

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Pfeffer

Einfluss von Norharman auf Indoleamin-2,3-dioxygenase von  
Makrophagen nach Toxoplasmenerkrankung und Stimulation durch  
Zytokine

Dissertation

zur Erlangung eines Doktorgrades der Humanmedizin

vorgelegt von  
Beate H. Panek

2005

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

Gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab

Referent: PD Dr. MacKenzie

Koreferent: PD Dr. med. R. Wessalowski

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

*Albert Einstein, Deutscher Physiker, 1879-1955*

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	3
<b>A Einleitung</b>	5
1. Toxoplasma gondii	5
1.1 Morphologie und Entwicklung	6
1.2 Immunantwort auf eine Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	10
1.3 Klinik	11
2. Makrophagen	13
3. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)	17
4. Norharman	18
5. Zielsetzung der Arbeit	19
<b>B Material und Methoden</b>	22
1. Materialien	22
1.1 Materialliste	22
1.2 Kulturmedien	25
1.3 Puffer und andere Reaktionsgemische	25
1.4 Geräte und Verbrauchsmittel	27
2. Herkunft der Protozoen und Zellen	29
2.1 Herkunft der Makrophagen	29
2.2 Herkunft der Glioblastomzellen	29
2.3 Herkunft der Toxoplasmen	30
2.4 Herkunft der Fibroblasten	30
3. Zellkulturtechniken	31
3.1 Präparation und Differenzierung von PBMDM	31
3.2 Präparation von PBMDM für einen Northern Blot	31
3.3 Kultur und Ernte der Glioblastomzellen	32
3.4 Kultur und Ernte der Fibroblasten, sowie Anzucht von Toxoplasmen	33
4. Methoden	35
4.1 IDO-Aktivitätsmessung im Zellüberstand	35
4.2 Messen des Toxoplasmenwachstums	36
4.3 Vitalfärbung mit Trypanblau	36
4.4 Messen der IDO-Aktivität im Zell-Lysat	37
4.5 Northern Blot	38
4.6 Nachweis von DNA bzw. RNA	40
4.8 Western Blot	45

<b>C</b>	<b>Ergebnisse</b>	48
1	PBMDM: IDO-Aktivität und Toxoplasmenwachstum bei IFN $\gamma$ - und TNF $\alpha$ -Zugabe	48
2	Effekt der Tryptophan-Supplementierung auf das Toxoplasmenwachstum	50
3	IDO-Aktivität und Toxoplasmenwachstum in PBMDM in Abhängigkeit vom pH-Wert (IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -Stimulation)	52
4	Einfluss von Norharman auf die IDO-Aktivität und das Toxoplasmenwachstum in PBMDM in Abhängigkeit vom pH-Wert	54
5	Bestimmung der IDO-Aktivität im Zell-Lysat	56
6	Einfluss von Norharman auf die Expression von IDO	57
7	Realtime-PCR (TaqMan®-System): quantitativer Nachweis des Einflusses von Norharman auf die Expression von IDO-RNA	59
8	Semiquantitativer Nachweis von ID-O und GAPDH-Protein im Western Blot	61
<b>D</b>	<b>Diskussion</b>	63
1	Toxoplasmostatische Mechanismen	63
1.1	Effekte der Tryptophan-Metabolite	63
1.2	Nicht auf Tryptophandepletion basierende Toxoplasmostase-Mechanismen	65
2.	Norharman und seine Effekte	66
2.1	Norharman und Toxoplasmostase	66
2.2	Norharman und die Interaktion mit der IDO	67
2.3.	Norharman- auf der Suche nach dem Wirkort	69
<b>E</b>	<b>Ausblick</b>	72
<b>F</b>	<b>Zusammenfassung</b>	73
<b>G</b>	<b>Literatur</b>	74
<b>H</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	81
<b>I</b>	<b>Lebenslauf</b>	83
<b>J</b>	<b>Danksagung</b>	84
<b>K</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	85

# A Einleitung

## 1. Toxoplasma gondii

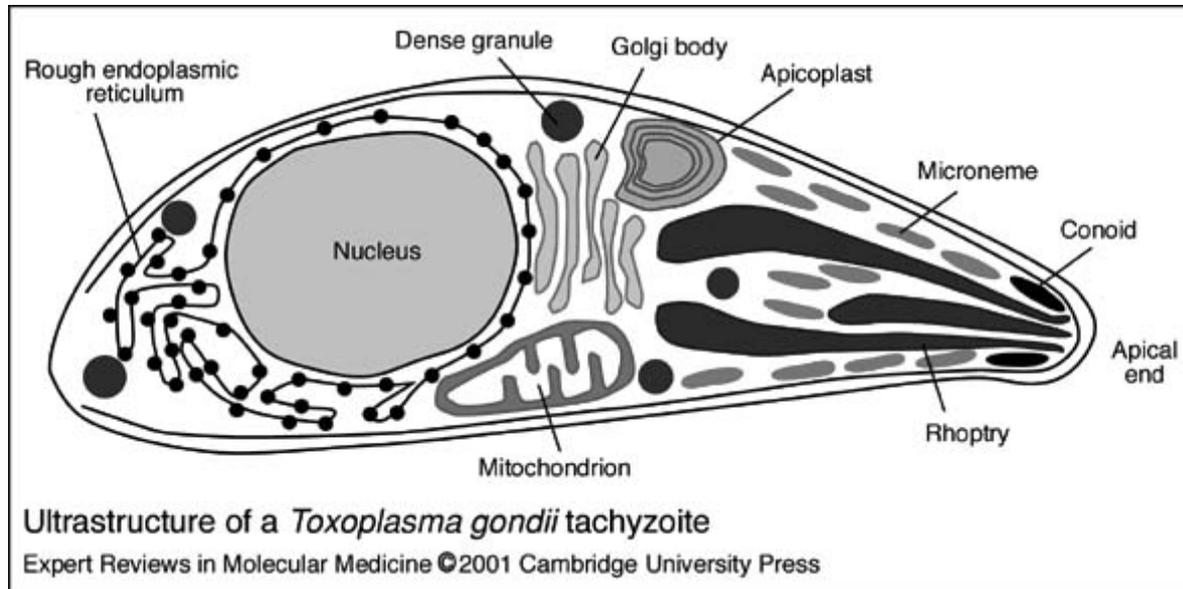


Abb. A1a: Ultrastruktur eines *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten, Quelle: [www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002216h.htm](http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/01002216h.htm)

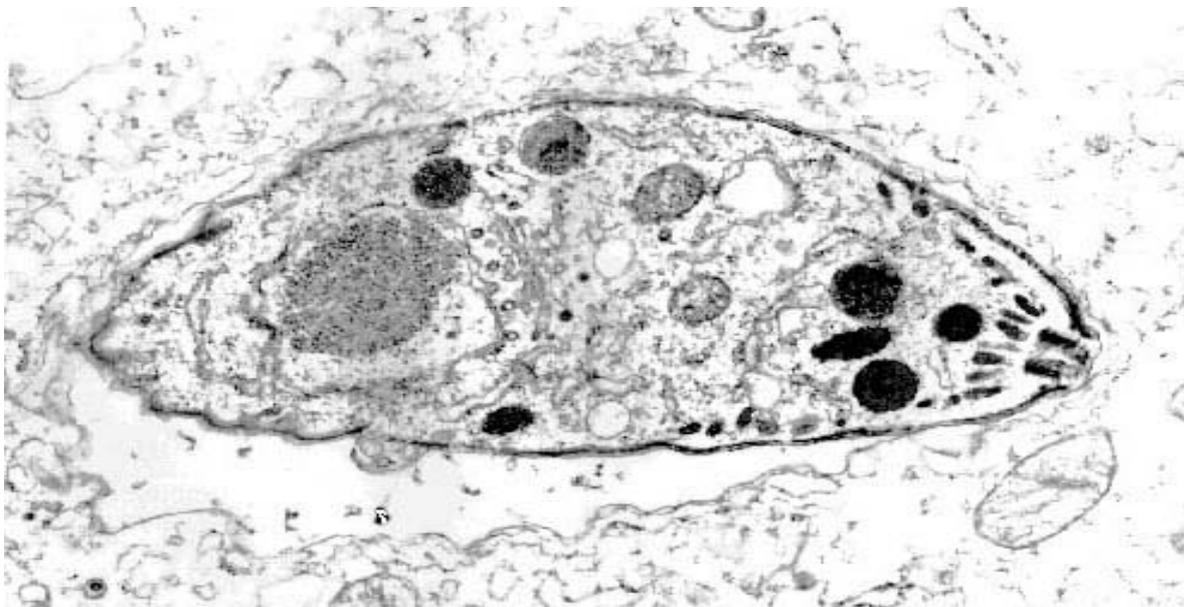


Abb. A1b: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten, Quelle: [www.hei.org/research/depts/aemi/toxo.htm](http://www.hei.org/research/depts/aemi/toxo.htm), Bild nachbearbeitet

## 1.1 Morphologie und Entwicklung

### 1.1.1 Taxonomie:

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulärer Parasit eukaryonter Zellen. Es gehört zum Stamm der *Apicomplexa* und ordnet sich hier in der Klasse der *Sporozoa* zu den *Eimeriina* unter die Ordnung der *Eucoccidiida* ein.

### 1.1.2 Epidemiologie:

Dieser Parasit ist weltweit verbreitet, wobei die Prävalenz einer Infektion regional abhängig ist, aber auch eine Korrelation mit dem Lebensalter aufweist. So erreicht die Durchseuchungsrate bei alten Menschen Werte von durchaus 70-80% (Herold 2002). Zurzeit werden in Deutschland Infektionsraten von 40-60% angegeben. Bezogen auf die Weltbevölkerung sollen ungefähr ein Drittel aller Menschen mit *Toxoplasma gondii* durchseucht sein (Montoya, 2004). Die regionalen Unterschiede erklären sich aus der unterschiedlichen Virulenz der einzelnen Erregerstämme, aber auch durch unterschiedliche Ernährungsgewohnheiten (s. u.) und dem Zusammenleben mit möglichen Zwischen- und Endwirten. Die Erregerstämme variieren zudem auch im Bezug auf biologische und genetische Eigenschaften (Suzuki, 1995).

Aufgrund seiner geringen Wirtsspezifität- *Toxoplasma gondii* befällt fast alle warmblütigen Wirbeltiere (Hill et al. 2002)- finden sich Infektionen mit *Toxoplasma gondii* auch bei Schweinen, Schafen, Rindern und vielen anderen Säugetieren, aber auch bei Vögeln.

Eine besondere Bedeutung haben Katzen und Felidae (Katzenartige), da nur sie Endwirte im Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii* sein können. Jedoch kommen nur 1-6% der Katzen als Ausscheider der Oozysten (s. u.) in Frage (Kayser et al. 2001), für die Infektion des Menschen scheint die Durchseuchung von Schafen und Schweinen mit Gewebszysten zu 10-30% eine größere Relevanz zu besitzen (Kayser et al. 2001). Dabei werden als infektiöses Entwicklungsstadium Zysten, die so genannte Zystozoitien enthalten, aufgenommen. Als eine weitere Ursache für Infektionen werden die Aufnahme des Erregers nach Gartenarbeit oder Verzehr von ungewaschenem Gemüse und Obst diskutiert, da auch hier Zysten von *Toxoplasma gondii* zu finden sind (Cook et al. 2000). Zu beachten ist hier allerdings, dass es sich bei diesem Infektionsweg um die Aufnahme von bereits sporulierten Oozysten handelt (s. u.).

### 1.1.3 Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii*

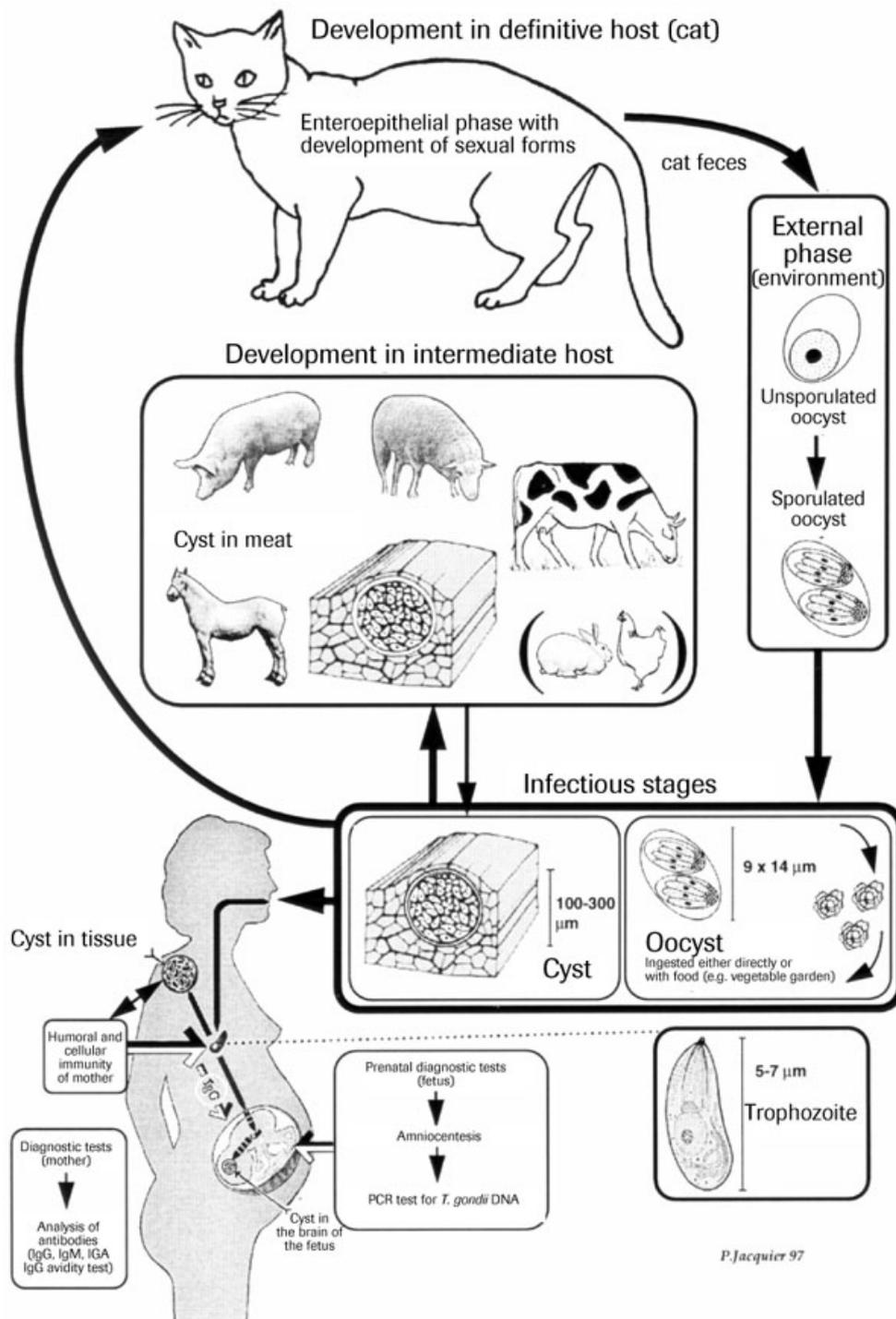


Abb. A1c: Schema des Entwicklungszyklus von *Toxoplasma gondii*, Quelle: <http://www.roche.com/pages/facets/2/toxmoplasma.jpg>

Unterschieden werden folgende Stadien:

1. *Endozoiten* (syn. *Tachyzoiten*): Sie sind in der Lage, sich schnell durch *Endodyogenie* in sogenannten parasitophoren Vakuolen innerhalb der Wirtszelle zu vermehren. Hierbei entstehen aus einer Mutterzelle jeweils zwei Tochterzysten. Durch ihre Doppelmembran werden diese Vakuolen oftmals auch als Pseudozysten bezeichnet. Die Tachyzoiten erreichen eine Größe von 4-7  $\mu\text{m}$  x 2-4  $\mu\text{m}$  und sehen bogenförmig aus (daher auch ihr Name: toxon, griechisch für Bogen), in der Außenwelt überleben sie schlecht, eine Magen-Darm-Passage fast gar nicht, sind jedoch, wenn sie überleben, infektiös.

2. *Zystozoiten/Bradyzoiten*: Sie entstehen aus Endozoiten dadurch, dass sie sich sehr langsam innerhalb von Zysten vermehren, dabei bilden sie sehr stabile Wände. Die Bradyzoiten sind ungefähr 4-8 $\mu\text{m}$  x 2-4 $\mu\text{m}$  groß und bilden Wartestadien, so dass sie innerhalb der Zysten im Wirt lange überleben können, da diese vom Immunsystem nicht angegriffen werden. Die Zysten enthalten z. T. mehrere Tausend dieser Bradyzoiten. Sie finden sich in diversen Geweben des Wirtes und erreichen eine Größe von ungefähr 150  $\mu\text{m}$ .

3. *Oozysten* sind rundliche Dauerstadien mit einer resistenten Hülle, ihre Größe beträgt 9  $\mu\text{m}$  x 14  $\mu\text{m}$ . Sie finden sich im Dünndarmepithel von Felidae, nachdem ein geschlechtlicher Vermehrungszyklus stattgefunden hat. In einer Oozyste befindet sich eine Zygote, aus der sich 2-4 Tage nach Absetzen mit dem Kot zwei Sporozysten entwickeln, die jeweils vier Sporozoiten enthalten. Dieser auch als *Sporulation* bezeichnete Vorgang führt ebenfalls zu infektiösen Stadien.

Im *Entwicklungszyklus* unterscheidet man drei Phasen:

1. *enteroepitheliale Phase*. Sie findet nur in den Endwirten statt, dabei werden die Geschlechtsformen, sprich die Oozysten gebildet. Bei der Erstinfektion der Katze durch Aufnahme von infektiösen Zygoten oder rohem, zystenhaltigen Fleisch kommt es zunächst zu einer ungeschlechtlichen Vermehrungsphase im Dünndarmepithel. Im Verlauf mehrerer Zyklen entwickeln sich nun die Gamonten, die Geschlechtsformen, aus denen die Oozysten hervorgehen, die mit dem Kot abgesetzt werden können. Diese sog. Präpatenzphase, also die Zeit zwischen Infektion mit Zystozoiten und dem Zeitpunkt der Nachweisbarkeit von Gamonten im Kot dauert ungefähr 3-9 Tage. Erfolgte die Infektion mit Sporozoiten, so ist diese Phase aufgrund der erst folgenden extraintestinalen Phase auf 20-35 Tage verlängert.

2. Die *externe Phase* bedeutet die Sporulation (s. o.), die bei Raumtemperatur nach 2-4 Tagen abgeschlossen ist.
3. *extraintestinale Phase*: Nach einer peroralen Infektion mit Zysten oder sporulierten Oozysten werden der Endwirt (Katze), Zwischenwirt (Schwein, Maus, Schaf u. a.) bzw. der Fehlwirt (Mensch) infiziert, zum Beispiel durch ungewaschenes, durch Katzenkot verunreinigtes Gemüse (Tenter et al. 2000). Dabei gelangt der Erreger aus dem Darm vermutlich über Makrophagen oder dem Lymphweg in andere kernhaltige Wirtszellen, z.B. Zellen des RHS (retikulo-histiozytäres System), der Muskulatur oder auch des ZNS. Dort befinden sie sich in einer parasitophoren Vakuole. Durch wiederholte *Endodyogenie* (ungeschlechtliche Vermehrung) kommt es schließlich zum Zerplatzen der Zelle, so dass die Tochterindividuen, bis zu 32 Stück, in der Umgebung neue Zellen infizieren, um sich wieder ungeschlechtlich fortzupflanzen. Hierbei ist die Möglichkeit der Infektion des Fötus über die Plazenta zu erwähnen. In den befallenen Gebieten kommt es zur Nekrose und einer entzündlichen Reaktion. An dieser Stelle erfolgt der Übergang von den Endozoiten zu den zystozoenhaltigen Zysten, die in der Regel keine entzündliche Reaktion verursachen, so z.B. im Gehirn, in der Skelettmuskulatur, Retina, Uterus oder dem Myokard, wo sie viele Jahre überdauern können.

*Zusammenfassung*: Durch die perorale Aufnahme von Oozysten oder Gewebszysten (Verzehr von zystenhaltigem Fleisch) kommt es zur Infektion von Fehl-, End- und Zwischenwirt. Es erfolgt die asexuelle extraintestinale Vermehrung mit Bildung von Tachyzoiten und später die Bildung von Gewebszysten, die die Zystozoen/Bradyzoiten enthalten. Diese werden wiederum von Carnivoren bzw. Omnivoren wie Menschen oder Schweine aufgenommen und führen zu einer erneuten Infektion. Bei Katzen kommt es dann nach der ungeschlechtlichen Vermehrung zu einer geschlechtlichen Vermehrung im Dünndarmepithel (enteroepitheliale Phase), bei der die noch nicht infektiösen Oozysten gebildet werden. Durch Kot freigesetzt durchlaufen sie in der externen Phase die Sporulation, bei der die infektiösen Sporozysten entstehen, die wieder von Zwischen- und Endwirt aufgenommen werden können.

## 1.2 Immunantwort auf eine Infektion mit *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* hat Antigene, die zu einer humoralen und auch zellulären Immunantwort führen. So kommt es bei einer Erstinfektion zur Bildung von Antikörpern, die die Verbreitung der Endozoiten limitieren. Durch Bildung von Zysten innerhalb der Wirtszellen ist *Toxoplasma gondii* in der Lage, sich dem Zugriff des Immunsystems zu entziehen, was auch als *Immunevasion* bezeichnet wird. Diese Zysten finden sich vorwiegend im ZNS, in der Skelett- und Herzmuskulatur, gelegentlich auch in der Retina bzw. im Uterus oder anderen Organen. Aufgrund der Tatsache, dass keine Fusion mit Zellbestandteilen der Wirtszelle erfolgt, können keine Peptide vom Toxoplasma produziert werden, die für eine Expression MHC-Molekülen notwendig wären, um dem Immunsystem eine Infektion durch *Toxoplasma gondii* anzuzeigen (Janeway et al. 1999). Dennoch werden permanent Antigene freigesetzt, so dass durch das aktivierte Immunsystem eine Neuinfektion nicht möglich ist (Kayser et al. 1999).

Kommt es zur einer Infektion von anderen Zellarten, zum Beispiel Fibroblasten, so produzieren diese G-CSF und GM-CSF, so dass auch neutrophile Leukozyten und Makrophagen aktiviert werden (Channon et al. 2002).

Bei den zellulären Mechanismen ist auch IFN $\gamma$  bedeutsam (Pfefferkorn et al. 1984/1986). Es induziert in CD8<sup>+</sup>-Zellen und Killerzellen zytotoxische Eigenschaften (Sher et al. 1995) und mindert die intrazelluläre Vermehrung im Makrophagen (u. a. durch Aktivierung der sog. IDO). Bei einer chronischen Infektion sind neben den CD8<sup>+</sup>- auch CD4<sup>+</sup>-Zellen involviert, wobei sich so genannte memory cells bilden (Janeway et al. 1999, pp. 407/408). Als humorale Faktoren bei der Bekämpfung einer Toxoplasmose haben sich C5, C6, C7 und C8 als besonders relevant erwiesen (Schreiber et al. 1980).

Zystozoen sind in der Lage, die Zyste zu verlassen, zum Teil ohne sie zur Ruptur zu bringen. Bei Immunkompetenten werden diese in einer lokalen, zellvermittelten Reaktion an einer weiteren Infektion der Umgebung gehindert (Ferguson et al. 1989).

Bei Immundefizienten, also z.B. HIV-Patienten, kann die latente Infektion wieder akut werden. Dies geschieht dann, wenn die CD4<sup>+</sup>-Zahl unter eine kritische Anzahl von 200 Zellen pro  $\mu$ l fällt (Pueyo et al. 1997, Kayser et al. 2001). Vergleichbare Zusammenhänge sind auch bei Chemotherapiepatienten, knochenmarksabladierten Patienten oder Organtransplantierten zu diskutieren.

## 1.3 Klinik

Zu unterscheiden sind hier die Möglichkeiten der postnatalen und der pränatalen Infektion.

### 1.3.1 Postnatale Infektion mit *Toxoplasma gondii*:

Typischer Infektionsweg ist die perorale Aufnahme von Gewebszysten in der Muskulatur von Zwischenwirten (z. B. Schweinemett) oder die Aufnahme von mit Oozysten verunreinigter Nahrung (z. B. ungewaschenes Gemüse).

Bei den meisten Menschen verläuft eine Erstinfektion mit *Toxoplasma gondii* klinisch inapparent, in wenigen Fällen (1%) kommt es zu einer subakuten Lymphadenitis *Piringer*, die sich dann im Halsbereich, seltener in der Axilla oder der Leiste mit Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen manifestiert (Herold, 2001). Die Inkubationszeit beträgt 1-3 Wochen.

Ist jedoch das Immunsystem supprimiert (z.B. durch eine HIV-Infektion) finden sich bei einer Primärinfektion je nach Funktionsfähigkeit der CD4<sup>+</sup>-/CD8<sup>+</sup>-Zellen aufgrund einer septischen Streuung fieberhafte Infekte mit makulopapulösem Exanthem, generalisierter Lymphadenitis, interstitielle Pneumonie, bilateraler Retinopathie, Myokarditis, Hepatosplenomegalie oder Meningoenzephalitis, die letztlich zum Tod führen können.

