichtige Aufgaben. Hierzu gehört die Expression von Oberflächenantigenen (MHC-Klasse-II Antigene), die Produktion von Zytokinen und die unmittelbare Erregerabwehr. Zur Erregerabwehr dient die Bildung toxischer Sauerstoffradikale (Oxidative Burst), die Bildung von Stickoxiden sowie die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase.

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase katalysiert den entscheidenden Schritt in der Degradation der Aminosäure Tryptophan. Diese stellt für viele infektiöse Organismen, so z.B. Toxoplasmen oder Chlamydien, eine essentielle Aminosäure dar. Durch diese Abhängigkeit erlangt die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als Abwehrmechanismus eine große Bedeutung. Unter den akzessorischen Zellen des ZNS konnte die IDO bei den humanen Astrozyten nachgewiesen werden (51). Es ist also leicht vorstellbar, daß diese bei der Abwehr von Toxoplasmen eine wichtige Rolle spielen.

Da aus ethischen Gründen die Gewinnung bzw. die Versuche mit humanen nativen Astrozyten schwierig ist, werden üblicherweise Glioblastomzellen bzw. Astrozytomzellen als Modell verwendet. Von uns wurden daher als Modell die Glioblastom- bzw. Astrozytomzellreihen 86HG39, U373MG und 87HG31 benutzt.

Ziel der Arbeit war es die Beeinflußbarkeit der IDO und das davon abhängige Toxoplasmenwachstum zu untersuchen. Da der entscheidende Schritt der IDO die Tryptophandegradation zu L-Kynurenin ist, benutzten wir zur Messung der Kynureninproduktion das im Abschnitt 3.1. beschriebene Testverfahren.

Im folgenden wurde die Induzierbarkeit der IDO bei den verschiedenen Zelltypen untersucht. Dafür wurden je 3×10^4 Glioblastomzellen/well mit IFN γ in verschiedenen Konzentrationen (1000/250/64 U/ml) inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die Produktion von N-Formylkynurenin, das spontan zu L-Kynurenin hydrolysiert, gemessen. Nach Zugabe von Ehrlich's Reagenz kann die Absorption, die ein Maß für die L-Kynurenin Produktion und damit die IDO-Aktivität ist, photometrisch bei 492nm bestimmt werden.

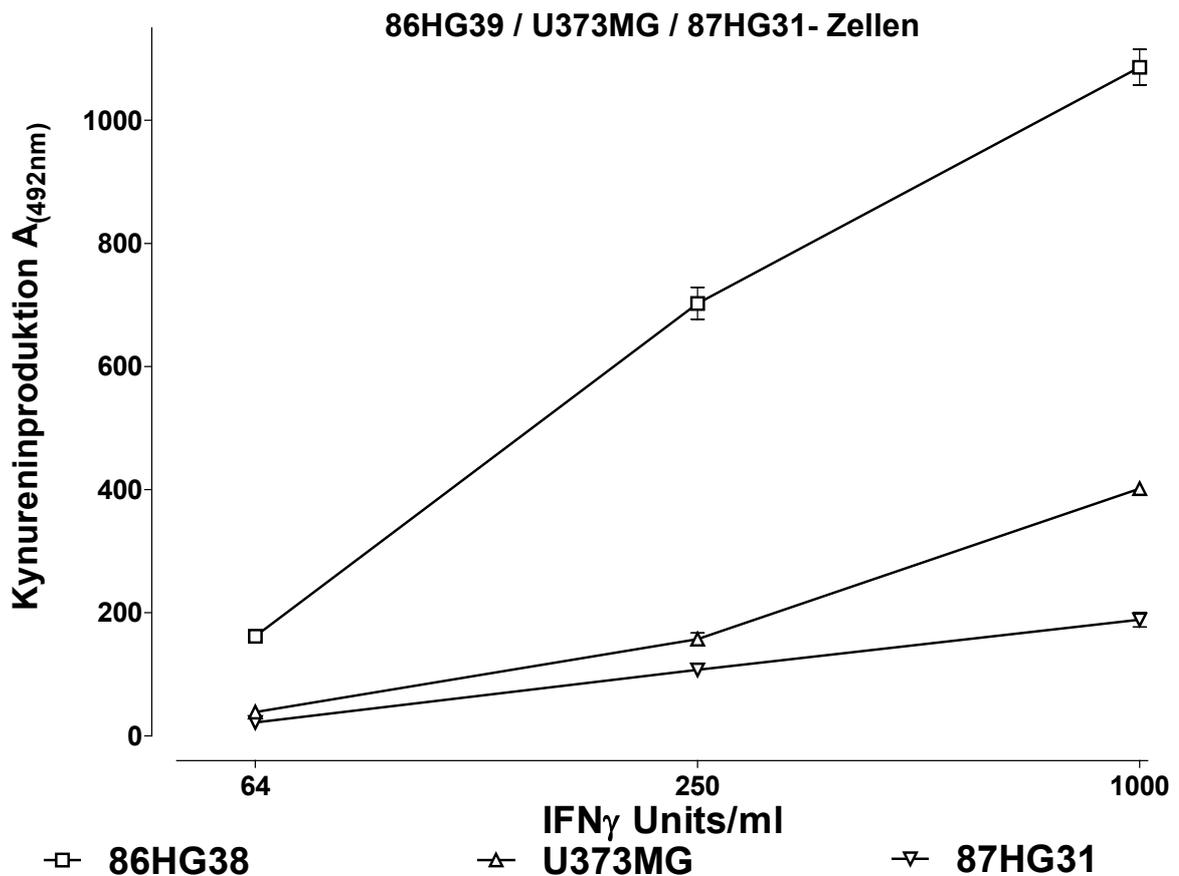


Abb. 4: IDO - Induktion durch IFN γ in verschiedenen Glioblastomzellen
 3×10^4 Zellen der Linie **86HG39**, **U373MG**, **87HG31**, wurden mit IFN γ (1000/250/64 U/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Abb. 4 spiegelt das Verhalten der 3 Zellreihen auf verschiedene Konzentrationen von IFN γ wieder. Es zeigte sich, daß nach Stimulation durch IFN γ die einzelnen Zellreihen qualitativ zwar einheitlich, quantitativ jedoch unterschiedlich auf den gleichen Stimulus reagierten. Dabei wurde die stärkste Kynureninproduktion (Stimulation mit IFN γ 1000 U/ml) bei der Zellreihe 86HG39 erreicht. Die schwächste Induktion wird bei der Glioblastomzelle 87HG31 beobachtet, die weniger als $\frac{1}{5}$ der Aktivität der Zelle 86HG39 erreicht. Die Zellreihe U373MG weist Werte auf, die bei maximaler IFN γ -Stimulation (1000 U/ml), zwischen den beiden anderen liegen.

Durch Zugabe von 1×10^5 Toxoplasmen/well 72 Stunden nach Inkubation kann der Effekt der Tryptophandegradation sichtbar gemacht werden. Toxoplasmen benötigen

als essentielle Aminosäure Tryptophan. Diese wird jedoch durch die $\text{IFN}\gamma$ induzierte Indolamin 2,3-Dioxygenase abgebaut. So beobachtet man eine Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch die Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ (**Abb.5**).

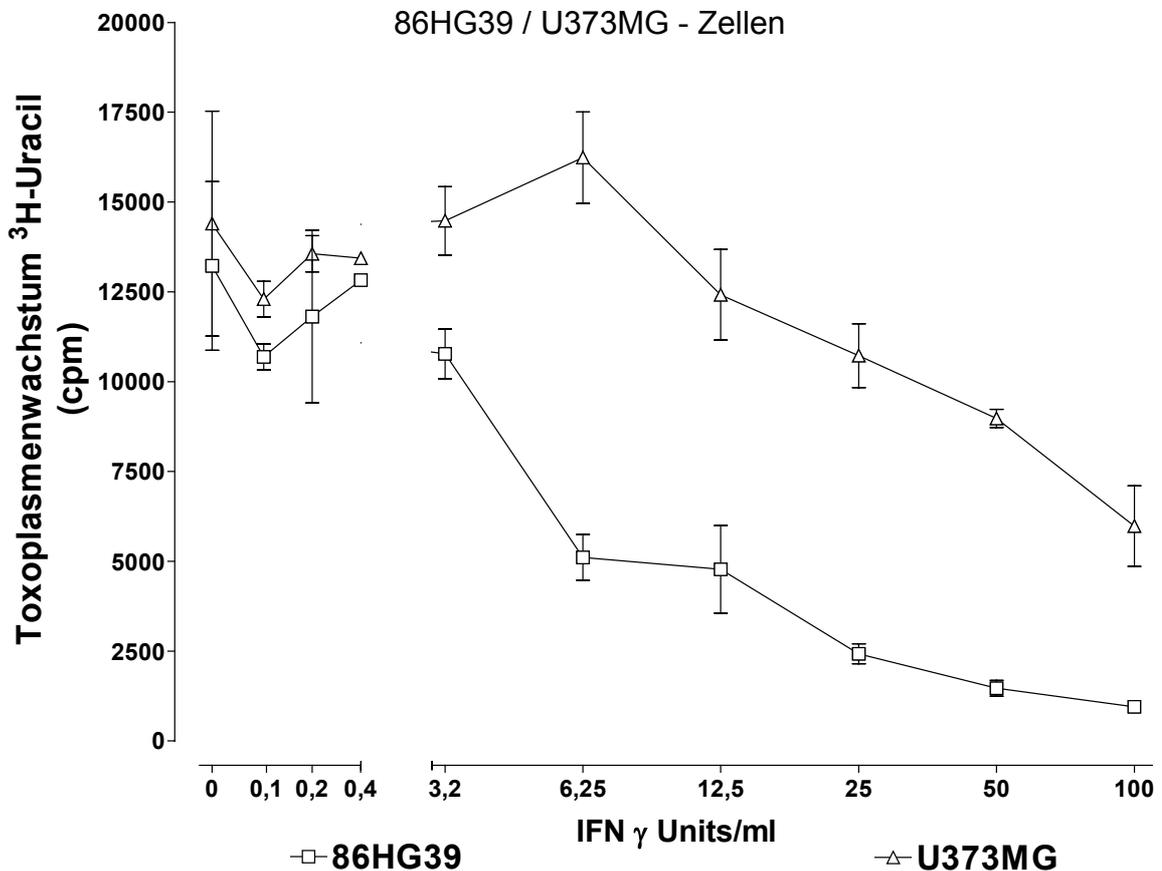


Abb. 5: Dosisabhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch $\text{IFN}\gamma$

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **86HG39** und **U373MG** mit $\text{IFN}\gamma$ (100 – 0 U/ml) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch im β -Counter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Auch hier zeigte sich, dass nach Stimulation durch $\text{IFN}\gamma$ das Toxoplasmenwachstum zwar in beiden Zellreihen gehemmt wird, das Ausmaß der Hemmung jedoch von der Stärke der IDO-Induktion und damit dem Ausmaß der Tryptophandepletion abhängig ist.

Um die Abhängigkeit der Toxoplasmen von Tryptophan zu demonstrieren wurde in einem Parallelansatz zusätzlich zur Infektion der Glioblastomzellen mit Toxoplasmen Tryptophan in einer Konzentration von $50\mu\text{g/ml}$ zum Ansatz gegeben. Wie schon

Däubener et al (1993)(93) zeigen konnten lässt sich die Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch die Supplementation von Tryptophan vollständig antagonisieren. Das Ergebnis ist eine Aufhebung der $\text{IFN}\gamma$ vermittelten Inhibition und resultiert in einem verstärkten Toxoplasmenwachstum (**Abb.6**).

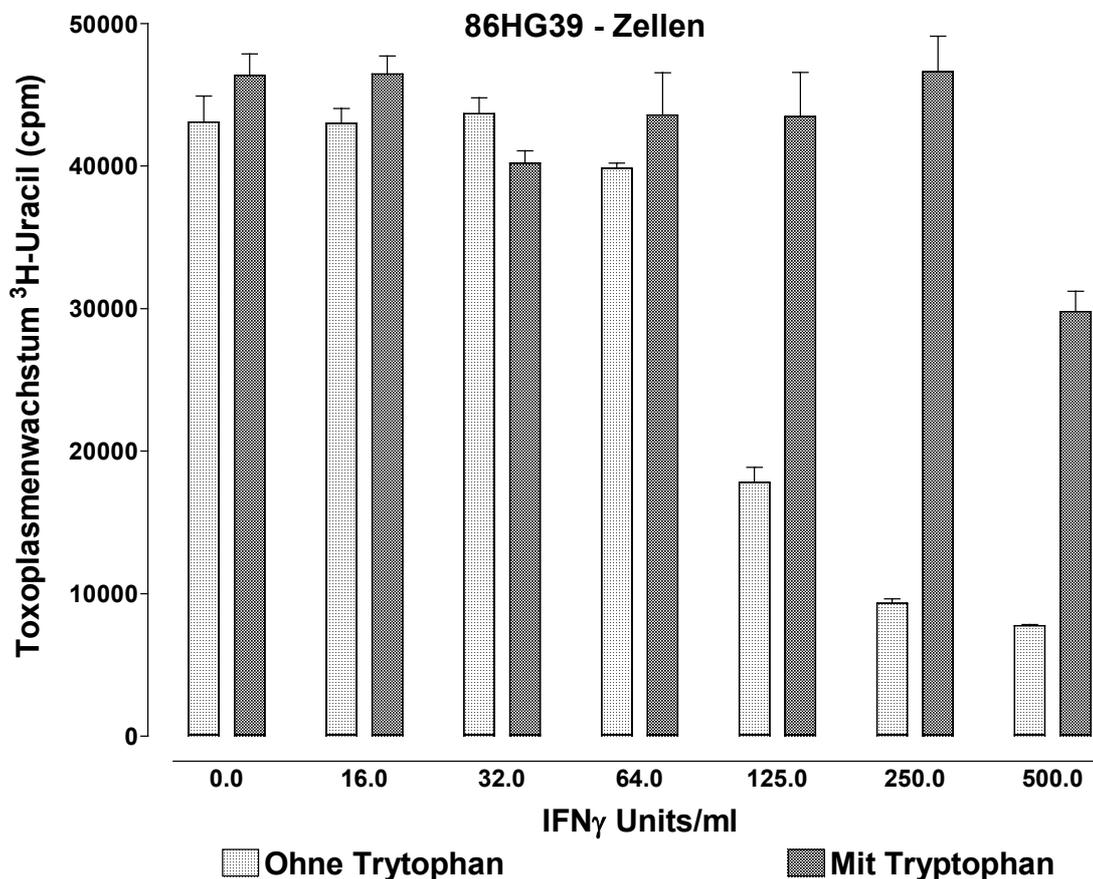


Abb. 6: Antagonisierung des durch $\text{IFN}\gamma$ inhibierten Toxoplasmenwachstums durch Supplementierung von Tryptophan

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **86HG39** mit $\text{IFN}\gamma$ (500 – 0 U/ml) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch im β -Counter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

2. Effekte von Zytokinen auf die Interferon γ vermittelte IDO-Aktivität

2.1 Wirkung von IL-1 auf die IDO Aktivität

Das Ausmaß der IFN γ vermittelten IDO-Induktion ist bei den Glioblastomzellreihen unterschiedlich stark ausgeprägt. Nach den Angaben in der Literatur existieren keine weiteren Zytokine denen eine IDO-induzierende Funktion zugeschrieben werden kann. Im folgendem haben wir untersucht, ob durch zusätzliche Gabe von weiteren Zytokinen die IFN γ vermittelte IDO-Induktion moduliert werden kann. Dabei konnte der Tumornekrosefaktor α (TNF- α) als ein die IDO verstärkendes Zytokin festgemacht werden. Allerdings war TNF α lediglich als Cofaktor von IFN γ in der Lage eine Induktion der IDO zu erreichen. Die verstärkenden Effekte waren besonders bei den Glioblastomzellen der Zellreihen U373MG und 87HG31 zu erkennen. Diese beiden Zellreihen weisen per se eine geringere IDO-Induktion auf. Nun interessierte die Frage ob es weitere Zytokine gibt, die die IDO in positiver oder negativer Weise beeinflussen können.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Interleukin 1 (IL-1) die IFN γ induzierte IDO-Aktivität z.B. in humanen Makrophagen steigern kann (94/95). Unser Augenmerk richtete sich nun darauf, ob IL-1 auch bei Astrozytomzellen in der Lage ist den wichtigsten Abwehrmechanismus nämlich die Induktion der IDO zu verstärken, oder gar selbst eine regulatorische Funktion zu übernehmen. Jeweils 3×10^4 Zellen/Vertiefung einer 96-well Platte der Zellreihen 86HG39 und U373MG wurden für 72 Stunden mit IFN γ (0-500 U/ml) alleine, sowie zusätzlich mit IL-1 (200/400 U/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der N-Formylkynurenin- Produktion nach Hydrolyse zu Kynurenin durch Messung der Absorption bei 492 nm. Die Messung zeigte unabhängig vom Zelltyp keine Beeinflussung der IDO Aktivität. Selbst nach Erhöhung der IL-1 Dosis war weder durch das Zytokin alleine noch in Verbindung mit IFN γ eine Veränderung zu beobachten (**Abb.7/8**).

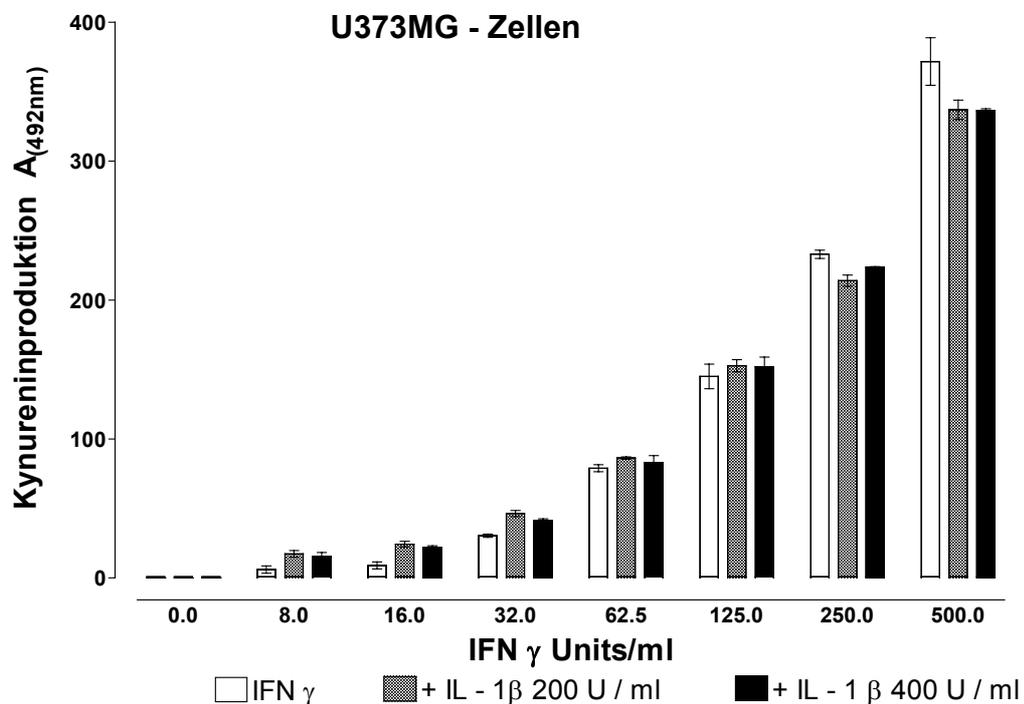
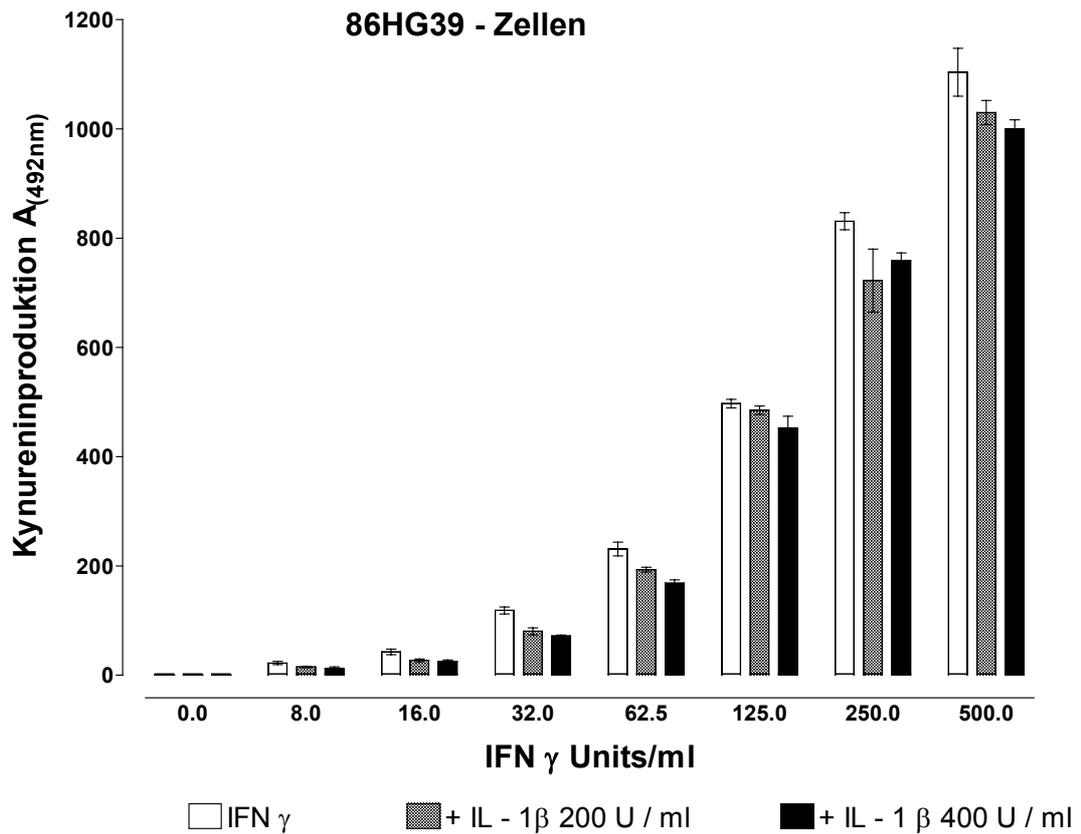


Abb. 7/8: IDO-Induktion durch IFN γ ; fehlende Beeinflussung der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität durch IL-1

3 x 10⁴ Zellen der Linie **86HG39** sowie **U373MG** wurden mit IFN γ (500-0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-1 (200/400 U/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Um die möglichen Auswirkungen des IL-1 auf die Toxoplasmenproliferation zu testen wurden die Zellen im selben Ansatz nach Messung der N-Formylkynureninproduktion mit 1×10^4 Toxoplasmen pro Vertiefung infiziert. Nach Markierung mit ^3H -Uracil wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch gemessen. Auch hier zeigte sich, demonstriert am Beispiel der Zellreihe 86HG39, nun wie erwartet keine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums (**Abb. 9**).

