

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

**Einfluss von Hypoxie auf die antimikrobiellen und
immunregulatorischen Wirkungen der Indolamin
2,3-Dioxygenase**

Dissertation

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

vorgelegt von

Sebastian Ebel

2017

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

gez.: Sebastian Ebel
Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter: Prof. Dr. Walter Däubener
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ingo Drexler

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Schmidt SK, Ebel S, Keil E, Woite C, Ernst JF, et al. (2013)

Regulation of IDO Activity by Oxygen Supply: Inhibitory Effects on Antimicrobial and Immunoregulatory Functions.

PLoS ONE 8(5): e63301. doi:10.1371/journal.pone.0063301

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
APZ	Antigen präsentierende Zellen
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie bildende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
cm ²	Quadratzentimeter
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
d	Tag
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochloridhydrat
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
ds	doppelsträngig
D-Trp	D-Tryptophan
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
FCS	fötale Kälberserum
FoxP3	<i>Forkhead Box P3</i>
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GAS	Gamma aktivierte Sequenz
GTP	Guanosintriphosphat
³ H	Tritium
h	Stunde(n)
HBV	Hepatitis B Virus
HFF	humane Vorhaut Fibroblasten (<i>human foreskin fibroblasts</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSV	Herpes simplex Virus Typ I
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IDO ⁺	Indolamin 2,3-Dioxygenase-positiv
IDO-2	Indolamin 2,3-Dioxygenase-2
IFA	Immunfluoreszenzanalyse
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α -Rezeptor
IFNGR	Interferon- γ -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	Interferon regulatorische Faktoren (<i>Interferon regulatory factors</i>)
ISRE	<i>Interferon stimulated response elements</i>
JAK	Janus-Kinase
KAT	Kynurenin Aminotransferase
kDa	Kilodalton
K _i	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K _m	Michaeliskonstante
k.o.	<i>knock out</i>
KynA	Kynureninsäure
LB	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharid
L-Trp	L-Tryptophan
M	Molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
μ L	Mikroliter
μ M	Mikromolar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	Vielfachheit der Infektion (<i>multiplicity of infection</i>)

MOPS	3-[N-Norpholino]propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Molekulargewicht
NADP	Nicotinsäure-Adenin-Dinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OKT3	monoklonaler Antikörper gegen den CD3-Rezeptor von T-Zellen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-L1	<i>programmed death ligand-1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Pyridoxalphosphat
pM	Pikomolar
POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismen (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
ss	einzelsträngig
STAT	Signalüberträger und –aktivator der Transkription (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TCA	Trichloressigsäure

TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
Tregs	regulatorische T-Zellen
U	Uracil
U/mL	Units pro Milliliter
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

II. Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Tryptophan.....	2
1.1.1	Tryptophan und seine physiologische Rolle	2
1.1.2	Tryptophanmetabolismus	3
1.2	Tryptophanspaltende Enzyme.....	6
1.2.1	Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO).....	6
1.2.1.1	Entdeckung	6
1.2.1.2	Induktion.....	6
1.2.1.3	Substrate und Inhibitoren	7
1.2.1.4	Funktion	7
1.2.1.4.1	IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte.....	7
1.2.1.4.2	IDO-vermittelte Immunmodulation	8
1.2.2	Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2)	9
1.2.3	Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO)	9
1.3	Das humane Immunsystem.....	10
1.3.1	Humorale Komponenten des humanen Immunsystems	10
1.3.1.1	Antikörper	10
1.3.1.2	Das Komplementsystem.....	12
1.3.2	Zelluläre Komponenten.....	12
1.3.3	Zytokine	13
1.4	In vitro Infektionsmodelle.....	16
1.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.4.2	Herpes simplex Virus Typ 1	18
1.4.3	<i>Toxoplasma gondii</i>	18
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Zellen	21
2.1.2	Erreger für Infektionsversuche	22
2.1.2.1	Bakterien.....	22
2.1.2.2	Viren.....	22
2.1.2.3	Parasiten	22
2.1.3	Medien, Lösungen und Puffer	22
2.1.3.1	Medien für die Zellkultur	22
2.1.3.2	Lösungen.....	23
2.1.3.3	Puffer	23
2.1.4	Primer	24
2.1.5	Sonden	24
2.1.6	Zytokine	24
2.1.7	Antikörper.....	24
2.1.8	Inhibitoren.....	25
2.1.9	Größenstandards	25
2.1.9.1	Größenstandards für DNA.....	25

2.1.9.2	Größenstandards für Proteine.....	25
2.1.10	Enzyme	25
2.1.11	Chemikalien	25
2.1.11.1	Allgemeine Chemikalien	25
2.1.11.2	Radiochemikalien	27
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.13	Geräte und sonstige Materialien.....	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.2.1.1	FACS-Analyse	29
2.2.2	Zellbiologische Methoden	30
2.2.2.1	Zelllagerung	30
2.2.2.2	Zellkultivierung.....	30
2.2.2.3	Bestimmung der Zellzahl	30
2.2.2.4	Stimulation von HeLa-, HFF- und 86HG39-Zellen.....	30
2.2.2.5	Verwendung von Tryptophan.....	31
2.2.2.6	Kryokonservierung von Zelllinien	31
2.2.2.7	Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBMC) aus Vollblut.....	31
2.2.2.8	Versuchsansätze mit PBL.....	32
2.2.2.9	Bestrahlung von Zellen	32
2.2.2.10	Bestimmung der T-Zell Proliferation.....	32
2.2.2.11	Herstellung hypoxischer Bedingungen	33
2.2.2.12	Nachweis von Zellüberleben	33
2.2.2.13	Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i>	34
2.2.2.14	Infektion mit <i>Toxoplasma gondii</i>	34
2.2.2.15	Bestimmung der Toxoplasmenproliferation	34
2.2.2.16	Infektion mit <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.2.2.17	Bestimmung des Wachstums von <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.2.2.18	Infektion mit Herpes simplex Virus Typ I (HSV-1)	35
2.2.2.19	Bestimmung der Virusreplikation.....	35
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.3.1	Herstellung von Zelllysaten	36
2.2.3.2	Gelelektrophorese.....	36
2.2.3.3	Western-Blot	37
2.2.3.4	Ponceau S Färbung	37
2.2.3.5	Immundetektion mit Antikörpern	37
2.2.3.6	Kynureninmessung.....	38
2.2.3.7	Inhibitorexperimente	39
2.2.3.8	Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC.....	39
2.2.4	Statistische Auswertung	40
2.2.5	Ethikvotum	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	IDO-Aktivität und Expression in Tumorzellen und Fibroblasten unter Hypoxie.....	41
3.1.1	Analyse der IDO-vermittelten Tryptophandegradation unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen.....	41
3.1.2	Analyse der JAK-STAT-abhängigen IDO-Expression bei vermindertem Sauerstoffangebot	42
3.1.3	Ausschluss von vermehrter Proteindegradation als Ursache der verminderten IDO-Aktivität unter Hypoxie	45
3.1.4	Analyse der Expression weiterer JAK-STAT-induzierter Proteine unter Hypoxie	46
3.1.5	Ausschluss von vermehrtem Zelluntergang als Ursache der verminderten IDO-Expression unter Hypoxie	47

3.2 Analyse von IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekten unter Hypoxie anhand von Infektionsmodellen.....	50
3.2.1 Analyse der IDO-vermittelten Hemmung des bakteriellen Wachstums unter Hypoxie.....	50
3.2.2 Analyse der IDO-vermittelten Hemmung parasitären Wachstums unter Hypoxie	53
3.2.3 Analyse der IDO-vermittelten Inhibition der Virusreplikation unter Hypoxie	55
3.3 Analyse der IDO-vermittelten immunregulatorischen Mechanismen unter Hypoxie.....	56
4 DISKUSSION	60
4.1 IDO-Expression und -Aktivität unter verminderten Sauerstoffkonzentrationen	60
4.2 Zellüberleben und -adaptation unter Hypoxie.....	64
4.3 IDO-vermittelte Immunabwehr unter Hypoxie	66
4.4 IDO-vermittelte Immunregulation unter Hypoxie.....	74
5 ZUSAMMENFASSUNG	76
6 LITERATURVERZEICHNIS	77
7 DANKSAGUNG	87
8 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	88

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel	3
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des JAK-STAT-Signalweges	16
Abbildung 2.1 Gradientenverlauf bei HPLC – Messung	40
Abbildung 3.1 IDO-Aktivität in IFN γ -stimulierten 86HG39-, HeLa-Zellen oder HFF	42
Abbildung 3.2 Western-Blot-Analyse von 86HG39- HeLa-Zellen und HFF	44
Abbildung 3.3 Hemmung der enzymatischen Aktivität der IDO durch Zugabe verschiedener Inhibitoren	46
Abbildung 3.4 JAK-STAT-Signalweg und Zellüberleben unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen	49
Abbildung 3.5.1 Antibakterieller Effekt in IFN γ -stimulierten Glioblastomzellen unter Hypoxie	51
Abbildung 3.5.2 Antibakterieller Effekt in IFN γ -stimulierten HFF unter Hypoxie	53
Abbildung 3.6 Antiparasitärer Effekt in IFN γ -stimulierten HFF unter Hypoxie	55
Abbildung 3.7 IDO-vermittelte antivirale Effekte in HFF unter Hypoxie	56
Abbildung 3.8 IDO-vermittelte Regulation der T-Zell-Aktivierung unter Hypoxie	59

1 Einleitung

Der menschliche Körper sieht sich permanent mit einer Vielzahl von Pathogenen konfrontiert, welche nach einer erfolgten Infektion zum Teil schwerwiegende Erkrankungen auslösen können. Um dem zu entgehen verfügt unser Organismus über diverse Abwehrmechanismen, welche entweder dem angeborenen oder dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden können. Ein wichtiger Abwehreffekt wird von dem Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelt, welches durch Reduktion der lokalen Konzentration der essenziellen Aminosäure Tryptophan das Wachstum diverser Pathogene, wie zum Beispiel von Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*, Enterokokken oder *Streptococcus agalactiae*), Viren (z.B. Herpes simplex Typ 1) oder Parasiten (z.B. *Toxoplasma gondii* oder *Neospora caninum*) hemmt [1]. IDO kann durch Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin Interferon- γ (IFN γ) in diversen nativen Zellen (z.B. HFF) und auch in Tumorzellen (z.B. Glioblastomzellen oder HeLa-Zellen) über den JAK-STAT-Weg induziert werden [2]. Weiter konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass die IDO auch immunmodulatorische Effekte vermittelt und damit Einfluss auf das adaptive Immunsystem nimmt. Diese Effekte werden zum einen über die Erniedrigung der lokalen Tryptophankonzentration und die damit verbundene Regulation der T-Zellantwort vermittelt und zum anderen über Toleranz-induzierende Metabolite des Tryptophans [3-6]. All diese Daten stammen aus *in vitro*-Versuchen, in denen IDO-positive Zellen stimuliert und unter Normoxie (21% O₂) inkubiert wurden. Derart hohe Sauerstoffkonzentrationen kommen jedoch physiologisch im menschlichen Körper nicht vor. Bei Inhalation von Raumluft liegt die durchschnittliche Gewebesauerstoff-konzentration zwischen 3% und 5%. Selbst in der Lunge, direkt peribronchial werden selten Werte über 12% O₂ gemessen [7]. Zudem liegt die Sauerstoffkonzentration in entzündetem Gewebe oder in Tumorgewebe aufgrund des erhöhten Sauerstoffverbrauches sowie mangelnder Gefäßversorgung bei < 1% O₂ [8, 9]. Während viele Pathogene, wie z.B. das fakultativ anaerobe Bakterium *Staphylococcus aureus* unter solchen Bedingungen noch teilungsfähig sind, sind die menschlichen Wirtszellen zur Adaptation gezwungen, um ihren Stoffwechsel aufrecht zu erhalten [10]. 2010 zeigten Roth *et al.*, dass Zellen aus der humanen *Tuba uterina* unter hypoxischen Bedingungen aufgrund von Störungen im JAK-STAT-Weg kaum in der

Lage sind das Wachstum des obligat intrazellulären Bakteriums *Clamydia trachomatis* zu hemmen [11]. Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro*-Modellen für Infektionen, sowie der Analyse zellulärer Abwehrmechanismen. Dabei liegt der Schwerpunkt auf der Frage, ob sich Hypoxie bzw. Anoxie auf denIDO-vermittelten Effekt auswirkt und ob neben dem von Roth *et al.* [11] beschriebenen noch andere Faktoren existieren, welche die unter Hypoxie herabgesetzte Fähigkeit der IDO zur Abwehr bakterieller Infektionen begründen. In den hierzu durchgeführten Experimenten wurde die Aktivität der IDO unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen sowohl photometrisch als auch funktionell untersucht. Als mikrobielle Erreger dienten *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* und humanes Herpes Simplex Virus Typ 1. Um die immunmodulatorische Aktivität der IDO zu erfassen, wurde das Wachstum humaner peripherer Blutlymphozyten erfasst.

1.1 Tryptophan

1.1.1 Tryptophan und seine physiologische Rolle

Tryptophan gehört zusammen mit Phenylalanin und Tyrosin zu den aromatischen Aminosäuren. Es trägt einen Indolring und gehört zu den α -Aminosäuren. Natürlicherweise kann Tryptophan entweder als L- oder als D-Tryptophan vorliegen, wobei nur L-Tryptophan physiologisch eine Rolle spielt. Tryptophan ist sowohl für viele Säugetiere, wie z.B. den Menschen als auch für viele Mikroorganismen eine essenzielle Aminosäure. Das heißt, dass der jeweilige Organismus nicht in der Lage ist, selber Tryptophan zu synthetisieren, er kann es nur über die Nahrung aufnehmen. Hingegen sind einige Pflanzen und Mikroorganismen, wie z.B. *Escherischia coli* in der Lage Tryptophan selbst herzustellen. *E. coli* verfügt dabei über ein Operon, welches mehrere Enzyme reguliert, die an der Tryptophansynthese beteiligt sind. Interessanterweise fungiert Tryptophan hier als Ko-Repressor, welcher die Syntheserate der beteiligten Enzyme auf bis zu unter 1 % senken kann [12]. Da der Mensch nicht in der Lage ist Tryptophan selbst herzustellen, muss er es über die Nahrung aufnehmen. Nahrungsmittel wie Fleisch, Nüsse und Käse enthalten dabei besonders viel Tryptophan. Der Tagesbedarf eines gesunden Erwachsenen liegt bei etwa 3,5 mg – 6 mg Tryptophan pro Kilogramm Körpergewicht, kann während der Schwangerschaft jedoch erhöht sein [13, 14].

1.1.2 Tryptophanmetabolismus

Folgende Abbildung verdeutlicht die zentrale Rolle von Tryptophan im Stoffwechsel des Menschen:

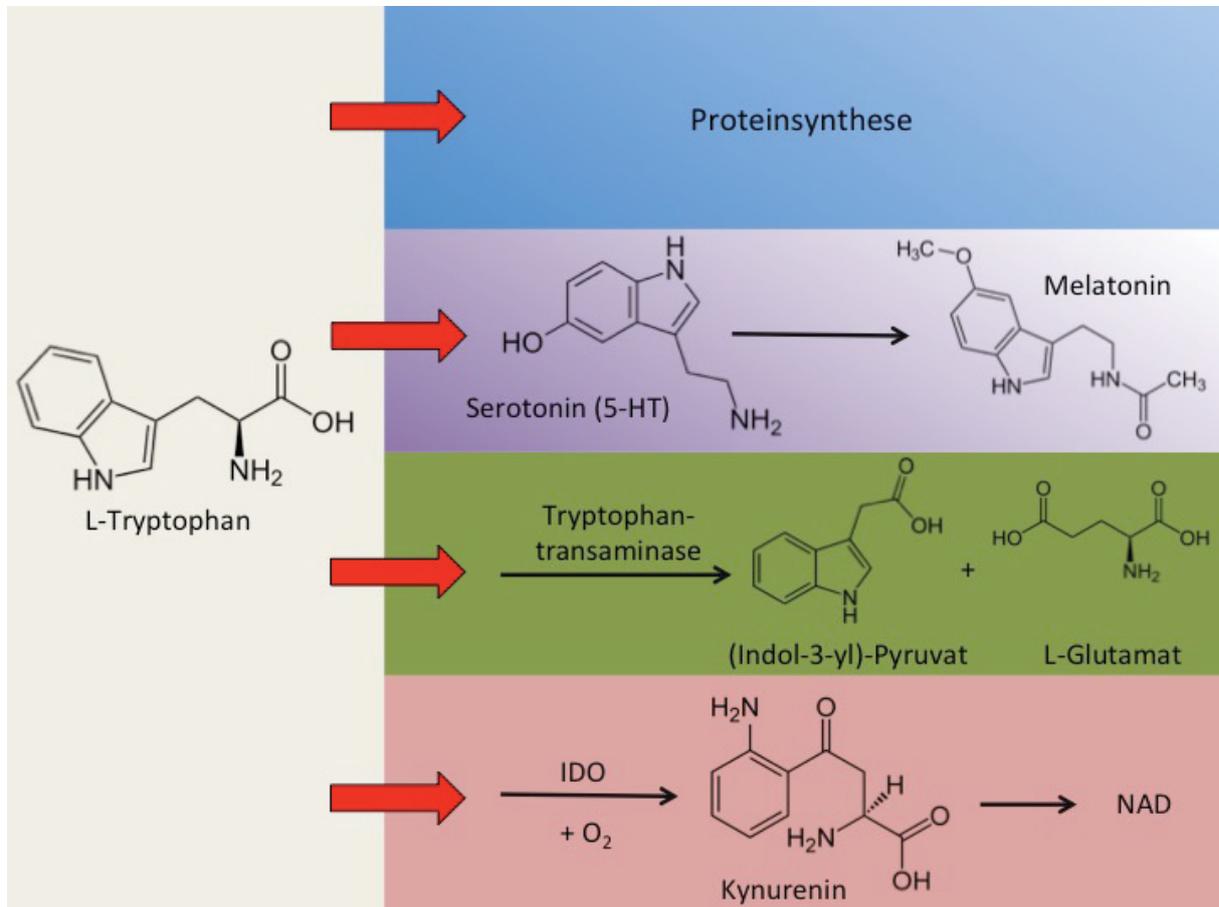


Abbildung 1.1 Schematische Übersicht über den Tryptophan-Stoffwechsel

(a) Proteinsynthese (b) Serotoninstoffwechsel (c) Transaminasenstoffwechsel (d) Kynureninstoffwechsel
Modifiziert nach [15]

Tryptophan gehört zur Gruppe der proteinogenen Aminosäuren. Das bedeutet, dass es für den Aufbau einer Vielzahl von Proteinen benötigt wird. Weiter spielt es eine wichtige Rolle im Aufbau zweier wichtiger Mediatoren des Nervensystems: Serotonin und Melatonin. Serotonin ist ein biogenes Amin, welches in zwei Schritten aus Tryptophan synthetisiert wird. Erst erfolgt die Hydroxylierung des aromatischen Ringsystems durch die Tryptophan-Hydroxylase. Das so entstandene Hydroxytryptophan wird nun durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase zu 5-Hydroxytryptamin (5-HT) decarboxyliert, was auch als Serotonin bezeichnet wird. Serotonin spielt in vielen Neuronen des ZNS eine wichtige Rolle als Neurotransmitter, zudem liegt es in großer Menge in den enterochromaffinen Zellen des

Gastrointestinaltraktes und in Thrombozyten vor. Es reguliert die Magen-Darm-Tätigkeit, beeinflusst das Herz-Kreislaufsystem und im ZNS unter anderem das Schmerzempfinden, den Schlaf-Wach-Rhythmus und die Temperaturregulation [16]. Zudem spielt Serotonin eine entscheidende Rolle bei der Auslösung von Brechreiz. Es wird in den enterchromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes ausgeschüttet, gelangt über die Blutbahn ins ZNS und gibt an der *Area postrema* das Signal zum Auslösen von Übelkeit und Erbrechen, was z.B. im Rahmen einer Chemotherapie eine Rolle spielt [17]. Serotonin entfaltet seine Wirkung über die Bindung an Serotoninrezeptoren (5-HT-Rezeptoren), welche sich in sieben Unterarten einteilen lassen (5-HT₁ – 5-HT₇), welche 2008 von Millan *et al.* genau charakterisiert wurden [18]. Bis auf den 5-HT₃-Rezeptor, welcher ein Ionenkanal ist, sind alle Serotoninrezeptoren G-Protein-gekoppelt. Ausgehend von Serotonin ist der Organismus in der Lage mit Hilfe der N-Acetyl Transferase und 5-Hydroxyindol-O-Methyltransferase in mehreren Schritten das Hormon Melatonin zu bilden. Die Melatoninproduktion findet hauptsächlich in der *Glandula pinealis* (Epiphyse) und in der Retina statt. Die Synthese des Melatonins unterliegt einer ausgeprägten zircadianen Rhythmik. Melatonin dient der Aufrechterhaltung des Schlaf-Wach-Rhythmus, es wird vor allem Nachts, in Abwesenheit von Licht produziert und induziert Müdigkeit [17]. So verwundert es nicht, dass der Melatoninhaushalt im Winter, bedingt durch dunklere und kürzere Tage, empfindlich gestört werden kann, was vermehrte Müdigkeit und Depressionen zur Folge haben kann [19]. Weiter dient Tryptophan der Tryptophan-Transaminase als Substrat. Diese setzt Tryptophan und 2-Oxoglutarat zu (Indol-3-yl)-Pyruvat und L-Glutamat um [20]. Der weitaus größte Teil des über die Nahrung aufgenommenen Tryptophans geht in den Kynurenin-Stoffwechselweg ein. Dabei wird Tryptophan in einem ersten Schritt durch eines von drei Enzymen zu *N*-Formyl-Kynurenin oxidiert: Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO). In dieser Arbeit liegt der Fokus auf dem Enzym IDO. Alle drei genannten Enzyme sind in der Lage, den Indolring des Tryptophans oxidativ zu spalten, was zur Bildung von *N*-Formyl-Kynurenin führt. Dies geschieht indem entweder molekularer Sauerstoff oder Superoxid in das Molekül eingebaut wird [21]. In einem zweiten Schritt wird vom entstandenen *N*-Formyl-Kynurenin Ameisensäure durch die Formyl-Kynurenin Formidase abgespalten, wodurch Kynurenin entsteht. Von Kynurenin ausgehend kann der Stoffwechsel nun mehrere Wege einschlagen, so können Metabolite wie Anthranilsäure, Chinolinsäure,

Kynureninsäure, und Nicotinamid gebildet werden, wovon einige biologisch aktiv sind. Kynureninsäure z.B. wirkt durch Vermittlung eines antikonvulsiven Effektes neuroprotektiv. 3-Hydroxykynurenin und Chinolinsäure hingegen wirken eher neurotoxisch [22, 23]. Die Wirkungen der Tryptophandegradationsprodukte beschränken sich nicht nur auf das Nervensystem bzw. Neurone, sondern spielt auch im Immunsystem eine Rolle: 2005 zeigten Bauer *et al.*, dass durch Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure die allogene T-Zell Antworten von Rattenzellen gehemmt werden konnten [24]. Weiter zeigten MacKenzie *et al.*, dass humane T-Zellen in Anwesenheit von Kynureninmetaboliten nicht mehr proliferationsfähig sind [4]. Letztlich mündet der Kynureninstoffwechselweg in die Entstehung von Vitamin B3 bzw. Niacin und Nicotinamid. Niacin findet sich in nahezu allen humanen Zellen als Teil der Pyridinnukleotid-Koenzyme Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) und NAD-Phosphat (NADP⁺), deren reduzierte Formen NADH und NADPH wichtig für vielfältige Redoxreaktionen des Metabolismus, die Glykolyse, die Fettsäuresynthese und –oxidation, DNA-Reparaturen und den Zelltod sind. Somit ist klar, dass eine ausreichende Versorgung des Organismus mit Niacin essenziell ist. Die Zufuhr kann entweder über die Nahrung, also die Absorption aus dem Dünndarm oder aus der Umwandlung aus Tryptophan sichergestellt werden. Etwa 60 mg Tryptophan werden benötigt werden um ca. 1 mg Niacin zu synthetisieren. Wird der Organismus nicht ausreichend mit Niacin versorgt, kann dies zur häufig schwer verlaufenden Krankheit Pellagra mit Dermatitis, Diarrhoe und Demenz führen [25]. Diese kann besonders bei einseitiger Ernährung in Gebieten in denen die Hauptnahrungsquelle aus Mais besteht auftreten. Initial ist mit Schleimhautaffektion besonders an Mund, Zunge und Vagina zu rechnen, sowie mit der Ausbildung des sogenannten Casal-Halsbandes, einer bandförmigen Hyperpigmentierung im Bereich der sonnenexponierten Areale des Halses. Zusätzlich ist mit Appetitlosigkeit, daraus resultierender Schwäche, Stimmungsschwankungen, Angst, Schlafstörungen, Desorientierung und Halluzinationen zu rechnen. Behandelt wird die Pellagra durch Optimierung der Niacinaufnahme sowie durch Niacinsupplementation, wobei Dauer und Dosierung vom Schweregrad der Erkrankung abhängen [25, 26]. Um der Erkrankung vorzubeugen werden in den USA viel konsumierte Lebensmittel, die sonst ausschließlich aus Mais bestehen (z.B: Cornflakes) mit Niacin versetzt [17].

1.2 Tryptophanspaltende Enzyme

Wie in Abschnitt 1.1.2 schon beschrieben, wird die oxidative Spaltung von Tryptophan zu *N*-Formyl-Kynurenin von drei verschiedenen Enzymen katalysiert: Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO).

1.2.1 Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

1.2.1.1 Entdeckung

Indem Kotake *et al.* 1936 Kaninchen D-Tryptophan verabreichten und anschließend eine erhöhte D-Kynureninkonzentration im Urin feststellten, wurde erstmals nachgewiesen, dass ein Mechanismus zum Tryptophanabbau existieren muss [27]. Dass dies ein enzymatisch katalysierter Prozess ist, welcher durch die IDO vermittelt wird wurde erst 1967 durch Yamamoto *et al.* beschrieben [28]. 1978 wurde die IDO durch Shimizu *et al.* isoliert und genauer charakterisiert [29]. Dass die IDO in vielen Organen exprimiert wird, die höchste Konzentration aber in Lunge, Darm und Plazenta zu finden ist, wurde 1996 bzw. 2005 beschrieben [30, 31]. Heute weiß man, dass das für die IDO kodierende Gen auf Chromosom 8 lokalisiert ist [32] und aus 10 Exons besteht. Das IDO-Protein besteht aus 2 Untereinheiten, enthält ein Häm-Molekül und hat ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa [33].

1.2.1.2 Induktion

Der wichtigste Induktor der IDO-Expression ist das proinflammatorische Zytokin IFN γ [2]. Dieses bindet an einen Rezeptorkomplex, der den JAK-STAT-Signalweg, welcher in einem späteren Kapitel noch ausführlich beschrieben wird, aktiviert. Neben der direkten Transkription des IDO-Proteins sorgt IFN γ noch über die Expression von IRF-1 (*interferon-regulated-factor*) für eine verstärkte IDO-Expression. IRF-1 bindet an ISRE-Sequenzen (*IFN-stimulated response elements*) in der IDO-Promotorregion, was letztlich die IDO-Expression verstärkt [34]. Heseler *et al.* zeigten 2008, dass die IFN γ -vermittelte IDO-Expression durch Zugabe von TNF α und IL1 β noch verstärkt werden kann [35]. Diese Zytokine erhöhen ebenfalls die transkriptionelle Aktivität der IDO-Promotorregion [36].

1.2.1.3 Substrate und Inhibitoren

Die IDO hat eine hohe Affinität zu L-Tryptophan [37], kann aber auch D-Tryptophan, Serotonin, Tryptamin und L-5-Hydroxykynurenin spalten [29]. Es ist bekannt, dass unter Anderen 1-Methyl-Tryptophan sowie das Sauerstoff- bzw. Schwefelanalogon von Tryptophan kompetitive Inhibitoren der IDO darstellen [38].

1.2.1.4 Funktion

Der IDO sind sowohl antimikrobielle als auch immunmodulatorische Wirkkomponenten zuzuschreiben. So ist sie in der Lage durch die oxidative Spaltung von Tryptophan die lokalen Tryptophanspiegel im Gewebe derart zu senken, dass das Wachstum diverser pathogener Mikroorganismen gehemmt wird, die zur Proliferation essentiell auf Tryptophan angewiesen sind. Durch denselben Mechanismus kann die IDO auch das T-Zell-Wachstum und damit die Immunantwort beeinflussen. Zusätzlich wird die T-Zell-Antwort noch durch Kynureninmetabolite beeinflusst, welche bei der durch die IDO katalysierten Tryptophanspaltung entstehen.

