

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Hadding

**Zytokin-vermittelte Regulation der  
Interferon-gamma-induziertenIDO-Aktivität  
als antiparasitärer Effektormechanismus**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Eva-Maria Türck, geb. Kniep

2002

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. Dr. Labisch

Referent: PD Dr. MacKenzie

Koreferent: Prof. Dr. Schrotten

## **Inhaltsverzeichnis**

### **A. Einleitung**

#### **1. *Toxoplasma gondii***

1.1.	Morphologie und Entwicklung	3
1.2.	Medizinische Relevanz	6
1.2.1.	Formen der postnatalen Toxoplasmeninfektion	7
1.2.2.	Pränatal erworbene Toxoplasmose	8
1.3.	Immunabwehr gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	8
1.3.1.	Humorale Immunantwort	9
1.3.2.	Zelluläre Immunantwort	9
1.3.3.	Humane Makrophagen	11
1.3.3.a.	Degradation von L-Tryptophan	12
1.3.3.b.	Oxidative burst	13
1.3.3.c.	L-Arginin-abhängige Produktion von Stickoxiden	14

#### **2. Zielsetzung der Arbeit** 15

### **B. Materialien und Methoden**

#### **1. Materialien**

1.1.	Zell- und Protozoenstämmen	17
1.1.1.	Humane Makrophagen	17
1.1.2.	Herkunft der humanen Astrozyten	17
1.1.3.	Herkunft der Glioblastomzellen	17
1.1.4.	Herkunft des Toxoplasmenstammes	18
1.1.5.	Herkunft der Fibroblasten	18
1.2.	Medien, Puffer	18
1.3.	Chemikalien, Zytokine, Antikörper	20

---

<b><u>2. Techniken und Methoden</u></b>	
2.1. Zellkultur	21
2.1.1. Kultivierung und Charakterisierung der MDM	21
2.1.2. Kultivierung und Ernte der Glioblastomzellen	23
2.1.3. Kultivierung und Ernte der Toxoplasmen	24
2.1.4. Kultivierung und Ernte der Fibroblasten	24
2.2. Stimulation der Makrophagen	25
2.3. Messung der IDO-Aktivität	25
2.4. Messung des Toxoplasmenwachstums	26
2.5. TNF $\alpha$ -ELISA	27
<b>C. Ergebnisse</b>	
1. <b><u>IFN<math>\gamma</math> vermittelt IDO-Induktion in humanen MDM</u></b>	29
2. <b><u>IL-10 reguliert die IFN<math>\gamma</math>-vermittelte Induktion der IDO</u></b>	36
3. <b><u>Wirkung von IL-10 auf die TNF<math>\alpha</math>-Produktion in MDM</u></b>	39
4. <b><u>IL-4 reguliert die IFN<math>\gamma</math>-vermittelte IDO-Induktion</u></b>	42
<b>D. Diskussion</b>	44
1. <b><u>IFN<math>\gamma</math> induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer Effektormechanismus</u></b>	45
2. <b><u>Interleukin (IL)-10</u></b>	50
3. <b><u>IL-10 hemmt die TNF<math>\alpha</math>-Produktion</u></b>	53
4. <b><u>Interleukin (IL)-4</u></b>	55
<b>E. Zusammenfassung</b>	58
<b>F. Literaturverzeichnis</b>	59
<b>G. Abkürzungsverzeichnis</b>	65

## **A. Einleitung**

### **1. Toxoplasma gondii**

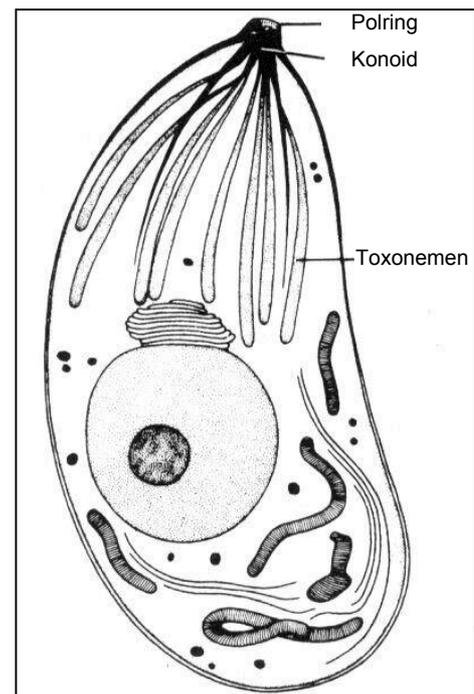
#### **1.1. Morphologie und Entwicklung**

*Toxoplasma gondii* ist ein weltweit verbreitetes, obligat intrazellulär parasitierendes Protozoon, welches 1908 erstmals von Nicolle und Manceaux in einem afrikanischen Nagetier entdeckt wurde. Aufgrund seiner geringen Wirtsspezifität ist der Erreger befähigt ein breites Spektrum warmblütiger Vertebraten zu infizieren. Einzig bekannter, epidemiologisch bedeutender, Endwirt ist jedoch die Hauskatze. Serologische Untersuchungen bei in Zentraleuropa lebenden Menschen ergaben eine Durchseuchungsrate von 37-58% (Tenter et al., 2000).

*Toxoplasma gondii* tritt im Verlauf seines Entwicklungszyklus in verschiedenen Stadien auf, die sich aufgrund ihrer Morphologie unterscheiden lassen.

Als Endozoiten, auch Tachyzoiten genannt, bezeichnet man Proliferationsformen, die sich innerhalb der Wirtszelle sehr rasch durch Endodyogenie (griech. innere Zweiteilung) vermehren. Bei diesem asexuellen Vermehrungsvorgang entstehen innerhalb einer Mutterzelle zwei Tochterindividuen, so daß die parasitophore Vakuole der parasitierten Wirtszelle nach und nach völlig ausgefüllt wird und auch als Pseudozyste bezeichnet werden kann (Mehlhorn und Piekarski, 1992).

Bei den Endozoiten (Abb. A1) handelt es sich um halbmondförmige Zellen, die am vorderen Pol einen sogenannten Apikomplex aufweisen. Dieser besteht aus einem Konoid und einem Polring. Im Bereich dieses Polrings münden die Ausführungsgänge der Toxonemen, deren enzymatisches Produkt bei der Penetration der Wirtszellmembran eine entscheidende Rolle



**Abb. A1** Endozoit,  
aus Kayser/Bienz/Eckert/Lindemann, 1998

spielen soll. Endozoiten lassen sich in Versuchstieren und Gewebekulturen, insbesondere in Zellen des lymphatischen Gewebes, vermehren. Die Magenpassage nach oraler Aufnahme überleben sie jedoch meist nicht, an der Außenwelt sind sie ebenfalls nicht lebensfähig (Eckert, 1998).

Eine zweite morphologisch abzugrenzende Erscheinungsform sind die Zystozoen (Bradyzoiten), welche sich innerhalb von Zysten, und vor allen Dingen wesentlich langsamer als die Tachyzoiten vermehren. Hierbei wird die Wand der parasitophoren Vakuole verdickt, und im Inneren entstehen, durch wiederholte Endodyogenie-Schritte, zahlreiche sichelförmige Parasiten. Sie stellen das sogenannte Wartestadium dar, da sie viele Jahre im Gewebe persistieren. Die Zysten entwickeln sich in verschiedenen Organen und Geweben aus den zuvor beschriebenen Pseudozysten, insbesondere im Gehirn und der Muskulatur der Zwischenwirte. Die einsetzenden Abwehrreaktionen des Wirtes scheinen diese Entwicklung zu begünstigen. Menschen und Tiere können sich durch die orale Aufnahme zystenhaltigen Fleisches (Hahn, 1999; Eckert, 1998) infizieren.

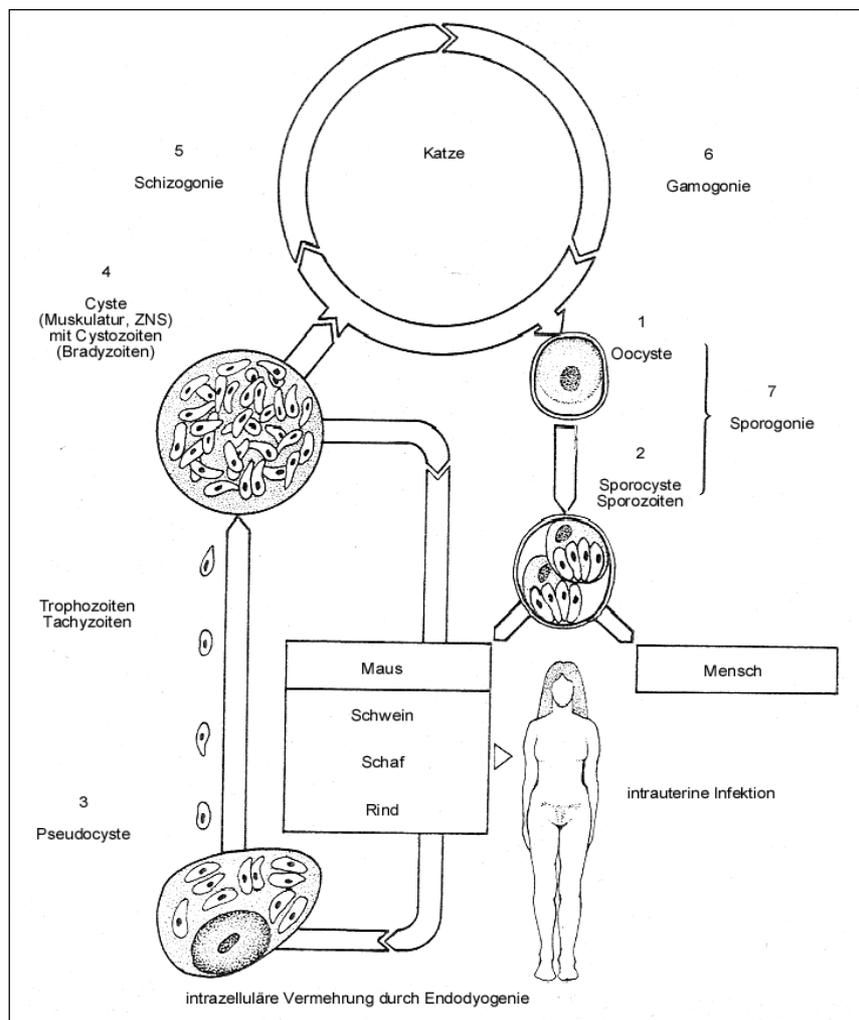
Die dritte und damit als letzte zu erwähnende morphologische Erscheinungsvariante von *Toxoplasma gondii* sind die Oozysten. Sie entstehen als Endprodukt eines im Darmepithel von katzenartigen Tieren ablaufenden geschlechtlichen Zyklus (Gamogonie). Diese, ausschließlich mit dem Kot katzenartiger Tiere ausgeschiedenen rundlichen Dauerstadien, sporulieren innerhalb von 2 - 4 Tagen und sind damit für den Menschen infektiös (Eckert, 1998).

In der Entwicklung von *Toxoplasma gondii* unterscheidet man eine enteroepitheliale, eine externe und eine extraintestinale Phase (Abb. A2):

Die enteroepitheliale Phase, mit der Ausbildung von Geschlechtsformen, vollzieht sich ausschließlich im Darmepithel der Endwirte, d.h. in Katzen und katzenartigen Tieren. Sie endet mit der Ausbildung von Oozysten, welche wiederum frühestens nach 3 Tagen, längstens jedoch nach einem Zeitraum von 3 Wochen mit dem Kot ins Freie gelangen und in sporulierter Form für Mensch und Tier infektiös sind.

Katzen sind die einzigen Ausscheider, sie infizieren sich meist durch die orale Aufnahme zystenhaltigen Fleisches (Mäuse), seltener durch die Aufnahme von Oozysten. Die in Zysten enthaltenen Zoiten überstehen die Magenpassage

unbeschadet, dringen in die Dünndarmmucosazellen der Katze ein und vermehren sich zunächst in wiederholten Schüben von ungeschlechtlichen Schizogonie- und Endodyogeniezyklen. Auf diese ungeschlechtliche Vermehrungsphase folgt die Gamogonie (Eckert, 1998). Die entstehenden männlichen Geschlechtszellen (Mikrogameten) werden ins Darmlumen entlassen, wogegen die weiblichen Keimzellen (Makrogameten) bis zum Zeitpunkt der Befruchtung intrazellulär lokalisiert sind und erst in befruchteter Form, als Oozyste, über den Darm ausgeschieden werden (Dönges, 1988).



**Abb. A2** *Toxoplasma gondii*, Entwicklungszyklus

aus Mehlhorn und Piekarski, 1992

Hier schließt sich nun die externe Phase an. Die zunächst unversporteten Oozysten sporulieren bei Zimmertemperatur, wie zuvor beschrieben, werden durch Desinfektionsmittel nur schlecht abgetötet und halten sich in feuchter Umgebung bis zu 5 Jahren.

Die extraintestinale Phase folgt auf die perorale Infektion durch Zystenaufnahme und ist sowohl bei Zwischen-, Fehl- und Endwirten vorzufinden. Nachdem die Toxoplasmen den Darm verlassen haben, infizieren sie Zellen des retikuloendothelialen Systems (RES), insbesondere Makrophagen, und verbreiten sich auf dem Blutweg im Körper. In den Organen findet eine ausschließlich ungeschlechtliche Vermehrung durch Endodyogenie statt, wobei insbesondere die Muskulatur und das Zentrale Nervensystem (ZNS) betroffen sind (Hahn, 1999). Für die Beschreibung des Ablaufes der extraintestinalen Gewebsinfektion, ist es wichtig zwischen den sich schnell vermehrenden Tachyzoiten und den Bradyzoiten zu unterscheiden.

Die Tachyzoiten prägen das akut verlaufende Initialstadium der Toxoplasmose wobei sich die Parasiten in den Vakuolen der Wirtszelle so stark vermehren, daß sie die Zelle vollständig ausfüllen und sogenannte Pseudozysten bilden. Nach Einsetzen der Immunisierungsprozesse, d.h. nach Erreichen einer gewissen Konzentration an Antikörpern, tritt das chronische Krankheitsstadium ein (Dönges, 1988). Die durch eine wesentlich längere Generationszeit gekennzeichneten Bradyzoiten sind zu mehreren von einer Zystenwand umgeben und als „Dauerstadien“ unter anderem im Gehirn, der Skelettmuskulatur und im Uterus vorzufinden. Man unterscheidet also zwischen Pseudozysten, die von der einfachen Doppelmembran der parasitophoren Vakuole umgeben sind, und Dauerzysten, die von einer festen Zystenwand umgeben werden. Letztere rufen an sich keine Entzündungsreaktion hervor und scheinen die Immunität aufrecht zu erhalten. Die bei gelegentlich platzenden Zysten freiwerdenden Zystozoen bilden bei bestehender Immunität erneut Zysten, bei Immunsuppression kommt es zur intrazellulären Proliferation und Reaktivierung der Toxoplasmose (Eckert, 1998).

## **1.2. Medizinische Relevanz**

Die Grundlage für die Pathogenese und das Krankheitsbild der Toxoplasmose bilden fokale nekrotisierende und entzündliche Prozesse, sowie immunpathologische Vorgänge. Infiziert sich ein Individuum mit *Toxoplasma gondii*, so entscheiden sowohl das Alter als auch der Immunstatus über den Krankheitsverlauf. Die Übertragung erfolgt auf drei unterschiedlichen Wegen.

Einerseits durch den Genuß roher zystenhaltiger Muskulatur von Schlachttieren, z.B. Verzehr von Schweinemett, weiterhin durch die orale Aufnahme von sporozitenhaltigen Oozysten mit verunreinigter Nahrung und zuletzt, bei Erstinfektion der Mutter in der Schwangerschaft, auf dem hämatogen-diaplazentaren Weg (Heizmann, 1991).

Bezüglich des Krankbildes unterscheidet man verschiedene Formen der Toxoplasmose .

### **1.2.1. Formen der postnatalen Toxoplasmeninfektion**

Die häufigste Form, die oftmals aufgrund fehlender klinischer Symptome nur anhand von anti-Toxoplasma-Antikörpern retrospektiv im Serum erkannt wird, ist die Primärinfektion bei Immunkompetenten. Bei nur ca. 1% der Infizierten treten nach einer Inkubationszeit von 1 – 3 Wochen Symptome wie Lymphknotenschwellung, insbesondere zervikal und nuchal, Fieber, Kopf- und Muskelschmerz auf (Herold, 1999). Bei immunsupprimierten Personen, d.h. Patienten die insbesondere Störungen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellfunktionen aufweisen, z.B. im Rahmen einer HIV-Infektion, oder eine hochdosierte Chemotherapie mit immunsuppressiver Nebenwirkung erhalten haben, unterscheidet man eine Primärinfektion von einer Reaktivierungs-Toxoplasmose (Eckert, 1998). Aufgrund septischer Streuung findet man bei diesen Primärinfektionen häufig das Bild einer fieberhaften Allgemeinerkrankung mit makulopapulösem Exanthem, generalisierter Lymphadenitis, nekrotisierender interstitieller Pneumonie, Hepatosplenomegalie, Meningoenzephalitis, Myokarditis und weiteren organischen Manifestationen. Hierbei besteht ebenso eine hohe Letalität wie bei der Form der Toxoplasmose, bei der es zu einer Reaktivierung einer latenten Toxoplasmose kommt, welche damit zur aktuellen Todesursache wird. Bei *Toxoplasma gondii* handelt es sich somit um einen opportunistischen Parasit (Remington, 1990).

### **1.2.2. Pränatal erworbene Toxoplasmose**

Eine Erstinfektion, d.h. Infektion einer zuvor seronegativen Mutter, während der Schwangerschaft führt bei mütterlicher Serokonversion in etwa 30% der Fälle zur pränatalen Infektion des Fötus (Desmots et al, 1985). Bei Frauen die eine latente, chronische Infektion und Antikörper des IgG-Typs aufweisen besteht keine Gefahr der hämatogen-diaplazentaren Übertragung. Zu Beginn der Schwangerschaft ist das Übertragungsrisiko geringer als im letzten Schwangerschaftsdrittel, dafür führt eine Infektion im ersten Trimenon jedoch zu stärkeren Schäden. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt und Intensität der Infektion können sich also relativ leichte, unspezifische Krankheits Symptome wie Fieber, Hautausschlag und Purpura zeigen oder die Trias bestehend aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Chorioretinitis bei dem Neugeborenen auftreten (Herold, 1999). Weiterhin besteht die Gefahr der Früh- und Totgeburten. In 75% handelt es sich um subklinische Fälle, d.h. die Kinder erscheinen bei Geburt klinisch unauffällig, können jedoch später im Säuglings- und Kleinkindalter Anzeichen von Hirn- und Augenschäden, bis hin zur Erblindung, aufweisen (Eckert, 1998).

### **1.3. Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii***

Parasitäre Infektionen stimulieren sowohl die humorale, als auch die zelluläre Immunantwort des infizierten Organismus. Bereits nach einem Zeitraum von einer Woche werden Antikörper und immunreaktive Zellen produziert. Im Bezug auf die Infektion mit *Toxoplasma gondii* wird der zellulären Immunantwort jedoch die größere Bedeutung beigemessen (Däubener und Hadding, 1997), da insbesondere Patienten mit Schädigung des T-Zell-Systems, z.B. im Rahmen der HIV-Infektion, an lebensbedrohlicher Toxoplasmose erkranken. Eine wesentliche Rolle scheinen weiterhin Zytokine wie das Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) zu spielen. Behandelt man latent infizierte Mäuse mit monoklonalen Antikörpern gegen IFN $\gamma$ , so kann die Infektion durch Aufgehen von Zysten aktiviert werden (Suzuki et al., 1988).

### 1.3.1. Humorale Immunantwort

Die humorale Antwort spielt in der akuten Phase der Infektion eine bedeutende Rolle. Hierbei unterscheidet man die unspezifische Abwehr, d.h. vor allem die alternative Aktivierung der Komplementkaskade, von der spezifischen, also durch Antikörper vermittelten Abwehr.

Die Produktion der Antikörper führt, mit dem Ziel der Abtötung extrazellulärer Toxoplasmen, zur Auslösung des klassischen Weges der Komplementaktivierung (Schreiber und Feldmann, 1980).

Bezüglich der unspezifischen humoralen Antwort konnten Fuhrmann und Joiner 1989 zeigen, daß der alternative Weg der Komplementaktivierung nach Bindung der C3-Komponente an die Toxoplasmenmembran ohne Ausbildung eines lytischen Komplexes abbricht. Das C3-Fragment wird aufgrund der Membranbeschaffenheit von *Toxoplasma gondii* in ein inaktives iC3-Fragment gespalten, welches zum Aufbau eines lytischen Komplexes befähigt ist.

Um die Rolle festzulegen, die die humoralen Mechanismen, insbesondere die Antikörper (Ak), in der Immunantwort spielen, muß zwischen akuter und chronischer Infektion unterschieden werden. Die Beobachtung, daß die Toxoplasmose bei immunsupprimierten Patienten trotz hoher Ak-Titer wieder aufbrechen kann, gibt Hinweise darauf, daß die Zellularimmunität eine Hauptrolle in der Abwehr chronischer Infektionen spielt. Andererseits resultierte die Gabe von Antikörpern gegen die schwere Kette des IgM bei Mäusen in einer nicht beherrschbaren Erstinfektion (Sharma, 1990). Nur die Immunisierung mit lebenden Toxoplasmen erzielte bei Mäusen einen Schutz vor einer akuten Infektion (Stadtsbaeder et al., 1975).

### 1.3.2. Zelluläre Immunantwort

Die zuvor beschriebene, durch spezifische Antikörper vermittelte humorale Immunantwort führt in den meisten Fällen zwar zur Abtötung extrazellulärer Toxoplasmen, hemmt jedoch nicht die Proliferation intrazellulärer Parasiten. Bei ihrer Abwehr steht ein Zell-vermittelter Mechanismus, der ebenfalls in eine unspezifische und spezifische Form unterteilt wird, im Vordergrund.