Häufiger ist jedoch die Reaktivierung einer Infektion bei Immunsupprimierten. Das heißt, dass es zunächst zu einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* gekommen ist, als der Patient noch nicht immunkompromittiert war. Bei Verschlechterung der Abwehrlage tritt dann jedoch eine schwerere Infektion mit den oben beschriebenen Manifestationen zu Tage. So zeigen sich generalisierte oder lokale von Gewebszysten ausgehende Reaktionen. Dabei sind unter den lokalen Manifestationen diejenigen im ZNS zu beachten, etwa 40% der AIDS-Patienten weisen Koagulationsnekrosen und kleinherdige Blutungen mit Umgebungsödem auf, die zu entsprechenden Herdbefunden, epileptischen Anfällen, Hirndruckzeichen, mentale und psychische Störungen führen können. Seltener sind die Lunge oder das Myokard betroffen.

### 1.3.2 Pränatale Infektion mit *Toxoplasma gondii*:

Wichtig zu erwähnen ist auch die Erstinfektion von Schwangeren, da hier die diaplazentare Übertragung des Erregers zu zum Teil schweren

postenzephalitischen Hirnschäden der Frucht durch Hydrozephalus, aber auch zu einer Erblindung aufgrund einer Chorioretinitis (Dutton et al. 1989) führen kann. Ergänzt wird die Trias durch intrazerebrale Verkalkungen. Diese Schädigungen entstehen am wahrscheinlichsten im dritten Trimenon, da zu diesem Zeitpunkt die Plazenta eine höhere Durchgängigkeit für Pathogene als in der Zeit davor besitzt. Zu diesem Zeitpunkt findet auch Reifung des ZNS statt. Als besonders sensibel für Schädigungen erweist sich jedoch die Erstinfektion im ersten Trimenon aufgrund der jetzt ablaufenden Organogenese. Hier reichen die Symptome von Hepatomegalie/Splenomegalie über Myokarditis bis hin zum Abort. Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion verhält sich jedoch umgekehrt proportional zum Ausmaß der Schäden. Aufgrund der stärkeren Durchlässigkeit der Plazenta für Pathogene mit Fortschreiten der Schwangerschaft erhöht sich das Risiko einer diaplazentaren Übertragung. Das heißt, dass eine Infektion des Fetus im letzten Trimenon der Schwangerschaft eher möglich ist, ein Schaden aber, wenn sich die Infektion im ersten Trimenon manifestiert, sehr viel gravierender ist.

Die Mehrzahl der Infektionen laufen nahezu symptomlos ab, erst im Verlauf von Monaten bis Jahren nach der Geburt zeigen sich Folgen wie Retinochorioiditis oder mentale Retardierung (Wen et al. 2003, Miksits, 2004).

Allerdings kommt es zu einer Erstinfektion in der Schwangerschaft nur in 0.6-0.7% der Schwangerschaften, die wiederum nur zu einem Drittel auf den Fetus übertragen werden (Herold, 2001). Jedoch schwanken auch diese Zahlen im europäischen Vergleich.

Hat die werdende Mutter bereits vor der Schwangerschaft bereits eine Infektion mit *Toxoplasma gondii* durchgemacht, so sind eine erneute akute Infektion und damit eine diaplazentare Übertragung weitestgehend ausgeschlossen aufgrund der bereits bestehenden Antikörper gegen *Toxoplasma gondii*.

### **1.3.3 Nachweis:**

Der Nachweis einer *Toxoplasma gondii*-Infektion wird durch Bestimmung von toxoplasmenspezifischen IgG- und IgM geführt (Immunfluoreszenztest = IFT, Enzyme linked Immunosorbant Assay = ELISA u. a.) (Pouletty et al. 1984), (Remington et al. 1985). Aufgrund der besonderen Abwehrlage des Un- und Neugeborenen (Nestschutz durch plazentagängige Antikörper der Mutter, keine eigene Antikörperbildung) sollte hier der Nachweis nicht über die Antikörpersuche sondern der Antigennachweis per PCR in Erwägung gezogen werden, auch wenn

einer hohen Spezifität eine geringe Sensitivität gegenübersteht (Desmonts 1987), (Grover et al. 1990).

#### **1.3.4 Therapie:**

Eine Therapie kann durch Spiramycin, Pyrimethamin und Sulfonamiden erfolgen (Couvreur et al. 1988), (Mehlhorn/Piekarski, 2002), ähnliche Therapieoptionen wurden zuvor im Tierversuch untersucht (Nguyen et al. 1985).

Als Indikation für eine solche Therapie gilt Toxoplasmose bei Immunsupprimierten, Erstinfektion bei Schwangeren und bei kongenital infizierten Neugeborenen. Eine symptomatische Infektion mit *Toxoplasma gondii* bei Immunkompetenten wird jedoch nicht zwingend mit den oben genannten Chemotherapeutika behandelt, oftmals reicht eine symptomorientierte Therapie.

Diese Angaben wurden über die aktuellen Empfehlungen des Robert-Koch-Instituts bezogen, die Autorin möchte jedoch darauf hinweisen, dass sich im Lauf der Zeit aktuellere Therapieempfehlungen ergeben. Diese können unter [www.rki.de](http://www.rki.de) eingesehen werden.

Besondere Beachtung verdient die **Prävention**.

Ebenso einfach wie wichtig sind folgende Maßnahmen:

- Fleisch sollte vor dem Verzehr völlig durchgegart sein (mind. 50°C für 20 Minuten), gepökelte Rohdauerewaren (Salami o. ä.) sind ebenfalls unbedenklich.
- Rohes Gemüse und Früchte vor dem Verzehr waschen.
- regelmäßiges Händewaschen mit Seife nach dem Zubereiten von rohem Fleisch, nach Garten-, Feld- oder anderen Erdarbeiten, nach dem Besuch von Sandspielplätzen
- bei Katzenhaltung Katze nur mit Dosen- oder Trockenfutter ernähren, die Kotkästen sollten täglich mit heißem Wasser gereinigt werden (Cook et al. 2000), (Kapperud et al. 1996).

## **2. Makrophagen und ihre Aufgabe in der angeborenen Immunität**

Das Immunsystem des Menschen gliedert sich in eine angeborene, unspezifische und eine erworbene, spezifische Antwort. Letztere wird durch die im Laufe des Lebens auftretende Exposition des Menschen mit den unterschiedlichsten Keimen ausgelöst und hinterlässt eine meist lebenslange Immunität in Form von Antigen-

spezifischen T-Zellen und Antikörpern, die nach der Exposition mit einem Pathogen gebildet werden. Typischerweise vermitteln Lymphozyten diese Immunreaktion. Da diese Reaktion erst einige Tagen nach vorausgegangener Antigenexposition anläuft (= Schutz vor Reinfektion mit dem gleichen Pathogen), muss also eine erste effektive Immunantwort die Zeit bis zur spezifischen Reaktion überbrücken. Diese wurde schon im 19. Jahrhundert von dem Immunologen E. Metchnikoff gefordert (1905). In dieser zellulären „first line of defense“ stehen neben neutrophilen Granulozyten auch Makrophagen. Des Weiteren gibt es auch eine humorale Immunantwort, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll.

Diese Leukozytenart entsteht aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Aus einer pluripotenten Stammzelle entwickelt sich eine myeloische Vorläuferzelle, die sich weiter in einen Monoblast differenziert. Über die Stufe des Promonozyten entsteht schließlich der Monozyt, der aus dem Knochenmark in das Blut übertritt. Diese Differenzierung läuft über einen Zeitraum von 1 ½ bis 3 Tagen und steht unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren wie IL 3 (Interleukin 3), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor). Während der Reifung kommt es zur Bildung unterschiedlicher Granula innerhalb des Zytoplasmas, deren Enzymzusammensetzung derer der neutrophilen Granulozyten ähnelt.

Nach 40 Stunden treten die Monozyten aus dem Blut in die peripheren Gewebe über, wo sie zu Makrophagen werden. Diese Makrophagen sind ubiquitär vorhanden (Alveolarmakrophagen der Lunge, Bindegewebsmakrophagen, Kupffer'sche Sternzellen der Leber, Langerhans' Zellen der Dermis, im lymphatischen System, um nur einige Beispiele zu nennen), zusammenfassend nennt man die beweglichen Zellen und die gewebsständigen Makrophagen auch das mononukleäre Phagozytosesystem (MPS), ein älterer Name ist auch retikulo-histiozytäres System (RHS) oder auch RES (retikulo-endotheliales System), der von Aschoff eingeführt wurde.

Schon Metchnikoff erkannte eine wichtige Eigenschaft der Makrophagen, nämlich die Endozytose. Diese gliedert sich in die Pinozytose (Aufnahme von löslichen Substanzen) und in die Phagozytose („Fressen“) von Mikroorganismen, Fremdkörpern und Zelltrümmern. Diese können den doppelten Durchmesser der Makrophagen betragen. Die sofortige oder auch unspezifische Phagozytose von Mikroorganismen ohne vorhergehende Exposition ist ein wichtiger Faktor bei der Immunantwort.

Im Gegensatz dazu steht die spezifische Aufnahme eines Pathogens. Dabei ist dieses schon opsoniert, d.h. die Oberfläche ist mit Proteinen des Komplementsystems oder Antikörpern besetzt (humorale Abwehr), die von Fc- und Komplement-Rezeptoren der Makrophagen erkannt werden können und zur Ingestion des Fremdkörpers führen. Daneben besitzt der aktivierte Makrophage noch andere Oberflächenrezeptoren: CD14 u. a. zur Bindung von LPS, das von gramnegativen Bakterien sezerniert wird, CD 11c/18 bzw. CD 11b/18, Rezeptoren für Mannose und Glycan und auch den sog. Scavenger-Rezeptor, der sialidierte Liganden bindet. Die ingestierten Pathogene werden in den Makrophagen in Phagosomen transportiert, die dann mit Lysosomen zu Phagolysosomen fusionieren. In ihnen beginnt dann die Destruktion des Materials. Dazu stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung: Durch Azidifikation bei pH 3.5-4.0 kommt es zur Bakteriostase bzw. zur Bakteriozidie. Daneben steht Produktion von toxischen Sauerstoffmetaboliten (Superoxid  $O_2^-$ , Wasserstoffperoxid,  $O_2$ -Radikal, Hydroxylradikal  $OH\cdot$  und Hypochlorit  $OCl$ ) und Stickstoffmetaboliten (NO, dessen Produktion von einem Enzym, der iNOS, katalysiert wird (Chao et al. 1993), (Oberdörfer et al. 2003). Als weiterer Mechanismus ist die Bildung von antimikrobiellen Peptiden wie Defensine und kationische Proteine zu nennen, Enzyme wie Lysozym (löst die Zellwand grampositiver Bakterien auf) und saure Hydrolasen (Bakterienverdau) und Kompetitoren wie Laktoferrin (Tanaka et al. 1996), (Wakabayashi et al. 2003) und Vit. B<sub>12</sub>-bindendes Protein.

Letztlich können Makrophagen MHC I und II-Moleküle exprimieren, die zur spezifischen Abwehr von Pathogenen zählen. Unterstützt wird diese Expression durch IL-4 (Stuart et al. 1988).

Nicht zu vernachlässigen ist im Besonderen das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), deren Effekte im Rahmen der hier beschriebenen Arbeiten im Mittelpunkt stehen und daher in Abschnitt I.4 genauer erläutert werden. Siehe auch (Murray et al. 1989), (Suzuki 2002).

Sowohl Nachteil als auch Vorteil ist, dass dadurch die Umgebung ebenfalls Schaden davon trägt. So wird auch gesundes Gewebe geschädigt, gleichzeitig haben die Makrophagen Einfluss auf Tumorgewebe und größere Parasiten, die sie nicht phagozytieren können.

Eine weitere wichtige Aufgabe der Makrophagen ist die Sekretion verschiedenster Moleküle: Zytokine wie die Interleukine IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 und  $TNF\alpha$ , Plasminogenaktivator (Hämostasie), Phospholipase und Entzündungsmediatoren wie

Prostaglandine und Leukotriene, Plättchen-Agglutinationsfaktor (PAF) und Komplementfaktoren (z.B. C1-5, Inaktivierung von Antigenen u. a. durch Lyse und Opsonisierung).

Die Verknüpfung zwischen unspezifischer und erworbener, spezifischer Immunantwort kommt durch die Eigenschaft der Makrophagen zustande, dass sie neben dendritischen und B-Zellen in der Lage sind, als Antigen-Präsentierende Zellen (APC) T-Zellen zu aktivieren. Dabei erfolgen zwei Schritte:

1. Antigenpräsentation, nachdem das Pathogen phagozytiert und prozessiert wurde. Dabei ist es wichtig, dass sich der Makrophagen als körpereigene Zelle durch Exprimierung von MHC-II-Molekülen als körpereigen kenntlich macht.
2. Sekretion von IL-1. Dabei erfolgt die Antigenpräsentation potenter, aber auch differenzierter, wenn durch die Aktivierung der Makrophagen vermehrt MHC-II- und B7-Moleküle, CD40- und  $\text{TNF}\alpha$ -Rezeptoren auf der Makrophagenoberfläche vorhanden sind.

Aktiviert werden die Makrophagen durch  $T_H1$ -Zellen, die mittels  $\text{IFN}\gamma$  und CD40 die Aufnahme des zu phagozytierenden Materials fördern. Sind Makrophagen selbst chronisch infiziert und stehen damit der Immunabwehr nicht mehr zur Verfügung, so wird mittels Fas-Ligand und  $\text{TNF}\beta$  die Zelle abgetötet, die Bakterien freigesetzt und von frischen Makrophagen phagozytiert. Dabei sorgen IL-3 und GM-CSF für Nachschub aus dem Knochenmark. Leukotriene und  $\text{TNF}\alpha$  erleichtern den Monozyten die Diapedese aus dem Blutstrom ins entzündete Gebiet. Angelockt werden die Makrophagen durch den MAF (Makrophagenaktivierungsfaktor), und durch den MIF (Migrationshemmfaktor) am Ort des Geschehens gehalten. Bei großen Gebieten kann es mittels des MFF (Makrophagen-Fusionsfaktor) zur Fusionierung zu Riesenzellen kommen.

Zusammenfassend haben die Makrophagen also insbesondere folgende Aufgaben: die Sekretion von Stoffen, die die Immunantwort regulieren, die Antigenpräsentation, aber vor allem auch ihre Aktivität in der angeborenen Immunität als „First line of Defense“ durch ihre Fähigkeit zur unspezifischen Phagozytose und Eliminierung oder Reduktion der Zahl des Pathogens. Siehe auch (Murray et al. 1979,1980) und (Stafford et al. 2002).

### **3. Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) [EC 1.13.11.42]**

Hierbei handelt es sich um ein Häm-tragendes Enzym mit ungefähr 400 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 45,329 kDa. Es zählt zur Gruppe der Oxygenasen. Einer der Erstbeschreiber im Hinblick auf biochemische Eigenschaften war Shimizu (Shimizu et al. 1978). Die Aufgabe von IDO besteht in der Umwandlung von Tryptophan und anderen Indolderivaten zu Kynurenin (Taylor et al. 1991). Die IDO wird von vielen menschlichen Geweben produziert, wie z.B. dem Gehirn, der Lunge, der Plazenta, aber auch von Makrophagen.

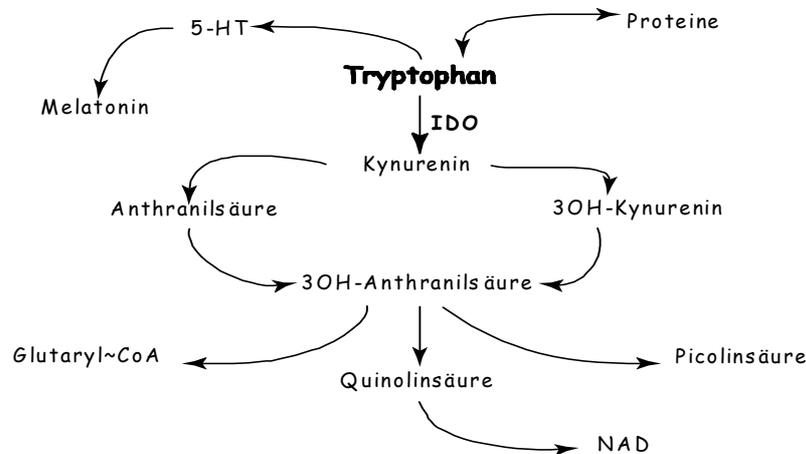
Dabei wird die Expression von IDO durch Interferon gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) induziert (Murray et al. 1985). Dieser Effekt wird durch Tumor Nekrose Faktor alpha ( $\text{TNF}\alpha$ ) verstärkt (Däubener et al. 1996), (Sibley et al. 1991). Aber auch Lipopolysaccharid (LPS) und Muramyltripeptid sind dazu in der Lage (Hissong et al. 1995) Im Gegensatz dazu sind IL-10, TGF beta and IL-4 als Inhibitoren der IDO bekannt (MacKenzie et al. 1999, Musso et al. 1994).

$\text{IFN}\gamma$  wird vor allem von T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen sezerniert (Janeway et al. 1999). Neben der Induktion der Expression von MHC-II-Antigenen durch Makrophagen ist  $\text{IFN}\gamma$  in der Lage, durch Aktivierung der IDO das Wachstum von Bakterien (Däubener et al. 1999), (MacKenzie et al. 1998), Tumorzellen (Takikawa et al. 1988/1990), (Yoshida et al. 1988), aber auch das von intrazellulären Parasiten, z.B. von *Toxoplasma gondii* (Dai et al. 1994), aber auch von Chlamydien (Byrne et al. 1986), zu hemmen. Weitere Nachweise für das intrazelluläre Wachstum von *Toxoplasma gondii* wurden auch durch andere Arbeitsgruppen erbracht (Nathan et al. 1983/1984), (Pfefferkorn et al. 1984), (Suzuki et al. 1988).

Zusätzlich spielt die IDO-Aktivität im Rahmen von intrazerebralen inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle (Chiarugi et al. 2001), (Däubener et al. 1997), (Oberdörfer et al. 2003), (Kwidzinski et al. 2003).

Die oben erwähnten Aspekte beruhen unter anderem auf den Verbrauch von Tryptophan, eine Aminosäure, die für die meisten Zellen/Protozoen essentiell ist (Pfefferkorn 1984/1986), (Carlin et al. 1989). Dabei baut die IDO das Tryptophan mit Hilfe von Wasserstoffperoxidradikalen zu N-Formylkynurenin und über eine ubiquitäre Formaminidase zu L-Kynurenin ab (Thomas et al. 1999, Shimizu et al.

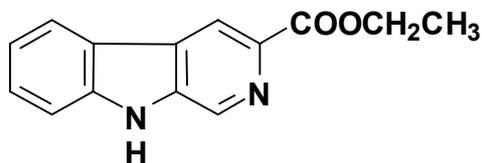
1978). Als weitere Metabolite entstehen unter anderen auch 3OH-Kynurenin und Quinolinsäure (Moroni, 1999). Siehe auch das folgende Schaubild:



**Abb. A3:** Abbauewege des Tryptophan durch die IDO.

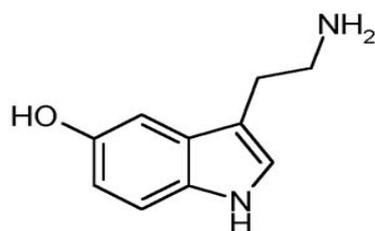
#### 4. Norharman

Norharman zählt zu den natürlich vorkommenden  $\beta$ -Carbolinen. Diese sind kationisch-amphiphile Substanzen mit einem heterotrizyklischen Ringsystem.

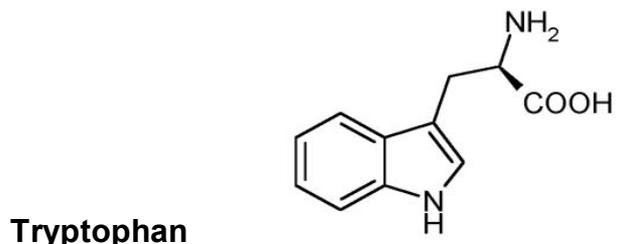


**Norharman**

Aufgrund dessen ist Norharman im sauren Bereich sehr viel besser löslich als bei physiologischem pH-Wert. Ein weiteres bekanntes  $\beta$ -Carbolin ist z.B. Serotonin. Auch bei Tryptophan ist eine strukturelle Verwandtschaft zu erkennen:



**Serotonin**



**Tryptophan**

Aus diesem Grund liegt es nahe, anzunehmen, dass die hemmende Eigenschaft von Norharman auf die IDO-Aktivität unter anderen so zu erklären ist, dass Norharman

als kompetitiver Antagonist (wegen der vergleichbaren räumlichen Struktur) agieren kann (Eguchi et al. 1984).

Norharman, wie auch andere  $\beta$ -Carboline, kommen in diversen Säugetiergeweben vor, so sind neben Hirnregionen wie die Substantia nigra (Pawlik et al. 1990) auch das Nebennierenmark und die Leber zu nennen. Bei chronischen Alkoholikern finden sich erhöhte Werte, die im Zusammenhang mit der Abhängigkeit zu stehen scheinen (Badawy et al. 1998), (Rommelspacher et al. 1991), (Stawowy et al. 1999).

Aufgrund ihres Vorkommens im Gehirn, vor allem aber wegen der Wirkungen als Antagonist an Serotonin-, Dopamin- und Benzodiazepin-Rezeptoren werden die– bei Ratten beobachteten– psychotropen Effekte (epileptiforme Krämpfe, Agitation, aber auch Halluzinationen) erklärbar (Naranjo et al. 2001).

Des Weiteren sind von Klinker, Rommelspacher et al. 1997 stimulatorische Effekte auf G-Proteine gezeigt worden (Klinker et al. 1997). Die genaue Interaktionsweise ist jedoch noch ungeklärt.

Wie im Nachfolgenden gezeigt wird, hat Norharman einen hemmenden Einfluss auf die IDO-Aktivität.

## **5. Zielsetzung der Arbeit**

Wie so oft, stellt sich die Frage nach Sinn oder Unsinn einer wissenschaftlichen Fragestellung, vor allem, wenn kein direkter praktischer Nutzen ersichtlich ist. Daher soll an dieser Stelle erläutert werden, vor welchem Hintergrund die Arbeit entstanden ist.

In der ärztlichen Praxis begegnen uns viele Aspekte, die mit dieser Arbeit in Verbindung stehen. Im Bereich der Schwangerschaftsvorsorge, aber auch im Hinblick auf die zunehmende Anzahl von HIV-Erkrankungen spielt die Verhinderung einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* eine nicht unwesentliche Rolle bei der Gesundheitsvorsorge der einzelnen Bevölkerungsgruppen. So kann die Erforschung der immunologischen Grundlagen viele Erkenntnisse gerade im Hinblick einer Therapie bringen.

Daher ist es spannend, mehr über die molekularbiologischen Mechanismen der Infektion zu erfahren und immunologische Mechanismen zu untersuchen, die Einfluss auf das Wachstum von Toxoplasmen haben.

Eine der ersten und relevantesten Stationen des Immunsystems des Menschen sind die Makrophagen. Sie sind in der Lage, die Infektion mit Toxoplasmen einzudämmen. Diesen Prozess nennt man Toxoplasmostase. Dabei existieren einige antiparasitäre Effektormechanismen, z.B. die Bildung von Stickoxiden durch die induzierbare Stickoxid-Synthase (iNOS) (Adams et al. 1990), Eisendepletion (Dimier et Bout, 1998) oder die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst) (Nathan et al. 1983, Aline et al. 2002).

Im Vordergrund der Betrachtung steht allerdings die Indoleamin-2,3-dioxygenase (IDO), ein Enzym der Makrophagen, das in der Lage ist, eine Toxoplasmostase hervorzurufen. Dies geschieht durch Tryptophandepletion (Pfefferkorn, 1984/1986). Unentbehrlich ist dabei die Stimulation des Makrophagen durch diverse Zytokine, wie  $IFN\gamma/TNF\alpha$ . Diese Effekte sind bereits gut untersucht (Carlin 1989). Im Rahmen dieser Doktorarbeit gilt es, diese Erkenntnisse zu verifizieren, da sie eine wichtige Grundlage für die nachfolgenden Versuche bilden.

Wie jedes Enzym kann auch die IDO in ihrer Funktion gehemmt werden. Neben Verbindungen wie 6-Chloro-D, L-Tryptophan oder 4-Chloro-3-Hydroxyanthranilat ist das  $\beta$ -Carbolin Norharman einer der prominentesten Inhibitoren. Durch die Versuche von Saito et al. 1993 und 1994 wurde bekannt, dass die Aktivität von IDO auch in Anwesenheit von Norharman gehemmt werden konnte.

Diese Resultate führten zu der Überlegung, ob es nicht möglich sei, dass die Toxoplasmen wieder wachsen könnten, wenn der wichtigste toxoplasmostatische Faktor, die IDO, durch Norharman ausgeschaltet würde.