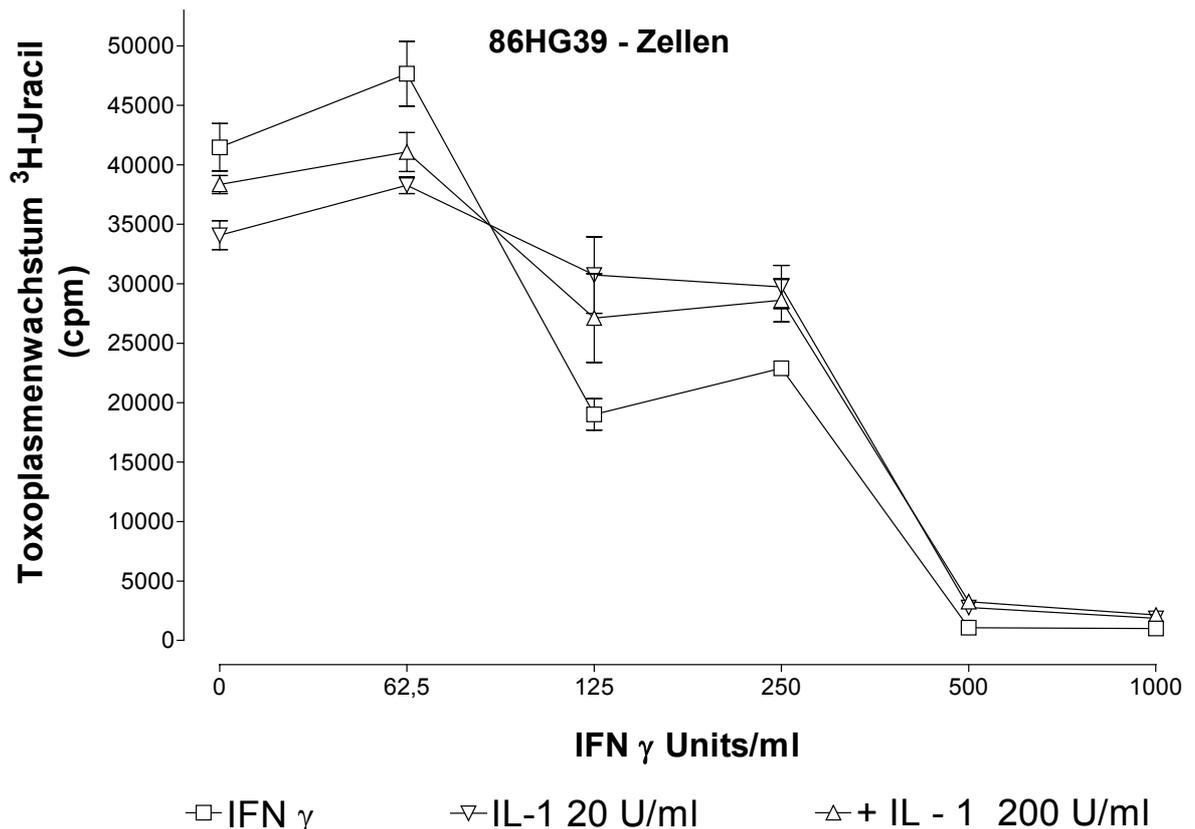


Abb. 9: Dosisabhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch IFN γ ; eine Modulation durch IL-1 ist nicht möglich

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **86HG39** mit IFN γ (1000–0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-1 (20/200U/ml) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch im β -Counter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

IL-1 ist also alleine nicht in der Lage, weder die IDO zu induzieren, noch die Toxoplasmenproliferation zu beeinflussen. Auch ist IL-1 nicht in der Lage die durch IFN γ induzierte IDO sowie die Hemmung des Toxoplasmenwachstums zu beeinflussen. Nun stellte sich die Frage ob Glioblastomzellen überhaupt die Möglichkeit besitzen auf einen Stimulus mit IL-1 entsprechend zu reagieren. Es wäre

denkbar, dass die Astrozytomzellen keinen IL-1 Rezeptor tragen. Damit wären sie nicht in der Lage auf dieses Zytokin reagieren zu können.

Eine bekannte IL-1 Wirkung ist die Induktion der IL-6 Synthese. Um dies zu überprüfen wurden die Glioblastomzellen mit IL-1 stimuliert und die IL-6 Produktion gemessen. Diese IL-6 Produktion wurde mit Hilfe eines Bioassays mit der Indikatorzelle B9 nachgewiesen. Diese Indikatorzelle wird ausschließlich durch IL-6 zur Proliferation stimuliert. Demnach ist die Proliferationsrate der Indikatorzelle ein Maß für die Produktion von IL-6 in U373MG-Zellen. Nach Stimulation der U373MG-Zellen mit IL-1 (25 U/ml) über 24 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und eine Verdünnungsreihe angelegt. Anschließend wurden pro well 2×10^3 B9 Zellen hinzugegeben. Nach 48-72 Stunden konnte die Zellproliferation durch die ^3H -Thymidineinbaumethode szintigraphisch bestimmt werden. **Abb. 10** zeigt die durch IL-6 induzierte B9 Zellproliferation in einer konzentrationsabhängigen Weise.

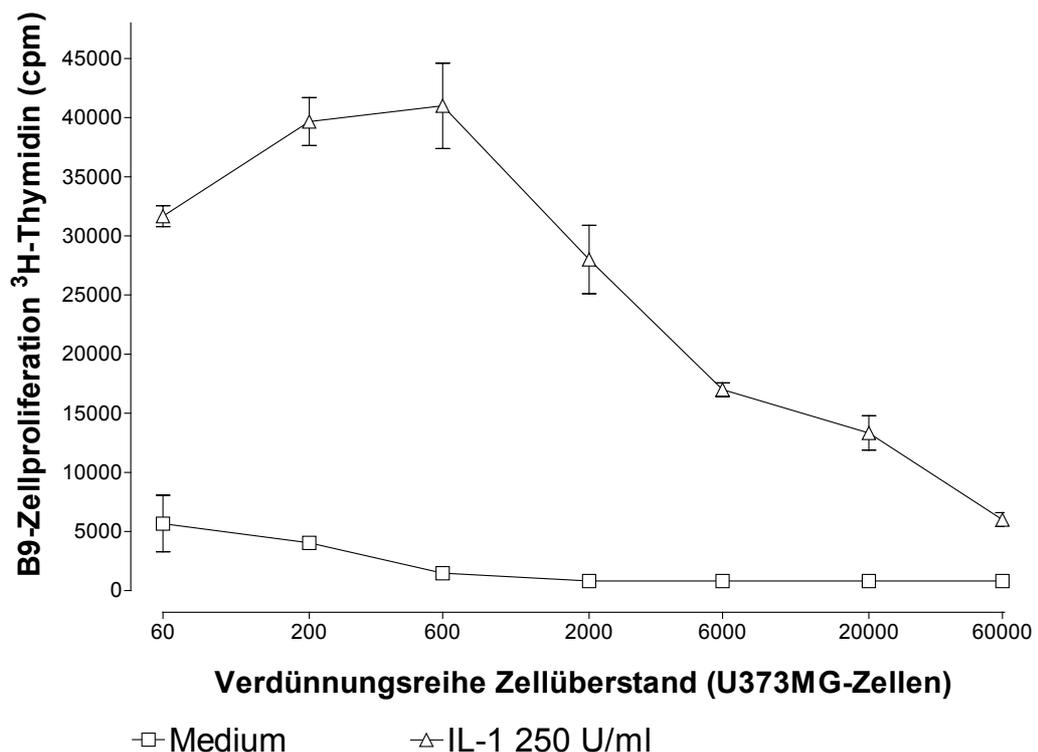


Abb. 10: Dosisabhängiges Wachstum von B9-Zellen als Indikator einer IL-6 Produktion durch IL-1 Stimulation von U373MG-Zellen

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **U373MG** mit IL-1 (25U/ml) für 24 Stunden vorinkubiert. Nach Anlage einer Verdünnungsreihe aus den Zellüberständen wurden 2×10^3 B9 Zellen pro well hinzugegeben. Nach 48-72 Stunden konnte die Zellproliferation durch die ^3H -Thymidin-Einbaumethode szintigraphisch gemessen werden. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Abschließend kann man sagen, daß IL 1 selbst bei der antiparasitären Abwehr der Astrozytomzellen keine Bedeutung besitzt. Die Zellen sind zwar in der Lage auf einen entsprechenden Stimulus zu reagieren, jedoch führt dieser nicht zu einer Beeinflussung der IDO-Aktivität oder des Toxoplasmenwachstums. Ob allerdings IL-1 über eine verstärkte Freisetzung von IL-6 Einfluß auf die IDO und damit auf das Toxoplasmenwachstum besitzt soll im folgenden untersucht werden.

2.2 Effekte der spontanen und induzierten IL-6 Produktion auf die IDO

Wie bereits gezeigt werden konnte, weisen die Astrozytomzellen U373MG und 87HG31 eine spontane Interleukin 6 (IL-6) Produktion auf. Diese ist nicht bei der Astrozytomzelle 86HG39 zu beobachten. Die Frage drängt sich auf, ob dies im Zusammenhang mit der unterschiedlich starken Induzierbarkeit der IDO steht. Denn wie bereits in **Abb.4** gezeigt, ist die IDO in U373MG und 87HG31 Zellen durch IFN- γ schlechter induzierbar als in 86HG39 Zellen. Besitzt also IL-6 auch auf die IDO-Aktivität, wie auch schon bei anderen in der Literatur beschriebenen Mechanismen, einen inhibitorischen Effekt, oder wird hier IL-6 zur Immunmodulation gänzlich anderer Zellen exprimiert.

Zu diesem Zweck wurden je 3×10^4 Zellen der Glioblastomreihen 86HG39 und U373MG pro Vertiefung in einer 96-well Platte ausgesät. Diese wurden für 72 Stunden mit IFN γ (0-1000 U/ml) und zusätzlich IL-6 (25/250 U/ml) inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Optischen Dichte bei 492nm als Maß für die L-N-Formylkynurenin Produktion (**Abb.11/12**). Es konnte bei beiden Zellreihen keine Beeinflussung der Indolamin 2,3-Dioxygenase beobachtet werden.

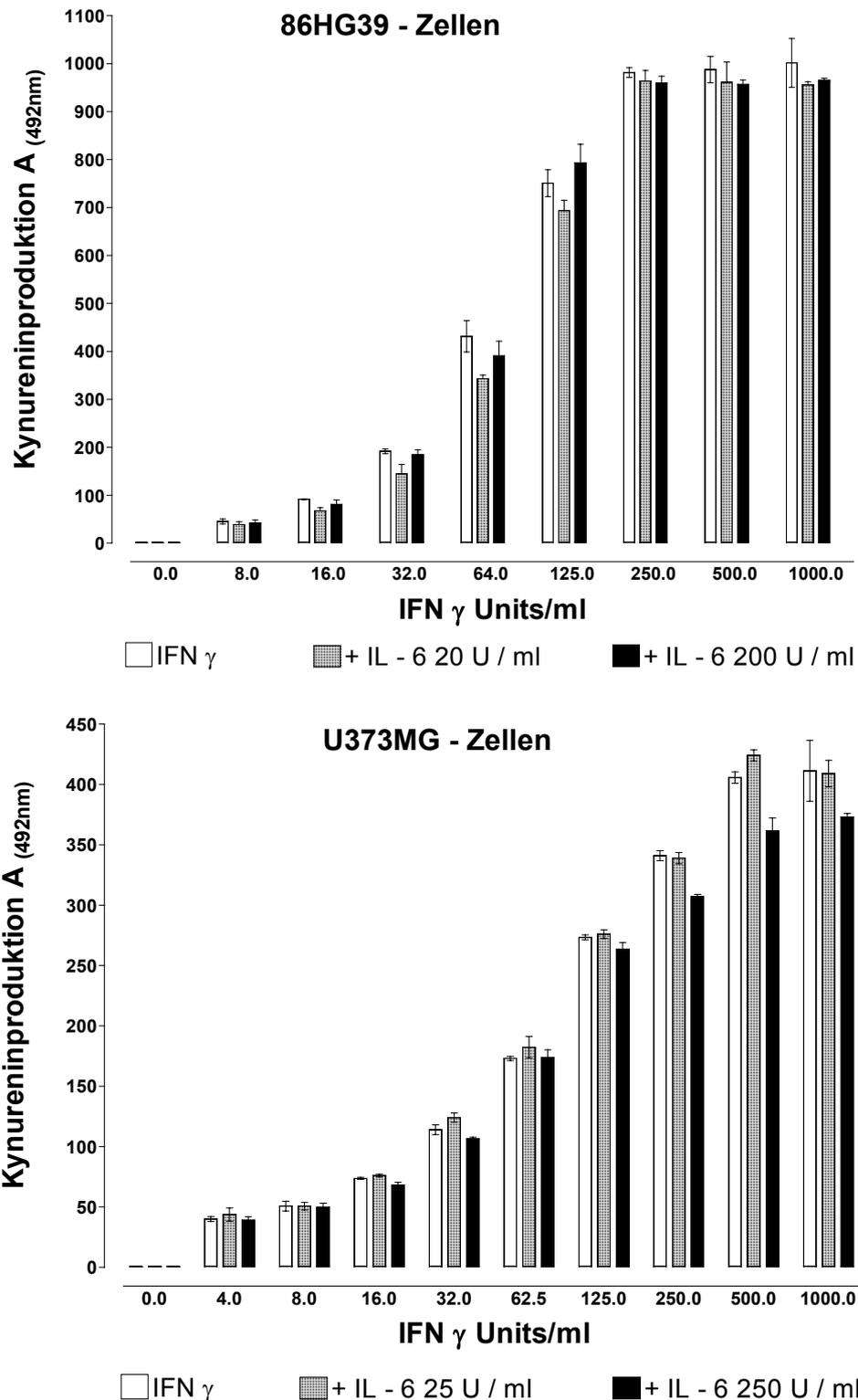


Abb.11/12: IDO - Induktion durch IFN γ ; kein Effekt durch die Zugabe von IL-6
 3×10^4 Zellen der Linie **86HG39** sowie **U373MG** wurden mit IFN γ (0-1000 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-6 (20/200 bzw. 25/250 U/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492 nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Ob IL-6 in der Lage ist über einen anderen Mechanismus das Toxoplasmenwachstum selbst zu beeinflussen sollte in einem weiteren Test geklärt werden. Dazu wurden die mit IFN_γ und IL-6 inkubierten Zellen mit 1×10^4 Toxoplasmen/well infiziert. Das Parasitenwachstum wurde durch radioaktive Markierung der Toxoplasmen mit ^3H -Uracil szintigraphisch gemessen. Es konnte, wie **Abb. 13** zeigt, keine Änderung des Toxoplasmenwachstums durch die Zugabe von IL-6 erreicht werden.

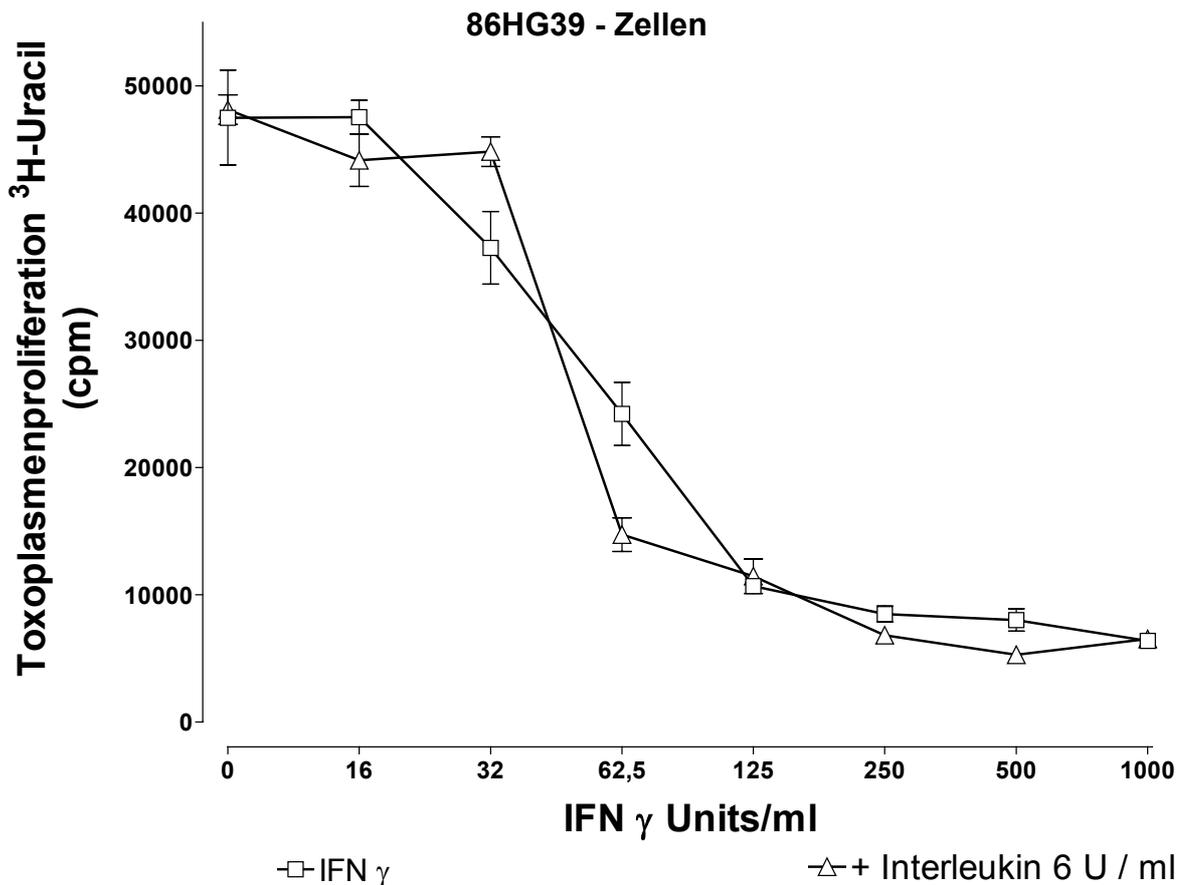


Abb. 13: Dosisabhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch IFN_γ ; eine Modulation durch IL-6 ist nicht möglich

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **86HG39** mit IFN_γ (1000–0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-6 (600 U/ml) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch im β -Counter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Nach Abschluß der Versuchsreihe kann man zusammenfassend sagen, dass IL-6 in keinem der beiden Meßsysteme eine Beeinflussung der IDO und des Toxoplasmenwachstums zu erreichen vermag. Die spontane bzw. durch IL-1 induzierbare IL-6 Produktion der Astrozytomzellen sowie die zusätzliche IL-6 Gabe besitzt also keine IDO-modulatorische Aktivität.