Der wichtigste Mechanismus der unspezifischen zellulären Abwehr bei der akuten Toxoplasmose ist die Phagozytose des Erregers durch Makrophagen, Monozyten und Granulozyten (Review von Krahenbuhl und Remington, 1982). Toxoplasmen sind jedoch generell in der Lage sich in diesen Zellen zu vermehren, so daß zur Verstärkung eine vorhergehende Aktivierung durch Zytokine, bzw. die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern oder Komplement (Stadtsbaeder et al., 1975) der erfolgreichen Phagozytose voraus gehen muß. Sowohl bei murinen als auch bei humanen Makrophagen (Anderson und Remington, 1974) konnte der Effekt einer, über den Fc-Teil der Antikörper vermittelten, verstärkten Phagozytose beobachtet werden. In dem humanen (Anderson et al., 1976) und auch murinen Abwehrsystem (Hughes et al., 1987) konnte weiterhin eine Aktivierung ruhender Makrophagen durch Lymphokine nachgewiesen werden, wobei dem, von den T-Zellen gebildeten  $\text{IFN}\gamma$  in der Abwehr von *Toxoplasma gondii* die größte Bedeutung zukommt (Kayser et al., 1998). An dieser Stelle sei erwähnt, daß verschiedene Gewebsmakrophagen jedoch auch spontan toxoplasmozid wirken können (Catterall et al., 1987). Das Zytokin  $\text{IFN}\gamma$  ist sowohl an immunregulatorischen Prozessen, wie der Expression von MHC Klasse I- und II-Antigenen beteiligt, als auch an der Induktion antibakterieller und antiparasitärer Effektormechanismen. Es konnte einerseits seine proliferationshemmende Wirkung auf Erreger wie *Chlamydia psittaci* (Murray et al., 1985 a), andererseits eine mikrobizide bei *Leishmania donovani* (Murray et al., 1985 b) und *Schistosoma mansoni* (Esparza et al., 1987) gezeigt werden.

Neben den Interleukinen -1, -2, -7 und -12, welchen eine protektive Wirkung zugeschrieben wird (Däubener und Hadding, 1997), spielt der Tumor-Nekrose-Faktor alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ), welcher hauptsächlich in Monozyten und Makrophagen gebildet wird (Herold, 1999), eine wesentliche Rolle in der Toxoplasmenabwehr, da er die  $\text{IFN}\gamma$ -Wirkung unterstützt (Däubener et al., 1996).

Die Bedeutung der T-Zell vermittelten Toxoplasmenabwehr wurde 1977 in einem in vitro Experiment von Lindberg und Frenkel dargestellt. Thymus- und T-Zell-defiziente Mäuse konnte nach Übertragung von physiologischen Lymphozyten im Vergleich zu vorher einen Infektionsschutz entwickeln.

Die lymphokinvermittelte Abwehr ist nicht der einzige Mechanismus der den T-Zellen zugeschrieben wird. Es konnte des weiteren eine direkte Wirkung nachgewiesen werden. Sowohl in murinen als auch humanen Infektionsmodellen

wurden intrazelluläre Toxoplasmen durch CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen abgetötet (Khan et al., 1990).

### 1.3.3. Humane Makrophagen

Die humanen Makrophagen bilden neben den Granulozyten die Grundlage für den zellulären, antigenunspezifischen Teil des Immunsystems (Herold, 1999). Da ihre Hauptaufgabe bei der körpereigenen Abwehr in der Aufnahme von Flüssigkeiten und festen Substanzen besteht, zählen sie neben Neutrophilen und Eosinophilen zu den professionellen Phagozyten (Klein, 1991).

Man findet diese mononukleären Phagozyten einerseits im Blut, als die sogenannten Monozyten, andererseits finden sie sich an einem festen Standort als gewebsspezifische Makrophagen, wie die Kupffer-Sternzelle in der Leber, oder die Histozyten im Bindegewebe. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Standorte differieren diese Zellen in Größe und Form und ändern ihr Funktionsrepertoire abhängig von der lokalen Situation.

Ruhende Makrophagen können durch inflammatorische Stimuli wie bakterielle Produkte oder Zytokine aktiviert werden. Hierbei spielen des weiteren regulatorische Signale anderer Zellen des Immunsystems eine bedeutende Rolle. Als aktivierte Makrophagen sind sie dann in der Lage biologisch aktive Verbindungen, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies, aber auch immunregulatorische Moleküle wie z.B. Interleukin-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  oder Interleukin-10 zu sezernieren. Durch solche Verbindungen ist eine ausgeglichene Immunantwort gewährleistet, denn die durch Zytokinexpression vermittelte Hochregulation immunologischer Prozesse kann andererseits durch inhibitorische Signalsubstanzen, wie beispielsweise Interleukin-10, wieder abgeschwächt werden. So kann die Ausdehnung entzündlicher Reaktionen begrenzt werden.

Intrazelluläre Parasiten wie *Toxoplasma gondii* können sich in Zellen wie Makrophagen vermehren und sind des weiteren innerhalb dieser vor der zytotoxischen T-Zell-Antwort geschützt. Unter der Stimulation mit IFN $\gamma$  konnten die Makrophagen jedoch eine effektive Toxoplasmostase zeigen, diesem Sachverhalt liegt ein spezieller Effektormechanismus zugrunde.

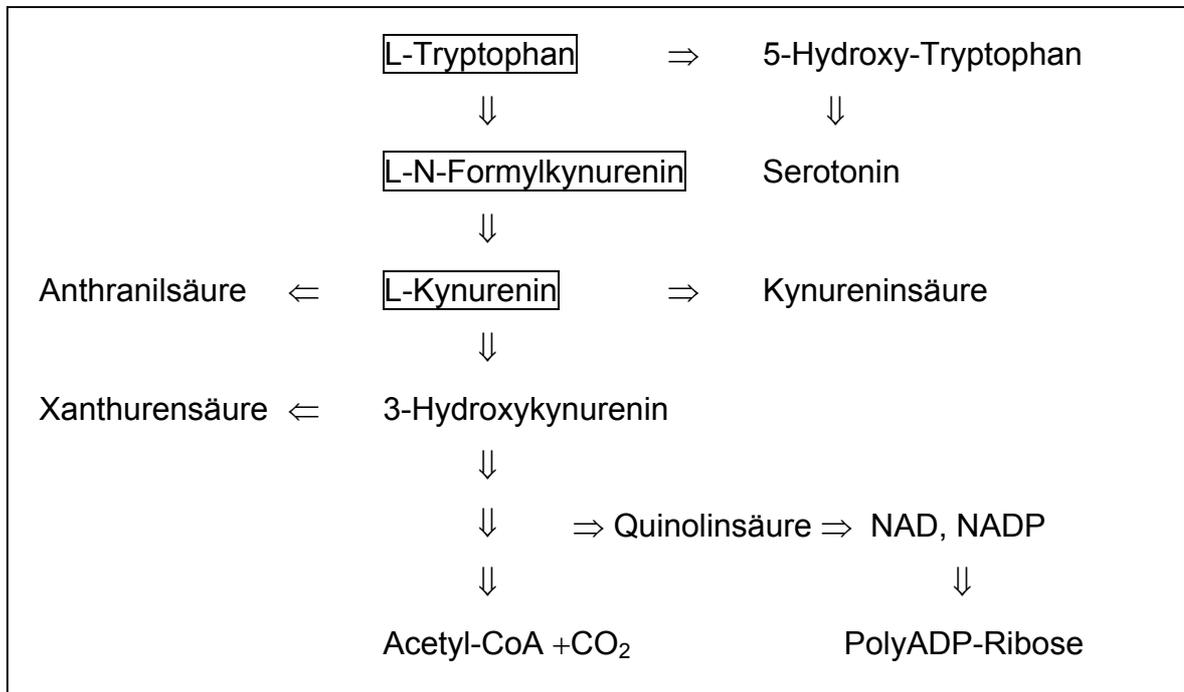
Aus der Literatur sind verschiedene Effektormechanismen zur Abwehr intrazellulärer Parasiten bekannt, von denen drei hier insbesondere erwähnt werden sollen. Dies sind die Degradation von L-Tryptophan sowie die als „oxidative burst“ bezeichnete Produktion reaktiver Sauerstoffradikale und die L-Arginin abhängige Produktion von Stickoxiden.

### **1.3.3.a Degradation von L-Tryptophan**

Die Indolamin 2.3-dioxygenase (IDO: E.C.1.13.11.42) ist ein Flavin-abhängiges Enzym, welches in Anwesenheit von Sauerstoff den Abbau von L-Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin und Kynurenin katalysiert (Takikawa et al., 1986). Der Abbauweg (Abb. A3) unterteilt sich in den sogenannten Indolaminweg, in dessen Verlauf Serotonin entsteht und den Kynureninweg, dessen Endprodukte Quinolin- und Kynureninsäure sind. Durch IFN $\gamma$  sowie durch sogenannte „IFN-Inducers“ wie LPS oder Viren kann die Tryptophandegradation verstärkt werden. In humanen, aus Monozyten gereiften Makrophagen [monocyte-derived-macrophages (MDM)] konnte für TNF $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  ebenfalls eine IFN $\gamma$ -potenzierende Wirkung in Bezug auf die IDO-Induktion gezeigt werden, wohingegen beide alleine keine Stimulation aufweisen (Carlin und Weller, 1995). Die Indolamin 2.3-dioxygenase konnte in vielen verschiedenen humanen Zelltypen, so z.B. in Monozyten (Carlin et al., 1989 a), Makrophagen (Murray et al., 1989) und Tumorzellen (Däubener et al., 1993), nachgewiesen werden.

1984 beschrieb Pfefferkorn die IFN $\gamma$ -induzierte Hemmung des Toxoplasmenwachstums in Fibroblasten und stellte fest, daß der antimikrobielle Effekt mit der Tryptophankonzentration korrelierte. Gleiches konnte auch für einen weiteren intrazellulären Parasiten *Chlamydia psittaci* nachgewiesen werden (Carlin et al., 1989 b). Die antiparasitäre Wirkung in Fibroblasten und Glioblastomzellen wird durch L-Tryptophan-Supplementation wieder aufgehoben (Däubener et al., 1993). Man nimmt daher an, daß die Verarmung der Zellen an Tryptophan der Mechanismus der IDO-vermittelten antiparasitären Wirkung ist. Neben dem antitoxoplasmatischen Effekt der IDO-Aktivierung konnte weiterhin eine antibakterielle Wirkung gezeigt werden. In humanen, aus Nabelschnurblut

isolierten MDM zeigte sich eine IDO-vermittelte Wachstumshemmung extrazellulärer Gruppe B Streptokokken (MacKenzie et al., 1998).



**Abb.A3** Tryptophanmetabolismus

### 1.3.3.b Oxidative burst

Im Falle einer Stimulation eines Makrophagen phosphoryliert ein membranständiges Enzym, Proteinkinase C, zwei Gruppen von Proteinen. Einerseits handelt es sich um Proteine der Mikrofilamente, so daß die phagozytäre Aufnahme eines Partikels ermöglicht wird, auf der anderen Seite werden Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes aktiviert, deren Phosphorylierung zum sogenannten „Oxidative burst“ führt (Klein, 1991). Die hierbei auftretenden metabolischen Veränderungen sind gewöhnlich mit der mitochondrialen Atmung assoziiert, so daß auch hierbei der Sauerstoffverbrauch, und parallel dazu die Produktion von Peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) deutlich ansteigt. Diese Sauerstoffspezies, zu denen auch die Hydroxyl- ( $\cdot$ OH) und Alloxylradikale (RO $\cdot$ ) zählen, leiten sich von dem molekularen Sauerstoff ab, erscheinen jedoch aufgrund ihrer Elektronenkonfiguration weitaus reaktiver (Lodish, 1996). Sowohl

bei Entzündungsprozessen, als auch bei einer Vielzahl anderer pathologischer Zustände werden diese Sauerstoffspezies, nach Aktivierung mit  $\text{IFN}\gamma$ , von den humanen (Nathan et al., 1983) und auch murinen (Murray et al., 1985 b) Makrophagen gebildet und erhöhen somit die antimikrobizide Wirkung. Toxoplasmen sind jedoch in der Lage sich diesen Effektormechanismen, insbesondere der Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , zu entziehen, da sie sogenannte endogene Katalasen besitzen. Diese sind in der Lage  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  zu spalten und damit unschädlich zu machen. (Murray et al., 1985 a).

### **1.3.3.c L-Arginin-abhängige Produktion von Stickoxiden**

Eine weitere wichtige Komponente in der von Makrophagen vermittelten Abwehr ist die bei Mäusen beschriebene Produktion von Stickstoffmonoxid NO (Ding et al., 1988).

Die Stimulation muriner Makrophagen durch Zytokine wie  $\text{IFN}\gamma$  führt zur enzymatischen Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin. Diese Reaktion wird durch einen Vertreter der NO-Synthasen, genauer durch das zytokininduzierbare Enzym iNOS (inducible NO synthase) katalysiert. Hierbei entsteht unter  $\text{O}_2$ -Verbrauch das Radikal  $\text{NO}\cdot$ , welches für die zytotoxische Wirkung aktivierter Makrophagen verantwortlich gemacht wird. Es bewirkt bei Enzymen, die in ihren katalytischen Zentren das Kation  $\text{Fe}^{2+}$  enthalten, wie beispielsweise die Enzymkomplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette (Voet und Voet, 1992), einen Eisenverlust (Liew und Cox, 1991).

Für das murine System ist die Produktion von NO unumstritten ein wichtiger Effektormechanismus in der Toxoplasmenabwehr. In humanen Makrophagen wurde die Anwesenheit entsprechender Faktoren, beispielsweise das Vorkommen der iNOS mRNA, beschrieben (Bertholet et al., 1999). Ob jedoch NO in effektiven Mengen gebildet wird und welche Bedeutung die Stickoxide als Abwehrmechanismus im menschlichen Organismus haben, insbesondere in Bezug auf die Toxoplasmentötung, wird kontrovers diskutiert (Weinberg et al., 1995).

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Die Infektion mit *Toxoplasma gondii* und das Verständnis der daraus resultierenden immunologischen Reaktionen gewinnt im Rahmen der ansteigenden Zahlen von HIV-Infizierten und Therapien mit Immunsuppressiva zunehmend an Bedeutung.

Die verschiedenen Abwehrmechanismen und ihre Rolle in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten wurde zuvor in Kapitel 1.3. erläutert. Insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Makrophagen sind an der Abwehr der Toxoplasmen beteiligt und zeigen unter der Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  eine effektive Toxoplasmostase, andererseits dienen sie jedoch als Reservoir für *Toxoplasma gondii*. Daher ist es von großem Interesse mehr Verständnis von den immunologischen Vorgängen zu gewinnen, die von diesen Zellen ausgehen. Für Glioblastomzellen sowie Fibroblasten konnte ein durch  $\text{IFN}\gamma$  induzierter Effektormechanismus nachgewiesen werden, der in einer Hemmung des intrazellulären Toxoplasmenwachstums resultiert (Däubener et al., 1996; Pfefferkorn 1984). Die Stimulation dieser Zellen mit  $\text{IFN}\gamma$  induziert das tryptophanabbauende Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) und hemmt somit das tryptophanabhängige Wachstum der Toxoplasmen. Dieses kann durch Resupplementation der Zellkultur mit Tryptophan wieder aufgehoben werden. Ein direkter Zusammenhang zwischen steigenden Zytokinkonzentrationen und Abnahme der Toxoplasmenzahlen konnte nachgewiesen werden, bei dem es sich um den einzig effektiven antitoxoplasmatischen Abwehrmechanismus dieser Zellen zu handeln scheint. Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand nun darin, die Bedeutung dieses  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Tryptophanabbaus, und den Einfluß des daraus resultierenden Tryptophanmangels in humanen Makrophagen zu untersuchen. In Anbetracht dieser immunologischen Funktion war es des weiteren Ziel der Arbeit die Regulation dieses Effektormechanismus zu untersuchen.

Für Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  konnte ein verstärkender, antiparasitärer Effekt gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit stand nun die Herunterregulation der IDO im Vordergrund, welche eine ausgeglichene

Immunantwort gegenüber eindringenden Organismen gewährleisten soll. Insbesondere inhibitorisch wirksamen Zytokinen, wie Interleukin (IL)-10 oder Interleukin (IL)-4 sollte hier Aufmerksamkeit gewidmet werden.

## **B. Materialien und Methoden**

### **1. Materialien**

#### **1.1. Zell – und Protozoenstämmen**

##### **1.1.1. Humane Makrophagen**

Das Präparationsverfahren zur Gewinnung der humanen Makrophagen sollte im Rahmen dieser Arbeit so etabliert werden, daß für alle Versuchsreihen möglichst gleiche Zellzahlen gleichen Alters und gleicher Qualität zur Verfügung stehen.

Die peripheren mononukleären Blut-Zellen (PBMC) stammen von gesunden, adulten Vollblutspendern. Das aus der Blutbank der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf stammende Spenderblut wurde nach einer Abkühlzeit von ca. 1 Std. mit Heparin ungerinnbar gemacht und bei 2200g für 13 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurde das Plasma abgepresst und die Erythrozyten als Sediment isoliert. Die dazwischen befindliche Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten (Buffy coat) konnte von uns zur Gewinnung der Monozyten weiter verarbeitet werden (B 2.1.1.).

##### **1.1.2. Herkunft der Glioblastomzellen**

Die Glioblastomzelllinie 86HG39, die in der vorliegenden Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt wurde, stellte Prof. Dr. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf zur Verfügung. Die Tumorzellen entstammen dem Erstrezidiv eines Glioblastoms und wurden zwischen der 140. bis 200. in vitro Passage (Passagedauer 6-8 Tage) in den Experimenten eingesetzt. Auch nach Langzeit-in-vitro-Kultur erwiesen sie sich für den Astrozytenmarker GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) positiv (Bilzer et al., 1991).

##### **1.1.2 Herkunft der humanen Astrozyten**

Die humanen Astrozyten wurden von BioWhitaker Verviers, Belgien bezogen.

### 1.1.3 Herkunft des Toxoplasmenstammes

*Toxoplasma gondii* des Stammes BK wurden von Dr. Saathoff und Dr. Seitz, Institut für Parasitologie, Bonn, zur Verfügung gestellt.

### 1.1.4. Herkunft der Fibroblasten

Die zur intrazellulären Vermehrung der Toxoplasmen verwendeten Mausfibroblasten L929 stammen ursprünglich von ATCC Rockville, Maryland, USA (Katalognr.CC11). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um normale, aus dem subcutanen Gewebe der Maus stammenden Zellen.

## 1.2. Medien, Puffer

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von der Firma Sigma, Chemical CO., St.Louis, MO, USA bezogen.

**I-Medium 5%** : Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser und versetzt mit:

- 0,3%(w/v) NaHCO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt)
- 5% (v/v) hitzeinaktiviertem (56°C/ 30 min) fetalem Kälberserum (FCS, Seromed)
- 1% (w/v) Glutamin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 50 µM β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)

**RPMI 5%** : RPMI 1640 Medium wurde mit und ohne Phenolrot als Fertigmedium (Gibco) bezogen. Dieses Medium wurde noch mit 5% hitzeinaktiviertem FCS supplementiert.

**PBS-Puffer:** Den sterilen PBS-Puffer verwendeten wir als Waschpuffer.

Zusammensetzung: • 0,8% (w/v) NaCl

- 0,02% (w/v) KCl
- 0,135% (w/v) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O

- 0,025% (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

**2% AB-Medium:** Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser und versetzt mit:

- 0,3%(w/v)  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, Darmstadt)
- 2%(v/v) hitzeinaktiviertem (56°C/30min) humanen AB-Serum (Bio Whittaker, Walkersville, USA)
- 1% (w/v) Glutamin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 50 $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)

**5% FCS-Medium:** Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser und versetzt mit:

- 0,3%(w/v)  $\text{NaHCO}_3$  (Merck, Darmstadt)
- 5%(v/v) hitzeinaktiviertem (56°C/30min) fetalen Kälberserum (FCS, Seromed)
- 1%(w/v) Glutamin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 50 $\mu\text{M}$   $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)

**Tween 20 Puffer:** • PBS 500ml

- 0,05%(v/v) Tween 20 (Firma Genzyme, Rüsselsheim)

**Blockpuffer:** • PBS 100ml

- 3g Milchpulver

**Streptavidin –HRP-Lösung:**

- 5 $\mu\text{l}$  Streptavidin-HRP
- 20ml PBS
- 1%(w/v) Bovine Serum Albumin (Sigma)
- 0,05%(v/v) Tween 20

Alle verwendeten Medien wurden mit einem 0,2 $\mu\text{m}$  MediaKap 5 Sterifilter (Microgon, Laguna Hill, USA) steril filtriert. Alle Medien wurden einer Sterilkontrolle unterzogen, indem 3 Tage lang ein Aliquot bebrütet und anschließend auf

Kontamination überprüft wurde. Bei negativem Befund erfolgte die Freigabe des Mediums. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet.

### 1.3. Chemikalien, Zytokine, Antikörper

#### Chemikalien:

- **Ehrlich-Reagenz:** 0,4% (w/v) Dimethylbenzaldehyd/ Eisessig  
Merck, Darmstadt
- **TNF $\alpha$ - ELISA:** Das DuoSet ELISA-System für humanes TNF $\alpha$  wurde von der Firma Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland bezogen.
- **Ficoll-Paque:** Amersham Pharmacia Biotetech,  
Uppsala, Schweden
- **LPS:** Sigma, Chemical Co., St.Louis, MO, USA
- **L-Tryptophan:** Sigma, Chemical Co., St.Louis, MO, USA
- **Trypanblau:** Sigma, Chemical Co., St.Louis, MO, USA
- **<sup>3</sup>H-Uracil:** Amersham, International, England
- **Trichloressigsäure:** Merck, Darmstadt
- **Tetramethylbenzidin:** Sigma, Chemical Co., St.Louis, MO, USA

**Zytokine:** Alle Zytokine wurden von der Firma Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland bezogen.

**Antikörper:** • Monoclonal Rat **Anti-Human IL-10**,  
Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland  
• Monoclonal Rat **Anti-Human TNF $\alpha$** ,  
Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland

## **2. Techniken und Methoden**

### **2.1. Zellkultur**

#### **2.1.1. Kultivierung und Charakterisierung der MDM**

Zur Kultivierung der MDM wurden die anderen Zellbestandteile des Buffy coat, die Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten, mit Hilfe eines Dichtegradienten abgetrennt.

