

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

**Die Bedeutung der Indolamin 2,3-Dioxygenase als  
antimikrobieller Faktor und immunregulatorische Stellgröße:  
wie passen Bakteriostase und T-Zellinhibition zusammen?**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anika Patricia Katharina Müller

**2015**

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

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Walter Däubener  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Roland Meisel

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. (2007).

Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines.

Curr Drug Metab. 8, 237-244.

Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. (2008).

The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects.

J Cell Mol Med. 13, 1125-1135.

Schmidt SK\*, Müller A\*, Heseler K, Woite C, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. (2009).

Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-Dioxygenase.

Eur J Immunol. 39, 2755-2764.

(\*contributed equally to this work)

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VII
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die adaptive Immunität .....</b>	<b>3</b>
1.1.1 Antigenerkennung .....	3
1.1.2 T-Zell-vermittelte Effektormechanismen bei Infektionserkrankungen .....	7
1.1.3 Zytokine .....	9
<b>1.2 Tryptophan .....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Die Physiologie des Tryptophans .....	12
1.2.2 Regulation der Tryptophan-Konzentration .....	14
<b>1.3 Indolamin 2,3-Dioxygenase vermittelte Effekte .....</b>	<b>16</b>
1.3.1 DieIDO und ihre Wirkmechanismen .....	16
1.3.2 DieIDO und die Pathogenabwehr .....	16
1.3.3 Immunregulatorische Effekte derIDO .....	19
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Bezugsquellennachweis .....</b>	<b>22</b>
2.1.1 Geräte, Materialien .....	22
2.1.2 Chemikalien .....	23
2.1.3 Radiochemikalien .....	24
2.1.4 Zytokine .....	24
2.1.5 Reagenzien und Puffer .....	24
2.1.6 Zellkulturmedien .....	24
2.1.7 Medien für die Bakterienkulturen .....	24
2.1.8 Bakterienstämme und Zelllinien .....	24
<b>2.2 Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Kultivierung von Zelllinien .....	25
2.2.2 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut .....	25
2.2.3 Bestimmung der Zellzahl .....	26
2.2.4 OKT3-Stimulation und Allogene-Immunantwort .....	26
2.2.5 Herstellen von Zellüberständen .....	27
2.2.6 Bestrahlung von HeLa-Zellen .....	28
<b>2.3 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.3.1 Infektion mit bakteriellen Erregern .....	28
<b>2.4 Messung der Proliferation .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums mittels optischer Dichte .....	29
2.4.2 Bestimmung der <i>colony forming units</i> zur Quantifizierung des bakteriellen Wachstums .....	29
2.4.3 Quantifizierung der T-Zellproliferation .....	29
<b>2.5 Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.5.1 Messung derIDO-Aktivität .....	30

2.5.2	IFN- $\gamma$ ELISA .....	30
<b>2.6</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>IDO-Aktivität, antimikrobielle Effekte, Immunregulation der IDO.....</b>	<b>32</b>
3.1.1	IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Aktivität in verschiedenen humanen Zellen.....	32
3.1.2	Antimikrobielle Effekte der IDO durch verschiedene Zellen .....	33
3.1.3	T-Zellinhibition durch IDO exprimierende humane Zellen .....	34
3.1.4	Aufhebung des T-Zell-inhibitorischen Effekts durch den kompetitiven IDO-Inhibitor 1-Methyltryptophan.....	35
<b>3.2</b>	<b>Ausschluss eines IDO-unabhängigen IFN-<math>\gamma</math> Effekts.....</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>TDO-vermittelte antibakterielle und immunsuppressive Effekte.....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Direkte immunregulatorische Effekte von HeLa-TDO-Zellen .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5</b>	<b>Einfluss der IDO auf die Zytokinproduktion von T-Zellen .....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Das von aktivierten Zellen produzierte IFN- $\gamma$ reicht aus, eine IDO-Aktivität zu induzieren, die bakterielles Wachstum hemmt.....	45
3.6	Der unterschiedliche Tryptophanbedarf zwischen Bakterien und T-Zellen .....	47
3.6.1	Bestimmung des Tryptophanbedarfs anderer Bakterien .....	49
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>51</b>
4.1	IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte.....	52
4.2	Die Bedeutung der IDO in der Immunregulation .....	55
4.3	Wirkmechanismen der IDO .....	58
4.4	Die fehlende Verbindung zwischen IDO-vermittelten antibakteriellen und immunregulatorischen Effekten.....	62
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>65</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>67</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>80</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Strukturformel der proteinogenen, essentiellen, aromatischen $\alpha$ -Aminosäure L-Tryptophan. ....	12
Abb. 1.2 Die verschiedenen Stoffwechselwege des Tryptophans in Säugetieren mit besonderem Augenmerk auf den Kynurenin-Abbauweg schematisch dargestellt. ....	13
Abb. 1.3 Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz der Enzyme IDO und TDO. (modifiziert nach Forouhar <i>et al.</i> , 2007) .....	15
Abb. 3.1: IDO-Aktivität durch IFN- $\gamma$ Stimulation in verschiedenen humanen Zellen. ....	33
Abb. 3.2: IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte auf das Wachstum von <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	34
Abb. 3.3: IDO-vermittelte immunregulatorische Inhibition auf die Proliferation humaner T-Zellen. ...	35
Abb. 3.4: Aufhebung des T-Zellinhibitorischen Effekts der IDO durch den spezifischen Inhibitor 1-Methyltryptophan. ....	36
Abb. 3.5: Vergleich der antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte der IDO im Vergleich mit einer IDO-negativen Jurkat-Zelle.....	38
Abb. 3.6: Kynureninproduktion und antibakterielle Effekte von HeLaTDO-Zellen. ....	40
Abb. 3.7: Inhibition der T-Zellproliferation durch Tryptophan-Degradation durch die TDO unter OKT3-Stimulation und als Allo-Antwort. ....	41
Abb. 3.8: T-Zell-Proliferation zusammen mit TDO-aktiven transformierten HeLa-Zellen.....	42
Abb. 3.9: Abhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Produktion von der T-Zellproliferation. ....	44
Abb. 3.10: Das durch die stimulierten T-Zellen produzierte IFN- $\gamma$ führt zur IDO-Expression in Fibroblasten, wodurch das Bakterien-Wachstum direkt gehemmt wird. ....	46
Abb. 3.11: Unterschiede im Tryptophanbedarf zwischen T-Zellen und Bakterien. ....	48
Abb. 3.12: Bestimmung des Tryptophanbedarfs von verschiedenen Bakterien.....	50
Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Verlaufs der Tryptophan-Konzentration im Gewebe während einer bakteriellen Infektion.....	63





## 1 Einleitung

Die Immunologie als relativ junge Wissenschaft beschäftigt sich mit der Erforschung aller Komponenten des Immunsystems eines Organismus gegen ein Pathogen. Als einen der größten Erfolge basierend auf immunologischer Forschung ist sicherlich die 1979 von der Weltgesundheitsorganisation erklärte Ausrottung der Pocken-Erkrankung zu nennen, deren Grundstein bereits 1796 durch Edward Jenner mit der Entdeckung der Pocken-Impfung gelegt wurde. Das Immunsystem der Wirbeltiere lässt sich phylogenetisch in die angeborene und die adaptive Immunität einteilen, wobei die angeborene Immunität die phylogenetisch ältere Komponente darstellt. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort werden körperfremde Antigene spezifisch erkannt. Eine spezifische Stimulierung dieser adaptiven Immunreaktionen bildet die Grundlage für eine erfolgreiche Impfreaktion. Im Gegensatz dazu kann eine gezielte antigenspezifische Unterdrückung adaptiver Immunreaktionen therapeutisch eingesetzt werden, zum Beispiel in der Bekämpfung von Allergien, Autoimmunerkrankungen und Transplantatabstoßungen.

Zu den Eigenschaften der angeborenen Immunität gehört, dass es sich um eine erste, sehr schnelle Immunantwort handelt, diese aber unspezifisch agiert. Das heißt, dass lediglich eine Unterscheidung „körpereigen“ versus „körperfremd“ erfolgt, ohne das Pathogen als solches zu erkennen. Anders ist dies bei der adaptiven Immunantwort, deren primäre Induktion einige Tage *post infectionem* dauern kann. Hier wird über verschiedene Erkennungsprozesse hochspezifisch auf ein infektiöses Agens reagiert und ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet, so dass bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Agens eine schnellere spezifische Immunantwort möglich wird. Dieses Prinzip macht man sich unter anderem bei der Entwicklung von Impfstoffen zu nutze. Zu den physiologischen Bestandteilen des Immunsystems gehören sowohl humorale (=lösliche) als auch zelluläre Komponenten. Beide Komponenten finden ihr jeweiliges Äquivalent in der angeborenen wie auch in der adaptiven Immunabwehr. Als erste Barriere zum Schutz gegen pathogene Mikroorganismen sind die Oberflächen des Körpers, die Kontakt mit Pathogenen haben, mit Epithelien ausgestattet. Einerseits stellt eine Epithelschicht eine sichere funktionell mechanische Barriere gegenüber Krankheitserregern dar, andererseits gibt es mittels sogenannter Defensine – Proteine auf Epithelzelloberflächen bzw. von Epithelzellen sezernierte Abwehrproteine – bereits

einen aktiven antimikrobiellen Mechanismus auf allen Körperoberflächen. Zu den humoralen Mediatoren der angeborenen Immunität zählt das bereits 1922 von Alexander Fleming beschriebene Lysozym. Ein Enzym, das bakterielle Zellwände spaltet. Hierzu gehört ferner das Komplementsystem, ein weiteres zur bakteriellen Lyse führendes System, bestehend aus proteolytischen Serumenzymen. Es gehören auch die Akute-Phase-Proteine zur humoralen Abwehr der angeborenen Immunität, die aktuell eine zunehmende klinische Relevanz erlangen. Zellulär sind als wichtigste Vertreter die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die Phagozyten zu nennen, wobei die Phagozyten zusätzlich als Effektorzellen der adaptiven Immunität agieren und somit eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen. Die bedeutendsten zellulären Anteile der adaptiven Immunität sind jedoch die B- und T-Zellen. Ihre Aktivierung und Steuerung erfolgt durch lösliche Proteine, den Chemokinen und Zytokinen.

So mannigfaltig die verschiedenen Komponenten, die zu einer erfolgreichen Bekämpfung unseres Organismus gegen pathogene Erreger sein mögen, so unklar ist bisher die Relevanz einzelner Anteile des Immunsystems. So auch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase, das zentraler Fokus vorliegender Arbeit ist. Dieses 43 kD große Enzym besitzt einerseits die außergewöhnliche Fähigkeit, das Wachstum vieler Arten pathogener Mikroorganismen, wie Bakterien, Parasiten, Pilze und Viren, zu hemmen; andererseits gewinnt es zunehmende Bedeutung als immunregulatorische Stellgröße der adaptiven Immunität.

## 1.1 Die adaptive Immunität

### 1.1.1 Antigenerkennung

Die zellulären Bestandteile des Immunsystems stammen von einer gemeinsamen pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark ab. Diese kann sowohl die lymphatische als auch die myeloide Reihe durchlaufen. Zu den lymphatischen Zellen des menschlichen Körpers gehören die B-Zellen und T-Zellen, und die natürlichen Killerzellen. Man teilt die T-Zellen in zwei Hauptgruppen ein: die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helfer-Zellen. Aus der myeloischen Progenitorzelle entstehen alle zellulären Bestandteile des Blutes: die Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten. Zu den Leukozyten gehören neben den Lymphozyten, die polymorphkernigen Leukozyten, die Monozyten und die dendritischen Zellen.

Dabei unterscheidet man die polymorphkernigen Leukozyten, auch Granulozyten genannt, nach ihren Färbeeigenschaften im Blutausschlag in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, wobei die neutrophilen Granulozyten die quantitativ größte Gruppe unter Leukozyten darstellen. Die Granulozyten spielen sowohl bei der angeborenen wie auch bei der adaptiven Immunantwort eine Rolle. Zu ihren Hauptaufgaben gehören die Phagozytose und Freisetzung ihrer spezifischen Granula. Im Fall der neutrophilen Granulozyten wird bakterizide Granula ausgeschüttet, während die Mastzellen hauptsächlich Histamin als aktivierende Substanz freisetzen. Diese Funktionen sind im Rahmen der angeborenen Immunantwort einzugliedern (St John *et al.*, 2013).

Eine weitere Untergruppe der Leukozyten sind die Monozyten. Wandert ein Monozyt vom Blut ins Gewebe, wird er dort zu einem phagozytierenden Makrophagen oder einer unreifen dendritischen Zelle, die ihre Reifung im Lymphknoten erfährt.

Ebenfalls zu den Leukozyten gehören die dendritischen Zellen: Die dendritischen Zellen stellen das Bindeglied zur adaptiven Immunität dar, indem sie in der Peripherie aufgenommene Antigene in den Lymphknoten transportieren und dort den T-Zellen präsentieren. Auch Makrophagen besitzen die Fähigkeit der Antigenpräsentation, indem sie phagozytierte Pathogene in intrazelluläre Vesikel einschließen, die Pathogene dort zerstören und ihre inaktivierten Einzelteile an der Oberfläche präsentieren. Dazu benötigen diese antigen-präsentierenden Zellen spezifische Membrankomplexe, die mit

den Pathogenbestandteilen beladen werden: die MHC-Proteine (MHC = *major histocompatibility complex*). Die Peptidfragmente fremder Proteine werden von zwei verschiedenen dieser membrangebundenen Glykoproteine präsentiert. Dazu unterscheidet man die MHC-I und MHC-II Proteine. MHC-I bindet Peptidfragmente intrazellulärer Erreger, hauptsächlich virale Proteine, im endoplasmatischen Retikulum und gelangt als beladener MHC-I Komplex über Vesikel an die Zelloberfläche. Dort wird er dann CD8+T-Zellen präsentiert. Damit eine erfolgreiche Erkennung des über MHC-I präsentierten Antigens durch die T-Zelle stattfinden kann, benötigt der T-Zellrezeptor CD3, CD8 und CD27 als kostimulatorische Moleküle. MHC-I Moleküle werden auf fast allen Körperzellen exprimiert (Garbi *et al.*, 2013).

MHC-II hingegen präsentiert phagozytierte Antigene. Im Phagolysosom wird der MHC-II Komplex mit den phagozytierten Antigenen beladen und in Vesikeln zur Oberfläche transportiert. Dort wird es den T-Zellen präsentiert und über den CD4-Korezeptor auf T-Helferzellen erkannt. Nur bestimmte Zellen exprimieren schon ohne Voraktivierung MHC-II: die Antigen-präsentierenden Zellen, die B-Zellen, die dendritischen Zellen und die Makrophagen.

Die Korezeptoren CD4 und CD8 (CD = *cluster of differentiation*) werden als Oberflächenmarker für reife T-Zellen verwendet, da T-Zellen entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche tragen, nie jedoch beide gleichzeitig. Beide CD-Moleküle sind mit der Ick-Kinase assoziiert, die den ersten Schritt der T-Zell-Aktivierung nach MHC-Bindung vermittelt (Janeway *et al.*, 2005).

Die B-Zellen und T-Zellen sind kleine lymphozytäre Zellen. Die Lymphozyten sind eine Subpopulation der Leukozyten. In einem physiologischen, humanen Plasma sind circa 20% der Leukozyten lymphozytär. Neben den B-Zellen und T-Zellen gehören auch die large granular lymphocytes zu den Lymphozyten. Zu diesen großen granulären Lymphozyten gehören die Natürlichen Killerzellen und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, deren Aufgabe darin besteht, Änderungen der Wirtszelle durch Infektionen zu erkennen. Die B-Lymphozyten werden durch Antigenkontakt im Lymphknoten zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen oder B-Gedächtniszellen aktiviert. Die T-Lymphozyten werden im Thymus geprägt. Unreife T-Zellen gelangen während der Embryonalentwicklung des Organismus in den Thymus und entwickeln dort ihren jeweiligen spezifischen T-Zell-Rezeptor. Dabei findet auch die Differenzierung der  $\alpha:\beta$ -T-

Zellen in zytotoxische T-Zelle (CD8+) oder T-Helfer-Zelle (CD4+) statt. Jede T-Zelle besitzt einen eigenen T-Zell-Rezeptor, der nur ein Antigen spezifisch bindet. Dies ist ein typischer Mechanismus der adaptiven Immunität. Nur die Erkennung dieses einen spezifischen Antigens führt zur Aktivierung. Um auf ein größtmögliches Repertoire an Antigenen reagieren zu können, benötigt der menschliche Körper demzufolge viele verschiedene Antigen-spezifische Rezeptoren. Allerdings steht für die Bildung jeden Rezeptors das gleiche Genmaterial zur Verfügung. Die notwendige Variabilität entsteht durch Rekombination. Ein T-Zell-Rezeptor-Komplex besteht aus den variablen Regionen, die das Antigen erkennen, und unveränderlichen Proteinen, den CD3-Molekülen, die die Signaltransduktion ausüben. Die höchste Vielfalt wird dabei im zentralen Bereich des T-Zellrezeptors erreicht, der mit dem MHC-präsentierten Liganden in Verbindung tritt (Petrova *et al.*, 2012).

Die Umlagerung der T-Zell-Rezeptorgene des T-Zell-Vorläufers findet im Thymus statt. Dort schließen sich positive und negative Selektion an. Unreife T-Zellen, die körpereigene MHC-Moleküle erkennen, erhalten Überlebenssignale durch die Wechselwirkung mit dem Thymusepithel. Dies wird als positive Selektion bezeichnet. Bei der negativen Selektion erhalten T-Zellen mit einem Rezeptor, der autoreaktiv ist, das heißt stark mit körpereigenen Antigenen reagiert, ein Apoptose-Signal. Dadurch werden ungefähr 95% aller initial gebildeten T-Zell-Vorläufer selektioniert. Danach wandern die naiven T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe. Dort treffen die reifen naiven T-Zellen auf mit Fremdartigen beladene Antigen-präsentierende Zellen und werden dadurch aktiviert. Mit der Aktivierung ist immer ein Proliferationssignal verbunden, das zu einer klonalen Vermehrung der T-Effektorzelle führt. Die Interaktionbereiche einer Antigen-präsentierenden Zelle mit einer T-Zelle beschreibt man mit dem Begriff der „immunologischen Synapse“, die mittels interzellulärer Adhäsionsmoleküle aufrecht erhalten wird. Wie bei den Antigen-präsentierenden Zellen bereits beschrieben besteht die Interaktion aus Antigen-präsentierender Zelle und naiver T-Zelle aus der Bindung eines MHC-präsentierten Peptids mit dem spezifischen T-Zell-Rezeptor und dem dazugehörigen Co-Rezeptor, CD4 oder CD8. Dieses Signal allein reicht jedoch nicht aus, um eine T-Zelle zu aktivieren. Zusätzlich wird von derselben Antigen-präsentierenden Zelle ein zweites, kostimulatorisches Signal benötigt, damit die naive T-Zelle ihre antigenspezifische klonale Vermehrung beginnt. Zu den am besten untersuchten

kostimulatorischen Signalen gehören die B7-Moleküle der Antigen-präsentierenden Zellen. Man unterscheidet das B7.1 (CD80) und das B7.2 (CD86), beide sind auf dendritischen Zellen konstitutiv exprimiert und können durch Stimulation mit Lipopolysaccharid oder IFN- $\gamma$  verstärkt exprimiert werden. Die B7-Moleküle interagieren mit CD28 auf den naiven T-Zellen. Bei einer Bindung eines präsentierten Antigens mit dem spezifischen T-Zell-Rezeptor interagieren somit zusätzlich das B7 der Antigen-präsentierenden Zelle mit den CD28-Molekülen der T-Zelle (Chen *et al.*, 2013).

Zur T-Zellaktivierung durch Antigen-präsentierende Zellen sind also drei Signale notwendig: Das erste Signal entsteht durch die Präsentation des pathogenen Peptidfragments an den T-Zell-Rezeptor. Das zweite Signal entsteht durch die Bindung von CD28 mit B7 und als drittes Signal sind kostimulatorische Mediatoren notwendig. Erst alle drei Signale zusammen führen zu einer Signaltransduktion. Dabei werden über Transmembrandomänen, sowohl des T-Zell-Rezeptor-Komplexes als auch des CD28-Moleküls, die PI-3-Kinase und damit der MAP-Kinase-Weg aktiviert, an dessen Ende die Induktion der Zellteilung steht. Aktivierte T-Zellen exprimieren weitere Proteine, die das kostimulatorische Signal der Antigen-präsentierenden Zellen erhalten und/oder modifizieren (Yu *et al.*, 2012). Hier ist beispielsweise der CD40-Ligand zu nennen, dessen Bindung an das CD40-Molekül auf Antigen-präsentierenden Zellen weitere Aktivierungssignale an die T-Zelle sendet und die B7-Expression der Antigen-präsentierenden Zelle steigert.

Ein weiterer Interaktionspartner für die B7-Moleküle ist das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen 4, CTLA-4 (CD152). CTLA-4 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen exprimiert. CTLA-4 interagiert mit dem B7-Molekül mit einer höheren Affinität als das CD28 und kann somit das Signal 2 der T-Zellaktivierung kompetitiv verhindern. Es stellt somit einen Schutzmechanismus dar, die T-Zell-Proliferation als Reaktion auf ein Antigen zu begrenzen. In Versuchen mit CTLA-4-knock-out Mäusen zeigt sich, dass die Tiere mit einer Defizienz im CTLA-4-Gen an einer massiven Lymphozytenproliferation versterben (Tivol *et al.*, 1997). Als weiterer inhibitorischer Mechanismus des CTLA-4 ist beschrieben, dass eine Interaktion des Moleküls mit B7 auch zu einer Induktion derIDO in der antigen-präsentierenden Zelle führt (Grohmann *et al.*, 2002). Der durch IDO-induzierte Tryptophanabbau stellt einen weiteren T-Zellinhibitorischen Mechanismus von CTLA4 dar. Dieses Wirkprinzip wird mittlerweile sogar therapeutisch zur

Immunsuppression eingesetzt, zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder bei der Multiplen Sklerose.

Die dargestellten Mechanismen der T-Zell-Inaktivierung tragen entscheidend zur Vermeidung von Immunreaktionen gegen körpereigene Antigene bei. Dabei spielt dieIDO eine Rolle der peripheren Toleranz. Sowohl lösliche Mediatoren wie das IFN- $\gamma$ , als auch zellständige Rezeptoren wie das CTLA-4 oder das CD40 induzieren eine IDO-Expression.

### **1.1.2 T-Zell-vermittelte Effektormechanismen bei Infektionserkrankungen**

Sind die T-Zellen regelgerecht aktiviert, üben sie verschiedene Funktionen in der Abwehr von Pathogenen aus. Diese zellvermittelte Immunantwort der adaptiven Immunität richtet sich besonders gegen Erreger, die sich intrazellulär vermehren, wie alle Viren, einige Bakterien (z.B. Chlamydien) und Parasiten (z.B. Toxoplasmen). Wie zuvor beschrieben, kann man an Hand der Oberflächenmarker CD4 und CD8 verschiedene T-Zellen unterscheiden. Zellen mit dem charakteristischen CD8-Molekül sind die zytotoxischen T-Zellen. Sie haben eine direkte Wirkung auf körpereigene Zellen, die mit Pathogenen besiedelt sind. Zytotoxische T-Zellen erkennen virusinfizierte Körperzellen über antigenbeladene MHC-I Moleküle auf der Zelloberfläche der betroffenen Zelle. Erkennen die zytotoxischen T-Zellen eine infizierte Zelle, töten sie diese Zelle ab, bevor die virale Replikation beendet ist und die replizierten Viren ausgeschleust werden (Callan *et al.*, 2000).

Dazu senden die zytotoxischen T-Zellen an diese infizierte Zielzelle ein Apoptosesignal. Wenn Zellen im Rahmen einer normalen Zellreaktion sterben, nennt man dies den programmierten Zelltod oder Apoptose. Ein Beispiel für Apoptose ist das Absterben von selektierten T-Zellen im Thymus, die körpereigene Antigene erkennen können. Sie erhalten ein sogenanntes Apoptosesignal und zerstören sich selbst, in dem sich zunächst der Zellkern auflöst, die Zelle schrumpft und sich schließlich selbst abbaut.

