

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie  
und Krankenhaushygiene  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer**

**Auswirkung von Tryptophan verunreinigtem  
1-L-Methyltryptophan auf das Wachstum verschiedener  
Zellen, sowie auf IDO vermittelte antimikrobielle  
und immunologische Effekte**

**Dissertation**

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

**Stephan Siepmann**

**2019**

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

gez.:	Stephan Siepmann
Dekan:	Prof. Dr. Nikolaj Klöcker
Erstgutachter:	Prof. Dr. Walter Däubener
Zweitgutachter:	PD Dr. Albert Zimmermann

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Schmidt, S.K. et al., 2012. Influence of tryptophan contained in 1-methyl-tryptophan on antimicrobial and immunoregulatory functions of indoleamine 2,3-dioxygenase. *PloS one*, 7(9), p.e44797.

## Zusammenfassung

Tryptophan steht im Mittelpunkt vieler Stoffwechselprozesse, sowohl des menschlichen Körpers, als auch vieler Organismen. Es ist für viele Organismen eine essentielle Aminosäure deren Regulation eine zentrale Rolle in einzelnen Lebewesen darstellt. Der größte Anteil des aufgenommenen Tryptophans wird von den Tryptophan abbauenden Enzymen IDO, IDO-2 und TDO zu Kynurenin umgewandelt. Dabei kommt es zu antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten. Diese Beobachtungen sind auf den Tryptophanmangel als auch auf die Bildung von Abbauprodukten z.B. Kynurenin zurückzuführen, welches beispielsweise toxisch für T-Zellen ist. Dieser immunregulatorische Effekt spielt auch eine große Rolle bei dem sogenannten "Tumor Escape" Phänomen. So konnte gezeigt werden, dass Tumoren welche eine erhöhte IDO Expression hatten, ein verstärktes Wachstum zeigten und der natürlichen Immunregulation „entgingen“. Um diesem Effekt entgegenzuwirken und die Aktivität der IDO zu reduzieren, untersuchte man den spezifischen Inhibitor der IDO, das 1-MT, *in vivo* als auch *in vitro* auf seine Wirkung. Die Ergebnisse sind divergent und konnten bis jetzt noch nicht schlüssig erklärt werden. So zeigte sich vor allem 1-L-MT als ein potenter Inhibitor der IDO in *in vitro* Experimenten. Auf der anderen Seite scheint 1-D-MT ein besserer Inhibitor *in vivo* zu sein. Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Beobachtungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden.

So waren sowohl Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus* und *Toxoplasma gondii*, als auch T-Zellen und humane Astrozytomzellen in der Lage, nach Zugabe von 1-L-MT in Tryptophan-freiem Milieu zu wachsen. Hierbei zeigte sich allerdings der Inhibitor als ein schlechteres Substrat. Bei der Untersuchung dieses Effektes und des Substrates konnte mit Hilfe von MS Analysen kein Einbau von 1-L-MT in Proteine von Bakterien oder 86HG39 Zellen nachgewiesen werden. Im Weiteren konnte mit Hilfe von HPLC Analysen demonstriert werden, dass die handelsüblichen 1-L-MT Chargen mit der proteinogenen Aminosäure Tryptophan verunreinigt sind. So sind die beobachteten Effekte am ehesten auf die Tryptophanverunreinigung zurückzuführen. Diese Ergebnisse stellen eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von 1-L-MT und 1-D-MT in *in vitro* oder *in vivo* Experimenten dar und müssen noch weiter untersucht werden.