2.3 Wirkung von TGF β auf die IDO-Aktivität

TGF β ist ein multifaktoriell wirkender Faktor, der eine hemmende Wirkung auf die Zellen des Immunsystems besitzt und als Antagonist vieler stimulierender Zytokine dient. Bei humanen Makrophagen kann durch Zugabe von TGF β eine Hemmung der IFN γ vermittelten IDO Induktion erreicht werden. Die Induzierbarkeit der Indolamin 2,3-Dioxygenase wurde ebenfalls bei diesem Zytokin mit Hilfe des indirekten Nachweises der Kynureninproduktion beurteilt. Jeweils 3×10^4 Zellen/Vertiefung einer 96-well Platte der Zellreihen 86HG39 und U373MG wurden für 72 Stunden mit Interferon γ (0-100 U/ml) alleine, sowie zusätzlich mit TGF β (200 U/ml) inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der N-Formylkynurenin-Produktion nach Hydrolyse zu Kynurenin durch Messung der Absorption bei 492 nm.

Die Messung zeigte unabhängig vom Zelltyp keine Beeinflussung der IDO Aktivität (**Abb.14**). Auf eine Darstellung der Toxoplasmenwachstumkurve wurde verzichtet. Das Ergebnis korreliert mit dem der IDO-Induktion; TGF β ist nicht in der Lage das Toxoplasmenwachstum zu beeinflussen.

Interferon γ (0-100 U/ml) und zusätzlich IL-10 (25 U/ml) inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Optischen Dichte bei 492nm als Maß für die Kynurenin Produktion (**Abb.15**). Es konnte erneut bei beiden Zellreihen wider Erwarten keine Beeinflussung der Indolamin 2,3-Dioxygenase beobachtet werden.

Um die Auswirkungen des Zytokins auf das Toxoplasmenwachstum zu untersuchen wurden die mit IFN γ und IL-10 vorinkubierten Zellen mit 1×10^4 Toxoplasmen infiziert. Die Proliferation wurde durch radioaktive Markierung der Toxoplasmen mit ^3H -Uracil szintigraphisch gemessen. Es konnte durch die Zugabe von IL-10 zu den Glioblastomlinien 86HG39 und U373MG keine Inhibition oder Verstärkung des Toxoplasmenwachstums erreicht werden (**Abb.16** hier bei 86HG39).

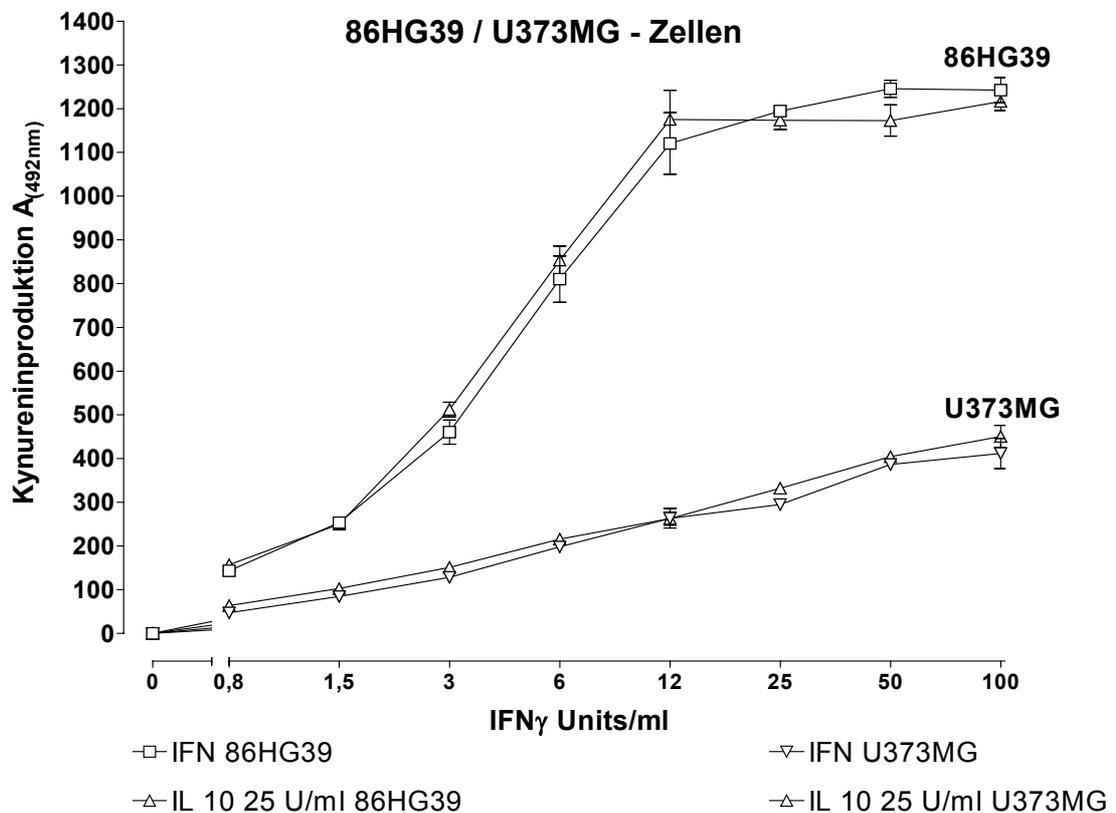


Abb. 15: Induktion der IDO durch IFN γ ; kein Effekt durch die Zugabe von IL-10

3×10^4 Zellen der Linie **86HG39** sowie **U373MG** wurden mit IFN γ (100-0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-10 (25 U/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

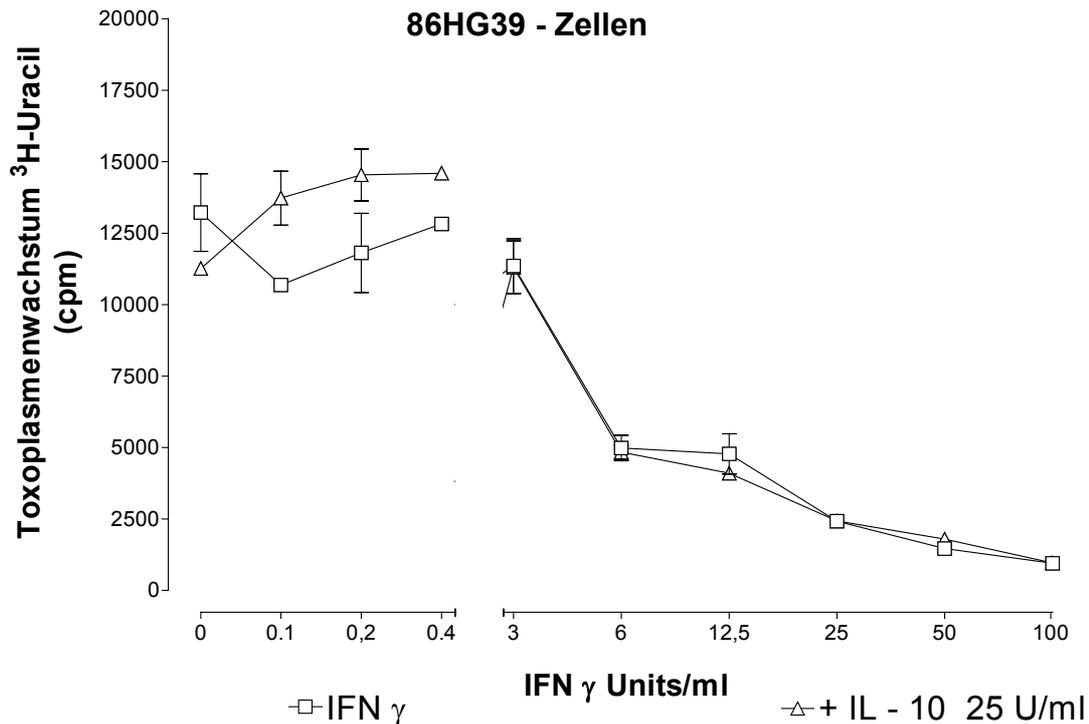


Abb. 16: Dosisabhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch IFN γ ; kein Effekt durch IL-10

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **86HG39** mit IFN γ (100–0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit IL-10 (25 U/ml) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen wurde das Toxoplasmenwachstum szintigraphisch im β -Counter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Zusammenfassend ergibt sich aus den bisher vorgestellten Daten: Die IDO stellt in humanen Astrozyten den wichtigsten antiparasitären Abwehrmechanismus gegen eine Infektion mit Toxoplasmen dar. Die IDO wird nicht durch die getesteten Zytokine (IL-1, IL-6, TGF- β und IL-10) induziert, es zeigt sich folgerichtig auch bei keinem der Zytokine eine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums. Ferner ist die IFN- γ induzierte Indolamin 2,3-Dioxygenase Aktivität in den Glioblastomzellen, trotz der vielfältigen Wirkungsweise und der vielfältigen Angriffspunkte der verschiedenen Zytokine (IL-1, IL-6, IL-10 und TGF β), in vitro nicht durch diese modulierbar. In vivo werden die hier getesteten immunregulatorischen Zytokine jedoch sicher auch einen Einfluss auf die IDO-Induktion haben. Dieser erfolgt, wie die vorgestellten Daten zeigen, nicht auf der Enzymebene sondern wahrscheinlich durch einen Eingriff in die IFN- γ Produktion der Immunzellen. Durch eine Veränderung der IFN- γ Produktion können alle genannten Zytokine in vivo regulierend in die IDO Induktion eingreifen.

Dieser Effekt kann jedoch in dem hier verwendeten in-vitro Experimentalsystem nicht gemessen werden.

3. Beeinflussung der IDO-Aktivität durch das Medikament Dexamethason

3.1 Synergistische Effekte von Dexamethason auf die IDO

Nachdem die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF β keinen Einfluß auf die IDO-Aktivität in Glioblastomzellen haben war es jetzt unser Ziel die wichtigste antiphlogistische Substanz Cortison (Dexamethason) zu testen. Als Versuchsaufbau diente zunächst wieder die Messung der Kynureninproduktion nach IFN γ Stimulation der Glioblastomzellreihen 86HG39, U373MG und 87HG31.

Es wurden je 3×10^4 Glioblastomzellen pro well auf eine 96-well Platte ausgesät. Diese wurden mit IFN γ (1000-0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit Dexamethason (100/50/500 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach Ablauf von 72 Stunden wurde die L-Kynureninproduktion photometrisch mit Ehrlich´s Reagenz bei 492nm gemessen. Bei den Zellen der Reihe 86HG39, die zusätzlich mit Dexamethason in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert wurden, konnte man allenfalls im niedrigen Dosisbereich (16 – 64 U/ml) eine geringfügige Verstärkung der IFN γ induzierten IDO erkennen (**Abb.17**).

Bei den beiden anderen getesteten Zellreihen U373MG und 87HG31, die mit Dexamethason 50 bzw. 500 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert wurden, konnte man eine deutliche Verstärkung der IDO Aktivität erkennen. Diese war am stärksten bei den 87HG31 – Zellen ausgeprägt, wo man eine 100%ige Steigerung der IFN γ induzierten IDO beobachten konnte (**Abb. 18/19**).

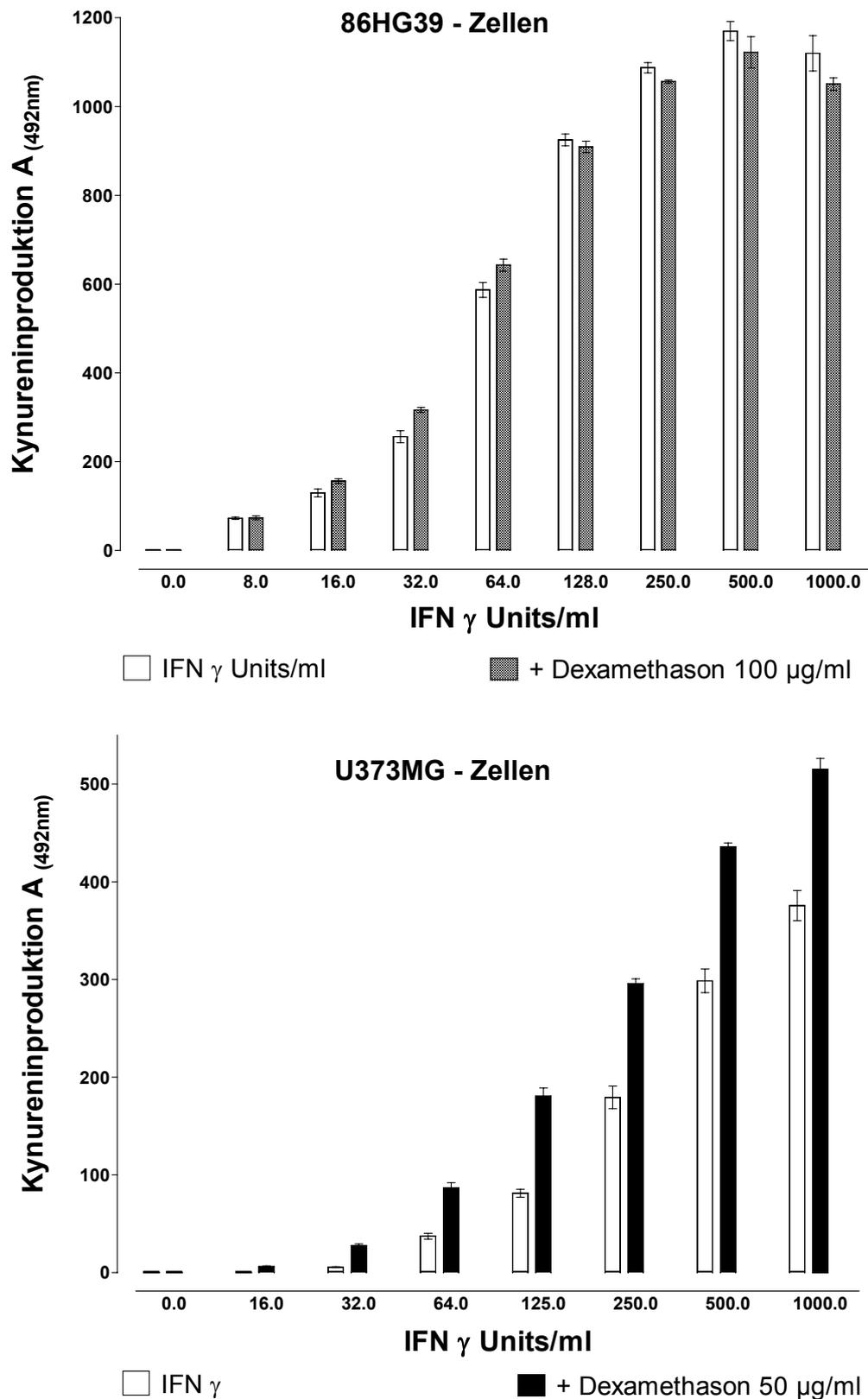


Abb. 17/18: Induktion der IDO durch IFN γ ; Einfluß von Dexamethason

3×10^4 Zellen der Linie **86HG39/U373MG** wurden mit IFN γ (1000-0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit Dexamethason (100 μ g/ml)/(50 μ g/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

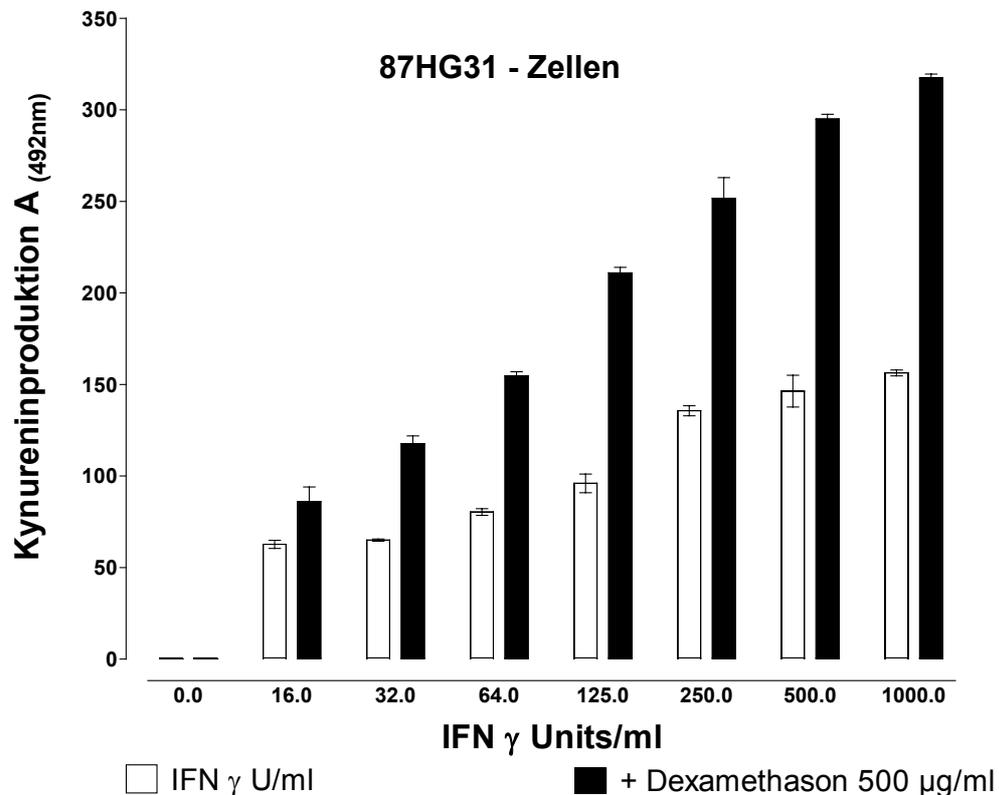


Abb. 19: IDO-Induktion durch IFN γ ; Einfluß von Dexamethason

3×10^4 Zellen der Linie **87HG31** wurden mit IFN γ (1000-0) alleine sowie zusätzlich mit Dexamethason (500 μ g/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Das unterschiedliche Verhalten der Glioblastomzellen war nicht weiter verwunderlich. Zum einen ist die IDO Induktion bei den 86HG39 Zellen schon durch IFN γ maximal stimuliert, so dass zusätzlich gegebene verstärkende Substanzen keine signifikante Steigerung der IDO bewirken können; so z.B. auch bei der Costimulation mit TNF α . Zum anderen zeigten die Zellreihen U373MG sowie 87HG31 in früheren Versuchen bei einer Costimulation mit IFN γ und TNF α ebenfalls eine deutlich verstärkte IDO Induktion. Die Zellreihe 86HG39 eignet sich eher zur Beobachtung inhibitorische Effekte.