Dieses Apoptosesignal wird durch Granzyme induziert. Die Granzyme lösen in praktisch jeder Zielzelle durch Caspasenaktivierung eine Apoptose aus. Die Caspasen initiieren den Abbau der zellulären Nukleinsäuren. Dadurch wird der Zellkern aufgelöst. Eine Besonderheit der Apoptose ist, dass sie im Gegensatz zur Nekrose keine Inflammationsreaktion auslöst.

Neben der Induktion von Apoptose ist, als ein weiterer relevanter Effektormechanismus der zytotoxischen T-Zellen, die Ausschüttung von Zytokinen zu nennen. Eines der wichtigsten von den zytotoxischen T-Zellen produzierten Zytokine ist ein Interferon, das so genannte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  trägt auf unterschiedliche Weise zur Elimination des Pathogens in der Wirtszelle bei. Zunächst hemmt es direkt die intrazelluläre virale Replikation. Wesentlich entscheidender scheint jedoch, dass IFN- $\gamma$  die Expression von MHC-I-Komplexen verstärkt und somit infizierte Zellen leichter und schneller von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden (Strehl *et al.*, 2005). IFN- $\gamma$  wirkt auch auf Makrophagen, die dadurch am Ort der Infektion aktiviert werden und dort entweder als Antigen-präsentierende Zelle oder als phagozytierende Effektorzelle wirken. Dabei gilt die Aktivierung von Makrophagen als ein entscheidendes Element in der Abwehr pathogener intrazellulärer Protozoen, wie zum Beispiel *Toxoplasma gondii* (Denkers *et al.*, 1998). Neben der Phagozytose und der Antigen-Präsentierung gibt es weitere antiparasitäre Effektormechanismen des IFN- $\gamma$ . Der für diese Arbeit relevante Mechanismus wurde bereits 1984 von Pfefferkorn beschrieben. Er beschrieb die Hemmung von Toxoplasmen-Wachstum in IFN- $\gamma$  stimulierten humanen Fibroblasten (Pfefferkorn *et al.*, 1984). Hier wurde erstmals ein direkter Zusammenhang antiparasitärer Effekte und der Aktivierung des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase nachgewiesen, das in Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  exprimiert wird.

Neben den bisher beschriebenen zytotoxischen T-Lymphozyten, die das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche besitzen, tragen auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Abwehr intrazellulärer Pathogene bei. T-Lymphozyten mit dem Oberflächenmerkmal CD4 werden in zwei große Gruppen unterteilt, den T-Helferzellen Typ 1 (T<sub>H1</sub>) und den T-Helferzellen Typ 2 (T<sub>H2</sub>). Die Hauptaufgabe der T<sub>H1</sub> ist die Makrophagenaktivierung. Dabei spielt als Leitzytokin der T<sub>H1</sub>-Zellen, das bereits erwähnte IFN- $\gamma$  eine wesentliche Rolle. T<sub>H2</sub>-Lymphozyten (Leitzytokin IL-4) beeinflussen im Wesentlichen die B-Zellantwort. Neu sind hier noch die CD17 Zellen zu nennen, die Interleukin-17 als Leitzytokin produzieren und in der Summe ihrer Aktivitäten eine Verstärkung der Granulozytenaktivierung bewirken und somit an der Abwehr von extrazellulären Bakterien beteiligt sind (Annunziato *et al.*, 2012).

Bestimmte intrazellulär lebende Pathogene, wie zum Beispiel Mykobakterien und Toxoplasmen, vermehren sich in Makrophagen und anderen Körperzellen. Ein Makrophage, der ein solches Pathogen aufgenommen hat, ist nicht in der Lage diese



„Parasiten“ ohne Aktivierung zu eliminieren. Erst eine Stimulierung der Zelle mit IFN- $\gamma$ , befähigt die Zelle, die intrazellulären Erreger in ihren Phagosomen zu zerstören. Das dafür benötigte IFN- $\gamma$  stammt dabei von unterschiedlichen Zellen. Dabei ist der Zeitpunkt der IFN- $\gamma$  Ausschüttung entscheidend. In der Initialphase der Infektion stammt das IFN- $\gamma$  von natürlichen Killerzellen. Erst später, nach Aktivierung, spielen die T<sub>H</sub>1-Zellen eine wesentliche Rolle in der Produktion des IFN- $\gamma$ . Erst danach sind auch die CD8+ T-Zellen für die Produktion von IFN- $\gamma$  bedeutsam.

Neben dem IFN- $\gamma$  werden makrophagenaktivierende Signale auch über das Oberflächenantigen CD40 und über das Zytokin Tumornekrosefaktor (TNF) beziehungsweise das Lymphotoxin (LT) vermittelt, die in vielen Fällen synergistisch mit IFN- $\gamma$  wirken.

Ist ein Makrophage aktiviert, setzt er verschiedene antimikrobielle Mediatoren wie Sauerstoffradikale, Stickoxide und Proteasen frei. Sauerstoff-Radikale und toxische Stickoxide wirken direkt bakterizid. Dabei werden toxische Sauerstoffradikale von IFN- $\gamma$  stimulierten Phagozyten im Rahmen der „oxidative burst“ Reaktion freigesetzt (Ellis *et al.*, 2004), während toxische Stickoxide durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (Däubener *et al.*, 2009) in aktivierten Makrophagen entstehen. Die Produktion der toxischen Radikale, aber auch die oben beschriebeneIDO-Induktion sind für die Pathogenabwehr von Bedeutung, können aber auch schädliche Effekte auf körpereigene Zellen vermitteln. Daher ist eine exakte Regulation der Induktion und Aktivität der beteiligten Enzyme (wie der IDO) von besonderer Bedeutung.

Regulatoren der IDO sind die Oberflächenantigene (CD40 und CTLA-4), steigende Zytokine (IFN- $\gamma$  und TNF) und hemmende Zytokine (IL10, TGF- $\beta$ ).

### 1.1.3 Zytokine

Unter dem Begriff Zytokine versteht man Proteine, die regulierende Funktion auf das Wachstum und die Differenzierung von Körperzellen ausüben. Zytokine lassen sich in fünf Hauptgruppen unterteilen: die Interferone, die Interleukine, die koloniestimulierenden Faktoren (colony stimulating factors = CSF), die Tumornekrosefaktoren und die Chemokine.

Dabei übernehmen die Interferone immunregulatorische Funktionen. Während die Interleukine hauptsächlich Differenzierungs- und Wachstumssignale vermitteln, dienen

die koloniestimulierenden Faktoren (CSF) der Zellvermehrung. Die Tumornekrosefaktoren übernehmen Effektorfunktionen bei der Inflammation. Chemokine wirken bevorzugt chemotaktisch auf Immunzellen. So steuern Zytokine in allen Bereichen des Immunsystems die unterschiedlichen Funktionen der Körperzellen zur Immunabwehr.

Bei den Interferonen handelt es sich um Zytokine, die immunstimulierende Wirkung entfalten. Man unterscheidet funktionell die Typ I und die Typ II Interferone. Es gibt drei verschiedene Gruppen von Interferonen: IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  (beide Typ I-Interferon) (jeweils mit vielen verschiedenen Untergruppen) und das IFN- $\gamma$  (Typ II-Interferon). Allen Interferonen gemeinsam sind die antivirale Wirkung und die Verstärkung der MHC-Expression auf körpereigenen Zellen.

Die starke antivirale Wirkung der Typ-I Interferone beruht darauf, dass sie die Proteinbiosynthese viral befallener Zellen und damit die virale Replikation dieser Zellen hemmen (Boehm *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden besonders die Funktionen des Zytokins Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) untersucht. An Hand der antiviralen Wirkung wurde IFN- $\gamma$  erstmals als Interferon-ähnliches Peptid beschrieben (Wheelock, 1965). IFN- $\gamma$  kristallisierte sich in den vergangenen Jahren als eines der zentralen Moleküle der humanen Immunantwort heraus. Über die Bindung an den IFNGR reguliert es die Transkription einiger hundert Gene (Boehm *et al.*, 1997).

Das Typ-II Interferon, besser bekannt als IFN- $\gamma$ , unterscheidet sich strukturell von den bereits deutlich länger bekannten Typ-I Interferonen. Alle Typ-I-Interferone, sowohl IFN- $\alpha$  als auch IFN- $\beta$ , binden an einen gemeinsamen Rezeptor. Nach der Freisetzung bindet IFN- $\gamma$  hingegen an seinen eigenen Rezeptor, den IFN- $\gamma$ -Rezeptor (IFNGR). Bei dem IFN- $\gamma$ -Rezeptor handelt es sich um ein Heterotetramer, das aus insgesamt vier Untereinheiten besteht. Der Ligand IFN- $\gamma$  bindet an zwei dieser Untereinheiten (IFNGR1), die anderen beiden Untereinheiten (IFNGR2) beginnen die Signaltransduktionskaskade (Bazan *et al.*, 1990; Thoreau *et al.*, 1991).

Das IFN- $\gamma$ -Signal wird über den Jak-Stat-Signalweg weitergeleitet (Darnell, Jr. *et al.*, 1994), einen der Signalwege, der in ähnlicher Form bei der Signalvermittlung vieler Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormonen beteiligt ist (Schindler *et al.*, 1995; Ihle *et al.*, 1996; Subramaniam *et al.*, 2001).

Am Ende des Jak-Stat-Signalweges wird im Zellkern durch Bindung an GAS (gamma activated site) und ISRE (interferon stimulated response element) die Transkription einer Vielzahl von Genen reguliert (Boehm *et al.*, 1997; Schroder *et al.*, 2004). Diese primär-responsiven Gene werden bereits 15-30 min nach IFN- $\gamma$  Bindung induziert (Kerr und Stark, 1991). Zu den primär IFN $\gamma$ -responsiven Genen gehören auch weitere Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise der *interfero-regulated-factor* IRF-1, die zur Transkription sekundär IFN $\gamma$ -responsiver Gene führt, was die Anzahl der IFN- $\gamma$  regulierten Gene noch weiter steigert.

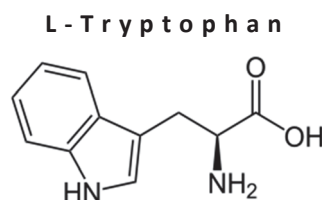
Durch die Vielzahl der IFN- $\gamma$  aktivierten Gene werden vielfältige und teilweise unterschiedliche Funktionen vermittelt. Dabei handelt es sich um Funktionen in den Bereichen der Antigen-Präsentation, der T-Zell-Aktivierung, der Abwehr von viralen, bakteriellen und parasitären Pathogenen und der Bildung von toxischen Radikalen.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein besonderes IFN- $\gamma$  induziertes Enzym, die Indolamin 2,3 Dioxygenase (IDO), untersucht. Neben der bereits genannten Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gibt es eine Reihe weiterer immunologisch aktiver Moleküle, welche die IDO regulieren, wie beispielsweise einzelne Prostaglandine (Braun *et al.*, 2005), das bereits oben genannte Oberflächenmolekül CTLA-4 (Fallarino *et al.*, 2005), ebenso CD40 (Hwu *et al.*, 2000) und zuletzt einige toll-like-Rezeptoren (Hayashi *et al.*, 2004). Dennoch sind die meisten Aktivatoren, vorrangig der TNF- $\alpha$  und der GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), abhängig von der Anwesenheit des IFN- $\gamma$  (Fallarino *et al.*, 2003). Nur wenige Signalwege können die IDO IFN- $\gamma$  unabhängig aktivieren, dazu gehört im Besonderen die Aktivierung durch Prostaglandin E2 (PGE2) (Braun *et al.*, 2005).

## 1.2 Tryptophan

### 1.2.1 Die Physiologie des Tryptophans

Die in dieser Arbeit vorgestellten antimikrobiellen wie auch immunregulatorischen Effekte des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase lassen sich auf den Abbau der Aminosäure Tryptophan (Abb. 1.1) zurückführen. Tryptophan ist eine für Säugetiere essentielle aromatische  $\alpha$ -Aminosäure, die von Pflanzen und Mikroorganismen aus einem aromatischen Indol-Ringsystem und der Aminosäure Serin synthetisiert wird. Die Tryptophansynthese ist ein energieaufwändiger Prozess. Daher nehmen auch Organismen die Tryptophan selbst synthetisieren können, Tryptophan bevorzugt aus ihrer Umgebung auf (Mellor, 2005).

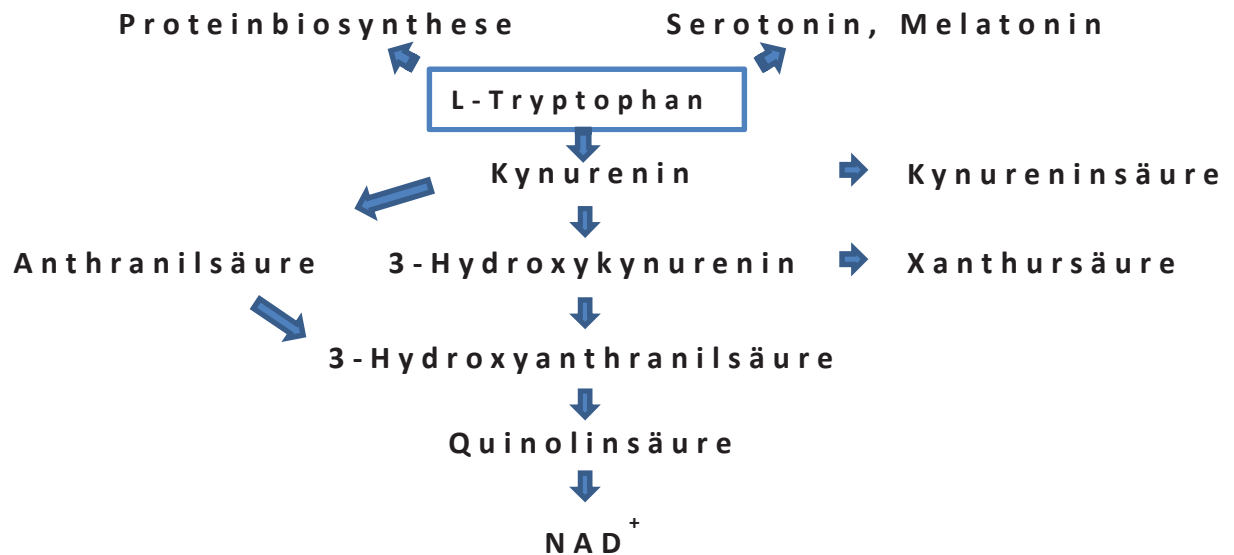


**Abb. 1.1** Strukturformel der proteinogenen, essentiellen, aromatischen  $\alpha$ -Aminosäure L-Tryptophan.

Ein Erwachsener hat einen durchschnittlichen Tryptophanbedarf von 200mg pro Tag. Unter Tryptophanmangelbedingungen kann Tryptophan auch endogen durch Umbau und Abbau von Proteinen wieder bereit gestellt werden (Brown, 1996). In den Industrieländern nimmt ein Erwachsener ungefähr ein 1 g Tryptophan pro Tag über die Nahrung auf (Peters, 1991). Dies ist ein erheblich höherer Anteil, als der Körper täglich für die Proteinbiosynthese und die Produktion von Serotonin benötigt. Der weitaus größte Anteil des aufgenommenen Tryptophans wird über den Kynurenin-Stoffwechsel abgebaut. Das Abbauprodukt Kynurenin wird renal eliminiert. Die verschiedenen Stoffwechselwege sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.

Der erste Schritt in diesem Stoffwechselweg führt durch die Oxidation des Indol-Ringes zur Bildung von N-Formylkynurenin. Dieser Schritt kann durch verschiedene Enzyme katalysiert werden, einerseits durch die Tryptophan 2,3 Dioxygenase (TDO: EC 1.13.11.11) und andererseits durch die Indolamin 2,3 Dioxygenase (IDO: EC 1.13.11.52). Im Kynurenin-Stoffwechselweg wird Nicotinsäureamidadeninindinukleotid (NAD<sup>+</sup>), das der Bildung des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) dient, endogen hergestellt.

Deshalb kommt Tryptophan bei Patienten mit einer unzureichenden Zufuhr an Vitamin B3 (Niacin) eine besondere Bedeutung als Provitamin zu. Ein Niacin-Mangel führt zum Pellagra-Syndrom.



**Abb. 1.2** Die verschiedenen Stoffwechselwege des Tryptophans in Säugetieren mit besonderem Augenmerk auf den Kynurenin-Abbauweg schematisch dargestellt.

Die verschiedenen Neben- und Zwischenprodukte des Kynurenin-Stoffwechselweges (Abb 1.2) besitzen unterschiedliche immunregulatorische, aber auch neuroaktive Wirkungen. Obwohl im Zentralnervensystem nur geringe Mengen Kynurenin produziert werden, wurden die meisten Effekte der Kynurenine an Gehirnzellen von Säugetieren untersucht. Quinolinsäure und ihr Vorläufermolekül 3-Hydroxykynurenin vermitteln einerseits über die Bindung an den NMDA-Rezeptor exzitatorische Effekte und andererseits über die Bildung freier Radikale neurodegenerative Effekte (Schwarcz *et al.*, 1983). Kynureninsäure besitzt antikonvulsive Eigenschaften, in dem es antagonistisch an exzitatorischen Aminosäure-Rezeptoren wirkt (Perkins und Stone, 1982). So ergeben sich aus den Kynurenin-Stoffwechsellzymen und ihren Produkten interessante Ziele für neue Strategien in der Therapie von ischämischen und konvulsiven Erkrankungen des Zentralnervensystems (Schwarcz und Pellicciari, 2002).

In der Summe ist Tryptophan das Substrat von unterschiedlichen Enzymen: zunächst von der Tryptophan-5-Hydroxylase, deren Aktivität zur Bildung des Neurotransmitters 5-Hydroxytryptamin (Serotonin) führt. Die beiden anderen Enzyme sind die TDO und die

IDO, die Tryptophan dem Kynurenin-Stoffwechselweg zuführen. Sie leiten einerseits die Elimination von Tryptophan ein und andererseits stellen sie wichtige Vorläufer für die Bildung von  $\text{NAD}^+$  bereit. Mittlerweile ist ein weiteres Tryptophan abbauendes Enzym, die Indolamin 2,3-Dioxygenase 2 beschrieben. Über die Aktivierungswege dieses Enzyms gibt es bisher nur wenige Daten. Sicher ist jedoch, dass die IDO2 im Vergleich zur IDO nur eine geringe Effektivität beim Tryptophanabbau aufweist (Ball *et al.*, 2009).

Der erste Schritt des Kynurenin-Stoffwechselweges ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, so dass die Regulation dieses ersten Schrittes den quantitativen Abbau von Tryptophan bestimmt.

### 1.2.2 Regulation der Tryptophan-Konzentration

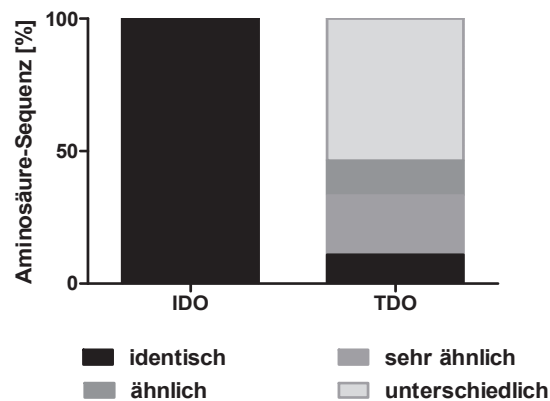
Die Menge des systemisch verfügbaren Tryptophans wird im Wesentlichen durch die Menge der Aufnahme und den Abbau über die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) bestimmt. Die TDO wird hauptsächlich in der Leber exprimiert. Dort metabolisiert sie den Überschuss des über die Nahrung aufgenommenen Tryptophans. So wird die Serumkonzentration des Tryptophans reguliert.

Die Aktivität der TDO wird im Wesentlichen durch das Vorhandensein des Substrates Tryptophan determiniert. Sinkt die Tryptophankonzentration wird das Enzym instabil und zerfällt. Die TDO wird in der Leber nicht nur konstitutiv exprimiert, sondern lässt sich auch durch Glucocorticoide und Glucagon stimulieren (Schutz *et al.*, 1973).

Die IDO hingegen ist im Gewebe nicht konstitutiv exprimiert. Sie wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen in einer Vielzahl von Geweben induziert. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Entzündungsreaktion durch ein Trauma, eine Infektion, ein Tumorgeschehen oder eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird (Mellor, 2005). Entscheidend bei der Regulation der IDO-Expression sind die inflammatorischen Zytokine  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$  (MacKenzie, 2007). Die IDO trägt unter physiologischen Bedingungen funktionell nicht zur Regulation der systemischen Tryptophankonzentration bei; sie kann jedoch unter pathologischen Bedingungen zu einer systemischen Tryptophanreduktion beitragen (Schröcksnadel *et al.*, 2006). Nach Stimulation durch bestimmte Zytokine ist die IDO in nahezu allen humanen Zellen induzierbar (MacKenzie *et al.*, 2007). Dabei hängt die Stärke der IDO-Aktivierung von der

Art des Gewebes bzw. dem Zelltyp und lokalen Faktoren (beispielsweise einer Hypoxie) ab (Stone, 1993, Roth et al, 2010, Schmidt *et al.*, 2013).

IDO und TDO katalysieren zwar dieselbe Reaktion, den Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin, jedoch unterscheiden sich beide erheblich in ihrer Struktur. Im humanen TDO-Protein sind lediglich 43% der Aminosäure-Sequenz gleich beziehungsweise ähnlich dem der IDO (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3** Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz der Enzyme IDO und TDO. (modifiziert nach Forouhar *et al.*, 2007)

Aus den strukturellen Unterschieden ergeben sich für beide Enzyme auch Unterschiede in Bezug auf die Substratspezifität. Das Substratspektrum der IDO ist deutlich breiter als das der TDO. Die IDO kann neben L-Tryptophan auch D-Tryptophan, Serotonin, Tryptamin und L-5Hydroxykynurenin metabolisieren (Shimizu *et al.*, 1978). Die TDO hingegen galt lange Zeit als hochspezifisch für L-Tryptophan. Erst später wurde beschrieben, dass die TDO auch eng verwandte Substrate wie das 6-Fluoro-Tryptophan spalten kann (Leeds *et al.*, 1993).

## 1.3 Indolamin 2,3-Dioxygenase vermittelte Effekte

### 1.3.1 Die IDO und ihre Wirkmechanismen

Das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase wurde erstmals 1975 von einer japanischen Arbeitsgruppe in Struktur und Funktion beschrieben (Hayaishi *et al.*, 1975). Die IDO ist ein etwa 43 kDa großes Monomer. Die Häm-Gruppe ist für die katalytische Wirkung der IDO essentiell. Die IDO katalysiert den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin. Die IDO vermittelte Reaktion hat hauptsächlich zwei Folgen: einerseits kommt es im Bereich der Entzündung zu einem Mangel an Tryptophan, andererseits entstehen aus dem gebildeten Kynurenin toxische Metabolite. Welcher Wirkmechanismus die jeweiligen IDO-vermittelten Effekte verursacht, ist bisher nur teilweise nachgewiesen. Beispielsweise gibt es Hinweise darauf, dass der Tryptophanmangel allein für die antimikrobiellen Effekte der IDO verantwortlich ist (MacKenzie *et al.*, 2007).

Anders verhält es sich mit den immunregulatorischen Effekten der IDO. Hier wurde gezeigt, dass Tryptophanmetabolite toxische Effekte auf T-Zellen vermitteln können. (Frumento *et al.*, 2002) (Terness *et al.*, 2002).

Zusätzlich scheint die IDO nach einer Phosphorylierung als Transkriptionsfaktor bei der Entstehung von regulatorischen T-Zellen im TGF- $\beta$  Weg eine Rolle zu spielen (Chen *et al.*, 2011).

### 1.3.2 Die IDO und die Pathogenabwehr

Es konnten bis dato Effekte der IDO bei der Abwehr verschiedenster Mikroorganismen gefunden werden. Zuerst entdeckte Pfefferkorn 1984, dass IFN- $\gamma$  in Fibroblasten den Abbau von Tryptophan induziert, wodurch eine Hemmung des Wachstums von *Toxoplasma gondii* erzielt wird (Pfefferkorn *et al.*, 1984). Das Enzym, das diesen Abbau des Tryptophan IFN- $\gamma$ -abhängig katalysiert, stellte sich als die IDO heraus. Bereits in dieser ersten Arbeit zu den antiparasitären Effekten der IDO wird als Wirkmechanismus die Tryptophanverarmung konstatiert. Es folgten viele weitere experimentelle Hinweise dafür, dass die IFN- $\gamma$ -abhängige Induktion der IDO ein effektiver Wirkmechanismus gegen eine *Toxoplasma-gondii*-Infektion im Menschen darstellt. So konnte dieser Wirkmechanismus für die unterschiedlichsten humanen Zellen wie Epithelzellen



(Däubener *et al.*, 1999), Astrozyten (Oberdörfer *et al.*, 2003; Däubener *et al.*, 1993) und Endothelzellen (Däubener *et al.*, 2001) nachgewiesen werden.