Die Isolierung der PBMC erfolgte, indem das mit PBS 1:2 verdünnte Blut in einem 50ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen) über 10–15ml Ficoll-Paque geschichtet und zunächst für 30 Minuten bei 950g, ungebremst, bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert wurde. Die Dichte von Ficoll liegt über der Dichte die Lymphozyten und Monozyten aufweisen, so daß nach der Zentrifugation oberhalb der Ficoll-Phase eine dünne, helle Schicht, bestehend aus mononuklearen Blut-Zellen (PBMC), isoliert werden konnte. Das Sediment, bestehend aus Erythrozyten und Granulozyten, wurde verworfen.

In dem folgenden Waschvorgang wurde mit 30ml PBS resuspendiert und bei 550g, bei 5°C für 10 Minuten erneut zentrifugiert.

Die erhaltenen Zellen wurden im weiteren Verlauf der Kultivierung mit Hilfe der für sie beschriebenen Plastikadhaerenz (Carlin et al., 1989 a) aufgearbeitet. Um gleichbleibend gute und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten wurden zur Etablierung dieses Verfahrens verschiedene Medien, Puffer und Plastikartikel getestet. Die besten Ergebnisse, bezogen auf Qualität und Quantität, wurden bei folgendem Verfahren erzielt:

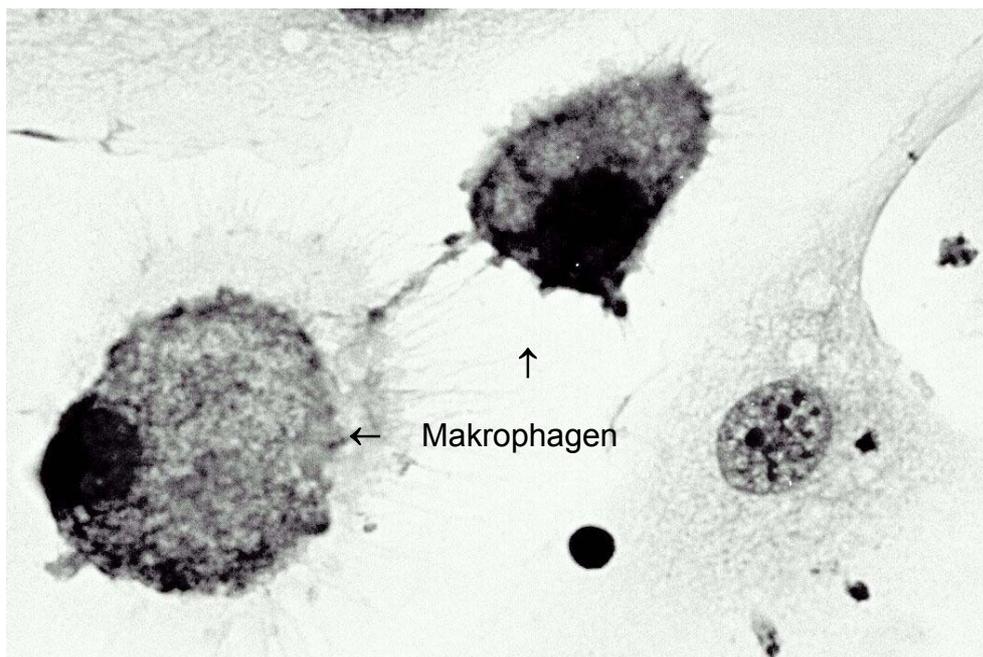
Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment, welches zu ca. 10% aus Monozyten besteht, wurde mit 30ml 2%igem AB-Medium aufgenommen, die Gesamtzellzahl in der Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen in entsprechender Anzahl auf einer 96-well-Platte mit Flachboden (Greiner, Solingen) verteilt. Trypanblau wurde als Farbstoff verwendet, um vitale von toten Zellen zu unterscheiden. Lebende Zellen sind in der Lage diese Verbindung aktiv aus der Zelle zu transportieren und färben sich somit nicht an. Hierbei zeigten sich die besten Resultate bei einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  in 50µl 2% AB-Medium/well. Nach einer

Inkubationszeit von 1 Stunde bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Luft wurden die nichtadhärenten Zellen vorsichtig mit PBS-Puffer ausgewaschen und die auf dem Grund haftenden 5×10<sup>4</sup> Monozyten/well mit 200µl frischem Kulturmedium versorgt.

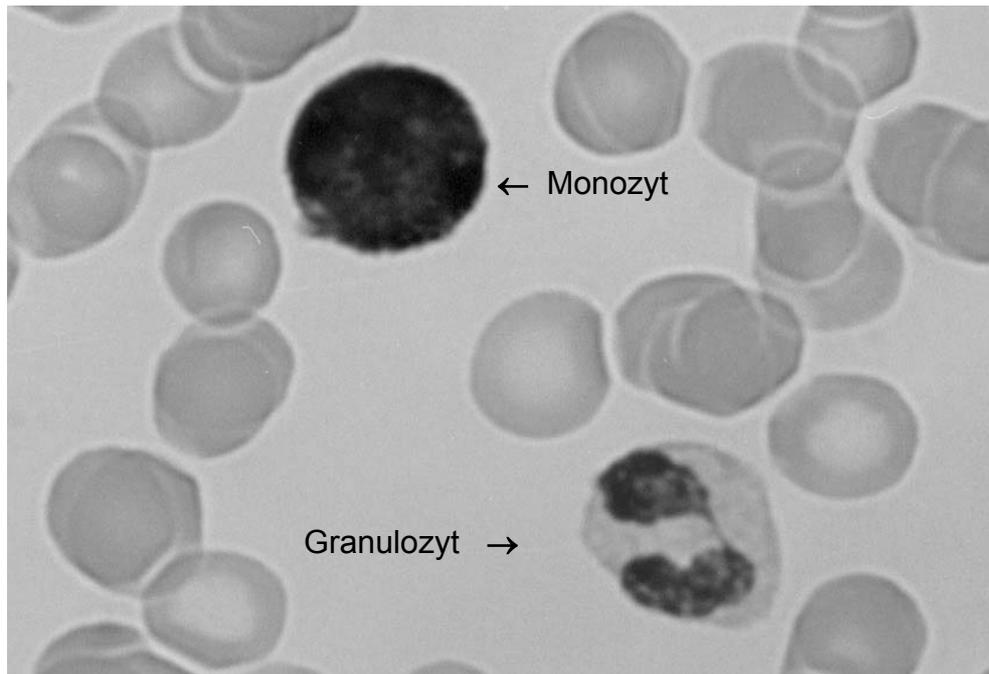
Da mehr als 95% der Monozyten das Oberflächenantigen CD14 aufweisen, kann hier auch eine andere, von der Plastikadhaerenz unabhängige, Methode angewandt werden. Es erfolgt eine Separierung der MDM unter Verwendung von Anti-CD14-Antikörpern, die an eisenhaltige „beads“ kovalent gebunden sind (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland). Diese binden an die oberflächlichen CD14-Antigene, so daß die MDM unter Einfluss eines Magnetfeldes von den anderen Zellen isoliert werden können. Die CD14<sup>+</sup> Monozyten werden zu einer Zellzahl von 5×10<sup>4</sup> ausplattiert.

Bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> konnten die Monozyten dann innerhalb von 8-10 Tagen zu Makrophagen heranreifen (Carlin et al., 1989,a; Hissong et al., 1994) und direkt, ohne Erntevorgang, in den 96-Well-Platten für die Versuchsansätze verwendet werden.

Die Charakterisierung der Monozyten fand durch Nachweis der Monozyten-Esterase statt, die nur in Zellen der monozytären Linie zu finden ist (Bildung eines Azofarbstoffes durch Hydrolyse von α-Naphtylacetat). Eine Färbung nach Giemsa diente zur Toxoplasmendarstellung in den MDM.



**Abb.B1** Makrophagennachweis mittels Esterase



**Abb. B2** Monozytendifferenzierung mittels Monozytenesterase

### 2.1.2. Kultivierung und Ernte der Glioblastomzellen

Die im Rahmen der Arbeit als Positivkontrolle verwendeten Glioblastomzellen wurden in 50ml-Zellkulturflaschen (Costar) bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Luft im Brutschrank kultiviert. Diese Tumorzellen zeichnen sich durch eine hohe Zellteilungsrate aus, so daß sie alle 5 Tage geerntet werden konnten. Zu diesem Zweck wurden die plastikadhärenten Zellen mit 4ml Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) von dem Flaschenboden abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min. wurden, zur Neutralisation des Trypsins, 10ml 5%-FCS-Medium hinzugegeben und die Glioblastomzellen geerntet. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 200g und 10°C abzentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde mit 5 ml Kulturmedium resuspendiert und nach 1:2 Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Da diese Tumorzellen eine hohe Teilungsrate von 1,5 pro Tag aufweisen, konnten sie, um große Zellzahlschwankungen zu vermeiden, erst kurze Zeit vor dem eigentlichen Versuchsansatz auf die 96-Well-Platte mit Flachboden (Greiner, Solingen) verteilt werden. In den hier vorliegenden Versuchsreihen wurden  $1 \times 10^4$  Glioblastomzellen/well in 50µl Medium eingesetzt.

### 2.1.3. Kultivierung und Ernte der Toxoplasmen

Der obligat intrazellulär lebende Parasit *Toxoplasma gondii* ist auf eine Wirtszelle angewiesen. In der vorliegenden Arbeit dienten als solche Zellen die Mausfibroblasten der Linie L929 (Kultivierung siehe Kapitel B.2.1.4.). Bei der zur Kulturanlage verwendeten Zellzahl von  $2 \times 10^6$  pro 50ml Kulturflasche (Costar), die mit  $5 \times 10^6$  Toxoplasmen infiziert wurden, dauerte es nur 2-3 Tage bis alle Fibroblasten durch die intrazelluläre Proliferation zerstört waren. Die dadurch vorliegenden extrazellulären Parasiten wurden direkt mit dem Kulturmedium vom Flaschenboden gespült und zur Entfernung von Zelltrümmern in einem 15ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) für 10 Minuten bei 40g, RT zentrifugiert. Der Toxoplasmen enthaltende Überstand wurde erneut für 10 Minuten, diesmal bei 300g, RT zentrifugiert und die nun im Sediment vorliegenden Toxoplasmen mit 5ml tryptophanfreiem RPMI-Medium aufgenommen. Die Anzahl der vitalen Toxoplasmen wurden mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt und für die Versuchsreihen das RPMI-Medium in den gewünschten Konzentrationen zugegeben. Die besten Ergebnisse erhielten wir bei einer Toxoplasmenzahl von  $1,5 \times 10^4$ /well in 50 $\mu$ l Medium auf  $5 \times 10^4$  Makrophagen/well. Zur erneuten Kultivierung wurde den Fibroblasten ein Teil der restlichen Toxoplasmen, in den zuvor erwähnten Konzentrationen, zugeführt und 5ml frisches FCS-Medium zugesetzt.

### 2.1.4. Kultivierung und Ernte der Fibroblasten

Die Mausfibroblasten wurden, ebenso wie alle anderen in der Arbeit verwendeten Zellen, bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Luft im Brutschrank kultiviert. Mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner, Düsseldorf) sowie durch Abspülen mit FCS-Medium konnten die plastikadhärenten Zellen alle 4-6 Tage geerntet werden. 1ml dieser Zellsuspension wurde dabei jeweils in der 5ml-Kulturflasche (Costar) belassen und mit 4ml frischem Medium zur weiteren Kultivierung aufgefüllt. Die restlichen 4ml wurden für 10 Minuten bei 250g, RT zentrifugiert und das fibroblastenreiche Sediment mit 3ml FCS-Medium resuspendiert. Nach

Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer konnten die so erhaltenen Wirtszellen für die Kultivierung der Toxoplasmen eingesetzt werden (Kapitel B.2.1.3.).

## 2.2. Stimulation der Makrophagen

In der vorliegenden Arbeit wurden die zuvor aus Monozyten gereiften Makrophagen (MDM) durch Interferon  $\gamma$  stimuliert und somit ein IDO-vermittelter Tryptophanabbau induziert. Die humanen Makrophagen erhielten wir nach ca. 1 Woche durch das in Kapitel 2.1.1. beschriebene Kultivierungsverfahren in den 96-Well-Platten. Das zur Zellreifung verwendete AB-Medium wurde vor Zugabe der Zytokine erneuert (100 $\mu$ l/well). Des weiteren wurde dem Kulturmedium, um eine gut meßbare IDO-Aktivität zu gewährleisten, L-Tryptophan zugesetzt (Endkonzentration von 75 $\mu$ g/ml Medium).

Nach abgeschlossener Verdünnung des IFN $\gamma$  folgte die Zugabe der zu untersuchenden Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4 ). Diese Verdünnungsreihe wurde nun auf die Makrophagenplatte übertragen und somit ein Endvolumen von 200 $\mu$ l/well erreicht. Es folgte die 2-3-tägige Stimulation der Zellen.

Das gleiche Stimulationsverfahren wurde auch bei den als Vergleichsansatz dienenden Glioblastomzellen verwendet.

## 2.3. Messung der IDO-Aktivität

Der Kynureninnachweis im Überstand aktivierter Zellen bietet im Vergleich zu den von Feng und Taylor (1989) beschriebenen Verfahren des intrazellulären IDO-Nachweises deutliche Vorteile, da die Zellen bei diesem indirekten Aktivitätsnachweis der Indolamin 2,3-dioxygenase nicht aufgeschlossen werden müssen. L-Tryptophan, welches zuvor dem Medium zugesetzt wurde, ist bei Induktion der IDO zu Kynurenin abgebaut worden (s.1.3.3.a, Abb.A3). Das, während einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden, entstandene Kynurenin kann, nach Zusatz von Ehrlich-Reagenz, photometrisch nachgewiesen werden und seine Menge ist direkt proportional zur IDO-Aktivität. Hierzu wurden 160 $\mu$ l/well an Überstand abgenommen und in eine 96-Well-Platte mit Spitzkonus (Greiner)

überführt. Nach Zugabe von 10µl/well an 30%iger Trichloressigsäure (Merck) wurden die Platten für 30 Minuten in einem 50°C warmen Wasserbad inkubiert um N-Formylkynurenin zu hydrolysieren und Proteine zu fällen. Im Anschluß daran wurde 10 Minuten bei 550g und RT zentrifugiert und 100µl des Überstandes auf eine 96-Well-Platte mit Flachboden übertragen. Zur Bestimmung des Kynureniningehaltes wurden nun 100µl eines zuvor frisch angesetzten Ehrlich-Reagenz (Kapitel B.1.3.) /well zugegeben, so daß insgesamt ein Volumen von 200µl/well vorlag. Die Absorption wurde bei 490nm gemessen, wobei die Überstände der unstimulierten Zellen als Negativkontrollen dienten.

#### 2.4. Messung des Toxoplasmenwachstums

Nach der IDO-Aktivitätsmessung im Überstand stimulierter Zellen wurden diese adhärenen Makrophagen mit *Toxoplasma gondii* infiziert (Däubener et al., 1994). Hierzu erwies sich die Toxoplasmenzahl von  $1.5 \times 10^4$  /50µl RPMI-Medium auf  $5 \times 10^4$  Zellen/well als besonders geeignet. Wichtig war hierbei weiterhin die Verwendung des tryptophanfreien RPMI-Mediums, da die Wirkung des IDO-induzierten Tryptophanabbaus, d.h. der daraus resultierende Tryptophanmangel und seine Folgen, untersucht werden sollten. Die mit der Toxoplasmensuspension infizierten Makrophagen wurden im Brutschrank inkubiert und täglich das Wachstum sowie die damit verbundene Zellzerstörung mikroskopisch kontrolliert. Nach 48 Stunden konnte meist ein Proliferationsmaximum beobachtet werden, da der erste Vermehrungszyklus abgeschlossen war und erneut extrazelluläre Parasiten auftraten. Zu diesem Zeitpunkt, möglichst vor einem erneuten Infektionszyklus, wurden die Testansätze radioaktiv markiert. Hierzu wurden pro Vertiefung 37 kBq [<sup>3</sup>H]-Uracil (10µl) zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die [<sup>3</sup>H]-Uracil-gepulsten Platten, zur Zerstörung der Zellmembran und Freisetzung der DNA, bis zur Auswertung im β-Zähler bei -20°C eingefroren.

Im Gegensatz zu Säugetierzellen besitzen Toxoplasmen ein Enzym, die Uracil-Phosphoribosyltransferase, welches Uracil in das in der Nukleotidsynthese verwendete Uridylat überführt. Daher wird [<sup>3</sup>H]-Uracil fast ausschließlich von

*Toxoplasma gondii* in die DNA und RNA eingebaut (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977) und kann zur Bewertung der Toxoplasmenproliferation genutzt werden.

Die eingefrorenen Platten wurden zu diesem Zweck bei RT wieder aufgetaut, der Inhalt der Wells mit Hilfe eines Zellerntegerätes (LKB Wallac) zur Zell-Lyse mit Wasser gewaschen und über einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) abgesaugt um die Tritium markierte DNA zurückzuhalten. Nach 20 Minuten Trockenzeit bei 100°C konnten die Filter unter Zugabe von 10ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) in einzelne Plastikfolien geschweißt und in einem  $\beta$ -Counter (1205 Betaplate, LKB Wallac) ausgewertet werden.

## 2.5. TNF $\alpha$ -Elisa

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem die Wirkung inhibitorischer Zytokine auf aktivierte Zellen und die Beeinflussung der zytokinabhängigen TNF $\alpha$ -Produktion untersucht.

Zu diesem Zweck wurden TNF $\alpha$ -Duo-Set-ELISA der Firma Genzyme verwendet und so der TNF $\alpha$ -Gehalt im Überstand stimulierter Zellen photometrisch bestimmt. Vor dem eigentlichen Gebrauch dieses Testsystems wurden die zu untersuchenden Proben vorbereitet. Die humanen Makrophagen wurden 2 Tage zuvor mit LPS, einem Membranbestandteil gramnegativer Bakterien, in einer Konzentration von 1 $\mu$ g/ml stimuliert. Weiterhin erfolgte, je nach Versuchsansatz, die Zugabe von Zytokinen und Antikörpern in verschiedenen Konzentrationen, so daß ein Gesamtvolumen von 200 $\mu$ l/well die adhärennten Makrophagen überdeckte. Anschließend wurden die Zellen über einen Zeitraum von 2 Tagen im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Zeit wurden 100 $\mu$ l/well dieses Überstandes abgenommen und auf die vorbereiteten Platten für den ELISA übertragen.

1 Tag vor der eigentlichen TNF $\alpha$ -Bestimmung wurden die Vertiefungen (Flachboden) der 96-well-Platten mit 100 $\mu$ l/well einer gepufferten Fänger-Ak-Lösung (2 $\mu$ g/ml Boratpuffer) bedeckt, für 24 Stunden bei 4°C inkubiert und ein Waschpuffer pH 7.2-7.4 (0,05% Tween20/PBS) vorbereitet. Am folgenden Tag wurden die Wells 5 $\times$  mit diesem Puffer gewaschen und mit 250 $\mu$ l/well eines

Blockpuffers bedeckt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Im Anschluß wurde dekantiert, die 100µl der zu bestimmenden Überstandsproben übertragen und erneut für 1 Stunde zur Bildung des Ak-Proteinkomplexes inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang mit der Waschpufferlösung wurden die Wells mit einem biotinyliertem, proteinspezifischen 2. Ak (1:400 Verdünnung) bedeckt und eine weitere Inkubationszeit von einer Stunde bei RT angeschlossen. Im Anschluß folgte die Zugabe von je 100µl/well einer Streptavidin-HRP-Lösung, welche nach 15 Minuten durch je 100µl/well an Tetramethylbenzidin (Sigma) ersetzt wurde. Hierdurch entsteht eine Blaufärbung, die durch Zugabe von 100µl/well einer „Stoplösung“ (2mH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) in eine gelbe Farbe umschlägt. Zwischen diesen Schritten erfolgte stets ein gründlicher Waschvorgang .

Innerhalb von 20 Minuten wurde der Ansatz des Sandwich-ELISA bei 450nm photometrisch ausgewertet.

Um Aussagen über die Quantität der TNF $\alpha$ -Produktion erbringen zu können, wurde parallel eine Standardreihe in den von Genzyme angegebenen Konzentrationen angesetzt.

## C. Ergebnisse

### 1. Interferon $\gamma$ vermittelt IDO-Induktion in humanen MDM

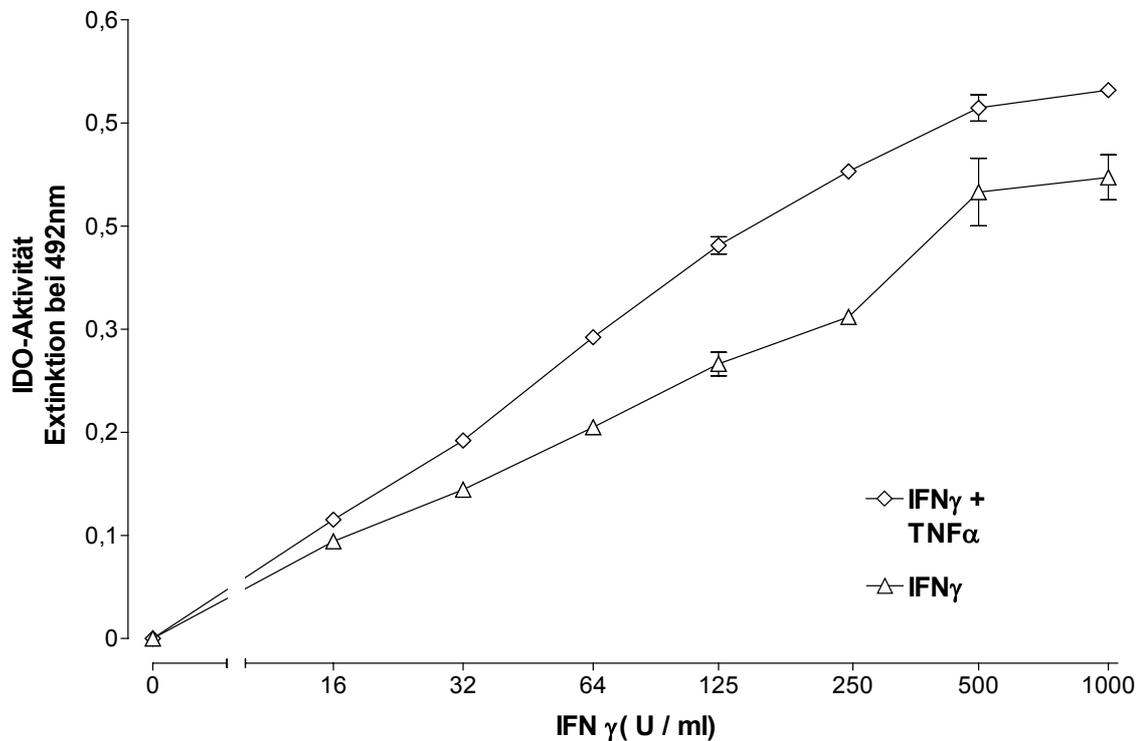
Wie schon zuvor in Kapitel A.1.3.3.a beschrieben, ist einer der Wirkungsmechanismen in der Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii* die Degradation von L-Tryptophan. Für Glioblastomzellen und Fibroblasten konnte bereits gezeigt werden, daß der hieraus resultierende Tryptophanmangel eine effektive Toxoplasmostase verursacht (Pfefferkorn, 1984).