1.2.1.4.1 IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte

Wie zuvor schon beschrieben, ist die IDO durch Tryptophandepletion in der Lage das Wachstum vieler mikrobieller Erreger zu hemmen. Die IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekte sind eher dem angeborenen Immunsystem zuzurechnen, denn da diese auf dem einfachen Prinzip der Nährstoffrestriktion beruhen, sind sie nicht spezifisch gegen spezielle Pathogene gerichtet. Sie wirken vielmehr gegen eine Vielzahl tryptophan-auxotropher Organismen. Erstmals 1978 stellten Yoshida *et al.* eine Assoziation zwischen Infektion und der Aktivität der IDO her [39]. Der Wirkmechanismus der Tryptophandepletion wurde erstmals von Pfefferkorn *et al.* anhand eines Infektionsmodelles mit humanen Fibroblasten und dem intrazellulär wachsenden Parasiten *Toxoplasma gondii* gezeigt, in welchem die IFN γ -induzierte IDO das parasitäre Wachstum hemmen konnte [40]. Danach wurde für eine große Bandbreite verschiedener pathogener Mikroorganismen der Beweis erbracht, dass ihr Wachstum durch die IDO-vermittelte Erniedrigung der lokalen Tryptophankonzentration gehemmt werden kann. Dazu gehören diverse Bakterien, wie Streptokokken [41],

Enterokokken [42], Chlamydien [43] und *Staphylococcus aureus* [44], außerdem auch Viren wie Cytomegalievirus [45], Herpes simplex Virus Typ 1 und 2 [46, 47] und Masern Virus [48] und auch Parasiten wie *Toxoplasma gondii* und *Neospora caninum* [49]. DieseIDO-vermittelten Effekte sind in einer Vielzahl humaner Zellen wie zum Beispiel in Makrophagen [41], Endothelzellen [1], Urothelzellen [42] und Glioblastomzellen [44] nachweisbar.

1.2.1.4.2 IDO-vermittelte Immunmodulation

Die immunmodulatorischen Effekte der IDO beruhen ebenfalls zum Teil auf der Erniedrigung der lokalen Tryptophanspiegel. Auf diese Weise kann die Proliferation von T-Zellen gehemmt werden, was einen Mechanismus der Toleranzinduktion darstellt. Dies wurde erstmalig 1998 durch Munn *et al.* beschrieben. Graviden Mäusen wurde der IDO-Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan in Form von Pellets subkutan appliziert. Dies führte dazu, dass der murine Organismus allogene, nicht aber syngene Feten abstieß. Daraus wurde geschlossen, dass die IDO-katalysierte Reaktion im Bereich der Plazenta den Tryptophanspiegel physiologisch derart erniedrigt, dass die maternalen T-Zellen nicht mehr proliferieren, wodurch eine Abstoßung allogener Feten verhindert wird [5]. Wenig später wurde auch *in vitro* nachgewiesen, dass dendritische Zellen und Makrophagen dazu fähig sind, durch Expression der IDO und konsekutive Tryptophanrestriktion eine T-Zell-Antwort zu inhibieren [50]. Zudem haben auch die bei der IDO-vermittelten Tryptophanspaltung anfallenden Kynureninmetabolite einen hemmenden Einfluss auf die T-Zell-Proliferation [51, 52]. Diese Toleranzinduktion spielt auch bei Organtransplantationen eine Rolle. So wurde in der Vergangenheit im Tiermodell eine beschleunigte Abstoßungsreaktion nach spezifischer Inhibition der IDO beobachtet, wohingegen eine IFN γ -induzierte IDO-Expression zu verbesserter Toleranz nach Leber- bzw. Nierentransplantationen führte [53-55]. Auch in der Onkologie spielen die IDO-vermittelten Effekte eine Rolle. So wurde 2009 von Liu *et al.* eine IDO-Expression in dendritischen Zellen aus tumorinfiltrierten Lymphknoten beschrieben, welche die Differenzierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen positiv beeinflusst [56]. Zudem führten Fallarino *et al.* 2006 *in vitro* - Experimente durch, welche ergaben, dass naive CD4⁺ T-Zellen sich IDO-vermittelt zu CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen entwickeln können, welche sowohl das Tumorwachstum als auch die Entstehung tumorspezifischer Zellen hemmen [57].

1.2.2 Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2)

Die IDO-2 wurde erstmals 2007 beschrieben. Während sie beim Menschen vorwiegend in Gehirn, Uterus und Plazenta zu finden ist, findet man die murine IDO-2 meist in Leber-, Nieren- und Epididymisgewebe [58]. Zudem wurde IDO-2-Protein auch in Tumorzellen nachgewiesen [59]. Über die Funktion der IDO-2 ist bisher noch nicht viel bekannt. Sie scheint im Gegensatz zur IDO keine größere Rolle im Rahmen der Immunabwehr zu spielen, so zeigte Ball *et al.* 2009, dass in einem murinen *in vivo* Malariainfektionsmodell zwar die IDO-, nicht aber die IDO-2-Expression aufgrund der zirkulierenden Zytokine erhöht war [60]. Weiter kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, wie die IDO-2-Expression reguliert wird, aber im Gegensatz zur IDO scheint IFN γ dabei keine Rolle zu spielen.

1.2.3 Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO)

Die TDO wird auch als „Tryptophan Pyrrolase“ oder „Tryptophan Oxygenase“ bezeichnet. Sie wurde erstmals 1936 durch Kotake *et al.* [27] beschrieben und 1955 von Knox *et al.* [61] genauer charakterisiert. Interessanterweise verfügen nicht nur Säugetiere über die TDO, sie wurde ebenfalls in Insekten, Bakterien und Hefen nachgewiesen [62-64]. Dies lässt, zusammengenommen mit der Tatsache, dass die humane TDO-Sequenz zu 40% mit der des Bakteriums *Xanthomonas campestris* und zu 88% mit der der Ratte übereinstimmt [65], den Schluss zu, dass die TDO ein evolutionär sehr altes Enzym ist [66]. Ebenso wie die IDO und die IDO-2 ist auch die TDO in der Lage, Tryptophan zu *N*-Formyl-Kynurenin zu spalten, sie ist beim Menschen vor allem in der Leber exprimiert und spielt eine wichtige Rolle für die Tryptophanhomöostase. Da durch sie über 95% des durch die Nahrung aufgenommenen Tryptophans dem Kynureninstoffwechsel zugeführt wird und dadurch weniger Tryptophan zur Serotoninproduktion zur Verfügung steht, wird ein Zusammenhang zwischen einer veränderten TDO-Aktivität und neuropsychiatrischen Erkrankungen diskutiert [67]. Zudem zeigten Schmidt *et al.* 2009, dass die TDO auch von immunologischer Relevanz ist, denn wie auch die IDO, ist die TDO in der Lage, durch Erniedrigung des lokalen Tryptophanspiegels das Wachstum mikrobieller Erreger zu inhibieren. Weiter kann die TDO immunoregulatorisch wirken, indem sie die T-Zell-Proliferation inhibiert [68].

1.3 Das humane Immunsystem

Um die Gesundheit des Menschen zu gewährleisten, verfügt der humane Organismus über ein komplexes Immunsystem, welches sich in eine humorale Komponente und eine zelluläre Komponente unterteilen lässt. Das Immunsystem verfügt über einige Abwehrmechanismen, welche es befähigen, Fremdkörper und Mikroorganismen aus der Umwelt abzuwehren. Eine grundlegende Voraussetzung für eine funktionierende Immunabwehr ist, dass das Immunsystem zwischen „fremd“ und „selbst“ unterscheidet. Dabei muss „fremd“ beseitigt und „selbst“ toleriert werden.

1.3.1 Humorale Komponenten des humanen Immunsystems

1.3.1.1 Antikörper

Die humorale Komponente des Immunsystems umfasst vor allem Antikörper, welche sich entweder gelöst in Körperflüssigkeiten befinden können, oder als Rezeptor fest auf der Oberfläche von B-Lymphozyten verankert sein können. Antikörper sind Y-förmige Glykoproteine der Immunglobulinfamilie. Ihre Grundstruktur besteht aus zwei schweren (H für *heavy*) und zwei leichten (L für *light*) Ketten. Am aminoterminalen Ende befindet sich die sogenannte variable Region, an welcher Antigene gebunden werden können und welche sich von Antikörpermolekül zu Antikörpermolekül unterscheidet. Auf diese Weise kann eine enorme Anzahl verschiedener Antigene durch verschiedene Antikörper erkannt bzw. gebunden werden. Antikörper werden von Plasmazellen, welche sich von B-Lymphozyten ableiten, produziert und sezerniert. Diese B-Lymphozyten besitzen membranständige Antikörper, welche als Rezeptor fungieren. Bindet nun ein Antigen an einen zu ihm passenden B-Zell-Rezeptor wird dieser B-Lymphozyt nach T-Zell Hilfe, aktiviert. Es gibt noch weitere Wege zur B-Zell Aktivierung, auf welche nicht näher eingegangen wird. Nun erfolgt eine klonale Expansion und Umwandlung in eine Plasmazelle, d.h. dieser Lymphozyt bildet durch wiederholte Teilung eine große Anzahl identischer (monoklonaler) Zellen mit identischer Antigenspezifität, welche nun spezifische Antikörper, gegen diesen Erreger, sezernieren können. Diese sezernierten Antikörper tragen nun entweder direkt oder indirekt zur Beseitigung des Erregers bei. Antikörper können direkt an die Antigenstrukturen des

Pathogens binden und so einen Antigen-Antikörper-Komplex bilden. Auf diese Weise können Antigene neutralisiert werden. So können Toxine z.B. das Tetanus- oder Diphterietoxin als Antigene erkannt und durch Antikörperbindung inaktiviert werden. Auf dieselbe Weise kann auch ein Virus inaktiviert werden: Ein mit Antikörpern behaftetes Virus ist nicht mehr in der Lage an seine Wirtszelle zu adhären und kann sich somit nicht mehr vermehren. Zusätzlich können Antikörper Erreger immobilisieren indem beispielhaft Geißeln von extrazellulären Bakterien besetzt werden, wodurch diese in ihrer Bewegung stark eingeschränkt werden und damit weniger virulent sind. Weiter können Antikörper Pathogene immobilisieren, indem sie Erreger miteinander „verklumpen“ also zu einer Agglutination führen. Dazu sind vor allem die polymeren Antikörper der Klasse IgM befähigt. Antikörper binden mit ihrem variablen Teil Antigene, andererseits können sie mit ihrem nicht-variablen Ende, dem so genannten Fc Teil spezifische Zellen des Immunsystems aktivieren und so indirekt durch verstärkte Phagozytose zur Neutralisierung von Pathogenen beitragen. So können sie z.B. an ein extrazelluläres Bakterium binden und es so markieren, sodass es durch spezifische Zellen des Immunsystems z.B. Makrophagen über Fc-Rezeptoren erkannt und phagozytiert werden kann. Dieser Mechanismus wird als „Opsonisierung“ bezeichnet. Zudem erhöht die Bindung von Antikörpern über Fc-Rezeptoren an die Zelloberfläche die Zytotoxizität von NK-Zellen. Als letzter Punkt ist die Aktivierung des Komplementsystems zu nennen, die in Kapitel 1.3.1.2 genauer beschrieben ist. Man kann Antikörper in fünf verschiedene Klassen einteilen, welche sich zum Teil in Form und Funktion unterscheiden: IgG, IgM, IgA, IgD und IgE. Etwa 70 % aller Antikörper gehören zur Klasse IgG. Durch ihr geringes spezifisches Gewicht (150 kDa) gelangen sie in nahezu alle Körperregionen, sie spielen deshalb eine wichtige Rolle bei der Opsonisierung von Erregern und der Komplementaktivierung. IgG sind die einzigen Antikörper, die im Rahmen einer Schwangerschaft die Plazentaschranke überwinden und so zu einer passiven Immunisierung des Fötus beitragen können. IgM sind pentamere Immunglobuline mit einem spezifischen Gewicht von ca. 900 kDa. Aufgrund Ihrer Größe können sie die Gefäßwände nicht überwinden. IgA haben eine dimere Struktur. Sie besitzen eine sekretorische Komponente, sodass sie von Plasmazellen sezerniert werden können. Sie kommen meist in Sekreten auf Schleimhäuten z.B. im Atmungs- und Verdauungstrakt vor. IgD ist ein monomeres. IgE sind maßgeblich an der Aktivierung von Mastzellen und basophilen Granulozyten und der damit verbundenen Ausschüttung von vasoaktiven

Substanzen wie z.B. Histamin beteiligt. Sie spielen eine wichtige Rolle bei anaphylaktischen und allergischen Reaktionen [15].

1.3.1.2 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus einer ganzen Reihe von Plasmaproteinen, welche in einem komplexen Zusammenspiel Pathogene neutralisieren können. Da das Komplementsystem den Organismus zwar schützt, ihm aber potentiell schaden kann, liegen die Komplementfaktoren zunächst in inaktiver Form vor. Um die einzelnen Proteine und damit das Komplementsystem zu aktivieren existieren drei Wege. Der sogenannte klassische Weg beginnt mit der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes. Dieser Komplex verfügt über die C1-Bindungsstelle, welche die Aktivierung des ersten Komplementfaktors vermittelt. Besonders effektiv funktioniert dies mit den pentameren Antikörpern der Klasse IgM. Als nächstes ist der alternative Weg der Komplementaktivierung zu nennen, bei dem der Komplementfaktor C3b spontan aktiviert wird und durch Oberflächenmerkmale von Pathogenen wie z.B. gramnegativer Bakterien oder Viren stabilisiert wird. Auch dadurch wird die Komplementkaskade aktiviert. Als letztes existiert der Lektinweg, bei dem das Komplementsystem über das Akute-Phase-Protein mannanbindendes Lektin aktiviert wird. Alle drei Wege münden in der Bildung des Membranangriffskomplexes, welcher zur Lyse des pathogenen Erregers führt. Zudem verfügen die einzelnen Komplementfaktoren auch über proinflammatorische und chemotaktische Eigenschaften und können ihrerseits auch zur Opsonisierung von Erregern beitragen [15].

1.3.2 Zelluläre Komponenten

An zellulären Komponenten des humanen Immunsystems seien vor allem Phagozyten, an erster Stelle die Makrophagen, die antigenpräsentierenden Zellen und die Lymphozyten zu nennen. An dieser Stelle soll vor allem auf die T-Lymphozyten eingegangen werden. T-Lymphozyten stammen von lymphoiden Stammzellen aus dem Knochenmark ab. Zur Weiterreifung und Differenzierung wandern sie in den Thymus, wo sie einen T-Zell-Rezeptor (*T-Cell-Receptor* = TCR) exprimieren, welcher, wie der B-Zell-Rezeptor, zur Familie der Immunglobuline gehört. Der TCR besteht aus mehreren Untereinheiten. Diese besitzen je

einen konstanten und einen variablen Anteil. Durch den variablen Part ist der TCR in der Lage eine große Anzahl unterschiedlicher Antigene zu erkennen bzw. zu binden. Zusätzlich exprimieren die T-Zellen im Thymus unterschiedliche Oberflächenmarker, wodurch sie sich grob in zwei Subpopulationen unterteilen lassen: $CD4^+$ T_H1 -, T_H2 - und T_H17 - Zellen, sowie $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen. Diese verschiedenen T-Lymphozyten können nur durch spezifische Antigene aktiviert werden, wenn ihnen diese auf körpereigenen *major-histocompatibility-complex*-Molekülen (MHC) präsentiert werden. Die MHC-Moleküle werden beim Menschen in mehreren Genen kodiert und treten in vielen verschiedenen Allelen auf, was die extremen interindividuellen Unterschiede der MCH-Komplexe in der Bevölkerung erklärt. Die Wahrscheinlichkeit, zwei menschliche Individuen mit identischen MCH-Komplexen zu finden ist verschwindend gering, was ein großes Problem in der Transplantationsmedizin darstellt. Es lassen sich zwei Klassen von MHC-Komplexen unterscheiden: MCH-Klasse-I und MCH-Klasse-II. MCH-Klasse-I Antigene werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie dienen der Präsentation von Proteinen, welche zuvor in der Zelle über das Proteasom degradiert wurden. So können vor allem Antigene von intrazellulären Erregern (v.a. Viren und Parasiten), aber auch pathologische Proteine, wie sie von karzinomatös veränderten Zellen gebildet werden an der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese auf MCH-Klasse-I-Molekülen präsentierten pathologischen Proteine können dann durch $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten erkannt werden. MCH-Klasse-II finden sich ausschließlich auf speziellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen expressing cells* = APC), z.B. Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen. APC nehmen extrazelluläre Pathogene (z.B. Bakterien) auf (Phagozytose). Nun erfolgt eine Prozessierung der Proteine der phagozytierten Pathogene im intrazellulären Phagolysosom, anschließend werden diese an MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert. Diese so präsentierten Fremdproteine können durch T-Zellen erkannt werden, was zu einer Aktivierung des Phagozyten führt, wodurch dieser befähigt wird das zuvor phagozytierte Pathogen zu zerstören [15].

1.3.3 Zytokine

Unter der Überschrift „Zytokine“ lässt sich eine ganz Reihe von Proteinen zusammenfassen. An dieser Stelle soll am Beispiel von Tumornekrose-Faktor- α (TNF α) die Funktionsweise von

Zytokinen erläutert werden, anschließend wird auf die für diese Arbeit wichtige Zytokinfamilie der Interferone (IFN) eingegangen. TNF α besteht aus 157 Aminosäuren und wird vorwiegend von Makrophagen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen produziert. Es ist auf Chromosom 6 kodiert. Die Hauptfunktion von TNF α liegt in der Vermittlung der lokalen Entzündungsreaktion, dies wird durch mehrere Mechanismen erreicht. TNF α steigert die Expression von Adhäsionsmolekülen der lokalen Endothelzellen und erhöht die Permeabilität der lokalen Gefäße, somit können Immunzellen (z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten) leichter das Gefäßsystem verlassen und zum Ort der Inflammation gelangen. Zudem folgt der gesteigerten Gefäßpermeabilität eine verstärkte Lymphdrainage aus den infizierten Gebieten. Dadurch werden Pathogene mit der Lymphe schneller zu den lokoregionären Lymphknoten transportiert, wo sie auf spezialisierte Immunzellen treffen und somit eine Antwort des adaptiven Immunsystems initiieren. Weiter aktiviert TNF α die Endothelzellen, wodurch diese gerinnungsaktive Substanzen sezernieren. Dies führt zu einem Verschluss derjenigen Gefäße, welche sich nah am Ort der Entzündung befinden. Auf diese Weise wird eine Ausbreitung der Erreger über das Gefäßsystem und die Blutbahn verhindert. Diese TNF α -vermittelten Effekte dämmen eine lokale Entzündung effektiv ein. Sobald allerdings der Fall eintritt, dass sich eine Infektion über die Blutbahn systemisch ausbreitet, tragen die oben beschriebenen TNF α -vermittelten Mechanismen zur Entstehung des oft letal verlaufenden Krankheitsbildes des septischen Schocks bei. Hier können die Steigerung der Gefäßpermeabilität zu einem dramatischen Blutdruckabfall und die Endothelaktivierung zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen. Systemisch trägt TNF α gemeinsam mit IL-1 β und IL-6 dazu bei die sogenannte „Akute-Phase“ mit der Ausschüttung der „Akute-Phase-Proteine“ durch Hepatozyten einzuleiten. Hier sind beispielsweise das C-Reaktive-Protein, welches im klinischen Alltag als Entzündungsmarker genutzt wird zu nennen und das Mannose-bindende-Lektin, welches eine wichtige Rolle bei der Komplementaktivierung spielt [15].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene humane Zellen für Infektionsmodelle verwendet und mit Interferon gamma (IFN γ) stimuliert. Dass vor allem das IFN γ eine zentrale Rolle bei der Immunabwehr spielt, wurde schon in der Vergangenheit verdeutlicht, so sind IFN γ -*knock-out* Mäuse deutlich vulnerabler gegenüber Infektionen mit bakteriellen Erregern (z.B. Mykobakterien), Viren und Parasiten (z.B. *Toxoplasma gondii*) als der Wildtyp [69-71].

Aus diesem Grund sollen die Interferone, besonders IFN γ an dieser Stelle genauer charakterisiert werden. Der Name der „Interferone“ leitet sich von ihrer Fähigkeit ab, mit dem Wachstum von Viren zu interferieren. Es lassen sich mehrere Klasse von Interferonen unterscheiden: Hier soll nur auf das IFN γ eingegangen werden. Gamma-Interferone sind homodimer konfiguriert, bestehen aus 143 Aminosäuren und werden von diversen Zellen des angeborenen und auch des adaptiven Immunsystems wie z.B. CD4⁺ T_H1-Zellen, CD8⁺ zytotoxischen Zellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), B-Zellen und von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen expressing cells* = APC) produziert [34]. Sie wurden 1965 erstmals von Wheelock *et al.* als Glykoproteine beschrieben, welche von Leukozyten gebildet werden [72]. Die IFN γ -Produktion wird durch Zytokine reguliert, welche durch APC nach Antigenkontakt ausgeschüttet werden, dabei spielen besonders die Interleukine 12 (IL-12) und 18 (IL-18) eine herausragende Rolle [73, 74] (siehe Abbildung 1.2). IFN γ bindet spezifisch an den Interferon- γ -Rezeptor (IFN γ R), was zur Induktion des JAK-STAT-Signalweges führt [75]. Die Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor führt zu dessen Dimerisierung. Dadurch machen intrazelluläre Janus-Kinasen (JAKs) eine Konformationsänderung durch, welche es ihnen erlaubt sich gegenseitig zu aktivieren und den Rezeptor zu phosphorylieren. Als nächstes bindet *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1) an den Rezeptor und wird ebenfalls phosphoryliert. Diese phosphorylierten STAT1-Moleküle (pSTAT1) dimerisieren und translozieren in den Zellkern. Dort binden sie an spezielle Abschnitte der DNA, welche als gamma-aktivierte-Sequenzen (GAS) bezeichnet werden und regulieren so die Transkription von mehreren hundert Genen [76]. Diese Genen werden in zwei Gruppen unterteilt: sogenannte primär-responsive-Gene, welche zuerst transkribiert werden und sekundär-responsive-Gene, welche erst in einem zweiten Schritt durch Transkriptionsfaktoren anderer aktivierter Gene transkribiert werden. Zu der Gruppe der primär-responsiven Gene zählen u.A. die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), GTPasen, *major-histocompatibility-complex*-Moleküle (MHC-Klasse I und II) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS). Zu den sekundär-responsiven Genen zählen sogenannte Interferon regulatorische Faktoren (IRF) welche an *Interferon stimulated response element* (ISRE) binden [77]. Auf diese Weise wird durch IFN γ -Stimulation neben vielfältigen anderen Mechanismen auch die Aktivierung von Makrophagen vermittelt. Bei Makrophagen bewirkt IFN γ eine vermehrte Expression von MHC-Molekülen und erhöht ihre Responsivität auf

andere proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Zudem wird auch die Expression anderer, für die Antigenprozessierung und -präsentation wichtiger Faktoren verstärkt [78, 79]. Ähnliches gilt auch für neutrophile Granulozyten und NK-Zellen, auch ihre Aktivierung wird durch $\text{IFN}\gamma$ beeinflusst, zudem fördert $\text{IFN}\gamma$ die Differenzierung von CD8^+ zytotoxischen T-Zellen, während die Immunantwort von $\text{T}_\text{H}2$ -Zellen unterdrückt wird [80, 81].

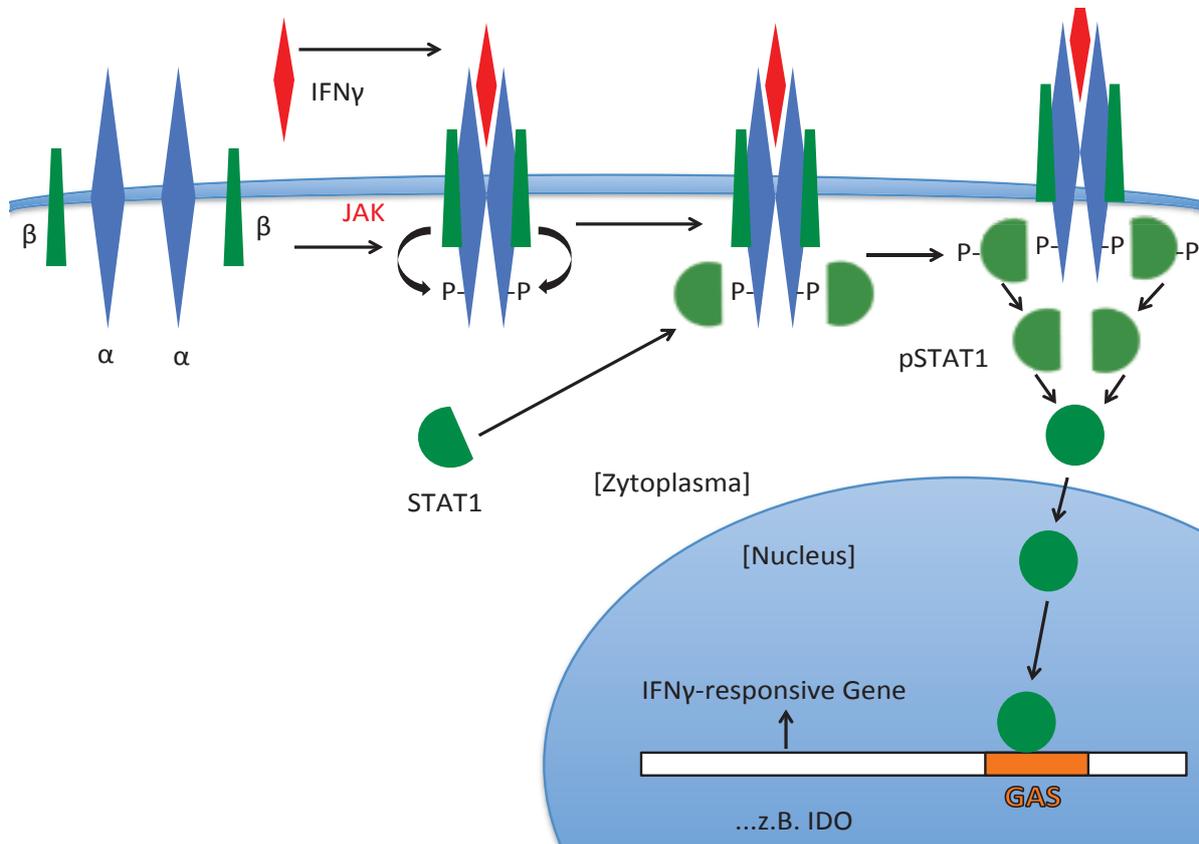


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des JAK-STAT-Signalweges. Modifiziert nach [15]

1.4 *In vitro* Infektionsmodelle

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro* Modellen für mikrobielle Infektionen und der Charakterisierung der Abwehrmechanismen. Dabei wird ein besonderes Augenmerk auf denIDO-vermittelten Mechanismus der oxidativen Tryptophandegradation gelegt. Als Erreger für die Infektionsmodelle dienen *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* und Herpes simplex Virus Typ 1. Mit der Verwendung von bakteriellen, parasitären und viralen Erregern, bzw. von intra- und auch von extrazellulären Erregern soll eine große Bandbreite an Infektionsmodalitäten abgedeckt werden. Denn während extrazelluläre Erreger den humoralen

Komponenten des Immunsystems zugänglich sind, also beispielsweise von Antikörpern gebunden werden und anschließend zerstört werden können, müssen zur Elimination von intrazellulären Erregern andere Strategien angewendet werden. Hier seien z.B. NK-Zellen oder zytotoxische T-Lymphozyten zu nennen. Im Folgenden sollen die eingesetzten Mikroorganismen genauer vorgestellt werden.