Allerdings gibt es nur wenige Arbeitsgruppen, die die Rolle der IDO bei der Pathogenabwehr anderer Parasiten außer *Toxoplasma gondii* beschreiben. Neben den Toxoplasmen als parasitären Erreger wurden auch *Neospora caninum* als intrazelluläre Erreger untersucht. Dabei dienen bovine Fibroblasten und Endothelzellen als Wirtszellen. Auch in diesen bovinen Zellen wird der antiparasitäre Effekt durch eine IDO Induktion vermittelt (Spekker *et al.*, 2009).

Weitere Hinweise für die IDO-Wirksamkeit gegen Toxoplasmen ergeben sich aus Arbeiten, die zeigen, dass eine Expression rekombinanter IDO in humanen Fibroblasten dazu in der Lage ist, das parasitäre Wachstum zu hemmen (Dai *et al.*, 1994; Habara-Ohkubo *et al.*, 1993). Als weiterer Hinweis lässt sich die Beobachtung von Sibley *et al.* nennen, die gezeigt haben, dass Toxoplasmen, die das *trpB* gen von *E. coli* exprimieren und somit selbst Tryptophan produzieren können, durch die IDO-Aktivität nicht gehemmt werden (Sibley *et al.*, 1994; Hartman *et al.* 1988). Alle Untersuchungen deuten darauf hin, dass tatsächlich die Tryptophanverarmung durch die IDO-Aktivität für den antiparasitären Effekt auf Toxoplasmen verantwortlich ist.

Neben diesen Daten zu den antiparasitären Effekten gibt es Befunde zur antibakteriellen und antiviralen Wirksamkeit der IDO. Es wurden zunächst IDO-vermittelte antibakterielle Effekte gegen obligat intrazelluläre Bakterien untersucht. Byrne *et al.* zeigten, dass humane T24-Zellen IDO-abhängig das Wachstum von *Chlamydia psittacci* hemmen (Byrne *et al.*, 1986). Ähnliche Daten wurden später von Feng *et al.* auch mit Rickettsien, anderen obligat intrazellulären Bakterien, erhoben (Feng *et al.*, 2000). Es folgten viele Untersuchungen zur Sensitivität verschiedener Chlamydien-Stämme auf die Tryptophan-Depletion in verschiedenen humanen Zellen. Die meisten Chlamydien-Stämme zeigten sich sensibel auf die Inhibition durch den Tryptophanentzug (Roshick *et al.*, 2006). Einige wenige Chlamydien-Stämme, zum Beispiel *C. psittacii*, können aus einigen Metaboliten des Kynurenin-Stoffwechsels (Antranilsäure und Kynurenin) Tryptophan synthetisieren und sich damit dem IDO-Einfluss entziehen (Wood *et al.*, 2004).

Einige Studien lassen vermuten, dass *Chlamydia pneumoniae* an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sein könnte. Im Hinblick darauf ist eine Untersuchung mit den glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta interessant, in der gezeigt werden konnte,

dass das Wachstum von *Chlamydia pneumoniae* einerseits durch IDO-Aktivität gehemmt werden kann und andererseits dieser Effekt durch die Zugabe des IDO-Inhibitors 1-L-Methyltryptophan wieder aufgehoben werden kann (Pantoja *et al.*, 2000)

Ein weiterer Schritt in der Erforschung der Rolle der IDO bei der Pathogenabwehr erfolgte durch die Untersuchung von nicht obligat intrazellulären Bakterien. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die IDO auch extrazelluläre Bakterien im Wachstum hemmen kann. Dies gilt im Besonderen für *Staphylococcus aureus*, Enterokokken und Streptokokken der Gruppe B. Auch diese Befunde wurden mit unterschiedlichen humanen Zelllinien wie Endothelien, Urothelien, Makrophagen und Astrozyten erhoben (Däubener *et al.*, 1999; MacKenzie *et al.*, 1998; MacKenzie *et al.*, 1999; Schroten *et al.*, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Staphylokokken und Enterokokken untersucht, darunter sind auch ein Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und mehrere Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) vertreten. Damit wurde ein Erregerspektrum untersucht, das heute im Verlauf einer Sepsis, auf Grund seines ausgeprägten Resistenzprofils große therapeutische und hygienische Probleme bereitet. Die klassische Sepsistherapie mit einer Kombination aus symptomatischer und antimikrobieller Therapie zeigt bis heute eine hohe Mortalität, so dass nach neuen Therapiestrategien, auch im Bereich der Immunmodulation, gesucht wird.

Neben bakteriellen Erregern spielen unter anderem bei schweren Infektionserkrankungen auch virale Erreger eine große Rolle im infektiologischen Alltag, besonders bei immunkompromittierten Patienten. Es konnte auch gezeigt werden, dass die IDO an der Virusabwehr beteiligt ist. Erste Versuche dazu erfolgten an humanen retinalen Pigmentepithelzellen, die mit dem Zytomegalie-Virus infiziert wurden. Auch hier konnte eine Hemmung des viralen Wachstums durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  erzielt werden, die durch die Zugabe von Tryptophan reversibel ist (Bodaghi *et al.*, 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte einen IDO-verursachten antiviralen Effekt auch mit anderen Viren der Herpesgruppe, HSV Typ-I und HSV Typ-II, nachweisen (Adams *et al.*, 2004a/b).

Die vorliegenden Daten zu den antiviralen Effekten der IDO ergaben, dass sich die antiviralen Effekte nur teilweise durch eine Tryptophansupplementation aufheben lassen (Bodagi *et al.*, 1999). Dies könnte dadurch begründet werden, dass bei hohen

Konzentrationen von Tryptophan auch hohe Konzentrationen toxischer Kynurenin-Metabolite entstehen, die auch die Wirtszelle negativ beeinflussen. Desweiteren lässt die Datenlage den Schluss zu, dass es bei dem antiviralen Effekt der IDO nicht vorrangig um eine Abwehr virus-befallener Zellen handelt, sondern vielmehr die nicht-infizierten Nachbarzellen vor einer Infektion geschützt werden (MacKenzie *et al.*, 2007). Beispielsweise ist CMV in der Lage, den IFN- $\gamma$  Signalweg zu unterbrechen. So erfolgt im Gewebe eine IDO-Induktion durch IFN- $\gamma$  nur in den noch nicht CMV-infizierten Zellen (Miller *et al.*, 1998, Schmidt *et al.*, 2013).

Zusammenfassend lässt sich der IDO in Makrophagen und nicht-professionellen Abwehrzellen eine entscheidende Rolle in der Abwehr von unterschiedlichen Pathogenen wie Parasiten, Bakterien und Viren zusprechen. Es scheint so, als interagieren die nicht-professionellen Immunzellen mit anderen Gewebszellen, um einen synergistischen Effekt der IDO-Aktivität zu erreichen. So wirken zum Beispiel IDO-positive humane mikrovaskuläre Endothelzellen und die in der Bluthirnschranke benachbarten IDO-positiven Astrozyten gemeinsam gegen das Eindringen von Pathogenen (Adam *et al.*, 2005).

### **1.3.3 Immunregulatorische Effekte der IDO**

Die ersten Arbeiten, die einen immunmodulatorischen Effekt der IDO nachweisen, wurden von der Arbeitsgruppe von Mellor und Munn publiziert. Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass die IDO-Wirkung für das Überleben allogener Föten verantwortlich ist (Munn *et al.*, 1998).

Dabei behandelten sie trächtige Mäuse mit allogenen bzw. syngenen Föten mit dem IDO-spezifischen Inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT). Dabei fanden sie, dass 1-L-MT den Verlauf einer syngenen Schwangerschaft nicht beeinflusst, während eine 1-L-MT-Behandlung während einer allogenen Schwangerschaft zur Abstoßung der Föten führte. So wurde erstmals beschrieben, dass der Tryptophan-Abbau durch die IDO in der Plazenta immunsuppressiv wirkt.

Später wurde dieser IDO-abhängige immunregulatorische Effekte auch in verschiedenen Subpopulationen von Makrophagen und dendritische Zellen gefunden (Munn *et al.*, 2002) (Munn *et al.*, 2005) (Fallarino *et al.*, 2002). Dabei können IDO-positive DCs das Wachstum von T-Zellen unterdrücken.

Doch blieb der Mechanismus IDO-vermittelten Immunregulation nicht auf die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen beschränkt. Vielmehr wurden im Kontext der Tumorforschung eine Reihe humaner Tumorzellen entdeckt, die die IDO stark exprimieren (Uyettehove *et al.*, 2003). Des Weiteren gibt es eine Untersuchung bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom, bei der eine starke IDO-Expression in den Karzinomzellen mit einem schlechteren klinischen *outcome* zusammenhängt (Okamoto *et al.*, 2005). In diesen Modellen wird angenommen, dass die IDO positiven Zellen die Entwicklung bzw. Aktivität der gegen Tumorantigen-gerichteten T-Zellen hemmen.

Um nun den molekularen Wirkmechanismus der T-Zell-Hemmung durch die IDO zu beschreiben, sind verschiedene Theorien in Betracht zu ziehen. Naheliegend scheint die Beobachtung, dass die toxischen Metabolite des Kynurenins, im Besonderen das Kynurenin selbst und das 3-Hydroxykynurenin, über einen zytotoxischen Effekt entweder direkt (Terness *et al.*, 2002; Frumento *et al.*, 2002) oder indirekt über die dendritischen Zellen (Belladonna *et al.*, 2006) wirken. Andere Arbeiten belegen eine vermehrte Induktion regulatorischer T-Zellen bzw. regulatorischer dendritischer Zellen durch die IDO (Mellor und Munn, 2003). Weitere Arbeiten der Gruppe um Mellor und Munn fanden die Aktivität der GCN2-Kinase als möglichen Vermittler der IDO-abhängigen T-Zell-Inhibition (Munn *et al.*, 2005). Sie vermuten, dass die T-Zellen den GCN2-Signalweg als Sensor für die Tryptophankonzentration nutzen. Der IDO-vermittelte Tryptophanabbau führt zu einem Tryptophanmangel, der über GCN2 ein Stresssignal induziert, wodurch die Hemmung der T-Zell-Proliferation eingeleitet wird.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Auf den ersten Blick scheint die IDO zwei völlig gegensätzliche Aufgaben im Immunsystem zu übernehmen. Auf der einen Seite stehen die zuerst genannten Aufgaben der IDO im Bereich der Pathogenabwehr mit ihren antiparasitären, antibakteriellen und antiviralen Effekten. Auf der anderen Seite steht die Hemmung der inflammatorischen Reaktion durch die Inhibition der T-Zell-Proliferation. Wie kann ein einzelnes Enzym einerseits wichtige Abwehrfunktionen des Immunsystems hemmen und andererseits gleichzeitig an der Pathogenabwehr beteiligt sein? Zur Bearbeitung dieser komplexen Problematik wurden antibakterielle und immunregulatorische Eigenschaften der IDO in *in-vitro* Systemen detailliert untersucht. Zur Analyse der antibakteriellen IDO-Wirkungen wurde *Staphylococcus aureus* als Modellorganismus genutzt und das Bakterienwachstum quantitativ bestimmt. Die immunregulatorischen Effekte der IDO wurden durch Bestimmung der T-Zellproliferation ermittelt. Als ein Maß für eine T-Zellaktivierung diente dabei auch die quantitative Messung des T-Zellproduzierten Zytokins IFN- $\gamma$ . Ferner wurde untersucht, ob für die antibakteriellen und immunregulatorischen Effekte alleine durch einen Abbau von Tryptophan zu Kynurenin zu erklären sind, oder ob weitere Eigenschaften des IDO-Proteins oder zusätzliche IFN- $\gamma$  induzierte Mechanismen bei der Vermittlung dieser Effekte beteiligt sind. Um diese Fragestellung zu bearbeiten wurden sowohl IDO exprimierende Zellen als auch konditionierte Medien von IFN- $\gamma$  stimulierten Zellen verwendet. In einem weiteren Ansatz wurde die immunregulatorische Eigenschaft eines weiteren Tryptophan-abbauenden Enzyms, der TDO, analysiert. In diesem Versuchsaufbau wird die TDO als rekombinantes Enzym durch Stimulation exprimiert. IFN- $\gamma$  induzierte Zusatzeffekte und weitere IDO-Protein-spezifische Effekte konnten so ausgeschlossen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bezugsquellennachweis

#### 2.1.1 Geräte, Materialien

Bestrahlungsgerät, Gammacell 1000 Elite	Nordion, Ottawa, Kanada
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Brutschränke	B5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus, Hanau,
Kippschüttler	Duomax 1030, Heidolph, Nürnberg
Mikroskope: Axiovert 25, TE2000	Zeiss, Oberkochen; Nikon, Düsseldorf
Pipetten	Finnpipette Labsystems, München
Plattenphotometer	Tecan, Crailsheim
Quarzküvetten, 100 µL	Hellma, Jena
Photometer	DU 640, Beckman-Coulter, München
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A)	Flow Laboratories, Meckenheim
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Perkin Elmer, Thermal Cycler 480
	Biometra Göttingen, UNO
Thermoblock	
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät	Harvester Basic 96, Satron
	Instruments Tampere, Finnland
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau,
	Heraeus Biofuge fresco, Hanau
96-well Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Einmalspitzen	Polylab, Seoul, Korea
Einmalspritzen, 1-20 ml	Polylab Seoul, Korea
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glasfilter	Preprint Filtermat, LKB Wallac
Kanülen; Microlance, verschiedene Größen	BD Becton Dickinson, Heidelberg

Kryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße, 0.5-2.0 mL	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen, 25-175 cm <sup>2</sup>	Costar, Bodenheim
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, 10 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen

### 2.1.2 Chemikalien

Acetonitril	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Biozym, Oldendorf
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
Eisessig (Essigsäure 96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol 97 %	Merck, Darmstadt
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Heparin 25000IE/5mL	Ratiopharm, Ulm
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	BioChrom, Berlin
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
1-Methyl-L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit	Beta Plate Scint, LKB Wallac
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

### 2.1.3 Radiochemikalien

[<sup>3</sup>H]-Thymidin, 0.74 MBq/mL

Das Reagenz wurde von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen, in RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan, ohne Glutamin) gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### 2.1.4 Zytokine

Humanes IFN- $\gamma$  wurde von R&D (Wiesbaden) bezogen, in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  U/mL in IMDM gelöst und in Aliquots von 100  $\mu$ L (à 20 000U/100 $\mu$ L) bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

### 2.1.5 Reagenzien und Puffer

Ehrlich's Reagenz	1.2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in 96% Eisessig
PBS	(Phosphate-buffered saline): 13.7mM NaCl, 2.7mM KCl, 80.9mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4

### 2.1.6 Zellkulturmedien

IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium)	Cambrex, München
RPMI 1640 ohne L-Tryptophan	Gibco, Karlsruhe

### 2.1.7 Medien für die Bakterienkulturen

LB-Agarplatten	LB-Medium 1.2 % Bacto-Agar
----------------	----------------------------

### 2.1.8 Bakterienstämme und Zelllinien

Vier Stämme von *Staphylococcus aureus* und vier Stämme Enterokokken (darunter drei Vancomycinresistente Stämme) dienten als Erreger in Infektionsversuchen. Alle Bakterienstämme wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial isoliert und identifiziert.

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

- HFF (humane Vorhautfibroblasten) bezogen von ATCC



- A549 (humanes Lungenadenokarzinom, Alveolarzellen Typ II) bezogen von DSMZ, Braunschweig
- A2 (86HG39, humanes Astrozytom) zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bilzer, Institut für Neuropathologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Jurkat-Zellen (humane T-Zellleukämie-Zelllinie)
- HeLa (Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms) bezogen von Invitrogen, Karlsruhe
- Von der AG Däubener transformierte HeLa-Zellen, die unter Tetrazyklin-Stimulation TDO exprimieren

## **2.2 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.1 Kultivierung von Zelllinien**

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Kautelen. Die Inkubation erfolgte stets in einem Brutschrank bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 10% mit wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte in IMDM-Medium. Das Zellkulturmedium wurde mit 10%igem hitzeinaktiviertem (30min bei 56°C) fötalem Kälberserum (FCS) angereichert. Nach einer Inkubationszeit von drei bis fünf Tagen wurden die Zellen geerntet und für die Experimente weiterverwendet oder gesplittet. Dazu wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und der Zellrasen in den Kulturflaschen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,25% Trypsin-EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in Medium aufgenommen und zehn Minuten bei 1800 Umdrehungen pro Minute (entsprechend 500g) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und für die unterschiedlichen Experimente verwendet. Zur weiteren Kultivierung wurden ein Sechstel aller Zellen bzw. ein Drittel der HFF-Zellen in frische Zellkulturflaschen mit frischem IMDM+FCS-Medium gegeben und für weitere drei bis fünf Tage im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchte und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.2 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten aus Vollblut**

Zur Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (= PBMC) wurden gesunden, freiwilligen Blutspendern 50mL Heparin-Vollblut entnommen, d.h. 2000IE Heparin auf 50mL

Frischblut (Heparin-Natrium, 25.000IE/5mL von Ratiopharm). Das Frischblut wurde 1:1 mit PBS-Puffer verdünnt. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Der Gradient entstand dabei über Ficoll-Paque. Dazu wurden 15mL Ficoll-Paque mit 35mL des verdünnten Frischblutes überschichtet und bei 2400 Umdrehungen pro Minute (entsprechend 1500g) für 30 Minuten bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert. Am Boden des 50mL Zentrifugenröhrchens setzen sich die Erythrozyten und Granulozyten ab, darüber entsteht eine Schicht bestehend aus Ficoll. Es folgt eine Interphase mit Leukozyten und zuoberst sammelt sich das Serum. Die Interphase bestehend aus Lymphozyten wird mit einer Pipette abnehmen, der Rest wird verworfen. Um die in der Interphase konzentrierten Lymphozyten von Thrombozyten und Resten von Ficoll zu trennen, werden sie dreimal in PBS gelöst und zentrifugiert. Die Zentrifugation erfolgt für jeweils zehn Minuten bei 800 (ca. 100g), 1200 (ca. 280g) und 1800 (ca. 500g) Umdrehungen pro Minute, die Überstände werden verworfen und das Pellet erneut in PBS gewaschen. Abschließend werden die Zellen in 5mL PBS aufgenommen und gezählt. Für jeden Versuch wurden frische Lymphozyten isoliert.

### **2.2.3 Bestimmung der Zellzahl**

Für die jeweiligen Versuche wurde zur besseren Vergleichbarkeit jeweils eine vordefinierte Anzahl an Zellen, d.h. A549, A2, HeLa, HFF und PBMC, verwendet. Zur Zellzahlbestimmung wurden die nicht-vitalen Zellen mittels Trypanblau-Färbung identifiziert und die vitalen Zellen in einer Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

### **2.2.4 OKT3-Stimulation und Allogene-Immunantwort**

Die Stimulation von Lymphozyten zur Proliferation erfolgte in den meisten Experimenten mittels CD3-Antikörper. Desweiteren wurden die Lymphozyten über eine allogene Immunantwort aktiviert. Die Stimulation mittels CD3-Antikörper erfolgte mit OKT3 in einer Endverdünnung des Antikörpers von 1:3000. Zum Zeitpunkt der Zugabe der Lymphozyten zu den einzelnen Versuchsansätzen wurden ebenfalls 10µL OKT3, in RPMI (ohne Tryptophan) gelöst, zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Ansätze mit [<sup>3</sup>H]Thymidin gepulst und weitere 24 Stunden inkubiert, bevor

die Auswertung erfolgte. In den Experimenten zur allogenen T-Zell-Antwort wurden PBMC von zwei verschiedenen, nicht verwandten Spendern benutzt. Die T-Lymphozyten des Spenders A wurden mit 5.000 rad bestrahlt (Bestrahlungsgerät, Gammacell 1000 Elite von Nordion, Ottawa, Kanada). Es wurden jeweils 150.000 Zellen/well einer 96-well Flachbodenplatte den unterschiedlichen Versuchsansätzen zugegeben. Anschließend wurden 450.000 Zellen/well der unbestrahlten Zellen des Spenders B den jeweiligen Ansätzen zugegeben, so dass die T-Zellen des Spenders B durch eine allogene Immunantwort mit den inaktivierten Zellen des Spenders A reagierten und so aktiviert wurden.

### **2.2.5 Herstellen von Zellüberständen**

Das Herstellen von konditionierten Zellkulturmedien erfolgte durch IFN- $\gamma$  Stimulation IDO-positiver Zellen und anschließender Trennung der durch IDO-Aktivität Tryptophan-depletierten Überstände. Dazu wurden 5.000.000 Zellen (A549, A2, HFF, HeLa) in 20mL IMDM-Medium aufgenommen und in 75cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen im Brutschrank für drei Tage kultiviert. Dies ergab dann bei den jeweiligen Versuchen die Medium-Kontrollgruppe. Um IDO-Aktivität zu induzieren und so das Tryptophan aus den Ansätzen zu depletieren, wurden die unterschiedlichen Zellen wie in der Mediumkontrolle kultiviert, jedoch wurden zu Versuchsbeginn 1000 U/mL Interferon- $\gamma$  zugegeben. Durch das Interferon- $\gamma$  exprimierten die Zellen IDO, deren Aktivität während der Inkubationszeit von 72h das Tryptophan des Mediums abgebaut hat. Für die Versuche mit den von unserer Arbeitsgruppe hergestellten TDO-aktiven HeLa-Zellen wurden ebenfalls 5.000.000 HeLaTDO-Zellen in 20mL IMDM-Medium, diesmal jedoch für fünf Tage inkubiert. Zur Expression der TDO wurde den Ansätzen Tetrazyklin in einer Dosierung von 1  $\mu$ g/mL zugegeben. Dadurch wurde TDO-Aktivität induziert und das im Medium enthaltene Tryptophan durch die TDO vollständig abgebaut. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände mit einer Pasteur-Pipette geerntet und durch Zentrifugation mit 1.800 Umdrehungen pro Minute (500g) für 10min von den übrigen Zellen getrennt. Die konditionierten Überstände wurden direkt für die jeweiligen Experimente verwendet.

## 2.2.6 Bestrahlung von HeLa-Zellen

In einem Versuchsansatz wurden die HeLa-TDO-Zellen direkt mit Bakterien und Lymphozyten zusammen inkubiert, um Wechselwirkungen durch die Anwesenheit der IDO+ bzw. TDO+ Zellen zu untersuchen. Um ein weiteres Proliferieren dieser Zellen während des Versuchs zu verhindern, wurden die HeLa-TDO-Zellen für diesen Versuch in 10mL IMDM aufgenommen und mit 5.000 rad bestrahlt (Gammacell 1000 Elite, Nordion, Ottawa). In Vorversuchen habe ich ermittelt, dass nach 5 000 rad Bestrahlung die Proliferation der HeLa-Zellen gehemmt ist, die IDO- und TDO-Aktivität jedoch noch deutlich messbar bleibt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen bei 1800 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden 30 000 Zellen/200µl IMDM-Medium in eine 96-well-Flachbodenplatte gegeben und die jeweiligen Triplets mit Interferon-γ oder Tetracyclin stimuliert oder als Kontrolle ohne Stimulation verwendet. Es wurden jeweils drei Ansätze erstellt. In dem ersten Ansatz wurde als Kontrolle die IDO-Aktivität gemessen, der zweite Ansatz wurde mit bakteriellen Erregern infiziert und im dritten Ansatz wurde die Proliferation von dazugegebenen Lymphozyten gemessen.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Infektion mit bakteriellen Erregern

Die konditionierten Überstände und auch die in 2.2.5 beschriebenen Ansätze mit HeLa-Zellen wurden mit extrazellulär replizierenden Bakterien infiziert. Dazu wurden Isolate von *Staphylococcus aureus* und verschiedenen Enterokokken auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Bakterienkolonie aufgenommen und in 1mL PBS gelöst. Anschließend wurde die Lösung 1:100 000 mit PBS verdünnt. Jeweils 10µL dieser Bakteriensuspension wurden zu 200µL der jeweiligen Überstände in einer 96-well Flachbodenplatte zugegeben und für 24h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die unterschiedlichen Bakterien wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial isoliert und identifiziert.

