

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. K. Pfeffer

**Der Einfluss klinisch relevanter, entzündungshemmender Substanzen
und Antibiotika auf dieIDO-Aktivität der Makrophagen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniel Worku

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-
Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Priv-Doz. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Korreferent: Prof. Dr. med. Horst Schrotten

Die in der vorliegenden Dissertation zusammengefassten Ergebnisse wurden von Juli 1999 bis April 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erarbeitet.

Teile dieser Arbeit sind bereits publiziert:

Daniel Worku, Colin R. MacKenzie and Walter Däubener

Der Einfluss anti-inflammatorische Substanzen und subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen auf die durch Makrophagen vermittelte Bakteriostase,
Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Halle 14-16.03.2002,
Deutschland

Colin R. MacKenzie, Daniel Worku and Walter Däubener

Regulation of IDO-mediated bacteriostasis in macrophages: Role of antibiotics and anti-inflammatory agents.
10th International Meeting on Tryptophan Research, Padova, I, June 27th - 30th, 2002;
Organiser: ISTRY - International Study Group for Tryptophan Research

C.R. MacKenzie, D. Worku, W. Däubener

Regulation of IDO-mediated bacteriostasis in macrophages: role of antibiotics and anti-inflammatory agents.
Adv Exp Med Biol. 2003; 527: 67-76

Inhaltsverzeichnis

<i>Danksagung</i>	III
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	IV
I. Einleitung	1
1 Makrophagen und Monozyten	1
1.1 Einleitung.....	1
1.2 Immunologische Antwort der Makrophagen.....	4
2 Streptokokken der Gruppe A: Streptococcus pyogenes	7
2.1 Einleitung.....	7
2.2 Streptococcus pyogenes und seine klinischen Bedeutung	8
3 Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)-vermittelte bakterielle Wachstumshemmung IFNγ-stimulierter Makrophagen	9
4 Zielsetzung der Arbeit	10
II. Material und Methoden	12
1 Material	12
1.1 Zellen.....	12
1.2 Bakterien	13
1.3 Geräte.....	13
1.4 Plastikware	13
1.5 Medienkomponenten, Cytokine und Chemikalien	14
1.6 Medien zur Gewinnung und Kultivierung der Zellkultur	15
1.7 Medium zur Gewinnung und Kultivierung der Bakterien	16
1.8 Lösung zum Nachweis der IDO-Aktivität	16
2 Methoden	17
2.1 Zellpräparation	17
2.2 Bakterien	19
2.3 Stimulation der CBMDM und PBMDM und die anschließende Bakterieninfektion mit GAS. 20	
2.4 Nachweismethoden	21
III. Ergebnisse	23
1 Die IFNγ-induzierte IDO-Aktivität in Makrophagen ist dosisabhängig	23
2 IFNγ-iduzierte, IDO-vermittelte L-Tryptophan-Depletion bedingt eine Bakteriostase der GAS	25
3 IL4, IL10 und TGFβ hemmen die IDO-Aktivität und folglich die IDO-iduzierte Bakteriostase der GAS	27
4 Anti-inflammatorischen Substanzen inhibieren die IFNγ-induzierte IDO Aktivität	29
5 Glucokortikoide verstärken die IDO-Aktivität in CBMDM	33

Inhaltsverzeichnis

6	<i>Sub-inhibitorischen Ampicillin-Konzentrationen verstärken die IDO-induzierte Bakteriostase der GAS</i>	37
IV.	<i>Diskussion</i>	39
1	<i>IDO-Induktion und die IDO-vermittelte Bakteriostase</i>	40
2	<i>Zytokine und ihre Interaktionen mit IDO</i>	41
3	<i>Indomethacin und IDO-induzierte Bakteriostase</i>	43
4	<i>Glukokortikoide und der Effekt auf CBMDM</i>	45
5	<i>Sub-MHK-Werte von Antibiotika und IDO-induzierte Bakteriostase</i>	47
V.	<i>Zusammenfassung</i>	49
VI.	<i>Ausblick</i>	50
VII.	<i>Literaturverzeichnis</i>	51
VIII.	<i>Erklärung</i>	54
IX.	<i>Lebenslauf</i>	55

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Einigen danken, die zum Erfolg dieser Herausforderung beigetragen haben. Zunächst danke ich dem ehemaligen Leiter des Instituts der Medizinischen Mikrobiologie und Virologie **Herrn Professor Dr. Ulrich Hadding**, sowie seinem Nachfolger **Herrn Professor Dr. Klaus Pfeffer**, dass ich die Dissertation dort beginnen und beenden durfte.

Herrn Professor Dr. Horst Schrotten danke ich für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten.

Meinem "**Doktorvater**" **PD Dr. Colin R. MacKenzie** danke ich für die uneingeschränkte Betreuung und Unterstützung, insbesondere in den Zeiten des "Zweifeln". Ich danke ihm nicht nur für mein akademisches Vorrankommen sondern auch für die interessanten Gespräche über die amüsanten und wertvollen Dinge des Lebens, sowie "unserem" Kontinent.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe für eine schönes und herzliches Zusammenarbeiten. Besonders möchte ich mich bei **Raquel** für ihre Geduld und ständige Motivation, insbesondere in den Momenten, in den meine Kraft und Geduld verbraucht waren, bedanken. **Anja**, unsere Biologin und meine zukünftige "Arzthelferin", danke ich für die vielen lustigen Gespräche und Momente in unserem Labor. Allen restlichen Institutsmitgliedern insbesondere **Marzena** danke ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre.

Meiner Mutter danke ich für die grenzenlose Unterstützung und Aufopferung auf meinem Lebensweg. Meinen Schwestern **Tsion** und **Tigist** danke ich für die wiederholten Stunden der Korrektur am PC.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ABS	AB-Serum
BHI	Brain Heart Infusion
C	Komplementprotein
CBMDM	Cord blood monocyte derived macrophages
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming units
CFU-GM	Colony forming unit – granulocyte-macrophage
COX	Cyclooxygenase
FCS	Fetal calf serum
FFP	Fresh Frozen Plasma
GAS	Gruppe A Streptokokken
GBS	Gruppe B Streptokokken
HC	Hydrocortisol
HHUD	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IgA,E,G	Immunglobulin A, E, G
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modified Dulbecco's medium
LPS	Lipopolysaccharide
LTC	Long-term Culture
MACS	Magnetic Cell Sorting
MBK	Minimal-Bakterizide-Konzentration
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MPS	Mononukleäres Phagozytensystem
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natural-Killer
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBMDM	Peripheral blood monocyte-derived macrophages
PBS	Phosphat-buffered saline
PGE	Prostaglandin E
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor- γ
RES	Retikulo-endotheliales System
ROI	Reactive Oxygen Intermediates
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumornekrosefaktor

I. Einleitung

1 Makrophagen und Monozyten

1.1 Einleitung

Elie Metchnikoff verwendete erstmals bei der Beobachtung einer phagozitierenden Zelle im Gewebe den Terminus des „Makrophagen“ vor ungefähr 100 Jahren (Karnovsky 1981), bevor Aschoff diese Zellen dem retikulo-endothelialen Systems (RES), ein System welches durch eine Vielfalt von Zellarten, zu denen auch Fibroblasten, Retikulumzellen und Endothelzellen gehören, zuteilte. Van Furth et al schlug 1968 jedoch die Bezeichnung des mononukleären Phagozytensystems (MPS) vor, da das RES auch Zellen enthielt, die nicht der Makrophagenlinie entsprachen (van Furth, Cohn et al. 1972). Innerhalb des MPS stellt der Makrophag die terminale Differenzierung der Zellen dar. Die Makrophagen sind von großer Bedeutung im Immunsystem und kennzeichnen sich durch ein ubiquitäres Vorkommen im Organismus als auch eine funktionelle und strukturelle Vielfalt aus. Die Verteilung der Makrophagen geht von lymphatischen Organen, die Leber, die Lungen, Gastrointestinaltrakt über das Zentralnervensystem, seröse Höhlen, Knochen und Haut und ermöglicht somit eine ausgeprägte Beteiligung der Makrophagen an unzähligen physiologischen und pathologischen Prozessen. Sie stellen einen wichtigen Bestandteil der zellulären Immunität des Organismus dar und sind darüber hinaus die Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Die Entwicklung der Makrophagen findet im Knochenmark statt. Hierbei ist hervorzuheben, dass Makrophagen und Granulozyten eine gleiche Vorläuferzelle haben (Metcalf 1971), die „colony forming unit, granulocyte-macrophage“ (CFU-GM). Die Reifung dieser Vorläuferzelle durchschreitet folgende Stadien: CFU-GM \Rightarrow Monoblast \Rightarrow Promonozyt \Rightarrow Monozyt (im Knochenmark) \Rightarrow Monozyt (im zirkulierenden Blut) \Rightarrow Makrophag (im Gewebe) (siehe Abb. 1).

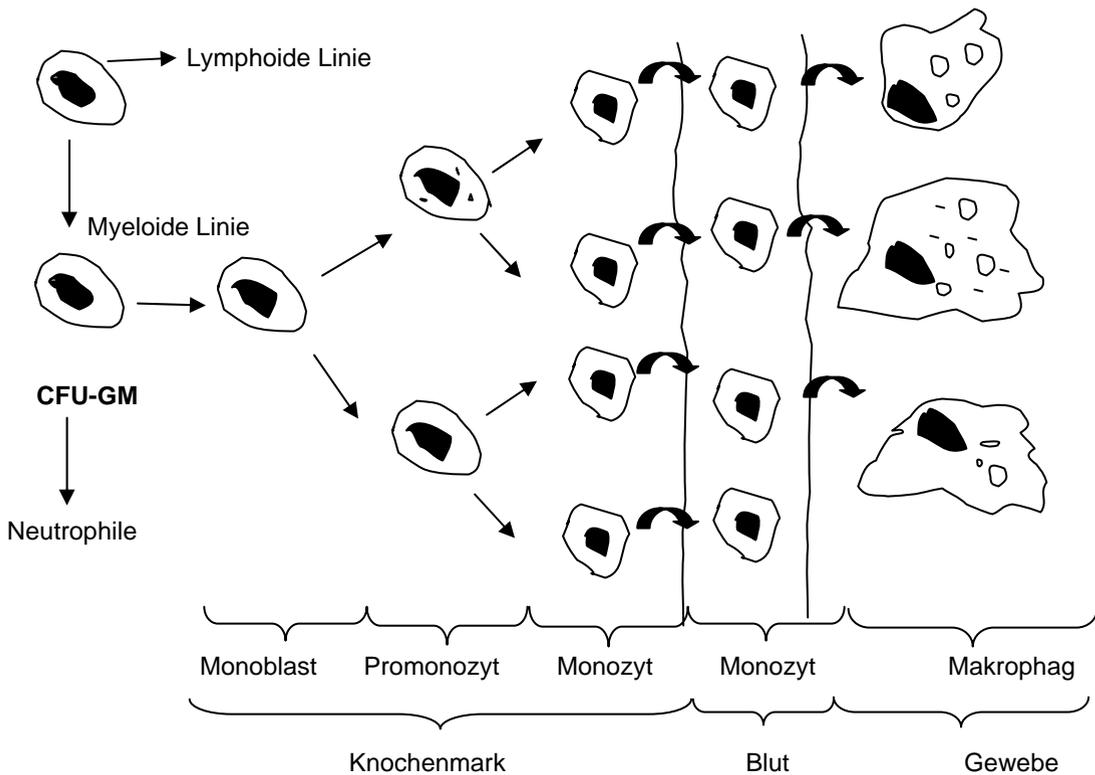


Abb. 1: Die Ausdifferenzierung des Makrophagen verläuft über mehrere Stadien. Der Makrophag und die Granulozyten entstehen aus einer gemeinsamen Stammzelle (CFU-GM) im Knochenmark. Über die Differenzierungsstadien des Monoblasten, Promonozyt und Monozyt im Knochenmark tritt der reife Monozyt in den Blutkreislauf und verweilt dort bis zu 70h. Durch chemotaktische Reize angelockt migriert der Monozyt über die Diapedese in die verschiedenen Organsysteme und differenziert sich zum Gewebemakrophagen aus.

Die Ausdifferenzierung von Stammzelle zum gewebsspezifischen Makrophag ist ein komplexes Zusammenspiel von Zytokinen, Chemokinen und weiteren Immunzellen.

Dieser Prozess, der auch Monozytopoese genannt wird, wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren gesteuert. Das Makrophagen-Colonie-stimulierender-Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Colonie-stimulierender-Faktoren (GM-CSF) beeinflusst die Produktion und Funktion der Makrophagen und wird von den Makrophagen selbst (Jones and Millar 1989) und von Fibroblasten und Endothelzellen synthetisiert, nachdem diese von Makrophagen durch Interleukin (IL-1) und Tumornekrosefaktor (TNF) stimuliert wurden. Ebenso beeinflussen T-Lymphozyten über die Produktion von GM-CSF und Interleukin 3 die Produktion und Aktivität der mononukleären Phagozyten (Cannistra, Rambaldi et al. 1987). Des Weiteren haben die Zytokine der Interferone (IFN), IFN α, β, γ und die Chemokine der Prostaglandin E-Reihe (PGE), die

Einleitung

von den Makrophagen umgebenden Immunzellen gebildet werden, in mehreren Studien eine inhibitorische Wirkung auf die Monozytopoese gezeigt (Kurland, Bockman et al. 1978; Pelus, Broxmeyer et al. 1979). Die verschiedenen Stadien der Ausdifferenzierung sind nicht nur morphologisch erkennbar, sondern auch an sich entwickelnden oder zurückbildenden charakteristischen Fähigkeiten der Zellen, zu denen die Phagozytoseaktivität, IgG und C3 Rezeptorausbildung und Peroxidaseaktivität (s. Abb. 2) gehören.

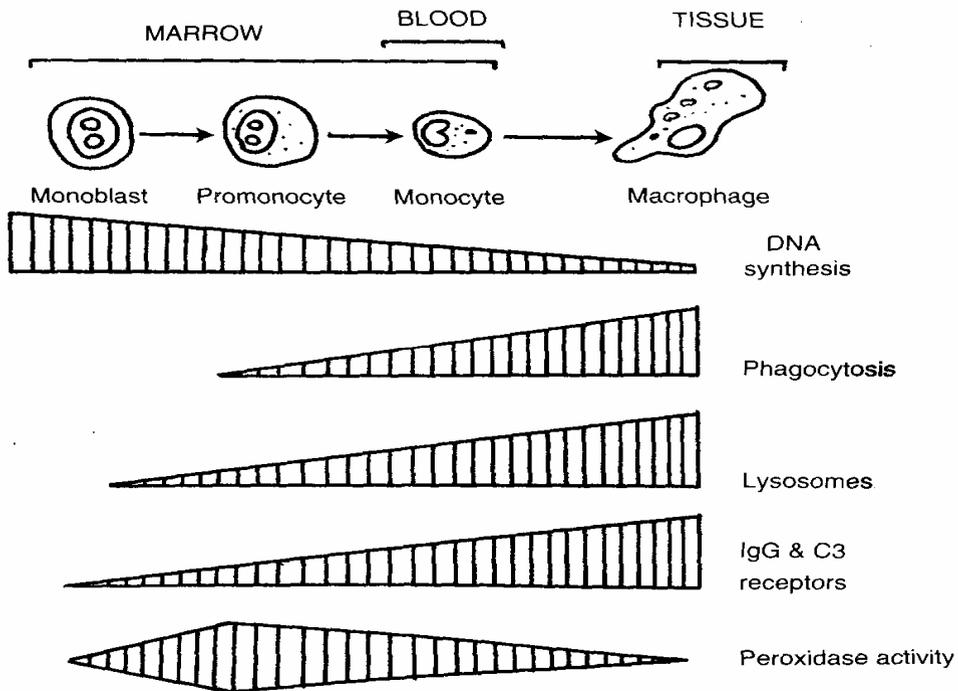


Abb. 2: Charakteristische Eigenschaften der Zellen des MPS. Im Verlauf der Differenzierung der Zellen im MPS bilden sich Phagozytosefähigkeit, Lysosomenvorkommen und Bildung von IgG- und C3-Rezeptoren verstärkt aus, während die DNA-Synthese im Reifungsprozess der Zellen abnimmt. Die Peroxidaseaktivität nimmt zu Beginn der Reifung im Knochenmark bis zu einem Maximum zu, nimmt in den weiteren Stadien der Reifung wieder ab (Lewis 1992).

Die Diapedese der Monozyten ist eine weitere grundlegende Voraussetzung bei der Differenzierung des Monozyten zum Makrophagen und ist essentiell für die Rekrutierung und Beteiligung der Monozyten an physiologischen und pathologischen Prozessen in den verschiedenen Organen. Dieser Vorgang setzt die Adhärenz der Monozyten an die Gefäßwand voraus, und diese wiederum das Vorhandensein makromolekularer Glykoproteine, die sich auf der Oberfläche des Makrophagen und der Endothelzelle befinden und die Interaktion der Zellen während der Diapedese ermöglichen (Dustin, Rothlein et al. 1986; Rothlein, Dustin et al. 1986). Die Migration der Monozyten in die entsprechenden Organe, die die Differenzierung zu Makrophagen bedingt (van Furth and Cohn 1968), variiert mengenmäßig von Organ zu Organ. Bei entzündlichen Prozessen ist die Migration durch eine IFN γ - und IL-1-induzierte Erhöhung der zur Adhärenz benötigten Oberflächen-

proteine verstärkt wahrzunehmen (Dustin, Rothlein et al. 1986), welches hierdurch eine verstärkte Präsenz der Monozyten am Entzündungsort gewährleistet. Durch diese Verteilung der Monozyten auf die verschiedenen Organe entstehen diverse organspezifische, residente Makrophagen, welche die Heterogenität der Makrophagen innerhalb des MPS veranschaulichen. Die Verteilung der Monozyten auf die verschiedenen Gewebe, in denen sie als gewebsspezifische Makrophagen verbleiben, geschieht vielmehr zufällig, da es keine Anhaltspunkte für eine Vorbestimmung auf ein bestimmtes Gewebe gibt (Lewis 1992). Residente Makrophagen passen sich ihrer Umgebung an und üben bestimmte Funktionen aus. Die Alveolarmakrophagen, die einen wesentlichen zellulären Anteil der Lunge darstellen, sind sowohl entscheidend bei der lokalen Abwehr gegenüber Erreger und Partikel, die über die Luftwege eingeschleppt werden als auch bei chronisch granulomatöse Krankheitsprozesse, z.B. Sarkoidose, und Infektionen, z.B. Tuberkulose. Die Aktivität der Alveolarmakrophagen bestimmt den Verlauf dieser Krankheiten wesentlich. Residente Makrophagen der Leber nehmen an der Filterung von Partikeln sowie wasserlöslichen Substanzen der Leber teil und exprimieren diverse Rezeptoren, die unter anderem die Interaktion mit den Hepatozyten ermöglichen. Die Milz beherbergt eine heterogene Population von Makrophagen, die in ihrer Funktion der Milz angepasst sind (Buckley, Smith et al. 1987). In der roten Pulpa befinden sich hauptsächlich Makrophagen, die alte Erythrozyten phagozytieren, während sich in der weißen Pulpa Makrophagen befinden, die auf die Interaktion mit T-Lymphozyten angepasst sind. Im Knochenmark übernehmen die Makrophagen die wichtige Funktion der Kontrolle bei der Hämatopoese. Sie befinden sich dort im Stroma und treten mit den sich differenzierenden Zellen in Kontakt und beeinflussen somit das Wachstum und die Differenzierung der Vorläuferzellen (Crocker, Morris et al. 1988). Die Monozyten können somit nach der Migration in das entsprechende Gewebe eines Organs diverse organspezifische Funktionen übernehmen und durch Interaktion mit gewebsspezifischen Zellen ein effizientes Monitoring von physiologischen und pathologischen Prozessen gewährleisten. Im Folgenden steht der immunologische Aspekt der diversen Aufgaben der Makrophagen im Mittelpunkt.