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylokokken gehören zur Gruppe der grampositiven Bakterien. Sie wurden erstmals 1884 von Robert Koch beschrieben. Man unterteilt Staphylokokken in Koagulase-positive und Koagulase-negative Spezies. Hier soll vor allem auf die Koagulase-positive Subspezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) eingegangen werden. *S. aureus* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium. Es tritt meist in Konglomeraten auf und wird deshalb zu den „Hauferkokken“ gezählt. *S. aureus* gehört zur natürlichen Hautflora des Menschen, zudem sind die Nasenvorhöfe von ca. 30 % aller gesunden Menschen mit *S. aureus* besiedelt, was bei gesunden, immunkompetenten Menschen kein Problem darstellt. Im Rahmen einer Immunschwäche kann es allerdings leicht zu endogenen Infektionen besonders in Wundbereichen kommen. Zu den durch *S. aureus* hervorgerufenen Erkrankungen gehören Abszesse, Furunkel, Wundinfektionen, Osteomyelitiden, Pneumonien, Endoprotheseninfektionen, Endokarditiden sowie das schwere Krankheitsbild der Sepsis. *S. aureus* gehört zu den „Problemkeimen“ im Krankenhausalltag, die oft für nosokomiale Infektionen verantwortlich sind. Der Keim ist sehr Hitzeresistent und übersteht die Magendarmpassage problemlos, zudem ist er unempfindlich gegenüber Austrocknung. Besonders problematisch sind Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), welche aufgrund ihrer Antibiotikaresistenz besonders bei immunsupprimierten Patienten zu einer erhöhten Mortalität und Morbidität führen können. Der Resistenzmechanismus beruht hier auf der Expression eines veränderten Penicillin-bindenden Proteins (PBP2 → PBP2a). PBP2 dient als Anheftungsstelle für alle β -Lactamantibiotika und Carbapeneme. Da die Affinität dieser Antibiotika zu PBP2a deutlich geringer ist als zu PBP2, gelten Bakterien mit PBP2a als Resistent gegen alle Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme, sodass hier Reserveantibiotika aus anderen Antibiotikaklassen wie Linezolid, Vancomycin und Teicoplanin zum Einsatz kommen [82]. *Staphylococcus aureus* besitzt eine ganze Reihe von

Virulenzfaktoren. Hier ist beispielhaft der *Clumpingfactor* zu nennen, welcher die Bindung von *S. aureus* an Fibrinogen ermöglicht, sodass sich der Keim besonders auf verletztem Gewebe festsetzen kann. Aufgrund der dadurch induzierten Aktivierung von Fibrinmonomeren kann sich *S. aureus* in einer Art Fibrinschutzwand einhüllen, in welchem er sich nun stark vermehrt. Anschließend wird der Fibrinwall mittels der Staphylokinase lysiert, sodass sich *S. aureus* nun systemisch ausbreiten kann [83]. Ein weiterer Pathogenitätsfaktor ist das Protein A, welches antiphagozytäre Effekte vermittelt, indem es den Fc-Teil von Antikörpern blockiert und so dessen Bindung an den Fc-Rezeptor von Makrophagen inhibiert.

1.4.2 Herpes simplex Virus Typ 1

Das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV1) ist ein DNA-Virus und gehört zur Familie der *Herpesviridae*. Insgesamt werden acht humane Herpesviren unterschieden, welche alle spezifische Krankheiten verursachen können. Allen Herpesviren gemein ist, dass sie nach Infektion lebenslang im Wirtsorganismus persistieren [84]. HSV1 wird entweder über direkten Kontakt (z.B. Geschlechtsverkehr, Kuss) oder über durch Tröpfchen- und Schmierinfektionen übertragen. Nach Infektion wandert HSV1 retrograd an den Axonen des Wirtsorganismus entlang und gelangt so in regionale Ganglien, wo es persistiert. In Deutschland sind etwa 80 % aller Erwachsenen latent mit HSV1 infiziert [85]. Die Erstinfektion verläuft in der Mehrzahl der Fälle klinisch stumm ab und geht direkt in das latente Stadium über, in der es durch exogene Reize, transiente Immunschwäche oder durch hormonelle Schwankungen zu einer endogenen Reaktivierung des Virus kommt. Dann werden Viruspartikel gebildet, welche nun aus den Ganglien entlang der Axone wieder in Richtung Peripherie wandern und dort ulzerierende und vesikuläre Läsionen im Bereich der Lippen und der Mundschleimhaut verursachen können [84]. Besonders gefürchtet ist die oft letal verlaufende Herpes-Encephalitis [86].

1.4.3 *Toxoplasma gondii*

Der Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) gehört zum Stamm *Apikomplexa*, der Klasse der *Coccidia* und der Ordnung *Eimeriida*. Sein Hauptwirt ist die Katze, zu den Zwischenwirten gehören z.B. der Mensch, Nagetiere und Vögel. *T. gondii* durchläuft einen spezifischen

Lebenszyklus: Infizierte Katzen scheiden über dem Darm *Oozyten* aus, welche nach Sporulation durch einen Zwischenwirt oral aufgenommen werden. In ihm entwickeln sich aus den *Oozyten* *Tachyzoiten* und nachfolgend *Bradyzoiten*, welche das Ruhestadium von *T. gondii* darstellen [84]. Diese persistieren lebenslang innerhalb von Zysten vor allem in Gehirn und Muskulatur der Wirtsorganismen. Der Lebenszyklus von *T. gondii* ist vollendet, wenn eine Katze nun eine zystenhaltige Maus oder einen Vogel frisst [84]. *T. gondii* ist ein obligat intrazellulärer Erreger. Ca. 95% aller Infektionen mit *T. gondii* verlaufen klinisch stumm, es kommt dabei allerdings zur lebenslangen Persistenz der Parasiten. In seltenen Fällen können bei Erstinfektion eine nuchale Lymphadenopathie und eine Retinochorioiditis auftreten. Bei immunkompromitierten Patienten kann sich eine Infektion mit *T. gondii* als schwere zerebrale oder auch pulmonale Toxoplasmose manifestieren. Gefürchtet ist die Erstinfektion während der Schwangerschaft. Im ersten Trimenon äußert sich diese meist als Spontanabort, im zweiten Trimenon kann es zur Ausbildung der klassischen Trias, bestehend aus Hydrozephalus, intrazerebralen Verkalkungen und Retinochorioiditis kommen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Durch die Regulation des lokalen Tryptophanspiegels im Gewebe ist die humane Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) in der Lage das Wachstum vieler pathogener Mikroorganismen wie z.B. von HSV1, *Toxoplasma gondii* und *Staphylococcus aureus* zu hemmen. Dieser Effekt beruht auf dem einfachen Mechanismus der Nährstoffrestriktion, denn die oben genannten Pathogene sind, wie auch der humane Organismus selbst, essentiell auf die Aminosäure Tryptophan angewiesen. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die IDO auch immunregulatorische Effekte vermittelt, indem sie die T-Zell-Proliferation und –Aktivierung reguliert. Dieser Effekt beruht zum Einen auf der Depletion von Tryptophan und zum Anderen auf der Wirkung toxischer Kynureninmetabolite, welche bei der IDO-katalysierten Reaktion anfallen. Da die IDO zur Enzymfamilie der Dioxygenasen gehört, benötigt sie Sauerstoff zur Katalyse der Tryptophanspaltung. Dabei wird das Indolringsystem von Tryptophan aufgebrochen, indem molekularer Sauerstoff bzw. Superoxid in das Molekül eingebaut wird, sodass *N*-Formly-Kynurenin entsteht. IDO wurde in der Vergangenheit im Rahmen von *in vitro* Untersuchungen ausschließlich unter Laborbedingungen, d.h. bei atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. Derart hohe Sauerstoffkonzentrationen sind im humanen

Organismus allerdings nicht anzutreffen. Physiologisch liegt die mittlere Sauerstoffkonzentration im Gewebe zwischen 3% und 5% O₂. In infizierten oder maligne veränderten Geweben kann die Sauerstoffkonzentration sogar auf unter 1% O₂ fallen. Aus diesem Grund beleuchtet die vorliegende Arbeit, wie dieIDO unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen arbeitet. Dazu wurden die antimikrobiellen und immunregulatorischen Komponenten sowohl unter Normoxie (20% O₂), unter intermediären Sauerstoffkonzentrationen (10% O₂) und unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) untersucht. Weiter sollte geklärt werden, inwieweit Hypoxie die IFN γ -vermittelte Induktion derIDO beeinflusst. Abschließend sollte gezeigt werden, ob es unter hypoxischen Bedingungen zusätzliche Mechanismen gibt, welche die Arbeitsweise derIDO beeinflussen (z.B. vermehrter Zelluntergang oder heraufregulierte Proteindegradation) können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Zelllinie (Eigenschaften)	Quelle	Verwendung
86HG39 (humane Glioblastomzellen)	Dr. Bilzer, Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf	<i>In vitro</i> Analysen
HeLa (humane Zervixkarzinomzellen)	Invitrogen, Karlsruhe	<i>In vitro</i> Analysen
HFF (humane Vorhautfibroblasten)	ATCC, Wesel	<i>In vitro</i> Analysen
PBL (humane Blutlymphozyten)	selbst isoliert	<i>In vitro</i> Analysen

In dieser Arbeit dienten humane Glioblastomzellen (86HG39) als Model für neuronale Zellen. Die Eigenschaften dieser Zelllinie wurden zuvor charakterisiert [87]. Die Zelllinie HeLa diente als Model für Zellen aus dem Urogenitaltrakt, es handelt sich dabei um Zellen eines humanen Zervixkarzinoms welche 1956 etabliert und charakterisiert wurden [88]. Humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden als Model für native humane Zellen und als Model für nicht-spezialisierte Immunzellen eingesetzt. Humane periphere Blutlymphozyten (PBL) dienten in dieser Arbeit als Model für spezialisierte Zellen des Immunsystems.

2.1.2 Erreger für Infektionsversuche

2.1.2.1 Bakterien

Die bakteriellen Infektionsversuche wurden mit *Staphylococcus aureus* durchgeführt. Die eingesetzten Bakterienstämme wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, der Universitätsklinik Düsseldorf, aus Patientenmaterial isoliert und identifiziert.

2.1.2.2 Viren

Humanes Herpes simplex Virus Typ I (HSV-1) stammen von Prof. K. E. Schneeweis und wurden von Prof. Adams (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

2.1.2.3 Parasiten

Der *Toxoplasma gondii* BK-Stamm wurde von Dr. Seitz und Dr. Saathoff (Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn) erhalten.

2.1.3 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.3.1 Medien für die Zellkultur

Zellkulturmedium	L-Tryptophan-konzentration	Zusätze	Verwendung	Hersteller
IMDM (Iscoves's Modified Dulbecco's Medium)	15 µg/mL	5 % FCS	<i>In vitro</i> Analysen	Cambrex, München
RPMI 1640 ohne L-Tryptophan, ohne L-Glutamin	0 µg/mL	580 µg/mL L-Glutamin +/- 5% FCS	<i>In vitro</i> Analysen	Gibco, Karlsruhe

2.1.3.2 Lösungen

Im Folgenden ist die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer aufgeführt. Diese wurden, wenn nicht anders vermerkt, ausschließlich mit hochreinem Wasser einer Aufbereitungsanlage Direct-Q™ (Millipore GmbH, Schwalmbach) hergestellt, welches im weiteren Verlauf als dH₂O bezeichnet wird.

Lösung	Bestandteile
dNTP-Mix	1mM dATP 1mM dCTP 1mM dTTP 1mM dGTP
Proteinase K-Lösung	6.6 µg/mL in PBS
Kryokonservierungslösung	12 % DMSO 88% FCS

2.1.3.3 Puffer

Puffer	Bestandteile
5 x DNA-Probenpuffer	15 % Ficoll Typ 400 0.25 % Bromphenolblau 0.25 % Xylenxyanol in 5 x TBE Puffer
Blotting-Puffer	50 mL NuPage-Blot-Puffer (20x) (Invitrogen) 200 mL Methanol 750 mL dH ₂ O
Ehrlich's Reagenz	1.2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in Eisessig
FACS-Puffer	2 % FCS 2 mM EDTA
Laufpuffer (Western-Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris-Base 0.1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7.7
PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	13.7 mM NaCl 2.7 mM KCl 80.9 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
SDS-Probenpuffer	45 % Glyzerin 25 % β-Mercaptoethanol 10 % SDS 0.15 % Bromphenolblau

	30 mM Tris/HCl pH 6.8
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 7 89 mM Borsäure 2.5 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA

2.1.4 Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
HSV-for	ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA	Detektion von HSV-Replikation
HSV-rev	AGA AGC GGA AGG AGC CGC	Detektion von HSV-Replikation

2.1.5 Sonden

Die Sonde, die in der Real-time PCR zur Detektion der Virusreplikation eingesetzt wurde, wurde von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen. Sie war am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Sonde	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
S-HSV	FAM-CGG AGC GCA GCA TCT CGT CCA-TAMRA	Detektion von HSV

2.1.6 Zytokine

Humanes IFN- γ wurde von R&D (Wiesbaden) bezogen, in einer Konzentration von 2×10^5 U/mL in Tryptophan-freiem RPMI gelöst und in Aliquots von 100 μ L bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.7 Antikörper

Primäre Antikörper	Quelle	Verdünnung
Maus-anti-myc	Serotec, Düsseldorf	1:500
Maus-anti-beta-aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	1:10000
Maus-anti-human-HLD-DR	Biosciences, Heidelberg	1:1000
Kaninchen-anti-IDO	Chemikon, Hofheim	1:3000
Anti-CD3	Rockville, USA	1:3000

2.1.8 Inhibitoren

Inhibitor	Quelle
Proteasominhibitor MG-132	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
SUMOylierungsinhibitor Anancardsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ginkolsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
JAK2-Inhibitor BSK805	Selleck Chemicals, München

2.1.9 Größenstandards

2.1.9.1 Größenstandards für DNA

Für den Größenvergleich von DNA-Fragmenten in Agarosegelen wurde die „1-kb-DNA-Leiter“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) als Standard eingesetzt. Die Lagerung des Größenstandards erfolgte bei einer Temperatur von $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.1.9.2 Größenstandards für Proteine

Bei Analysen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden zur Bestimmung der molekularen Masse der Proteine in jedem Gel $10\mu\text{L}$ des Proteingrößenstandards „SeeBlue Plus2 Pre-stained“ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) aufgetragen.

2.1.10 Enzyme

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

2.1.11 Chemikalien

2.1.11.1 Allgemeine Chemikalien

Acetonitril
Agarose

Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Biozym, Oldendorf

Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
6-Chloro-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
D-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI	Boehringer, Mannheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Roth
4-(Dimethylamin)benzaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
ECL	GE Healthcare, München
EDTA	Riedel-de Haen, Seelze
Eisessig (Essigsäure 96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol 97 %	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Fluoromount-G SBA	SouthernBiotech, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glyzerin	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Kryokonservierungslösung	Merck, Darmstadt
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	BioChrom, Berlin
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	Gibco, Karlsruhe
1-Methyl-L-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-D-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-DL-Tryptophan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Milchpulver	Oxoid, Wesel
MOPS	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NuPage Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pferdeserum	DaKoCytomation, Hamburg
SDS	Schuchard, Hohenbrunn
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

TRIZol Reagenz
 Trypanblau
 Trypsin/EDTA
 Tween-20

Invitrogen, Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Taufkirchen
 Biochrom, Berlin
 Merck, Darmstadt

2.1.11.2 Radiochemikalien

Radiochemikalie	Aktivität	Bezugsquelle
(L-5-)[³ H]-Tryptophan	1 MBq/mL	Hartmann Analytic, Braunschweig hattest du das auch?
[³ H]-Thymidin	0.74 MBq/mL	Amersham, Braunschweig
[³ H]-Uracil	1.23 MBq/mL	Amersham, Braunschweig

Die Radiochemikalien wurden in Tryptophan-freiem RPMI 1640 gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.1.12 Verbrauchsmaterialien

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

2.1.13 Geräte und sonstige Materialien

Analysenwaage	Chyo JL-180, Welabo, Düsseldorf
Bestrahlungsgerät, Gammacell 1000 Elite	Nordion, Ottawa, Kanada
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Blottingkammer	Semidry, Bio-Rad, München
Brutschränke	B5060 EK/CO ₂ , Heraeus, Hanau,
Digitalkamera, Powershot G2	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammern	AGS, Heidelberg
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Photomikroskop II, Zeiss, Köln
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze, Biometram, Göttingen
HPLC Anlage	BeckmanCoulter, Krefeld
Hypoxiebrutschrank	HERAcell 150i, ThermoFisher Scientific, Langenselbold
Hypoxiekammer	Invivo200 hypoxia, Ruskinn, USA
Kippschüttler	Duomax 1030, Heidolph, Nürnberg
Kodak X-OMAT, AR Film,	Rochester, USA
Mikroskope: Axiovert 25, TE2000	Zeiss, Oberkochen; Nikon, Düsseldorf
Nitrozellulosemembran „Protran“ (0.45 µm)	Schleicher & Schüll, Dassel
Pipetten	Finnpipette Labsystems, München
Plattenphotometer	Tecan, Crailsheim
Quarzküvetten, 100 µL	Hellma, Jena
Real-time PCR Gerät iQ5	iCycler, Biorad, München
Röntgenfilmkammer	REGO, Haan
Filme Hyperfilm TM -ECL	GE Healthcare, München
SDS-Gelelektrophoresekammer	XCell, Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsgeber	Electrophoresis constant Power Supply EPS 500/400, Amersham Biosciences, Braunschweig
Photometer	DU 640, Beckman-Coulter, München
GeneQuant II	Pharmacia, Braunschweig

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
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau, Heraeus Biofuge fresco, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 FACS-Analyse

Zur FACS-Analyse wurden je 1×10^6 HeLa-Zellen in eine Zellkulturflasche eingesetzt und mit $\text{IFN}\gamma$ (0 oder 100 U/mL) stimuliert. Anschließend erfolgte eine 72-stündige Inkubation unter normoxischen (20% O_2), hypoxischen (1% O_2) oder anoxischen (0% O_2) Bedingungen in tryptophansupplementiertem (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) IMDM Zellkulturmedium. Eine IDO-Induktion wurde per Kynureninmessung in den Zellüberständen wie unten beschrieben nachgewiesen. Nach Ernte der Zellen wurden diese zentrifugiert und in FACS-Puffer (PBS mit 2% FCS und 2 mM EDTA) bzw. dem gewünschten Antikörper (Maus-anti-human HLA-DR Nr. 559866 oder Isotyp APC Maus IgG2ak Nr. 555576, BD Biosciences, Heidelberg) resuspendiert. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Proben erneut zentrifugiert, in FACS-Puffer resuspendiert und mit DAPI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) 1:1000 geladen. Als Positivkontrolle für Zelltod wurden die Zellen nach der Ernte für 45 Minuten mit PFA [4%] behandelt. Diese Messungen wurden überwiegend von Dr. rer. nat. Silvia Eller und Silke Stuhlsatz durchgeführt.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zelllagerung

Alle Zellkulturen, welche in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden in einem Inkubator bei 37 °C, einer CO₂-Konzentration von 10% und wasserdampfgesättigter Atmosphäre gelagert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen.

2.2.2.2 Zellkultivierung

Die Kultivierung von 86HG39 und HFF Zellen erfolgte in IMDM Medium. Dieses wurde mit 5 % fötalem Kälberserum (FCS) versetzt, welches zuvor bei 56 °C für 30 Minuten inaktiviert wurde. Die Zellkultur erfolgte in 75 cm² oder 162 cm² großen Zellkulturflaschen. Zum Aufteilen oder Ernten der Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, trypsiniert (Trypsin-EDTA 0.25 %) und mechanisch abgelöst. Durch Zugabe von 10 mL Kulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert und die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 in neue Zellkulturflaschen mit frischem Medium gegeben.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellanzahl wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und 1:10 verdünnt. Je 10 µL der Verdünnung wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Es wurden nur die lebenden (ungefärbten) Zellen gezählt.

2.2.2.4 Stimulation von HeLa-, HFF- und 86HG39-Zellen

Alle Experimente wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurden jeweils 3×10^4 HeLa-, HFF- oder 86HG39-Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen IFN γ für 72 Stunden stimuliert. Anschließend erfolgte als Positivkontrolle ein photometrischer Kynureninnachweis.

2.2.2.5 Verwendung von Tryptophan

200 mg L-Tryptophan wurden in 50 mL RPMI Medium im Warmwasserbad gelöst. Die so hergestellte 20 mM Stocklösung wurde steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.6 Kryokonservierung von Zelllinien

Für die Kryokonservierung wurden die zu konservierenden Zellen geerntet und je 1×10^7 Zellen in 200 µl Kryokonservierungslösung (12 % DMSO, 8% FCS) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen in Kryotubes pipettiert, auf – 80 °C heruntergekühlt und am folgenden Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.7 Isolierung von peripheren Blutlymphozyten (PBMC) aus Vollblut

Für jedes Experiment wurden frische periphere Blutlymphozyten aus heparinisiertem (2000 I.E.) Vollblut gewonnen. Dazu wurden 50 ml Vollblut 1:1 mit PBS verdünnt. Dann wurden 15 mL Ficoll-Paque in ein 50 mL Reaktionstube vorgefüllt und langsam mit 35 mL PBS-Blutgemisch überschichtet. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei ca. 600 g und 6 °C, ohne forciertes Beschleunigen und bremsen, so dass sich die Blutbestandteile in der Dichtegradienten-Zentrifugation separierten. Das in der oberen Phase angesammelte Blutserum/PBS Gemisch wurde abgesaugt, so dass die PBMC in der Interphase mit Hilfe einer Glaspipette in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt werden konnten. Die restlichen Bestandteile des Blutes und das Ficoll wurden verworfen. Die PBMC wurden anschließend bis auf 50 mL mit PBS aufgefüllt und zum Entfernen der Thrombozyten für 10 Minuten bei ca. 300 g und 6 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit PBS gewaschen, indem das Röhrchen erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt wurde. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei ca. 250 g und 6 °C wurde das Pellet erneut mit PBS gewaschen. In einem letzten Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 100 g und 6 °C wurden die PBMC im Pellet in 5 mL Tryptophan-freiem RPMI Medium gelöst und wie oben beschrieben ausgezählt.

2.2.2.8 Versuchsansätze mit PBL

In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden je $1,5 \times 10^5$ PBMC in 10 μ L PBS pro Vertiefung eingesetzt. Dazu wurden jeweils 180 μ L IMDM-Kulturmedium mit 5 % FCS gegeben. Dem Medium wurden jeweils unterschiedliche Mengen L-Tryptophan zugegeben. Die Stimulation der T-Zell Proliferation erfolgte durch die Anwesenheit von allogenen T-Zellen oder durch die Zugabe von 10 μ L monoklonalem anti-CD3 Antikörper OKT3 (1:3000 Endkonzentration).

2.2.2.9 Bestrahlung von Zellen

Um eine allogene T-Zellproliferation auszulösen, wurde eine Ko-Kultivierung von T-Zellen zweier verschiedener Spender vorgenommen. Um zu verhindern, dass die T-Zellen beider Spender proliferieren, wurden die Zelle eines Spenders in einem 50 mL Röhrchen in 10 mL IMDM-Medium mit 5 % FCS aufgenommen und mit 50 Gy bestrahlt (Gammacell 1000 Elite, Nordion, Ottawa, Kanada). Anschließend wurden die Zellen bei ca. 250 g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann im gewünschten Medium aufgenommen und für Experimente eingesetzt.

2.2.2.10 Bestimmung der T-Zell Proliferation

Um eine T-Zell-Proliferation nachzuweisen, wurde entweder der Einbau von [3 H]-Thymidin oder der Einbau von (L-5-)[3 H]-Tryptophan gemessen. Für den Nachweis mittels [3 H]-Thymidin wurden die PBMC unter den gewünschten Bedingungen (siehe Legenden im Ergebnisteil) inkubiert. Nach 72 Stunden wurden 7.4 kBq [3 H]-Thymidin pro Vertiefung zugegeben. 24 Stunden später wurden die Zellen eingefroren und bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert. Nach Auftauen wurden die Versuchsansätze in einem Zellernteegerät geerntet, auf Glasfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht und getrocknet. Anschließend wurden die Proben mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) versehen, in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgezählt. Hierzu wurde der radioaktive Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit als Cerenkow-Strahlung gemessen und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) ausgegeben. Für den Nachweis mit [3 H]-Tryptophan wurden die PBL ebenfalls für 72 Stunden

unter den gewünschten Inkubationsbedingungen gehalten. Es folgte eine radioaktive Markierung der Zellen mit 0,75 µg/mL [³H]-Tryptophan. 24 Stunden später wurde der Versuchsansatz eingefroren und bis zur Auswertung bei – 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die T- Zellen in einem Zellerntegerät (Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland) geerntet und auf einen Glasfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht. Nach dem Trocknen der Proben wurden die Filter mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) versehen, in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgezählt. Hierzu wurde die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung gemessen und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) angezeigt.

2.2.2.11 Herstellung hypoxischer Bedingungen

Für alle Hypoxieexperimente wurde die jeweils gewünschte Zelllinie wie oben beschrieben behandelt und anschließend in einem Hypoxiebrutschrank (HERAcell 150 i CO₂ incubator (ThermoFisher Scientific, Langenselbold)) oder in einer Hypoxiekammer (Invivo200 hypoxia chamber (Ruskin)) unter den gewünschten hypoxischen Bedingungen (siehe Legenden in Ergebnisteil) inkubiert [89].

2.2.2.12 Nachweis von Zellüberleben

Um Zellüberleben unter Normoxie (20% O₂) oder Hypoxie (1% O₂) nachzuweisen wurde alamarBlue *cell viability reagent* (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Es wurden jeweils eine unterschiedliche Anzahl HFF, HeLa- oder 86HG39-Zellen (1×10^3 – 3×10^4) in IMDM Zellkulturmedium mit 5% FCS inkubiert (24, 48 oder 72 Stunden lang). Anschließend wurden 20 ml alamarBlue hinzugefügt. Der im alamarBlue enthaltene Farbstoff Resazurin wird ausschließlich in lebenden Zellen zu Resofurin reduziert. Resofurin ist rot und kann photometrisch bei OD_{570 nm} vs. OD_{600 nm} Absorption detektiert werden.

2.2.2.13 Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

Die Kultivierung von *Toxoplasma gondii* erfolgte mit Hilfe von humanen Vorhautfibroblasten (HFF) als „feeder“. Dazu wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen ein Monolayer aus HFF kultiviert und mit *T. gondii* im Verhältnis 4:1 beimpft. Anschließend wurde mikroskopisch kontrolliert, ob die Wirtszellen von *T. gondii* befallen und zerstört waren. War der größte Teil der Wirtszellen lysiert, so wurden die extrazellulären Tachyzoiten von *T. gondii* durch Zentrifugation geerntet oder auf neue HFF Zellen gegeben.

2.2.2.14 Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Für Infektionsversuche wurde *T. gondii* zusammen mit Zellkulturüberstand der HFF-Wirtszellen aus den Zellkulturflaschen geerntet. Um *T. gondii* von den Wirtszellen zu separieren, wurde der Überstand für 10 Minuten bei ca. 60 g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die Toxoplasmen, welche in einem nächsten Zentrifugationsschritt (ca. 650 g für 10 Minuten) pelletiert wurden. Anschließend wurden die Toxoplasmen in Tryptophan-freiem RPMI Medium aufgenommen. Nach Zugabe von Trypanblau im Verhältnis 1:10 wurde die Toxoplasmenkonzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Infektion erfolgte mit 2×10^4 Tachyzoiten pro Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte (Flachboden).

2.2.2.15 Bestimmung der Toxoplasmenproliferation

Die Toxoplasmenproliferation wurde mit Hilfe von [³H]-Uracil detektiert, wie zuvor von Pfefferkorn *et al.* beschrieben [90]. Da Toxoplasmen das Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase besitzen, ist es möglich die direkte Inkorporation von Uracil in die RNA zu messen. Zur Bestimmung des [³H]-Uracil Einbaus wurden *T. gondii* für 48 Stunden nach der Infektion mit 0.012 MBq [³H]-Uracil pro Vertiefung markiert und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellkulturplatten bei -20 °C eingefroren. Nach Auftauen wurden die Versuchsansätze in einem Zellerntegerät geerntet und auf Glasfilter (Preprint Filtermat, LKB Wallac) aufgebracht und trocknen gelassen. Anschließend wurden die Proben mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB Wallac) versehen, in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter (1205 Betaplate, Perkin Elmer) ausgezählt. Hierzu wurde der radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit

als Cerenkow-Strahlung gemessen und in Zerfällen pro Minute (cpm = counts per minute) ausgegeben.

2.2.2.16 Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Bakterienkolonien von *Staphylococcus aureus* wurden auf Blutagarplatten in einem Inkubator bei 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 10 % kultiviert. Für Infektionsversuche mit *S. aureus* wurde eine Bakterienkolonie von der Blutagarplatte entnommen, in 5 mL PBS suspendiert und mit PBS auf 1:100000 verdünnt. Anschließend erfolgte die Infektion der zu untersuchenden Testansätze mit je 10 µL des Bakteriengemisches. Es folgte eine 12-stündige Inkubationsphase bei 37 °C.