## 2.4 Messung der Proliferation

### 2.4.1 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums mittels optischer Dichte

Zur Bestimmung des bakteriellen Wachstums wurden die Versuchsansätze, die mit Bakterien beimpft und über Nacht inkubiert wurden, mehrfach resuspendiert, bis sich alle Bakterien gleichmäßig verteilt hatten. Dann konnte die optische Dichte mittels Photometer bestimmt werden. Hierzu wurde eine Wellenlänge von 620nm verwendet. Die Absorption bei 620nm korreliert mit der bakteriellen Keimzahl.

### 2.4.2 Bestimmung der *colony forming units* zur Quantifizierung des bakteriellen Wachstums

Zur besseren Quantifizierung des bakteriellen Wachstums wurden in einigen Titrationsversuchen zusätzlich colony-forming units (Kolonie-bildende Einheiten) bestimmt. Dazu wurde die Überstände bzw. Ansätze, die mit Bakterien beimpft wurden, nach der Inkubationszeit ebenfalls wieder sorgfältig resuspendiert, bis alle Bakterien gleichmäßig verteilt waren und die Triplets gepoolt. 50µL dieser Überstände wurden seriell achtfach 1:10 in PBS verdünnt und je 10µL auf einer Blutagarplatte ausgestrichen. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37°C im Brutschrank konnten die einzelnen Kolonien der verschiedenen Verdünnungen gezählt und auf Kolonien/mL hochgerechnet werden.

### 2.4.3 Quantifizierung der T-Zellproliferation

Die Quantifizierung der T-Zellproliferation erfolgte mittels der Messung einer Tritium-Inkorporation der proliferierenden T-Zellen. Dazu wurden die Versuchsansätze, die zusammen mit Lymphozyten inkubiert wurden, nach der Inkubationszeit von drei Tagen bei Stimulation mit dem CD3-Antikörper OKT3 oder von fünf Tagen bei einer Stimulation mit allogenen T-Zellen, mit Tritiummarkiertem Thymidin markiert. Dazu wurden die Ansätze mit jeweils 10µL 7,4kBq [<sup>3</sup>H]-Thymidin für 24h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zur Auswertung wurden die radioaktiv markierten Zellen mit einem Erntegerät auf einen Glasfilter überführt. Das Glasfilterpapier wurde im Trockenschrank bei 100°C getrocknet. Anschließend wurden die Glasfilter in Folie verpackt, mit 10mL Szintillationsflüssigkeit vollständig benetzt und luftdicht verschweißt. Mit einem

Betacounter wurde dann die erzeugte Cerenko-Strahlung gemessen, die durch den Zerfall des Tritiums erzeugt wurde. Die Szintillationslösung führte diesen Zerfall des Tritiums herbei. Die Ergebnisse wurden in Zerfällen pro Minute, also counts per minute (=cpm), gemessen. Sie korrelieren mit der Anzahl der proliferierenden Lymphozyten.

## **2.5 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.5.1 Messung der IDO-Aktivität**

Die Messung der IDO-Aktivität erfolgte mittels der photometrischen Quantifizierung des Tryptophanmetaboliten Kynurenin. Dazu wurden jeweils 180µL des zu untersuchenden Überstandes in eine 96-well Spitzbodenplatte gegeben. Es wurden jeweils Dupletts bzw. Triplets gemessen. Anschließend wurden 10µL 30% Trichloressigsäure zugegeben, damit die Proteinbestandteile ausfallen. Anschließend wurde die Platte für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Dabei hydrolysiert das N-Formylkynurenin zum messbaren Kynurenin. Anschließend wurde die Platte 10 Minuten mit 1800 Umdrehungen pro Minute (entsprechend 500g) zentrifugiert. 100µL der Überstände wurden in eine 96-well Flachbodenplatte überführt und mit jeweils 100µL frisch angesetztem Ehrlich`s Reagenz (= 2 % Dimethylaminobenzaldehyd in 20 %iger Salzsäure) vermischt. Durch die Bindung der Aldehydgruppe des Dimethylaminobenzaldehyd mit dem Kynurenin entsteht ein gelber Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann. Das Absorptionsmaximum liegt bei 492nm. Die Stärke der Absorption der Probe bei 492nm korreliert mit der Menge des Kynurenins. Als Negativkontrollen wurden die Zellüberstände der unstimulierten Zellen verwendet.

### **2.5.2 IFN-γ ELISA**

Zur Messung der IFN-γ-Konzentration wurde ein Kit der Firma R&D Systems verwendet, „DuoSet® ELSIA Development System“ für „human IFN-γ“ mit der Katalognummer DY285. Die Durchführung erfolgte streng nach Protokoll des Herstellers. Es handelt sich um einen so genannten „sandwich-ELISA“.

## **2.6 Statistische Auswertung**

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm *GraphPad Prism*® durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels des Standard t-Tests für gepaarte

bzw. und gepaarte Proben. In Einzelexperimenten wurde die Standardabweichung angegeben, bei der Kombination mehrerer Experimente wurden alle Daten mit dem Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden antimikrobielle und immunregulatorische Effekte untersucht, die durch eine Tryptophandegradation hervorgerufen werden. Diese Tryptophandegradation kann *in vivo* durch das Enzym Indolamin 2,3 Dioxygenase (IDO) oder Tryptophan 2,3 Dioxygenase (TDO) vermittelt werden und soll in dieser Arbeit in verschiedenen *in vitro* Modellen detailliert untersucht werden.

#### 3.1 IDO-Aktivität, antimikrobielle Effekte, Immunregulation der IDO

Nicht nur die professionellen Abwehrzellen weisen eine induzierbare IDO Aktivität auf, sondern nahezu jede humane kernhaltige Zelle kann nach IFN- $\gamma$  Stimulation das funktionsfähige Enzym IDO exprimieren.

Die IDO-Aktivität ist in verschiedenen Körperzellen unterschiedlich. So mussten in Vorversuchen zunächst die geeigneten Zelltypen für die jeweiligen Versuche identifiziert werden.

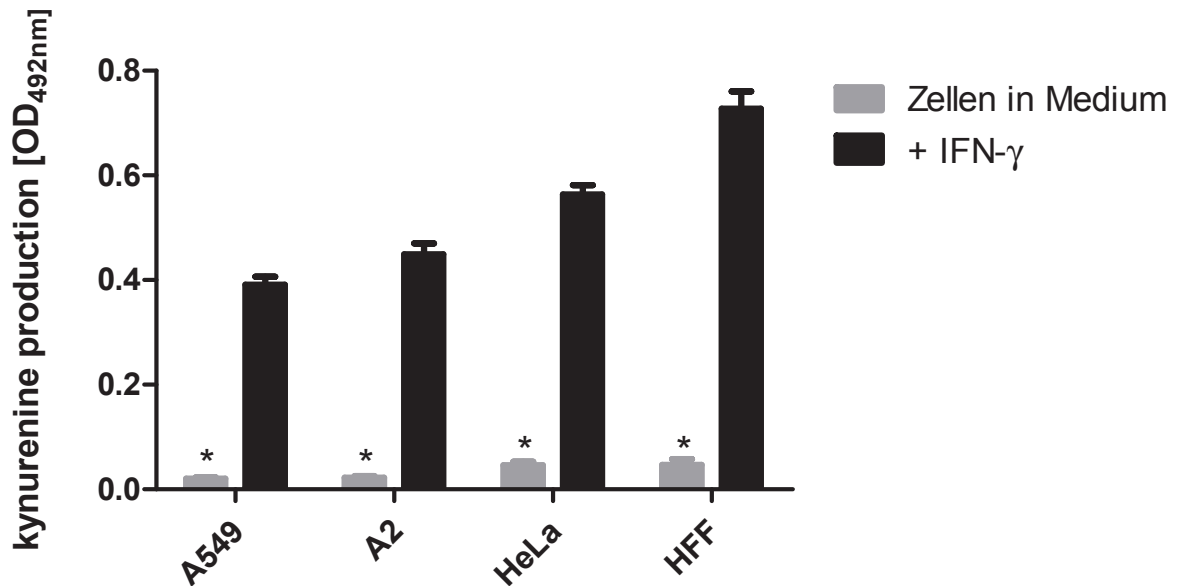
##### 3.1.1 IFN- $\gamma$ vermittelte IDO-Aktivität in verschiedenen humanen Zellen

Zunächst wird gezeigt, dass die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen eine IDO-Aktivität aufweisen. Dazu wurde eine Lungenadenokarzinomzelllinie des Alveolarepithels (A549-Zellreihe), eine Astrozytomzelllinie (A2-Zellreihe), eine HeLa-Zelllinie eines humanen Zervixepithelkarzinoms und naive humane Vorhautfibroblasten (HFF) auf ihre IDO-Aktivität nach IFN- $\gamma$  Stimulation getestet. Jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen wurden in 20mL Medium (und additiv  $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  Tryptophan) ohne und mit  $1000 \text{ U}/\text{mL}$  IFN- $\gamma$  für 72h inkubiert. Die Zellüberstände wurden geerntet und der Kynureninegehalt bestimmt. Der Nachweis des gebildeten Kynurenins wurde photometrisch nach Anfärbung der Aldehydgruppe des Dimethylaminobenzaldehyd mit dem Kynurenin bestimmt.

In Abb. 3.1 ist die photometrisch gemessene Kynurenin-Konzentration im Zellüberstand der jeweiligen Zellen dargestellt, jeweils als nicht-stimulierte Kontrolle und unter IFN- $\gamma$  Stimulation.

Die Abbildung 3.1. dargestellten Ergebnisse zeigen, dass alle ausgetesteten Zellen eine induzierbare IDO-Aktivität aufweisen und nach IFN- $\gamma$  Stimulation vergleichbare Mengen Kynurenin aus Tryptophan produzieren.





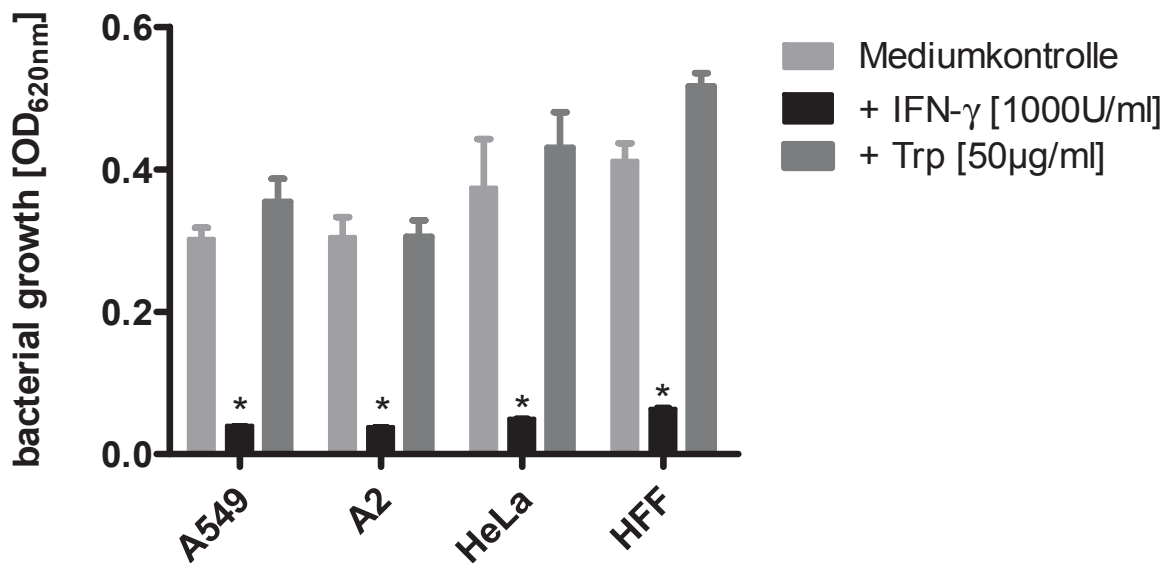
**Abb. 3.1: IDO-Aktivität durch IFN- $\gamma$  Stimulation in verschiedenen humanen Zellen.**

A549-, A2-, HeLa- und HFF-Zellen werden mit jeweils 1000U/mL IFN- $\gamma$  stimuliert. Um die Substratkonzentration zu erhöhen, wurde den Medien Tryptophan (100 $\mu$ g/mL) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72h wurde mittels Ehrlich-Reagenz photometrisch die Kynurenin-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Daten sind als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen dargestellt. Bei allen verwendeten Zellreihen wurde jeweils unter IFN- $\gamma$  Stimulation eine signifikante Kynurenin-Produktion gemessen (\*  $p < 0.005$ ).

### 3.1.2 Antimikrobielle Effekte der IDO durch verschiedene Zellen

Die entstandenen Zellüberstände, jeweils ein unstimulierter Mediumüberstand und eine mit IFN- $\gamma$  stimulierter Überstand, wurden mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Einem Teil der Proben wurden zum Zeitpunkt der Infektion Tryptophan (50  $\mu$ g/mL) supplementiert. Nach 24h wurde das bakterielle Wachstum photometrisch bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.2 dargestellt.

Abbildung 3.2 zeigt, dass sowohl die A549-, die A2-, die HFF- und die HeLa-Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation die Vermehrung von *Staphylococcus aureus* verhindern. Ferner ist gezeigt, dass in allen Zelltypen eine Zugabe von Tryptophan den antibakteriellen Effekt aufhebt. Diese Daten zeigen, dass die IFN- $\gamma$  induzierte IDO Aktivität für den antibakteriellen Effekt verantwortlich ist. Ferner belegt der Versuch, dass unter den gewählten Bedingungen der antibakterielle Effekt für alle Zelltypen quantitativ ähnlich stark ausgeprägt ist.



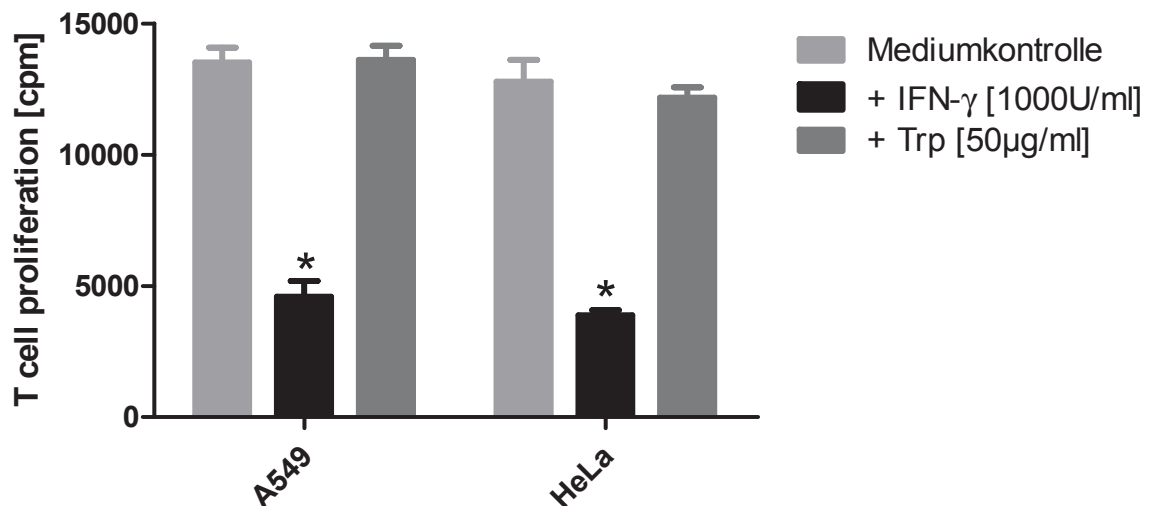
**Abb. 3.2: IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*.**

Die durch IFN- $\gamma$  stimulation Tryptophan-degradierten Überstände von A549-, A2-, HeLa- und HFF-Zellen werden als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus* verwendet. Bei der Hälfte der stimulierten Ansätze wird gleichzeitig mit der bakteriellen Infektion Tryptophan in einer Konzentration von 50µg/ml supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 24h wird photometrisch das bakterielle Wachstum über die optische Dichte bestimmt. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen dargestellt. Die Inhibition des bakteriellen Wachstums ist bei allen Zellreihen jeweils signifikant (\*  $p < 0,005$ ).

### 3.1.3 T-Zellinhibition durch IDO exprimierende humane Zellen

Um die Fähigkeit zur immunregulatorischen T-Zellinhibition an einigen humanen Epithelzellen zu testen, werden die Überstände von A549-Zellen und HeLa-Zellen einmal als Überstand von unstimulierten Zellen und einmal als Überstand unter IFN- $\gamma$  Stimulation nach 72h geerntet. Diese Überstände werden als Kulturmedium für periphere Blutmononukleäre Zellen (= PBMC) verwendet. Einem Teil der Ansätze wurde Tryptophan in einer Konzentration von 50 µg/mL supplementiert, um den T-Zell-inhibitorischen Effekt aufzuheben. Mit dem CD3-Antikörper OKT3 werden die T-Zellen stimuliert. Nach einer Kulturzeit von 72h wird den T-Zellen [<sup>3</sup>H]Thymidin zugegeben, dass die proliferierenden Zellen in weiteren 24h einbauen. Diese Inkorporation wird gemessen und ist in *counts per minute* (cpm) in Abb. 3.3 dargestellt. In beiden Überständen (von A549-Zellen und HeLa-Zellen), in denen die Zellen zu Beginn mit IFN- $\gamma$  stimuliert wurden, zeigt sich eine signifikante Inhibition der T-Zellproliferation auf circa 34% der Mediumkontrolle im stimulierten A549-Überstand und auf circa 30% der

Mediumkontrolle im stimulierten HeLa-Überstand. Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Tryptophan in beiden Fällen aufgehoben. Durch IFN- $\gamma$  Stimulation kommt es zu einer IDO-Aktivität, wodurch das Tryptophan depletiert wurde und somit eine T-Zellinhibition erzeugt wurde.



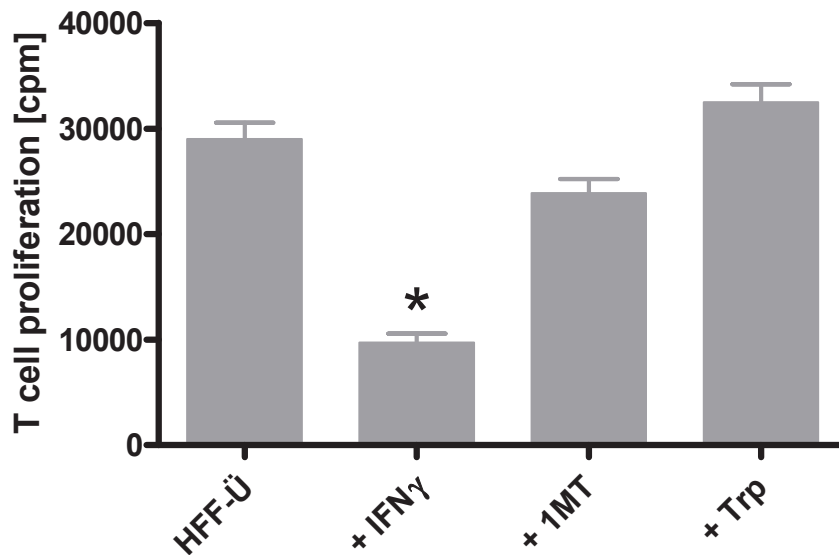
**Abb. 3.3: IDO-vermittelte immunregulatorische Inhibition auf die Proliferation humaner T-Zellen.**

Die durch IFN- $\gamma$  Stimulation Tryptophan-degradierten Überstände von A549- und HeLa-Zellen werden als Inkubationsmedium für humane PBMC verwendet, die mit anti-CD3-Antikörper OKT-3 aktiviert werden. Bei der Hälfte der Ansätze wird Tryptophan in einer Konzentration von 100 $\mu$ g/ml supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 72h werden die proliferierenden T-Zellen mittels radioaktivem  $^3$ HThymidin markiert. Nach weiteren 24h Inkubationszeit wird die Menge des in die Zellen eingebauten  $^3$ HT gemessen und in cpm angegeben, um das Ausmaß der T-Zellproliferation zu bestimmen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Die Inhibition der T-Zellproliferation ist sowohl in den Überständen der A549-Zellen als auch in den Überständen der HeLa-Zellen signifikant (\*  $p < 0,005$ ).

### 3.1.4 Aufhebung des T-Zell-inhibitorischen Effekts durch den kompetitiven IDO-Inhibitor 1-Methyltryptophan

Dieser eben beschriebene T-Zell-inhibitorische Effekt der IDO lässt sich nicht nur für A549- und HeLa-Zellen zeigen, sondern auch mit humanen Vorhautfibroblasten (HFF). Bei HFF handelt es sich um naive Gewebszellen und nicht um Tumorzellen, so dass diese repräsentativ für weitere naive Gewebszellen gesehen werden können. Für dieses Experiment wurden  $5 \times 10^6$  HFF-Zellen in 20mL Medium mit IFN- $\gamma$  (1000 U/mL) in der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 1-Methyltryptophan [1,2mM] stimuliert. Nach 72h wurden die Kulturüberstände geerntet und als konditioniertes Kulturmedium verwendet.

Anschließend wurden  $1,5 \times 10^5$  periphere Blutmononukleäre Zellen (PBMC) in 200 $\mu$ L des konditionierten Mediums mit einem anti-CD3-Antikörper aktiviert. Nach 72h Proliferationszeit wurde die Inkorporation von [ $^3$ H]Thymidin als Maß für die T-Zellproliferation gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 dargestellt.



**Abb. 3.4: Aufhebung des T-Zellinhibitorischen Effekts derIDO durch den spezifischen Inhibitor 1-Methyltryptophan.**

Konditioniertes Medium von IFN- $\gamma$  stimulierten HFF-Zellen (in An- und Abwesenheit von 1-L-MT wurde als Kulturmedium für humane PBMC verwendet, die mit OKT3 aktiviert wurden. Als Kontrolle wurde der Überstand unstimulierter HFF (HFF-Ü) verwendet. Ein Teil der Ansätze wurde mit Tryptophan supplementiert. Nach einer Inkubationszeit von 72h wurden die proliferierenden T-Zellen mittels radioaktivem  $^3$ HThymidin markiert. Nach weiteren 24h Inkubationszeit wurde die Menge des in die Zellen eingebauten  $^3$ HT gemessen, um das Ausmaß der T-Zellproliferation zu bestimmen. Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus sieben verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Eine signifikante Inhibition (\*  $p < 0.001$ ) der T-Zell-Proliferation fand sich in dem durch IFN- $\gamma$  Induktion Tryptophan-depletierten Inkubationsmedium. Sowohl durch Zugabe des spezifischen IDO-Inhibitors 1-L-MT (bei der Produktion des konditionierten Mediums), als auch durch die Supplementation von Tryptophan (während der Proliferationsphase) wird diese Inhibition aufgehoben.