1.2 Immunologische Antwort der Makrophagen

Als wichtigster Vertreter des MPS kommt dem Makrophagen die Aufgabe der Phagozytose, die aktive Aufnahme unbelebter Partikel oder pathogenen Keimen in das Innere der Zelle zur Eliminierung dieser, zu. Hieran schließt meist eine Antigenpräsentation an T-Lymphozyten an, die die Grundlage für die Bildung der erworbenen Immunität bildet. Das Procedere dieser immunologischen Reaktion der Makrophagen kann beispielsweise durch einen entzündungsbedingten, chemo-

Einleitung

taktischen Reiz, z.B. durch eine bakterielle Infektion, verursacht werden und eine verstärkte Rekrutierung im Blut zirkulierender Monozyten bedingen. Diese gelangen über die Diapedese in das entsprechende Entzündungsgebiet. In diesem Initialstadium der Entzündung befinden sich zwei morphologisch und funktionell unterschiedliche Zellen des MPS, frisch rekrutierte Monozyten und residente Makrophagen, im Entzündungsgebiet des Organs. Die Makrophagen, die sich aus den frisch rekrutierten Monozyten bilden, sind durch Ausbildung von zytokin-vermittelter MHC-Klasse II-Molekülen, welche wichtig für die Aktivierung für die Immunantwort sind, und Komplementrezeptor CR3, welches bei der Phagozytose des Antigens eine zentrale Rolle spielt, charakterisiert und werden als immunologische aktivierte Makrophagen bezeichnet. Zusätzlich wird die Phagozytose, die Bildung von pro-inflammatorischen Botenstoffen und zytotoxischen Produkten dieser Zellen verstärkt. Im Gegensatz hierzu fehlt die Entzündungsreaktion der residenten Makrophagen, welchen trophischen Aufgaben im Gewebe zukommen und somit den Ernährungs-, Regenerations- und Wachstumszustand des Gewebes unterstützen. Die aktivierten Makrophagen werden insbesondere von $\text{IFN-}\gamma$ stimuliert, welches von anderen Immunzellen Vorort gebildet wird. Die Bildung pro-inflammatorischer Substanzen bedingt das Anlocken anderer Immunzellen, z.B. T-Lymphozyten, die die Entzündungsreaktion unterstützen. Es werden jedoch nicht nur pro-inflammatorische, sondern auch anti-inflammatorische Substanzen (z.B. $\text{TGF-}\beta$, PGE_2 , IL-10) von den Makrophagen sezerniert, die eine überschießende Entzündungsreaktion verhindern. Die Phagozytose des entzündungsauslösenden Antigens durch die Makrophagen dient einerseits der Induktion der Produktion pro- und anti-inflammatorischer Substanzen und andererseits der Eliminierung des Antigens. Die Mechanismen zur Zerstörung der Antigene sind vielfältig. Der stark saure pH-Wert der Phagolysosome innerhalb des Makrophagen, die bei der Phagozytose zwischen Phagosom und Lysozom entstehen, wirkt bakterizid. Legionellen konterkarieren diesen Mechanismus und können hierdurch überleben (Unanue 2003; Wieland, Goetz et al. 2004). Effizient sind ebenso die sauerstoffabhängigen Mechanismen und der Stickstoffmonoxid (NO) Mechanismus der aktivierten Makrophagen. Aktivierte Makrophagen zeigen einen verstärkten Sauerstoffverbrauch (respiratory burst), in dem sie in der Lage sind vermehrt Sauerstoffradikale („reactive oxygen intermediates“) zu bilden. Diese Sauerstoffradikale bilden im wässrigen Milieu Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches intra- und extrazellulär mikrobizid wirkt. Der NO-Mechanismus basiert auf die Fähigkeit $\text{IFN-}\gamma$ -stimulierter Makrophagen NO zu bilden, welches in folgenden Reaktionen toxische Substanzen generiert, die wiederum intra- oder extrazelluläre Erreger zerstören (s. Übersicht in: Immunology (Roitt 2001)). Ein weiterer wichtiger Mechanismus $\text{IFN-}\gamma$ -aktivierter Makrophagen in der Bekämpfung intra- und extrazellulärer Pathogen ist die Produktion des Enzyms Indolamin-2, 3-dioxygenase (IDO). Durch einen IDO-vermittelten L-Tryptophanabbau findet eine L-Tryptophanmangel-bedingte Wachstumshemmung parasitärer und

Einleitung

bakterieller Erreger statt. Dieser enzymabhängige Effektormechanismus wurde unter anderem als Ursache einer Wachstumshemmung von Gruppe B Streptokokken, Staphylokokken und *Toxoplasma gondii* experimentell nachgewiesen (Pfefferkorn 1984; MacKenzie, Hadding et al. 1998). Der experimentelle Nachweis dieses Mechanismus spiegelt jedoch nicht die Verhältnisse eines Entzündungsprozesses *in vivo* in den Einzelheiten wieder. Innerhalb der Entzündungsregion befinden sich außer den Makrophagen noch weitere Immunzellen, die selbst weitere pro- oder anti-inflammatorische Substanzen bilden. Hierzu gehören Interleukine, Interferone, Prostaglandine und Tumornekrosefaktoren. Diese Substanzen haben einen Einfluss auf die Funktion der Makrophagen und folglich auch auf die Effektormechanismen gegenüber bakteriellen Erregern. Die positiven und negativen Einflüsse einiger dieser Substanzen auf dieIDO-Aktivität wurden bereits dokumentiert (MacKenzie, Gonzalez et al. 1999) und werden in diesem Zusammenhang anhand eines weiteren Bakteriums, *Streptococcus pyogenes*, in dieser Arbeit erweitert. Die Effektormechanismen der Makrophagen bei einer erregerbedingten Entzündung sind zusätzlich klinisch relevanten Therapeutika ausgesetzt. Insbesondere der Einsatz von Immunsuppressiva und Antibiotika hat in der Therapie entzündlicher Prozesse eine zentrale Rolle und ist demzufolge ein weiterer wichtiger Faktor, der den Entzündungsprozess entscheidend beeinflusst. In diesem Zusammenhang stellt sich in dieser Arbeit unter anderem auch die Frage, welchen Stellenwert nun die medikamentöse Manipulationen des Organismus und die daraus folgende Beeinträchtigung der Immunregulation und Immuntoleranz innehaben. Beeinflussen diese Medikamente die antibakteriellen Mechanismen der Makrophagen und bieten somit besseren Nährboden für bakterielle Infektionen? Oder unterstützen diese die Funktion der Makrophagen in der „first line of defense“? Auch bei dieser Fragestellung dient *Streptococcus pyogenes* als Modell einer bakteriellen Infektion.

2 Streptokokken der Gruppe A: *Streptococcus pyogenes*

2.1 Einleitung

Verschiedene grampositive Kokken und Sporenbildner bilden transitorische bzw. residente Keime der Bakterienflora der Haut. Im Allgemeinen werden die dauernd oder vorübergehend als Lebensgemeinschaft einen Ort besiedelnden Bakterien als Bakterienflora bezeichnet. Beim Menschen sind dies, die Mund-, Haut-, Darm-, und Scheidenflora, die aus parasitären und aus saprophytären Kommensalen besteht, welche als Verdauungshilfe und als Gewebeschutz (v.a. die Hautflora) wirken. Streptokokken der Gruppe A (GAS), *Streptococcus pyogenes*, sind ebenfalls Keime der Bakterienflora, können allerdings unter bestimmten Vorraussetzungen verschiedene Infektionen auslösen. *Streptococcus pyogenes* ist ein grampositiver, nichtbeweglicher, Kokkenbakterium, der keine Sporen bildet. Die Zellen sind rund bis oval und besitzen einen Durchmesser von 0.6-1.0 µm. Sie kommen paarweise oder in Kettenform vor. Dieser Organismus besitzt einen fermentativen Metabolismus, ist Katalase-negativ, fakultativ anaerob und benötigt angereichertes Medium, welches Schafsblut enthält, um zu gedeihen. Ein weiteres Kennzeichen grampositiver A-Streptokokken ist die beta-hämolytische Eigenschaft auf dem Blutagar, sowie eine sie umgebende Kapsel aus Hyaluronsäure. Klinisch weitaus relevanter ist jedoch die immunologische Typisierung der Streptokokken, die auf die Variabilität der kohlenhydratreichen Gruppen der Oberflächenantigene basiert. Grundlage dieser Identifikation bildet die Zellwand der Streptokokken, die sich aus wiederholenden Einheiten der Standard-Peptidoglykane, N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure-Monomere, zusammensetzt. Die Zellwand besitzt somit Eigenschaften eines Antigens und wird durch serologische Methoden differenziert. Rebecca Lancefield hat anhand dieser Methode 18 verschiedene antigenspezifische Gruppen – Lancefield Gruppen - der Streptokokken typisiert, welche jeweils die alphabetische Bezeichnung A bis O tragen (Madigan 2003). All diese Streptokokken können wie bereits erwähnt klinisch relevante Entzündungen verursachen, nachdem sie die natürlichen Barrieren der Haut durch eine Eintrittspforte überwunden haben und sich in einer Auseinandersetzung mit dem MPS durchsetzen konnten.

2.2 *Streptococcus pyogenes* und seine klinischen Bedeutung

Streptococcus pyogenes (*S.pyogenes*) kann häufig aus dem oberen Respirationstrakt Erwachsener ohne pathologischen Hintergrund isoliert werden. Die Anzahl der dort vorkommenden *S. pyogenes* ist gewöhnlich gering, kann jedoch unter immunsuppremierten Zuständen oder durch das Vorkommen hochvirulenter Stämme stark zunehmen und folglich eine akute bakterielle Infektion verursachen. Die auf diesem Wege erworbene Infektion manifestiert sich klinisch meist als Angina tonsillaris, eine Erkrankung, die durch Schluckschmerzen, Fieber, Schwellung der Halslymphknoten und gestörtem Allgemeinbefinden gekennzeichnet ist. Hierbei ist die schnelle Diagnose und Isolierung des Keimes ausschlaggebend, da eine sofortige antibiotische Behandlung indiziert ist, um poststreptokokkale Folgeerkrankungen zu vermeiden. Poststreptokokkale Folgeerkrankungen basieren auf eine Ähnlichkeit der Oberflächenantigene von *S. pyogenes* mit wirtseigener Zelloberfläche. Durch eine Infektion mit *S. pyogenes* verursachte Antikörperbildung gegen *S. pyogenes* führt somit ebenfalls zur Kreuzreaktion der Antikörper mit wirtseigenen Zellen, insbesondere Herz-, Gelenke- und Nierengewebe sind hier betroffen, und manifestiert sich als rheumatisches Fieber. Das rheumatische Fieber gehört zu der Gruppe der Autoimmunerkrankungen, welches sich durch die permanente Schädigung der betroffenen Gewebe, rezidivierender *S. pyogenes*-Infekte und Fieber kennzeichnet. Scharlach gliedert sich ebenso in die Krankheitsbilder, die durch *S. pyogenes* verursacht werden, ein. Die bei diesem Krankheitsbild auffällige Rötung der Haut wird durch ein Exotoxin, erythrogenes Toxin, verursacht. Ein Fortschreiten dieser Symptomatik durch Exotoxin A, B oder C und das Oberflächenprotein M bedingt, lockt eine große Anzahl von T-Lymphozyten chemotaktischen in das Entzündungsgebiet an. Durch die darauf folgende übermäßige Sekretion von Zytokinen werden viele Effektorzellen aktiviert und diese wiederum bedingen eine starke Entzündung mit Gewebszerstörung und systemischer Ausbreitung. Sowohl Otitis media, Mastitis als auch die Impetigo, eine Entzündung der oberflächlichen Haut, sind weitere Infektionen, die *S. pyogenes* als pathogenen Erreger klinisch relevant machen (Madigan 2003).

3 Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)-vermittelte bakterielle Wachstums- hemmung IFN γ -stimulierter Makrophagen

Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO, EC 1.13.11.11) ist ein Häm-enthaltendes Enzym mit ungefähr 400 Aminosäuren, welches die Umwandlung von L-Tryptophan zu L-Kynurenin katalysiert (Taylor and Feng 1991). Das Enzym wird durch eine ligandengesteuerte Bindung von Interferon- γ (IFN- γ) an die entsprechenden Zellrezeptoren und der nachfolgenden Aktivierung des JAK/STAT-Signalweg und der Induktion des IDO-Gens gesteuert (Hassanain, Chon et al. 1993). IFN- γ ist hierbei das Hauptstimulanz der IDO, wobei beobachtet wurde, dass dieser IDO-Effekt in Makrophagen durch eine Kostimulation mit TNF- α und IL-1 β verstärkt werden kann (Carlin and Weller 1995). Der IFN- γ -vermittelte Mechanismus der IDO-Aktivierung führt konsekutiv zum Abbau des L-Tryptophans und eine durch L-Tryptophanmangel bedingte Hemmung des Wachstums von Tumorzellen (Takikawa, Kuroiwa et al. 1988; Yoshida, Park et al. 1988), extrazellulären bakteriellen Erreger (MacKenzie, Hadding et al. 1998), aber auch das Wachstum von intrazellulären Organismen, z.B. Chlamydien (Byrne, Lehmann et al. 1986) und Toxoplasmen (Pfefferkorn 1984). Eine erneute Anreicherung des Mediums mit L-Tryptophan hebt die Hemmung des Wachstums auf. Nur im Fall der Toxoplasmen ist die Aufhebung der Toxoplasmostase in Makrophagen im Gegensatz zu Fibroblasten und Glioblastomzellen durch Zugabe von L-Tryptophan im Überschuss nicht möglich (Murray, Szuro-Sudol et al. 1989). Ein Unterschied zwischen den genannten Zellen besteht darin, dass Makrophagen im Gegensatz zu den anderen Zellen in der Lage sind das Produkt des L-Tryptophanabbau, L-Kynurenin, noch weiter zu verstoffwechseln. Die Toxoplasmostase in Makrophagen geht somit nicht nur auf den IDO-vermittelte Mangel an L-Tryptophan zurück, sondern möglicherweise auch auf die Substanzen, die in der weiteren Abbaukaskade entstehen und eine toxische Wirkung auf die intrazellulären wachsenden Toxoplasmen haben. Der Nachweis des IDO-vermittelten antiparasitären und antibakteriellen Effektormechanismus der Zellen ist eine Bestimmung des direkten Abbauproduktes des L-Tryptophan, L-Kynurenin. Das L-Kynurenin kann nach der etablierten Methode von Daubener et al. (Daubener, Wanagat et al. 1994) photometrisch gemessen werden und spiegelt folglich die IDO-Aktivität wieder. In der folgenden Abbildung ist der für diese Arbeit relevante Abschnitt der IDO-Katalyse des L-Tryptophans kurz schematisch dargestellt.

Einleitung

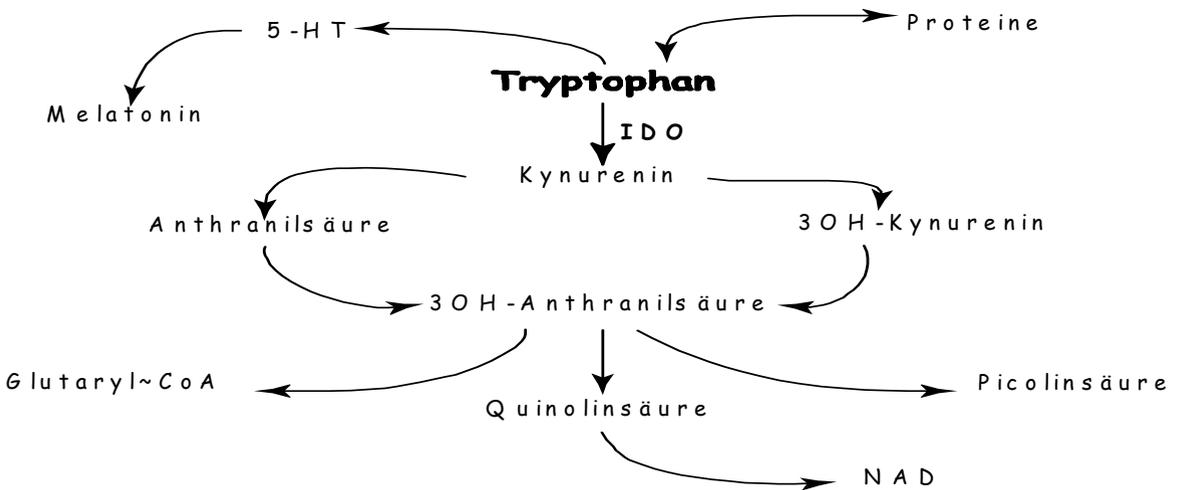


Abb. 3: Tryptophan-Stoffwechsel

4 Zielsetzung der Arbeit

Die Effektormechanismen der Makrophagen zur Bekämpfung und regionaler Begrenzung einer Infektion mit intrazellulären und extrazellulären Erregern sind vielfältig. Neben der Produktion von Sauerstoffzwischenprodukten, wie z.B. Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale, und Stickstoffzwischenprodukten, z.B. NO, die eine Wachstumshemmung oder Zerstörung der Erreger bewirken, nimmt die IDO eine wichtige Rolle unter diesen Mechanismen ein. Die IDO-vermittelte Bakteriostase der GBS in CBMDM und Glioblastomzellen als auch der antiparasitären Einfluss des Enzyms gegenüber Chlamydien und Toxoplasmen sind sehr gut dokumentiert und unterstreichen die Effizienz dieses Mechanismus.

Vor diesem Hintergrund sollen in der hier vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen experimentell eingehend geprüft werden:

1. Bislang wurde der IDO-Mechanismus unter anderem in Nabelschnurblutmakrophagen (CBMDM) und adulten Makrophagen (PBMDM) durchgeführt. Es wurde jedoch nicht geprüft, ob es einen Unterschied zwischen diesen zwei Zellpopulationen gibt. Folglich wird der Versuch unternommen, Unterschiede zwischen CBMDM und PBMDM herauszuarbeiten. Da es bereits Ergebnisse zum Einfluss inhibitorischer Zytokine (IL-4, IL-10 und TGF- β) auf die IDO-Aktivität in CBMDM gibt, wird in hier vergleichend der Einfluss dieser Zytokine auf die IDO-Aktivität in PBMDM durchgeführt. Als Erreger dient in allen folgenden

Einleitung

Experimenten *Streptococcus pyogenes*, zu dem es noch keine Untersuchungen bezüglich IDO gibt.

2. Untersuchungen zum Einfluss klinisch relevanter und verwendeten anti-inflammatorische Substanzen auf die IDO-Aktivität. Der Schwerpunkt in dieser Arbeit liegt in der Untersuchung von Indomethacin, eine Substanz aus der Gruppe der Nicht-Steroidalen-Antirheumatika (NSAR), und Glukokortikoide (Hydrocortison und Dexamethson).
3. Vor dem Hintergrund das die Antibiotikatherapie eine zentrale Rolle in der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen spielt, wird der Effekt von Antibiotikakonzentrationen, die sich unterhalb der minimalen Hemmkonzentration (MHK) befinden, auf die IDO-induzierte Bakteriostase untersucht. Im Vordergrund steht ein in der Klinik häufig eingesetzte Antibiotika gegen grampositive Bakterien, Ampicillin.

Diese Arbeit soll Unterschiede zwischen CBMDM und PBMDM untersuchen und zusätzliche Informationen zum angeborenen Abwehrsystem Neugeborener und Erwachsener liefern. Der Einsatz anti-inflammatorischer Substanzen besonders in autoimmun-bedingten Krankheiten und das Ergebnis der Auswirkungen auf das angeborene Immunsystem trägt zum Verständnis der Wirkungsmechanismen dieser Substanzen bei. Ferner soll diese Arbeit eine weitere Hypothese zum postantibiotischen Effekt (PAE), in dem Antibiotika trotz Konzentrationen unterhalb des MHK-Wert einen bakteriostatischen Effekt zeigen, liefern.

II. Material und Methoden

1 Material

1.1 Zellen

1.1.1 Nabelschnurblutmakrophagen (cord blood monocyte-derived macrophages = CBMDM)

Das Nabelschnurblut wurde von dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHUD) und der Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf bezogen. Die Spenderinnen wurden über die Verarbeitung des Blutes eingehend aufgeklärt und haben der Spende zugestimmt.

1.1.2 Adulte Makrophagen (peripheral blood monocyte-derived macrophages = PBMDM)

Adulte Makrophagen wurden entweder aus peripherem Spenderblut (100-200ml) oder aus Buffy coat von der Plasmafraktionierung der Blutspendenzentrale der HHUD bezogen. Im Vergleich zu der Blutabnahme direkt im Labor (max. 100 ml) stehen hier die Zellen aus ca. 500 ml Blut zur Verfügung, so dass die Menge an Makrophagen um ein Vielfaches (Faktor 3-8) größer ist.

Durch die vielen unterschiedlichen Spender in der Blutspendenzentrale weisen die Buffy coats z.T. deutliche Unterschiede in Bezug auf Zellqualität/-lebensfähigkeit und Zellzahl auf.

Material und Methoden

1.2 Bakterien

Die Streptokokken der Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*) wurden einer Blutkultur eines septischen Patienten entnommen. Mittels gängigen labortechnischen Untersuchungen wurden die Bakterien identifiziert.

1.3 Geräte

Für die Untersuchungen wurden folgende Gerät verwendet:

Sterile Werkbank	Gelaire HF BSB 4A (Flow Lab, Meckenheim, D)
CO ₂ -begaster Brutschrank	Heraeus B 5060 EK/CO ₂ (Heraeus, Hanau, D)
Mikroskope	Zeiss
Kühlzentrifugen	(Hettich Zentrifugen, Mülheim an der Ruhr, D)
Tischzentrifuge	Megafuge 1.0 (Heraeus, Düsseldorf, D)
Photometer	SLT TECAN Rainbow (SLT Labinstruments, Crailsheim, D)
Digitalwaage	Precisa 600C (Oehmen Labortechnik, Essen, D)
Feinwaage	JL-180 (Chyo Balance Corporation, Kyoto, J)
Tischrüttler	Vortex VF2 IKA (Janke & Kunkel)
Wasserbad	Laktotherm (Dinkelberg, Typ (Köttermann, Häningsen, D)
Dampfdrucksterilisator	Autoklav P23 (Melag, Düsseldorf, D)

1.4 Plastikware

Alle Plastikwaren wurden, falls nicht anders angegeben, steril bezogen.