## Summary

Tryptophan is at the center of many metabolic processes, both of the human body and of many organisms. For many organisms, it is an essential amino acid whose regulation plays a central role in individual organisms. The majority of the tryptophan consumed is converted to kynurenine by the tryptophan-degrading enzymes IDO, IDO-2 and TDO. This leads to antimicrobial and immunoregulatory effects. These observations are due to tryptophan deficiency as well as the formation of degradation products, e.g. Kynurenine, which is toxic for T cells, for example. This immunoregulatory effect also plays a major role in the so-called "tumor escape" phenomenon. Thus, it could be shown that tumors which had an increased IDO expression showed an increased growth and "escaped" the natural immune regulation. To counteract this effect and to reduce the activity of the IDO, the specific inhibitor of IDO, the 1-MT, was investigated *in vivo* as well as *in vitro* for its effect. The results are divergent and have not yet been conclusively explained. In particular, 1-L-MT was shown to be a potent inhibitor of IDO in *in vitro* experiments. On the other hand, 1-D-MT seems to be a better inhibitor *in vivo*. Another explanation for the different observations could be shown in this work.

Thus, both microorganisms, such as *Staphylococcus aureus* and *Toxoplasma gondii*, as well as T cells and human astrocytoma cells, were able to grow in tryptophan-free environment after the addition of 1-L-MT. However, the inhibitor was found to be a poorer substrate. Examination of this effect and the substrate did not detect the incorporation of 1-L-MT into bacteria or 86HG39 cells using MS analyzes. Furthermore, it was demonstrated by means of HPLC analyzes that the commercially available 1-L-MT batches are contaminated with the proteinogenic amino acid tryptophan. Thus, the observed effects are most likely due to the tryptophan contamination. These results provide further explanation for the differential effect of 1-L-MT and 1-D-MT in *in vitro* or *in vivo* assays and need to be further investigated.

## Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-DL-Methyltryptophan (Racemat)
1-D-MT	1-D-Methyltryptophan
1-L-MT	1-L-Methyltryptophan
3-HK	3-Hydroxykynurenin
5-HT	5-Hydroxytryptamin
86HG39 Zellen	Humane Astrozytomzellen
$\alpha$ 7NR	$\alpha$ 7-nikotinerger Cholinrezeptor
$\Delta$ Trp-KM	Tryptophan-freies konditioniertes Medium
AHR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
AP 1	Transkriptionsfaktor
APO866	Daporinad (E)-N-(4-(1-benzoylpiperidin-4-yl)butyl)-3-(pyridin-3-yl) acrylamid
ARC	<i>American Radiolabelled Chemicals, Inc.</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cfu	Kolonie erzeugende Einheiten ( <i>colony forming units</i> )
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CoA	Coenzym A
c-Fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 und ein Protoonkogen
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4 ( <i>cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> )
CTL-4 Rezeptor	zytotoxischer T-Lymphozyt 4 Rezeptor
d	Tag(e)
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DRE	<i>Dioxin-Responsive-Element</i>
D-Trp	D-Tryptophan
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal-Growth-Factor</i>
eIF-2 $\alpha$	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinases</i>
FCS	Fötale Kälberserum
Fc-Teil	<i>crystallisable fragment</i> -Teil
FDR	<i>false discovery rate</i>
g	Gramm
GAS	gamma-aktivierte Sequenz
GCN2	<i>general control nonrepressed 2</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
$^3\text{H}$	Tritium
h	Stunde(n)
HeLa Zellen	Humane Zervix Epithelzellkarzinom Zellen
HFF Zellen	Humane Vorhautfibroblasten
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase-1
IDO-2	Indolamin 2,3-Dioxygenase-2
I.E.	Internationale Einheiten
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-13	Interleukin-13
IMDM	Iscoe's Modified Dulbecco's Medium
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	<i>Interferon regulated elements</i>
ISRE	<i>Interferon stimulated response element</i>
JAK	Janus-Kinase
K $^+$	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton

KG	Kontrollgruppe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante des Inhibitors
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
KM	konditioniertes Medium
Ko	knockout
kV	Kilovolt
Kyn	Kynurenin
l	Liter
LIP	<i>liver-enriched inhibitory protein</i>
LTQ	2D-Ionenfallen-Massenspektrometer von Thermo Fisher Scientific
L-Trp	L-Tryptophan
mA	Milliampere
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen (p38)
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie
MAO A	Monoaminoxidase Typ A
mBq	Millibecquerel
MS	Massenspektroskopie
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute(n)
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	Mikromolar
mM	Millimolar
mmol	Millimol
µmol	Mikromol
MOPS	3-[N-Norpholino]propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
mTOR	<i>mechanistic Target of Rampamycin</i>

m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NF-IL6	<i>Nuclear Factor-Interleukin-6</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OKT3	Monoklonaler anti-CD3 Antikörper
PBL	Periphere humane Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PAS	Per-Arnt-Sim
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RNA	Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
STAT 1	<i>Signal transducers and activators of transcription 1</i>
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
Tet	Tetrazyklin
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
TH-1 Zellen	T-Helferzellen Typ 1
TLR	Toll like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
tRNA	Transfer RNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Trp	Tryptophan
TSST	<i>Toxic shock syndrome toxin</i>
U	Uracil
U/ml	Units pro Milliliter
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

### **Vorsätze zu Maßeinheiten**

M	mega ( $10^6$ )
k	kilo ( $10^3$ )
d	deci ( $10^{-1}$ )
c	centi ( $10^{-2}$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1** Tryptophan-Stoffwechsel
- Abbildung 1.2** Abbau von Tryptophan zu Kynurenin
- Abbildung 1.3** Tryptophan und Kynureninstoffwechsel
- Abbildung 1.4** Schematische Darstellung IDO vermittelter Effekte
- Abbildung 2.1** Strukturformeln von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.1** IDO Expression in 86HG39 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation
- Abbildung 3.2** 1-L-MT hemmt die IDO abhängige Kynureninproduktion
- Abbildung 3.3** L-Trp und 1-L-MT heben den IDO vermittelten antimikrobiellen Effekt auf
- Abbildung 3.4** Bakterienwachstum in Trp-freiem, konditioniertem Medium nach Supplementation von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.5** Toxoplasmenwachstum unter Trp-freien Kulturbedingungen nach Supplementation von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.6** Antagonisierung des Einbaus von radioaktivem [ $^3\text{H}$ ]-Trp in *Toxoplasma gondii* durch unmarkiertes L-Trp und unmarkiertes 1-L-MT
- Abbildung 3.7** T-Zellwachstum in Trp-freiem, konditioniertem Medium nach Zugabe von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.8** Antagonisierung des Einbaus von radioaktivem [ $^3\text{H}$ ]-Trp in T-Zellen durch unmarkiertes L-Trp und unmarkiertes 1-L-MT
- Abbildung 3.9** Wachstum von 86HG39 Zellen in Trp-freiem, konditioniertem Medium nach Supplementation von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.10** Wachstum von 86HG39 Zellen aus Vorkultur, in Trp-freiem konditioniertem Medium nach Supplementation von L-Trp und 1-L-MT
- Abbildung 3.11** Erhalt der Funktionalität von 86HG39 Zellen, nach Vorkultivierung in unterschiedlichen Nährmedien
- Abbildung 3.12** MS/MS Spektroskopische Analyse eines Trp-enthaltenden Proteins aus *S. aureus*
- Abbildung 3.13** MS/MS Spektroskopie eines Trp-enthaltenden Proteins von 86HG39 Zellen

**Abbildung 3.14** HPLC-Analyse von 1-L-MT, das in Trp-freiem RPMI Medium gelöst wurde

**Abbildung 3.15** Massenspektroskopische Analyse von 1-L-MT

**Abbildung 3.16** Bakterienwachstum in Tryptophan-freiem Medium mit 1-L-MT aus unterschiedlichen Chargen

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1</b>	Zellen
<b>Tabelle 2</b>	Erreger
<b>Tabelle 3</b>	Nährmedien
<b>Tabelle 4</b>	Puffer und Lösungen
<b>Tabelle 5</b>	Zytokine und Antikörper
<b>Tabelle 6</b>	Chemikalien
<b>Tabelle 7</b>	Radiochemikalien
<b>Tabelle 8</b>	Gebrauchsmaterialien
<b>Tabelle 9</b>	sonstige Geräte und Materialien