Während der praktischen Phase zeigte sich, dass die initiale Fragestellung, ob durch die Inhibition der IDO durch Norharman die Toxoplasmen wieder wachsen könnten, nicht weiter verfolgt werden konnte. Vielmehr drängte sich die Frage auf, welchem Wirkungsmechanismus die Inhibition der Indoleamin-2,3-dioxygenase durch Norharman zugrunde liegen könnte.

Die Erforschung von Norharman birgt einige Erkenntnisse auf die molekularbiologischen Abläufe, gerade auf immunologischer Basis, aber auch im Hinblick auf neurophysiologische Prozesse im Bereich der Signalübertragung. Und interessanterweise tritt hier das Tryptophan in Erscheinung, denn auch hier hat Tryptophan wichtige Funktionen, zum Beispiel als Vorläufer des Neurotransmitters Serotonin.

Aufgrund der sterischen Verwandtschaft mit Tryptophan liegt als Inhibitionsmodus ein räumlicher Antagonismus nahe. Es zeigte sich, dass eine Konkurrenz

Tryptophan/Norharman nicht als einziger Faktor für die geminderte IDO-Aktivität in Frage kam.

Daher wurde die Aufgabenstellung modifiziert. Im Mittelpunkt des Interesses stand dann, herauszufinden, auf welche Art und Weise Norharman in der Lage ist, die IDO zu hemmen. Hierzu wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewendet, die nachfolgend beschrieben werden sollen.

## B Material und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1 Materialliste

Material	Quelle
ABS (Humanserum der Blutgruppe AB)	Bio Whittaker Molecular Applications (Rockland, ME, USA)
Acrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, D.)
Agarose	Biozym (Hamburg, D.)
alk. Phosphatase gekoppelte Anti-DIG-Antikörper	Roche Diagnostics (Mannheim, D.)
6-Aminohexansäure	Merck (Darmstadt, D.)
Anti-IDO-Antikörper (Maus)	O.Takikawa, University of Wollongong, Australia
Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt, D.)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, D.)
BSA-Standard	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Boehringer (Mannheim, D.)
CDP-Star	Roche Diagnostics (Mannheim, D.)
Coomassie Brilliantblau G 250	Sigma (Deisenhofen, D.)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	sigma (Deisenhofen, D.)
DIG	Roche Diagnostics (Mannheim, D.)
Dithiothreitol	plus one
EDTA/Tritriplex	Merck (Darmstadt, D.)
Ehrlich`s Reagenz	sigma (Deisenhofen, D.)
Enhanced Chemiluminescence System (ECL)	Amersham Pharmacia Biotech AB (Piscataway, NJ, USA)
Erwachsenen-Makrophagen = PBMDM (peripheral blood monocyte derived macrophage)	Freiwillige gesunde erwachsene Spender, Buffy coats der Blutspendezentrale der HHUD s.u. *
Essigsäure, 96% bzw. 100%	Merck (Darmstadt, D.)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, D.)
Ethidiumbromid	sigma (Deisenhofen, D.)
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Ficoll-Paque™ Research Grade	sigma (Deisenhofen, D.)
Filmentwickler	Kodak (Stuttgart, D.)
Fixierer	Kodak (Stuttgart, D.)
Formaldehyd	Merck (Darmstadt, D.)
Formamid	Merck (Darmstadt, D.)
Glycerin	Merck (Darmstadt, D.)
Guanidiniumthiocyanat (GSCN)	sigma (Deisenhofen, D.)
Hydrocortison	sigma (Deisenhofen, D.)

Interferon gamma (IFN $\gamma$ )	R&D Systems (Wiesbaden, D.)
IMDM = Iscove`s modified Dulbecco`s medium	Gibco, Grand Island, NY Bio Whittaker Europe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt, D.)
Kaliumphosphat	Merck (Darmstadt, D.)
Katalase	sigma (Deisenhofen, D.)
Leupeptin	sigma (Deisenhofen, D.)
L-Glutamin	sigma (Deisenhofen, D.)
Liquemin N 25000	Roche Diagnostics (Mannheim, D.)
Low Range Standard (14,4-97,4 kD)	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, D.)
L-Tryptophan	sigma (Deisenhofen, D.)
MACS Reagent CD14 micro beads	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach, D.)
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck (Darmstadt, D.)
Maleinsäure	Merck (Darmstadt, D.)
Mausfibroblasten L929	ATCC/LTC Promochem (Wesel, D.)
Methylenblau	sigma (Deisenhofen, D.)
Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt, D.)
Milchpulver	Oxoid Ltd.(Basingstoke, GB)
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	sigma (Deisenhofen, D.)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, D.)
Natriumphosphat	Merck (Darmstadt, D.)
Nitrocellulose-Membran (Protran)	Schleicher & Schuell (Dassel, D.)
N-Laurylsarcosine	sigma (Deisenhofen, D.)
Norharman	sigma (Deisenhofen, D.)
Paraffin	Merck (Darmstadt, D.)
PBS-Puffer pH 7,3	Serag Wiessner (Naila, D.)
Pefabloc	Boehringer (Mannheim, D.)
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt, D.)
Pferde-Serum (PS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Plasmid Purification Kit	Quiagen (Hilden, Deutschland)
Ponceaurot S	Serva Feinbiochemica (Heidelberg, D.)
RNA-Größenmarker	Invitrogen (Karlsruhe, D.)
RPMI mit L-Tryptophan	Gibco (Grand Island, NY, USA)
RT-PCR-Kit	BD Biosciences Clontech (Heidelberg, D.)
Salzsäure/HCl 37%	Merck (Darmstadt, D.)
Sulfosalicylsäure	Merck (Darmstadt, D.)
TNF $\alpha$	R&D Systems GmbH (Wiesbaden, D.)
Toxoplasma gondii, Stamm BK	freundl. Gabe von Prof. Seitz,

	Institut für Parasitologie, Univ. Bonn
Trichloressigsäure (TCE)	Merck (Darmstadt, D.)
Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris-HCl)	Merck (Darmstadt, D.)
Tritium-Uracil	Amersham Pharmacia Biotech AB, (Piscataway, NJ, USA)
Trypan-Blau	sigma (Deisenhofen, D.)
Trypsin-EDTA	Biochrom KG (Berlin, D.)
Tween 20	Merck (Darmstadt, D.)
Wasserstoffperoxid	Merck (Darmstadt, D.)
Xylencyanol	Merck (Darmstadt, D.)

## 1.2 Kulturmedien

**Iscove´s modifiziertes Dulbecco´s Medium (IMDM)** mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser, wurde als Ausgangsbasis für folgende Medien genommen:

**IMDM + 2% ABS:** Auf ein Gesamtvolumen von 500 ml werden 10 ml Humanserum der Blutgruppe AB gegeben und mit IMDM ergänzt.

**IMDM + 5% FCS:** Es werden 25 ml Fetal Calf Serum (FCS) mit IMDM-Medium auf 500 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Das FCS wird zuvor für 30 Minuten auf 56°C erhitzt, um Komplement zu deaktivieren.

Zusätzlich wird den Medien 3g/l Natriumhydrogencarbonat und 50 µM β-Mercaptoethanol sowie 1% Glutamin hinzugefügt.

**LTC-Medium (Long Term Culture):** 62,5ml FCS, 62,5ml Pferde-Serum,

4ml L-Glutamin, 50 µM Mercaptoethanol, 50 µl Hydrocortison mit IMDM auf 500ml auffüllen, dabei sollte alles vor der Benutzung steril filtriert werden. Verfahren nach Ye, Z.Q. et al 1994.

**RPMI-Medium** als Fertigmedium von Gibco, ebenfalls mit Serum-Zusätzen:

**RPMI + 2% ABS:** Auf ein Gesamtvolumen von 500 ml werden 10 ml Humanserum der Blutgruppe AB gegeben und mit RPMI aufgefüllt.

**RPMI + 5% FCS:** Es werden 25 ml Fetal Calf Serum mit RPMI-Medium auf 500 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Alle Medien werden mit Hilfe eines 0,2 µm MediaKap 5 Sterilfilter (Microgon, Laguna Hill, USA) steril hergestellt und vor der Verwendung einer Sterilitätskontrolle unterzogen. Auf die Zugabe von Antibiotika wird verzichtet, um Verunreinigungen mit Bakterien frühzeitig erkennen zu können.

## 1.3. Puffer und andere Reaktionsgemische:

**Reaktionspuffer für die IDO-Messung im Zell-Lysat:**

- 800 µM L-Tryptophan
- 20µM Methylenblau

- 40 mM Ascorbat
- 100mM Kaliumphosphat

(Der aus den o. g. Komponenten hergestellte Puffer kann aliquotiert und eingefroren werden.)

- 10 µg/ml Katalase

Der Reaktionspuffer wird im Verhältnis 1:1 zu dem Lysat gegeben. Es ist darauf zu achten, dass die Katalase dem Reaktionspuffer erst kurz vor Versuchsbeginn hinzugefügt wird, damit dieses Enzym erst im Versuch aktiviert wird.

### **DEPC-Wasser**

500 µl DEPC-Reagenz (Diethylpyrocarbonat) pro 1000 ml Aqua bidest.

Über Nacht unter einem Abzug reagieren lassen, um die im Wasser vorhandenen RNAsen zu inaktivieren. Am Folgetag autoklavieren, dabei zerfällt das sehr giftige DEPC in Kohlendioxid und Ethanol und wird damit unschädlich.

### **Weitere Puffer/Reaktionsgemische in der Übersicht:**

<b>Anodenpuffer I</b>	- 30 mM Tris-HCl - 20% (v/v) Methanol
<b>Anodenpuffer II</b>	- 300 mM Tris-HCl - 20% (v/v) Methanol
<b>Blockpuffer</b>	- 5% (w/v) Milchpulver in PBS
<b>Bradfordreagenz</b>	- 0,1% Coomassie Brilliantblau G 250 - 7,5% (v/v) Essigsäure - 40% (v/v) Methanol
<b>Kathodenpuffer</b>	- 25 mM Tris-HCl - 4 mM 6-Aminohexansäure - 20% (v/v) Methanol
<b>MOPS-Puffer (10x)</b>	- 1,08% (w/v) Natriumacetat - 4,12% (w/v) MOPS (3-N-Morpholinopropansulfonsäure) in 800ml DEPC-Wasser lösen und auf pH 7,4 einstellen

	- 20ml EDTA hinzufügen, auf 1l mit DEPC-Wasser auffüllen
<b>PBS- Puffer (als Waschmedium)</b>	- 0,8 % (w/v) NaCl - 0,02% (w/v) KCL - 0,135% (w/v) KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O - 0,025% (w/v) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Ponceau S-Stammlösung</b>	- 2% Ponceau S - 30% Trichloressigsäure; - 30% Sulfosalicylsäure
<b>5x SDS-Probenpuffer für Proteingele (Laemmli-Puffer)</b>	- 10% SDS - 0,4M Tris-HCl pH 6,8 - 25% (v/v) Glycerin - 5% β-Mercaptoethanol - 0,1% Bromphenolblau
<b>Trenngelpuffer</b>	- 1,5M Tris-HCl pH 8,8 - 0,1% SDS

#### 1. 4 Geräte und Verbrauchsmittel

Analysenwaage	Mettler-Toledo (Giessen, D.)
Basic 96 Harvester	Skatron/Molecular Devices (München, D.)
Blotting Chamber	Schleicher & Schuell (Dassel, D.)
CO <sub>2</sub> -Brutschrank	Heraeus (Hanau, D.)
Cryotubes	Nunc (Wiesbaden, D.)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, D.)
Filterpapier, 3mm	Whatman International Ltd. (Brentford, GB)
Flüssigszintillationszähler	LKB Wallac
Gelelektrophoresekammer	Febikon Feinmechanik (Wermelskirchen, D.)
Heizblock	Thermo-Dux (Wertheim, D.)
Kühlzentrifuge	Heraeus (Hanau, D.)
Light Box	LKB Wallac
Magnetrührer	Heidolph (Schwabach, D.)
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach, D.)
Mikroskope	Zeiss (Oberkochen, D.)

Multiwell Platten, steril	Greiner (Flacht, D.)
Neubauer-Zählerkammer	Neubauer
PCR-Gerät	Biorad (Hercules CA,USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biorad (Hercules CA,USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA)
Pipettenspitzen	Biorad (Hercules CA,USA)
Pipettenspitzen, steril und gestopft	Biozym (Hamburg, D.)
pH-Meter	Knick (Berlin, D.)
Photometer	Tecan (Crailsheim, D.)
Printed Filtermat	LKB Wallac
Reaktionsgefäße	BD Biosciences Clontech (Heidelberg, D.)
Realtime-PCR Gerät	Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Sample Bag	LKB Wallac
Scientific Imaging Film X-OMAT AR	Kodak (Stuttgart, D.)
Serumpipetten, steril	BD Biosciences Clontech (Heidelberg, D.)
Sterilfilter (0,22µM, 0,44µM)	Schleicher & Schuell (Dassel, D.)
Ultrazentrifuge	Beckmann (München, D.)
UV-Photometer Gene Quant II	Amersham Pharmacia Biotech AB, (Piscataway, NJ, USA)
Vortex-Gerät	Labinco (Breda, NL)
Zellkulturflaschen (25/75 cm <sup>2</sup> )	Corning Inc., (Corning, NY, USA)
Zellkulturzentrifuge	Hettich (Tuttlingen, D.)

## **2. Herkunft der Zellen und Protozoen**

### **2.1 Herkunft der Makrophagen**

Verwendet wurden Makrophagen von Erwachsenen. Diese wurden aus peripherem Blut frisch gewonnen. Daher stammt die Abkürzung PBMDM: peripheral blood monocyte-derived-macrophages.

Dazu entnimmt man entweder einem gesunden Erwachsenen bis zu 100ml Vollblut, oder verwendet so genannte Buffy coats:

Zur Herstellung von Erythrozytenkonzentraten werden Frischblutkonserven zentrifugiert (lt. Transfusionsmedizin/Plasmafraktionierung Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: 20 min. bei 3740 rpm, bei 20°C). Durch diesen Vorgang lagert sich auf der Erythrozytensäule ein Zellgemisch auf, das überwiegend Leukozyten, aber auch Erythrozyten und Thrombozyten enthält. Das Zellgemisch erhält man dadurch, dass durch Kompression des Blutspendebeutels am oberen Ende Plasma in einen weiteren Beutel läuft (dies wird nach einem halben Jahr Quarantäne-Lagerung als FFP = Fresh Frozen Plasma weiter verwendet). Aus dem unteren Ende läuft die Erythrozytensäule ab, die als Erthrozytenkonzentrat benutzt wird. Aus dem restlichen Zellgemisch werden die Makrophagen präpariert (s. Abb. B 3.1).

Im Vergleich zu der Blutabnahme direkt im Labor (max. 100 ml) standen hier die Zellen aus ca. 500 ml Blut zur Verfügung, so dass die Menge an Makrophagen um ein Vielfaches (Faktor 3-8) größer ist.

### **2.2 Herkunft der humanen Glioblastomzellen**

Die sogenannten A2-Zellen entstammen der Glioblastom-Zelllinie 86HG39, die freundlicherweise von Prof. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt wurde (Bilzer et al. 1991). Sie wurden zwischen der 140. und der 200. Passage in den Experimenten verwendet bei einer durchschnittlichen Passagezeit von 2-3 Tagen. Auch nach vielfacher Passage waren die Zellen noch für den Astrozyten-Marker GFAP (Glial Fibrillary Acid Protein) positiv. Sie besitzen die besondere Eigenschaft, sehr vielIDO zu produzieren, so dass Effekte auf dieses Enzym leicht nachzuweisen sind.

Da es sich hier nicht um Primärzellen handelt, sondern um Tumorzellen, die sich gut in Zellkultur aufgrund der leichteren (und kostengünstigeren) Handhabung vermehren lassen, wurde ein Teil der Versuche auch mit diesen Zellen durchgeführt.

### **2.3 Herkunft der Toxoplasmen**

Verwendet wurden Tachyzoiten des BK-Stammes von *Toxoplasma gondii*, die uns freundlicherweise von Prof. Seitz, Institut für Parasitologie, Bonn zur Verfügung gestellt wurden. Da es sich wie beschrieben um intrazelluläre Parasiten handelt, werden sie in einer Mausfibroblasten-Kultur der Zelllinie L929 gehalten, die damit als Wirt für die Toxoplasmen dient.

### **2.4 Herkunft der Maus-Fibroblasten**

Die Maus-Fibroblastenzelllinie L929 sind normale Zellen des subcutanen Gewebes der Maus und sind über die Firma ATCC Rockville, Maryland, USA (Katalog-Nr. CCl1) zu beziehen. Es handelt sich hierbei um eine der ersten etablierten kontinuierlichen Zelllinien (Earle et al. 1943).

### **3. Zellkulturtechniken**

#### **Allgemein:**

Alle Zellkulturen wurden in 10ml oder 50ml Kulturflaschen in einer mit 10% CO<sub>2</sub> angereicherten und wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C kultiviert.

#### **3.1 Präparation von PBMDM und Differenzierung über CD14-Antikörper**

PBMDM wurden von gesunden Spendern gewonnen.

Die Aufarbeitung erfolgte mittels Auftrennung durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Dabei wurde das Blut, das entweder aus Buffy coats oder direkt von erwachsenen Spendern stammt, im Verhältnis 2:1 mit sterilem PBS verdünnt. Dies wurde dann vorsichtig in einem 50 ml-Falcon®-Tube auf 15 ml Ficoll überschichtet. Dies ist möglich, weil das Blut-PBS-Gemisch eine kleinere Dichte hat als Ficoll.

Danach wurden die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von den dichteren Granulozyten und Erythrozyten durch Zentrifugation (bei 1020 g für 30 min bei 8°C) getrennt. Die als gelblich-weiße Schicht deutlich zu erkennenden PBMCs wurden abpipettiert. Es erfolgte die weitere Auftrennung von Monozyten von Lymphozyten durch einen CD14-Antikörper. Dabei bediente man sich eines Antikörpers, der gleichzeitig mit Eisen-haltigen Gel-Kugeln gekoppelt ist. Der Antikörper bindet die CD14-positiven Zellen, also die Monozyten. Mittels Magnet-Elution (Midi-Macs®) gelang es, die von dem Antikörper gebundenen Monozyten zu gewinnen.

Diese wurden zu 10<sup>5</sup> Zellen/well auf einer 96-well culture-cluster-Platte der Fa. Costar® in Iscove`s-Medium + 2% ABS ausplattiert.

Nach ungefähr 7 Tagen, in denen die Monozyten im Brutschrank zu Makrophagen ausgereift sind, wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

#### **3.2 Präparation von PBMDM für einen Northern Blot**

Auch hier wurden große Zellzahlen benötigt, um eine ausreichende Menge an RNA gewinnen zu können. Dazu bediente man sich wieder eines Buffy coats, der wie in 3.1 beschrieben bis zur Stufe der PBMCs genauso präpariert wurde. Danach erfolgte eine Differenzierung über Plastikadhärenz (Carlin et al. 1989). Dazu wurde das Pellet mit den PBMCs in 4 ml IMDM + 2% ABS gut resuspendiert und in vier bis fünf

Flaschen verteilt, je nach Anzahl der Zellen. Die Kulturflaschen wurden mit jeweils 10-15 ml IMDM + 2% ABS gefüllt und für eine Stunde in den Brutschrank gestellt. Dann erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem alle nicht am Flaschenboden adhärenente Zellen ebenfalls entfernt wurden. Die besondere Eigenschaft der Monozyten ist es, sich an Oberflächen wie dem Flaschenboden zu adhären, so dass dies eine einfache Methode der Differenzierung ist. Die Monozyten reifen im Laufe einer Woche in der Flasche zu Makrophagen. Es wurde IMDM + 2% ABS hinzugefügt, und zwar 15 ml pro Flasche. Die Zellen blieben weiterhin größtenteils adhären, dies ist jedoch ohne Nachteil, da sie innerhalb der Flasche für die RNA-Präparation lysiert wurden und ein Auszählen nicht nötig war. Die Zellen wurden nach einer Woche Reifung mit IFN $\gamma$  stimuliert und- je nach Versuchsansatz- mit Norharman versetzt. Sie wurden dann 24 (-48) h nach Zugabe weiter aufbereitet für die RNA-Gewinnung. Größere Zeitabstände sind nicht empfehlenswert, da zu diesem Zeitpunkt die zu untersuchende RNA zu großen Teilen abgebaut sein dürfte.

### **3.3 Kultur und Ernte der Glioblastomzellen**

Die Zellen wurden in 50 ml Flaschen kultiviert, als Medium diente Iscove`s-Medium mit 5% FCS-Zusatz.

Alle 2-3 Tage mussten die Zellen passagiert werden. Dabei erfolgte die Wachstumskontrolle mikroskopisch. Sobald sich erkennen ließ, dass die Zellen mit mehr als einer Schicht den Boden der Kulturflasche bedeckten, war eine Entnahme der Zellen angebracht.

Hierzu wurde das Nährmedium abgezogen, die Flasche mit 5-10 ml (je nach Flaschengröße) PBS gespült und 3-5ml Trypsin-EDTA hinzugefügt. Dieses bewirkte durch Andauen der Zellfortsätze eine Ablösung der Zellen von ihrem Untergrund, so dass sich die Zellen nach 2-5 Minuten losklopfen ließen. Durch Zugabe von 5-10 ml Nährmedium wurde das Trypsin-EDTA verdünnt, das sonst zu einer Zell-Lyse führen würde, so dass die Zellen nicht weiter verwendet werden konnten.

Sollten die Zellen für Versuche gewonnen werden, nahm man bis auf 1-2 ml die Lösung aus der Flasche, gab sie in einen Falcon®-Tube (50ml), verdünnte nochmals mit 10-20 ml Nährmedium und zentrifugierte bei 650xg für 10 Minuten bei 4°C. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 1-2 ml Medium resuspendiert. Nach dem Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurden die

Zellen so verdünnt, dass beim Ausplattieren in eine 96-well culture-cluster-Platte  $3 \times 10^4$  Zellen/well pipettiert werden.

In die Kulturflaschen wurden wieder 10-15 ml IMDM + 5% FCS pipettiert. Diese wurden weiter bebrütet, da sich die restlichen in der Flasche befindlichen Zellen weiter darin vermehren.

Wurden keine Zellen gebraucht, wurde das Zell-Trypsin-EDTA-Gemisch verworfen, und die Flasche ebenso mit wieder 10-15 ml IMDM + 5% FCS aufgefüllt.

Waren noch nicht genug Zellen gewachsen, so erfolgte ein Mediumwechsel alle 2-3 Tage.

### **3.4 Kultur und Ernte der Fibroblasten, sowie Anzucht der Toxoplasmen**

Die Anzucht des intrazellulären Toxoplasmen des Stammes BK erfolgte in einer Mausfibroblasten-Kultur der Zelllinie L929 im Brutschrank bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten 10%CO<sub>2</sub>-haltigen Atmosphäre. Als Anzuchtmedium verwendete man Iscove`s-Medium + 5% FCS + 2mM L-Glutamin.

Die Zellen wurden in einer 25cm<sup>2</sup> –Kulturflasche angezüchtet, dabei wurden initial  $2,5 \times 10^6$  Fibroblasten bzw.  $3,5 \times 10^5$  Toxoplasmen in die Flasche pipettiert. Alle 2-4 Tage mussten die Toxoplasmen in eine neue Fibroblastenkultur passagiert werden, da durch das intrazelluläre Wachstum im Rahmen von mehreren Teilungszyklen nahezu alle Wirtszellen zerstört werden.

Dazu führte man parallel zu den mit Toxoplasmen infizierten Fibroblasten eine Kultur mit uninfizierter Fibroblasten, die als weitere Wirtszellen dienten. Auch hier war alle 2-4d ein Mediumwechsel sowie ein Reduzieren der Fibroblastenzahl notwendig, um ein Überwuchern der Kultur oder ein Absterben aufgrund der Akkumulation von Stoffwechselprodukten zu verhindern.

Um Toxoplasmen für weitere Versuche zu ernten, wurde das in den Kulturflaschen befindliche Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dies wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 120g zentrifugiert, um die ebenfalls abgespülten Mausfibroblasten und deren Zelltrümmer (Debris) sedimentieren zu lassen. Die im Überstand verbliebenen Toxoplasmen wurden in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 650g zentrifugiert, um die Toxoplasmen zu pelletieren. Dieses Vorgehen wurde bereits von K. Pilz 1992 beschrieben.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 5ml RPMI ohne Phenolrot resuspendiert. Nach entsprechender Verdünnung mit Trypanblau wurden die Toxoplasmen in der Neubauerzählkammer ausgezählt und für die entsprechenden Experimente weiter verdünnt. Die Toxoplasmen wurden vor dem Auszählen in der Neubauerzählkammer für 5 min. bei 4°C inkubiert. Bei dieser Temperatur wird das Verdunsten des Mediums verhindert. Gleichzeitig sinken die Toxoplasmen auf den Boden des Objektträgers, so dass sie sich beim Auszählen mit Hilfe eines Mikroskops auf der gleichen Ebene befinden.