3.2 Effekte von Dexamethason auf das Toxoplasmenwachstum

Um den Einfluß von Dexamethason auf das Toxoplasmenwachstum zu untersuchen wurde im Anschluß an den Kynureninnachweis (U373MG, 100/500µg/ml Dexamethason) im selben Testansatz ein Toxoplasmenproliferationstest angeschlossen. Dazu wurden die Zellen mit 1×10^4 Toxoplasmen/well infiziert und der Ansatz nach 24-48 Stunden mit ^3H -Uracil markiert.

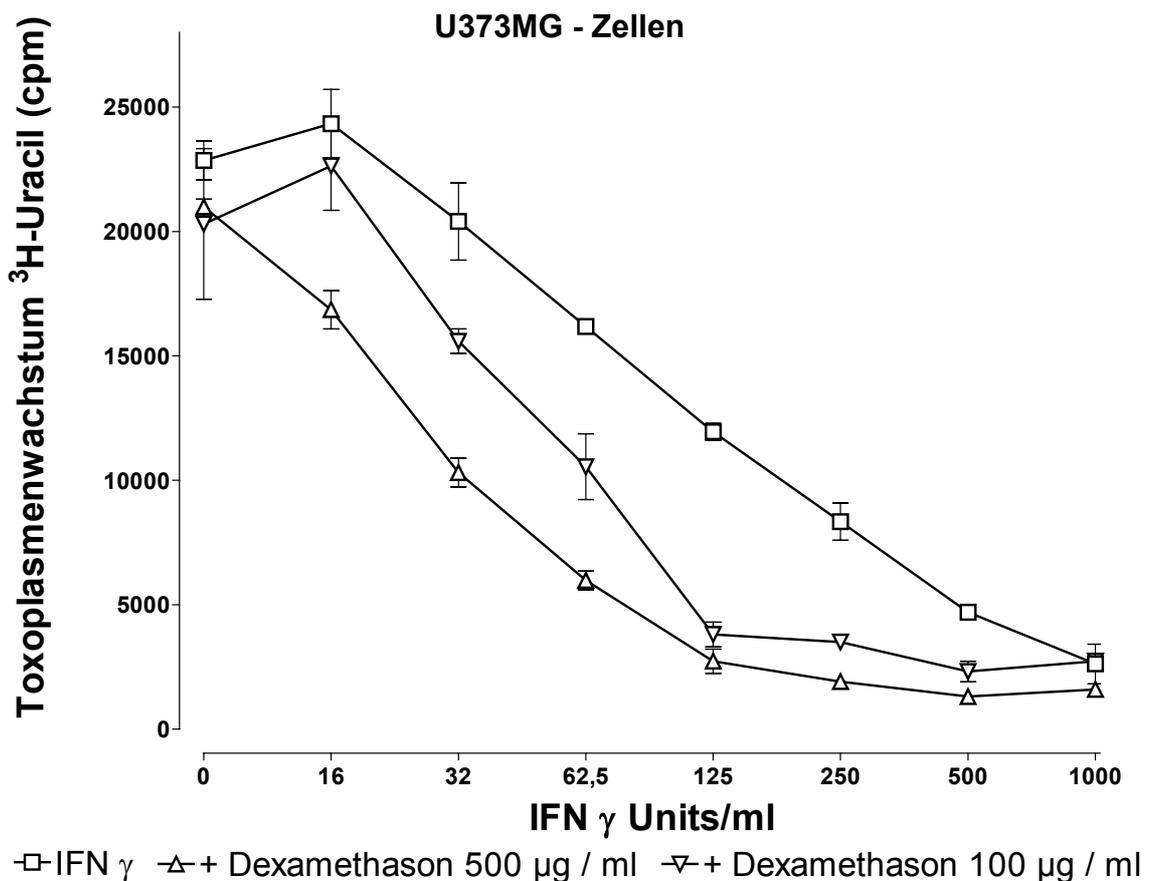


Abb. 20: Dosisabhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums durch IFN γ und Verstärkung dieses Effektes durch Gabe von Dexamethason

Es wurden 3×10^4 Glioblastomzellen der Linie **U373MG** mit IFN γ (1000–0 U/ml) alleine sowie zusätzlich mit Dexamethason (100/500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 72 Stunden vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion mit 1×10^4 Toxoplasmen und 48 Stunden später die Markierung mit ^3H -Uracil. 24 Stunden später wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Nach Auftauen der Zellen erfolgte die szintigraphische Messung des Toxoplasmenwachstums im β -Counter. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Die szintigraphische Auswertung zeigte eine $\text{IFN}\gamma$ und Dexamethason abhängige Inhibition des Toxoplasmenwachstums. Die höchste Verstärkung der Wachstumsinhibition lag dabei bei einer $\text{IFN}\gamma$ Konzentration von 125 U/ml und einer Dexamethasonkonzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$. Dabei muss man sehen, dass bei einer Dexamethasonkonzentration von nur 100 $\mu\text{g/ml}$ eine ähnliche starke Inhibition erreicht wird. Diese Ergebnisse korrelieren mit denen der IDO Induktion. Wie auch schon bei der IDO Induktion mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ wird auch hier eine deutliche Toxoplasmostase bei den Glioblastomzellen U373MG und 87HG31 erst durch eine zusätzliche Gabe von Dexamethason erreicht (**Abb.20**).

3.3 Effekte von Dexamethason auf die intrazelluläre IDO-Aktivität

Der Nachweis der intrazellulären IDO in stimulierten Glioblastomzellen beruht auf folgendem Prinzip: Das im Zytoplasma vorhandene Enzym wird durch Aufschluß der Zellen herausgelöst und setzt das im Reaktionspuffer befindliche L-Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin um. Dieses wird durch die ubiquitär vorkommende Kynurenin-Formaminidase zu L-Kynurenin hydrolysiert. Nach Zugabe von Ehrlich Reagenz kann die Absorption photometrisch bei 492nm gemessen werden. Die Höhe der Absorption ist ein Maß für die gebildete Menge an Kynurenin und damit für die Stärke der IDO Induktion. In den nun folgenden Experimenten sollte die intrazelluläre Aktivität der IDO bestimmt werden. Dazu wurden je $1,5 \times 10^6$ Zellen (87HG31) mit $\text{IFN}\gamma$ (300U/ml) und Dexamethason (250 $\mu\text{g/ml}$) für 72 Stunden in 15ml Kulturflaschen inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert. Durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen aufgeschlossen, und danach das Zelllysate im Puffer aufgenommen. Nach weiteren Bearbeitungsschritten wurde durch Zugabe eines tryptophanhaltigen Reaktionspuffers die IDO Aktivität bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Zelllysate welches von der zusätzlich mit Dexamethason versetzten Probe stammt eine um ca. 65% stärkere IDO Induktion aufweist, als die nur mit $\text{IFN}\gamma$ stimulierte Probe. Im Gegensatz dazu hatte Dexamethason alleine keinen Effekt auf die IDO (**Abb.21**). Dieser Versuch bestätigt also unsere bisherigen Ergebnisse.

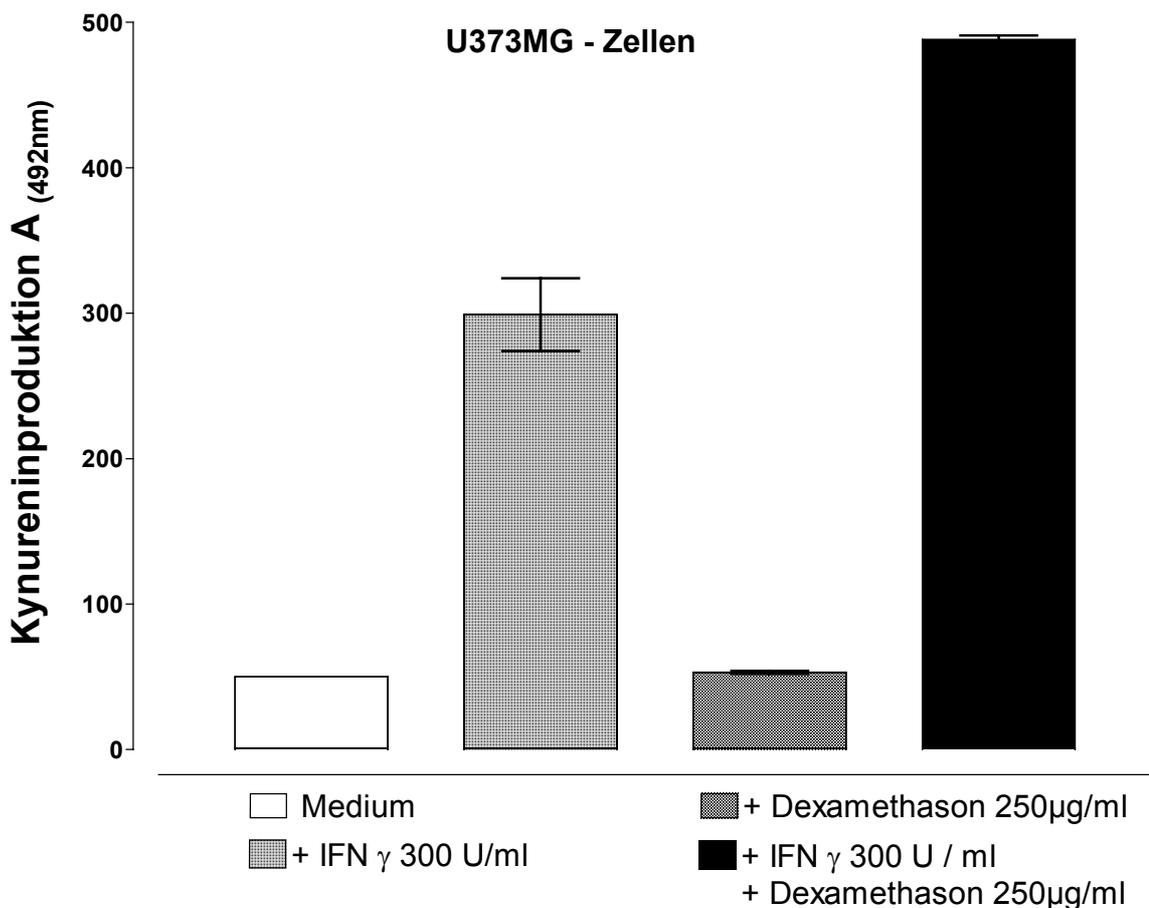


Abb. 21: Durch Dexamethason verstärkte IFN γ - vermittelte intrazelluläre IDO – Aktivität

Je $1,5 \times 10^6$ Zellen der Zelllinie **U373MG** wurden für 72 Stunden mit IFN (300U/ml) sowie Dexamethason (250 μ g/ml) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Abschnitt 3.2 beschrieben aufgeschlossen und die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

3.4 Effekte von Dexamethason auf die TNF α verstärkte, IFN γ vermittelte IDO-Induktion

Nun stellte sich die Frage ob Dexamethason in der Lage ist auf andere Zytokineinflüsse auf die Indolamin 2,3-Dioxygenase einzuwirken. Bisher konnten nur IFN γ als IDO Induktor und TNF α als beeinflussender Faktor der IDO bei Astrozytomzellen festgemacht werden. Um diese Frage zu klären diente wiederum die Messung der Absorption als Maß der N-Formylkynurenin Produktion, und damit der IDO Induktion. Für diesen Versuch wurden Zellen der Linie U373MG und

87HG31 mit $\text{IFN}\gamma$ (500-0 U/ml) sowie zusätzlich mit $\text{TNF}\alpha$ (200 U/ml als optimale Dosis) und Dexamethason (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 72 Stunden inkubiert. Die Auswahl der Zellreihen erklärt sich dadurch, dass die Einzeleffekte von $\text{TNF}\alpha$ sowie Dexamethason bei diesen Glioblastomzellen am deutlichsten sichtbar waren. Dabei zeigte sich, dass die $\text{TNF}\alpha$ und Dexamethason vermittelten Effekte auf die IDO bei beiden Zelltypen annähernd gleich ausfallen. Die Verstärkung des $\text{IFN}\gamma$ Effektes wird je um ca. 2/3 gesteigert. Bei der Kombination dieser beiden synergistisch wirkenden Stoffe konnte sogar eine zusätzliche Steigerung der IDO beobachtet werden. Diese Steigerung war nochmals etwa 4/5 stärker als der Effekt der Einzelsubstanzen (Abb.22/23).

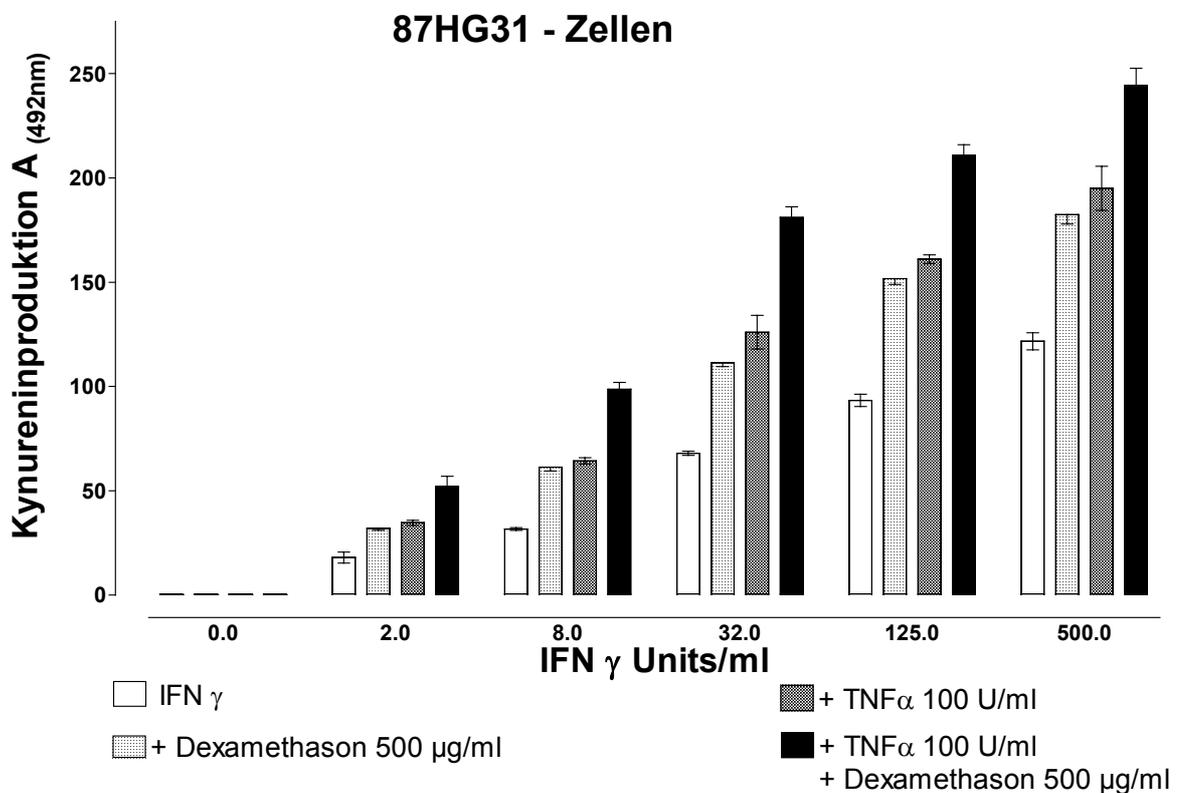


Abb. 22: IDO-Induktion durch $\text{IFN}\gamma$; synergistische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ und Dexamethason

3×10^4 Zellen der Linie **87HG31** wurden mit $\text{IFN}\gamma$ (0-500U/ml) alleine sowie zusätzlich mit $\text{TNF}\alpha$ (100U/ml)/Dexamethason (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

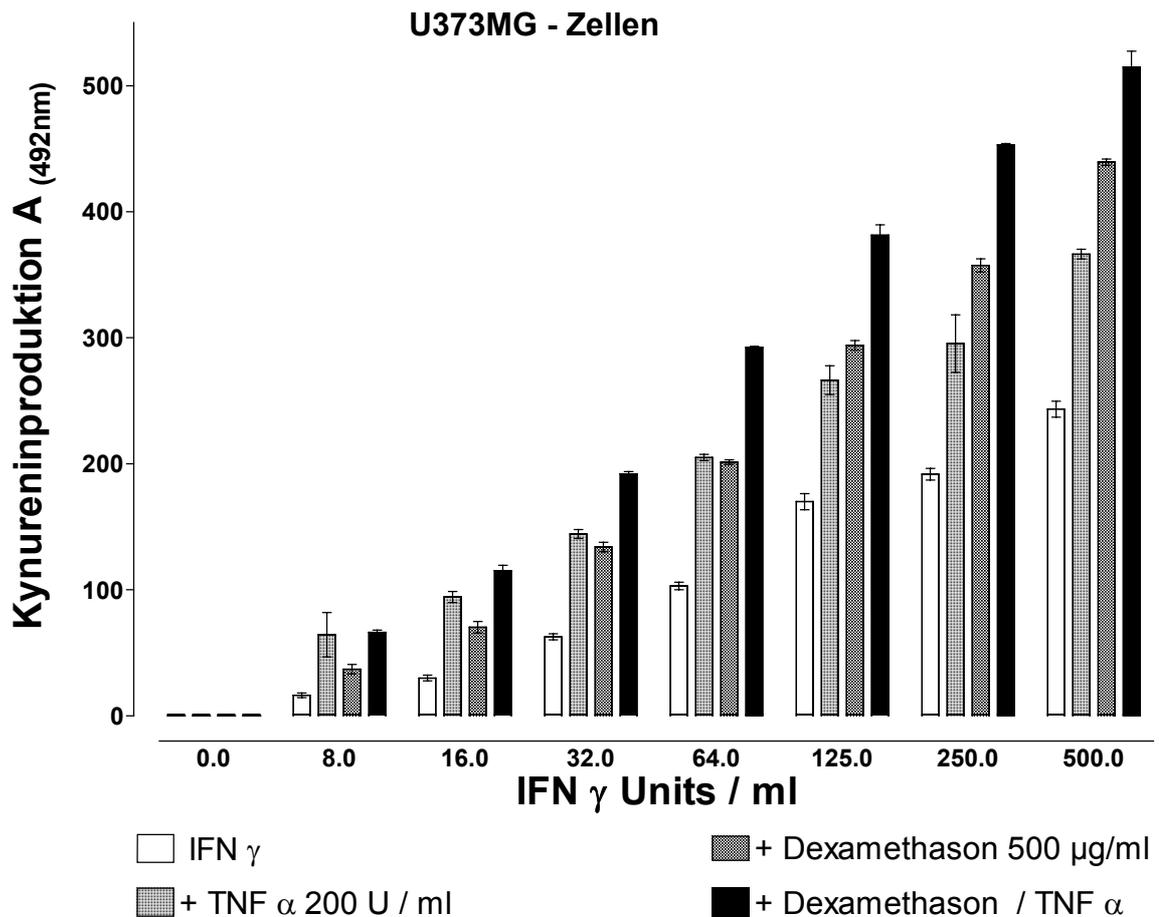


Abb.23: IDO-Induktion durch IFN γ ; synergistische Wirkung von TNF α und Dexamethason

3×10^4 Zellen der Linie U373MG wurden mit IFN γ (0-500U/ml) alleine sowie zusätzlich mit TNF α (200U/ml)/Dexamethason (500 μ g/ml) für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

3.5 TNF α -Antikörper vermittelte Effekte auf die IDO

Wegen der vergleichbaren Wirkung ergab sich nun die Frage, ob die Dexamethason vermittelten Effekte auf eine TNF α -Wirkung, z.B. durch Induktion einer TNF α Produktion, zurückzuführen sind.

Dazu wurde in einem neuen Versuch wiederum eine Verdünnungsreihe mit IFN γ (500-0 U/ml) mit Zellen der Glioblastomzellreihe 87HG31 angelegt. Zusätzlich wurden TNF α (100U/ml) und Dexamethason (500 μ g/ml) alleine und in Kombination zum Ansatz gegeben. Ein Antikörper gegen TNF α wurde hinzugefügt um die TNF α -vermittelte Wirkung aufzuheben. Das Augenmerk wurde nun darauf gerichtet, ob

dieser anti-TNF α Ak in der Lage ist, die Dexamethason-vermittelten Effekte zu antagonisieren.