2.2.2.17 Bestimmung des Wachstums von *Staphylococcus aureus*

Zur Homogenisierung wurden die mit *S. aureus* beimpften Testansätze mehrfach auf- und abpipettiert. Anschließend wurde deren optische Dichte im Photometer (Tecan, Crailsheim) bei 620 nm gemessen. Zusätzlich wurde das Bakterienwachstum durch eine Bestimmung der CFU ermittelt werden. Dazu wurden die beimpften Kulturen mit PBS sequenziell 1:10 verdünnt auf einer Blutagarplatte ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C konnte die Anzahl der Bakterienkolonien dann in den verschiedenen Verdünnungsstufen ausgezählt werden.

2.2.2.18 Infektion mit Herpes simplex Virus Typ I (HSV-1)

HSV-1 wurde mit PBS verdünnt, anschließend wurden die zu untersuchenden Zellkulturen infiziert ($1,45 \times 10^5$ HSV-1 Kopien pro Vertiefung), indem jeweils 10 µL der Virensuspension pro Vertiefung zu den Zellen zugegeben wurde. Nach einer 48-stündigen Inkubation wurden die Ansätze eingefroren und bei – 20 °C bis zur Auswertung gelagert.

2.2.2.19 Bestimmung der Virusreplikation

Zur Bestimmung der Virusreplikation wurden die eingefrorenen Ansätze aufgetaut und für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände in Eppendorf-Reaktionsgefäße

überführt und bei 16000 g für 10 Minuten abzentrifugiert. Da so gewonnene Pellet wurde mit Hilfe von Proteinase K (5 µg in 75 µL PBS) gelöst. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 56 °C für 60 Minuten und ein Erhitzen auf 96 °C für 20 Minuten. Nun wurde die Virusmenge mittels Real-time PCR bestimmt. Als Standard dienten Plasmide, welche die zu amplifizierende Region der Viren enthalten.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die zu lysierenden Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen für 24 Stunden unter den gewünschten Bedingungen (siehe Legende im Ergebnisteil) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und für 10 Minuten bei ca. 400 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nochmals mit PBS gewaschen und anschließend in 1 mL PBS mit Proteinaseinhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) gelöst und durch 5maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 37 °C Wasserbad lysiert. Die Zelllysate wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten bei 16000 g und 4 °C zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der so gewonnene Überstand wurde dann in Kryotubes aufgeteilt und bei –70 °C gelagert.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine in den Zelllysaten zunächst denaturiert. Dies geschah, indem die Lysate mit SDS-Probenpuffer (Verhältnis 1:5) versetzt und folgend für 10 Minuten im Heizblock 100 °C ausgesetzt wurden. Dann wurden je 20 µL der Lysate pro Proben tasche auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel (NuPage-Polyacrylamidgel, Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Der obere Teil des SDS-Polyacrylamid-Gels enthält dabei ein Sammelgel, welches die zu analysierenden Proteine fokussiert, so dass sie im Trenngel durch Elektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 Volt für circa 2 Stunden. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine ist dabei antiproportional zum Logarithmus der

Molekularmasse. Anhand der Auftrennung des Markers SeeBlue™Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) konnte die Auftrennung der zu untersuchenden Proteine abgelesen werden.

2.2.3.3 Western-Blot

Die per Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nun auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran geblottet. Zur Aktivierung der Proteinbindestellen der Membran wurde den Ansätzen Methanol zugegeben, dies bindet die Proteine durch hydrophobe Kräfte an der Membran. Als Puffersystem dienten in Transferpuffer getränkten Filterpapiere (Whatman Ltd., Maidstone, England). Nun wurden die einzelnen Komponenten in folgender Weise geschichtet: Zu unterst die Graphitplatte (Anode), dann drei Lagen Filterpapier, gefolgt von der Nitrozellulosemembran, auf der dann direkt das SDS-Gel aufgelegt wurde, zu oberst wiederum sechs Lagen Filterpapier, sowie das Verschließen der Apparatur mit der zweiten Graphitplatte (Kathode). Nun folgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 Membran für 90 Minuten.

2.2.3.4 Ponceau S Färbung

Um einen erfolgreichen Proteintransfer zu bestätigen, erfolgte eine Kontrolle mit Ponceau S. Dieser Farbstoff hat die Eigenschaft reversibel an positiv geladenen Aminogruppen der Proteine zu binden und einen sichtbaren, rötlichen Komplex zu bilden. Für die Detektion wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S-Lösung beschichtet, für 120 Sekunden inkubiert und geschwenkt. Anschließend wurde die Ponceau S – Schicht abgegossen. Durch Waschen der Membran mit dH_2O konnte die Membran wieder leicht entfärbt werden. In Filterpapiere gewickelt, welche zuvor in Transferpuffer getränkt wurden, konnten die Membranen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

2.2.3.5 Immundetektion mit Antikörpern

Nach dem Transfer der Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte die Immundetektion mit Hilfe von Antikörpern. Eine solche Membran wurde zu Beginn der Detektion für 1 - 2 h in Blocklösung (3% Milchpulver in PBST [PBS + 0,05% Tween]) bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran

zu blockieren. Anschließend konnte der gewünschte Antikörper, in Blocklösung verdünnt, zugegeben werden. Um das Volumen so gering wie möglich zu halten wurden die Membranen in Folie eingeschweißt. So wurden die Versuchsansätze über Nacht bei 4 °C inkubiert und geschwenkt. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Membranen dreimal für je 10 Minuten in 0,05% PBST-Puffer gewaschen. Nun wurden mit Peroxidase (POX) gekoppelten Sekundäntikörper zugegeben, welche ebenfalls in Blocklösung verdünnt (in der Regel 1:10.000) und für 2 h schwenkend bei RT mit der Membran inkubiert wurden. Um unspezifisch gebundene Sekundäntikörper zu entfernen, wurde die Membran erneut – wie zuvor beschrieben – dreimal gewaschen. Diese Sekundäntikörper erzeugen aufgrund der gekoppelte Peroxidase nach Zugabe eines „ECL Western Blotting“ Substrats (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) Chemielumineszenz. Auf diese Weise konnten die Proteinbanden, welche zuvor durch die Primäntikörper spezifisch markiert wurden, visualisiert werden. Das Detektionsreagenz wurde nach den Herstellerangaben angesetzt. Anschließend wurde jede Membran mit ca. 1 ml Detektionsreagenz behandelt und für 120 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die ECL-Lösung entfernt und die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Folien gelegt. Die Exposition erfolgte in einer Filmkassette auf einem Röntgenfilm (Kodak, Deutschland) je nach Intensität für 30 Sekunden bis über Nacht. Die exponierten Filme wurden unter Rotlicht in einer Dunkelkammer mit Hilfe einer Entwicklermaschine entwickelt. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte durch Vergleich mit einer Markerbande für die Proteingröße auf der Nitrozellulosemembran.

2.2.3.6 Kynureninmessung

Die Kynureninbestimmung in den Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe von Ehrlich's Reagenz (4-(Dimethylamin)benzaldehyd). Dieses bildet mit der aromatischen Aminogruppe des Kynurenins ein Imin, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen werden kann. Mit Hilfe eines Standards lässt sich so die Kynurenin-Konzentration in der entsprechenden Probe berechnen [31]. Aus der produzierten Kynureninmenge im Zellkulturüberstand lässt sich darüber hinaus die Aktivität der IDO bestimmen, da klar gezeigt werden konnte, dass sie mit der Konzentration von N-Formyl-Kynurenin in den Überständen der Zellkulturen korreliert [91]. Zur Kynureninmessung wurden 160 µL der zu untersuchenden Überstände in Mikrotiterplatten überführt und mit 10 µL 30 % TCA versetzt,

um die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Platten für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert, so dass das N-Formyl-Kynurenin zu Kynurenin hydrolysiert wurde. Es folgte eine Zentrifugation bei ca. 400 g für 10 Minuten in einer Plattenzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0, Hanau). Dann wurden je 100 µL der Überstände in Mikrotiterplatten mit Flachboden überführt und mit je 100 µL Ehrlich's Reagenz (1.2 % (w/v) in Eisessig) vermischt. Nun konnte anhand der Produktion eines gelben Azofarbstoffs der Kynureningehalt in den Proben bei 492 nm Absorption im Photometer (Tecan, Crailsheim) ermittelt werden. Als Negativkontrolle dienten jeweils Überstände unstimulierter Zellen.

2.2.3.7 Inhibitorexperimente

Für die Experimente mit unterschiedlichen Inhibitoren wurden jeweils 3×10^4 HFF pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte eingesetzt und mit je 100 U / mL $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren in der jeweils gewünschten Konzentration: Proteasominhibitor MG-132 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen; 0,25– 1 mM) [92], SUMOylierungsinhibitor Anancardsäure (Sigma- Aldrich, Deisenhofen; 2,5–10 mM), Ginkolsäure (Sigma-Aldrich, Deisenhofen; 2,5–10 mM) [93] oder der JAK2-Inhibitor BSK805 (Selleck Chemicals, München; 0,5–2 mM) [94]. Als Kontrolle wurde je ein Testansatz nicht mit Inhibitor versetzt. Nach einer 72-stündigen Inkubation unter den jeweils gewünschten Bedingungen wurde die Kynureninproduktion wie oben beschrieben bestimmt.

2.2.3.8 Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC

Eine quantitative Bestimmung des Tryptophan- und Kynureningehalts in Zellkulturüberständen erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie). Dazu wurden störende Proteine gefällt, in dem die Proben 1:10 mit 25% Sulfosalizylsäure versetzt wurden. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 16000 g zentrifugiert und 500 µL des Überstand in ein HPLC-Glasröhrchen überpipettiert. Dann wurde der pH-Wert mit 85 µL 1 M NaOH auf 7.2 eingestellt. Die so vorbereiteten Proben wurden sofort in dem Gold-Universal-Grad System (BeckmanCoulter, Krefeld) und einer Umkehrphasensäule (Grom-Sil FMOC-2, 100 mm x 4 mm) gemessen. Als Puffer diente

ein Natriumacetat-Puffer (50 mM, pH 4.2). Die Trennung erfolgte in einem Gradienten mit einem ansteigenden Gehalt an Acetonitril bei einer Durchflussrate von 1.0 mL/min. Das Kynurenin wurde nach einer Retentionszeit von ca. 7 Minuten, das Tryptophan nach ca. 14 Minuten detektiert. In jeder Messung wurden unterschiedlich verdünnte Tryptophan- und Kynureninproben als Standards mitgemessen. Diese Messungen wurden überwiegend von Dr. rer. nat. S. Eller durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch Dr. rer. nat. S. Eller und mich.

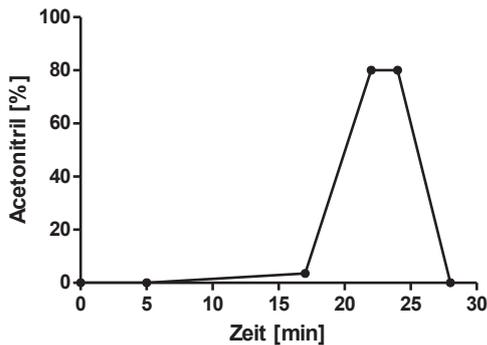


Abbildung 2.1 Gradientenverlauf bei HPLC – Messung

2.2.4 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mittels des Standard t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben. Alle Daten wurden bei Einzelexperimenten als Mittelwerte \pm Standardfehler aufgeführt, bei einer Zusammenfassung mehrerer Experimente als Mittelwerte \pm SEM. Signifikante Unterschiede wurden jeweils mit Sternchen markiert. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

2.2.5 Ethikvotum

Die Studiennummer des Ethikvotums lautet 3838.

3 Ergebnisse

Im ersten Teil dieser Arbeit soll anhand von Stimulationsmodellen untersucht werden, wie sich Hypoxie auf die enzymatische Aktivität und die Expression bzw. die IFN γ -abhängige Induktion des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) auswirkt. Im zweiten Teil steht die Frage im Mittelpunkt, ob die IDO-vermittelten antibakteriellen, antiviralen sowie antiparasitären Effekte unter hypoxischen Bedingungen in gleicher Intensität auftreten, wie unter normoxischen Bedingung. Da die IDO auch immunmodulatorische Effekte vermittelt, indem sie die Aktivierung von T-Zellen beeinflusst, wird im letzten Teil der Arbeit analysiert, wie sich Hypoxie auf diesen Aspekt der IDO-vermittelten Mechanismen auswirkt.

3.1 IDO-Aktivität und Expression in Tumorzellen und Fibroblasten unter Hypoxie

3.1.1 Analyse der IDO-vermittelten Tryptophandegradation unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

Um zu zeigen, wie sich veränderte Sauerstoffkonzentrationen auf die enzymatische Aktivität der IDO auswirken, wurden auf einer Mikrotiterplatte pro Vertiefung je 3×10^4 humane Glioblastomzellen (86HG39), humane *Cervixcarcinom*zellen (HeLa) oder humane Vorhautfibroblasten (HFF) mit jeweils 500 U/ml IFN γ stimuliert. Die Kontrollgruppen blieben jeweils unstimuliert. Anschließend erfolgte für 72 Stunden die Inkubation, entweder unter Normoxie (20% O₂), mittlerer Sauerstoffkonzentration (10% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂). Um die Messstrecke an Kynurenin zu vergrößern, wurde jedem Testansatz 100 μ g/ml L-Tryptophan beigelegt. Nun wurde die Kynureninkonzentration ermittelt, wie in Material und Methoden beschrieben. Abbildung 3.1 zeigt, dass unter normoxischen Bedingungen alle drei Zelltypen in der Lage waren nach Stimulation mit IFN γ Kynurenin zu produzieren. Auch unter mittlerer Sauerstoffkonzentration konnte dies beobachtet werden. Unter Hypoxie (1% O₂) war dieser Effekt weitestgehend aufgehoben. Sowohl die unter Hypoxie stimulierten Zellen, wie auch die unstimulierten Zellen bildeten signifikant weniger Kynurenin, was bedeutet, dass in diesen Zellen signifikant weniger Tryptophan gespalten wurde: Glioblastomzellen bildete unter 1% O₂ circa 94% weniger Kynurenin als unter 20% O₂. HeLa-Zellen bildeten unter 1% O₂ circa 82% weniger Kynurenin als unter 20% O₂ und HFF bildeten unter 1% O₂ circa 80%

weniger Kynurenin als unter 20% O₂. Sodass geschlussfolgert werden kann, dass für die Degradation von L-Tryptophan zu Kynurenin eine ausreichende Sauerkonzentration (>1% O₂) nötig ist.

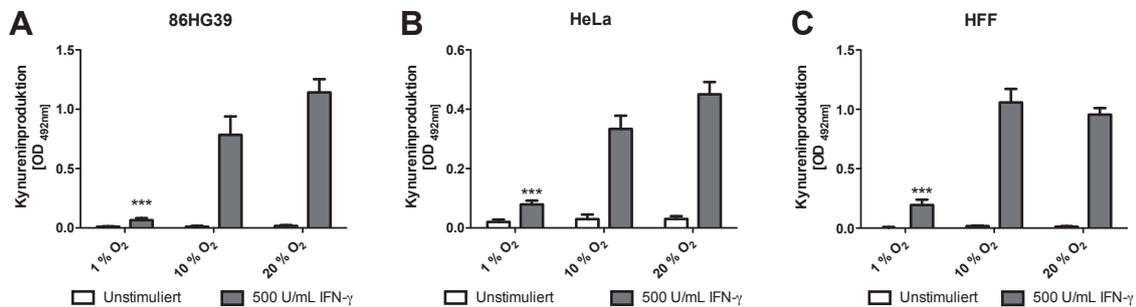


Abbildung 3.1 IDO-Aktivität in IFN γ -stimulierten 86HG39-, HeLa-Zellen oder HFF

In diesem Experiment wurden je 3×10^4 Glioblastomzellen (A), humane Vorhautfibroblasten (B) bzw. HeLa-Zellen (C) pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte ausgesät und entweder mit 500 U/ml IFN γ in IMDM-Zellkulturmedium stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert gelassen. Um eine größere Ausbeute an Spaltprodukt Kynurenin zu erhalten, wurde jedem Test 100 μ g/mL Tryptophan beigelegt. Nach 72 Stunden Inkubation unter absteigenden Sauerstoffkonzentrationen (20%, 10% oder 1% O₂) erfolgte mit Hilfe von Ehrlichs Reagenz die photometrische Messung von Kynurenin bei 492 nm Wellenlänge. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition der Kynureninproduktion im Vergleich zur Positivkontrolle (stimuliert und unter Normoxie inkubiert) wurde mit Sternen (***) ($p \leq 0,001$) markiert.

3.1.2 Analyse der JAK-STAT-abhängigen IDO-Expression bei vermindertem Sauerstoffangebot

Um zu beleuchten, ob die Ursache der reduzierten Produktion an Kynurenin unter Hypoxie eine reduzierte Enzymaktivität der IDO oder eine reduzierte Enzymexpression ist, wurden mit Hilfe von Western-Blots untersucht ob sich in Zellen, welche unter Hypoxie inkubiert wurden, weniger IDO-Protein nachweisen lässt als in Zellen welche unter Normoxie inkubiert wurden. Es wurden jeweils 5×10^5 86GH39-, HeLa- bzw. HFF mit 30 - 500 U/ml IFN γ stimuliert, und unter Normoxie (20% O₂) oder Hypoxie (1% O₂) für 24 Stunden inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren wurden die Zellen geerntet und kryolysiert. Anschließend erfolgte das Auftrennen der Proteine mit Hilfe eines 10%igen Polyacrylamidgels, sowie das Aufblotzen auf eine Nitrozellulosemembran, welche dann mit einem Antikörper gegen humane IDO für weitere 12 Stunden inkubiert wurde. Als Positivkontrolle wurde β -Aktin mit einem Antikörper gegen humanes β -Aktin detektiert. Abbildung 3.2 (A-C) zeigt, dass nach IFN γ -Stimulation IDO-Protein in allen untersuchten

Zelltypen und unter allen Sauerstoffkonditionen nachgewiesen werden konnte, wobei unter Hypoxie in allen Gruppen weniger Protein nachgewiesen werden konnte als unter Normoxie. In Abbildung 3.2. (D-F) ist eine quantitative Auswertung der IDO Banden der in Abbildung 3.2. (A) gezeigten Westernblot-Ergebnisse dargestellt. Besonders unter niedriger IFN γ -Stimulation (30 U/mL) war die Menge an IDO unter Hypoxie bei den Glioblastomzellen (86HG39) (D) um über die Hälfte (62,2 %) erniedrigt. Bei den HeLa-Zellen (Abb. 3.2 E) produzierten die unter Normoxie inkubierten Zellen fast dreimal so viel IDO-Protein wie die unter Hypoxie inkubierten. In humanen Vorhautfibroblasten (Abb. 3.2. F) konnte in der Hypoxiegruppe ein um ca. 60% reduziertes Proteinlevel gegenüber der Normoxiegruppe für IDO nachgewiesen werden. Die Westernblot-Ergebnisse für β -Aktin zeigen, dass in der Hypoxiegruppe der Proteingehalt gegenüber dem der Normoxiegruppen erniedrigt ist, sodass nicht sicher differenziert werden kann ob sich bei den gezeigten Effekten um eine selektive Hemmung der IDO oder möglicherweise um eine generelle Hemmung der Proteinbiosynthese handelt. So ist zu vermuten, dass nicht nur die IDO-Aktivität durch Hypoxie herabgesetzt wird, sondern auch die IFN γ -induzierte IDO-Expression. 2010 zeigten Roth *et al.* anhand von Versuchen mit humanen Zellen der *Tuba uterina*, dass eine reduzierte IDO-Expression unter Hypoxie Konsequenz einer reduzierten Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs sein kann [11]. Zur weiteren Analyse ob der JAK-STAT-Signalweg durch Hypoxie beeinträchtigt wird, wurden native Zellen (HFF) und Tumorzellen (86HG39, HeLa) nach Stimulation mit 500 U/mL IFN γ und Inkubation unter Hypoxie (1% O $_2$) oder Normoxie (20% O $_2$) per Western-Blot auf ihr Gehalt an phosphoryliertem STAT1 (pSTAT1) untersucht. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Abbildung 3.2 G-I zeigt, dass unter Normoxie sowohl in nativen Zellen, als auch in Tumorzellen nach Stimulation mit IFN γ der JAK-STAT-Signalweg induziert wurde, sodass pSTAT1 nachgewiesen werden konnte. Nach IFN γ -Stimulation und Inkubation unter Hypoxie wird, relativ zur Menge an β -Aktin, in Tumorzellen (86HG39) nahezu kein, und in HFF nur eine geringe Menge an pSTAT1 nachgewiesen, was nahelegt, dass die Phosphorylierung von STAT1 zu pSTAT1, und damit der JAK-STAT-Signalweg durch Hypoxie negativ beeinflusst wird. Da die Expression der IDO über den JAK-STAT-Signalweg gesteuert wird, ist es verständlich, dass eine verminderte Menge an pSTAT1, also eine herabgesetzte Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges auch eine verminderte Expression der IDO zur Folge hat. In Zusammenschau der Ergebnisse aus 3.1.1 und 3.1.2 kann angenommen

werden, dass Hypoxie nicht nur die enzymatische Aktivität der Dioxygenase IDO, sondern auch die IFN γ -abhängige Induktion bzw. Expression der IDO hemmt.

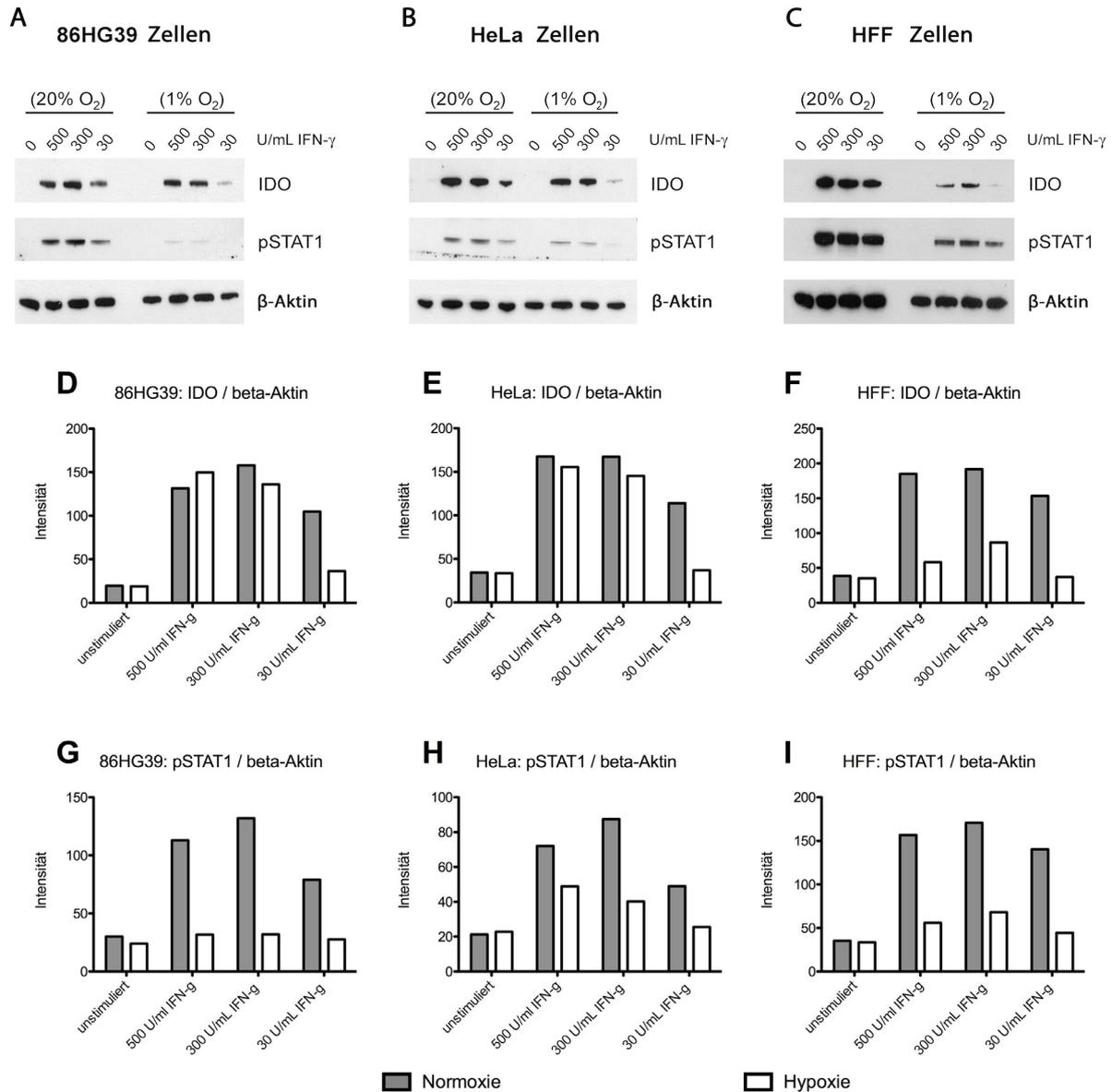


Abbildung 3.2 Western-Blot-Analyse von 86HG39- HeLa-Zellen und HFF

(A-C) 1×10^5 Glioblastomzellen (A), HeLa-Zellen (B) bzw. HFF (C) wurden für 24 Stunden mit 0 U/mL als Negativkontrolle bzw. 30 – 500 U/mL IFN- γ in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und mit Hilfe eines 10%igen Polyacrylamidgels aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Weiter erfolgte die Detektion der IDO bzw. des phosphorylierten STAT1 (pSTAT1) mit anti-IDO- und anti-pSTAT1-Antikörpern. Als Kontrollgruppe wurde β -Aktin mittels anti- β -Aktin-Antikörpern bestimmt. In allen Fällen wurden IgG-Sekundärantikörper zum Nachweis verwendet. (D-I) zeigen die densitometrischen Analysen der Western-Blots aus A-C. Dargestellt sind die Ergebnisse von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

3.1.3 Ausschluss von vermehrter Proteindegradation als Ursache der verminderten IDO-Aktivität unter Hypoxie

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass ein verminderter Sauerstoffgehalt sowohl die enzymatische Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase, als auch die IFN γ -vermittelte Induktion des Enzyms selbst hemmt. Zusätzlich ist in Abbildung 3.2 A-C zu sehen, dass in der Hypoxiegruppe der Proteingehalt, gemessen anhand des Gehaltes von β -Aktin, gegenüber dem der Normoxiegruppen erniedrigt war. So stellte sich die Frage, ob die oben beschriebene, verminderte Aktivität der IDO Folge einer erhöhten Proteindegradation unter Hypoxie sein kann. Um diesen Aspekt näher zu beleuchten, wurden humane Vorhautfibroblasten (HFF) mit 100 U/mL IFN γ stimuliert und entweder mit dem Proteasominhibitor MG-132 oder den Sumoylierungsinhibitoren (sumo = *small ubiquitin related modifier*) Anancardsäure oder Ginkolsäure versetzt. Anschließend wurden die Testansätze für 72 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) oder unter Normoxie (20% O₂) inkubiert. Die Auswertung erfolgte anhand der photometrisch nachgewiesenen Menge an Kynurenin, was bei der IDO-vermittelten Degradation von L-Tryptophan anfällt. In Abbildung 3.4 wird gezeigt, dass die Zellen aus der Gruppe „Hypoxie – ohne Inhibitor“ ca. 80 % weniger Kynurenin gebildet haben, als die Zellen aus der Kontrollgruppe „Normoxie – ohne Inhibitor“. Weiter ist zu sehen, dass auch die Zellen aus der Gruppe „Hypoxie – MG-132“ ca. 75 % - 85 % weniger Kynurenin als die Kontrollgruppe bildeten. Gleiches gilt für die Zellen aus den Gruppen „Hypoxie – Anancardsäure“ sowie „Hypoxie – Ginkolsäure“. Wichtig ist die Beobachtung, dass sich innerhalb der Hypoxiegruppen (mit und ohne Inhibitor) für die Kynureninbildung kein signifikanter Unterschied nachweisen lässt, also dass die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren unter Hypoxie keine weitere IDO-Hemmung bewirkte. So kann gefolgert werden, dass eine vermehrte Proteindegradation durch das Proteasom und nach Sumoylierung unter Hypoxie nicht für die beobachtete Hemmung der IDO-vermittelten enzymatischen Reaktion bzw. der IDO-Expression verantwortlich ist.

