

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

# Der Einfluss von Herpes simplex Virus Typ 1 auf die Indolamin 2,3-Dioxygenase vermittelten antimikrobiellen Effektor- leistungen in Koinfektionsmodellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Marc André Quambusch**

2014

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Däubener

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Ortwin Adams

## *Meiner Familie*

„Zwei Dinge erfüllen das Gemüt mit immer neuer und zunehmender Bewunderung und Ehrfurcht, je öfter und anhaltender sich das Nachdenken damit beschäftigt:  
Der bestirnte Himmel über mir und das moralische Gesetz in mir.“

Immanuel Kant

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>4</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>10</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten .....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) .....	16
<b>1.2. In vitro Infektionsmodelle .....</b>	<b>20</b>
1.2.1. Bakterien .....	20
1.2.2. Viren .....	24
1.2.3. Parasiten .....	27
<b>1.3. Infektiöse Krankheitsbilder des ZNS .....</b>	<b>29</b>
1.3.1. Enzephalitis .....	29
1.3.2. Meningitis .....	31
<b>1.4. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen Tryptophan- konzentration .....</b>	<b>33</b>
1.4.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (EC 1.13.11.42) .....	34
1.4.1.1. Katalytische Eigenschaften der Indolamin 2,3-Dioxygenase .....	35
1.4.1.2. L-Tryptophan und seine physiologische Bedeutung .....	37
1.4.1.3. Indolamin 2,3-Dioxygenase: Regulation der Gentranskription und Protein- Expression .....	39
<b>1.5. Funktionelle Bedeutung der IDO bei antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten .....</b>	<b>40</b>
1.5.1. IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte .....	40
1.5.1.1. IDO-vermittelte antibakterielle Effekte .....	40
1.5.1.2. IDO-vermittelte antivirale Effekte .....	41
1.5.1.3. IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte .....	41
1.5.2. IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte .....	42
<b>1.6. Zielsetzung der eigenen Arbeit .....</b>	<b>43</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>2.1. Material .....</b>	<b>45</b>
2.1.1. Zellen .....	45
2.1.2. Erreger für Infektionsversuche .....	45
2.1.2.1. Bakterien .....	45
2.1.2.2. Viren .....	45
2.1.2.3. Parasiten .....	46
2.1.3. Medien, Lösungen und Puffer .....	46
2.1.3.1. Medien für die Bakterienkultur .....	46
2.1.3.2. Medien für die Zellkultur .....	46
2.1.3.3. Lösungen .....	47
2.1.3.4. Puffer .....	47

2.1.4. Primer .....	48
2.1.5. Sonden .....	48
2.1.6. Zytokine .....	48
2.1.7. Antikörper .....	49
2.1.7.1. Primärantikörper .....	49
2.1.7.2. Sekundärantikörper .....	49
2.1.8. Größenstandards .....	49
2.1.8.1. Größenstandards für Proteine .....	49
2.1.9. Sonstige Enzyme .....	50
2.1.10. Chemikalien .....	50
2.1.10.1. Allgemeine Chemikalien .....	50
2.1.10.2. Radiochemikalien .....	51
2.1.11. Verbrauchsmaterialien .....	51
2.1.12. Geräte und sonstige Materialien .....	51
<b>2.2. Methoden .....</b>	<b>53</b>
2.2.1. Molekularbiologische Methoden .....	53
2.2.1.1. Isolierung von gesamtzellulärer RNA .....	53
2.2.1.2. cDNA Synthese aus gesamtzellulärer RNA .....	53
2.2.1.3. Amplifikation von DNA Molekülen mittels PCR .....	54
2.2.1.4. Real-Time PCR .....	56
2.2.1.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	57
2.2.2. Zellbiologische Methoden .....	57
2.2.2.1. Zellkulturmethoden .....	57
2.2.2.2. Kultivierung von Zelllinien .....	57
2.2.2.3. Kryokonservierung von Zelllinien .....	58
2.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl .....	58
2.2.2.5. Verwendung von L-Tryptophan .....	58
2.2.2.6. Stimulation von Zellen .....	58
2.2.2.7. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut .....	59
2.2.2.8. Versuchsansätze mit PBL .....	59
2.2.2.9. Bestimmung von T-Zell Proliferation .....	60
2.2.2.10. Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	60
2.2.2.11. Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i> .....	61
2.2.2.12. Bestimmung der <i>Toxoplasma gondii</i> Proliferation .....	61
2.2.2.13. <i>In vitro</i> Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i> oder <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	62
2.2.2.14. Bestimmung des <i>Staphylococcus aureus</i> oder <i>Streptococcus agalactiae</i> Wachstums .....	62
2.2.2.15. <i>In vitro</i> Infektion mit humanen Herpesviren .....	62
2.2.2.16. Bestrahlung von Herpes simplex Typ 1 (HSV-1) .....	63
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden .....	63
2.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten .....	63
2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	63
2.2.3.3. Western Blot Analyse .....	64
2.2.3.4. Ponceau S Färbung .....	64
2.2.3.5. Immundetektion der Proteine mit Antikörpern .....	65
2.2.3.6. Messung der IDO-Aktivität/ L-Kynureninmessung .....	66
2.2.4. Computergestützte Arbeiten .....	66
2.2.4.1. Statistische Auswertung .....	66
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>67</b>
<b>3.1. IDO-vermittelte Effekte in humanen Astrozytom-/ Glioblastomzellen (86HG39 Zellen) und humanen Vorhautfibroblasten (human foreskin fibroblasts [HFF]) .....</b>	<b>67</b>
3.1.1. IDO-vermittelte Effekte in der humanen Gehirnzelllinie 86HG39 .....	67
3.1.2. Immunregulatorische IDO-vermittelte Effekte in 86HG39 Zellen .....	72

3.1.3. IDO-Aktivität in humanen, nativen HFF-Zellen .....	73
3.1.4. IDO-Proteinexpression in nativen HFF-Zellen.....	74
3.1.5. Antibakterielle Effekte in nativen HFF-Zellen.....	75
<b>3.2. Beeinflussung der IDO durch humanes Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) .....</b>	<b>78</b>
3.2.1. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Aktivität.....	79
3.2.2. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Proteinexpression .....	82
3.2.3. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-mRNA-Expression .....	85
3.2.4. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte antibakterielle Effekte.....	86
3.2.5. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte.....	94
3.2.6. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte.....	96
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>98</b>
<b>4.1. Die Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase und den Glioblastom- (86HG39) und HFF-Zellen (humane Fibroblasten) bei der antimikrobiellen Pathogenabwehr .....</b>	<b>98</b>
<b>4.2. Humanes Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1): Blockade antimikrobieller Effekte durch Hemmung der IDO-Aktivität, IDO-Protein- und -mRNA-Expression.....</b>	<b>101</b>
<b>4.3. hHSV-1 in der Immunregulation.....</b>	<b>107</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>6. Summary .....</b>	<b>112</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>8. Danksagung.....</b>	<b>135</b>
<b>9. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>136</b>
<b>10. Lebenslauf.....</b>	<b>137</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1.:</b> Schematischer Überblick JAK-STAT-Signaltransduktionsweg .....	18
<b>Abb. 1.2.:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Staphylococcus aureus</i> mit typischer Haufenformation .....	20
<b>Abb. 1.3.:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Streptococcus agalactiae</i> mit typischer Kettenformation .....	23
<b>Abb. 1.4.:</b> Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Herpes simplex Virus Typ 1 .....	25
<b>Abb. 1.5.:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Toxoplasma gondii</i> mit typischer Anordnung in Rosettenform.....	27
<b>Abb. 1.6.:</b> Überblick Enzephalitis-Erreger: Aufgelistet sind Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren, die eine Enzephalitis verursachen.....	30
<b>Abb. 1.7.:</b> Cranielle MRT (hier T2-Gewichtung) mit pathognomonischer Hyperintensität des anterioren Temporallappen (hier rechter; siehe grüner Pfeil) bei HSV-1 Enzephalitis ...	31
<b>Abb. 1.8.:</b> Überblick Meningitis-Erreger: Zusammengefasst wurden Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren, die eine Meningitis auslösen können.....	32
<b>Abb. 1.9.:</b> Reaktionsschema: Abbau von L-Tryptophan zu L-Kynurenin .....	36
<b>Abb. 1.10.:</b> Schematischer Überblick über den Kynurenin-Stoffwechselweg.....	38
<b>Abb. 3.1.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen.....	68
<b>Abb. 3.2.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte IDO-Proteinexpression in 86HG39 Zellen.....	68
<b>Abb. 3.3.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen.....	69
<b>Abb. 3.4.:</b> IFN- $\gamma$ vermittelter Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen.....	69
<b>Abb. 3.5.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in 86HG39 Zellen.....	70
<b>Abb. 3.6.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen.....	71
<b>Abb. 3.7.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in 86HG39 Zellen.....	71
<b>Abb. 3.8.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Hemmung der Proliferation von <i>Toxoplasma gondii</i> in 86HG39 Zellen.....	72

<b>Abb. 3.9.:</b> IFN- $\gamma$ induzierter IDO-vermittelter immunregulatorischer Effekt in 86HG39 Zellen. .....	73
<b>Abb. 3.10.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte IDO-Aktivität in HFF-Zellen. ....	74
<b>Abb. 3.11.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte IDO-Proteinexpression in humanen, nativen HFF-Zellen. ....	75
<b>Abb. 3.12.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen). ....	76
<b>Abb. 3.13.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen). ....	76
<b>Abb. 3.14.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Streptococcus agalactiae</i> in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen). ....	77
<b>Abb. 3.15.:</b> IFN- $\gamma$ induzierte Wachstumshemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen). ....	77
<b>Abb. 3.16.:</b> Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen. ....	79
<b>Abb. 3.17.:</b> Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen. ....	80
<b>Abb. 3.18.:</b> Einfluss einer Infektion mit UV-inaktiviertem hHSV-1 auf die IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen. ....	81
<b>Abb. 3.19.:</b> Einfluss einer Infektion mit UV-inaktiviertem hHSV-1 auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen. ....	82
<b>Abb. 3.20.:</b> Western Blot Analyse hHSV-1 infizierter und mit IFN- $\gamma$ stimulierter humaner Hirntumorzellen 86HG39. ....	83
<b>Abb. 3.21.:</b> Western Blot Analyse hHSV-1 infizierter und mit IFN- $\gamma$ stimulierter humaner HFF-Zellen. ....	84
<b>Abb. 3.22.:</b> Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-mRNA- Expression in 86HG39 Zellen. ....	85
<b>Abb. 3.23.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen. ....	87
<b>Abb. 3.24.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-vermittelte Hemmung des Wachstums von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen. ....	87
<b>Abb. 3.25.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von <i>Staphylococcus aureus</i> in 86HG39 Zellen. ....	88
<b>Abb. 3.26.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in 86HG39 Zellen. ....	89

<b>Abb. 3.27.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in 86HG39 Zellen. ....	90
<b>Abb. 3.28.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in HFF-Zellen.....	91
<b>Abb. 3.29.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in HFF-Zellen. ....	91
<b>Abb. 3.30.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von <i>Streptococcus agalactiae</i> in HFF-Zellen.....	92
<b>Abb. 3.31.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i> in HFF-Zellen. ....	93
<b>Abb. 3.32.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt in 86HG39 Zellen. ....	95
<b>Abb. 3.33.:</b> Einfluss der hHSV-1 Infektion auf den IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekt. ....	97

### III. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1.:</b> Überblick Eigenschaften der IDO .....	34
<b>Tab. 2.1.:</b> Verwendete Zelllinien.....	45
<b>Tab. 2.2.:</b> Verwendete Bakterienkulturmedien.....	46
<b>Tab. 2.3.:</b> Verwendete Zellkulturmedien.....	46
<b>Tab. 2.4.:</b> Verwendete Lösungen.....	47
<b>Tab. 2.5.:</b> Verwendete Puffer .....	47
<b>Tab. 2.6.:</b> Eingesetzte Primer für Real-Time PCR .....	48
<b>Tab. 2.7.:</b> Verwendete Primärantikörper .....	49
<b>Tab. 2.8.:</b> Verwendete Sekundärantikörper.....	49
<b>Tab. 2.9.:</b> Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue® Plus2 .....	49
<b>Tab. 2.10.:</b> Verwendete Enzyme .....	50
<b>Tab. 2.11.:</b> Radiochemikalien.....	51

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
1-L-MT	1-Methyl-L-Tryptophan
A	Adenosin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
A260	Absorption bei 260 nm
A280	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BZLF1	<i>BamHI Z fragment leftward open reading frame number 1</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CAMP	Faktor, der nach den Erstbeschreibern <u>C</u> hristie, <u>A</u> tkins, <u>M</u> unch- <u>P</u> etersen benannt wurde
CCR	<i>CC chemokine receptor</i> (cc Chemokin-Rezeptor)
CCT	Cranielle Computertomographie
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> )
cfu	Koloniebildende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
cMRSA	<i>community acquired</i> Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 ( <i>cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> )
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
D-Trp	D-Tryptophan
DTT	Dithiothreitol
e. g.	zum Beispiel; beispielsweise (lat.: <i>exempli gratia</i> )

EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EC	numerisches Enzymklassifikationssystem (engl.: <i>Enzyme Commission numbers</i> )
ECHO	<i>enteric cytopathogenic human orphan</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
Engl.	Englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanosin
GAS	Gamma-aktivierte Sequenz
GBS	Gruppe-B-Streptokokken
GFAP	Saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
Griech.	Griechisch
GTP	Guanosintriphosphat
GvHD	Transplantat-versus-Wirt-Reaktion/-Krankheit ( <i>Graft-versus-Host-Disease</i> )
<sup>3</sup> H	Tritium
h	Stunde(n)
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HFF	humane Vorhautfibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )
hHSV-1	humanes Herpes simplex Virus Typ 1
HHV	humanes Herpes Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HSV(-1)	Herpes simplex Virus (Typ 1)
ICP	<i>infected cell protein</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IDO-2	Indolamin 2,3-Dioxygenase 2
I. E.	Internationale Einheit
IFN	Interferon
IFNGR	Interferon- $\gamma$ Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscoves' s Modified Dulbecco' s Medium</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Interferon regulatorische Faktoren ( <i>Interferon regulatory factors</i> )
IRF-1	Interferon regulatorischer Faktor 1 ( <i>Interferon regulatory factor 1</i> )
ISRE	<i>Interferon stimulated response elements</i>
Ital.	italienisch

JAK	Janus-Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
k. o.	<i>knock out</i>
LAT	Transporter für Aminosäuren ( <i>large amino acid transporter</i> )
Lat.	Latein, lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
min.	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Vielfachheit der Infektion, Multiplizität der Infektion ( <i>multiplicity of infection</i> )
MOPS	3-[N-Norpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
ORSA	Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
p. p.	nach der Geburt ( <i>post partum</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten ( <i>periphere blood lymphocytes</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Saline ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PKC	Proteinkinase C
POX	Peroxidase
PVL	Panton-Valentine-Leukozidin
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )

sec.	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SHP2	<i>src homology region 2 domain-containing phosphatase 2</i>
SH2-Domäne	<i>Src-homology 2</i>
SOCS3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
sog.	sogenannt
SSSS	<i>Staphylococcal scalded skin syndrome</i>
<i>Staph.</i>	
<i>aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
STAT	Signalüberträger und –aktivator der Transkription ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
<i>Strept.</i>	
<i>agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TEMED	N, N, N, N,-Tetramethylethylendiamin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	Toll-like Rezeptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNBS	Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
tRNA	Transfer-RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSST-1	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i>
TYK2	Tyrosinkinase 2
U	Uracil
UL41	<i>unique long</i> Region 41 des Genoms von HSV-1
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett (-Strahlung)
VHS	<i>Virion host shutoff</i>
VZV	Varicella-Zoster-Virus
w/v	Gewicht/Volumen
Y	Tyrosin
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

Das Immunsystem ist der Schutz eines Organismus gegen die potenzielle Bedrohung durch infektiöse Agenzien, wie z. B. Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten. Damit das Immunsystem diese Funktion erfüllen kann, verfügt es zum einen über die angeborene, unspezifische Immunabwehr und zum anderen über den spezifischen, adaptiven, erworbenen immunologischen Schutz. Die angeborene immunologische Abwehr stellt einen ersten, sehr schnellen, aber unspezifischen Abwehrmechanismus gegen infektiöse Pathogene dar. Hierbei wird nur zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ unterschieden, der Erreger an sich wird nicht identifiziert. Irrtümer bei dieser Differenzierung können autoaggressive Immunreaktionen mit schwerwiegenden klinischen Komplikationen zur Folge haben. Anders ist es bei der spezifischen immunologischen Abwehr. Sie erkennt das infektiöse Agens spezifischer, wird jedoch langsamer aktiviert. Die Erkennung des Erregers führt über verschiedene Antigen-spezifische Rezeptoren und Signalkaskaden zu einer Induktion und Ausbildung spezifischer Effektorzellen, welche bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen oder „verwandten“ Pathogen reaktiviert werden, um den jeweiligen Erreger unschädlich zu machen. Das adaptive Immunsystem verfügt somit über ein immunologisches Gedächtnis, das das Fundament für eine lebenslange Immunität beziehungsweise einen Schutz vor einer durch einen bestimmten Erreger ausgelösten Erkrankung bildet. Die zellulären Komponenten der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr sind die Leukozyten, die aus einer hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks entstehen und über verschiedene Differenzierungs- und Reifungsstufen ihre spezifischen Eigenschaften erwerben.

In der vorliegenden Arbeit wird ein spezifischer Baustein der immunologischen Abwehr und zwar die Funktion desIDO-induzierten Tryptophanabbaus als antimikrobiellen und immunregulatorischen Effektormechanismus intensiv analysiert. ZurIDO-Induktion wird in dieser Arbeit das proinflammatorische Zytokin  $\text{IFN-}\gamma$  verwendet. Weiterhin soll der Einfluss von Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) auf dieIDO-Aktivität und ihre Funktionen untersucht werden. Hierfür wird ein Meningo-Enzephalitis-Koinfektionsmodell etabliert. Besonders interessant ist die Tatsache, dass die genanntenIDO-vermittelten Effektormechanismen von fast allen Körperzellen und nicht nur von Zellen des Immunsystems vermittelt werden können. In verschiedenen Vorarbeiten wurde bereits festgestellt, dass dieIDO und die daraus resultierenden antimikrobiellen und immunregulatorischen Prozesse durch viele verschiedene Zellen, wie zum Beispiel Bindegewebszellen (Fibroblasten), Epithel- oder Endothelzellen, induziert werden können. Genauer gesagt, wurde unter anderem gezeigt, dass durchIDO-Induktion das Wachstum von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen und die Proliferation von

T-Zellen gehemmt beziehungsweise limitiert werden kann (Pfefferkorn, 1984; Munn *et al.*, 1998; Däubener *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2004; MacKenzie *et al.*, 2007).

## **1.1. Proinflammatorische Zytokine im Rahmen von Infektionskrankheiten**

Um die immunologischen Effektormechanismen zu induzieren, werden immunregulatorische, proinflammatorische Zytokine innerhalb der spezifischen, aber auch der unspezifischen Immunabwehr benötigt. Als Beispiele sind hierfür das Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und das Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) zu nennen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des IFN- $\gamma$  analysiert beziehungsweise benutzt, um dieIDO und deren Effektormechanismen zu induzieren. Daher wird im Folgenden das IFN- $\gamma$  und seine Eigenschaften vorgestellt.

### **1.1.1. Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )**

Es gibt verschiedene Typen von Interferonen. Zum einen gibt es die Typ 1-Interferone, zu denen das Interferon- $\alpha$  (Leukozyten-Interferon [IFN- $\alpha$ ]) und das Interferon- $\beta$  (Fibroblasten-Interferon [IFN- $\beta$ ]) gehören. Zum anderen existiert das Typ 2-Interferon, das auch als IFN- $\gamma$  (Immuninterferon) bezeichnet wird (Isaacs, Lindemann; 1957). Interferone sind Glykoproteine mit regulierender Wirkung für die Wachstumskontrolle und der Differenzierung von Zellen, insbesondere des hämatopoetischen Systems und spielen bei der immunologischen Abwehr von infektiösen Pathogenen eine wichtige Rolle (Herold *et al.*, 2008). Interferone können die Replikation von Viren unterbinden und noch nicht infizierte Zellen gegen die jeweilige Virusinfektion schützen. Dabei wirken IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  besonders stark virostatisch, während IFN- $\gamma$  ein entscheidendes Zytokin bei der Regulation der Immunantwort ist (Hof *et al.*, 2005).

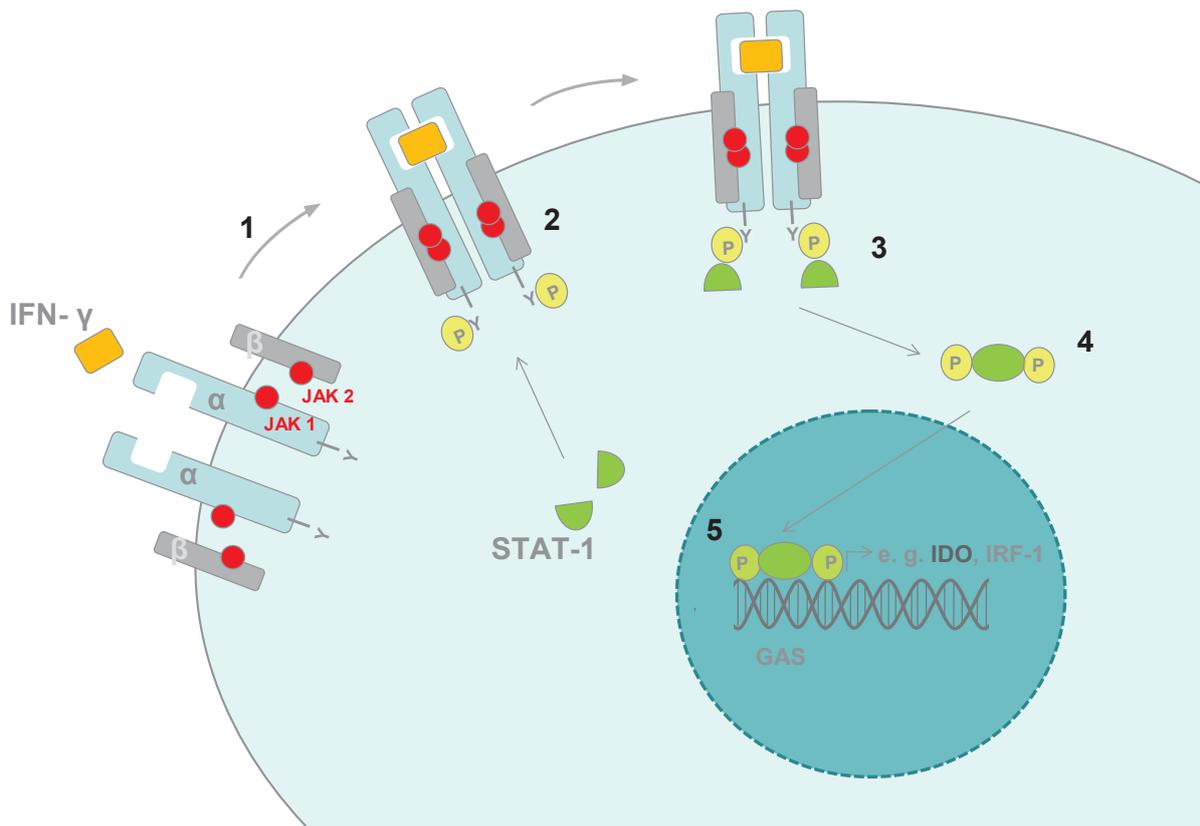
Das IFN- $\gamma$  ist ein aus 143 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein und wurde 1965 von Wheelock entdeckt (Wheelock, 1965). Es ist weder mit dem IFN- $\alpha$  noch mit dem IFN- $\beta$  strukturell verwandt und bindet an einen eigenen Rezeptor, dem sogenannten IFNGR (Interferon- $\gamma$  Rezeptor), auch als CD 119 bezeichnet (Merlin *et al.*, 1985). Das IFN- $\gamma$  ist ein Botenstoff, der eine stimulierende Wirkung auf Zellen des Immunsystems hat. Insbesondere Makrophagen zeigen eine erhöhte Aktivität nach IFN- $\gamma$  Exposition, was sich zum Beispiel in der Hochregulierung der MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) der Klasse I und II und der daraus folgenden Verbesserung der Antigenpräsentation widerspiegelt (Hof *et*

*al.*, 2005). Das proinflammatorische Zytokin ist in der Lage die Transkription von über 200 Genen zu regulieren und stellt damit ein entscheidendes Glykoprotein im Immunsystem dar (Boehm *et al.*, 1997). Es kann als ein zentrales Schlüsselzytokin für die Effektor- und Regulationsmechanismen der Immunantwort bezeichnet werden.

IFN- $\gamma$  wird von vielen verschiedenen Zellen ausgeschüttet. Inzwischen wurde unter anderem gezeigt, dass natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen), B-Zellen, professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ), wie Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen, fähig sind IFN- $\gamma$  zu produzieren (Frucht *et al.*, 2001; Schröder *et al.*, 2004). Historisch gesehen sind T-Zellen die ersten Zellen, für die gezeigt wurde, dass es nach einer Aktivierung zu einer zellulären IFN- $\gamma$  Produktion kommt (Havell *et al.*, 1982).

Die IFN- $\gamma$  vermittelte Transkription vieler verschiedener Gene läuft über den sogenannten JAK-STAT-Signaltransduktionsweg ab (siehe Abb. 1.1. [Darnell *et al.*, 1994; Bach *et al.*, 1997; Rassow *et al.*, 2006]). Hierbei bindet das IFN- $\gamma$  an seinem Rezeptor IFNGR, einem Tetramer welcher mit Tyrosinkinase (= Janus-[JAK-] Kinasen) nichtkovalent assoziiert ist. Es kommt zu einer Rezeptor-Dimerisierung der  $\alpha$ - (IFNGR1) und  $\beta$ - (IFNGR2) Ketten (Pestka, 1997). Hierbei werden die JAK-Kinasen (JAK1 und 2) aktiviert, was wiederum zu einer vielfachen Autophosphorylierung führt. Diese Kinasen phosphorylieren daraufhin die Tyrosinreste (Y) des IFNGR bzw. der IFNGR- $\alpha$ -Kette und bilden somit Andockstellen für Proteine mit einer sogenannten SH2-Domäne (*Src-homology 2*). An diese zytosolische Rezeptordomäne können dann sog. STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Proteine, die diese SH2-Domäne besitzen, binden und werden von den JAK-Kinasen an ihren Tyrosinresten phosphoryliert. Anschließend bilden zwei STAT1-Proteine ein Homodimer, das in den Zellkern diffundieren und dort als Transkriptionsaktivator funktionieren kann (Rassow *et al.*, 2006). Genauer gesagt, binden die Homodimere an bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte gamma-aktivierte Sequenzen (GAS) und veranlassen so die Transkription primär-responsiver Gene. Diese Gene kodieren für Proteine wie die Indolamin-2,3-Dioxygenase, die MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse I- und II-Moleküle, die GTP-bindenden Proteine (GTPasen) und die induzierbare NO-Synthetase (iNOS). Somit kann eine Vielzahl von Proteinen, die spezifische Aufgaben im Immunsystem erfüllen, mit diesem Signaltransduktionsweg exprimiert werden. Neben der Expression der genannten Proteine, können jedoch auch weitere Transkriptionsfaktoren, als Produkt sekundär-responsiver Gene, gebildet werden und so die Gesamtzahl der durch IFN- $\gamma$  regulierten Gene vergrößern. Sehr wichtige Mediatoren dieser sekundären Antwort sind die Mitglieder der Familie der Interferon regulatorischen Faktoren (*interferon regulatory factors* [IRF]) (Nguyen *et al.*, 1997). Bei

diesen Faktoren ist besonders der IRF-1 (Interferon regulatorischer Faktor 1 [*interferon regulatory factor 1*]) hervorzuheben. Er wird zum einen von IFN- $\gamma$ , zum anderen aber auch durch die beiden proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert. IRF-1 bindet dazu an bestimmte Response-Elemente, den sog. ISRE (*Interferon stimulated response element*)-Sequenzen der DNA (Bach *et al.*, 1997; Escalante *et al.*, 1998).



**Abb. 1.1.:** Schematischer Überblick JAK-STAT-Signaltransduktionsweg: 1= Rezeptor-Dimerisierung, 2= Aktivierung und Autophosphorylierung der JAK-Kinasen, 3= STAT-Proteine binden an phosphorylierte Tyrosinreste (Y), 4= Homodimerisierung von zwei phosphorylierten STAT-Proteinen, 5= STAT-Homodimere binden an GAS und induzieren Gen-Transkription (Abb. erstellt nach Rassow *et al.*, 2006).

Für die IFN- $\gamma$  Produktion der APZ werden verschiedene Mediatoren benötigt. Ein mikrobieller Stimulus in Form eines pathogenen Keims führt zur Aktivierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen. Diese produzieren daraufhin Zytokine, insbesondere IL-12 und IL-18, die NK-Zellen über spezifische Rezeptoren auf deren Oberflächen aktivieren und sie zur Zytokin-Produktion anregen. Das IFN- $\gamma$  wirkt hierbei wiederum immunmodulatorisch auf die APZ. Diese Mechanismen werden als klassisches Modell der frühen IFN- $\gamma$  Produktion bzw. parakrines Stimulationsmodell zusammengefasst (Bancroft *et al.*, 1987; Gazzinelli *et al.*, 1993; Unanue, 1997; Munder *et al.*, 1998; Otani *et al.*, 1999; Granucci *et al.*, 2004). Daneben existiert das autokrine Stimulationsmodell der frühen IFN- $\gamma$

Produktion, bei dem die Kombination von IL-12 und IL-18 die Dendritischen Zellen und Makrophagen, durch die sie produziert wurden, wiederum weiter oder zusätzlich aktiviert werden. Diese autokrine Stimulation spielt eine entscheidende Rolle in der erregere-stimulierten IFN- $\gamma$  Produktion während der natürlichen Immunabwehr (Fukao *et al.*, 2000; Hochrein *et al.*, 2001; Frucht *et al.*, 2001). Die durch IFN- $\gamma$  vermittelten zellulären Effekte sind sehr komplex und vielfältig. Oben wurde bereits beschrieben, dass durch IFN- $\gamma$  eine Reihe von Proteinen exprimiert werden kann. Insbesondere die erhöhte Expression der MHC-Moleküle und die damit verbesserte Antigenpräsentation durch Makrophagen stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus im Immunsystem dar (Collins *et al.*, 1984). IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen und beeinflusst den Klassenwechsel in B-Zellen, das heißt es hemmt den Klassenwechsel zu IgE und stimuliert den Klassenwechsel zu IgG<sub>2</sub> und IgG<sub>3</sub> (Rassow *et al.*, 2006). In der Maus führt die IFN- $\gamma$  vermittelte Makrophagenaktivierung zu einer vermehrten NO-(Stickstoffmonoxid) Produktion und verbesserten Abtötung intrazellulärer Erreger (Stuehr *et al.*, 1989).

Wie wichtig das funktionsfähige IFN- $\gamma$ , seine induzierten Reaktionen und sein zugehöriger Rezeptor IFNGR sind, erkennt man an der Tatsache, dass IFN- $\gamma$ - oder IFNGR-*knock out*-Mäuse eine stark verminderte Resistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen, wie Mykobakterien (*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* [Flynn *et al.*, 1993; Newport *et al.*, 1996; Jouanguy *et al.*, 1999; O'Donnel *et al.*, 1999; Salgame, 2005]) oder *Listeria monocytogenes* (Kiderlen *et al.*, 1984; Thäle und Kiderlen, 2005), bestimmten Viren, wie Vaccinia Virus (Huang *et al.*, 1993; Xu *et al.* 2004) und HSV-1 (Cantin *et al.*, 1999) oder Parasiten, wie *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993; Deckert-Schlüter *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004) oder *Leishmania major* (Varkila *et al.*, 1993; Tabbara *et al.*, 2005), besitzen. Hierbei fällt auf, dass es sich bei den Pathogenen um intrazelluläre Erreger handelt, die sich dem humoralen Immunsystem entziehen können. Ein effektiver Schutz vor solchen Keimen muss somit von der zellulären Immunkomponente, wie zum Beispiel dem IFN- $\gamma$ , gewährleistet werden. Fällt diese Schutzbarriere weg, kommt es zu einer erhöhten Anfälligkeit für die oben genannten Erreger.

Letztlich ist noch aus medizinischer Sicht zu erwähnen, dass IFN- $\gamma$  (Interferon gamma-1b [Imukin®]) auch therapeutisch eingesetzt wird, insbesondere bei der seltenen malignen Osteopetrosis (Marmorknochenkrankheit) und der chronischen Granulomatose (Dingermann *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wird speziell der lokale Tryptophanabbau, welcher durch die IFN- $\gamma$  induzierteIDO-Aktivität zustande kommt, analysiert. Dieser Effekt hat, wie schon in

einigen Veröffentlichungen vorgestellt, antimikrobielle und immunregulatorische Eigenschaften (Pfefferkorn, 1984; Mellor *et al.*, 1998; Däubener *et al.*, 1999).

## 1.2. *In vitro* Infektionsmodelle

In der vorliegenden Arbeit wurden in *in vitro* Infektionsmodellen antimikrobielle und immunregulatorische Effektormechanismen in humanen Astrozytomzellen und Fibroblasten genauer untersucht.

Damit die komplexen antimikrobiellen Effektormechanismen in Zukunft noch besser verstanden werden, wurden in dieser Arbeit verschiedene Infektionserreger in Infektionsmodellen eingesetzt und analysiert. Das Koinfektionsmodell wurde absichtlich eingesetzt, um den Mechanismus einer möglichen Bedingung einer HSV-1 ZNS-Infektion für beispielsweise eine reaktivierte *Toxoplasma gondii*-Enzephalitis zu analysieren. Zudem könnte durch HSV-1 eine erhöhte Suszeptibilität für beispielsweise eine reaktivierte *Toxoplasma gondii*-Enzephalitis verursacht werden. Die eingesetzten Erreger werden im Folgenden vorgestellt.

### 1.2.1. Bakterien

#### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* (griechisch „staphyle“ = die Traube, „kókkos“ = das Kügelchen, „aureus“ = der Goldene) gehört zu den gram-positiven Haufenkokken.

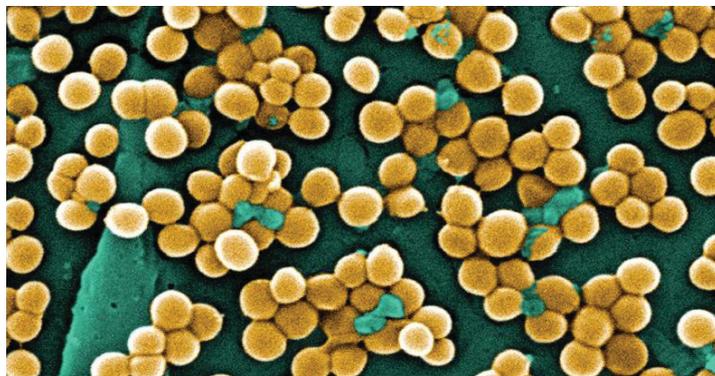


Abb. 1.2.: Elektronenmikroskopische Aufnahme (9560-fache Vergrößerung) von *Staphylococcus aureus* mit typischer Haufenformation (Department of Health and Human Services).

Diese Bakterien sind  $\beta$ -hämolytisch, koagulasepositiv, fakultativ anaerob, fakultativ pathogen und gehören zu der Familie der *Micrococcaceae*. *Staphylococcus aureus* (*Staph. aureus*) ist bezüglich der Wachstumsbedingungen relativ anspruchslos und sehr umweltresistent. Daraus resultiert sein ubiquitäres Vorkommen. Ungefähr 30 % aller Menschen beherbergen *Staph. aureus* auf der Haut, wie zum Beispiel in der Leiste, oder auf den Schleimhäuten, wie z. B. im Nasopharyngealraum. Ca. 30 % aller Menschen sind vorübergehend besiedelt (Hof *et al.*, 2005). Der opportunistisch pathogene Erreger kann über Händekontakt, direkt über Tröpfchenemission oder indirekt über Staub verbreitet werden und kann nosokomiale Infektionen verursachen. *Staph. aureus* wird zu den wichtigsten Erregern nosokomialer Infektionen gezählt. Die Infektionen können zum einen lokal in Form einer Wundinfektion, Follikulitis, eines Furunkels, Karbunkels, Abszesses oder einer *Impetigo follicularis et pyoderma* auftreten. Auf der anderen Seite kann *Staph. aureus* systemische Infektionen, wie das Toxische Schock-Syndrom, eine (Lobär-)Pneumonie, Meningitis, Osteomyelitis, Endokarditis, Hirnabszesse oder eine Sepsis verursachen. Seine Enterotoxine A-E verursachen 40 % aller Lebensmittelvergiftungen mit Diarrhoe und Erbrechen (Hof *et al.*, 2005). Aus medizinischer Sicht stellen die rasant zunehmenden Antibiotika-Resistenzen ein großes Problem dar. Hierbei ist der klinisch besonders relevante Oxacillin bzw. Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (ORSA bzw. MRSA) anzuführen. Dieser multiresistente Erreger hat eine Mutation im Penicillin-bindenden Protein und ist somit gegen penicillinasefeste Penicilline (Oxacillin, Methicillin) und Cephalosporine (z. B. Cefazolin) resistent. Therapeutisch muss man in diesem Falle auf Glykopeptidantibiotika wie Vancomycin oder Teicoplanin ausweichen. Auch das Oxazolidinon Linezolid (Zyvoxid®) kommt zum Einsatz. Wenn ein ORSA die Nasenvorhöfe besiedelt hat, kann man auch Mupirocin-Nasensalbe (Turixin®) als Lokalthapeutikum zur Sanierung einsetzen. *Staph. aureus* verfügt über eine Reihe verschiedener Pathogenitätsfaktoren, dabei sind besonders der Clumping-Faktor A und die Koagulase hervorzuheben. Diese spielen auch im Rahmen von Nachweismethoden in der Diagnostik von *Staph. aureus* eine wichtige Rolle (Hof *et al.*, 2005). Beide führen zu einer lokalen Fibrin-Koagulation und schützen das Bakterium so vor einer Immunreaktion des Körpers, da es sich mit einer Art Fibrin-Hülle den Antikörpern des Immunsystems entzieht. Ist es jedoch zu einer großen Keimvermehrung innerhalb dieser fibrinösen Kapsel gekommen, setzt *Staph. aureus* seine Staphylokinase ein, bildet Fibrinolysin und kann also somit das Fibrin zerlegen (Bokarewa *et al.*, 2006). Daraufhin werden die bakteriellen Enzyme Hämolysin, DNase, Lipase und Hyaluronidase aktiviert, um

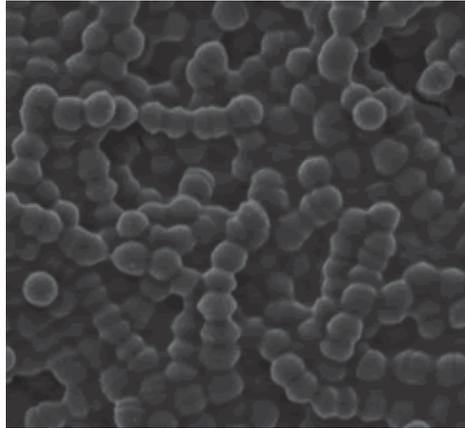
Fibroblasten und umliegende Parenchymzellen zu zerstören. In diesem Zuge kann dann eine systemische Infektion entstehen.

Die zunehmende und immer problematischer werdende Verbreitung des Keims wird darüber hinaus durch das bakterielle Leukozidin begünstigt, welches ein porenbildendes Toxin darstellt und neutrophile Granulozyten und Makrophagen lysiert und dadurch die zelluläre Immunantwort hemmt (Nishiyama *et al.*, 2006). Dieser zusätzliche Virulenzfaktor, das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL), wird insbesondere bei MRSA-Stämmen beobachtet, die außerhalb von stationären Institutionen, wie Krankenhäusern und Pflegeheimen, übertragen werden. Diese PVL-exprimierende Stämme werden auch als cMRSA (*community acquired MRSA*) bezeichnet und können u. a. eine nekrotisierende Pneumonie mit hoher Letalität hervorrufen (Labandeira-Rey *et al.*, 2007).

Darüber hinaus ist in der bakteriellen Polysaccharid-Kapsel das Protein A eingelagert, das durch Fc-Fragment-Bindung eine ordnungsgemäße Opsonisierung und somit eine Makrophagen-Phagozytose verhindert. Bei einigen Stämmen ist schon die Schleimkapsel selbst ein Phagozytose-Schutz (Hof *et al.*, 2005). Ungefähr 5 % aller *Staph. aureus* Stämme weisen Exfoliatintoxine (Exfoliatin A und B) auf, welche epidermolytisch-toxische Eigenschaften haben und durch eine Spaltung von *Stratum spinosum* und *granulosum* zum staphylogenen Lyell-Syndrom, auch Morbus Ritter von Rittershain oder *Staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS) genannt, mit bullösen Hautabhebungen führt. Ungefähr 1 % aller *Staph. aureus* Isolate exprimieren das sogenannte *Toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1). Es funktioniert wie ein „Superantigen“, das heißt es stellt eine zusätzliche Verbindung zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem MHC Klasse II einer antigenpräsentierenden Zelle dar, was zu einer übermäßigen T-Zell-Aktivierung, einer massiven Zytokinproduktion (Zytokinsturm) und so zum toxischen Schock führen kann (Krakauer, 1999; Proft *et al.*, 2003; Hof *et al.*, 2005).

### ***Streptococcus agalactiae***

*Streptococcus agalactiae* (griechisch „*streptos*“ = gewunden) gehört zu den fakultativ anaeroben gram-positiven Kettenkokken.



**Abb. 1.3.:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (9500-fache Vergrößerung) von *Streptococcus agalactiae* mit typischer Kettenformation (Center for Emerging Infectious Diseases).

*Streptococcus agalactiae* ist  $\beta$ -hämolytisch und serologisch nach der Einteilung von Rebecca C. Lancefield den B-Streptokokken zuzuordnen. Diese serologische Einteilung beruht auf dem Antigenmuster von Zellwandbestandteilen, insbesondere einem Polysaccharid, welches auch C-Substanz (C = *carbohydrate*) genannt wird. Gruppe-B-Streptokokken (GBS) besitzen eine antiphagozytäre Polysaccharidkapsel. Zudem verfügt ihre Zellwand über eine C5a-Peptidase, welche den chemotaktisch wirksamen Komplementfaktor C5a inaktiviert (Hahn *et al.*, 2005). Als extrazelluläres Produkt bildet *Streptococcus agalactiae* den CAMP-Faktor, welcher mit dem  $\beta$ -Hämolysin von *Staphylococcus aureus* zu einer synergistischen Hämolyse führt. Dieses sog. CAMP-Phänomen macht man sich bei der GBS-Identifizierung zu Nutze (Hahn *et al.*, 2005).