## **4. Methoden**

### **4.1 IDO-Aktivitätsmessung im Zellüberstand**

Reife Makrophagen werden drei Tage lang stimuliert. Dazu wird der Überstand der einzelnen wells entnommen und im Gegenzug die Zytokine je nach Versuchsplanung hinzu pipettiert. Wichtig zu erwähnen ist, dass Tryptophan im Überschuss supplementiert wird (75µg/ml), da die im Medium vorhandene Menge nicht ausreicht, die IDO-Aktivität eindeutig nachweisbar zu machen.

Nach der Zugabe werden die Kulturplatten wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die einzelnen Versuchspläne der IDO-Stimulation sind aus den Beschreibungen der Versuchsansätze zu entnehmen.

Die IDO-Aktivität wird, wie bereits erwähnt, 3 Tage nach Zugabe des IFN $\gamma$  gemessen. Dabei erfolgt die Aktivitätsbestimmung indirekt durch Bestimmung der Produkte nach Umsatz von Tryptophan. Durch den Umsatz von Tryptophan entsteht nach einem Abbauschritt das Zwischenprodukt N-Formyl-Kynurenin, aus dem schließlich das Kynurenin entsteht (siehe auch Abb. A3). Durch Reaktion des Kynurenins mit Ehrlich`s Reagenz (p-Dimethylaminobenzaldehyd) verfärbt sich letzteres gelb. Dabei ist die Intensität der Gelbfärbung proportional zu der entstandenen Menge Kynurenin. Die Gelbfärbung kann durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) quantifiziert werden (Däubener et al. 1994)

Verwendet wird für die OD-Messung jeweils 160 µl des Überstandes der einzelnen wells der Kulturplatten, der in eine V-well-Platte übertragen wird. Nach Ansäuern des Überstandes mit 30%iger Trichloressigsäure (TCE, 10 µl/well) und Aktivieren der Reaktion (Hydrolyse von N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin) in einem Wasserbad (50°C, für 30 min.) wird die Platte zentrifugiert (10 min. bei 650x g). Der neu gewonnene Überstand wird dann in eine Flachbodenplatte pipettiert und mit Ehrlich`s Reagenz (ER) versetzt (100µl ER + 100µl Zellüberstand, die Lösung- 0,3 g Ehrlich`s Reagenz in 25ml 96 %iger Essigsäure- wird kurz vor der Messung frisch angesetzt). Nun kann die OD photometrisch bei 492nm gemessen werden.

## 4.2 Messen des Toxoplasmenwachstums

Das Wachstum von Toxoplasma lässt sich relativ einfach verfolgen.

Zunächst müssen die zu untersuchenden Zellen (Makrophagen oder Glioblastomzellen) mit Toxoplasmen infiziert werden. Nachdem 160 µl aus dem Überstand der Zellkulturplatten für die Bestimmung der OD entnommen worden sind, werden die Toxoplasmen in RPMI-Medium zu den Zellen hinzu pipettiert. PBMDM werden mit  $6 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert, die A2-Zellen mit  $1 \times 10^4$  Toxoplasmen/well. Das RPMI-Medium enthält für die PBMDM 2% ABS als Zusatz, für die Glioblastom-Zellen 5% FCS.

Wie in jeder anderen Wirtszelle auch, fangen die Toxoplasmen nun an, sich in den Makrophagen bzw. den Glioblastomzellen ungeschlechtlich zu vermehren.

Ungefähr 24 Stunden nach Infektion der untersuchten Zellen mit Toxoplasma werden die Zellen mit Tritium markiertem Uracil versetzt ( $1.48 \times 10^4$  Bq/ well). Proliferierende Toxoplasmen bauen [ $^3$ H]-Uracil in ihre Nukleinsäure ein. So kann man nach 24 h das Ausmaß des Einbaus messen, da entsprechend mehr [ $^3$ H]-Uracil in die Nukleinsäure der Toxoplasmen eingebaut wird, je mehr Toxoplasmen intrazellulär wachsen (Pfefferkorn et al 1977).

Für die Bestimmung werden die Zellen lysiert und der Well-Inhalt auf eine Glasfasermembran aufgebracht. Auf dieser Membran haftet die Nukleinsäure fest. Mittels Lumineszenz kann man nun die  $\beta$ -Strahlung des [ $^3$ H]-Uracil im sogenannten  $\beta$ -Strahl-Counter messen, wobei die gemessene  $\beta$ -Strahlung in cpm (counts per minute) angegeben wird und proportional zum Wachstum ist (Pfefferkorn et al 1984).

## 4.3 Vitalfärbung mit Trypanblau

Benutzt wurde Trypanblau in einer 1:2-Verdünnung. Es handelt sich hierbei um einen Farbstoff, der leicht in Zellen diffundiert. Eine vitale Zelle ist in der Lage, den Farbstoff wieder hinaus zu transportieren. In abgestorbene Zellen diffundiert der Farbstoff so lange, bis ein Konzentrationsgleichgewicht zwischen Zellinnerem und äußerem Medium erreicht ist. Diese Zellen erscheinen mikroskopisch blau, während vitale Zellen hell im Vergleich zum blau gefärbten Umgebungsmedium aufleuchten. Dies erleichtert zum einem das Auszählen von Zellen, zum anderen lässt sich diese

Färbung als Kontrolle verwenden, ob die Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Zusätze geschädigt werden.

#### **4.4 Messen der IDO-Aktivität im Zell-Lysat**

Prinzip: Durch Zell-Lyse wird u. a. die IDO freigesetzt. Durch Nachempfinden der Bedingungen in vivo kann die direkte IDO-Aktivität und der Einfluss von Norharman auf das Enzym selbst untersucht werden.

Ablauf: Hierzu werden Makrophagen benutzt, die aus buffy coats gewonnen wurden. Dies ist durch die benötigte große Zellzahl begründet.

Zunächst wird das buffy coat ebenso aufbereitet wie bereits beschrieben (s. B 3.1), jedoch erfolgt die weitere Differenzierung nicht mit Hilfe von CD14-Antikörpern, sondern über Adhärenz an Zellkulturflaschenwänden (entsprechend der Präparation für Northern Blots). 48 Stunden vor dem Versuchsbeginn werden die Zellen mit 500 U/ml IFN $\gamma$  stimuliert, um IDO zu bilden.

Eine Freisetzung des Zellinhaltes wird dadurch erreicht, dass die Zellen wechselweise hohen (50°C) und niedrigen Temperaturen (-170°C, in einem flüssigen Stickstoffbad) ausgesetzt werden.

Es erfolgt eine Zentrifugation, um Zelltrümmer und Membranteile zu entfernen. Der Überstand enthält nun alle Zellinhaltsstoffe in Lösung, also auch die IDO. Dieser Proteinlösung kann jetzt Norharman und ein Reaktionspuffer hinzugefügt werden, der die Situation in vivo nachahmt. Wichtig ist dabei die Zugabe von Tryptophan als Substrat, Katalase für die Bereitstellung von Radikalen bei der Enzymreaktion, Methylenblau zur Färbung des Puffers.

Die Reaktion, sprich die Umsetzung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin, läuft nun unter Inkubation in einem Wasserbad (37°C, 30 min.) ab. Danach erfolgt die Weiterverarbeitung der Proben, wie es schon von der IDO-Aktivitätsmessung des Zellüberstandes (s. B 4.1) bekannt ist. Kynurenin wird wie oben beschrieben gemessen.

## 4.5 Northern Blot

Northern Blot heißt eine Technik, mit der man in der Lage ist, nach gelelektrophoretischer Auftrennung RNA nachzuweisen. Dabei wird das Gel auf eine Membran „geblottet“ (dt.: Blot = Abklatsch). Die Information über die RNA auf der Membran kann mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht werden, die hier verwendete Methode wird unten ausführlicher besprochen.

Dieses Verfahren ist sehr anfällig für Enzyme, die die RNA abbauen (RNAsen). Die RNAsen sind allgegenwärtig, sie haften auf der Haut, aber auch auf allen Laborgegenständen. Um sich vor dem Abbau durch die RNAsen zu schützen, sind folgende Vorsichtsmaßnahmen zu beachten:

- Verwendung von Einmalhandschuhen und Einmalmaterialien (z.B. Plastikröhrchen)
- RNasefreie sterile Einmalpipetten und –spitzen
- Reinigen aller mehrfach benutzbaren Gerätschaften mit 0.1% SDS, danach mit 3% Wasserstoffperoxid. Gut abspülen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser (2-3 Mal), da dieses keine RNAsen enthält. Alle anderen verwendeten Puffer/Lösungen werden ebenfalls mit DEPC angesetzt.

### a) Präparation der PBMDM-Gesamt-RNA

Mit Hilfe der „single-step“-Methode nach Chomczynski und Sacchi (1984) erfolgt zunächst die Isolierung der Gesamt-RNA. Dazu werden die Zellen in der Kulturflasche mit Guanidiniumthiocyanat (GSCN) lysiert, nachdem der Überstand abgenommen worden ist, wobei alle Proteine einschließlich der RNAsen denaturiert werden. Wichtig ist, dass mit Einsetzen der Lyse (s. u.) auch alle nachfolgenden Schritte unter RNase-Freiheit durchgeführt werden, da zu diesem Zeitpunkt die RNA für die RNAsen angreifbar wird. Man sollte auch RNA aus Zellen des Überstandes gewinnen, indem man den Überstand abnimmt, 10 min. bei 650xg zentrifugiert und ebenfalls mit GSCN lysiert. Danach erfolgt eine Dichtegradientenzentrifugation bei 190.000xg für 16 Stunden über Cäsiumchlorid.

Nach Beendigung der Zentrifugation findet sich die RNA als kristallin aussehendes Pellet auf dem Boden des Zentrifugationsröhrchens. Sie wird mit 75% Ethanol gespült (2-3 Mal) und damit von allen Salzen befreit, und schließlich in DEPC-Wasser aufgenommen. Danach erfolgt die photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes einer 1:100 verdünnten Probe. An dieser Stelle kann die RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$

weggefroren werden, sofern nicht sofort eine gelelektrophoretische Auftrennung erfolgen soll.

#### b) Gelelektrophorese der RNA

Hierbei wird die RNA nach Zusatz von 10x MOPS-Puffer, 37%igem Formaldehyd, deionisiertes Formamid, Probenpuffer und evtl. Ethidiumbromid in einem 3%igen Agarosegel aufgetrennt. Verwendet werden für eine GAPDH-Detektion 15-20 µg RNA, für die IDO mindestens 60, oftmals eher 70 µg. Bevor das Gel mit der RNA beladen wird, wird das Probengemisches auf 65°C kurz erhitzt, um Einzelstrang-RNA herzustellen. Danach erfolgt die Zugabe von Ethidiumbromid und dem Probenpuffer. Schließlich wird das Gel beladen. Die Auftrennung der RNA erfolgt in Richtung Anode (da RNA negativ geladen ist) bei 30-45V Spannung, die Amperezahl liegt meist um die Hälfte in mA darunter, und wird ebenfalls über Nacht durchgeführt.

#### c) Blotten

Ist die Auftrennung erfolgt, können die mit Ethidiumbromid markierten Proben auf eine saubere Auftrennung der RNA mittels UV-Licht kontrolliert werden. Zum Vergleich hat man in dem Gel einen bekannten, standardisierten RNA-Marker mitlaufen lassen.

Das Gel kann nun auf eine Nylon-Membran „geblottet“ werden. Das heißt, die aufgetrennte RNA wird durch Druck, aber vor allem durch den Sog trockener Einmalpapiertücher und einem Konzentrationsgefälle der Salze in den verwendeten Lösungen auf die Nylonmembran gebracht. Dieser Vorgang dauert 2-3 Stunden (Chomczynski et al. 1994). Danach kann die RNA durch ein sog. „crosslinken“ durch UV-Exposition auf der Membran fixiert werden und ist nicht mehr anfällig für RNAsen. An diesem Punkt kann die Membran in Kühlschrank aufbewahrt werden, sofern sich nicht direkt der nachfolgende Punkt anschließt.

#### d) Hybridisieren mit Sonden und DIG-Detektion.

Neben der Detektion der RNA mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden besteht auch die Möglichkeit der enzymatischen Detektion. Die Membran wird über Nacht in einem Wasserbad bei 65°C mit zuvor bei 95-99°C denaturierten Sonden (für GAPDH und IDO) inkubiert. Dabei bindet die Sonde, die DIG-Uracil markiert ist, an die komplementären Stellen der RNA für GAPDH und IDO auf der Membran. Nach mehreren Waschschritten mit DIG-Waschpuffer, die die überschüssige ungebundene Sonde entfernen sollen, um einen unerwünschten Hintergrund zu entfernen, fügt man einen „alkalische Phosphatase (AP) gekoppelten anti-DIG-Antikörper“ hinzu.

Durch ein Substrat der AP, das CDP-Star (Fa. Roche), ein Fluoreszenz-Farbstoff, entsteht bei der Katalyse Licht, das die Röntgenfilme belichten kann.

Dadurch kommt es zur Schwärzung des Filmes an den Stellen, an denen die gesuchte RNA markiert ist. Die Stärke des Signals ist letztlich abhängig von der Menge der vorhandenen RNA, so dass man hiermit ein Verfahren an der Hand hat, zumindest semiquantitativ die Menge an RNA zu bestimmen; je mehr RNA vorhanden ist, die für das untersuchte Protein translatiert werden soll, desto stärker ist die Schwärzung des Films. Dieser Film wird nach der Belichtung entwickelt, gewässert, im Fixierbad fixiert und getrocknet.

#### **4.6 Nachweis von DNA bzw. RNA**

Der qualitative Nachweis von DNA wird mit Hilfe einer PCR erbracht, in dieser Arbeit jedoch weitaus relevanter ist der Nachweis von mRNA. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der RNA muss die Umschreibung in cDNA erfolgen. Der quantitative Nachweis wird mittels Realtime-PCR erbracht. Alle genannten Verfahren sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

##### **4.6.1 PCR**

Die konventionelle PCR oder auch Polymerase-Chain-Reaction ist ein Verfahren zur Amplifizierung von DNA. Dies ist immer dann notwendig, wenn die Menge an DNA für einen direkten qualitativen, oder auch quantitativen Nachweis nicht ausreichend ist.

Im Rahmen dieser Arbeit war für die Vorbereitungen einer RealTime-PCR (s. 4.6.3) ein Nachweis von IDO- und GAPDH-DNA zunächst auf qualitativer Ebene notwendig. Die dabei verwendete Methode wurde initial von Saiki et al 1988 beschrieben und wie nachfolgend aufgeführt modifiziert:

Pipettierschemata:

- für die GAPDH:

cDNA	5 µl
10fach Reaktionspuffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	7 µl
dNTP (12,5 mM)	4 µl
Primer (Forward/Reverse)	2/2 µl
Taq-Polymerase	0,4 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

- für die IDO:

cDNA	7,5 µl
10fach Reaktionspuffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	7 µl
dNTP (12,5 mM)	4 µl
Primer (Forward/Reverse)	3/3 µl
Taq-Polymerase	0,4 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

Um Pipettierfehler zu reduzieren, wird ein sog. Mastermix in ausreichender Menge hergestellt, der Reaktionspuffer, Magnesiumchlorid, dNTP, steriles Wasser und die Primer enthält. Die cDNA und die Taq-Polymerase werden einzeln hinzugefügt.

Die PCR erfolgten nach folgenden Programmen:

- für die GAPDH:

Prädenaturierung	95°C	3 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 sek	40x
Primer-Anlagerung	53°C	1 min	40x
Primerextension	72°C	2 min	40x
Finale Extension	72°C	4 min	1x
Herunterkühlen	4°C		

- für die IDO:

Prädenaturierung	95°C	5 min	1x
Denaturierung	95 °C	30 sek	35x
Primer-Anlagerung	55°C	30 sek	35x
Primerextension	72°C	2 min	35x
Finale Extension	72°C	5 min	1x
Herunterkühlen	4°C		

Unterschiedliche Programme sind das Ergebnis einer optimalen Anpassung an die unterschiedlichen Annealingtemperatur der Primer. Dabei wurden auch die eingesetzte Menge an Template und die geschätzte Länge des Amplikons berücksichtigt.

Folgende Primer wurden eingesetzt:

GAPDH-Forward: 5`- ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC

GAPDH-Reverse: 5`- CAG CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG

IDO-Forward: 5`- GGC CTT GCA CGT CTA GTT CTG

IDO-Reverse: 5`- CGG ACA TCT CCA TGA CCT TTG

Die Primer wurden von MWG Biotech, Eberling bezogen.

Als Template wurde die cDNA verwendet, die zuvor aus mRNA synthetisiert wurde (siehe unten). Dabei wurde stets eine Leerkontrolle (Ersatz des Volumens für die cDNA durch steriles Wasser) mitgeführt.

Nach abgelaufener PCR erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Amplikon, auf die an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden soll.

#### **4.6.2 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde das „Advantage RT-PCR Kit“ der Firma Clontech, Heidelberg, verwendet und alle Komponenten nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Die Bezeichnung „RT-PCR“ leitet sich vom dem Enzym „Reverse Transkriptase“ ab. Dieses ist in der Lage, mRNA in DNA umzuschreiben. In diesem Fall lag also die mRNA nach Stimulation der Makrophagen vor und wurde in cDNA umgeschrieben. Eine weitere Amplifikation der cDNA wie bei der PCR erfolgte nicht, sondern nur die Umschreibung von mRNA in cDNA.

Dabei wurden zunächst 2 µg Template (mRNA) einem DNase-Verdau unterzogen. Nach dem Verdau erfolgte die Zugabe von 1µl Oligo-DT, einem unspezifischen Primer. Das Gemisch wurde zunächst bei 95°C denaturiert, dann folgte das Annealing des Primers bei 42°C für 20 Minuten. Erst danach wurde ein Mastermix aus Reaktionspuffer, Nukleotiden, RNSin (RNase-Inhibitor) und M-MLV (die Reverse Transkriptase aus dem Moloney-Murine-Leukemia-Virus,) hinzugefügt. Daran schloss sich die Synthesephase im Thermocycler an. Hierbei lief die Reaktion bei 42°C über 90 Minuten ab und wurde mit einem Erhitzen auf 95°C für fünf Minuten abgeschlossen.

Nach Aufstocken der Proben mit DEPC-Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen lagen handliche Größen zur Weiterverarbeitung vor.

Die entstandene cDNA kann in einem quantitativen Verfahren wie der Realtime-PCR untersucht werden. Vergleiche auch Fairman et al. 1999.

#### **4.6.3 Realtime-PCR (TaqMan®-System)**

Wie zuvor erwähnt, stellt die Realtime-PCR ein Verfahren zur Quantifizierung von DNA dar.

Dahinter steht folgendes Prinzip: Der Reaktionsansatz wird mit einer fluoreszierenden Sonde versetzt, die in der Lage ist, sich an die zu amplifizierende Sequenz zu binden. Diese Sonde besteht unter anderem aus einem Reporter und einem Quencher. Durch die räumliche Nähe der beiden wird die Fluoreszenz des Reporters durch den Quencher absorbiert. Kommt es zum Ablesen der DNA durch die Taq-Polymerase (Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*), wird der Reporter vom Quencher durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase getrennt. Nun wird die Fluoreszenz nicht mehr durch den Quencher absorbiert, sondern wird abgegeben und kann mit Hilfe einer CCD-Kamera detektiert werden.

Als Templates wurden einerseits die cDNA eingesetzt, die zuvor aus mRNA über cDNA-Synthese gewonnen wurde. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe eines Plasmids (pMEP4), das die komplette IDO-DNA als Insert enthielt, als Standard mitgeführt (R. Langen, Institut für Med. Mikrobiologie). Die Verdünnungsreihe diente als Eichkurve, mit Hilfe derer man die Anzahl der zugrunde liegenden IDO-mRNA-Kopien ausrechnen konnte. Außerdem wurde erneut eine Leerkontrolle mitgeführt.

Verwendet wurden die gleichen Primer für die IDO-DNA-Amplifizierung wie bei der PCR (s. 4.6.1).

Als IDO-Sonde wurde die von Eurogentec (Köln) synthetisierte folgende Basensequenz verwendet (JOE= Reporter, TAMRA= Quencher):

5'(JOE)- ATG CAT CAC CAT GGC ATA TGT GTG GG (TAMRA)

Für die GAPDH wurden Primer und Sonde aus dem „TaqMan™ GAPDH Endogenous Control Kit“ von Eurogentec benutzt.

Gearbeitet wurde mit folgendem Pipettierschema (Volumina pro Ansatz):

qPCR™ Master Mix*	25 µl
Primer-Forward (3 µM)	5 µl
Primer Reverse (3 µM)	5 µl
Sonde (50-200nM)	5 µl
Aqua dest.	5 µl
Template	5 µl

\* ebenfalls von Fa. Eurogentec, Köln. Komponenten: dNTPs, Magnesiumchlorid, Glykosylase, Hot-Start-DNA-Polymerase.

Dieses Pipettierschema gilt für IDO wie für GAPDH gleichermaßen. Die Ansätze wurden unter sterilen Bedingungen als Doppelbestimmung in eine optische 96-well Platte entsprechend einem zuvor erstellten Belegungsplan pipettiert. Dabei wurde zunächst eine Stammlösung aus Master Mix, Primern, Sonde und Aqua dest. pipettiert, und abschließend das Template.

Die Amplifizierung erfolgte nach dem Standard-Programm des ABI Prism 5700 Sequence Detector (Applied Biosystem):

50 °C	2 min	1x
95 °C	10 min	1x
60 °C + 95°C	1 min + 15 sek	} 40x

Eine Auswertung erfolgte mit der dem Detektor zugehörigen ABI-SDS-Software.

Soll neben dem quantitativen Nachweis auch ein qualitativer Nachweis erfolgen, so können die Proben zunächst auf Eis gelagert werden und schließlich mittels Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden.

## **4.8 Western Blot**

Der Western Blot ist eine Methode, um bestimmte Proteine in Proteingemischen, wie sie zum Beispiel nach Lyse von Zellen entstehen, nachweisen zu können.

Damit ergeben sich drei Arbeitsschritte:

- a) elektrophoretische Auftrennung der Proteine
- b) Übertragen der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran (=Blotting)
- c) Nachweis der Proteine auf dem Blot mit Hilfe von Antikörpern.

Ziel des Western Blots an dieser Stelle soll der Nachweis von GAPDH bzw. vonIDO-Protein nach Stimulation von Makrophagen mit IFN $\gamma$  bzw. Zugabe von Norharman (Kyhse-Andersen, 1984).

### **4.8.1 Auftrennung der Proteine per Gel-Elektrophorese**

Die zu untersuchenden und gemäß dem Versuchsansatz vorbehandelten Zellen werden lysiert und zentrifugiert. Das Pellet wird in 100-150  $\mu$ l Lysepuffer aufgenommen. Der Lysepuffer enthält Proteaseinhibitoren (10 $\mu$ M Leupeptin, 2mM Pefabloc und 1mM EDTA, pH 7.5), da bei der Lyse freigesetzte Proteasen die Proteine zerstören könnten. Der Überstand enthält nun die gelösten Proteine.

Um vergleichbare Mengen an Protein auf das Gel auftragen zu können, muss zunächst eine Mengenbestimmung der Proteine aus den Überständen erfolgen. Dazu wird die Methode nach Bradford (1976) verwendet.

Verglichen werden die Proben mit einem BSA-Standard, dazu legt man eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin (=BSA) bekannter Konzentration (0.2 mg/ml) an. Ähnlich wie bei der Bestimmung der IDO-Aktivität erfolgt die Proteingehaltsbestimmung über Messung der optischen Dichte.

Zunächst wird in einer 96-F-well-Platte eine Verdünnungsreihe des BSA-Standards als Dreifachbestimmung angelegt (20 µl/well).

Parallel dazu werden die eigenen Proben als Doppelbestimmung (ebenfalls 20 µl/well) geführt, auch hier wird eine Verdünnungsreihe angelegt. Schließlich fügt man zu allen wells Bradford-Reagenz hinzu (Lösung von Coomassie brilliant blau G 250 in Ethanol/Phosphorsäure, 200 µl/well) und misst die optische Dichte bei 620 nm mit einem Referenzfilter bei 492 nm.

Nun erfolgt die elektrophoretische Auftrennung der Proteinproben in einem 9,5 %igem Polyacrylamidgel mit 0,1% SDS bei zunächst 100mV, dann bei 200mV über 3-4 Stunden (Methode nach Laemmli, 1970). Dazu werden die Proben folgendermaßen vorbereitet: Es werden pro Stimulationsansatz 6, 12 und 24 µg Gesamt-Protein in einem Volumen von je 20 µl eingesetzt. Zum Aufstocken verwendet man PBS. Den Proben wird zusätzlich 8 µl Laemmli-Puffer (= 5x Proteinprobenpuffer) hinzugefügt. Dann werden die Proben für fünf Minuten bei 95-100°C aufgeköcht, danach zentrifugiert und letztlich in die Taschen des Gels pipettiert. Die Proteine wandern nun entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld. Zusätzlich wird ein Größenstandard für Proteine (Low Range Standard, Fa. Bio-Rad) mitgeführt.