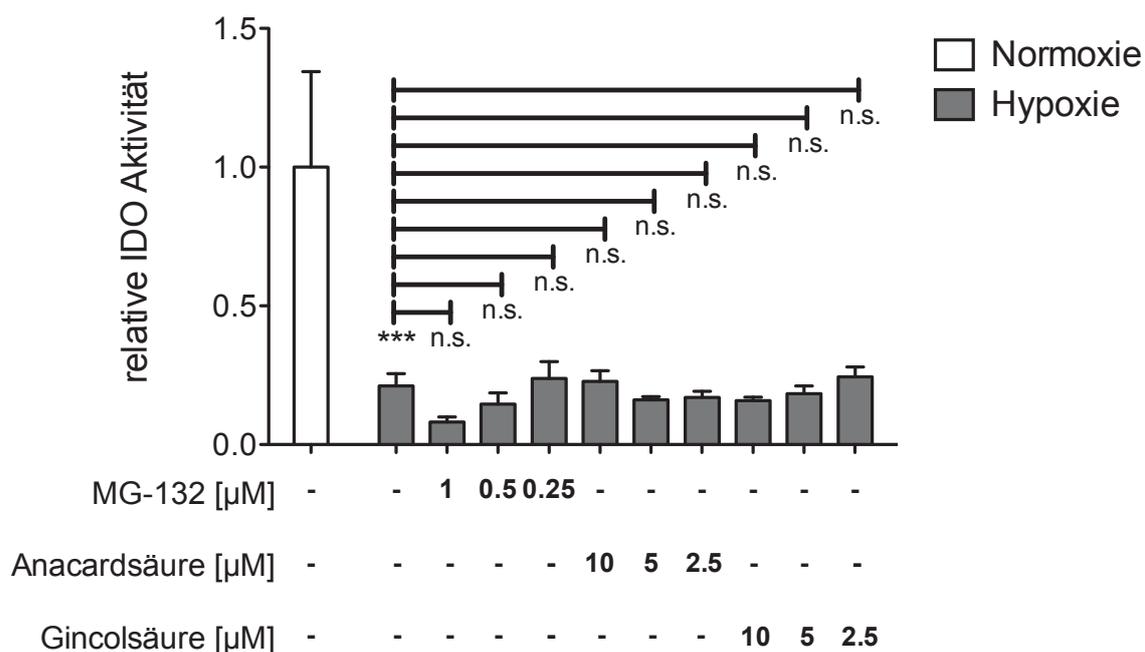


Abbildung 3.3 Hemmung der enzymatischen Aktivität der IDO durch Zugabe verschiedener Inhibitoren

Kynurenin-Produktion von IFN γ -stimulierten (100 U/mL) oder unstimulierten HFF in IMDM-Zellkulturmedium, bei Zugabe von Proteasominhibitor MG-132 (0-1 mM) oder der Sumoylierungsinhibitoren Anacardsäure (0-10 mM), oder Ginkolsäure (0-10 mM). Die Zellen wurden nach IFN γ -stimulation (100 U/mL) für 72 Stunden unter Hypoxie oder Normoxie inkubiert. Dann erfolgte die Kynureninmessung. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition der Kynureninproduktion im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternen (***) $p \leq 0,001$ markiert. n.s. = Nicht signifikant.

3.1.4 Analyse der Expression weiterer JAK-STAT-induzierter Proteine unter Hypoxie

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass Hypoxie nicht nur die enzymatische Aktivität der IDO, sondern auch die IFN γ -induzierbare Expression der IDO selbst beeinflusst, indem ihre Induktion per JAK-STAT-Signalweg inhibiert wird. 2012 zeigten O'Shea *et al.*, dass der IFN γ -induzierbare JAK-STAT-Signalweg verantwortlich für die Induktion vieler für das Immunsystem relevante Proteine und Enzyme ist [95]. So kann erwartet werden, dass Hypoxie auch die Expression anderer JAK-STAT-abhängiger Proteine supprimiert. Um diese Hypothese zu untermauern wurde exemplarisch die Expression von HLA-DR, einem Zelloberflächenrezeptor der *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) analysiert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden

Tumorzellen eines *Cervixcarcinoms* (HeLa) in IMDM-Zellkulturmedium mit 100 U/mL IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert gelassen und für 72 Stunden unter Normoxie (20% O $_2$) oder unter Hypoxie (1% O $_2$) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und in Mikrotiterplatten (Flachboden) mit anti-HLA-DR-Antikörpern und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI versetzt und eine FACS-Analyse durchgeführt. Abbildung 3.4 (A) verdeutlicht wie erwartet, dass es zwischen den Gruppen „Normoxie – unstimuliert“ und „Hypoxie – stimuliert“ keinen signifikanten Unterschied gibt, beide Gruppen exprimieren etwas gleich viel HLA-DR (ca. 10 2). Hingegen waren die Zellen aus der Gruppe „Normoxie – stimuliert“ in der Lage ca. 10fach mehr HLA-DR zu exprimieren, ihr Maximum liegt bei ca. 10 3 . Mit anderen Worten ist hier unter Normoxie eine positive und für Hypoxie eine negative Stimulation nachweisbar. So kann angenommen werden, dass Hypoxie neben der Expression der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) auch die Expression eines anderen JAK-STAT-induzierten Proteins hemmt.

3.1.5 Ausschluss von vermehrtem Zelluntergang als Ursache der verminderten IDO-Expression unter Hypoxie

Die bisher präsentierten Daten zeigen, dass Hypoxie neben der Expression der IDO, auch die Phosphorylierung von STAT1 und die Expression von HLA-DR herabsetzt. So stellt sich die Frage, ob nicht nur die Expression der bisher untersuchten Proteine herabgesetzt ist, sondern die Expression aller Proteine. Eine mögliche Ursache für generell erniedrigte Proteinlevel wäre vermehrter Zelltod unter Hypoxie. Gegen einen vermehrten Zelluntergang als Ursache spricht die Tatsache, dass die Proteinlevel der Hypoxiegruppen gegenüber denen der Normoxiegruppen, detektiert anhand von β -Aktin, in Abbildung 3.2 nur dezent erniedrigt waren. Abbildung 3.4 (E) zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse nach DAPI-Färbung: DAPI färbt DNA (und auch RNA), kann die Membran lebender Zellen allerdings nur sehr langsam und eingeschränkt durchdringen, sodass DAPI bei kurzen Einwirkzeiten nur die DNA toter Zellen (zerstörte Membranen) färben kann. Der überwiegende Anteil der Zellen in Abbildung 3.4 (E) wurde in der Frühphase entweder gar nicht oder nur sehr gering durch DAPI angefärbt, was bedeutet, dass diese Zellen die 72 stündige Inkubation sowohl unter Normoxie (20% O $_2$), als auch unter Hypoxie (1% O $_2$) und sogar unter Anoxie (0% O $_2$) überlebten. Als Positivkontrolle für Zelltod wurde eine Gruppe Zellen mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert

(Abbildung 3.4 E). Um das Zellüberleben genauer zu quantifizieren, wurden verschiedene Mengen ($1 \times 10^3 - 4 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung) Tumorzellen (86HG39, HeLa) als auch Fibroblasten (HFF) für 24 Stunden, 48 Stunden oder 72 Stunden unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert und anschließend mit *AlamarBlue* gefärbt. Das in diesem Farbstoff enthaltene Resazurin wird in lebenden Zellen zu dem rotleuchtenden Farbstoff Resofurin reduziert. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 570 – 600 nm. Abbildung 3.4 B-D zeigt, dass in allen Gruppen und unter allen Sauerstoffkonditionen vergleichbar viele vitale Zellen nachgewiesen werden konnten, was nahelegt, dass kein vermehrter Zelluntergang unter Hypoxie stattfindet. Zusätzlich wurde das Zellüberleben auch funktionell anhand der IDO-vermittelten Kynurenin-Produktion untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit 500 U/mL IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert gelassen. Dann wurden die Zellen für 72 Stunden unter Hypoxie inkubiert. Anschließend folgte eine zweite Inkubationsphase für 48 Stunden unter Normoxie. Die Auswertung erfolgte anhand des photometrischen Nachweises von Kynurenin mit Hilfe von Ehrlichs Reagenz bei 492 nm Wellenlänge. Abbildung 3.4 F zeigt, dass nach Inkubation der Zellen unter Hypoxie, wie erwartet, sehr wenig Kynurenin nachgewiesen werden konnte. Nach Reoxygenierung waren die Zellen wieder in der Lage, effektiv L-Tryptophan zu Kynurenin zu degradieren, was den Schluss zulässt, dass der größte Anteil der Zellen die Hypoxiephase überlebte. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass vermehrten Zelluntergang nicht als Begründung für die unter Hypoxie herabgesetzte Expression und Aktivität der IDO, bzw. die herabgesetzte Expression von HLA-DR infrage kommt.

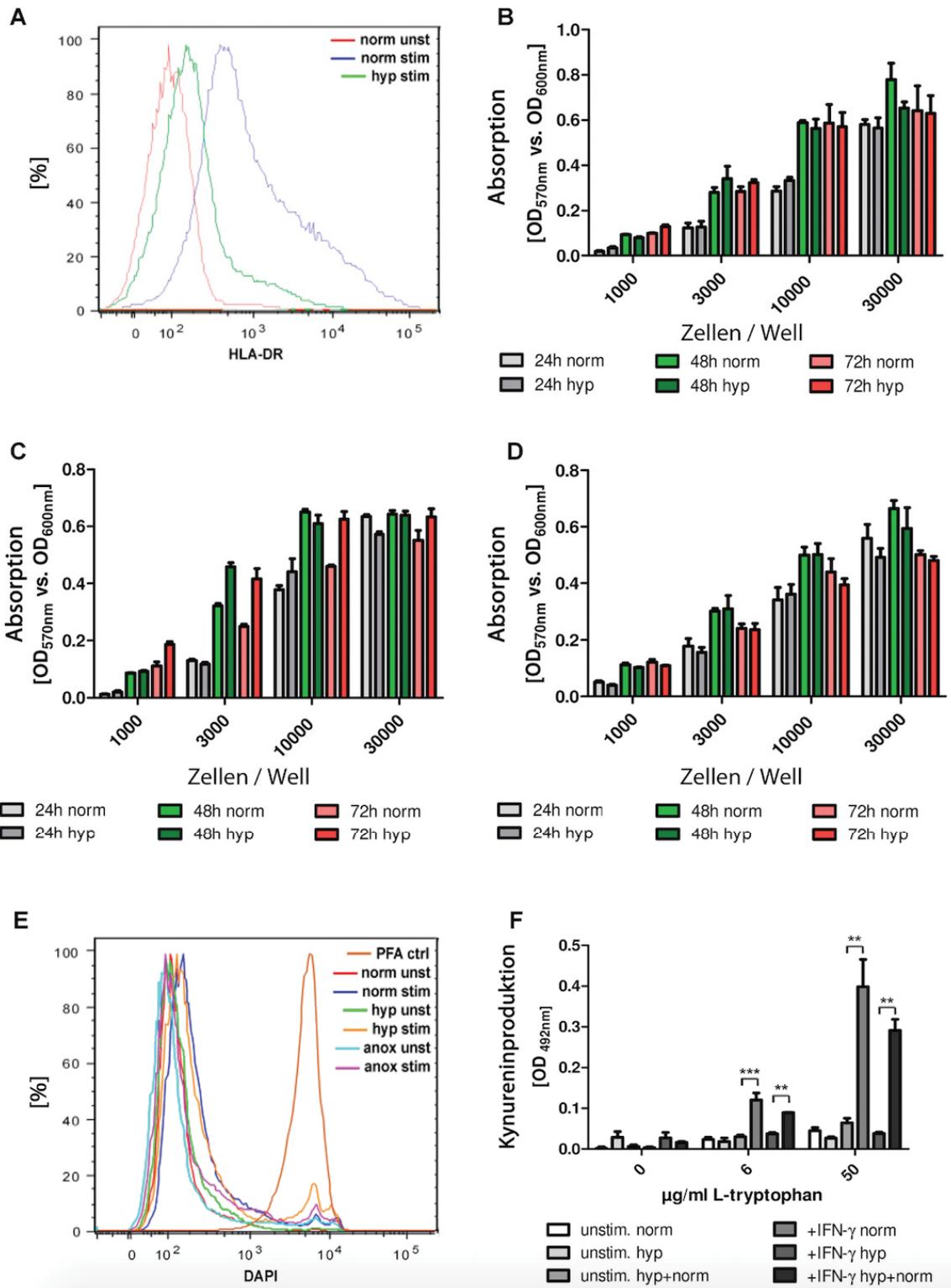


Abbildung 3.4 JAK-STAT-Signalweg und Zellüberleben unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen

(A) FACS-Analyse von HeLa-Zellen auf HLA-DR-Expression, nach Stimulation mit 100 U/mL IFN γ in IMDM-Zellkulturmedium mit Zugabe von L-Tryptophan (100 μ g/mL) und Inkubation unter Hypoxie (1 % O $_2$) oder Normoxie (20 % O $_2$). (B-D) Vitalitätsanalyse von 86HG39- (B) HeLa- (C) und HFF (D). Nach Inkubation unter Hypoxie oder Normoxie für 24 – 72 Stunden wurde *alamarBlue* zugegeben, und dessen Reduktion durch lebende Zellen quantitativ per Photometer bei 570 nm bzw. 600 nm Wellenlänge gemessen. (E) FACS-Analyse von stimulierten (100 U/mL IFN γ) oder unstimulierten HeLa-Zellen. Inkubation in IMDM-Zellkulturmedium mit Zugabe von L-Tryptophan (100 μ g/mL) unter Anoxie (0 % O $_2$), Hypoxie (1 % O $_2$) oder Normoxie (20 % O $_2$). DAPI-Färbung der Zellen zum Nachweis von Zellüberleben. Als Positivkontrolle für Zelltod wurde eine Gruppe mit PFA fixiert. (F) Photometrischer Nachweis von Kynurenin bei 492 nm Wellenlänge aus Überständen von IFN γ -Stimulierten (500 U/mL) oder unstimulierten HeLa-Zellen nach Zugabe von verschiedenen Mengen von L-Tryptophan (0, 6 oder 50 μ g/mL). Die Zellen wurden für 72 Stunden unter Hypoxie (1 % O $_2$) oder Normoxie (20 % O $_2$) inkubiert. Dann erfolgte die erste Kynureninmessung. Die Hypoxiegruppe wurde anschließend für weitere 48 Stunden unter Normoxie (20 % O $_2$) inkubiert. Dann erfolgte eine zweite Kynureninmessung. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternen (** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001) markiert.

3.2 Analyse von IDO-vermittelten antimikrobiellen Effekten unter Hypoxie anhand von Infektionsmodellen

3.2.1 Analyse der IDO-vermittelten Hemmung des bakteriellen Wachstums unter Hypoxie

Die IDO-vermittelte Reduktion der lokalen Tryptophankonzentration stellt einen wichtigen Mechanismus in der Abwehr mikrobieller Erreger dar. So sollte als erstes an *Staphylococcus aureus*, als Beispiel für bakterielle Erreger, untersucht werden, wie effektiv die IDO unter Hypoxiebedingungen wirken kann. Da eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* in manchen Fällen zu einer intrazerebralen Abszessbildung führen kann, wurde dieses Experiment mit humanen Glioblastomzellen (86HG39), als Modell für Zellen des ZNS, durchgeführt. So wurden auf einer Mikrotiterplatte (Flachboden) je 3 x 10 4 humane 86HG39-Zellen zur IDO-Induktion mit je 500 U/mL IFN γ stimuliert oder blieben als Kontrollgruppe unstimuliert. Die Zellen wurden zunächst für 72 Stunden unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1% oder 20% O $_2$) inkubiert. Anschließend wurden deren Überstände in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mit *Staphylococcus aureus* beimpft. Um einen Mangel an L-Tryptophan auszugleichen, wurde einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL Tryptophan supplementiert, den anderen Gruppen wurde das gleiche Volumen tryptophanfreies Medium zugegeben. Dann folgte eine weitere 24-stündige Inkubationsphase unter Normoxie. Die Auswertung des bakteriellen Wachstums erfolgte anhand einer photometrischen Messung der Bakteriendichte bei 620 nm Wellenlänge. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3.5.1 dargestellt. Wie zu erwarten, zeigte *S. aureus* in den unstimulierten Ansätzen ein starkes Wachstum. In

den unter Normoxie (20 % O₂) stimulierten Ansätzen wurde das Wachstum von *Staphylococcus aureus* gehemmt, es wurde eine OD von ca. 0,007 erreicht. Hingegen reichte das bakterielle Wachstum in der Gruppe der unter Hypoxie (1 % O₂) mit IFN γ stimulierten Ansätze bis zu einer OD von ca. 0,27. Unter Hypoxie wurde der antibakterielle Effekt aufgehoben und es konnte gegenüber der Normoxiegruppe eine um über 90 % erhöhte Bakteriendichte gemessen werden. Außerdem ist zu sehen, dass der IFN γ -vermittelte antibakterielle Effekt in der Gruppe der unter Normoxie stimulierten Zellen durch L-Tryptophansupplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden konnte, wodurch der Schluss zulässig ist, dass die Hemmung des bakteriellen Wachstums durch einen Mangel an L-Tryptophan begründet ist.

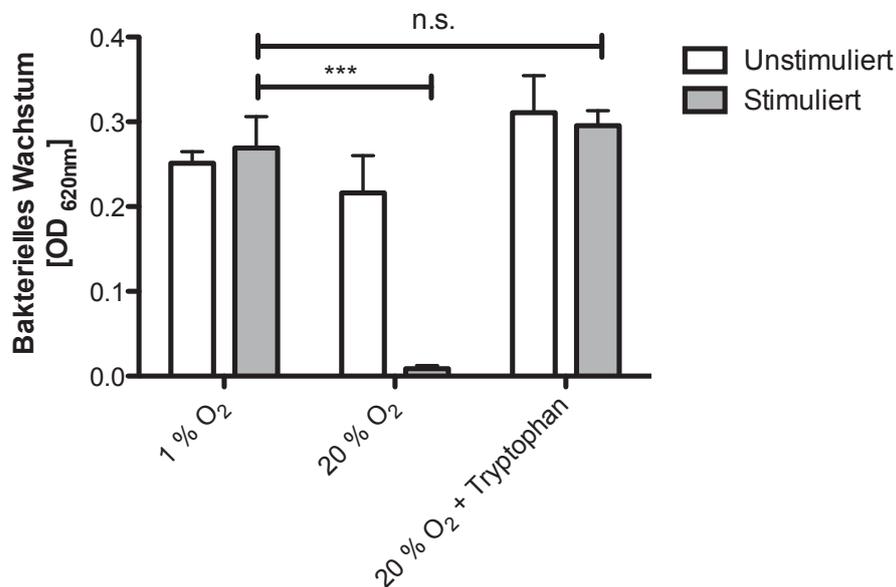


Abbildung 3.5.1 Antibakterieller Effekt in IFN γ -stimulierten Glioblastomzellen unter Hypoxie

Es wurden 3×10^4 86HG39-Zellen pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte ausgesät und entweder mit 500 U/ml IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert belassen. Nach 72 Stunden Inkubationszeit unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1% O₂ oder 20 % O₂), erfolgte die Inokulation der Überstände mit einer 1:100000 verdünnten Suspension einer Kolonie *Staphylococcus aureus*. Parallel wurden 100 μ g/mL L-Tryptophan bzw. tryptophanfreies Medium supplementiert. Nach weiteren 24 Inkubationszeit unter Normoxie erfolgte die photometrische Messung der Bakteriendichte bei 620 nm Wellenlänge. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition des bakteriellen Wachstums im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternchen (***) ($p \leq 0,001$) markiert. n.s. = nicht signifikant.

Da die verwendeten Glioblastomzellen maligne verändert sind, stellte sich die Frage, ob die gemachten Beobachtungen eine Besonderheit des Glioblastoms darstellen oder ob die

Ergebnisse mit physiologischen Zellen reproduzierbar sind. Aus diesem Grund wurde das oben beschriebene Experiment mit humanen Vorhautfibroblasten (HFF) (als Modell für native Zellen) wiederholt. So wurden nun HFF ebenfalls zurIDO-Induktion mit je 500 U/mL IFN γ stimuliert oder blieben als Kontrollgruppe unstimuliert. Die Zellen wurden für 72 Stunden unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1% oder 20% O $_2$) inkubiert. Anschließend wurden deren Überstände in eine neue Mikrotiterplatte überführt und mit *Staphylococcus aureus* beimpft. Um einen Mangel an L-Tryptophan auszugleichen, wurde einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL Tryptophan supplementiert, den anderen Gruppen wurde das gleiche Volumen tryptophanfreies Medium zugegeben. Dann folgte eine weitere 24-stündige Inkubationsphase unter Normoxie. Die Auswertung des bakteriellen Wachstums erfolgte anhand einer photometrischen Messung der Bakteriendichte bei 620 nm Wellenlänge bzw. anhand der Bestimmung von *Colony forming units* (CFU) wie in Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 3.5.2 dargestellt. Wie zu erwarten, zeigte *S. aureus* in den Überständen der unstimulierten Zellen ein starkes Wachstum (OD 0,24). In der Gruppe der unter Normoxie (20 % O $_2$) mit 500 IFN γ U/mL stimulierten Ansätze wurde das Wachstum von *Staphylococcus aureus* inhibiert, es wurde eine OD von 0,02 gemessen. In der Gruppe der unter Hypoxie (1 % O $_2$) mit 500 U/mL IFN γ stimulierten Ansätze konnte *Staphylococcus aureus* ebenfalls stark wachsen, es wurde eine OD von ca. 0,21 gemessen. Hier ist also eine Reduktion des antibakteriellen Effektes unter Hypoxie um fast 90 % zu beobachten. Außerdem ist zu sehen, dass der antibakterielle Effekt durch L-Tryptophansupplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden konnte. Die gleichen Ergebnisse können auch durch die CFU-Analyse gezeigt werden: In den Überständen der unter Normoxie (20 % O $_2$) mit IFN γ stimulierten Zellen waren 1×10^4 CFUs nachweisbar. In den Überständen der unter Hypoxie (1 % O $_2$) mit IFN γ stimulierten Zellen konnten über 1×10^6 *colony forming units* gezählt werden, also über 2 log-Stufen mehr. Auch hier konnte der antibakterielle Effekt durch L-Tryptophansupplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden, was zeigt, dass die Hemmung des bakteriellen Wachstums auf einen Mangel an L-Tryptophan zurückzuführen ist.

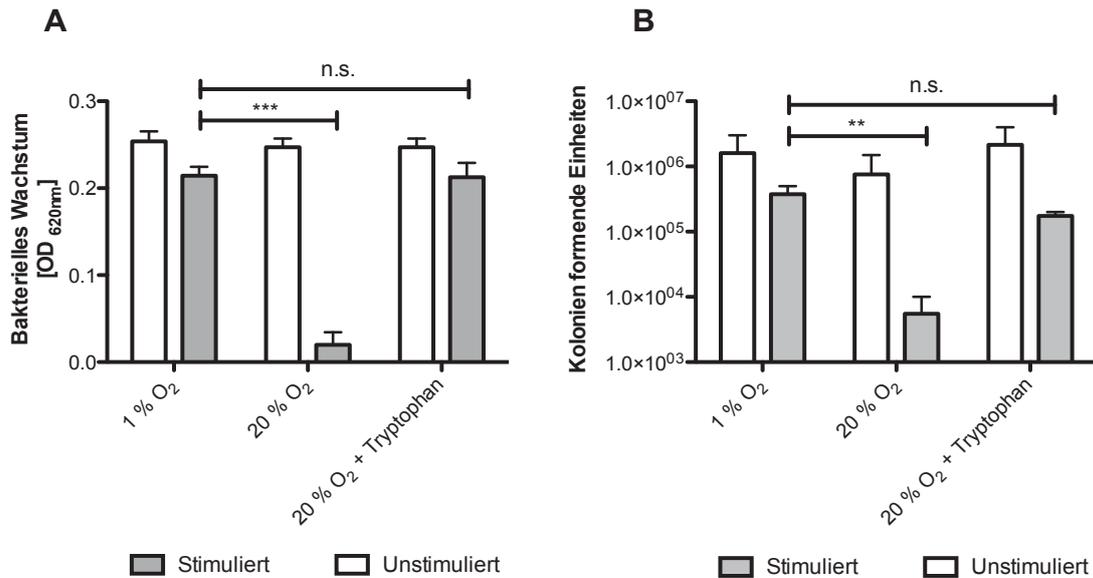


Abbildung 3.5.2 Antibakterieller Effekt in IFN γ -stimulierten HFF unter Hypoxie

(A) Es wurden 3×10^4 humane Vorhautfibroblasten (HFF) pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte ausgesät und entweder mit 500 U/ml IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert belassen. Nach 72 Stunden Inkubationszeit unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (1% O₂ oder 20% O₂) erfolgte die Beimpfung der Überstände mit einer 1:100000 verdünnten Suspension einer Kolonie *Staphylococcus aureus*. Parallel wurden 100 μ g/mL L-Tryptophan bzw. tryptophanfreies Medium supplementiert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit unter Normoxie erfolgte die photometrische Messung der Bakteriendichte bei 620 nm Wellenlänge. (B) Graphische Darstellung von Colony forming units (CFU). Sequenzielle Verdünnungsreihen der *Staphylococcus aureus*-haltigen Überständen aus (A) in PBS. Anschließend wurden 10 μ L einer jeden Verdünnungsstufe auf *Columbia* Blutagarplatten gegeben, dann erfolgte eine 18-stündige Inkubation unter Normoxie. Ausgezählt wurden die gewachsenen Bakterienkolonien. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition des bakteriellen Wachstums im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternen (** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$) markiert. n.s = nicht signifikant.

3.2.2 Analyse der IDO-vermittelten Hemmung parasitären Wachstums unter Hypoxie

Als nächstes sollten weitere IDO-vermittelte antimikrobielle Effekte anhand von Infektionsversuchen mit *Toxoplasma gondii*, als Beispiel für parasitäre Erreger, unter hypoxischen Bedingungen analysiert werden. Dazu wurden je 3×10^4 HFF pro Vertiefung in einer Mikrotiterplatte ausgesät und mit 500 U/mL IFN γ in IMDM-Zellkulturmedium stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Nach 72 Stunden Inkubation unter Normoxie (20% O₂), mittleren Sauerstoffkonzentrationen (10% O₂ und 5% O₂), oder Hypoxie (3% O₂ und 1% O₂) erfolgte die Infektion mit je 2×10^4 *Toxoplasma gondii* - Tachyzoiten pro Vertiefung. Zu diesem Zeitpunkt wurde einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL L-Tryptophan

zugegeben, um den IDO-vermittelte Tryptophanmangel auszugleichen. Die anderen Gruppen wurden mit der gleichen Menge tryptophanfreiem Medium versetzt. Nach einer weiteren 72-stündigen Inkubationsphase wurde die Toxoplasmaproliferation anhand des Einbaus von radioaktiv-markiertem Uracil ($[^3\text{H}]$ -Uracil) detektiert. In Abbildung 3.6 ist dargestellt, dass der intrazelluläre Parasit *Toxoplasma gondii* in unstimulierten HFF ein starkes Wachstum zeigte. Wie erwartet wurde das Parasitenwachstum unter Normoxie nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ gehemmt, wohingegen die Parasiten in den stimulierten Hypoxiegruppen gut proliferieren konnten. So konnte in der unstimulierten Gruppe (20% O_2) im Vergleich zur stimulierten Gruppe (20% O_2) ein circa 3fach stärker ausgeprägtes Parasitenwachstum gezeigt werden. Eine ähnliche Beobachtung lässt sich in den unter 5 % O_2 und unter 10 % O_2 inkubierten Ansätzen machen: Im Vergleich zur stimulierten Gruppe konnte in der unstimulierten Gruppe ein ca. 2 - 3fach stärker ausgeprägtes Parasitenwachstum gezeigt werden. In den unter 3 % O_2 inkubierten Ansätzen ist in der stimulierten Gruppe auch eine Hemmung des parasitären Wachstums nachweisbar, jedoch ist diese nicht mehr so stark ausgeprägt: Im Vergleich zur stimulierten Gruppe konnte in der unstimulierten Gruppe ein ca. 1,3fach stärker ausgeprägtes Parasitenwachstum gezeigt werden. Damit kann angenommen werden, dass für eine effektive IDO-vermittelte Toxoplasmenabwehr eine Art Schwellenwert für die benötigte Sauerstoffkonzentration existiert, der bei über 3% O_2 liegen muss. In den unter 1 % O_2 inkubierten Ansätzen konnte *T. gondii* sowohl in den unstimulierten, als auch in stimulierten Zellen gut proliferieren. Der antiparasitäre Effekt konnte durch L-Tryptophansupplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden (exemplarisch anhand der unter 20% O_2 inkubierten Ansätze gezeigt). Auch hier lässt sich folgern, dass das parasitäre Wachstum unter Hypoxie (1 % O_2) aufgrund einer hypoxiebedingten Hemmung der IDO nicht mehr inhibiert werden kann.