Bakteriologische Petrischalen (Greiner, Nürtingen, D)

Zellscharber (Greiner)

Material und Methoden

Zellkulturflaschen (Costar Tecnomara, Fernwald, D)

25 cm², 75 cm² mit und ohne belüfteten Deckel, zur Kultivierung von Nabelschnurmakrophagen und adulten Makrophagen.

Zellkulturplatten

24- und 48-well Zellkulturplatten (Costar), zur Titration von Zell- und Bakterienanzahl

Mikrotiterplatten

96-well Zellkulturplatten (Greiner oder Costar), zur Stimulationansätze der Makrophagen, Messung der IDO-Aktivität und Bakterienwachstumnachweis in entsprechenden Makrophagenansätzen.

Zentrifugenröhrchen

15 ml Spitzboden (Sarstedt, Nümbrecht, D), 50 ml Spitzböden (Greiner)

Cryotubes

1.8 ml (Nunc), Kryokonservierung von Bakterien, Chemokine und Zytokine

Einmalspritzen

1 ml (Ersta, Asik, DK), 5 ml, 10 ml, 20 ml (Luer Amefa, Kriftel, D)

Plastikpipetten (Greiner)

Kanülen

0.4 x 12 mm (Sherwood Medical, Schwalbach, D)

0.9 x 40 mm, 1.2 x 40 mm (Becton Dickinson, Heidelberg, D)

Einmalspitzen

10 µl (Eppendorf), 200 µl (Polylab, Seoul, Korea) und 1000 µl (Greiner)

Sterilfilter 0.2 µm (Millipore, Molsheim, F)

1.5 Medienkomponenten, Cytokine und Chemikalien

AB-Serum	Cambrix, Taufkirchen, D
Ampicillin	Sigma, Deisenhof, D
Clindamycin	Sigma, Deisenhof, D
Dexamethason	Sigma, Deisenhof, D
EDTA/Tritriplex	Merck, Darmstadt, D

Material und Methoden

Essigsäure, 96% bzw. 100%	Merck, Darmstadt, D
Fetales-Kälber-Serum (FCS)	Cytogen GmbH, Sinn, D
Ficoll-Hypaque	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Heparin	Boehringer Ingelheim, Ingelheim, D
Hydrocortisol	Sigma, Deisenhof, D
IFN- γ	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
IL-10	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Indomethacin	Sigma, Deisenhof, D
L-Glutamin	Cambrix, Taufkirchen, D
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhof, D
N ^G -monomethyl-L-Arginin (N ^G MMA)	Calbiochem, Schwalbach/TS, D
PGE2	Sigma, Deisenhof, D
TGF- β	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, D
Trichloressigsäure (TCE)	Merck, Darmstadt, D
Trypanblau 0.4%	Sigma, Deisenhof, D

Das Wasser zur Herstellung von Lösungen wurde mit einer Anlage der Firma Millipore entmineralisiert.

1.6 Medien zur Gewinnung und Kultivierung der Zellkultur

Folgende Medien wurden in den experimentellen Ansätzen verwendet, die zuvor einer Sterilkontrolle unterzogen wurden.

Phosphat-buffered saline (PBS): Für die Anwendung in der Zellkultur wurde steriler PBS-Puffer (pH 7.3) von Serag Wiessner, Naila, D, bezogen.

Magnetic-Cell-Sorting (MACS)-Puffer: PBS, 2 mM EDTA, 2% ABS.

Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM): Das IMDM-Medium wurde im flüssigem Zustand, mit NaHCO₃, steril, endotoxingetestet von Gibco (Eggenstein, D) bezogen und bei 4°C gelagert. Dieses Basismedium wurde mit 2 mM L-Glutamin und 5% inaktiviertem (56 °C, 30 min) fetalem Kalbserum (FCS) oder 2% inaktiviertem (56 °C, 30 min) Humanserum der Blutgruppe AB supplementiert.

Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-Medium): Das RPMI-Medium wurde im flüssigem Zustand, mit NaHCO_3 , ohne L-Glutamin, steril, endotoxingetestet von Gibco bezogen und bei 4°C gelagert. Dieses Basismedium wurde mit 5% inaktiviertem (56 °C, 30 min) fetalem Kalbserum (FCS) oder 2% inaktiviertem (56 °C, 30 min) Humanserum der Blutgruppe AB supplementiert.

Long-term culture (LTC)-Medium: Dieses spezielle Medium für CBMDM wurde nach der etablierten Methode von Ye, Z.Q et al (Ye, Burkholder et al. 1994) hergestellt. IMDM oder Iscove's Medium wurde mit 12,5% Fetal Calf Serum (FCS), 12,5% Pferdeserum, 2 mM L-Glutamin und 1 μM Hydrocortison supplementiert.

1.7 Medium zur Gewinnung und Kultivierung der Bakterien

Glycerollösung: Zu Herstellung einer 20%-igen Glycerollösung, wurden 2ml Glycerin, Merck, D, mit 8ml PBS vermischt und steril abfiltriert. Dieses Medium diente der Konservierung der Bakterien bei -20°C.

MUELLER-HINTON-Bouillon: Die zubereitete Bouillon (Oxoid, Wesel, D) war klar und leicht gelblich. Die MUELLER-HINTON-Bouillon war zur Bestimmung der MHK und MBK im Reihenverdünnungstest vorgesehen.

1.8 Lösung zum Nachweis der IDO-Aktivität

Ehrlich's Reagenz: Die Standardlösung zum Nachweis der IDO-Aktivität setzte sich aus 25 ml 96%-iger Essigsäure und 300 mg Ehrlich's Reagenz (p-dimethyl-amino-benzaldehyd) zusammen.

2 Methoden

2.1 Zellpräparation

2.1.1 Dichte Gradient Zentrifugation: Isolierung Mononukleärer Zellen aus peripherem Blut (periphere blood monocyte-derived macrophages = PBMDM)

Aus peripherem Blut eines Spenders oder eines Buffy coats wurden in der Dichte Gradient Zentrifugation die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Die Auftrennung gelang über einen Dichtegradienten, bei dem sich die mononukleären Zellen an der Phasengrenze von Blut/PBS und Ficoll anreicherten. Die Erythrozyten und die meisten polymorphkernigen Leukozyten sammelten sich aufgrund ihrer größeren Dichte im Pellet unterhalb des Ficolls. Das Spenderblut wurde im Verhältnis 1:1, Material von Buffy coats mindestens 1:3 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde auf 12,5 ml Ficoll Hypaque vorsichtig das mit PBS verdünnte Blut pipettiert, so dass noch keine Mischung von Blut- und Ficoll-Phase eintrat. Der Dichtegradient wurde bei 1150 g, 30 min zentrifugiert, und anschließend der Überstand bis zur sichtbaren, weißen Schicht mit mononukleären Zellen abgesaugt. Da diese Zellen leicht an Plastik adhärten, löste man zunächst mit einer Pipette die Zellen von der Wand der Röhren. Anschließend wurde diese Schicht in ein neues Röhren überführt, auf 50 ml mit 0,4% (v/v) Heparin enthaltendem PBS, gemischt und erneut zentrifugiert (650 g, 4°C, 10 min). Das Pellet wurde noch einmal mit PBS, 0,4% (v/v) Heparin gewaschen und anschließend je nach Größe in 1 bis 5 ml PBS, 0,4% (v/v) Heparin aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte über eine 1:10 bis 1:100 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop (400x).

Im Folgenden bestand zum einen die Möglichkeit die Zellen in IMDM mit 2% (v/v) AB-Serum zu Makrophagen differenzieren zu lassen. Dafür ließ man die erhaltenen PBMC 1 Stunde in der Kulturflasche adhären, nahm den Überstand, in dem sich die nicht-adhären Zellen befanden, ab und gab neues Medium dazu.

Zum anderen konnten die CD14⁺-Monozyten aus der Präparation, nach Markierung mit Antikörpern, an die magnetische Partikel gekoppelt waren, über eine magnetische Säule aufgereinigt werden (siehe nächstes Kapitel).

2.1.2 MACS: Magnetic cell sorting

CD14⁺-Monozyten wurden nach modifizierter Vorschrift von Miltenyi Biotech (MACS-Isolation Kit) aus einer Ficoll Hypaque Zellpräparation gewonnen. Dabei wurden je 90 MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen eingesetzt, resuspendiert und anschließend je 10 µl anti-CD14-MACS-Mico-Beads je 10⁷ Zellen zugegeben und erneut resuspendiert. Nach 15 minütiger Inkubation (4 °C), wurden die Zellen herunterzentrifugiert (650 g, 4°C, 10 min) und das Pellet in 1500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Der MACS-Puffer enthielt EDTA (2 mM) zur Komplexierung in der Lösung vorkommenden Calciums. Dies sollte eine mögliche Adhärenz noch vorhandener Thrombozyten an die zu präparierenden Monozyten verhindern. Nach der Aufreinigung über die Säule wurde die Zellzahl mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch (400x) bestimmt.

2.1.3 Präparation von Nabelschnurblutmakrophagen (cord blood monocyte derived macrophages = CBMDM)

Unmittelbar nach der Nabelschnurdurchtrennung gesunder Neugeborener wurde aus der V. umbilica Nabelschnurblut entnommen und in einen heparinisierten Beutel gefüllt. Die Präparation des Blutes wurde erfahrungsgemäß innerhalb von 48h durchgeführt, da ansonsten die Ausbeute der Monozyten innerhalb des entnommenen Nabelschnurblutes stark reduziert war. Die Präparation der CBMDM entsprach in den einzelnen Schritten der Methode der Ficoll Hypaque Zentrifugation (s. 2.1.1). Die anhand dieser Methode separierten Monozyten wurden in LTC-Medium in Kulturflaschen abgefüllt und 1h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Innerhalb dieser Zeit adhärten die Monozyten in der Kulturflasche. Der Überstand mit den nicht-adhären Zellen wurde nach Ablauf der Zeit abgesaugt und neues LTC-Medium dazugeben. Nach diesem Trennungsverfahren der Monozyten des Nabelschnurblutes reiften die Zellen bei 37° C und 5% CO₂ und einer Inkubation von ca. 3 Wochen zu Makrophagen aus.

2.2 Bakterien

2.2.1 Herstellung des Bakterienstock

Die einmalige Bereitstellung eines Bakterienstocks der Gruppe A Streptokokken erleichterte das Procedere der Versuchsreihen mit der Bakterieninfektion. Hierbei wurden 8-10 Kolonien GAS in 100 ml BHI-Medium in einer Übernachtskultur angezüchtet. Anschließend wurde die Übernachtskultur zentrifugiert (1400 g, 4 °C, 30 min) und in PBS gewaschen. Das hierdurch entstandene Pellet wurde in einer 20%-igen Glycerollösung und PBS resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20 ° C gelagert. Die Anzahl der Bakterien (KBE), die in den Experimenten verwendet wurden, wurde für jedes Experiment durch Verdünnungsreihen und Ausplattieren dieser Reihen auf Blutagarplatten (BHI + 5% Schafsblut) kontrolliert.

2.2.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und minimalen bakteriziden Konzentration (MBK)

2.2.2.1 Herstellung der Keimsuspension

Von einer 18 Stunden alten Bouillonkultur wurde eine Verdünnung der GAS hergestellt, die einer Keimzahl von 2×10^5 bis 2×10^6 vermehrungsfähigen Keimen/ml entsprach. Diese wurden nach der Methode der koloniebildende Einheiten (KBE) bestimmt. Diese Bouillonkultur der Gruppe A Streptokokken wurde weiter 1:100 verdünnt; 100µl der Bouillonkultur wurden zu 9,9 ml physiologischer NaCl-Lösung pipettiert.

2.2.2.2 Herstellung der Verdünnungsreihe

In die Vertiefungen 1 bis 12 einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100µl MUELLER-HINTON-Bouillon pipettiert. Anschließend wurde in die 1. Vertiefung 100µl der Antibiotikastammlösung (mit einer Konzentration von 1µg/ml, wobei jeweils für Clindamycin und Ampicillin verschiedene Ansätze gemacht wurden) pipettiert und durch überpipettieren von jeweils 100 µl eine 1:2 abfallende Verdünnungsreihe bis zur 10. Vertiefung hergestellt. Aus der 10. Vertiefung wurden die 100 µl verworfen.

Danach wurden in die Vertiefungen 1 bis 11 100 μ l der Keimsuspension pipettiert. Die 12. Vertiefung entsprach der Sterilitätskontrolle. Die Mikrotiterplatte wurde daraufhin 18-20 Stunden bei 36 °C bebrütet.

2.2.2.3 Auswertung

Der MHK-Wert entsprach bei visueller Ablesung die niedrigste Antibiotika-Konzentration, bei der kein mit dem Auge sichtbares bakterielles Wachstum erfolgt war.

Zur Erfassung der MBK wurden die nicht getrübbten Verdünnungsreihen auf Agar ausgeimpft und für weitere 18-20 Stunden bei 36 °C bebrütet. Als MBK entsprach die niedrigste Konzentration des Antibiotikums, bei der nach Ausimpfung kein Keimwachstum mehr auftrat.

2.3 Stimulation der CBMDM und PBMDM und die anschließende Bakterieninfektion mit GAS.

2.3.1 Stimulation der CBMDM und PBMDM

Das Prinzip der Stimulation der Zellen wurde für CBMDM und PBMDM in gleicher Weise durchgeführt. Die Zellen wurden nach ihrer Reifung in 96-well Platten (10⁵ Zellen/well PBMDM, 3x10⁴ Zellen/well CBMDM) in IMDM-Medium, welches zur Messung der IDO-Aktivität mit 50 μ g/ml L-Tryptophan supplementiert ist, ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit IFN γ stimuliert. Hierbei wurde eine 1:2 Titration des IFN γ , beginnend mit einer Aktivität von 500U/ml, bis zur einer Verdünnung von 8 U/ml angestrebt. Durch eine Kostimulation mit Zytokinen, Chemokinen und Glukokortikoiden wurde der Einfluss dieser Substanzen auf die IFN γ -stimulierten Makrophagen untersucht. Die applizierte Konzentration der Substanzen, bei der eine Wirkung erzielt wurde, wurde aus Titrationsversuchen mit den entsprechenden Substanzen entnommen. In der folgenden angegebenen Aktivität bzw. Konzentration wurden in einigen wells die entsprechenden Substanzen dazugegeben: IL 4 (500U/ml), IL 10 (50 ng/ml), TGF- β ₁ (5 ng/ml), Indometacin (80 μ mol/ml), PGE₂ (2,5 und 7,5 μ g/ml), Hydrocortison (50 μ mol/ml) und Dexamethason (0,1 μ mol/ml). Um eine Negativkontrolle zu erhalten, wurden einige wells weder mit IFN γ noch mit anderen Substanzen stimuliert. Anschließend wurden die stimulierten Zellen bei 37°C in 5% CO₂ drei Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die IDO-Aktivität photometrisch bestimmt (s. 2.4.1).

2.3.2 Infektion der Makrophagen mit GAS

Gemäß der oben beschriebenen Stimulation der Zellen (2.3.1) wurde diese mit denselben Konzentrationen der entsprechenden Zytokine, Chemokine und Glucokortikoide in RPMI durchgeführt. Das RPMI-Medium enthält dabei kein L-Glutamin und 5 µg/ml L-Tryptophan, somit weniger als IMDM (15 µg/ml L-Tryptophan). Nach 72h Inkubation wurden die Bakterien der Gruppe A Streptokokken hinzugegeben. Die Bakterien wurden zuvor in einer Anzahl von 5×10^4 KBE in 1ml RPMI resuspendiert und anschließend in 10 µl/well zu den Zellen hinzu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24h-48h wurde die Extinktion bei 620nm gemessen und es wurden die KBE angefertigt. In einigen Wells wurde außerdem 40 µg L-Tryptophan addiert und nach weiteren 24 h Inkubation nochmals die Extinktion bei 620 nm gemessen.

2.3.3 Bestimmung des Effektes der sub-inhibitorische Antibiotika-Konzentrationen auf die IDO-induzierte Bakterio-stase der GAS

Die MHK von Ampicillin und Clindmycin wurde nach der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Methode bestimmt. Anschließend wurden IFN γ -stimulierte PBMDM in RPMI-Medium nach 72 stündiger Inkubation gemäß der bekannten Methode (Kapitel 2.3.2) mit GAS infiziert. Im Unterschied zu den zuvor durchgeführten Inokulationen der Makrophagen mit GAS, wurde hierbei das verwendete RPMI-Medium mit Ampicillin und Clindamycin angereichert, deren Konzentrationen 1-2 log₂-Stufen unterhalb der zuvor bestimmten MHK-Werte lagen (sub-inhibitorische Antibiotika-Konzentration).

2.4 Nachweismethoden

2.4.1 Photometrische Messung der IDO- Aktivität

Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen wurde die IDO-Aktivität im Zellüberstand indirekt anhand der Konzentration von L-Kynurenin photometrisch ermittelt.

Hierzu wurden jeweils 160 µl/well von Zellüberstand entnommen und in eine V-Boden-Platte übertragen. Nach einer Zugabe von 10 µl/well 30%-iger Trichloressigsäure wurde die Platte 30 min in einem auf 50°C erhitzten Wasserbad inkubiert. Dieses Verfahren beschleunigt die Hydrolyse des L-Formyl-Kynurenins zu Kynurenin. Anschließend wurde die Platte 10 min bei 650 g zentrifugiert, um die noch vorhandenen korpuskulären Anteile vom Überstand zu trennen. Der Überstand wurde in eine Flach-Boden-Platte zu je 100 µl/well übertragen. Nach einer Zugabe von

100 μl /well frisch angefertigten Ehrlich's Reagenz (s. 1.8) wurde die Extinktion bei 492 nm gemessen.

2.4.2 Anfertigen der koloniebildenden Einheiten (KBE)

Grundlage der Anfertigung der KBE ist das Ergebnis der IDO-vermittelten Bakteriostase, welches in der vorangegangenen Messung bei einer Extinktion von 620 nm ermittelt wurde. Es wurden jeweils 10 μl aus repräsentativen wells entnommen und in 100 μl PBS gut resuspendiert. Anschließend erfolgte eine serielle Verdünnung von 10^{-1} bis 10^{-7} . Aus den einzelnen Verdünnungen wurden 10 μl entnommen und auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und 24 Stunden im Brutkasten inkubiert. Im Weiteren wurden die einzelnen Bakterienkolonien einer Verdünnungsreihe ausgezählt und mit den einzelnen Verdünnungsfaktoren multipliziert. Somit wurden die Menge der Bakterien ermittelt, die sich in der Testreihe befanden.

III. Ergebnisse

1 Die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität in Makrophagen ist dosisabhängig

Interferone haben eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunität in Säugetieren gegenüber Erregern. Während INF α/β in virusinfizierten Körperzellen produziert werden, wird IFN γ in aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produziert. IFN γ beeinflusst diverse Funktionen der Immunzellen und steuert zusätzlich die Expression von über 200 Substanzen in diesen Zellen. Hierzu gehört ebenso die Stimulation der bakteriziden und bakteriostatischen Mechanismen der Phagozyten (Boehm, Klamp et al. 1997). Die IDO-Induktion durch IFN γ in Makrophagen ist ein Effektormechanismus, der eine große Bedeutung erlangt hat und in den folgenden Versuchen in CBMDM und PBMDM reproduziert wurde. Hierbei wurden CBMDM und PBMDM in verschiedenen Versuchsreihen mit IFN γ stimuliert. Die Stimulation fand mit der höchsten IFN γ -Konzentration von 500 U/ml (im Falle von PBMDM auch bis 1000 U/ml) statt und wurde seriell 1:2 bis zu einer Konzentration von 8 U/ml durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten nicht-stimulierte Makrophagen in einigen Wells. Das Ergebnis der photometrischen Messung in Abb. 4 zeigt, dass die IDO-Aktivität in CBMDM und PBMDM mit der Zunahme der IFN γ -Konzentration signifikant zunimmt.