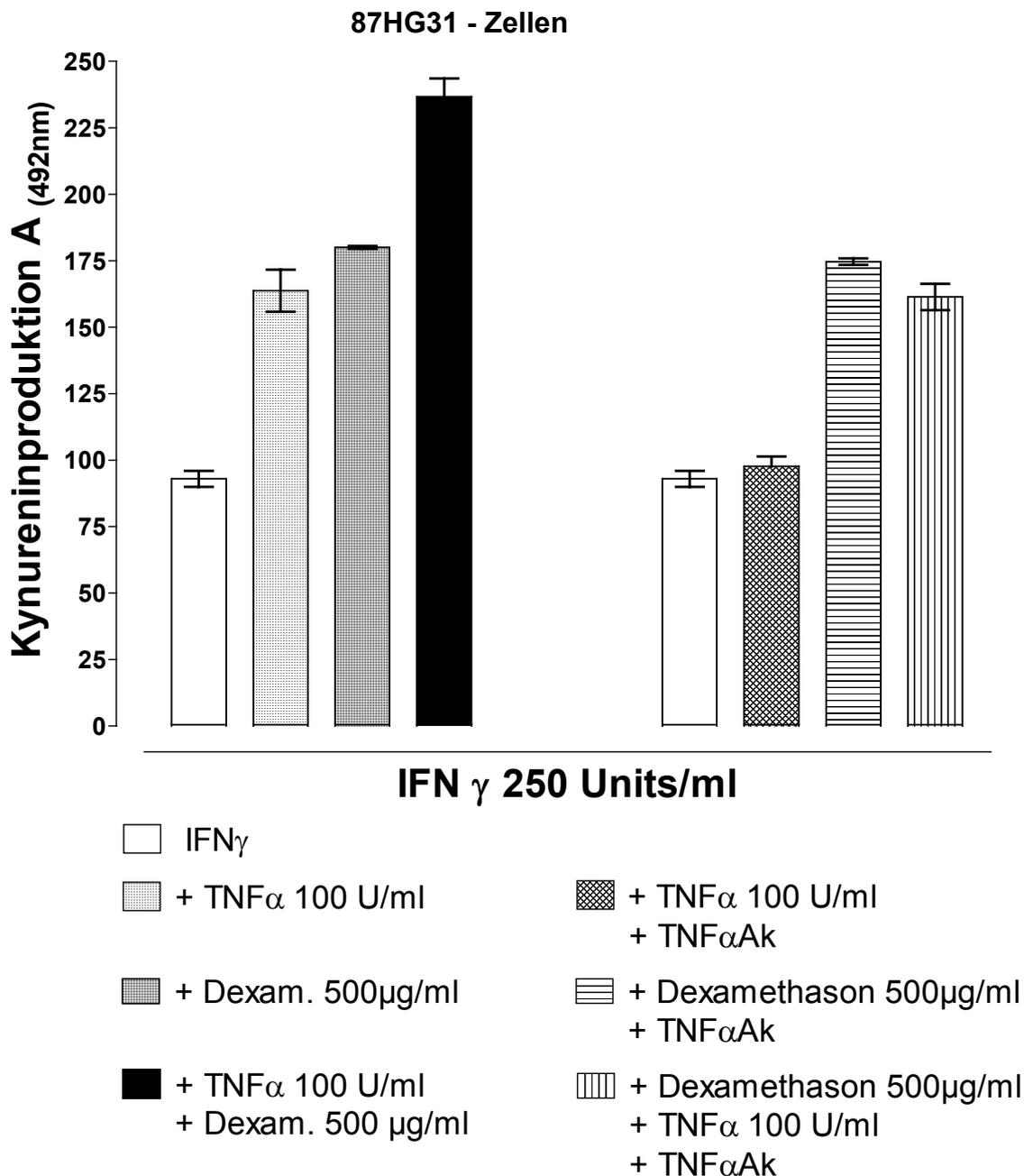


Abb. 24: IDO-Induktion durch IFN γ ; der Dexamethason-Effekt beruht nicht auf TNF α vermittelter Wirkung

3×10^4 Zellen der Linie 87HG31 wurden mit IFN γ (250U/ml) alleine sowie zusätzlich mit TNF α (100U/ml) und Dexamethason (500 μ g/ml) sowie Antikörper gegen TNF α für 72 Stunden inkubiert und anschließend die Kynureninproduktion photometrisch bei 492nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

Das der Antikörper wirksam war, wurde durch die vollständige Antagonisierung der $\text{TNF}\alpha$ -vermittelten Wirkung auf die $\text{IFN}\gamma$ induzierte IDO bewiesen. Der anti- $\text{TNF}\alpha$ Ak war ebenfalls in der Lage den Anteil der $\text{TNF}\alpha$ -Wirkung bei der kombinierten Anwendung beider Substanzen ($\text{TNF}\alpha$ /Dexamethason) zu blockieren. Die dexamethasonvermittelte Wirkung wurde dadurch jedoch weder abgeschwächt noch aufgehoben (**Abb.24**). Die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase über Dexamethason muß also einen anderen Mechanismus besitzen.

3.6 Western Blot: Nachweis von verstärkter IDO-Protein-Expression in Cortison (Dexamethason)-stimulierten U373MG-Zellen

Zum Nachweis einer durch Dexamethason induzierten verstärkten Produktion des IDO-Enzyms wurde das IDO-Protein nach Inkubation der U373MG-Zellen durch Lyse der Zellen gewonnen und mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte dann durch Bindung monoklonaler anti-IDO-Antikörper und anschließender Detektion durch ein Chemilumineszenzsubstrat (ECL, Amersham, Buckinghamshire, E) sowie Visualisierung durch enzymatischen Umsatz des Substrats und Exposition mit Röntgenfilm. Wie **Abb. 25** zeigt wird bei $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten Glioblastomzellen durch die zusätzliche Gabe von Dexamethason (hier 200mg/ml) eine verstärkte Expression des IDO-Proteins erzielt. Als Kontrolle diente der Nachweis der GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) einem Glykolyse-Enzym, welches in jeder kernhaltigen Zelle konstitutiv exprimiert wird.

Western Blot Analyse der IDO-Expression in A8-Zellen

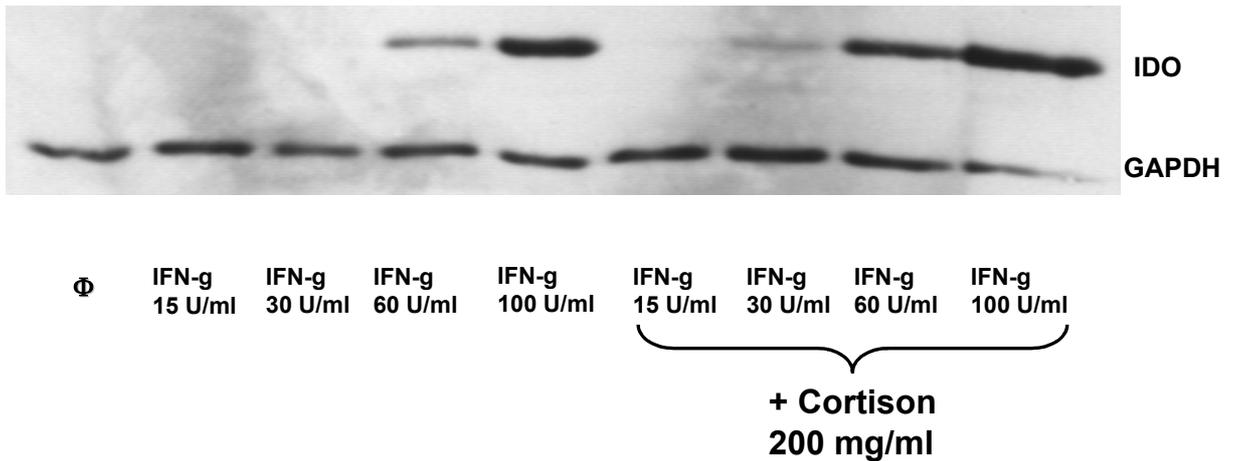


Abb.25: Western-Blot: IDO-Protein Expression in U373MG (A8)-Zellen
Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Kit von Amersham wie in Material und Methoden beschrieben.

D. Diskussion

In den letzten Jahren kam es aufgrund der steigenden Anzahl von Patienten mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems so z.B. im Rahmen einer Tumorthherapie, in der Transplantationsmedizin sowie insbesondere im Rahmen der Immunschwäche AIDS, zu einer zunehmenden Zahl an Erkrankungen, die beim Gesunden keine oder nur milde Symptome auslösen. Zu nennen sind hier neben viralen Erkrankungen (Cytomegalie/Papovaviren) auch solche die durch Protozoen wie *Pneumocystis carinii* (60-80% bei AIDS) oder *Toxoplasma gondii* hervorgerufen werden. Bei Polyomaviren sowie insbesondere bei *Toxoplasma gondii* (Reaktivierungstoxoplasmosen bei ca. 30% aller AIDS Kranken) stehen die Auswirkungen auf das ZNS im Vordergrund. Hierdurch wuchs das Interesse an Immunvorgängen im zentralen Nervensystem insbesondere wegen der besonderen immunologischen Stellung im Konzept der antiparasitären körpereigenen Abwehr. Dieses ist durch das Vorhandensein einer Blut-Hirn-Schranke, das Fehlen eines Lymphsystems (2), sowie durch die geringe Expression von MHC-Molekülen auf Hirnzellen (96) gekennzeichnet.

Um der besonderen Stellung der Toxoplasmen Enzephalitis (HIV – Patienten), sowie den besonderen Bedingungen im ZNS gerecht zu werden, wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit mit Zellen durchgeführt werden, die im ZNS eine wichtige Aufgabe in der Abwehr von parasitären Erkrankungen einnehmen. Neben Makrophagen und T-Zellen als professionelle Abwehrzellen sind Astrozyten wichtige nichtprofessionelle Zellen, die anatomisch bedeutsam, unter anderem direkt an der Blut-Hirn-Schranke liegen und die funktionelle Integrität des ZNS bewahren. Sie zeichnen sich durch die Fähigkeit zur Bildung von Zytokinen (IL-1 (8/20), IL-3, IL-6, TNF α und Prostaglandine), zur Antigenpräsentation mit Hilfe der MHC-Klasse-II-Moleküle (anhand von Astrozytomzellen gezeigt (9)), durch Phagozytose (10) und die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen aus.

Im Rahmen der parasitären Immunabwehr sind 3 Mechanismen bekannt, die im humanen bzw. murinen System abhängig von der Zellart in jeweils unterschiedlicher

Weise wirken. Dazu gehört beim Menschen in erster Linie die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), sowie des weiteren die induzierbare NO-Synthase und der Oxidative Burst.

Erstmalig konnte Pfefferkorn 1984 (46) die Interferon γ induzierte Aktivierung von Fibroblasten und den durch die Tryptophandepletion verbundenen toxoplasmostatischen antiparasitären Effekt der IDO zeigen. Vorausgegangen war 1936 die Entdeckung eines leberständigen Enzyms, der Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO). Dieses war in der Lage die Aminosäure Tryptophan zu Kynurenin abzubauen. 1963 isolierten dann Hayaishi et al. (44/45) die Indolamin 2,3-dioxygenase. Durch die Beobachtung erhöhter Spiegel von Zwischenprodukten des Tryptophanabbaus, wie beispielsweise Kynurenin und N-Formylkynurenin im Urin von Patienten mit Tuberkulose, M. Hodgkin und Leukämie, deren Leber-TDO völlig normale Aktivitätswerte aufwies konnte man die IDO als ein ubiquitäres Enzymsystem postulieren. Dabei beeinflusst die TDO die systemische, während die IDO die lokale Tryptophankonzentration reguliert. Des weiteren zeigte sich dadurch, daß die IDO nicht nur einen großen Stellenwert in der antiparasitären Abwehr, sondern auch einen Platz in der antitumoralen Abwehr des Immunsystems besitzt.

Wie Pfefferkorn 1984 (46) an humanen Fibroblasten, so konnten wir in unseren Experimenten die durch IFN γ hervorgerufene Induktion der Indolamin 2,3-dioxygenase am Beispiel von 3 Glioblastomzellreihen zeigen (97). Hierbei wurde deutlich, dass alle Zellreihen zwar qualitativ gleich, also mit einer Zunahme der IDO-Stoffwechselprodukte auf den gesetzten Stimulus reagieren. Jedoch zeigt sich auch eine quantitativ unterschiedliche IDO-Aktivität, was sich auch in einem unterschiedlichen Grad der induzierten Toxoplasmostase widerspiegelt (Abb.5). Die Hauptwirkung der IDO besteht im Abbau der für Toxoplasmen essentiellen Aminosäure Tryptophan. Das dieser Abbau tatsächlich für ein vermindertes parasitäres Wachstum verantwortlich ist, zeigt sich an der Antagonisierung dieses Effektes durch die Zugabe von Tryptophan (Abb.6) zur Zellkultur und an der damit aufgehobenen Wachstumsinhibition der Parasiten.

Auch im murinen System zeigte sich durch die Gabe von IFN γ ein längeres Überleben bei mit Toxoplasmen infizierten Mäusen (98), sowie eine verminderte Ausprägung einer Enzephalitis (99). Die Hauptmechanismen im murinen System

sind jedoch die induzierbare NO-Synthase und der Oxidative Burst. DieIDO nimmt im murinen System bei der Abwehr von Mikroorganismen einen eher kleinen Stellenwert ein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Induzierbarkeit der Indolamin 2,3-dioxygenase durch verschiedene Zytokine untersucht. Dabei wurden auf der einen Seite Zytokine wie IL-1 und IL-6 verwendet, die eher als Immunstimulatoren wirken. Auf der anderen Seite wurden Zytokine verwendet, deren Aufgabe es ist eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu begrenzen. Zu diesen Zytokinen zählen IL-10 und TGF β . Weiterhin wurde das Verhalten von Dexamethason auf die IDO und das Toxoplasmenwachstum untersucht. Diese, eine der wichtigsten antiinflammatorisch wirkenden Substanzen, wird schon seit langem im klinischen Alltag verwendet. (siehe hierzu auch Fragestellung der Arbeit)

Effekte des Zytokin Interleukin-1 auf die IDO:

Interleukin-1 (IL-1) ist ein Polypeptid, das an Rezeptoren der Ig-Superfamilie bindet (100). Es gehört zu den Zytokinen, die wie TNF α und IFN γ die Expression von ICAM und VCAM auf der Zelloberfläche (Astrozyten/ Monozyten/ Lymphozyten) induzieren. Bei Entzündungen (AIDS/ Enzephalopathie) werden diese Zell-Adhäsions-Moleküle verstärkt produziert und tragen zur Extravasation von Leukozyten durch die Bluthirnschranke bei. Ein Effekt der bedeutsam ist für die Immunabwehr im ZNS. Des weiteren zeigt sich die Bedeutsamkeit von IL-1 an der Tatsache, dass im Konzert mit anderen Zytokinen und Zelladhäsionsmolekülen IL-1 von humanen Retinaepithelzellen nach Infektion mit Toxoplasmen verstärkt sezerniert wird (101). Dies konnte ebenfalls durch Fischer (102) an Maus Astrozyten gezeigt werden. Durch die Behandlung mit einer Kombination von IL-1 und TNF α bei mit Toxoplasma gondii infizierte Mäuse konnte zudem ein signifikant höheres Überleben erreicht werden (103).

Parallel dazu ist IL-1 in der Lage bei humanen Zellen in Kombination mit TNF α eine Toxoplasmostase in Nabelvenenendothelzellen (HUVEC) zu induzieren (62) (Mechanismus unbekannt) bzw. die IFN γ vermittelte IDO Induktion in humanen mononukleären Phagozyten zu verstärken (95/104).

Im Gegensatz dazu zeigten Pelloux et al. bei humanen Astrozytomzellen eine Zunahme des Toxoplasmenwachstums sowie eine Zunahme der Aufnahme von Toxoplasmen in die Zelle durch die Gabe von IL-1 (105). Eine Erklärung dieser Ergebnisse könnte die Induktion der Produktion von Stickoxiden durch IL-1 sein. Wie nämlich Däubener et al zeigen konnten vermag IL-1 auf der anderen Seite auch eine regulatorische Funktion in bezug auf dieIDO einzunehmen. Es vermag in humanen Uroepithelzellen die durch $\text{IFN}\gamma$ induzierteIDO durch die Induktion einerNO-Produktion zu hemmen (40/106). Auf der anderen Seite konnte durch Hu und Zhao gezeigt werden, dass IL-1 in der Lage ist, die iNOS –vermittelten Effekte in humanen Astrozyten (fetale sowie „erwachsene“ Zellen) zu induzieren (107/108). Ob diese Induktion mit einer verstärkten oder gehemmten Toxoplasmostase einhergeht bleibt hier offen. Peterson hingegen konnte eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums durch die Induktion derNO-Synthase zeigen (39). Grundsätzlich spielen bezüglich derNO-Produktion im humanen System vor allem Astrozyten eine Rolle, wogegen dieNO-Produktion von humanen Mikrogliazellen, im Gegensatz zu murinen Zellen, unbedeutend ist. Das dies auch für andere opportunistische Erreger gilt zeigte Lee am Beispiel der Cryptokokkose: es zeigte sich eine Hemmung des Wachstums von Cryptokokkus neoformans nach Zugabe von IL-1 und $\text{IFN}\gamma$ zu einer humanen Astrozytenkultur (109).

Im murinen System jedoch gelingt eine Toxoplasmostaseinduktion z.B. bei Astrozyten sowie Fibroblasten nicht (110/111); hier scheinen eher Mikrogliazellen, nach adäquater Stimulation, verantwortlich für die Restriktion des Toxoplasmenwachstums (110/34/112) zu sein.

Die auch innerhalb einer Spezies erhaltenen diskrepanten Daten zur Rolle von IL-1 bei der Induktion von Abwehrmechanismen deuten ferner auf zellspezifische Unterschiede hin. Dieser Sachverhalt hebt außerdem die Speziesunterschiede hervor und zeigt die mangelnde Übertragbarkeit von Tier- auf Menschmodelle.

Um die Wirkung von IL-1 auf die Induktion derIDO zu untersuchen wurden Astrozytomzellen mit IL-1 (wie in Material und Methoden beschrieben) inkubiert. Anschließend wurde das entstandene Kynurenin im Überstand der stimulierten Zellen gemessen. In unseren Experimenten konnte durch die Zugabe von IL-1 keine Induktion derIDO erreicht werden. Selbst nach Erhöhung der IL-1 Dosis trat keine

Veränderung im Sinne einer gesteigertenIDO-Aktivität ein. Ebenso zeigte sich keine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums.

Nun interessierte, ob IL-1 einen hemmenden oder verstärkenden Effekt auf die IFN γ induzierte IDO ausüben kann. Es zeigte sich, dass IL-1 nicht in der Lage war die IFN γ induzierte Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase zu beeinflussen (Abb.7/8). Bei den anschließenden Toxoplasmenproliferationstests zeigte sich ebenfalls keine verstärkte Hemmung des durch IFN γ induzierten Toxoplasmenwachstums (Abb.9). Dieses Ergebnis ist auf der einen Seite erwartet, da ja auch keine Beeinflussung der IDO-Aktivität erreicht werden konnte. Auf der anderen Seite hätte jedoch eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums durch eine NO-Produktion, wie oben beschrieben, erfolgen können. Experimente mit humanen Astrozyten haben gezeigt, dass die Zellen zur NO-Produktion befähigt sind (107/113). Eine Erklärung für die mangelnde Beeinflussbarkeit der Glioblastomzellen könnte also darin liegen, dass sie die Fähigkeit zur NO-Produktion verloren haben und damit eine Beeinflussung der IDO wie bei den oben erwähnten RT-4 Zellen über eine Induktion der NO-Produktion nicht möglich wird.