#### **4.8.2. Blotten:**

Ähnlich wie beim Northern Blot wird nun das Gel auf die Nitrocellulose-Membran geblottet. Wichtigster Unterschied ist hier allerdings, dass dieser Blot nicht durch Druck oder Sog durchgeführt wird, sondern durch Anlage von Spannung. Dazu wird eine Blotting Chamber benötigt (z.B. von CarboGlas, Schleicher und Schuell, Dassel). In diese Blotting Chamber kommt ein Sandwich aus mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren, das Gel, die Membran, sowie mit Anodenpuffer getränkten Filterpapieren. Bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm<sup>2</sup> wird nun über einen Zeitraum von einer halben bis ganzen Stunde das Gel auf die Membran transferiert.

Anschließend kann man das Ergebnis mit Hilfe einer Ponceau-Rot-Färbung unter einer Weißlichtkamera überprüfen. Dazu wird die Membran für zwei Minuten mit Ponceau-Rot gefärbt. An dieser Stelle hilft der mitgeführte Größenstandard, einzelne Banden den jeweiligen kD-Größen zuzuordnen und damit die Proteine zu identifizieren. Die Größe von GAPDH beträgt 40 kD, die für IDO 45 kD.

Für den nächsten Schritt sollte die Membran durch mehrere Bäder in destilliertem Wasser entfärbt werden.

#### **4.8.3. selektiver Proteinnachweis**

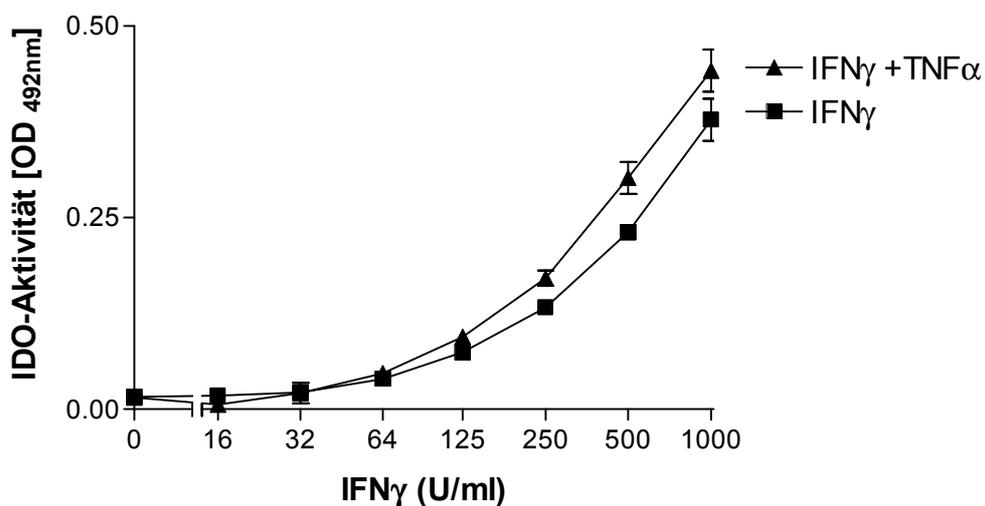
Zunächst wird die Membran für 1h in 5% Milchpulver „geblockt“. Ziel ist es, unspezifische, freie Bindungsstellen mit einem für die Antikörper nicht erkennbaren Protein, also dem Milchpulver, abzusättigen. Danach folgt die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion bei 4°C über Nacht mit Maus-Antikörper (1:5000 in 5% Milchpulver), die spezifisch an GAPDH bzw. an IDO binden. Am Folgetag werden die überschüssigen Antikörper ausgewaschen (3x mit PBS für 5 Minuten) und die Membran mit einem weiteren Antikörper versetzt, der nun spezifisch an die Maus-Antikörper bindet und mit Peroxidase (POX) gekoppelt ist (Ziege-Anti-Maus, IgG und IgM, 1:2500 in 5% Milchpulver). Hier reicht eine Inkubationszeit von 1h. Nach mehrfachem Waschen in PBS wird nun die Membran für 5 Minuten mit ECL, einem Chemolumineszenz, in Kontakt gebracht. Die durch die Reaktion mit der POX frei werdende Lichtenergie belichtet Röntgenfilme. War die Bindung sowohl der Maus-Antikörper an IDO bzw. GAPDH, als auch des sekundären POX-Antikörpers an die Maus-Antikörper erfolgreich, sind nun die entsprechenden Banden auf dem Röntgenfilm sichtbar. Üblicherweise reicht eine Belichtungszeit von 10 Minuten aus.

## C Ergebnisse

### 1. Bestimmung der IDO-Aktivität in PBMDM in Abhängigkeit vom der Konzentration der Zytokine IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ und damit verbunden Bestimmung des Toxoplasmenwachstums

Dieser Versuch soll die Grundlagen für die weiteren Experimente legen. PBMDM sind in der Lage, nach Stimulation mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  Indoleamine-2,3-dioxygenase zu produzieren und (s. u.) die Toxoplasmen an ihrem Wachstum zu hindern.

Verglichen wurden hier Ansätze mit austitriertem IFN $\gamma$  (2000 U/ml bis 0 U/ml) mit oder ohne 100 U/ml TNF $\alpha$ .

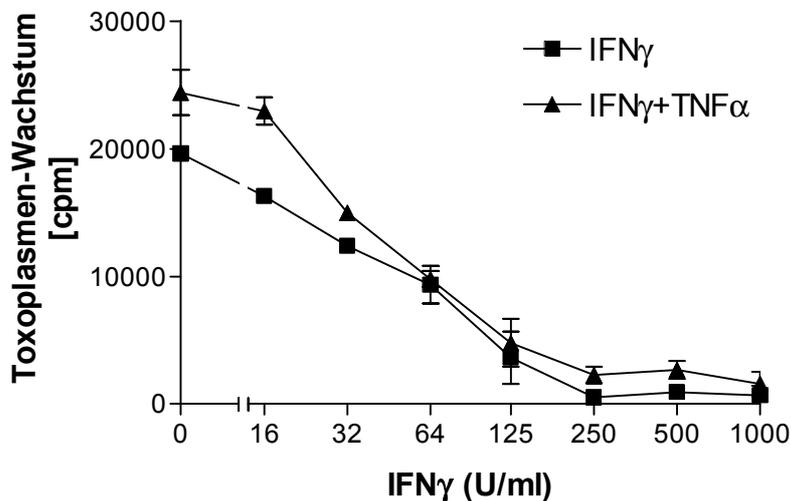


**Abb. C1a: Dosisabhängigkeit der IDO-Induktion durch IFN $\gamma$ .**  $10^5$  Makrophagen/well wurden mit IFN $\gamma$  mit oder ohne TNF $\alpha$  (100U/ml) stimuliert und nach 3 Tagen die IDO-Aktivität gemessen. Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

Wie aus Abbildung C1a zu ersehen ist, steigt die IDO-Aktivität mit Höhe der IFN $\gamma$ -Konzentration. Das heißt, dass durch Zugabe von IFN $\gamma$  die Katalyse von Tryptophan zu Kynurenin durch die IDO konzentrationsabhängig induziert worden ist. Die Zugabe von TNF $\alpha$  hatte nur einen geringfügig steigernden Effekt.

Vergleichbare Ergebnisse sind auch beim Toxoplasmenwachstum zu sehen (Abb. C1b). Je höher die eingesetzte IFN $\gamma$ -Konzentration war, desto stärker wurde das Toxoplasmenwachstum gehemmt.

Dieser Effekt erscheint durch die Anwesenheit von  $\text{TNF}\alpha$  eher abgeschwächt. Das Toxoplasmenwachstum beginnt unter  $\text{TNF}\alpha$  auf einem höheren Level und wird nie mehr unterdrückt als durch Zugabe von  $\text{IFN}\gamma$  allein.

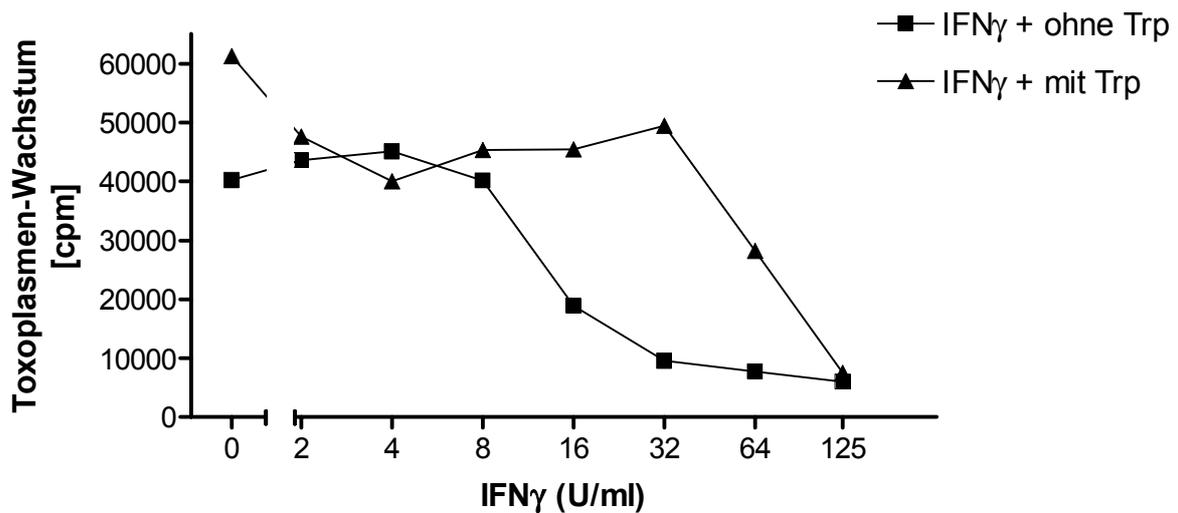


**Abb. C1b: Abhängigkeit des Toxoplasmenwachstums von der  $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration.**  $10^5$  Makrophagen/well wurden mit  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert und nach 3 Tagen mit  $1,2 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. 24h nach Infektion wurden die Zellen radioaktiv markiert (s. Methoden) und das Wachstum 24h später im  $\beta$ -Counter gemessen. Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

Diese Ergebnisse sind mit denen von Glioblastomzellen (schon publiziert) vergleichbar.

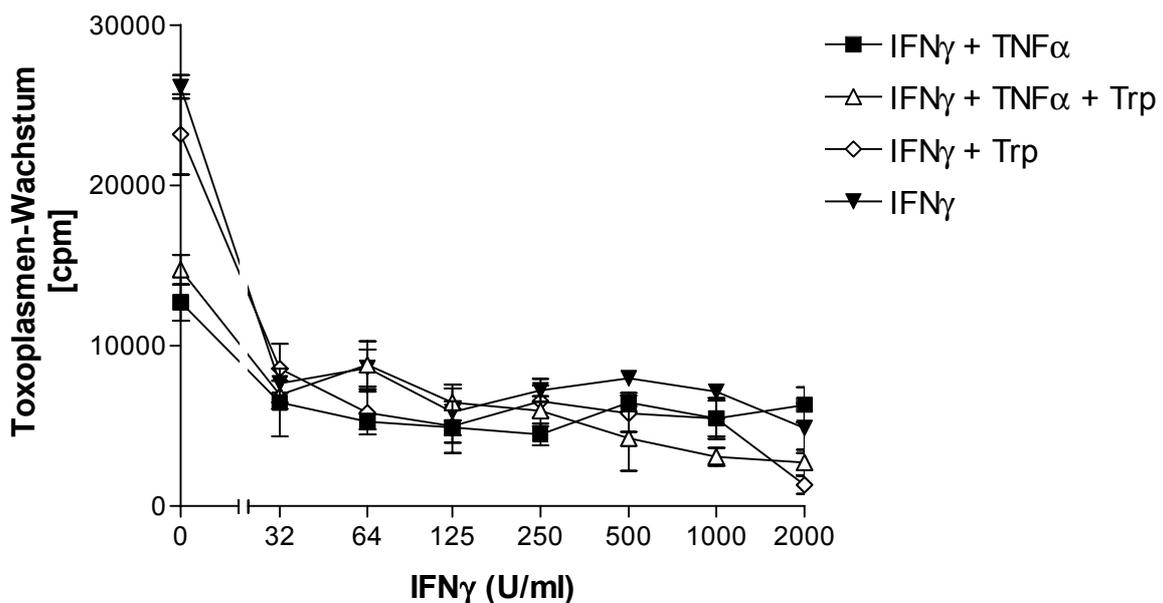
## **2. Toxoplasmenwachstum unter Einfluss von IFN $\gamma$ und TNF $\alpha$ mit oder ohne Tryptophan-Resupplementierung. Vergleich der unterschiedlichen Reaktion von PBMDM und Glioblastomzellen**

Es ist bekannt, dass in Glioblastomzellen nach Stimulation mit IFN $\gamma$  eine Toxoplasmostase erreicht werden kann (Däubener et al. 1993). Dabei stellt sich die Frage, ob das Toxoplasmenwachstum allein aufgrund des abgebauten Tryptophan eingeschränkt ist oder durch andere IFN $\gamma$ -vermittelte Prozesse. Deswegen werden zwei Ansätze untersucht, einmal ein Ansatz mit und einmal ohne Tryptophan-Supplementierung. Das heißt, dass zum Zeitpunkt der Infektion mit Toxoplasmen zum einen mit Tryptophan (75 $\mu$ g/ml) im Medium resupplementiert wird, zum anderen lediglich die Toxoplasmen in RPMI-Medium ohne Tryptophan zu den Zellen hinzugefügt werden. Vor Infektion wurden die Zellen wie bekannt mit IFN $\gamma$  stimuliert. Liegt ein durch die IDO-Aktivität bedingter Mangel von Tryptophan als alleinige Ursache der Toxoplasmostase vor, so ist nach der Resupplementierung ein Wachstum der Toxoplasmen zu erwarten. Infiziert werden sowohl Makrophagen als auch Glioblastomzellen (A2-Zellen). Die beiden Zellsysteme unterscheiden sich dadurch, dass der Tryptophan-Abbau bei den A2-Zellen nur bis zur Stufe des Kynurenins erfolgt, bei den Makrophagen dieser Abbau noch weiterläuft (bisher noch nicht publizierte Ergebnisse von S. Nockemann) und möglicherweise toxische Metabolite entstehen. Aus den Grafiken ist zu erkennen, dass bei A2-Zellen der durch die IDO-Aktivität hervorgerufene Tryptophanmangel zu einer Toxoplasmostase führt, die aber durch eine erneute Zugabe von Tryptophan reversibel ist (Abb. C2a).



**Abb. C2a: Toxoplasmenwachstum in Glioblastomzellen mit oder ohne Tryptophan-Supplementierung.**  $3 \times 10^4$  Glioblastomzellen/well werden mit  $2 \times 10^5$  Toxoplasmen/well infiziert, mit oder ohne Tryptophan ( $75 \mu\text{g/ml}$ ). Nach 24h wurden die Zellen mit 3 H-Uracil gepulst und weitere 24h später die Uracil-Inkorporation gemessen. Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen.

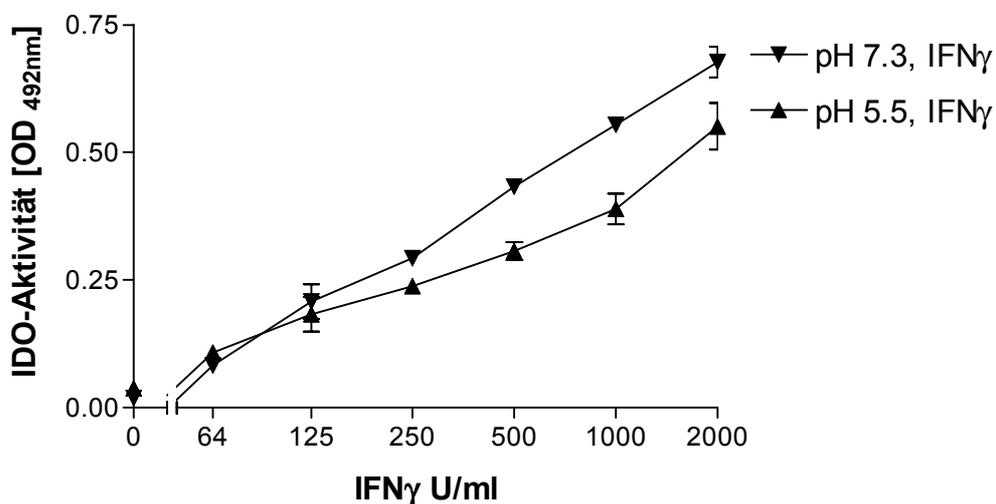
Im Gegensatz dazu kann bei den Makrophagen eine Tryptophan-Resupplementierung die Toxoplasmostase nicht aufheben. Lediglich bei Zellen, in denen nicht mit IFN $\gamma$  IDO-Aktivität ausgelöst wurde, wachsen die Toxoplasmen bei Tryptophan-Zugabe besser.



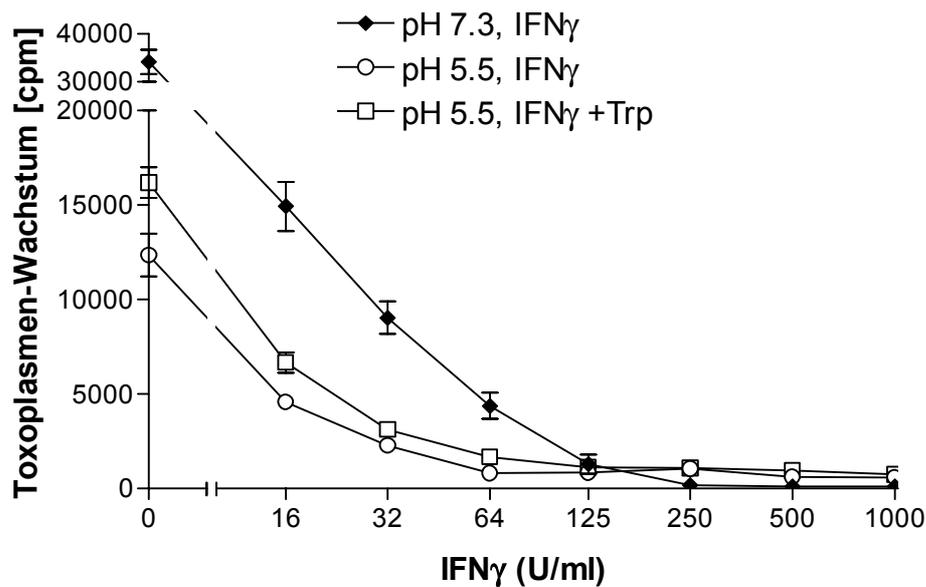
**Abb. C2b: Tryptophan(Trp)-Supplementierung hebt die Toxoplasmenwachstumshemmung in IFN $\gamma$ -stimulierten PBMDM nicht auf.**  $10^5$  Makrophagen/well wurden mit IFN $\gamma$  stimuliert und nach 3 Tagen mit  $1,2 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. Dabei wurde Trp resupplementiert ( $75 \mu\text{g/ml}$ , offene Symbole) oder nicht (geschlossene Symbole). Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

### 3 IDO-Aktivität und Toxoplasmenwachstum in PBMDM in Abhängigkeit vom pH-Wert (IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ -Stimulation)

Untersucht wurde hier, ob die pH-Wert-Verschiebung aus dem physiologischen pH-Bereich (7.3) in den sauren Bereich (pH 5.5) Effekte auf die IDO-Aktivität bzw. das Toxoplasmenwachstum hat. Aus der Abbildung C3a ist zu entnehmen, dass es zu einer geringeren IDO-Aktivität bei pH 5.5 unter IFN $\gamma$ -Stimulation kommt. Der Unterschied der IDO-Aktivität ist deutlich, jedoch insgesamt eher gering ausgeprägt. Das Toxoplasmenwachstum bei pH 5.5 hingegen ist um die Hälfte reduziert. (Abb. C3b).



**Abb. C3a:** Effekt unterschiedlicher pH-Werte auf die Aktivität der IDO  $10^5$  Makrophagen/well wurden bei pH 5.5 und 7.3 mit IFN $\gamma$  stimuliert und nach 3 Tagen die IDO-Aktivität gemessen. Werte bilden Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.



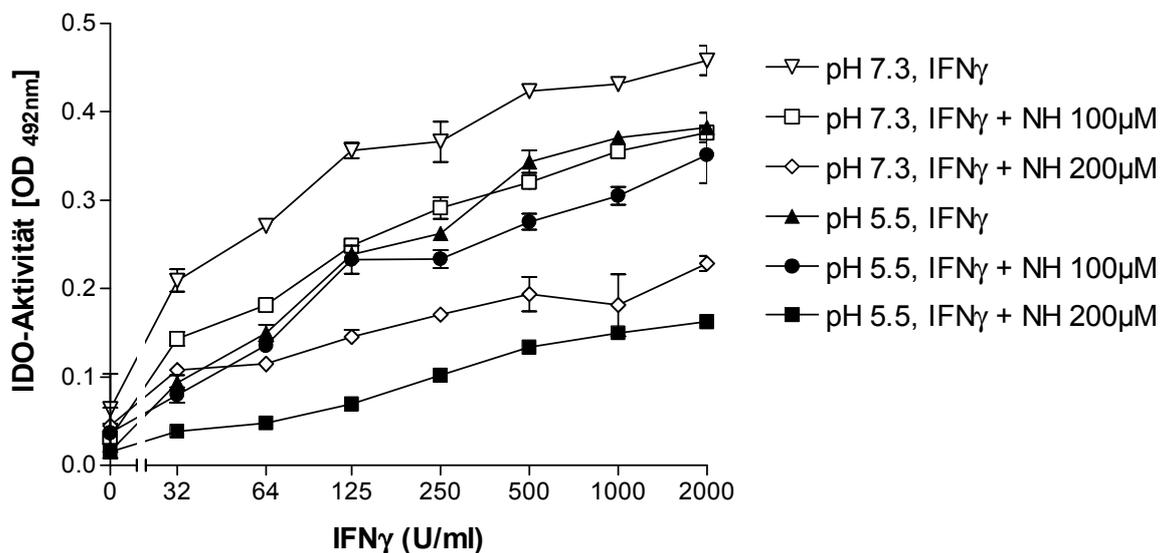
**Abb. C3b: Toxoplasmen-Wachstum bei unterschiedlichen pH-Werten.**  $10^5$  Makrophagen/well wurden mit IFN $\gamma$  bei unterschiedlichen pH-Werten (5.5 und 7.3) stimuliert und nach 3 Tagen mit  $1,2 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. Dabei wurde zum Teil Trp resupplementiert (75 $\mu$ g/ml). Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

Ein saures Medium bewirkt also einerseits eine mangelnde IDO-Aktivität, aber auch ein vermindertes Toxoplasmenwachstum.

Makrophagen agieren u. a. auch in sauren Medien, also z.B. bei inflammatorischen Prozessen. Es wäre daher denkbar, dass die IDO bei saurem pH-Wert den gleichen Expressionslevel, ggf. sogar einen höheren erreicht. Im Gegensatz dazu steht das oben gezeigte Ergebnis.

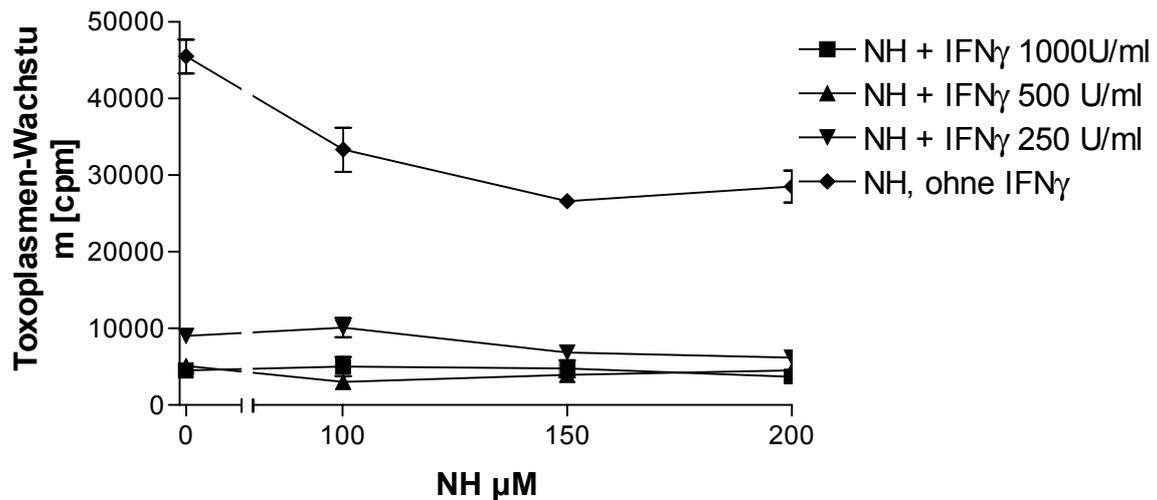
#### 4 Einfluss von Norharman auf die IDO-Aktivität und das Toxoplasmenwachstum in PBMDM in Abhängigkeit vom pH-Wert

Bei diesem Versuch wurden die Makrophagen ebenfalls mit  $\text{IFN}\gamma$  in verschiedenen Konzentrationsstufen stimuliert, des Weiteren erfolgte eine Zugabe von Norharman in unterschiedlichen Konzentrationen. Es wurden die Ansätze bei unterschiedlichen pH-Werten verglichen. Dies geht aus der Abbildung C4a hervor. Dabei wird außerdem deutlich, dass Norharman die IDO umso stärker beeinflusst, je höher die Konzentration ist. Jedoch ist Norharman ab einer gewissen Konzentration toxisch für die Zellen. Diese Grenze liegt bei  $250 \mu\text{M}$ , wobei diese durch eine Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau bestimmt worden ist. Die Grenze muss zum Teil je Versuch korrigiert werden, da die Empfindlichkeit gegenüber Norharman vom Alter der Makrophagen und auch vom Spender abhängig ist. Deswegen wird eine Konzentration von  $200 \mu\text{M}$  Norharman nicht überschritten, um sicher im vitalen Bereich zu liegen. Tatsächlich ist Norharman in der Lage, die IDO-Aktivität zu senken, dieser Effekt ist stärker im sauren Bereich.