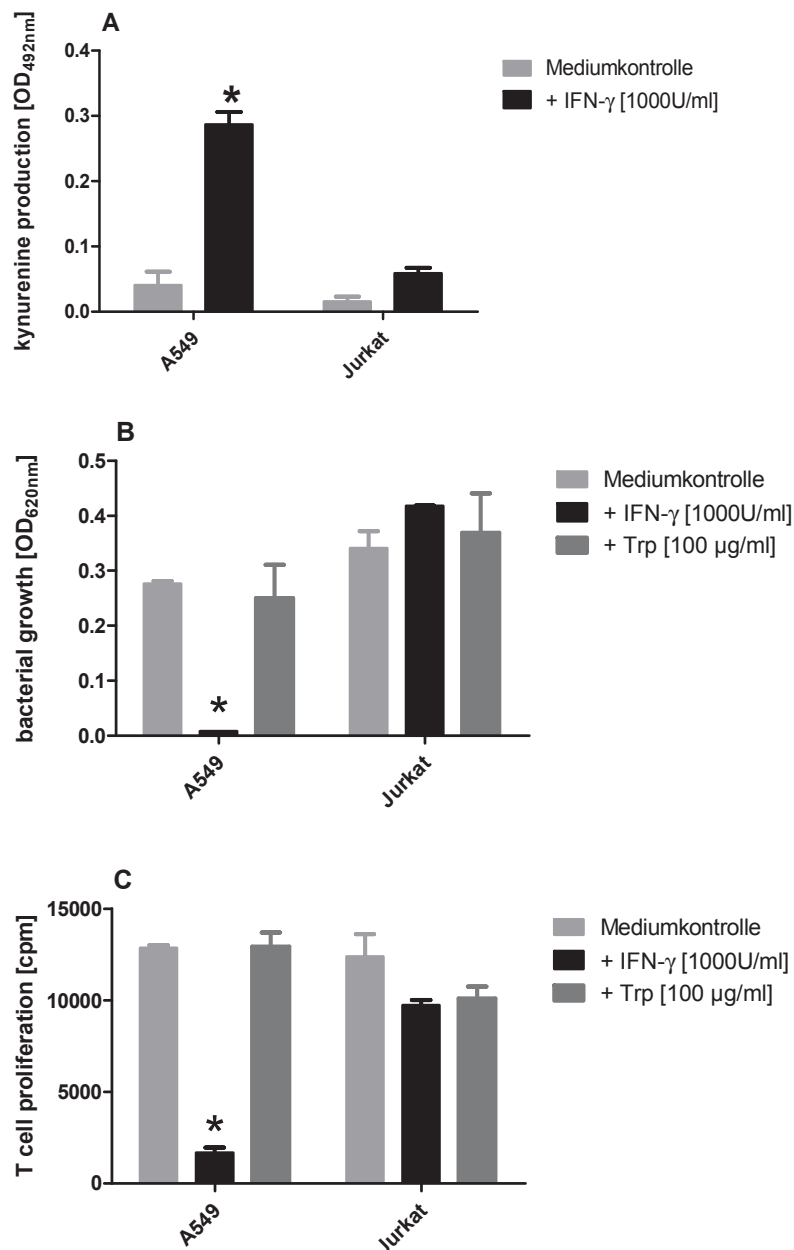
Abbildung 3.4 zeigt auch bei naiven humanen Fibroblasten (HFF) einen IDO-vermittelten T-Zellinhibitorischen Effekt. Dieser Effekt lässt sich durch Zugabe des IDO-spezifischen Inhibitors 1-L-MT zu Beginn der IFN- $\gamma$  Stimulation aufheben. Ebenso hebt eine Tryptophansupplementation in der Proliferationsphase den T-Zellinhibitorischen Effekt der IDO auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit den anderen Tumorzellen erhoben (Daten nicht gezeigt).

### 3.2 Ausschluss eines IDO-unabhängigen IFN- $\gamma$ Effekts

In den bisher gezeigten Versuchen wurden antibakterielle und immunregulatorische Effekte in konditionierten Medien von IDO-positiven Zellen untersucht. Um auszuschließen, dass das in diesen konditionierten Medien vorhandene IFN- $\gamma$  einen direkten Einfluss auf die gemessenen Effekte hat, wurden im Folgenden der Versuchsaufbau mit Zellen wiederholt, die nicht in der Lage sind IDO unter IFN- $\gamma$  zu exprimieren.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass Lymphozyten keine IDO-Aktivität aufweisen, wurde in diesen Versuchen eine T-Zelleukämielinie, die Jurkat-Zellen, verwendet. Wie Abbildung 3.5 A gezeigt, produzieren diese Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation kein Kynurenin (siehe Abb. 3.5 A). Bakterien (Abb. 3.5 B) und T-Zellen (Abb. 3.5 C) proliferieren in dem konditionierten Medium dieser Zellen unbeeinflusst. Eine Tryptophan-Supplementation hat unter diesen Bedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum.

Im Vergleich zu den Abbildungen Abb. 3.2-3.4 geben die Daten in Abb. 3.5 B und C einen Hinweis darauf, dass das im konditionierten Medium enthalten IFN- $\gamma$  keinen direkten Einfluss auf das Wachstum von Bakterien und T-Zellen hat. Dies kann als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass allein die durch die IDO reduzierte Tryptophankonzentration für die Inhibition des Bakterienzellwachstums und der T-Zellen verantwortlich ist.



**Abb. 3.5: Vergleich der antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte der IDO im Vergleich mit einer IDO-negativen Jurkat-Zelle.**

Um mögliche Nebeneffekte durch die IFN- $\gamma$  Stimulation außer der IDO-Aktivität auszuschließen, wird der gleiche Versuchsaufbau für verschiedene Zellen gewählt. In A wird der Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin nach IFN- $\gamma$  Stimulation photometrisch gemessen. In B erfolgt erneut eine Anzucht von *Staphylococcus aureus* im Überstand einer für 3d mit IFN- $\gamma$  stimulierten Zelle mit und ohne Supplementation von Tryptophan. Nach einer Inkubation von 24h wird photometrisch das bakterielle Wachstum bestimmt. In C werden in diesen Überständen mit und ohne Tryptophan-Supplementation PBMC kultiviert und nach 72h mittels radioaktiver Markierung mit  $^3\text{HT}$  deren Proliferation gemessen. Die antibakteriellen und immunregulatorischen Effekte zeigen sich nur bei der A549-Zelle, die IDO exprimieren kann, nicht jedoch bei der IDO-negativen Jurkatzelle (\* markiert signifikante Effekte bei den A549 Zellen, jeweils  $p < 0,005$ ; mit Jurkat-Zellen lässt sich unter Stimulation kein signifikanter Effekt messen A:  $p = 0,33$ ; B:  $p = 0,69$ ; C:  $p = 0,28$ ). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen dargestellt.

### 3.3 TDO-vermittelte antibakterielle und immunsuppressive Effekte

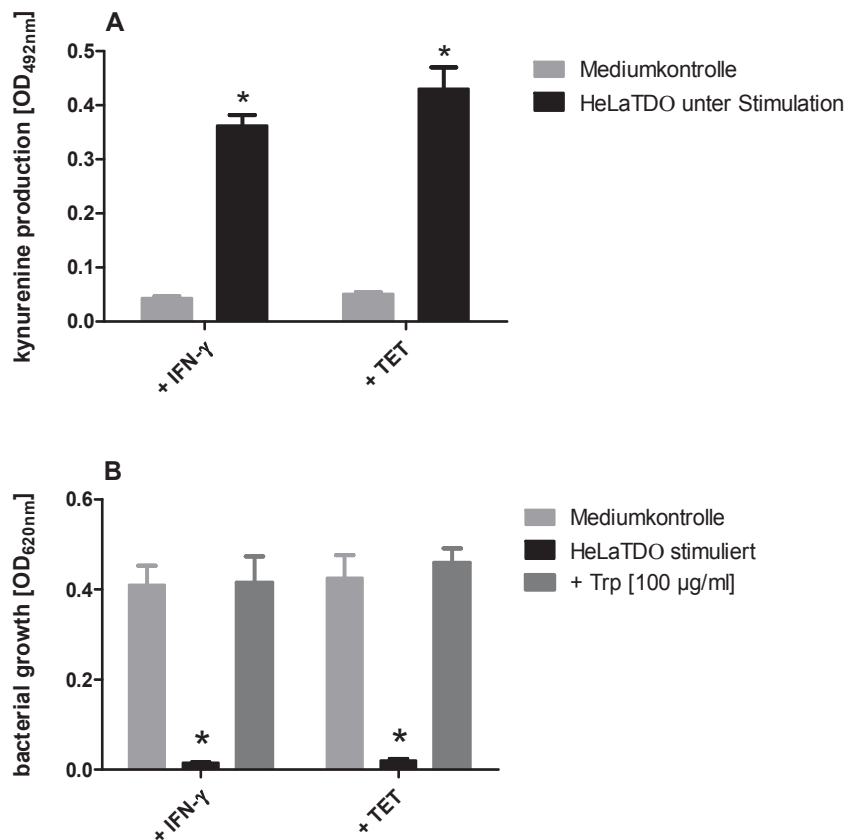
Die bisherigen Daten belegen, dass die Reduktion der Tryptophankonzentration für die antibakteriellen und immunregulatorischen Effekte derIDO verantwortlich ist. Nun gilt es zu überprüfen, ob diese Effekte auch hervorgerufen werden können, wenn der Tryptophanabbau durch ein Enzym anderer Struktur erfolgt. Dazu wurden HeLa-Zellen verwendet, die nach Tetrazyklin-Stimulation die humane TDO rekombinant exprimieren (HeLa-TDO-Zellen) (Schmidt *et al.*, 2009).

Ferner können HeLa-Zellen wie in Abb. 3.1 und Abb. 3.2 nach IFN- $\gamma$  Stimulation auch IDO exprimieren.

Zunächst wurde die Kynureninproduktion von HeLa-TDO-Zellen nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 A dargestellt und zeigen, dass die IDO-Aktivierung mit IFN- $\gamma$  und die TDO-Aktivierung durch Tetrazyklin zu einer quantitativ ähnlichen Kynureninproduktion führt.

Ferner können HeLa-TDO-Zellen nach IFN- $\gamma$ - oder TET-Stimulation bakterielles Wachstum aufheben. Auch dieser antibakterielle Effekt ist durch eine Tryptophan-Depletion vermittelt, da eine Supplementation von Tryptophan diesen Effekt vollständig aufhebt (Abb. 3.6 B).

Dies ist ein Hinweis, dass auch die TDO durch die Tryptophandepletion antibakterielle Effekte vermitteln kann. In den folgenden Versuchen wird überprüft, ob die TDO auch immunregulatorisch wirken kann. Dazu wurden erneut konditionierte Überstände von HeLa-TDO-Zellen hergestellt und als Kulturmedium für T-Zellen verwendet. In einem ersten Ansatz wurden PBMC in den konditionierten Medien mit dem anti-CD3-Antikörper stimuliert. Auch in diesem Ansatz, wie in Abb. 3.7 A ersichtlich, führt die TDO-vermittelte Tryptophandegradation zu einer signifikanten Hemmung des T-Zellwachstums. Die TDO vermittelt eine der IDO quantitativ vergleichbaren T-Zellinhibition. Alle bisher gezeigten Stimulationsansätze wurden mit OKT3 durchgeführt. In einem zusätzlichen Ansatz wurde eine allogene T-Zellstimulation verwendet. Dazu wurden PBMC von unterschiedlichen Spendern gemeinsam in den konditionierten Medien der HeLa-TDO-Zellen kultiviert. Wie Abb. 3.7 B zeigt, wird auch diese allogene Stimulation von T-Zellen sowohl durch einen IDO als auch TDO-vermittelten Tryptophanmangel gehemmt.

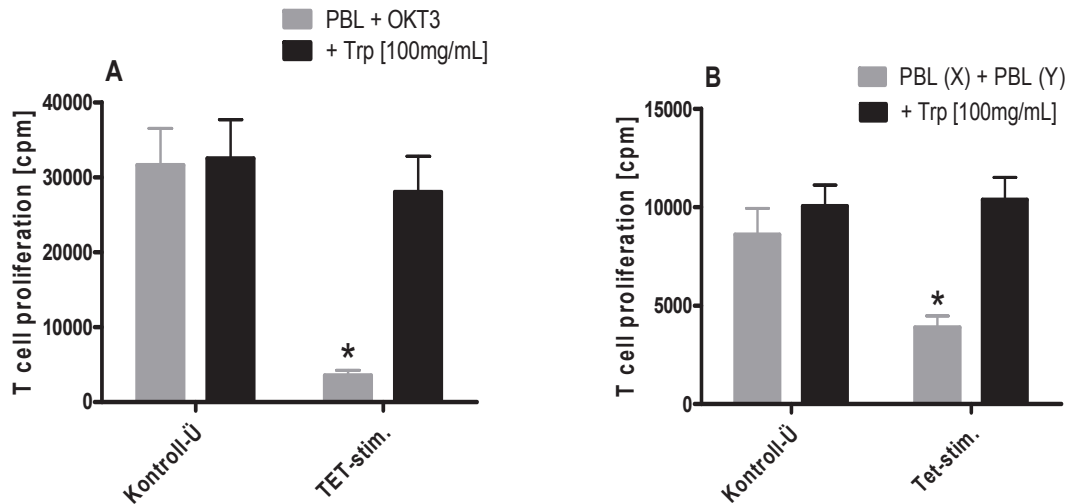


**Abb. 3.6: Kynureninproduktion und antibakterielle Effekte von HeLaTDO-Zellen.**

Transformierte HeLa Zellen wurden mit IFN- $\gamma$  oder Tetrazyklin stimuliert. Nach 72h wurde das konditionierte Medium geerntet. In A wird die Kynureninproduktion nach IFN- $\gamma$  Stimulation bzw. nach Tetrazyklin-Stimulation photometrisch gemessen. In B erfolgt eine Anzucht von *Staphylococcus aureus* im konditionierten Medium, das zum Teil zum Zeitpunkt der Infektion mit Tryptophan supplementiert wurde. Nach einer Inkubation von 24h wird photometrisch das bakterielle Wachstum bestimmt. Zu A: unter Stimulation zeigen die HeLaTDO Zellen jeweils eine signifikante Kynurenin-Produktion (\*  $p < 0,005$ ). Zu B: unter Stimulation zeigen die HeLaTDO Zellen jeweils eine signifikante Inhibition des bakteriellen Wachstums (\*  $p < 0,005$ ). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

In Abb. 3.6 konnte ein antibakterieller Effekt und in Abb. 3.7 ein immunsuppressiver Effekt von HeLa-TDO-Zellen nachgewiesen werden. Dabei spielt es keine Rolle, ob der Tryptophanmangel durch dieIDO oder durch die strukturell unterschiedliche TDO hervorgerufen wird. Beide Effekte lassen sich durch Tryptophansupplementation nahezu vollständig aufheben. Dies ist ein Hinweis darauf, dass dieIDO-vermittelten Effekt allein durch die Enzymfunktion vermittelt werden und weitereIDO-Protein-abhängige Effekte nicht vorliegen.



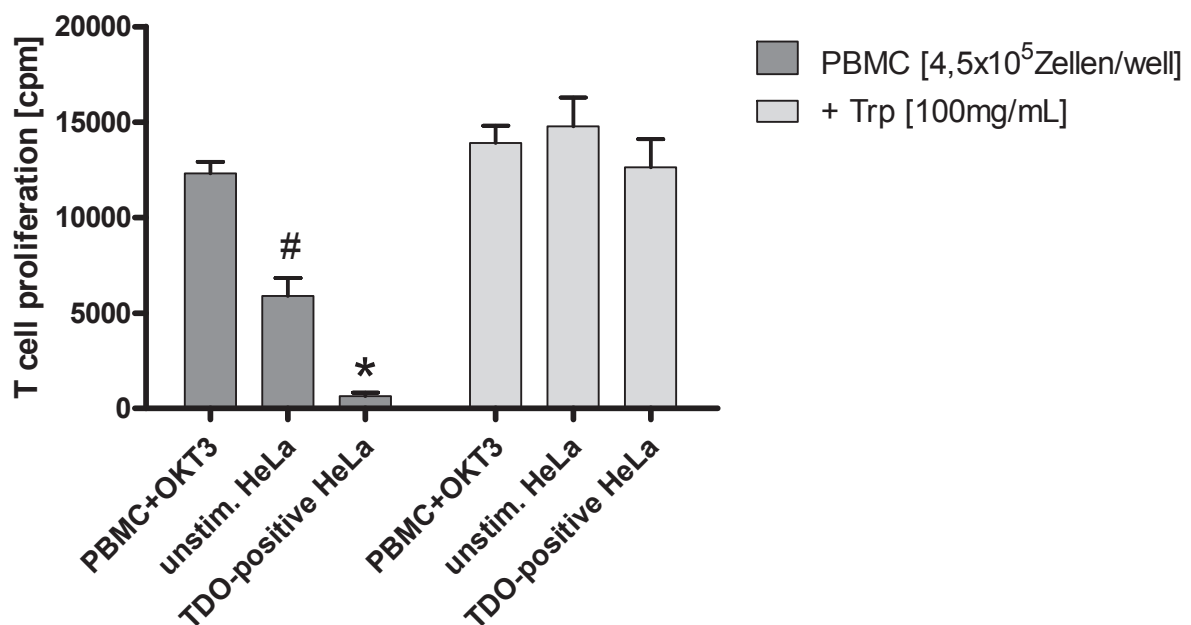


**Abb. 3.7: Inhibition der T-Zellproliferation durch Tryptophan-Degradation durch die TDO unter OKT3-Stimulation und als Allo-Antwort.**

Durch TET-Stimulation werden die HeLa-Überstände Tryptophan-degradiert und werden als Inkubationsmedium für humane PBMC verwendet. Bei einem Teil der Ansätze wird Tryptophan in einer Konzentration von 100µg/ml supplementiert. Zur Aktivierung werden die Lymphozyten in A mit anti-CD3-AK OKT3 stimuliert, in B handelt es sich um eine Allo-Antwort, weil zu den Lymphozyten des Spenders X alloreaktive durch Bestrahlung inaktivierte Lymphozyten eines Spenders Y zugegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 72h werden die proliferierenden T-Zellen mittels radioaktivem  $^3\text{HT}$  markiert. Nach weiteren 24h Inkubationszeit wird die Menge des in die Zellen eingebauten  $^3\text{HT}$  gemessen, um das Ausmaß der T-Zellproliferation zu bestimmen. In A und B zeigt sich eine signifikante Inhibition der T-Zellproliferation unter TDO-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Mediumkontrolle (A \*  $p < 0,001$ ; B \*  $p < 0,001$ ). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

### 3.4 Direkte immunregulatorische Effekte von HeLa-TDO-Zellen

Um einem den *in-vivo* Bedingungen näheren Modell zu gelangen, wurden im Folgenden die TDO-positiven Zellen direkt mit anti-CD3-Antikörper stimulierten T-Zellen kokultiviert. Es wurden  $3 \times 10^4$  HeLa-TDO-Zellen pro well entweder mit IFN- $\gamma$  oder TET stimuliert. Als Kontrolle wurden unstimulierte HeLa-TDO-Zellen und eine reine Mediumkontrolle ohne Zellzugabe verwendet. Nach einer Inkubation von 72h wurden den einzelnen Ansätzen  $4,5 \times 10^5$  PBMCs pro well zugegeben und mit anti-CD3-Antikörper stimuliert. Nach einer weiteren Inkubation von 72h wird mittels  $^3\text{HT}$ -Inkorporation die T-Zell-Proliferation quantifiziert (Abb. 3.8).



**Abb. 3.8: T-Zell-Proliferation zusammen mit TDO-aktiven transformierten HeLa-Zellen.**

Jeweils  $3 \times 10^4$  HeLaTDO-Zellen werden jeweils ohne und mit Stimulation (TET) für 72h inkubiert. Es gibt zwei Kontrollgruppen: Es wird die Aktivität stimulierter PBMC mit und ohne Tryptophan gemessen (jeweils erste Säule). Die zweite Kontrollgruppe besteht aus unstimulierten HeLa-TDO-Zellen (jeweils zweite Säule). Im Anschluss werden jeweils  $4,5 \times 10^5$  anti-CD3-Antikörper stimulierte PBMC kokultiviert, einer Hälfte der Ansätze wird Tryptophan supplementiert. Nach weiteren 72h wird  $^3\text{HT}$  zugeben und nach weiteren 24h über den Einbau des radioaktiven Thymidin die Proliferation der T-Zellen bestimmt. Bei der Kokultivierung unstimulierter HeLa-Zellen mit PBMCs zeigt sich eine halbmaximale Inhibition der T-Zellproliferation im Vergleich zur Mediumkontrolle (#  $p = 0,035$ ). In der Gruppe der stimulierten HeLa-TDO Zellen zeigt sich eine vollständige und signifikante Inhibition der T-Zellproliferation (\*  $p < 0,001$ ). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

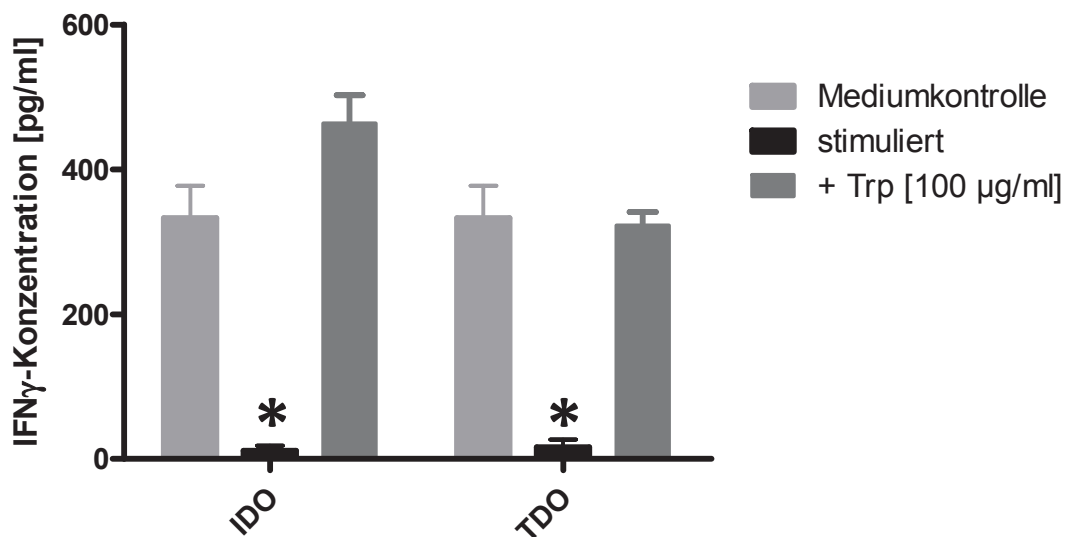
Wie in Abb. 3.7 wird auch hier deutlich, dass durch die Aktivierung der TDO T-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt werden. Auch lässt sich hier dieser direkt zellvermittelte Effekt durch die Zugabe von Tryptophan aufheben. Auffällig ist jedoch, dass bereits bei

der Kokultivierung OKT3-aktivierter PBMC mit unstimulierten HeLa-Zellen eine halbmaximale Hemmung der T-Zellproliferation im Vergleich zum Versuchsansatz ohne HeLa-Zellen zu beobachten ist.

### 3.5 Einfluss der IDO auf die Zytokinproduktion von T-Zellen

In den bisherigen Versuchen wurde als Maß für die T-Zellinhibition die Inkorporation von  $^3\text{HT}$  bestimmt. Die  $^3\text{HT}$ -Einbau korreliert mit der Proliferationsaktivität der T-Zellen. Da aktivierte T-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, wurde nun überprüft, ob auch diese T-Zellfunktion durch Tryptophanmangel inhibiert wird.

Dazu wurden die konditionierten Überstände von HeLa-TDO-Zellen als Kulturmedium für anti-CD3-Antikörper stimulierte T-Zellen verwendet. Nach 3d Stimulation wurden die Kulturüberstände geerntet und die IFN- $\gamma$  Konzentration mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb.3.9 dargestellt.



**Abb. 3.9: Abhängigkeit der IFN- $\gamma$ -Produktion von der T-Zellproliferation.**

Es wurden HeLa-TDO-Zellen durch Stimulation entweder mit IFN- $\gamma$  oder TET dazu aktiviert, IDO bzw. TDO zu exprimieren und so das Tryptophan im Medium vollständig abzubauen. Diese Tryptophan-degradierten Überstände werden als Kulturmedium für PBMC verwendet, die über 72h unter anti-CD3-Aktivierung proliferieren. Im Anschluss wird die Produktion dieser proliferierenden T-Zellen mittels IFN- $\gamma$  ELISA gemessen. Die durch die IDO bzw. TDO in ihrer Proliferation gehemmten T-Zellen stellen also auch die Produktion der Zytokine ein, die signifikante Reduktion ( $P < 0,001$ ) ist gekennzeichnet (\*). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus drei verschiedenen Experimenten mit jeweils zweifachen Ansätzen dargestellt.