Eine weitere Ursache für die Areaktivität der Zellen könnte darin liegen, dass die Zellen sei es durch ihren als Tumorzelle veränderten immunologischen Verhaltensmuster bzw. mangels Ausstattung mit den nötigen Rezeptoren oder Signalketten in der Zelle, gar nicht in der Lage sind auf den gesetzten Stimulus zu reagieren. Lee zeigte, dass humane Astrozyten auf einen Stimulus mit IL-1 hin neben TNF α auch IL-6 produzieren (113). Um die Reaktivität der analysierten Glioblastomzellen (U373MG/ 86HG39) auf das Zytokin IL-1 zu überprüfen wurden sie über 24 Stunden mit IL-1 inkubiert. Voraussetzung war, dass die Zellen wie die Astrozyten/ Fibroblasten in der Lage sind auf diesen Stimulus unter anderem IL-6 zu produzieren (7/113). Die Überstände der Zellen wurden dann in einer Verdünnungsreihe mit der Indikatorzelle B9 inkubiert. Diese Zelle zeichnet sich dadurch aus, dass hier ausschließlich durch die Gabe des Zytokins IL-6 ein Wachstum induziert werden kann. Wie erwartet zeigte sich durch die Überstände eine dosisabhängige Steigerung des B9-Zellwachstums (Abb.10) bei der Zellreihe U373MG sowie, wenn auch schwächer bei der Reihe 86HG39. Die Ursache dieses Reaktionsunterschiedes bleibt zu klären. Hieraus folgt zumindest teilweise, dass eine

Reaktivität der Glioblastomzellen auf einen Stimulus mit IL-1 gegeben ist. Lediglich eine Induzierbarkeit oder Hemmung der IDO ist über dieses Zytokin nicht gegeben. Ob allerdings IL-1 über eine verstärkte Freisetzung von IL-6 Einfluß auf die IDO und damit auf das Toxoplasmenwachstum besitzt sollte im folgenden geklärt werden. Bei den bisher vorliegenden Ergebnissen scheint jedoch zumindest die durch IL-1 induzierte IL-6 Bildung der U373MG-Zellen nicht ausreichend für eine Beeinflussung der IDO oder der Toxoplasmostase.

Effekte des Zytokin IL-6 auf die IDO

IL-6 bindet ähnlich wie $\text{IFN}\gamma$ an einen Tyrosin-Kinase-assoziierten Rezeptor. Die Signaltransduktion erfolgt über den JAK/STAT-Weg, entfaltet seine Wirkung damit direkt am Zellkern und reguliert darüber die Genexpression. IL-6 erscheint zudem in der Lage über einen autokrinen Mechanismus eine Rolle bei der Entwicklung der Glioblastomzellen zu spielen.

Zur Wirkung gibt es sehr widersprüchliche und verwirrende Angaben in der Literatur. Es scheint bei den Effekten eine Co-Funktion von IL-1/IL-6 evtl. auch $\text{TNF}\alpha$ zu sein, die im gegenseitigen Wechselspiel die Wirkungen entfalten. So erscheinen auch viele IL-1-Wirkungen durch eine induzierte IL-6 Produktion ausgelöst (61). Das IL-6 wichtige immunregulatorische Funktionen in der Pathophysiologie von *Toxoplasma gondii* übernimmt zeigt, daß u.a. humane Retinaepithelzellen oder auch murine Astrozyten mit der Produktion von IL-6 auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* reagieren (101/102). Im murinen System war IL-6 in der Lage im Sinne einer Protektion eine $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in Astrozyten zu verstärken (60).

Auf der anderen Seite resultierte die Gabe von IL-6 zu murinen toxoplasmeninfizierten Peritonealmakrophagen in einem verstärkten Toxoplasmenwachstum (63). Weiterhin konnte gezeigt werden, das die Gabe eines Antikörpers gegen IL-6 zu höheren Serumkonzentrationen von $\text{IFN}\gamma$, und damit zu einer verminderten Anzahl von zerebralen Zysten sowie zu einer verminderten Entzündungsreaktion führt (64).

Auf der anderen Seite ist bei IL-6 defizienten Mäusen im Gegensatz zur Kontrollgruppe eine verminderte Expression von $\text{IFN}\gamma$ (114) assoziiert mit einer verminderten Zahl von Abwehrzellen und einer höheren Zahl von *Toxoplasma gondii*

Zysten sowie größeren Nekrosearealen beobachtet worden (115). Die erhöhte Serumkonzentration von $\text{IFN}\gamma$ muß jedoch nicht zwanghaft auf eine durch den Antikörper gegen IL-6 aufgehobenen Inhibition der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion zurückzuführen sein, sondern kann auch Ursache einer durch den fehlenden Abwehrunterstützenden Effekt von IL-6 hervorgerufene verstärkte $\text{IFN}\gamma$ Induktion sein.

Eine Untersuchung zu den Auswirkungen von IL-6 auf humane Astrozytomzellen zeigte keinen Effekt bezüglich des Toxoplasmenwachstums (105). Jedoch konnte durch einen nicht NO-abhängigen Effekt eine Toxoplasmostase in humanen Mikrogliazellen gezeigt werden, der zudem noch $\text{IFN}\gamma$ unabhängig war.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass IL-6 von einigen Glioblastomzellen (87HG31/ U373MG) spontan sowie nach Stimulation mit LPS verstärkt bzw. von Glioblastomzellen der Reihe 86HG39 nur nach Stimulation (nicht spontan) mit LPS/IL-1 produziert wird (116). Wenn IL-6, wie einige Autoren sagen, zu einem verminderten Toxoplasmenwachstum führt stellt sich die Frage wie sich die Gabe von IL-6 zu einer Glioblastomzellkultur in Bezug auf den Haupteffektormechanismus gegen Toxoplasmen im humanen System dieIDO bzw. auf dessen immunologischen Verhaltens bezüglich einer Toxoplasmostase auswirkt. Als Maß für dieIDO-Induktion wurde ein Abbauprodukt des Tryptophanstoffwechsels das N-Kynurenin nach dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten Testsystem (86) gemessen. Hier zeigte sich wie in Abbildung 11 und 12 dargestellt weder eine Induktion derIDO durch IL-6 alleine, wie sie für humane Mikrogliazellen beschrieben wurde, noch eine Beeinflussung der $\text{IFN}\gamma$ induziertenIDO. Selbst nach Konzentrationserhöhung von IL-6 zeigte sich keine Beeinflussbarkeit (Abb. 11/12). Bei der Beobachtung des Toxoplasmenwachstums wurde der ^3H -Uracil-Einbautest angewendet. Der Toxoplasmenproliferationstest eignet sich zur quantitativen Bestimmung der Toxoplasmenvermehrung. Toxoplasmen besitzen im Gegensatz z.B. zum Säugetier das Enzym Uracil-Phosphoribosyltransferase, das Uracil in das in der Nukleotidsynthese verwendete Uridylat überführt. So wird ^3H -Uracil fast ausschließlich von *Toxoplasma gondii* in die DNA/ RNA eingebaut (88), und nicht in die im Testansatz befindlichen Glioblastomzellen. Bei der Auswertung zeigte sich ein von $\text{IFN}\gamma$ abhängiges aber von IL-6 völlig unbeeinflusstes Toxoplasmenwachstum (Abb.13).

Pelloux et. al. konnten ebenfalls am Beispiel von Glioblastomzellen keine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums durch IL-6 feststellen. Jedoch zeigte sich bei diese Zellen auch nach Gabe von IFN γ keine Änderung, sowie auf einen Stimulus mit IL-1 eine Steigerung, des Toxoplasmenwachstums. Man muß hier wohl davon ausgehen, dass die verwendeten Zellen durch ihre tumorigenen Eigenschaften keine Ähnlichkeiten mehr mit Astrozyten besitzen.

Warum IL-6 in unserer Versuchsanordnung keine Wirkung zeigt bleibt letztlich unklar. Möglicherweise entfaltet es seine Wirkung in der Immunabwehr nur über eine Induktion von anderen Zytokinen so z.B. über eine IL-1-Produktion in anderen an der körpereigenen Abwehr beteiligten Zellen. In unserem Testsystem ist jedoch nur die Endstrecke des IFN γ -Effektes gemessen worden. IL-6 ist aber auch in der Lage auf andere Effekte in-vivo zu wirken, wie z.B. auf eine Antikörperproduktion oder durch eine Syntheseinduktion eine erhöhte Regeneration geschädigter Zellen zu bewirken. Eine verstärkte Produktion von IL-6 in toxoplasmeninfizierten humanen Mikrogliazellen zeigt zumindest, das hier IL-6 eine wichtige Rolle spielt (65). Auf der anderen Seite mag die spontane IL-6 Produktion z.B. der Zellreihe U373MG hier einen störenden Einfluß zu besitzen.

Effekte des Zytokin TGF β auf die IDO

TGF β ist biochemisch ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 25kDa. Nur das Dimer ist biologisch aktiv (23). TGF β bindet an hochaffine Rezeptoren (Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren) auf der Zelloberfläche; dabei geschieht die Signaltransduktion über Aktivierung von SMAD Signaltransduktoren, die im Kern ihre Wirkung entfalten (117). Es ist ein im Rahmen von Immun- und Entzündungsvorgängen in geringer Konzentration vorwiegend proinflammatorisch in hohen Konzentrationen vorwiegend inhibitorisch/antiinflammatorisch wirkendes Zytokin (118); dies zeigt sich insbesondere an der starken Proliferationshemmung von B- und T-Lymphozyten (119). (siehe auch Fragestellung)

Die Wirkung von TGF β konnte in Bezug auf die IDO u.a. am Beispiel von humanen Makrophagen (eigene Experimente)(76) sowie bei Fibroblasten (77) gefunden werden; hier zeigte sich eine Hemmung der IFN γ induzierten IDO. Bei letzteren Zellen erfolgt die Wirkung, also die Hemmung der IDO-Expression, sowohl auf

Transkriptions- als auch auf post-Transkriptionsebene. Wie sich die Hemmung der IDO auf das Toxoplasmenwachstum in Glioblastomzellen auswirkt wurde bisher nicht untersucht.

Auf der anderen Seite kann eine Beeinflussung auch über eine „Downregulation“ von $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren vermittelt sein wie sie bei murinen Makrophagen beschrieben wurde (120). Insbesondere wird hier auch von Makrophagen selbst $\text{TGF}\beta$ bereits nach 6-stündiger Exposition mit *Toxoplasma gondii* (bzw. Plasmodien) produziert (120/(bzw.121)); eine Tatsache, die die Wichtigkeit von $\text{TGF}\beta$ bei der Regulation von Abwehrvorgängen unterstreicht. Außerdem vermag $\text{TGF}\beta$ die $\text{IFN}\gamma$ induzierte Expression von MHC Klasse II Gen Transkription in humanen Astrozytomzellen sowie die NOS-Transkription in Makrophagen (80) zu antagonisieren.

In unseren Experimenten wurde die Auswirkung von $\text{TGF}\beta$ auf die Glioblastomzellreihen 86HG39 und U373MG untersucht. Dabei zeigte $\text{TGF}\beta$ alleine zu einer Glioblastom-Zellkultur gegeben keinen Einfluß auf die IDO oder das Toxoplasmenwachstum. Im Gegensatz zu den inhibitorischen Effekten bei der Inkubation mit Makrophagen fand sich in unseren Versuchen ebenfalls keine Beeinflussung der $\text{IFN}\gamma$ induzierten IDO. Ebenso konnte bei den Toxoplasmenversuchen keine Beeinflussung des Wachstums erreicht werden (Abb.14).

Eine Ursache der Areaktivität der Zellen könnte demnach darin begründet sein, dass durch die Transformation zur Tumorzelle die Eigenschaft der $\text{TGF}\beta$ -Produktion und Sensitivität verloren geht. Dies führt zu einer vermehrten Proliferation der Tumorzellen; es fehlt die Wachstumshemmung durch $\text{TGF}\beta$ und es folgt ein Expressions- und/ oder Funktionsverlust der $\text{TGF}\beta$ -Rezeptoren. Zum anderen ist die Anzahl der Rezeptoren auf der Zelloberfläche sehr unterschiedlich (Fibroblasten 80.000, Lymphozyten 250 (119)) sodaß sich hieraus unterschiedlich starke Reaktionen ableiten lassen können. Des weiteren ist auch ein völliger Verlust von $\text{TGF}\beta$ -Rezeptoren aufgrund der malignen Transformation der Zelle denkbar. Hier könnte eine Inkubation mit dem Erreger der Chagas-Krankheit *Trypanosoma cruzi* Klarheit geben. Dieser obligat intrazelluläre Parasit ist nur bei Anwesenheit von $\text{TGF}\beta$ -Rezeptoren in der Lage in die Zelle einzudringen (122).

Neben den beschriebenen Zytokinen wurden im Laufe der Arbeit noch weitere Zytokine wie $\text{IFN}\alpha/\beta$, Prostaglandin sowie Substanz P, IL-4 und IL-10 (siehe exemplarisch im Ergebnisteil) in Bezug auf die IDO-Induktion getestet. Bei keiner der genannten Substanzen konnte eine IDO-Induktion bzw. eine Beeinflussung der $\text{IFN}\gamma$ induzierten IDO erzielt werden.

Wenn die hier verwendeten Glioblastomzellen sich wie die Astrozyten verhalten dann bedeutet dies, dass in vivo von den bekannten Zytokinen keine Regulation der IDO erfolgt. Dies ist auch nicht unbedingt notwendig, da viele der hier getesteten Zytokine die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion beeinflussen können und damit indirekt mit der IDO-Induktion interferieren.

Effekte von Dexamethason auf die IDO

Als Ersatz für das körpereigene Cortisol wurde in unseren Versuchen das synthetische Analogon Dexamethason, welches schon lange als Medikament mit ausschließlich glukokortikoider (entzündungshemmend und immunsuppressiv) Wirkung appliziert wird, eingesetzt. Wie eingangs schon erwähnt spielt Cortisol/Dexamethason eine wichtige Rolle als Regulator des Intermediärstoffwechsels und als Modulator des Immunsystems. Hier wirkt es als Inhibitor der Produktion von Antikörpern entgegen und reduziert die immunologischen Abwehrreaktionen wie die Migration von Entzündungszellen. Da Rezeptoren für Cortison im Zytoplasma praktisch aller Zellen vorkommen, kann man von der Prämisse ausgehen, daß sich Rezeptoren ebenfalls im Zytoplasma von Glioblastomzellen/ Astrozyten befinden und diese eventuell durch Dexamethason einen Einfluß auf Zellenzyme wie die IDO haben. Steroide werden größtenteils proteingebunden transportiert. Der ungebundene Teil dient als Wirkungsanteil. Glukokortikoide gelangen durch passive Diffusion entlang einem Konzentrationsgradienten in das Zytoplasma. Der Glukokortikoidrezeptor befindet sich normalerweise im Zytoplasma und bildet eine Einheit mit verschiedenen Proteinen wie z.B. dem heat-shock-protein (hsp90). Es kommt dann durch die Bindung des Cortisons an diesen spezifischen Rezeptor unter Abspaltung von Proteinen und anderen Faktoren zur Bildung eines Hormon-Rezeptor-Komplexes. Dieser gelangt zum Kern, bindet dort an einen weiteren Rezeptor und bildet ein Homodimer. Dieses Homodimer interagiert mit einem DNA-Element dem Glucocorticoid-response-element (GRE) und bewirkt hierüber eine Beeinflussung von

transkriptionsregulierenden Proteinen und reguliert Cortison-sensitive Gene und damit die mRNA sowie die Synthese von zytoplasmatischen Proteinen (13/123). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die murine TDO (Tryptophan 2,3-dioxygenase) durch Tryptophan sowie auch durch Hydrokortison/ Glukokortikoide induzierbar ist (124). Auf der anderen Seite zeigte sich keine Induktion der IDO (Indolamin 2,3-dioxygenase) durch die Zugabe von Tryptophan oder Hydrokortison/ Glukokortikoide alleine. Letzterer Sachverhalt konnte auch in unseren Experimenten für die IDO bestätigt werden.

Die Beeinflussbarkeit der IDO durch Dexamethason konnten erstmalig Ozaki et al (125) 1987 an humanen peripheren Makrophagen zeigen. Dabei wurden Makrophagen mit $IFN\alpha/\gamma$ und Dexamethason inkubiert. Die durch Interferon γ induzierte IDO wurde hierbei durch die Gabe von Dexamethason annähernd verdoppelt während die $IFN\alpha$ induzierte IDO gehemmt wurde. Die Enzyminduktion zeigte sich entsprechend in einer Tryptophandepletion. Auf der anderen Seite konnte Nishida 1989 (126) an der Glioblastomzelllinie U373MG zeigen, dass Dexamethason nicht nur Einfluss auf die IDO (wie oben gezeigt) hat sondern z.B. hier auch die durch IL-1 induzierte Produktion von z.B. BSF-2/GM-CSF//IL-1 β /IL-6 auf mRNA Ebene dosisabhängig vermindert. Dabei lag die suppressive Dosis von Dexamethason zwischen 10^{-6} und 10^{-8} M. Die Autoren propagieren hier eine Regulation der Zytokinproduktion von IL-1 auf der einen und Dexamethason auf der anderen Seite. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch Chao (127) am Beispiel muriner Mikrogliazellen. Hier wurde die durch Lipopolysaccharide induzierte IL-6 sowie $TNF\alpha$ Bildung durch die Zugabe von Dexamethason inhibiert. Batuman et al. (128) sehen Dexamethason als Immunsuppressor via Induktion von $TGF\beta$ in humanen T-Zellen und Hemmer von Immunsuppression via $TGF\beta$ -Hemmung in humanen Glia-Zellen (U87MG 10^{-6} M Dexamethason).

Des weiteren zeigt sich die Wirkung von Dexamethason durch eine Stimulation der IL-10 Produktion über eine TH2-typische Zytokinantwort. Es wirkt hierüber antiinflammatorisch (129/130) und unterstützt die humorale Immunantwort. Die Folge ist eine Hemmung der TH1 Antwort und eine Hemmung der zellvermittelten Immunreaktion. Gerade diese zellvermittelte Immunantwort bildet jedoch den Hauptmechanismus der Toxoplasmenabwehr. Allerdings zeigten sich in unseren Experimenten keine Beeinflussung der IDO durch die Zugabe von IL-10 (Abb15/16).

Bei unseren Experimenten konnte eine Beeinflussung des antiparasitären Effektormechanismus durch Dexamethason selbst wie auch schon mehrmals bei anderen Zellreihen vorbeschrieben nicht gefunden werden. Jedoch zeigte sich in Kombination mit der Gabe von $\text{IFN}\gamma$ eine zusätzliche Enzyminduktion. Diese war besonders deutlich bei den Glioblastomzellen U373MG/87HG31, bei denen eine Verdopplung der IDO-Induktion, in Form einer verdoppelten Kynureninproduktion, gemessen wurde (Abb.18/19). Dabei ergaben sich Unterschiede in den einzelnen getesteten Glioblastomzellreihen. Die Glioblastomzelle 86HG39 zeigte praktisch keine stärkere Induktion der $\text{IFN}\gamma$ induzierten IDO (Abb.17). Dies resultiert wahrscheinlich in der ohnehin durch $\text{IFN}\gamma$ bestehenden maximalen und nicht mehr steigerbaren IDO-Induktion. Als Zeichen der Tryptophandepletion zeigte sich hier ebenfalls eine nicht durch Dexamethason beeinflussbare dosisabhängige Toxoplasmostase.

Wie würde sich nun die gesteigerte IDO-Aktivität der Glioblastomzellreihen U373MG und 87HG31 in bezug auf die Toxoplasmostase widerspiegeln? Abb. 20 zeigt die durch die Gabe von Dexamethason bedingte zusätzliche Hemmung des Toxoplasmenwachstums. Wie erwartet spiegeln sich auch hier die quantitativen Unterschiede der IDO-Induktion in einer unterschiedlich stark ausgeprägten Toxoplasmostase wieder.

Weiterhin war die Frage zu klären inwieweit die IDO neben der Verstoffwechslung des extrazellulär gelegenen Tryptophans, die intrazelluläre Aminosäurekonzentration beeinflusst, zumal die Zelle nicht in der Lage ist Tryptophan für ihren eigenen Bedarf zu synthetisieren. Für diese Experimente wurden die Zellen, wie in Material und Methoden 3.2 beschrieben, aufgeschlossen und die im Intrazellularraum gelegene IDO herausgelöst. Auch hier zeigte sich eine durch Dexamethason deutlich verstärkte Aktivität der intrazellulären Indolamin 2,3-Dioxygenase (Abb. 21). Ein Toxoplasmenproliferationstest konnte hier methoden-bedingt nicht angeschlossen werden.