*Streptococcus agalactiae* ist primär ein tierpathogener Erreger, kann aber auch als Humanpathogen Sepsis, Meningitis, Arthritis, Osteomyelitis, Wund- und Harninfekte verursachen. Insbesondere bei Neugeborenen führen GBS zu schwersten Infektionen. Dabei unterscheidet man zwischen einer frühen Form (*early onset*) innerhalb von sieben Tagen p. p. (*post partum*, nach der Geburt) und einer späten Form (*late onset*) (Larsen *et al.*, 2008). Die meisten kindlichen Infektionen erfolgen bereits intrauterin über das mit *Streptococcus agalactiae* kolonisierte Fruchtwasser. Die *Early-Onset*-Form, die im Mittel innerhalb von 20 Stunden nach der Geburt zu ersten Symptomen führt (Bromberger *et al.*, 2000), kann sich bei den Neugeborenen als Sepsis und Pneumonie, aber auch als Meningitis, Osteomyelitis oder Arthritis präsentieren (Hahn *et al.*, 2005; Flügge *et al.*, 2006). Der Verlauf kann sich dramatisch verschlechtern und zu einem septischen Schock führen. Es muss sogar mit dem Tod oder neurologischen Langzeitfolgen gerechnet werden (Berner, 2003; Flügge *et al.* 2006). Auch Erwachsene können an einer Streptokokken-Meningitis, aber auch an einem Streptokokken-Hirnabszess erkranken (Gleixner *et al.*, 2009). Insbesondere wenn Erwachsene

immunsupprimiert oder an *Diabetes mellitus* erkrankt sind, ist das Risiko einer invasiven Gruppe-B-Streptokokken-Infektion erhöht (Muñoz *et al.*, 1997; Kamaratos *et al.*, 2005). Am häufigsten erkranken Frühgeborene mit geringem Geburtsgewicht an der *Early-Onset-Sepsis* (Flügge *et al.*, 2006), da bei ihnen die mütterliche Leihimmunität gering ist. Die Infektion des Neugeborenen erfolgt prä- oder postpartal, häufig bei der Passage durch den besiedelten mütterlichen Geburtskanal (Berardi *et al.*, 2007). Bei ca. 10 % bis 30 % in der Regel symptomlosen Schwangeren können GBS im Bereich der Vagina und/ oder des Anus nachgewiesen werden. Neuere Zahlen aus Deutschland geben eine GBS-Besiedlungsrate von durchschnittlich 16 % aller Frauen an (Brimil *et al.*, 2006).

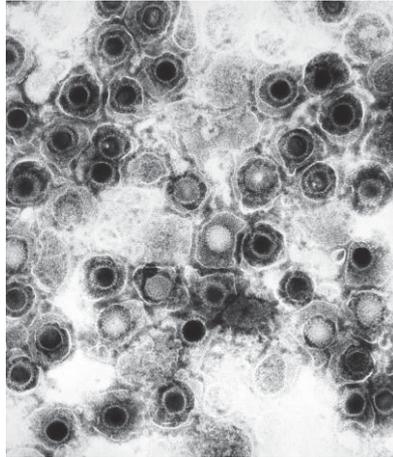
Die B-Streptokokken-Infektionen kommen mit der Häufigkeit von 1:1000 aller Neugeborenen vor und enden ohne therapeutische Interventionen in 50 % der Fälle tödlich (Hamada *et al.*, 2008). Die Spätform muss nicht durch eine Infektion mütterlicher- oder väterlicherseits verursacht sein, sondern kann auch durch das Pflegepersonal zustande kommen. Diese Infektion tritt nach der ersten Lebenswoche auf und mündet meist in einer Meningitis mit einer Letalität von ungefähr 25 % trotz einer adäquaten Therapie (Hof *et al.*, 2005).

Therapie der Wahl stellt das Benzylpenicillin Penicillin G dar. Dieses kann auch eventuell mit einem Aminoglykosid kombiniert werden.

## **1.2.2. Viren**

### **Herpes simplex Virus Typ 1**

Das humane Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1, auch humanes Herpesvirus 1 [HHV 1]) gehört wie das humane Herpes simplex Virus Typ 2 (hHSV-2, auch HHV 2) und das Varicella-Zoster-Virus (VZV, auch HHV 3) zu der Subfamilie der *Alphaherpesvirinae*. Diese weisen einen relativ kurzen Replikationszyklus, einen durch sie ausgelösten zytopathischen Effekt mit unterschiedlich ausgeprägter Zellzerstörung und ein relativ breites Zellspektrum auf (Hof *et al.*, 2005).



**Abb. 1.4.: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 50.000-fache Vergrößerung) von Herpes simplex Virus Typ 1 (Department of Health and Human Services).**

Alle *Herpesviridae* sind lineare doppelsträngige DNA-Viren, haben einen ikosaederischen Kapsidtyp, eine Virusgröße zwischen 150-200 nm, sind behüllt und persistieren nach der Primärfektion lebenslang im Wirtsorganismus (Hof *et al.*, 2005). Zur Zeit sind acht verschiedene Typen human pathogener Herpesviren (HHV 1-8) bekannt, wobei man das HHV 6 noch in HHV 6 A und B unterteilen kann (Modrow *et al.*, 2003; Sedy *et al.*, 2008). Das hHSV-1 und hHSV-2 weisen eine besonders hohe Ähnlichkeit auf, sie haben eine 50 %ige Sequenz-Homologie (Braun *et al.*, 1987). Die Inzidenz ist abhängig von der Altersgruppe, dem Sozialstatus und der geographischen Lebenslage (Siegel *et al.*, 1992; Schillinger *et al.*, 2004). Die Durchseuchungsrate in der erwachsenen Population liegt bei hHSV-1 zwischen 80-90 %, bei hHSV-2 liegt sie bei ca. 10 bis 20 % (Hellenbrand *et al.*, 2005, Hof *et al.*, 2005). Zur hHSV-1 Primärfektion kommt es meist durch eine Tröpfchen- oder Schmierinfektion, oft schon in der Kindheit. Die hohe Durchseuchungsrate kommt vor allem dadurch zustande, dass die Virusübertragung nicht nur über akut an hHSV-1 erkrankte, sondern ebenfalls über asymptomatische Virusträger erfolgt (Wald *et al.*, 2002). Das hHSV-2 wird meist durch einen sexuellen Kontakt, damit eher nach der Geschlechtsreife, übertragen. Wie oben schon angesprochen, folgt der Primärfektion eine lebenslange Persistenz der Herpesviren. Das hHSV-1 persistiert durch retrograden neuronalen Transport im Trigeminalganglion, auch Ganglion Gasseri genannt, das hHSV-2 dagegen persistiert in sakralen Ganglienzellen.

Die häufigste Variante der Erstmanifestation einer hHSV-1 Infektion ist die Gingivostomatitis herpetica, auch als Stomatitis aphthosa oder Herpes oralis bezeichnet. Meist sind Kinder betroffen. Die Inkubationszeit beträgt ca. 1 Woche und die Krankheitsdauer meist 2 bis 3 Wochen. Dass klinische Symptome überhaupt signifikant auftreten, wird jedoch nur in 10 % aller Infektionsfälle beobachtet (Hof *et al.*, 2005). Das häufigste Krankheitsbild bei einer

hHSV-1 Exazerbation ist der Herpes labialis, welcher durch ulzeröse und vesikuläre Hauteffloreszenzen gekennzeichnet ist. Durch Stress (endogen), Immunsuppression oder UV-Strahlung (exogen) kann das persistierende Virus zu einem vollständigen Replikationszyklus gebracht werden. Die Folge ist eine endogene Reinfektion, die zu klinischen Manifestationen (Rekrudeszenz) oder einem asymptomatischen Zustand (Rekurrenz) führen kann. Eine Herpes simplex Typ 1 Infektion kann aber auch weitaus schlimmere Komplikationen zur Folge haben. Auf einer ekzematösen Haut kann sich ein Ekzema herpeticum ausbilden und eine zusätzliche bakterielle Superinfektion und eine daraus resultierende Sepsis oder Generalisierung der Herpes simplex-Infektion hat nicht selten einen letal endenden Verlauf (Sanderson *et al.*, 1987). Insbesondere bei Kontaktsportlern, wie Ringern und Rugbyspielern, ist der Herpes gladiatorum (auch Herpes rugbiorum oder „*scrum*pox“ [= engl. „Gedrängepocken“] genannt) anzutreffen. Dabei treten die Hauteffloreszenzen auf Stirn, Armen und Brust auf. Wissenschaftler fanden bei dieser Herpes-Manifestation sogar einen besonders virulenten Stamm namens BgKL, der letale Infektionen zur Folge haben kann (Ban *et al.*, 2008).

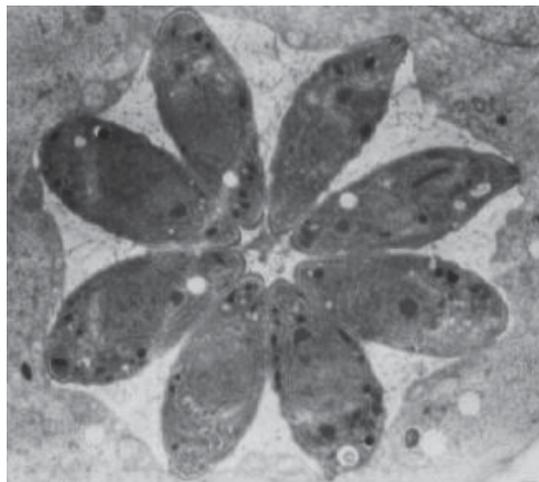
Es kann aber auch zu einer okulären Manifestation im Sinne einer Keratitis dendritica oder disciformis kommen. Bei der Keratitis dendritica infiltriert das hHSV-1 den Nervus Ophthalmicus, der die Hornhaut innerviert, zerstört ihn und führt so zu den typischen, schmerzhaften, verzweigten Läsionen. Die fatalste Erstmanifestation oder Rekrudeszenz ist eine ZNS-Infektion in Form einer Enzephalitis, die oft den Temporallappen befällt und zu einer Wernicke Aphasie (sensorische Aphasie), Verwirrtheitszuständen, Desorientierung und Verhaltensänderung führen kann (Wilson, 1976). Histologisch finden sich hämorrhagische Nekrosen im Bereich des Temporallappens (Gleixner *et al.*, 2009). Unbehandelt endet die Enzephalitis in 70 % der Fälle tödlich, oft bleiben auch neurologische Schäden zurück (Mertens, 1986; Flückinger *et al.*, 2001; Whitley, 2006). Wenn der Verdacht einer HSV-1 Enzephalitis besteht, sollte schnellstmöglich eine hoch dosierte Aciclovir-Therapie i. v. (3 x 10 mg/kg KG/Tag) über mindestens 14 Tage erfolgen. Dadurch kann die Letalität auf 20 % gesenkt werden (Skoldenberg *et al.*, 1984; Whitley *et al.*, 1986; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2008). Das hHSV-1 kann aber auch seltener zu einer aseptischen Meningitis, der Mollaret-Meningitis führen (Tang *et al.*, 2000; Carmena *et al.*, 2004). Dies ist eine Sonderform der benignen, chronisch rezidivierenden, aseptischen Meningitis, die aber öfter durch das hHSV-2 ausgelöst wird (Bruyn *et al.*, 1962; Tang *et al.*, 2000; Tyler, 2004; Abu Khattab *et al.*, 2009). Weitere Infektionen innerer Organe sind Ösophagusulzerationen oder schwere Pneumonien, insbesondere wenn der Patient immunsupprimiert ist (Flückinger *et al.*, 2001).

Ca. 2 bis 5 Wochen nach einer Organtransplantation und folgender Immunsuppression kommt es in 50 % der Fälle zu einer Infektion mit dem HSV-1. Meist resultiert die Infektion aus einer Reaktivierung. Seltener erfolgt eine Infektion durch die Virus-Transmission mit dem Transplantat. Die Folge einer Infektion können Hepatitis, Ösophagitis, Keratitis, Pneumonie und/ oder Enzephalitis sein. Präventiv ist eine Behandlung mit Virustatika (z. B. Aciclovir) bei immunsupprimierten Patienten indiziert (Schmook, Stockfleth; Bundesverband der Organtransplantanten). Ein protektiver Impfstoff gegen Herpes simplex Viren konnte bis dato nicht hergestellt werden (Kern *et al.*, 1964; Mertz *et al.*, 1990; Straus *et al.* 1994; Whitley *et al.*, 2002).

### 1.2.3. Parasiten

#### *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* (griech. „Toxon“ = Bogen, „Plasma“ = Gebilde, „gondii“ = nach dem afrikanischen Nagetier Gundi [Nicolle *et al.*, 1908]) ist ein obligat intrazellulärer Gewebsparasit, der weltweit vorkommt und zu den am häufigsten vorkommenden infektiösen Parasiten zählt (Dubey *et al.*, 2007). *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) wird in die Klasse der Coccidien eingeordnet und wie der Malariaerreger Plasmodium und Cryptosporidium zu dem Stamm der Sporentierchen (Apicomplexa) gezählt. *T. gondii* ist bislang der einzige Vertreter der Gattung *Toxoplasma* (Levine, 1977; Mehlhorn, Piekarski, 2002).



**Abb. 1.5.:** Elektronenmikroskopische Aufnahme (ca. 11.000-fache Vergrößerung) von *Toxoplasma gondii* mit typischer Anordnung in Rosettenform (Boothroyd *et al.*, 2008).

Sein weltweites Vorkommen impliziert bereits eine hohe Durchseuchungsrate bei Mensch und Tier. Tatsächlich ist bekannt, dass *T. gondii* über 200 Vogel- und Säugetierarten infizieren kann (Hof *et al.*, 2005). Sein breites Wirtsspektrum, das auch viele Haustiere

einschließt, führt dazu, dass der Mensch oft mit dem Gewebeparasit in Kontakt gerät und letztendlich auch infiziert wird. In Europa liegt die Durchseuchungsrate altersabhängig bei bis zu 70 % (Hermentin *et al.*, 1987). Die sexuelle Vermehrung des Parasiten erfolgt im Darm der Katze, sodass sie als Hauptwirt innerhalb des komplexen Entwicklungszyklus deklariert werden kann. Die asexuelle Vermehrung kann beispielsweise im menschlichen Organismus ablaufen, somit ist er ein Nebenwirt. Zur menschlichen Infektion kann es zum einen durch die orale Inkorporation von sporulierten Oozysten, welche von der Katze defäkiert werden und zum anderen durch den Verzehr von rohem, kontaminiertem, zystenhaltigem Fleisch. Daraufhin disseminieren Tachyzoiten im menschlichen Körper und es erfolgt die asexuelle Vermehrung mittels Endodyogenie (Mehlhorn, Piekarski, 2002; Hof *et al.*, 2005). Wenn sich der Mensch infiziert hat, persistiert *T. gondii* zeitlebens im Organismus. Aufgrund von immunologischen Reaktionen wandeln sich die intrazellulären Tachyzoiten in langsam proliferierende, stoffwechselträge Bradyzoiten um, die insbesondere im ZNS und in der quergestreiften Muskulatur in Gewebezysten persistieren. Im Regelfall verläuft die Infektion und die daraus folgende Persistenz asymptomatisch. Aber auch grippeähnliche Symptome mit Kopf- und Muskelschmerzen, Lymphknotenschwellungen kommen vor (Herold *et al.*, 2008). Wenn jedoch ein Organismus mit *Toxoplasma*-Persistenz beispielsweise im Fall von AIDS immunsupprimiert ist, kann es zur endogenen Reinfektion kommen. Die Folge sind interstitielle Pneumonien, Myokarditis oder cerebrale Toxoplasmose, bei der es häufig zur Enzephalitis kommt (Eza *et al.*, 2006). Zu beachten ist, dass die Toxoplasmose die häufigste ZNS-Infektion bei AIDS-Patienten ist. Ein weiterer Zustand, in dem man eine Toxoplasmose vermeiden sollte, stellt die Schwangerschaft von *T. gondii* seronegativen Frauen dar. Kommt es in diesem Fall zur Primärinfektion kann es im ersten Trimenon zur fatalen konnatalen Toxoplasmose kommen. Die Folge sind Abort oder geistige Retardierung und schwerste Schädigungen des Feten, welche durch eine Enzephalitis mit konsekutivem Hydrozephalus, Chorioretinitis und intrazerebralen Verkalkungen hervorgerufen werden (Herold *et al.*, 2008; Gleixner *et al.*, 2009). Dies alles sind Gründe, aus denen man z. B. in Frankreich ein Screening aller Schwangeren auf Toxoplasmose und *Toxoplasma gondii*-Antikörper durchführt.

Therapeutisch wird die Toxoplasmose mit Pyrimethamin (Daraprim®) und Sulfonamid (Sulfadiazin-Heyl®) für 3 bis 4 Wochen behandelt, bei ZNS-Befall wird Atovaquon (Wellvone®) zusätzlich eingesetzt. Bei AIDS-Patienten wird zur Toxoplasmose-Enzephalitis-Prophylaxe Co-Trimoxazol (Cotrim®) eingesetzt. Im Falle einer Schwangerschaftsinfektion wird z. B. in Deutschland insbesondere bis zur 16.- 20. Schwangerschaftswoche Spiramycin

eingesetzt. Ab dem 2. Trimenon wird bis zur Entbindung mit Sulfadiazin und Pyrimethamin (Daraprim®) therapiert (Herold *et al.*, 2008; Gleixner *et al.*, 2009).

### **1.3. Infektiöse Krankheitsbilder des ZNS**

Alle oben angesprochenen Erreger haben das Potential ZNS-Infektionen in Form einer Enzephalitis und/ oder Meningitis auszulösen. Dies ist auch der Grund, aus dem diese Pathogene in den verschiedenen *in vitro* Infektionsmodellen benutzt und somit die Etablierung eines Meningo-Enzephalitis-Koinfektionsmodell ermöglicht wurde. Auf diese für die vorliegende Arbeit, aber auch für die Humanmedizin an sich wichtigen Krankheitsbilder möchte ich im Folgenden kurz eingehen.

#### **1.3.1. Enzephalitis**

Die Enzephalitis ist eine Entzündung des Gehirns (griech. „*enkephalitis*“= die Gehirnentzündung). Sie kann durch viele verschiedene Erreger ausgelöst werden, eine Zusammenfassung mit wichtigen Erregern zeigt Abb. 1.6.. Zum einen kann die Enzephalitis direkt viral durch HSV-1 ausgelöst werden. Hierbei ist meist die graue Substanz betroffen und wird daher als Polioenzephalitis bezeichnet. Zum anderen kann eine Enzephalitis als eine Komplikation einer Meningitis als Meningoenzephalitis durch Bakterien, Pilze oder Protozoen ausgelöst werden. Die parainfektiose oder perivenöse Enzephalitis ist eine immunologische Reaktion bei Viruserkrankungen, wie bei der infektiösen Mononukleose (Erreger: Epstein-Barr-Virus) oder auch bei HIV. In diesem Fall ist meist die weiße Substanz betroffen und wird daher oft pathophysiologisch als Leukoenzephalitis bezeichnet. *Listeria monocytogenes* führt oft typischerweise zu einer Rhombenzephalitis (Entzündung des Rhombenzephalon [= griech. für Rautenhirn]), *Rickettsia prowazeki* führt zur Fleckfieberenzephalitis. Paraneoplastisch kann im Rahmen eines ovariellen Teratoms eine Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis auftreten (Dalmau *et al.*, 2008). Mit einem Risiko zwischen 1:300.000 bis 1:2.000.000 kann es z. B. nach einer Tollwut- oder FSME-Impfung zu einer postvakzinalen Enzephalitis kommen. Von der Ätiologie her unbekannt sind Enzephalitiden im Rahmen anderer Erkrankungen, wie bei der Sarkoidose oder Multiplen Sklerose.

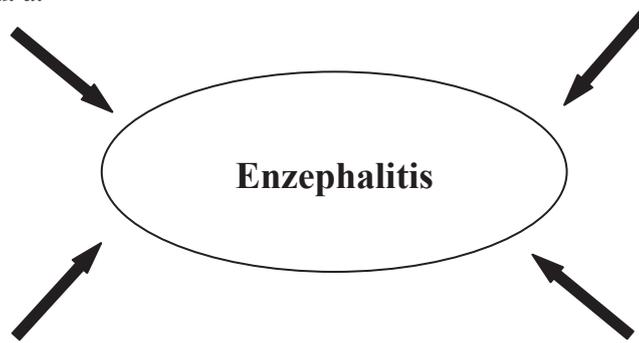
Aus epidemiologischer Sicht ist die Japanische-B-Enzephalitis die weltweit am häufigsten vorkommende Enzephalitis-Form. Etwa 1.000.000 Fälle erkranken pro Jahr weltweit an dieser Enzephalitis. In Deutschland liegt die Inzidenz einer viralen Enzephalitis bzw. Meningoenzephalitis bei 3/ 100.000/ Jahr.

**Bakterien**: *Listeria monozytogenes*, *Salmonella typhi*,  
*Borrelia burgdorferi*, *Rickettsia prowazeki*,  
*Treponema pallidum* u. a.

**Pilze**: *Cryptococcus neoformans*,  
*Candida albicans* u. a.

**Parasiten**: *Toxoplasma gondii*,  
*Entamoeba histolytikum* u. a.

**Viren**: HSV-1, HSV-2, VZV, CMV,  
Coxsackie-Virus A und B, FSME-Virus,  
ECHO-, Japanisches-B-Enzephalitis-Virus,  
Mumps-, Masern-, Röteln-Viren u. a.



**Abb. 1.6.: Überblick Enzephalitis-Erreger: Aufgelistet sind Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren, die eine Enzephalitis verursachen (Pfeil).**

In der klinischen Praxis fallen die Patienten meist mit Fieber, Kopfschmerzen und je nach Lokalisation mit neurologischen Manifestationen, wie epileptischen Anfällen oder Hirnnervenausfällen, auf. Zudem kann eine Bewusstseinsstörung mit progredienter Eintrübung bis hin zum Koma vorliegen. Allen Symptomen gemein sind ein akuter Beginn aus voller Gesundheit und ein rasches Fortschreiten. Aus diesem Grund sollte bei diesen Symptomen die Diagnose einer Enzephalitis zumindest als Differentialdiagnose beachtet werden.

Als Komplikation, auch nach einer erfolgten Therapie, kann es zu einem postenzephalitischem Syndrom mit bestehen bleibenden neurologischen Symptomen und einem hirnorganischen Psychosyndrom kommen.

Zu Beginn der Diagnosenstellung steht die Anamnese. Anschließend erfolgt eine genaue neurologische Untersuchung. Der Liquor, der mittels einer Lumbalpunktion gewonnen wird, zeigt je nach Enzephalitis-Erreger eine Trübung oder er ist klar. Im Falle einer bakteriellen Ursache ist er getrübt bis eitrig verändert, bei viraler Genese ist er in der Regel klar. Zudem erniedrigen Bakterien den Zucker, führen zu einer Zellzahl-, Laktat- und Eiweißerhöhung im Liquor. Im Gegensatz dazu können bei einer viralen Enzephalitis Zellzahl, Eiweiß und Zucker

im Normbereich liegen. Zudem kann mit Hilfe einer PCR (*polymerase chain reaction*) oder der Mikroskopie ein Keimnachweis im Liquor vorgenommen werden. Laborchemisch können beispielsweise anti-Virus-Antikörper mittels ELISA detektiert werden. Im EEG können meist schwere Allgemeinveränderungen oder Herdbefunde erkennbar sein. Letztendlich kann eine cranielle Computertomographie (CCT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) angefertigt werden. Dort zeigt eine MRT (T2-Gewichtung) im Falle einer Herpesenzephalitis meist temporal einen hyperintensiven Entzündungsherd (Berlit, 2007; Vergleiche Abb. 1.7.). In der CT fallen hypodense Nekrosen im Bereich des Temporallappens auf, meist aber erst ab dem 3. Erkrankungstag (Berlit, 2007).

Prophylaktisch stehen verschiedene Impfstoffe zur Verfügung zum Schutz vor FSME, Japanische-B-Enzephalitis oder Mumps-, Masern-, Röteln-Infektionen (nach Herold *et al.*, 2008; Gleixner *et al.*, 2009; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2008).



**Abb. 1.7.:** Cranielle MRT (hier T2-Gewichtung) mit pathognomonischer Hyperintensität des anterioren Temporallappens (hier rechter; siehe grüner Pfeil) bei HSV-1 Enzephalitis (FrontalCortex Online Courses).

### 1.3.2. Meningitis

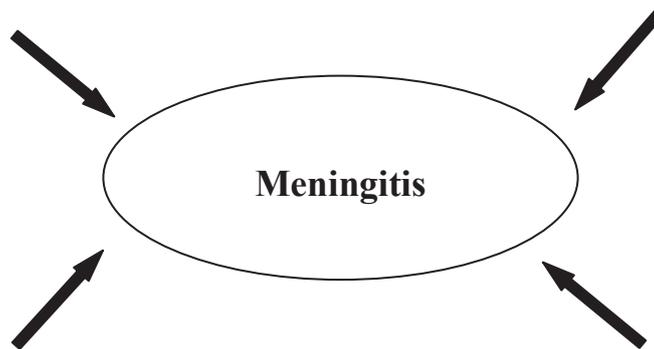
Die Meningitis ist eine Entzündung der Hirnhäute *Pia mater* und *Arachnoidea mater*, also der *Leptomeninges encephali*. Sie kann, wie die oben beschriebene Enzephalitis, durch viele verschiedene Erreger ausgelöst werden, eine Zusammenfassung mit dem wichtigen Keimpektrum zeigt Abb. 1.8.. Hierbei fällt bereits auf, dass einige Erreger, wie verschiedene Herpesviren (HSV-1 und -2) oder *Toxoplasma gondii*, potenziell beide Entzündungen (Enzephalitis und Meningitis) verursachen können. Die Toxoplasmosen-Meningoenzephalitis

ist bei AIDS eine häufige Komplikation, die meist durch eine Reaktivierung nach inapparenter Primärinfektion mit Toxoplasmen auftritt (Berlit, 2007).

Im Falle einer bakteriellen Meningitis spricht man auch von einer eitrigen Meningitis; sind Viren der Grund liegt eine lymphozytäre Meningitis vor.

**Bakterien:** Gruppe B-Streptokokken, *E. coli*, *Listeria monozytogenes*, *Haemophilus influenzae*, Meningokokken, Pneumokokken, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* u. a.

**Pilze:** *Cryptococcus neoformans* u. a.



**Parasiten:** *Toxoplasma gondii* u. a.

**Viren:** Coxsackie-Viren, ECHO-Virus, Adenovirus, HSV-2, VZV, HSV-1, CMV, Phlebovirus, Polioviren, Masern, FSME, Mumps-Viren, EBV, Röteln, Enterovirus 71, HIV, Parvovirus B19, HHV-6, Dengue-Virus u. a.

**Abb. 1.8.: Überblick Meningitis-Erreger: Zusammengefasst wurden Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren, die eine Meningitis auslösen können (Pfeil).**

Die Inzidenz einer Meningitis in Deutschland liegt bei ca. 2/ 100.000 Einwohner/ Jahr. Bei den klinischen Symptomen ist insbesondere der Meningismus in Form einer schmerzhaften Nackensteifigkeit hervorzuheben. Dieser kann mittels klinischer Zeichen, wie dem Kernig- oder Brudzinski-Zeichen, geprüft werden. An dieser Stelle sei noch einmal die spezielle Form der Mollaret-Meningitis genannt. Sie ist eine benigne, chronisch rezidivierende, aseptische lymphozytäre Meningitis, die meist durch das Herpes simplex Virus Typ 2 (HSV-2) ausgelöst wird (Bruyn *et al.*, 1962; Tang *et al.*, 2000; Tyler, 2004; Abu Khattab *et al.*, 2009). Es wurden jedoch auch Krankheitsfälle in der Literatur beschrieben, bei denen HSV-1 diese Sonderform verursachte (Tang *et al.*, 2000; Carmena *et al.*, 2004). Diese Meningitis-Form wurde erstmalig 1944 von Pierre Mollaret beschrieben und 1962 von Bruyn *et al.* näher definiert (Mollaret, 1944; Bruyn *et al.*, 1962).

Die diagnostischen Mittel und Komplikationen einer Meningitis sind mit denen der Enzephalitis vergleichbar (siehe 1.3.1.).

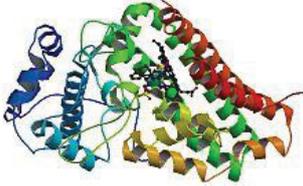
Auf die Therapie, der für diese wissenschaftliche Arbeit wichtigen Pathogene, wird in dem jeweiligen Abschnitt des Erregers (siehe oben 1.2.1. bis 1.2.3.) eingegangen (nach Herold *et al.*, 2008; Gleixner *et al.*, 2009; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, 2008).

#### **1.4. Antimikrobielle Effektormechanismen: Regulation der lokalen Tryptophankonzentration**

Ein protektiver immunologischer Abwehrmechanismus gegenüber verschiedenen Bakterien, Viren und Parasiten ist die lokale Tryptophan-Depletion. Diese kann in humanen Zellen durch die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) erreicht werden und stellt einen entscheidenden antimikrobiellen Schutzmechanismus im menschlichen Immunsystem dar (Däubener *et al.*, 1999; Adam *et al.*, 2005; Heseler *et al.*, 2008). Im murinen Tiermodell ist die IFN- $\gamma$  abhängige induzierbare NO-Synthase (iNOS) ein gut analysierter antimikrobieller Effektormechanismus, der u. a. durch das von Makrophagen gebildete Stickstoffmonoxid (NO) zustande kommt (Vazquez-Torres *et al.*, 2008).

In dieser Arbeit stehen die Regulation der lokalen Tryptophankonzentration und die damit hervorgerufenen Abwehrmechanismen gegen bakterielle, virale und parasitäre Pathogene im Mittelpunkt. Da hierbei die IDO, als entscheidendes Enzym, und der Tryptophanstoffwechsel die zentralen Rollen spielen, werden sie im Folgenden genauer vorgestellt.

### 1.4.1. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (EC 1.13.11.42)

<b>Molekulare Struktur (*)</b>	<p style="text-align: center;">Monomer</p> 
<b>Vorkommen</b>	Ubiquitär im menschlichen Körper (v. a. Tonsillen, Plazenta)
<b>Substrate</b>	L-Trp, D-Trp, Serotonin (Tryptamine), L-5-Hydroxykynurenin
<b>Induktion durch</b>	IFN- $\gamma$ (Hauptinduktor), (IFN- $\alpha$ , - $\beta$ ), LPS, TLR
<b>Inhibition durch</b>	1-Methyl-L-Tryptophan, Exiguamin A, Menadion, (Curcumin)
<b>Funktion</b>	antimikrobiell, immunregulatorisch

Tab. 1.1.: Überblick Eigenschaften der IDO (\* Protein Data Bank; Sugimoto *et al.*, 2006)

Das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) wurde 1978 erstmals isoliert und beschrieben (Shimizu *et al.*, 1978). Es ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von ca. 45 kDa und weist ein Häm als prosthetische Gruppe auf. Es gehört damit zu den Hämenzymen (Daley-Yates *et al.*, 1988). Die Ähnlichkeit zu anderen Häm-bindenden Proteinen, wie dem Myoglobin der Mollusken, deutet auf einen gemeinsamen Ursprung hin (Yuasa *et al.*, 2003). Das Gen, das für die IDO beim Menschen kodiert, liegt auf dem kurzen Arm des 8. Chromosoms, genauer an dem Genlokus 8p12-p11 (Burkin *et al.*, 1993). Das IDO-Gen besteht aus 10 Exons. Diese kodieren für ein offenes Leseraster von 1209 Nukleotiden und somit 403 Aminosäuren (Burkin *et al.*, 1993).

Das Immunsystem reguliert die Bildung und Aktivität der IDO. Durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  kann in nahezu allen humanen Zellen eine Expression der IDO hervorgerufen werden. Ihr Vorkommen ist somit als ubiquitär zu beschreiben. Es führen jedoch auch andere immunologische Mediatoren wie Prostaglandin oder membranständige Rezeptoren wie CTLA4 (Fallarino *et al.*, 2005), CD40 (Hwu *et al.*, 2000) oder Toll-like-Rezeptor 9 (TLR9) (Hayashi *et al.*, 2004) zu einer Regulierung der IDO-Expression. Die wichtigste Rolle bei der Induktion der IDO-Expression spielt jedoch das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  (Taylor *et al.*, 1991). Zusätzlich kann aber auch mit inflammatorischen Mediatoren wie dem Lipopolysaccharid (LPS) die IDO-Aktivität in nahezu allen Zellen induziert werden.

Als Substrate kann die IDO u. a. L-Tryptophan, D-Tryptophan und Serotonin (Tryptamine) erkennen und verstoffwechseln, ihre Substratspezifität ist somit eher gering (Shimizu *et al.*, 1978). Hierbei ist das L-Tryptophan als Hauptsubstrat der IDO besonders hervorzuheben. Die Aktivität der IDO kann kompetitiv mit 1-Methyl-L-Tryptophan (1-L-MT) gehemmt werden (Cady *et al.*, 1991; Sakurai *et al.*, 2002; Löb *et al.*, 2008). Aber auch das Alkaloid Exiguamin A und das Vitamin K<sub>3</sub> Menadion sind in der Literatur als Hemmstoffe beschrieben (Brastianos *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008). Indirekt hemmt Curcumin die Expression der IDO durch eine Blockade des JAK-PKC-delta-STAT1-Signalwegs (Jeong *et al.*, 2008).

Die IDO vermittelt im humanen Immunsystem einen lokalen Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan und stellt aus diesem Grund einen effektiven Abwehrmechanismus gegen Pathogene dar, die L-Tryptophan notwendigerweise für die Proteinbiosynthese benötigen. Zudem kann durch IDO-Aktivität die T-Zell Proliferation beeinflusst werden. Daraus ergeben sich antimikrobielle und immunregulatorische Aufgaben der IDO, welche in vielen Arbeitsgruppen weltweit analysiert werden. Untersuchungen ergaben, dass einige Tumorzelllinien eine IDO-Expression mit konsekutiver T-Zell Toleranz aufweisen, sodass ein genaues Verstehen der Effektormechanismen einen großen Fortschritt auf dem Gebiet der IDO-positiven Tumoren bedeuten könnte.

#### **1.4.1.1. Katalytische Eigenschaften der Indolamin 2,3-Dioxygenase**

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase ist ein entscheidendes Enzym des Tryptophanstoffwechsels. Sie katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, in dem sie unter Sauerstoffverbrauch die essentielle Aminosäure L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin (siehe Abb. 1.9.) abbaut (Moffet und Namboodiri; 2003). Sie spaltet somit oxidativ den Indol- bzw.

Pyrrrolring des L-Tryptophan und baut daher zwei Sauerstoffmoleküle ein (Daley-Yates *et al.*, 1988; Stone *et al.*, 2002). Anschließend katalysiert die Formyl-Kynurenin Formidase den Umbau von N-Formyl-Kynurenin zu L-Kynurenin und Formiat (siehe Abb. 1.9.).

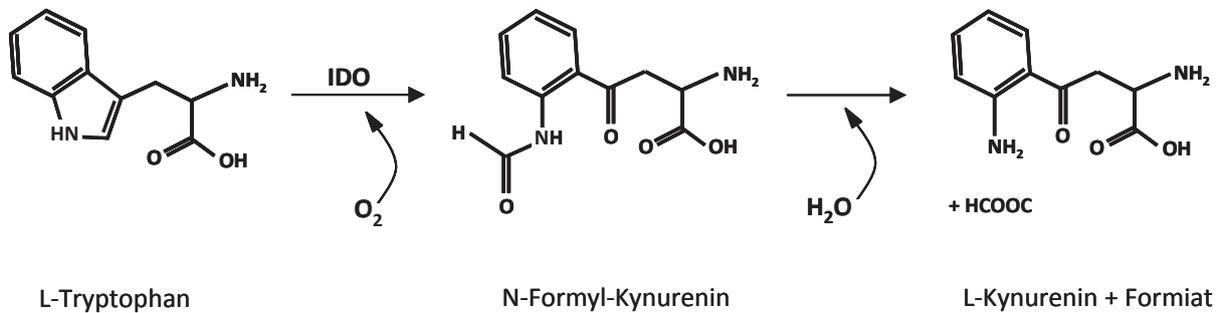


Abb. 1.9.: Reaktionsschema: Abbau von L-Tryptophan zu L-Kynurenin

In der Leber, genauer gesagt in den Hepatozyten wird die oben genannte Reaktion hauptsächlich durch ein Isoenzym namens Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) katalysiert. Die TDO ist für die Erhaltung der systemischen Serumkonzentrationen des L-Tryptophans im Blut verantwortlich (Saito *et al.*, 1991). Sie steuert daher das allgemeine Verfügbarsein dieser essentiellen Aminosäure für verschiedene wichtige Stoffwechselwege im menschlichen Organismus.

Vor kurzer Zeit wurde ein weiteres Enzym entdeckt, das wie die IDO und TDO L-Tryptophan zu N-Formyl-Kynurenin verstoffwechselt (Ball *et al.*, 2007). Da es eine starke strukturelle Ähnlichkeit mit der IDO hat, wurde es IDO-2 genannt. Über die genaue biologische Aktivität und Funktion der IDO-2 *in vivo* konnten bis dato noch keine genauen Angaben gemacht werden (Löb *et al.*, 2008; Löb *et al.*, 2009). Aus diesem Grund wird in dieser Dissertation nicht weiter auf die IDO-2 eingegangen.

Der für diese Arbeit entscheidende Effektormechanismus ist die durch die IDO-vermittelte Tryptophan-Depletion im Extrazellularraum (Munn *et al.*, 1999). Daraus resultieren die antimikrobiellen und immunregulatorischen Eigenschaften der IDO, welche in dieser Dissertation eine zentrale Rolle einnehmen (Pfefferkorn, 1984; Munn *et al.*, 1998; Adams *et al.*, 2004; MacKenzie *et al.*, 2007).

#### 1.4.1.2. L-Tryptophan und seine physiologische Bedeutung

L-Tryptophan ist eine aromatische, proteinogene  $\alpha$ -Aminosäure, die von allen Organismen für die Proteinbiosynthese benötigt wird (Rassow *et al.*, 2006). Diese Aminosäure wurde im Jahre 1901 von Hopkins entdeckt (Hopkins *et al.*, 1901). Pflanzen und einige Mikroorganismen, wie *E. coli*, können aus der Shikimisäure das L-Tryptophan selbst synthetisieren (Herrmann *et al.*, 1992; Herrmann, 1995; Stryer, 1999). Die Säugetiere, wie der menschliche Organismus, verfügen nicht über diese Stoffwechselfähigkeit, sodass sie auf die orale Aufnahme mit der täglichen Nahrungszufuhr angewiesen ist. Aus diesem Grund ist das L-Tryptophan eine essentielle Aminosäure für den Menschen und macht ihn zu einem Tryptophan-auxotrophen Organismus. Nahrungsmittel wie Sojabohnen und Nüsse enthalten besonders viel Tryptophan. Der erwachsene Mensch benötigt pro Tag zwischen 3,5 bis 6 mg Tryptophan pro kg Körpergewicht (Young *et al.*, 1996). Eine einseitige Ernährung mit Mais kann aufgrund des geringen Tryptophangehaltes zu einem Tryptophan- oder Niacinmangel führen. Die entsprechende Krankheit, die hieraus resultieren kann, ist *Pellagra* (ital. „raue Haut“) (Rassow *et al.*, 2006). Tryptophan wird nicht nur für den Aufbau wichtiger Körperproteine, wie z. B. Muskelproteine und Enzyme, verwendet, darüber hinaus ist es eine Synthesestufe der sehr wichtigen Neurotransmitter Melatonin und Serotonin (5-Hydroxytryptamin) und hat damit eine wichtige Funktion für den zirkadianen Rhythmus. Aber auch als Provitamin des Vitamin B<sub>3</sub> (Niacin, Nicotinsäure) ist es essentiell. Ein weiterer wichtiger Metabolit, der am Ende des Kynurenin-Stoffwechselweges steht, ist NAD<sup>+</sup> (Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid), welches einen wichtigen zellulären Kofaktor bei einigen biochemischen Reaktionen, wie der ATP-Synthese im Citratzyklus oder in der Atmungskette, darstellt (Moffett *et al.*, 2003; Rassow *et al.*, 2006).

Ungefähr 95 % des oral aufgenommenen Tryptophans wird über den Kynurenin-Stoffwechselweg abgebaut (Botting *et al.*, 1995). Die Regulation des gesamten L-Tryptophan-Stoffwechselweges hängt stark von den jeweiligen Zellen oder Parenchymenten ab (Takikawa, 2005). Viele Zellen haben gewissermaßen nur eine spezifische Ausstattung an Enzymen, sodass nicht zwangsweise der komplette L-Tryptophan-Stoffwechselweg, wie er in Abb. 1.10. skizziert ist, abläuft (Stone, 1993; Saito *et al.*, 1993; Alberati-Giani *et al.*, 1996; Bertazzo *et al.*, 2001). Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann dabei von den drei tryptophanabbauenden Enzymen, der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) und der Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2), katalysiert werden. Abb. 1.10. zeigt nur die wichtigsten Enzyme und Stoffwechselmetabolite und erhebt somit keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Da die IDO im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, wird sie in

Kapitel 1.4. detailliert vorgestellt. Innerhalb des L-Kynurenin-Stoffwechselweges entstehen verschiedene immunregulatorisch wirksame Metabolite. Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure können die T-Zell Proliferation inhibieren und vermitteln damit einen immunsuppressiven Effekt (Namboodiri *et al.*, 1996; Mellor *et al.*, 1999; Terness *et al.*, 2002; Fallarino *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2003). Siehe dazu auch Kapitel 1.5.2. „IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte“. 3-Hydroxykynurenin und Chinolinsäure stehen dagegen zudem im Verdacht neurotoxische Eigenschaften zu besitzen. So wurde ein erhöhter Spiegel von einem der beiden oder beiden Metaboliten im Liquor von Patienten mit neurodegenerativer Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Demenz bei AIDS-Patienten, festgestellt (Schwarcz *et al.*, 1983; Heyes, 1987; Behan *et al.*, 1999; Stone, 2001; Stone *et al.*, 2003; Németh *et al.*, 2006).