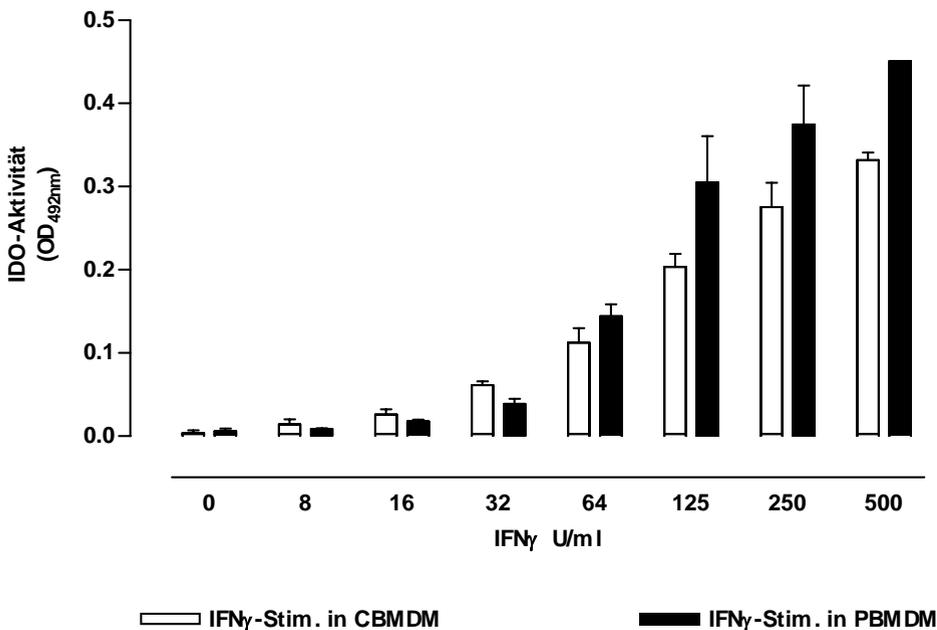


Abb. 4: Die IDO-Aktivität ist von der IFN γ -Konzentration abhängig. CBMDM (3×10^4 /well) und PBMDM (1×10^5 /well) wurden 72h mit IFN γ inkubiert und anschließend die IDO-Aktivität photometrisch bestimmt. Die Daten zeigen die Mittelwerte \pm SD aus 3 Werten und wurden mindestens 3x reproduziert.

Ergebnisse

Weiterhin ergab sich, dass die maximale IFN γ -Konzentration für CBMDM bei 500 U/ml und für PBMDM bei 1000 U/ml (Ergebnisse hier nicht gezeigt) befand. Konzentrationen oberhalb dieser Werte zeigten keine Erhöhung der IDO-Aktivität. Ferner stellt diese Abbildung und die anderen Ergebnisse dar, dass die PBMDM im Bereich höherer (500 U/ml) IFN γ -Konzentration eine stärkere IDO-Aktivität zeigten. Diese unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber IFN γ könnte ein Hinweis auf Differenzierungsunterschiede zwischen PBMDM und CBMDM sein. Gibt es tatsächlich größere Unterschiede, könnte ebenso die unterschiedliche maximale Konzentration von IFN γ richtungweisend sein.

2 IFN γ -induzierte, IDO-vermittelte L-Tryptophan-Depletion bedingt eine Bakteriostase der GAS

IFN γ -stimulierte Makrophagen produzieren das Enzym IDO. IDO katalysiert den Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan und führt dadurch zu einer intrazellulären bzw. extrazellulären Verarmung der Zelle an L-Tryptophan. Der hieraus entstehende L-Tryptophanmangel in Monozyten und Fibroblasten hat eine antiparasitäre und antibakterielle Wirkung (Pfefferkorn 1984; Daubener and MacKenzie 1999). Die folgenden Ergebnisse illustrieren die Korrelation zwischen der IDO-vermittelten L-Tryptophan-Depletion und der Bakteriostase der GAS. IFN γ -stimulierte CBMDM und PBMDM wurden gemäß der in Kapitel 2.3.2 beschriebenen Methode ohne weitere Zytokine in unterschiedlichen Testreihen 72 Stunden inkubiert und anschließend mit GAS infiziert. Eine photometrische Messung des Bakterienwachstums, die 24-48 Stunden nach Infektion durchgeführt wurde ist in Abb. 5 dargestellt.

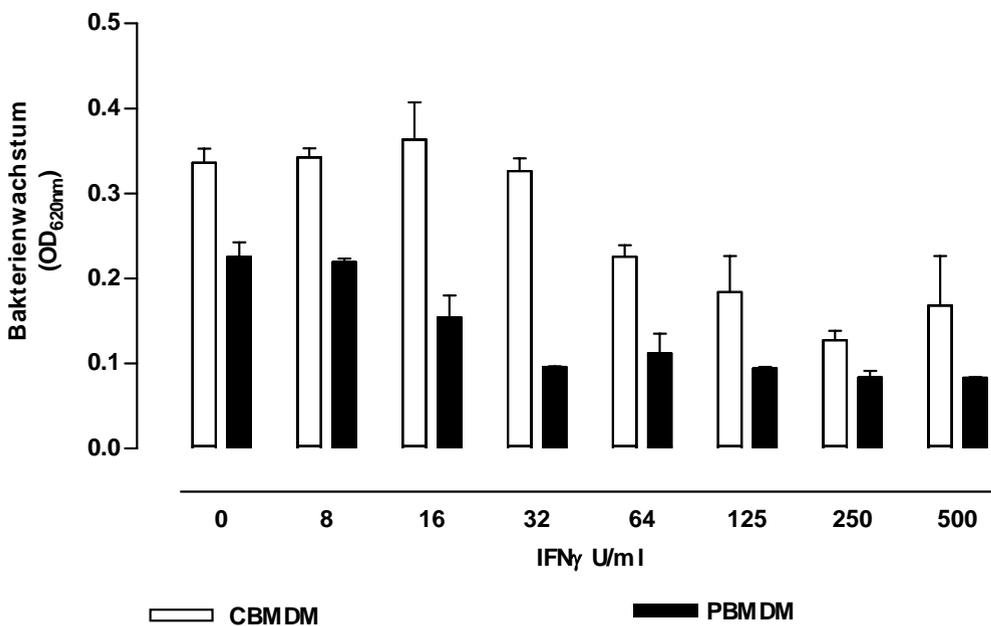


Abb. 5: IFN γ -stimulierte CBMDM und PBMDM inhibieren das Wachstum der GAS. CBMDM (3×10^4 /well) und PBMDM (1×10^5 /well) wurden mit IFN γ stimuliert. Nach einer 72 stündigen Inkubation wurden die Makrophagen mit GAS (50 cfu/well) infiziert und weitere 24-48h bebrütet. Das Bakterienwachstum wurde bei 620nm gemessen. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei Messungen +/- SD dar und wurden mindestens 3x wiederholt.

Ergebnisse

Nach der Messung wurde denselben Testplatten L-Tryptophan supplementiert und weitere 24 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde wiederum eine photometrischen Messung durchgeführt (s. Abb.6).

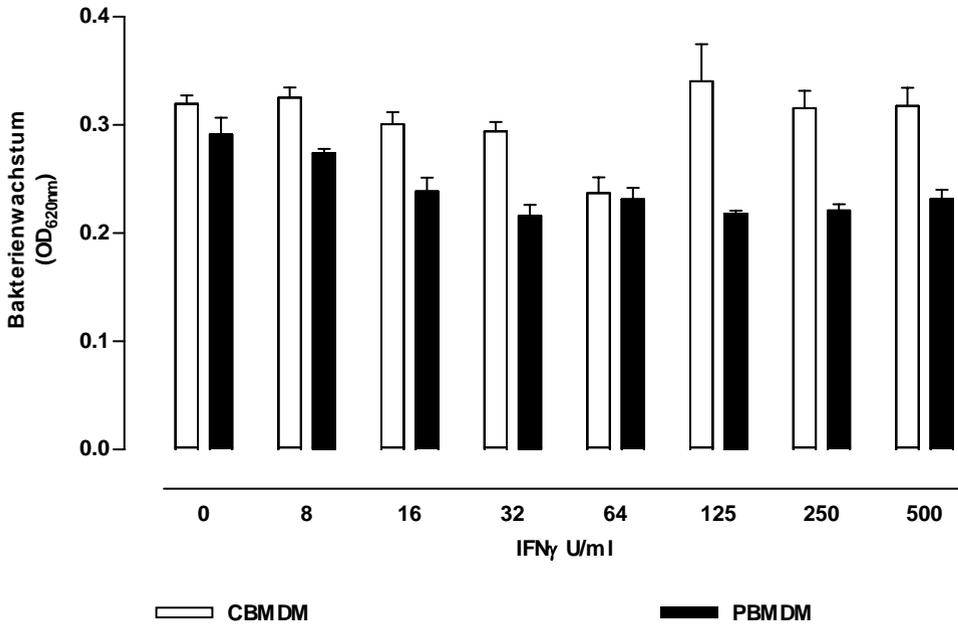


Abb. 6: L-Tryptophan-Supplementierung hebt die IDO-vermittelte Bakteriostase der GAS auf. Im direkten Anschluß der Messung der Bakteriostase (s. Abb.5) wurden 40 μ g/well L-Tryptophan hinzugegeben und die Platten weitere 24h inkubiert. Anschließend wurde das Bakterienwachstum erneut photometrischen bei 620nm bestimmt. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei Messungen +/- SD dar und wurden mindestens 3x wiederholt.

In der Abbildung 5 ist die IFN γ -abhängige Bakteriostase der GAS erkennbar. Hohe IFN γ -Konzentrationen bedingen eine stärkere Bakteriostase durch CBMDM und PBMDM, da vermehrt L-Tryptophan verbraucht wird. Weiterhin fällt die gegenüber CBMDM stärkere Hemmung des Bakterienwachstums durch PBMDM auf. Eine notwendige Maßnahme zur Bestätigung der IFN γ -induzierten, IDO-vermittelten Bakteriostase ist die Supplementierung von L-Tryptophan, welches folglich den IDO-vermittelten L-Tryptophanmangel aufhebt und demzufolge das Bakterienwachstum erneut fördert (s. Abb.6).

3 IL4, IL10 und TGFβ hemmen die IDO-Aktivität und folglich die IDO-induzierte Bakteriostase der GAS

Die IDO-Induktion unterliegt komplexen Regelmechanismen des Immunsystems. In einer vorhergehenden Studie unseres Instituts wurde der inhibitorischen Effekt der Zytokine IL-4, IL-10 und TGFβ auf die IDO-Aktivität in Nabelschnurblutmakrophagen gezeigt. Folglich wurde auch die Bakteriostase der entsprechenden Bakterien durch die zytokinbedingte Hemmung der IDO-Aktivität abgeschwächt. Analog zu diesen Ergebnissen wurde dieser zytokinabhängige Effekt in einem Modell mit PBDM durchgeführt.

IFN γ -stimulierte adulte Makrophagen wurden mit IL-4, IL-10 und TGFβ kostimuliert und 72 Stunden inkubiert. Die IDO-Aktivität wurde nach obigem Protokoll gemessen. Auch hier führt die Kostimulation IFN γ -stimulierte adulter Makrophagen mit den entsprechenden Zytokinen zu einer Inhibition der IDO-Aktivität (Abb. 7).

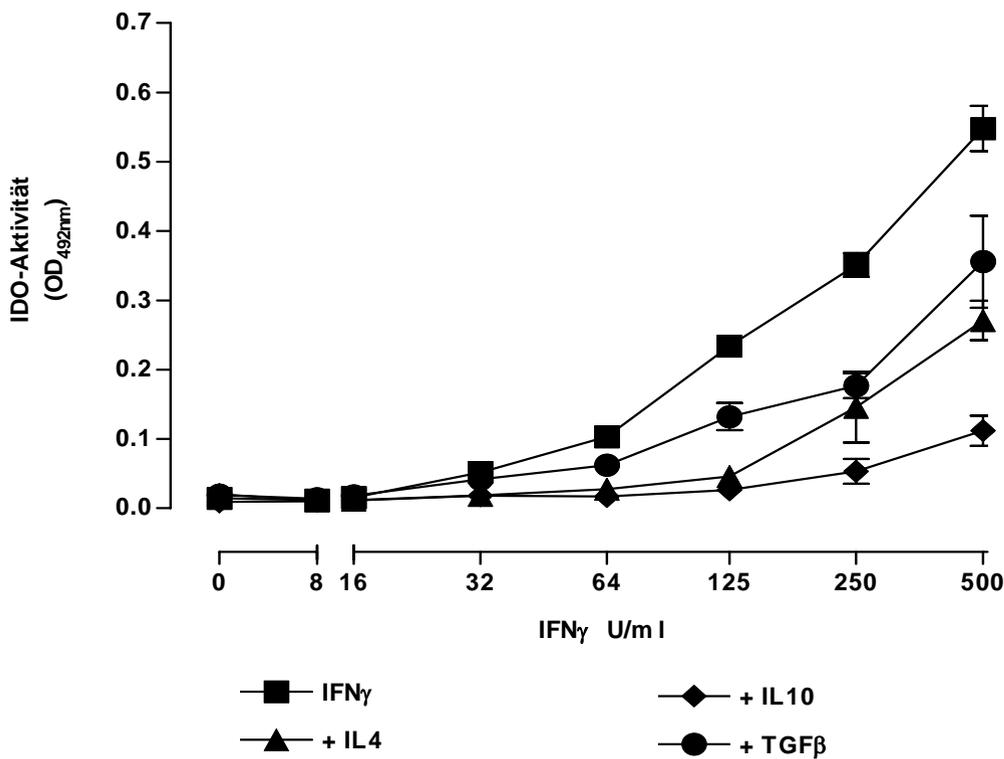


Abb. 7: Zytokin-vermittelte Inhibition der IFN-gamma-induzierten IDO-Aktivität. IFN γ -stimulierte PBMDM (1×10^5 /well) wurden mit IL4 (500U/ml), IL10 (50 ng/ml) und TGFβ (1 μ g/ml) kostimuliert. Nach 72h Inkubation wurde die IDO-Aktivität gemessen. Die Werte entsprechen einem Durchschnitt von 3 Messungen \pm SD und wurden mindestens 3x reproduziert.

Ergebnisse

Ähnlich der publizierten CBMDM Ergebnissen übt die Zugabe von IL 10 die stärkste Hemmung derIDO-Aktivität aus. TGF β hat hierbei den geringsten Effekt. Parallel hierzu wurden in separaten Ansätzen IFN γ -stimulierte PBMDM wiederum mit IL-4, IL-10 und TGF β kostimuliert und nach 3 Tagen Inkubation mit GAS infiziert. Das Ergebnis der photometrischen Messung am 4 Tag ist in Abb. 8 dargestellt.

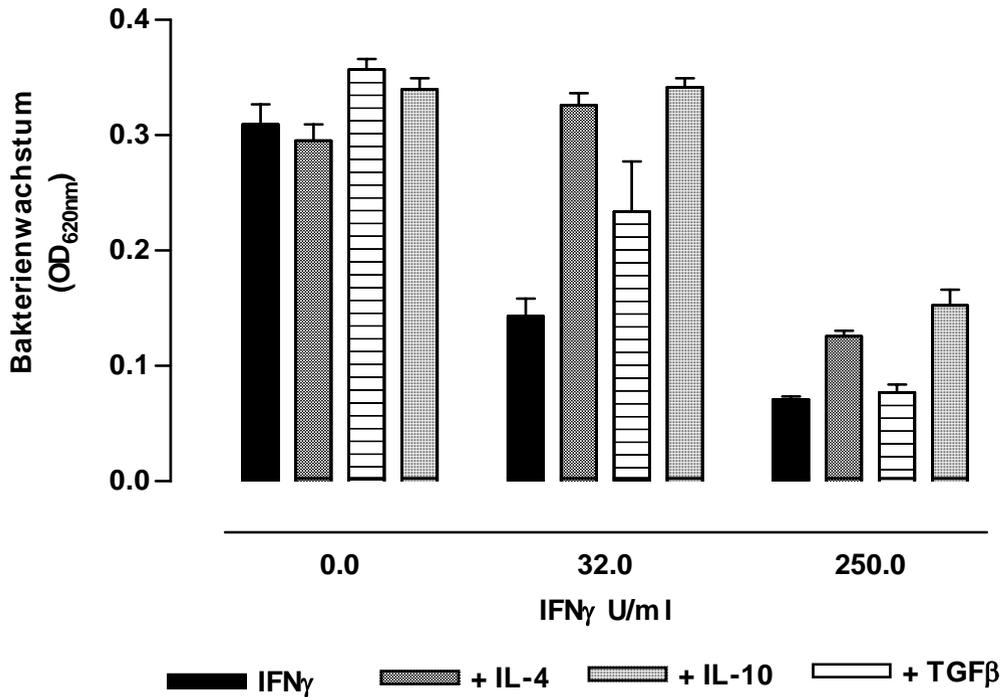


Abb. 8:Die IDO-vermittelte Bakteriostase in PBMDM wird durch Zytokine partiell aufgehoben. Adulte Makrophagen (1×10^5 /well) wurden mit IFN γ alleine, und zusätzlich noch mit IL4 (500 U/ml), IL10 (50 ng/ml) und TGF β (5 ng/ml) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen wurden diese Ansätze mit GAS infiziert und nach 24h das Bakterienwachstum bei 620nm gemessen. Die Werte entsprechen dem Durchschnitt von 3 Messungen +/- SD und sind für min. 3 Experimente stellvertretend.

Die zytokin-bedingte Hemmung der IDO-Aktivität bewirkt eine Aufhebung der Bakteriostase der GAS. Die Hemmung der IDO-Aktivität führt somit zum verminderten Abbau des L-Tryptophans, welches dadurch vermehrt für die GAS vorhanden ist. Die Bakterien können demzufolge stärker wachsen als im Medium mit nur IFN γ -stimulierten PBMDM. In Abb. 8 ist zu erkennen, dass das Wachstum der Bakterien unter der IL 10-Kostimulation am größten ist. Dieses Ergebnis ist gut nachvollziehbar, da IL 10 bei den zytokin-bedingten Hemmungen der IDO-Aktivität den größten Effekt zeigte und demzufolge der L-Tryptophanmangel unter dem Einfluss von IL 10 am geringsten ist.

4 Anti-inflammatorischen Substanzen inhibieren die IFN γ -induzierte IDO Aktivität

Indomethacin gehört zu der Gruppe der nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR), welches aufgrund seiner antipyretischen und analgetischen Wirkung eine breite Anwendung in der Therapie bei Erkrankungen in rheumatischen Formenkreis eingesetzt wird. Die entzündungshemmende Wirkung des Präparates erfolgt über eine Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX 2). COX ist ein reaktionsentscheidendes Enzym bei der Bildung der entzündungsfördernden Prostaglandinen. Das Enzym katalysiert die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandin H₂, welches eine Vorstufe der biologisch aktiven Prostaglandinen; hier insbesondere Prostaglandin E₂, ist. Die Gruppe der Prostaglandine gehören mit den Thromboxane und Leukotriene zu den Eicosanoide, die einen vielseitigen Einfluss auf die Entzündungsprozesse im Organismus, insbesondere im Bereich der Gelenke, Haut und Augen haben. Sie greifen unter anderem in Intensität und Dauer der Schmerz- und Fieberentwicklung im Rahmen einer Entzündung ein. In den folgenden Ansätzen wurde der Effekt der COX-2-Inhibition durch Indomethacin auf die IDO-Aktivität überprüft. IFN γ -stimulierte Makrophagen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Indomethacin kostimuliert und die IDO-Aktivität gemessen. Es wurde eine Konzentration von 250 U/ml IFN γ eingesetzt, da die Konzentration eine nicht maximale IDO-Aktivität in den Zellen hervorruft, um den Indomethacineffekt zu bestimmen. Mehrfach reproduzierte Versuche zeigten eine konzentrationsabhängige Hemmung der IDO-Aktivität durch Indomethacin (Abb. 9).

Ergebnisse

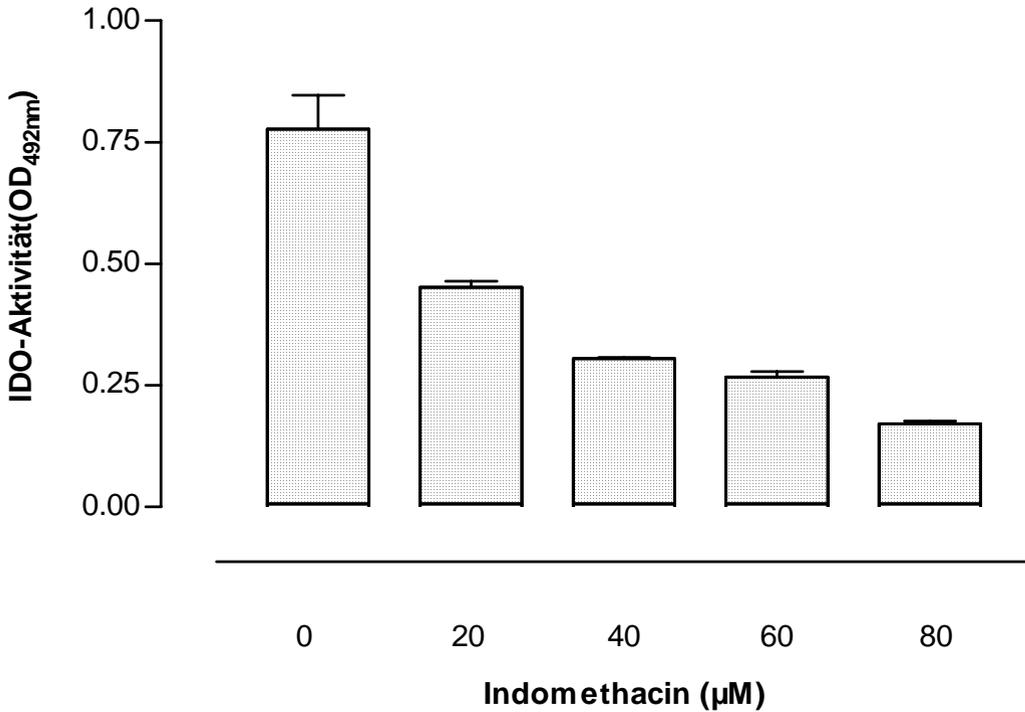


Abb. 9: Dosis-abhängige Inhibition der IDO-Aktivität durch Indomethacin. Makrophagen (1×10^5 /well) wurden mit IFN γ (250 U/ml) stimuliert. Zusätzlich wurden in ausgewählten Reihen mit verschiedenen Konzentrationen von Indomethacin stimuliert und die IDO-Aktivität nach der beschriebenen Methode bestimmt. Die Werte entsprechen dem Durchschnitt von 3 Messungen \pm SD und sind für min. 3 Experimente stellvertretend.