In der hier vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob dieser Sachverhalt auch bei humanen MDM besteht.

Zu diesem Zweck wurden, wie in „Material und Methode“ beschrieben, humane Glioblastomzellen und Makrophagen über einen Zeitraum von 72 Stunden in 96-well-Platten mit Interferon  $\gamma$  in einer 1:2 Verdünnungsreihe von 1000 bis 0 U/ml stimuliert. Anschließend erfolgte die indirekte Messung der IDO-Aktivität durch photometrische Bestimmung des Kynureningehaltes in den Überständen. Nachfolgend wurde die Toxoplasmostase beobachtet. Für humane Makrophagen sowie für Glioblastomzellen und Fibroblasten konnte ein verstärkender Effekt der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Aktivität durch die gleichzeitige Zugabe von TNF $\alpha$  beschrieben werden (Däubener et al., 1996; Carlin und Weller, 1995).

In Abbildung C1 ist dieser Sachverhalt für die Glioblastomzellen der Linie 86HG39 in einem typischen Experiment dargestellt.

Wie dem Graphen zu entnehmen ist, bewirkt Interferon  $\gamma$  mit steigender Konzentration eine Zunahme der Extinktion, d.h. eine Steigerung der durch die IDO katalysierten Kynureninproduktion. Ein Maximum der Stimulation wird bei Interferonkonzentrationen von 500U/ml erreicht. Durch die Zugabe von 100U/ml an TNF $\alpha$  konnte eine Potenzierung dieses Effektes erlangt werden, dieses Zytokin alleine erzielt jedoch keine Wirkung (siehe „Nullwert“ für IFN $\gamma$ ).



**Abb.C1 IFN $\gamma$  vermittelte IDO-Induktion in Glioblastomzellen.**

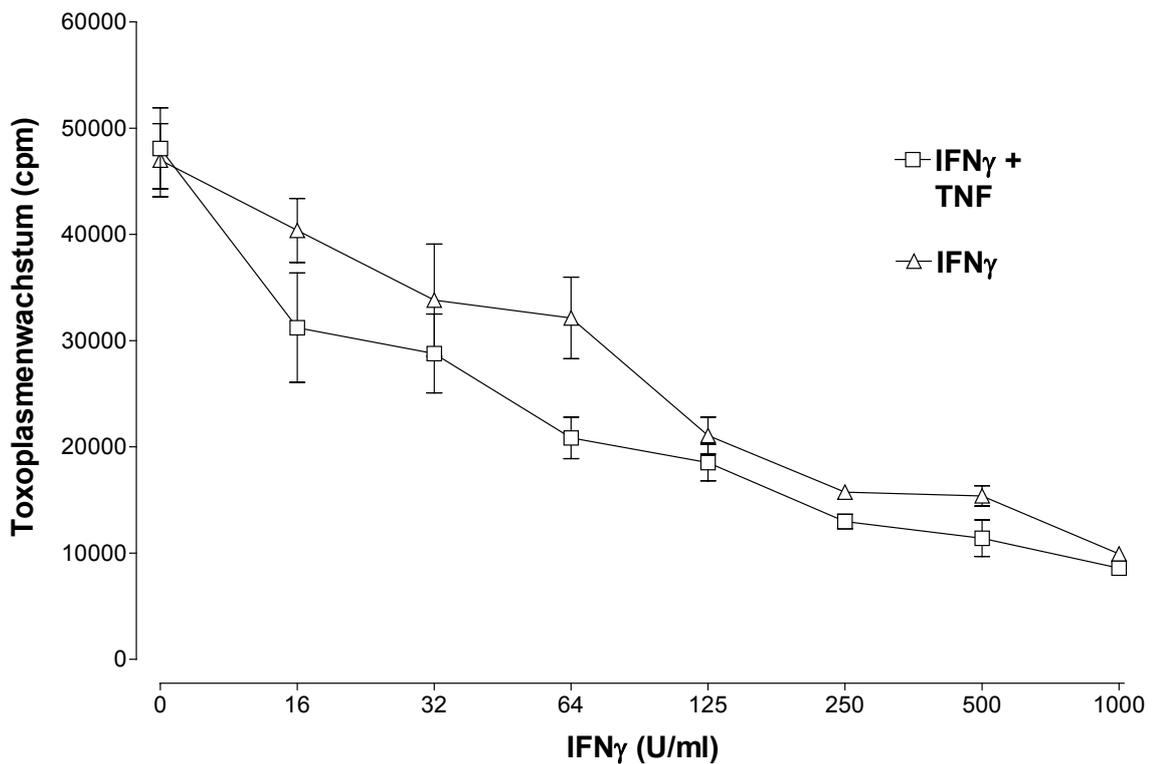
86HG39 ( $1 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  und mit ( $\diamond$ ) und ohne ( $\Delta$ ) TNF $\alpha$  (100U/ml) für 72 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Die für Toxoplasmen nachgewiesene, durch Tryptophanmangel hervorgerufene Wachstumshemmung zeigt sich in Abbildung C2.

Nach Ermittlung der IDO-Aktivität in den Zellüberständen wurden die Zellen mit Toxoplasmen infiziert und die Toxoplasmenanzahl durch den  $^3\text{H}$ -Uracil-Einbau bestimmt (s. Kapitel B.2.4.).

Da die IDO die Degradation des Tryptophan vermittelt, ergibt sich bei dieser Tumorzelllinie mit Anstieg des Tryptophanabbaus, also der Zunahme der Extinktion, eine Abnahme der Toxoplasmenproliferation. Auch hierbei zeigt sich ein, durch die Zugabe von TNF $\alpha$  verstärkter, antiparasitärer Effekt. Durch TNF $\alpha$  alleine wird jedoch weder die IDO noch eine Toxoplasmostase induziert.

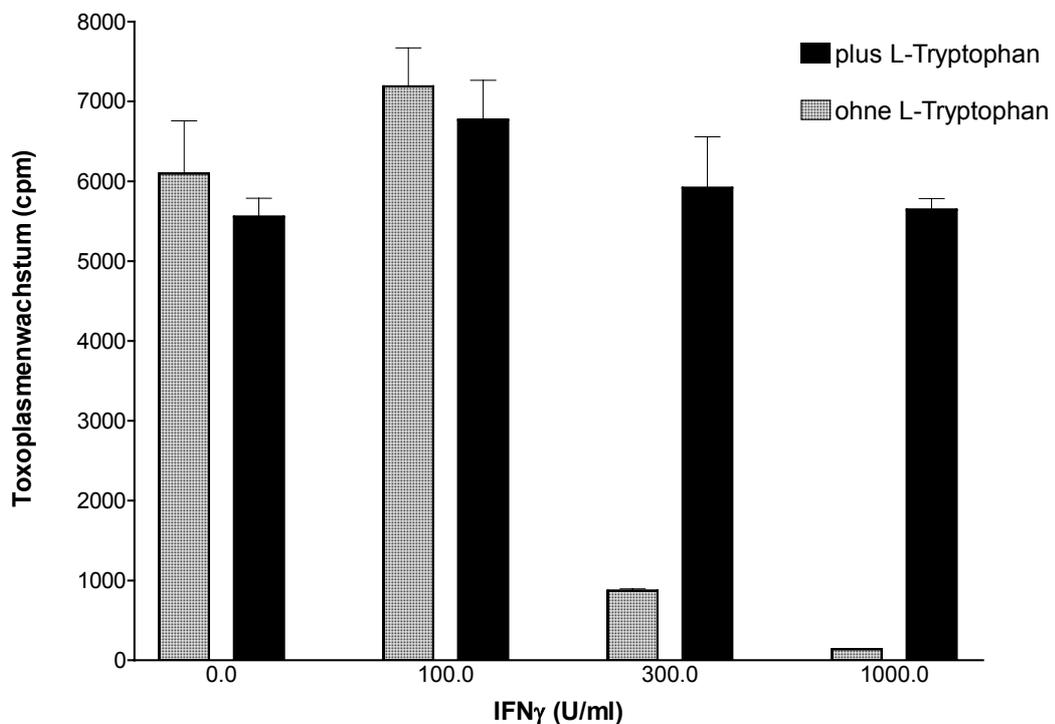


**Abb.C2 IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in Glioblastomzellen.** 86HG39 ( $1 \times 10^4$ /well) wurden für 72h mit IFN $\gamma$  und mit ( $\square$ ) und ohne ( $\Delta$ ) TNF $\alpha$  (100U/ml) inkubiert und anschließend mit  $1.5 \times 10^4$ /well Toxoplasmen infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und nach 24h das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -Uracil-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Für *Chlamydia psittaci* und *Toxoplasma gondii* konnte der unmittelbare Zusammenhang zwischen demIDO-vermittelten Tryptophanmangel und der antiparasitären Aktion hergestellt werden. Durch Zufuhr von L-Tryptophan kann bei der Glioblastomzelle die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase aufgehoben werden (Pfefferkorn, 1984; Däubener et al., 1996). Der Effekt der Re-Supplementation von L-Tryptophan ist in Abbildung C3 nun für native humane Astrozyten dargestellt. Diese nativen Zellen wurden anstelle der Tumorzelllinie verwendet um ein besseren Vergleich zu humanen Makrophagen herstellen zu können. Die native Astrozyten zeigten in sämtlichen Versuchen identische Ergebnisse zu der Glioblastomzelllinien und daher wurden diese Tumorzellen für die weitere Versuche verwendet.

Wie in den zuvor beschriebenen typischen Experimenten wurden humane Astrozyten zu einer Zellzahl von  $1 \times 10^4$ /well mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{IFN}\gamma$  inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung des Kynureningehaltes in den Zellüberständen. Auch hier zeigten sich die zu erwartenden steigenden Extinktionswerte bei zunehmendem Gehalt an Interferon. Im weiteren Verlauf des Versuches wurden die Zellen mit Toxoplasmen infiziert und einem Versuchsansatz (schwarze Säulen in Abb.C3)  $100 \mu\text{g/ml}$  L-Tryptophan zugeführt.

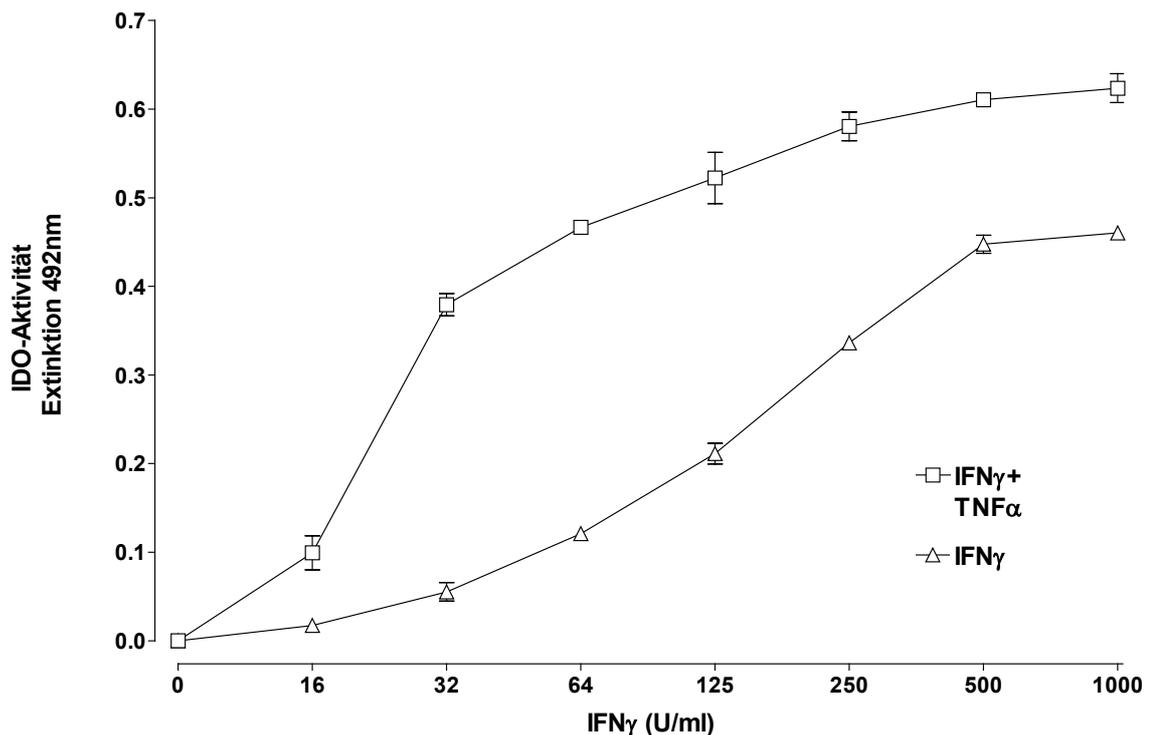
Die graphische Darstellung der Ergebnisse zeigt dementsprechend bei Re-Supplementation von Tryptophan eine Aufhebung der Wachstumshemmung in Form der Zunahme der Zerfallsrate pro Minute (cpm).



**Abb.C3  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in nativen Astrozyten. Aufhebung des Effektes durch Tryptophan-supplementation.** Astrozyten ( $1 \times 10^4$ /well) wurden für 72h mit  $\text{IFN}\gamma$  inkubiert und anschließend mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well, mit (■) und ohne (▨) Zugabe von  $100 \mu\text{g/ml}$  L-Tryptophan infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit  $10 \mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -Uracil-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes in professionellen Phagozyten wurde das Modell im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf humane MDM übertragen.

Wie der Abbildung C4 zu entnehmen ist, zeigt sich eine konzentrationsabhängige,  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Aktivität der IDO, d.h. es wird Tryptophan zu Kynurenin abgebaut. Ab einer Interferonkonzentration von 500U/ml nähert sich das zytokinabhängige Stimulationsmaximum. Durch die gleichzeitige Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  konnte auch bei den MDM eine deutliche Potenzierung des Effektes erreicht werden, es weist jedoch auch hier keine IDO-induzierende Eigenaktion auf.



**Abb.C4  $\text{IFN}\gamma$  vermittelt IDO-Induktion in humanen Makrophagen.**

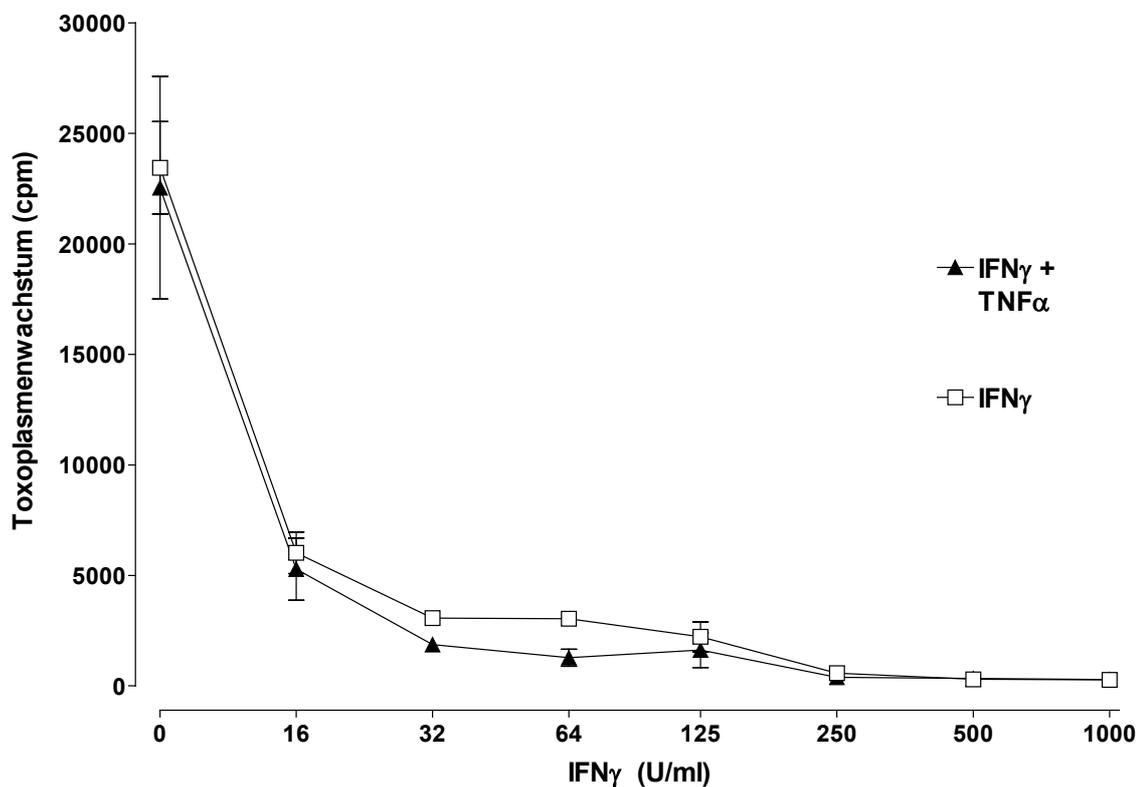
MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden mit  $\text{IFN}\gamma$  mit ( $\square$ ) und ohne ( $\Delta$ )  $\text{TNF}\alpha$  (100U/ml) für 72 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

Auch für die humanen MDM konnte eine  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Wachstumshemmung der intrazellulären Parasiten gezeigt werden. Die graphische Auswertung der Ergebnisse in Abbildung C5 läßt hier ebenfalls mit Anstieg der Interferonkonzentration eine Abnahme der cpm, als Maß für das Toxoplasmenwachstum erkennen.

Im Vergleich zu den Daten der dazugehörigen IDO-Aktivitätsmessung (Abb.C4) tritt der antitoxoplasmatische Effekt jedoch weitaus früher, d.h. wenn auch

messtechnisch schwer erfassbar, bereits bei einer  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration von 16U/ml ein. Durch diese Diskrepanz stellte sich nun die Frage, ob der IDO-induzierte Tryptophanmangel allein verantwortlich für die Proliferationshemmung ist. Eine Verstärkung des antiparasitären Effektes durch  $\text{TNF}\alpha$  lag nicht vor.



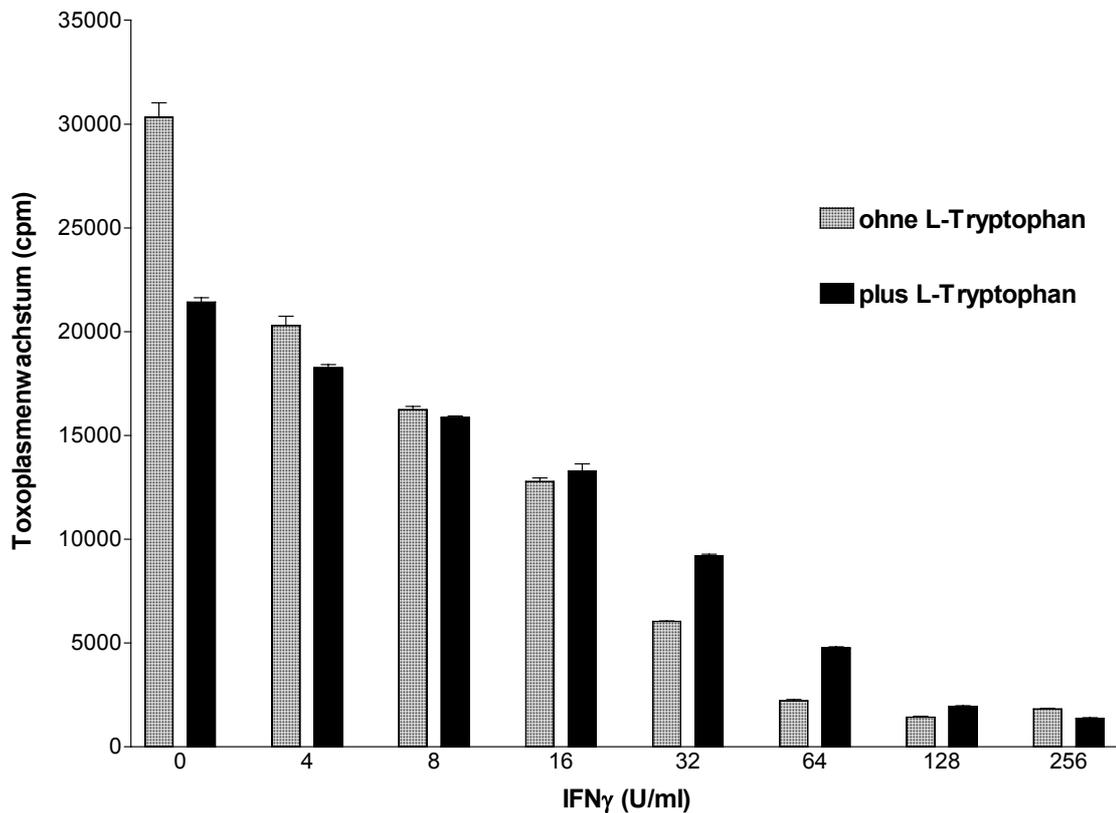
**Abb.C5  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in MDM.**

MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 72h mit  $\text{IFN}\gamma$  und mit ( $\blacktriangle$ ) und ohne ( $\square$ )  $\text{TNF}\alpha$  (100U/ml) inkubiert und anschließend mit  $1.5 \times 10^4$ /well Toxoplasmen infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -U-Inkorporation bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Für die Astrozyten konnte zuvor eine Aufhebung der Wachstumshemmung durch Re-Supplementation von Tryptophan gezeigt werden. Um einen ähnlichen Zusammenhang für die humanen MDM aufzuzeigen, erfolgte auch hier bei der Zugabe von Toxoplasmen simultan die Supplementation von L-Tryptophan. Der durch die IDO-Aktivierung entstandene Tryptophanmangel wurde somit aufgehoben.