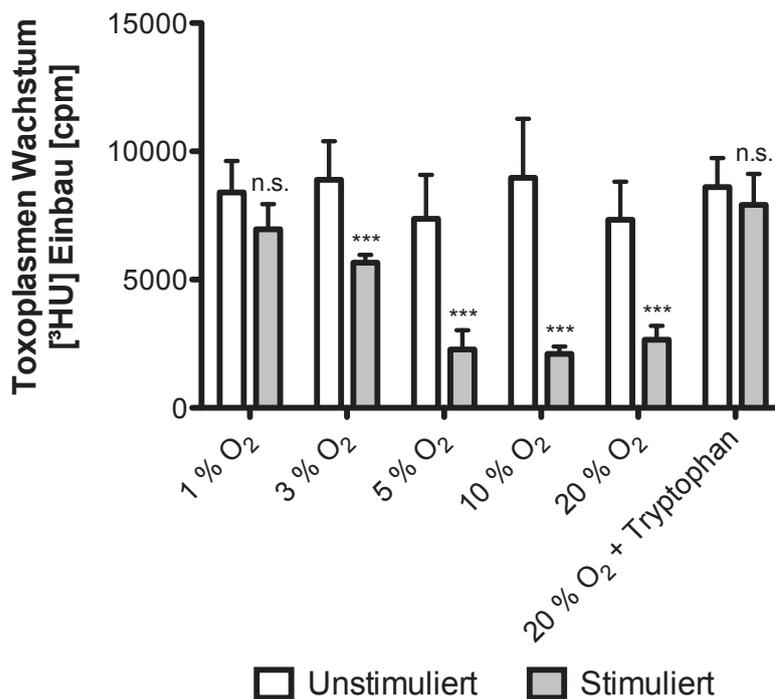


Abbildung 3.6 Antiparasitärer Effekt in IFN γ -stimulierten HFF unter Hypoxie

3 x 10⁴ humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden pro Vertiefung ausgesät und mit 500 U/mL IFN γ in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (20%, 10%, 5%, 3% oder 1% O₂) inkubiert. Dann erfolgte die Infektion mit jeweils 2 x 10⁴ *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten pro Vertiefung. Parallel wurde 100 μ g/mL L-Tryptophan (als Kontrollgruppe) oder tryptophanfreies Medium supplementiert. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurde die Parasitenproliferation durch den Einbau von [³H]-Uracil ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition des parasitären Wachstums im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternen (***) p \leq 0,001) markiert. n.s. = nicht signifikant.

3.2.3 Analyse der IDO-vermittelten Inhibition der Virusreplikation unter Hypoxie

Als nächstes stellte sich die Frage, ob auch antivirale Effekte, welche unter Normoxie durch die IDO vermittelt werden können, unter Hypoxie aufgehoben sind. Dazu wurden *in vitro* Infektionsversuche mit Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1), als Beispiel für virale Erreger, an humanen Vorhautfibroblasten (HFF) durchgeführt. Dazu wurden je 3 x 10⁴ Fibroblasten in IMDM-Zellkulturmedium mit 500 U/mL IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert gelassen. Die Zellen wurden für 72 Stunden entweder unter 1%iger Sauerstoffkonzentration (Hypoxie) oder unter 20%iger Sauerstoffkonzentration (Normoxie) inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zellen mit je 1,45 x 10⁵ Viruskopien HSV-1 pro Vertiefung. Nach

einer weiteren 72-stündigen Inkubationsphase erfolgte die Messung der Virusmenge per *real time* PCR. Abbildung 3.7 zeigt, dass sich das HSV-1 in den unstimulierten Kontrollgruppen gut replizieren konnte. In der unter Normoxie mit IFN γ stimulierten Gruppe konnte die Virusreplikation um ca. 2 log-Stufen gehemmt werden. Dahingegen ist in der unter Hypoxie stimulierten Gruppe keine Inhibition der Virusreplikation zu verzeichnen. Das zeigt, dass Hypoxie die IFN γ -vermittelte Inhibition der viralen Replikation hemmt, sodass sich HSV-1 annähernd normal replizieren konnte.

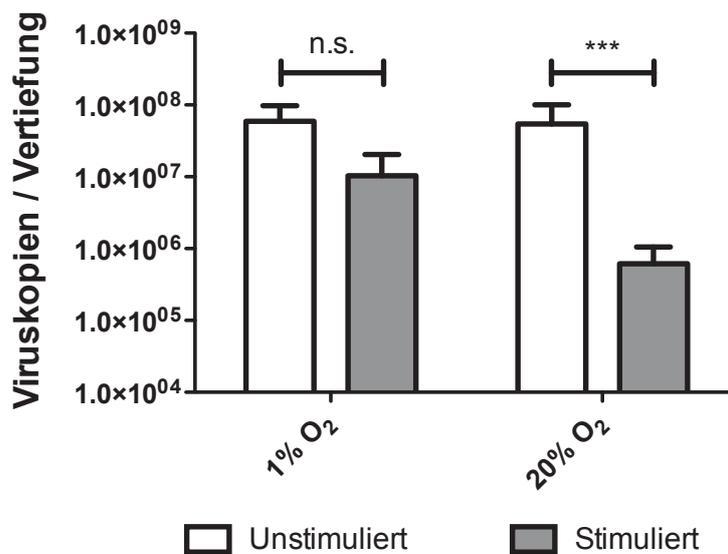


Abbildung 3.7 IDO-vermittelte antivirale Effekte in HFF unter Hypoxie

3 × 10⁴ humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden pro Vertiefung ausgesät und mit 500 U/mL IFN γ in IMDM Zellkulturmedium stimuliert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 72 Stunden entweder unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Dann erfolgte die Infektion mit jeweils 1,45 × 10⁵ Kopien von Herpes Simplex Typ 1 (HSV-1) pro Vertiefung. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurde die Viruslast per *real Time* PCR ermittelt. Dazu wurde ein Plasmid als Standard verwendet, welches die amplifizierende Region enthält. Die Amplifikation wurde mit Hilfe eines iCyclers durchgeführt und mit iCycler iQ analysiert. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition der Virusreplikation im Vergleich zur jeweiligen Positivkontrolle wurde mit Sternen (***) p ≤ 0,001) markiert. n.s. = nicht signifikant.

3.3 Analyse der IDO-vermittelten immunregulatorischen Mechanismen unter Hypoxie

Neben den schon beschriebenen antimikrobiellen Mechanismen, vermittelt die IDO auch immunmodulatorische bzw. immunsuppressive Effekte, indem sie zum Einen durch Tryptophandegradation und zum Anderen durch ihre Metabolite die Aktivierung von T-Zellen reguliert und so Toleranz induzieren kann. Da der Sauerstoffgehalt in entzündlich verändertem

Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich erniedrigt ist, müssen T-Zellen häufig unter hypoxischen Bedingungen arbeiten. Aus diesem Grund wurde die IDO-vermittelte T-Zellaktivierung unter Hypoxie (1% O₂) untersucht. Es wurden auf einer Mikrotiterplatte 3 x 10⁴ humane Vorhautfibroblasten (HFF) pro Vertiefung ausgesät und in IMDM-Zellkulturmedium mit IFN γ stimuliert (60 U/mL), eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Es folgte die Inkubation der Zellen für 72 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) oder Normoxie (20% O₂). Dann wurden die Überstände auf eine neue Mikrotiterplatte überführt und dienten als Medium für je 1,5 x 10⁵ humane periphere Blutlymphozyten (PBMC). Um einen möglichen IDO-vermittelten Tryptophanmangel auszugleichen wurde einer Kontrollgruppe 100 μ g/mL L-Tryptophan supplementiert. Die anderen Gruppen wurden mit dem gleichen Volumen tryptophanfreiem Medium versetzt. Anschließend wurden die T-Zellen durch Zugabe eines Anti-CD3-Antikörpers (OKT3) (1:3000) aktiviert und nochmals für 72 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) oder Normoxie (20% O₂) inkubiert. Zur Detektion der T-Zellproliferation wurden die Zellen nach Zugabe von radioaktiv markiertem 0.2 mCi [³H]-Thymidin für nochmals 24 Stunden bei Normoxie inkubiert. Abbildung 3.8 (A) zeigt eine starke T-Zell-Proliferation in den Überständen der unstimulierten Zellen. In den Überständen der mit 60 U/mL IFN γ stimulierten und unter Normoxie (20% O₂) inkubierten Zellen wurde das T-Zell-Wachstum um über 90 % gehemmt, wohingegen unter Hypoxie (1% O₂) die Hemmung der T-Zellproliferation aufgehoben wurde. Wieder konnte der gezeigte Effekt durch Supplementation von L-Tryptophan zum Zeitpunkt der T-Zell-Stimulation aufgehoben werden, was den Schluss erlaubt, dass die Hemmung der T-Zellproliferation unter Normoxie auf einen IDO-vermittelten Tryptophanmangel zurückzuführen ist, welcher unter Hypoxie nicht zustande kommt.

Um das physiologische Zusammenspiel zwischen T-Zellen und HFF (als Modell für native Zellen) genauer zu analysieren, wurde bei weiteren Experimenten zur T-Zell-Aktivierung auf die Verwendung von synthetisch hergestelltem IFN γ verzichtet. Wieder wurden auf einer Mikrotiterplatte 0 – 10⁴ humane Vorhautfibroblasten (HFF) pro Vertiefung ausgesät. Anschließend wurden pro Vertiefung 1,5 x 10⁵ frisch isolierte, humane periphere Blutlymphozyten (PBMC) zugegeben und durch Zugabe eines monoklonalen Anti-CD3-Antikörpers (OKT3) (1:3000) aktiviert und zur IFN γ -Produktion angeregt. Dieses IFN γ stimulierte wiederum die HFF zur IDO-Produktion, welche dann Tryptophan zu Kynurenin

degradiert und dadurch die T-Zell-Proliferation hemmt. Es folgte eine 72-stündige Inkubation unter Hypoxie (1% O₂) oder unter Normoxie (20% O₂). Zur Detektion der T-Zell-Proliferation wurde radioaktiv markiertes [³H]-Thymidin hinzugefügt und es folgte einer weitere Inkubation für 24 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) oder Normoxie (20% O₂). Abbildung 3.8 (B) zeigt, dass die T-Zellen in Abwesenheit von HFF-Zellen sowohl unter Normoxie, als auch unter Hypoxie proliferieren konnten. Je mehr HFF mit den Lymphozyten co-stimuliert wurden, desto geringer fiel das T-Zell-Wachstum aus. So belief sich die Reduktion der T-Zell-Proliferation bei 10 HFF auf ca. 10 % und bei 10⁴ HFF auf über 75 %. Diese Beobachtung ist nur unter Normoxie zu machen, unter Hypoxie war das T-Zell-Wachstum in keiner Versuchsgruppe eingeschränkt. Abbildung 3.8 (C) zeigt, dass die Hemmung der T-Zell-Proliferation in der Normoxiegruppe durch Supplementation von L-Tryptophan aufgehoben werden kann, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass die IDO-vermittelte Degradation von Tryptophan für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Eine alleinige co-inkubation von T-Zellen und HFF (ohne Zugabe von OKT3) führt zu keiner T-Zell-Proliferation, das heißt die bloße Anwesenheit von HFF reicht nicht aus, eine Alloantwort zu induzieren (nicht abgebildet).

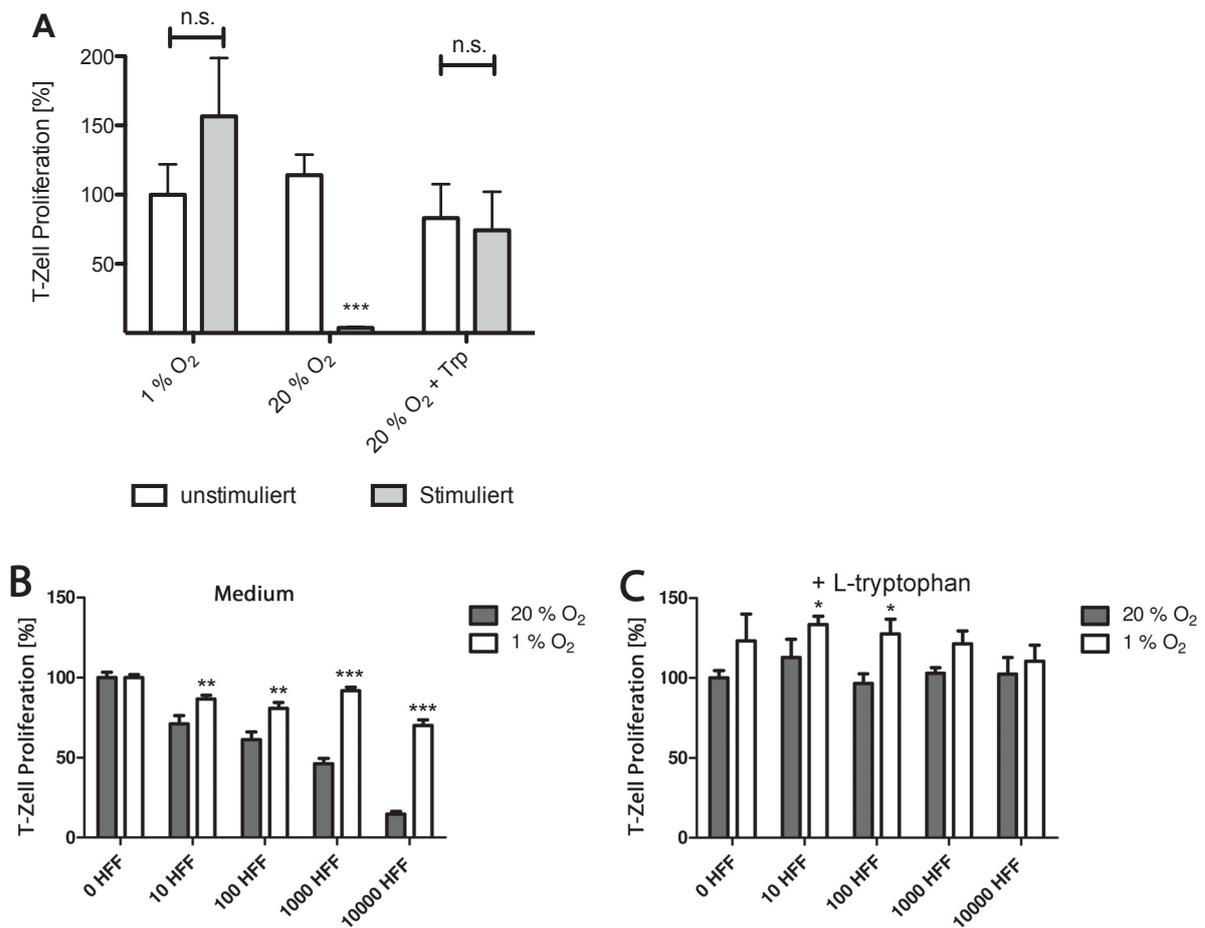


Abbildung 3.8 IDO-vermittelte Regulation der T-Zell-Aktivierung unter Hypoxie

(A) 3×10^4 bestrahlte, nicht proliferationsfähige humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden pro Vertiefung mit 60 U/mL IFN γ in IMDM Zellkulturmedium stimuliert und für 72 Stunden entweder unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb unstimuliert. Anschließend wurden die Überstände auf eine neue Mikrotiterplatte überführt und dienen als Medium für je $1,5 \times 10^5$ humane periphere Blutlymphozyten. Dann wurden die T-Zellen mit einem monoklonalen anti-CD3-Antikörper (OKT3) (1:3000) stimuliert. Parallel wurde ein möglicher Tryptophanmangel in einer Kontrollgruppe mit 100 μ g/mL L-Tryptophan ausgeglichen. Den anderen Gruppen wurde die gleiche Menge tryptophanfreies Medium zugefügt. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurde die T-Zell-Proliferation anhand von Zugabe von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin analysiert. (B) 0 – 1×10^4 bestrahlte, nicht proliferationsfähige humane Vorhautfibroblasten (HFF) wurden pro Vertiefung mit je $1,5 \times 10^5$ frisch isolierten peripheren Blutlymphozyten mit monoklonalem Anti-CD3-Antikörper (OKT3) (1:3000) für 72 Stunden entweder unter Normoxie (20% O₂) oder Hypoxie (1% O₂) co-stimuliert. Dann wurde die T-Zellen-Proliferation anhand von Zugabe von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin analysiert. (C) Hier wurde ein möglicher Mangel an L-Tryptophan durch Supplementation von 100 μ g/mL L-Tryptophan ausgeglichen. Dargestellt sind die Ergebnisse mit Standardfehler (SEM) von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Eine signifikante Inhibition der T-Zell-Proliferation wurde mit Sternen (***) $p \leq 0,001$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$) markiert.

4 Diskussion

4.1 IDO-Expression und –Aktivität unter verminderten Sauerstoffkonzentrationen

Wie auch der Mensch sind viele Mikroorganismen wie z.B. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) oder auch *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels auf die Aminosäure Tryptophan angewiesen. So verwundert es nicht, dass die Tryptophankonzentration im Gewebe auch Auswirkungen auf das Wachstum vieler mikrobieller Pathogene hat. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) antimikrobiell wirksam ist, indem es die lokale Tryptophankonzentration senkt und so das Wachstum von Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*), Parasiten (z.B. *Toxoplasma gondii*) oder auch Viren (z.B. HSV-1) hemmt [1]. Zudem besitzt die IDO auch eine immunregulatorische Funktion, indem sie ebenfalls durch Tryptophandegradation die Aktivierung humaner T-Zellen beeinflusst [3-6]. Da die IDO zur Enzymklasse der Dioxygenasen gehört, benötigt sie zur Katalyse der Reaktion Sauerstoff. Bei Inhalation von Raumluft liegt die mittlere Sauerstoffkonzentration im Gewebe zwischen 3% und 5% O₂ und selbst in gut durchblutetem Gewebe sind selten Werte über 12% O₂ nachweisbar [7]. In infiziertem Gewebe oder in Tumorgewebe kann bei stark expansivem Wachstum und mangelnder Gefäßversorgung der Sauerstoffgehalt auf unter 1% O₂ fallen, sodass sie als hypoxisch anzusehen sind [8, 9]. So können Ergebnisse, die auf Basis von Experimenten unter Normoxie gewonnen wurden nicht uneingeschränkt auf physiologische Bedingungen übertragen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Expression als auch die Aktivität der IDO unter normoxischen (20% O₂), unter physiologischen (10% O₂) und unter hypoxischen Bedingungen (1% O₂) untersucht. Als Versuchszellen dienten humane Tumorzellen (Glioblastom- und Zervixkarzinomzellen) und native Zellen (humane Vorhautfibroblasten). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen nach IFN γ -Stimulation und anschließender Inkubation unter normoxischen Sauerstoffkonzentrationen (20% O₂) und auch unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (10% O₂) in der Lage waren IDO zu exprimieren, welche effektiv Tryptophan zu Kynurenin spalten konnte. Wurden die Zellen allerdings mit IFN γ stimuliert und dann unter hypoxischen Sauerstoffkonzentrationen (1% O₂) inkubiert, wurde keine IDO exprimiert und folglich fand auch keine Tryptophandegradation

statt. Diese Ergebnisse decken sich teilweise mit den Ergebnissen von Herbert *et al.* aus dem Jahr 2011 [96]. Diese Gruppe arbeitete mit *endothelial-like-cells*: CD14⁺ PBMC die mit Angiogenesewachstumsfaktoren behandelt wurden und anschließend sowohl endothel- (CD83, CD32, CD14 und CD15) also auch myeloidcharakteristische Proteine (CD31, CD34 und von Willebrand-Faktor (VWF)) exprimierten. Diese Zellen sind sowohl für die Angiogenese als auch für Reparaturvorgänge an Gefäßen wichtig. Diese Zellen wurden *ex vivo* mit IFN γ stimuliert und dann für 48 Stunden unter Normoxie (20% O₂) oder Hypoxie (1% O₂) inkubiert. Anschließend konnten in den Hypoxiegruppen gegenüber den Normoxiegruppen um bis zu 80% erniedrigte Proteinlevel für IDO und 14fach erhöhte Level für *Glucose transporter 1* (GLUT-1) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Hypoxie ein Trigger für verschiedenste zelluläre Anpassungsvorgänge ist die sowohl die Angiogenese als auch die Immunantwort beeinflussen. Dass Endothelzellen nach IFN γ -Stimulation IDO exprimieren und dadurch den lokalen Tryptophanspiegel senken zeigten Däubener *et al.* bereits im Jahr 2001 [97] indem sie humane Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (*human brain microvascular endothelial cells* (HBMEC)) mit IFN γ stimulierten und für 72 Stunden unter Normoxie inkubierten. Weiter zeigte die Gruppe anhand von Infektionsmodellen mit *T. gondii*, dass HBMEC und Gliazellen durch die IDO vermittelte Tryptophanrestriktion eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr im Rahmen von parasitären Infektionen spielt und verhindert, dass *T. gondii* die Blut-Hirn-Schranke passiert. So kann in Zusammenschau der Ergebnisse angenommen werden, dass eine herabgesetzte Sauerstoffkonzentration im Bereich der Blut-Hirn-Schranke mit einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber parasitären ZNS-Infektionen einhergeht. Im Gegensatz zu den Versuchen von Däubener *et al.* und Herbert *et al.* [96, 97] wurden in der vorliegende Arbeit auf die Verwendung spezialisierter Immunzellen verzichtet und stattdessen humane Vorhautfibroblasten (HFF) und Tumorzellen (humane Glioblastom- und Zervixkarzinomzellen) untersucht, welche *in vivo* ebenfalls mit Pathogenen in Kontakt kommen und in der Lage sind, nach IFN γ -Stimulation IDO zu exprimieren. Abb. 3.2 zeigt in humanen Vorhautfibroblasten nach Stimulation mit IFN γ und Inkubation unter Hypoxie eine Reduktion der IDO-Proteinlevel von bis zu 60% (verglichen mit HFF nach Stimulation mit IFN γ und Inkubation unter Normoxie). Somit wurde gezeigt, dass die oben beschriebenen Effekte nicht nur für Endothelzellen bzw. spezialisierte Immunzellen gelten, sondern auch für HFF und Tumorzellen, also für Zellen die im eigentlichen Sinn nicht zum Immunsystem

gehören. Roth *et al.* zeigten einen ähnlichen Effekt in Zellen der humanen *Tuba uterina* [11]. Nach Stimulation mit IFN γ und Infektion mit *Chlamydia trachomatis* wurden die Zellen unter Hypoxie (2 – 5% O $_2$) oder Normoxie (20% O $_2$) inkubiert. Anschließend konnten in der Hypoxiegruppe um bis zu 70% erniedrigte Proteinlevel für IDO gemessen werden (verglichen mit der entsprechenden Normoxiegruppe). Abb. 3.2 der vorliegenden Arbeit zeigt ein ähnliches Ergebnis für nicht-infizierte Zellen: So waren die IDO-Proteinlevel in den Hypoxiegruppen um ca. 60% erniedrigt (verglichen mit den jeweiligen Normoxiegruppen). Es kann geschlussfolgert werden, dass es sich bei den gezeigten Effekten nicht um eine Besonderheit von mit *C. trachomatis* infizierten Zellen handelt. Roth *et al.* zeigte in Zellen der humanen *Tuba uterina*, dass die beschriebene Hypoxie induzierte Erniedrigung der IDO-Proteinlevel nicht mit höheren Dosen IFN γ aufgehoben werden kann, was nahelegt, dass dieser Hemmeffekt nicht von der Aktivierungsstärke abhängig ist [11]. Genau dies zeigt auch Abb. 3.2 (F) für HFF, in denen auch nach Stimulation mit 300 U/mL oder 500 U/mL IFN γ und Inkubation unter hypoxischen Bedingungen die IDO-Proteinlevel niedriger als in den jeweiligen Normoxiegruppen waren. So scheint der Hypoxie-induzierte Hemmeffekt nicht von der Aktivierungsstärke abzuhängen. Um den für diese Beobachtungen verantwortlichen Mechanismus zu identifizieren, analysierten Roth *et al.* den für die IDO-Expression wichtigen JAK-STAT-Signalweg indem sie Zellen der humanen *Tuba uterina*, welche mit *C. trachomatis* infiziert waren mit IFN γ stimulierten und entweder unter Hypoxie oder unter Normoxie inkubierten und anschließend auf die Menge an phosphorylierten STAT 1 (pSTAT1) untersuchten [11]. Es zeigte sich in den unter Hypoxie inkubierten Zellen eine um ca. 70% reduzierte Menge an pSTAT1 im Vergleich zu den unter Normoxie inkubierten Zellen. Um zu beleuchten, ob dies eine Besonderheit für mit *C. trachomatis* infizierte Zellen ist bzw. eine Besonderheit für Zellen der humanen *Tuba uterina*, wurde in der vorliegenden Arbeit der JAK-STAT-Signalweg in verschiedenen humanen Zelllinien ohne Infektion mit bakteriellen Erregern unter Hypoxie und auch Normoxie untersucht, indem die Menge an pSTAT1 nach der Stimulation mit IFN γ ermittelt wurde. Abbildung 3.2 zeigt in der Tat in allen verwendeten Zelllinien eine um bis zu 90% verminderte Expression von pSTAT1 relativ zu β -Aktin unter Hypoxie (verglichen mit den jeweiligen Normoxiegruppen). Die gemessenen pSTAT1-Proteinlevel wurden dort in Relation zur Menge an β -Aktin abgebildet um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte Ausdruck einer generellen Inhibition der

Proteinbiosynthese unter Hypoxie sind, denn dann wären sowohl die Proteinlevel für β -Aktin, also auch die für pSTAT1 stark erniedrigt. So scheint es sich bei den gezeigten Ergebnissen nicht um eine Besonderheit von mit *C. trachomatis* infizierte Zellen bzw. eine Besonderheit von Zellen der human *Tuba uterina* zu handeln, denn auch in nicht infizierten humanen Vorhautfibroblasten, Glioblastomzellen und HeLa-Zellen waren die gemessenen pSTAT1-Proteinlevel nach IFN γ -stimulation und Inkubation unter Hypoxie erniedrigt. Nun stellt sich die Frage, ob die gezeigten Ergebnisse wirklich eine verminderte Expression von pSTAT1 bzw.IDO-Protein widerspiegeln oder Ausdruck einer erhöhten Proteindegradation unter Hypoxie sind, also ob Hypoxie nicht nur die Expression der IDO hemmt, sondern möglicherweise auch zusätzlich den Abbau der IDO forciert. In diesen Zusammenhang zeigten Salceda *et al.* [98], dass humane Hepatozyten (Hep 3B-Zellen), als Reaktion auf sich ändernde Sauerstoffkonzentrationen, die Proteasom-vermittelte Degradation einzelner Proteine ändern. Dieser Nachweis gelang indem sie Hep 3B-Zellen sequenziell für 6 Stunden unter hypoxischen und anschließend für 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen inkubierten. Während der Inkubation unter Normoxie wurden alle 10 Minuten Proben entnommen und deren HIF1 α -Proteinlevel per Westernblot gemessen. Die Ergebnisse zeigen hohe HIF1 α -Proteinlevel unmittelbar nach Beendigung der Hypoxiephase, welche mit fortschreitender Zeit unter normoxischen Bedingungen zunehmend abfallen. In einem weiteren Experiment wurden die Hep 3B-Zellen kurz vor Beendigung der Hypoxiephase mit dem spezifischen Proteasominhibitor MG-132 versetzt: Nun zeigten sich zu allen Messzeitpunkten gleichbleibend hohe HIF1 α -Proteinlevel, sodass geschlussfolgert wurde, dass HIF1 α unter normoxischen Bedingungen rapide durch das Proteasom degradiert wird. Um auszuschließen, dass der in meiner Arbeit beschriebene verminderte IDO-Proteingehalt unter Hypoxie ebenfalls Ausdruck einer veränderten Proteindegradation ist wurden ähnliche Experimente mit humanen Vorhautfibroblasten (unter 3.1.3 beschriebenen) durchgeführt. Abbildung 3.3 zeigt innerhalb der Hypoxiegruppen für die Kynureninbildung keinen signifikanten Unterschied zwischen den Testansätzen mit und ohne Proteasom- bzw. Sumoylierungsinhibitor (MG-132, Anacarisäure und Ginkgolsäure), anders formuliert bewirkt die Zugabe der verschiedenen Inhibitoren unter Hypoxie keine weitere Erniedrigung der IDO-Aktivität. So kann geschlussfolgert werden, dass es keine vermehrte Proteindegradation durch das Proteasom

bzw. durch Sumoylierung unter Hypoxie gibt. Eine vermehrte Proteindegradation ist somit keine Begründung für die verminderte IDO-Expression und –Aktivität unter Hypoxie.