Die Konzentration von 80 μ l Indomethacin übte bei diesen Titrationsversuchen die stärkste Hemmung der IDO-Aktivität aus. Diese Konzentration war nicht cytotoxisch.

Nachdem die maximale Konzentration zur effizienten Hemmung der IDO-Aktivität durch Indomethacin bestimmt wurde, folgten die Experimente zum Einfluss von Indomethacin auf die IDO-induzierten Bakteriostase durch CBMDM und PBMDM. Hierbei stellte sich heraus, dass die Kostimulation mit Indomethacin die IDO-vermittelte Bakteriostase aufhob. Das dargestellte Ergebnis wurde in PBMDM reproduziert und gilt ebenso für CBMDM (hier nicht dargestellt). Analog zu den zytokin-bedingten Effekten, ist davon auszugehen, dass die IDO-Aktivität durch Indomethacin gehemmt wird und konsekutiv der L-Tryptophanmangel in diesen Zellreihen geringer ausfällt. Die Bakterien können folglich unter diesen Bedingungen besser wachsen (Abb. 10).

Ergebnisse

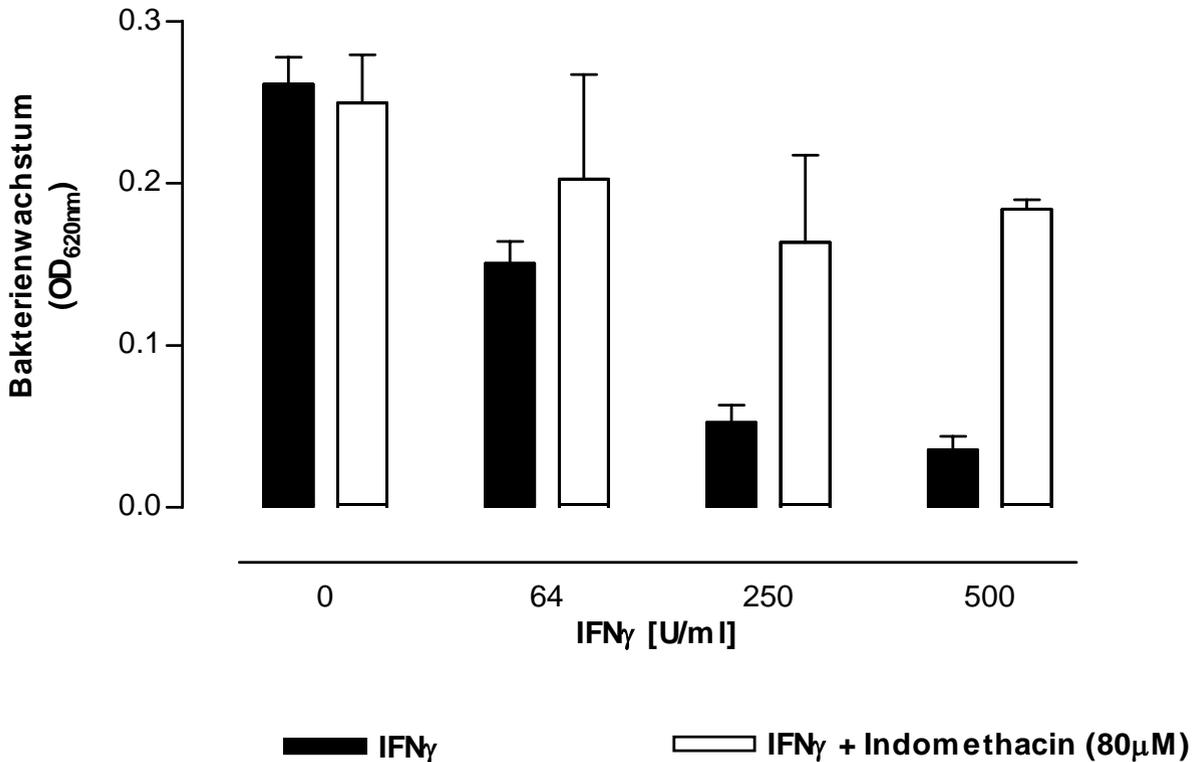


Abb. 10: Indomethacin hebt die IDO-vermittelte Bakteriostase auf. IFN γ -stimulierte PBMDM (1×10^5 /well) ohne und mit Indomethacin (80 μ l) wurden 3 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Gruppe A Streptokokken (50 cfu/well) infiziert und 24h später das Bakterienwachstum gemessen. Die Ergebnisse entsprechen hierbei dem Durchschnittswert \pm SD und repräsentieren vier Experimente.

Vor dem Hintergrund, der inhibitorischen Wirkung von Indomethacin auf die Prostaglandinsynthese und demzufolge auf die Entzündung, wurde im Folgenden der Zusammenhang zwischen diesem Mechanismus und dem inhibitorischen Effekt von Indomethacin auf die IDO-Aktivität untersucht. Wirkt Indomethacin durch Inhibition der Prostaglandinsynthese hemmend auf die IDO-Aktivität? Für diese Analyse wurden IFN γ -stimulierte Makrophagen (CBMDM und PBMDM) mit und ohne Indomethacin zusätzlich mit Prostaglandin E₂ (PGE₂) kostimuliert. Nach 3 Tagen Inkubation wurde die IDO-Aktivität gemessen. Wider Erwarten zeigt die Abbildung 11, dass PGE₂ nicht die indomethacin-vermittelte Hemmung der IDO-Aktivität aufhebt, sondern sie sogar konzentrationsabhängig verstärkt hemmt.

Ergebnisse

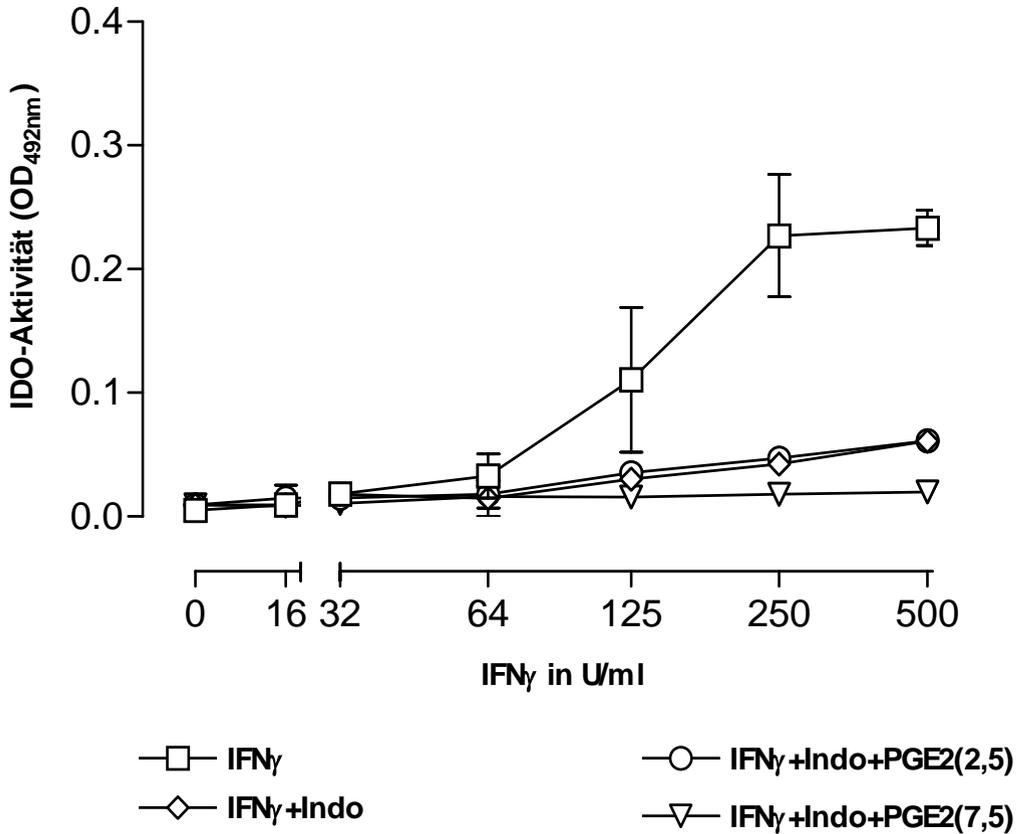


Abb. 11: PGE₂ hebt nicht die Indomethacinwirkung auf. Makrophagen (PBMDM) (1×10^5 /well) wurden mit IFN γ und mit Indomethacin (20 μ M) kostimuliert. Zusätzlich wurden einige Zellen mit Indomethacin und PGE₂ (2,5/7,5 μ g/ml) kostimuliert. Die IDO-Aktivität wurde nach obig beschriebener Methode nach 3 Tagen Inkubation gemessen. Die Ergebnisse entsprechen Durchschnittswert \pm SD. Diese Versuche wurden mindestens dreimal reproduziert.

Das Ergebnis einer Kombination von Indomethacin und PGE₂ entspricht nicht der angenommenen Hypothese und zog weitere Untersuchungen nach sich, in denen der alleinige Effekt von PGE₂ überprüft wurde. Wie verhält sich die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität in PBMDM in Anwesenheit PGE₂? Hierbei zeigte sich, dass eine Kostimulation mit PGE₂ eine dosisabhängige Hemmung der IDO-Aktivität bewirkt (Abb.12). Während eine Kostimulation mit 2,5 μ g/ml PGE₂ eine starke Hemmung verursacht, führt die Kostimulation mit 7,5 μ g/ml PGE₂ fast zu einer kompletten Blockade der IDO-Aktivität. Bei dieser hohen Konzentration von PGE₂ erfolgte eine Prüfung der Zellvitalität mit einer Trypanblaufärbung, um den cytotoxischen Tod der Zellen auszuschließen. Die Zellen waren bei beiden PGE₂-Konzentration lebendig.

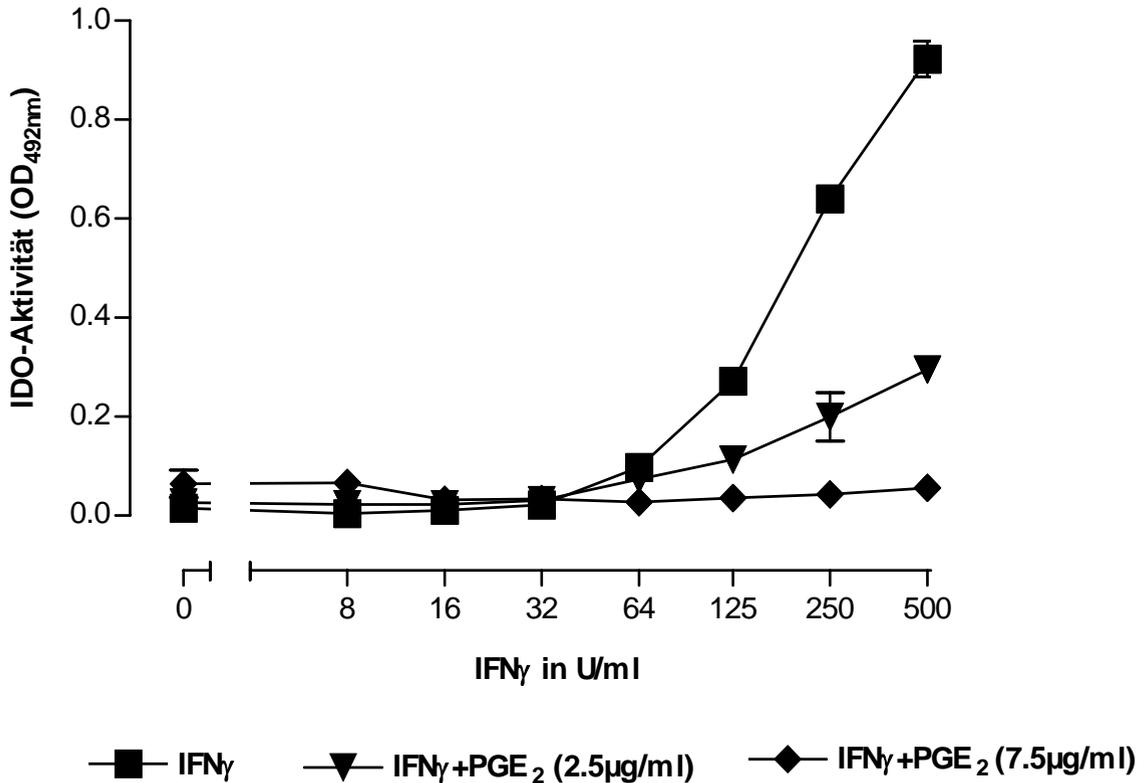


Abb. 12: Dosisabhängig Inhibition der IDO-Aktivität durch PGE₂. IFN- γ -stimulierte PBMDM (1×10^5 /well) ohne und mit PGE₂ (2,5/7,5 µg/ml) wurden 3 Tagen bebrütet und nachfolgend die IDO-Aktivität bei 492nm ermittelt. Die Aktivitäten entsprechen einem Durchschnitt +/- SD von 3 Werten. Dieser Ansatz wurde mindestens dreimal wiederholt.

5 Glucokortikoide verstärken die IDO-Aktivität in CBMDM

Glucokortikoide gehören der Gruppe der Steroide an, die im Rahmen des Lipidstoffwechsels im Körper produziert werden. Steroide haben eine ausgeprägte entzündungshemmende als auch immunsupprimierende Wirkung und werden daher regelmäßig bei Erkrankungen rheumatischer Genese, insbesondere bei der chronische Arthritis und autoimmunologischen Erkrankungen, eingesetzt. Die entzündungshemmende Wirkung der Glucokortikoide wird der Synthese von Lipocortin-1, eine Protein der Familie der Annexine, zugerechnet, welches als „second messenger“ fungiert (Flower and Rothwell 1994). Der Effekt der Immunsuppression wird durch die Inhibition der Synthese verschiedener Zytokine und Chemokine vermittelt (Pitzalis, Pipitone et al. 2002). Vor diesem Hintergrund birgt die systemische Therapie mit Glucokortikoiden im Falle einer bakteriellen Superinfektion die Gefahr einer Dissemination mit den entsprechenden Konsequenzen. In den folgenden Versuchsreihen wurde der Effekt von Hydrocortisone und Dexamethasone auf die IDO-Aktivität und anschließend auf die IDO-vermittelte Bakteriostase der CBMDM und

Ergebnisse

PBMDM überprüft. Es sei vorweggenommen, dass weder Hydrocortisone noch Dexamethasone einen Effekt auf die IDO-Aktivität bzw. IDO-vermittelte Bakteriostase im adulten Makrophagensystem hatten. Allerdings zeigte sich ein überraschender Effekt der Glukokortikoide auf die IDO-Aktivität der CBMDM. Die Kostimulation mit Hydrocortisone und Dexamethasone verstärken die IFN γ -induzierte IDO-Aktivität der CBMDM (Abb. 13 und 14).

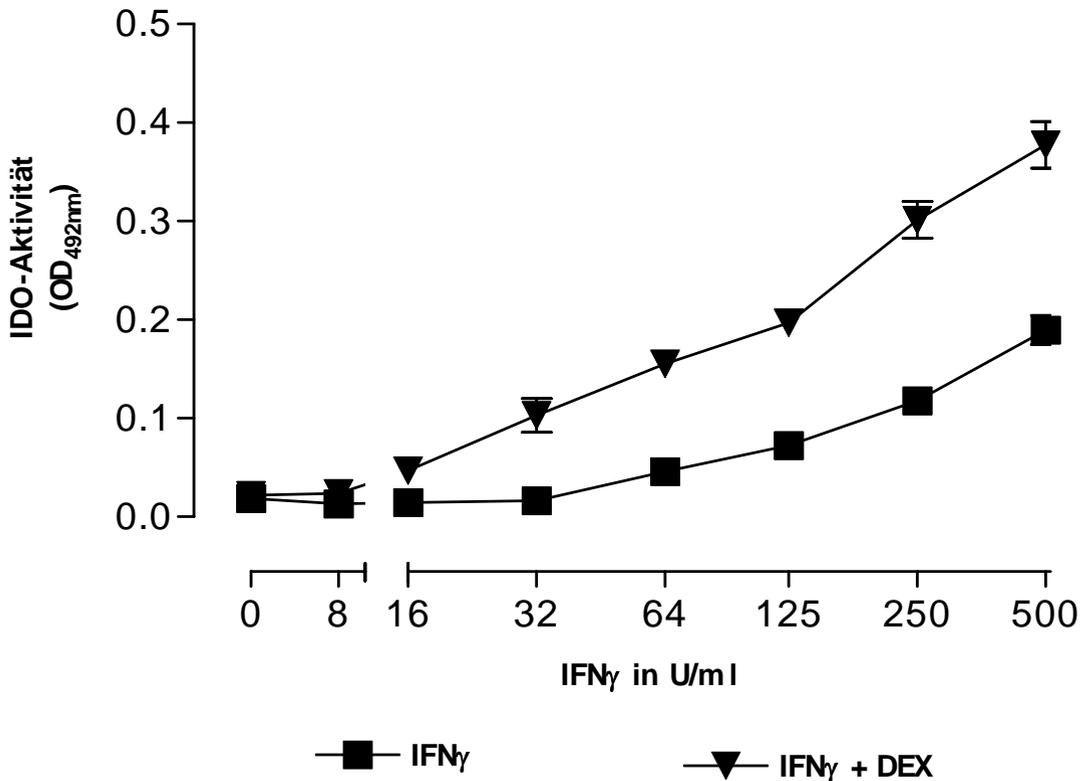


Abb. 13: Dexamethson verstärkt die IDO-Aktivität der CBMDM. Nabelschnurblutmakrophagen (3×10^4 /well) wurden mit IFN γ und zusätzlich mit Dexamethson (DEX, $0,1 \mu\text{M}$) stimuliert. Nach drei Tagen Inkubation wurde die IDO-Aktivität bei 492nm gemessen. Die dargestellten Werte entsprechen dem Durchschnitt von drei Messungen \pm SD und repräsentieren drei verschiedene Versuchsansätze.

Ergebnisse

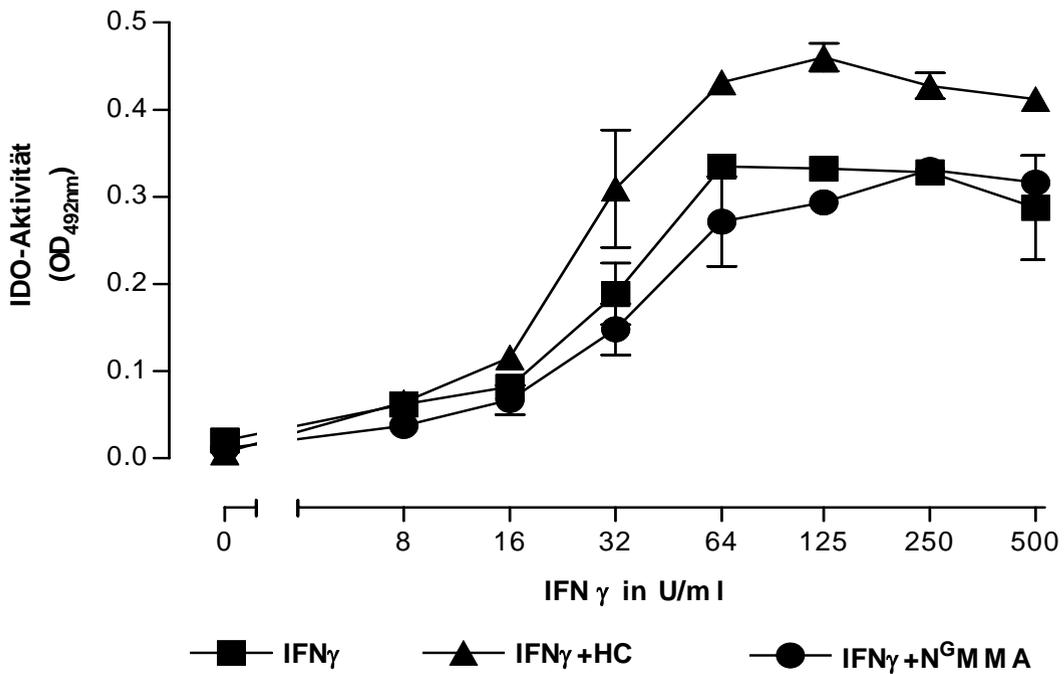


Abb. 14: Die Verstärkung der IFN γ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM durch Hydrocortisone ist nicht NO-vermittelt. Nabelschnurblutmakrophagen (3×10^4 /well) wurden mit IFN γ und zusätzlich mit Hydrocortisone (HC, 50 μ M) und N^GMMA (100 μ M) stimuliert. Nach drei Tagen Inkubation wurde die IDO-Aktivität bei 492nm gemessen. Die dargestellten Werte entsprechen dem Durchschnitt von drei Messungen +/- SD und repräsentieren drei verschiedene Versuchsansätze.