Wie der Abbildung C6 zu entnehmen ist, konnte, im Gegensatz zu den Astrozyten, die Toxoplasmostase durch Zugabe hoher Mengen an L-Tryptophan nicht aufgehoben werden. Somit ist der Rückschluß erlaubt, daß in humanen MDM die Hemmung des Toxoplasmenwachstums nicht nur eine Abhängigkeit vom Tryptophanmangel aufweist.



**Abb.C6 IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in humanen MDM, keine Aufhebung des Effektes durch Tryptophansupplementation.** MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 72h mit IFN $\gamma$  inkubiert und anschließend mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well, unter Zugabe von  $100 \mu\text{g/ml}$  L-Tryptophan (■) oder ohne L-Tryptophan (▨) infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit  $10 \mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -U-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung .

## **2. Interleukin-10 reguliert die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion der IDO**

Die Notwendigkeit einer Regulation immunologischer Antworten wurde schon zuvor in Kapitel A2 erwähnt .

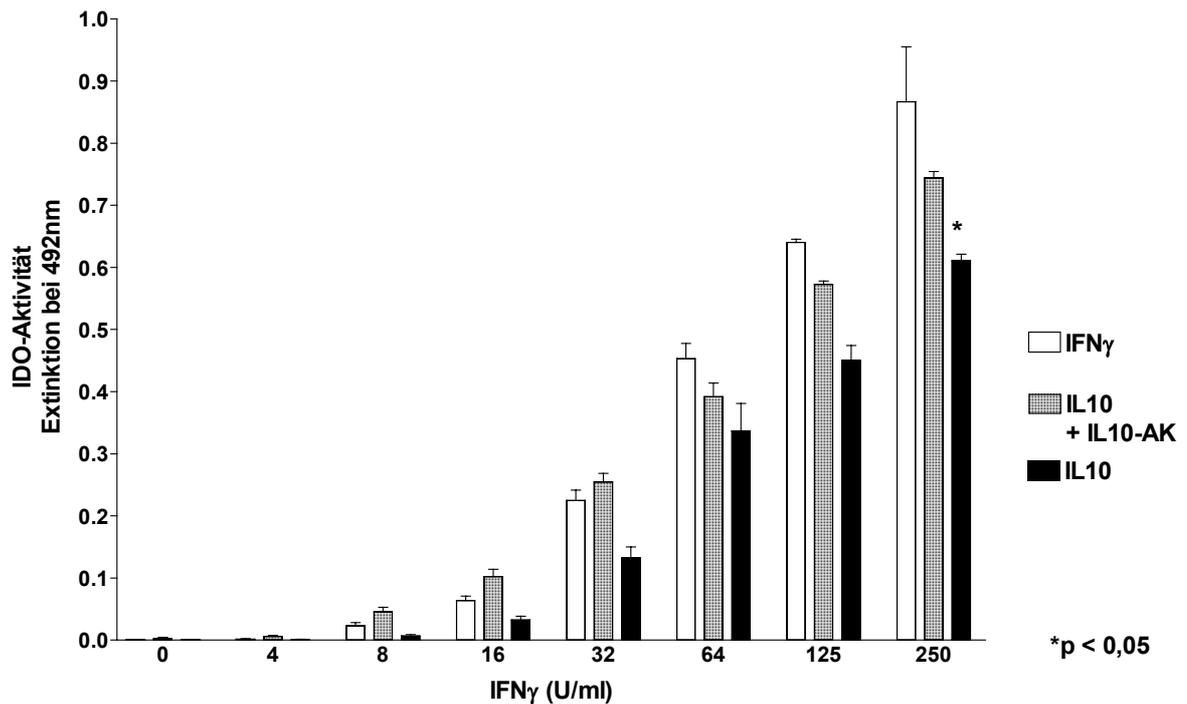
In der vorliegenden Arbeit sollten nun insbesondere die Mechanismen untersucht werden, die an der Regulierung der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivierung und den daraus resultierenden Effekten beteiligt sind. Hierbei wurde unter anderem das inhibitorische wirksame Zytokin IL-10 untersucht.

Interleukin-10 ist an der Reduktion der Entzündungsausbreitung beteiligt und wird somit im Rahmen der körpereigenen Immunantwort etwas verspätet von den humanen Makrophagen gebildet (Alexander et al.,1997).

Für uns stellte sich zunächst die Frage in wieweit dieses Zytokin eine Wirkung auf unser Infektionsmodell zeigt und somit wurde folgender Versuchsansatz durchgeführt:

Zunächst wurde in einer 96-well-Platte mit  $1 \times 10^5$  MDM/well eine 1:2 Verdünnungsreihe mit IFN $\gamma$  angesetzt, so daß Konzentrationen von 0-250U/ml vorlagen. Auf höhere Mengen Interferon konnte verzichtet werden, da bei 250U/ml eine durchaus meßbare IDO-Aktivität zu erwarten ist. Zusätzlich erfolgte bei zwei Versuchsansätzen die Zugabe von IL-10 (50ng/ml) und als Kontrolle der Spezifität von IL-10 wurden bei einem dieser Ansätze zusätzlich neutralisierende IL-10-Antikörper verwendet. Bei diesen Antikörpern (Ak) der Firma Genzyme neutralisieren 30ng/ml Antikörper 1ng/ml des Zytokins IL-10. In weiteren Versuchsansätzen, deren Ergebnisse hier nicht dargestellt wurden, konnte gezeigt werden, daß die Anti-IL-10-Antikörper alleine keinen Effekt auf die MDM besitzen. Die in Abbildung C7 dargestellten Ergebnisse zeigen die erhaltenen Daten nach 72stündiger Inkubation bei Zugabe von Medium, IL-10 und IL-10+IL-10-Ak zu IFN $\gamma$  in steigender Konzentration.

Es ist zu erkennen, daß mit steigender Konzentration des IFN $\gamma$  die IDO-Aktivität zunimmt und daß IL-10 die IFN $\gamma$  vermittelte Wirkung inhibiert. Aus der Zugabe neutralisierender Ak resultierte eine Aufhebung dieses Effektes, so daß die Spezifität von IL-10 bestätigt werden konnte. Somit ist die Aussage zugelassen, daß IL-10 die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivierung hemmt.



**Abb.C7 IL-10 hemmt die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion in humanen MDM.**

MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit (■) und ohne (□) IL-10 (50ng/ml) oder IL-10 (50ng/ml) +IL-10-Ak (▨) in 96-well-Platten für 72 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

Die Ermittlung der zugehörigen Toxoplasmendaten erwies sich als sehr schwierig. In den vorhergehenden Proliferationsversuchen stellte sich eine radioaktive Markierung ca. 48 Stunden nach Zugabe der Toxoplasmensuspension als optimaler Zeitpunkt (Proliferationsmaximum) heraus. Sollte Interleukin-10 den IFN $\gamma$ -vermittelten antiparasitären Effekt inhibieren, wären diese infizierten Makrophagen entsprechend dem Entwicklungszyklus der Toxoplasmen früher zu pulsen als die ohne IL-10 inkubierten Zellen. Des weiteren war nicht geklärt, ob IL-10 einen direkten, IFN $\gamma$ -unabhängigen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit von *Toxoplasma gondii* ausübt und sich somit der Markierungszeitpunkt verschiebt.

Um hier standardisierte Versuchsbedingungen zu schaffen wurde eine Kinetik angesetzt, die eine radioaktive Markierung der Toxoplasmen-DNA zu festen Zeitpunkten, ohne vorhergehende mikroskopische Beurteilung, voraussetzte.

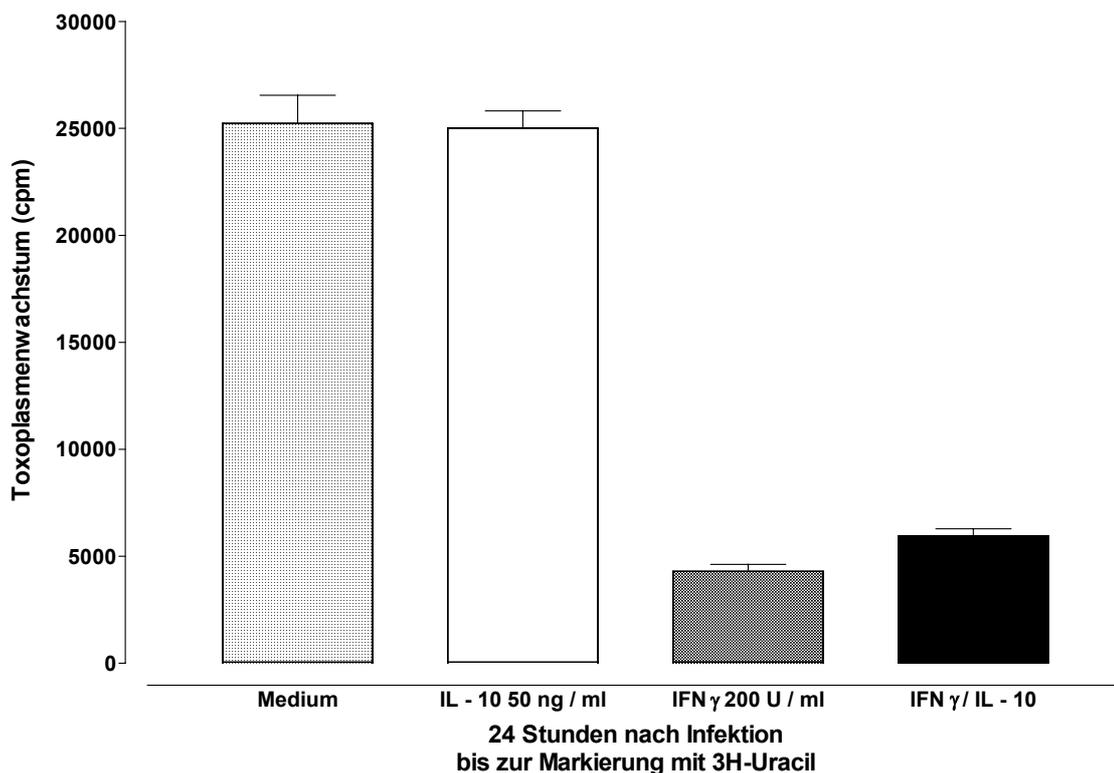
Zunächst erfolgte die 72stündige Inkubation der humanen Makrophagen mit reinem Medium, IL-10, IFN $\gamma$  und IFN $\gamma$ + IL-10 auf drei verschiedenen 96-well-

Platten. Die drei Versuchsansätze verliefen bis zu diesem Zeitpunkt völlig identisch, die Werte der IDO-Aktivitätsmessung entsprachen den Darstellungen in Abbildung C7. IL-10 hemmte auch hier die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität.

Diese drei Platten wurden im Anschluß mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert und unterschiedlich lange inkubiert.

Nach 24, 36 und 48 Stunden wurde, unabhängig vom Proliferationsstand, mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und die Daten im  $\beta$ -Counter ermittelt.

In allen drei Versuchsansätzen zeigte IL-10 keine Wirkung auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase. Die Ergebnisse waren identisch und zeitbedingte Markierungsfehler somit ausgeschlossen. In Abbildung C8 sind die Daten des Versuchsansatzes gezeigt bei dem 24-Stunden nach der Infektion mit Toxoplasmen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst wurde.



**Abb.C8 IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in humanen MDM. Keine Aufhebung des Effektes durch IL-10.**

MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 72h mit IL-10 (50ng/ml) (□), IL-10 (50ng/ml) +IFN $\gamma$  (200U/ml) (■) oder IFN $\gamma$  (200U/ml) (▨) alleine inkubiert und anschließend mit  $1 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -Uracil-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

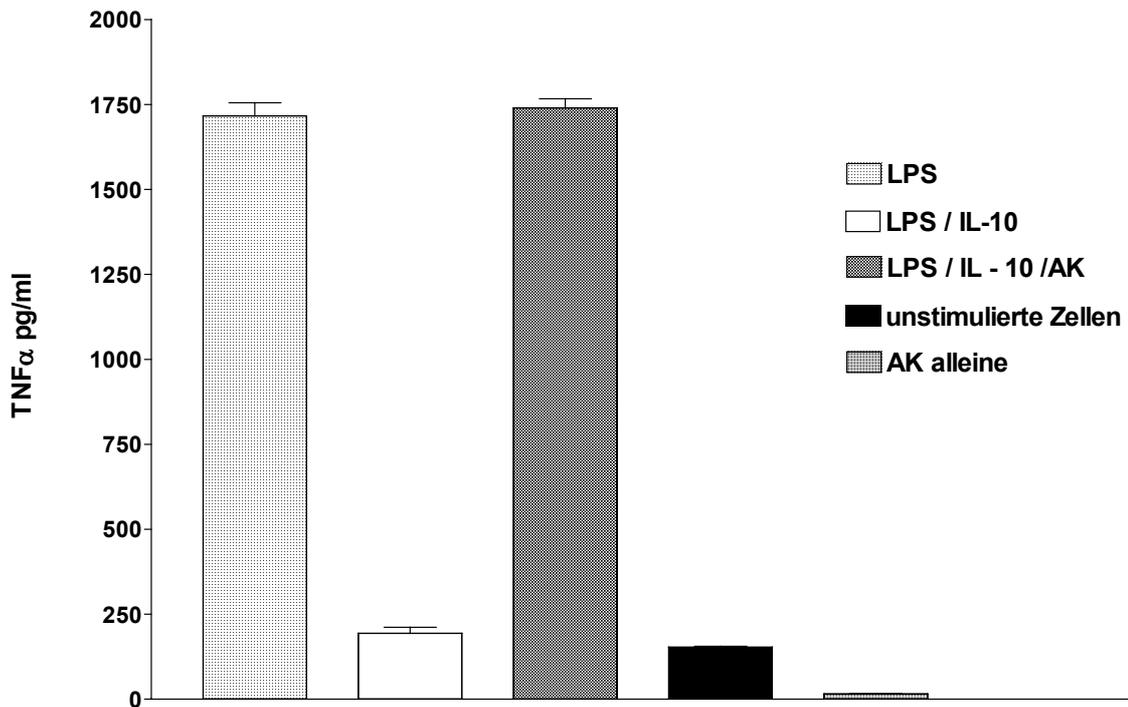
### **3. Wirkung von IL-10 auf die TNF $\alpha$ -Produktion in aktivierten humanen MDM**

TNF $\alpha$  ist ein Zytokin, welches in aktivierten Makrophagen gebildet wird (Kapitel A 1.3.2) und in natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie spezifischen T-Zellen, eine erhöhte Freisetzung von IFN $\gamma$  bewirkt. Hieraus resultiert entsprechend, wie zuvor beschrieben, die Induktion derIDO, mit L-Tryptophandegradation und antiparasitärer Wirkung. Des weiteren wird eine durch Stimulation mit IFN $\gamma$  vermittelte Produktion von TNF $\alpha$  in MDM, mit autokrin regulativer Wirkung, diskutiert (MacKenzie et al., 1999). Der dem TNF $\alpha$  zugeschriebene direkt potenzierende, von den NK-Zellen unabhängige, Effekt auf dieIDO konnte schon in Kapitel C1 gezeigt werden.

Für uns stellte sich nun die Frage, ob Interleukin-10 die TNF $\alpha$ -Produktion in humanen MDM senkt, und so die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Aktivität reduziert, oder ob andere Mechanismen zusätzlich involviert sind. Um diesen Sachverhalt zu erklären wurde zunächst zur quantitativen Bestimmung von TNF $\alpha$  ein ELISA der Firma Genzyme verwendet. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgte mit Hilfe von Lipopolysaccharid (LPS). Lipopolysaccharid ist ein Membranbestandteil gramnegativer Bakterien und wird auch als Endotoxin bezeichnet. Durch LPS werden Makrophagen zur vermehrten Synthese von TNF und IL-1 angeregt und somit, über eine Kaskade, ein Anstieg der Körpertemperatur und der Granulopoese bewirkt (Kayser, 1998).

$1 \times 10^5$  MDM /well wurden für einen Zeitraum von 2 Tagen mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS mit oder ohne Zugabe von IL-10 ( $50 \text{ng/ml}$ ) inkubiert. Versuche, bei denen IL-10 in Konzentrationen von 20 oder  $10 \text{ng/ml}$  zugegeben, wurde brachten gleiche Ergebnisse. Zur Kontrolle der Spezifität des Effektes von IL-10 erfolgte weiterhin die Inkubation mit neutralisierenden IL-10-Antikörpern. Anschließend wurden die Überstände auf die vorbereiteten Platten für den ELISA übertragen und nach dem zuvor erläuterten Schema (Material und Methode, Kap.2.5.) bearbeitet. Die nach photometrischer Auswertung bei  $450 \text{nm}$  erhaltenen Daten wurden mit Hilfe einer Standardreihe in den TNF $\alpha$ -Gehalt umgerechnet und in Abbildung C9 graphisch ausgewertet.

In Abb. C9 ist deutlich zu erkennen, daß Lipopolysaccharid einen Anstieg der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in humanen Makrophagen bewirkt und IL-10 diesen Effekt aufhebt. Die Spezifität dieser Produktionshemmung wird durch die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern bestätigt. Die Kontrollgruppen zeigen nur einen geringen  $\text{TNF}\alpha$ -Gehalt an.



**Abb.C9 Hemmung der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion durch IL-10.**

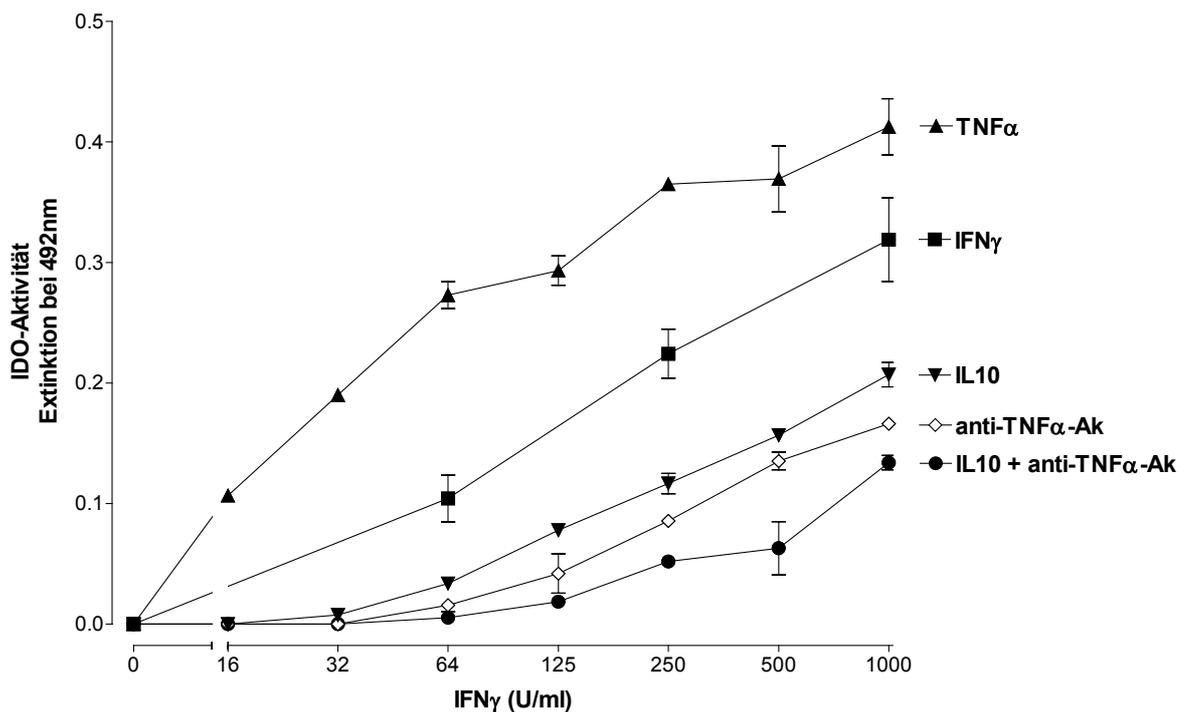
MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 48 Stunden mit  $1 \mu\text{g/ml}$  LPS (▨), LPS+IL10 (50ng/ml) (□), LPS+IL10+IL10-AK (1500ng/ml) (▩) und reinem Medium (■), bzw. IL10- Ak alleine inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung des  $\text{TNF}\alpha$ -Gehaltes bei 450nm.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 4-fach-Bestimmungen +/-Standardabweichung.