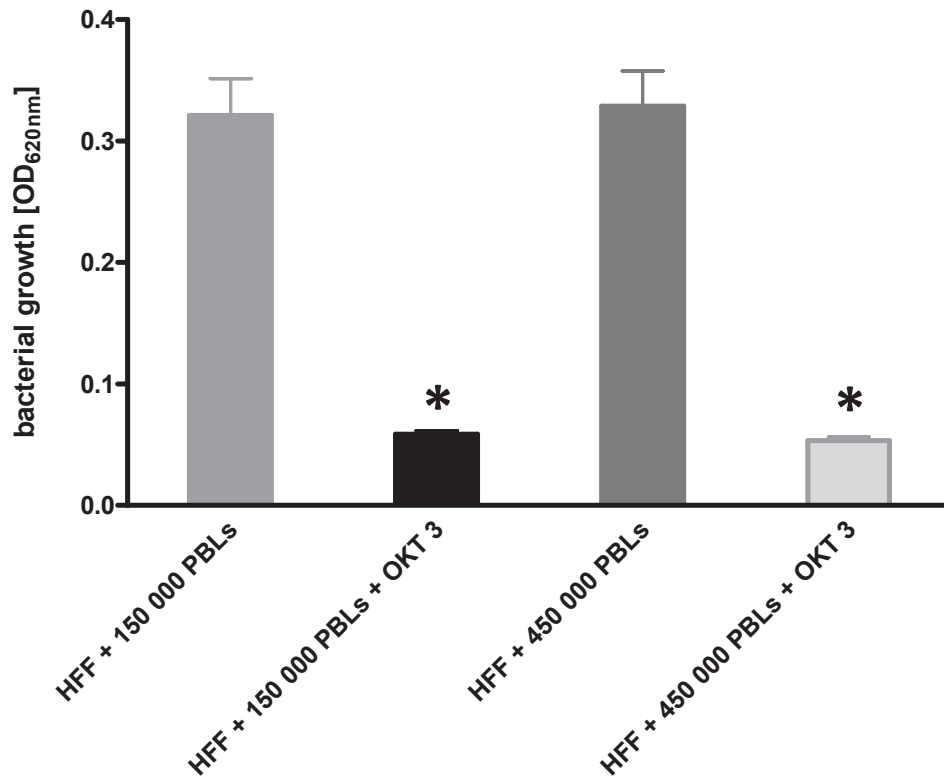
Durch die IDO-Aktivität wurden die T-Zellen nicht nur in ihrer Proliferation sondern auch in ihrer IFN- $\gamma$ -Produktion gehemmt. Dieser Effekt lässt sich dadurch antagonisieren, dass man das durch die IDO-Aktivität depletierte Tryptophan ersetzt. Unter Stimulation mit Tetrazyklin wird kein additives IFN- $\gamma$  zugegeben wird. Auch in der Gruppe der TDO zeigt sich eine deutlich reduzierte IFN- $\gamma$  Produktion. Supplementiert man diese Gruppe mit Tryptophan lässt sich eine IFN- $\gamma$  Produktion nachweisen. Dieser Anteil entspricht der

Menge IFN- $\gamma$ , die von den PBMC produziert wurde (Abb.3.9). So lässt sich vermuten, dass die T-Zellen nicht nur in ihrer Fähigkeit zur Proliferation, sondern auch in ihrer Eigenschaft Zytokine zu produzieren durch die durchIDO- bzw. TDO-Aktivität gehemmt werden.

### **3.5.1 Das von aktivierten Zellen produzierte IFN- $\gamma$ reicht aus, eine IDO-Aktivität zu induzieren, die bakterielles Wachstum hemmt**

In einem nächsten Schritt wird untersucht, ob das von aktivierten T-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  in humanen Fibroblasten eine zur Hemmung des Bakterienwachstums ausreichende IDO-Aktivität induzieren kann. Dazu wurden HFF-Zellen (30 000 Zellen) mit peripheren Blutlymphozyten zusammen für 72h inkubiert, jeweils mit unterschiedliche Konzentrationen an Lymphozyten (150 000 und 450 000 Zellen) und jeweils mit und ohne dem T-Zell-aktivator anti-CD3-AK. Im Anschluss werden die Kulturen für 24h mit *Staphylococcus aureus* infiziert und danach wird das bakterielle Wachstum photometrisch bestimmt (Abb.3.10).

Eine signifikante Inhibition der Bakterien findet sich in den Gruppen der aktivierten Lymphozyten mit den HFF-Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die aktivierten proliferierenden T-Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, dass bei den kokultivierten Fibroblasten zu einer IDO-Expression führt. Die aktive IDO metabolisiert nun das vorhandene Tryptophan, so dass es durch den Tryptophanmangel zu einer Inhibition des bakteriellen Wachstums kommt.



**Abb. 3.10:** Das durch die stimulierten T-Zellen produzierte IFN- $\gamma$  führt zurIDO-Expression in Fibroblasten, wodurch das Bakterien-Wachstum direkt gehemmt wird.

HFF-Zellen (30 000 Zellen) wurden mit peripheren Blutlymphozyten zusammen für 72h inkubiert, jeweils unterschiedliche Konzentrationen an Lymphozyten (150 000 und 450 000 Zellen) und jeweils mit und ohne dem T-Zellaktivator anti-CD3-AK OKT3. Im Anschluss werden die Kulturen für 24h mit *Staphylococcus aureus* infiziert. Danach wird das bakterielle Wachstum photometrisch bestimmt. Eine signifikante Hemmung ( $P < 0,01$ ) des bakteriellen Wachstums ist gekennzeichnet (\*). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus zwei verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt.

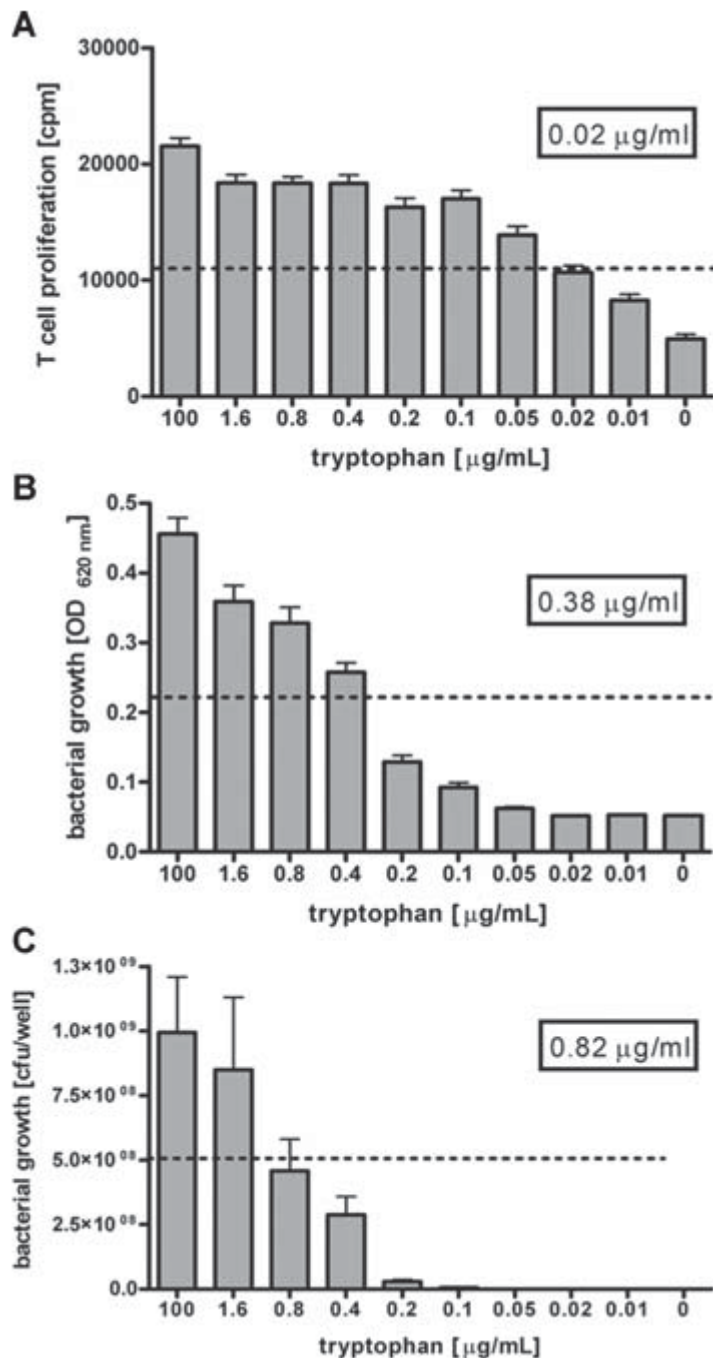
### 3.6 Der unterschiedliche Tryptophanbedarf zwischen Bakterien und T-Zellen

Nachdem in dieser Arbeit mehrfach die inhibitorischen Effekte der IDO sowohl auf bakterielles Wachstum als auch auf die T-Zellproliferation gezeigt wurden, stellt sich die Frage, wie diese zwei scheinbar gegensätzlichen Funktionen sinnvoll bei der immunologischen Abwehr vereinbar sind.

Um die scheinbar gegensätzlichen Funktionen des IDO-Enzyms näher zu untersuchen, wurde der jeweilige Schwellenwert in der Tryptophankonzentration ermittelt, bei dem einerseits die Bakterien als auch andererseits die T-Zellen noch ein Wachstum aufweisen. Dazu wurden die Überstände IDO-aktiver Zellen geerntet und als Kulturmedium verwendet. Diesen vollständig Tryptophan-depletierten Überständen wurden unterschiedliche Mengen Tryptophan titriert zugegeben. Es wurde die Tryptophan-Konzentration bestimmt, bei der eine halbmaximale Inhibition des bakteriellen Wachstums bzw. der T-Zellproliferation vorliegt.

Für diese Analysen wurden zwei verschiedene Verfahren zur Messung des Bakterienwachstums verwendet. Zum Einen wurde die Bakterienmenge durch Trübungsmessung ( $OD_{620}$ ) bestimmt (Abb. 3.11 B). Zum Anderen wurde als sensitiveres System die Anzahl der *colony-forming-units* bestimmt, und somit die Anzahl an vitalen Bakterien erfasst (Abb. 3.11 C).

Abb. 3.11 B zeigt das bakterielle Wachstum gemessen über die optische Dichte in dem Wellenlängenbereich von 620nm. In den Tryptophan-depletierten Überständen ist das bakterielle Wachstum gehemmt. Durch die Zugabe von Tryptophan in Abhängigkeit von der Menge des supplementierten Tryptophans lässt sich dieser Effekt aufheben. Eine halbmaximale Hemmung des bakteriellen Wachstums zeigt sich bei einer Gesamttryptophankonzentration von etwa  $0,38\mu\text{g/mL}$  (entsprechend  $1,9\mu\text{M}$ ). Die gleichen Tryptophan-depletierten Überstände werden nun auch als Kulturmedium für PBMC verwendet (Abb. 3.11 A).



**Abb. 3.11: Unterschiede im Tryptophanbedarf zwischen T-Zellen und Bakterien.**

Die mit IFN- $\gamma$  inkubiert Überstände von A549-Zellen werden nach 72h geerntet und als Kulturmedium verwendet. Anti-CD3-aktivierte T-Zell-Proliferation in konditionierten Überständen in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen Tryptophankonzentrationen (A). Staphylokokkenwachstum in konditionierten Überständen in Ab- und Anwesenheit von unterschiedlichen Tryptophankonzentrationen nach 24h photometrisch bestimmt (B) oder es erfolgte eine Bestimmung der Colony forming Units nach Kultivierung (C). Die Daten wurden als Durchschnittswerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus 18 verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Die gepunktete Linie gibt die jeweilige halbmaximale Hemmung an. Der Tryptophanbedarf von T-Zellen ist im Vergleich zu Bakterien für alle Tryptophankonzentrationen kleiner 0,8mg/mL signifikant geringer ( $P < 0,0014$ ).

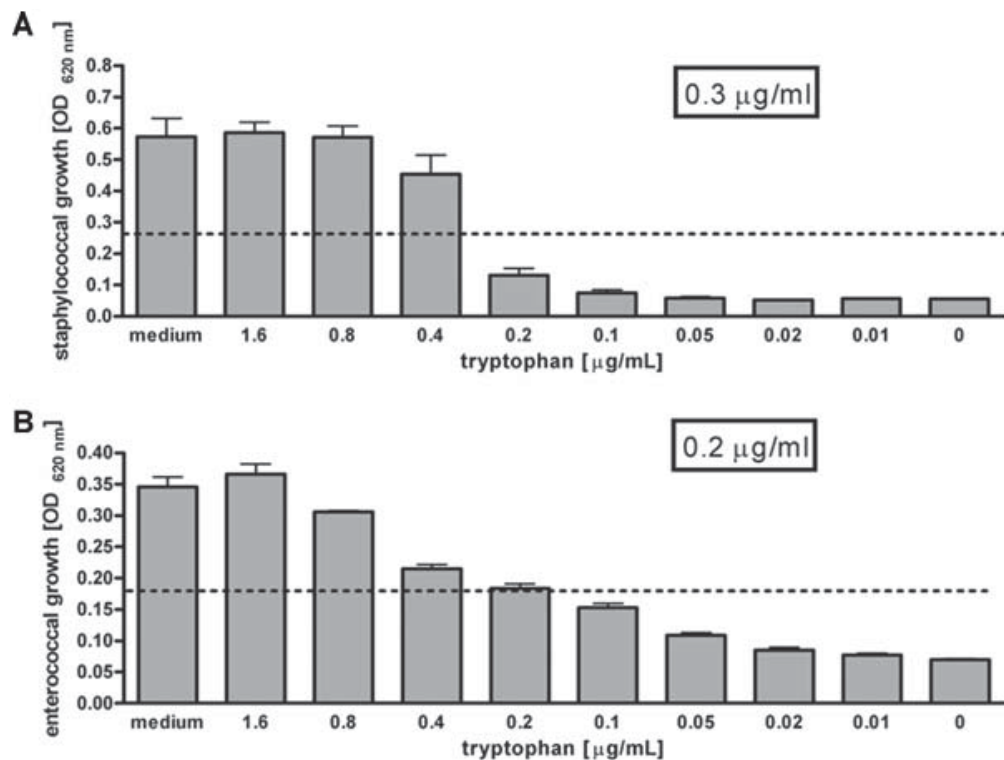


Auch hier zeigt sich der inhibitorische Effekt der Tryptophan-depletierten Überstände auf die T-Zellproliferation. Hier wird die Proliferation um etwa 70% gesenkt. Die halbmaximale Hemmung der T-Zellproliferation, also die Tryptophankonzentration bei der etwa nur noch 50% der T-Zellproliferation vorhanden ist, findet sich hier bei nur etwa 0,02 µg/mL (entsprechend 0,1 µM) (Abb. 3.11 A). Es liegt ein 19-facher Unterschied im Tryptophanbedarf zwischen Bakterien und T-Zellen vor. Bei der Bestimmung von *colony-forming-units* zur Erfassung vitaler Bakterien zeigt sich ebenfalls, dass sich das Wachstum der Bakterien erheblich von den Tryptophan-depletierten Überständen inhibieren lässt und zwar von  $10^9$ CFU/well in der Kontrollgruppe auf 1 CFU/well in der Gruppe der depletierten Überstände. Die Halbmaximale Inhibition des bakteriellen Wachstums mittels der CFU-Methode wurde bei einer Tryptophan-Konzentration von etwa 0,82µg/mL (entsprechend 4,1µM) ermittelt. Diese Konzentration entspricht einer 41-fach höheren Konzentration an Tryptophan als derjenigen, die für ein 50%iges Wachstum der T-Zellen ausreicht. Somit liegt der Tryptophanbedarf der Bakterien erheblich über dem der T-Zellen.

### 3.6.1 Bestimmung des Tryptophanbedarfs anderer Bakterien

Alle Experimente in Abb. 3.11 wurden mit einem Isolat von *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Um sicherzustellen, dass der vergleichsweise hohe Tryptophanbedarf auch auf andere Bakterien übertragbar ist, wurden weitere Bakterienstämme analysiert. Zunächst wurden andere Stämme von *Staphylococcus aureus*, im Besonderen ein MRSA-Stamm, getestet (Abb. 3.12 A).

Bei dem MRSA-Stamm zeigte sich eine halbmaximale Hemmung des bakteriellen Wachstums bei einer Tryptophankonzentration von 0,3µg/mL. Darüber hinaus wurden auch vier verschiedene Enterokokken-Isolate auf ihren Tryptophanbedarf untersucht (Abb. 3.12 B). Die Enterokokken zeigen eine halbmaximale Inhibition bei einer Tryptophankonzentration von 0,2µg/mL. Insgesamt zeigen die Daten aller getesteten Bakterienisolate einen signifikant höheren Tryptophanbedarf für ihr Wachstum als die T-Zellen zur Proliferation benötigen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei einer höheren Tryptophankonzentration das bakterielle Wachstum bereits gehemmt wird, während die T-Zellen noch ungehindert proliferieren können und die T-Zellproliferation erst durch weitaus niedrige Tryptophankonzentrationen beeinflusst wird.



**Abb. 3.12: Bestimmung des Tryptophanbedarfs von verschiedenen Bakterien.**

Vier verschiedene Stämme von *Staphylococcus aureus* (A) und vier verschiedene Stämme Enterokokken (B) werden in mit IFN- $\gamma$  stimulierten Überständen von A549-Zellen in Ab- und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Tryptophan dargestellt. Die Daten wurden als Durchschnittswert  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus vier verschiedenen Experimenten mit jeweils dreifachen Ansätzen dargestellt. Die gepunktete Linie zeigt die jeweilige halb-maximale Hemmung. Bei dem MRSA-Stamm zeigt sich eine halb-maximale Inhibition des Wachstums bei 0,3  $\mu\text{g/mL}$  Tryptophan-Gehalt im Medium und bei Enterokokken zeigt sich eine halb-maximale Inhibition des Wachstums bei 0,2  $\mu\text{g/mL}$ .

## 4 Diskussion

Die Indolamin 2,3 Dioxygenase katalysiert die geschwindigkeitsbestimmende, erste Reaktion des Kynurenin-Stoffwechselweges, dessen Ausgangssubstanz die Aminosäure Tryptophan ist. Die IDO kann in nahezu allen kernhaltigen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert werden. In Anwesenheit von IFN- $\gamma$  wird die IDO-Expression induziert. Die vielen verschiedenen Effekte, die die IDO-Aktivität vermittelt, werden durch den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin hervorgerufen. Die genauen Wirkmechanismen sind jedoch noch unklar und wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Dabei müssen mehrere Aspekte diskutiert werden. Besondere Bedeutung wird dabei der IDO-vermittelten Tryptophanverarmung zugesprochen. Welche Mechanismen durch den Tryptophanmangel in der Zelle ausgelöst werden, wird derzeit noch untersucht. Jedoch gibt es Hinweise auf einen Sensor, den GCN2Kinase-Weg (Munn *et al.*, 2005), der den Abfall der Tryptophan-Konzentration misst. Neben dem Tryptophanmangel wurde lange Zeit auch die Bildung toxischer Kynurenine aus dem Tryptophan diskutiert. Auch dieser Aspekt wurde in dieser Arbeit näher untersucht. Des Weiteren wurden Proteinspezifische, von der Enzymaktivität unabhängige Nebeneffekte des IDO-Enzyms analysiert. Auch Nebeneffekte, die durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  IDO-unabhängig hervorgerufen werden könnten, wurden überprüft. So wurden in dieser Arbeit viele verschiedene Aspekte untersucht, die zum Verständnis der Wirkmechanismen der IDO beitragen.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in den unterschiedlichen Effekten, die durch eine IDO-Aktivität verursacht werden. Auf den ersten Blick scheint es paradox, dass ein Enzym durch seine Aktivität sowohl antimikrobiell wirkt, jedoch auch eine Immunsuppression verursacht. Alle bisher durchgeführten Untersuchungen zur IDO beschäftigen sich entweder mit den antimikrobiellen oder den immunregulatorischen Effekten der IDO-Aktivität. Von unserer Arbeitsgruppe wurden erstmals beide Effekte parallel untersucht und in der vorliegenden Arbeit wurde deren Interaktion in einem Modell zusammengefasst.

#### 4.1 IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte

Die IDO-Aktivität vermittelt antibakterielle, antiparasitäre und antivirale Effekte. Die meisten Untersuchungen erfolgten dabei *in vitro* mit IDO<sup>+</sup> humanen Zellen. Antibakterielle Effekte konnten sowohl gegenüber intrazellulären, als auch an extrazellulären Bakterien gezeigt werden (Pfefferkorn *et al.*, 1984), (Byrne *et al.*, 1986), (Däubener *et al.*, 1999). Es gibt neuere *ex vivo* Analysen zu den antimikrobiellen Effekten der IDO, die sich mit weiteren Erregern beschäftigen. Beispielsweise zeigte die Gruppe um Mao, dass die IDO auch in der humanen Leber antivirale Effekte gegen eine Hepatitis-B-Infektion vermittelt (Mao *et al.*, 2011). In den meisten *in-vitro*-Arbeiten wird der antimikrobielle Effekt der IDO durch Zugabe von Tryptophan und/oder durch Zugabe von 1-Methyltryptophan aufgehoben. Es stellt sich die Frage, ob dieser *in-vitro* häufig gezeigte antimikrobielle Effekt der IDO auch *in vivo* eine Rolle spielt und wie er nachgewiesen werden kann. Naheliegend wäre ein Mausmodell. Jedoch gab es bereits *in vitro* in der Maus Hindernisse die verschiedenen antimikrobiellen Effekte der IDO nachzuweisen.

Es scheint in *in-vitro*-Versuchen im murinen System so zu sein, dass die induzierbare NO-Synthetase iNOS (Scharton-Kersten *et al.*, 1997) und die Produktion von GTPasen (Taylor *et al.*, 2004; Halonen *et al.*, 2001, Degrandi *et al.* 2013) die wichtigsten Abwehrmechanismen gegen Toxoplasmen sind.

In *in-vivo*-Versuchen in der Maus konnte eine IDO-Aktivität nachgewiesen werden. Zunächst konnte Hayashi *et al.* in einem Allergiemodell IDO-Immunreaktivität in der Lunge von Mäusen nachweisen. Er erzeugte durch TLR-9-Stimulation eine IDO-Expression in murinen Alveolarzellen. Diese IDO-Expression in der murinen Lunge führte zu einer T-Zellinhibition (Hayashi *et al.*, 2004).

So konnten trotz der gescheiterten *in-vitro*-Versuche zur IDO-Aktivität in Mäusen, *in-vivo* IDO-vermittelte Effekte erstmals nachgewiesen werden. Es folgten weitere Untersuchungen zur IDO im murinen System. Auch in Malaria-erkrankten Mäusen konnte immunhistochemisch das IDO-Protein nachgewiesen werden (Hanson *et al.*, 2004). Dazu wurden Mäuse mit verschiedenen Stämmen von *Plasmodium berghei* infiziert. Anschließend wurde in den Endothelzellen eine deutlich erhöhte IDO-Expression gemessen.

Die Bedeutung der IDO-Aktivität in infizierten Tieren ist jedoch noch unklar. Es gibt zwei verschiedene Erklärungsmodelle. Einerseits könnte eine IDO-Aktivität während einer Infektion über die T-Zellinhibition zu einer Immunsuppression führen, die eine Chronifizierung der Infektion begünstigt. Diese These vertreten beispielsweise Plain *et al.*, in einer Arbeit zur Paratuberkulose in Schafen (Plain *et al.*, 2011). Andererseits kann die IDO-Aktivität auch als antimikrobieller Abwehrmechanismus gewertet werden. Das Infektionsmodell von Silva *et al.* unterstützt diese These, der IDO als antimikrobieller Abwehrmechanismus. Seine Arbeitsgruppe konnte während einer Toxoplasmenpneumonie einen erheblichen Abfall der Tryptophan-Konzentration bei gleichzeitigem Kynurenin-Anstieg im Lungengewebe nachweisen (Silva *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich formulieren, dass es *in vivo* einige Hinweise für IDO-vermittelte Effekte im murinen System gibt. Allerdings ist es *in vitro* bisher noch nicht gelungen, diese antimikrobiellen Effekte zu zeigen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass in der Maus andere – bisher noch unbekannte - Stimuli eine IDO-Expression hervorrufen als bei humanen Zellen.

Es stellt sich nun die Frage nach der Bedeutung der IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte der IDO im Menschen. Wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt, konnten nicht nur in dieser Arbeit deutliche antimikrobielle Effekte der IDO in humanen Zellen *in vitro* gezeigt werden. Nun wird auch eine *in vivo* Beteiligung der IDO an der Pathogenabwehr im humanen System diskutiert. Beispielsweise wurden im Liquor von Patienten mit einer HIV-Enzephalitis erhöhte Kynurenin-Konzentrationen gefunden, die einen Hinweis auf eine erhöhte IDO-Aktivität geben (Heyes *et al.*, 1992). Weitere Untersuchungen zeigen einen IFN- $\gamma$  abhängigen Abfall der Tryptophankonzentration im Serum. Dies konnte beispielsweise die Gruppe um Becerra und Bosch zeigen. Sie zeigten einen Abfall der Tryptophanserumkonzentration und einen gleichzeitigen Anstieg der Kynureninkonzentration im Serum bei Patienten mit einer akuten Dengue-Fieber-Infektion, den sie auf eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität zurückführten. Sie wiederholten ihr Modell *in vitro* und konnten auch dort in Dengue-Fieber infizierten dendritischen Zellen eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität nachweisen, der sie eine besondere Bedeutung in der Abwehr einer akuten Denguefieber-Infektion zuschreiben (Becerra *et al.*, 2008).