NO ist an der Steuerung der IDO-Aktivität beteiligt (Daubener, Posdziech et al. 1999). Hier wurde gezeigt, dass NO eine inhibitorische Wirkung auf die IDO-Aktivität hat. Weiterhin ist bekannt, dass Steroide die Bildung von NO inhibieren, sodass die Kostimulation mit Glukokortikoiden in den vorhergehenden Versuchen vermeintlich die NO-Produktion in den Makrophagen hemmen und folglich indirekt die IDO-Aktivität verstärken. Diese Hypothese kann mittels eines parallel angesetzten Versuches mit einem NO-Hemmer N^G-monomethyl-L-Arginin (N^GMMA) verifiziert werden. Die Kostimulation mit N^GMMA müsste NO inhibieren und hierdurch einen ähnlichen Effekt auf die IDO-Aktivität haben wie die Steroide. Da dieses jedoch nicht der Fall ist (siehe Abb. 14) wirken demzufolge Steroide nicht über die NO-Inhibition.

Ergebnisse

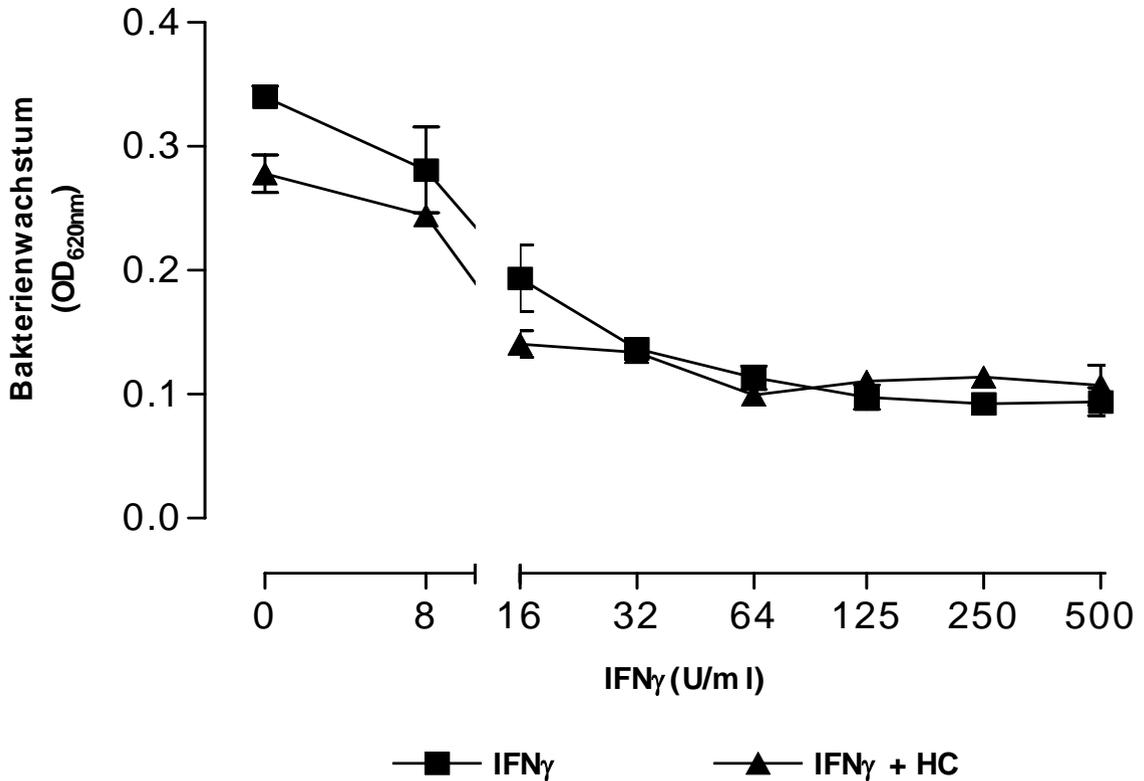


Abb. 15: Hydrocortisol beeinflusst nicht die Bakteriostase. Nabelschnurmakrophagen (3×10^4 /well) wurden mit IFN γ und zusätzlich mit Hydrocortisone (HC, 50 μ M) stimuliert und nach 72 Stunden Inkubation mit GAS (50 cfu/well) infiziert. 24h später wurde das Bakterienwachstum gemessen. Die Ergebnisse entsprechen hierbei dem Durchschnittswert von drei Messungen \pm SD und repräsentieren vier Experimente.

Überraschenderweise wurde die Bakteriostase nicht durch HC verstärkt.

Die Abbildung 15 illustriert, dass die Kostimulation mit HC nicht dieIDO-induzierte Bakteriostase beeinflusst. Der Effekt der verstärktenIDO-Aktivität durch HC in Abbildung 14 konnte somit nicht auf eine verstärkte Hemmung des Bakterienwachstums durch dieIDO übertragen werden.

6 Sub-inhibitorischen Ampicillin-Konzentrationen verstärken die IDO-induzierte Bakteriostase der GAS

Die bakteriostatische bzw. bakterizide Wirkung von Antibiotika ist von der Konzentration des Antibiotikums am Ort der Infektion abhängig. Die Konzentration des Antibiotikums ist wiederum abhängig von der applizierten Dosis, der Permeabilität des Antibiotikums durch die Zellmembran, die Metabolisierung in der Leber und der Exkretion oder Sekretion durch die Niere. Die Konzentration des Antibiotikums am Ort der Infektion ist folglich abhängig von komplexen pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Prozessen im Körper.

In den meisten Fällen ist die Konzentration des Antibiotikums für einen gewissen Zeitraum unterhalb der bakteriostatischen oder bakteriziden Konzentration. Die Effekte innerhalb dieses Zeitfensters wurden oftmals in der Literatur als postantibiotischer Effekt (PAE) beschrieben. Die folgenden Ergebnisse demonstrieren die Relevanz der IDO-vermittelten Bakteriostase in der postantibiotischen Phase.

Nachdem die MHK für Ampicillin nach der oben beschriebenen Methode für GAS bestimmt wurde, wurde zusätzlich zu den nur mit $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte PBMDM, das Medium $\text{IFN}\gamma$ -stimulierte PBMDM mit einer Konzentration von Ampicillin, die die Hälfte bzw. Viertel des MHK-Wertes entspricht, versetzt. Die Anreicherung des Medium mit sub-inhibitorische Ampicillin-Konzentration verstärkt die IDO-vermittelte Bakteriostase. Die Verstärkung ist hierbei abhängig von der Konzentration des Ampicillins. Die Darstellung in Abbildung 16 zeigt, dass bei der Hälfte der Konzentration des MHK-Wertes von Ampicillin die IDO-vermittelte Bakteriostase signifikant stärker ausgeprägt ist als bei einem Viertel des MHK-Wertes.

Ergebnisse

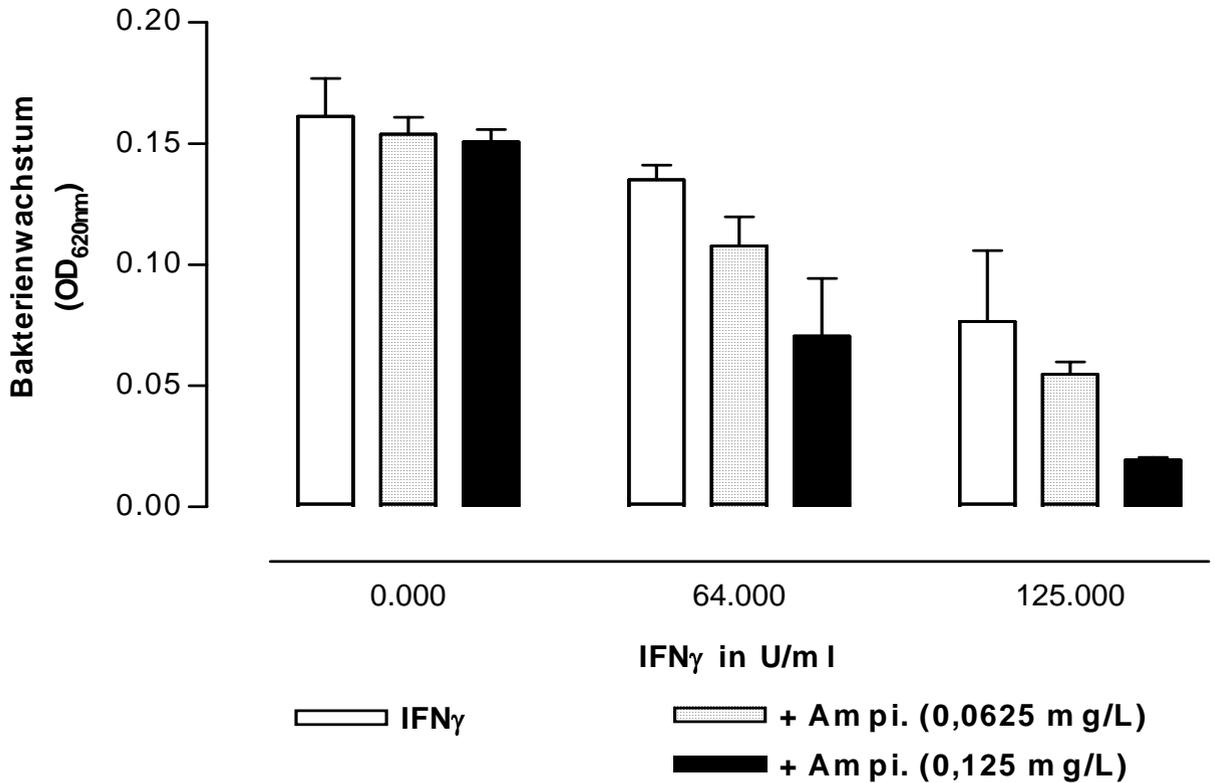


Abb. 16: Synergismus zwischen sub-inhibitorischer Konzentration von Ampicillin und IDO-induzierte Bakteriostase. PBMDM (1×10^5 /well) wurden mit IFN γ stimuliert und in ampicillin-haltigem Medium (0.0625 und 0.125 mg/l) 72 Stunden inkubiert. Die Ampicillin-Konzentration entsprachen jeweils $\frac{1}{4}$ und $\frac{1}{2}$ des MHK-Wertes. Anschließend wurden die Makrophagen mit GAS infiziert, um nach weiteren 24-48 Stunden das Bakterienwachstum bei 620nm zu messen. Die Werte entsprechen einem Durchschnitt von drei Messungen +/- SD und repräsentieren drei verschiedene Ansätze.

Ferner veranschaulicht die Darstellung, dass eine höhere Konzentration von IFN γ den Effekt der sub-inhibitorischen Ampicillin-Konzentration deutlich unterstreicht: je höher die IFN γ -Konzentration, desto höher ist der Effekt von Ampicillin in sub-inhibitorischer Konzentration.

IV. Diskussion

Die Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion ist durch eine komplexe Interaktion zwischen den Zellen des Immunsystems und des Erregers charakterisiert. Eine wesentliche Rolle spielt hierbei die erregerspezifische Induktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und die Konstellation dieser. Diese zytokingesteuert, interzelluläre Kommunikation in der Initialphase der Infektion ist grundlegend bei der Entwicklung der Immunität und Resistenz gegenüber intrazelluläre und extrazelluläre Erreger (Wilson, Seymour et al. 1998). Folglich resultiert eine Immunreaktion in der erfolgreichen Bekämpfung des Erregers oder einer ineffizienten Antwort mit der Gefahr der Ausbreitung der Infektion sowie der Entwicklung einer Sepsis. Nach Eindringen des Erregers in den Organismus findet meist der erste Kontakt der Krankheitserreger mit Makrophagen oder dendritischen Zellen statt. Diese Zellen gehören dem angeborenen Immunsystem an, welches auch als unspezifisch bezeichnet wird, da die Antwort keine Adaption an den Erreger benötigt. Die wichtigsten Pfeiler dieses Systems bildet die zelluläre Abwehr, in der die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen ausschlaggebend ist, und die humorale Abwehr, in der die Produktion von Zytokine und die Lyse der Erreger durch das Komplementsystem bedeutend sind.

Diese Initialphase einer Infektion hat einerseits die Bedeutung in der Ausbildung einer spezifischen Immunität und andererseits ist sie sehr bedeutsam in der sofortigen Bekämpfung Vorort und Verhinderung der Streuung des Krankheitserregers. Letzteres, die antimikrobielle Wirkung des angeborenen Immunsystems, insbesondere dieIDO-vermittelt Bakteriostase, bildet den Schwerpunkt dieser Arbeit. Als Bestandteil der unspezifischen zellulären Abwehr, haben Makrophagen vielfältige Mechanismen zur Bekämpfung von Mikroorganismen. Hierzu gehören die Zerstörung von intrazellulären Parasiten durch NO, toxische Wirkung durch reaktiven Sauerstoff und verschiedener Proteasen, die den Abbau von essentiellen Nährstoffen (z.B. Eisen oder L-Tryptophan) bedingen (Pfefferkorn 1984), (Weinberg 1984). Der Abbau der Aminosäure L-Tryptophan wird durch die IDO katalysiert. Das Enzym wird durch IFN γ induziert, wobei die Expression des Enzyms durch eine Reihe von Zytokine beeinflusst wird.

1 IDO-Induktion und die IDO-vermittelte Bakteriostase

Sowohl die Stimulation von CBMDM als auch von PBMDM mit $\text{IFN}\gamma$ induziert die IDO und führte zum Abbau von L-Tryptophan. Der Zusammenhang zwischen $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation und IDO-Induktion zeigt eine Konzentrationsabhängigkeit der IDO von $\text{IFN}\gamma$, die einer Sättigungskurve entspricht. $\text{IFN}\gamma$ ist das wesentliche Zytokin, welches die stärkste Wirkung auf die IDO-Induktion hat. Eine Kostimulation $\text{IFN}\gamma$ -stimulierter Makrophagen (CBMDM) mit $\text{TNF-}\alpha$ (Daten hier nicht gezeigt) oder $\text{IL-1}\beta$ verstärken signifikant die IDO-Aktivität. Eine alleinige Stimulation mit diesen pro-inflammatorischen Zytokinen, $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$, hat keinen stimulierenden Effekt auf die IDO. Einige Untersuchungen von $\text{IFN-}\alpha$ - und $\text{IFN-}\beta$ -Stimulationen in CBMDM bezüglich der IDO-Induktion ergaben, dass diese Zytokine alleine keine Induktion der IDO verursachten (MacKenzie, Gonzalez et al. 1999). Wurden CBMDM jedoch zusätzlich zu der Stimulation mit $\text{IFN}\alpha$ oder β mit $\text{TNF-}\alpha$ oder mit Lipopolysaccharide (LPS), das Endotoxin auf der Membranoberfläche gramnegativer Bakterien, kostimuliert, so wurde in beiden Fällen eine geringe IDO-Aktivität detektiert. Die Kostimulation mit LPS zeigte überdies eine stärkere IDO-Aktivität als bei der Verwendung von $\text{TNF-}\alpha$. Es wird angenommen, dass die deutlich stärkere IDO-Aktivität unter LPS-Kostimulation, einerseits auf eine LPS-vermittelten Stimulation der $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion der Zellen zurückgeht. Andererseits werden zusätzlich andere Ursachen in diesem Zusammenhang diskutiert. Die Annahme, dass LPS die $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion der Zellen stimuliert, wurde mittels Verabreichung von $\text{TNF-}\alpha$ -Antikörper verifiziert, da in diesem Fall die LPS-induzierte IDO-Aktivität geringer ausfiel als ohne $\text{TNF-}\alpha$ -Antikörper. Dieser Mechanismus ist in vivo sehr relevant, da die Stimulation der $\text{TNF-}\alpha$ -Produktion durch Bakterien die Produktion andere pro-inflammatorische Zytokine, z.B. $\text{IFN}\gamma$ durch Lymphozyten oder NK-Zellen, verursacht und im Fall von $\text{IFN}\gamma$ die IDO induziert wird. Dies führt zu einem L-Tryptophanmangel im Entzündungsgebiet und zu einer Hemmung des Bakterienwachstums. Diese Arbeit beweist die IDO-vermittelte und somit L-Tryptophanmangel bedingte Bakteriostase der GAS in CBMDM- und PBMDM-Kulturen. Weitere Arbeiten liefern zusätzliche Ergebnisse, welches den antiparasitären und antibakteriellen Effekt der IDO in verschiedenen Zellen unterstreicht (Daubener, Remscheid et al. 1996; MacKenzie, Hadding et al. 1998; Daubener and MacKenzie 1999; MacKenzie, Huckle et al. 1999).

Dieser Mechanismus nimmt somit eine wichtige Rolle in der angeborenen zellulären Immunität ein. Hierdurch und durch weitere Effektormechanismen gelingt es dem Immunsystem in der Initialphase einer Entzündung den eingedrungenen Erreger in Schach zu halten. Die Feinabstim-

mung der initialen Effektormechanismen wird durch eine zytokinbasierte Interaktion der Immunzellen bewerkstelligt.