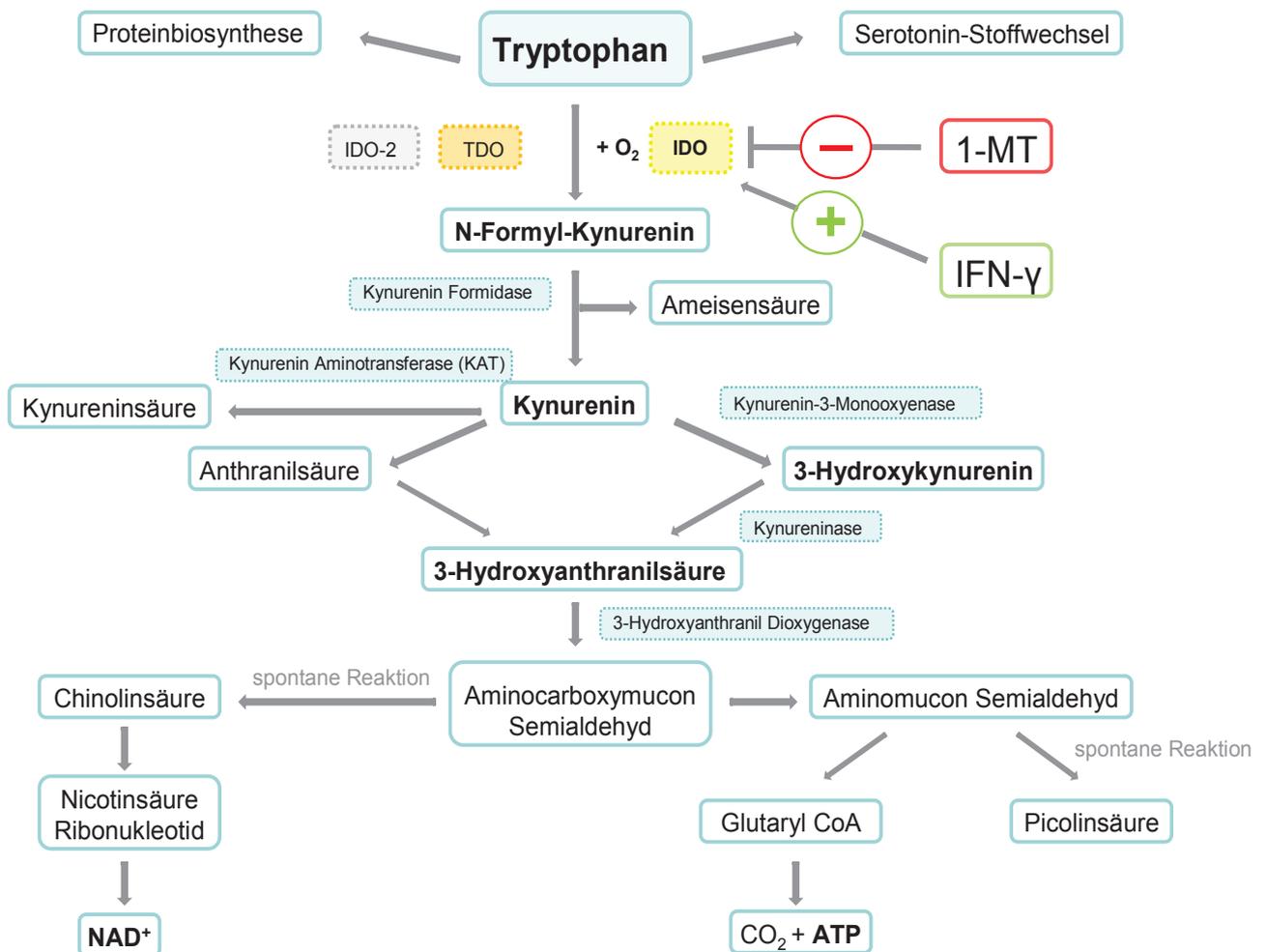


Abb. 1.10.: Schematischer Überblick über den Kynurenin-Stoffwechselweg (Nach Rassow *et al.*, 2006).

### 1.4.1.3. Indolamin 2,3-Dioxygenase: Regulation der Gentranskription und Protein-Expression

Die Mechanismen und Prozesse, die der Regulation der *ido*-Gentranskription zugrunde liegen, wurden bereits in der Vergangenheit analysiert. Nach der Erkenntnis, dass eine IFN- $\gamma$  Zellstimulation zu einer IDO-Aktivität führt, konnte auch eine IFN- $\gamma$  vermittelte Induktion der *ido*-Transkription gezeigt werden (Pfefferkorn *et al.*, 1986; Dai *et al.*, 1990; Du *et al.*, 2000; Sotero-Esteva *et al.*, 2000). Wie bereits oben unter 1.1.1. beschrieben, wird über den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg die *ido*-Transkription des IDO-Proteins induziert ([siehe Abb. 1.1.] Shuai *et al.*, 1993; Darnell *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2000; Sotero-Esteva *et al.*, 2000; Rassow *et al.*, 2006). Zum einen wird die *ido*-Transkription durch Bindung der STAT-Homodimere an ein GAS (gamma-aktivierte Sequenz)-Motiv vermittelt. Zudem verstärkt IFN- $\gamma$  die IDO-Expression durch eine sekundäre Antwort mit der Transkription von IRF-1 (*interferon regulated factor 1*), der wiederum an ISRE-Sequenzen (*IFN-stimulated response elements*) im *ido*-Promotor bindet (Schröder *et al.*, 2004). IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  binden ebenfalls an ISRE im *ido*-Promotor, jedoch kommt es zu keiner Expression des IDO-Proteins, sondern nur zu einer schwach ausgeprägten IDO-mRNA-Expression (Dai *et al.*, 1990; Hassanain *et al.*, 1993; Adams *et al.*, 2004). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass es nur über die Bindung an die GAS-Motive zu einer wirksamen IDO-Proteinexpression kommen kann. Die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und/ oder IL-1 $\beta$  können die Expression des IDO-Proteins zusätzlich verstärken (Däubener *et al.*, 1996; Babcock *et al.*, 2000; Currier *et al.*, 2000; Heseler *et al.*, 2008). Babcock zeigte, dass diese Zytokine eine Erhöhung der transkriptionalen Aktivität der *ido*-Promotorregion hervorrufen (Babcock *et al.*, 2000). Dies wird wahrscheinlich durch eine IRF-1-Transkription ermöglicht, da in dessen Promotorbereich neben einem GAS- ein  $\kappa$ B-Motiv lokalisiert ist (Saha *et al.*, 2010). Dieses  $\kappa$ B-Motiv wird vermutlich von NF- $\kappa$ B erkannt, welches wiederum durch die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  aktiviert wird. Darüber hinaus führen diese beiden Zytokine zu einer Erhöhung der IFN- $\gamma$  Rezeptor-Expression auf Epithelzellen (Shirey *et al.*, 2006). Robinson *et al.* zeigten zudem, dass der TNF- $\alpha$  eine gesteigerte Translokation der STAT1-Homodimere in den Nukleus induzieren kann (Robinson *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2005). Nach der IFN- $\gamma$  induzierten IDO-Expression kann das Enzym das mittels *large amino acid transporter* (LAT) von extra- nach intrazellulär transportierte L-Tryptophan als Substrat erkennen und verstoffwechseln (Verrey *et al.*, 1999). Daraus erfolgt ein Tryptophanmangel im Extrazellulärraum (Munn *et al.*, 1999).

## **1.5. Funktionelle Bedeutung der IDO bei antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten**

Im Immunsystem des Menschen nimmt die IDO mit ihrem vermittelten Tryptophanabbau eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von infektiösen Agenzien ein. Sie besitzt jedoch auch immunregulatorische Eigenschaften. Die vielfältigen und komplexen antimikrobiellen und immunregulatorischen Funktionen werden nun dargestellt.

### **1.5.1. IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte**

Schon seit 1984 mit den wissenschaftlichen Arbeiten Pfefferkorns sind die IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte gegen viele Pathogene bekannt und wurden seit dem immer weiter analysiert und erforscht.

#### **1.5.1.1. IDO-vermittelte antibakterielle Effekte**

Wie bereits an mehreren Stellen genannt, stellt die Indolamin 2,3-Dioxygenase einen antibakteriellen Effektormechanismus gegen verschiedene bakterielle Pathogene dar. Zum einen zeigten Byrne *et al.*, dass das obligat intrazelluläre Bakterium *Chlamydia psittacci* mittels IFN- $\gamma$  vermittelter IDO-Expression in humanen T24-Zellen (humane Blasenkarzinom-Zelllinie) in seiner Replikation gehemmt werden kann (Byrne *et al.*, 1986). Aber auch die Proliferation von *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia muridarum* wird durch die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität und den L-Tryptophanabbau gehemmt. Durch eine L-Tryptophan-Supplementation kann dieser Effekt wieder aufgehoben werden (Beatty *et al.*, 1994; Nettelnbreker *et al.*, 1998; Pantoja *et al.*, 2000; Roshick *et al.*, 2006). Bei den Chlamydien gibt es jedoch Ausnahmen. Ein *Chlamydia psittacci* Stamm kann aus Tryptophan-Metaboliten, wie zum Beispiel Anthranilinsäure, wieder Tryptophan herstellen. Somit wird der IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekt aufgehoben (Wood *et al.*, 2004).

Zudem hat die IDO-vermittelte L-Tryptophan-Depletion eine proliferationshemmende Wirkung gegenüber B-Streptokokken (MacKenzie *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001) und Enterokokken (Däubener *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 1999).

Zusammenfassend ist hier festzuhalten, dass der IDO-induzierte L-Tryptophanabbau das Wachstum von intrazellulären, aber auch extrazellulären Bakterien hemmen kann.

### 1.5.1.2. IDO-vermittelte antivirale Effekte

Antivirale Effektorcaskaden können, wie unter 1.1.1. schon beschrieben, durch IFN- $\gamma$  (Typ 2-Interferon) und IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\beta$  (Typ 1-Interferone) ausgelöst werden. In den vergangenen Jahren wurde gezeigt, dass IFN- $\gamma$  und IFN- $\beta$  vermittelt die Cytomegalievirus-Replikation gehemmt werden und lediglich im Falle von IFN- $\gamma$  eine L-Tryptophan-Supplementation eine Aufhebung des Effektes bewirken kann. Dies ist ein Hinweis dafür, dass der Effekt durch die IDO vermittelt wird (Bodaghi *et al.*, 1999). Heseler wies durch den Einsatz des IDO-Inhibitors 1-L-MT direkt nach, dass die beobachtete Inhibition der Cytomegalievirus (CMV) Virusreplikation IDO-abhängig ist (Heseler, 2008). Zudem konnte analysiert werden, dass die Replikation von anderen Herpesviren, wie HSV-1 und -2, ebenfalls durch die IDO gehemmt wird (Adams *et al.*, 2004 A; Adams *et al.*, 2004 B). Der IDO-vermittelte antivirale Effekt bezieht sich nicht nur auf die Familie der Herpesviren, sondern trifft auch für das Masernvirus, Vacciniavirus und Hepatitis-B-Virus zu (Obojes *et al.*, 2005; Terajima *et al.*, 2005, Mao *et al.*, 2011).

Die Wirkung von IDO auf das HSV-1, aber auch umgekehrt der Einfluss von HSV-1 auf die IDO, wird in der vorliegenden Arbeit eine zentrale Rolle spielen.

### 1.5.1.3. IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte

In verschiedenen wissenschaftlichen Arbeiten konnte der IDO-vermittelte antiparasitäre Effektormechanismus gezeigt werden. Schon 1984 zeigten Pfefferkorn *et al.*, dass eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität in Fibroblasten das Wachstum des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii in vitro* hemmen kann (Pfefferkorn *et al.*, 1984; Dai *et al.*, 1994). In den vergangenen Jahren konnte diese Parasiten-Proliferationshemmung auch im Falle anderer Zelllinien, wie Endothel-, Epithel-, retinale Pigmentepithelzellen und Astrozyten gezeigt werden (Däubener *et al.*, 1993; Nagineni *et al.*, 1996; Däubener *et al.*, 1999; Däubener *et al.*, 2001; Oberdörfer *et al.*, 2003). Der IDO-induzierte antiparasitäre Effekt stellt somit einen effektiven, nicht zellspezifischen Effektormechanismus des Immunsystems dar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Kostimulation mit TNF- $\alpha$  und/ oder IL-1 $\beta$  den IFN- $\gamma$  vermittelten antiparasitären Effekt synergistisch verstärkt (Däubener *et al.*, 1996; Heseler *et al.*, 2008).

Der IDO-vermittelte antiparasitäre Effekt konnte auch gegenüber anderen Parasiten, wie *Neospora caninum* (Spekker *et al.*, 2009), *Plasmodium falciparum* (Hunt *et al.*, 2006),

Trypanosomen (Vincendeau *et al.*, 1999; Knubel *et al.*, 2010), *Leishmania donovani* (Murray *et al.*, 1985) und *Schistosoma mansoni* (Esparza *et al.*, 1987) gezeigt werden.

### 1.5.2. IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte

Die Erkenntnis der IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekte wurde im Gegensatz zu den seit 1984 erforschten antimikrobiellen Eigenschaften erst seit dem Jahre 1998 u. a. durch Mellor und Munn gewonnen (Munn *et al.*, 1998; Miki *et al.*, 2001; Uyttenhove *et al.*, 2003). Im Vergleich zur Rolle der IDO im menschlichen Immunsystem übernimmt die IDO in der Maus eher immunregulatorische als antimikrobielle Aufgaben, die meist in der Toleranzentstehung von T-Zellen münden (Muller *et al.*, 2008). Munn *et al.* zeigten anhand von trächtigen Mäusen, dass durch die systemische Hemmung der IDO mit dem kompetitiven IDO-Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan allogene Feten abgestoßen, syngene Feten jedoch nicht abortiert wurden. Aus diesem Experiment erwuchs die Annahme, dass die IDO eine essentielle Rolle in der Schwangerschaft übernimmt. Durch den lokalen Tryptophanmangel, kommt es zu einer Proliferationshemmung maternaler, sich in der Plazenta befindende T-Zellen, die vermutlich ohne IDO-Aktivität eine Abstoßungsreaktion vermitteln würden. Bei vorhandener IDO-Aktivität entsteht somit eine Toleranz gegenüber dem Fetus (Munn *et al.*, 1998). Diese IDO-vermittelte T-Zell Hemmung konnte ebenfalls direkt *in vitro* nachgewiesen werden. Dabei unterdrücken IDO-exprimierende Makrophagen und dendritische Zellen die T-Zell Antwort, in dem sie das extrazelluläre Tryptophan abbauen (Munn *et al.*, 1999; Mellor *et al.*, 2004). Es konnte jedoch ein weiterer Mechanismus dieser T-Zell Inhibition nachgewiesen werden. Die Stoffwechselprodukte, wie z. B. Kynurenin, die beim Tryptophanabbau entstehen, können die T-Zell Proliferation *in vitro* und *in vivo* beeinflussen und eine regulatorische Funktion im Immunsystem vermitteln (Namboodiri *et al.*, 1996; Mellor *et al.*, 1999; Terness *et al.*, 2002; Grohmann *et al.*, 2003). Auch 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure induzieren Apoptose in T-Helfer-Zellen (Fallarino *et al.*, 2002). Zusätzlich wird die Proliferation von NK-Zellen und B-Zellen durch die Tryptophan-Metabolite inhibiert (Frumento *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002).

Ein genaues Verstehen der Effektormechanismen der IDO könnte einen großen Fortschritt auf dem Gebiet der IDO-positiven Tumoren bedeuten. In Untersuchungen mit verschiedenen Tumoren besteht eine T-Zell Toleranz, die mit der IDO-Expression in den Tumorzellen erklärt wird (Logan *et al.*, 2002; Pardoll, 2003; Uyttenhove *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2004). Darum ist die IDO ein therapeutisches *Target* in der Tumorummunologie. Curti *et al.* zeigten,

dass Leukämiezellen bei der akuten myeloischen Leukämie (AML), die IDO exprimieren, eine Konversion von CD25<sup>-</sup> in CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) bewirken und somit eine Tumor-Toleranz induzieren (Curti *et al.*, 2007).

Auch im Fall von Autoimmunkrankheiten könnte die IDO-induzierte T-Zell Inhibition eine bedeutende Rolle übernehmen. Im Mausmodell konnte durch eine IDO-Hemmung mittels 1-MT eine Progression der T-Zell-vermittelten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), welche das Modell für die humane Multiple Sklerose darstellt, nachgewiesen werden (Sakurai *et al.*, 2002; Kwizdzinski *et al.*, 2005). Aber auch bei anderen experimentell ausgelösten Erkrankungen, wie z. B. einer TNBS (Trinitrobenzensulfonsäure)-Colitis (Entzündung des Dickdarms durch TNBS), konnte gezeigt werden, dass eine IDO-Inhibition eine fortschreitende inflammatorische Reaktion zur Folge hat (Gurtner *et al.*, 2003).

Die IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekte sind ebenfalls für Wissenschaftler auf dem Gebiet der Organtransplantation interessant. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass eine IDO-Inhibition ein gesteigertes Risiko für eine Organtransplantatabstoßung darstellt. Eine IFN- $\gamma$  Stimulation und die konsekutive IDO-Aktivität führt dagegen zu einer verbesserten Toleranz gegenüber allogenen Nieren- und Lebertransplantaten (Laurence *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2008). Auch bei transplantierten allogenen Zellen, die fähig sind IDO zu exprimieren, konnte gezeigt werden, dass eine Transplantatabstoßungsreaktion durch den Empfänger verhindert werden kann (Alexander *et al.*, 2002).

## **1.6. Zielsetzung der eigenen Arbeit**

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) mit ihren antimikrobiellen und immunregulatorischen Eigenschaften spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr pathogener, infektiöser Erreger, sowie in der Koordination des humanen Immunsystems. Es ist das erste und geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Tryptophan-Stoffwechsel und vermittelt seine antimikrobiellen und immunregulatorischen Mechanismen sowohl durch den Tryptophanabbau, als auch durch die Produktion verschiedener Tryptophan-Metabolite. Ihr potentiell ubiquitäres Vorkommen unterstreicht zudem den Schlüsselrollencharakter im humanen Immunsystem.

Die IFN- $\gamma$  vermittelte Aktivität, sowie die mRNA- und Proteinexpression der IDO wird im ersten Teil dieser Arbeit anhand der nativen HFF-Zelllinie und den 86HG39 Zellen (humane Glioblastomzellen) analysiert. Anschließend wird im ersten Teil der Arbeit anhand eines

Modells mit humanen Hirntumorzellen (86HG39) die funktionelle Bedeutung der IDO bei der Abwehr verschiedener Enzephalitis- oder Meningitis- bzw. Meningo-Enzephalitis-Erreger *in vitro* untersucht.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wird die Regulation der IDO-Aktivität, IDO-mRNA- und IDO-Proteinexpression durch den pathogenen Erreger selbst analysiert. Hierbei war vorher vielfach in der Literatur beschrieben, dass Infektionserreger immer wieder Wege und Mechanismen entwickeln, um sich gegen antimikrobielle Effekte zu schützen. Als Beispiel hierfür kann das humane Cytomegalievirus (hCMV) angeführt werden, da es mit dem IFN- $\gamma$  vermittelten JAK-STAT-Signaltransduktionsweg interferieren und ihn an verschiedenen Stellen hemmen kann. So war bereits bekannt, dass eine hCMV-Infektion die Aktivität und Expression der IDO in HFF-Zellen unterdrückt (Heseler, 2012).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss des humanen Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) auf die antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte der IDO untersucht werden. Ein inhibitorischer Effekt hätte *in vivo* schwerwiegende Folgen, z. B. im Rahmen von Enzephalitis- oder Meningo-Enzephalitis-Koinfektionen oder im Falle von Immunsuppression bei organtransplantierten Patienten mit konsekutiver Verminderung der Organtoleranz. Aus medizinischer Sicht wäre denkbar, dass eine hHSV-1 ZNS-Infektion andere schwerwiegende ZNS-Infektionen, wie eine bakterielle Meningitis oder parasitäre Enzephalitis begünstigt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellen

Für die in vitro Experimente wurden verschiedene Zelllinien verwendet, die in Tabelle 2.1. aufgelistet sind.

Zelllinie	Eigenschaften	Quelle (Referenz)	Verwendung
HFF	Humane Vorhautfibroblasten ( <i>human foreskin fibroblasts</i> )	ATCC , Wesel ( <i>American Type Culture Collection</i> )	Experimente, Wirtszellen für <i>T. gondii</i>
86HG39	Humane Glioblastom-/ Astrozytomzellen	Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf (Bilzer <i>et al.</i> , 1991)	Experimente
PBL	Humane Periphere Blutlymphozyten	Probanden	Experimente

Tab. 2.1.: Verwendete Zelllinien

#### 2.1.2. Erreger für Infektionsversuche

##### 2.1.2.1. Bakterien

*Staphylococcus aureus* und *Streptococcus agalactiae* dienten als bakterielle Erreger in diversen Infektionsversuchen. Beide Bakterienisolate wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial identifiziert, isoliert und kulturell angezchtet.

##### 2.1.2.2. Viren

Das humane Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) wurde von Prof. K. E. Schneweis (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Bonn) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2.3. Parasiten

*Toxoplasma gondii* RH-Stamm erhielten wir von ATCC (*American Type Culture Collection*, Wesel).

### 2.1.3. Medien, Lösungen und Puffer

#### 2.1.3.1. Medien für die Bakterienkultur

Bakterienkulturmedium	Verwendung	Hersteller
bluthaltige Columbia-Agarplatte (COS-Agarplatte)	Experimente (Anzucht von <i>Staphylococcus aureus</i> und <i>Streptococcus agalactiae</i> )	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

Tab. 2.2.: Verwendete Bakterienkulturmedien

#### 2.1.3.2. Medien für die Zellkultur

Zellkulturmedium	L-Tryptophan-konzentration	Zusätze	Verwendung	Hersteller
IMDM ( <i>Iscoves's Modified Dulbecco's Medium</i> )	80 µM	10 % FCS	Zellkultur (HFF, 86HG39) Experimente	Cambrex, München
RPMI 1640	25 µM	10 % FCS	Experimente	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 ohne L-Tryptophan, ohne L-Glutamin		580 µg/mL L-Glutamin	Experimente	Gibco, Karlsruhe

Tab. 2.3.: Verwendete Zellkulturmedien

Nun folgen die Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer. Diese wurden, wenn nicht anders beschrieben, ausschließlich mit hochreinem Wasser einer Aufbereitungsanlage Direct-Q™ (Millipore GmbH, Schwalmbach) hergestellt, welches im weiteren Verlauf als dH<sub>2</sub>O bezeichnet wird.

### 2.1.3.3. Lösungen

Lösung	Bestandteile
dNTP-Mix	1 mM dATP 1 mM dCTP 1 mM dTTP 1 mM dGTP
Proteinase K-Lösung	6.6 µg/mL in PBS
Kryokonservierungslösung	12 % DMSO 88 % FCS
Ponceau S Färbung	2 g Ponceau 30 g TCA (Trichloressigsäure) 30 g Sulfosalicylsäure ad 100 ml dH <sub>2</sub> O

Tab. 2.4.: Verwendete Lösungen

### 2.1.3.4. Puffer

Puffer	Bestandteile
Blotting-Puffer	50 mL NuPage-Blot-Puffer (20x) (Invitrogen™, Karlsruhe) 200 mL Methanol 750 mL dH <sub>2</sub> O
Ehrlich's Reagenz	1.2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig
Laufpuffer (Western Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7.7
PBS (Phosphat-gepufferte Saline [ <i>Phosphate-buffered saline</i> ])	13.7 mM NaCl 2.7 mM KCl 80.9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.4
SDS-Probenpuffer	45 % Glycerin 25 % β-Mercaptoethanol 10 % SDS

	0.15 % Bromphenolblau 30 mM Tris/HCl pH 6.8
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA

**Tab. 2.5.: Verwendete Puffer**

#### 2.1.4. Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Verwendung
IDO-for	TGG AGG AAC TGA GCA GCA T	Detektion von IDO-mRNA
IDO-rev	TTC AGT GCT TTG ACG TCC TG	Detektion von IDO-mRNA
β-Aktin-for	ATT GGC AAT GAG CGG TTC	Detektion von β-Aktin-mRNA
β-Aktin-rev	GGA TGC CAC AGG ACT CCA T	Detektion von β-Aktin-mRNA

**Tab. 2.6.: Eingesetzte Primer für Real-Time PCR**

#### 2.1.5. Sonden

Die Sonden, die in der Real-Time PCR zur Detektion der IDO- (Nr. 22) und β-Aktin-mRNA (Nr. 11) eingesetzt wurden, wurden von Roche (Mannheim) hergestellt. Die Sonden waren am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

#### 2.1.6. Zytokine

Humanes IFN-γ wurde von R&D (Wiesbaden) bezogen, in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  U/mL in IMDM gelöst und in Aliquots von 100 μL bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

## 2.1.7. Antikörper

### 2.1.7.1. Primärantikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Eingesetzte Verdünnung
Maus-anti- $\beta$ -Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000
Kaninchen-anti-IDO	Chemicon, Hofheim	1:5000

Tab. 2.7.: Verwendete Primärantikörper

### 2.1.7.2. Sekundärantikörper

Sekundäre Antikörper	Quelle	Eingesetzte Verdünnung
POX-anti-Maus-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:10000
POX-anti-Kaninchen-IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK	1:10000

Tab. 2.8.: Verwendete Sekundärantikörper

## 2.1.8. Größenstandards

### 2.1.8.1. Größenstandards für Proteine

Für die Bestimmung der molekularen Masse von Proteinen in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden Proteingrößenstandards der Firma Invitrogen™ (Karlsruhe) benutzt. In Tabelle 2.10. sind die molekularen Massen der „SeeBlue® Plus2 Pre-Stained“ Standardproteine aufgelistet.

Proteine des Größenstandards	in MOPS-Puffer [kDa]
Myosin	191
Phosphorylase B	97
BSA	64
Glutamat-Dehydrogenase	51
Alkohol-Dehydrogenase	39
Carboanhydrase	28
Myoglobin Rot	19
Lysozym	14
Aprotinin	n/a
Insulin, B-Kette	n/a

Tab. 2.9.: Molekulargewichte der Proteingrößenstandards von SeeBlue® Plus2

### 2.1.9. Sonstige Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Expand-High-Fidelity-Polymerase	Roche, Mannheim
M-MLV-Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche, Mannheim
RNase Out	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 2.10.: Verwendete Enzyme

### 2.1.10. Chemikalien

#### 2.1.10.1. Allgemeine Chemikalien

Agarose	Biozym, Oldendorf
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Roth
4-(Dimethylamin)benzaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
Eisessig (Essigsäure 96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol 97 %	Merck, Darmstadt
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	BioChrom, Berlin
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
Milchpulver	Oxoid Wesel
MOPS	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NuPage® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Schuchard, Hohenbrunn
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
TRIZOL Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Trypsin/EDTA  
Tween-20

Biochrom, Berlin  
Merck, Darmstadt

### 2.1.10.2. Radiochemikalien

Die Reagenzien erhielt man von der Firma Amersham (Braunschweig), wurden in RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan, ohne Glutamin) gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

Radiochemikalie	Aktivität	Bezugsquelle
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin	0.74 MBq/mL	Amersham, Braunschweig
[ <sup>3</sup> H]-Uracil	1.23 MBq/mL	Amersham, Braunschweig

Tab. 2.11.: Radiochemikalien

### 2.1.11. Verbrauchsmaterialien

6-well Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
96-well Platten Real-Time PCR	Applied Biosystems, Darmstadt
Deckgläschen, Glas, ø 13 mm	Hecht-Assistent, Sondheim
Einmalspitzen	Polylab, Seoul, Korea
Einmalspritzen, 1-20 mL	Polylab Seoul, Korea
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpapier Whatman 3 MM	VWR, Darmstadt
Kanülen; Microlance, verschiedene Größen	BD Becton Dickinson, Heidelberg
Kryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, 0.5-2.0 mL	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen, 25-175 cm <sup>2</sup>	Costar, Bodenheim
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 15 mL und 50 mL	Greiner, Frickenhausen

### 2.1.12. Geräte und sonstige Materialien

Analysenwaage	Chyo JL-180, Welabo, Düsseldorf
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Blottingkammer	Semidry, Bio-Rad, München
Brutschränke	B5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus, Hanau,
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande

Elektrophoresekammern  
Entwicklermaschine Curix 60  
Fluoreszenzmikroskop  
Kippschüttler  
Kodak X-OMAT, AR Film,  
Mikroskope: Axiovert 25, TE2000  
Nitrozellulosemembran „Protran“ (0.45 µm)  
Photometer  
Pipetten  
Plattenphotometer  
Quarzküvetten, 100 µL  
Real-Time PCR Gerät iQ5  
Röntgenfilmkammer  
Filme Hyperfilm™-ECL  
SDS-Gelelektrophoresekammer  
Spannungsgeber

Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A)  
Thermoblock  
Thermocycler

UV-Bestrahlungsgerät:  
Crosslinker (UV-) CL-1000  
Vortexer  
Wasserbad  
Zellerntegerät

Zentrifugen

AGS, Heidelberg  
Agfa, Köln  
Photomikroskop II, Zeiss, Köln  
Duomax 1030, Heidolph, Nürnberg  
Rochester, USA  
Zeiss, Oberkochen; Nikon, Düsseldorf  
Schleicher & Schüll, Dassel  
DU 640, Beckman-Coulter, München  
Finnpipette Labsystems, München  
Tecan, Crailsheim  
Hellma, Jena  
iCycler, Biorad, München  
REGO, Haan  
GE Healthcare, München  
XCell, Invitrogen, Karlsruhe  
Electrophoresis constant Power Supply  
EPS 500/400, Amersham Biosciences,  
Braunschweig  
Flow Laboratories, Meckenheim  
Eppendorf, Hamburg  
Perkin Elmer, Thermal Cycler 480  
Biometra Göttingen, UNO Thermoblock  
UVP, Upland, Kanada  
Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz  
GFL, Burgwedel  
Harvester Basic 96, Satron Instruments  
Tampere, Finnland  
Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau,  
Heraeus Biofuge fresco, Hanau

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1. Isolierung von gesamtzellulärer RNA**

Um gesamtzelluläre RNA aus der jeweiligen Zelllinie zu isolieren, wurde TRIzol Reagenz der Firma Invitrogen™ (Karlsruhe) verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Guanidiniumthiocyanat Methode (Chomczynski *et al.*, 1987). Trizol enthält Guanidiniumthiocyanat. Dieses Thiocyanat-Salz des Guanidin lysiert die Zellen und inaktiviert zudem die zellulären RNasen und weitere Zellenzyme. Die Durchführung der Isolierung der gesamtzellulären RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden die benötigten Zellen (zwischen  $5-10 \times 10^6$ ) geerntet, abzentrifugiert (1800 rpm, 10 min.) und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1mL TRIzol Reagenz resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit einem Ultraturrax zerkleinert. Es folgte eine 5-minütige Inkubationszeit, eine Zugabe von 200  $\mu$ L Chloroform, sowie Schütteln der Suspension. Nach 3 Minuten wurde die Suspension 15 Minuten lang bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nun wurde mittels Pipette die obere Phase sorgfältig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurde 500  $\mu$ L Isopropanol pipettiert und anschließend das Reaktionsgefäß vorsichtig invertiert. Nach einem weiteren 10-minütigen Inkubationsschritt wurde erneut für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das sichtbare Pellet wurde nun mit Ethanol (75 %ig) gewaschen und für weitere 10 Minuten zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet luftgetrocknet, in 100  $\mu$ L DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und letztlich wurde das Pellet 10 min. bei 56 °C aufgelöst. Nun konnte die RNA-Konzentration mit dem Photometer, wie unter 2.2.1.5. beschrieben, bestimmt werden.

#### **2.2.1.2. cDNA Synthese aus gesamtzellulärer RNA**

Bei der Synthese von cDNA wird mRNA aus Zellen oder Gewebeproben enzymatisch mittels dem Enzym „reverse Transkriptase“ in DNA umgeschrieben. Hierbei werden die molekularen Verhältnisse der Transkripte nicht verändert. Daher kann die entstehende cDNA zur Expressionsquantifizierung genutzt werden. Die Synthese der cDNA erfolgte mittels *M-MLV Reverse Transcriptase Kit* von Invitrogen™ (Karlsruhe). Der Ansatz und die Durchführung werden nun im Folgenden kurz skizziert:

### Ansatz

1 µg RNA in 10 µL DEPC-H<sub>2</sub>O

- + 1 µL Oligo-dT Primer (10 µM)
- + 1 µL dNTP-Mix (10 mM)

Inkubation des Ansatzes bei 65 °C für 5 Minuten und anschließend sofort Abkühlung auf Eis.

- + 4 µL 5 x First Strand Puffer
- + 2 µL (0.1 M DTT)
- + 1 µL RNase OUT

Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für 2 min.

- + 1 µL (200 Units) M-MLV RT

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 50 min. Danach wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung bei 70 °C für 15 min. gestoppt.

#### **2.2.1.3. Amplifikation von DNA Molekülen mittels PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase-chain-reaction*) wurde 1983 von Kary Mullis entwickelt, 1993 erhielt er dafür den Chemie-Nobelpreis. Die PCR ist eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können. Aus geringsten DNA-Mengen können mit der PCR innerhalb kurzer Zeit größere DNA-Mengen hergestellt werden. Anschließend können diese weiter analysiert werden. Aus diesem Grund werden die Polymerase-Kettenreaktion und ihre Varianten (z. B. RT-PCR) häufig in medizinischen und biologischen Laboratorien für viele verschiedene Fragestellungen verwendet, z. B. für das Detektieren von Erbkrankheiten und zur Erstellung von genetischen Fingerabdrücken in der forensischen Medizin, und für Vaterschaftstests. Die zu amplifizierende, doppelsträngige DNA, welche DNA-Matrize oder auch Template genannt wird, kann ein Teil eines Gens (Exon) oder eine nicht-codierende Sequenz (Intron) sein. Die DNA-Matrize besteht maximal aus bis zu 10000 bp und ist damit relativ kurz. Die mit Hilfe der PCR amplifizierte DNA kann anschließend z. B. durch Spaltung mit Restriktionsenzymen, durch Agarose-Gelelektrophorese oder durch Sequenzierung genauer untersucht werden.

Im Prinzip besteht die PCR-Methode aus drei Hauptschritten. Am Anfang steht die Hitzedenaturierung, dann kommt das Primer-Annealing und zuletzt folgt die Primer-Extension oder Polymerisation. Im ersten Schritt wird die doppelsträngig vorliegende DNA durch Hitze

(95 °C) denaturiert. Danach können sich während einer Abkühlungsphase die beiden spezifischen, gegenläufig orientierten Oligonucleotid-Startermoleküle (Primer) mit der 5`- oder 3`-flankierenden Sequenz verbinden. Durch eine Temperaturerhöhung auf 72 °C kann die spezifische, thermostabile DNA-Polymerase den jeweiligen Komplementärenstrang synthetisieren. In diesem Fall wurde die „*expand high fidelity*“ DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) eingesetzt, die im Vergleich zur *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) eine 3`→5` Exonuklease-Aktivität, das proofreading, besitzt und dadurch eine geringere Fehlerrate hat. Die DNA-Vermehrung erfolgt in einem Thermocycler. Durch ein 20- bis 30-faches Wiederholen des Zyklus erreicht man einen exponentiellen, millionenfachen Anstieg der Konzentration des DNA-Amplifikats. Weitere Zyklen führen zu keiner weiteren DNA-Vermehrung, da die Reaktion durch die Ansammlung von entstehendem Pyrophosphat, die Konkurrenz zwischen Primer und komplementärem DNA-Strang, die Konkurrenz zwischen den Matrizenmolekülen um die DNA-Polymerase und durch die Inaktivierung der DNA-Polymerase zunehmend inhibiert wird.

#### PCR-Ansatz

10 – 500 ng	Template-DNA
100 pmol	Primer 1
100 pmol	Primer 2
5 µL	10 x Reaktionspuffer
40 nmol	dNTP-Mix
2.5 Units	DNA-Polymerase
ad 50 µL	Reinstwasser

#### Thermoprofil des Reaktionszyklus:

95 °C	5 min.	} 30 Zyklen
95 °C	30 sec.	
53-64 °C	60 sec.	
72 °C	1 min. / kb des Produkts	
72 °C	7 min.	
4 °C	unendlich	

#### 2.2.1.4. Real-Time PCR

Die Real-Time PCR, auch als Real-Time-quantitative-PCR oder quantitative Echtzeit-PCR bezeichnet, ist eine molekularbiologische Methode, die eine Quantifizierung von Nukleinsäuren ermöglicht. Diese Technik basiert auf der in 2.2.1.3. beschriebenen herkömmlichen PCR. In dieser Arbeit wurde die Real-Time PCR zur Quantifizierung der IDO-mRNA- und  $\beta$ -Aktin-mRNA-Kopien in der Zellkultur eingesetzt. Sie wurde in einem iCycler (Biorad, München) durchgeführt und mittels der Biorad iQ5 Software ausgewertet. Im Unterschied zur herkömmlichen PCR wird bei dieser Methode zusätzlich eine sequenzspezifische Sonde, die zwischen den verschiedenen Primern an der Template-DNA bindet, benötigt. Die Sonde hat an dem einen Ende einen Quencher und ist an dem anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch diese Eigenschaften kann man eine Fluoreszenz, die proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produkts ist, messen. Ist die Sonde jedoch, wie zu Beginn des PCR-Zyklus, intakt, unterdrückt der Quencher die potentielle Fluoreszenz-Emission des Reporters aufgrund der räumlichen Nähe durch Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET, *fluorescence resonance energy transfer*). Wenn jedoch die Sonde, durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase, während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abgebaut wird, entfernen sich Quencher (6-Carboxytetramethylrodamin) und Reporter (Fluorophor, 6-Carboxyfluorescein) voneinander. Daraus folgt eine zunehmende Reporter-Fluoreszenz, welche detektiert wird und auf die Konzentration der IDO-mRNA in Relation zur  $\beta$ -Aktin-mRNA als konstitutiv exprimiertes Gen, auch als Haushaltsgen (engl. *housekeeping gene*) bezeichnet, schließen lässt. Die unterschiedliche mRNA-Expression wurde letztendlich mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet.

#### Real-Time PCR-Ansatz

5.0 $\mu$ L	Template-DNA
12.5 $\mu$ L	qPCR Mastermix-No ROX (Eurogentec, Köln)
0.3 $\mu$ L	Primer 1
0.3 $\mu$ L	Primer 2
0.5 $\mu$ L	Sonde
6.4 $\mu$ L	steriles H <sub>2</sub> O

#### Thermoprofil des Reaktionszyklus

50 °C	10 min.	
95 °C	10 min.	
95 °C	15 sec.	} 45 Zyklen
60 °C	1 min.	
4 °C	unendlich	

### **2.2.1.5. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Um die DNA-Konzentration zu bestimmen, wurden die Proben 1:100 in Reinstwasser verdünnt, in eine Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) pipettiert und die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm im Spektralphotometer (Pharmacia LKB Ultraspec Plus, Pharmacia, Freiburg) detektiert. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder Reinstwasser). Das Verhältnis der ermittelten Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Auskunft über Kontaminationen der Nukleinsäuren. Wenn eine Absorption von 1.0 bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm vorliegt, würde dies einem DNA-Gehalt von 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doppelsträngiger DNA und 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei einzelsträngiger DNA und RNA entsprechen. Bei sauber durchgeführten Präparationen sollten die Werte des  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten zwischen 1.7-2.0 liegen. Bei Verunreinigungen mit Proteinen oder Phenol liegt der Quotient deutlich niedriger, bei Kontaminationen mit Salzen deutlich höher.

### **2.2.2. Zellbiologische Methoden**

#### **2.2.2.1. Zellkulturmethoden**

Alle Zellkulturen, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden in einem Brutschrank, in dem eine  $\text{CO}_2$ -Konzentration von 10 % bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre und eine Temperatur von 37 °C vorherrschten, kultiviert. Alle Arbeiten in der Zellkultur erfolgten unter einer Sterilbank und mit Hilfe steriler Materialien.

#### **2.2.2.2. Kultivierung von Zelllinien**

Die Kultivierung der 86HG39 und HFF-Zellen erfolgte in IMDM, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem (30 min. bei 56 °C im Wasserbad) fetalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde. Die Zellkultur erfolgte in 75  $\text{cm}^2$  oder 162  $\text{cm}^2$  großen Zellkulturflaschen. Zum Ernten oder Splitten der jeweiligen Zellen wurden diese 3 Mal mit ca. 5 bis 10 mL PBS gewaschen und mit ca. 3 bis 5 mL 0.25 %igen Trypsin-EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst. Durch Zugabe von ca. 10 mL Kulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellsuspension in einem Verhältnis von ca. 1:6 (bei HFF-Zellen ca. 1:3) in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium gegeben.

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders erwähnt, ebenfalls in dem entsprechendem Kulturmedium durchgeführt.

### **2.2.2.3. Kryokonservierung von Zelllinien**

Für die Kryokonservierung der jeweiligen Zellen wurden diese in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /mL in die Kryokonservierungslösung aufgenommen und je 1 mL in Kryotubes pipettiert. Danach wurden die Zellen rasch auf eine Temperatur von  $-80\text{ °C}$  heruntergekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.2.4. Bestimmung der Zellzahl**

Die verschiedenen Zellen, Toxoplasmen und PBL wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dazu wurden sie mit Trypanblau vermischt (je nach Ausgangskonzentration in einer 1:10 oder 1:2 Verdünnung) und im Mikroskop gezählt. Es wurden nur die ungefärbten, vitalen Zellen gezählt, da diese fähig sind, den Farbstoff aktiv aus der Zelle zu transportieren und sich damit nicht blau anfärben.

### **2.2.2.5. Verwendung von L-Tryptophan**

Das L-Tryptophan wurde in einer Konzentration von 20 mM in einer Stocklösung angesetzt. Dazu wurden 204 mg L-Tryptophan abgewogen und in 50 mL RPMI 1640 (ohne Tryptophanzusatz) gelöst. Danach wurde es steril filtriert und bei  $4\text{ °C}$  im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.2.6. Stimulation von Zellen**

Die Experimente wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Dazu wurden jeweils  $3 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung eingesetzt und für 72 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , wie in den einzelnen Experimenten angegeben, stimuliert. Lediglich in den Experimenten, in denen *Toxoplasma*-Tachyzoiten zugegeben wurden, wurden  $4 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung eingesetzt.

Diese Ansätze wurden danach für die Messung der IDO-Aktivität, sowie für Infektionsexperimente gleichermaßen verwendet.

### **2.2.2.7. Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut**

Für die jeweiligen Experimente wurden PBL (periphere Blutlymphozyten) aus dem venösen Blut von gesunden Spendern gewonnen. Die Lymphozyten wurden für jeden Versuch frisch präpariert. Es wurden 50 mL Blut abgenommen, mit 2000 I. E. Heparin, um eine Gerinnung zu verhindern, vermischt und mit 50 mL PBS verdünnt. Die Anreicherung der T-Zellen erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biototech, Uppsala, Schweden). Dafür wurden 15 mL Ficoll-Paque zunächst in ein 50 mL Reaktionstube pipettiert und mit 35 mL des heparinisierten, verdünnten Blutes vorsichtig überschichtet. Anschließend wurde das Gemisch 30 min. bei Raumtemperatur ungebremst mit 2400 rpm zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau). Das Ergebnis dieser Zentrifugation ist eine Auftrennung der einzelnen Blutbestandteile. Es wurde zunächst die obere Phase, die aus Blutserum und PBS besteht, vorsichtig abgesaugt. Die Lymphozyten, die sich in der Interphase befinden, wurden mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 50 mL Reaktionstube gegeben. Die restlichen Bestandteile des Blutes (u. a. Erythrozyten) und das Ficoll wurden verworfen. Um möglichst nur die PBL zu erhalten, mussten sie noch vom restlichen Ficoll und Thrombozyten isoliert werden. Dazu folgten drei Waschschriffe mit PBS. Hierbei wurde das Gemisch mit PBS bis auf 50 mL aufgefüllt. Es folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 1800 rpm. Anschließend wurden ca. 45 mL aus dem Tube abpipettiert und verworfen. Zu den übrig gebliebenen 5 mL wurden erneut 50 mL PBS gegeben. Dieser Schritt wurde noch zweimal durchgeführt, aber bei dem zweiten Zentrifugationsschritt wurde das Zentrifugationstube bei 1200 rpm und beim Dritten bei 700 rpm 10 min. lang zentrifugiert. Anschließend wurde das Lymphozyten-Zell-Pellet in 5 mL PBS aufgenommen und mit der Neubauer-Zählkammer gezählt.