**Abb. C4a: IDO-Aktivität drei Tage nach Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  und Norharman bei verschiedenen pH-Werten (pH 5.5 und 7.3).**  $10^5$  Makrophagen/well wurden bei pH 5.5 und 7.3 mit  $\text{IFN}\gamma$  und mit oder ohne Norharman ( $100 \mu\text{M}$  oder  $200 \mu\text{M}$ ) stimuliert und nach 3 Tagen die IDO-Aktivität gemessen. Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

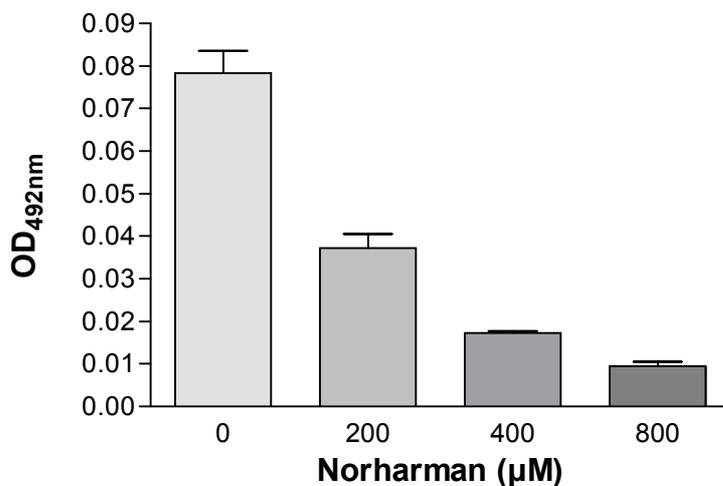
Der erwartete Effekt, durch Senken der IDO-Aktivität eine Aufhebung der Toxoplasmostase zu erreichen, konnte hier nicht bestätigt werden (Abb. C4b). Das Toxoplasmenwachstum ist zum einen pH-abhängig gesenkt, zu anderen scheint auch Norharman selbst einen hemmenden Effekt auf das Toxoplasmenwachstum aufzuweisen.



**Abb. C4b: Wachstum von Toxoplasmen in PBMDM in Abhängigkeit vom Norharman-Einfluss.**  $10^5$  Makrophagen/well wurden mit IFN $\gamma$  und Norharman stimuliert und nach 3 Tagen mit  $1,2 \times 10^4$  Toxoplasmen/well infiziert. Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

## 5 Bestimmung der IDO-Aktivität im Zell-Lysat

Die bisher gezeigten Ergebnisse ließen keinen Schluss darüber zu, inwiefern Norharman in der Lage ist, direkt mit dem Enzym zu interagieren, da man nur das Produkt der IDO-Aktivität im Zellüberstand messen konnte, jedoch damit keinen Aufschluss über den Wirkort von Norharman erhielt. Durch die Lyse der Zelle liegt nun die IDO (neben anderen ehemals intrazellulären Bestandteilen der Zelle) frei vor, Norharman kann nur mit der IDO interagieren, nicht jedoch auf der Ebene der IDO-Expression. Man sieht allerdings einen deutlichen Effekt von Norharman auf die IDO-Aktivität, bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  ist die IDO-Aktivität um 50% gesenkt. Weiterhin ist es möglich, mit sehr viel höheren Konzentrationen Effekte zu erzielen, bei einer Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  ist die IDO-Aktivität fast vollständig gehemmt. In vivo ist eine Konzentration von 800  $\mu\text{M}$  nicht zu überprüfen, da hier jenseits der Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  (s. Abb. C5) die Zelle abzusterben beginnt.



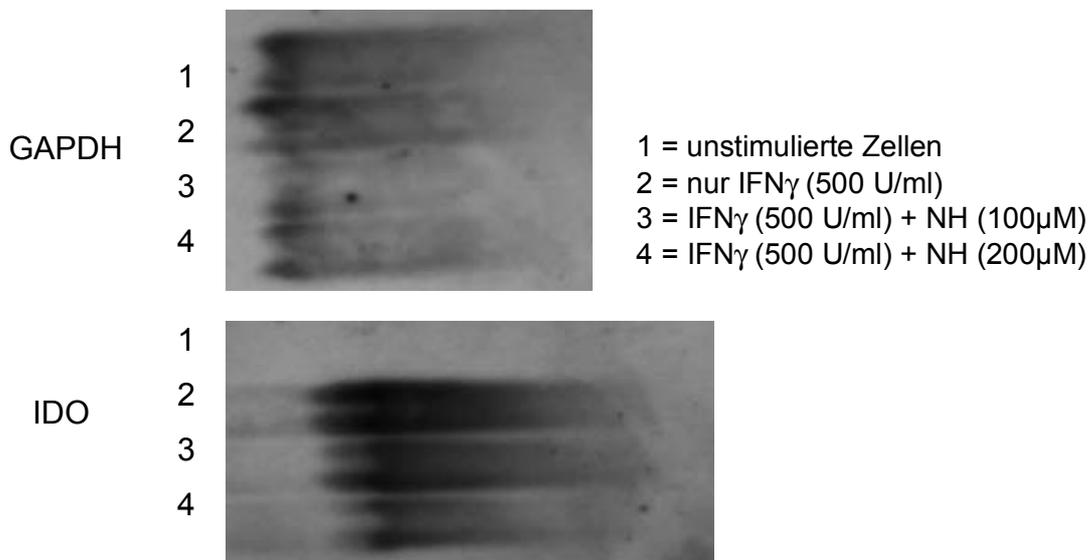
**Abb. C5: Effekte von Norharman direkt auf das IDO-Enzym, nach Lyse der Makrophagen.** Die Aktivität des freigesetzten Enzyms von  $2 \times 10^6$  Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen von Norharman beeinflusst. Die Werte bilden den Durchschnitt 3 gleicher Messungen mit Standardabweichung.

Insgesamt ist die IDO-Aktivität schwächer als bei der Messung im Zellüberstand, obwohl mehr Zellen pro Ansatz verwendet wurden ( $2 \times 10^6$  Zellen vs.  $10^5$  Zellen). Dafür findet sich folgende Erklärung: für die eigentliche Reaktion, Umwandlung des Tryptophan in Kynurenin, ist nur eine halbe Stunde Zeit. Im Gegensatz hierzu dauert die Kynureninbestimmung im Überstand 72 Stunden.

## 6 Einfluss von Norharman auf die Expression von IDO

### a) Einfluss von Norharman auf die Expression von IDO-mRNA bei pH 7.3

Die Zellen werden 24 Stunden vor der RNA-Präparation mit 500 U/ml IFN $\gamma$  und Norharman (100  $\mu$ M oder 200  $\mu$ M) stimuliert. Verglichen wird die IDO-Expression mit der Expression von GAPDH. Letztere dient als Nachweis dafür, dass eine Reduktion des IDO-RNA-Signals nicht auf eine verminderte Vitalität der Zelle zurückzuführen ist, da GAPDH als Housekeeping-Gen immer exprimiert wird. Zudem ist damit sichergestellt, dass man gleiche Mengen mRNA pro Spur eingesetzt hat.

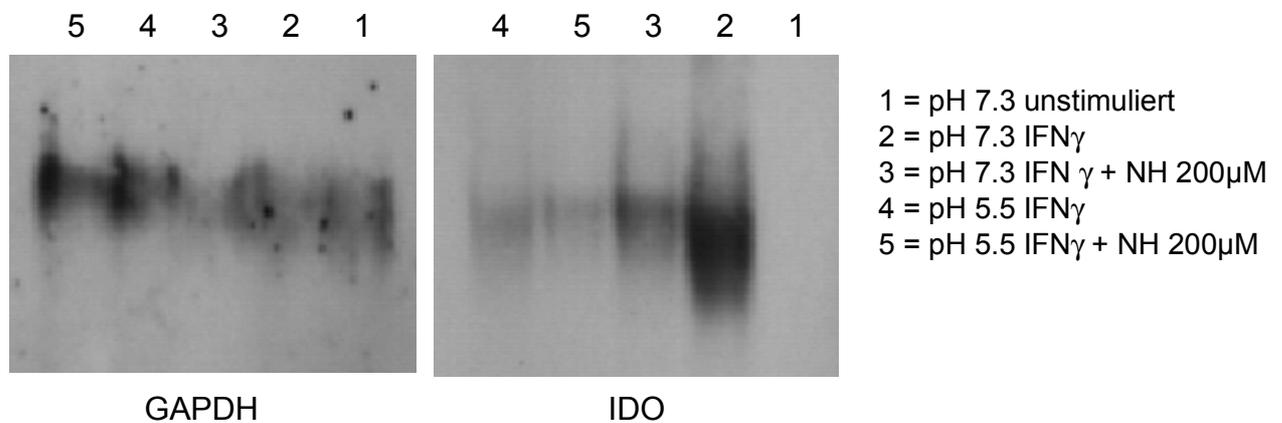


**Abb. C6a: Vergleich GAPDH-/IDO-mRNA im Northern Blot bei Zugabe von Norharman.** Eingesetzt wurden für eine GAPDH-Detektion 15-20  $\mu$ g RNA, für die der IDO 60-70  $\mu$ g RNA. Es wurde RNA von Makrophagen verwendet, die 24h vor RNA-Präparation mit IFN $\gamma$  (500 U/ml) bzw. Norharman (100 bzw. 200 $\mu$ M) stimuliert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei vergleichbaren Versuchen.

Betrachtet man die IDO-Signale, so sieht man bei den mit Norharman behandelten Zellen eine sehr viel deutlichere Signalabschwächung als dies bei der GAPDH der Fall ist. Die Vitalität der Zelle mag also etwas eingeschränkt sein, aber deutlicher ist der hemmende Effekt von Norharman auf die IDO-Expression. Dies ist zudem konzentrationsabhängig; je größer die NH-Konzentration ist, desto weniger IDO-mRNA ist nachweisbar.

## b) Einfluss von Norharman auf die Expression von IDO bei pH 5.5

Verglichen wird die IDO-Expression bei unterschiedlichen pH-Werten, da hier der Effekt von Norharman aufgrund der besseren Löslichkeit von Norharman noch deutlicher sein müsste. Insgesamt ist hier auch das Signal abgeschwächt, jedoch auch bei Zellen, die nur mit IFN $\gamma$  stimuliert worden sind. Bei pH 5.5 sind also die Zellen weniger vital, dennoch hat Norharman hier einen hemmenden Effekt auf die Expression von IDO. Die IDO-Expression ist generell bei saurem pH und speziell bei Zugabe von Norharman eingeschränkt.



**Abb. C6b: Vergleich GAPDH-/IDO-mRNA im Northern Blot bei Zugabe von Norharman bei pH 7.3 bzw. 5.5.** Eingesetzt wurden für eine GAPDH-Detektion 15-20  $\mu$ g RNA, für die der IDO 60-70  $\mu$ g. Es wurde RNA von Makrophagen verwendet, die 24h vor RNA-Präparation mit IFN $\gamma$  (500 U/ml) bzw. Norharman (200 $\mu$ M) bei unterschiedlichen pH-Werten stimuliert wurden. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei vergleichbaren Versuchen.

## **7 Realtime-PCR (TaqMan®-System): quantitativer Nachweis des Einflusses von Norharman auf die Expression von IDO-RNA**

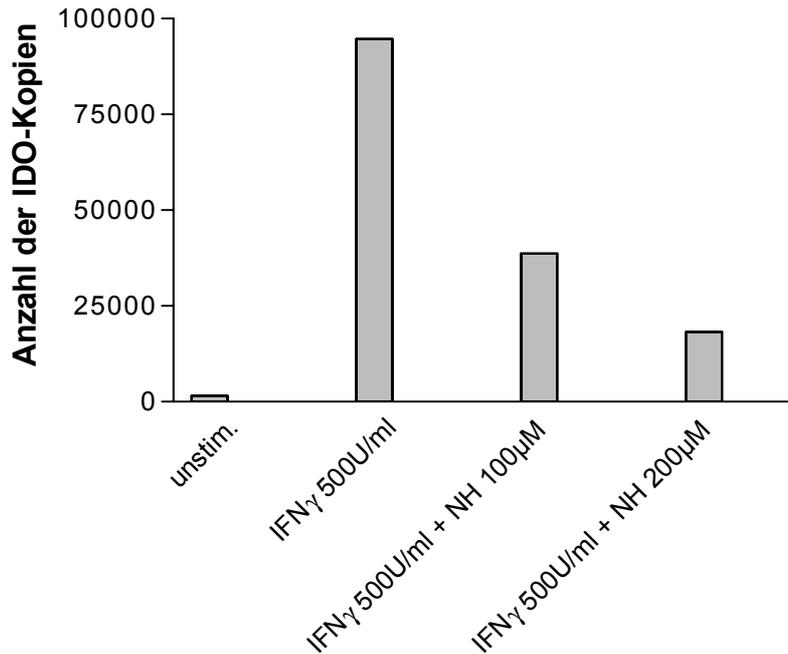
Wie bereits in den Methoden beschrieben, stellt die TaqMan®-PCR ein Verfahren dar, Mengen an DNA zu quantifizieren. In diesem Fall hilft uns das Verfahren, die bereits im Northern Blot gewonnene Erkenntnis über den Einfluss von Norharman auf die Expression von IDO auf mRNA-Ebene in Zahlen zu fassen.

Als Templates für die Realtime-PCR diente DNA von mRNA, die bereits schon für die Northern Blots präpariert wurde. Dabei waren folgende Ansätze untersucht worden: Gesamt-RNA von unstimulierten Makrophagen, von Makrophagen, die mit 500 U/ml IFN $\gamma$  stimuliert worden sind, und von stimulierten Makrophagen, denen entweder 100  $\mu$ M oder 200  $\mu$ M Norharman zugesetzt wurde. Die RNA-Präparation erfolgte 24h nach Zusatz von IFN $\gamma$  bzw. Norharman.

Die mRNA wurde dann in cDNA im Verhältnis 1:1 umgeschrieben. Die cDNA konnte danach für die Realtime-PCR eingesetzt werden.

In der Realtime-PCR wurden sowohl GAPDH- als auch IDO-Templates amplifiziert. Auch hier diente die GAPDH (Housekeeping-Gen) als Vitalitätskontrolle bzw. zur Kontrolle, ob gleiche Mengen an Templates pipettiert worden sind, da die Menge an GAPDH definitionsgemäß in allen Ansätzen gleich sein sollte. Trotz sorgfältigen Arbeitens sind dennoch unterschiedliche Mengen an Template pipettiert worden. Dies zeigte sich an kleinen Abweichungen beim zyklusabhängigen Überschreiten der Schwelle, die den Beginn einer exponentiellen Amplifizierung von GAPDH darstellt.

Daher wurde die Menge der IDO-Amplifikate mit der der GAPDH-Amplifikate in jeder Probe verglichen, um eine generelle Hemmung der mRNA-Synthese mit einzukalkulieren. Die GAPDH-Probe der unstimulierten Makrophagen wurde als Bezugswert genommen und für jeden weiteren Ansatz ein Korrekturfaktor ermittelt, um die gewonnen Werte miteinander vergleichen zu können. Diese Daten wurden für die gezeigte Grafik verwendet.



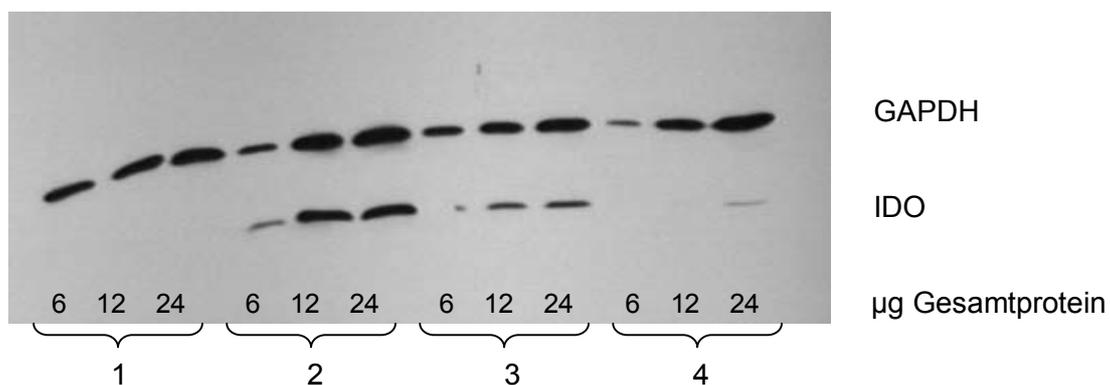
**Abb. C7: Unterschiedliche Menge an IDO-cDNA-Kopien nach TaqMan®-PCR** Makrophagen wurden mit IFN $\gamma$  (500 U/ml), sowie mit und ohne Einfluss von Norharman (100 bzw. 200 $\mu$ M) stimuliert und nach 24h RNA gewonnen. Für die cDNA-Synthese wurde ein 2 $\mu$ g RNA eingesetzt. Die Ergebnisse bilden den Durchschnitt einer Doppelbestimmung und sind eine repräsentative Darstellung von 3 Experimenten.

Dabei ist folgendes zu beachten: Die Kopienzahl wird dadurch errechnet, dass ein Standard (bekannte Template-Anzahl der IDO in pMEP4, s. Methoden) mit bekannter Kopienzahl mitgeführt wurde. Damit ist man in der Lage, eine Eichkurve zu bilden und die Kopien der IDO-mRNA auszurechnen. Wie erwartet findet sich für die IDO-mRNA von unstimulierten Makrophagen nur eine geringe Anzahl an Kopien. Dies könnte auf eine basale Expression von IDO hinweisen, ist jedoch eher einer Fehlerquote innerhalb des Testsystems zuzuschreiben. Weitaus mehr Kopien werden bei Zellen nachgewiesen, die mit IFN $\gamma$  stimuliert wurden. Dabei bewirkte die Zugabe von 100  $\mu$ M Norharman eine Reduktion der IDO-mRNA auf die Hälfte der mRNA-Menge der zuvor nur mit IFN $\gamma$  stimulierten Zellen, bei Zugabe von 200  $\mu$ M Norharman kam es zu einer Reduktion auf annähernd ein Viertel.

## 8 Semiquantitativer Nachweis von IDO- und GAPDH-Protein im Western Blot

Bisher erfolgte der Nachweis des Effektes von Norharman auf RNA-Ebene und als Nachweis der Aktivität der IDO. Mit Hilfe des Western Blottes sollte nun auch auf Proteinebene dargestellt werden, dass die geringere IDO-Aktivität unter Norharman-Einfluss aufgrund einer reduzierten Menge an IDO-Protein hervorgerufen wurde.

Auch hier wurde folgender Ansatz verfolgt: Proben mit unstimulierten Makrophagen, Makrophagen, die mit 500 U/ml IFN $\gamma$  stimuliert worden sind und stimulierte Makrophagen, die zusätzlich mit 100 bzw. 200  $\mu$ M Norharman versetzt worden sind. Von diesen Zellen wurden die Proteine isoliert und durch den Western Blot semiquantitativ dargestellt.



- 1 = unstimulierte Zellen
- 2 = nur IFN $\gamma$  (500 U/ml)
- 3 = IFN $\gamma$  (500 U/ml) + Norharman (100 $\mu$ M)
- 4 = IFN $\gamma$  (500 U/ml) + Norharman (200 $\mu$ M)

**Abb. C8: Nachweis von IDO-Protein unterschiedlicher Menge, zusätzlich Nachweis von GAPDH als Vitalitätskontrolle. Konzentrationsabhängige Minderung der Proteinexpression der IDO durch Norharman.** Stimulation von Makrophagen mit IFN $\gamma$  (500 U/ml), sowie mit und ohne Einfluss von Norharman (100/200 $\mu$ M), die eingesetzten Proteinmengen sind 6, 12 und 24  $\mu$ g. Die dargestellte Abbildung ist ein repräsentatives Beispiel von drei Western Blots.

Es sind deutlich die Abstufungen zu erkennen, die die eingesetzten unterschiedlichen Proteingesamtmengen widerspiegeln. Vergleicht man 40 kD- und 45 kD-Bande, so erscheinen die Banden der GAPDH (40 kD) deutlich stärker als bei der IDO (45 kD). Vergleicht man die unterschiedlichen Stimulationsansätze, erkennt man sehr gut, dass die GAPDH in den einzelnen Ansätzen unterschiedlich stark

erscheint. Des Weiteren ist zu sehen, dass unstimulierte Makrophagen so wenig IDO produzieren, dass sie mit dem gewählten Verfahren fast nicht nachweisbar ist, aber eine Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  die Makrophagen zur Produktion von IDO anregt, da hier die Signale gut zu erkennen sind. Wird einer Makrophagen-Kultur jedoch Norharman zugesetzt, so werden schwächere Signale detektiert.

## **D Diskussion**

In den vorhergehenden Abschnitten konnten durch die durchgeführten Versuche einige der in der Zielsetzung formulierten Fragen beantwortet werden. Dabei tauchten jedoch neue Fragen auf, so dass im Folgenden die produzierten Ergebnisse interpretiert und diskutiert werden sollen.

### **1. Toxoplasmostatische Mechanismen**

#### **1.1 Effekte der Tryptophan-Metabolite**

Wie aus den Versuchen unter Abschnitt C2 hervorgeht, ermöglicht eine Resupplementierung von Tryptophan in Glioblastomzellen eine Aufhebung der Toxoplasmostase. Dies wurde bereits von Däubener 1993 beschrieben.

Bei Makrophagen hingegen kann trotz Resupplementierung von Tryptophan nach IDO-Aktivierung die Toxoplasmostase nicht aufgehoben werden. Ein Tryptophanmangel ist hierfür also nicht verantwortlich. Es ist also zu überlegen, ob das Toxoplasmenwachstum durch weitere mit der IDO-Aktivität in Verbindung stehende Mechanismen negativ beeinflusst werden. Hier sind zum Beispiel toxische Metabolite im Tryptophan/Kynurenin-Abbau zu diskutieren.

So konnte sowohl durch Okuda et al. 1998 als auch durch Moroni 1999 gezeigt werden, dass 3-OH-Kynurenin oder 3-OH-Anthranilsäure, zwei weitere Abbauprodukte im Tryptophan-Katabolismus, für die Apoptose von kultivierten Neuronen verantwortlich zu sein scheinen. Vergleichbare Ergebnisse erzielte Chiarugi 2001, als er kortikale Zellen mit dem Zellüberstand von IFN $\gamma$  stimulierten Makrophagen inkubierte. Es ist daher anzunehmen, dass diese Metabolite ebenfalls toxisch auf Toxoplasmen wirken könnten.

Betrachtet man darüber hinaus den Einfluss auf aktivierte CD4(+)-T-Lymphozyten, CD8(+)T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK), dann scheinen Kynurenin, Picolinsäure und Quinolinsäure inhibitorische Effekte auf die Proliferation der o.g. Zellen zu besitzen. Diese inhibitorischen Effekte sind in Anwesenheit von Tryptophan abgeschwächt und werden durch den IDO-vermittelten Tryptophanabbau verstärkt (Frumento 2002).

Die oben genannten Ergebnisse könnten auf ähnliche Effekte bei Makrophagen hindeuten. Im Hinblick auf einen Effekt auf Protozoen allgemein und *Toxoplasma gondii* im Speziellen sind die erwähnten Beispiele jedoch nur zurückhaltend zu bewerten.

So werden die für Quinolinsäure und Kynurenin beschriebenen Effekte in der Interaktion mit NMDA-Rezeptoren beschrieben (Stone, 2001, Chen et al. 1999). Diese Rezeptoren sind typisch für Neuronen und haben als Ionenkanäle ihre Aufgabe in der Signalübermittlung. Ob vergleichbare Ionenkanäle bei Toxoplasmen oder Makrophagen existieren, ist noch nicht beschrieben.

Ein weiteres Augenmerk ist auf die Picolinsäure im Speziellen zu richten: Durch Bosco et al. wurde ebenfalls im Bezug auf murine Makrophagen Folgendes beschrieben: Picolinsäure ist ein potenter Aktivator der inflammatorischen Chemokine MIP (macrophage inflammatory protein)-1 alpha bzw. MIP-1 beta und scheint zusätzlich in Interaktion mit dem Eisenstoffwechsel (s. auch unten) zu stehen (2000). In einer weiteren Studie (2003) vermutete Bosco, dass IFN $\gamma$  und Picolinsäure reziproke Effekte auf die MIPs bzw. auf die Expression von deren Rezeptoren haben könnten. Hiermit liegt also eine weitere Interaktionsmöglichkeit durch ein Tryptophanderivat vor.