2 Zytokine und ihre Interaktionen mit IDO

Die Resultate zur Untersuchung des Einflusses der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β zeigen eindeutig die inhibitorischen Wirkung auf die IDO-Aktivität und die konsekutive Aufhebung der IDO-vermittelten Bakteriostase der GAS. Die zytokin-gesteuerte Modulation der bakteriostatischen und bakteriziden Mechanismen des Immunsystems ist sehr komplex und wird nicht nur von dem Zusammenspiel der verschiedenen Zellen des Immunsystems bestimmt, sondern auch von dem Virulenzfaktoren des Erregers. Wilson et al beschreiben dieses Zusammenspiel zwischen Erreger und Immunsystem und heben hierbei die Induktion pro- und anti-inflammatorische Zytokine durch den Erreger als auch die Reaktion der Immunzellen hierauf besonders hervor (Wilson, Seymour et al. 1998). Das in dieser Interaktion entstandene Muster pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Entzündungsgebiet bestimmt die Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Erreger. Überwiegt die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine, droht eine zytokin-bedingte Zerstörung des Gewebes. Sollten jedoch anti-inflammatorische Zytokine im Entzündungsgebiet überwiegen, ist die Gefahr einer Sepsis vorhanden. Das Gleichgewicht dieser entgegengesetzten Wirkungen charakterisiert ein effizient funktionierendes Immunsystem (Ertel, Kremer et al. 1995). In der Gruppe der anti-inflammatorischen Zytokine reihen sich die in dieser Arbeit verwendeten Zytokine, IL-4, IL-10 und TGF- β ein. Die Bildung dieser Zytokine inhibiert die Bildung pro-inflammatorischer Substanzen (IL-1, TNF- α , IL-8) durch die Zellen des Immunsystems (z.B. Makrophagen) (Cassatella, Meda et al. 1993). Vor diesem Hintergrund kann die IL-4-, IL-10- und TGF- β -bedingte Hemmung der IDO-Aktivität als ein Gleichgewicht des Immunsystems gesehen werden. Hierbei handelt es sich um das Zusammenspiel der IDO-induzierten Bakteriostase, die durch Tryptophanmangel verursacht wird, und einer lokalen H \ddot{o} meostase, die als Voraussetzung zur Proliferation von wirtseigenen Immunzellen dient. So wurde jüngst die IDO-vermittelte Wirkung auf die Proliferation von T-Lymphozyten, in vivo und in vitro, eingehend von einigen Arbeitsgruppen beschrieben (Hwu, Du et al. 2000), (Munn, Shafizadeh et al. 1999). Der Focus dieser Studien beleuchtet den Einfluss von Makrophagen auf T-Lymphozyten. Durch einen IDO-vermittelten L-Tryptophanmangel sind IFN γ -stimulierte Makrophagen in der Lage das Wachstum der T-Lymphozyten innerhalb eines Entzündungsgebietes zu hemmen. In diesem Zusammenhang ist es denkbar, dass die Produktion anti-inflammatorische Zytokine durch T-Lymphozyten und anderen umgebenden Immunzellen als Steuerungselement vor zu starkem L-Tryptophanmangel und daraus resultierendem Mangel an Immunzellen im Entzündungsgebiet

Diskussion

dient. In unseren vorliegenden Beispielen führt die Inhibition der IDO-Aktivität in PBMDM durch die entsprechenden Zytokine zum verminderten Abbau des vorhandenen L-Tryptophan und folglich zum verstärkten Bakterienwachstum. Die Inhibition der IDO-Aktivität durch IL 4, IL 10 und TGF- β wurde in CBMDM ebenfalls nachgewiesen (MacKenzie, Gonzalez et al. 1999). Ein wesentlicher Schwerpunkt in der Arbeit von MacKenzie et al bestand in der Entwicklung eines Modells, der den Mechanismus der zytokin-bedingten Hemmung der IDO-Aktivität erklärt. Vor dem Hintergrund, dass TNF- α die IDO-Aktivität verstärkt, wurde in dieser Arbeit insbesondere die Hemmung der TNF- α -Produktion durch diese Zytokine in CBMDM und eine dadurch verursachte Hemmung der IDO-Aktivität als ein möglicher Mechanismus eingehend eruiert. Hierbei wurde festgestellt, dass der inhibitorische Einfluss der Zytokine auf die IDO-Aktivität nicht lediglich auf eine Inhibition der TNF- α -Produktion zurückzuführen ist, sondern auch andere Mechanismen in Frage kommen. Im Fall der Inhibition durch IL-10 wird ein negativer Einfluss von IL-10 auf den nuklearen Faktor κ B, einem Transkriptionsfaktor, der die Zytokinproduktion (IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF- α) steuert, beschrieben (Wang, Wu et al. 1995). Zusätzlich ist die Hemmung des Transports eines wichtigen Transkriptionsfaktor (Stat 6) als Ursache dokumentiert (Dickensheets and Donnelly 1997). Transkriptionsfaktoren sind somit empfindliche zentrale Steuerungselemente, die auch im Zusammenhang der IDO-Expression, IL-10-vermittelt, negativ beeinflusst werden können und demzufolge eine Verminderung der IDO-Aktivität bedingen könnten. Bei der IL-4-vermittelten Hemmung der entzündungsfördernden Zytokinproduktion wird der verstärkte Abbau von messenger-RNA (mRNA) des Zytokins diskutiert (Wang, Wu et al. 1995), sodass dieser Mechanismus auch für die Hemmung der IDO-Aktivität durch einen Abbau der IDO-mRNA, IL-4-vermittelt, in Betracht kommt. Das Zytokin TGF- β übt seine inhibitorische Wirkung auf Zellen unter anderem über eine Hemmung der Zytokinproduktion (z.B. TNF- α) auf der Translationsebene aus (Bogdan and Nathan 1993). In der Studie mit CBMDM wird die Inhibition der IDO-Aktivität durch TGF- β sowohl auf die Hemmung IDO-Expressions-fördernder Zytokinproduktion, wie TNF- α , als auch die Hemmung bestimmter IDO-Translationsprodukte zurückgeführt. Vor dem Hintergrund, dass die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- β vergleichbare Ergebnisse in den Versuchen mit PBMDM lieferten und die Zellgruppen (CBMDM und PBMDM) bis dato keine wesentlichen funktionellen Unterschiede zeigen, sind die obig erwähnten Erklärungsansätze ebenso für PBMDM nachvollziehbar. Allerdings sollten noch in weiteren molekularbiologischen Versuchen, die nicht das Ziel dieser Arbeit darstellen, die Mechanismen der zytokin vermittelten IDO-Effekte näher beleuchtet werden. Die komplexe Steuerung der IDO-Expression durch entzündungshemmende Zytokine und weitere Zytokine ist ein zusätzlicher Beweis für das effiziente Netzwerk der Zytokine und die daraus resultierende Interaktion der Zellen. Betrachtet man jedoch hierzu die Fähigkeit der bakteriellen Erreger eine Induktion bestimmter

anti-inflammatorischer Zytokine zu verursachen, ist ein hierdurch bedingter Überlebensvorteil des Bakteriums im Immunsystem denkbar.

3 Indomethacin undIDO-induzierte Bakteriostase.

Die klinische Bedeutung der NSAR, insbesondere Indomethacin, zeigt sich in der Applikation dieser bei verschiedenen Krankheitsbilder, die von autoimmunologisch bedingten bis hin zu neurologisch-traumatisch bedingten Krankheiten reichen (Slavik and Rhoney 1999; Forderreuther and Straube 2000). Die Wirkung dieser Substanzen wird durch die Hemmung der COX vermittelt. Die Bildung und Reaktion dieses Enzyms ist entscheidend für die Bildung der Prostaglandine. In der Literatur werden zwei Isoformen, COX 1 und 2, beschrieben.

COX 1 wird im Allgemeinen als konstitutiv produziertes Enzym bezeichnet, wohingegen COX 2 durch bestimmte Zytokine, Mitogene und Phorbolster induziert wird (Hla and Neilson 1992; O'Banion, Winn et al. 1992; Ristimaki, Garfinkel et al. 1994). Ein weiteres Kennzeichen der COX 2 ist, dass dieses Enzym vorwiegend von Zellen produziert wird, die sich im Entzündungsgebiet befinden, wie zum Beispiel Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen (O'Banion, Winn et al. 1992; Habib, Creminon et al. 1993; Roy, Polgar et al. 1996). Die Isoform COX 1 gehört zu den konstitutiven Enzymen und wird daher unabhängig von der Umgebung und Stoffwechsellzustand mit gleich bleibender Rate synthetisiert, welches eine Homöostase der Prostaglandinbiosynthese gewährleistet (Griswold and Adams 1996; Smith and Dewitt 1996). Indomethacin hemmt vorzugsweise, jedoch nicht selektiv, COX 1 (Masferrer, Zweifel et al. 1990; Meade, Smith et al. 1993). Weiterhin wird beschrieben, dass Indomethacin unter anderem konzentrationsabhängig COX 2 partiell inhibiert (Griswold and Adams 1996; Iniguez, Punzon et al. 1999) und folglich die Prostaglandinsynthese zweifach beeinflusst. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Indomethacin die IDO-Aktivität IFN γ -stimulierten Makrophagen deutlich inhibiert. Weiterhin wurde gezeigt, dass dieses Ergebnis ebenso mit der Aufhebung der IDO-induzierten Bakteriostase der GAS durch Indomethacin korreliert. Demnach lag es nahe, dass dieser Effekt durch die Inhibition der Prostaglandinsynthese bedingt ist. Die Substitution von PGE₂ in diesem Versuchsmodell führte jedoch zu einer verstärkten Inhibition der IDO-Effekte und bestätigte somit nicht die Hypothese, dass die Substitution von PGE₂ die indomethacin-bedingte Hemmung der IDO-Aktivität aufheben würde, vorausgesetzt PGE₂ hat einen direkten Einfluss auf IDO. Ein direkter Einfluss von PGE₂ auf die IDO-Aktivität ist bis dato jedoch noch nicht beschrieben. Die Wirkung von PGE₂ per se auf die Makrophagen könnte jedoch bei der Erklärung der Indomethacinwirkung sehr hilfreich sein. PGE₂ macht mengenmäßig den größten Anteil der Prostaglandine aus, die durch stimulierte Makrophagen in Entzündungsregionen gebildet werden (DeWitt 1991; Vane, Mitchell et al.

1994). Hierbei wirkt PGE₂ gegenüber Lymphozyten inhibitorisch auf die Bildung der Th1-spezifische Zytokine (IFN γ und IL 2) und fördert hierdurch das Überwiegen der Th2-spezifischen Zytokine (IL 4 und IL 5) (Snijdwint, Kalinski et al. 1993; Romagnani 1997). Zusätzlich bewirkt PGE₂ autokrin die Hemmung der Produktion von TNF- α als auch die Expression der MHC-II-Moleküle durch die Makrophagen. Die autokrine Wirkung von PGE₂ auf IFN γ -stimulierten Makrophagen, insbesondere die Hemmung der TNF- α -Produktion, liefert uns keine mögliche Erklärung für die indomethacin-bedingte jedoch für die PGE₂-bedingte Hemmung derIDO-Aktivität. Die Experimente zeigen deutlich, dass ein zusätzliches Beimengen von PGE₂ zu IFN γ -stimulierten Makrophagen eine konzentrationsabhängige Inhibition derIDO-Aktivität verursacht. Däubener et al wiesen in einer Studie nach, dass die IFN γ -induzierteIDO-Aktivität und somit auch die antiparasitäre Wirkung dieses Enzyms durch einen Kostimulation mit TNF- α signifikant verstärkt wurde (Daubener, Remscheid et al. 1996). Weiterhin wird in der Literatur eine basale TNF- α -Produktion IFN γ -stimulierten Makrophagen mittels Einsatz von Antikörper gegen TNF- α beschrieben (MacKenzie, Gonzalez et al. 1999). Demzufolge führt die Hemmung der basalen TNF- α -Produktion IFN γ -stimulierten Makrophagen durch die zusätzliche Kostimulation mit PGE₂ zu der nachweisbaren Hemmung derIDO-Aktivität. Ein experimentell direkt nachweisbarer Zusammenhang zwischen der PGE₂-bedingten Inhibition der TNF- α -Produktion und der vermindertenIDO-Aktivität durch eine Substitution von TNF- α sollte demzufolge noch in nachfolgende Versuchsreihen durchgeführt werden und ist nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Da die indomethacin-bedingte Hemmung derIDO-Aktivität nicht PGE₂-vermittelt ist, wird sich dieser Effekt voraussichtlich über andere immunmodulatorischen Mechanismen von Indomethacin abspielen. Jiang et al (Jiang, Ting et al. 1998) beschreiben in ihrer Arbeit einen zusätzlichen Effekt von NSAR neben der selektiven COX-Inhibition, die die entzündungshemmende Wirkung dieser weiterhin unterstreicht. NSAR, besonders Indomethacin, verstärken die Produktion des „Peroxisome proliferator-activated receptor- γ “ (PPAR- γ). PPAR- γ gehören zu der Familie der Nuklearrezeptoren der Transkriptionsfaktoren, welche die liganden-gesteuerte Aktivierung und Hemmung der Transkription steuern (Mangelsdorf, Thummel et al. 1995; Lemberger, Desvergne et al. 1996). Die Aktivierung dieser Rezeptoren, unter anderem durch NSAR, führt einerseits zur erhöhten Insulinsensitivität und verstärkten Differenzierung von Adipozyten und andererseits zur Inhibition der TNF- α -Produktion. Im Gegenzug inhibiert TNF- α die Aktivierung dieser Rezeptoren, verursacht eine erhöhte Insulinresistenz und blockiert die Differenzierung der Adipozyten (Jiang, Ting et al. 1998). Vor dem Hintergrund, dass TNF- α die IFN γ -vermittelteIDO-Aktivität verstärkt, erscheint es plausibel, dass die Hemmung derIDO-Aktivität durch Indomethacin auf eine indomethacin-vermittelte über PPAR- γ ausgelöste Inhibition der TNF- α -Produktion IFN γ -stimulierten Makrophagen zurückzuführen ist. Auch in diesem Fall scheint demzufolge der Effekt

von Indomethacin über die Hemmung der basalen TNF- α -Produktion ausgelöst zu werden. Weiterhin ist der *in vivo* Effekt von Indomethacin auf Lymphozyten und die damit zusammenhängend Aktivierung der Makrophagen im Initialstadium einer Entzündung entscheidend. Die vorwiegend über COX 2-Inhibition vermittelte Wirkung der NSAR bedingt eine Hemmung der Differenzierung der T-Lymphozyten und die Produktion von IL-2, TNF- α und IFN- γ durch diese (Iniguez, Punzon et al. 1999). Dieses hätte die Konsequenz einer verminderten Aktivierung der Makrophagen durch IFN γ und konsekutiv einen hierdurch verminderten bakteriostatischen und bakteriziden Effekt der Makrophagen im Entzündungsgebiet. Eine derartige immunmodulatorische Wirkung der NSAR kann einerseits positiv in weiteren autoimmunologische-bedingten Erkrankungen eingesetzt werden, andererseits birgt es die Gefahr einer Superinfektion mit Bakterien und Ausbreitung bakterieller Infektion durch die negative Beeinflussung des angeborenen Immunsystems.

4 Glukokortikoide und der Effekt auf CBMDM

Ein sehr überraschendes und rätselhaftes Resultat stellt die Verstärkung der IFN- γ -induzierten IDO-Aktivität durch Hydrocortison in CBMDM dar, jedoch fehlende Verstärkung der IDO-induzierten Bakteriostase, zumal dieses Phänomen lediglich in CBMDM und nicht in PBMDM beobachtet wurde. Ursächlich hierfür mag ein unterschiedlicher Differenzierungsgrad der Zellen diskutiert werden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte der weitere Abbauweg von L-Kynurenin nach der Katalyse von L-Tryptophan durch IDO aufzeigen. Ein verzögerter Abbau von L-Kynurenin unter Steroideinfluss würde eine vermehrte L-Kynureninegehalt im Medium zur Zeit der photometrischen Messung nach sich ziehen. Somit würde man fälschlicherweise die Hemmung des weiteren Abbauprozesses von Kynurenin als einen verstärkt IDO-Aktivität messen. Diese Überlegung wird weiterhin durch das Fehlen der verstärkten konsekutiven Hemmung der IDO-vermittelten Bakteriostase unterstützt. Obwohl Hydrocortison die IDO-Aktivität in CBMDM verstärkte, folgte daraus nicht eine gesteigerte Bakteriostase der GAS. Demzufolge war die Konzentration des L-Tryptophan proportional zu der gesteigert detektierten IDO-Aktivität nicht vermindert. Nachdem L-Tryptophan durch die IDO zu L-Kynurenin katalysiert wird, wird L-Kynurenin entweder durch L-Kynurenin-Hydrolase zu Anthralinat, durch 2-oxoglutarat-aminotransferase (Kynurenin-Aminotranferase) zu 4-(2-aminophenyl)-2,4-dioxobutenoat oder durch eine Oxidoreduktase zu 3-Hydroxy-L-Kynurenin verstoffwechselt. Wird nun einer dieser drei Enzyme gehemmt, führt dies zum verminderten Abbau von Kynurenin, welches demzufolge vermehrt nachweisbar ist. Im Fall der L-Kynurenin-Hydrolase ist eine Hemmung durch Östrogene in der Literatur beschrieben (Wolf, Walter et al. 1980; Bender and Wynick 1981; Bender, Tague et al. 1982). Diese Studien zeigen *in vivo* tierexperimentell und in humanen Organismus, dass

Diskussion

synthetisch hergestellte als auch selbst produzierte Östrogene die Katalyse von L-Kynurenin durch L-Kynurenin-Hydrolase inhibieren. Da Östrogene zu den Steroidhormonen gehören, behalten sie ebenso das Sterangerüst, welches das Charakteristikum der Steroide darstellt. Hydrocortison und Dexamethason erfüllen gleichermaßen das Charakteristikum der Steroide und könnten somit ebenfalls die Katalyse von L-Kynurenin hemmen und folglich die erhöhte IDO-Aktivität erklären. Eine Hemmung der Kynurenin-Aminotransferase durch Isonicotinsäurehydrazid (INH) bedingt gleichfalls eine verstärkte Anreicherung von L-Kynurenin (Shibata, Marugami et al. 1996). Weiterhin gehören β -Östradiol und Ethynylöstradiol zu den Kynurenin-Aminotransferase-hemmenden Substanzen (El-Zoghby, El-Sewedy et al. 1976). Somit ist es auch hierbei denkbar, dass durch die Hemmung dieses Enzyms durch Steroide weniger L-Kynurenin abgebaut wird und demnach bei der photometrischen Messung vermehrt L-Kynurenin detektiert wird. Betrachtet man zusätzlich die Ergebnisse der IDO-vermittelten Bakteriostase der GAS unter Steroideinwirkung, erkennt man keinen signifikanten Unterschied zwischen IFN γ -stimulierten CBMDM ohne oder mit Hydrocortisol. Einerseits könnte dies wie schon erwähnt eine Unterstützung der Hypothese mit der vermehrten Anreicherung von L-Kynurenin sein, andererseits sollte man sich dagegen die Wirkung von Steroiden auf das Bakterienwachstum ansehen. Diesbezüglich wird eine Hemmung des Bakterienwachstums durch Methylprednisolon in der Literatur beschrieben (Meduri, Kananagat et al. 2001). Methylprednisolon inhibiert einerseits die Produktion pro-inflammatorische Zytokine und andererseits das Überleben verschiedener Bakterien in Monozyten. Die Ergebnisse in Kapitel III.5 dieser Arbeit lassen dieses jedoch nicht erkennen. IFN γ -stimulierten CBMDM ohne und mit Hydrocortisol zeigen den gleichen Verlauf des Bakterienwachstums. Nach der Studie von Meduri et al wäre jedoch anzunehmen, dass die IFN γ -stimulierten CBMDM mit Hydrocortisol eine stärkere Hemmung des Bakterienwachstums ausüben müssten, welches sich in den Ergebnissen niederschlagen müsste. Zusammenfassend ist es demzufolge wahrscheinlicher, dass die gemessene Steigerung der IDO-Aktivität in CBMDM auf eine Hemmung des weiteren Abbauweges des L-Kynurenin und die zu dem Zeitpunkt der Messung damit einhergehende Detektion des aufgestauten L-Kynurenins einhergeht. Es ist anzunehmen, dass die Enzyme zur weiteren Katalyse des L-Kynurenin der PBMDM weniger ausgeprägt sind als die Enzyme der CBMDM. Diese Hypothese sollte jedoch noch explizit anhand weiterer Experimente verifiziert werden.

5 Sub-MHK-Werte von Antibiotika undIDO-induzierte Bakteriostase

Die pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Prozesse einer Antibiotikatherapie und die damit einhergehenden Effekte auf das Bakterienwachstum sind weitestgehend unklar und Gegenstand der Forschung. Insbesondere der postantibiotische Effekt bestimmter Antibiotika genießt sehr großes Interesse. Dieser Effekt ist definiert als die persistierende Suppression des bakteriellen Wachstums nach einer vorangehenden, zeitlich exakt definierten, antibiotischen Exposition oberhalb der minimalen Hemmwerte des jeweiligen Keimes (Craig and Vogelmann 1987). Der Effekt antibiotischer Konzentrationen unterhalb der minimalen Hemmwerte in Kombination mit stimulierten Zellen des angeborenen Immunsystems wurde kürzlich für *Candida albicans* beschrieben (Coste, Linas et al. 2002). Die durchgeführten Experimente mit subinhibitorischer Konzentration von Ampicillin kombiniert mit IFN γ -stimulierten Makrophagen und die daraus resultierende Verstärkung der IDO-induzierten Bakteriostase der GAS unterstützt diese Erkenntnisse. Der hierfür ursächliche Mechanismus ist größtenteils ungeklärt, dennoch lässt sich vermuten, dass die Wirkung von Ampicillin, nämlich die Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese, und der IDO-induzierte Mangel der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan, trotz der subinhibitorischen Konzentration von Ampicillin, einen synergistischen Effekt auf die Hemmung der Zellwandsynthese haben. Es ist denkbar, dass L-Tryptophan als Aminosäure Bestandteil der Peptide ist, welche die benachbarten Ketten aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure bei der Zellwandsynthese miteinander verbinden. Ferner besteht die Möglichkeit, dass dieser Synergismus nicht allein auf die eingeschränkte Zellwandsynthese des Bakteriums zurückzuführen ist, sondern unter Umständen die subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen indirekt Einfluss auf die Zytokinproduktion der Makrophagen hat. Unterstützt wird diese Hypothese durch zahlreiche Arbeiten, die tatsächlich eine antibiotikainduzierte Zytokinproduktion durch Makrophagen beschreiben. Hierunter finden sich Erklärungsansätze für diesen Mechanismus, die einerseits eine unmittelbare Interaktion der Antibiotika mit den Makrophagen beschreiben und andererseits eine durch antibiotikainduzierte veränderte Antigenität des Erregers und somit eine Modulation der Reaktion der Makrophagen. Allerdings führen erstere vielmehr zu einer antibiotikainduzierten Hemmung der Produktion bestimmter Entzündungsmediatoren durch Makrophagen (Yoshimura 2000) und folglich nicht zur Erklärung der Ergebnisse dieser Arbeit. Letztere Untersuchungen beschreiben die Wirkung bestimmter Antibiotika, die die Synthese der Zellwandsynthese hemmen, und hierüber die Freisetzung einiger Bestandteile der Zellwand bedingen, die wiederum die Produktion von NO $_2$ und TNF- α und weitere Mediatoren durch Makrophagen verstärken (Tracey, Fong et al. 1987; Casey, Cox et al. 1989; Eng, Smith et al. 1993; Mattsson, Van Dijk et al. 1996; Suffredini, Hochstein et al. 1999). Eine weitere Studie, die die Zytokinproduktion von Makrophagen bei In-

Diskussion

fektion mit Pneumokokken unter β -lactam-Antibiotikatherapie untersuchte, zeigte, dass die Produktion der NO und TNF- α signifikant erhöht war (Orman and English 2000). Demnach unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit mit Ampicillin diesen Mechanismus und stärken die Hypothese, dass ebenfalls subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen Zellwandbestandteile lösen und somit eine verstärkte Expression proinflammatorische Substanzen durch Makrophagen bedingen. Zur Verifizierung dieser Hypothese sollten weitere Experimente folgen, in der die Zytokinproduktion der Makrophagen unter diesen Bedingungen untersucht werden. Eine antibiotikavermittelte Verstärkung der Phagozytoseeigenschaft der Makrophagen steht in diesem Zusammenhang eher im Hintergrund, da β -laktam-Antibiotika vielmehr die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen hemmen (Yamaryo, Oishi et al. 2003).