### **2.2.2.8. Versuchsansätze mit PBL**

In jede der 96-well Vertiefungen wurden  $1,5 \times 10^5$  PBL eingesetzt. Als Kulturmedium diente IMDM Medium, welches mit 10 % FCS versetzt wurde. Den Medien wurden jeweils unterschiedliche Mengen L-Tryptophan zugesetzt. Die Stimulation der T-Zell Proliferation erfolgte durch die Zugabe von 10  $\mu$ L monoklonalem anti-CD3-Antikörper OKT3 in einer Endkonzentration von 1:3000. Dieser Antikörper, der gegen das T-Zell-Oberflächenantigen CD 3 gerichtet ist und in der Medizin nach Organtransplantation als Muromonab-CD3

(Orthoclone OKT3®) eingesetzt wird, wurde mit Hilfe von OKT3 produzierenden Hybridomzellen gewonnen (*American Type Culture Collection*, Rockville).

#### **2.2.2.9. Bestimmung von T-Zell Proliferation**

Wie bereits unter 2.2.2.8 kurz beschrieben, gab man  $1.5 \times 10^5$  PBL in die Stimulationsansätze. Nach 72 Stunden wurde der anti-CD3-Antikörper OKT3 (Endverdünnung 1:3000) in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und die Stimulationsansätze wurden für weitere 24 Stunden mit 7.4 kBq [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin radioaktiv markiert und inkubiert. Danach konnten die 96-well Mikrotiterplatten bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  weggefroren werden. Nach ca. 24 Stunden taute man die mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin radioaktiv markierten Ansätze auf und brachte sie mittels eines Zellerntegeräts (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac). Anschließend wurden die Glasfaserfilter im Trockenschrank bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  getrocknet. Nun gab man die Filter mit ca. 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) in spezielle Plastikfolien und schweißte diese zu. Die anschließende Auswertung der Glasfaserfilter erfolgte mit einem Beta-Counter (1205 Betaplate, LKB Wallac). Bei der Messung wurde die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung detektiert und in Zerfällen pro Minute (cpm = *counts per minute*) angegeben.

Bei den T-Zell Proliferationsexperimenten setzte man die Zellkulturüberstände von 86HG39 Zellen, die zuvor für 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  (600 U/mL) stimuliert wurden, als Kulturmedium für die PBL ein. Hierbei wurden nach der IFN- $\gamma$  Stimulation 200  $\mu\text{L}$  des Zellkulturüberstandes in eine 96-well Mikrotiterplatte gegeben und anschließend pipettierte man die PBL ( $1,5 \times 10^5$ /Vertiefung) in 10  $\mu\text{L}$  PBS dazu.

#### **2.2.2.10. Kultivierung von *Toxoplasma gondii***

Da der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* (RH-Stamm) eine Wirtszelle zur Vermehrung benötigt, wurden er in HFF-Zellen kultiviert. Die Wirtszellen, die in einer  $25\text{ cm}^2$  Zellkulturflasche in einem Monolayer angezüchtet worden sind, wurden in einem Wirtszell-Parasiten-Verhältnis von ca. 2:1 infiziert. Nach zwei bis drei Tagen waren nahezu alle HFF-Zellen durch die Parasiten lysiert. Die nun freigesetzten, extrazellulär vorliegenden Tachyzoiten wurden geerntet und mittels 10-minütiger Zentrifugation (600 rpm) von verbliebenen HFF-Zellbestandteilen getrennt. Um die Tachyzoiten aus dem Überstand zu

pelletieren, wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert und für weitere 10 min. bei 2800 rpm abzentrifugiert. Das Pellet mit den Tachyzoiten wurde in 5 mL PBS aufgenommen und entweder für Infektionsversuche oder zur Infektion eines neuen HFF-Zell-Monolayers für eine erneute Kultivierung genutzt. Die isolierten Tachyzoiten wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

#### **2.2.2.11. Infektion mit *Toxoplasma gondii***

Wie unter 2.2.2.10 beschrieben wurden die Tachyzoiten des *Toxoplasma* RH-Stammes geerntet und isoliert. Die Infektion erfolgte mit ca.  $3 \times 10^4$  Tachyzoiten in einem Volumen von 10  $\mu$ L pro 96-well Vertiefung.

#### **2.2.2.12. Bestimmung der *Toxoplasma gondii* Proliferation**

Die Proliferation des Parasiten *Toxoplasma gondii* wurde durch den Einbau von [ $^3$ H]-Uracil (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977) gemessen. Lediglich mit Hilfe des Enzyms Uracil-Phosphoribosyl-Transferase kann Uracil direkt in die RNA eingebaut werden. *Toxoplasma gondii* hat eine 100-fach höhere Aktivität dieses Enzyms als die Wirtszellen, sodass das radioaktive Uracil vermehrt in die proliferierenden Toxoplasmen eingebaut wird. Die jeweiligen Versuchsansätze (siehe 2.2.2.6) wurden mit  $3 \times 10^4$  Tachyzoiten nach 24 Stunden infiziert. Nach weiteren 48 Stunden wurden die Parasiten mit 0.012 MBq [ $^3$ H]-Uracil radioaktiv markiert und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen brachte man die radioaktiv markierten Ansätze mittels eines Zellerntegeräts (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) auf einen Glasfaserfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) auf. Anschließend wurden die Glasfaserfilter im Trockenschrank bei 100 °C getrocknet. Nun gab man die Filter mit 10 mL Szintillations-flüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) in spezielle Plastikfolien und schweißte diese zu. Die anschließende Auswertung der Glasfaserfilter erfolgte mit einem Beta-Counter (1205 Betaplate, LKB Wallac). Bei der Messung wurde die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung detektiert und in Zerfällen pro Minute (cpm = *counts per minute*) angegeben.

### **2.2.2.13. *In vitro* Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae***

Die Infektion der jeweiligen Zellkulturen mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae* wurden, wenn nicht anders beschrieben, mit den Stimulationsansätzen, die unter 2.2.2.6 beschrieben sind, durchgeführt. Hierfür wurde eine Bakterienkolonie, die über Nacht auf einer Columbia-(COS-)Blutagarplatte angezüchtet wurde, in 5 mL PBS aufgelöst und anschließend für das jeweilige Experiment auf 1:100000 oder 1:10000 in PBS verdünnt. Aus der entsprechenden Verdünnung wurden anschließend 10 µL Bakteriensuspension mit je ca. 10 – 100 bzw. 100 – 1000 Koloniebildende Einheiten (cfu = *colony forming units*) zu den 200 µL Ansätzen pipettiert. Anschließend folgte eine Inkubationszeit von 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank. Nun konnte wie unter 2.2.2.14 beschrieben das Bakterienwachstum bestimmt werden.

### **2.2.2.14. Bestimmung des *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae***

#### **Wachstums**

Die Stimulationsansätze, die mit *Staphylococcus aureus* oder *Streptococcus agalactiae* infiziert wurden, wurden mit der Mehrkanalpipette mehrfach resuspendiert bis keine Kolonien mehr makroskopisch sichtbar waren. So konnte die optische Dichte der Ansätze und damit das Bakterienwachstum im Photometer (Tecan, Crailsheim) bei 620 nm detektiert werden. Darüber hinaus konnte das bakterielle Wachstum durch Bestimmung der Koloniebildenden Einheiten errechnet werden. Hierfür wurden die mit den Bakterien infizierten Kulturen resuspendiert, seriell 1:10 verdünnt und in einem Volumen von 5 µL auf eine Blutagarplatte ausplattiert. Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C konnten die Bakterienkolonien in den verschiedenen Verdünnungsstufen gezählt und so die cfu ermittelt werden.

### **2.2.2.15. *In vitro* Infektion mit humanen Herpesviren**

Die Infektion der jeweiligen Zellen mit dem humanen Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) erfolgte unter Verwendung der in den unter 2.2.2.6. beschriebenen Stimulationsansätze. Dazu wurden die Viren in IMDM bis zur gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) verdünnt und zu den Zellen in die Vertiefungen in einem Volumen von 50 µL gegeben.

### **2.2.2.16. Bestrahlung von Herpes simplex Typ 1 (HSV-1)**

Um eine Negativ-Kontrolle zu etablieren bzw. um von den analysierten Effekten auf das HSV-1 schließen zu können, wurde das HSV-1 mit UV-Strahlen inaktiviert. Dazu wurde das HSV-1 in den verschiedenen MOI-Konzentrationen in einer 6-well Platte in das UV-Bestrahlungsgerät Crosslinker (UV-) CL-1000 (UVP, Upland, Kanada) positioniert und einer UV-Strahlungsenergie von  $800 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt. Dass Viren mittels UV-Strahlung inaktiviert werden können, macht man sich in der Medizin nicht nur in der Forschung zur Nutze, sondern dient auch im Rahmen von Sterilisationsprozessen dem Abtöten des infektiösen Agens.

## **2.2.3. Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.3.1. Herstellung von Zelllysaten**

Um die Proteinexpression der jeweiligen Zelle analysieren zu können, wurden die Zellen mittels mehrmaligen Einfrieren und Auftauen (*freeze-thaw*-Methode) mechanisch aufgetrennt. Hierzu wurden die HFF- oder 86HG39 Zellen zunächst mit Hilfe eines Zellschabers geerntet, zweimal mit etwas PBS gewaschen und für 10 min. bei 2800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zell-Pellet wurde anschließend in proteaseinhibitorhaltigem PBS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgenommen. Die entstandenen 1 bis 2 mL Suspension wurde dann mit flüssigem Stickstoff gefroren und in dem 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Danach wurden die Proben bei 13000 rpm (Biofuge fresco, Heraeus) und 4 °C für 10 min. erneut zentrifugiert. Dies ist erforderlich, um nicht benötigte Zellmembranbestandteile und nicht aufgetrennte Zellen zu entfernen. Die gewonnenen Zelllysate wurden in kleinen Mengen à 45 µL aliquotiert und bei -70 °C weggefroren.

### **2.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung geladener Teilchen, wie Proteine, nach ihrer Ladung und Größe. Hierfür wurden die Zelllysate, die wie unter 2.2.3.1. hergestellt wurden, eingesetzt. Zunächst wurden die Proteinproben 1:5 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min. bei 100 °C in einem Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die verschiedenen Proben à 10 bis 20 µL in die Geltaschen pipettiert. Im NuPage®-

Polyacrylamidgel werden die zu detektierenden Proteine zuerst in einem Sammelgel gesammelt und anschließend in einem Trenngel aufgetrennt. Die elektrische Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Zeit von 1 bis 2 Stunden und bei einer Spannung von 160 Volt. Da der Marker SeeBlue™Plus2 parallel mitdetektiert wurde, konnten die molekularen Massen der Proteine abgelesen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Bei dieser proteinbiochemischen Methode wurden 10 %ige NuPage®-Polyacrylamidgele der Firma Invitrogen™ eingesetzt.

#### **2.2.3.3. Western Blot Analyse**

Die Western Blot Analyse, auch Immunblot genannt, ist ein Verfahren, mit dem gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Semidry-Blotting auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran übertragen (geblottet) werden. Die Methode wurde ursprünglich 1979 im Labor von George Stark an der Universität Stanford entwickelt. Um die Proteine zu transferieren, wurden drei in Blotting-Puffer getränkte 3 MM'-Whatman-Papiere, welche auf die Größe des NuPage®-Polyacrylamidgels zugeschnitten wurden, auf die mit Blotting-Puffer befeuchtete Kathodenplatte der Blotting-Kammer gelegt. Nun wurde das NuPage®-Polyacrylamidgel und die mit Blotting-Puffer angefeuchtete Membran luftblasenfrei aufgelegt. An dieser Stelle ist es entscheidend hervorzuheben, dass beim Übereinanderlegen der Papiere und Membranen keine Luftblasen zwischen den Schichten entstehen dürfen, da sonst die Proteine nicht korrekt auf die Membran transferiert werden können. Zusätzlich wurden auf die Membran sechs in Blotting-Puffer getränkte Filterpapiere aufgelegt und darauf wiederum legte man den Anodendeckel, sodass die Blotting-Kammer abgeschlossen wurde. Anschließend erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche für 120 Minuten.

#### **2.2.3.4. Ponceau S Färbung**

Ponceau S ist ein Farbstoff, mit dem man den Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran überprüfen kann. Dazu bindet dieser Farbstoff reversibel an positiv geladene Aminogruppen der nachzuweisenden Proteine und verursacht eine Rotfärbung. Zur Färbung wurde die Western Blot Nitrozellulosemembran mit dem Ponceau S in eine Schale gegeben und für ca. 2 Minuten auf einem Kippschüttler geschwenkt. Anschließend konnte die Ponceau S-Lösung in einen Reaktionstube zurückgeschüttet und für einen weiteren Einsatz bei Raumtemperatur

gelagert werden. Die Nitrozellulosemembran wurde mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in der Western Blot Analyse eingesetzt.

#### **2.2.3.5. Immundetektion der Proteine mit Antikörpern**

Nach dem Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran (siehe 2.2.3.3.) erfolgte die Immundetektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper. Die Membran wurde zunächst für ca. 1,5 Stunden in einer Milchpulver-Blocklösung (5 %iges fettfreies Milchpulver in PBST [PBS + 0,05 % Tween]) auf einem Kippschüttler schwenkend inkubiert. Dies war nötig, um die unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde der jeweilige Primärantikörper in der Milchpulver-Blocklösung verdünnt (siehe 2.1.7.1) und zu der jeweiligen Membran pipettiert. Es folgte eine 2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur schwenkend auf einem Kippschüttler. Falls eine Inkubation über Nacht nötig war, wurden die Membranen mit dem Antikörper in einer Plastikfolie eingeschweißt und bei 4 °C schwenkend über Nacht inkubiert. Danach wurden die Membranen mit 0,05 % PBST-Puffer ca. 10 min. gewaschen, damit unspezifisch gebundenen Primär-antikörper eliminiert werden. Dieser Waschvorgang erfolgte dreimal. Anschließend erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem verdünnten Peroxidase (POX)-gebundenen Sekundärantikörper (siehe 2.1.7.2) und ein dreimaliger Waschschrift, wie bei der Primärantikörper-Inkubation. Mittels der an dem Sekundärantikörper gekoppelten Peroxidase und unter Verwendung des *'Enhanced Chemiluminescence (ECL) Western Blotting'*-Substrats (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) kann eine Lichtemission bzw. Chemilumineszenz erzeugt werden. Die Membranen wurden mit ca. 1 bis 5 mL ECL-Substrat bei Raumtemperatur ohne Lufblasen zwischen zwei Folien gelegt. Anschließend legte man in einer Dunkelkammer auf die in einer Filmkassette mit ECL benetzten und zwischen zwei Folien fixierten Nitrozellulosemembranen einen Röntgenfilm (Kodak, Deutschland). Die Expositionszeit dieses Films hing von der Stärke des detektierten Signals ab und konnte bei wenigen Sekunden bis einige Minuten oder gar Stunden liegen. Der Röntgenfilm wurde letztlich mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt und die detektierten Proteinbanden wurden durch den Vergleich mit den Referenz-Markerbanden für Proteingrößen (siehe 2.1.8.1.) auf der Nitrozellulosemembran ausgewertet.

### **2.2.3.6. Messung der IDO-Aktivität/ L-Kynureninmessung**

Um die Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) zu ermitteln, wurde Ehrlich's Reagenz eingesetzt, mit dessen Hilfe die Konzentration von Kynurenin, dem Produkt der IDO-Aktivität gemessen werden konnte. Hierbei gilt: Je höher die IDO-Aktivität, desto höher ist die L-Kynurenin-Konzentration in den Zellüberständen. Es besteht somit eine positive Korrelation bzw. Proportionalität (Däubener *et al.*, 1994). Um eine möglichst hohe Messstrecke zu erzielen, wurde den Stimulationsansätzen bereits zu Beginn zusätzlich L-Tryptophan (Endkonzentration 0,6 mM) zugefügt. Bei der Nachweismethode wurde zunächst mit einer Mehrkanalpipette ein Volumen von 160 µL der zu messenden Zellüberstände in 96-well Platten mit V-förmigem Boden pipettiert. Dazu wurde pro Vertiefung 10 µL 30 % TCA gegeben, um eine Proteinpräzipitation zu erzielen. Nun erfolgte eine 30-minütige Inkubation im 50 °C warmen Wasserbad, damit das N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin hydrolysierte. Anschließend wurden die jeweiligen 96-well Platten bei 1800 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0, Hanau). Aus den Vertiefungen wurden 100 µL der Kulturüberstände entnommen und diese wurden wiederum in eine 96-well Platten mit Flachboden überführt. Dazu wurden dann 100 µL Ehrlich's Reagenz (1.2 % (w/v) 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig) zugegeben. Das Ehrlich's Reagenz reagierte dabei mit dem Kynurenin zu einem gelben Azofarbstoff, dessen Absorption anschließend bei 492 nm im Photometer (Tecan, Crailsheim) detektiert wurde. Hierbei gilt: Je stärker die Absorption bei 492 nm ausfiel, desto größer war die Menge des produzierten Kynurenins in den Zellüberständen. Die Kulturüberstände mit den unstimulierten Zellen stellten eine Negativkontrolle dar. Abschließend ist noch anzuführen, dass das Ehrlich's Reagenz für jedes Experiment neu angesetzt wurde.

### **2.2.4. Computergestützte Arbeiten**

#### **2.2.4.1. Statistische Auswertung**

Die Statistischen Auswertungen wurden mit dem Computer-Programm „*GraphPad Prism*“ (Version Nr. 5) durchgeführt. Genauer gesagt, erfolgte die statistische Auswertung des Datensatzes mit Hilfe des Standard t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben. Alle Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardfehler [*standard error of the mean*]) angegeben.

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll analysiert werden, ob die tryptophanabbauende Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) *in vitro* in humanen tumorösen Astrozytom-/Glioblastomzellen (86HG39 Zellen) und humanen nativen Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts* [HFF]) einen antimikrobiellen und immunregulatorischen Effektormechanismus vermittelt. Im ersten Teil dieser Arbeit war das primäre Ziel im Modell mit humanen Hirntumorzellen und humanen Fibroblasten die funktionelle Bedeutung der IDO bei der Abwehr verschiedener Enzephalitis- oder Meningitis- beziehungsweise Meningo-Enzephalitiserreger *in vitro* zu analysieren. Darüber hinaus wurde im zweiten Teil untersucht, ob humanes Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) die IDO und ihre antimikrobiellen und immunregulatorischen Eigenschaften beeinflusst. Dabei wurde analysiert, ob eine hHSV-1 Infektion weitere syn- beziehungsweise metachrone Infektionen des Zentralen Nervensystems, wie z. B. eine *Toxoplasma*-Enzephalitis, begünstigt. Hierfür wurde ein Meningo-Enzephalitis-Koinfektionsmodell etabliert und zudem die Regulation der IDO-Aktivität, IDO-mRNA- und IDO-Proteinexpression durch den pathogenen Erreger hHSV-1 selbst untersucht.

#### 3.1. IDO-vermittelte Effekte in humanen Astrozytom-/ Glioblastomzellen (86HG39 Zellen) und humanen Vorhautfibroblasten (*human foreskin fibroblasts* [HFF])

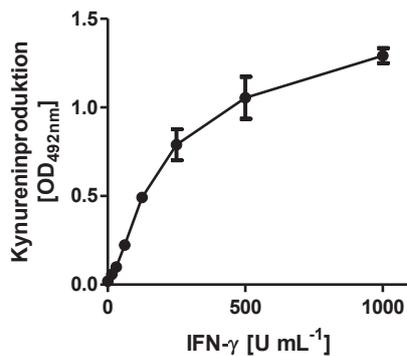
Zu Beginn des Ergebnisteils dieser Dissertation sollen die Aktivität, Proteinexpression, sowie die antimikrobiellen Effektormechanismen der IFN- $\gamma$  induzierten IDO mittels der Zelllinie 86HG39 unter den geplanten Experimentalbedingungen als Positivkontrolle bestimmt werden. Zudem wurden die immunregulatorischen Effektormechanismen der IDO in einem weiteren Versuchsansatz untersucht. Um eine breitere Gültigkeit der analysierten Effekte ableiten zu können, wurde neben dem *in vitro* Modell mit humanen 86HG39 Zellen, ein *in vitro* Modell mit humanen, nativen HFF-Zellen etabliert.

##### 3.1.1. IDO-vermittelte Effekte in der humanen Gehirnzelllinie 86HG39

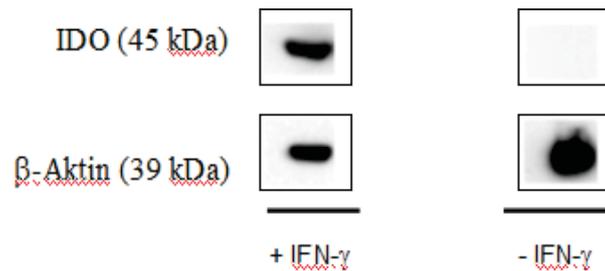
Um die IDO-Aktivität in Gehirnzellen zu untersuchen, wurde die humane Gehirntumorzelllinie 86HG39 eingesetzt. Für die Induktion der IDO-Aktivität wurde das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  verwendet. Es wurden je  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung in 96-well Mikrotiterplatten gegeben und die Zellen mit IFN- $\gamma$  Konzentrationen

von 0 – 1000 U/mL stimuliert. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurde die IDO-Aktivität in den 86HG39 Zellen durch den Nachweis von Kynurenin im Zellkulturüberstand detektiert. Das bei den Experimenten verwendete Medium enthielt eine Konzentration von 600  $\mu$ M (0.6 mM) L-Tryptophan, um eine maximale Kynureninproduktion zu erzielen.

**Abb. 3.1.**



**Abb. 3.2.**



**Abb. 3.1.: IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. IFN- $\gamma$  wurde in Konzentrationen von 0 – 1000 U/mL verwendet. Anschließend wurde das Tryptophan-Abbauprodukt Kynurenin im Zellkulturüberstand photometrisch bei einer optischen Dichte von 492 nm (OD<sub>492nm</sub>) quantitativ erfasst. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

**Abb. 3.2.: IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Proteinexpression in 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen ( $5 \times 10^6$ /Ansatz) wurden für 24 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem IMDM Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. IFN- $\gamma$  wurde in einer Konzentration von 600 U/mL verwendet. Anschließend wurden die 86HG39 Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Western Blot erfasst. Hierbei wurde die humane IDO durch einen Kaninchen-anti-IDO-Antikörper nachgewiesen. Als Auftragskontrolle diente  $\beta$ -Aktin.

Abbildung 3.1. bestätigt und zeigt eindeutig, dass eine Stimulation der 86HG39 Zellen mit IFN- $\gamma$  zu einer Kynureninproduktion führt. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass je höher die verwendete IFN- $\gamma$  Konzentration für die Stimulation der 86HG39 Zellen ist, desto höher ist auch die Kynureninproduktion und die induzierte IDO-Aktivität. Es besteht somit eine positive Korrelation zwischen der verwendeten IFN- $\gamma$  Konzentration und der IDO-Aktivität.

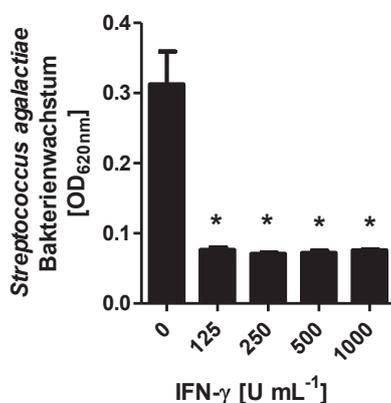
Als Nachweis, ob die humane Gehirntumorzelllinie 86HG39 auch das IDO-Protein exprimiert, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (siehe Abb. 3.2.). Hierbei wurden humane 86HG39 Zellen ( $5 \times 10^6$ /Ansatz) zum einen mit 600 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert, zum anderen wurden sie nicht stimuliert. Als Auftragskontrolle wurde außer dem IDO-Protein auch das nicht-regulierte Gen,  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.2. gekennzeichnet ist das IDO-Protein ca. 45 kDa schwer und das Molekulargewicht von  $\beta$ -Aktin-Protein liegt bei ca. 39 kDa. In der Western Blot Analyse ist nun zu erkennen, dass es im Fall einer IFN- $\gamma$

Stimulation zu einer deutlichen IDO-Proteinbildung und Expression von  $\beta$ -Aktin kommt. Die unstimulierten Zellen exprimieren lediglich das konstitutiv gebildete  $\beta$ -Aktin.

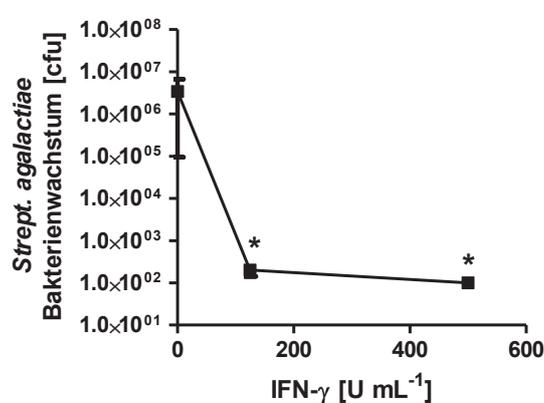
Die bisher gezeigten Daten bestätigen, dass humane, tumoröse Hirnzellen 86HG39 fähig sind eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität auszubilden. In den nun folgenden Experimenten soll überprüft werden, ob die IDO-Aktivität antimikrobielle Effekte vermittelt.

Um die antimikrobiellen Effekte analysieren zu können, wurden die Hirntumorzellen mit verschiedenen Konzentrationen IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/mL) stimuliert und mit bakteriellen und parasitären Meningo-Enzephalitis-Erregern infiziert. Zunächst wurden die über 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellkulturen mit *Streptococcus agalactiae* infiziert. Das bakterielle Wachstum wurde 24 Stunden nach der bakteriellen Infektion durch die Messung der optischen Dichte ( $OD_{620nm}$ ), sowie durch die Auswertung der *colony forming units* ([cfu], Koloniebildende Einheiten) analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3. ( $OD_{620nm}$ ) und Abbildung 3.4. (cfu) dargestellt. Hierbei kann ein signifikanter ( $p < 0.0001$ ), IDO-induzierter antibakterieller Effekt, bezogen auf die Werte der nicht stimulierten Zellen, ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 125 U/mL erkannt werden (siehe Abb. 3.3.). Man sieht zudem, dass das bakterielle Wachstum um mehr als 4 Logarithmus-Stufen gehemmt wird (siehe Abb. 3.4.).

**Abb. 3.3.**



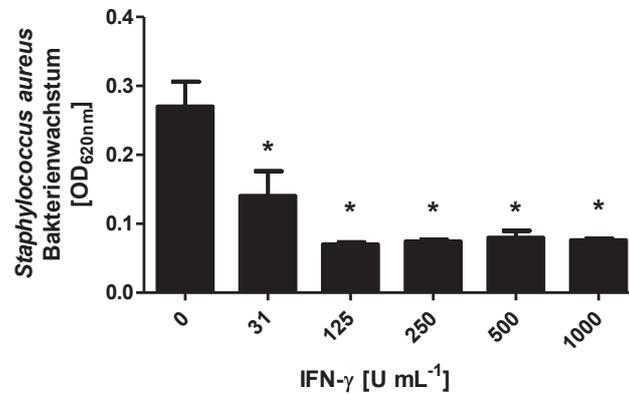
**Abb. 3.4.**



**Abb. 3.3. und Abb. 3.4.: IFN- $\gamma$  induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* in 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert (bis 1000 U/mL) oder unstimuliert belassen (0 U/mL). Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und das bakterielle Wachstum nach weiteren 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte ( $OD_{620nm}$ ) ermittelt (Abb. 3.3.) bzw. wurde das Wachstum durch *colony forming units* (cfu) bestimmt. (Abb. 3.4.). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf die Werte bei unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*).

Zudem wurde das Experiment mit einer *Staphylococcus aureus*-Infektion durchgeführt. Das Bakterienwachstum wurde mit Hilfe der optischen Dichte ( $OD_{620nm}$ ) gemessen. Die Ergebnisse sind Abbildung 3.5. zu entnehmen. Hier ist ebenfalls ein signifikanter ( $p < 0.01$ ),

IDO-induzierter antibakterieller Effekt, bezogen auf die Daten der unstimulierten Zellen, ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 31 U/mL zu erkennen.



**Abb. 3.5.: IFN- $\gamma$  induzierte Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* in 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert (bis 1000 U/mL) oder nicht stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und das Bakterienwachstum nach weiteren 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.01$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte, antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Die Signifikanz liegt bei einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 31 U/mL bei  $p < 0.01$ , ab 125 U/mL liegt die Signifikanz bei  $p < 0.0001$ .

Um zu untersuchen, ob der IDO-vermittelte antibakterielle Effekt von der Bakterieninfektionsdosis abhängt, wurden die oben dargestellten Experimente (siehe Abb. 3.3. und 3.5.) mit einer höheren *Streptococcus agalactiae*- und *Staphylococcus aureus*-Infektionsdosis durchgeführt. Hierbei wurde eine 10-mal höhere Dosis von 100 bis 1000 cfu/Vertiefung, anstatt 10-100 cfu/Vertiefung, als Infektionsdosis eingesetzt. Die Ergebnisse der Infektionsexperimente mit *Streptococcus agalactiae* sind in Abbildung 3.6., mit *Staphylococcus aureus* in Abbildung 3.7. dargestellt. Hierbei ist zusammenfassend festzuhalten, dass die höhere Infektionsdosis keinen Effekt auf den IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt hat. Man kann in diesen Infektionsexperimenten sehen, dass schon ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration 15 U/mL das Bakterienwachstum signifikant ( $p < 0.0001$ ) gehemmt wird.

Abb. 3.6.

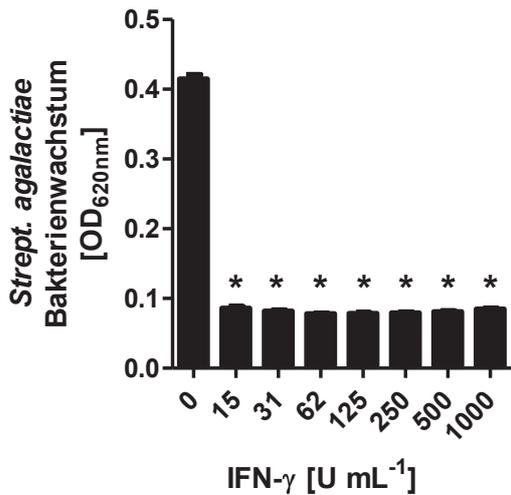


Abb. 3.7.

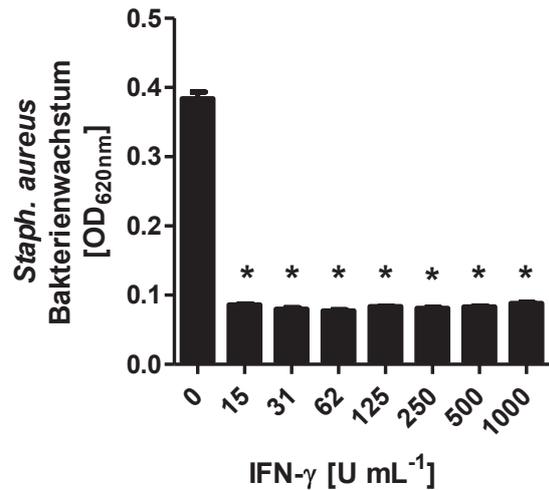
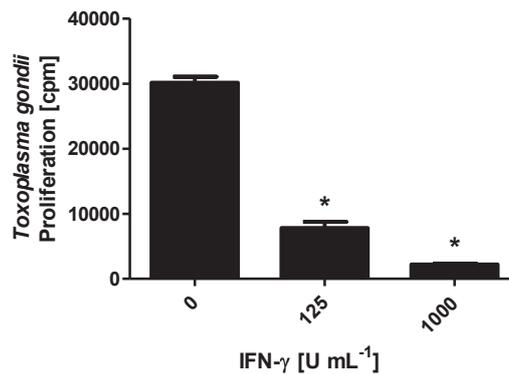


Abb. 3.6. und Abb. 3.7.: IFN- $\gamma$  induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* (Abb. 3.6.) und *Staphylococcus aureus* (Abb. 3.7.) in 86HG39 Zellen. 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert (bis 1000 U/mL) oder blieben unstimuliert (0 U/mL). Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* bzw. *Staphylococcus aureus* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und das bakterielle Wachstum nach weiteren 24 Stunden durch Messung der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*).

Die Analyse desIDO-vermittelten antiparasitären Effektes in den Hirntumorzellen wurde in einem ebenfalls etabliertem Modellsystem mit dem obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* durchgeführt (siehe Abb. 3.8.). Hierbei wurden die 86HG39 Zellkulturen 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert und danach mit *Toxoplasma gondii* infiziert. Die Detektion der *Toxoplasma*-Proliferation wurde mit Hilfe eines Beta-Counters, der die Strahlung des eingebauten, radioaktiv markierten [<sup>3</sup>H]-Uracil in der RNA des Parasiten misst, durchgeführt. In Abbildung 3.8. ist zu erkennen, dass eine IFN- $\gamma$  Dosis von 125 U/mL zu einer deutlichen, signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Inhibition der *Toxoplasma*-Proliferation führt. Dabei sinkt das Wachstum auf ca. 30 % des unstimulierten Ansatzes. Eine höhere IFN- $\gamma$  Konzentration (1000 U/mL) führt zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Parasitenproliferation.



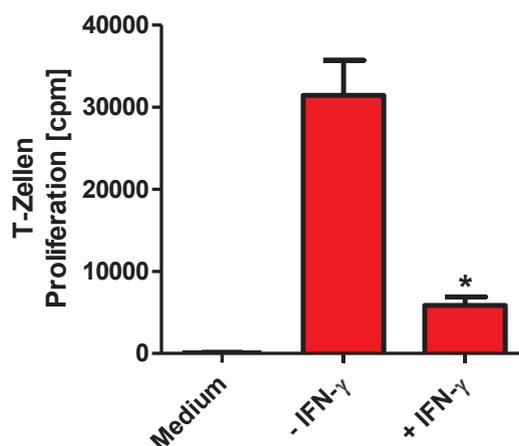
**Abb. 3.8.: IFN- $\gamma$  induzierte Hemmung der Proliferation von *Toxoplasma gondii* in 86HG39 Zellen.**  $4 \times 10^4$  86HG39 Zellen wurden zunächst für 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder nicht stimuliert. Dann wurden die Kulturen mit *Toxoplasma gondii* ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) infiziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Uracil in die parasitäre RNA mit einem Beta-Counter gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte der Uracilinkorporation  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Hemmung ( $p < 0.0001$ ) des parasitären Wachstums, durch IFN- $\gamma$  induziert, bezogen auf den jeweiligen Ansatz, der nicht mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde, wurde extra gekennzeichnet (\*).

Somit wurden die von unserer Arbeitsgruppe bereits publizierten Ergebnisse zur antimikrobiellen Aktivität von 86HG39 Zellen reproduziert und die Infektionsmodelle können im Folgenden für Ko-Infektionsansätze verwendet werden.

### 3.1.2. Immunregulatorische IDO-vermittelte Effekte in 86HG39 Zellen

Letztlich sollte auch noch der IDO-vermittelte immunregulatorische Effekt in 86HG39 Zellen analysiert werden. Hierzu wurden humane 86HG39 Tumorzellen 72 Stunden lang mit IFN- $\gamma$  stimuliert (600 U/mL). Danach wurden die Zellkulturüberstände geerntet und als Kulturmedium für periphere Blutlymphozyten (PBL) benutzt. Die T-Zellen wurden hierbei durch den Zusatz von OKT3 aktiviert und die daraus resultierende T-Zell Proliferation wurde durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin detektiert. Als Negativkontrolle wurde ein unbehandelter Ansatz ohne eine Stimulation mit OKT3 (Medium) eingesetzt.

Abbildung 3.9. zeigt einen deutlichen, signifikanten ( $p < 0.0001$ ), IFN- $\gamma$  vermittelten immunregulatorischen Effekt in Form einer Inhibition der T-Zell Proliferation. Die T-Zell Proliferation wird dabei auf weniger als 20 % des Ausgangswertes der unstimulierten Kontrolle reduziert.



**Abb. 3.9.: IFN- $\gamma$  induzierter IDO-vermittelter immunregulatorischer Effekt in 86HG39 Zellen.**  $1 \times 10^6$  86HG39 Zellen wurden in An- (+ IFN- $\gamma$ ) oder Abwesenheit (- IFN- $\gamma$ ) von IFN- $\gamma$  (600 U/mL) in 5 mL Medium inkubiert. Nach 72 Stunden wurden je 200  $\mu$ L der Zellüberstände als Kulturmedium für  $1.5 \times 10^5$  PBL, die mit OKT3 stimuliert und aktiviert wurden, verwendet. Als Negativkontrolle wurden  $1.5 \times 10^5$  PBL ohne OKT3 (Medium) in Kulturmedium inkubiert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die T-Zell Proliferation mittels Beta-Counter durch den Einbau von [ $^3$ H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des [ $^3$ H]-Thymidineinbaus  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Inhibition ( $p < 0.0001$ ) der T-Zell Proliferation, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne IFN- $\gamma$  wurde gekennzeichnet (\*).

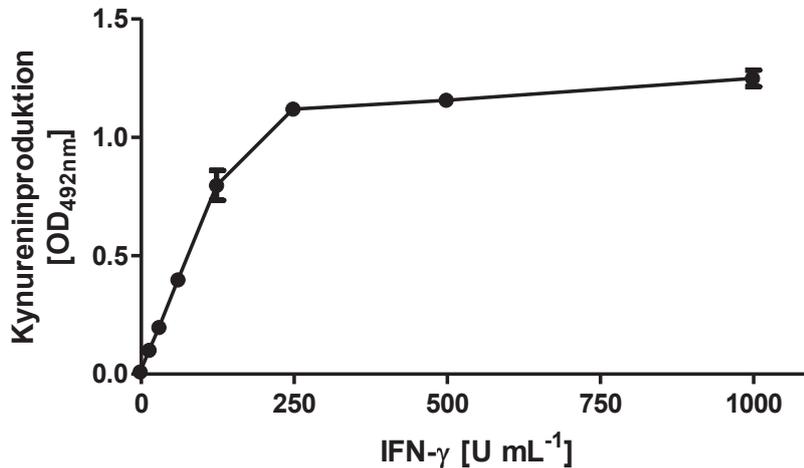
Damit sind auch die von der Arbeitsgruppe bereits veröffentlichten Daten zur Hemmung des T-Zellwachstums durch IFN- $\gamma$  stimulierte Glioblastomzellen reproduziert und auch dieses Modellsystem soll später, um eine gleichzeitige HSV-1 Infektion erweitert, in komplexeren Modellsystemen verwendet werden.

### 3.1.3. IDO-Aktivität in humanen, nativen HFF-Zellen

Die Ergebnisse der bisherigen Experimente (siehe 3.1.1.), wurden durch die Analyse der IFN- $\gamma$  vermittelten IDO-Aktivität und IDO-induzierten antimikrobiellen Effekte in einem etabliertem Modell mit den Hirntumorzellen 86HG39 gewonnen. Um die IDO-Aktivität und die IDO-vermittelten Effekte in der humanen Astrozytom-/ Glioblastomzelllinie mit einer nativen Zelllinie vergleichen zu können, wurde die Experimente ebenfalls mit humanen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) wiederholt.

Wie auch in den Experimenten mit den 86HG39 Tumorzellen, wurde zunächst die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität in den humanen, nativen HFF-Zellen analysiert. Auch in dieser Zelllinie konnte eine IDO-Aktivität nach einer 72-stündigen Stimulation mit IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/mL) mit Hilfe der Messung der Kynureninproduktion in den Zellüberständen bei

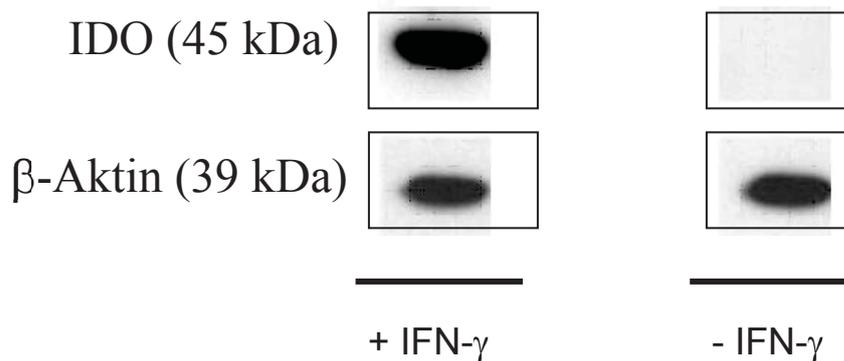
einer optischen Dichte von 492nm ( $OD_{492nm}$ ) nachgewiesen werden. Wie bereits mit der Zelllinie 86HG39 gezeigt, kann in der HFF-Zelllinie ebenfalls eine IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Aktivität mit einer Kynureninproduktion untersucht werden. Anhand von Abbildung 3.10. lässt sich zusammenfassend sagen, dass auch bei den HFF Zellen eine positive Korrelation zwischen IFN- $\gamma$  Stimulation und IDO-Aktivität besteht.



**Abb. 3.10.: IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Aktivität in HFF-Zellen.** HFF-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. IFN- $\gamma$  wurde in einer Konzentration von 0 – 1000 U/mL eingesetzt. Anschließend wurde das Tryptophan-Abbauprodukt Kynurenin im Zellkulturüberstand photometrisch bei einer optischen Dichte von 492 nm ( $OD_{492nm}$ ) quantitativ erfasst. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

#### 3.1.4. IDO-Proteinexpression in nativen HFF-Zellen

Zum Vergleich, ob die nativen, humanen HFF-Zellen, ebenso wie die Gehirntumorzelllinie 86HG39, in der Lage sind das IDO-Protein zu exprimieren, wurde ebenfalls wie unter 3.1.1. eine IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Proteinexpression mit Hilfe einer Western Blot Analyse erfasst (siehe Abb. 3.11.). Hierbei wurden HFF-Zellen ( $1 \times 10^6$ /Ansatz) zum einen mit 600 U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert, zum anderen blieben sie unstimuliert. Als Kontrolle wurde außer dem IDO-Protein auch das *housekeeping gene*  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Da eine IDO-Aktivität in den HFF-Zellen mittels IFN- $\gamma$  induziert werden kann (siehe Abb. 3.10.), ist zu erwarten, dass es auch zu einer nachweisbaren IDO-Proteinexpression kommt. Der Abbildung 3.11. ist zu entnehmen, dass es im Fall einer IFN- $\gamma$  Zellstimulation zusätzlich zu einer deutlichen Expression des IDO-Proteins kommt. Die unstimulierten Zellen exprimieren lediglich das konstitutiv gebildete  $\beta$ -Aktin.



**Abb. 3.11.: IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Proteinexpression in humanen, nativen HFF-Zellen.** HFF-Zellen ( $1 \times 10^6$ /Ansatz) wurden für 24 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. IFN- $\gamma$  wurde in einer Konzentration von 600 U/mL verwendet. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (NuPage®-Polyacrylamidgel) nach ihrer Größe aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Western Blot erfasst. Hierbei wurde die humane IDO durch einen Kaninchen-anti-IDO-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mittels eines Maus-anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper detektiert. Als spezifischer Sekundärantikörper diente zum Nachweis des IDO-Proteins ein POX-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper. Die Detektion von  $\beta$ -Aktin erfolgte mit dem POX-anti-Maus-IgG Antikörper.