Bereits 1993 fanden Melillo et al. heraus, dass Picolinsäure ein Co-Stimulus für die Induktion Stickoxid-Produkten ist. So wurde bei der Untersuchung von murinen Makrophagen erstmalig eine Verbindung zwischen dem Tryptophan-Metabolismus und einer L-Arginin abhängigen Stickoxidproduktion gefordert.

Zusätzlich wurde beobachtet, dass Picolinsäure in der Lage ist, die Produktion von IFN $\gamma$  und iNOS zu stimulieren (Mucci et al. 2003). Daraufhin konnte in den untersuchten Makrophagenkulturen eine antifungale Aktivität festgestellt werden.

Alle diese Studien sind Hinweise darauf, dass auch Metabolite im Tryptophan- bzw. Kynurenin-Abbau Einfluss auf die Toxoplasmostase in Makrophagen haben. Durch die letztgenannte Untersuchung, wie auch durch die von Melillo (1993, s. o.) ergeben sich jedoch zusätzlich Hinweise auf eine Interaktion von IDO, IFN $\gamma$  und iNOS. Damit eröffnet sich ein weiterer Diskussionspunkt (s. nächste Seite):

## 1.2 Nicht auf Tryptophandepletion basierende Toxoplasmostase-Mechanismen

Eine Toxoplasmostase in Makrophagen muss im Vergleich zu den Glioblastomzellen nicht nur durch die IDO vermittelt worden sein. Hierfür sind bereits einige andere Mechanismen beschrieben: Wie bereits oben erwähnt, ist die Produktion von Stickoxid durch die iNOS (Adams et al. 1990, Chao et al. 1993) einer der in Frage kommenden Mechanismen. Weitere Möglichkeiten sind Synthese reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst) (Nathan et al. 1983, Aline et al. 2002) oder die Eisendepletion (Dimier et Bout, 1998). Vergleichbares wurde von Byrd et al. 1989 für die ebenfalls intrazellulär lebenden *Legionella pneumophila* gezeigt.

Zusätzlich ist bekannt, dass Protozoen wie *Toxoplasma gondii* abhängig sind von der Aquisition von Cholesterol zur Proliferation in ihrem Wirt, dabei gewinnen sie Cholesterol von vorhandenen LDL (low density lipoproteins) für die Cholesterylestersynthese und speichern sie in Lipidkörpern (Sonda et al 2001, Nishikawa et al. 2005). Umgekehrt ist jedoch bekannt, dass Makrophagen nach Stimulation durch IFN $\gamma$  in der Lage sind, LDL zu oxidieren (Fong et al. 1994). Es bleibt also zu fragen, ob nicht ebenfalls ein Mangel an verfügbaren LDL als Ursache für eine Toxoplasmostase in Erwägung zu ziehen ist.

Bezüglich der Interaktion zwischen IDO und iNOS ergaben sich in einer in vivo Studie mit Mäusen von Fujigaki et al. (2002) Hinweise darauf, dass nach Toxoplasmeninfektion sowohl IDO als auch iNOS als toxoplasmostatische Mechanismen in Frage kommen, dass jedoch das Vorherrschen des jeweiligen Enzyms stark abhängig ist von untersuchten Gewebe (dort: Lunge versus Gehirn). In einer Untersuchung an mit Staphylokokken infizierten Epithelialzellen durch Hucke wurde sogar nachgewiesen, dass iNOS in der Lage ist, den Abbau von IDO zu fördern (Hucke et al. 2004).

Zusammenfassend konnte hier also neben der Tryptophandepletion durch die IDO über folgende weitere Toxoplasmostase-Mechanismen berichtet werden:

1. Toxische Effekte von Tryptophan-Metaboliten, insbesondere der Picolinsäure
2. Eisendepletion
3. Oxidative burst
4. Entzug von Cholesterol durch LDL-Oxidation
5. Produktion von Stickoxiden durch die iNOS.

## **2. Norharman und seine Effekte**

### **2.1 Norharman und Toxoplasmostase**

Norharman konnte als hemmender Faktor, sowohl was die IDO-Aktivität als auch das Toxoplasmenwachstum anbelangt, identifiziert werden. Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Inhibition der IDO durch 6-Chloro-DL-Tryptophan, durch die zwar das Wachstum von Streptokokken und Staphylokokken wieder möglich war, aber eine Toxoplasmostase nicht aufgehoben werden konnte (MacKenzie et al. 1999).

Dieses Ergebnis war insofern überraschend, weil zunächst durch die Hemmung der IDO eine Aufhebung der Toxoplasmostase erwartet worden ist. In vivo-Untersuchungen mit Trypanosomen stützten diese Vermutung (Vincendeau et al. 1999). In Anwesenheit von Norharman konnte eine erhöhte Parasitenzahl nachgewiesen werden.

Wie jedoch oben bereits diskutiert wurde, basiert eine Toxoplasmostase wahrscheinlich nicht nur auf die IFN $\gamma$ -vermittelte Tryptophandepletion durch die IDO, wie zum Beispiel bei den oben Ergebnissen mit Bakterien.

Dennoch verdient die Untersuchung von Norharman besondere Aufmerksamkeit.

Für den technischen Aspekt war wichtig zu zeigen, dass trotz besserer Löslichkeit von Norharman im sauren pH-Bereich auch bei Versuchsansätzen mit normalem pH-Wert ähnliche Ergebnisse erzielt worden sind. Auch Makrophagen sind im sauren Milieu besonders aktiv, Toxoplasmen zeigen hingegen in einem sauren Milieu eher reduzierte Wachstumstendenzen. Die besondere Empfindlichkeit der Toxoplasmen auf ein saures Milieu konnte bereits 1985 durch Sibley et al. gezeigt werden.

Für einen physiologischen pH bleibt zu fragen, welche weiteren Effekte Norharman auf die Toxoplasmen gehabt haben könnte. Neben der Überlegung, dass weitere toxoplasmostatisch wirkende Mechanismen existieren, die von Norharman unbeeinflusst bleiben (s. o.), wäre zu diskutieren, dass Norharman zum Beispiel direkt toxisch auf die Toxoplasmen wirken könnte.

So konnten Uezono et al. 2001 nachweisen, dass unter Gabe von Norharman, bzw. auch durch die Gabe von Harman in Neuroblastomzellen eine Apoptose bzw. eine Nekrose, vermutlich durch DNA-Schäden, hervorgerufen werden konnte. Bei Gamma-Carbolinen (3-Amino-1,4-Dimethyl-5H-Pyrido[4,3-b]-Indol (Trp-P-1)) und 3-Amino-4-Methyl-5H-Pyrido[4,3-b]-Indol (Trp-P-2) konnte sogar ein direkter Schaden der DNA nachgewiesen werden. Es bleibt offen, ob Toxoplasmen auch von einer

Norharman-induzierten Apoptose betroffen sind. Möglichweise lassen sich jedoch auch folgende Ergebnisse für die Unterstützung der o.g. These heranziehen: So bewirkt Norharman allein bei *Salmonella typhimurium* keinerlei Mutagenität, in Anwesenheit von aromatischen Aminen wie Anilin und Toluidin kommt es jedoch zur Veränderung der ursprünglichen DNA (Wakabayashi et al. 1997). Allerdings erscheint unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen eine Verbindung von Norharman und Aminen und deren gemeinsamer Einfluss auf die Toxoplasmen eher unwahrscheinlich.

Eine weitere These ist, dass das Wachstum der Toxoplasmen durch den toxischen Effekt von Norharman auf die Makrophagen (Vitalitätseinschränkung der Wirtszelle) verhindert wird, so dass die Makrophagen nicht mehr als Wirt zur Verfügung stehen. Für die Gruppe der beta-Carboline und Norharman in Speziellen konnte ebenfalls für andere Gewebe Toxizität nachgewiesen werden, so zum Beispiel für renale Tubuluszellen (Hagiwara et al. 1992), sowie in der Organogenese von Ratten. (Naga et al. 2002).

Für die durchgeführten Versuche konnte jedoch eine Vitalitätseinschränkung von Makrophagen und Toxoplasmen ausgeschlossen werden, da nur nicht-toxische Konzentrationen von Norharman verwendet wurden. Diese Konzentrationen wurden durch die Vitalitätsprüfung mittels Trypanblau ermittelt.

## **2.2 Norharman und die Interaktion mit der IDO**

Im Mittelpunkt des Interesses stand dann die Interaktionsweise des Norharmans mit der IDO. Hierzu wurden Messungen der IDO-Aktivität im Zell-Lysat durchgeführt. In diesem Lysat lagen nur noch Zellproteine- und damit auch die IDO- vor. Norharman konnte also nur noch mit dem Enzym selbst reagieren, nicht jedoch mit Substraten der Gentranslation (siehe unten), während dies beim initialen Ansatz, Stimulation der Makrophagen und Messen der IDO-Aktivität im Zellüberstand, denkbar war. Diese Messungen haben gezeigt, dass Norharman in der Lage ist, das Enzym direkt zu hemmen. Dabei wurden unter anderem deutlich höhere Konzentrationen eingesetzt, als dies bei den Versuchen in einer Zellkultur aufgrund einer Vitalitätseinschränkung der Zellen durch Norharman realisierbar gewesen war. Der Effekt einer Inhibition von IDO war bei sehr hohen Konzentrationen von Norharman besonders deutlich. Bei eingesetzten Mengen von 200 µM Norharman, die für Versuche mit Makrophagen

tolerable Konzentration, war jedoch auch bei den Zell-Lysatversuchen bereits eine Reduktion der IDO-Aktivität um 50% nachzuweisen.

Beim Nachweis der IDO-Aktivitätsminderung im Zellüberstand (also nach einer Stimulation der Zellkultur durch IFN $\gamma$  bzw. Norharman) war aber auch bei niedrigeren Konzentrationen von Norharman bereits ein Effekt zu sehen. Betrachtete man beide Untersuchungen, war zu sehen, dass Norharman in einer Zellkultur bei gleichen eingesetzten Konzentrationen eine stärkere Hemmung der IDO bewirkte als bei der Interaktion mit der freien IDO bei den Zell-Lysat-Versuchen. So könnten auch andere Interaktionswege innerhalb der Makrophagen außer der direkten Enzyminhibition für die beobachteten Effekte verantwortlich sein.

Einschränkend muss darauf hingewiesen werden, dass es möglich ist, dass innerhalb der Zelle vergleichbar hohe oder ggf. höhere Konzentrationen herrschten wie in den Zell-Lysat-Versuchen, zum Beispiel durch eine Kompartimentierung innerhalb der Zelle, d.h. dass innerhalb der Zelle lokalisiert höhere Konzentrationen vorlagen.

Wie kam es jedoch zu der direkten Hemmung von IDO durch Norharman? Durch die sterische Verwandtschaft mit Tryptophan ist zum Beispiel ein kompetitiver Wettbewerb denkbar. Durch die Verdrängung von Tryptophan steht weniger Substrat für die Umsetzung zu N-Formylkynurenin zur Verfügung, damit sind geringere Mengen nachweisbar. Tatsächlich bindet Norharman jedoch direkt am Häm-Eisen der IDO als Nitrogendonor (Sono et al. 1989).

Norharman und andere Carboline sind Gegenstand weitreichender Forschungen. Gerade im Hinblick auf die hier durchgeführten Untersuchungen ist folgende Studie besonders interessant, da sie im Widerspruch zu allen bisher aufgeführten Überlegungen zu stehen scheint: 2001 wies die Arbeitsgruppe um Fekkes nach, dass unter Tryptophan-Gabe die Plasma-Level von Tryptophan wie auch Norharman erhöht waren. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Tryptophan ein Vorläufer von Norharman sein könnte. Vergleicht man dies jedoch mit den bestehenden Studien (Sono et al. 1989, s.o.), so könnte man auch folgende Schlüsse diskutieren:

1. Der Tryptophanspiegel im Plasma war erhöht aufgrund der zusätzlichen Gabe von Tryptophan.
2. Norharman war im Plasma erhöht, da es aufgrund des Tryptophanangebotes zu einem vermehrten Auftreten von IDO gekommen war, so dass Norharman verstärkt an der IDO binden konnte und damit einem physiologischen Abbau nicht zugänglich war.

Die Möglichkeit, dass Norharman aus Tryptophan entsteht, macht zumindest für Makrophagen keinen Sinn. Nach den oben erhobenen Ergebnissen würde dies bedeuten, dass sich ein wirksamer antiinflammatorischer Wirkmechanismus, nämlich Entzug der essentiellen Aminosäure Tryptophan durch die IDO, selbst limitiert, indem aus Tryptophan ein Inhibitor der IDO entstehen würde. Dennoch könnte die These, dass Tryptophan ein Vorläufer von Norharman sein könnte, auch durch die Untersuchungen von Wakabayashi et al. 1997 gestützt werden, hierbei wurde durch Erhitzen Tryptophan zu Norharman umgewandelt. Welche Mechanismen dies in Makrophagen bewirken könnten, und ob dies tatsächlich geschieht, bietet Anreiz zu weiterer Forschung.

Doch nicht nur auf die IDO scheint Norharman einen Einfluss zu haben. Nach Stimulation mit  $\text{IFN}\gamma$  werden in Makrophagen sowohl die IDO als auch die iNOS aktiviert. Versuche mit Mausmakrophagen haben gezeigt, dass nach Hinzugabe von Norharman nicht nur die Stoffwechselprodukte der IDO, 3-OH-Kynurenin und Quinolinsäure, sondern auch das iNOS-Produkt NO nur noch in verringerter Menge nachgewiesen werden konnten (Chiarugi et al. 2000). Norharman scheint also auch Einfluss auf die iNOS zu haben. Den genauen Wirkort hat man aber auch in diesem Fall nicht näher bestimmen können. Jedoch konnte ausgeschlossen werden, dass das für die Katalyse notwendige NADPH reduziert war, oder eine mangelnde Induktion der iNOS vorlag.

## **2.3. Norharman- auf der Suche nach dem Wirkort**

### **2.3.1 Transkriptionsebene**

Nach den oben vorgestellten Versuchen stellte sich die Frage, ob Norharman nicht nur mit der IDO selbst interagiert, sondern auch eine Interaktion auf dem Level der Genexpression bzw. Gentranslation besteht.

Zudem war eine Interaktion von Norharman auf Ebene der G-Proteine im Bereich der Translation bereits bekannt (Klinker et al. 1997). Der eukaryote Initiationsfaktor 2 (eIF2) ist zum Beispiel ein G-Protein, das für den Transport von Starter-Aminoacyl-tRNA auf die kleine ribosomale Untereinheit zuständig ist. Daher ist eine Interaktion von Norharman auch bei der Translation der IDO-mRNA denkbar.

Aus diesem Grund wurde per Northern Blot untersucht, ob in Anwesenheit von Norharman eine Reduktion von IDO-mRNA zu nachzuweisen ist. Durch den Northern

Blot konnte bestätigt werden, dass in Anwesenheit von Norharman die IDO-mRNA in geringeren Mengen nachweisbar ist und sogar bei pH 5.5 Norharman einen noch stärkeren Effekt hat als bei pH 7.3.

Wie bereits erwähnt, ist der Northern Blot nur ein qualitatives Verfahren. Eine quantitative Abschätzung bot die TaqMan®-PCR, da hier ein numerischer Vergleich möglich war. Es zeigte sich, dass die Templates der GAPDH bei unterschiedlicher Stimulation in annähernd gleichen Mengen vorlagen. Dies erlaubte zwei Schlüsse:

1. Die Vitalität der Zellen war trotz Zytokin- und Norharman-Einfluss nicht eingeschränkt.
2. Darauf basierend konnte die Zahl der Templates der IDO miteinander verglichen werden.

Letztlich wurde damit der Effekt von Norharman auf mRNA-Ebene in drei Schritten nachgewiesen: Die Einflüsse auf die Transkription wurde qualitativ durch die Verminderung der mRNA mittels Northern Blot, quantitativ durch die Realtime-PCR nachgewiesen. Als weiterer qualitativer Schritt folgte der Western Blot, der die reduzierte Menge der IDO an sich zeigte und damit die Translation beleuchtete.

Im Hinblick auf die Aktivitätsmessungen im Überstand der Zellkultur bzw. auf die Versuche mit den isolierten Proteinen im Zell-Lysat konnte damit nachgewiesen werden, dass es nicht nur zu einer isolierten Inhibition der IDO-Aktivität durch Norharman gekommen ist.

### **2.3.2 Weitere Effekte auf andere G-Proteine der Makrophagen**

Der Ort der Interaktionen von Norharman lässt sich im Bezug auf die GTP-bindenden Proteine (kurz G-Proteine) noch weiter untersuchen.

Die Expression des IDO-Genes wird durch IFN $\gamma$  vermittelt, indem IFN $\gamma$  an einem sog. Interferon-Stimulated Response Element (ISRE) bindet. Dadurch wird ein G-Protein aktiviert, das in der Literatur als IGTP (Interferon gamma- induzierte GTPase) bezeichnet wird (Collazo et al. 2002), dass wiederum die Expression des IDO-Genes reguliert (Hassanain et al. 1993, Lew. Et al. 1991). Dadurch ist ein weiteres G-Protein im Rahmen der IDO-Synthese gefunden, dessen Aktivität durch Norharman modifiziert werden könnte.

### **2.3.3 Effekte auf G-Proteine der Toxoplasmen**

An dieser Stelle lenkt sich die Diskussion ebenfalls auch zu dem Aspekt der fehlenden Aufhebung der Toxoplasmostase. Es ist zu überlegen, ob Norharman mit anderen G-Proteinen interagiert, die für ein Toxoplasmenwachstum notwendig sind.

So besitzen Toxoplasmen zum Beispiel heterotrimere G-Proteine, die für eine Sekretion zur Umgestaltung der parasitophoren Vakuole notwendig sind. Dabei sind einerseits die G(o)-alpha- und die Gs-alpha-Untereinheit paranukleär und andererseits die Gi3-Untereinheit in der Zytoplasma-Matrix lokalisiert (Halonen et al. 1996).

Im Rahmen einer Immunreaktion wird unter anderem IL-12 gebildet. In diesen für die Bildung von IL-12 verantwortlichen Signalweg sind der Chemokin-Rezeptor CCR5, aber auch ein G-Protein involviert, dieser Signalweg kann durch Toxoplasmenantigene beeinflusst werden (Aliberti et al. 2002). Auch hier ergeben sich Möglichkeiten, dass Norharman in die Toxoplasmostase über Interaktionen mit G-Proteinen eingreift.

## **E Ausblick:**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit kamen einige Fragen auf, aus denen sich neue Arbeitsansätze ergeben und die zum Teil Gegenstand aktueller Forschung sind.

Zum Beispiel:

- Welche anderen Mechanismen gibt es, die die Toxoplasmen im intrazellulären Wachstum hemmen?
- Wie sind die inhibitorischen Effekte von Norharman auf die IDO selbst aus molekularbiologischer Sicht zu sichern?
- Wie erklären sich die Effekte von Norharman auf Transkriptions- und Translationsebene? Eine Untersuchung der an der Translation beteiligten G-Proteine, wie zum Beispiel eIF2, scheint ein lohnenswertes Ziel zu sein.
- Welche anderen Angriffsorte (G-Proteine) von Norharman lassen sich nachweisen?

## F Zusammenfassung:

Die Expression des Enzyms Indoleamin-2,3-dioxygenase, kurz IDO, von Makrophagen und Glioblastomzellen ist durch die Zytokine IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  stimulierbar. Die nachgewiesene Aktivität des Enzyms im Zellüberstand ist umso stärker, je höher die Konzentration der Zytokine war.

Parallel dazu konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von Toxoplasmen in Makrophagen bzw. Glioblastomzellen gehemmt wurde. Dabei scheint der IDO-vermittelte Tryptophanmangel eine wichtige Rolle zu spielen. Supplementiert man Tryptophan in Glioblastomzellen, können die Toxoplasmen trotz Aktivierung der IDO durch IFN $\gamma$  wieder wachsen. In Makrophagen hingegen kommt es zu keinem erneuten Wachstum. Damit ergeben sich erste Hinweise, dass bei Makrophagen andere toxoplasmostatische Mechanismen wirksam sind.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, sollte die IDO durch die Zugabe des  $\beta$ -Carbolins Norharman in ihrer Funktion gehemmt werden. Dennoch kam es zu keiner Aufhebung der Toxoplasmostase. Damit war die o. g. These bestätigt.

Im Bezug auf die Wirkungsweise des Norharmans konnte zunächst nachgewiesen werden, dass Norharman auf der Ebene der Enzyminhibition aktiv ist. So konnten durch die Zell-Lysat-Versuche gezeigt werden, dass die IDO-Aktivität eingeschränkt war, wenn Norharman direkt auf das isolierte Enzym trifft.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass unter Norharman-Einfluss deutlich weniger IDO-mRNA exprimiert wurde. Dieser Einfluss auf die Transkriptionsebene konnte sowohl qualitativ per Northern Blot, als auch quantitativ per Realtime-PCR erbracht werden. Dass aufgrund der verminderten Menge an mRNA die Proteinsynthese im Rahmen der Translation ebenfalls eingeschränkt war, konnte durch den Western Blot verifiziert werden.

Zusätzlich wurde ein Teil der o. g. Verfahren nicht nur bei pH 7.3, sondern auch bei pH 5.5 durchgeführt. Dabei konnte bei pH 5.5 eine bessere Löslichkeit von Norharman beobachtet werden. Zudem konnte für das saure Milieu eine erhöhte Effektivität von Norharman bei der Bestimmung der IDO-Aktivität im Zellüberstand, sowie im Northern Blot nachgewiesen werden.

## G Literatur

**Adams,L.B.; Hibbs,J.B.,Jr.; Taintor,R.R.; Krahenbuhl,J.L.** " Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine" J Immunol. 1990 Apr 1;144(7):2725-9.

**Aliberti,J.; Sher,A.** " Positive and negative regulation of pathogen induced dendritic cell function by G-protein coupled receptors" Mol Immunol. 2002 May;38(12-13):891-3.

**Aline,F.; Bout,D.; Dimier-Poisson,I.** " Dendritic cells as effector cells: gamma interferon activation of murine dendritic cells triggers oxygen-dependent inhibition of *Toxoplasma gondii* replication" Infect Immun. 2002 May;70(5):2368-74.

**Badawy, A. A. et al.** "Tryptophan metabolism in alcoholism. Tryptophan but not excitatory amino acid availability to the brain is increased before the appearance of the alcohol-withdrawal syndrome in men." Alcohol Alcohol 33.6 (1998): 616-25.

**Bilzer, T. et al.** "Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three humangioblastomas established in vitro." Virchows Arch.A Pathol.Anat.Histopathol. 418.4 (1991): 281-93.

**Bosco,M.C.; Rapisarda,A.; Massazza,S.; Melillo,G.; Young,H.; Varesio,L.** " The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages" J Immunol. 2000 Mar 15;164(6):3283-91.

**Bradford,M.M.** " A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

**Brown,R.R.; Ozaki,Y.; Datta,S.P.; Borden,E.C.; Sondel,P.M.; Malone,D.G.** "Implications of interferon-induced tryptophan catabolism in cancer, auto-immune diseases and AIDS", Adv Exp Med Biol. 1991;294:425-35.

**Byrd,T.F.; Horwitz,M.A.** " Interferon gamma-activated human monocytes downregulate transferrin receptors and inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* by limiting the availability of iron" J Clin Invest. 1989 May;83(5):1457-65.

**Byrne, G. I., L. K. Lehmann, and G. J. Landry.** "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells." Infect.Immun. 53.2 (1986): 347-51.

**Carlin J.M.; Borden E.C.; Sondel P. M.; Byrne G. I.** Interferon-induced indoleamine-2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J.Leukoc.Biol.* 45 (1):29-34, 1989.

**Carlin,J.M.; Ozaki,Y.; Byrne,G.I.; Brown,R.R.; Borden,E.C.** Interferons and indoleamine-2,3-dioxygenase: role in antimicrobial and antitumor effects, *Experientia.* 1989 Jun 15;45(6):535-41.

**Channon,J.Y.; Miselis,K.A.; Minns,L.A.; Dutta,C.; Kasper,L.H.** "*Toxoplasma gondii* induces granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secretion by human fibroblasts: implications for neutrophil apoptosis" Infect Immun. 2002 Nov;70(11):6048-57.

**Chao, C. C. et al.** "Activated microglia inhibit multiplication of *Toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism." Clin.Immunol.Immunopathol. 67.2 (1993): 178-83.

**Chen,Q.; Surmeier,D.J.; Reiner,A.** "NMDA and non-NMDA receptor-mediated excitotoxicity are potentiated in cultured striatal neurons by prior chronic depolarization" Exp Neurol. 1999 Sep;159(1):283-96.