Wie oben bereits erwähnt propagierten verschiedene Autoren als Ursache der Dexamethasonwirkung die Induktion bzw. Hemmung bestimmter Zytokine. So z.B. IL-1/ IL-6 oder $\text{TGF}\beta$, alles Zytokine, die in unserem Versuchsaufbau keine Beeinflussung der IDO bzw. des Toxoplasmenwachstums zeigten. Interessant wäre hier zu untersuchen inwieweit die Gabe von Dexamethason einen Einfluß auf das

Zusammenspiel von IL-1/ IL-6 auf Astrozytomzellen/ RT4-Zellen ausübt; z.B. ob Dexamethason in der Lage ist wie bei Fibroblasten (B-Lymphozyten) beschrieben (120) die IL-1 Rezeptor-Expression hochzuregulieren und damit wiederum eine antagonistisch/ regulierende Wirkung zur oben gezeigten Wirkung von Dexamethason auszuüben.

Das einzige bisher entdeckte Zytokin welches die IFN γ induzierte IDO verstärkt ist TNF α . Daraus resultiert die Frage ob Dexamethason über eine Induktion und Produktion von TNF α seine verstärkende Wirkung entfaltet. Die durch die zusätzliche Gabe von TNF α erzielte IDO-Induktion ist ungefähr im gleichen Bereich wie die Induktion durch Dexamethason anzusiedeln. Diese Tatsache macht die oben genannte Vermutung wahrscheinlich. Es zeigte sich jedoch in unseren Experimenten durch die Gabe von Dexamethason zusätzlich zu TNF α und IFN γ unabhängig von der Zellreihe eine nochmalige Stimulation der IDO im Sinne einer Superstimulation (Abb.22/23).

Dieser Effekt könnte jedoch ebenfalls noch durch eine Dexamethason-vermittelte TNF α -Produktion erklärt werden. Durch die Zugabe von Antikörpern gegen TNF α sollte dieser Sachverhalt abschließend geklärt werden. Bei oben postuliertem Mechanismus sollte sich die zusätzliche TNF α sowie die Dexamethasonwirkung aufheben lassen. Es konnte dann im Rahmen dieses Versuches eine Verminderung der Kynureninproduktion erzielt werden. Die Höhe dieser Verminderung entsprach der Höhe des durch TNF α vermittelten Effektes. Die zusätzliche Induktion der IFN γ induzierten IDO durch Dexamethason blieb demnach durch die Zugabe des TNF α mAk völlig unbeeinflusst (Abb.24). So ist zu folgern, dass die Dexamethasonwirkung direkt erfolgt, und zwar durch die Bindung an Nukleotidsequenzen am Kern. Damit wird direkt die Bildung einer IDO-mRNA bewirkt und damit eine verstärkte Produktion des IDO-Proteins erreicht. Um dies zu zeigen wurde direkt die Bildung von IDO-mRNA im Vergleich zu einem Kontrollprotein der GAPDH gemessen. In der Tat zeigte sich eine verstärkte wenngleich auch nur schwach sichtbare Produktion von IDO-mRNA durch die zusätzliche Gabe von Dexamethason zum Versuchsansatz (hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden mittels RT-PCR erhalten, diese ist aber per Definition zur quantitativen Analyse schlecht geeignet, Northern Blot Untersuchungen wurden nicht durchgeführt.

Anschließend wurde die Menge des IDO-Protein selbst in den verschiedenen stimulierten Versuchsansätzen bestimmt. Dabei zeigte sich eine stärkere Bildung des IDO Proteins bei mit Dexamethason stimulierten Glioblastomzellen (Abb.25). Hierbei blieben die Konzentrationen von GAPDH als ein Kontrollenzym, dass in jeder kernhaltigen Zelle konstitutiv exprimiert wird in den verschiedenen Ansätzen jeweils gleich (Abb. 25). Aus letzterem Versuch ist nun zweierlei zu postulieren. Offensichtlich vermag Dexamethason die IFN γ -vermittelte IDO-Induktion zu verstärken. Dies kann auf zweierlei Weise geschehen. Entweder ist Dexamethason in der Lage die Lebenszeit der IDO-mRNA zu verlängern und somit eine höhere Transkriptionsrate zu bewirken, oder es wird direkt durch eine Wirkung am Glucocorticoid-Response-Element Einfluß auf die Transkriptionsrate genommen und somit die Anzahl der IDO-mRNA Transskripte erhöht. In Zusammenschau der Ergebnisse sowie der bekannten Wirkungsweise von Cortison ist von einer Beeinflussung der IDO-Protein Produktion über eine Signaltransduktion direkt am Kern durch Erhöhung der mRNA auszugehen. Eine Wirkung über eine Enzyminduktion im Sinne eines Cofaktors, oder über die Freisetzung anderer zwischengeschalteter Zytokine erscheint hier unwahrscheinlich. Über die verstärkte IDO-Produktion erfolgt dann ein verstärkter Tryptophanabbau, der in einer verstärkten Toxoplasmostase resultiert. Gleichzeitig zeigt sich, dass TNF α in unseren Experimenten nicht in der Lage ist, wie bei humanen Monozyten gezeigt wurde (131), Einfluß auf die Sensitivität des Glukokortikoidrezeptors zu nehmen und hierüber eine Modulation der Cortisonwirkung auszuüben. Bei dem in der Literatur beschriebenen hemmenden Effekt auf die Produktion von Zytokinen (z.B. auf die IL-6-Produktion bei Mikrogliazellen (127)) müsste hier noch geklärt werden ob sich der Dexamethason vermittelte Effekt durch die Zugabe von IL-1 oder IL-6 zumindest zu Teilen antagonisieren lässt um hier weitere Einblicke in die Regulation der IDO zu erhalten.

Da IFN γ sowie auch Dexamethason einen Einfluß auf das Zellwachstum nehmen, stellt sich die Frage ob ein Teil der Wirkungen auf ein vermindertes oder verstärktes Zellwachstum zurückzuführen ist. Diese Hypothese wird dadurch entkräftet, dass bei den Messungen der intrazellulären IDO jeweils gleiche Zellzahlen verwendet wurden. Bei den Messungen der extrazellulären IDO zeigten sich zudem auch nach 3 Tagen Inkubation mikroskopisch keine relevanten Zellzahlunterschiede zwischen den Ansätzen mit IFN γ sowie denen, die zusätzlich Dexamethason enthielten.

Gerade anhand dieser wenigen ausgesuchten Zytokine zeigt sich die Schwierigkeit bei der Fülle von Wirkungen die eine einzelne Substanz besitzt die Erfahrungen mit Zellkulturen auf einen Gesamtorganismus zu übertragen. Insbesondere zeigen sich teilweise doch erhebliche Unterschiede im Aufbau und der Wirkung von Zytokinen im humanen und murinen System, sodass eine Übertragung von Experimenten mit murinen Zellen auf humane Systeme nur eingeschränkt erfolgen kann. Die Versuche zeigen weiterhin, dass die Wirkungen von Dexamethason sehr differenziert zu sehen sind und in unserem System Cortison sogar protektiv, also die Toxoplasmostase verstärkend, wirken kann. Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass Dexamethason auch therapeutisch z.B. zur Drosselung der Immunabwehr bei fulminanten bakteriellen Enzephalitiden eingesetzt wird um eine Schädigung des Gehirns durch körpereigene Stoffe zu verhindern. Hier scheint Dexamethason wohl auch zusätzlich eine direkte antiparasitäre Wirkung zu entfalten.

E. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den immunologischen Vorgängen bei der antiparasitären körpereigenen Immunabwehr. In diesem Rahmen wurde die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als wichtigster antiparasitären Abwehrmechanismus im humanen System auf die Regulation durch ausgesuchte körpereigene Botenstoffe und Entzündungsmediatoren hin untersucht.

Als in vitro Modell dienten, am Beispiel der zerebralen Toxoplasmose, humane Glioblastomzellen.

Diese Arbeit knüpft damit an vorausgegangene Arbeiten aus dieser Arbeitsgruppe an.

Es wurde die Beeinflussbarkeit der IDO durch eine Reihe von Zytokinen untersucht, die im Gefüge der körpereigenen Abwehr auf der einen Seite eher immunsupprimierende und auf der anderen Seite eher immunsupportive Eigenschaften besitzen bzw. hervorrufen. Hierzu wurden die Zytokine Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) sowie die wichtigste körpereigene antiinflammatorisch wirkende Substanz Cortison untersucht.

Keines der getesteten Zytokinen konnte die Indolamin 2,3-dioxygenase in Glioblastomzellen induzieren. Ebenso konnte keine Beeinflussung der durch IFN γ induzierten IDO-Aktivität gemessen werden. Da in Glioblastomzellen die IDO den einzigen antiparasitären Effektormechanismus darstellt, konnte hier folgerichtig auch keine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums erreicht werden.

Auf der anderen Seite zeigte sich eine Beeinflussbarkeit der IDO durch die Zugabe von Cortison zu einer mit Interferon γ (IFN γ) inkubierten Zellkultur. Überraschenderweise erfolgte hier keine Hemmung sondern eine gesteigerte Aktivität des Enzyms und zwar besonders deutlich bei den Zellreihen U373MG und 87HG31, die per se eine eher schwache Induktion der IDO durch IFN γ alleine zeigten. Diese Steigerung ist nicht durch eine Induktion anderer Zytokine, z.B. TNF α , sondern durch die alleinige Wirkung von Dexamethason, eventuell über spezifische

Cortisonrezeptor und eine Signaltransduktion direkt am Kern, erklärt. Durch die Zugabe von Dexamethason zu einer mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ inkubierten Glioblastomzellkultur konnte sogar eine weitere Steigerung im Sinne einer Superinduktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase erreicht werden. Im weiteren wurde dann über einen Western-Blot der Nachweis der quantitativen Mehrexpression des IDO-Proteins unter Dexamethason-stimulation erbracht.

F. Literaturverzeichnis

- (1) **Ossorio P.N.**, Schwartzmann J.D., Boothroyd J.C., 1992. A *T. gondii* rhoptry protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. *Mol Biochem Parasitol* 50: 1-16.
- (2) **Cserr H.F.**, Knopf P.M., 1993. Cervical lymphatics, the blood brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today* 13: 507-510.
- (3) **Hunter C. A.**, Remington J.S., 1994. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases* 170: 1057-67.
- (4) **Suzuki Y.**, Wong S.Y., Grumet F.C., Fessel J., Montoya J.G., et al. 1996. Evidence for genetic regulation of susceptibility to toxoplasmic encephalitis in AIDS patients. *J Infect Dis* 173: 265-268.
- (5) **Bilzer T.**, Stavrou D., Dahme E., Keiditsch E., Bürrig K.F., Anzil A.P., Wechsler W., 1991. Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastoma established in vitro. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 418: 281-293.
- (6) **Rauber/Kopsch**, 1987. *Anatomie des Menschen, Band III Nervensystem und Sinnesorgane*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- (7) **Fontana A.**, Bodmer S., Frei K., 1987. Immunoregulatory factors secreted by astrocytes and glioblastoma cells. *Lymphokines* 14: 91-121.
- (8) **Frei K.**, Bodmer S., Schwerdel C., Fontana A., 1986. Astrocyte derived IL-3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J Immunol* 137: 3521-3527.
- (9) **Däubener W.**, Seghrouchni-Zennati S., Wernet P., Bilzer T., Fischer H.G., Hadding U., 1992. Human glioblastoma cell line 86HG39 activates T-cells in an antigen specific major histocompatibility complex class II-dependant manner. *J Neuroimmunol* 41: 21-28.
- (10) **Watabe K.**, Osborne D., Kim S. U., 1998. Phagocytic activity of human adult astrocytes and oligodendrocytes in culture. *J Neuropathol Exp Neurol* 48(5): 499-506.
- (11) **Murray H.W.**, Rubin, B.Y., Carriero, S.M., Harris, A. M., Jaffee, E.A., 1985. Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanism: Oxygen dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 134: 1982-1988.
- (12) **Suzucki Y.**, Orellana M.A., Schreiber R.D., Remington J.S., 1988. IFN γ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516.
- (13) **Murray H.W.**, Spitalny, G.L., Nathan, C.F., 1985. Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon- γ . *J. Immunol.* 134: 1619-1632.
- (14) **Esparza I.**, Männel D., Ruppel A., Falk W., Krammer P.H., 1987. Interferon γ and lymphotoxin or TNF act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med* 166: 589-594.
- (15) **MacKenzie C.R.**, Wilberg C.B., Däubener W., 1998. Inhibition of group B streptococcal growth by IFN γ -activated human glioblastoma cells. *Journal of Neuroimmunology* 89: 191-197.
- (16) **Däubener W.**, Mackenzie C., Hadding U., 1995. Establishment of T-helper type 1- and T-helper type 2-like human *Toxoplasma* antigen-specific T-cell clones. *Immunology* 86: 79-84.

- (17) **Khan I.A.**, Smith K.A., Kasper L.H., 1988. Induction of antigen-specific paracitidal cytotoxic T cell splenocyte by a major membrane protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. J immunol 141: 3600-3605.
- (18) **Khan I.A.**, Smith K.A., Kasper L.H., 1990. Induction of antigen-specific cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. J Clin Invest 85: 1879-1886.
- (19) **Bonhomme A.**, Bouchot A., Pezzelle N., Gomez J., LeMoal H., Pinon J.M., 1999. Signaling during the invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*. FEMS Microbiology Reviews 23: 551-561.
- (20) **Debard N.**, Buzoni Gatel D., Bout D., 1996. Intranasal immunization with SAG 1 protein of *Toxoplasma gondii* in association with cholera toxin dramatically reduces development of cerebral cysts after oral infection. Infect immune 64: 2158-2166.
- (21) **Fadul C.E.**, Channon J.Y., Kasper L.H., 1995. Survival of immunoglobulin G-opsonized *Toxoplasma gondii* in nonadherent human monocytes. Infect Immun 63: 4290-4294.
- (22) **Schreiber R.D.**, Feldmann H.A., 1980. Identification of the activator system for antibody of *Toxoplasma* as the classical complement pathway. J Infect Dis 141 : 366-369.
- (23) **Fuhrmann S.A.**, Joiner K.A., 1989. *Toxoplasma gondii*: Mechanisms of resistance to complement-mediated killing. J Immunol 142(3): 940-947.
- (24) **Nakao M.**, Konishi E., 1991. Proliferation of *Toxoplasma gondii* in human neutrophils in vitro. Parasitology 103: 23-27.
- (25) **Remington J.S.**, Krahenbuhl J.L., Mendenhall J.W., 1972. A role for activated macrophages in resistance to infection with *Toxoplasma*. Infect immune 6: 829-834.
- (26) **Parker S.J.**, Roberts C.W., Alexander J., 1991. CD8⁺ T-Cells are the major lymphocyte subpopulation involved in the protective immune response to *Toxoplasma gondii* in mice. Clin Exp Immunol 84: 207-212.
- (27) **Gazzinelli R.T.**, Hakim F.T., Hieny S., Shearer G.M., 1991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T-Lymphocytes in IFN γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol 146: 286-292.
- (28) **Gazzinelli R.T.**, Xu Y., Hieny S., Cheever A., and Sher A., 1992. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 149: 175-180.
- (29) **Khan I.A.**, Green W.R., Kasper L.H., Green K.A., Schwartzman J.D., 1999. Immune CD8⁺ T cells prevent reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the immunocompromised host. Infection and Immunity 5869-5876.
- (30) **Luft B.J.**, Remington J.S., 1988. AIDS commentary: toxoplasmic encephalitis. J infect Dis 157: 211-222.
- (31) **Bogdan C.**, Rölinghoff M., Diefenbach A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. Current opinion in Immunology, 12:64-76.
- (32) **Liew F.Y.**, Cox F.E.G., 1991. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. Immunoparasitology Today 3:17-21.
- (33) **Green S.J.**, Nacy C.A., 1993. Antimicrobial and immunopathologic effects of cytokine-induced nitric oxide synthesis. Curr. Opin. Immunol. 6: 384-396.

- (34) **Schneemann M.**, Schoedon G., Hofer S., Blau N., Gurrero L., Schaffner A., 1993. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. *J. Infect Dis* 167: 1358-1363.
- (35) **Murray, H.W.**, Teitelbaum R.F., 1992. L-Arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 165: 513-517.
- (36) **Reiling N.**, Ulmer A.J., Duchrow M., Ernst M., Flad H.D., Hauschlidt S., 1994. Nitric oxide synthase: mRNA expression of different isoforms in human monocyte/macrophages. *Eur J Immunol* 24: 1941-1944.
- (37) **Bertholet S.**, Tzeng E., Felley-Bosco E., Mauël J., 1999. Expression of the inducible NO synthase in human monocytic U937 cells allows high output nitric oxide production. *J of Leucocyte Biology* 65: 50-58.
- (38) **Voudoukis I.**, Riveros-Moreno V., Dugas B., Quaaz F., Becherel P., Moncada S., Mossalayi M. D., 1995. The killing of *Leishmania major* by human macrophages is mediated by nitric oxide induced after ligation of the FcεRII/CD23 surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7804-7808.
- (39) **Peterson P.K.**, Gekker G., Hu S., Chao C.C., 1995. Human astrocytes inhibit intracellular multiplication of *Toxoplasma gondii* by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Infect Dis* 171:516-518.
- (40) **Däubener W.**, Posdziech V., Hadding U., MacKenzie C.R., 1999. Inducible anti-parasitic effector mechanism in human uroepithelial cells: Tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol* 187:143-147.
- (41) **Nathan C.F.**, Murray, H.W., Wiebe, M.E., Rubin, B.Y., 1983. Identification of interferon γ as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.
- (42) **Sibley, L.D.**, Lawson, R., Weidner, E., 1986. Superoxiddismutase and catalase in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19: 83-87.
- (43) **Murray, H.W.**, Byrne, G.I., Rothermel, C.D., Cartelli, D.M., 1983. Lymphokine enhances oxygen independent activity against intracellular pathogens. *J. Exp. Med.* 158:234 – 239.
- (44) **Higuchi K.**, Kuno S., Hayaishi O., 1963. Enzymatic formation of D-kynurenin. *Federation Proc.* 22, 243 (abstr.)
- (45) **Shimizu T.**, Nomiya S., Hirata F., Hayaishi O., 1987. IDO – purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 253: 4700-4706.
- (46) **Pfefferkorn E.R.**, Guyre P.M., 1984. Interferon γ blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 908-912.
- (47) **Shimizu T.**, Nomiya S., Hirata F., Hayaishi O., 1978. Indolamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem* 253: 4700-4706.
- (48) **Mehler A.H.**, Knox W.E., 1950. Conversion of tryptophan to kynurenine in liver: II The enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. *J Biol Chem* 187: 431-433.
- (49) **Murray H.W.**, Szuro-Sudol A., Wellner D., et al., 1989. Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of IFN γ stimulated human macrophages. *Infect Immun* 57: 845-849.
- (50) **Weihrauch T.R.**, (Hrsg) (1998/99). *Internistische Therapie*. Urban & Schwarzenberg, 12. Auflage.