Die Western Blot Analyse zeigt abschließend, dass die Ergebnisse der Experimente mit 86HG39 Tumorzellen über die IDO-Proteinexpression und -Aktivität auf die humane, native HFF-Zelllinie übertragbar sind.

### 3.1.5. Antibakterielle Effekte in nativen HFF-Zellen

Auch in den nativen, humanen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen) wurden die IFN- $\gamma$  induzierten antimikrobiellen Effekte analysiert. In diesen Experimenten wurden erneut die Kulturen über 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert und dann mit *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus aureus* infiziert. 24 Stunden *post infectionem* wurde wiederum die optische Dichte ( $OD_{620nm}$ ) als Maß für das bakterielle Wachstum gemessen. Die Ergebnisse der IFN- $\gamma$  vermittelten antibakteriellen Effekte sind bei Infektion mit *Streptococcus agalactiae* in Abbildung 3.12., bei Infektion mit *Staphylococcus aureus* in Abbildung 3.13. dargestellt.

Auch in diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Bakterienwachstum IFN- $\gamma$  abhängig gehemmt werden kann. Dieser IDO-vermittelte antibakterielle Effekt war ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration von 31 U/mL signifikant ( $p < 0.0001$ ) und konnte durch höhere Konzentrationen an IFN- $\gamma$  noch etwas verstärkt werden. Das Wachstum von *Streptococcus agalactiae* wurde bis auf ca. 25 % des Ausgangswertes der unstimulierten Kontrolle reduziert (siehe Abb. 3.12.). Das bakterielle Wachstum von *Staphylococcus aureus* konnte auf ca. 30 % verringert werden (siehe Abb. 3.13.).

Abb. 3.12.

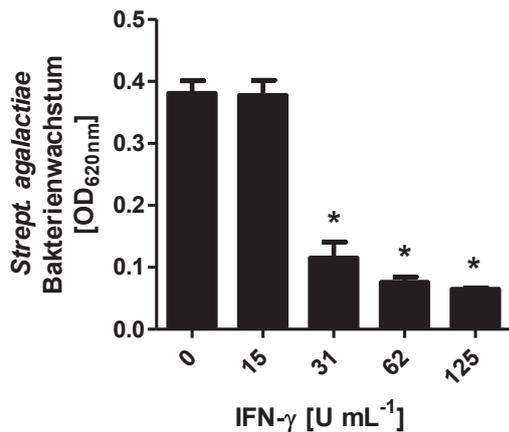
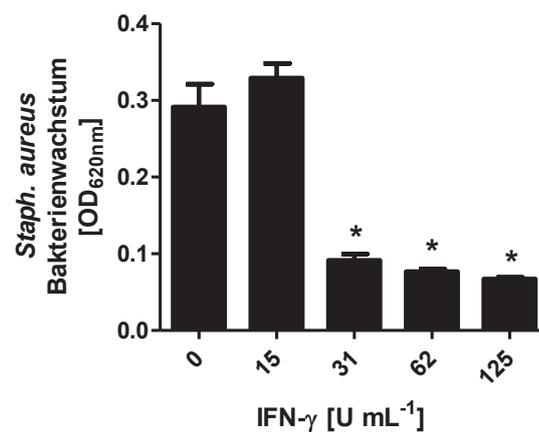


Abb. 3.13.



**Abb. 3.12. Abb. 3.13.: IFN- $\gamma$  induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* (Abb. 3.12.) *Staphylococcus aureus* (Abb. 3.13.) in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen).** HFF-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* bzw. *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und das bakterielle Wachstum nach weiteren 24 Stunden durch die Detektion der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte, antibakterielle Effekte, bezogen auf die Werte bei unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*).

Um denIDO-vermittelten antibakteriellen Effekt bei einer höheren Bakterieninfektionsdosis (cfu 100-1000/Vertiefung), wie unter 3.1.1., untersuchen zu können, wurden die oben dargestellten HFF-Experimente (siehe Abb. 3.12. und 3.13.) mit der höheren *Streptococcus agalactiae*- und *Staphylococcus aureus*-Bakteriendosis durchgeführt. Die Ergebnisse der Infektionsexperimente mit *Streptococcus agalactiae* sind in Abbildung 3.14., mit *Staphylococcus aureus* in Abbildung 3.15. dargestellt.

Zusammenfassend ist an dieser Stelle ebenfalls zu sagen, dass in beiden Infektionsexperimenten der antibakterielle IDO-Effekt, wie in den Versuchsansätzen mit 86HG39 Zellen (siehe Abb. 3.6. und 3.7.), nicht von der ca. 10-mal höheren Bakterieninfektionsdosis beeinträchtigt wird. Stattdessen wird das Bakterienwachstum durch die IFN- $\gamma$  Stimulation (15 U/mL) auf ca. 25 % des Wachstums der Kontrollgruppe ohne eine IFN- $\gamma$  Stimulation reduziert (siehe Abb. 3.14. und 3.15.).

Abb. 3.14.

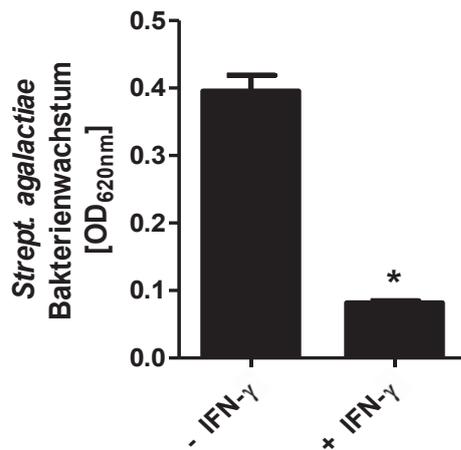


Abb. 3.15.

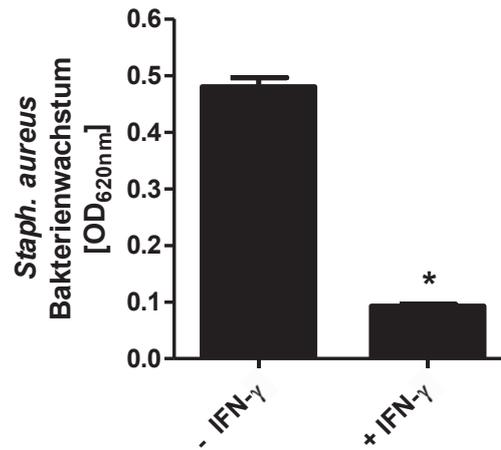


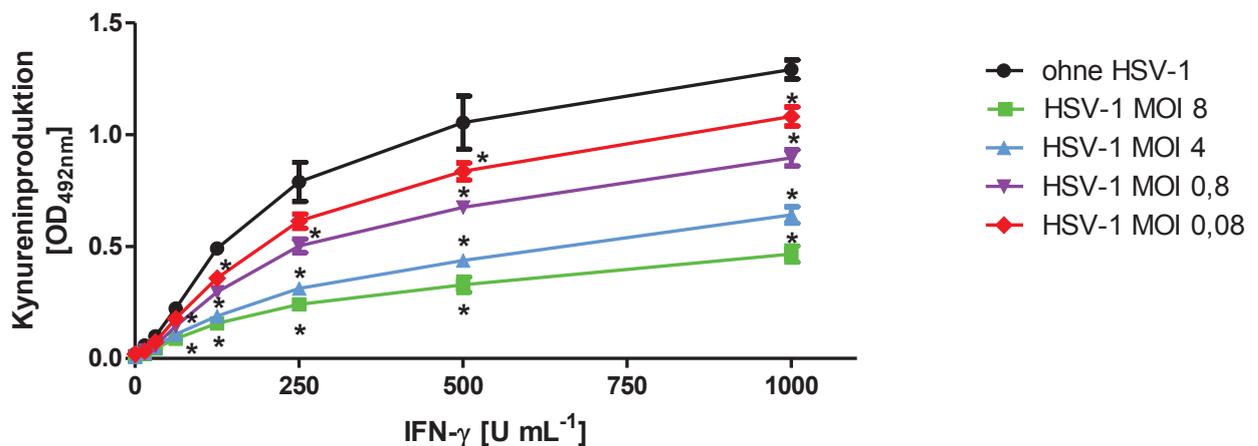
Abb. 3.14. und Abb. 3.15.: IFN- $\gamma$  induzierte Hemmung des Wachstums von *Streptococcus agalactiae* (Abb. 3.14.) und *Staphylococcus aureus* (Abb. 3.15.) in humanen, nativen Vorhautfibroblasten (HFF-Zellen). HFF-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden mit IFN- $\gamma$  (hier 15 U/mL exemplarisch demonstriert) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus aureus* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und das bakterielle Wachstum nach weiteren 24 Stunden durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte, antibakterielle Effekte, bezogen auf die Werte bei unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*).

### 3.2. Beeinflussung derIDO durch humanes Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1)

In den oben präsentierten *in vitro* Experimenten wurden die Tumorzelllinie 86HG39 und die native HFF-Zelllinie initial mit IFN- $\gamma$  stimuliert und dann in einem zweiten Schritt mit dem jeweiligen Pathogen infiziert. *In vivo* wäre dies der Fall bei einer aktiven, floriden Infektion beziehungsweise Entzündung. Am Anfang einer Erkrankung oder Infektion trifft der Krankheitserreger jedoch meist auf eine Zelle, die noch keine Verteidigungsmechanismen aktiviert hat. Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde daher untersucht, wie eine bestehende Infektion den Verlauf beziehungsweise die Ausprägung des antimikrobiellen Effektes beeinflusst. Hierfür wurde im Modellsystem mit humanen Hirntumorzellen (Zelllinie 86HG39) und zum Teil mit nativen HFF-Zellen untersucht, welchen Einfluss eine Herpes simplex Virus Typ 1 Infektion auf die durch IFN- $\gamma$  induzierten IDO-Effekte hat. Wie bereits unter 3.1.1. erwähnt, veröffentlichte unsere Arbeitsgruppe bereits, dass es dem hHSV-1 möglich ist, sich in der Hirntumorzelllinie 86HG39 zu replizieren (Adams *et al.*, 2004 A). Zudem zeigte Heseler, dass der IFN- $\gamma$  vermittelte antivirale Effekt von der hHSV-1 Infektionsdosis abhängt und bei einer höheren Infektionsdosis (MOI 1,5) nicht so effektiv ist, wie bei einer niedrigeren Infektionsdosis (MOI 0,15) (Heseler, 2008). Diese Daten stellen für die vorliegende Arbeit, in der ein Meningo-Enzephalitis-Modellsystem etabliert wurde, eine wichtige Voraussetzung dar.

### 3.2.1. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Aktivität

Zunächst wurde der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen analysiert. Dabei wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/ml) stimuliert und zum Zeitpunkt Null mit verschiedenen Konzentrationen (MOI 0,08 bis 8) des hHSV-1 infiziert. Die Infektion der Zellen mit hHSV-1 wurde mikroskopisch überprüft. Die IDO-Aktivität wurde anhand der optischen Dichte bei 492nm ( $OD_{492nm}$ ), die durch die vorhandene Menge an produziertem Kynurenin variiert, nach 72-stündiger Inkubation gemessen. Die Ergebnisse der Experimente zeigt Abbildung 3.16.. Hier ist deutlich zu erkennen, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität von der hHSV-1 Infektionsdosis abhängt. So ist zu sehen, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität mit der ansteigenden hHSV-1 Infektionsdosis abnimmt. Die IDO-Aktivität ist in der IFN- $\gamma$  stimulierten, uninfizierten Kontrolle am höchsten und im Falle einer zusätzlichen hHSV-1 Infektionsdosis mit einer MOI von 8 am geringsten. Eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Inhibition der IDO-Aktivität kann schon ab einer hHSV-1 MOI von 0,08 erreicht.

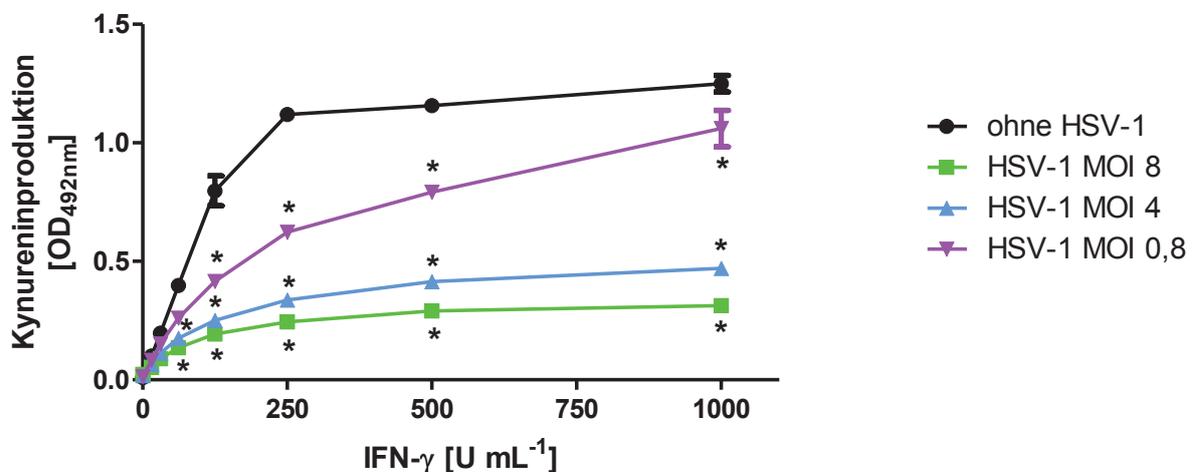


**Abb. 3.16.:** Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen.  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen/Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 0,08; 0,8; 4 oder 8) in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) der photometrisch ( $OD_{492nm}$ ) ermittelten Kynureninproduktion in den Zellkulturüberständen aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Hemmung ( $p < 0.05$ ) der IDO-Aktivität, bezogen auf die jeweilige IFN- $\gamma$  Konzentration ohne hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*).

Vergleichend wurde ebenfalls der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in IFN- $\gamma$  stimulierten HFF-Zellen, also einer nativen Zelllinie, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.17. dargestellt und man erkennt, dass auch in der nativen, humanen HFF-Zelllinie die IFN- $\gamma$  stimulierte IDO-Aktivität von der verwendeten hHSV-1 Infektionsdosis

abhängt und eine Proportionalität vorliegt. Demnach ist die IDO-Aktivität in der IFN- $\gamma$  stimulierten und uninfizierten Kontrolle am höchsten und im Falle einer zusätzlichen hHSV-1 Infektionsdosis mit einer MOI von 8 am geringsten. Eine signifikante Inhibition ( $p < 0.05$ ) der IDO-Aktivität kann ab einer hHSV-1 MOI von 0,08 beobachtet werden.

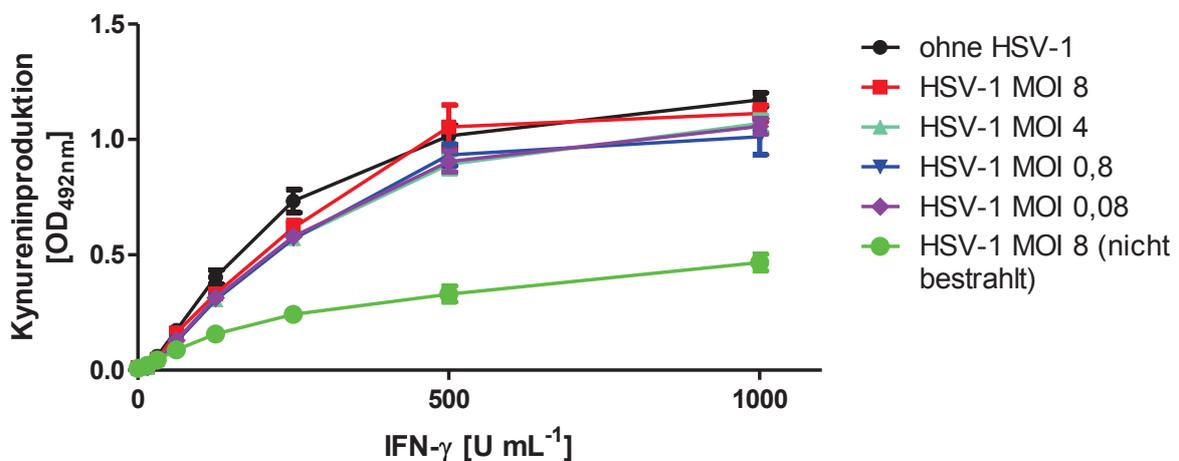
Bei der 86HG39 Zelllinie (siehe Abb. 3.16.) wird die IDO-Aktivität bei 1000 U/mL IFN- $\gamma$  und einer hHSV-1 MOI von 8 um mehr als 60 % gehemmt. Die IDO-Aktivität der HFF-Zelllinie (siehe Abb. 3.17.) konnte bei einer vergleichbaren hHSV-1 Infektionsdosis mit einer MOI von 8 sogar um mehr als 70 % inhibiert werden.



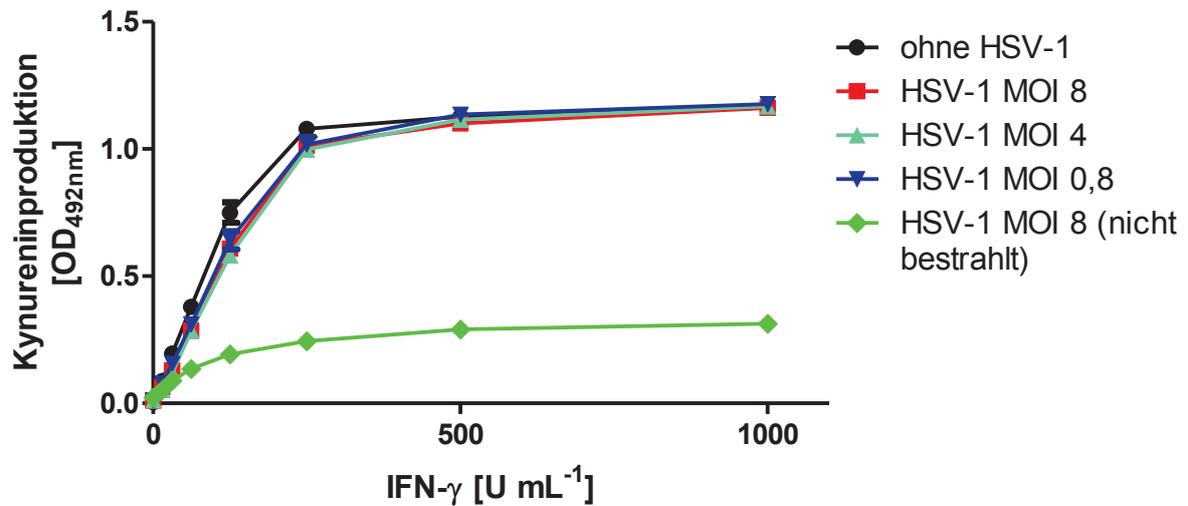
**Abb. 3.17.: Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen.** HFF-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 0,8; 4 oder 8) in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/mL) stimuliert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) der photometrisch ( $OD_{492nm}$ ) ermittelten Kynureninproduktion in den Zellkulturüberständen aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Hemmung ( $p < 0.05$ ) der IDO-Aktivität, bezogen auf die jeweilige IFN- $\gamma$  Konzentration ohne hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*).

Nach den beiden Versuchsansätzen (siehe Abb. 3.16. und 3.17.), in denen der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Aktivität untersucht wurde, lässt sich jedoch bis zu dieser Stelle nur vermuten, dass für die Reduktion der IDO-Aktivität die Virusinfektion verantwortlich ist. Um eine spezifische Negativkontrolle zu etablieren und den inhibitorischen Effekt auf die IDO-Aktivität dem hHSV-1 zuschreiben zu können, wurde das hHSV-1 durch UV-Bestrahlung inaktiviert. Hierbei wurde das hHSV-1 vor der Infektion in das UV-Bestrahlungsgerät Crosslinker (UV-) CL-1000 (UVP, Upland, Kanada) positioniert und einer UV-Strahlungsenergie von  $800 \text{ mJ/cm}^2$  ausgesetzt. Abbildung 3.18. zeigt ein hHSV-1 Infektionsexperiment wie Abbildung 3.16., aber mit dem Unterschied, dass hier nun das hHSV-1 mittels UV-Strahlung vor der Infektion der 86HG39 Zellen inaktiviert wurde.

Abbildung 3.19. zeigt ebenfalls das gleiche Experiment, aber unter Verwendung von nativen HFF-Zellen. Beide Experimente lassen den Schluss zu, dass bei einer hHSV-1 Inaktivierung der inhibitorische Effekt auf die IDO-Aktivität im Vergleich zu Abbildung 3.16. und 3.17. komplett aufgehoben wird. Diese Aussage kann anhand der fast deckungsgleich verlaufenden Kurven getroffen werden (siehe Abb. 3.18. und 3.19.). Dies bedeutet, dass in beiden Fällen die IDO-Aktivität nahezu den Wert der Positivkontrolle erreicht, bei der die Zellen mit IFN- $\gamma$  stimuliert, aber uninfiziert sind. Als weitere Kontrolle wurde in beiden Experimenten ein Versuchsansatz mitgeführt, der mit hHSV-1 infiziert (MOI 8 [nicht bestrahlt]) wurde.



**Abb. 3.18.: Einfluss einer Infektion mit UV-inaktiviertem hHSV-1 auf die IDO-Aktivität in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen/Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von UV-inaktiviertem hHSV-1 in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/mL) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde zudem ein HSV-1 infizierter (MOI 8 [nicht bestrahlt]) Versuchsansatz mitgeführt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) der photometrisch ( $OD_{492nm}$ ) ermittelten Kynureninproduktion in den Zellkulturüberständen aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Bei allen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zeigte sich in den Versuchsansätzen mit dem UV-inaktivierten hHSV-1, jeweils bezogen auf den uninfizierten Ansatz, eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Aufhebung der Hemmung der IDO-Aktivität.

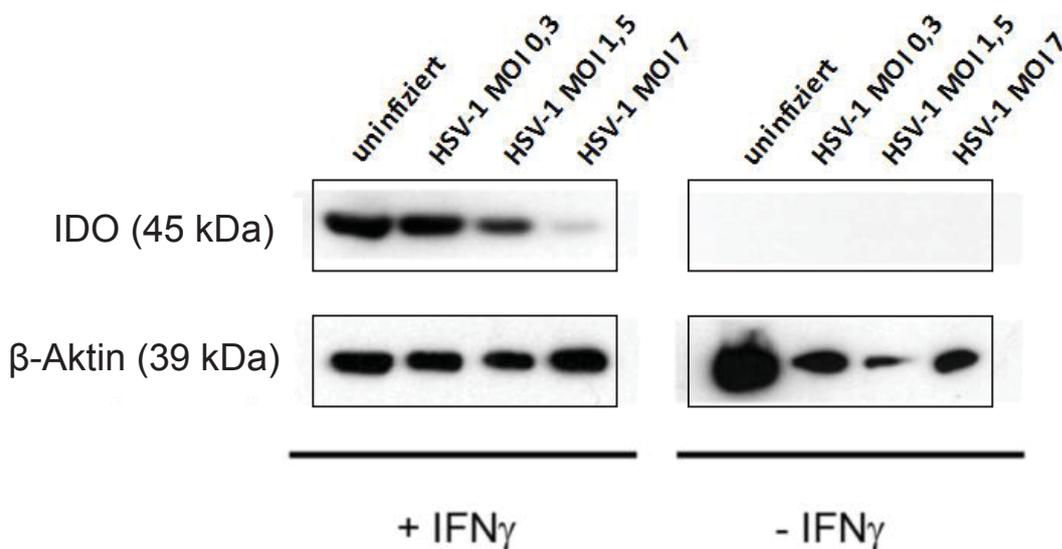


**Abb. 3.19.: Einfluss einer Infektion mit UV-inaktiviertem hHSV-1 auf die IDO-Aktivität in HFF-Zellen.** HFF-Zellen ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von UV-inaktiviertem hHSV-1 in L-Tryptophan-supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  (0 bis 1000 U/mL) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde zudem ein HSV-1 infizierter (MOI 8 [nicht bestrahlt]) Versuchsansatz mitgeführt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) der photometrisch ( $OD_{492nm}$ ) ermittelten Kynureninproduktion in den Zellkulturüberständen aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Bei allen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen zeigte sich in den Versuchsansätzen mit dem UV-inaktivierten hHSV-1, jeweils bezogen auf den uninfizierten Ansatz, eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Aufhebung der Hemmung der IDO-Aktivität.

### 3.2.2. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Proteinexpression

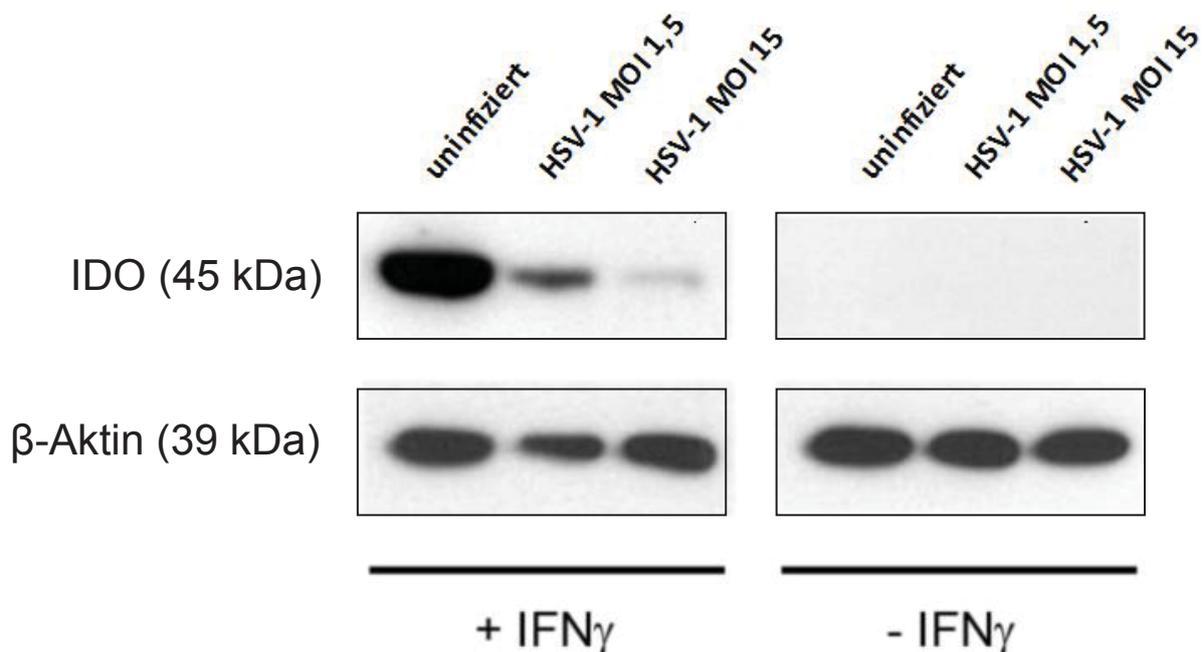
Als nächstes wurde der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Proteinbiosynthese analysiert. Der Grund hierfür war die Frage, ob die hHSV-1 vermittelte Reduktion der IDO-Aktivität auf einer inhibierten Enzym-Expression basiert. Die Untersuchung erfolgte mittels einer Western Blot Analyse. Hierzu wurden zunächst die humanen Hirntumorzellen 86HG39 mit IFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen und mit verschiedenen Mengen hHSV-1 infiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 wurde mikroskopisch kontrolliert. Als Negativkontrolle dienten IFN- $\gamma$  stimulierte, nicht mit hHSV-1 infizierte 86HG39 Zellen. Nach dem Ernten der Ansätze wurden die Zellen lysiert und mittels spezifischer Antikörper das darin enthaltene IDO-Protein, beziehungsweise das *housekeeping gene*  $\beta$ -Aktin, im Western Blot quantitativ detektiert (siehe Abb. 3.20.). Das  $\beta$ -Aktin funktioniert hierbei als Auftragskontrolle. Zudem ließ sich durch Analyse dieses konstitutiv exprimierten und nicht-regulierten *housekeeping genes* erkennen, dass die infizierten Zellen noch Proteinbiosynthese durchführten, das heißt vital waren.

Die Western Blot Analyse (Abb. 3.20.) zeigt, dass die IFN- $\gamma$  vermittelteIDO-Proteinexpression von der hHSV-1 Infektionsdosis beeinflusst wird. Es ist zu sehen, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Proteinbildung mit der ansteigenden hHSV-1 Infektionsdosis zunehmend inhibiert wird. Die uninfizierten und mit IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen weisen demnach die stärkste IDO-Expression auf. Bei einer zusätzlichen hHSV-1 Infektion mit einer MOI 1,5 ist die IDO-Proteinbildung um ca. 50 % reduziert und bei einer MOI von 7 ist lediglich eine ganz geringe IDO-Proteinexpression erkennbar. Die  $\beta$ -Aktin-Expression ist dagegen stets vorhanden. Dabei ist explizit hervorzuheben, dass sowohl bei der Detektion des IDO-Proteins, als auch bei dem Nachweis von  $\beta$ -Aktin gleich viel Lysat für den Western Blot verwendet worden ist. Daraus kann man schließen, dass das hHSV-1 zu keiner vollständigen Blockade der Proteinbiosynthese oder zum Zelltod der 86HG39 Zellen führt. Ob es durch eine hHSV-1 Infektion zu einer spezifischen Inhibition des IDO-Proteins kommt, lässt sich abschließend nicht sagen.



**Abb. 3.20.: Western Blot Analyse hHSV-1 infizierter und mit IFN- $\gamma$  stimulierter humaner Hirntumorzellen 86HG39.** 86HG39 Zellen ( $5 \times 10^6$ /Ansatz) wurden für 24 Stunden in L-Tryptophan supplementiertem Medium (Endkonzentration 0.6 mM L-Tryptophan) mit IFN- $\gamma$  stimuliert und zeitgleich mit hHSV-1 (MOI 0,3; 1,5 oder 7) infiziert. Als Negativkontrolle dienten mit IFN- $\gamma$  stimulierte und nicht mit hHSV-1 infizierte 86HG39 Zellen. IFN- $\gamma$  wurde in den jeweiligen Versuchsansätzen in einer Konzentration von 600 U/mL verwendet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zellysate wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (NuPage®-Polyacrylamidgel) nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt und die Proteinexpression mittels Western Blot erfasst. Hier wurde die humane IDO durch einen Kaninchen-anti-IDO-Antikörper nachgewiesen. Als Auftragskontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mittels eines Maus-anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper detektiert. Als spezifischer Sekundäntikörper diente beim Nachweis des IDO-Proteins ein POX-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper. Für die Detektion von  $\beta$ -Aktin wurde ein POX-anti-Maus-IgG Antikörper verwendet.

Vergleichend wurde erneut der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Proteinexpression in IFN- $\gamma$  stimulierten HFF-Zellen analysiert. Damit wollte man unter anderem zeigen, dass der Effekt einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-Proteinbiosynthese nicht auf eine Gehirntumorzelllinie beschränkt, sondern ebenfalls auf native Fibroblasten übertragbar ist. Die Western Blot Analyse (siehe Abb. 3.21.) zeigt erneut, dass die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Proteinbildung mit der ansteigenden hHSV-1 Infektionsdosis zunehmend gehemmt wird. Es kommt ebenfalls in den HFF-Zellen zu einer Reduktion der IDO-Proteinexpression durch eine hHSV-1 Infektion. Die Intensität der Reduktion ist hierbei ebenfalls von der hHSV-1 Infektionsdosis abhängig. Die mit IFN- $\gamma$  stimulierten und uninfizierten HFF-Zellen weisen die stärkste IDO-Proteinbildung auf. Wenn die HFF-Zellen zusätzlich mit einer hHSV-1 MOI von 1,5 infiziert wurden, konnte die Proteinexpression auf ca. 30 % reduziert werden. Bei einer MOI von 15 liegt lediglich eine sehr geringe IDO-Proteinexpression vor. An dieser Stelle kann man vergleichend anführen, dass die IDO-Proteinbildung in den HFF-Zellen stärker durch die hHSV-1 Infektion beeinflusst wird, zumindest hat eine hHSV-1 MOI von 1,5 eine stärkere Reduktion der Proteinbildung zur Folge. Die  $\beta$ -Aktin-Expression ist dagegen stets nachweisbar. Dabei ist erneut explizit zu sagen, dass sowohl bei dem Nachweis des IDO-Proteins, als auch bei dem Detektion von  $\beta$ -Aktin die gleiche Menge an Zelllysate für den Western Blot aufgetragen worden ist.



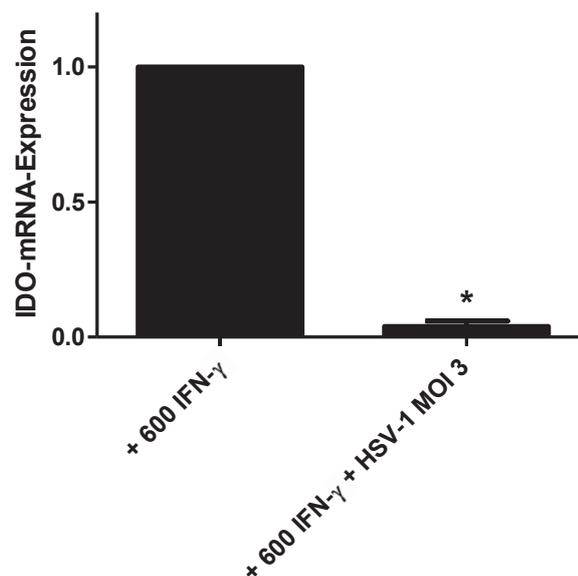
**Abb. 3.21.: Western Blot Analyse hHSV-1 infizierter und mit IFN- $\gamma$  stimulierter humaner HFF-Zellen.**  $1 \times 10^6$  Fibroblasten wurden mit IFN- $\gamma$  (600 U/mL) stimuliert und zur gleichen Zeit mit hHSV-1 (MOI 1,5 oder 15) infiziert. Als Negativkontrolle dienten mit IFN- $\gamma$  stimulierte und uninfizierte HFF-Zellen. Nach ca. 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Zelllysate wurden in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe eines Western Blot analysiert. Hierbei wurde die humane IDO durch einen Kaninchen-

anti-IDO-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mittels eines Maus-anti- $\beta$ -Aktin-Antikörpers detektiert. Als spezifischer Sekundärantikörper diente beim Nachweis des IDO-Proteins ein POX-gekoppelter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper. Für die Detektion von  $\beta$ -Aktin wurde ein POX-anti-Maus-IgG Antikörper benutzt.

### 3.2.3. Einfluss von hHSV-1 auf die IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-mRNA-Expression

Letztlich wurde der Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IDO-mRNA-Expression in 86HG39 Zellen analysiert. Dabei wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  stimuliert (600 U/ml) und gleich danach mit einer hHSV-1 MOI von 3 infiziert beziehungsweise uninfiziert belassen. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 wurde mikroskopisch überprüft. Die IDO-mRNA-Expression wurde schließlich nach 48 Stunden mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR gemessen. In Abbildung 3.22. sind die Ergebnisse dieses Experimentes dargestellt. Hierbei wurde ein Vergleich der IDO-mRNA- und  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression unternommen beziehungsweise wurden die IDO-mRNA-Kopien auf die Kopien des Referenzgens  $\beta$ -Aktin normalisiert, sodass letztendlich eine Hemmung der IDO-mRNA-Bildung detektiert wurde. Eine hHSV-1 Infektion mit einer MOI von 3 führt somit zu einer signifikanten ( $p < 0.0001$ ) Reduktion der IDO-mRNA-Expression. Bezogen auf die mit IFN- $\gamma$  stimulierten und uninfizierten 86HG39 Zellen, konnte die IDO-mRNA-Bildung nach einer Infektion der 86HG39 Zellen mit hHSV-1 auf ca. 1/10 reduziert werden.

Anhand dieses Experimentes konnte abschließend gezeigt werden, dass die hHSV-1 Infektion nicht zu einer spezifischen Hemmung der IDO-Aktivität bzw. -Proteinexpression führt, sondern schon die Bildung der mRNA beeinflusst und signifikant ( $p < 0.0001$ ) verringert.

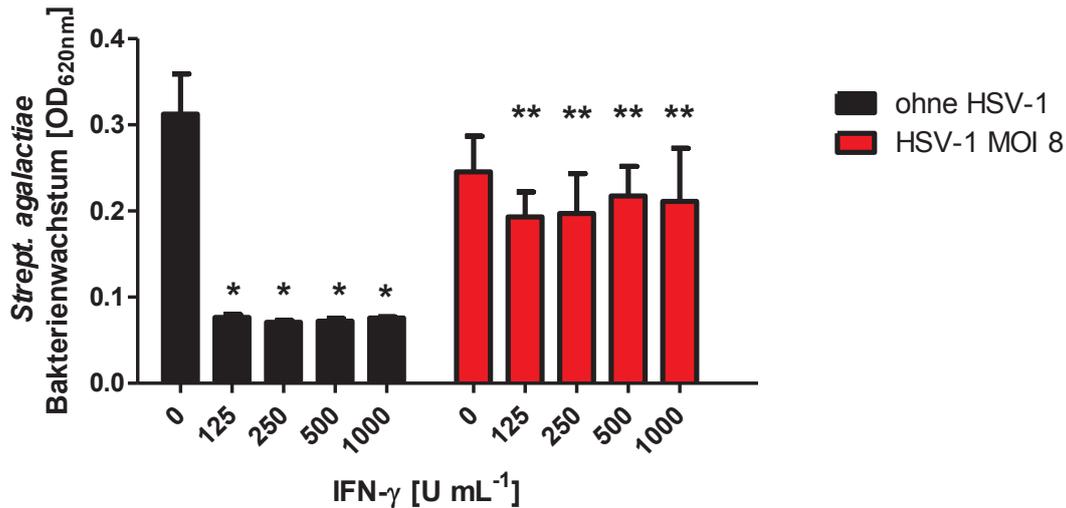


**Abb. 3.22.: Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf die IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-mRNA-Expression in 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen  $1 \times 10^6$ /Ansatz wurden mit IFN- $\gamma$  (600 U/ml) stimuliert und anschließend direkt mit hHSV-1 (MOI 3) infiziert. Nach 48 Stunden wurde die IDO- und  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression mittels quantitativer Real-Time PCR detektiert. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Die signifikante ( $p < 0.0001$ ) Reduktion der IDO-mRNA-Expression durch die HSV-1 Infektion, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz, der lediglich mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde, wurde gekennzeichnet (\*).

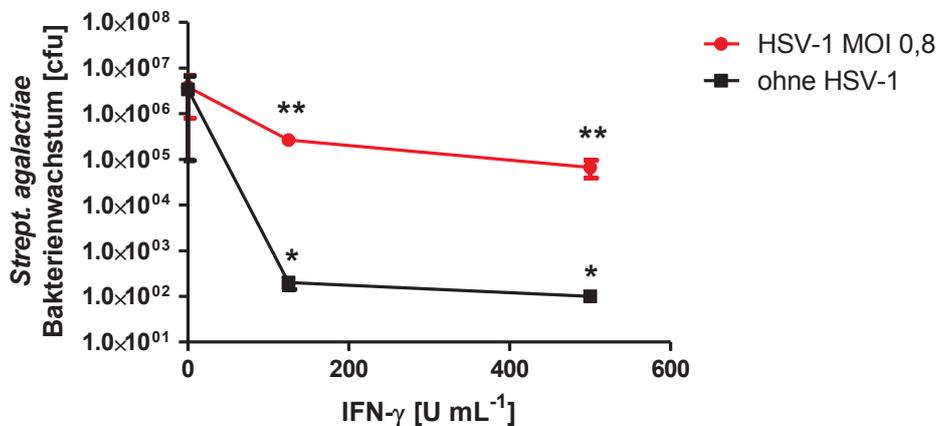
### 3.2.4. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte antibakterielle Effekte

Bisher wurde unter 3.2.1. bis 3.2.3. gezeigt, dass eine hHSV-1 Infektion in humanen Tumorzellen, aber auch nativen Zellen zu einer Reduktion der IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität, IDO-Protein- und -mRNA-Expression führt. Daraus ergab sich die Frage, welchen Einfluss diese hHSV-1 induzierten Effekte auf die IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte haben.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden verschiedene Infektionsexperimente mit Bakterien und Parasiten durchgeführt. Hierbei wurden mit hHSV-1 infizierte und mit IFN- $\gamma$  stimulierte oder unstimulierte humane 86HG39 Zellen und HFF-Zellen 72 Stunden nach Stimulationsbeginn mit *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus aureus* koinfiziert. Genauer gesagt werden jeweils die Zellkulturen bakteriell infiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 und den Bakterienstämmen wurde mikroskopisch überprüft. Als Negativkontrolle dienen uninfizierte und mit IFN- $\gamma$  stimulierte Zellen. Hier wird ein IFN- $\gamma$  vermittelter antibakterieller Effekt, wie bereits unter 3.1.1. beschrieben, beobachtet. Wurden die jeweiligen Zellen jedoch neben der IFN- $\gamma$  Stimulation zusätzlich mit hHSV-1 infiziert, konnte kein antibakterieller Effekt induziert werden, sodass die Bakterien weiter proliferieren können. Die fast vollständige Aufhebung des IDO-vermittelten antibakteriellen Effekts gegen *Streptococcus agalactiae* durch hHSV-1 konnte sowohl bei der Messung der optischen Dichte (siehe Abb. 3.23.), als auch bei der Bestimmung der *colony forming units* (siehe Abb. 3.24.) gezeigt werden. Abbildung 3.24. veranschaulicht deutlich, dass die hHSV-1 Infektion bereits bei einer MOI von 0,8 den antibakteriellen Effekt nahezu komplett über 3 Stufen aufhebt.



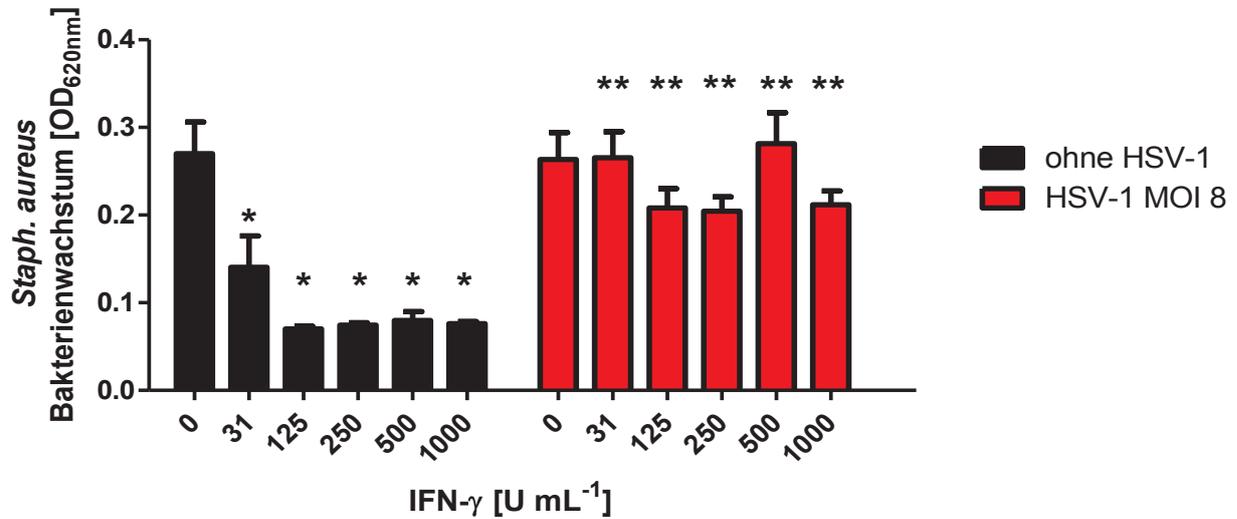
**Abb. 3.23.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Die signifikante Hemmung ( $p < 0.0001$ ) des Bakterienwachstums, bezogen auf die Mediumkontrolle, wurde gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde ebenfalls gekennzeichnet (\*\*).