Somit konnte gezeigt werden, daß IL-10 die LPS-induzierte  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion in humanen MDM hemmt. Aufgrund der vorherbeschriebenen  $\text{TNF}\alpha$ -Bildung durch humane MDM in Gegenwart von  $\text{IFN}\gamma$ , stellte sich jedoch anschließend die Frage, ob die Unterdrückung der  $\text{TNF}\alpha$ -Bildung der einzige IL10-vermittelte Effekt auf das IDO-System ist, oder ob weitere Wirkungsweisen bei dieser Inhibition in unserem Modell eine Rolle spielen. Abbildung C10 zeigt die Ergebnisse eines Experimentes

in dem  $1 \times 10^5$  humane Makrophagen/well mit  $\text{IFN}\gamma$  unter oder ohne Zusatz von IL-10 und neutralisierenden  $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern stimuliert wurden.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, bewirkt IL-10 eine Hemmung der  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten, und durch  $\text{TNF}\alpha$  verstärkten, IDO-Aktivität. Diese entspricht annähernd der durch anti- $\text{TNF}\alpha$ -Ak produzierten Inhibition, so daß auch hier der Eindruck entsteht, daß IL-10 ausschließlich die  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion hemmt. Betrachtet man jedoch die fast vollständige IDO-Aktivitätshemmung, welche erst durch Kombination von IL-10 mit anti- $\text{TNF}\alpha$ -Ak erreicht wird, kann diese Aussage widerlegt werden. Hierbei sollte erwähnt sein, daß sowohl IL-10 als auch anti- $\text{TNF}\alpha$ -Ak im Überschuss vorgegeben wurden. Es scheinen somit andere Mechanismen als nur die reine Antagonisierung der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion durch IL-10 zu Grunde zu liegen.



**Abb.C10** IL-10 wirkt nicht nur über die Unterdrückung der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion hemmend auf die  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion. MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 72 Stunden mit  $\text{IFN}\gamma$  mit (▼) oder ohne IL-10 (20ng/ml)(■), mit neutralisierenden anti- $\text{TNF}\alpha$ -Ak (◇) oder  $\text{TNF}\alpha$  (100U/ml)(▲) inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.

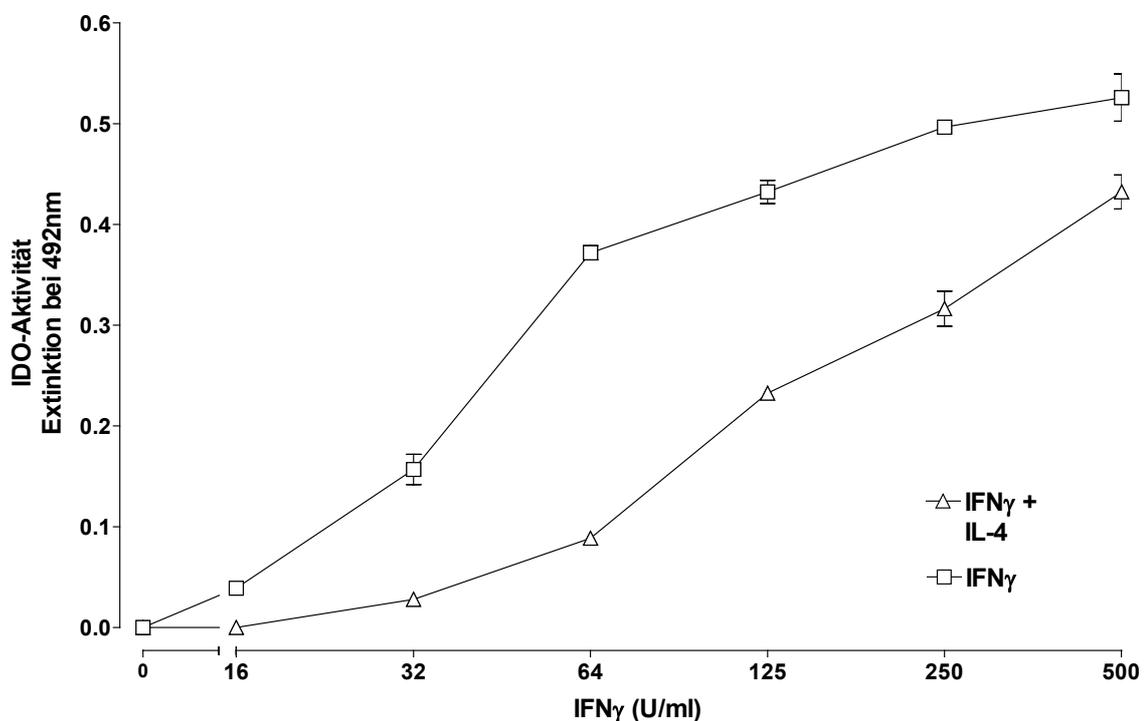
Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichungen.

#### 4. Interleukin-4 reguliert die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion

Interleukin-4 (IL-4) ist ebenfalls ein inhibitorisches Zytokin, welches vorwiegend von den T-Zellen gebildet wird. Musso et al. konnten 1994 in humanen Monozyten eine IL-4 vermittelte Hemmung der IDO-Expression und der Induktion der IDO mRNA zeigen.

In den folgenden Versuchen sollte nun geklärt werden in wie weit IL-4 auf unser „in-vitro Infektionsmodell“ einen Einfluß zeigt.

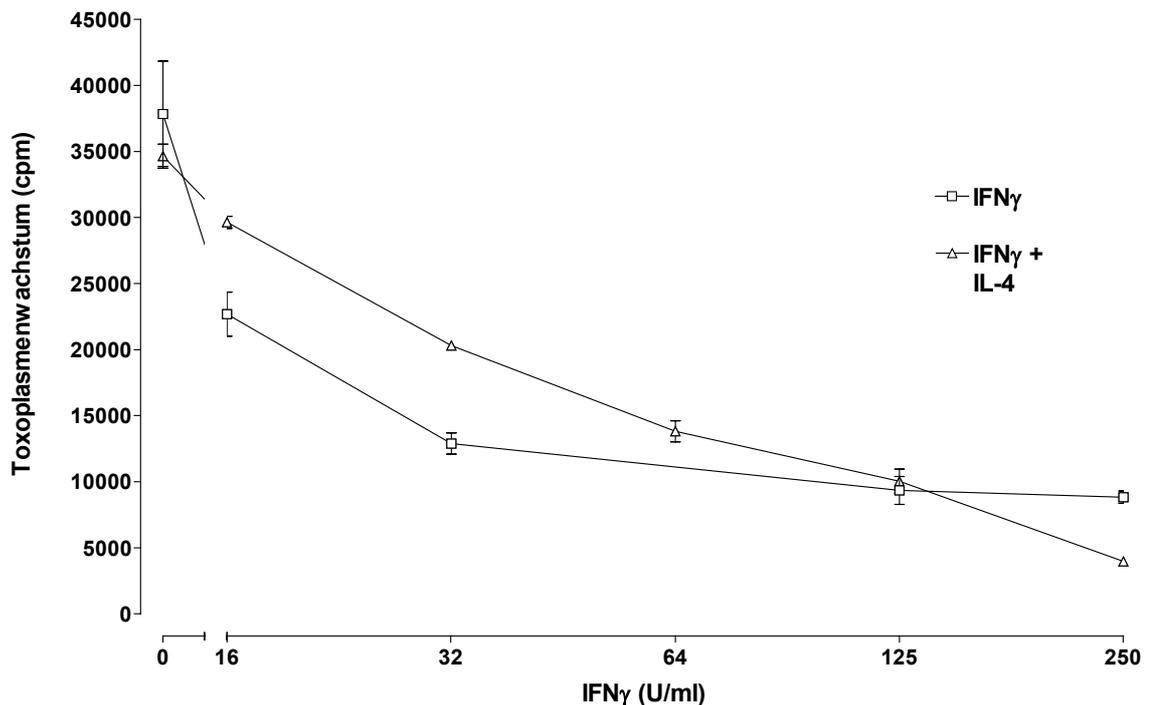
Um diesen Sachverhalt zu klären wurden zunächst zwei 1:2 Verdünnungsreihen mit IFN $\gamma$  (0-500 U/ml) angesetzt. Einem dieser Ansätze wurde IL-4 in einer Konzentration von 500U/ml zugegeben. Nach einer 72stündigen Inkubation der humanen MDM mit den Zytokinen wurde der Kynureningehalt der Überstände photometrisch bei 492nm bestimmt.



**Abb.C11 IL-4 hemmt die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion in humanen MDM.** MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit ( $\Delta$ ) oder ohne ( $\square$ ) IL-4 (500U/ml) für 72 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmung +/- Standardabweichung.

Wie der Abbildung C11 zu entnehmen ist, bewirkt IL-4, ebenso wie IL-10, eine deutliche Hemmung der  $\text{IFN}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität.

Im Anschluß an diese photometrische Auswertung wurden die Zellen mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert und wie zuvor die radioaktiv markierte DNA im Beta-Counter ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung C12 graphisch verarbeitet. Hier zeigt sich eine  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung, die durch Zugabe von IL-4 teilweise aufgehoben wird.



**Abb.C12  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Toxoplasmenproliferationshemmung in humanen MDM. Wirkung von IL-4.** MDM ( $1 \times 10^5$ /well) wurden für 72 Stunden mit  $\text{IFN}\gamma$  mit ( $\square$ ) oder ohne ( $\triangle$ ) IL-4 (500U/ml) inkubiert und anschließend mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Zellen mit  $10 \mu\text{l}$ /well  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und das Wachstum durch  $^3\text{H}$ -U-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/-Standardabweichung.

## **D. Diskussion**

Trotz der hohen Durchseuchungsrate in der Bevölkerung mit *Toxoplasma gondii* hatte die Toxoplasmose, abgesehen von der Primärinfektion bei Schwangeren, lange Zeit nur eine untergeordnete Bedeutung. Erst durch die ansteigenden Zahlen von HIV-Infizierten und durch vermehrte Anwendung von immunsuppressiven Therapien gilt das Interesse den während einer Infektion ablaufenden Immunreaktionen.

Als obligat intrazellulär lebender Erreger kann sich *Toxoplasma gondii* in vielen Zelltypen vermehren. In humanen in-vitro Kultursystemen ist das Wachstum in Fibroblasten (Pfefferkorn et al., 1984), Endothelzellen (Murray et al., 1985 a), Monozyten (McLeod et al., 1983 und Catteral et al., 1987) und in Glioblastomzellen (Däubener et al., 1992) beschrieben. Des weiteren sind die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Makrophagen als Wirtszellen bekannt (Anderson et al., 1976, Catteral et al., 1987). Diesen Zellen kommt ein besonderes Interesse zu, da Makrophagen einerseits an der Abwehr der Toxoplasmen beteiligt sind und sowohl unter bestimmten Versuchsbedingungen als auch in vivo eine effektive Toxoplasmostase aufweisen, andererseits dienen sie jedoch als Reservoir für *Toxoplasma gondii*. Es bestehen komplexe Zusammenhänge zwischen der humoralen und zellulären Immunabwehr, in immunkompetenten Individuen wird *Toxoplasma gondii* jedoch vorwiegend durch das zelluläre Immunsystem, den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, kontrolliert. Diese Zellen produzieren Zytokine, welche beispielsweise antiparasitäre Effektormechanismen in humanen Makrophagen induzieren.

In dieser Arbeit wurden die immunologischen Mechanismen untersucht, die im Rahmen der Toxoplasmenabwehr von Bedeutung sind. Es wurde eine Quantifizierung der Toxoplasmenvermehrung in den humanen Makrophagen vorgenommen und die Wirkung der Interferon  $\gamma$ -vermittelten Induktion derIDO auf die Proliferation des Erregers untersucht. Da gerade die Rolle derIDO-Induktion in der Toxoplasmenabwehr bei humanen Makrophagen kontrovers diskutiert wird (Murray et al., 1989), sollten die immunregulatorischen Vorgänge im Bezug auf den IFN $\gamma$ -vermittelten Tryptophanabbau, der neben der Produktion von Sauerstoffradikalen und der L-Arginin-abhängigen Produktion von Stickoxiden in der Literatur als antiparasitärer Mechanismus beschrieben ist, untersucht werden.

## **1. Interferon $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer Effektor-mechanismus**

L-Tryptophan ist eine essentielle Aminosäure, deren Metabolismus eine zentrale Rolle in der menschlichen Physiologie spielt. So bilden sich z.B. während der Synthese von NAD aus Tryptophan, unter Mitwirkung verschiedenster Zytokine (siehe Kapitel A.1.3.3.a), biologisch aktive Metabolite (Moroni, 1999) wie die neuroaktive Kynureninsäure (Stone, 1993) oder 3OH-Kynurenin, welches Schädigungen wie Nekrose und Apoptose verursachen kann (Okuda et al., 1998). Das Enzym im Tryptophanmetabolismus, welches in den meisten Körperzellen nachgewiesen werden konnte, ist die Indolamin 2.3-dioxygenase. Dieses Hämhaltige Enzym katalysiert, in Anwesenheit von Sauerstoff, den Tryptophanabbau zu L-N-Formylkynurenin und Kynurenin (Shimizu et al., 1978; Musso et al., 1994). Taylor und Feng beschrieben 1991 IFN $\gamma$  als den wichtigsten „Inducer“ der IDO-Aktivität. Dem von den NK- und aktivierten T-Zellen gebildeten IFN $\gamma$  wird, neben der Hemmung des Zellwachstums, die wichtigste Funktion in der Regulierung der Immunantwort und der Induktion anti-mikrobieller Effektormechanismen zugeschrieben (Farrar und Schreiber, 1993).

Die Induktion der IDO erfolgt durch Bindung des IFN $\gamma$ -Liganden an den Zelloberflächenrezeptor, mit nachfolgender Aktivierung des JAK/STAT-Weg und Induktion des IDO-Gens (Hassanain et al., 1993).

Eine Beschreibung der IDO-Aktivität, als antiparasitärer Effektormechanismus, insbesondere im Bezug auf *Toxoplasma gondii*, erfolgte erstmalig 1984 durch Pfefferkorn. Es wurde eine, durch den Tryptophanmangel verursachte, Wachstumshemmung von Toxoplasmen in humanen Fibroblasten beobachtet, die durch Zusatz von L-Tryptophan aufgehoben werden konnte. *Toxoplasma gondii* Linien, die das Tryptophansynthese-Gen von *Escherichia coli* tragen, d.h. mit dem trpB-Gen von *E.coli* transfeziert sind, können nicht durch IFN $\gamma$ -aktivierte Zellen gehemmt werden (Sibley et al., 1994), welches die Annahme bestätigt, daß es sich bei dem IDO-vermittelten Tryptophanabbau um einen wichtigen antitoxoplasmatischen Effektormechanismus handelt. Nicht nur in den oben genannten Fibroblasten, sondern auch in humanen Epithel- und Astrozytomzellen

(Däubener und Hadding, 1997) konnte eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums über die  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelteIDO-Aktivierung gezeigt werden.

Aufgrund der häufigen ZNS-Beteiligung bei chronischen Infektionen wurde zur Untersuchung der immunologischen Zusammenhänge in Gehirnzellen 1992 von Däubener et al. ein in-vitro Modell der zerebralen Toxoplasmose entwickelt. Bestehend aus humanen Glioblastomzellen konnte eine Toxoplasmeninfektion in vivo simuliert, und die Wirkung von rekombinanten  $\text{IFN}\gamma$  im Bezug auf die Induktion des zuvor beschriebenen Effektormechanismus gezeigt werden.

Da sich dieses Modell für die Untersuchung derIDO-Induktion bewährt hat, und sich gut replizieren ließ, wurde es im Rahmen dieser Arbeit auf humane Makrophagen angewendet. Um eine korrekte Durchführung der Experimente gewährleisten zu können wurden die Glioblastomzellen, bei welchen die Induktion derIDO als anti-toxoplasmatischer Mechanismus nachgewiesen werden konnte, als Positivkontrolle verwendet.  $\text{IFN}\gamma$ , in einer Konzentration von 200-500U/ml, kann in Glioblastomzellen der Linie 86HG39 eine bis zu 80%ige Toxoplasmostase induzieren (Däubener et al., 1996).

In humanen Makrophagen wird die Rolle derIDO als Mechanismus in der Toxoplasmenabwehr kontrovers diskutiert.

Carlin sowie Ozaki beschrieben 1987 die Aktivierung von peripheren Blutmonozyten durch  $\text{IFN}\gamma$ , und die dadurch vermittelte Aktivität derIDO mit resultierendem Tryptophanabbau. Murray et al. diskutierten 1989 den Zusammenhang zwischen  $\text{IFN}\gamma$ -induziertem Tryptophanabbau, als Oxidative-burst-unabhängigen Mechanismus, und resultierender Toxoplasmostase. Sowohl in Blut- als auch in Gewebsmakrophagen konnte  $\text{IFN}\gamma$  diesen Effektormechanismus vermitteln, wobei er nicht für alle Populationen relevant erscheint. So ist beispielsweise für aktivierte Alveolarmakrophagen und frische Monozyten ein verminderter Effekt beschrieben (Murray et al., 1989).

Unter Verwendung des für Glioblastomzellen beschriebenen Infektionsmodells konnten wir zeigen, daß in den von uns benutzten, aus Monozyten gereiften, Makrophagen (MDM) eine  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Wachstumshemmung der Toxoplasmen vorliegt (Abbildung C5). Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen der dazugehörigenIDO-Induktions-Messung (Abbildung C4), zeigt sich jedoch eine Diskrepanz zwischen dem Auftreten des antiproliferativen Effektes und der

Bildung von meßbaren Kynurenin. Ein relevanter Tryptophanabbau scheint erst bei einem IFN $\gamma$ -Gehalt von 250-500 U/ml zu erfolgen, die Wachstumshemmung setzt jedoch schon bei wesentlich geringeren Konzentrationen ein, so daß sich die Frage stellt, ob wirklich der Mangel an dieser Aminosäure verantwortlich für die antiparasitäre Wirkung ist.

In der Literatur ist für verschiedene Zellen ein potenzierender Effekt der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Induktion durch TNF $\alpha$  beschrieben (Carlin und Weller, 1995, Däubener und Hadding, 1997), woraus sich eine Verstärkung des antiparasitären Effektes begründet. Angewendet auf unser in vitro Modell zeigt TNF $\alpha$ , wie in der Literatur beschrieben (Carlin et al., 1987), alleine keine stimulierende Aktion. Erst durch die simultane Stimulation der humanen Makrophagen mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  kann die IDO-Aktivität, und somit die Bildung von Kynurenin, erhöht werden. Die zu erwartende Verstärkung der Toxoplasmenhemmung, wie sie sich für Glioblastomzellen der Linie 86HG39 zeigt, ist jedoch hier nur eingeschränkt zu beobachten (Abbildung C5), so daß die Rolle des Tryptophanabbaus, als antitoxoplasmatischer Mechanismus in MDM in Frage gestellt ist.

Nachdem für Fibroblasten (Pfefferkorn, 1984) und Glioblastomzellen (Däubener et al., 1996) sowie im Rahmen dieser Arbeit auch für humane Astrozyten gezeigt werden konnte, daß durch Resupplementation dieser Aminosäure die antiparasitäre Wirkung aufgehoben werden konnte, sollte dieser Zusammenhang nun auch für humane MDM gezeigt werden.

Da im Gegensatz zu den oben genannten Zellen die IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmostase in humanen MDM trotz Zusatz größter Mengen an L-Tryptophan nicht abgeschafft werden konnte, scheint also nicht allein der Tryptophanverlust für die parasitäre Abwehr in den humanen Makrophagen verantwortlich zu sein. Es ist zu diskutieren, ob nicht das IDO-induzierte Entstehen von toxischen Tryptophanmetaboliten eine Rolle spielt, welche eventuell schon bei geringeren IFN $\gamma$ -Konzentrationen, also vor Bildung meßbarer Mengen an Kynurenin, antiparasitär wirken.

Diese Vermutung scheint zunächst widerlegt durch die kontrovers diskutierte Induktion der IDO durch Zytokine wie IFN- $\alpha$  und - $\beta$ .

Sollten die beiden zuvor genannten Zytokine, ebenso wie IFN $\gamma$ , die IDO induzieren, wie es von Carlin et al. 1987 und Ozaki et al. 1987 für periphere

Blutmonozyten beschrieben wurde, dann entsteht auch hier entweder ein Tryptophanmangel oder toxische Metabolite, und das Toxoplasmenwachstum sollte entsprechend beeinflusst werden. Murray konnte jedoch zeigen, daß sich *Toxoplasma gondii* frei in MDM, die mit diesen Zytokinen inkubiert wurden, replizieren kann, obwohl auch hier ein meßbarer, wenn auch nicht kompletter, Tryptophanabbau stattgefunden hat.

Diese Beobachtungen sind beispielsweise durch die Annahme in Einklang zu bringen, daß  $\text{IFN}\gamma$ , im Gegensatz zu  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\beta$ , simultan zurIDO-Induktion einen weiteren Abwehrmechanismus induziert, der in humanen MDM unabhängig vom Tryptophanmangel ist, da er durch Resupplementation eben nicht aufgehoben werden kann. Hierbei könnte es sich beispielsweise um eine  $\text{IFN}\gamma$ -abhängige Produktion von toxischen, beim Tryptophanabbau entstandenen Substanzen handeln, die bei den durch  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\beta$  induzierten Metabolisierungsprozessen nicht entstehen.

An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, daß in den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Versuchsreihen weder  $\text{IFN}\alpha$  noch  $\text{IFN}\beta$  alleine in humanen MDM eine meßbareIDO-Aktivität vermitteln konnten (MacKenzie et al., 1999).

Sicherlich ist eine regulatorisch wirksame Beeinflussung der zytokininduzierten Effektormechanismen untereinander zu diskutieren. Neben der Degradation des Tryptophans existieren in der Abwehr intrazellulärer Parasiten noch weitere Mechanismen, welche durch die von T-Zellen gebildeten Zytokine induziert werden. Wie bereits in Kapitel A.1.3.3. beschrieben, handelt es sich hierbei um die Produktion toxischer Sauerstoffradikale und die  $\text{IFN}\gamma$ -vermittelte Bildung von Stickoxiden. Die Bedeutung der einzelnen Mechanismen ist abhängig vom infizierenden (Parasit) sowie vom infiziertem Organismus (Wirt). Die Stickoxidproduktion beispielsweise ist der wichtigste Abwehrmechanismus in Nagetier-Makrophagen (Liew und Cox, 1991), wohingegen er in humanen Makrophagen eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Schneemann et al., 1993). In humanen uroepithelialen Zelllinien kann durch Inkubation mit  $\text{IFN}\gamma$  sowohl die Produktion von Nitrit-Oxid als auch die Induktion derIDO-Aktivität nachgewiesen werden, für beide Mechanismen ist eine Beteiligung an der Toxoplasmenabwehr beschrieben. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß in Gegenwart von NO dieIDO-Aktivität gehemmt wurde, auch wenn die Produktion

von Stickoxiden keinen ausreichenden antiparasitären Effekt erbrachte (Däubener und MacKenzie, 1999), so daß hier eine regulatorische Funktion, eine gegenseitige Beeinflussung der Mechanismen eine Rolle spielen kann. In humanen peripheren Blutmonozyten wurde ebenfalls eine Hemmung der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität durch NO beschrieben (Thomas et al., 1994).