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 L-Tryptophan (L-Trp)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Charakterisierung der Tryptophan oxidierenden Enzyme</b> .....	<b>8</b>
1.2.1 Indolamin 2,3 Dioxygenase-1 (IDO).....	8
1.2.2 Indolamin 2,3 Dioxygenase-2 (IDO-2).....	11
1.2.3 Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO).....	12
1.2.4 Therapeutische Beeinflussung der IDO und IDO-2 Aktivität durch 1-Methyltryptophan.....	13
<b>1.3 Infektionsmodelle, verwendete Pathogene</b> .....	<b>14</b>
1.3.1 Bakterium <i>Staphylococcus aureus</i> ( <i>S. aureus</i> ).....	14
1.3.2 Parasit <i>Toxoplasma gondii</i> ( <i>T. gondii</i> ) RH Stamm.....	16
<b>1.4 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>18</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>20</b>
2.1.1 Zellen und Erreger.....	20
2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen.....	21
2.1.3 Zytokine/Antikörper.....	22
2.1.4 Chemikalien/Radiochemikalien.....	22
2.1.5 Gebrauchsmaterialien.....	24
2.1.6 Sonstige Geräte und Materialien.....	25
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 Zellbiologische Methoden.....	26
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	31
2.2.3 Statistische Auswertung.....	38
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1 Wachstum unterschiedlicher Zellen in Tryptophan-freiem         Medium nach Zugabe von 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT)</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2 Analyse von 1-L-Methyltryptophan</b> .....	<b>59</b>
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>68</b>
<b>5 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>82</b>

# 1 Einleitung

Unsere Nahrung besteht aus 3 großen Stoffkomponenten, den Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen. Dabei bestehen die Kohlenhydrate aus vielen Einfachzuckermolekülen, die Fette aus Fettsäuren, welche an Glycerin gebunden sind und die Proteine aus langen Aminosäureketten, welche auf unterschiedliche Arten gefaltet und untereinander verbunden sind (Rassow *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit werden vor allem die Funktionen der Proteine und Aminosäuren untersucht.

Ein erwachsener Mensch besitzt etwa 6 - 12 kg Protein, davon werden etwa 300 g/d unter Beteiligung von Proteasen zu Aminosäuren abgebaut (Rassow *et al.*, 2006). Aminosäuren gehören in die Gruppe der organischen Verbindungen und besitzen alle mindestens eine Carboxylgruppe, eine Aminogruppe und einen charakteristischen Rest (Rassow *et al.*, 2006). Sie werden in proteinogene und nicht proteinogene Gruppen eingeteilt, dabei spielen die proteinogenen Aminosäuren für den Menschen eine besondere Rolle. Insgesamt sind 20 proteinogene Aminosäuren bekannt, die bei der Proteinbiosynthese als Proteinbaustein zum Einsatz kommen (Rassow *et al.*, 2006). Weiterhin stellen Aminosäuren die Grundlage für die Bildung von Hormonen, Neurotransmittern oder Vitaminen dar. So bildet beispielsweise Glutamin die Grundlage für den Neurotransmitter Glutamat oder Tyrosin die Grundlage für die Bildung von Dopamin, Noradrenalin oder Adrenalin (Löffler *et al.*, 2002). Eine weitere sehr wichtige Aminosäure ist Tryptophan. Deren Stoffwechsel, Abbauprodukte und die Regulation der beteiligten Enzyme wurden im Rahmen dieser Dissertation genauer untersucht.