**Abb. 3.24.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-vermittelte Hemmung des Wachstums von *Streptococcus agalactiae* in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von HSV-1 (MOI 0,8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die mit IFN- $\gamma$  (bis 500 U/mL) stimulierten Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden wurde das Wachstum durch *colony forming units* (cfu) bestimmt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des Bakterienwachstums  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten angegeben. Die signifikante Hemmung ( $p < 0.0001$ ) des Bakterienwachstums, bezogen auf die Mediumkontrolle, wurde gekennzeichnet (\*). Die signifikante Aufhebung des antibakteriellen Effektes ( $p < 0.05$ ) durch die Virusinfektion, bezogen auf die Versuchsgruppe mit IFN- $\gamma$ , wurde ebenfalls gekennzeichnet (\*\*).

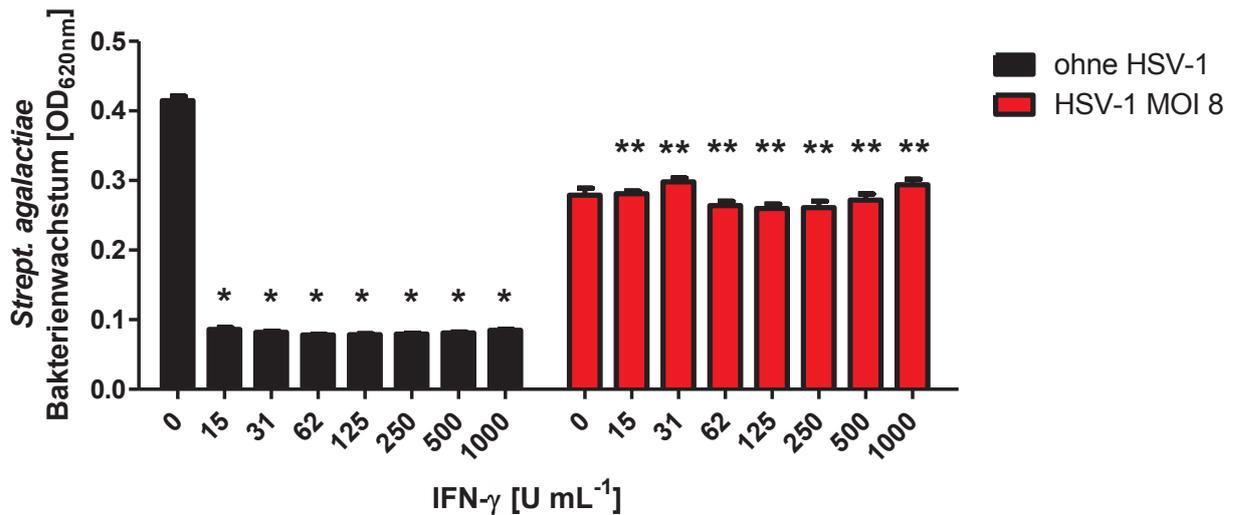
Nach dem Infektionsexperiment mit *Streptococcus agalactiae* war es nun interessant zu erfahren, ob die Inhibition des antibakteriellen Effektes durch hHSV-1 auch bei einer Koinfektion mit *Staphylococcus aureus* zustande kommt. Hierzu zeigt Abbildung 3.25. die nahezu vollständige und signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung des IDO-vermittelten

antibakteriellen Effekts gegen *Staphylococcus aureus* durch hHSV-1 mit Hilfe der Messung der optischen Dichte.



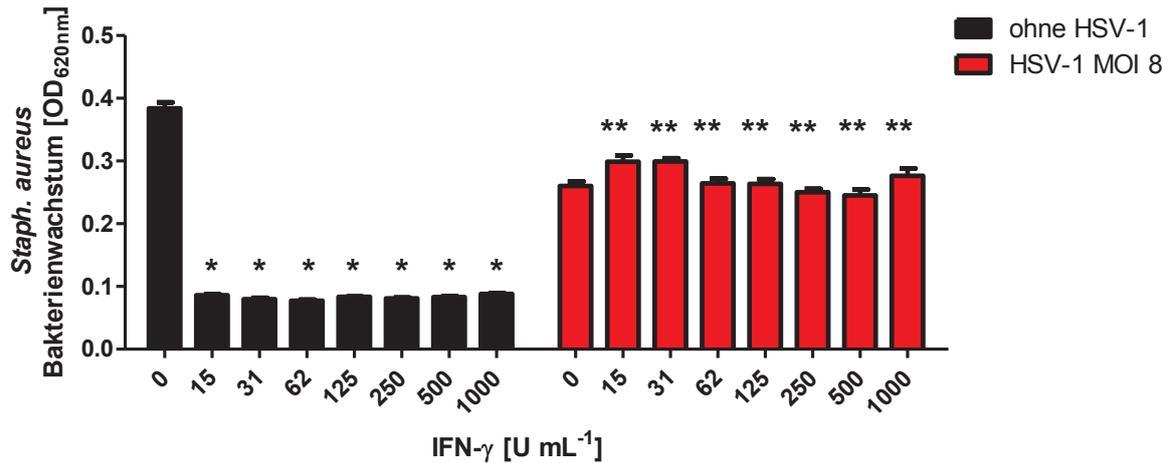
**Abb. 3.25.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Die signifikante Hemmung ( $p < 0.01$ ) des Bakterienwachstums, bezogen auf die Mediumkontrolle, wurde gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

Um den Einfluss einer hHSV-1 Infektion auf eine höher konzentrierte Bakterieninfektion von *Streptococcus agalactiae* beziehungsweise den vermittelten IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt analysieren zu können, wurden die 86HG39 Zellkulturen nun zusätzlich zu dem hHSV-1 (MOI 8) mit einer höheren Bakteriendosis (100 bis 1000 cfu/Vertiefung) infiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 und den jeweiligen Bakterienstämmen wurde mikroskopisch überprüft. Die Abbildung 3.26. zeigt eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des IDO-induzierten antibakteriellen Effekt ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration 15 U/mL. Das Bakterienwachstum liegt im Falle einer hHSV-1 Infektion bei ca. 75 % des Ausgangswertes der unstimulierten und uninfizierten Kontrollgruppe. Eine höhere Bakterieninfektionsdosis von *Streptococcus agalactiae* hat somit keinen negativen Effekt auf die Inhibition des antibakteriellen Effektes durch hHSV-1.



**Abb. 3.26.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

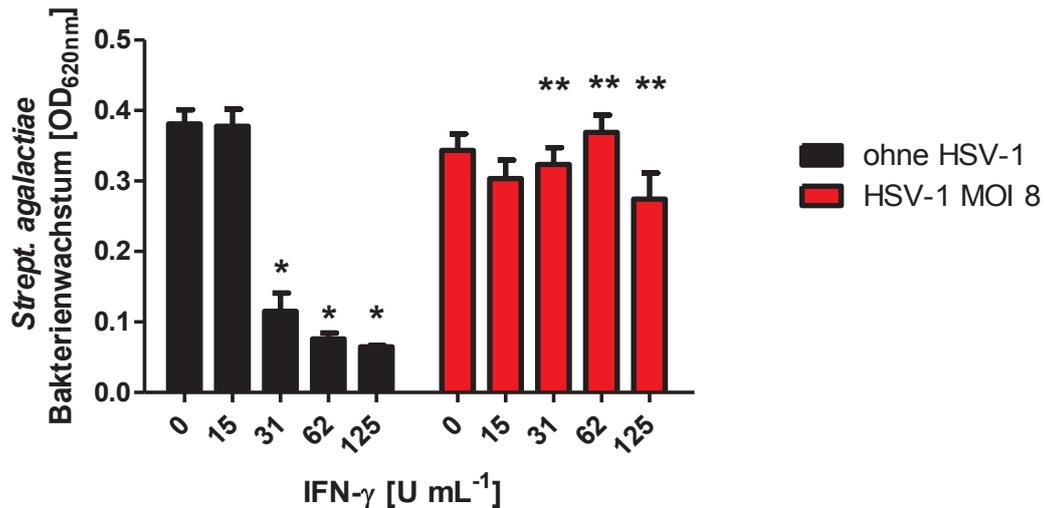
Anschließend überprüfte man, ob auch bei einer höheren Bakterienkonzentration (100 bis 1000 cfu/Vertiefung) von *Staphylococcus aureus* die Aufhebung des IDO-vermittelten antibakteriellen Effekt durch eine hHSV-1 Infektion (MOI 8) erreicht werden kann. Auch in Abbildung 3.27. erkennt man eine deutliche, signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des IDO-induzierten antibakteriellen Effekt ab einer IFN- $\gamma$  Konzentration 15 U/mL. Auch hier liegt das Bakterienwachstum nach der hHSV-1 Infektion bei ca. 75 % bezogen auf die uninfizierte und nicht mit IFN- $\gamma$  stimulierte Kontrolle. Eine höhere Bakterieninfektionsdosis von *Staphylococcus aureus* hat somit ebenfalls keinen negativen Effekt auf die Inhibition des antibakteriellen Effektes durch eine hHSV-1 Infektion.



**Abb. 3.27.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* in 86HG39 Zellen.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

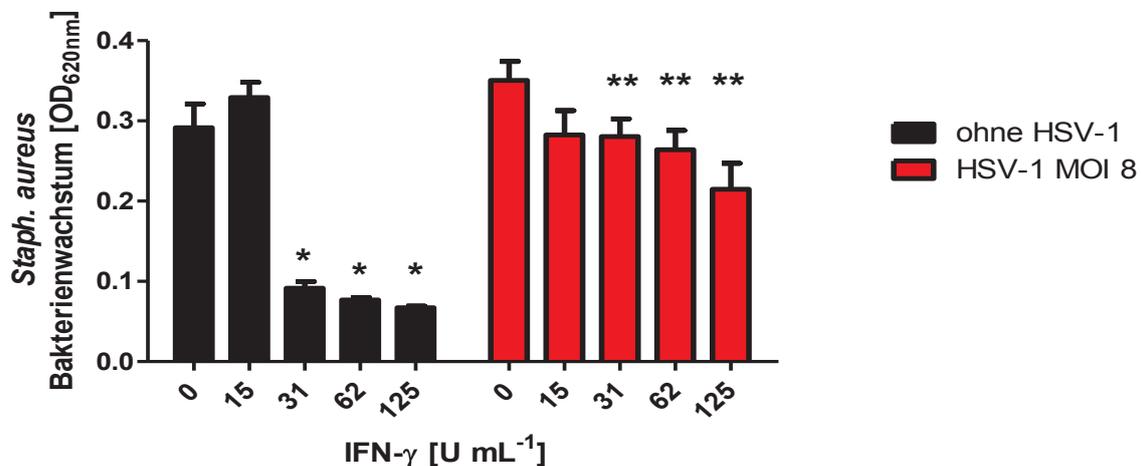
Erneut wurden vergleichend Infektionsexperimente auch mit nativen HFF-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden mit hHSV-1 infizierte und mit IFN- $\gamma$  stimulierte oder unstimulierte humane, native HFF-Zellkulturen nach 72 Stunden mit *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus aureus* infiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 und den Bakterien wurde wie zuvor mikroskopisch überprüft.

Zunächst wurden Koinfektionen mit hHSV-1 und *Streptococcus agalactiae* durchgeführt und untersucht, ob eine hHSV-1 Infektion die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von *Streptococcus agalactiae* beeinflussen kann. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.28. Die nahezu vollständige und signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des IDO-vermittelten antibakteriellen Effekts gegen *Streptococcus agalactiae* durch eine hHSV-1 Infektion konnte anhand der Messung der optischen Dichte veranschaulicht werden.



**Abb. 3.28.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* in HFF-Zellen.**  $3 \times 10^4$  HFF-Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

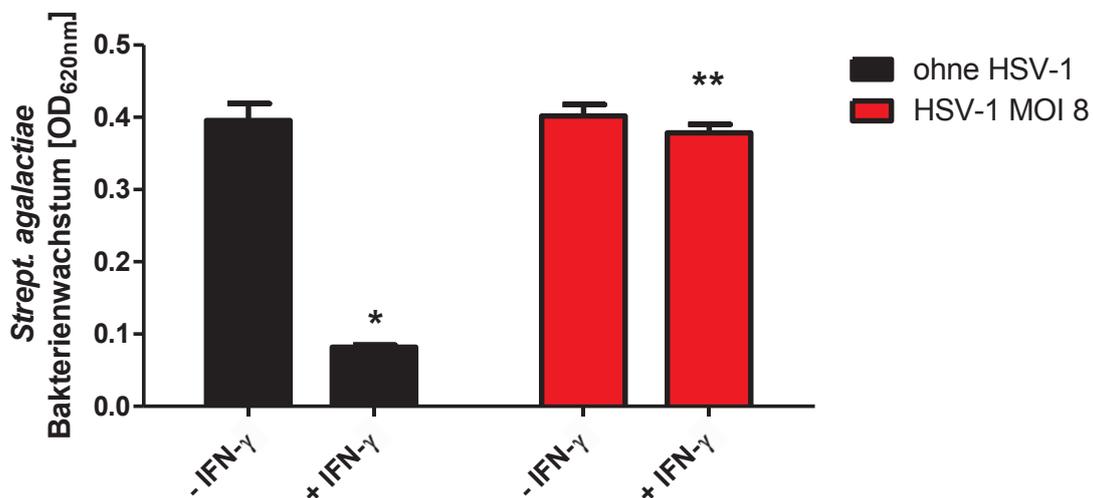
Nachdem gezeigt wurde, dass eine hHSV-1 Infektion die IDO-vermittelte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* signifikant ( $p < 0.0001$ ) aufhebt, war es nun interessant zu analysieren, ob die Inhibition des antibakteriellen Effektes durch hHSV-1 auch bei einer Koinfektion mit *Staphylococcus aureus* erreicht werden kann. Abbildung 3.29. zeigt in diesem Zusammenhang die signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung der IDO-vermittelten Wachstumshemmung von *Staphylococcus aureus* durch hHSV-1 mit Hilfe der Messung der optischen Dichte.



**Abb. 3.29.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* in HFF-Zellen.**  $3 \times 10^4$  HFF-Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw.

Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (10-100 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

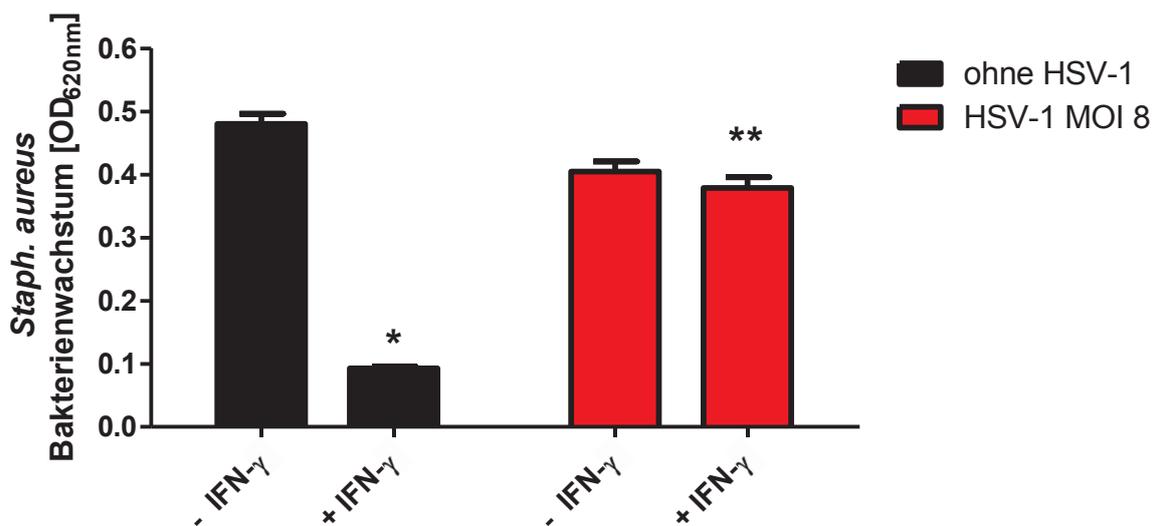
Ob eine höher konzentrierte Bakterieninfektionsdosis von *Streptococcus agalactiae* den Einfluss von hHSV-1 auf den vermitteltenIDO-vermittelten antibakteriellen Effekt abschwächt, wurde mit den kommenden Infektionsexperimenten untersucht. Die HFF-Zellkulturen wurden nun zusätzlich zu dem hHSV-1 (MOI 8) mit einer höheren Bakteriendosis (100 bis 1000 cfu/Vertiefung) koinfiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 und den jeweiligen Bakterienstämmen wurde mikroskopisch überprüft. Die Abbildung 3.30. zeigt eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des IDO-induzierten antibakteriellen Effekt bei der exemplarisch gezeigten IFN- $\gamma$  Konzentration 15 U/mL. Das Bakterienwachstum liegt im Falle einer hHSV-1 Infektion bei nahezu 100 % des Ausgangswertes der unstimulierten und uninfizierten Kontrollgruppe. Eine höhere Bakterieninfektionsdosis von *Streptococcus agalactiae* hat somit keinen Einfluss auf die Inhibition des antibakteriellen Effektes durch hHSV-1.



**Abb. 3.30.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Wachstumshemmung von *Streptococcus agalactiae* in HFF-Zellen.**  $3 \times 10^4$  HFF-Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  (hier 15 U/mL exemplarisch demonstriert) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Streptococcus agalactiae* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*).

Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

Abschließend überprüfte man erneut, ob auch bei einer höheren Bakterienkonzentration (100 bis 1000 cfu/Vertiefung) von *Staphylococcus aureus* die Aufhebung desIDO-vermittelten antibakteriellen Effekt durch eine hHSV-1 Infektion (MOI 8) erzielt werden kann. Abbildung 3.31. zeigt eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung desIDO-induzierten antibakteriellen Effekt bei der exemplarisch demonstrierten IFN- $\gamma$  Konzentration 15 U/mL. Das Bakterienwachstum liegt nach der hHSV-1 Infektion bei ca. 80 %, bezogen auf die uninfizierte und nicht mit IFN- $\gamma$  stimulierte Kontrolle. Eine höhere Bakterieninfektionsdosis von *Staphylococcus aureus* hat somit ebenfalls keinen negativen Effekt auf die Hemmung des antibakteriellen Effektes durch eine hHSV-1 Infektion.



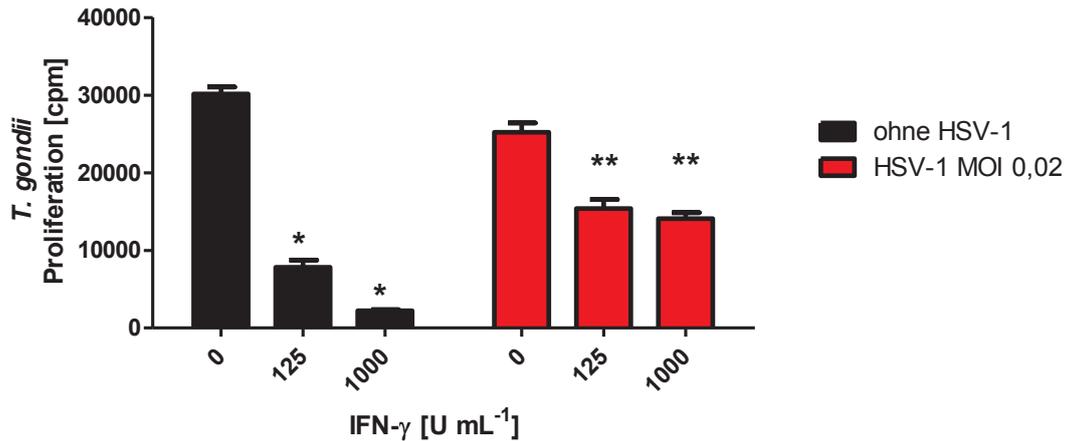
**Abb. 3.31.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf die IDO-induzierte Hemmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus* in HFF-Zellen.**  $3 \times 10^4$  HFF-Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 8) mit IFN- $\gamma$  (hier 15 U/mL exemplarisch demonstriert) stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Kulturen mit *Staphylococcus aureus* (100-1000 cfu/Vertiefung) infiziert und nach weiteren 24 Stunden das Bakterienwachstum durch das Messen der optischen Dichte (OD<sub>620nm</sub>) ermittelt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Statistisch signifikante ( $p < 0.0001$ ), durch IFN- $\gamma$  vermittelte antibakterielle Effekte, bezogen auf das Bakterienwachstum in Anwesenheit von unstimulierten Zellen, wurden gekennzeichnet (\*). Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Aufhebung des antibakteriellen Effektes, jeweils bezogen auf den Versuchsansatz ohne eine hHSV-1 Infektion, wurde gekennzeichnet (\*\*).

### 3.2.5. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte antiparasitäre Effekte

Insbesondere unter Immunsuppression kann das humane Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) zu schwerwiegenden Infektionen führen. Es war wichtig zu analysieren, ob eine aktive hHSV-1 Infektion den IDO-vermittelten inhibitorischen Effekt gegenüber *Toxoplasma gondii* beeinflussen oder sogar aufheben kann. Hierzu wurden ebenfalls humane 86HG39 Gehirntumorzellen mit verschiedenen IFN- $\gamma$  Konzentrationen stimuliert und anschließend mit hHSV-1 (MOI 0,02) infiziert. Nach einer 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Versuchansätze mit *Toxoplasma* Tachyzoiten infiziert. Die erfolgreiche Infektion mit hHSV-1 und *Toxoplasma gondii* wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach weiteren 72 Stunden wurde das *Toxoplasma gondii* Wachstum mittels der Inkorporation von [3H]-Uracil detektiert. Die Ergebnisse dieses Infektionsexperiments kann man Abbildung 3.32. entnehmen. Wie bereits unter 3.1.1. (Abb. 3.8.) beschrieben, führt eine IFN- $\gamma$  Stimulation zu einem signifikanten, IDO-vermittelten antiparasitären Effekt. Bei diesem Experiment (Abb. 3.32.) führt jedoch eine hHSV-1 Infektion zu einer Inhibition dieses IDO-Effektes.

Der antiparasitäre Effekt kann jedoch nur zu ca. 50 % aufgehoben werden. Dennoch zeigte sich ab einer IFN- $\gamma$ -Konzentration von 125 U/mL in allen mit hHSV-1 infizierten Versuchsansätzen, jeweils bezogen auf den jeweiligen uninfizierten und mit der gleichen IFN- $\gamma$  Dosis stimulierten Ansatz, eine signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung des antiparasitären Effektes. In vielen vorherigen Experimenten mit höheren hHSV-1 Infektionsdosen konnte nur eine geringere Hemmung des IDO-vermittelten antiparasitären Effektes erreicht werden, sodass man lediglich eine niedrigere hHSV-1 MOI von 0,02 einsetzen konnte, um den antiparasitären Effekt aufzuheben. Gründe, aus denen eine höhere hHSV-1 Infektionsdosis zu keiner oder sehr schwachen Aufhebung des IDO-vermittelten antiparasitären Effekt führen oder wie das Wachstum von *Toxoplasma gondii* eingeschränkt werden könnte, werden noch einmal gesondert in der Diskussion dieser Dissertation dargestellt (siehe 4.2.).

Bei Vergleich der vorgestellten Ergebnisse der *Toxoplasma gondii*-Infektionsexperimente mit denen, der zuvor dargestellten Bakterien-Versuche, lassen sich in der Aufhebung des IDO-vermittelten antimikrobiellen Effektes Gemeinsamkeiten erkennen. Bei den Infektionsexperimenten mit *Toxoplasma gondii* ist entscheidend, dass die obligat intrazellulären Parasiten eine vitale Zelle für ihr Wachstum benötigen. Daraus kann man schließen, dass die hHSV-1 infizierten und mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen noch größtenteils lebendig sind. Die untersuchten hHSV-1 induzierten Effekte basieren somit nicht nur auf zytotoxischen Veränderungen.



**Abb. 3.32.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt in 86HG39 Zellen.**  $4 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 24 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von hHSV-1 (MOI 0,02) mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Danach wurden die Kulturen mit *Toxoplasma gondii* ( $3 \times 10^4$ /Vertiefung) infiziert. Die Proliferation von *T. gondii* wurde nach weiteren 72 Stunden durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Uracil in die parasitäre RNA mittels Beta-Counter gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte der Uracilinkorporation  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante Hemmung ( $p < 0.0001$ ) des parasitären Wachstums durch IFN- $\gamma$  induziert, bezogen auf den jeweiligen Ansatz, der nicht mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurde, wurde gekennzeichnet (\*). Ab einer IFN- $\gamma$ -Konzentration von 125 U/mL zeigte sich in allen mit hHSV-1 infizierten Versuchsansätzen, jeweils bezogen auf den jeweiligen uninfizierten und mit der gleichen IFN- $\gamma$  Dosis stimulierten Ansatz, eine signifikante ( $p < 0.01$ ) Aufhebung des antiparasitären Effektes. Dies ist mit \*\* gekennzeichnet. Die Signifikanz bei der Gruppe mit 1000 U/mL IFN- $\gamma$  ist  $p < 0.0001$ .

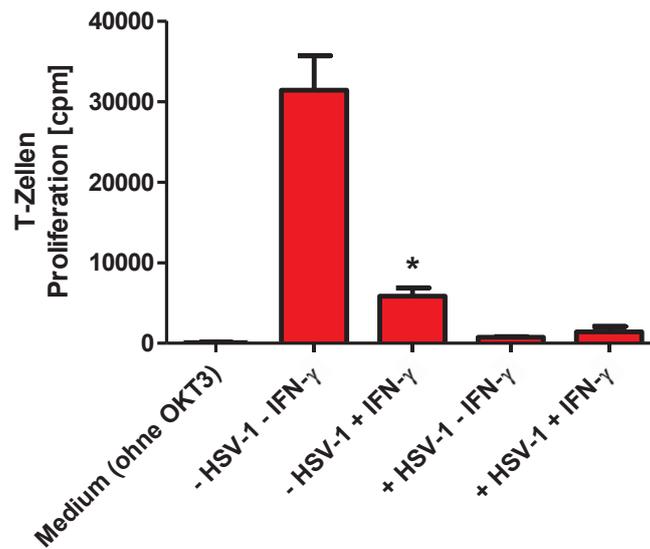
Damit ist experimentell gezeigt, dass eine Koinfektion mit hHSV-1 den IDO-vermittelten antiparasitären Effekt aufheben kann. Aus diesem Grund beeinflusst die Koinfektion die antiparasitäre Antwort qualitativ ähnlich wie die antibakterielle Antwort. Der wichtigste Unterschied zwischen den beiden Experimentalsystemen mit Bakterien und Parasiten ist jedoch in der Bebrütungszeit zu sehen, so müssen die Experimente mit den Parasiten länger bebrütet werden, um ein zur Auswertung ausreichendes Parasitenwachstum zu erzielen. Aus diesem Grund wurde auch die hHSV-1 MOI reduziert, um der längeren Bebrütungszeit Rechnung zu tragen.

### 3.2.6. Einfluss von hHSV-1 auf IDO-vermittelte immunregulatorische Effekte

Von einer aktiven humanen Cytomegalievirus-Infektion ist bekannt, dass das Risiko nach einer Organtransplantation das Transplantat wieder abzustößen, erhöht ist. Insbesondere im Rahmen einer Nierentransplantation kommt dies vor (De Keyzer *et al.*, 2011). Die Aktivität der IDO spielt *in vivo* mit ihren immunregulatorischen Effekten eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Transplantattoleranz (Lin *et al.*, 2008; Laurence *et al.*, 2008). Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass der IDO-vermittelte immunregulatorische Effekt durch eine hCMV-Infektion gehemmt werden kann. Hierdurch könnte das Risiko einer *Host-versus-graft*-Reaktion erhöht sein. Vor diesem Hintergrund war es in dieser Arbeit ein Ziel die Auswirkungen einer hHSV-1 Infektion auch auf das Wachstum von T-Zellen zu analysieren. Experimentell wurden 86HG39 Zellen über 72 Stunden mit IFN- $\gamma$  stimuliert (600 U/mL) oder unstimuliert belassen und zusätzlich mit hHSV-1 infiziert beziehungsweise auch nicht infiziert. Eine erfolgreiche Infektion der Zellen mit hHSV-1 wurde mikroskopisch kontrolliert. Danach wurden die Zellkulturüberstände geerntet und als Kulturmedium für die PBL eingesetzt. Hierbei wurden die T-Zellen mit dem CD3-Antikörpers OKT3 aktiviert. Die daraus resultierende Proliferation der T-Zellen konnte anschließend durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin bestimmt werden. Wie unter 3.1.2. bereits beschrieben, kommt es im Fall der nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten und nicht mit HSV-1 infizierten Zellen zu einer signifikanten Hemmung der T-Zell Proliferation. Bei einer zusätzlichen hHSV-1 Infektion fällt jedoch auf, dass dieser Effekt nicht aufgehoben werden kann. Das T-Zell Wachstum ist sogar in diesem Fall zusätzlich vermindert (siehe Abb. 3.33.). Als Positivkontrolle wurde das T-Zell Wachstum in Kulturüberständen von nicht mit IFN- $\gamma$  stimulierten und uninfizierten 86HG39 Zellen detektiert. Als Negativkontrolle diente ein unbehandelter Ansatz ohne eine Stimulation mit OKT3 ("Medium ohne OKT3").

Ein Grund kann für die fehlende Antagonisierung der IDO-vermittelten antiproliferativen Effekte könnte sein, dass HSV-1 direkt mit den PBL interagiert und zytotoxische Effekte vermittelt. Das passt zu der mikroskopischen Analyse der Kulturen, bei denen die PBL in den HSV-1 infizierten Gruppen zytopathisch verändert waren.

Vergleichend mit einer hCMV-Infektion, wie von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt, kommt es somit bei einer hHSV-1 Infektion nicht zu einer Aufhebung des IDO-vermittelten immunregulatorischen Effektes.



**Abb. 3.33.: Einfluss der hHSV-1 Infektion auf den IDO-vermittelten immunregulatorischen Effekt.**  $1 \times 10^6$  86HG39 Zellen wurden in An- (+ IFN- $\gamma$ ) oder Abwesenheit (- IFN- $\gamma$ ) von IFN- $\gamma$  (600 U/mL) und hHSV-1 (MOI 6) in 5 mL Medium inkubiert. Nach 72 Stunden wurden je 200  $\mu$ L der Zellüberstände als Kulturmedium für  $1.5 \times 10^5$  PBL, die mit OKT3 stimuliert und aktiviert wurden, verwendet. Als Negativkontrolle wurden  $1.5 \times 10^5$  PBL ohne OKT3 (Medium) in Kulturmedium inkubiert. Nach weiteren 48 Stunden wurde die T-Zell Proliferation durch den Einbau von [ $^3$ H]-Thymidin (in cpm) gemessen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte des [ $^3$ H]-Thymidineinbaus  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen angegeben. Eine signifikante ( $p < 0.0001$ ) Inhibition der T-Zell Proliferation, bezogen auf die Kontrollgruppe ohne IFN- $\gamma$  und ohne hHSV-1, wurde gekennzeichnet (\*).

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die antimikrobiellen und immunregulatorischen Eigenschaften der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in einem Infektionsmodell mit Glioblastom- (86HG39) und HFF-Zellen untersucht bzw. wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierte Experimente reproduziert, um sie in komplexeren Infektionsexperimenten weiter analysieren zu können.

Im zweiten und entscheidenden Teil dieser Arbeit wurde dann schließlich der inhibitorische Einfluss einer humanen Herpes simplex Typ 1 (hHSV-1) Infektion auf die IDO und ihre vermittelte Effekte untersucht. Die dabei gefundenen Ergebnisse zeigen, dass eine Infektion mit hHSV-1 in der Lage ist, die IDO-Expression und –Aktivität, sowie deren induzierten antimikrobiellen Effekte, zu inhibieren. Dieser von unserer Arbeitsgruppe schon für hCMV gezeigte Mechanismus kann in der Humanmedizin zu einem besseren Verständnis von Koinfektionen, insbesondere die das ZNS betreffen, führen. Zudem konnte der Einfluss von hHSV-1 auf die IDO-vermittelte Immunregulation in einem weiteren Modell mit T-Zellen analysiert werden. Daraus ergeben sich verschiedene Erklärungsansätze, wie es zum Beispiel im Zuge einer Herpesvirusinfektion zu einer erhöhten Disposition für weitere pathogene Erreger oder zu einem erhöhten Risiko für eine Transplantatabstoßung kommen könnte. Die geschilderten *in vitro* Daten und deren Nutzung zur Erklärung von Beobachtungen und Erkrankungen *in vivo* werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1. Die Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase in Astrozytomzellen und Fibroblasten bei der Pathogenabwehr

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen humane Glioblastomzellen (86HG39) und zum anderen native, humane HFF-Zellen verwendet, um ein *in vitro* Meningo-Enzephalitis-Infektionsmodell zu etablieren und um die IDO-vermittelten antimikrobiellen Effektormechanismen genauer zu analysieren. Hierzu wurden neben den genannten zwei unterschiedlichen Zelllinien verschiedene infektiöse Pathogene, wie *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* oder *Toxoplasma gondii* eingesetzt.

Die IDO-vermittelte lokale Tryptophan-Depletion stellt einen protektiven immunologischen Abwehrmechanismus gegenüber verschiedenen Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen dar (Däubener *et al.*, 1999; Adam *et al.*, 2005; Heseler *et al.*, 2008). Bereits veröffentlichte Daten zeigten, dass die IDO im ZNS in Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und Hirnendothelzellen

durch das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  induziert werden kann und dass eine IDO-Hemmung mittels 1-Methyl-Tryptophan (1-MT) zur Progression einer T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung, wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), führt (Däubener *et al.*, 2001; Adams *et al.*, 2004 A; Guillemin *et al.*, 2005; Kwidzinski *et al.*, 2005).

Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Proteinexpression und IDO-Aktivität in der Glioblastomzelllinie 86HG39 nachgewiesen. Eine IFN- $\gamma$  induzierte IDO-mRNA-Expression in den 86HG39 Zellen konnte bereits ebenfalls vorher von unserer Arbeitsgruppe experimentell gezeigt werden (Adams *et al.*, 2004 A).

Die Ergebnisse der Infektionsexperimente veranschaulichen, dass ein IDO-vermittelter antibakterieller Effekt gegenüber *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* in humanen Glioblastomzellen (86HG39) mittels IFN- $\gamma$  induziert werden kann. Hierbei wurden die Experimente mit *Streptococcus agalactiae* reproduziert und um *Staphylococcus aureus* erweitert.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Infektionsmodell mit humanen Glioblastomzellen und *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* verwendet, da diese Bakterien *in vivo* häufig ZNS-Infektionen wie Meningitiden und Hirnabszesse verursachen. Insbesondere Immunkompromittierte und Patienten unter Immunsuppression, aber auch Neugeborene sind von den Infektionen betroffen (Muñoz *et al.*, 1997; Kamaratos *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2005; Hof *et al.*, 2005; Flüge *et al.*, 2006; Gleixner *et al.*, 2009). Bereits vor dieser Dissertation konnte ebenfalls von unserer Arbeitsgruppe ein IDO-vermittelter antiviraler Effekt von 86HG39 Gehirntumorzellen gegenüber hHSV-1, welches eine Enzephalitis verursachen kann, gezeigt werden (Adams *et al.*, 2004 A). Zudem konnte von unserer Arbeitsgruppe auch bewiesen werden, dass der IFN- $\gamma$  vermittelte antivirale Effekt von der hHSV-1 Infektionsdosis abhängt und bei einer höheren Infektionsdosis (MOI 1,5) nicht so effektiv ist, wie bei einer niedrigeren Infektionsdosis (MOI 0,15) (Heseler, 2008). Ebenfalls konnte dieser Zusammenhang für ein weiteres Herpesvirus und zwar für das hCMV in Alveolarepithelzellen gezeigt werden (Heseler, 2008). Im Gegensatz dazu belegen die in dieser Arbeit gezeigten Daten, dass eine Erhöhung der bakteriellen Infektionsdosis die Effektivität der IDO als antimikrobiellen Effektormechanismus nicht negativ beeinflusst.

Um zu überprüfen, ob die im Modell mit humanen Glioblastomzellen gewonnenen Ergebnisse eine breitere Gültigkeit besitzen, wurden die Experimente ebenfalls mit humanen, nativen HFF-Zellen durchgeführt. Da es sich bei den HFF-Zellen um Bindegewebszellen handelt,

kann aber auch eine Analogie zur Meningitis hergestellt werden, da es sich hierbei um eine Infektion der bindegewebigen *Leptomeninges* (weiche Hirnhaut) handelt.

Schon im Jahr 1984 zeigten Pfefferkorn *et al.*, dass eine IFN- $\gamma$  vermittelteIDO-Aktivität in Fibroblasten das Wachstum des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii in vitro* hemmen kann (Pfefferkorn *et al.*, 1984; Dai *et al.*, 1994). Das Infektionsmodell mit der Hirntumorzelllinie 86HG39 und *Toxoplasma gondii* wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls reproduziert, da eine Toxoplasmen-Enzephalitis bei Patienten unter Immunsuppression eine häufige opportunistische Infektion darstellt. Besonders hervorzuheben ist, dass durch eine endogene Reinfektion die Toxoplasmose die meisten ZNS-Infektionen von AIDS-Patienten ausmacht.

Eine Toxoplasmen-Infektion ist jedoch nicht nur für AIDS-Patienten gefährlich. Auch eine maternale Primärinfektion in der Schwangerschaft kann schwerste Infektionen und Schädigungen des Feten, welche durch eine Enzephalitis mit konsekutivem Hydrozephalus, Chorioretinitis und intrazerebralen Verkalkungen hervorgerufen werden, verursachen (Herold *et al.*, 2008; Gleixner *et al.*, 2009). Hierbei ist der Aspekt der Immunsuppression interessant, da man die Schwangerschaft als eine Art Schwächephase des Immunsystems beschreiben kann. Die spezifische, zelluläre Abwehr wird durch hormonelle Veränderungen während der Gravidität geschwächt, sodass der Körper von bestimmten Erregern leichter infiziert werden kann (Hof *et al.*, 2005). Zudem ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass Erkrankungen wie Malaria oder Hepatitis E meist viel schwerer verlaufen (Hof *et al.*, 2005).

Durch die Induzierbarkeit derIDO in der Hirntumorzelllinie 86HG39 *in vitro* ist es vorstellbar, dass native Gehirnzellen (Astrozyten) *in vivo* ebenfalls einenIDO-induzierten antimikrobiellen Effekt vermitteln können, um so mittels einer Tryptophan-Depletion Pathogene abzuwehren und das Gehirn vor invasiven Infektionen zu schützen. Hierbei ist anzufügen, dass die hier verwendeten Glioblastomzellen immunhistochemisch GFAP (*glial fibrillary acidic protein* [saures Gliafaserprotein]) positiv sind und so einen astrozytären Ursprung haben (Velasco *et al.*, 1980). In der Diagnostik gelingt so meist die Differenzierung von Hirnmetastasen. Die Hypothese der Übertragbarkeit der *in vitro* Daten auf die *in vivo* Situation wird zusätzlich von der oben genannten Tatsache unterstützt, dass Mikroglia, Astrozyten, Neuronen und Hirnendothelien des ZNS ebenfalls in der Lage sind eineIDO-Aktivität auszubilden, um so wahrscheinlich infektiöse Agentien unschädlich zu machen. Mit den genannten Zellen wurden jedoch bis dato keine Daten überIDO-vermittelte antimikrobielle Effekte veröffentlicht.

Zu den immunregulatorischen Fähigkeiten derIDO innerhalb des ZNS ist anzuführen, dass *in vivo* Experimente in der Maus vorliegen, die zeigen, dass während einer Entzündung des ZNS in Form einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) dieIDO-Expression und -Aktivität durch Mikroglia des ZNS induziert wird. Eine pharmakologische Inhibition derIDO führt hierbei zu einer Progression der T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankung (Kwidzinski *et al.*, 2005).

#### **4.2. Humanes Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1): Blockade antimikrobieller Effekte durch Hemmung derIDO-Aktivität,IDO-Protein- und -mRNA-Expression**

In der vorliegenden Arbeit wurden die durch IFN- $\gamma$  beziehungsweiseIDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte anhand von zwei Zelllinien untersucht. Primär wurden Experimente mit der Astrozytomzelllinie 86HG39 reproduziert und durchgeführt. Um eine breitere Gültigkeit der Daten ableiten zu können, wurden fast alle Experimente auch mit der humanen, nativen HFF-Zelle gezeigt.

In dieser Dissertation steht das hHSV-1 als virales Pathogen im Mittelpunkt. Wie in der Einleitung dieser Arbeit ausführlich beschrieben und von anderen Herpesviren ebenfalls bekannt, liegt eine hohe Durchseuchungsrate in der Population zwischen 80 – 90 % vor. Aber auch für *Toxoplasma gondii* geht man von einer lebensalterabhängigen Seroprävalenz von bis zu 70 % in Europa aus. Bei immunkompromittierten Patienten können schwerwiegende Krankheitsverläufe entstehen, wenn die persistierenden Erreger reaktiviert werden.

Bezogen auf die Immunsuppression kann die Phase der Schwangerschaft aus immunologischer Sicht als Beispiel genannt werden (Hof *et al.*, 2005). Der Fetus kann während der Gravidität fatal infiziert werden. Beide Pathogene gehören zu den sog. STORCH-Erregern. Dazu gehören der Syphilis-Erreger *Treponema pallidum*, T*oxoplasma gondii*, andere (engl. O*thers*) Pathogene, wie  $\beta$ -Streptokokken oder Ringelröteln, das Rötel (Rubella)-, Cytomegalie- und Herpes simplex Virus, aber auch das Hepatitis B-/ C- oder HI-Virus (Bühling *et al.*, 2009). Den genannten Erregern und deren verursachte konnatale Infektion ist gemein, dass sie während der Schwangerschaft von der infizierten Mutter auf den Fetus übertragen werden und schwerwiegende, zum Teil letale, Erkrankungen hervorrufen können. Die schwersten Infektionen, die durch hHSV-1 oder *Toxoplasma gondii* verursacht werden können, sind meist die, die das Zentrale Nervensystem beispielsweise in Form einer Enzephalitis oder Meningo-Enzephalitis betreffen. Aufgrund der klinischen Relevanz wurde

in dieser Dissertation ein Meningo-Enzephalitis-Modellsystem mit humanen Gehirntumorzellen (86HG39) etabliert.