Zusammengefaßt ergeben die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf, daß in den von uns verwendeten Makrophagen durch die Inkubation mit Interferon $\gamma$  neben dem IDO-vermittelten Tryptophanmangel ein Effektormechanismus aktiviert wird, der in der Toxoplasmenabwehr dieser Zellen eine wesentlich stärkere Rolle spielt. Hierbei ist insbesondere die Entstehung toxischer Metabolite zu diskutieren und eine gegenseitige Beeinflussung beider Mechanismen im Sinne einer Regulation nicht auszuschließen.

## **2. Interleukin (IL)-10**

Das humane Interleukin-10, dessen Gen auf dem Chromosom 1 lokalisiert ist, ist ein anti-entzündliches Zytokin, welches die Synthese der proinflammatorischen Zytokine und Chemokine hemmt.

Es reguliert als TH<sub>2</sub>-Typ-Zytokin die humoralen Immunantworten hoch und scheint im Gegensatz dazu die Zell-vermittelten Immunreaktionen, insbesondere die Zytokin-Synthese, zu bremsen (Opal et al., 1998).

Identifiziert und lokalisiert wurde das humane Interleukin mit Hilfe von Kreuz-Hybridisierungen unter Verwendung von cDNA-Klonen des Mäuse-IL-10. Die DNA-Sequenzen der beiden Zytokine stimmen in über 80% überein (Kim et al., 1992), in der Tertiärstruktur weist das humane Interleukin-10 deutliche Übereinstimmungen zu IFN $\gamma$  auf (Zdanov et al., 1996). 1993 wurde erstmals eine Ähnlichkeit zwischen der Konstitution des IFN $\gamma$ -Rezeptors und des Rezeptor des Interleukin-10 nachgewiesen (Ho et al., 1993), so daß dies sicherlich eine Ursache für die gegenseitige antagonisierende Wirkung beider ist. Beide zeigen eine hohe Affinität und werden in den verschiedensten Zelllinien gefunden.

Durch das Auftreten von Endotoxinen induziert, wird Interleukin-10 in vielen verschiedenen Zelltypen, wie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Keratinozyten gebildet (Pajkart et al., 1997). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Makrophagen scheinen jedoch das dominierende Gewebe im Bezug auf die IL-10 - Synthese zu sein (de Vries et al.; 1995). Beschrieben ist eine Aktivierung auf der Transkriptionsebene durch Interaktion von „nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF $\kappa$ B) und cAMP ( Moore et al., 1993), welche erst deutlich nach der durch IL-1, IL-12 und TNF- $\alpha$  gekennzeichneten frühen, proinflammatorischen Immunreaktion einsetzt (van der Poll et al., 1997). Diese Beobachtung läßt die Annahme zu, daß die Freisetzung von IL-10 ein natürlicher Abwehrmechanismus ist, der eine überschießende Entzündungsausbreitung verhindern soll. IL-10 hemmt des weiteren die Produktion von IL-12, Stickstoffmonoxid (Gazinelli et al., 1992), dem Tumornekrosefaktor und dem in der Arbeit verwendeten und schon im Bezug auf die antagonisierende Wirkung erwähnten TH<sub>1</sub>-Typ Zytokin IFN $\gamma$  (Terminelli et al., 1996).

Aber auch die Synthese von IL-10 selbst wird von Zytokinen wie das IL-4, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  begrenzt und kontrolliert (Chomarat et al.; 1993). Des weiteren unterstützen Glucokortikoide die Zytokinantwort vom TH<sub>2</sub>-Typ bei gleichzeitiger Abschwächung der TH<sub>1</sub>-Reaktion (Lebel et al., 1988). Letztlich sei hier auch noch die Herunterregulation der mRNA-Synthese durch das Zytokin IL-10 selbst erwähnt (Brown et al. 1996).

Bei dem Interleukin-10 sind zwei unterschiedliche Wirkungsweisen im Körper bekannt. Einerseits die bereits oben erwähnte, anti-entzündliche Eigenschaft, durch welche eine Vielzahl der entzündlichen Aktivitäten antigenpräsentierender Zellen deaktiviert werden (Bogdan et al., 1991). Ihr gegenüber steht eine immunstimulatorische Komponente welche die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen des Immunsystems begünstigt und Antikörper-abhängige zelluläre zytotoxische Reaktionen fördert (Moore et al.; 1993).

Die bisher in der Literatur beschriebenen Infektionsmodelle zeigen eine Abhängigkeit der IL-10-vermittelten Effekte von dem Infektionsort und dem infizierenden Mikroorganismus, so daß sich für uns die Frage stellte welche Rolle dieses Interleukin bei einer Toxoplasmeninfektion spielt. Für die Pathogenese immunsuppressiver Vorgänge bei Infektionen mit Leishmanien, Schistosomen und *Mycobacterium leprae* konnte bereits eine Beteiligung des TH<sub>2</sub>-Zytokins nachgewiesen werden (Finkelmann et al., 1991; Heinzl et al., 1991; Yamamura et al., 1991).

1995 veröffentlichten Khan et al. eine IL-10 vermittelte Immunsuppression bei Infektionen mit *Toxoplasma gondii* in Mäusen. In dieser Studie konnte sowohl in Makrophagen als auch in T-Zellen infizierter Labormäuse eine Produktion dieses löslichen Interleukins nachgewiesen werden. Am 7. Tag nach der Infektion fand sich sowohl eine Reduktion der IFN $\gamma$ -Konzentration im Zellüberstand, als auch eine verminderte Expression der IFN $\gamma$ -mRNA. Diese Immunregulation konnte durch die Zugabe von anti-IL-10-Antikörper bis zu 50% aufgehoben werden, so daß sich auch hier erneut Hinweise dafür ergaben, daß IL-10 ein potenter Antagonist des IFN $\gamma$  ist. Da bei Mäusen andere Effektormechanismen in der Toxoplasmenabwehr diskutiert werden als in humanen Zellen (s.A. 1.3.3), wurde in der vorliegenden Arbeit nun die Wirkung von IL-10 auf denIDO-vermittelten Tryptophanabbau untersucht.

Wir konnten eine Hemmung der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Induktion in humanen MDM nachweisen, welche durch die Zugabe von neutralisierenden anti-IL-10-Ak aufgehoben werden konnte (Abbildung C7). Auch hierbei zeigte sich wieder die gegensätzliche Wirkungsweise von IL-10 und IFN $\gamma$ . Auf welche Art und Weise das Zytokin nun auf das IDO-System wirkt ist nicht geklärt. Ein direkter Effekt auf die Aktivierung ist jedoch nicht auszuschließen.

Andererseits stellten Dickensheets und Donnelly 1997 eine Verbindung zwischen IL-10 und einem Transkriptionsfaktor her, der ein Vermittler der suppressiven Effekte von IL-10 und IFN $\gamma$  zu sein scheint. Sie brachten IL-10 mit einem abnehmenden Transfer dieses STAT6 (IL-4/IL-13-induzierter Transkriptionsfaktor) in den Kern in Verbindung, wodurch eine Hemmung des IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Transkriptionsfaktors, und somit eine verminderte IDO-Aktivität bewirkt werden kann. Eine solche Wirkungsweise in unserem System ist sicherlich ebenfalls in Betracht zu ziehen.

Bei der Ermittlung der zugehörigen Toxoplasmendaten erwarteten wir zunächst eine IL-10-vermittelte Aufhebung der Proliferationshemmung. Dieser immunsuppressive Effekt konnte jedoch, nach Ausschluß einer Beeinflussung des Wachstums, nicht nachgewiesen werden (Abbildung C8).

Da Interleukin-10, wie zuvor beschrieben, eine Hemmung des IFN $\gamma$ -vermittelten Tryptophanabbau zeigt, das Toxoplasmenwachstum jedoch hierbei unbeeinflusst zu sein scheint, ist hier erneut die IDO als einziger und wichtigster Effektormechanismus im Rahmen der Toxoplasmenabwehr in humanen MDM anzuzweifeln.

### **3. Interleukin(IL)-10 hemmt die TNF $\alpha$ -Produktion**

Für das IDO-System sind potenzierende, durch TNF $\alpha$  hervorgerufene Effekte (s.D.1) beschrieben. Dieses Zytokin wird nach Stimulation mit LPS oder GBS (Goodrum et al., 1995) von humanen Makrophagen gebildet. TNF $\alpha$  wiederum stimuliert in NK- und spezifischen T-Zellen die Freisetzung von IFN $\gamma$  mit den zuvor beschriebenen antiparasitären Effekten. In unserer Arbeitsgruppe konnte des weiteren nach Stimulation mit IFN $\gamma$  die Anwesenheit der TNF $\alpha$  mRNA in MDM mittels RT-PCR gemessen werden. Die Konzentration an TNF $\alpha$ -Protein zeigte sich an dieser Stelle jedoch unter der Nachweisgrenze. Somit ergab sich der Verdacht, daß diese Form der TNF-Produktion als ein autokriner Verstärkermechanismus dienen könnte, mit dem Ergebnis einer erhöhten IDO-Expression. Wie bereits zuvor erwähnt, ist eine Begrenzung solcher Immunreaktionen notwendig um überschießende Immunantworten, mit beispielsweise der Folge eines Sepsis-Syndromes, zu verhindern. In diesem Zusammenhang werden in komplizierten klinischen Fällen Therapien mit inhibitorischen Substanzen diskutiert (Pajkart et al., 1997; Gomez et al., 1995). Marchant et al. beschrieben bereits 1994 Interleukin-10 als potenten Inhibitor von TNF.

Wir konnten ebenfalls zeigen, daß IL-10 die durch LPS-induzierte TNF $\alpha$ -Produktion in humanen MDM komplett hemmt. Die Spezifität dieser Synthesehemmung konnte durch die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern bestätigt werden (Abbildung C9).

Aufgrund der zuvor beschriebenen Produktion von TNF $\alpha$  durch MDM war es nun Ziel dieser Arbeit zu ermitteln, ob die IL-10-vermittelten Effekte auf unser Modell ausschließlich der Reduktion, oder der quantitativen Hemmung der Produktion dieses Faktors zu zuschreiben sind.

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde (Abbildung C10), konnte tatsächlich die erwartete Reduktion, wenn auch unvollständig, erreicht werden. Da die komplette IDO-Aktivitätshemmung jedoch erst durch Kombination von IL-10 und anti-TNF $\alpha$ -Ak erreicht wurde (additiver Effekt), ergeben sich Hinweise auf das Vorliegen weiterer IL-10 abhängiger Prozesse, die parallel und unabhängig von TNF $\alpha$  abzulaufen scheinen. Durch Zugabe beider Substanzen im Überschuß wurde

erreicht, daß beide ihre volle Wirksamkeit entfalten konnten. Wang et al. erklärten 1995 die IL-10-vermittelte Hemmung der Produktion entzündlicher Zytokine, wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , in humanen Monozyten durch eine Blockierung der Gen-Transkription. Diese erfolgt über eine Hemmung des Transfer des „nuclear factor  $\kappa\text{B}$ “ vom Zytoplasma zum Kern, welche auch bei der zuvor erwähnten Aktivierung der IL-10-Synthese involviert ist (Moore et al., 1993). Es ist möglich, daß in dem von uns verwendeten in vitro System eine Beteiligung dieses Faktors vorliegt und hierdurch die  $\text{IFN}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität potenziert wird. Durch die zuvor beschriebene IL-10-vermittelte Transferhemmung des Faktors wäre dann beispielsweise der hemmende Effekt auf das IDO-System zu erklären.

Insgesamt scheint IL-10 jedoch, unter Berücksichtigung sämtlicher in vitro Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen, eine interessante Perspektive für die Behandlung infektiöser und entzündlicher Erkrankungen zu bieten. Durch Kombination eradizierender Medikamenten mit IL-10 kann, sowohl in der Behandlung bakterieller als auch parasitärer Erkrankungen, eine effektive und trotzdem für den Wirt nicht schädliche Abwehr bewirkt werden. Krankheitsverläufe mit der Folge eines septischen Schocks könnten somit verhindert werden (Opal et al.; 1997). In ersten experimentellen Anwendungen einer solchen Kombinationstherapie, bei einer durch Listerien verursachten Meningitis, konnte bereits ein Benefit für den infizierten Organismus erzielt werden (Paris et al.; 1997).

#### **4. Interleukin (IL)- 4**

Nachdem die IL-10 vermittelten Effekte auf die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Expression untersucht wurden, stellte sich nun die Frage wie ein anderes, auch als inhibitorische Substanz bekanntes, Zytokin auf dieses System wirkt.

Bei Interleukin (IL)-4 handelt es sich ebenfalls um ein Zytokin vom TH<sub>2</sub>-Typ, dem eine duale Rolle in der Abwehr mononukleärer Phagozyten zugeschrieben wird (Musso et al., 1994).

Auf der einen Seite kann IL-4 die Aktivierung einiger Abwehrezellen herunter regulieren (Cox et al., 1991) und Immunantworten, die durch das TH<sub>1</sub>-Typ Zytokin IFN $\gamma$  oder durch IL-2 induziert wurden, antagonisieren. Hierzu zählen beispielsweise die Produktion von TNF $\alpha$  (Hart et al., 1989), IL-6 (te Velde et al., 1990; Cheung et al., 1990) oder IL-1 (Donnelly et al., 1990). Somit sind bezüglich der inhibitorischen Wirkungsweise in mononukleären Phagozyten deutliche Parallelen zu IL-10 zu finden. Neben TGF $\beta$  und IL-10 ist IL-4 also ein weiteres Zytokin, dem eine Makrophagen-deaktivierende Wirkung zugeschrieben wird (Bogdan et Nathan, 1993).

Andererseits findet man in der Literatur zahlreiche Beispiele für eine Monozyten stimulierende Funktion. So diskutierten Weiser et al. 1989 beispielsweise die IL-4 vermittelte Sekretion von Kolonie stimulierenden Faktoren (CSF) für Makrophagen. Des weiteren konnte in Versuchen mit Maus-Makrophagen eine durch IL-4 induzierte MHC (major histocompatibility complex) Klasse I und II Antigen Expression gezeigt werden (Stuart et al., 1988).

Eine Induktion des IL-1 Rezeptors Typ I und II durch IL-4 ist ebenfalls beschrieben (Colotta et al., 1993 und 1996), die jedoch durch IFN $\gamma$ , aber auch durch IL-10 gehemmt werden kann (Dickensheets et al., 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden ob und wenn welche immunregulatorische Funktion das Interleukin (IL)- 4 bei der Toxoplasmeninfektion übernimmt.

Musso veröffentlichte bereits 1994 die Ergebnisse seiner Arbeitsgruppe mit 18 Stunden alten humanen Monozyten, die einen inhibitorischen Effekt von IL-4 auf

das IDO-System aufzeigten. Damals ergaben sich so erste Hinweise auf eine negative Beeinflussung des Tryptophankatabolismus.

Da Bogdan und Nathan 1993 eine Abhängigkeit der Wirkungsweise sowohl von der verwendeten Zytokinkonzentration, als auch von dem Differenzierungs- und Aktivierungsgrad der Makrophagen beschrieben, führten wir die Versuchsreihe mit den aus humanen Monozyten gereiften Makrophagen durch.

Bei Stimulation humaner MDM mit  $\text{IFN}\gamma$  in Gegenwart von IL-4 zeigte sich ein IL-4-vermittelter inhibitorischer Effekt auf die  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivierung (Abbildung C11) mit resultierender Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums (Abbildung C12).

In weiteren Versuchen unserer Arbeitsgruppe (MacKenzie et al., 1999) konnte, ebenso wie in den Experimenten mit IL-10, gezeigt werden, daß der regulatorische Effekt des IL-4 nicht alleine in der zuvor beschriebenen Hemmung der  $\text{TNF}\alpha$ -Produktion der Makrophagen liegt. Durch IL-4 konnte eine viel stärkere Hemmung der IDO erreicht werden, als durch Zugabe neutralisierender  $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper. Im Gegensatz zu den Versuchen mit IL-10 konnte durch Anwesenheit von IL-4 und neutralisierenden  $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern jedoch keine Verstärkung erreicht werden. Hierfür könne verschiedene Ursachen verantwortlich sein. Einerseits besteht die Möglichkeit, daß beide Zytokine auf dem gleichen Signalweg wirken oder daß die Effekte von IL-4 zentraler liegen.

Wie zuvor erwähnt wird eine IL-10-vermittelte Hemmung der Zytokinbildung über die Aktivitätsminderung des  $\text{NF}\kappa\text{B}$  diskutiert. Wang et al. verglichen 1995 den Wirkungsort von IL-4 und IL-10. IL-4 zeigt jedoch nur geringe Effekte bezüglich der Beeinflussung von  $\text{NF}\kappa\text{B}$ . Vielmehr scheint dieses Interleukin die mRNA Degeneration zu begünstigen, so daß IDO-induzierende Zytokine eventuell schon vor Beginn der Translation angegriffen werden, oder die IDO mRNA direkt durch IL-4 vermindert wird.

Diese Ergebnisse mit IL-4 lassen erkennen, daß eine sensible immunologische Kontrolle des Tryptophanmetabolismus existiert. Es zeigt sich erneut, daß die IDO-Expression sowohl unter dem positiven, verstärkenden Einfluß des  $\text{IFN}\gamma$  steht, als auch unter einem weiteren inhibitorischen Effekt, dem von IL-4.

Ob nun das Entstehen toxischer Metabolite durch IL-4 verhindert wird, oder die Beeinflussung eines weiteren, durch  $\text{IFN}\gamma$ -induzierten, antitoxoplasmatischen

Effektormechanismus stattfindet, bleibt ungeklärt. Die für Gruppe B Streptokokken beschriebene Aufhebung der Bakterio­stase durch IL-10 und IL-4 konnte für die Toxoplasmeninfektion zumindest nicht nachgewiesen werden, welches gegen die IDO als wichtigsten Effektormechanismus in der Toxoplasmenabwehr der MDM spricht.

Eine Vorhersage von Immunreaktionen in vivo, auf der Basis von Ergebnissen aus in vitro-Versuchen mit isolierten Makrophagen ist aufgrund der verschiedenen Wirkungsweisen, in Abhängigkeit vom Zelltyp und gegenseitiger Beeinflussung schwierig und bedarf weiterer intensiver Forschung.

## **E. Zusammenfassung**

Die Stimulation von humanen MDM mit Interferon  $\gamma$  induziert das L-Tryptophan abbauende Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO). In der Literatur ist gut dokumentiert, daß das Wachstum einiger intrazellulärer Parasiten, wie z.B. *Toxoplasma gondii* in humanen Glioblastomzellen, durch den IDO-vermittelten L-Tryptophan Abbau inhibiert ist.

Wir konnten in humanen MDM keinen direkten Zusammenhang zwischen der durch IFN $\gamma$ -vermittelten Tryptophandegradation und einem antitoxoplasmatischen Effekt aufzeigen. Es finden sich Anhaltspunkte dafür, daß es sich bei dem so verursachten Tryptophanmangel nicht um den einzigen antitoxoplasmatischen Mechanismus humaner MDM handelt, da in Resupplementations-Versuchen keine Aufhebung des antiparasitären Effektes erreicht werden konnte. Neben der Entstehung toxischer Metabolite ist die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion weiterer, eventuell parallel ablaufender, Abwehrreaktionen in Erwägung zu ziehen.

Die IDO als antiparasitärer Effektormechanismus unterliegt einer Immunregulation. Sie wird in humanen Makrophagen durch Interferon  $\gamma$  induziert und kann durch simultane Stimulation mit TNF $\alpha$  verstärkt werden. Wie im Rahmen der Arbeit gezeigt werden konnte besteht darüber hinaus eine Inhibition dieser Immunreaktion durch die Zytokine IL-10 und IL-4. Beiden wird eine wichtige Rolle in der Immunaktivierung auf unterschiedlichem Zellniveau zugeschrieben, so beispielsweise die Produktions- und Sekretionshemmung von TNF $\alpha$ . Unter isolierter Betrachtung des anti-TNF $\alpha$  sekretorischen Effektes fand sich für beide Zytokine der Beweis für das Ablaufen TNF $\alpha$ -unabhängiger Prozesse.

Eine Beeinflussung der Toxoplasmostase blieb bei IL-10 aus, für IL-4 zeigte sich eine minimale Aufhebung der Toxoplasmostase.