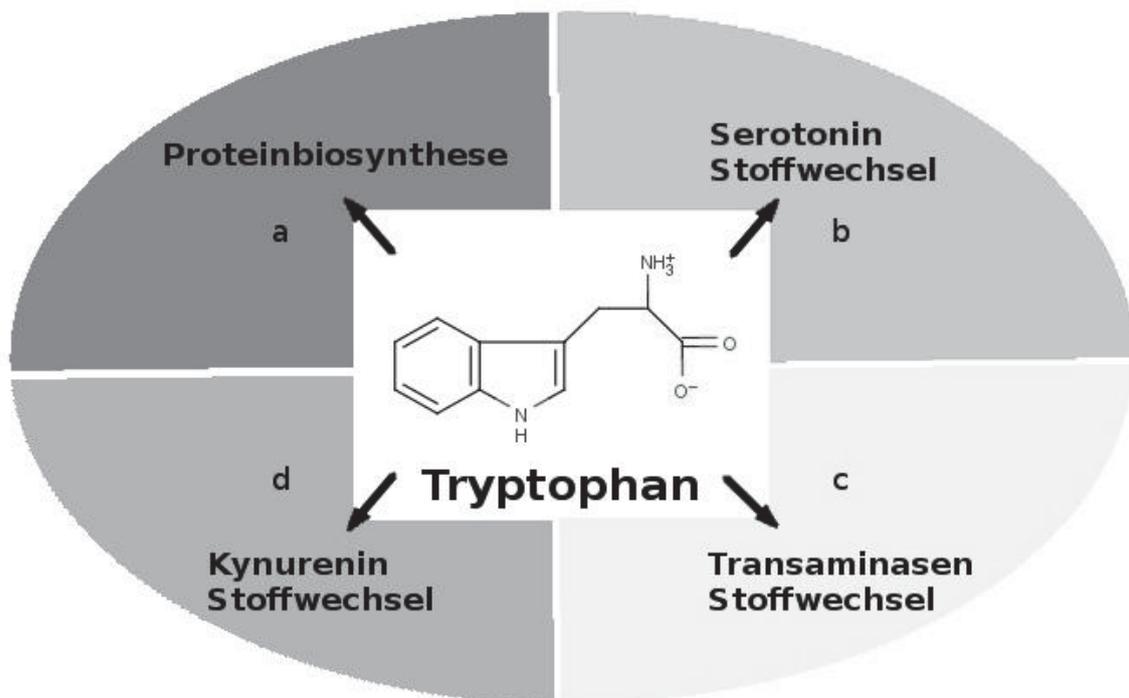
## 1.1 Tryptophan (Trp)

Tryptophan steht im Mittelpunkt vieler Stoffwechselprozesse und hat einen großen Einfluss auf zelluläre Reaktionen. Es ist eine  $\alpha$ -Aminosäure, die biologisch als L-Tryptophan und D-Tryptophan vorliegt, wobei nur die L-Konfiguration von physiologischer Bedeutung ist. Durch das Indol-Ringsystem wird Tryptophan gemeinsam mit Phenylalanin, Tyrosin und Histidin in die Gruppe der aromatischen Aminosäuren

eingeorordnet. Die apolare Seitenkette ist für die lipophile Eigenschaft verantwortlich (Löffler *et al.*, 2002; Rassow *et al.*, 2006).

Von großem Interesse für diese Arbeit ist die Tatsache, dass Tryptophan sowohl für manche Mikroorganismen, als auch für Säugetiere eine essentielle Aminosäure darstellt. Dies bedeutet, dass diese Organismen nicht in der Lage sind, Tryptophan selbst zu bilden und somit auf eine stete Zufuhr angewiesen sind. So muss beispielsweise der Mensch diese Aminosäure mit der Nahrung aufnehmen. Dabei liegt die empfohlene Menge für einen Erwachsenen täglich bei etwa 5 mg pro Kilogramm Körpergewicht (Fernstrom, 2012).

Sowohl durch die zentrale Stellung im Stoffwechsel vieler Spezies als auch durch die Tatsache, dass es sich um eine essentielle Aminosäure für manche Organismen handelt, ist die Regulation der Tryptophankonzentration ein zentraler Bestandteil im Stoffwechsel. Beispielsweise werden durch die Kontrolle der Tryptophanzufuhr, und den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin, antimikrobielle und immunregulatorische Prozesse vermittelt.