4.2 Zellüberleben und –adaptation unter Hypoxie

Humane Zellen sind für ihr Überleben essentiell auf Sauerstoff angewiesen, sodass sich die Frage stellt, ob die eingesetzten Versuchszellen die Inkubation unter Hypoxie überleben oder ob sie untergehen. So könnten die oben beschriebenen, erniedrigten IDO-Proteinlevel auch ein Ausdruck vermehrten Zellunterganges unter Hypoxie sein. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden in verschiedenen Versuchen beleuchtet inwieweit Hypoxie den Versuchszellen schadet: Es wurden HFF, 86HG39- und HeLa-Zellen für 24, 48 oder 72 Stunden unter Normoxie (20% O₂) oder unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert und anschließend mit *AlamarBlue* gefärbt. Das in diesem Farbstoff enthaltene Resazurin wird ausschließlich in lebenden Zellen zu dem rotleuchtenden Farbstoff Resofurin reduziert, welcher photometrisch gemessen werden kann. Abbildung 3.4 B-D zeigt, dass in allen Gruppen und unter allen Sauerstoffkonditionen vergleichbar viele vitale Zellen nachgewiesen werden konnten, was nahelegt, dass kein vermehrter Zelluntergang unter Hypoxie stattfindet. Um das Zellüberleben auch funktionell nachzuweisen wurden HeLa-Zellen mit IFN γ stimuliert oder als Kontrollgruppe unstimuliert gelassen und für 72 Stunden unter Hypoxie inkubiert. Anschließend folgte eine zweite Inkubationsphase für 48 Stunden unter Normoxie. Der anschließend durchgeführte photometrische Kynureninnachweis zeigt, dass nach der Hypoxiephase wie erwartet sehr wenig Kynurenin nachgewiesen werden konnte. Nach Reoxygenierung waren die Zellen wieder in der Lage, effektiv L-Tryptophan zu Kynurenin zu degradieren, was den Schluss zulässt, dass der größte Anteil der Zellen die Hypoxiephase überlebte. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Hu *et al.* [99]. Diese Gruppe untersuchte zelluläre Anpassungsvorgänge an humanen Glioblastomzellen, welche für 48 Stunden unter Hypoxie (1% O₂) inkubiert wurden. Es wurde gezeigt, dass die Zellen unter hypoxischen Bedingungen verschiedene Anpassungsvorgänge im Sinne von Hoch- bzw. Herabregulation verschiedenster Proteine durchlaufen, die der Autophagie zuzuordnen sind. Das heißt die Zellen degradieren unter Hypoxie eigene Proteine um deren Bausteine zur Aufrechterhaltung des eigenen Stoffwechsels verwerten zu können, um so Phasen verminderter Sauerstoffversorgung überleben zu können. In einem weiteren Versuchsansatz

wurden die Zellen mit Autophagieinhibitoren versetzt und anschließend wieder für 48 Stunden unter Hypoxie inkubiert, was dazu führte, dass signifikant weniger Zellen die Hypoxiephase überlebten. Es kann also angenommen werden, dass die eingesetzten Zellen über Mechanismen wie z.B. Autophagie verfügen um Phasen verminderter Sauerstoffversorgung überleben zu können. So kann Hypoxie-induzierter Zelluntergang als Ursache für die in Abb. 3.2 gezeigten vermindertenIDO-Proteinlevel in den Hypoxieansätzen weitestgehend ausgeschlossen werden.

Trotz der Tatsache, dass der größte Teil der Zellen eine Inkubation unter 1% O₂ überlebte, bedeutet Hypoxie Stress für die Zellen. Bei der zellulären Antwort auf diesen Stress spielt der *hypoxia-inducible factor* (HIF) eine zentrale Rolle. Ursprünglich wurde HIF in Zusammenhang mit der Hypoxie-vermittelten Induktion von Erythropoetin (EPO) beschrieben [100]. In allen kernhaltigen Zellen durch Hypoxie induzierbar, reguliert dieser zentrale Proteinkomplex mehr als 100 verschiedene Gene, welche eine Rolle bei der Zelldifferenzierung, dem Metabolismus, der Angiogenese, dem Gefäßtonus und der Apoptose spielen [101]. Der HIF-Komplex besteht aus HIF1 β (auch AhR *nuclear translocator*; ARNT genannt), welcher an eine der beiden induzierbaren α -Untereinheiten HIF1 α oder HIF2 α bindet [102]. 2011 wurde gezeigt, dass ARNT auch mit dem Ligand-aktivierten *aryl hydrocarbon receptor* (AhR) dimerisieren kann, welcher einen Transkriptionsfaktor für Zellwachstum, Differenzierung und die Immunantwort darstellt [103, 104]. Interessanterweise hat HIF1 α unter normoxischen Bedingungen eine sehr kurze Halbwertszeit, denn es wird durch sauerstoffabhängige prolyl-Hydroylasen zur Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System markiert. Erst unter Hypoxie werden diese sauerstoffabhängigen prolyl-Hydroylasen inhibiert, sodass HIF1 α nicht mehr durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert wird und akkumuliert [98, 101]. Die zentrale Bedeutung von HIF1 α wird anhand einer Arbeit von Iyer *et al.* deutlich, in der gezeigt wird, dass HIF1 α -*knockout*-Mäuse früh während der Embryogenese aufgrund von Fehlern in der Angiogenese mit schweren Missbildungen wie z.B. Neuralrohrdefekte versterben [105]. Cramer *et al.* zeigten 2003, dass Mäuse mit HIF1 α -defizitären Myeloidzellen nach chemischer Reizung der Haut weder Rötung, noch Schwellung zeigten. Diese Zeichen stellen neben Überwärmung, Schmerz und Funktionseinschränkungen die Kardinalsymptome einer Entzündung dar. Also waren die murinen Organismen ohne HIF1 α zu keiner geregelten Immunantwort in der Lage. Daraus wurde gefolgert, dass HIF1 α

auch eine wichtige Rolle bei der Vermittlung einer Immunantwort spielt [106]. Anders formuliert: Ein Mangel an HIF1 α bedeutet eine verschlechterte Immunlage. Weiter wurde gezeigt, dass Kynurenin, das Spaltprodukt derIDO-vermittelten Degradation von Tryptophan, ein endogener Ligand des AhR ist [6]. Diese Fakten berücksichtigend lässt sich folgende Theorie entwickeln: Im Rahmen einer lokalen Infektion, beispielhaft sei eine durch Bakterien infizierte Wunde genannt, werden lokale Abwehrmechanismen in Gang gesetzt: IFN γ wird freigesetzt und stimuliert in lokalen Fibroblasten die IDO-Produktion. Durch IDO wird lokal Tryptophan gespalten und es entsteht Kynurenin als Spaltprodukt. Dieses aktiviert AhR. AhR transloziert nun in den Nukleus und bindet ARNT. Dadurch steht nicht mehr ausreichend ungebundenes ARNT zur Verfügung um HIF1 α zu bilden und die betroffene Zelle ist nicht mehr in der Lage sich an ein hypoxisches Milieu anzupassen. Sollte die oben beschriebene infizierte Wunde nun hypoxisch werden, zum Beispiel aufgrund einer verminderten Blutzufuhr, könnte folgendes geschehen: Durch die mangelnde Sauerstoffversorgung wird der JAK-STAT-Signalweg gehemmt, es wird weniger IDO gebildet, das lokale Tryptophan kann nicht gespalten werden und es entsteht kein Kynurenin welches AhR aktivieren könnte. AhR kann so nicht in den Nukleus translozieren und ARNT binden. So steht mehr freies ARNT zur Verfügung um HIF1 α zu bilden, welches der Zelle erlaubt sich an das hypoxische Milieu anzupassen. Verkürzt bedeutet dies, dass eine hypoxiebedingte, verminderte IDO-Produktion eine erhöhte HIF1 α -Produktion zur Folge haben könnte, so kann man annehmen, dass durch eine verminderte IDO-Aktivität bzw. –Produktion unter Hypoxie sichergestellt wird, dass der Zelle genügend HIF1 α zur Verfügung steht. Andererseits ist unter Hypoxie die IDO-vermittelte Hemmung bakteriellen Wachstums inhibiert bzw. aufgehoben, sodass die o.g. bakteriellen Erreger ungehindert proliferieren können. Da im Zentrum einer solchen Infektion häufig Nekrose herrscht, stehen dort nur wenige Zellen für die IDO-Expression zur Verfügung, so könnte angenommen werden, dass die IDO-vermittelte Hemmung bakteriellen Wachstums im Zentrum einer infizierten, hypoxischen Wunde eine untergeordnete Rolle spielt.

4.3 IDO-vermittelte Immunabwehr unter Hypoxie

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf humane Fibroblasten und humane Tumorzellen (als Model für Zellen des ZNS (86HG39) und des Urogenitaltraktes (HeLa)) gelegt, also keine

spezialisierten Zellen des Immunsystems, die aber trotzdem *in vivo* mit Pathogenen in Kontakt kommen und in der Lage sind nach IFN γ -Stimulation endogen IDO zu exprimieren. Am Model dieser Zellen konnte gezeigt werden, wie sich Hypoxie und die damit verbundene herabgesetzte IFN γ -induzierte IDO-Expression auf die IDO-vermittelten Effekte *in vitro* auswirkt. In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass die Versuchszellen in einem hypoxischen Milieu nicht mehr in der Lage waren, das Wachstum verschiedener mikrobieller Erreger zu kontrollieren. Im Rahmen dieser Versuche wurde das Bakterium *Staphylococcus aureus* als Beispiel für einen extrazellulären Erreger verwendet, welcher Hautinfektionen wie Furunkel oder Karbunkel, organspezifische Infektionen wie Pneumonien oder Endokarditiden und schwere generalisierte Infektionen (Sepsis, toxisches Schocksyndrom (TSS)) auslösen kann. In der Vergangenheit wurde in Tierversuchen *in vivo* gezeigt, dass systemische Hypoxie die Immunabwehr gegen *S. aureus* bei Lungen- und Hautinfektionen inhibiert. Green *et al.* setzten 1964 Mäuse einem *S. aureus* haltigem Aerosol aus [107]. Die Hälfte der Versuchstiere wurde unmittelbar nach Exposition getötet, die andere Hälfte 4 Stunden nach Exposition. Anschließend wurde die absolute Anzahl an Bakterien in den Lungen der Mäuse bestimmt und so die *Clearance* ermittelt. Verglichen wurden die Ergebnisse von Tieren die vor Exposition für 48 Stunden unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden mit denen von Tieren die vor Exposition keiner besonderen Behandlung zugeführt wurden. Bei den unbehandelten Mäusen konnte nach 4 Stunden eine Reduktion der Bakterien um 87% gemessen werden, wohingegen bei den zuvor unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Mäusen nur eine Reduktion um 55% detektiert wurde. Daraus wurde geschlossen, dass Hypoxie den Metabolismus der Immunzellen dahingegen beeinflusst, dass sie nicht mehr in Lage sind die intrapulmonalen Bakterien zu entfernen. In einer 1986 von Takikawa *et al.* [108] veröffentlichten Arbeit wurde im Rahmen von Tierversuchen gezeigt, dass die IDO nach systemischer Gabe von Lipopolysaccharid (LPS) in verschiedensten murinen Gewebetypen (z.B. der Lunge) exprimiert wird und Tryptophan zu Kynurenin degradieren kann. Weiter wurde durch Yoshida *et al.* [109] gezeigt, dass die Induktion der IDO in murinen Lungen interferonabhängig ist. Die Daten von Green *et al.* wurden im Mausmodell erhoben. Meisel *et al.* 2011 [110] konnte aber grundlegende Unterschiede zwischen muriner und humaner IDO anhand von Versuchen mit mesenchymalen Stromazellen (MSC) aufzeigen: Während humane MSC nach Stimulation mit IFN γ und anderen proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β und TNF α) IDO exprimieren,

welche in der Lage ist antimikrobielle Effekte zu vermitteln, ist dies bei murinen MSC nicht der Fall. Auch nach Hochdosisstimulation konnte in Versuchen mit murinen MSC keineIDO induziert werden. Dafür konnten in Mäusen die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) als Gegenpart zur humanen IDO identifiziert werden: Diese konnte in murinen MSC durch eine Zytokinkombination aus $IFN\gamma$, $IL-1\beta$ und $TNF\alpha$ induziert werden und war in der Lage effektiv das Wachstum von *T. gondii* zu hemmen. Ob die durch Green *et al.* gezeigten Daten auf einer durch Hypoxie inhibierten Expression und Aktivität der IDO oder auf anderen Mechanismen (z.B. Inhibition der iNOS) beruhen, kann nicht sicher geklärt werden. Jedoch kann festgehalten werden, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen Sauerstoffversorgung und antimikrobiellen Mechanismen gibt: Je mehr Sauerstoff zur Verfügung steht, desto effektiver kann das Wachstum mikrobieller Erreger inhibiert werden. Dieser Zusammenhang konnte auch in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Versuche aus 3.2 gezeigt werden. Jönsson *et al.* zeigten 1988 anhand von Tierexperimenten, dass die Schwere postoperativer, bakterieller Infektionen direkt mit dem Sauerstoffgehalte des betroffenen Gewebes korreliert [111]. Dazu wurde an Hunden eine Lappenplastik des *Musculus recuts abdominis* durchgeführt, ähnlich wie sie an Menschen zur Deckung größerer Weichteildefekte durchgeführt wird. Unmittelbar postoperativ wurde in die Lappenplastik 0,1 ml *S. aureus*-haltige Kochsalzlösung subkutan gespritzt (10^8 Kolinien / ml). Anschließend wurden die Hunde für 72 Stunden in Umgebungen mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen gehalten: 12%, 21% und 45% O_2 . Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die Größe der Läsion im Bereich der infizierten Lappenplastik gemessen und verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Läsionen der Versuchstiere, welche in einer Umgebung mit 12% O_2 gehalten wurden zu allen Zeitpunkten größer waren, als die der Tiere welche in einer Umgebung mit 45% O_2 gehalten wurde. Die Größe der Läsionen der Tiere aus der 21% O_2 - Gruppe waren immer größer als die der Tier aus der 45% O_2 -Gruppe und kleiner als der Tiere aus der 12% O_2 -Gruppe. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Resistenz gegenüber bakterieller Infektionen von frisch operierten Geweben direkt mit der Sauerstoffkonzentration korreliert. Ob die beschriebenen Effekten auf eine hypoxievermittelte, verminderte IDO-Aktivität und -Induktion zurückzuführen ist, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da es keine belastbaren Daten zu IDO-vermittelten antibakteriellen Effekten in Hunden gibt. Jedoch konnte sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch durch Jönsson *et al.*

ein direkter Zusammenhang zwischen Sauerstoffversorgung und bakteriellem Wachstum gezeigt werden: In Milieus niedriger Sauerstoffkonzentrationen ist bakterielles Wachstum stärker ausgeprägt als in Milieus hoher Sauerstoffkonzentration. In der vorliegenden Arbeit konnte in Abb. 3.5.1 *in vitro* gezeigt werden, dass diese Beobachtungen auf eine durch Hypoxie herabgesetzte Expression und Aktivität der IDO zurückzuführen sind: Es wurden Glioblastom- bzw. HeLa-Zellen wie im Teil „Material und Methoden“ beschrieben stimuliert und mit *S. aureus* infiziert. In den in den unter Normoxie (20% O₂) stimulierten Ansätzen, wurde das Wachstum von *Staphylococcus aureus* stark gehemmt. Unter Hypoxie wurde der antibakterielle Effekt aufgehoben und es konnte gegenüber der Normoxiegruppe eine um über 90% erhöhte Bakteriendichte gemessen werden. Außerdem ist zu sehen, dass der IFN γ -vermittelte antibakterielle Effekt in der Gruppe der unter Normoxie stimulierten Zellen durch L-Tryptophansupplementation zum Zeitpunkt der Infektion aufgehoben werden konnte, wodurch der Schluss zulässig ist, dass die Hemmung des bakteriellen Wachstums durch einen Mangel an L-Tryptophan begründet ist. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass *in vivo*, beispielhaft im Rahmen von infizierten Wunden (beim Menschen), eine verminderte IDO-Aktivität dazu führt, dass hypoxische Wunden vulnerabler gegenüber bakteriellen Infektionen sind, als gut durchblutete Wunden mit hohen Gewebesauerstoffkonzentrationen. Auf Basis der bisherigen Ergebnisse lässt sich also die Aussage treffen, dass eine verminderte Sauerstoffkonzentration und die daraus folgende verminderte IDO-Aktivität für den Menschen von großem Nachteil sein kann. 2011 zeigten Darcy *et al.* in einer Fall-Kontroll-Studie das eine hohe IDO-Aktivität mit verschiedensten, zum Teil gesundheitsschädlichen Reaktionen assoziiert ist [112]. Im Rahmen dieser Studie wurde der Kynurenin-Tryptophan-Quotient im Plasma von Patienten mit Sepsis mit dem von Patienten ohne Sepsis verglichen und so auf die IDO-Aktivität geschlossen. Es wurde vermutet, dass im Rahmen einer Sepsis erhöhte Plasmaspiegel verschiedener Zytokine, wie z.B. IFN γ eine erhöhte IDO-Aktivität nach sich ziehen. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit diagnostizierter Sepsis niedrigere Plasmatryptophanspiegel und höhere Plasmakynureninspiegel haben als Patienten ohne Sepsis, was als Ausdruck erhöhter IDO-Aktivität gewertet wurde. Weiter hatten die Sepsispatienten deutlich erniedrigte Lymphozytenzahlen im Vergleich zur Kontrollgruppe, was als Ausdruck einer stark herabgesetzten Immunlage zu werten ist. Ein weiteres Problem im Rahmen einer fulminanten Sepsis ist das so genannte *capillary leak*, eine

Endotheldysfunktion aufgrund derer u.A. vermehrt Zellen und Flüssigkeit nach extravasal gelangen und zu Ödemen führen. Um die Endothelfunktion zu messen wurde eine Blutdruckmanschette am Arm für kurze Zeit über den systolischen Blutdruck aufgepumpt und die anschließende Hyperämie pulsoxymetrisch gemessen. Die Sepsispatienten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich geringer ausgeprägte Hyperämie, was als eingeschränkte Endothelfunktion gewertet wurde. So wurde gefolgert, dass während einer Sepsis erhöhte Plasmaspiegel verschiedener Zytokine eine erhöhteIDO-Aktivität bedingen, woraus ein erhöhter Kynurenin-Tryptophan-Quotient im Plasma resultiert. Erhöhte Kynureninspiegel haben sowohl eine Immundysfunktion (vermehrte Apoptose von Lymphozyten) als auch mikrovaskuläre Dysregulationen zur Folge, sodass das schwere Krankheitsbild der Sepsis noch verschlimmert wird. So ist eine erhöhte Aktivität derIDO bei Sepsis für den Organismus von Nachteil. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *in vitro* die Auswirkungen lokal erniedrigter Sauerstoffkonzentrationen auf die Induktion und die Aktivität derIDO beleuchtet. Es konnte gezeigt werden, dass Hypoxie zu einer herabgesetzten Induktion und zu einer Hemmung der antimikrobiellen Eigenschaften derIDO führt, was für die Organismus von Nachteil ist, da lokale Infektionen weniger effektiv bekämpft werden können. Huttunen *et al.* [112, 113] zeigten ebenfalls an Sepsispatienten, dass eine erhöhteIDO-Aktivität, gemessen am Kynurenin-Tryptophan-Quotient im Plasma, mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist, denn es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit letal verlaufender Sepsis der Kynurenin-Tryptophan-Quotient im Plasma signifikant höher war als bei Patienten mit nicht-letalem Verlauf. Als Schlussfolgerung daraus wurde diskutiert, ob eine erhöhteIDO-Aktivität als unabhängiger Prädiktor für einen letalen Verlauf einer Sepsis zu werten sein könnte. Die Datenlage deutet also darauf hin, dass eine erniedrigteIDO-Aktivität im Rahmen von lokalen Infektionen, beispielhaft sei eine infizierte, hypoxische Wunde genannt, negative Auswirkungen hat. Denn unter solchen Bedingungen ist, wie meine Arbeit zeigt, die Fähigkeit derIDO mikrobielles Wachstum zu hemmen stark eingeschränkt. Im Gegensatz dazu hat eine erhöhteIDO-Aktivität im Rahmen systemischer Infektionen, beispielhaft sei eine Sepsis genannt, ebenfalls negative Auswirkungen. Denn im Rahmen einer Sepsis führt einer erhöhteIDO-Aktivität zu erhöhten Plasmakynureninspiegeln, was Immundysfunktionen und mikrovaskuläre Dysregulationen zur Folge hat. Ob sich hier die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes in der Sepsistherapie ergibt, könnte in Zukunft

näher beleuchtet werden. Denkbar wären zum Beispiel eine gezielte pharmakologische Inhibition der IDO oder Inaktivierung von Kynurenin.

Um den Einfluss von Hypoxie auf die IDO vermittelte Parasitenabwehr in humanen Glioblastomzellen, humanen Zervixkarzinomzellen und humanen Fibroblasten (HFF) zu analysieren diente in dieser Arbeit der Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) als Beispiel für einen obligat intrazellulären Erreger. Infektionen mit *T. gondii* verlaufen bei immunkompetenten Menschen in der Regel asymptomatisch ab, in sehr seltenen Fällen kann es zu generalisierten Lymphadenopathien oder Myalgien kommen. Bei immundefizienten Patienten (z.B. im Rahmen einer HIV-Erkrankung) kann die Infektion mit *T. gondii* zu schweren Myokarditiden, Pneumonien, Enzephalitiden und intrazerebralen Abszessen führen [114]. Gefürchtet ist die Toxoplasmose bei Schwangeren bzw. die Infektionen des Fötus, hier reicht das Spektrum der Schädigung von Kalzifikationen des ZNS des Neugeborenen bis hin zu fulminanten Embryopathien mit Abort [115]. Im Jahr 2006 wurde gezeigt dass Fibroblasten bei Infektion mit *T. gondii* auch unter physiologischen Sauerstoffkonzentrationen den Transkriptionsfaktor HIF1 α verstärkt exprimieren [116]. Spear *et al* zeigten 2006 anhand von Experimenten mit HIF1 α -Knockout-Fibroblasten, dass das Vorhandensein von HIF1 α in mit *T. gondii* infizierten Fibroblasten zu einem verstärkten parasitären Wachstum führt [117]. Welcher Mechanismus diesem Zusammenspiel zwischen Hypoxie und parasitärem Wachstum zu Grunde liegt bleibt unklar. In Kenntnis der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte dies bezüglich jedoch folgende Theorie entwickelt werden: Die Anwesenheit von HIF1 α in beschriebenen Fibroblasten deutet auf das Vorliegen eines hypoxischen Milieus hin, welches zelluläre Anpassungsvorgänge nach sich zieht (Akkumulation von HIF1 α). Unter Hypoxie sind Expression und Aktivität der IDO gehemmt, es findet also keine IDO-vermittelte Degradation lokalen Tryptophans statt, sodass für *T. gondii* ausreichend Tryptophan zur Proliferation zur Verfügung steht. Wie in Abbildung 3.6 gezeigt, hemmt Hypoxie die antiparasitären Effekte der IDO, sodass *T. gondii* ungehindert proliferieren konnte, wohingegen das parasitäre Wachstum unter physiologischen und atmosphärischen Bedingungen durch die IDO vermittelte Tryptophandegradation gehemmt wurde. Roth *et al.* zeigte anhand eines Infektionsmodells, dass Zellen der humanen *Tuba uterina* ab einer Sauerstoffkonzentration von unter 3% O₂ nicht mehr in der Lage sind das Wachstum des obligat intrazellulären Bakteriums *C. trachomatis* zu inhibieren [11]. In Abb. 3.6 wurde ein

ähnlicher Schwellenwert für *T. gondii* gefunden: Für eine effektive IDO-vermittelte Toxoplasmenabwehr muss die Sauerstoffkonzentration über 3% O₂ liegen. 2008 zeigten Muccio *et al.* in einer MRT-Studie mit Hilfe diffusionsgewichteter Sequenzen (DWI), dass bakterielle und parasitäre intrazerebrale Abszesse zentral keine Diffusion aufweisen, wohingegen der Randbereich stark perfundiert ist [118]. Dies erlaubt den Rückschluss, dass im Zentrum eines intrazerebralen Abszesses Hypoxie herrscht, während im Randbereich physiologische Sauerstoffkonzentrationen zu erwarten sind. Nun lässt sich die Theorie entwickeln, dass die IDO-vermittelte Hemmung parasitären Wachstums im Zentrum eines solchen Abszesses aufgrund der hypoxischen Bedingungen keine Rolle spielt. Da das Zentrum eines solchen Abszesses überwiegend nekrotisch ist, ist hier auch kein Wachstum des intrazellulären Parasiten *T. gondii* zu erwarten, sodass argumentiert werden könnte, dass es hier auch keinen „Bedarf“ an IDO-vermittelter Tryptophandegradation gibt. Wenn jedoch im Randbereich eines solchen Prozesses physiologische Sauerstoffbedingungen herrschen, kann *T. gondii* hier proliferieren. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Bakterium *S. aureus* hingegen gehört zu den fakultativ anaeroben Bakterien, welche auch innerhalb nekrotischer Areale (also auch im Zentrum eines Abszesses) noch proliferationsfähig sind. So konnte mit IDO-vermittelter Tryptophandegradation in der vorliegenden Arbeit ein sehr effektiver Mechanismus gezeigt werden, infizierte und abszedierende Prozesse unabhängig von der Art der auslösenden Keime (aerob oder anaerob) einzudämmen und eine systemische Ausbreitung zu verhindern.

Da auch Viren zur Replikation auf die Aminosäure Tryptophan angewiesen sind, sollte beleuchtet werden inwieweit Hypoxie einen Einfluss auf IDO-vermittelte antivirale Effekte hat. Als Beispiel für einen viralen Erreger diene Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1). Infektionen mit HSV-1 verlaufen in der Regel chronisch und münden auch bei immunkompetenten Wirten meist in einer lebenslangen Viruspersistenz. Bei immunkompromittierten Patienten kann HSV-1 lebensgefährliche Pneumonien oder Enzephalitiden verursachen [119, 120]. In der Vergangenheit konnte durch Aghi *et al. in vivo* gezeigt werden, dass Hypoxie das Wachstum von onkolytischen HSV verstärken kann [121]. Dazu wurden in insgesamt 10 Mäusen Glioblastome induziert, indem ihnen humane Glioblastomzellen (U87) subkutan appliziert wurden. Fünf Mäuse wurden unter atmosphärischen Bedingungen gehalten, während die anderen fünf unter hyperbaren

Sauerstoffkonzentrationen gehalten wurden und wöchentlich Erythropoetininjektionen erhielt um den arteriellen pO_2 auf 1500 mmHg anzuheben. Es erfolgte die Infektion mit onkolytischen HHV indem 5×10^6 Viruskopien direkt in die Tumoren injiziert wurden. Nach 120 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Tumoren auf die Anzahl an Viruskopien untersucht. In den „hypoxischeren“ Tumoren, also in denen der Mäuse, welche unter atmosphärischen Bedingungen gehalten wurden, konnten bis zu fünfmal mehr Viruskopien nachgewiesen werden als in den sauerstoffreicheren Tumoren. Davis *et al.* zeigten *in vitro* dass Hypoxie HHV-8 in humanen Sarkomzellen reaktivieren kann [122]. Dazu wurden HHV-8-positive Sarkomzellen für 48 Stunden entweder unter Normoxie (21% O_2) oder unter Hypoxie (1% O_2) inkubiert. Da bei einer Inkubationsdauer von 72 Stunden vermehrter Zelltod beobachtet wurde, wurde diese auf maximal 48 Stunden begrenzt um zu verhindern, dass sich im Zentrum der Tumoren Nekroseareale bilden. Anschließend wurde die Anzahl der Viruskopien bestimmt: In den unter Hypoxie inkubierten Zellen konnte bis zu 34fach mehr Viruskopien nachgewiesen werden als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse decken sich mit Daten dieser Arbeit, welche nahelegen, dass Hypoxie eine verminderteIDO-Expression und Aktivität zur Folge hat, sodass dieIDO-vermittelten antiviralen Effekte nicht mehr vermittelt werden konnten und sich so HSV-1 unter Hypoxie ungehindert replizierte, was unter Normoxie nicht der Fall war (Abb. 3.7). Die von Aghi *et al.* verwendeten Glioblastomzellen sind humane Zellen. So kann vor diesem Hintergrund diskutiert werden, ob die gemachten Beobachtungen auch auf eine hypoxieinduzierte Hemmung derIDO zurückzuführen sind. Im Zentrum eines Glioblastomes herrscht Hypoxie, sodass keineIDO-vermittelte Tryptophanspaltung stattfindet, dadurch war eine uneingeschränkte Replikation der onkolytischen HSV möglich. Während in unter hyperbaren Sauerstoffkonzentrationen gehaltenen Mäusen der Sauerstoffgehalt in den Tumoren angehoben war. Dadurch konnte wiederIDO-vermittelt Tryptophan zu Kynurenin gespalten werden, sodass die Replikation der onkolytischen HSV gehemmt wurde. Unter der Annahme, dass die von Davis *et al.* [122] verwendeten humanen Sarkomzellen in der Lage sindIDO zu exprimieren (viele Tumorzellen sind *per se*IDO-positiv [123]), kann vermutet werden, dass dieIDO-vermittelte Tryptophandegradation der zugrundeliegende Mechanismus dafür ist, dass HHV-8 unter 1%iger Sauerstoffkonzentration reaktiviert wurde, denn unter normoxischen Bedingungen kann derIDO-vermittelte Tryptophanmangel die Replikation von HHV-8 hemmen.