## **F. Literaturverzeichnis**

1. Alexander,J.; Scharon-Kersten,T.M.; Yap,G.; Roberts,C.W.; Liew,F.Y.; Sher,A.; 1997: Mechanisms of innate resistance to *toxoplasma gondii* infection. Phil.Trans.R.Soc.Lond.B. 352:1355.
2. Anderson,S.E.; Remington,J.S.; Bautista,S.; 1976: Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocytes products. J.Immunol. 117:381.
3. Anderson,S.E.; Remington,J.S.; 1974: Effect of normal and activated macrophages on *Toxoplasma gondii*. J.Exp.med. 139:1154.
4. Bertholet,S.; Tzeng,E.; Felley-Bosco,E.; Mauel,J.; 1999: Expression of the inducible NO-synthase in human monocytic U937 cells allows high output nitric oxide production. J.Leukocyte Biology 65:50.
5. Bilzer,T.; Stavrou,D.; Dahme,E.; Keiditsch,E.; Bürring,K.F.; Anzil,A.P.; Wechsler,W.; 1991: Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. Virchows Archiv A Pathol.Anat. 418:281.
6. Bogdan,C.; Vodovotz,Y.; Nathan,C.; 1991: Macrophage deactivation by interleukin-10. J.Exp.Med. 174:1549.
7. Bogdan,C. and Nathan,C.; 1993: Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. Ann.NY Acad.Sci. 685:713.
8. Brown,C.; Lagnado,C.; Vadrás,M.; Goodall,G.; 1996: Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10. J.Biol.Chem. 271:20108.
9. Carlin,J.M.; Borden,E.C.; Sondel,P.M.; Byrne,G.I.; 1987: Biological response modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. J.Immunol. 139:2414.
10. Carlin,J.M., Borden,E.C.; Sondel,P.M.; Byrne,G.I.; 1989(a): Interferon induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.J.Leukoc.Biol. 45:29.
11. Carlin,J.M.; Borden,E.C.; Byrne,G.I.; 1989(b): Interferon induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. J.Interferon Res. 9:329.
12. Carlin,J.M.; Weller,J.B.; 1995: Potentiation of interferon-mediated inhibition of chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. Infect. Immun. 63:1870.
13. Catterall,J.R.; Black,C.M.; Levnthal,J.P.; Rizk,N.W.; Wachtel,J.S., Remington,J.S.; 1987: Nonoxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages. Infect.Immun. 55:1635.
14. Cheung,D.; Hart,P.; Vitti,G.; Whitty,G.; Hamilton,T.; 1990: Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. Immunol. 71:70.
15. Chomarat,P.; Rissoan,N.; Banchereau,J.; Miossec,P.; 1993: Interferon gamma inhibits interleukin-10 production by monocytes. J.Exp.Med. 177:523.
16. Colotta,F.; Muzio,M.; Bertini,R.; Poletarutti,N.; Sironi,M.; Giri,J.; Dower,S.; Sims,J.; Mantovani,A.; 1993: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. Science 261:472.

17. Colotta,F.; Saccani,S.; Giri,J.; Dower,S.; Sims,J.; Introna,M.; Mantovani,A.; 1996: Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J.Immunol.* 156:2534.
18. Cox,G.; Chattopadhyay,U.; Oppenheim,J.; Varesio,L.; 1991: IL-4 inhibits the costimulatory activity of IL-2 or picolinic acid but not of lipopolysaccharide on IFN- $\gamma$ -treated macrophages. *J.Immunol.* 147:3809.
19. Däubener,W.; Seghrouchi-Zennati,S.; Wernet,T.; Bilzer,T.; Fischer,H.G.; Hadding,U.; 1992: Human glioblastoma cell line 86HG39 activates T cells in an antigen specific major histocompatibility complex class II-dependent manner. *J.Neuroimmunol.* 41:28.
20. Däubener,W. and Hadding,U.; 1997: Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. *Med.Microbiol.Immunol.Berl.* 85:195.
21. Däubener,W.; Pilz,K.; Seghrouchni,S.; Bilzer,T.; Fischer,H.-G.; Hadding,U.; 1993: Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by IFN $\gamma$  . *J.Neuroimmunol.* 43:31.
22. 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  $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Eur.J.Immunol.* 26:487.
23. Däubener,W.; Wangat,N.; Pilz,K.; Seghrouchni-Zennati,S.; Fischer,H.G.; Hadding,U.; 1994: A new, simple bioassay for human IFN $\gamma$ . *J.Immunol.Meth.* 168:39.
24. Däubener,W. and MacKenzie,C.; 1999: IFN $\gamma$  activated indoleamine 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, NY.
25. Desmonts,G.; Daffos,F.; Forestier,F.; Capella-Pavlovski,M.; Thulliez,P.; Chartier,M.; 1985: Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *Lancet* 1(8427):500.
26. De Vries,J. 1995: Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin-10. *Ann.Med.* 27:537.
27. Dickensheets,H.L. and Donnelly,R.; 1997: IFN $\gamma$  and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J.Immunol.* 159:6226.
28. 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.* 141:2407.
29. Dönges,J.; 1988: *Parasitologie.* (2.Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
30. Donnelly,R.; Fenton,M.; Finbloom,D.; Gerrard,T.; 1990: Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN $\gamma$  and IL-4. *J.Immunol.* 145:569.
31. Eckert,J.; 1998: *Protozoologie, Toxoplasma gondii .* Medizinische Mikrobiologie. (8.Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
32. Esparza,I.; Männel,D.; Ruppel,A.; Falk,W.; Krammer,P.H.; 1987: Interferon  $\gamma$  and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J.Exp.Med.* 166:589.
33. Farrar,M.A.; Schreiber,R.D.; 1993: The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Ann.Rev.Immunol.* 11:571.
34. Feng,W.; Taylor,M.W.; 1989: Interferon- $\gamma$  resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 86:7144.

35. Finkelmann,F.D.; Pearce,E.J.; Urban,J.F.; Sher,A.; 1991: Regulation and biological function of helminth induced cytokine responses. *Immunol.Parasitol.Today.* 12:A62.
36. Fuhrman,S.A.; Joiner,K.A.; 1989: *Toxoplasma gondii*: mechanism of resistance to complement - mediated killing. *J.Immunol.* 142:940.
37. Gazinelli,R.T.; Oswald,I.; James,S.; Sher,A.; 1992: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. *J.Immunol.* 148:1792.
38. Gomez,J.; Martin,M.; Sauri,R. et al.; 1995: Interleukin-10 and the monocyte-macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J.Infect.Dis.* 171:472.
39. Goodrum,K.J.; Dierksheide,J.; Yoder,B.J.; 1995: Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induce nitric oxide in group-B streptococcus-treated macrophages. *Infect.Immun.* 63:3715.
40. Hahn.; Falke; Kaufmann; Ullmann; 1999: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* (3.Auflage)/(Springer-Verlag, Berlin).
41. Hart,P.; Vitti,G.; Burgess,D.; Whitty,G.; Piccoli,D.; Hamilton,J.; 1989: Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: supression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and prostaglandin E<sub>2</sub>. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:3803.
42. Hassanain,H.H.; Chon,S.Y.; Gupta,S.L.; 1993: Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons  $\gamma$  and  $\alpha$ . Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon $\gamma$ -inducible DNA-binding factor. *J.Biol.Chem.* 268:5077.
43. Heizmann,W.; Döller,G.; 1991: *Medizinische Mikrobiologie,* Schattauer-Verlag.
44. Heinzl,F.P.; Sadick,M.D.; Mutha,S.S.; Locksley,R.S.; 1991: Production of interferon-gamma, interleukin-2, interleukin-4 and interleukin-10 by CD4<sup>+</sup> positive lymphocytes in vitro during healing and progressive leishmaniasis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 88:7011.
45. Herold,G.; 1999: *Innere Medizin,* Köln.
46. Hissong,B.D.; Byrne,G.I.; Marcia,L.P.; Carlin,J.M.; 1994: Upregulation of Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide and interleukin-1. *Cell.Immun.* 160:264.
47. Ho,A.; Liu,Y.; Khan,A.; Hsu,D.; Bazan,J.; Moore,K.; 1993: A receptor for interleukin-10 is related to interferon receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90: 11267.
48. Hughes,H.P.A.; Speer,C.A.; Kyle,J.E.;Dubey,J.P.; 1987: Activation of murine macrophages and a bovine cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. *Infect.Immun.* 55:784.
49. Kayser,F.H.; Bienz,K.A.; Eckert,J.; Lindemann,J.; 1998: *Medizinische Mikrobiologie.* (9.Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
50. Khan,I.A.; Smith,K.A.; Kasper,L.H.; 1990: Induction of antigen-specific human cytotoxic T-cells by *Toxoplasma gondii*. *J.Clin.Invest.* 85:1879.
51. Khan,I.A.; Matsuura,T.; Kasper,L.H.; 1995: IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. *Paras.Immun.* 17:185.
52. Kim,JM.; Brannan,CI.; Copeland,NG.; Jenkins,MA.; Khan,T.A.; Moore,K.W.; 1992: Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal location of the mouse and human genes. *J.Immunol.* 148:3618.
53. Klein,J.; 1991: *Immunologie.* (1.Auflage) / (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim).

54. Krahenbuhl, J.L. and Remington, J.S.; 1982: The immunology of toxoplasma and toxoplasmosis. In: Immunology of parasitic infections. 2.edition. Coehen, S. and Warren, K.S.(ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp:356.
55. Lebel, M.; Frei, B.; Syrogiannopoulos, G.; 1988: Dexamethasone therapy for bacterial meningitis: results of two double-blinded, placebo-controlled trials. N.Engl.J.Med. 319:964.
56. Liew, F.Y.; Cox, F.E.G.; 1991: Nonspecific defence mechanism: Role of nitric oxide. Immunol.Parasitolo.Today 3:17.
57. Lindberg, R.E.; Frenkel, J.K.; 1977: Toxoplasmosis in nude mice. J.Parasitol. 63(2):219.
58. Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Darnell, J.; 1996: Molekulare Zellbiologie.(2.Auflage) / (W.deGruyter-Verlag, Berlin).
59. MacKenzie, C.R.; Gonzalez, R.; Kniep, E.; Roch, S.; Däubener, W.; 1999: Cytokine Mediated Regulation of Interferon gamma-Induced IDO Activation. Adv Exp Med Biol. 467:533.
60. MacKenzie, C.R.; Hadding, U.; Däubener, W.; 1998: Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. J.Infect.Dis. 178:875.
61. McLeod, R.; Estes, R.; Mack, D.G.; McLeod, E.G.; 1983: Effects of human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes on *T. gondii*. J.Infect.Dis. 147:957.
62. Marchant, A.; Bruyns, C.; van Denabeele, P.; 1994: Interleukin-10 controls interferon gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. Eur.J.Immunol. 24:1167.
63. Mehlhorn, H.; Piekarski, G.; 1992: Grundriss der Parasitenkunde. G.Fischer Verlag, Stuttgart.
64. Moore, K.; O'Garra, A.; de Waal Malefyt, R.; Vieira, P.; Mosmann, T.; 1993: Interleukin-10. Ann.Rev.Immunol. 11:165.
65. Moroni, F.; 1999: Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. Eur.J.Pharmacol. 375:87.
66. Murray, H.W.; Rubin, B.Y.; Carriero, S.M.; Harris, A.M.; Jaffe, E.A.; 1985(a): Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanism: Oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J.Immunol. 134:1982.
67. Murray, H.W.; Spitalny, G.L.; Nathan, C.F.; 1985 (b): Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and vivo by interferon- $\gamma$ . J.Immunol. 134:1619.
68. Murray, H.W.; Szuro-Sudol, A.; Wellner, D.; Oca, M.J.; Granger, A.M.; Libby, D.M.; Rothermel, C.D.; Rubin, B.Y.; 1989: Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. Infect.Immun. 57:845.
69. Musso, T.; Gusella, G.L.; Brooks, A.; Longo, D.L.; Varesio, L.; 1994: Interleukin-4 inhibits Indoleamine 2,3-dioxygenase Expression in human monocytes. Blood, 83, No.5(March1), 1408.
70. Nathan, C.F.; Murray, H.W.; Wiebe, M.E.; Rubin, B.Y.; 1983: Identification of IFN $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and microbial activity. J.Exp.Med. 158:670.
71. Okuda, S.; Nishiyama, N.; Saito, H.; Katsuki, H.; 1998: 3-Hydroxy-kynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. J.Neurochem. 70:299.

72. Opal,S.; Wherry,J.C.; Grint, P.; 1998: Interleukin-10: Potential Benefits and Possible risks in Clinical Infectious Diseases. Clin.Inf.Dis. 27:1497.
73. Opal,S.; Cross,A.; 1997: The microbial consequences of antimediator therapy for sepsis. Sepsis 1:55.
74. Ozaki,Y.; Edelstein,M.P.; Duch,D.S.; 1987: The actions of interferon and anti-inflammatory agents on induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes. Biochem.Biophys.Res.Commun. 144:1147.
75. Pajkart,D.; Camoglio,L.; Tiel-van Buul,M.; et al.; 1997: Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: the effect of timing of rhIL-10 administration. J.Immunol. 158:3971.
76. Paris,M.; Hickey,S.; Trujillo,M.; Ahmed,A.; Olsen,K.; McCracken,G.jr.; 1997: The effect of interleukin-10 on meningeal inflammation in experimental bacterial meningitis. J.Infect.Dis. 176:1239.
77. Pfefferkorn,E.R. 1984: Interferon  $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:908.
78. Pfefferkorn,E.R.; 1990: Cell biology of *Toxoplasma gondii* ;In: Modern Parasite biology . Whyler,D.J.; Freeman,W.H and Company., N.Y. pp:26.
79. Pfefferkorn,E.R.; Pfefferkorn,L.C.; 1977: Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. J.Protozool. 24(3):449.
80. Piekarski,G.; 1987: Medizinische Parasitologie. (3.Auflage)/(Springer-Verlag, Berlin).
81. Remington,J.S.; Klein,J.O.; 1990. Third Edition.WB.S. Company.
82. Schneemann,M.; Schoedon,G.; Hofer,S.; Blau,N.; Guerro,L.; Schaffner,A.; 1993: Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. J.Infect.Dis. 167:1358.
83. Schreiber,R.D.; Feldmann,H.A.; 1980: Identification of the activator system for antibody to Toxoplasma as the classical complement pathway. J.Infect.Dis. 141:366.
84. Sharma,S.D., 1990: Immunology of toxoplasmosis. In: Modern Parasite biology. Wyler,D.J.; W.H. Freeman and Company, N.Y. pp:184.
85. Shimizu,T.; Nomiyama,S.; Hirata,F.; Hayaishi,O.; 1978: Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some Properties. J.Biol.Chem. 253:4700.
86. Sibley,D.; Messina,M.; Niesman,I.R.; 1994: Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 91:5508.
87. Stadtsbaeder,S.; Nguyen,B.T.; Calvin-Preval,M.C.; 1975: Respective role of antibodies and immune macrophages during acquired immunity against toxoplasmosis in mice. Ann.Inst.Past./Immunol. 126:461.
88. Stone,T.W., 1993: Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol.Rev. 45:309.
89. Stuart,P.; Zlotnik,A.; Woodward,J.; 1988: Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4. J.Immunol 143:3020.
90. Suzuki,Y.; Orellana,M.A.; Schreiber,R.D.; Remington,J.S.; 1988: IFN $\gamma$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 240:516.

91. Takikawa,O.; Yoshida,R.; Kido,R.; Hayashi,O.; 1986: Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J.Biol.Chem.* 261:3648.
92. Tenter,A.; Heckerroth,A.R.; Weiss,L.M.; 2000: *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int.J.Parasitol.* 30:1217.
93. Terminelli,C.; Denhardt,G.; Narula,S.; Thorbecke,G.J.; 1996: Administration of Interleukin-10 at the time of priming protects *Corynebacterium parvum* – primed mice against LPS - and TNF- $\alpha$ -induced lethality. *Cell Immunol.* 173:207.
94. te Velde,A.; Huijbens,R.; Heije,K.; de Vries,J.; Figdor,C.; 1990: Interleukin-4 inhibits secretion of IL-1- $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6 by human monocytes. *Blood* 76:1392.
95. te Velde,A.; Rousset,A.; Peronne,C.; de Vries,J.; Figdor,C.; 1990: IFN $\alpha$  and IFN $\gamma$  have different regulatory effects on IL-4-induced membrane expression of Fc $\epsilon$ RIIb and release of soluble Fc $\epsilon$ RIIb by human monocytes. *J.Immunol.* 44:3052.
96. Thomas,S.; Mohr,D.; Stocker,R.; 1994: Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J.Biol.Chem.* 269:20 14457.
97. Van der Poll,T.; de Waal Malefyt,R.; Coyle,S.; Lowry,S.; 1997: Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxaemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10 and IL-13. *J.Infect.Dis.* 175:118.
98. Voet,D.; Voet,J.G.; 1992 *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
99. Wang,P.; Wu,P.; Siegel,M.; Egan,R.; Billah,M.; 1995: Interleukin(IL)-10 inhibits nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J.Biol.Chem.* 270:9558.
100. Weinberg,J.B.; Misukonis,M.A.; Shami,P.J.; Mason,S.N.; Sauls,D.L.; Dittman,W.A.; Wood, E.R.; Smith,G.K.; McDonald,B.; Bachus,K.E.; Haney,A.F.; Granger,D.L.; 1995: Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase: analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86:1184.
101. Weiser,M.; Bonifer,R.; Oster,W.; Lindemann,A.; Mertelsmann,R.; Herrmann,F.; 1998: Interleukin-4 induces secretion of CSF for granulocytes and CSF for macrophages by peripheral blood monocytes. *Blood* 73:1105.
102. Yamamura,M.; Uyemura,K.; Deans,R.J.; Weinberg,K.; Rea,T.H.; Bloom,B.R.; Modlin,R.L.; 1991: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 255:277.
103. Zdanov,A.; Schalk-Hihi, C.; 1996: Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6Å and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci.* 5:1955.

## **G. Abkürzungsverzeichnis**

%(v/v)	Volumenprozent
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
cAMP	cyklisches Adenosidmonophosphat
Bq	Becquerel
CD	Cluster of Differentiation
cpm	Counts per minute
CSF	Kolonie stimulierender Faktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
FCS	Fetales Kälberserum
g	Fallbeschleunigung
GBS	Gruppe B Streptokokken
GFAP	Glial fibrillary acid protein
h	Stunde (n)
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I-Med.	Iscove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium
iNOS	Induzierbare Stickoxid-Synthase
JAK	Janus family of cytoplasmic tyrosine kinases
KBR	Komplementbindungsreaktion
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
mAk	Monoklonaler Antikörper
MDM	Monocyte derived macrophages
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
NAD(PH)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
N <sup>G</sup> MMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBMC	Periph. Mononucleare Blut-Zellen
rIFN	Rekombinantes IFN
RES	Retikuloendotheliales System
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SD	Standartabweichung
TGF	Tumor-growth-factor
TH -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
U	Units
ZNS	Zentrales Nervensystem

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

MacKenzie,C.R.; Gonzalez,R., Kniep,E.; Roch,S.; Däubener,W.; 1999:  
Cytokine Mediated Regulation of Interferon gamma-Induced IDO Activation.  
Adv Exp Med Biol. 467:533.

## **Zytokin-vermittelte Regulation der Interferon-gamma-induziertenIDO-Aktivität als antiparasitärer Effektormechanismus**

vorgelegt von Eva-Maria Türck, geb. Kniep

2002

Die Stimulation von humanen MDM mit Interferon  $\gamma$  induziert das L-Tryptophan abbauende Enzym Indolamin 2.3-dioxygenase (IDO). In der Literatur ist gut dokumentiert, daß das Wachstum einiger intrazellulärer Parasiten, wie z.B. *Toxoplasma gondii* in humanen Glioblastomzellen, durch den IDO-vermittelten L-Tryptophan Abbau inhibiert ist.

Wir konnten in humanen MDM keinen direkten Zusammenhang zwischen der durch IFN $\gamma$ -vermittelten Tryptophandegradation und einem antitoxoplasmatischen Effekt aufzeigen. Es finden sich Anhaltspunkte dafür, daß es sich bei dem so verursachten Tryptophanmangel nicht um den einzigen antitoxoplasmatischen Mechanismus humaner MDM handelt, da in Resupplementations-Versuchen keine Aufhebung des antiparasitären Effektes erreicht werden konnte. Neben der Entstehung toxischer Metabolite ist die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion weiterer, eventuell parallel ablaufender, Abwehrreaktionen in Erwägung zu ziehen.

Die IDO als antiparasitärer Effektormechanismus unterliegt einer Immunregulation. Sie wird in humanen Makrophagen durch Interferon  $\gamma$  induziert und kann durch simultane Stimulation mit TNF $\alpha$  verstärkt werden. Wie im Rahmen der Arbeit gezeigt werden konnte besteht darüber hinaus eine Inhibition dieser Immunreaktion durch die Zytokine IL-10 und IL-4. Beiden wird eine wichtige Rolle in der Immunaktivierung auf unterschiedlichem Zellniveau zugeschrieben, so beispielsweise die Produktions- und Sekretionshemmung von TNF $\alpha$ . Unter isolierter Betrachtung des anti-TNF $\alpha$ -sekretorischen Effektes fand sich für beide Zytokine der Beweis für das Ablaufen TNF $\alpha$ -unabhängiger Prozesse.

Eine Beeinflussung der Toxoplasmostase blieb bei IL-10 aus, für IL-4 zeigte sich eine minimale Aufhebung der Toxoplasmostase.

**Lebenslauf****Persönliche Daten**

Eva - Maria Türck, geb. Kniep  
 geb. am 03.01.1969  
 in Braunschweig  
 Familienstand verheiratet, 1 Kind Moritz Benjamin

**Wohnort**

Dr. Wintrichstr. 19a  
 85560 Ebersberg  
 Tel. 08092/865232

**Schulausbildung**

1975 - 1979  
 1979 - 1988  
 Gemeinschaftsgrundschule Beethovenstraße Hilden  
 Dietrich - Bonhoeffer - Gymnasium Hilden,  
 abgeschlossen mit dem Abitur

**Studium**

Okt. 1988 - April 1992

Diplomstudiengang Chemie  
 Universität zu Köln / HHU - Düsseldorf

April 1992 - Mai 1999

Studium der Humanmedizin HHU - Düsseldorf  
 Sept. 1994     Ärztliche Vorprüfung  
 April 1996     1. Abschnitt Ärztliche Prüfung  
 April 1998     2. Abschnitt Ärztliche Prüfung  
 Mai 1999       3. Abschnitt Ärztliche Prüfung

April 1998 - März 1999

Praktisches Jahr :

- |            |   |
|------------|---|
| 1. Drittel | Innere Medizin<br>EVK - Düsseldorf                                |
| 2. Drittel | Gynäkologie und Geburtshilfe<br>Kantonsspital St. Gallen, Schweiz |
| 3. Drittel | Chirurgie<br>EVK - Düsseldorf                                     |

**Promotion**

Beginn März 1996

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie,  
 Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf  
 Thema: Immunologie, induzierbare antiparasitäre  
 Effektormechanismen in humanen Makrophagen

**Publikationen**

Adv Exp Med Biol. 467:533:  
 Cytokine Mediated Regulation of Interferon gamma-  
 Induced IDO Activation

**Berufstätigkeit**

1.09.99-28.02.02 (seither Erziehungsurlaub)  
 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum / Assistenzärztin  
 Innere Medizin Kreiskrankenhaus Wasserburg am Inn