Neben der Indolamin 2,3-dioxygenase wird in verschiedenen Arbeiten auch die Indolamin 2,3-dioxygenase 2 (IDO-2) untersucht. Strukturell verfügen die IDO-2 und die IDO über eine ähnliche Proteinsequenz. Die IDO-2 konnte als Protein sowohl in der Maus als auch im Menschen, jedoch in unterschiedlichen Organsystemen nachgewiesen werden. Durch rekombinante Expression konnte, wenn nur in sehr geringem Ausmaß, gezeigt werden, dass die murine IDO-2 auch in der Lage ist, Tryptophan zu Kynurenin zu metabolisieren (Ball *et al.*, 2009). Zudem lässt sich die Expression von IDO-2 in verschiedenen Spleiß-Varianten in verschiedenen humanen und murinen Zellen nachweisen, die funktionell sehr unterschiedlich sind. Ferner gibt es aktuell keinen Hinweis auf eine Aktivität der IDO-2 *in vivo* (Löb *et al.*, 2008 und 2009). Es gibt Untersuchungen zur Expression der IDO-2 im Maussystem die zeigen, dass im Verlauf einer Plasmodieninfektion im Gegensatz zur IDO die IDO-2 nicht vermehrt exprimiert wird (Ball *et al.*, 2007). So geht man derzeit davon aus, dass die IDO-2 keine besondere Bedeutung im Tryptophankatabolismus hat und daher nicht wesentlich an der Erregerabwehr und Immunregulation beteiligt ist.

## 4.2 Die Bedeutung der IDO in der Immunregulation

Aktuell stehen vorrangig die immunregulatorischen Effekte der IDO im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchungen. Den Anfang machten Mellor und Munn 1998 in ihrer Arbeit zur maternalen Toleranz gegenüber des allogenen Fötus in der murinen Plazenta. Sie zeigten, dass diese Toleranz maßgeblich durch die immunsuppressiven Effekte der IDO-Aktivität hervorgerufen wurde. Dabei hemmt die IDO-Aktivität die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Es folgten zahlreiche Untersuchungen zur IDO-Aktivität in immunkompetenten und nicht-immunkompetenten Zellen. Die durch die IDO hervorgerufene Immunsuppression wird im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder untersucht. Dabei liegen die Schwerpunkte in den Bereichen der Tumorummunologie und der Autoimmunerkrankungen. Zwei der Hauptorgansysteme, an denen sich Autoimmunerkrankungen und Allergien vorrangig manifestieren, sind die Lunge und der Gastrointestinaltrakt. Besonders in diesen Geweben findet man bei einer inflammatorischen Reaktion eine starke IDO-Expression. So wurde in den Alveolarzellen der Lunge in einem experimentellen Asthma-Modell (mit murinen Zellen) eine starke IDO-Expression gemessen (Hayashi *et al.*, 2004). Auch im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen wurde in den Darmepithelzellen des Colons eine starke IDO-Expression nachgewiesen (Torres *et al.*, 2007). Also scheint in diesen stark immunaktiven Geweben eine Beteiligung der IDO bei der Regulation der Immunantwort wahrscheinlich.

Auch in der Tumorummunologie scheinen immunsuppressiven Effekte der IDO von Bedeutung. Tumorzellen die eine IDO-Aktivität aufweisen sind beispielsweise die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Astrozytomzellen A2, die humanen Lungenadenokarzinomzellen A549 und die HeLa-Zellen, Epithelzellen eines humanen Zervixkarzinoms. In viele weitere Studien wurden unterschiedliche Tumorzellreihen auf ihre IDO-Aktivität getestet, unter der Vorstellung dadurch einen prognostischen Faktor zu erlangen (Jacquemier *et al.*, 2012) (von Budnoff *et al.*, 2011).

Tumorwachstum ruft lokale antiinflammatorische Prozesse hervor, die eine T-Zell-Antwort des Erkrankten hemmen. Dies erklärt die Tatsache, dass auch allogene Tumorzellen nicht immer durch eine T-Zell-Antwort des gesunden Empfängers eliminiert werden. Betrachtet man das Tumorwachstum, findet man sowohl in einigen

Tumorzellen selbst, als auch in Antigen-präsentierenden Zellen um den tumorösen Prozess eine vermehrte IDO-Aktivität (Nakamura *et al.*, 2007). Eine vermehrte Aktivität der IDO in den Tumorzellen hemmt die T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen die Tumorantigene direkt im Gewebe. Ein weiterer Wirkort der tumorbedingten IDO-Aktivität zur T-Zellinhibition ist im Lymphknoten angesiedelt. Dort hemmen die tumorassoziierten Antigen-präsentierenden die T-Zellaktivierung (Nakamura *et al.*, 2007).

In Abbildung 3.8 sind die Daten von IDO+ Zellen eines humanen Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) zusammen mit T-Zellen koinkubiert, dargestellt. Es fällt auf, dass bereits in der Positivkontrolle (HeLa-Zellen und T-Zellen ohne IFN- $\gamma$  Stimulation) nur ein eingeschränktes T-Zellwachstum zu erzielen ist. Dieser Effekt lässt sich durch die Zugabe von zusätzlichem Tryptophan aufheben. Ohne zusätzliches Tryptophan proliferieren die T-Zellen zusammen mit den HeLa-Zellen nur etwa halb so stark, wie in der Kontrollgruppe stimulierter T-Zellen ohne HeLa-Zellen. Dies kann dadurch hervorgerufen werden, dass die T-Zellen durch den allogenen Proliferationsstimulus der HeLa-Zellen aktiviert werden und IFN- $\gamma$  produzieren. Dieses IFN- $\gamma$  bewirkt dann bei den HeLa-Zellen eine IDO-Induktion. Durch die IDO-Aktivität werden wiederum die T-Zellen in ihrer Proliferation gehemmt. Dies könnte eine wahrscheinliche Erklärung dafür sein, warum in der Positivkontrolle (nur HeLa-Zellen zusammen mit T-Zellen) keine vollständige T-Zellproliferation erreicht werden kann.

Die Beobachtungen einer IDO-abhängigen verminderten T-Zellabwehr gegen Tumorzellen führten zu den ersten Versuchen, durch eine IDO-Inhibition eine verstärkte körpereigene Immunabwehr gegen die Tumorzellen zu fördern. Beispielsweise testeten Xiangdong *et al.* einen IDO-1 spezifischen Inhibitor (INCB024360) als Therapeutikum an Pankreaskarzinom erkrankten Mäusen. Zunächst zeigten sie *in vitro*, dass der neue IDO-Inhibitor tatsächlich über eine Hemmung der IDO in der Lage ist, die IDO-vermittelte T-Zellinhibition aufzuheben. Diesen neuen Wirkstoff applizierten sie immunkompetenten und immundefizienten Mäusen, die ein IDO+ Pankreaskarzinom hatten. Die immundefizienten Mäuse hatten Störungen in der lymphozytären Immunabwehr. In der Gruppe der immunkompetenten Mäuse, die mit dem Inhibitor behandelt wurden, konnte eine signifikant geringere Zunahme der Tumormasse erhoben werden, als ohne diesen Therapieansatz. In den Gruppen der immundefizienten



Mäuse hingegen konnte kein positiver Einfluss des Inhibitors ermittelt werden. Die Autoren deuten ihre Ergebnisse dahin gehend, dass durch den Einfluss des IDO-Inhibitors die T-Zellabhängige Tumorbekämpfung nicht unterdrückt wird und so eine effektive körpereigene T-Zellvermittelte Elimination von Tumorzellen stattfinden kann (Xiangdong *et al.*, 2010).

Allerdings gibt es nicht nur Untersuchungen, dass die IDO (durch eine T-Zellsuppression) die Tumorbekämpfung hemmt. Viel mehr gibt es auch Hinweise aus in-vitro-Versuchen darauf, dass auch die Tumorzellen selbst durch die Tryptophanverarmung geschädigt werden. Dazu passt eine Arbeit von Yuan *et al.*, die in Gewebeproben eines Nierenzellkarzinoms signifikant höhere IDO-Aktivität nachwies. Sie fanden heraus, dass Patienten mit einer hohen IDO-Expression in den Tumorendothelzellen ein deutlich häufigeres 5-Jahres-Überleben aufwiesen, als die Patienten mit einer geringen IDO-Expression (Yuan *et al.*, 2012). Ähnliche Beobachtungen wurden für Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom erhoben: jeweils die Träger eines IDO+ Karzinoms wiesen ein verlängertes Überleben auf (Ishio *et al.*, 2004). Dem gegenüber steht jedoch, dass bei einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom eine IDO-Expression im Tumorgewebe als prognostisch schlechter Faktor detektiert wurde (Astigiano *et al.*, 2005).

Zusammenfassend ist die IDO in einer Vielzahl von malignen Tumoren exprimiert. Ihre Bedeutung für die Tumorentwicklung und damit für die Prognose ist dabei jedoch noch unklar und wird weiterhin kontrovers diskutiert.

### 4.3 Wirkmechanismen der IDO

Die Wirkmechanismen der IDO sind ebenfalls noch nicht vollständig erfasst. Enzymatisch baut die IDO Tryptophan zu Kynureninen ab. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten die IDO-Wirkmechanismen zu erklären: einerseits durch einen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan, andererseits durch ein Anhäufen toxischer Metabolite des Kynurenins. Dabei scheint es einen Unterschied zu geben, welche Zielzellen durch die IDO beeinflusst werden. Der Wirkmechanismus der antibakteriellen Effekte der IDO scheint durch die Tryptophanverarmung verursacht zu werden. In Tryptophanmangelzuständen teilen sich Bakterien nicht. Dieser inhibitorische Effekt auf die Zellteilung lässt sich durch die Zugabe von Tryptophan wieder vollständig aufheben. Die Anwesenheit von toxischen Metaboliten des Kynurenins hat keinerlei Einfluss auf die bakterielle Vermehrung, einzig die Abwesenheit bzw. Anwesenheit von Tryptophan beeinflusst die Bakterienvermehrung. Die entsprechenden Experimente wurden von unserer Arbeitsgruppe veröffentlicht (Müller *et al.*, 2008).

Bei den immunregulatorischen Effekten der IDO hingegen wird neben der Tryptophanverarmung die Beteiligung toxischer Kynurenin-Metabolite diskutiert. Zeitgleich veröffentlichten die Arbeitsgruppen um Terness und Frumento ihre Ergebnisse zum toxischen Einfluss von Kynurenin auf das T-Zellwachstum (Terness *et al.*, 2002; Frumento *et al.*, 2002). Beide Arbeiten und auch in unseren Versuchen zeigte sich ein negativer Einfluss der toxischen Kynureninmetabolite auf die T-Zellproliferation. Allen Versuchen, die einen negativen Einfluss der toxischen Kynurenine auf die T-Zellen zeigen, ist gemeinsam, dass unphysiologisch hohe Mengen an Tryptophan durch die IDO zu Kynurenin abgebaut wurden. So entstanden sehr hohe Konzentrationen an toxischen Metaboliten. In unseren Versuchen variierten wir daher die Menge des initial zugegebenen Tryptophans. Auch bei Tryptophanmengen im Bereich der physiologischen Serumkonzentration von Tryptophan wurde unter IFN- $\gamma$  Stimulation eine T-Zellhemmung verursacht. Diese ließ sich jedoch durch erneute Zugabe von zusätzlichem Tryptophan wieder aufheben. Im Unterschied dazu blieben die T-Zellen bei hohen Kynurenin-Konzentrationen irreversibel geschädigt, der inhibitorische Effekt ließ sich durch Zugabe von Tryptophan nicht mehr aufheben (Müller *et al.*, 2008). Diese Daten belegen, dass auch bei den T-Zellen die Tryptophanverarmung in den *in vitro*

Experimenten zumindest teilweise für die inhibitorischen Effekte der IDO verantwortlich ist. Die Menge toxischer Kynurenin-Metabolite, die notwendig ist, um die T-Zellen in ihrer Proliferation zu beeinflussen, ist so unphysiologisch hoch, dass dieser Wirkmechanismus *in-vivo* weniger von Bedeutung zu sein scheint.

In unserer Arbeitsgruppe liegen noch nicht veröffentlichte Daten zum Einfluss toxischer Kynureninmetabolite auf IDO+-Tumorzellen vor. Die Daten zeigen, dass IDO+-Tumorzellen deutlich weniger in ihrem Wachstum von den toxischen Kynureninmetaboliten beeinflusst werden als die T-Zellen. Dies könnte als fraglicher *Immun Escape Mechanismus* der Tumorzellen gewertet werden.

Die Arbeitsgruppe um Belladonna zeigte, dass durch IFN- $\gamma$  nicht nur die IDO-Expression induziert wird, sondern auch zeitgleich die weiteren Enzyme des Kynureninstoffwechsels in aktivierten murinen dendritischen Zellen vermehrt exprimiert werden. Durch den Abbau des Kynurenins zu weiteren toxischen Metaboliten werden die aktivierten dendritischen Zellen zu tolerogenen dendritischen Zellen. Es kommt durch die toxischen Metabolite zur Immunsuppression (Belladonna *et al.*, 2006).

Neben den toxischen Kynureninmetaboliten spielt als Wirkmechanismus der IDO die Tryptophanverarmung eine wichtige Rolle. Nimmt in der Mikroumgebung der T-Zelle die Tryptophankonzentration ab, wird der GCN2-Kinase-Weg aktiviert. Durch Aktivierung der GCN2-Kinase wird eine spezifische Stressantwort in der T-Zelle ausgelöst. GCN2 wird durch nicht mit Tryptophan beladene tRNA aktiviert. Der GCN2-Kinase-Stoffwechselweg wurde bekannt als ISR (integrated stress response) und hat Einfluss auf Zellzyklusarrest, Differenzierung, Adaptation und Apoptose. Es folgten Versuche mit GCN2-*knock-out* T-Zellen. Die T-Zellen, denen die GCN2-Kinase als Tryptophansensor fehlte, ließen sich nicht durch eine IFN- $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität in ihrer Proliferation hemmen (Munn *et al.*, 2005).

Neben einem zellintrinsicem Sensor für die Tryptophanverarmung ist auch ein Tryptophan-Speicher-Enzym zum Schutz gegen die Tryptophanverarmung beschrieben worden, die Tryptophanyl-t-RNA-Synthetase. Die Tryptophanyl-t-RNA-Synthetase wird ebenfalls in Anwesenheit von IFN- $\gamma$  von IDO-aktiven Zellen vermehrt exprimiert (Boasso *et al.*, 2005). So wird ihre Aktivität als Schutzmechanismus gewertet. Wird in einer Zelle IDO-Aktivität induziert, wird die Zelle selbst durch diesen Mechanismus vor einer

Tryptophanverarmung geschützt und kann weiterhin Tryptophan zur zelleigenen Proteinbiosynthese bereitstellen.

Diese sehr spezifischen Mechanismen bei Änderung der Tryptophankonzentration sind Hinweise auf die Bedeutung der Tryptophanverarmung als Wirkmechanismus der IDO *in vivo*. Die Effekte, die durch die Kynureninmetabolite verursacht werden, sind unspezifisch und werden eher durch einen direkt toxischen Einfluss hervorgerufen. Ferner ist zu bedenken, dass die Kynureninmetabolite nicht prinzipiell toxisch sind. So ist beispielsweise das bakterielle Wachstum von der Anwesenheit toxischer Kynureninmetabolite vollständig unbeeinflusst (Müller *et al.*, 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurden Nebeneffekte durch die IFN- $\gamma$  Stimulation selbst untersucht und konnten ausgeschlossen werden. Dazu wurden die Effekte einer IFN- $\gamma$  Stimulation von Zellen unterschiedlicher Fähigkeit IDO nach Stimulation zu exprimieren verglichen. Die IFN- $\gamma$  Stimulation von Jurkatzellen, die nach Stimulation keine IDO exprimieren, führte nicht zu antibakteriellen oder T-Zellinhibitorischen Effekten (Abb 3.5). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die antibakteriellen und T-Zellinhibitorischen Effekte allein durch eine IDO-Aktivität verursacht werden.

Zur Klärung der Frage, ob die IDO durch die enzymatische Reaktion allein die oben beschriebenen Effekte hervorrufen kann, oder ob das IDO Protein, unabhängig von seiner Enzymaktivität weitere Effekte vermittelt, wurden zusätzliche Experimente durchgeführt. Dazu verwendeten wir die Tryptophan 2,3 Dioxygenase (TDO). Die TDO unterscheidet sich in seiner Proteinstruktur deutlich von der IDO, sie katalysiert jedoch dieselbe enzymatische Reaktion von Tryptophan zu Kynurenin. In unseren Versuchen mit der TDO konnten wir nachweisen, dass allein der enzymatische Abbau von Tryptophan die entscheidende Aktivität ist. Unabhängig davon welche der beiden Proteinstrukturen (IDO oder TDO) den Abbau von Tryptophan katalysierte, konnten die antibakteriellen und T-Zellinhibitorischen Effekte nachgewiesen werden.

Die TDO ist ein Leber-spezifisches Enzym. Dort ist sie konstitutiv exprimiert, lässt sich jedoch beispielsweise durch das immunsuppressive Cortisol in seiner Aktivität steigern. Die Leber besitzt spezifische, angeborene tolerogene Eigenschaften. Diese Besonderheiten werden bei der allogenen Lebertransplantation deutlich. Im Tiermodell wurden erfolgreich Lebern transplantiert, obwohl nicht einmal eine MHC-Kompatibilität zwischen Empfänger und Spender bestand (Benseler *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde

eine im Empfänger induzierte Toleranz gegenüber alloogenen Antigenen des Spenders nach Lebertransplantation beschrieben (Qian *et al.*, 1997). Der von unserer Arbeitsgruppe gezeigte immunsuppressive Effekte der TDO (Abbildung 3.8 und Schmidt *et al.* 2009) kann in diesem Kontext ebenfalls als gewebstintrinsischer Toleranzmechanismus gewertet werden. Vergleicht man die HeLa-TDO-Zellen mit Hepatozyten, die ebenfalls die TDO exprimieren, kann durch einen ständigen Tryptohanabbau eine T-Zellaktivierung und Proliferation nur eingeschränkt stattfinden. Diese immunologische Sonderstellung der Leber mit ihren tolerogenen Effekten ist sicherlich noch nicht vollständig verstanden und noch viele weitere Einflussfaktoren müssen untersucht werden.

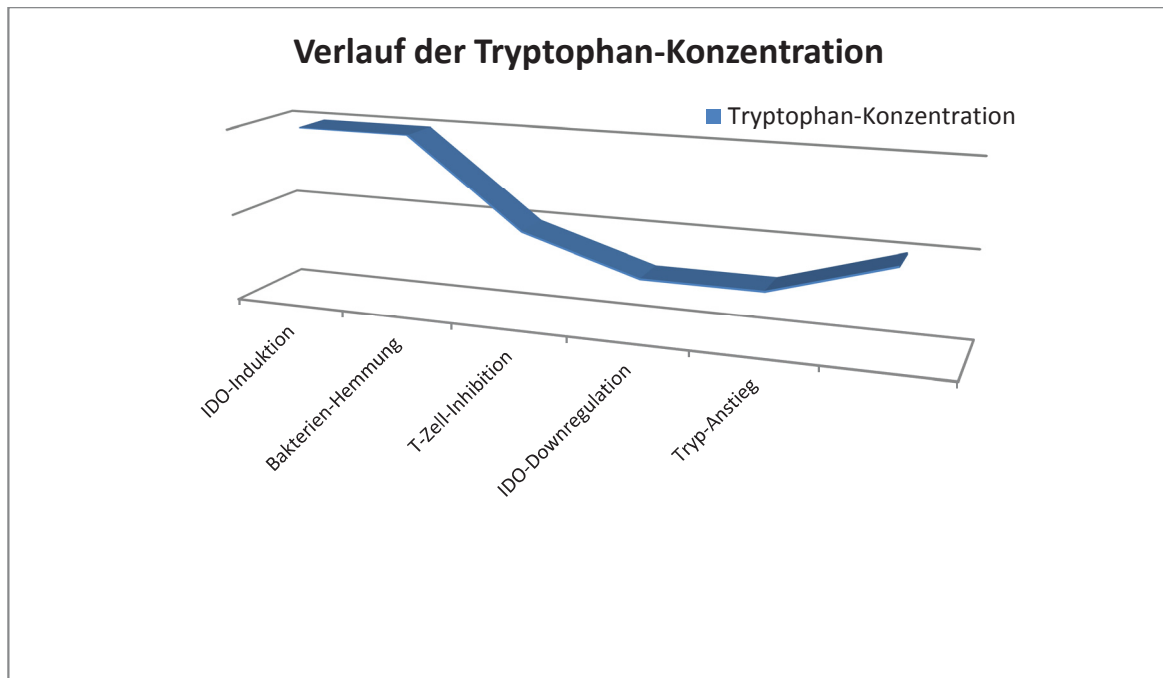
#### 4.4 Die fehlende Verbindung zwischenIDO-vermittelten antibakteriellen und immunregulatorischen Effekten

Die Rolle der IDO ist in der Immunologie weiterhin unklar. Ein Teil der Arbeitsgruppen, die sich mit der Rolle der IDO beschäftigen, beschrieben die IDO, wie oben gezeigt, als Enzym zur antimikrobiellen Abwehr. Dennoch wird es von der Mehrzahl der Autoren auf Grund seiner T-Zellinhibitorischen Eigenschaften als immunsuppressives Enzym beschrieben. Beide scheinbar gegensätzlichen Funktionen konnten bisher noch nicht in einen sinnvollen Zusammenhang gebracht werden. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit gelungen. Vereint man die unterschiedlichen Funktionen der IDO, entsteht ein Modell eines negativen Regulationsmechanismus: im Rahmen einer Infektion wird unter anderem von den T-Zellen IFN- $\gamma$  ausgeschüttet und eine IDO-Aktivität im Gewebe wird induziert. Zunächst wirkt die IDO durch die Tryptophanverarmung gegen den Erreger der Infektion. Im Verlauf nach der Elimination des Erregers kommt es zu einer T-Zell-Inhibition. Dadurch bleibt das IFN- $\gamma$ -Signal aus und die IDO-Aktivität nimmt ab. Es kann zu einer Erholung der Tryptophan-Konzentration kommen. Die Entzündungsreaktion ist beendet.

Dies konnte durch einen deutlichen Unterschied im Tryptophan-Bedarf zwischen Bakterien und T-Zellen belegt werden. Zunächst findet sich mit der Methode der Bakterienwachstumsbestimmung über die optische Dichte ein knapp 20-fach höherer Tryptophanbedarf für Bakterien als für T-Zellen. Um eine genauere Bestimmung des bakteriellen Wachstums zu erzielen wurde in einer erneuten Versuchsreihe die Methode der *colony-forming-units* verwendet und so ein quantitativer Nachweis vitaler Bakterien durchgeführt. Hier stellte sich der Unterschied noch deutlicher dar: ein über 40-fach höherer Unterschied wurde gemessen.

Dieser vergleichsweise hohe Tryptophanbedarf wurde nicht nur für unseren Typstamm von *Staphylococcus aureus* gemessen, sondern fand sich in vergleichbarer Menge auch bei anderen Isolaten der gleichen Bakterienart und auch in anderen Bakterienspezies.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich folgendes Modell (Abb. 4.1) ableiten:



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Verlaufs der Tryptophan-Konzentration im Gewebe während einer bakteriellen Infektion**

In der ersten Phase einer Inflammation kommt es zu einer IDO-Induktion durch IFN- $\gamma$  Stimulation. Durch die IDO-Aktivität wird Tryptophan im Gewebe depletiert, die Tryptophan-Konzentration sinkt ab. Durch den sinkenden Tryptophanspiegel werden zuerst die Bakterien in ihrem Wachstum beeinträchtigt, während die T-Zellen funktionell noch unbeeinflusst bleiben. Mit anhaltender IDO Aktivität wird später im Verlauf der Infektion der Tryptophanspiegel weiter abgesenkt. Da Tryptophan eine essentielle Aminosäure darstellt, ist eine komplette Depletion dieser Aminosäure auch für das Wirtsgewebe schädlich. Daher ist es sinnvoll, wenn durch den Tryptophanmangel eine Hemmung der T-Zellaktivität erreicht wird und damit der Nachschub an IFN- $\gamma$  reduziert wird. Ein erniedrigter IFN- $\gamma$  Spiegel führt dann zu einer geringeren IDO-Aktivität im Gewebe, wodurch ein weiteres Absinken der Tryptophan-Konzentration verhindert wird. Dadurch kann sich die Tryptophan-Konzentration wieder erholen. Das inflammatorische Geschehen ist beendet. Durch den Abwehrmechanismus der IDO-Aktivität wurde die bakterielle Infektion bekämpft. Darüber hinaus findet eine negative Regulation, als ein Schutzmechanismus vor weiteren Schäden an Zellen des Gewebes durch die Tryptophanverarmung, statt.