4.4 IDO-vermittelte Immunregulation unter Hypoxie

Im letzten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden wie die immunregulatorische Komponente der IDO von Hypoxie beeinflusst wird. Abbildung 3.8 zeigt eindeutig, dass humane Fibroblasten nach IFN γ -Stimulation und Inkubation unter Normoxie IDO exprimieren, welche dann durch Tryptophandegradation die T-Zell-Proliferation inhibiert. Bei Hypoxie (1% O $_2$) konnten diese immunregulatorischen Effekte der IDO nicht mehr beobachtet werden. Dass diese *in vitro* gemachten Beobachtungen nicht ausreichen, um die Regulation einer T-Zell-Antwort *in vivo* erschöpfend zu beschreiben, wird anhand der inhomogenen Datenlage in der Literatur klar: Biju *et al.* beschreiben z.B. dass Hypoxie über HIF in T-Zellen eine Apoptose induzieren kann [124]. Dies ergibt sich aus folgenden Befunden: Das von Hippel-Lindau-Genprodukt (pVHL) markiert die Alphauntereinheit von HIF für die proteasomvermittelte Degradation. So wurden Mäuse mit inaktiviertem, thymusspezifischem pVHL (Vhlh) gezüchtet. Bei diesen war der Thymus deutlich kleiner und es wurden deutlich weniger CD4 $^+$ /CD8 $^+$ -positive Zellen gefunden als beim Wildtyp. Weiter wurde gezeigt, dass dies durch eine erhöhte Aktivität der Caspase 8 begründet ist, was vermehrte T-Zell-Apoptose zur Folge hat. Eine pharmakologische Inaktivierung von HIF in Vhlh-defizienten Mäusen führte zu einer Normalisierung der Thymusgröße und Anzahl der CD4 $^+$ /CD8 $^+$ -positive Zellen, was nahelegt, dass HIF eine entscheidende Rolle bei der T-Zell-Apoptose spielt. Dazu passt, dass T-Zellen von HIF1 α -knockout-Mäusen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors signifikant mehr Tumornekrosefaktor (TNF) und IFN γ freisetzen als Wildtyp T-Zellen und dass HIF1 α -knockout-Mäuse eine höhere Überlebensrate in Sepsismodellen zeigen [125] als der Wildtyp. Während die Ergebnisse meiner Arbeit nahelegen, dass Hypoxie durch die Hemmung der IDO lokal zu einer effektiveren T-Zell-Proliferation führen, was als eine gesteigerte Immunlage gewertet werden kann, zeigen die Daten von Biju *et al.* im systemischen Setting gegenteiliges. Weiter wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass Hypoxie auch die T-Zell-Differenzierung beeinflusst: HIF1 α akkumuliert unter hypoxischen Bedingungen und induziert FoxP3, was eine zu einer Zunahme der regulatorischen T-Zellen unter Hypoxie *in vivo* und *in vitro* führt [126]. All diese Fakten weisen darauf hin, dass die T-Zell-Antwort unter Hypoxie einer strengen Regulation unterliegt, möglicherweise um eine Art „Über-Inflammation“ unter Hypoxie zu vermeiden und so gesundheitsschädliche Effekte unter Hypoxie gering zu halten. Diese Mechanismen und die Rolle der IDO dabei müssen in Zukunft näher beleuchtet werden,

dabei ist insbesondere die speziesspezifisch unterschiedliche Regulation der IDO Expression in murinen und humanen Zellen zu beachten.

5 Zusammenfassung

Tryptophan ist sowohl für den Menschen, als auch für viele Mikroorganismen eine essenzielle Aminosäure. Daher hat die Tryptophankonzentration im Gewebe auch Auswirkungen auf das Wachstum von Mikroorganismen. Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro*-Modellen für bakterielle, parasitäre und virale Infektionen. Hierbei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf den durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelten antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten. Bei der IDO handelt es sich um eine Dioxygenase, das bedeutet, dass sie die Spaltung von Tryptophan nur unter Verwendung von Sauerstoff katalysiert.

In vivo finden sich in unterschiedlichen Gewebetypen unterschiedliche Sauerstoffkonzentrationen die einen Einfluss auf die IDO Aktivität besitzen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob physiologisch oder pathophysiologisch normale Sauerstoffkonzentrationen von 1 - 10% O₂ die IDO Aktivität beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Enzymaktivität der IDO bei pathophysiologisch relevanten, niedrigen Sauerstoffkonzentrationen deutlich reduziert ist. Folgerichtig war eine IDO-vermittelte, auf Tryptophanmangel beruhende Hemmung des bakteriellen Wachstums unter hypoxischen Bedingungen nicht mehr nachzuweisen. Ähnliche Effekte konnten auch in Infektionssystemen mit Viren und Parasiten beobachtet werden. Auch die immunregulatorischen Funktionen der IDO bei der Aktivierung von T-Zellen konnten durch Hypoxie vergleichbar blockiert werden.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Effektivität der IDO vermittelten Tryptophandegradation in humanen Vorhautfibroblasten und in humanen Glioblastomzellen essenziell von einer ausreichenden Versorgung mit Sauerstoff abhängt und dass die O₂ Konzentration somit die Ausprägung antimikrobieller und immunregulatorischer Effektorleistung beeinflusst.

6 Literaturverzeichnis

1. Däubener W, S.S., Heseler K, Spekker KH, MacKenzie CR, *Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells*. Thromb Haemost, 2009. **102**: p. 1110–1116.
2. Taylor, M.W. and G. Feng, *Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2, 3-dioxygenase, and tryptophan catabolism*. The FASEB Journal, 1991. **5**(11): p. 2516-2522.
3. Fallarino F, G.U., Puccetti P, *Indoleamine 2,3-dioxygenase: from catalyst to signaling function*. Eur J Immunol, 2012. **42**: p. 1932–1937.
4. MacKenzie CR, H.K., Müller A, Däubener W, *Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines*. Curr Drug Metab, 2007. **8**: p. 237–244.
5. Munn DH, Z.M., Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, et al., *Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism*. Science, 1998. **281**: p. 1191-1193.
6. Opitz CA, L.U., Sahm F, Ott M, Tritschler I, et al., *An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2011. **478**: p. 197-203.
7. Wiese M, G.R., Popp I, Matuszak J, Mahapatro M, et al. , *Hypoxia-mediated impairment of the mitochondrial respiratory chain inhibits the bactericidal activity of macrophages*. Infect Immun, 2012. **80**: p. 1455-1566.
8. Zinkernagel AS, J.R., Nizet V, *Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection*. J Mol Med, 2007. **85**: p. 1339-1346.
9. Atkuri KR, H.L., Niemi AK, Cowan T, Herzenberg LA, *Importance of culturing primary lymphocytes at physiological oxygen levels*. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. **104**: p. 4547-1552.
10. Kempf VA, L.M., Alitalo K, Wälzlein JH, Eehalt U, et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections*. Circulation, 2005. **111**: p. 1054-1062.
11. Roth A, K.P., van Zandbergen G, Klinger M, Hellwig-Bürgel T, et al., *Hypoxia abrogates antichlamydial properties of IFN-c in human fallopian tube cells in vitro and ex vivo*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010. **107**(19502-19507).
12. Santillán, M. and M.C. Mackey, *Dynamic regulation of the tryptophan operon: a modeling study and comparison with experimental data*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(4): p. 1364-1369.

13. Lazaris-Brunner, G., et al., *Tryptophan requirement in young adult women as determined by indicator amino acid oxidation with L-[13C] phenylalanine*. The American journal of clinical nutrition, 1998. **68**(2): p. 303-310.
14. Young, V. and A. El-Khoury, *Human amino-acid requirements: a re-evaluation*. Food and Nutrition Bulletin (UNU), 1996.
15. Janeway Jr C A, T.P., Walport M, Shlomchik MJ, *Immunobiology, the immune system in health and disease*. Garland Science Publishing, 2005. **6th edition**.
16. Descarries, L., et al., *Morphology of central serotonin neurons*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1990. **600**(1): p. 81-92.
17. Rasso J, H.K., Netzker R, Deutmann R, *Biochemie*, 2008. **2nd Edition**.
18. Millan, M.J., et al., *Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions*. Trends in pharmacological sciences, 2008. **29**(9): p. 454-464.
19. Konturek, S., et al., *Role of melatonin in upper gastrointestinal tract*. Journal of physiology and pharmacology, 2007. **58**(6): p. 23-52.
20. O'Neil, S. and R. DeMoss, *Tryptophan transaminase from Clostridium sporogenes*. Archives of biochemistry and biophysics, 1968. **127**: p. 361-369.
21. Rafice, S., et al., *Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2, 3-dioxygenase and indoleamine 2, 3-dioxygenase*. Biochemical Society Transactions, 2009. **37**(2): p. 408.
22. Schwarcz, R., W.O. Whetsell, and R.M. Mangano, *Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain*. Science, 1983. **219**(4582): p. 316-318.
23. Stone, T., *Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids*. Pharmacological Reviews, 1993. **45**(3): p. 309-379.
24. Bauer, T.M., et al., *Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2, 3 - dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T - cell responses in vitro and in vivo*. Transplant international, 2005. **18**(1): p. 95-100.
25. Hegyi, J., R.A. Schwartz, and V. Hegyi, *Pellagra: dermatitis, dementia, and diarrhea*. International journal of dermatology, 2004. **43**(1): p. 1-5.
26. Goldsmith, G.A., et al., *Studies of niacin requirement in man. I. Experimental pellagra in subjects on corn diets low in niacin and tryptophan*. Journal of Clinical Investigation, 1952. **31**(6): p. 533.

27. Kotake, Y. and I. Masayama, *The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan.* Z. physiol. Chem, 1936. **243**: p. 237-244.
28. Yamamoto, S. and O. Hayaishi, *Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine d-and l-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes.* Journal of Biological Chemistry, 1967. **242**(22): p. 5260-5266.
29. Shimizu, T., et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase. Purification and some properties.* Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(13): p. 4700-4706.
30. Sono, M., et al., *Heme-containing oxygenases.* Chemical Reviews, 1996. **96**(7): p. 2841-2888.
31. Takikawa O., N.S., Hirata F., Hayaishi O., *Mechanism of interferon-gamma action.* J Biol Chem, 1988. **263**: p. 2041-2048.
32. Burkin, D.J., et al., *Localization of the human indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8.* Genomics;(United States), 1993. **17**(1).
33. Sugimoto, H., et al., *Crystal structure of human indoleamine 2, 3-dioxygenase: catalytic mechanism of O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(8): p. 2611-2616.
34. Schroder, K., et al., *Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions.* Journal of leukocyte biology, 2004. **75**(2): p. 163-189.
35. Heseler, K., et al., *Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN - γ - induced tryptophan degradation.* FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008. **52**(2): p. 273-281.
36. Babcock, T.A. and J.M. Carlin, *Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor α in interferon-treated epithelial cells.* Cytokine, 2000. **12**(6): p. 588-594.
37. King, N.J. and S.R. Thomas, *Molecules in focus: indoleamine 2, 3-dioxygenase.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2007. **39**(12): p. 2167-2172.
38. Cady, S.G. and M. Sono, *1-Methyl-dl-tryptophan, β -(3-benzofuranyl)-dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and β -[3-benzo (b) thienyl]-dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2, 3-dioxygenase.* Archives of Biochemistry and Biophysics, 1991. **291**(2): p. 326-333.
39. Yoshida, R. and O. Hayaishi, *Induction of pulmonary indoleamine 2, 3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978. **75**(8): p. 3998-4000.

40. Pfefferkorn, E., *Interferon gamma blocks the growth of Toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(3): p. 908-912.
41. MacKenzie, C.R., U. Hadding, and W. Däubener, *Interferon- γ -induced activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci*. Journal of Infectious Diseases, 1998. **178**(3): p. 875-878.
42. Mackenzie, C.R., et al., *Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon- γ -activated human uro-epithelial cells*. Journal of medical microbiology, 1999. **48**(10): p. 935-941.
43. Pantoja, L.G., et al., *Inhibition of Chlamydia pneumoniae Replication in Human Aortic Smooth Muscle Cells by Gamma Interferon-Induced Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Activity*. Infection and immunity, 2000. **68**(11): p. 6478-6481.
44. Schroten, H., et al., *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, 2001. **32**(4): p. 206-210.
45. Bodaghi, B., et al., *Role of IFN- γ -induced indoleamine 2, 3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells*. The Journal of Immunology, 1999. **162**(2): p. 957-964.
46. Adams, O., et al., *Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon γ and tumor necrosis factor α is mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase*. Microbes and Infection, 2004. **6**(9): p. 806-812.
47. Adams, O., et al., *Role of indoleamine-2, 3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections*. Journal of virology, 2004. **78**(5): p. 2632-2636.
48. Obojes, K., et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon*. Journal of virology, 2005. **79**(12): p. 7768-7776.
49. Spekker, K., et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase is involved in defense against Neospora caninum in human and bovine cells*. Infection and immunity, 2009. **77**(10): p. 4496-4501.
50. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nature Reviews Immunology, 2004. **4**(10): p. 762-774.
51. Grohmann, U., F. Fallarino, and P. Puccetti, *Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO*. Trends in immunology, 2003. **24**(5): p. 242-248.

52. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?* Immunology today, 1999. **20**(10): p. 469-473.
53. Cook, C.H., et al., *Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO.* The Journal of Immunology, 2008. **180**(5): p. 3103-3112.
54. Laurence, J.M., et al., *Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection.* Transplantation, 2008. **85**(9): p. 1357-1361.
55. Lin, Y., et al. *Induction of indoleamine 2, 3-dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation.* in *Transplantation proceedings.* 2008. Elsevier.
56. Liu, X., et al., *Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity.* Blood, 2010. **115**(17): p. 3520-3530.
57. Fallarino, F., et al., *The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells.* The Journal of Immunology, 2006. **176**(11): p. 6752-6761.
58. Ball, H.J., et al., *Characterization of an indoleamine 2, 3-dioxygenase-like protein found in humans and mice.* Gene, 2007. **396**(1): p. 203-213.
59. Löb, S., et al., *IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo-but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism.* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2009. **58**(1): p. 153-157.
60. Ball, H.J., et al., *Indoleamine 2, 3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway.* The international journal of biochemistry & cell biology, 2009. **41**(3): p. 467-471.
61. Knox, W.E. and V. Auerbach, *The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat.* Journal of Biological Chemistry, 1955. **214**(1): p. 307-313.
62. Iwamoto, Y., et al., *Tryptophan 2, 3-dioxygenase in Saccharomyces cerevisiae.* Canadian journal of microbiology, 1995. **41**(1): p. 19-26.
63. Searles, L.L., et al., *Structure and transcription of the Drosophila melanogaster vermilion gene and several mutant alleles.* Molecular and cellular biology, 1990. **10**(4): p. 1423-1431.
64. Zhang, Y., et al., *Crystal structure and mechanism of tryptophan 2, 3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis.* Biochemistry, 2007. **46**(1): p. 145-155.

65. Comings, D.E., et al., *Human tryptophan oxygenase localized to 4q31: Possible implications for alcoholism and other behavioral disorders*. Genomics, 1991. **9**(2): p. 301-308.
66. Yuasa, H.J., et al., *Evolution of vertebrate indoleamine 2, 3-dioxygenases*. Journal of molecular evolution, 2007. **65**(6): p. 705-714.
67. Nabi, R., et al., *Association of tryptophan 2, 3 dioxygenase gene polymorphism with autism*. American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics, 2004. **125**(1): p. 63-68.
68. Schmidt, S.K., et al., *Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2, 3 - dioxygenase*. European journal of immunology, 2009. **39**(10): p. 2755-2764.
69. Deckert-Schlüter, M., et al., *Interferon-gamma receptor-deficiency renders mice highly susceptible to toxoplasmosis by decreased macrophage activation*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1996. **75**(6): p. 827-841.
70. Jouanguy, E., et al., *IL-12 and IFN- γ in host defense against mycobacteria and salmonella in mice and men*. Current opinion in immunology, 1999. **11**(3): p. 346-351.
71. Newport, M.J., et al., *A mutation in the interferon- γ -receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection*. New England Journal of Medicine, 1996. **335**(26): p. 1941-1949.
72. Wheelock, E.F., *Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin*. Science, 1965. **149**(3681): p. 310-311.
73. Munder, M., et al., *Murine macrophages secrete interferon γ upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: a novel pathway of autocrine macrophage activation*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(12): p. 2103-2108.
74. Otani, T., et al., *Identification of IFN- γ -producing cells in IL-12/IL-18-treated mice*. Cellular immunology, 1999. **198**(2): p. 111-119.
75. Darnell, J., I.M. Kerr, and G.R. Stark, *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 1994. **264**(5164): p. 1415-1421.
76. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon- γ* . Annual review of immunology, 1997. **15**(1): p. 749-795.
77. Nguyen, H., J. Hiscott, and P.M. Pitha, *The growing family of interferon regulatory factors*. Cytokine & growth factor reviews, 1997. **8**(4): p. 293-312.

78. Collins, T., et al., *Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1984. **81**(15): p. 4917-4921.
79. Kårehed, K., et al., *IFN- γ -induced upregulation of Fc γ -receptor-I during activation of monocytic cells requires the PKR and NF κ B pathways*. Molecular immunology, 2007. **44**(4): p. 615-624.
80. Gattoni, A., et al., *Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II)(1 of 2 parts)*. La Clinica terapeutica, 2005. **157**(4): p. 377-386.
81. Plate J. M., L.T.L., Bustamante G., Hayes R. L., *Cytokines involved in the generation of cytolytic effector T lymphocytes*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **532**: p. 149-157.
82. Herrmann, D.J., et al., *Linezolid for the treatment of drug-resistant infections*. 2008.
83. Bokarewa, M.I., T. Jin, and A. Tarkowski, *Staphylococcus aureus: staphylokinase*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2006. **38**(4): p. 504-509.
84. Groß, *Medizinische Mikrobiologie und Infiktiologie*. Thieme, 2006. **First Edition**.
85. Hellenbrand, W., et al., *Seroprevalence of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2) in former East and West Germany, 1997–1998*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2005. **24**(2): p. 131-135.
86. Whitley, R.J., *Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults*. Antiviral research, 2006. **71**(2): p. 141-148.
87. Bilzer T, S.D., Dahme E, Keiditsch E, Bürrig KF, Anzil AP, Wechsler W, *Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro*. Virchows Archiv A, 1991. **418**(4): p. 281-293.
88. Theodore T. Puck, P.I.M., and Steven J. Cieciura, *Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer*. J Exp Med, 1956. **103**(2): p. 273-283.
89. Stichternoth C, F.A., Setiadi E, Giasson L, Vecchiarelli A, et al., *Sch9 kinase integrates hypoxia and CO₂ sensing to suppress hyphal morphogenesis in Candida albicans*. . Eukar Cell, 2011. **10**: p. 502-511.
90. Pfefferkorn E. R., P.L.C., *Specific labeling of intracellular toxoplasma gondii with uracil*. J Protozool, 1977. **24**: p. 449-453.
91. Däubener W., W.N., Pilz K., Seghrouchni S., Fischer H. G., Hadding U., *A new, simple, bioassay for human IFN-gamma*. J Immunol Methods, 1994. **168**: p. 39-47.

92. Tsubuki S, S.Y., Tomioka M, Ito H, Kawashima S, *Differential inhibition of calpain and proteasome activities by peptidyl aldehydes of di-leucine and tri-leucine.* J Biochem, 1996. **119**: p. 572-576.
93. Fukuda I, I.A., Hirai G, Nishimura S, Kawasaki H, et al., *Ginkgolic acid inhibits protein SUMOylation by blocking formation of the E1-SUMO intermediate.* Chem Biol, 2009. **16**(133-140).
94. Baffert F, R.C., De Pover A, Pissot-Soldermann C, Tavares GA, *Potent and selective inhibition of polycythemia by the quinoxaline JAK2 inhibitor NVP-BSK805.* Mol Cancer Ther, 2010. **9**: p. 1945-1955.
95. O'Shea JJ, P.R., *JAK and STAT signalling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease.* Immunity, 2012. **36**: p. 542-550.
96. Herbert A, N.H., Jessup W, Kockx M, Cartland S, et al, *Hypoxia regulates the production and activity of glucose transporter-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase in monocyte-derived endothelial-like cells: possible relevance to infantile haemangioma pathogenesis.* British J of Dermatology, 2011. **164**: p. 308-315.
97. Däubener, W., et al., *Restriction of Toxoplasma gondii growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2, 3-dioxygenase.* Infection and immunity, 2001. **69**(10): p. 6527-6531.
98. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Protein Is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions ITS STABILIZATION BY HYPOXIA DEPENDS ON REDOX-INDUCED CHANGES.* Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(36): p. 22642-22647.
99. Hu, Y.-L., et al., *Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma.* Cancer research, 2012. **72**(7): p. 1773-1783.
100. Semenza, G.L. and G.L. Wang, *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.* Molecular and cellular biology, 1992. **12**(12): p. 5447-5454.
101. Nizet V, J.R., *Interdependence of hypoxic and innate immune responses.* Nature Reviews Immunology, 2009. **9**: p. 609-617.
102. Weidemann A, J.R., *Biology of HIF-1 α .* Cell Death Differ, 2008. **15**: p. 621-627.
103. Monteleone I, A.R., Massimiliano Sarra, Giuseppe Sica, Pierpaolo Sileri, Livia Biancone, Thomas T. MacDonald, Francesco Pallone, Giovanni Monteleone, *Aryl Hydrocarbon Receptor-Induced Signals Up-regulate IL-22 Production and Inhibit Inflammation in the Gastrointestinal Tract.* Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 237-248.

104. Li Y, I.S., Withers DR, Roberts NA, Gallagher AR, Grigorieva EF, Wilhelm C, Veldhoen M., *Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation.* . Cell, 2011 **147**: p. 629-640.
105. Iyer, N.V., et al., *Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α .* Genes & development, 1998. **12**(2): p. 149-162.
106. Cramer, T., et al., *HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation.* Cell, 2003. **112**(5): p. 645-657.
107. Green, G.M. and E.H. Kass, *Factors influencing the clearance of bacteria by the lung.* Journal of Clinical Investigation, 1964. **43**(4): p. 769.
108. Takikawa, O., et al., *Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2, 3-dioxygenase.* Journal of Biological Chemistry, 1986. **261**(8): p. 3648-3653.
109. Yoshida, R., et al., *Induction of pulmonary indoleamine 2, 3-dioxygenase by interferon.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1981. **78**(1): p. 129-132.
110. Meisel, R., et al., *Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2, 3-dioxygenase.* Leukemia, 2011. **25**(4): p. 648-654.
111. Jönsson, K., T.K. Hunt, and S.J. Mathes, *Oxygen as an isolated variable influences resistance to infection.* Annals of surgery, 1988. **208**(6): p. 783.
112. Darcy CJ, D.J., Woodberry T, McNeil YR, Stephens DP, et al., *An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio in sepsis: Association with impaired immune and microvascular function.* PLoS ONE, 2011. **6**: p. e21185.
113. Huttunen R, S.J., Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, et al., *High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients.* Shock, 2010. **33**: p. 149-154.
114. Eza DE, L.S., *Fulminant toxoplasmosis causing fatal pneumonitis and myocarditis.* HIV Med, 2006. **7**: p. 415-420.
115. Jeffrey L. Jones, D.K.-M., Marianna Wilson, Geraldine McQuillan, Thomas Navin, and J.B. McAuley, *Toxoplasma gondii Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors.* American Journal of Epidemiology, 2001. **154**: p. 357-365.
116. Blader IJ, M.I., Boothroyd JC, *Microarray analysis reveals previously unknown changes in Toxoplasma gondii-infected human cells.* J Biol Chem, 2001. **276**: p. 24223-24231.

117. Spear W, C.D., Coppens I, Johnson RS, Giaccia A, et al., *The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for Toxoplasma gondii growth and survival at physiological oxygen levels*. Cellular Microbiology, 2006. **8**: p. 339–352.
118. Muccio CF, E.G., Bartolini A, Cerase A *Cerebral abscesses and necrotic cerebral tumours: differential diagnosis by perfusion-weighted magnetic resonance imaging*. Radiol Med, 2008. **113**: p. 747–757.
119. Flückiger U, T.A., *Pneumonia in the immune compromised host*. Ther Umsch, 2001. **58**: p. 614-619.
120. RJ, W., *Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults*. . Antiviral Res, 2006. **71**: p. 141-148.
121. Aghi MK, L.T., Rabkin S, Martuza RL, *Hypoxia enhances the replication of oncolytic herpes simplex virus*. Mol Ther, 2009. **17**: p. 51-56.
122. Davis DA, R.A., Zoetewij JP, Aoki Y, Read-Connole EL, et al., *Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. Blood, 2001. **97**: p. 3244-3250.
123. Munn, D.H. and A.L. Mellor, *IDO and tolerance to tumors*. Trends in molecular medicine, 2004. **10**(1): p. 15-18.
124. Biju, M.P., et al., *Vhlh gene deletion induces Hif-1-mediated cell death in thymocytes*. Molecular and cellular biology, 2004. **24**(20): p. 9038-9047.
125. Thiel M, C.C., Kreth S, Kuboki S, Chen P, et al. , *Targeted deletion of HIF-1 α gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival*. PLoS ONE 2007. **2**: p. e853.
126. Clambey ET, M.E., Westrich JA, Glover LE, Campbell EL, et al., *Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa*. PNAS, 2012. **109**: p. E2784–93.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation begleitet haben. Ohne diese Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen, diese Arbeit nun vorzulegen.

Ich bedanke mich bei ...

... Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener, dafür dass er mir ermöglicht hat diese Arbeit anzufertigen. Außerdem für eine erstklassige wissenschaftliche und menschliche Betreuung und dafür, dass er stets für alle Fragen und Probleme ein offenes Ohr hat.

... Herrn Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene.

... Herr Prof. Dr. med. Ingo Drexler für die Übernahme des Korreferates.

... allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für das angenehme Arbeitsklima und den fast schon familiären Umgang. Besonderer Dank gebührt dabei den Mitarbeiter aus meiner Arbeitsgruppe: Silvia Eller, Silke Stuhlsatz, Kathrin Heseler, Vanessa Ince, Margret Leineweber, Katrin Spekker, Silke Stuhlsatz, Winfried Schwippert, und Claudia Woite, die mir alle jederzeit helfend beiseite gestanden haben.

... Frau Dr. rer. nat. Silvia Eller, für die herausragende Betreuung und Korrektur dieser Arbeit. Außerdem für die gute Zeit.

... meiner Familie, für die Unterstützung und liebevolle Begleitung.

... meiner Freundin Victoria Herbsleb, die ich an meiner Seite niemals missen möchte.

8 Eidesstattliche Versicherung

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

Leipzig, den 14.07.2017

Sebastian Ebel