V. Zusammenfassung

Makrophagen können mittels verschiedener Mechanismen das Wachstum intrazellulärer Parasiten und extrazellulärer bakterieller Erreger hemmen. Hierzu gehört unter anderem das Enzym Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), welches L-Tryptophan zu N-Formylkynurenin verstoffwechselt. Durch den hierdurch entstandenen Mangel der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan, wird die Wachstumshemmung der Parasiten und Bakterien verursacht. Eine anschließende Supplementation mit L-Tryptophan hebt die Hemmung auf und erzeugt ein erneutes Wachstum der Erreger. Die Induktion der IDO wird durch IFN- γ am stärksten stimuliert und unterliegt komplexen zytokingesteuerten Immunregulationen.

In dieser Arbeit wurde die IFN- γ -abhängige IDO-Induktion und die Bakteriostase der Gruppe A Streptokokken (GAS) in Makrophagen von Nabelschnurblut (CBMDM) und von gesunden erwachsenen Spendern (PBMDM) untersucht. Von großem Interesse war der Einfluss von verschiedenen Zytokinen und zwei häufig in der Klinik als Therapeutikum eingesetzten antiinflammatorischen Substanzen, Hydrocortison und Indomethacin auf die IDO-Aktivität und die IDO-induzierte Bakteriostase der GAS. Vor dem Hintergrund, dass es unter Antibiotikatherapie häufig Zeitintervalle zwischen den Medikamenteneinnahmen vorkommen, die durch eine subinhibitorische Konzentration am Entzündungsort gekennzeichnet sind, wurde ferner der Effekt dieser subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen auf die IDO-induzierte Bakteriostase anhand von Ampicillin untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation der CBMDM und PBMDM mit IFN- γ das Bakterienwachstum der GAS hemmt. Die Bakteriostase konnte mit einer Substitution von L-Tryptophan aufgehoben werden, und war somit ein hinreichender Beweis für eine IDO-induzierte Bakteriostase. Eine Kostimulation mit IL 4, IL 10, TGF- β und Indomethacin hemmt die IDO-Aktivität und konsekutiv die Bakteriostase in CBMDM und PBMDM. Ampicillin in subinhibitorischer Konzentration verstärkt die IDO-induzierte Bakteriostase der GAS. Überraschend ist die Verstärkung der IDO-Aktivität durch Hydrocortison in CBMDM, aber nicht in PBMDM. Die Verstärkung der IDO-Aktivität geht jedoch nicht mit einer verstärkten Bakteriostase einher.

Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Therapie mit Indomethacin klinisch relevante bakterielle Infektionen begünstigt, da sie die IDO-basierte bakterielle Bekämpfung der Makrophagen negativ beeinflusst. Im Gegensatz hierzu dürfte die subinhibitorische Konzentration von Ampicillin in Infektionsgebieten in denen zahlreiche IFN- γ -stimulierte Makrophagen vorherrschen, eine unterstützende Rolle spielen.

VI. Ausblick

Die in dieser Arbeit gesammelten Erkenntnisse über den IDO-gesteuerter antibakterielle Effektormechanismus der Makrophagen und dessen Beeinflussung durch Zytokine, NSAR, Steroide und Antibiotika schaffen weitere Ansätze zur näheren Beleuchtung dieser komplexen Interaktionen.

- Die direkte Rolle des TNF- α auf den IDO-Effekt des PGE₂ kann in weiteren Versuchsreihen durch Substitution von TNF- α eruiert werden. Führt die Substitution von TNF- α zur Aufhebung der PGE₂-vermittelten IDO-Hemmung? Zusätzlich kann die Hypothese der PPAR- γ -vermittelten Hemmung der IDO durch Indomethacin anhand direkter Beeinflussung der PPAR- γ -Faktoren durch Indomethacin experimentell geprüft werden.
- Die Wirkung der Steroide auf CBMDM könnte durch einen experimentellen Nachweis der Enzymhemmung des Kynureninstoffwechsels einen Unterschied zu PBMDM dokumentieren.
- Der Synergismus zwischen IDO und sub-MHK von Antibiotika sollte noch durch weitere Antibiotika bestätigt werden. Ferner sollte durch radioaktive Markierung von L-Tryptophan geprüft werden, ob die Bakterien L-Tryptophan in die Zellwand einbauen. Diese Tatsache könnte einen weiteren Anhaltspunkt zur Erklärung des synergistischen Effektes zwischen Antibiotika und IDO aufzeigen.

VII. Literaturverzeichnis

- Bender, D. A., C. E. Tagoe, et al. (1982). "Effects of oestrogen administration on vitamin B6 and tryptophan metabolism in the rat." Br J Nutr **47**(3): 609-14.
- Bender, D. A. and D. Wynick (1981). "Inhibition of kynureninase (L-kynurenine hydrolase, EC 3 . 7. 1 . 3) by oestrone sulphate: an alternative explanation for abnormal results of tryptophan load tests in women receiving oestrogenic steroids." Br J Nutr **45**(2): 269-75.
- Boehm, U., T. Klamp, et al. (1997). "Cellular responses to interferon-gamma." Annu Rev Immunol **15**: 749-95.
- Bogdan, C. and C. Nathan (1993). "Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10." Ann N Y Acad Sci **685**: 713-39.
- Buckley, P. J., M. R. Smith, et al. (1987). "Human spleen contains phenotypic subsets of macrophages and dendritic cells that occupy discrete microanatomic locations." Am J Pathol **128**(3): 505-20.
- Byrne, G. I., L. K. Lehmann, et al. (1986). "Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells." Infect Immun **53**(2): 347-51.
- Cannistra, S. A., A. Rambaldi, et al. (1987). "Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces expression of the tumor necrosis factor gene by the U937 cell line and by normal human monocytes." J Clin Invest **79**(6): 1720-8.
- Carlin, J. M. and J. B. Weller (1995). "Potentiation of interferon-mediated inhibition of Chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures." Infect Immun **63**(5): 1870-5.
- Casey, M. L., S. M. Cox, et al. (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor." J Clin Invest **83**(2): 430-6.
- Cassatella, M. A., L. Meda, et al. (1993). "Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide." J Exp Med **178**(6): 2207-11.
- Coste, A., M. D. Linas, et al. (2002). "A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages." J Antimicrob Chemother **49**(5): 731-40.
- Craig, W. A. and B. Vogelstein (1987). "The postantibiotic effect." Ann Intern Med **106**(6): 900-2.
- Crocker, P. R., L. Morris, et al. (1988). "Novel cell surface adhesion receptors involved in interactions between stromal macrophages and haematopoietic cells." J Cell Sci Suppl **9**: 185-206.
- Daubener, W. and C. R. MacKenzie (1999). "IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism." Adv Exp Med Biol **467**: 517-24.
- Daubener, W., V. Posdziech, et al. (1999). "Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production." Med Microbiol Immunol (Berl) **187**(3): 143-7.
- Daubener, W., C. Remscheid, et al. (1996). "Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha." Eur J Immunol **26**(2): 487-92.
- Daubener, W., N. Wanagat, et al. (1994). "A new, simple, bioassay for human IFN-gamma." J Immunol Methods **168**(1): 39-47.
- DeWitt, D. L. (1991). "Prostaglandin endoperoxide synthase: regulation of enzyme expression." Biochim Biophys Acta **1083**(2): 121-34.
- Dickensheets, H. L. and R. P. Donnelly (1997). "IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes." J Immunol **159**(12): 6226-33.
- Dustin, M. L., R. Rothlein, et al. (1986). "Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)." J Immunol **137**(1): 245-54.
- El-Zoghby, S. M., S. M. El-Sewedy, et al. (1976). "In vitro trials to counteract the inhibitory effect of beta-oestradiol and ethinyloestradiol on the B6-dependent kynurenine aminotransferase enzyme." Biochem Pharmacol **25**(21): 2411-3.
- Eng, R. H., S. M. Smith, et al. (1993). "Effect of antibiotics on endotoxin release from gram-negative bacteria." Diagn Microbiol Infect Dis **16**(3): 185-9.
- Ertel, W., J. P. Kremer, et al. (1995). "Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients." Blood **85**(5): 1341-7.
- Flower, R. J. and N. J. Rothwell (1994). "Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance." Trends Pharmacol Sci **15**(3): 71-6.
- Forderreuther, S. and A. Straube (2000). "Indomethacin reduces CSF pressure in intracranial hypertension." Neurology **55**(7): 1043-5.
- Griswold, D. E. and J. L. Adams (1996). "Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date." Med Res Rev **16**(2): 181-206.
- Habib, A., C. Creminon, et al. (1993). "Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2." J Biol Chem **268**(31): 23448-54.

Literaturverzeichnis

- Hassanain, H. H., S. Y. Chon, et al. (1993). "Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor." *J Biol Chem* **268**(7): 5077-84.
- Hla, T. and K. Neilson (1992). "Human cyclooxygenase-2 cDNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7384-8.
- Hwu, P., M. X. Du, et al. (2000). "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation." *J Immunol* **164**(7): 3596-9.
- Iniguez, M. A., C. Punzon, et al. (1999). "Induction of cyclooxygenase-2 on activated T lymphocytes: regulation of T cell activation by cyclooxygenase-2 inhibitors." *J Immunol* **163**(1): 111-9.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* **391**(6662): 82-6.
- Jones, A. L. and J. L. Millar (1989). "Growth factors in haemopoiesis." *Baillieres Clin Haematol* **2**(1): 83-111.
- Karnovsky, M. L. (1981). "Metchnikoff in Messina: a century of studies on phagocytosis." *N Engl J Med* **304**(19): 1178-80.
- Kurland, J. I., R. S. Bockman, et al. (1978). "Limitation of excessive myelopoiesis by the intrinsic modulation of macrophage-derived prostaglandin E." *Science* **199**(4328): 552-5.
- Lemberger, T., B. Desvergne, et al. (1996). "Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 335-63.
- Lewis, C. E., McGee, J.O'D., Auger, M.J., Ross, J.A. (1992). *The Natural Immunesystem: The Macrophage*. New York, Oxford University Press.
- MacKenzie, C. R., R. G. Gonzalez, et al. (1999). "Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation." *Adv Exp Med Biol* **467**: 533-9.
- MacKenzie, C. R., U. Hadding, et al. (1998). "Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci." *J Infect Dis* **178**(3): 875-8.
- MacKenzie, C. R., C. Hucke, et al. (1999). "Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells." *J Med Microbiol* **48**(10): 935-41.
- Madigan, M. T. (2003). *Biology of Microorganism*, Brock.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, et al. (1995). "The nuclear receptor superfamily: the second decade." *Cell* **83**(6): 835-9.
- Masferrer, J. L., B. S. Zweifel, et al. (1990). "Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice." *J Clin Invest* **86**(4): 1375-9.
- Mattsson, E., H. Van Dijk, et al. (1996). "Supernatants from Staphylococcus epidermidis grown in the presence of different antibiotics induce differential release of tumor necrosis factor alpha from human monocytes." *Infect Immun* **64**(10): 4351-5.
- Meade, E. A., W. L. Smith, et al. (1993). "Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs." *J Biol Chem* **268**(9): 6610-4.
- Meduri, G. U., S. Kanangat, et al. (2001). "Effects of methylprednisolone on intracellular bacterial growth." *Clin Diagn Lab Immunol* **8**(6): 1156-63.
- Metcalf, D. (1971). "Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro." *Journal of Cellular Physiology* **77**(2): 277-80.
- Munn, D. H., E. Shafizadeh, et al. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Murray, H. W., A. Szuro-Sudol, et al. (1989). "Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages." *Infect Immun* **57**(3): 845-9.
- O'Banion, M. K., V. D. Winn, et al. (1992). "cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 4888-92.
- Orman, K. L. and B. K. English (2000). "Effects of antibiotic class on the macrophage inflammatory response to Streptococcus pneumoniae." *J Infect Dis* **182**(5): 1561-5.
- Pelus, L. M., H. E. Broxmeyer, et al. (1979). "Regulation of macrophage and granulocyte proliferation. Specificities of prostaglandin E and lactoferrin." *J Exp Med* **150**(2): 277-92.
- Pfefferkorn, E. R. (1984). "Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(3): 908-12.
- Pitzalis, C., N. Pipitone, et al. (2002). "Regulation of leukocyte-endothelial interactions by glucocorticoids." *Ann N Y Acad Sci* **966**: 108-18.
- Ristimaki, A., S. Garfinkel, et al. (1994). "Induction of cyclooxygenase-2 by interleukin-1 alpha. Evidence for post-transcriptional regulation." *J Biol Chem* **269**(16): 11769-75.
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. (2001). *Immunology*. London, Mosby.
- Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." *Immunol Today* **18**(6): 263-6.
- Rothlein, R., M. L. Dustin, et al. (1986). "A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1." *J Immunol* **137**(4): 1270-4.
- Roy, R., P. Polgar, et al. (1996). "Regulation of lysyl oxidase and cyclooxygenase expression in human lung fibroblasts: interactions among TGF-beta, IL-1 beta, and prostaglandin E." *J Cell Biochem* **62**(3): 411-7.

Literaturverzeichnis

- Shibata, K., M. Marugami, et al. (1996). "In vivo inhibition of kynurenine aminotransferase activity by isonicotinic acid hydrazide in rats." Biosci Biotechnol Biochem **60**(5): 874-6.
- Slavik, R. S. and D. H. Rhoney (1999). "Indomethacin: a review of its cerebral blood flow effects and potential use for controlling intracranial pressure in traumatic brain injury patients." Neurol Res **21**(5): 491-9.
- Smith, W. L. and D. L. Dewitt (1996). "Prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2." Adv Immunol **62**: 167-215.
- Snijdewint, F. G., P. Kalinski, et al. (1993). "Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes." J Immunol **150**(12): 5321-9.
- Suffredini, A. F., H. D. Hochstein, et al. (1999). "Dose-related inflammatory effects of intravenous endotoxin in humans: evaluation of a new clinical lot of Escherichia coli O:113 endotoxin." J Infect Dis **179**(5): 1278-82.
- Takikawa, O., T. Kuroiwa, et al. (1988). "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**(4): 2041-8.
- Taylor, M. W. and G. S. Feng (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." Faseb J **5**(11): 2516-22.
- Tracey, K. J., Y. Fong, et al. (1987). "Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia." Nature **330**(6149): 662-4.
- Unanue, E. R. (2003). "Intracellular pathogens and antigen presentation-new challenges with Legionella pneumophila." Immunity **18**(6): 722-4.
- van Furth, R. and Z. A. Cohn (1968). "The origin and kinetics of mononuclear phagocytes." Journal of Experimental Medicine. **128**(3): 415-35.
- van Furth, R., Z. A. Cohn, et al. (1972). "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells." Bulletin of the World Health Organization. **46**(6): 845-52.
- Vane, J. R., J. A. Mitchell, et al. (1994). "Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2046-50.
- Wang, P., P. Wu, et al. (1995). "Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms." J Biol Chem **270**(16): 9558-63.
- Weinberg, E. D. (1984). "Iron withholding: a defense against infection and neoplasia." Physiol Rev **64**(1): 65-102.
- Wieland, H., F. Goetz, et al. (2004). "Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of Legionella pneumophila in human monocytes." J Infect Dis **189**(9): 1610-4.
- Wilson, M., R. Seymour, et al. (1998). "Bacterial perturbation of cytokine networks." Infect Immun **66**(6): 2401-9.
- Wolf, H., S. Walter, et al. (1980). "Effect of natural oestrogens on tryptophan metabolism: evidence for interference of oestrogens with kynureninase." Scand J Clin Lab Invest **40**(1): 15-22.
- Yamaryo, T., K. Oishi, et al. (2003). "Fourteen-member macrolides promote the phosphatidylserine receptor-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by alveolar macrophages." Antimicrob Agents Chemother **47**(1): 48-53.
- Ye, Z. Q., J. K. Burkholder, et al. (1994). "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 **91**(25): 12140-4.
- Yoshida, R., S. W. Park, et al. (1988). "Tryptophan degradation in transplanted tumor cells undergoing rejection." J Immunol **141**(8): 2819-23.
- Yoshimura, T. (2000). "[Modulation of cytokine production from human mononuclear cells by several agents]." Yakugaku Zasshi **120**(12): 1277-90.

VIII. Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die der verwendeten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Düsseldorf, den 16.11.2005

Lebenslauf

IX. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN

DANIEL W O R K U

Geburtstag: 08.08.1975
Geburtsort: Addis Abeba/ Äthiopien
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

SCHUL-HOCHSCHULBILDUNG

09/1982 – 06/1994 Grundschule und Gymnasium in Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/1995 – 05/2003 Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

05/2003 **Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: „gut“)**

ZIVILDIENTST

09/1994 – 09/1995 Zivildienstleistender in der Inneren Medizin
Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf

PRAKTISCHES JAHR

04/2002 – 08/2002 **Innere Medizin**
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
CA Prof. Dr. D. Häussinger/ CA Prof. Dr. R. Haas

08/2002 – 12/2002 **Chirurgie**
Brigham & Women's Hospital
Harvard Medical School, USA
Ron Kikinis MD

12/2002 – 03/2003 **Radiologie**
Brigham & Women's Hospital
Harvard Medical School, USA
Stuart G. Silverman MD

Lebenslauf

PROMOTION

07/1999 – 04/2002 Promotionsarbeit bei PD. Dr. C.R. MacKenzie, Med. Mikrobiologie und Virologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Thema: „Der Einfluss klinisch relevanter, entzündungshemmender Substanzen und Antibiotika auf dieIDO-Aktivität der Makrophagen“

ANSTELLUNGEN

10/1997 – 02/1998 Tutor für den anatomischen Präparierkurs, Universität Düsseldorf

06/1999 – 10/1999 Regelmäßige Wochenenddienste und Nachtwachen auf der chirurgischen Intensivstation, Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf

08/1998 – 10/2002 Regelmäßige Wochenenddienste in der interdisziplinären Ambulanz mit den Versorgungsbereichen, Innere Medizin, Chirurgie und Orthopädie, im St. Vinzenz-Krankenhaus, Düsseldorf

04/1999 – 04/2004 Dozent für Biochemie und Physiologie im „Centrum für Nachhilfe und Repetitorium“, Düsseldorf

04/2001 – 04/2004 Dozent für Anatomie/Physiologie, Innere Medizin, Chirurgie, Neurologie, Augenheilkunde, Dermatologie in folgenden Krankenhäusern:

- Kooperationsgemeinschaft für Krankenpflege und Kinderkrankenpflege in Kaiserswerth, Düsseldorf
- Kooperationsgemeinschaft für Krankenpflege und Kinderkrankenpflege bei der Stiftung Evangelisches Kranken- und Versorgungshaus zu Muelheim an der Ruhr
- Evangelisches Krankenhaus Mettmann GmbH
- Evangelisches Krankenhaus Bethesda Mönchengladbach gGmbH, Lehrkrankenhaus der RWTH Aachen

08/2002 – 04/2003 Wissenschaftliche Hilfskraft Mülheimer Radiologisches Institut (MRI).

seit- 05/2004 Assistenzarzt in der Weiterbildung, Malteser Krankenhaus St. Anna, Duisburg

WEITERE FORSCHUNGSAKTIVITÄTEN

08/2002 - dato

Forschungsprojekt im Rahmen der Kooperation des Medical Imaging Processing, Mülheimer Radiologisches Institute und Surgical Planning Laboratory and Division of Abdominal Imaging and Intervention, Department of Radiology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA mit folgenden Schwerpunkten:

- Validierung multipler manueller Segmentierungen MRT-gesteuerter Kryotherapien von Nierenzell- und Weichteiltumoren
- Effektivitätsbeurteilung der MRT-gesteuerten Kryotherapie von Nierenzell- und Weichteiltumoren mittels manueller Segmentierung und 3D-Darstellung
- Validierung und Verbesserung automatischer Segmentationsalgorithmen mittels manueller Segmentierung von MRT-gesteuerten Kryotherapien in Schweinelebern zwecks Implementierung als Echtzeit-Monitoring der Intervention

→ in diesem Rahmen mehrere Publikationen (Abstracts, Paper)

Düsseldorf, den 16.11.2005