Um weitere Hinweise auf diese Modells zu erhalten, müssen noch weitere Erreger hinsichtlich ihres Tryptophanbedarfs untersucht werden. Eine Schwierigkeit stellt sich

bei intrazellulären Erregern, da eine weitere IDO-Aktivität während der Experimentaldauer bei diesem Versuchsansatz zu falsch hohen „minimalen Tryptophan-Konzentrationen“ führen kann. Ebenfalls ist der Tryptophanbedarf von Tumorzellen zu untersuchen. Benötigen verschiedene Tumorzellen mehr oder weniger Tryptophan als T-Zellen zum Wachstum? Und es gilt zu beweisen, dass die IDO-aktiven nativen Gewebszellen noch weniger Tryptophan benötigen. Diese Annahme ist wahrscheinlich, da die nativen Gewebszellen im Gegensatz zu Mikroorganismen, T-Zellen und Tumorzellen die geringste Proliferationsrate aufweisen.

Zusammenfassend wurden folgende Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit erzielt: die T-Zell-Inhibition in dem verwendeten Kultursystem ist abhängig von der Tryptophanverarmung. Dabei handelt sich ausschließlich um die Enzymfunktion der IDO. Ein zusätzlicher IFN- $\gamma$  vermittelter Effekt oder ein weiterer Einfluss der IDO-Proteinstruktur konnte als Ursachen der antibakteriellen und immunregulatorischen Effekte ausgeschlossen werden. Im Verlauf des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus ist der unterschiedliche Tryptophanbedarf zwischen Erregern und Abwehrzellen *in-vivo* unter der Vorstellung einer negativen Regulation sinnvoll.



## 5 Zusammenfassung

Zielsetzung der Arbeit ist es zwei völlig gegensätzliche Aufgaben des Enzyms IDO im Immunsystem in einen Zusammenhang zu bringen. Dazu wurden verschiedene humane Zellen gewählt, die durch IDO-Expression und Aktivität, sowohl das Wachstum verschiedener extrazellulärer Bakterien, wie zum Beispiel Staphylokokken, hemmen, als auch die Proliferation von T-Zellen inhibieren. Diese Effekte lassen sich, sowohl durch Zugabe des IDO-spezifischen Inhibitors 1-Methyltryptophan, als auch durch Zugabe Tryptophan aufheben. Auch enzyspezifische Effekte können widerlegt werden, da der katalytische Abbau von Tryptophan zu Kynurenin diese Effekte hervorruft, selbst wenn ein strukturell völlig unterschiedliches Enzym, die TDO, diese Reaktion katalysiert.

Erstmals wurden diese zwei scheinbar gegensätzlichen Effekte des Enzyms IDO im Immunsystem in einen Zusammenhang gebracht. Auf der einen Seite stehen die zuerst genannten Aufgaben der IDO im Bereich der Pathogenabwehr mit ihren antimikrobiellen Effekten. Auf der anderen Seite steht die Hemmung der inflammatorischen Reaktion durch die Inhibition der T-Zell-Proliferation. Ein unterschiedlicher Tryptophanbedarf zwischen bakteriellen Erregern und den T-Zellen des humanen Immunsystems scheint eine Erklärung zu sein. Der Bedarf an Tryptophan ist bei Bakterien um das bis zu 40fache höher als bei humanen T-Zellen.

In der ersten Phase der Inflammation kommt es zu einer IDO-Induktion durch IFN- $\gamma$  Stimulation. Durch die IDO-Aktivität wird Tryptophan im Gewebe depletiert, die Tryptophan-Konzentration sinkt. Durch den sinkenden Tryptophanspiegel werden zuerst die Bakterien in ihrem Wachstum beeinträchtigt, während die T-Zellen funktionell noch unbeeinflusst bleiben. Mit anhaltender IDO Aktivität wird später im Verlauf der Infektion der Tryptophanspiegel weiter abgesenkt. Da Tryptophan eine essentielle Aminosäure darstellt, ist eine komplette Depletion dieser Aminosäure auch für das Wirtsgewebe schädlich. Es wird durch den Tryptophanmangel eine Hemmung der T-Zellaktivität hervorgerufen und damit die Bildung an weiterem IFN- $\gamma$  reduziert wird. Ein erniedrigter IFN- $\gamma$  Spiegel führt dann zu einer geringeren IDO-Aktivität im Gewebe, wodurch ein weiteres Absinken der Tryptophan-Konzentration verhindert wird. Dadurch kann sich die

Tryptophan-Konzentration wieder erholen. Das inflammatorische Geschehen ist beendet. So ist dieser negative Regulationsmechanismus ein Schutz vor weiteren Schäden an Zellen des Gewebes durch die Tryptophanverarmung.

## 6 Literaturverzeichnis

Adam R, Rüssing D, Adams O, Ailyati A, Sik Kim K, Schroten H, Däubener W. (2005). Role of human brain microvascular endothelial cells during central nervous system infection. Significance of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immunoregulation.

*Thromb Hämost* 94, 341-346.

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Rüssing D, Däubener W. (2004a). Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase.

*Microbes and Infection*. 6, 806-812.

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Takikawa O, Däubener W. (2004b). Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections.

*J Virol*. 78, 2632-2636.

Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. (2012).

Defining the human T helper 17 cell phenotype.

*Trends Immunol*. 10, 505-512.

Astigiano S, Morandi B, Costa R, Mastracci L, D'Agostino A, Ratto GB, Melioli G, Frumento G. (2005).

Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non-small cell lung cancer.

*Neoplasia*. 7, 390–396.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. (1997).

The IFN-gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.

*Annu Rev Immunol*. 15, 563-591.

Ball HJ, Sanchez-Perez A, Weiser S, Austin CJ, Astelbauer F, Miu J, McQuillan JA, Stocker R, Jeremiin LS, Hunt NH. (2007).

Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. 396, 203–213.

Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. (2009).

Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway.

*Int J Biochem Cell Biol*. 41, 467–471.

Bazan JF. (1990).

Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily.

*Proc Natl Acad Sci*. 87, 6934–6938.

Becerra A, Warke R, Xhaja K, Evans B, Evans J, Martin K, deBosch N, Rothman A, Bosch I. (2008).

Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function.

*J Gen Viro.* 90, 810-817.

Belladonna ML, Grohmann U, Guidetti P, Volpi C, Bianchi R, Fioretti MC, Schwarcz R, Fallarino F, Puccetti P. (2006).

Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO.

*J Immunol.* 177, 130-137.

Benseler V, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bishop GA, Bowen DG, Bertolino P. (2007).

The liver: a special case in transplantation tolerance.

*Semin Liver Dis.* 27, 194–213.

Beutelspacher SC, Pillai R, Watson MP, Tan PH, Tsang J, McClure MO, George AJ, Larkin DF. (2006).

Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression.

*Eur J Immunol.* 36, 690–700.

Bodaghi B, Gourneau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. (1999).

Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells.

*J Immunol.* 162, 957-964.

Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. (1997).

Cellular responses to interferon-gamma.

*Annu Rev Immunol.* 15, 749-795.

Braun D, Longman RS, Albert ML. (2005).

A two-step induction of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation.

*Blood.* 106, 2375-2381.

Brown RR. (1996).

Metabolism and biology of tryptophan. Some clinical implications.

*Adv Exp Med Biol.* 398, 15-25.

von Bubnoff D, Zahn S, Wenzel J, Wilms H, Bieber T, Lüftl M. (2011).

Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in early keratocyte neoplasia of the lower lip correlates to the degree of cell atypia.

*Pathol Int.* 62, 105-111.

- Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. (1986).  
Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells.  
*Infect Immun.* 53, 347-351.
- Callan MF, Fazou C, Yang H, Rostron T, Poon K, Hatton C, McMichael AJ. (2000).  
CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo.  
*J Clin Invest.* 106, 1251-1261.
- Chen L, Flies DB. (2013).  
Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition.  
*Nat Rev Immunol.* 4, 227-242.
- Chen W. 2011.  
IDO: more than an enzyme.  
*Nat Immunol.* 12, 809-811.
- Dai W, Pan H, Kwok O, Dubey JP. (1994).  
Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells.  
*J Interferon Res.* 14, 313-317.
- Darnell JE Jr., Kerr IM, Stark GR. (1994).  
Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science.* 264, 1415-1421.
- Däubener W, Hucke C, Seidel K, Hadding U, MacKenzie CR. (1999).  
Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infect Immun.* 67, 5615-5620.
- Däubener W, Pilz K, Seghrouchni ZS, Bilzer T, Fischer HG, Hadding U. (1993).  
Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma.  
*J Neuroimmunol.* 43, 31-38.
- Däubener W, Posdziech V, Hadding U, MacKenzie CR. (1999).  
Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production.  
*Med Microbiol Immunol.* 187, 143-147.
- Däubener W, Schmidt SK, Heseler K, Spekker KH, MacKenzie CR. (2009).  
Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells. Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase.  
*Thromb Haemost.* 6, 1110-1116.

Däubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schroten H. (2001).  
Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells  
by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase.  
*Infect Immun.* 69, 6527-6531.

Degrandi D, Kravets E, Konermann C, Beuter-Gunia C, Klümpers V, Lahme S, Wischmann  
E, Mausberg AK, Beer-Hammer S, Pfeffer K. (2012).  
Murine guanylate binding protein 2 (mGBP2) controls *Toxoplasma gondii* replication.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1, 294-299.

Denkers EY, Gazzinelli RT. (1998).  
Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii*  
infection. *Clin Microbiol. Rev.* 11, 569-588.

Divanovic S, Sawtell NM, Trompette A, Warning JI, Dias A, Cooper AM, Yap GS, Arditi M,  
Shimada K, Duhadaway JB, Prendergast GC, Basaraba RJ, Mellor AL, Munn DH, Aliberti J,  
Karp CL. (2012).  
Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular  
infection.  
*J Infect Dis.* 205, 152-161.

Ellis TN, Beaman BL. (2004).  
Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function.  
*Immunology.* 1, 2-12.

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML,  
Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. (2003).  
Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T-cells.  
*Nat Immunol.* 4, 1206-1212.

Fallarino F, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Asselin-Paturel C, Fioretti MC, Trichieri  
G, Grohmann U, Puccetti P. (2005).  
Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan  
catabolism in plasmacytoid dendritic cells.  
*Int Immunol.* 17, 1429-1438.

Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor  
AL, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P. (2002).  
Functional expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic  
cells.  
*Int Immunol.* 14, 65-68.

Feng HM, Walker DH. (2000).  
Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial  
cells, hepatocytes, and macrophages.  
*Infect Immun.* 68, 6729-6736.

Forouhar F, Anderson JL, Mowat CG, Vorobiev SM, Hussain A, Abashidze M, Bruckmann C, Thackray SJ, Seetharaman J, Tucker T, Xiao R, Ma LC, Zhao L, Acton TB, Montelione GT, Chapman SK, Tong L. (2007).

Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2, 473-478.

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. (2002).

Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase.

J Exp Med. 196, 459-68.

Garbi N, Kreuzberg T. (2012).

Dendritic cells enhance the antigen sensitivity of T cells.

Front Immunol. 3, 389.

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. (2002).

CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo.

Nat Immunol. 3, 1097-1102.

Habara-Ohkubo A, Shirahata T, Takikawa O, Yoshida R. (1993).

Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase.

Infect Immun. 61, 1810-1813.

Halonen SK, Taylor GA, Weiss LM. (2001).

Gamma interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* in astrocytes is mediated by IGTP.

Infect Immun. 69, 5573-5576.

Hartman SC, Mulligan RC. (1988).

Two dominant-acting selectable markers for gene transfer studies in mammalian cells.

Proc Natl Acad Sci USA. 85, 8047-8051.

Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E. (2004).

Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase.

J Clin Invest. 114, 270-279.

Heyes MP, Brew BJ, Salto K, Quearry BJ, Price RW, Lee K, Bhalla RB, Der M, Markey SP. (1992).

Inter-relationships between quinolinic acid, neuroactive kynurenines, neopterin and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid and serum of HIV-1-infected patients.

J Neuroimmunol. 40, 71-80.

- Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. (2000).  
Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation.  
*J Immunol.* *164*, 3596-3599.
- Ihle JN. (1996).  
STATs: signal transducers and activators of transcription.  
*Cell.* *84*, 331-334.
- Ishio T, Goto S, Tahara K, Tone S, Kawano K, Kitano S. (2004).  
Immunoactivative role of indoleamine 2,3-dioxygenase in human hepatocellular carcinoma.  
*J Gastroenterol Hepatol.* *19*, 319–326.
- Jacquemier J, Bertucci F, Finetti P, Esterni B, Charafe-Jauffret E, Thibault ML, Houvenaeghel G, Van den Eynde B, Birnbaum D, Olive D, Xerri L. (2012).  
High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in the tumour is associated with medullary features and favourable outcome in basal-like breast carcinoma.  
*Int J Cancer.* *130*, 6-104.
- Janeway Jr CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. (2005).  
Immunobiology, the immune system in health and disease.  
Garland Science Publishing, New York, NY, USA. 6<sup>th</sup> Edition
- Kerr IM, Stark GR. (1991).  
The control of interferon-inducible gene expression.  
*FEBS Lett.* *285*, 194-198.
- Leeds JM, Brown PJ, McGeehan GM, Brown FK, Wiseman JS. (1993).  
Isotope effects and alternative substrate reactivities for tryptophan 2,3 dioxygenase.  
*J Biol Chem.* *268*, 17781-17786.
- Löb S, Königsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. (2008).  
Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells.  
*Blood.* *111*, 2152–2154.
- Löb S, Königsrainer A, Zieker D, Brücher BL, Rammensee HG, Opelz G, Terness P. (2009).  
IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism.  
*Cancer Immunol Immunother.* *58*, 153–157.
- MacKenzie CR, Hadding U, Däubener W. (1998).  
Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci.  
*J Infect Dis.* *178*, 875-878.



- MacKenzie CR, Heseler K, Müller A, Däubener W. (2007).  
Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines.  
*Curr Drug Metab.* 8, 237-244.
- MacKenzie CR, Hucke C, Müller D, Seidel K, Takikawa O, Däubener W. (1999).  
Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells.  
*J Med Microbiol.* 48, 935-941.
- Mao R, Zhang J, Jiang D, Cai D, Levy JM, Cuconati A, Block TM, Guo JT, Guo H. (2011).  
Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect of gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells.  
*J Virol.* 85, 1048-1057.
- Mellor A, Munn D. (2003).  
Tryptophan Catabolism and Regulation of Adaptive Immunity.  
*J Immunol.* 170, 5809-5813.
- Mellor A. (2005).  
Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 338, 20-24.
- Mellor AL, Munn DH. (2004).  
IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.  
*Nat Rev Immunol.* 4, 762-774.
- Miller DM, Rahill BM, Boss JM, Lairmore MD, Durbin JE, Waldman JW, Sedmak DD. (1998).  
Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway.  
*J Exp Med.* 87, 675-683.
- Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. (2008).  
The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects.  
*J Cell Mol Med.* 13, 1125-1135.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. (1999).  
Inhibition of T-cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.  
*J Exp Med.* 189, 1363-1372.
- Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. (2005).  
GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase.  
*Immunity.* 22, 633-642.

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. (2002).

Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase.

Science. 297, 1867-1870.

Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. (1998).

Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.

Science. 281, 1122-1124.

Murakami Y, Hoshi M, Hara A, Takemura M, Arikawa Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Funato T, Seishima M, Saito K. (2012)

Inhibition of increased indoleamine 2,3 dioxygenase activity attenuates Toxoplasma gondii replication in the lung during acute infection

Cytokine. 2, 245-251.

Nakamura T, Shima T, Saeki A, Hidaka T, Nakashima A, Takikawa O, Saito S. (2007).

Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and the recruitment of Foxp3-expressing regulatory T cells in the development and progression of uterine cervical cancer.

Cancer Sci. 6, 874-881.

Oberdörfer C, Adams O, MacKenzie CR, De Groot CJ, Däubener W. (2003).

Role of IDO activation in anti-microbial defense in human native astrocytes.

Adv Exp Med Biol. 527, 15-26.

Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, Takakura S, Saito M, Aoki Y, Ishii N, Yanaihara N, Yamada K, Takikawa O, Kawaguchi R, Isonishi S, Tanaka T, Urashima M. (2005).

Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells.

Clin Cancer Res. 11, 6030-6039.

Pantoja LG, Miller RD, Ramirez JA, Molestina RE, Summersgill JT. (2000).

Inhibition of Chlamydia pneumoniae replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity.

Infect Immun. 68, 6478-6481.

Perkins MN, Stone TW. (1982).

An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid.

Brain Res. 247, 184-187.

Peters JC. (1991).

Tryptophan nutrition and metabolism: an overview.

Adv Exp Med Biol. 294, 345-358.

- Petrova G, Ferrante A, Gorski J. (2013).  
Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system.  
*Crit Rev Immunol.* 4, 349-372.
- Pfefferkorn ER, Guyre PM. (1984).  
Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon.  
*Infect Immun.* 44, 211-216.
- Pfefferkorn ER. (1984).  
Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan.  
*Proc Natl Acad Sci.* 81, 908-912.
- Plain KM, de Silva K, Earl J, Begg DJ, Purdie AC, Whittington RJ. (2011).  
Indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan catabolism, and *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*: a model for chronic mycobacterial infections.  
*Infect Immun.* 79, 3821-3832.
- Qian S, Demetris AJ, Murase N, Rao AS, Fung JJ, Starzl TE. (1994).  
Murine liver allograft transplantation: tolerance and donor cell chimerism.  
*Hepatology.* 19, 916-924.
- Roshick C, Wood H, Caldwell HD, McClarty G. (2006).  
Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells.  
*Infect Immun.* 74, 225-238.
- Roth A, König P, van Zandbergen G, Klinger M, Hellwig-Bürgel T, Däubener W, Bohlmann MK, Rupp J. (2010).  
Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN- $\gamma$  in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo.  
*Proc Natl Acad Sci USA.* 107, 19502-19507.
- Saxena V, Ondr JK, Magnusen AF, Munn DH, Katz JD. (2007).  
The countervailing actions of myeloid and plasmacytoid dendritic cells control autoimmune diabetes in the nonobese diabetic mouse.  
*J Immunol.* 179, 5041-5053.
- Scharton-Kersten TM, Yap G, Magram J, Sher A. (1997).  
Inducible nitric oxide is essential for host control of persistent but not acute infection with the intracellular pathogen *Toxoplasma gondii*.  
*J Exp Med.* 185, 1261-1274.
- Schindler U, Wu P, Rothe M, Brasseur M, McKnight SL. (1995).  
Components of a Stat recognition code: evidence for two layers of molecular selectivity.  
*Immunity.* 2, 689-97.

- Schmidt SK, Ebel S, Keil E, Woite C, Ernst JF, Benzin AE, Rupp J, Däubener W. (2013). Regulation of IDO Activity by Oxygen Supply: Inhibitory Effects on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions. *PLoS One*. 5: e63301. Print 2013.
- Schmidt SK, Müller A, Heseler K, Woite C, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. (2009). Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-Dioxygenase. *Eur J Immunol*. 39, 2755-2764.
- Schröcksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D. 2006. Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clin Chim Acta*. 364, 82-90.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 75, 163-189.
- Schroten H, Spors B, Hucke C, Stins M, Kim KS, Adam R, Däubener W. (2001). Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*. 32, 206-210.
- Schutz G, Beato M, Feigelson P. (1973). Messenger RNA for hepatic tryptophan oxygenase: its partial purification, its translation in a heterologous cell-free system, and its control by glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 70, 1218-1221.
- Schwarcz R, Pellicciari R. (2002). Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*. 303, 1-10.
- Schwarcz R, Whetsell WO Jr, Mangano RM. (1983). Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*. 219, 316-318.
- Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, Hayaishi O. (1978). Indoleamine 2,3 dioxygenase – purification and some properties. *J Biol Chem*. 242, 4700-4706.
- Sibley LD, Messina M, Niesman IR. (1994). Stable DNA transformation in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii* by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91, 5508-5512.

Silva NM, Rodrigues CV, Santoro MM, Reis LF, Alvarez-Leite JI, Gazzinelli RT. (2002). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with *Toxoplasma gondii*: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infect Immun.* 70, 859–868.

Spekker K, Czesla M, Ince V, Heseler K, Schmidt SK, Schares G, Däubener W. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun.* 77, 4496-4501.

St John AL, Abraham SN. (2013). Innate immunity and its regulation by mast cells. *J Immunol.* 9, 4458-4463.

Stone TW. (1993). Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 45, 309-379.

Strehl B, Seifert U, Krüger E, Heink S, Kuckelkorn U, Kloetzel PM. (2005). Interferon-gamma, the functional plasticity of the ubiquitin-proteasome system, and MHC class I antigen processing. *Immunol Rev.* 207, 19-30.

Subramaniam PS, Torres BA, Johnson HM. (2001). So many ligands, so few transcription factors: a new paradigm for signaling through the STAT transcription factors. *Zytokine.* 15, 175-187.

Taylor GA, Feng CG, Sher A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol.* 4, 100-109.

Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 196, 447-57.

Thoreau E, Petridou B, Kelly PA, Djiane J, Mornon JP. (1991). Structural symmetry of the extracellular domain of the cytokine/growth hormone/prolactin receptor family and interferon receptors revealed by hydrophobic cluster analysis. *FEBS Lett.* 282, 26–31.

Tivol EA, Boyd SD, Mckeon S, Borriello F, Nickerson P, Strom TB, Sharpe AH. (1997).  
CTLA4 Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice.  
*J Immunol.* 158, 5091-5094.

Torres MI, Lopez-Casado MA, Lorite P, Rios A. (2007).  
Tryptophan metabolism and indoleamine 2,3-dioxygenase expression in coeliac disease.  
*Clin Exp Immunol.* 148, 419-424.

Wheelock EF. (1965).  
Interferon-Like Virus-Inhibitor Induced in Human Leukocytes by Phytohemagglutinin.  
*Science.* 149, 310-311.

Wood H, Roshick C, McClarty G. 2004.  
Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of *Chlamydia psittaci* GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells.  
*Mol Microbiol.* 52, 903-916.

Yu X, Li H, Ren X. (2012).  
Signaling cascades initiated by TSLP-mediated signals in different cell types.  
*Cell Immunol.* 2, 174-179.

Yuan F, Liu Y, Fu X, Chen J. (2012).  
Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase might be a prognostic biomarker for patients with renal cell carcinoma.  
*Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 37, 649-655.

## 7 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Walter Däubener. Ich danke ihm nicht nur für die Überlassung des Themas und die allzeit tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit, sondern möchte mich auch besonders für die guten Gespräche bedanken, aus denen ich Selbstsicherheit und Motivation erhalten habe. Walter, du hast mein „Ich, als Ärztin und Wissenschaftlerin“ deutlich geprägt. Herzlichen Dank!

Weiterhin danke ich seiner gesamten Arbeitsgruppe für die gute Einarbeitung, freundliche Unterstützung und für die vielfältigen Hilfen bei gemeinsamen Experimenten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, Rita und Alfred, die mich in allen Lebenslagen und zu allen Uhrzeiten immer unterstützt haben. Diese Liebe und Fürsorge ist nicht selbstverständlich. Sie haben mir stets das Gefühl gegeben, stolz auf mich zu sein.

Ein weiterer Dank gilt dem neuen Teil meiner Familie in Berlin, deren ermunternde Worte besonders im Endspurt der Arbeit wichtig wurden. Vielen Dank Stefan und deiner Mama Silvia und dem ganzen Rest der Bande.

Besonderer Dank gilt auch Dr. med. Alexandra Werner-Busse und Dr. med. Christiane Claas. Frauenpower ist angesagt!

## 8 Eidesstattliche Versicherung

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

Berlin, den 12.01.2015

---

Anika Müller