Entscheidend für die Ergebnisse dieser Arbeit ist die Tatsache, dass sowohl hHSV-1, als auch *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus agalactiae* und *Staphylococcus aureus* Tryptophan-auxotroph sind und somit mit einem gehemmten Wachstum auf den IFN- $\gamma$  vermittelten und IDO-induzierten Tryptophanabbau reagieren. In den vergangenen Jahren konnten Adams *et al.* zeigen, dass die Replikation von hHSV-1 bei einer geringen Viruskonzentration (MOI) in 86HG39 Zellen, durch die IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Aktivität gehemmt wird (Adams *et al.*, 2004 A). Aber auch die Replikation von HSV-2, CMV, Masernvirus, Vacciniavirus und Hepatitis-B-Virus kann durch die IDO inhibiert werden (Bodaghi *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2004 B; Obojes *et al.*, 2005; Terajima *et al.*, 2005; Mao *et al.*, 2011). Aber nicht nur die Replikation von Viren wird durch die IDO beeinflusst. Schon 1984 zeigten Pfefferkorn *et al.*, dass eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität in Fibroblasten das Wachstum des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii in vitro* hemmen kann (Pfefferkorn *et al.*, 1984; Dai *et al.*, 1994). In den letzten 20 Jahren konnte diese Proliferationshemmung auch in weiteren Zelllinien, wie Endothel-, Epithel-, retinalen Pigmentepithelzellen und Astrozyten gezeigt werden (Däubener *et al.*, 1993; Nagineni *et al.*, 1996; Däubener *et al.*, 1999; Däubener *et al.*, 2001; Oberdörfer *et al.*, 2003). Zudem hat der IDO-vermittelte Tryptophanabbau eine proliferationshemmende Wirkung gegenüber verschiedenen *Chlamydien*-Stämmen (Byrne *et al.*, 1986, Beatty *et al.*, 1994; Nettelbreker *et al.*, 1998; Pantoja *et al.*, 2000; Roshick *et al.*, 2006), B-Streptokokken (MacKenzie *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001) und Enterokokken (Däubener *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 1999). Der IDO-vermittelte antiparasitäre Effekt konnte auch gegenüber anderen Parasiten, wie *Neospora caninum* (Spekker *et al.*, 2009), *Plasmodium falciparum* (Hunt *et al.*, 2006), Trypanosomen (Vincendeau *et al.*, 1999; Knubel *et al.*, 2010), *Leishmania donovani* (Murray *et al.*, 1985) und *Schistosoma mansoni* (Esparza *et al.*, 1987) gezeigt werden.

Die zu untersuchenden Zellen (Astrozytomzellen oder Fibroblasten) wurden in dieser Arbeit mit verschiedenen Konzentrationen IFN- $\gamma$  stimuliert und dann jeweils uninfiziert belassen oder mit verschiedenen Virusdosen des humanen Herpes simplex Virus Typ 1 (hHSV-1) infiziert. Heseler zeigte, dass der IFN- $\gamma$  vermittelte antivirale Effekt von der hHSV-1 Infektionsdosis abhängt (Heseler, 2008). Demnach ist der IFN- $\gamma$  induzierte antivirale Effekt bei einer höheren Infektionsdosis (MOI 1,5) nicht so effektiv ist, wie bei einer niedrigeren Infektionsdosis (MOI 0,15). Dieser Zusammenhang konnte auch für eine andere Herpes-Infektion und zwar durch hCMV gezeigt werden (Heseler, 2008). Eine mögliche Erklärung

dafür ist, dass HSV-1 „Immune Escape“ Mechanismen entwickelt hat, die eine Aktivierung von IFN- $\gamma$  vermittelten Signalen inhibiert. In der Literatur finden sich einige Daten zu einer Interaktion von hHSV-1 mit dem IFN-Signalweg. Eine hHSV-1 Infektion führt zu einer Reduktion der Expression von STAT1 (*signal transducers and activators of transcription*), STAT2 und JAK1 (Januskinase 1) (Wiertz *et al.*, 2007). Zudem kommt es zu einer Hemmung der Phosphorylierung von STAT1, STAT2, JAK1, JAK2 und TYK2 (Tyrosinkinase 2), dadurch können die durch Typ 1 und 2 Interferon induzierten Gene nicht exprimiert werden (Yokota *et al.* 2001). Durch eine HSV-1 Infektion kommt es zusätzlich zu der Expression von SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling 3*), was ebenfalls eine Hemmung des JAK-STAT-Signalweg zur Folge hat und eine effiziente Replikation des HSV-1 bewirkt (Yokota *et al.*, 2004). Eisemann *et al.* zeigten, dass eine Infektion mit HSV-1 die Expression des IFN- $\gamma$  Rezeptors, die STAT1-Phosphorylierung und die Expression von IRF-1 supprimiert (Eisemann *et al.*, 2007). Insgesamt wird deutlich, dass HSV-1 an multiplen Stellen den IFN- $\gamma$ , aber auch den IFN- $\alpha$ /  $\beta$  Signalweg inhibiert (Chee *et al.*, 2004; Melroe *et al.*, 2004; Paladino *et al.*, 2009; Johnson *et al.*, 2010).

Das hHSV-1 ist nicht das einzige Virus, das mit dem JAK-STAT-Signaltransduktionsweg interagiert, sondern dieser inhibitorische Effekt ist in der wissenschaftlichen Literatur von verschiedenen Viren bekannt. Das humane Cytomegalievirus (CMV [= Humanes Herpesvirus 5]) induziert zum einen den Abbau der JAK1 und es kommt zu einer Reduktion der Expression der JAK1 (Miller *et al.*, 1998; Vossen *et al.*, 2002). Zum anderen kann eine hCMV-Infektion zur Aktivierung einer ubiquitär vorkommenden Tyrosin-Phosphatase, der SHP2 (*src homology region 2 domain-containing phosphatase 2*) führen. Dieses Enzym kann STAT1 dephosphorylieren (Wu *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2008). Das *immediate-early Protein* BZLF1 des Epstein-Barr-Virus (EBV [= Humanes Herpesvirus 4]) führt ebenfalls zur einer Hemmung der IFN- $\gamma$  induzierten STAT1-Phosphorylierung und -Translokation in den Nukleus. Außerdem inhibiert es die Expression des IFN- $\gamma$  Rezeptors (Morrison *et al.*, 2001). Das Varizella-Zoster-Virus (VZV [= Humanes Herpesvirus 3]) inhibiert die Expression von JAK2 und STAT1 $\alpha$  (Abendroth *et al.*, 2001).

Nicht nur Herpesviren haben einen Einfluss auf den JAK-STAT-Pathway. Das C-Protein des Sendai-Virus verhindert die STAT1-Synthese und vermittelt die Degradation von STAT1 durch das Proteasom (Garcin *et al.*, 2000). Das Masern-Virus verfügt ebenfalls über ein C-Protein, welches an das phosphorylierte STAT1 bindet und so die Dimer-Bildung verhindert (Yokota *et al.*, 2011). Das V-Protein des Nipah-Virus hemmt die nukleäre Translokation von STAT1 und STAT2 (Rodriguez *et al.*, 2002). Das V-Protein des Mumps-Virus induziert eine

Degradation von STAT1 und STAT3 (Fujii *et al.*, 2004). Ein Flavivirus des Tick-borne-Enzephalitis-Komplexes, welches eine Enzephalitis, Meningitis oder hämorrhagisches Fieber verursachen kann, ist fähig die JAK1-Phosphorylierung zu verhindern (Best *et al.*, 2005). Das Chikungunya-Virus führt zu einer Hemmung der STAT1-Phosphorylierung und/ oder STAT-Translokation in den Nukleus und so zur Inhibition der IFN- $\alpha$ /  $\beta$  und IFN- $\gamma$  Signalwegs (Fros *et al.*, 2010). Bezogen auf die vorliegende Arbeit kann man davon ausgehen, dass das hHSV-1 die oben geschilderten Effekte auf der Signaltransduktionsebene vermittelt und so für die verminderte IDO-Expression und Inhibition, der durch sie vermittelten Effekte, verantwortlich ist.

Es wurden jedoch auch hemmende Mechanismen auf den JAK-STAT-Weg von bakteriellen und parasitären Erregern entdeckt. So kann *Mykobakterium avium* die Expression des IFN- $\gamma$  Rezeptors herunterregulieren und führt zu einer reduzierten Phosphorylierung der  $\alpha$ -Unterheit des IFN- $\gamma$  Rezeptors, der JAK1, JAK2 und von STAT1 in Makrophagen (Hussain *et al.*, 1999). *Mykobakterium bovis* induziert die Bildung von SOCS1 und SOCS3 in murinen J774 Makrophagen. Der Cord-Faktor (Trehalose-6,6'-Dimykolat) von *Mykobakterium tuberculosis* vermittelt die Expression von SOCS und hemmt die Phosphorylierung von STAT1 (Imai *et al.*, 2003). Auch Leishmanien können den JAK-STAT-Weg in Makrophagen inhibieren (Bhardwaj *et al.*, 2005). *Ehrlichia chaffeensis*, ein obligat intrazelluläres Bakterium in humanen Monozyten oder Makrophagen, kann die IFN- $\gamma$  vermittelte JAK- und STAT-Phosphorylierung verhindern (Lee *et al.*, 1998). Bei den geschilderten Effekten wird insgesamt deutlich, dass eine Hemmung des JAK-STAT-Signaltransduktionsweges ein typisches Vorgehen eines Pathogens in der Natur zu sein scheint und nicht nur auf eine virale Spezies zurückzuführen ist.

Die in der Literatur beschriebenen durch hHSV-1 induzierten, inhibitorischen, zellulären Effekte können helfen die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zu verstehen. In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass die IFN- $\gamma$  induzierte IDO-Aktivität, IDO-Protein- und IDO-mRNA-Expression durch eine möglichst zeitnah erfolgte hHSV-1 Infektion inhibiert werden kann. Damit hemmt hHSV-1 also nicht nur das Enzym selbst, sondern verhindert auch die Bildung des Proteins. Dieser inhibitorische Effekt ist von der eingesetzten Infektionsdosis abhängig, das heißt je höher die Virusdosis, desto geringer sind die IDO-Aktivität oder Proteinexpression. Zudem ist dieser Zusammenhang von einer Tumorzelle auf eine native Fibroblasten Zelllinie übertragbar, was ein Zeichen für die breitere Gültigkeit des analysierten Effektes ist. In einem Experiment (Vgl. Abb. 3.18. und 3.19.), in dem eine Hemmung der IDO-Aktivität durch hHSV-1 induziert wurde, wurde eine zusätzliche Kontrolle mit einem

hHSV-1 durchgeführt, welches vor der Infektion mit UV-Strahlen inaktiviert wurde. Das UV-inaktivierte hHSV-1 konnte die IDO-Aktivität nicht inhibieren. Zusammenfassend ist also hervorzuheben, dass nur replikationsfähiges HSV-1 den korrekten Ablauf der JAK-STAT-Signaltransduktionskaskade (siehe 1.1.1. und Abb. 1.1) hemmt. Die Inhibition der IDO-Expression führt auch zu einer Hemmung der IDO-vermittelten antimikrobiellen Effektormechanismen. So zeigt diese Arbeit, dass eine hHSV-1 Infektion eine Aufhebung der IDO-vermittelten antibakteriellen und antiparasitären Effekte verursacht, sodass die Erreger, wie *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* und *Toxoplasma gondii* wieder proliferieren können. Dabei konnte der antibakterielle Effekt in den verschiedenen Experimenten deutlich antagonisiert werden, der antiparasitäre Effekt jedoch nicht vollständig. In der Literatur wurde bereits veröffentlicht, dass für die Restriktion der Replikation von *Toxoplasma gondii* der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg und die dadurch induzierte IDO-Aktivität entscheidend sind (Cerávolo *et al.*, 1999). Somit würde eine Blockade dieser Signalkaskade theoretisch zur kompletten Aufhebung des antiparasitären IDO-Effektes führen. Da aber durch die hHSV-1 Infektion nicht die vollständige Proliferation, verglichen mit unstimulierten und uninfizierten Kontrollen, erreicht wird, muss hHSV-1 in höheren Konzentrationen weitere Effekte vermitteln, die womöglich einen negativen Einfluss auf die Zellen zur Folge haben. Dies könnte durch den von hHSV-1 ausgelösten selektiven *host shutoff*, der Repression der Synthese von diversen Proteinen erklärt werden (Laurent *et al.*, 1998). Dieser Effekt wird durch das Protein UL41, auch VHS (*Virion host shutoff*) Protein genannt, ausgelöst (Matis *et al.*, 2001). Es wäre denkbar, dass durch die verringerte Proteinbiosynthese essentielle Proteine für *Toxoplasma gondii* weniger gebildet werden. So könnte der obligat intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* in seinem Wachstum leicht eingeschränkt sein. Für die Analyse dieser Hypothese müssten weitere Daten erhoben werden, die belegen, dass UL41 für *Toxoplasma gondii* inhibitorische Effekte vermitteln kann. Dabei ist es möglich dass durch den „shut off“ der Proteinbiosynthese in der Wirtszelle essentielle Proteine für *Toxoplasma gondii* nicht mehr gebildet werden, ferner könnte auch die Proteinbiosynthese von intrazellulären Toxoplasmen UL41-abhängig gehemmt werden. Zur Überprüfung des Wirkmechanismus wäre es sinnvoll UL41-negative Mutanten von hHSV-1 zu verwenden. Die Hypothese zu dem direkten Einfluss von hHSV-1 Genen auf *Toxoplasma gondii* ist bis dato nicht untersucht worden.

Die Daten zur Interaktion von HSV mit der Abwehr gegen Mikroorganismen wurden in einem *in vitro* Infektionsmodell gewonnen und könnten dabei helfen klinische Beobachtungen *in vivo* zu verstehen und zu erklären. Es ist aus der Humanmedizin bekannt, dass

beispielsweise eine Infektion mit dem Masern-Virus zu einer Reaktivierung einer latenten Tuberkulose führen kann, so dass früher Masern als „Schrittmacher der Tuberkulose“ bezeichnet wurden (Klein, 1927). Zudem kann eine Immunsuppression oder ein Zustand der Immunkompromittierung durch zum Beispiel AIDS zur Reaktivierung und/ oder Koinfektion von HSV-1 oder *Toxoplasma gondii* führen (Lloyd, 1996; He *et al.*, 2011). Außerdem sind bakterielle Infektionen oder Superinfektionen möglich (Herold *et al.*, 2008). Dies hat schwere Krankheitsbilder wie Meningo-Enzephalitiden, generalisierte Infektionen oder Koinfektionen zur Folge. In der Literatur sind weitere Daten veröffentlicht, die vermuten lassen, dass eine HSV-1 Infektion eine bakterielle oder parasitäre Infektion begünstigen kann. Farber *et al.* erkannten, dass Zellen, die mit Herpesviren wie HSV-1 oder -2 infiziert waren, eine erhöhte zelluläre Adhärenz von Streptokokken der Gruppe A ermöglichten. Dies könnte ein stark erhöhtes Risiko einer bakteriellen Superinfektion zur Folge haben (Farber *et al.*, 1983). Prandota berichtete darüber, dass eine Mollaret-Meningitis, die vor allem durch HSV-2, aber auch durch HSV-1, ausgelöst werden kann, eine Reaktivierung einer latenten zerebralen Toxoplasmose verursachen kann (Prandota, 2009). Zudem ist vorstellbar, dass es im Falle einer Immunsuppression zu einer hHSV-1 Reaktivierung mit einer HSV-1 Enzephalitis kommen könnte, die im Weiteren eine latente Toxoplasmose verursacht und so zu einer Enzephalitis-Koinfektion führt. Hierfür konnten jedoch keine Daten in der Literatur gefunden werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass eine HSV-1 Infektion oder Reaktivierung eine bakterielle Infektion mit *Streptococcus agalactiae* oder *Staphylococcus aureus* begünstigen und so das Risiko eine Meningo-Enzephalitis-Koinfektion erhöhen könnte. Zudem besteht das Risiko, dass das hHSV-1 eine Infektion mit Toxoplasmen oder eine Reaktivierung von *Toxoplasma gondii* begünstigen und dadurch eine Enzephalitis-Koinfektion verursachen könnte. Dies stellt besonders für Immunkompromittierte oder Patienten unter Immunsuppression ein signifikantes klinisches Problem dar. In diesen Fällen müsste einer prophylaktischen Aciclovir-Therapie gegen hHSV-1 ein hoher Stellenwert beigemessen werden, um eine hHSV-1 Infektion und damit das Risiko an einer Toxoplasmose oder verschiedenen bakteriellen Erkrankungen zu verhindern. Noch effektiver wäre jedoch eine Impfung gegen das virale Pathogen, um die Primärinfektion und die konsekutive lebenslange Persistenz und damit das Risiko der Reaktivierung abzuwehren. Ein protektiver Impfstoff gegen Herpes simplex Viren konnte jedoch bis dato nicht hergestellt werden (Kern *et al.*, 1964; Mertz *et al.*, 1990; Straus *et al.* 1994; Whitley *et al.*, 2002).

### 4.3. hHSV-1 in der Immunregulation und den Einfluss auf dieIDO-vermittelten immunregulatorischen Effekte

Wie unter 4.2. beschrieben und diskutiert, kann hHSV-1 an verschiedenen Stellen der JAK-STAT-Signalkaskade inhibitorisch wirken und dadurch einen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  induzierten Wirkungen nehmen. Hieraus ergibt sich der dosisabhängige Einfluss von hHSV-1 auf die durch IFN- $\gamma$  induzierten, IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte. In diesem Kontext wurde von unserer Arbeitsgruppe bereits der hemmende Einfluss des humanen Cytomegalievirus (hCMV), welches ebenfalls zu der Familie der Herpesviren gehört, auf den JAK-STAT-Signaltransduktionsweg und auf die IDO-vermittelten Effekte beschrieben. Ebenfalls wurde der Einfluss von hCMV auf die Immunregulation analysiert und zum ersten Mal gezeigt, dass eine hCMV-Infektion von humanen Zellen die IFN- $\gamma$  induzierte und IDO-vermittelte T-Zell Toleranzinduktion komplett aufheben kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Experimentalansatz der Einfluss von hHSV-1 auf die Immunregulation untersucht (Vgl. Abb. 3.33.). Wie bereits bekannt, beeinflusst das hHSV-1 die spezifische Immunantwort an verschiedenen Stellen. Dies ist oft bei Viren zu erkennen, die wie die Herpesviren eine Immunevasion als Schutz vor dem humanen Immunsystem durchführen. Das ICP (*infected cell protein*) 47 von HSV-1 hemmt TAP (*Transporter associated with antigen processing*) an seiner zytosolischen Seite, dadurch wird der Peptid-Import in das endoplasmatische Retikulum (ER) verhindert und es kommt zudem zu einer Akkumulation der MHC I-Molekülen im ER (Hill *et al.*, 1994; Tomazin *et al.*, 1996; Neumann *et al.*, 1997). Es findet eine Hemmung der MHC (*major histocompatibility complex*) I-Antigenpräsentation statt und damit wird die Erkennung der HSV-1 infizierten Zelle durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen verhindert (Ahn *et al.*, 1996; Goldsmith *et al.*, 1998). Eine Hemmung der MHC II-Antigenpräsentation kann durch die Produkte der Gene UL41 und  $\gamma$ 134.5 induziert werden (Trgovcich *et al.*, 2002). Eine HSV-1 Infektion der antigenpräsentierenden, reifen Dendritischen Zellen (DZ) führt zu einer spezifischen Degradation von CD83, welches bei der Reifung der DZ vermehrt auf deren Zelloberfläche exprimiert wird. Das ICP0, ein *Immediate-early-Protein* des HSV-1, vermittelt diesen Effekt, der in einer verminderten T-Zell Stimulation mündet (Kruse *et al.*, 2000; Kobelt *et al.*, 2003; Kummer *et al.*, 2007). Zudem wird die Expression von CCR7 auf reifen DZ durch HSV-1 reduziert. Dadurch werden die DZ in ihrer durch Chemokine vermittelten Migrationsfähigkeit stark eingeschränkt, sodass sie nicht mehr die antivirale Immunantwort in den Lymphknoten vermitteln können (Prechtel *et al.*, 2005). HSV-1 verfügt über eine weitere

Immunevasionsstrategie, indem es sich durch die Hemmung der Expression von CD1d den natürlichen Killer-T-Zellen entzieht (Yuan *et al.*, 2006).

Das hHSV-1 kann somit, wie andere Herpesviren, verschiedene Effekte im Immunsystem induzieren, die eine spezifische Immunantwort beeinflussen. HSV-1 kann aber auch eine apoptotische Wirkung auf PBL (periphere Blutlymphozyten) haben. Für das Sendai-Virus und hHSV-1 wurde bereits 1995 gezeigt, dass es in humanen mononukleären Blutzellen Apoptose verursachen kann (Tropea *et al.*, 1995). Auch in peripheren CD4-Helfer-T-Lymphozyten kann HSV-1 Apoptose auslösen und so eine Immunsuppression und Lymphozytopenie vermitteln (Ito *et al.*, 1997). Zudem kann HSV-1 Apoptose in unreifen DZ induzieren und so eine antivirale Immunantwort verhindern (Kather *et al.*, 2010). Eine Infektion mit HSV-1 muss jedoch nicht grundsätzlich zum Zelltod von peripheren mononukleären Blutzellen führen, da diese Zellen, wenn sie mit HSV-1 infiziert sind, eine signifikante Hochregulation von CD54 und MHC-I auf den nicht-infizierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen induzieren. Dieser Zusammenhang wird als *in vitro* Modell für das HSV-1 induzierte *Erythema exsudativum multiforme* benutzt (Larcher *et al.*, 2001).

Die Apoptoseinduktion von HSV-1 in peripheren Blutzellen könnte aber die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse unter 3.2.6. erklären. Auffallend ist, dass in allen Gruppen, in denen HSV-1 zugegeben war, eine deutliche Hemmung des T-Zell Wachstums festgestellt wurde. Damit konnte in diesen Experimenten nicht analysiert werden, ob eine HSV-1 Infektion die IFN- $\gamma$  bzw.IDO-vermittelte Proliferationshemmung der PBL aufheben kann. Dies könnte bedeuten, dass hHSV-1 eine T-Zell Apoptose ausgelöst und so eine T-Zell Proliferation verhindert hat. Ob das eventuelle Auslösen der Apoptose von der verwendeten Virusdosis abhängt, kann abschließend nicht gesagt werden, da diesbezüglich keine Daten in der Literatur existieren. In den Experimenten in dieser Arbeit wurde eine hHSV-1 MOI von 6 eingesetzt. Es wäre jedoch denkbar, dass eine geringere MOI keinen Zelltod verursacht. Zusätzlich könnten Experimente durchgeführt werden, die zeigen, ob die PBL noch vital sind oder Apoptose begangen haben. Man könnte eine Lebendfärbung der PBL durchführen oder entsprechende Apoptosemarker mittels FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*) überprüfen. In diesem Kontext gibt es sicherlich noch Raum für weitere, zukünftige Forschungsansätze.

Nach meinen bisherigen Ergebnissen hat das HSV-1 im Gegensatz zu CMV anscheinend eine apoptotische Wirkung auf die PBL. Auch dadurch könnte das HSV-1 eine immunsuppressive Wirkung vermitteln und so das Risiko für weitere Erkrankungen oder Koinfektionen erhöhen.

Tatsächlich tritt eine hHSV-1 Infektion oder Reaktivierung in 50 % der Fälle 2 bis 5 Wochen nach einer Organtransplantation und konsekutiver Immunsuppression auf. Zudem gehört eine HSV-1 Infektion, wie die HSV-1 Enzephalitis, zum Kreis der opportunistischen Infektionen, die im Falle einer Immunkompromittierung und Immunsuppression auftreten können. Außerdem scheint HSV-1 die Abstoßung eines Cornea-Grafts zu induzieren, wenn das Virus mit dem Transplantat übertragen wurde (De Kesel *et al.*, 2001). Hierzu gibt es ein interessantes Experiment von Beutelspacher *et al.*, das die immunologische Funktion der IDO bei einer Cornea-Transplantation beschreibt. Es wurde beobachtet, dass eine Überexpression der IDO in Allograft-Cornea-Transplantaten zu einem signifikant längeren Allograftüberleben und somit zur Transplantat-Toleranz führt. Allogene Cornea-Transplantate mit einer geringen IDO-Expression führten dagegen schnell zu einer Abstoßungsreaktion. Die IDO kann in diesem Zusammenhang zum einen eine Suppression der aktivierten CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen, also der lokalen Immunantwort induzieren. Zum anderen wird durch die Tryptophan-Depletion ein systemischer Toleranzeffekt vermittelt, da am kontralateralen Auge zeitgleich transplantierte Cornea-Allograft ohne IDO-Expression länger vom Immunsystem angenommen werden (Beutelspacher *et al.*, 2006; Ryu *et al.*, 2007). Ähnliche Erkenntnisse machte man ebenfalls bei kardialen und pulmonalen Allograft-Transplantaten mit IDO-Expression (Liu *et al.*, 2006 A; Liu *et al.*, 2006 B; Liu *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Kombiniert man nun die Ergebnisse von De Kesel und Beutelspacher miteinander, könnte wiederum eine hHSV-1 Infektion zu einer IDO-Expressions-Inhibition und somit zu einem erhöhten Rejektionsrisiko führen. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen jedoch noch weitere Experimente folgen.

Weitere Daten zeigen, dass bei der Transplantation von soliden, parenchymatösen Organen (z. B. Lunge, Leber, Nieren) die HSV-1 Reaktivierung bei den Organempfängern häufiger vorkommt, mehr invasive Infektionen auftreten, die zudem mehr Zeit für eine Heilung benötigen und ein höheres Disseminations-Risiko besitzen, als in immunkompetenten Patienten. Aus diesem Grund sollte eine prophylaktische Aciclovir-Therapie, die eine HSV-1 Infektion und Reaktivierung verhindert, eingesetzt werden (Smyth *et al.*, 1990; Slifkin *et al.*, 2004). Diese Daten sind zudem auf ein weiteres Herpesvirus, und zwar auf das CMV, übertragbar. Vor einer Organtransplantation sollte ebenfalls eine prophylaktische Therapie gegen CMV eingeleitet werden (Slifkin *et al.*, 2004). Im Falle einer CMV-Infektion oder -Reaktivierung nach einer Nierentransplantation unter Immunsuppression ist jedoch, verglichen mit einer HSV-1 Infektion nach Organtransplantation, die Morbidität und Mortalität signifikant erhöht (De Keyzer *et al.*, 2011).

Wie in dieser Dissertation bereits geschildert, kann die IDO immunregulatorische Effekte vermitteln und ist durch die immunsuppressive Wirkung ein therapeutisches *Target*, um eine längere Transplantat-Toleranz zu erreichen (Quan *et al.*, 2008, Mulley *et al.*, 2008). Zusätzlich gibt es Daten darüber, dass die IDO eine zentrale Rolle in der Immunmodulation spielt und eine Suppression einer *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) verursacht, was zu einem großen Interesse an der IDO innerhalb der Medizin führt (Jasperson *et al.*, 2008; Jasperson *et al.*, 2009). Zudem wurde in Untersuchungen mit verschiedenen Tumoren gezeigt, dass eine T-Zell Toleranz besteht, die mit der IDO-Expression in den Tumorzellen erklärt wird (Logan *et al.*, 2002; Pardoll, 2003; Uyttenhove *et al.*, 2003; Munn *et al.*, 2004). In einem Mausmodell konnte sogar gezeigt werden, dass eine IDO-Überexpression in Endometriumtumorzellen zu einer schnellen Tumorprogression führt (Yoshida *et al.*, 2008). Das genaue Verständnis der IDO-vermittelten Effektormechanismen könnte somit einen großen Fortschritt auf dem Gebiet der IDO-positiven Tumoren, aber auch in der Transplantationsmedizin bedeuten. Hierbei müsste jedoch eine selektive Methode gefunden werden, die IDO der Tumorzellen beispielsweise zu inhibieren, ansonsten wären sicherlich systemische Nebenwirkungen durch Hemmung der physiologischen IDO-Aktivität erwarten.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit einmal mehr, dass die IDO und ihre vermittelten Effekte, sowie der Einfluss von einem Pathogen auf diese, einen komplexen Teil der humanen Immunantwort darstellen.

Eine große humanmedizinische Relevanz *in vivo* besitzt die gewonnene Erkenntnis, dass eine hHSV-1 Infektion die IFN- $\gamma$  induzierten und IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte aufheben kann. Aber auch ein direkter inhibitorischer, apoptotischer Effekt des hHSV-1 auf T-Zellen könnte eine direkte immunsuppressive Wirkung vermitteln. Dies kann insbesondere im Falle einer Immunkompromittierung oder Immunsuppression zum Beispiel bei Organtransplantierten zu schweren Infektionen oder zu Koinfektionen führen.

## 5. Zusammenfassung

Infektiöse Enzephalitiden, Meningitiden oder Meningoenzephalitiden sind beim Menschen häufig auf Infektionen mit *Toxoplasma gondii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* oder Herpes simplex Virus Typ 1 zurückzuführen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Wachstum und Replikation dieser Erreger durch die Aktivierung des IFN- $\gamma$  induzierbaren und Tryptophan-abbauenden Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) kontrolliert wird. Die IDO verfügt über antimikrobielle Eigenschaften, die bereits in diversen Infektionsmodellen untersucht wurden. Im Rahmen dieser Dissertation sollte nun gezeigt werden, wie die Infektion mit dem humanen HSV-1 (hHSV-1) die Expression und Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase beeinflusst und ob dies zu einer Beeinträchtigung der IDO-vermittelten antimikrobiellen Abwehrmechanismen führt. Zur Analyse dieser Mechanismen wurde ein *in vitro* Modellsystem mit humanen Hirntumorzellen (86HG39 Zellen) und humanen, nativen Fibroblasten (HFF-Zellen) und den verschiedenen Erregern etabliert. Als Induktor der IDO wurde IFN- $\gamma$  verwendet.

Die Ergebnisse der Infektionsexperimente zeigen, dass eine Infektion mit hHSV-1 eine Hemmung der IDO-Expression und -Aktivität hervorruft. Daraus ergab sich, dass die verwendeten Zellen nicht mehr das Wachstum verschiedener Bakterienstämme und Parasiten unterbinden konnten.

Diese Daten der *in vitro* Infektionsmodelle könnten Beobachtungen *in vivo* erklären, wie Enzephalitiden oder Meningo-Enzephalitiden verursacht werden. Aus medizinischer Sicht wäre denkbar, dass eine hHSV-1 ZNS-Infektion andere schwerwiegende ZNS-Infektionen, wie eine bakterielle Meningitis oder parasitäre Enzephalitis begünstigt. Die durch hHSV-1 vermittelten, auf die IDO einwirkenden, inhibitorische Effekte könnten zudem im Falle von Immunsuppression bei organtransplantierten Patienten eine Verminderung der Organtoleranz hervorrufen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass bei der Transplantation von soliden, parenchymatösen Organen (z. B. Leber) eine hHSV-1 Reaktivierung bei den Organempfängern häufiger vorkommt, mehr invasive Infektionen verursacht, die zudem mehr Zeit für eine Heilung benötigen und ein höheres Disseminations-Risiko besitzen, als in immunkompetenten Patienten.

## 6. Summary

Infectious encephalitis, meningitis or meningoencephalitis in humans are often caused by pathogens including *Toxoplasma gondii*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* or herpes simplex virus Typ 1. In our research group we have shown that growth and replication of these agents is controlled by the activity of the IFN- $\gamma$ -inducible, tryptophan-degrading enzyme Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). IDO has antimicrobial properties which have already been analysed in different infection models. This doctoral thesis aims to show in which way the infection with human HSV-1 (hHSV-1) influences the expression and activity of IDO and if this leads to a negative effect on IDO-mediated antimicrobial defence mechanisms. For analysis of these mechanisms an *in vitro* model using human brain tumour cells (86HG39 cells), human native fibroblasts (HFF cells) and different pathogens was established. IFN- $\gamma$  was used to induce the IDO activity.

The results of the infection experiments show that hHSV-1 infection caused an inhibition of IDO expression and activity. As a result the infected cells were no longer capable of reducing the growth of different bacterial strains and parasites.

The data from the *in vitro* infection model could explain *in vivo* observations as to the pathophysiology encephalitis or meningoencephalitis. From the medical point of view it is possible that a hHSV-1 CNS infection may increase the likelihood of bacterial or parasitic CNS infections. The hHSV-1-mediated inhibition of IDO-induced immunosuppression could, in addition, result in a reduced graft tolerance in transplant patients. In this context it is well-known that during transplantation of solid organs (e. g. liver) reactivation of HSV-1 occurs more frequently, causes more invasive infections requiring for a greater convalescence time and have a higher risk of dissemination in comparison to immunocompetent patients.

## 7. Literaturverzeichnis

**Abendroth A. und Arvin A.M. (2001).** Immune evasion as a pathogenic mechanism of varicella zoster virus. *Immunology*; 13:27-39.

**Abu Khattab M., Al Soub H., Al Maslamani M., Al Khuwaiter J., El Deeb Y. (2009).** Herpes simplex virus type 2 (Mollaret's) meningitis: a case report. *Int J Infect Dis*; 13:e476-9.

**Adam R., Rüssing D., Adams O., Ailyati A., Sik Kim K., Schrotten H., Däubener W. (2005).** Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation. *Thromb Haemost*; 94:341–6.

**Adams O., Besken K., Oberdörfer C., MacKenzie C. R., Takikawa O., Däubener W. (2004 A).** Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol*; 78:2632–6.

**Adams O., Besken K., Oberdörfer C., MacKenzie C. R., Rüssing D., Däubener W. (2004 B).** Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect*; 6:806-12.

**Ahn, K., Meyer, T. H., Uebel, S., Sempe, P., Djaballah, H., Yang, Y., Peterson, P. A., Fruh, K. und Tampe, R. (1996).** Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47. *EMBO J*; 15: 3247-3255.

**Alberati-Giani D., Ricciardi-Castagnoli P., Kohler C., Cesura A. M. (1996).** Regulation of the kynurenine metabolic pathway by interferon-gamma in murine cloned macrophages and microglial cells. *J Neurochem*; 66: 996-1004.

**Alexander A. M., Crawford M., Bertera S., Rudert W. A., Takikawa O., Robbins P. D., Trucco M. (2002).** Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes*; 51:356–365.

**Babcock T. A., Carlin J. M. (2000).** Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*; 12:588–94.

**Bach E. A., Aguet M., Schreiber R. D. (1997).** The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokinereceptor signaling. *Annu Rev Immunol*; 15:563-591.

**Ball H. J., Sanchez-Perez A., Weiser S., Austin C. J., Astelbauer F., Miu J., McQuillan J. A., Stocker R., Jermiin L. S., Hunt N. H. (2007).** Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*; 396:203–13.

**Ball H. J., Yuasa H. J., Austin C. J., Weiser S., Hunt N. H. (2009).** Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*; 41:467-71.

- Ban F., Asano S., Ozawa S., Eda H., Norman J., Stroop W. G., Yanagil K. (2008).** Analysis of herpes simplex virus type 1 restriction fragment length polymorphism variants associated with herpes gladiatorum and Kaposi's varicelliform eruption in sumo wrestlers. *Journal of General Virology*; 89: 2410–2415
- Bancroft G. J., Schreiber R. D., Bosma G. C., Bosma M. J., and Unanue E. R. (1987).** A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J Immunol*; 139:1104 – 1107.
- Baron M., Davignon J. L. (2008).** Inhibition of IFN-gamma-induced STAT1 tyrosine phosphorylation by human CMV is mediated by SHP2. *J Immunol*; 181:5530–6.
- Beatty W. L., Morrison R. P., Byrne G. I. (1994).** Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*; 58:686–99.
- Behan W. M., McDonald M., Darlington L. G., Stone T. W. (1999).** Oxidative stress as a mechanism for quinolinic acid-induced hippocampal damage: protection by melatonin and deprenyl. *Br J Pharmacol*; 128:1754-60.
- Ben-Hur T., Cialic R., Itzik A., Yirmiya R., Weidenfeld J. (2001).** Acute effects of purified and UV-inactivated Herpes simplex virus type 1 on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinology*; 74:160-6.
- Benz C., Reusch U., Muranyi W., Brune W., Atalay R., Hengel H. (2001).** Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol*; 82:2061–70.
- Berardi A., Tzialla C., Riva M., Cerbo R. M., Creti R. (2007).** Group B streptococcus: early- and late-onset infections. *J Chemother*; 2:24–7.
- Berlit, P. (2007).** *Basiswissen Neurologie*, 5. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Berner R. (2003).** Infektionen durch Gruppe-B-Streptokokken in der Neonatalperiode. *Mschr Kinderheilk*; 151:373-83.
- Berner R. (2004).** Significance, management and prevention of Streptococcus agalactiae infection during the perinatal period. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 2:427–37.
- Bertazzo A., Ragazzi E., Biasiolo M., Costa C. V., Allegri G. (2001).** Enzyme activities involved in tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in rabbits. *Biochim Biophys Acta*; 1527:167-175.
- Best S. M., Morris K. L., Shannon J. G., Robertson S. J., Mitzel D. N., Park G. S., Boer E., Wolfenbarger J. B., Bloom M. E. (2005).** Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist. *J Virol*; 79:12828-39.
- Beutelspacher S. C., Pillai R., Watson M. P., Tan P. H., Tsang J., McClure M.O., George A. J., Larkin D. F. (2006).** Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol*; 36:690–700.

**Bhardwaj N., Rosas L. E., Lafuse W. P., Satoskar A. R. (2005).** Leishmania inhibits STAT1-mediated IFN-gamma signaling in macrophages: increased tyrosine phosphorylation of dominant negative STAT1beta by Leishmania mexicana. *Int J Parasitol.*; 35:75-82.

**Bilzer T., Stavrou D., Dahme E., Keiditsch E., Bürriig K. F., Anzil A. P., Wechsler W. (1991).** Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*; 418:281–93.

**Bodaghi B., Goureau O., Zipeto D., Laurent L., Virelizier J. L., Michelson S. (1999).** Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol*; 162:957–64.

**Boehm U., Klamp T., Groot M., Howard J. C. (1997).** Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*; 15:749–95.

**Bokarewa M. I., Jin T., Tarkowski A. (2006).** Staphylococcus aureus: Staphylokinase. *Int J Biochem Cell Biol*; 38:504–9.

**Boothroyd J. C., Dubremetz J.-F. (2008).** Kiss and spit: the dual roles of *Toxoplasma* rhoptries. *Nat Rev Microbiol*; 6:79-88.

**Botting N. P. (1995).** Chemistry and neurochemistry of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *Chem Soc Rev*; 24: 401-412.

**Brastianos H. C., Vottero E., Patrick B. O., et al. (2006).** Exiguamine A, an indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor isolated from the marine sponge *Neopetrosia exigua*. *J Am Chem Soc*; 128:16046–7.

**Braun R. W., Kirchner H., Munk K., et al. (1987).** *Herpes-simplex-Virus*. Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz: Verlag Kohlhammer GmbH.

**Brimil N., Barthell E., Heindricks U., Kuhn M., Luticken R., Spellerberg B. (2006).** Epidemiology of *Streptococcus agalactiae* colonization in Germany. *Int J Med Microb*; 296:39-44.

**Bromberger P., Lawrence J. M., Braun D., Saunders B., Contreras R., Petitti D. B. (2000).** The influence of intrapartum antibiotics on the clinical spectrum of early-onset Group B streptococcal infection in term infants. *Pediatrics*; 106:244-50.

**Bruyn G. W., Straathof L. J. A., Raymakers G. M. J. (1962).** Mollaret's meningitis differential diagnosis and diagnostic pitfalls. *Neurology*; 12:745-53.

**Bühling K. J., Friedmann W. (2009).** *Intensivkurs Gynäkologie und Geburtshilfe*; 2. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München.

**Burkin D. J., Kimbro K. S., Barr B. L., Jones C., Taylor M. W., Gupta S. L. (1993).** Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics*; 17:262–3.

**Byrne G. I., Lehmann L. K., Landry G. J. (1986).** Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun*; 53:347–51.

**Cady S. G., Sono M. (1991).** 1-Methyl-DL-tryptophan,  $\beta$ -(3-Benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and  $\beta$ -[3-Benzo(*b*)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Arch of Biochem Biophys*; 291:326-33.

**Cantin E, Tanamachi B, Openshaw H, Mann J, Clarke K. (1999).** Gamma interferon (IFN-gamma) receptor null-mutant mice are more susceptible to herpes simplex virus type 1 infection than IFN-gamma ligand null-mutant mice. *J Virol*; 73:5196-200.

**Carmena J., Macià Soler M., Cremades Mira A., Alcaraz Soriano M. J. (2004).** Herpes simplex 1 virus Mollaret meningitis. *Rev Clin Esp*; 204:418-9.

**Cebulla C. M., Miller D. M., Zhang Y., Rahill B. M., Zimmerman P., Robinson J. M., Sedmak D. D. (2002).** Human cytomegalovirus disrupts constitutive MHC class II expression. *J Immunol*; 169:167–76.

**Center for Emerging Infectious Diseases, University of Iowa College of Public Health:**

<http://www.public-health.uiowa.edu/CEID/Pathogen%20pages/GBStrep.html>

**Cerávolo I. P., Chaves A. C., Bonjardim C. A., Sibley D., Romanha A. J., Gazzinelli R. T. (1999).** Replication of *Toxoplasma gondii*, but not *Trypanosoma cruzi*, is regulated in human fibroblasts activated with gamma interferon: requirement of a functional JAK/STAT pathway. *Infect Immun*; 67:2233–40.

**Chee A. V., Roizman B. (2004).** Herpes Simplex Virus 1 Gene Products Occlude the Interferon Signaling Pathway at Multiple Sites. *Journal of Virology*; 78: 4185-4196.

**Chomczynski P., Sacchi N. (1987).** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156–9.

**Collins T., Korman A. J., Wake C. T., Boss J. M., Kappes D. J., Fiers W., Ault K. A., Gimbrone M. A. Jr., Strominger J. L., Pober J. S. (1984).** Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 81:4917–21.

**Cook C. H., Bickerstaff A. A., Wang J. J., Nadasdy T., Della Pelle P., Colvin R. B., Orosz C. G. (2008).** Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO. *J Immunol*; 180:3103–12.

**Currier A. R., Ziegler M. H., Riley M. M., Babcock T. A., Telbis V. P., Carlin J. M. (2000).** Tumor necrosis factor-alpha an lipopolysaccharide enhances interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *J Interferon Cytokine Res*; 20:369-76.

**Curti A., Pandolfi S., Valzasina B., Aluigi M., Isidori A., Ferri E., Salvestrini V., Bonanno G., Rutella S., Durelli I., Horenstein A. L., Fiore F., Massaia M., Colombo M.**

- P., Baccarani M., Lemoli R. M. (2007).** Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25<sup>-</sup> into CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Blood*; 109:2871–7.
- Däubener W., Pilz K., Seghrouchni Zennati S., Bilzer T., Fischer H. G., Hadding U. (1993).** Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol*; 43:31–8.
- Däubener W., Wanagat N., Pilz K., Seghrouchni S., Fischer H. G., Hadding U. (1994).** A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods*; 168:39–47.
- Däubener W., Remscheid C., Nockemann S., 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*; 26:487–92.
- Däubener W., MacKenzie C. R. (1999).** IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol*; 467:517-24.
- Däubener W., Hucke C., Seidel K., Hadding U., MacKenzie C. R. (1999).** Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infect Immun*; 67:5615–20.
- Däubener W., Posdziech V., Hadding U., MacKenzie C. R. (1999).** Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol*; 187:143–7.
- Däubener W., Spors B., Hucke C., Adam R., Stins M., Kim K. S., Schrotten H. (2001).** Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 69:6527–31.
- Dai W., Gupta S. L. (1990).** Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. Upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem*; 265:19871–7.
- Dai W., Pan H., Kwok O., Dubey J. P. (1994).** Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J Interferon Res*; 14:313–7.
- Daley-Yates P. T., Powell A. P., Smith L. L. (1988).** Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*; 96:222-32.
- Dalmau J., Gleichman A. J., Hughes E. G., et al. (2008).** Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*; 7:1091-98.
- Darnell J. E. Jr., Kerr I. M., Stark G. R. (1994).** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*; 264:1415-21.