- (51) **Däubener W.**, Remscheid C., Nockemann S., Pilz K., Seghrouchni S., MacKenzie C., Hadding, U., 1996. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon γ and tumor necrosis factor α . *Eur.J.Immunol.*26:487-492.
- (52) **Pfefferkorn E.R.**;, Eckel M., Rebhun S., 1986. Interferon γ suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* through starvation for tryptophan. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 215-224.
- (53) **Byrne G.I.**, Lehmann L.K., Landry G.J., 1986. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for interferon γ mediated inhibition of intracellular *Clamydia psitacci* replication in T24 cells. *Infect Immun* 53:347-351.
- (54) **Däubener W.**, Mackenzie C., 1999. IFN γ activated Indolamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications.* Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- (55) **Christen S.**, Peterhans E., Stocker S., 1990. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: Possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci* 87: 2506-2510.
- (56) **Clumeck N.**, 1991. Some aspects of the epidemiology of toxoplasmosis and pneumocystis in AIDS in Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 177-178.
- (57) **Carlin J.M.**, Weller J.B., 1995. Potentiation of interferon mediated inhibition of clamydia infection by interleukin-1 in human macrophages cultures. *Infect Immun* 63, 1870-1875.
- (58) **Löffler G.**, Petrides P., *Physiologische Chemie*, 4. Auflage. Springer Verlag. ISBN3-540-18163-6.
- (59) **Seckinger P.**, Dayer J.M., 1987. Interleukin-1 inhibitors. *Ann. Pasteur Inst.*, 138:486.
- (60) **Halonen S.K.**, Chiu F.C., Weiss L.M., 1998. Effect of cytokines on growth of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infection and Immunity* Vol. 66, p 4989-4993.
- (61) **Harrisons Innere Medizin**, 14. Auflage. McGraw-Hill , ISBN 3-89028-852-9.
- (62) **Dimier H.**, Bout D.T., 1993. Co-operation of IL-1 β and TNF α in the activation of human umbilical vein endothelial cells to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *Immunology* 79: 336-338.
- (63) **Beaman M.H.**, Hunter C.A., Remington J.S., 1994. Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. *J of Immunol* 153: 4583-4587.
- (64) **Suzuki Y.**, Yang Q., Conley F.K., Abrams J.S., Remington J.S., 1994. Antibody against IL-6 reduces inflammation and numbers of cysts in brains of mice with *Toxoplasmic* encephalitis. *Infection and Immunity* Vol.6, No.7: 2773-2778.
- (65) **Chao C.C.**, Gekker G., Hu S., Peterson G.K., 1994. Human microglia cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol* 152: 1246-1252.
- (66) **De Vries J.E.**, 1995. Immunosuppressiv and anti-inflammatory properties of IL-10. *Ann Med* 27: 537-541.
- (67) **Schlüter M.D.**, Buck Ch., Weiner D., et al., 1997. IL-10 downregulates the intracerebral immune response in chronic *Toxoplasma* encephalitis. *J of Neuroimmunol* 76: 167-176.
- (68) **Moore K.W.**, O'Garra A., de Waal R., Vieira P., Mosmann T.R., 1993. IL10. *Annu Rev Immunol* 11 : 165-190.

- (69) **Gazinelli R.T.**, Oswald I.P., James S.L., Sher A., 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN γ activated macrophages. *J Immunol* 148: 1792-1796.
- (70) **Rousset F.**, Garcia E., DeFrance T., et al., 1992. IL-10 as a potent growth and differentiation factor for activated human B-lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1890-1898.
- (71) **Marchant A.**, Bruyins C., van Denabeele P., et al., 1994. Interleukin 10 controls IFN γ and TNF production during experimental endotoxaemia. *Eur J Immunol* 24: 1167-1171.
- (72) **Standiford T.J.**, Strieter R.M., Lukacs N.W., Kunkel S.L., 1995. Neutralization of IL-10 increases lethality of endotoxaemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and TNF. *J Immunol* 155: 2222-2229.
- (73) **Opal S.M.**, Cross A.S., 1997. The microbial consequences of antimediator therapy for sepsis. *Sepsis* 1: 55-60.
- (74) **Opal S.M.**, Wherry J.C., Grint P., 1998. Interleukin-10: Potential benefits and possible risks in Clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 27: 1497-1507.
- (75) **Bellone G.**, 1995. Regulation of NK cell functions by TGF β . *J. Immunol.* 155, 1066-1073.
- (76) **MacKenzie C.R.**, Guadarrama R., Kniep E., Roch S., Däubener W., 1999. Tryptophan, Serotonin, and Melatonin: Basic Aspects and Applications. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.
- (77) **Yuan W.**, Collado-Hidalgo A., Yufit T., Taylor M., Varga J., 1998. Modulation of cellular tryptophan metabolism in human fibroblast by TGF β : selective inhibition of indolamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA synthetase gene expression. *J of Cellular Physiology* 177: 174-186.
- (78) **Devajyothi C.**, Kalvakolanu I., Babcock G.T., Vasavada H.A., Howe P.H., Ransohoff R.M., 1993. Inhibition of IFN γ -induced major histocompatibility complex class II gene transcription by IFN γ and type β_1 TGF in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 268: 18794-18800.
- (79) **Lee Y.**, Han Y., Lu H., Nguyen V., Qin H., Howe P.H., Hocesvar B.A., Boss R.M., Ransohoff R.M., Beneviste E.N., 1997. TGF β suppresses IFN γ induction of class II MHC gene expression by inhibiting class II transactivator messenger RNA expression. *J Immunol* 158: 2065-2075.
- (80) **Ding A.**, Nathan C.F., Graycar J., Derynck R., Stuehr D.J., Simal S., 1990. Macrophage deactivating factor and TGF β_1 and β_3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN γ . *J Immunol* 145: 940-944.
- (81) **Winkler M.K.**, Benveniste E.N., 1998. TGF β inhibition of cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human astrocytes. *Glia* 22: 171-179.
- (82) **Schlüter D.**, Bertsch D., Frei K., Hübers S.B., Wiestler O.D., Hof H., Fontana A., Deckert-Schlüter M., 1998. IFN γ antagonizes TGF β_2 -mediated immunosuppression in murine *Toxoplasma* encephalitis. *J of Neuroimmunol* 81: 38-48.
- (83) **Earle W.R.**, Schilling E.L., Stark T.H., Straus N.P., Brown M.F., Shelton E., 1943. Production of malignancy in vitro. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J Nat Cancer Inst* 4: 165-212.
- (84) **Pilz K.**, 1992. Wachstum von *Toxoplasma gondii* in humanen Glioblastomzellen: Beeinflussung durch IFN γ . Diplomarbeit an der Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf.
- (85) **Feng G.S.**, Taylor M.W., 1989. Interferon γ resistant mutants are defective in the induction of indolamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7144-7148.

- (86) **Däubener W.**, Wanagat N., Pilz K., Seghrouchni-Zennati S., Fischer H.G., Hadding U., 1994. A new, simple bioassay for human IFN γ . *J Immunol Meth* 168:39-57.
- (87) **Takikawa O.**, Yoshida R., Kido R., Hayaishi O., 1986. Tryptophan degradation in mice initiated by indolamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem* 261(8): 3548-3653.
- (88) **Pfefferkorn E.R.**, Pfefferkorn L.C., 1977. Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J Protozool* 24(3): 449-453.
- (89) **Green L.C.**, Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and (¹⁵N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126:131-138.
- (90) **Ding A.H.**, Nathan C.F., Stuehr D.J., 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 141(7): 2407-2412.
- (91) **Laemmli U.K.**, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, Aug 227:680-5.
- (92) **Kyhse-Andersen**, 1984. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984 Dec 10:3-4 203-9.
- (93) **Däubener W.**, Pilz K., Seghrouchni-Zennati S., Bilzer T., Fischer H.G., Hadding U., 1993. Induction of toxoplasmosis in human glioblastoma by interferon γ . *J Immunol Meth* 168: 39-57.
- (94) **Carlin J.M.**, Borden E.C., Sondel P.M., Byrne G.I., 1989. Interferon-induced indolamine 2,3 dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leucocyte Biol* 45: 29-34.
- (95) **Hissong B.D.**, Byrne G.J., Padilla M.I., Carlin J.M., 1995. Upregulation of interferon-induced IDO in human macrophage cultures by LPS, muramyl tripeptide and interleukin 1. *Cell Immunol* 160: 264-269.
- (96) **Fontana A.**, Bodmer S., Frei K., Hofer E., 1987. Immune-mediated encephalitis: on the role of antigen presenting cells in brain tissue. *Immunol Rev* 100:185-201.
- (97) **Kayser F.H.**, Bienz K.A., Eckert J., Lindemann J., 1993. *Medizinische Mikrobiologie*. Thieme Verlag, 8.Auflage.
- (98) **McCabe R.E.**, Luft B.J., Remington J.S., 1984. Effect of murine IFN γ on murine *Toxoplasmosis*. *J Infect Dis* 150: 961-2.
- (99) **Suzuki Y.**, Conley F.K., Remington J.S., 1990. Treatment of *Toxoplasmic* encephalitis in mice with recombinant IFN γ . *Infect Immun* 58: 3050-5.
- (100) **Abbas A.K.** et al., 1994. *Cellular and molecular Immunology*, 2d ed. Philadelphia, Saunders.
- (101) **Naginei C.D.**, Detrick B., Hooks J.J., 2000. *Toxoplasma gondii* infection induces gene expression and secretion of IL-1, IL-6, GM-CSF, and ICAM-1 by human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun* Jan; 68(1):407-10.
- (102) **Fischer H.G.**, Nitzgen B., Reichmann G., Hadding U., 1997. Cytokine response induced by *Toxoplasma gondii* in astrocytes and microglia cells. *Eur J Immunol*, Jun; 27(6):1539-48.
- (103) **Chang H.R.**, Grau G.E., Pechère J.C., 1990. Role of TNF and IL-1 in infections with *Toxoplasma gondii*. *Immunology* 69 33-37.

- (104) **Hu B.**, Hissong B.D., Carlin J.M., 1995. IL-1 enhances indolamine 2,3-dioxygenase activity by increasing specific mRNA expression in human mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res* 15: 617-624.
- (105) **Pelloux H.**, Pernod G., Polack B., et al., 1996. Influence of Cytokines on *Toxoplasma gondii* growth in human astrocytoma-derived cells. *Parasitol Res* 82:598-603.
- (106) **Däubener W.**, Hücke Ch., Seidel K., Hadding U., MacKenzie C.R., 1999. IL-1 inhibits IFN γ -induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infection and Immunity* Nov. 1999: 5615-5620.
- (107) **Hu S.**, Sheng W.S., Peterson P.K. Chao C.C., 1995. Differential Regulation by cytokines of human astrocytes NO production. *Glia* 15: 491-494.
- (108) **Zhao M.L.**, Liu J.S.H., Deke He., Dennis W., Lee S.C., 1998. Inducible NO-synthase expression is selectively induced in astrocytes isolated from adult human brain. *Brain Research* 813:2:402-405.
- (109) **Lee S.C.**, Dickson D.W., Brosnan C.F., Casadevall A., 1994. Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism. *J Exp Med* Jul 180:1 365-9.
- (110) **Peterson P.K.**, Gekker G., Hu S., Chao C.C., 1993. Intracellular survival and multiplication of *Toxoplasma gondii* in astrocytes. *JID* 168:1472-8.
- (111) **Schwartzmann J.D.**, Gonias S.L., Pfefferkorn E.R., 1990. Murine IFN γ fails to inhibit *Toxoplasma gondii* growth in murine fibroblasts. *Infect Immun.* 58 833-834.
- (112) **Chao C.C.**, Anderson W.R., Hu S., Gekker G., Martella A., Peterson P.K., 1993. Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clinical Immunology and Immunopathology* Vol. 67, No.2, May, pp. 178-183.
- (113) **Lee S.C.**, Dickson D.W., Brosnan C.F., 1995. Interleukin 1, nitric oxide and reactive astrocytes. *Brain Behav Immun* Dec 9:4 345-54.
- (114) **Jebbari H.**, Roberts C.W., Ferguson D.J., Bluethmann H., Alexander J., 1998. A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 20(5): 231-239.
- (115) **Suzuki Y.**, Rani S., Liesenfeld O., Kojima T., Lim S., Nguyen T.A., Dalrymple S.A., Murray R., Remington J.S., 1997. Impaired resistance to the development of *Toxoplasma* encephalitis in IL-6-deficient mice. *Infection and Immunity*: 65 (6): 2239-2345.
- (116) **Remscheid C.R.**, 1997. Untersuchung zur zerebralen Toxoplasmose: Rolle von von IFN γ und TNF α bei der Induktion antiparasitärer Effektormechanismen in humanen Glioblastomzellen. Doktorarbeit an der Medizinischen Fakultät der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf.
- (117) **Massague J.**, 1998. TGF β signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 753-791.
- (118) **Omer F.M.**, Kurtzhals J.A.L., Riley E.M., 2000. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: A role for TGF β ? *Parasitol Today*, vol 16, No. 1, 18-23.
- (119) **Durum S.K.**, Oppenheim J.J., 1989. Macrophages-Derived Mediators: IL-1, TNF α , IL-6, IFN, and related cytokines. *Fundamental Immunology*, Second Edition, edited by William E. Paul, Raven Press Ltd., New York.
- (120) **Bermudez L.E.**, Covaro G., Remington J., 1993. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor beta and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. *Infect. Immun.* 61, 4126-4130.

- (121) **Omer F.M.**, Riley E.M., 1998. Transforming growth factor beta production is inversely correlated with severity of murine malaria infection. *J. Exp. Med.* 188,39-48.
- (122) **Fitzpatrick D.R.**, Bielefeldt-Ohmann H., 1999. TGF β in infectious disease: always there for the host and the pathogen. *Trends in Microbiology* Vol.7, No. 6 June, 232-236.
- (123) **Webster J.C.**, Cidlowski J.A., 1999. Mechanisms of glucocorticoid-receptor-mediated repression of gene expression. *TEM* Vol.10, No. 10.
- (124) **Taylor M.W.**, Feng G., 1991. Relationship between IFN γ , indolamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal* Vol. 5: 2516-2522.
- (125) **Ozaki Y.**, Edelstein M.P., Duch D.S., 1987. The actions of interferon and antiinflammatory agents on induction of indolamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. *Biochemical and Physical Research communications* 144(3): 1147-1153.
- (126) **Nishida T.**, Nakai S., Kawakami T. et al., 1988. Dexamethasone regulation of the expression of cytokine mRNAs induced by IL-1 in the astrocytoma cell line U373MG. *Federation of European Biochemical Societies* 243 (1): 25-29.
- (127) **Chao C.C.**, Hu S., Close K., Choi C.S., Molitor T.W., Novick W.J., Peterson Ph.K., 1992. Cytokine release from microglia: Differential inhibition by pentoxifylline and dexamethasone. *The Journal of infectious Diseases* 166;166:847-53.
- (128) **Batuman O.A.**, Ferrero A., Cupp C., Jimenez S.A., Khalili K., 1995. Differential regulation of TGF β -1 gene expression by glucocorticoids in human T and glial cells. *The Journal of Immunology* 155: 4397-4405.
- (129) **Marchant A.**, Amraoui Z., Gueydan C. et al., 1996. Methylprednisolon differentially regulates IL-10 and TNF α production during murine endotoxaemia. *Clin Exp. Immunol.* 106:91-6.
- (130) **Ramierz F.**, Fowell D.J., Puklavec M., Sommonds S., Mason D., 1996. Glucocorticoids produce a Th2 cytokine response by CD4⁺ T-cells in vitro. *J Immunol* 156: 1406-12.
- (131) **Franchimont D.**, Martens H., Hagelstein M.T. et al., 1999. TNF α decreases, and IL-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. *J Clin Endocrino Metab* Aug 84:8 2834-9.

G. Abkürzungsverzeichnis

%(v/v)	Volumenprozent
Abb.	Abbildung
ÂDP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Bluthirnschranke
Bq	Becquerel
ccpm	Counts per minute(cpm) ccpm korrigierte cpm)
CD	Cluster of Differentiation
Ci	Curie
CoA	CoenzymA
DMSO	Dimethylsufoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GFAP	Glial fibrillary acid protein
h	Stunde(n)
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule – 1
IDO e	Indolamine 2,3-dioxygenas
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I-Med.	Iscove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium
iNOS	Induzierbare Stickoxid-Synthase
KBR	Komplementbindungsreaktion
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
mAk	Monoklonaler Antikörper
MDM	Monocyte derived macrophages
MHC	Major histocompatibility complex
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
N ^G MMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
NK	Nitrit
NO	Stickoxid
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
rIFN	Rekombinantes IFN
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standartabweichung
SOD	Superoxid-Dismutase
TDO	Tryptophan 2,3-dioxygenase
TGFβ	Transforming-growth-factor β
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units
ZNS	Zentrales Nervensystem

Regulation $\text{IFN}\gamma$ vermittelter antiparasitärer Effektormechanismen:
Einfluß von Cytokinen und Glukokortikoiden auf die Aktivierung der
Indolamin 2,3-Dioxygenase

vorgelegt von Jochen Türck
2002

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den immunologischen Vorgängen bei der antiparasitären körpereigenen Immunabwehr. In diesem Rahmen wurde die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) als wichtigster antiparasitärer Abwehrmechanismus im humanen System auf die Regulation durch ausgesuchte körpereigene Botenstoffe und Entzündungsmediatoren hin untersucht.

Als in vitro Modell dienten, am Beispiel der zerebralen Toxoplasmose, humane Glioblastomzellen.

Diese Arbeit knüpft damit an vorausgegangene Arbeiten aus dieser Arbeitsgruppe an.

Es wurde die Beeinflussbarkeit der IDO durch eine Reihe von Zytokinen untersucht, die im Gefüge der körpereigenen Abwehr auf der einen Seite eher immunsupprimierende und auf der anderen Seite eher immunsupportive Eigenschaften besitzen bzw. hervorrufen. Hierzu wurden die Zytokine Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α ($\text{TNF}\alpha$) sowie die wichtigste körpereigene antiinflammatorisch wirkende Substanz Cortison untersucht.

Keines der getesteten Zytokinen konnte die Indolamin 2,3-Dioxygenase in Glioblastomzellen induzieren. Ebenso konnte keine Beeinflussung der durch $\text{IFN}\gamma$ induzierten IDO-Aktivität gemessen werden. Da in Glioblastomzellen die IDO den einzigen antiparasitären Effektormechanismus darstellt, konnte hier folgerichtig auch keine Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums erreicht werden.

Auf der anderen Seite zeigte sich eine Beeinflussbarkeit der IDO durch die Zugabe von Cortison zu einer mit Interferon γ ($\text{IFN}\gamma$) inkubierten Zellkultur. Überraschenderweise erfolgte hier keine Hemmung sondern eine gesteigerte Aktivität des Enzyms und zwar besonders deutlich bei den Zellreihen U373MG und 87HG31, die per se eine eher schwache Induktion der IDO durch $\text{IFN}\gamma$ alleine zeigten. Diese Steigerung ist nicht durch eine Induktion anderer Zytokine, z.B. $\text{TNF}\alpha$, sondern durch die alleinige Wirkung von Dexamethason, eventuell über spezifische Cortisonrezeptor und eine Signaltransduktion direkt am Kern, erklärt. Durch die Zugabe von Dexamethason zu einer mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ inkubierten Glioblastomzellkultur konnte sogar eine weitere Steigerung im Sinne einer Superinduktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase erreicht werden. Im weiteren wurde dann über einen Western-Blot der Nachweis der quantitativen Mehrexpression des IDO-Proteins unter Dexamethasonstimulation erbracht.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Türck, Jochen geboren am 02.07.1971 in Köln Familienstand verheiratet
Wohnort	Zugspitzstr. 40 85560 Ebersberg Tel.: 08092/865232 jotuerck@hotmail.com
Schulbildung	1978 - 1982 Grundschule an der Alexander von Humboldt Schule in Lima, Perú; 1982 - 1988 Norbert Gymnasium Knechtsteden; 1988 - 1989 11. Schuljahr an der St. Stephens School in Austin, Texas, USA 1989 - 1991 Norbert Gymnasium Knechtsteden; 1991 Abitur
Studium	WS 1992/93 – SS 1999 Studium an der HHU in Düsseldorf - Physikum September '94 - I. Staatsexamen August '95 - II. Staatsexamen April '98 - III. Staatsexamen Mai '99
Praktisches Jahr	1. Drittel Innere Medizin am Klinikum Krefeld 2. Drittel Urologie am Kantonsspital in St. Gallen, Schweiz 3. Drittel Chirurgie am Klinikum Krefeld
Berufstätigkeit	1.08.99-31.01.01 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der 2. med. Abteilung im Städtischen Krankenhaus München Bogenhausen.

Seit dem 1.02.2001 Tätigkeit als Assistenzarzt im Städtischen Krankenhaus München Bogenhausen (2. Medizinische Abteilung Prof. Dr. W. Schepp).