- Chiarugi, A. et al.** "Synthesis and release of neurotoxic kynurenine metabolites by human monocyte-derived macrophages." *J Neuroimmunol.* 120.1-2 (2001): 190-98.
- Chiarugi,A.; Dello,Sbarba P.; Paccagnini,A.; Donnini,S.; Filippi,S.; Moroni,F.** "Combined inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and nitric oxide synthase modulates neurotoxin release by interferon-gamma-activated macrophages" *J Leukoc Biol.* 2000 Aug;68(2):260-6.
- Chomczynski, P. and K. Mackey.** "One-hour downward capillary blotting of RNA at neutral pH." *Anal.Biochem.* 221.2 (1994): 303-05.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi.** "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." *Anal.Biochem.* 162.1 (1987): 156-59.
- Collazo,C.M.; Yap,G.S.; Hieny,S.; Caspar,P.; Feng,C.G.; Taylor,G.A.; Sher,A.** "The function of gamma interferon-inducible GTP-binding protein IGTP in host resistance to *Toxoplasma gondii* is Stat1 dependent and requires expression in both hematopoietic and nonhematopoietic cellular compartments" *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6933-9.
- Cook, A. J. et al.** "Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis." *BMJ* 321.7254 (2000): 142-47.
- Couvreur, J., G. Desmots, P. Thulliez.** "Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection." *J Antimicrob.Chemother.* 22 Suppl B (1988): 193-200.
- Dai,W.; Pan,H.; Kwok,O.; Dubey,J.P.** " Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells" *J Interferon Res.* 1994 Dec;14(6):313-7.
- Däubener, W. and U. Hadding.** "Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system." *Med.Microbiol.Immunol.(Berl)* 185.4 (1997): 195-206.
- Däubener, W. and C. R. MacKenzie.** "IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism." *Adv.Exp.Med.Biol.* 467 (1999): 517-24.
- Däubener, W. et al.** "Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma." *J Neuroimmunol.* 43.1-2 (1993): 31-38.
- Däubener, W. et al.** "Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." *Eur J Immunol.* 26.2 (1996): 487-92.
- Däubener, W. et al.** "A new, simple, bioassay for human IFN-gamma." *J Immunol.Methods* 168.1 (1994): 39-47.
- Desmots, G. et al.** "Prenatal diagnosis of congenital toxoplasmosis." *Lancet* 1.8427 (1985): 500-04.
- Dimier,I.H.; Bout,D.T.** " Interferon-gamma-activated primary enterocytes inhibit *Toxoplasma gondii* replication: a role for intracellular iron" *Immunology.* 1998 Aug;94(4):488-95
- Dutton, G. N.** "Toxoplasmic retinochoroiditis--a historical review and current concepts." *Ann.Acad.Med.Singapore* 18.2 (1989): 214-21.
- Earle W.R., Schilling E. L. Stark T. H. Straus N. P. Brown M. F. Shelton E.** "Production of malignancy in vitro. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells." *J Nat Cancer Inst* 4 (1943): 165-212.
- Eguchi, N. Y. Watanabe K. Kawanishi Y. Hashimoto and O. Hayaishi.** "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3- dioxygenase by beta-carboline and indole derivatives." *Arch.Biochem.Biophys.* 232 (1984): 602-09.

- Fairman, J. et al.** "Quantitative RT-PCR to evaluate in vivo expression of multiple transgenes using a common intron." *Biotechniques* 27.3 (1999): 566-4.
- Fekkes,D.; Tuiten,A.; Bom,I.; Pepplinkhuizen,L.** "Tryptophan: a precursor for the endogenous synthesis of norharman in man" *Neurosci Lett.* 2001 May 11;303(3):145-8.
- Ferguson,D.J.; Hutchison,W.M.; Pettersen,E.** "Tissue cyst rupture in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. An immunocytochemical and ultrastructural study" *Parasitol Res.* 1989; 75 (8):599-603.
- Fong,L.G.; Albert,T.S.; Hom,S.E.** Inhibition of the macrophage-induced oxidation of low density lipoprotein by interferon-gamma" *J Lipid Res.* 1994 May;35(5):893-904.
- Frumento,G.; Rotondo,R.; Tonetti,M.; Damonte,G.; Benatti,U.; Ferrara,G.B.** "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase" *J Exp Med.* 2002 Aug 19;196(4):459-68.
- Fujigaki,S.; Saito,K.; Takemura,M.; Maekawa,N.; Yamada,Y.; Wada,H.; Seishima,M.** "L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2002 Feb;70(2):779-86.
- Goodrum, K. J., J. Dierksheide, and B. J. Yoder.** "Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induce nitric oxide in group B streptococcus-treated macrophages." *Infect.Immun.* 63.9 (1995): 3715-17.
- Grover, C. M. et al.** "Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid." *J.Clin.Microbiol.* 28.10 (1990): 2297-301.
- Hagiwara,A.; Asakawa,E.; Kurata,Y.; Sano,M.; Hirose,M.; Ito,N.** "Dose-dependent renal tubular toxicity of harman and norharman in male F344 rats" *Toxicol Pathol.* 1992;20(2):197-204.
- Halonen,S.K.; Weidner,E.; Siebenaller,J.F.** "Evidence for heterotrimeric GTP-binding proteins in *Toxoplasma gondii*" *J Eukaryot Microbiol.* 1996 May-Jun;43(3):187-93.
- Hassanain,H.H.; Chon,S.Y.; Gupta,S.L.** "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.* 1993 Mar 5;268(7):5077-84.
- Herold, G.** *Innere Medizin.* 2002. Köln. Ref Type: Book Chapter, 711+712
- Hill, D. and J. P. Dubey.** "*Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention." *Clin.Microbiol.Infect.* 8.10 (2002): 634-40.
- Hissong, B.D.; Byrne, G.I.; Padilla, M.L.; Carlin, J.M.** " Upregulation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1" *Cell Immunol.* 1995 Feb;160(2):264-9.
- Hucke,C.; MacKenzie,C.R.; Adjogble,K.D.; Takikawa,O.; Daubener,W.** Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase" *Infect Immun.* 2004 May;72(5):2723-30.
- Janeway,C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.** *Immunobiology: The Immune System in Health & Disease.* 4th. 1999. Ref Type: Book Chapter,
- Kapperud, G. et al.** "Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway." *Am.J Epidemiol.* 144.4 (1996): 405-12.
- Kayser F. , Bienz K.A. , Eckert J. , Zinkernagel R.M** *Medizinische Mikrobiologie.* Georg Thieme Verlag Stuttgart New York. 9th. 2001. Ref Type: Book Chapter, 517-524/ Eckert J.

**Klinker, J. F. et al.** "Activation by beta-carbolines of G-proteins in HL-60 membranes and the bovine retinal G-protein transducin in a receptor-independent manner." *Biochem.Pharmacol.* 53.11 (1997): 1621-26.

**Kwidzinski,E.; Bunse,J.; Kovac,A.D.; Ullrich,O.; Zipp,F.; Nitsch,R.; Bechmann,I.** " IDO (indolamine 2,3-dioxygenase) expression and function in the CNS". *Adv Exp Med Biol.* 2003;527:113-8.

**Kyhse-Andersen, J.** "Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose." *J Biochem.Biophys.Methods* 10.3-4 (1984): 203-09.

**Laemmli U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, Aug 227:680-5.

**Lew,D.J.; Decker,T.; Strehlow,I.; Darnell,J.E.** "Overlapping elements in the guanylate-binding protein gene promoter mediate transcriptional induction by alpha and gamma interferons" *Mol Cell Biol.* 1991 Jan;11(1):182-91.

**MacKenzie, C. R. et al.** "Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation." *Adv.Exp.Med.Biol.* 467 (1999): 533-39.

**MacKenzie, C. R. et al.** "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon-gamma-induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmosis." *Eur J Immunol.* 29.10 (1999): 3254-61.

**MacKenzie, C. R., C. B. Willberg, and W. Däubener.** "Inhibition of group B streptococcal growth by IFN gamma-activated human glioblastoma cells." *J Neuroimmunol.* 89.1-2 (1998): 191-97.

**Mehlhorn/Piekarski.** *Grundriß der Parasitenkunde.* 6th. 2002. Ref Type: Book Chapter, 89ff.

**Melillo,G.; Cox,G.W.; Biragyn,A.; Sheffler,L.A.; Varesio,L.** "Regulation of nitric-oxide synthase mRNA expression by interferon-gamma and picolinic acid" *J Biol Chem.* 1994 Mar 18;269(11):8128-33.

**Metchnikoff, E.** *Immunity in the Infectious Diseases.* N.Y., Macmillan Press. Ref Type: Thesis, 1905

**Miksits, K. and H. Hahn.** "*Toxoplasma Gondii.*" Ed. K. Miksits and H. Hahn. 3rd ed. Springer Verlag, 2004. 237-40.

**Montoya, J. G. and O. Liesenfeld.** "Toxoplasmosis." *Lancet* 363.9425 (2004): 1965-76.

**Moroni,F.** "Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites" *Eur J Pharmacol.* 1999 Jun 30;375(1-3):87-100.

**Mucci,A.; Varesio,L.; Neglia,R.; Colombari,B.; Pastorino,S.; Blasi,E.** Antifungal activity of macrophages engineered to produce IFNgamma: inducibility by picolinic acid" *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2003 May;192(2):71-8. Epub 2002 Jun 20.

**Murray, H. W. and Z. A. Cohn.** "Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates." *J Exp.Med.* 150.4 (1979): 938-49.

**Murray, H. W. and Z. A. Cohn.** "Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. III. Enhanced oxidative metabolism as an expression of macrophage activation." *J Exp.Med.* 152.6 (1980): 1596-609.

**Murray, H. W. et al.** "Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates." *J Exp.Med.* 150.4 (1979): 950-64.

**Murray, H. W., C. F. Nathan, and Z. A. Cohn.** "Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. IV. Role of endogenous scavengers of oxygen intermediates." *J Exp.Med.* 152.6 (1980): 1610-24.

- Murray, H. W., G. L. Spitalny, and C. F. Nathan.** "Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and in vivo by interferon-gamma." *J Immunol.* 134.3 (1985): 1619-22.
- Murray, H. W. et al.** "Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages." *Infect.Immun.* 57.3 (1989): 845-49.
- Musso,T.; Gusella,G.L.; Brooks,A.; Longo,D.L.; Varesio,L.** "Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes" *Blood.* 1994 Mar 1;83(5):1408-11.
- Naga,T.; Yoshimura,S.; Totsuka,Y.; Wakabayashi,K.** "Maternal and developmental toxicity in mice by aminophenylnorharman, formed from norharman and aniline" *Hum Exp Toxicol.* 2002 Mar;21(3):147-51.
- Naranjo et al.** "Psychotropic properties of the harmala alkaloids." *Ethnopharmacologic Search for Psychoactive Drugs.* 2nd, 385. 2001. Raven Press, N.Y., DH Efron, B. Holmstedt and N. S. Kline. Ref Type: Generic
- Nathan, C. F. et al.** "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity." *J Exp.Med.* 158.3 (1983): 670-89.
- Nathan, C. F. et al.** "Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon-gamma." *J Exp.Med.* 160.2 (1984): 600-05.
- Nguyen, B. T. and S. Stadtsbaeder.** "Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole) and spiramycin in pregnant mice infected with *Toxoplasma gondii* (Beverly strain)." *Br.J Pharmacol.* 85.3 (1985): 713-716.
- Nishikawa,Y.; Quittnat,F.; Stedman,T.T.; Voelker,D.R.; Choi,J.Y.; Zahn,M.; Yang,M.; Pypaert,M.; Joiner,K.A.; Coppens,I.** Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*" *Cell Microbiol.* 2005 Jun;7(6):849-67.
- Oberdörfer, C. et al.** "Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes." *Adv.Exp.Med.Biol.* 527 (2003): 15-26.
- Okuda,S.; Nishiyama,N.; Saito,H.; Katsuki,H.** "3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity" *J Neurochem.* 1998 Jan;70(1):299-307.
- Pawlik, M. et al.** "Quantitative autoradiography of [3H]norharman [( 3H]beta-carboline) binding sites in the rat brain." *J Chem.Neuroanat.* 3.1 (1990): 19-24.
- Pfefferkorn, E. R.** "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* 81.3 (1984): 908-12.
- Pfefferkorn, E. R.** "Interferon gamma and the growth of *Toxoplasma gondii* in fibroblasts." *Ann.Inst.Pasteur Microbiol.* 137A.3 (1986): 348-52.
- Pfefferkorn, E. R., M. Eckel, and S. Rebhun.** "Interferon-gamma suppresses the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts through starvation for tryptophan." *Mol.Biochem.Parasitol.* 20.3 (1986): 215-24.
- Pfefferkorn, E. R. and P. M. Guyre.** "Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon." *Infect.Immun.* 44.2 (1984): 211-16.
- Pfefferkorn, E. R. and L. C. Pfefferkorn.** "Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil." *J Protozool.* 24.3 (1977): 449-53.
- Pfefferkorn, E. R., S. Rebhun, and M. Eckel.** "Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts." *J Interferon Res.* 6.3 (1986): 267-79.
- Pilz, K.** Wachstum von *Toxoplasma gondii* in humanen Glioblastomzellen: Beeinflussung durch IFNg. 1992. Diplomarbeit an der Math-Nat. Fakultät der HHU Düsseldorf.

- Pouletty, P. et al.** "An anti-human immunoglobulin M monoclonal antibody for detection of antibodies to *Toxoplasma gondii*." *Eur J Clin.Microbiol.* 3.6 (1984): 510-15.
- Pueyo, S. et al.** "Survival after AIDS-defining events in patients with < 200 lymphocytes CD4+ x 10(6)/L who are toxoplasmosis antibody positive. ANRS 005/ACTG 154 Trial Group." *J Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* 14.5 (1997): 459-64.
- Remington, J. S., F. G. Araujo, and G. Desmots.** "Recognition of different *Toxoplasma* antigens by IgM and IgG antibodies in mothers and their congenitally infected newborns." *J Infect.Dis.* 152.5 (1985): 1020-24.
- Remington, J. S., R. McLeod, and G. Desmots.** "Toxoplasmosis." Ed. J. S. Remington and J. O. Klein. 4th ed. W.B. Saunders Company, 1995. 140-267.
- Rommelspacher, H., L. G. Schmidt, and T. May.** "Plasma norharman (beta-carboline) levels are elevated in chronic alcoholics." *Alcohol Clin.Exp.Res.* 15.3 (1991): 553-59.
- Saiki,R.K.; Gelfand,D.H.; Stoffel,S.; Scharf,S.J.; Higuchi,R.; Horn,G.T.; Mullis,K.B.; Erlich,H.A.** "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.
- Saito, K. et al.** "4-Chloro-3-hydroxyanthranilate, 6-chlorotryptophan and norharmane attenuate quinolinic acid formation by interferon-gamma-stimulated monocytes (THP-1 cells)." *Biochem.J* 291 ( Pt 1) (1993): 11-14.
- Saito, K., S. P. Markey, and M. P. Heyes.** "6-Chloro-D,L-tryptophan, 4-chloro-3-hydroxyanthranilate and dexamethasone attenuate quinolinic acid accumulation in brain and blood following systemic immune activation." *Neurosci.Lett.* 178.2 (1994): 211-15.
- Schreiber, R. D. and H. A. Feldman.** "Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway." *J Infect.Dis.* 141.3 (1980): 366-69.
- Sher,A.; Denkers,E.Y.; Gazzinelli,R.T.** "Induction and regulation of host cell-mediated immunity by *Toxoplasma gondii*" *Ciba Found Symp.* 1995;195:95-104; discussion 104-9.
- Shimizu,T.; Nomiya,S.; Hirata,F.; Hayaishi,O.** "Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties" *J Biol Chem.* 1978 Jul 10;253(13):4700-6.
- Sibley,L.D.; Weidner,E.; Krahenbuhl,J.L.** "Tumor necrosis factor-alpha triggers antitoxoplasmal activity of IFN-gamma primed macrophages." *J Immunol.* 147.7 (1991): 2340-45.
- Sibley, L. D.; Weidner,E.; Krahenbuhl,J.L.** " Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*" *Nature.* 1985 May 30-Jun 5;315(6018):416-9.
- Sonda,S.; Ting,L.M.; Novak,S.; Kim,K.; Maher,J.J.; Farese,R.V.,Jr.; Ernst,J.D.** "Cholesterol esterification by host and parasite is essential for optimal proliferation of *Toxoplasma gondii*" *J Biol Chem.* 2001 Sep 14;276(37):34434-40. Epub 2001 Jul 16.
- Sono,M.; Cady,S.G.** " Enzyme kinetic and spectroscopic studies of inhibitor and effector interactions with indoleamine 2,3-dioxygenase. 1. Norharman and 4-phenylimidazole binding to the enzyme as inhibitors and heme ligands" *Biochemistry.* 1989 Jun 27;28(13):5392-9.
- Stafford, J. L., N. F. Neumann, and M. Belosevic.** "Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites." *Crit Rev.Microbiol.* 28.3 (2002): 187-248.
- Stawowy, P., R. Bonnet, and H. Rommelspacher.** "The high-affinity binding of [3H]norharman ([3H]beta-carboline) to the ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 in rat liver." *Biochem.Pharmacol.* 57.5 (1999): 511-20.
- Stone,T.W.** "Kynurenic acid antagonists and kynurenine pathway inhibitors" *Expert Opin Investig Drugs.* 2001 Apr;10(4):633-45.

- Stuart, P. M., A. Zlotnik, and J. G. Woodward.** "Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B cell stimulatory factor 1)." *J Immunol.* 140.5 (1988): 1542-47.
- Suzuki, Y.** "Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis." *J Infect.Dis.* 186 Suppl 2 (2002): S234-S240.
- Suzuki, Y. et al.** "Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*." *Science* 240.4851 (1988): 516-18.
- Suzuki, Y., Q. Yang, and J. S. Remington.** "Genetic resistance against acute toxoplasmosis depends on the strain of *Toxoplasma gondii*." *J Parasitol.* 81.6 (1995): 1032-34.
- Takikawa, O., A. Habara-Ohkubo, and R. Yoshida.** "IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection." *J Immunol.* 145.4 (1990): 1246-50.
- Takikawa, O. T. Kuroiwa F. Yamazaki and R. Kido.** "Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity." *J.Biol.Chem.*263 (1988): 2041-48.
- Tanaka, T. et al.** "Growth inhibitory effects of bovine lactoferrin to *Toxoplasma gondii* parasites in murine somatic cells." *J Vet.Med.Sci.* 58.1 (1996): 61-65.
- Taylor, M. W. and G. S. Feng.** "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." *FASEB J* 5.11 (1991): 2516-22.
- Tenter, A. M., A. R. Heckerroth, and L. M. Weiss.** "*Toxoplasma gondii*: from animals to humans." *Int.J Parasitol.* 30.12-13 (2000): 1217-58.
- Thomas, S. R. and R. Stocker.** "Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway." *Redox.Rep.* 4.5 (1999): 199-220.
- Uezono,T.; Maruyama,W.; Matsubara,K.; Naoi,M.; Shimizu,K.; Saito,O.; Ogawa,K.; Mizukami,H.; Hayase,N.; Shiono,H.** "Norharman, an indoleamine-derived beta-carboline, but not Trp-P-2, a gamma-carboline, induces apoptotic cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells" *J Neural Transm.* 2001;108(8-9):943-53
- Vincendeau,P.; Lesthelle,S.; Bertazzo,A.; Okomo-Assoumou,M.C.; Allegri,G.; Costa,C.V.** "Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis" *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:525-31.
- Wakabayashi, H. et al.** "Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated *Candida albicans*." *Microbiol.Immunol.* 47.1 (2003): 37-43.
- Wakabayashi,K.; Totsuka,Y.; Fukutome,K.; Oguri,A.; Ushiyama,H.; Sugimura,T.** " Human exposure to mutagenic/carcinogenic heterocyclic amines and comutagenic beta-carbolines" *Mutat Res.* 1997 May 12;376(1-2):253-9.
- Wen, L. Z. et al.** "Effect of toxoplasma infection during pregnancy to the development of fetus and infant." *Zhonghua Fu Chan Ke.Za Zhi.* 38.6 (2003): 331-33.
- Ye,Z.Q.; Burkholder,J.K.; Qiu,P.; Schultz,J.C.; Shahidi,N.T.; Yang,N.S.** "Establishment of an adherent cell feeder layer from human umbilical cord blood for support of long-term hematopoietic progenitor cell growth" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 6;91(25):12140-4.
- Yoshida, R. et al.** "Tryptophan degradation in transplanted tumor cells undergoing rejection." *J Immunol.* 141.8 (1988): 2819-23.

## H Abkürzungsverzeichnis

ABS	Humanserum der Blutgruppe AB
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BSA	Bovine Serum Albumine= Rinderserumalbumin
Bq	Becquerel
cpm	counts per minute
d	day, Tag
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxiginin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked Immuno Sorbant Assay
FCS	Fetal calf serum
g	gravity, Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
h	hour, Stunde
HHUD	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
IDO	Indoleamin-2,3-dioxygenase
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IFT	Immunfluoreszenztest
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco Medium
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
Isc.	Iscove's Medium
kDa	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoproteine
LPS	Lipopolysaccharid
LTC-Medium	Long Time Culture- Medium
MAF	Makrophagenaktivierungsfaktor
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-Stimulierender Faktor
MFF	Makrophagenfusionsfaktor
MIF	Migrationshemmfaktor
MIP	Makrophagen-inflammatorisches Protein
$\mu$ M	Mikromol
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MPS	Mononukleäres Phagozytosesystem
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NH	Norharman
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickoxid
OD	optische Dichte
o. g.	oben genannte, -er, -es
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBMDM	peripheral blood monocyte derived macrophages

PS	Pferdeserum
RES	Retikulo-Endotheliales System
RHS	Retikulo-Histiozytäres System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute= Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium (Natrium) Dodecylsulfat
s. o.	siehe oben
sog.	so genannte, -er, -es
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor alpha
Trp	Tryptophan
U	Unit, Enzym-Einheit
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

# I Lebenslauf

## Angaben zur Person

Name: Beate Hedwig Panek  
Adresse: Bewerbungstr.41  
45276 Essen  
0201/5978674  
Geburtstag/-ort: 25.08.1976, Solingen  
Familienstand: ledig

## Schulbildung

08/1983 – 06/1987 Kath. Grundschule Treibstraße, Langenfeld  
08/1987 – 06/1996 Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld  
04/06/1996 Abitur

## Studium

WS 96/97-SS 03 Studium Humanmedizin,  
Heinrich Heine Universität Düsseldorf, (HHUD)  
08/1998 Physikum  
08/1999 Erstes Staatsexamen  
04/2002 Zweites Staatsexamen  
04/2002 – 03/2003 Praktisches Jahr, folgende Tertiale  

- 04/2002 - 08/2002 Neurochirurgie, Klinikum Krefeld
- 08/2002 – 11/2002 Chirurgie, Klinikum Krefeld
- 12/2002 – 03/2003 Innere Medizin, Hospital Universitario, Málaga, Spanien

  
05/2003 Drittes Staatsexamen

## Berufstätigkeit

07/2003-04/2004 Tätigkeit als ÄiP in der Neurochirurgie Uniklinik Essen  
05/2004-07/2005 Tätigkeit als ÄiP bzw. Assistenzärztin in der Inneren Medizin, St. Josef-Hospital, Essen-Kupferdreh  
seit 08/2005 Tätigkeit als Assistenzärztin in der Abt. für Krankenhaushygiene, Hygiene-Institut Gelsenkirchen

## Promotion

Beginn 10/1999 Exp. Doktorarbeit im Institut für Med. Mikrobiologie, HHUD, Prof. U. Hadding / Prof. Dr. med. Pfeffer / Dr. C. R. MacKenzie  
Thema: Einfluss von Norharman auf Indoleamin-2,3-dioxygenase von Makrophagen nach Toxoplasmeninfektion und Stimulation durch diverse Zytokine  
  
02/2001 Präsentation von Zwischenergebnissen auf dem Kongress der der Deutschen Gesellschaft für Immunologie (DGfI)

Essen, 26.11.2005

## **J Danksagung**

Es ist ein lobenswerter Brauch:  
Wer Gutes bekommt, der bedankt sich auch.

*Wilhelm Busch (1832 - 1908), deutscher Zeichner, Maler und Schriftsteller*

Hiermit möchte ich Herrn PD Dr. med. C. R. MacKenzie, für die Überlassung des Themas meiner Doktorarbeit, der ausgezeichneten und geduldigen Betreuung, insbesondere für die Unterstützung bei der Laborarbeit und für die Beratung bei der Interpretation meiner Ergebnisse, danken.

Herrn Prof. Dr. med. U. Hadding danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine Arbeit an seinem Institut durchführen konnte.

Des Weiteren möchte mich sehr für die für die freundliche und humorvolle Unterstützung durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe MacKenzie bedanken, wie auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts, durch deren gute und engagierte Zusammenarbeit meine Zeit an diesem Institut zu einem besonderen und sehr lehrreichen Erlebnis für mich wurde.

Danken möchte ich auch allen Freunden und Bekannten, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und in mir in den vielen Etappen dieser Arbeit eine große Stütze waren.

Nicht zu vergessen gebührt Dank auch allen Blutspendern, ohne deren Großzügigkeit diese Arbeit nicht hätte zustande kommen können.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, möchte ich ganz besonders herzlich dafür danken, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und auch in schwierigen Zeiten an mich geglaubt haben!

## **K Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, meine Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst zu haben und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die der verwendeten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Essen, den 26.11.2005