**Deckert-Schlüter M., Rang A., Weiner D., Huang S., Wiestler O. D., Hof H., Schlüter D. (1996).** Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation. *Lab Invest*; 75:827–41.

**Degrandi D., Konermann C., Beuter-Gunia C., Kresse A., Würthner J., Kurig S., Beer S., Pfeffer K. (2007).** Extensive characterization of IFN-induced GTPases mGBP1 to mGBP10 involved in host defense. *J Immunol*; 179:7729–40.

**De Kesel R. J., Koppen C., Ieven M., Zeyen T. (2001).** Primary graft failure caused by herpes simplex virus type 1. *Cornea*; 20:187-90.

**De Keyzer K., Van Laecke S., Peeters P., Vanholder R. (2011).** Human Cytomegalovirus and Kidney Transplantation: A Clinician's Update. *Am J Kidney Dis*; 58:118-26.

**Department of Health and Human Services; Center for Disease Control and Prevention; Public Health Image Library (PHIL):** <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>

**Deutsches Kolonial-Lexikon (1920):** Band III, S. 30

**Dingermann T., Hänsel R., Zündorf I. (2002).** *Pharmazeutische Biologie*; 1. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

**Du M. X., Sotero-Esteva W. D., Taylor M. W. (2000).** Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res.*; 20:133-42.

**Dubey J. P. (2007).** *Toxoplasma gondii*. The model apicomplexan: perspectives and methods. Weiss LM, Kim K, editors. *Academic Press*.

**Eisemann J., Mühl-Zürbes P., Steinkasserer A., Kummer M. (2007).** Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 interferes with the interferon signaling pathway. *Immunobiology*; 212:877-86.

**Escalante C. R., Yie J., Thanos D., Aggarwal A. K. (1998).** Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation. *Nature*; 391:103–6.

**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.

**Eza D. E., Lucas S. B. (2006).** Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis. *HIV Med*; 7:415–20.

**Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. (2002).** T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*; 9:1069–77.

**Fallarino F., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Gizzi S., Asselin-Paturel C., Fioretti M. C., Trinchieri G., Grohmann U., Puccetti P. (2005).** Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol*; 17:1429–38.

**Farber P. A., Long W. K. (1983).** Adherence of streptococci to cells infected with herpesvirus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 55:463-9.

**Flückiger U., Trampuz A. (2001).** Pneumonia in the immune compromised host. *Ther Umsch*; 58:614–9.

**Flügge K., Siedler A., Heinrich B., et al. (2006).** Incidence and Clinical presentation of Invasive Neonatal Group B Streptococcal Infections in Germany. *Pediatrics*; 117:e1139-e49.

**Flynn J. L., Chan J., Triebold K. J., Dalton D. K., Stewart T. A., Bloom B. R. (1993).** An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.*; 178:2249–2254.

**FrontalCortex Online Courses:** <http://frontalcortex.com/?page=oll&topic=24&qid=164>

**Fros J. J., Liu W. J., Prow N. A., Geertsema C., Ligtenberg M., Vanlandingham D. L., Schnettler E., Vlak J. M., Suhrbier A., Khromykh A. A., Pijlman G. P. (2010).** Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol*; 84:10877-87.

**Fujii N., Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T. (2004).** Molecular mechanisms for suppression of interferon signal transduction pathways caused by viral infections. *Viruses*; 54:169-78.

**Frucht D. M., Fukao T., Bogdan C., Schindler H., O'Shea J. J., Koyasu S. (2001).** IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol*; 22:556–560.

**Früh K., Karlsson L., Yang Y. (1997).**  $\gamma$ -Interferon in antigen processing and presentation. In:  $\gamma$ -Interferon in Antiviral Defense, (Ed. Karupiah G.) Springer, Heidelberg, S. 39.

**Frumento G., Rotondo R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G. B. (2002).** Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*; 196:459–68.

**Fukao, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000).** Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol*; 164: 64-71.

**Garcin D., Curran J., Kolakofsky D. (2000).** Sendai virus C proteins must interact directly with cellular components to interfere with interferon action. *J Virol*; 74:8823-30.

**Gazzinelli R. T., Hieny S., Wynn T. A., Wolf S., Sher A. (1993).** Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 90:6115–9.

**Gemoll W. (1965).** *Griechisch-Deutsches Schul- und Handwörterbuch.* München/Wien.

**Gleixner C., Müller M., Wirth S. und Mitarbeiter (2009/10).** *Neurologie und Psychiatrie*; 7. Auflage. Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.

**Goldsmith K., Chen W., Johnson D. C., Hendricks R. L. (1998).** Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J Exp Med*; 187:341-8.

**Granucci F., Zanoni I., Pavelka N., Van Dommelen S. L., Andoniu C. E., Belardelli F., Degli Esposti M. A., and Ricciardi-Castagnoli P. (2004).** A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J Exp Med*; 200: 287–295.

**Grohmann U., Fallarino F., Puccetti P. (2003).** Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol*; 24:242-8.

**Guillemin G. J., Smythe G., Takikawa O., Brew B. J. (2005).** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*; 49:15–23.

**Gurtner G. J., Newberry R. D., Schloemann S. R., McDonald K. G., Stenson W. F. (2003).** Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology*; 125:1762–1773.

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

**Hahn H., Miksits K., Gatermann S. (2005).** *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*; 5. Auflage. Springer-Lehrbuch, Heidelberg.

**Hamada S., Vearncombe M., McGeer A., Shah P. S. (2008).** Neonatal group B streptococcal disease: incidence, presentation, and mortality. *J Matern Fetal Neonatal Med*; 21:53–7.

**Hansen A. M., Ball H. J., Mitchell A. J., Miu J., Takikawa O., Hunt N. H. (2004).** Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *Int J Parasitol*; 34:1309–19.

**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*; 268:5077–84.

**Havell E. A., Spitalny G. L., Patei P. J. (1982).** Enhanced production of murine interferon  $\gamma$  by T cells generated in response to bacterial infection. *J Exp Med*; 156:112.

**Hayaishi O., Hirata F., Fujiwara M., Senoh S., Tokuyama T. (1975).** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol*; 29:291–3.

**Hayashi T., Beck L., Rossetto C., Gong X., Takikawa O., Takabayashi K., Broide D. H., Carson D. A., Raz E. (2004).** Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*; 114:270–9.

**He N., Chen L., Lin H. J., Zhang M., Wei J., Yang J. H., Gabrio J., Rui B. L., Zhang Z. F., Fu Z. H., Ding Y. Y., Zhao G. M., Jiang Q. W., Detels R. (2011).** Multiple viral coinfections among HIV/AIDS patients in China. *Biosci Trends*; 5:1-9.

**Hellenbrand W., Thierfelder W., Müller-Pebody B., Hamouda O., Breuer T. (2005).** Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997-1998. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 24:131–5.

**Hermentin K., Aspöck H. (1987).** Higher yields and increased purity of in vitro grown *Toxoplasma gondii*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg*; 267:272–6.

**Herold G. und Mitarbeiter (2008).** *Innere Medizin*; Köln.

**Herrmann K. M., Zhao J.- M., Pinto J. E. B. P., Weaver L., Henstrand J. M. (1992).** Regulation of carbon flow into the shikimate pathway. *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*, (Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists); 12-18.

**Herrmann, K.M. (1995).** The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell*; 7:907-919.

**Heseler K., Spekker K., Schmidt S. K., MacKenzie C. R., Däubener W. (2008).** Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN- $\gamma$ -induced tryptophan degradation. *FEMS*; 52:273-81.

**Heseler (2008).** Die Indolamin 2,3-Dioxygenase als antimikrobieller und immunregulatorischer Effektormechanismus: Bedeutung in der Infektions- und Transplantationsimmunologie. (Dissertation)

**Heseler K., Meisel R., Brokers S., Spekker K., Zimmermann A., Hengel H., Sinzger C., Sorg R. V., Stuhlsatz S., Quambusch M., Schmidt S. K., Däubener W. (2012).** Human cytomegalovirus: A major regulator of IFN- $\gamma$  induced antimicrobial and immunoregulatory effects in human mesenchymal stromal cells. Eingereicht bei *Leukemia*.

**Heyes M. P. (1987).** Hypothesis: a role for quinolinic acid in the neuropathology of glutaric aciduria type I. *Can J Neurol Sci*; 14:441-443.

**Hill A. B., Barnett B. C., McMichael A. J., Mc-Geoch D. J. (1994).** HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with Herpes simplex virus types 1 and 2. *J Immunol*; 152:2736–2741.

**Hochrein H., Shortman K., Vremec D., Scott B., Hertzog P., O’Keeffe M. (2001).** Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol*; 166:5448-5455.

**Hof H., Dörries R. (2005).** *Medizinische Mikrobiologie*; 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Holländer G. A. (2006).** *Immunologie*; Urban und Fischer Verlag Elsevier GmbH, München.

**Hopkins F. G., Cole S. W. (1901).** A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J Physiol*; 27:418–28.

**Hucke C., MacKenzie C. R., Adjogble K. D., Takikawa O., Däubener W. (2004).** Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*; 72:2723–30.

**Huang S., Hendriks W., Althage A., Hemmi S., Bluethmann H., Kamijo R., Vilcek J., Zinkernagel R. M., Aguet M. (1993).** Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*; 259(5102):1742–1745.

**Hunt N. H., Golenser J., Chan-Ling T., Parekh S., Rae C., Potter S., Medana I. M., Miu J., Ball H. J. (2006).** Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol*; 36:569–82.

**Hussain S., Zwilling B. S., Lafuse W. P. (1999).** Mycobacterium avium infection of mouse macrophages inhibits IFN-gamma Janus kinase-STAT signaling and gene induction by down-regulation of the IFN-gamma receptor. *J Immunol*; 163:2041-8.

**Hwu P., Du M. X., Lapointe R., Do M., Taylor M. W., Young H. A. (2000).** Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol*; 164:3596–9.

**Imai K., Kurita-Ochiai T, Ochiai K. (2003).** Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin infection promotes SOCS induction and inhibits IFN-gamma-stimulated JAK/STAT signaling in J774 macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 39:173-80.

**Isaacs A. und Lindenmann J. (1957).** Virus interference. I. The interferon. *Proc. RSoc. Lond. B Biol Sci*; 12:258-67.

**Ito M., Watanabe M, Kamiya H, Sakurai M. (1997).** Herpes simplex virus type 1 induces apoptosis in peripheral blood T lymphocytes. *J Infect Dis*; 175:1220-4.

**Janeway C. A. Jr., Travers P., Walport M., Shlomchik M. J. (2005)** Immunobiology. 6th edition new york and London: garland science.

**Jaspersen L. K., Bucher C., Panoskaltsis-Mortari A., Taylor P. A., Mellor A. L., Munn D. H., Blazar B. R. (2008).** Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical regulator of acute graft-versus-host disease lethality. *Blood*; 111:3257–65.

**Jaspersen L. K., Bucher C., Panoskaltsis-Mortari A., Mellor A. L., Munn D. H., Blazar B. R. (2009).** Inducing the tryptophan catabolic pathway, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), for suppression of graft-versus-host disease (GVHD) lethality. *Blood*; 114:5062-70.

**Jeong Y. I., Kim S. W., Jung I. D., et al (2008).** Curcumin suppresses the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by blocking the JAK-PKC-delta-STAT1 signalling pathway in IFN-gamma-stimulated murine dendritic cells. *J Biol Chem*; 284:3700-3708.

**Johnson K. E., Knipe D. M. (2010).** Herpes simplex virus-1 infection causes the secretion of a type I interferon-antagonizing protein and inhibits signaling at or before Jak-1 activation. *Virology*; 286:119-24.

**Jouanguy E., Doffinger R., Dupuis S., Pallier A., Altare F., Casanova J. L. (1999).** IL-12 and IFN-gamma in host defense against mycobacteria and Salmonella in mice and men. *Curr Opin Immunol*; 11:346-51.

- Kamaratos A., Kokkoris S., Tzanakari A., Protopsaltis J., Varytimiadis K., Lentzas J., Giannoulis G. (2005).** Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) meningitis in a diabetic adult. *Acta Diabetologica*; 42:117-118.
- Kather A., Raftery M. J., Devi-Rao G., Lippmann J., Giese T., Sandri-Goldin R. M., Schönrich G. (2010).** Herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced apoptosis in human dendritic cells as a result of downregulation of cellular FLICE-inhibitory protein and reduced expression of HSV-1 antiapoptotic latency-associated transcript sequences. *J Virol*; 84:1034-46.
- Kern A. B., Schiff B. L. (1964).** Vaccine Therapy in Recurrent Herpes Simplex. *Arch Dermatol*; 89:844-5.
- Kiderlen A. F., Kaufmann S. H., Lohmann-Matthes M. L. (1984).** Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon. *Eur. J. Immunol.*; 14:964–967.
- Klein F. (1927).** Die Bedeutung der Masern für die Entstehung und die Aktivierung einer Tuberkulose und ihre Bekämpfung durch die Tuberkulosefürsorgestellen. *Lung*; 66:497-506.
- Knubel C. P., Martínez F. F., Fretes R. E., Díaz Lujan C., Theumer M. G., Cervi L., Motrán C. C. (2010).** Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J*; 24:2689-701.
- Kobelt D., Lechmann M., Steinkasserer A. (2003).** The interaction between dendritic cells and herpes simplex virus-1. *Curr Top Microbiol Immunol*; 276:145-61.
- Komatsu T., Takeuchi K., Yokoo J., Gotoh B. (2002).** Sendai virus C protein impairs both phosphorylation and dephosphorylation processes of Stat1. *FEBS Lett*; 511:139–44.
- Krakauer T. (1999).** Immune response to staphylococcal superantigens. *Immunol Res*; 20:163-173.
- Kruse M., Rosorius O., Krätzer F., Stelz G., Kuhnt C., Schuler G., Hauber J., Steinkasserer A. (2000).** Mature dendritic cells infected with herpes simplex virus type 1 exhibit inhibited T-cell stimulatory capacity. *J Virol*; 74:7127-36.
- Kumar S., Malachowski W. P., DuHadaway J. B., et al. (2008).** Indoleamine 2,3-dioxygenase is the anticancer target for a novel series of potent naphthoquinone-based inhibitors. *J Med Chem*; 51: 1706–18.
- Kummer M., Turza N. M., Muhl-Zurbes P., Lechmann M., Boutell C., Coffin R. S., Everett R. D., Steinkasserer A., Prectel A. T. (2007).** Herpes simplex virus type 1 induces CD83 degradation in mature dendritic cells with immediate-early kinetics via the cellular proteasome. *J Virol*; 81:6326-38.
- Kwidzinski E., Bunse J., Aktas O., Richter D., Mutlu L., Zipp F., Nitsch R., Bechmann I. (2005).** Indoleamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB*; 19:1347–9.

**Labandeira-Rey M., Couzon F., Boisset S., Brown E. L., Bes M., Benito Y., Barbu E. M., Vazquez V., Hook M., Etienne J. (2007).** Staphylococcus aureus Pantone-Valentine Leukocidin Causes Necrotizing Pneumonia. *Science*; 315:1130–1133.

**Larcher C., Gasser A., Hattmannstorfer R., Obexer P., Fürhapter C., Fritsch P., Sepp N. (2001).** Interaction of HSV-1 infected peripheral blood mononuclear cells with cultured dermal microvascular endothelial cells: a potential model for the pathogenesis of HSV-1 induced erythema multiforme. *J Invest Dermatol*; 116:150-6.

**Larsen J. W., Sever J. L. (2008).** Group B Streptococcus and pregnancy: A review. *Am J Obstet Gynecol*; 198:440-50.

**Laurence J. M., Wang C., Park E. T., Buchanan A., Clouston A., Allen R. D., Mccaughan G. W., Bishop G. A., Sharland A. F. (2008).** Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection. *Transplantation*; 85:1357–61.

**Laurent A. M., Madjar J. J., Greco A. (1998).** Translational control of viral and host protein synthesis during the course of herpes simplex virus type 1 infection: evidence that initiation of translation is the limiting step. *J Gen Virol*; 79:2765-75.

**Lee E. H., Rikihisa Y. (1998).** Protein kinase A-mediated inhibition of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation of Janus kinases and latent cytoplasmic transcription factors in human monocytes by Ehrlichia chaffeensis. *Infect Immun*; 66:2514-20.

**Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie**; 4. überarbeitete Auflage 2008, S. 654 ff., ISBN 978-3-13-132414-6; Georg Thieme Verlag Stuttgart

**Le V. T., Trilling M., Wilborn M., Hengel H., Zimmermann A. (2008).** Human cytomegalovirus interferes with signal transducer and activator of transcription (STAT) 2 protein stability and tyrosine phosphorylation. *J Gen Virol*; 89:2416–26.

**Levine N. D. (1977).** Taxonomy of Toxoplasma. *J Protozool*; 24:36.

**Li J., Meinhardt A., Roehrich M. E., et al. (2007).** Indoleamine 2,3-dioxygenase gene transfer prolongs cardiac allograft survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 293(6):3415-23.

**Lin Y. C., Goto S., Tateno C., Nakano T., Cheng Y. F., Jawan B., Kao Y. H., Hsu L. W., Lai C. Y., Yoshizato K., Chen C. L. (2008).** Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation. *Transplant Proc*; 40:2706–8.

**Liu H., Liu L., Fletcher B. S., Visner G. A. (2006 A).** Sleeping Beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J*; 20:2384–6.

**Liu H., Liu L., Fletcher B. S., Visner G. A. (2006 B).** Novel action of indoleamine 2,3-dioxygenase attenuating acute lung allograft injury. *Am J Respir Crit Care Med*; 173:566-72.

**Liu H., Liu L., Visner G. A. (2007).** Nonviral gene delivery with indoleamine 2,3-dioxygenase targeting pulmonary endothelium protects against ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*; 7:2291-300.

- Lloyd A. (1996).** HIV infection and AIDS. *P N G Med J*; 39:174-80.
- Löb S., Königsrainer A., Schafer R., Rammensee H. G., Opelz G., Terness P. (2008).** Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood*; 111:2152-4.
- Löb S., Königsrainer A., Zieker D., Brücher B. L., Rammensee H. G., Opelz G., Terness P. (2009).** IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother*; 58:153-7.
- Logan G. J., Smyth C. M., Earl J. W., Zaikina I., Rowe P. B., Smythe J. A., Alexander I. E. (2002).** HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immunoinhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity. *Immunology*; 105:478-87.
- 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*; 178:875-8.
- MacKenzie C. R., Heseler K., Müller A., Däubener W. (2007).** Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab*; 8:237-44.
- MacKenzie C. R., Hucke C., Müller D., Seidel K., Takikawa O., Däubener W. (1999).** Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uroepithelial cells. *J Med Microbiol*; 48:935-41.
- Mackenzie C. R., Willberg C. B., Däubener W. (1998).** Inhibition of group B streptococcal growth by IFN gamma-activated human glioblastoma cells. *J Neuroimmunol*; 89:191-7.
- Mao R., Zhang J., Jiang D., Cai D., Levy J. M., Cuconati A., Block T. M., Guo J. T., Guo H. (2011).** Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *J Virol*; 85:1048-57.
- Matis J., Kúdelová M. (2001).** Early shutoff of host protein synthesis in cells infected with herpes simplex viruses. *Acta Virol*; 45:269-77.
- Mehlhorn H., Piekarski G. (2002).** *Grundriß der Parasitenkunde*; 6. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
- Mellor A. L., Munn D. H. (1999).** Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*; 20:469-73.
- Mellor A. L., Munn D. H. (2004).** IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*; 4:762-74.
- Melroe G. T., DeLuca N. A., Knipe D. M. (2004).** Herpes simplex virus 1 has multiple mechanisms for blocking virus-induced interferon production. *J Virol*; 78:8411-20.
- Merlin G., Falcoff E., Aguet M. (1985).** 125I-labelled human interferons alpha, beta and gamma: comparative receptor-binding data. *J Gen Virol*; 66:1149-1152.

**Mertens T. (1986).** Chemotherapy of herpes encephalitis. *Immun Infekt.* 14:143–7.

**Mertz G. J., Ashley R., Burke R. L., Benedetti J., Critchlow C., Jones C. C., Corey L. (1990).** Double-blind, placebo-controlled trial of a herpes simplex virus type 2 glycoprotein vaccine in persons at high risk for genital herpes infection. *J Infect Dis*; 161:653-60.

**Miki T., Sun H., Lee Y., Tandin A., Kovsky A. M., Subbotin V., Fung J. J., Valdivia L. A. (2001).** Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc*; 33:129-30.

**Miller D. M., Rahill B. M., Boss J. M., Lairmore M. D., Durbin J. E., Waldman J. W., Sedmak D. D. (1998).** Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. *J Exp Med*; 187:675–83.

**Modrow S., Falke D., Truyen U. (2003).** *Molekulare Virologie.* 2. Auflage. Spektrum. Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin.

**Moffett J. R., Namboodiri M. A. (2003).** Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*; 81:247-65.

**Mollaret P. (1944).** La méningite endothélio-leucocytaire multirécurrenente bénigne: syndrome nouveau ou maladie nouvelle? *Rev Neurol (Paris)*; 76:57-67.

**Morrison T. E., Mauser A., Wong A., Ting J. P., Kenney S. C. (2001).** Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*; 15:787-99.

**Mulley W. R., Nikolic-Paterson D. J. (2008).** Indoleamine 2,3-dioxygenase in transplantation. *Nephrology (Carlton)*; 13:204-11.

**Muller A. J., Sharma M. D., Chandler P. R., et al. (2008).** Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*; 105:17073–8.

**Müller A., Heseler K., Schmidt S. K., Spekker K., MacKenzie C. R., Däubener W. (2008).** The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med*; 12:1–11.

**Munder M., Mallo M., Eichmann K., Modolell M. (1998).** Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med*; 187:2103–8.

**Munn D. H., Zhou M., Attwood J. T., Bondarev I., Conway S. J., Marshall B., Brown C., Mellor A. L. (1998).** Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*; 281:1191–3.

**Munn D. H., Shafizadeh E., Attwood J. T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A. L. (1999).** Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*; 189:1363–72.

**Munn D. H., Sharma M. D., Hou D., Baban B., Lee J. R., Antonia S. J., Messina J. L., Chandler P., Koni P. A., Mellor A. L. (2004).** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*; 114:280–90.

**Munn D. H., Sharma M. D., Mellor A. L. (2004).** Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol*; 172:4100–10.

**Munn D. H., Sharma M. D., Baban B., Harding H. P., Zhang Y., Ron D., Mellor A. L. (2005).** GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*; 22:633–42.

**Muñoz P., Llancaqueo A., Rodríguez-Créixems M., Peláez T., Martín L., Bouza E. (1997).** Group B streptococcus bacteremia in nonpregnant adults. *Arch Intern Med*; 157:213–6.

**Murray H. W., Spitalny G. L., Nathan C. F. (1985).** Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and vivo by interferon- $\gamma$ . *J Immunol*; 134:1619.

**Naginei C. N., Pardhasaradhi K., Martins M. C., Detrick B., Hooks J. J. (1996).** Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun*; 64:4188–96.

**Namboodiri M. A., Venkateshan C. N., Narayanan R (1996).** Increased quinolate immunoreactivity in the peripheral blood monocytes/macrophages from SIV-infected monkeys. *J Neurovirol*; 2: 433-438.

**NCBI-Datenbank:** IFNGR1 interferon gamma receptor 1 [*Homo sapiens*]; Gene ID 3459: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3459>

**Németh H., Toldi J., Vécsei L. (2006).** Kynurenines, Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders: preclinical and clinical studies. *J Neural Transm*; 70: 285–304.

**Nettelbreker E., Zeidler H., Bartels H., Dreses-Werringloer U., Daubener W., Holtmann H., Kohler L. (1998).** Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN $\gamma$ . *J Med Microbiol*; 47:141-9.

**Neumann L., Kraas W., Uebel S., Jung G., Tampé R. (1997).** The active domain of the herpes simplex virus protein ICP47: a potent inhibitor of the transporter associated with antigen processing. *J Mol Biol*; 272:484-92.

**Newport M. J., Huxley C. M., Huston S., Hawrylowicz C. M., Oostra B. A., Williamson R., Levin M. (1996).** A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*; 335:1941-9.

**Nguyen H., Hiscott J., Pitha P. M. (1997).** The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth Factor Rev*; 8:293–312.

**Nicolle C., Manceaux L. (1908).** Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *Compt Rend de l'Acad Sci (Paris)*; 147:763.

**Nishiyama A., Kaneko J., Harata M., Kamio Y. (2006).** Assembly of staphylococcal leukocidin into a pore-forming oligomer on detergent-resistant membrane microdomains, lipid rafts, in human polymorphonuclear leukocytes. *Biosci Biotechnol Biochem*; 70:1300–7.

- Oberdörfer C., Adams O., MacKenzie C. R., De Groot C. J., Däubener W. (2003).** Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv Exp Med Bio*; 527:15–26.
- Obojes K., Andres O., Kim K. S., Däubener W., Schneider-Schaulies J. (2005).** Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol*; 79:7768–76.
- O'Donnell M. A., Luo Y., Che, X., Szilvasi A., Hunter S. E., Clinton S. K. (1999).** Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN-gamma in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol*; 163:4246–4252.
- Otani T., Nakamura S., Toki M., Motoda R., Kurimoto M., Orita K. (1999).** Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice. *Cell Immunol*; 198:111–9.
- Paladino P., Mossman K. L. (2009).** Mechanisms employed by herpes simplex virus 1 to inhibit the interferon response. *J Interferon Cytokine Res*; 29:599-607.
- Pantoja L. G., Miller R. D., Ramirez J. A., Molestina R. E., Summersgill J. T. (2000).** Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infect Immun*; 68:6478–81.
- Pardoll D. (2003).** Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu Rev Immunol*; 21:807–839.
- Pestka S. (1997).** The interferon receptors. *Semin Oncol*; 24:9.
- 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 U.S.A.*; 81:908–12.
- Pfefferkorn E. R., Guyre P. M. (1984).** Inhibition of growth of Toxoplasma gondii in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect Immun*; 44:211–6.
- Pfefferkorn E. R., Rebhun S., Eckel M. (1986).** Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res*; 6:267–79.
- Prandota J. (2009).** Mollaret meningitis may be caused by reactivation of latent cerebral toxoplasmosis. *Int J Neurosci*; 119:1655-92.
- Prechtel A. T., Turza N. M., Kobelt D. J., Eisemann J. I., Coffin R. S., McGrath Y., Hacker C., Ju X., Zenke M., Steinkasserer A. (2005).** Infection of mature dendritic cells with herpes simplex virus type 1 dramatically reduces lymphoid chemokine-mediated migration. *J Gen Virol*; 86:1645-57.
- Proft T., Fraser J. D. (2003).** Review: Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*; 133:299.
- Protein Data Bank: www.pdb.org; Sugimoto H., Oda S., Otsuki T, Hino T., Yoshida T., Shiro Y. (2006).** Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic

mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci Usa*; 103:2611-2616.

**Quan J., Tan P. H., MacDonald A., Friend P. J. (2008).** Manipulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) for clinical transplantation: promises and challenges. *Expert Opin Biol Ther*; 8:1705-19.

**Rodriguez J. J., Parisien J. P., Horvath C. M. (2002).** Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol*; 76:11476-83.

**Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. (2006).** *Biochemie*; Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

**Robinson C. M., Hale P. T., Carlin J. M. (2005).** The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res*; 25:20-30.

**Robinson C. M., Shirey K. A., Carlin J. M. (2003).** Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res*; 23:413-21.

**Roshick C., Wood H., Caldwell H. D., McClarty G. (2006).** Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infect Immun*; 74:225-38.

**Ryu Y.-H., Kim J.-C. (2007).** Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Human Corneal Cells as a Local Immunosuppressive Factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 48: 4148-4152.

**Sagedal S., Nordal K. P., Hartmann A., Sund S., Scott H., Degré M., Foss A., Leivestad T., Osnes K., Fauchald P., Rollag H. (2002).** The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. *Am J Transplant*; 2:850-6.

**Saha B., Jyothi Prasanna S., Chandrasekar B., Nandi D. (2010).** Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*; 50:1-14.

**Saito K., Nagamura Y., Ohta Y., Sasaki E., Ishiguro I. (1991).** Characterization of the L-tryptophan transport system in the liver of growing rats. *Life Sci*; 49:527-34.

**Saito K., Crowley J. S., Markey S. P., Heyes M. P. (1993).** A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J Biol Chem*; 268:496-503.

**Sakurai K., Zou J. P., Tschetter J. R., Ward J. M., Shearer G. M. (2002).** Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*; 129:186-96.

**Salgame P. (2005).** Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol*; 17:374-380.

- Sanderson I. R., Brueton L. A., Savage M. O., Harper J. I. (1987).** Eczema herpeticum: a potentially fatal disease. *Br Med J*; 294:693-694.
- Schillinger J. A., Xu F., Sternberg M. R. et al. (1976-1994).** National seroprevalence and trends in herpes simplex virus type 1 in the United States. *Sex Transm Dis* 2004; 31:753-760.
- Schmook T., Stockfleth E.. Bundesverband der Organtransplantierten. Charité Berlin:** [http://www.bdo-ev.de/front\\_content.php?idcat=740&idart=2228](http://www.bdo-ev.de/front_content.php?idcat=740&idart=2228)
- Schrag S. J., Zywicki S., Farley M. M., et al. (2000).** Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med*; 342:15-20.
- Schröder C. H., Urbaczka G. (1979).** Inactivation by u.v.-irradiation of interfering herpes simplex virus particles: interference requires a functional genome. *J Gen Virol*; 44:827-31.
- Schröder K., Hertzog P. J., Ravasi T., Hume D. A. (2004).** Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*; 75:163–89.
- Schroten H., Spors B., Hucke C., Stins M., Kim K. S., Adam R., Däubener W. (2001).** Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*; 32:206–10.
- Schwarcz R., Whetsell W. O. Jr., Mangano R. M. (1983).** Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*; 219:316–8.
- Sedy J. R., Spear P. G., Ware C. F. (2008).** Cross-regulation between herpesviruses and the TNF superfamily members. *Nat Rev Immunol*; 8:861–873.
- Shimizu T., Nomiya S., Hirata F., Hayaishi O. (1978).** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem*; 253:4700–6.
- Shirey K. A., Jung J. Y., Maeder G. S., Carlin J. M. (2006).** Upregulation of IFN-gamma receptor expression by proinflammatory cytokines influences IDO activation in epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res*; 26:53–62.
- Shuai K., Ziemiecki A., Wilks A. F., Harpur A. G., Sadowski H. B., Gilman M. Z., Darnell J. E. (1993).** Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*; 366:580–3.
- Siegel D., Golden E., Washington Ä. et al. (1992).** Prevalence and correlates of herpes simplex infections. The population-based AIDS in Multiethnic Neighborhoods Study. *JAMA*; 268: 1702-1708.
- Skoldenberg B., Fosgren M., Alestig K., et al. (1984).** Acyclovir versus vidarabin in herpes simplex encephalitis; randomised multicenter study in consecutive Swedish patients. *Lancet*; 2:707-711.
- Slifkin M., Doron S., Snyderman D. R. (2004).** Viral prophylaxis in organ transplant patients. *Drugs*; 64:2763-92.

**SMART-Datenbank:**

[http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do\\_annotation.pl?DOMAIN=SH2](http://smart.embl-heidelberg.de/smart/do_annotation.pl?DOMAIN=SH2)

**Smyth R. L., Higenbottam T. W., Scott J. P., Wreghitt T. G., Stewart S., Clelland C. A., McGoldrick J. P., Wallwork J. (1990).** Herpes simplex virus infection in heart-lung transplant recipients. *Transplantation*; 49:735-9.

**Sotero-Esteva W. D., Wolfe D., Ferris M., Taylor M. W. (2000).** An indoleamine 2,3-dioxygenase-negative mutant is defective in stat1 DNA binding: differential response to IFN-gamma and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res*; 20:623-32.

**Steckel N. K., Kuhn U., Beelen D. W., Elmaagacli A. H.(2003).** Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol*; 57:185–91.

**Stone T. W. (1993).** Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.*; 45:309–79.

**Stone T. W. (2001).** Kynurenines in the CNS: from endogenous obscurity to therapeutic importance. *Prog Neurobiol.*; 64:185-218.

**Stone T. W., Darlington L. G. (2002).** Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*; 1:609–620.

**Stone T. W., Mackay G. M., Forrest C. M., Clark C. J., Darlington L. G. (2003).** Tryptophan metabolites and brain disorders. *Clin Chem Lab Med*; 41:852–9.

**Straus, S. E., Corey L., Burke R. L., Savarese B., Barnum G., Krause P. R., Kost R. G., Meier J. L., Sekulovich R., Adair S. F., and et al. (1994).** Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet*; 343:1460-3.

**Stryer L. (1999).** *Biochemie*; 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

**Stuehr D.J., Nathan C.F. (1989).** Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*; 169:1543–55.

**Tabbara K. S., Peters N. C., Afrin F., Mendez S., Bertholot S., Belkaid Y., Sacks D. L. (2005).** Conditions influencing the efficacy of vaccination with live organisms against *Leishmania major* infection. *Infect Immun*; 73:4714–4722.

**Takikawa O. (2005).** Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*; 338:12–9.

**Tang Y. W., Cleavinger P. J., Li H., Mitchell P. S., Smith T. F., Persing D. H. (2000).** Analysis of candidate-host immunogenetic determinants in herpes simplex virus-associated Mollaret's meningitis. *Clin Infect Dis*; 30:176-8.

**Taylor M. W., Feng G. S. (1991).** Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J*; 5:2516-22.

- Taylor G. A., Feng C. G., Sher A. (2004).** p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol*; 4:100–9.
- Terajima M., Leporati A. M. (2005).** Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. *Viral Immunol*; 18:722–9.
- Terness P., Bauer T. M., Röse L., Dufter C., Watzlik A., Simon H., Opelz G. (2002).** Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*; 196:447–57.
- Thäle C. und Kiderlen A. F. (2005).** Sources of Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) in early response to *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology*; 210:673–683.
- Tomazin R., Hill A. B., Jugovic P., York I., van Endert P., Ploegh H. L., Andrews D. W., Johnson D. C. (1996).** Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP. *EMBO J*; 15:3256–66.
- Trgovcich J., Johnson D., Roizman B. (2002).** Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class II Proteins Are Regulated by the Products of the  $\gamma_134.5$  and U<sub>L</sub>41 Genes of Herpes Simplex Virus 1. *J Virol*; 76:6974–6986.
- Tropea F., Troiano L., Monti D., Lovato E., Malorni W., Rainaldi G., Mattana P., Viscomi G., Ingletti M. C., Portolani M., et al. (1995).** Sendai virus and herpes virus type 1 induce apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Exp Cell Res*; 218:63–70.
- Tyler K. L. (2004).** Herpes simplex virus infections of the central nervous system: encephalitis and meningitis, including Mollaret's. *Herpes*; 11 Suppl 2:57A–64A.
- Unanue E. R. (1997).** Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immuno*; 9:35–43.
- Uyttenhove C., Pilotte L., Théate I., Stroobant V., Colau D., Parmentier N., Boon T., Van den Eynde B. J. (2003).** Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*; 9:1269–74.
- Varkila K., Chatelain R., Leal L. M., Coffman R. L. (1993).** Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*; 23:262–268.
- Vazquez-Torres A., Stevanin T., Jones-Carson J., Castor M., Read R. C., Fang F. C. (2008).** Analysis of nitric oxide-dependent antimicrobial actions in macrophages and mice. *Methods Enzymol*; 437:521–38.
- Velasco M. E., Dahl D., Roessmann U., Gambetti P. (1980).** Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer*; 45:484–494.
- Verrey F., Jack D. L., Paulsen I. T., Saier M. H. Jr, Pfeiffer R. (1999).** New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol*; 172:181–92.
- Vincendeau P., Lesthelle S., Bertazzo A., Okomo-Assoumou M. C., Allegri G., Costa C. V. (1999).** Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis. *Adv Exp Med Biol*; 467:525–531.

- Vossen M. T., Westerhout E. M., Söderberg-Nauclér C., Wiertz E. J. H. (2002).** Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics*; 54:527-542.
- Wald A., Ashley-Morrow R. (2002).** Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*; 35:173–82.
- Wan J. S., Sharp S. J., Poirier G. M., Wagaman P. C., Chambers J., Pyati J., Hom Y. L., Galindo J. E., Huvar A., Peterson P. A., Jackson M. R., Erlander M. G. (1996).** Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat Biotechnol*; 14:1685-1691.
- Wang X., Kang H., Kikuchi T., Suzuki Y. (2004).** Gamma Interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T Cells is required for prevention of Toxoplasmic Encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. *Infect Immun*; 72:4432–4438.
- Wheelock E. F. (1965).** Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science*; 149:310–1.
- Whitley R. J., Alford C. A., Hirsch M. S., et al. (1986).** Herpes simplex encephalitis: vidarabin versus acyclovir therapy. *N Engl J Med*; 314:144-149.
- Whitley R. J., Roizman B. (2002).** Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest*; 110:145-51.
- Whitley R. J. (2006).** Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Res*; 71:141–8.
- Wilson L. G. (1976).** Viral encephalopathy mimicking functional psychosis. *Am J Psychiatry*; 133:165-70.
- Wiertz E. J., Devlin R., Collins H. L., Rensing M. E. (2007).** Herpesvirus Interference with Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted T-Cell Activation. *J Virol*; 81:4389-4396.
- Wood H., Roshick C., McClarty G. (2004).** Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of Chlamydia psittaci GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells. *Mol Microbiol*; 52:903–16.
- Wu T. R., Hong Y. K., Wang X. D., Ling M. Y., Dragoi A. M., Chung A. S., Campbell A. G., Han Z. Y., Feng G. S., Chin Y. E. (2002).** SHP-2 is a dual-specificity phosphatase involved in Stat1 dephosphorylation at both tyrosine and serine residues in nuclei. *J Biol Chem*; 277:47572–80.
- Xu R., Johnson A. J., Liggitt D., Bevan M. J. (2004).** Cellular and humoral immunity against Vaccinia Virus infection of mice. *J Immunol*; 172:6265–6271.
- Yokota S., Yokosawa N, Kubota T, Suzutani T, Yoshida I, Miura S, Jimbow K, Fujii N. (2001).** Herpes simplex virus type 1 suppresses the interferon signaling pathway by inhibiting phosphorylation of STATs and janus kinases during an early infection stage. *Virology*; 286:119-24.

**Yokota S., Yokosawa N., Okabayashi T., Suzutani T., Miura S., Jimbow K., Fujii N. (2004).** Induction of Suppressor of Cytokine Signaling-3 by Herpes Simplex Virus Type 1 Contributes to Inhibition of the Interferon Signaling Pathway. *J Virol*; 78:6282-6286.

**Yokota S., Okabayashi T., Fujii N. (2011).** Measles virus C protein suppresses gamma-activated factor formation and virus-induced cell growth arrest. *Virology*; 414:74-82.

**Yoshida N., Ino K., Ishida Y., Kajiyama H., Yamamoto E., Shibata K., Terauchi M., Nawa A., Akimoto H., Takikawa O., Isobe K., Kikkawa F. (2008).** Overexpression of indoleamine 2,3-dioxygenase in human endometrial carcinoma cells induces rapid tumor growth in a mouse xenograft model. *Clin Cancer Res*; 14:7251-9.

**Young V. R., El-Khoury A. E. (1996).** Human amino acid requirements: A re-evaluation. *United Nations University Press-Food and Nutrition bulletin*; 17.

**Yuan W., Dasgupta A., Cresswell P. (2006).** Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol*; 7:835-42.

**Yuasa H. J., Takubo M., Takahashi A., Hasegawa T., Noma H., Suzuki T. (2003).** Evolution of vertebrate Indoleamine 2,3-Dioxygenases. *J Mol Evol*; 65:705-14.

## **8. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Däubener für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die ausgezeichnete wissenschaftliche Promotions-Betreuung bedanken. Zudem danke ich für die immer freundliche und angenehme Forschungs- und Diskussionsatmosphäre. Ich hätte mir keinen besseren und hilfsbereiteren Doktorvater wünschen können.

Ebenfalls danke ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Ortwin Adams für die Übernahme des Korreferates.

Für die Möglichkeit dieses wissenschaftliche Werk an dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anfertigen zu dürfen, danke ich besonders dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Mentorin Frau Dr. rer. nat. Kathrin Heseler richten, die mich die erste Zeit mit allen Geräten und Versuchsdurchführungen vertraut gemacht und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Auch Frau Dr. rer. nat. Silvia K. Schmidt danke ich für die kompetente Unterstützung bei allen Fragen und Problemen rund um das Promotionsthema und die Experimente. Zudem bedanke ich mich bei ihr in aller Form für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich vielmals der gesamten Arbeitsgruppe Däubener Katrin Spekker, Vanessa Ince, Stephan Siepmann, Wilfried Schwippert, Silke Stuhlsatz, Margret Leineweber, Stefanie Brunder, sowie dem gesamten Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, insbesondere Herrn Prof. Dr. H. Hengel, Herrn Prof. C. MacKenzie und Herrn Dr. A. Zimmermann.

Ich bin froh so freundlich innerhalb der AG Däubener und des gesamten Instituts aufgenommen worden zu sein und stolz, dass mir die Möglichkeit und das Vertrauen geschenkt wurde meine Dissertation in der Medizinischen Mikrobiologie anfertigen zu dürfen.

Zum Schluss möchte ich aus tiefstem Herzen meinen lieben Eltern, Geschwistern und Freunden danken. Ohne sie wäre diese Dissertation und der erfolgreiche Abschluss des Humanmedizinstudiums nicht möglich gewesen.

## **9. Eidesstattliche Erklärung**

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

Wuppertal, den 10.05.2013

---

Marc André Quambusch

## 10. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Marc André Quambusch  
Anschrift: Buchenstr. 43  
42283 Wuppertal  
Kontakt: MarcAndre.Quambusch@uni-duesseldorf.de  
Geburtsdatum / -ort: 22.05.1986 / Wuppertal  
Eltern: Gustav A. Quambusch  
Ilona Quambusch, geborene Meeske  
Geschwister: Guido A. Quambusch  
Janet A. Quambusch  
Jasmin A. Quambusch

### Hochschulstudium

Okt. 2005 - Dez. 2011: Humanmedizin-Studium an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

### Schulbildung

Aug. 1996 - Mai 2005: Gesamtschule Wuppertal-Langerfeld  
Allgemeine Hochschulreife  
Aug. 1992 - Juni 1996: Grundschule Haselrain / Wuppertal

### Kenntnisse

Sprachen: Englisch ab 5. Klasse  
Französisch ab 7. Klasse

### Freizeitgestaltung

Sport (u. a. Marathon)  
Billard  
Lesen