**Abb. 1.1: Tryptophan-Stoffwechsel.** Die proteinogene Aminosäure ist eine essentielle Aminosäure in der Proteinbiosynthese (a). Ebenfalls ist sie der Ausgangspunkt für die Serotonin- und Melatoninproduktion (b). Ein anderer Teil wird in den Transaminasen-Stoffwechsel eingeschleust und zu Indol-Benztraubensäure abgebaut (c). Allerdings werden 90 % des Tryptophans im Kynurenin-Stoffwechsel zu Kynurenin abgebaut (d) und weiterverarbeitet (Modifikation nach Schmidt, 2010).

Abbildung 1.1 verdeutlicht die zentrale Stellung von Tryptophan im Stoffwechsel. So ruft Tryptophan relativ unspezifisch eine Verstärkung der Proteinsynthese im Leberstoffwechsel hervor (Cihák, 1979). Als proteinogene Aminosäure ist Tryptophan dabei ein essentieller Bestandteil bei der Bildung von Proteinen.

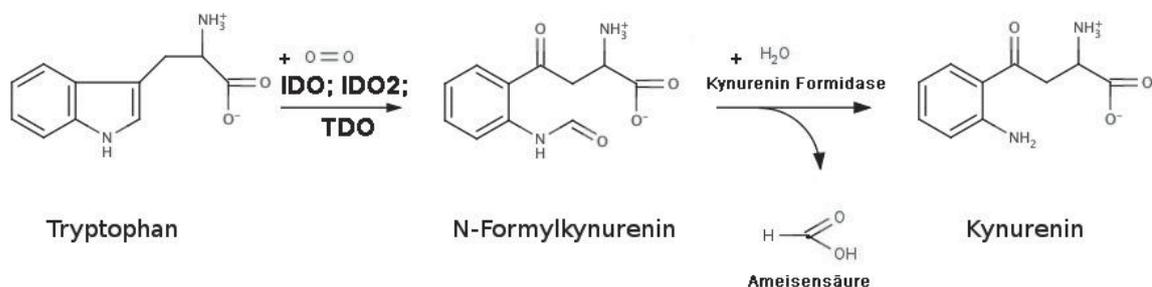
Außerdem stellt Tryptophan die Vorstufe von biogenen Aminen, wie den Hormonen Serotonin und Melatonin dar. Dabei wird es im ersten Schritt durch die Tryptophan-Hydroxylase zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Anschließend erfolgt, durch die 5-Hydroxytryptophan-Decarboxylase, die Decarboxylierung zu Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT). Gebildet wird 5-HT zu 90% von entero-chromaffinen Zellen des Darmes, im zentralen Nervensystem und im Blut. Seine unterschiedlichen Wirkungen übt Serotonin durch die Interaktion mit sieben verschiedenen Serotonin-Rezeptor-Klassen (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) aus. Fast alle Serotonin-Rezeptoren gehören in die Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Eine Ausnahme stellen die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren dar. Sie gehören zu den ligandenaktivierenden Kationenkanälen, welche die Permeabilität für Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> erhöhen (Millan *et al.*, 2008). Trotz dieser Gemeinsamkeiten erfüllen die verschiedenen Rezeptoren zumeist recht unterschiedliche Funktionen in den einzelnen Zellen.

Im Gastrointestinaltrakt kommt es vor allem durch die Aktivierung von Rezeptoren aus der 5-HT<sub>3</sub>- und 5-HT<sub>4</sub>-Klasse zu einer Steigerung der Darmperistaltik (Sikander *et al.*, 2009). So sind die Rezeptoren im zentralen Nervensystem an Lernprozessen beteiligt (5-HT<sub>4</sub>) oder können Erbrechen auslösen (5-HT<sub>3</sub>). Andere Rezeptoren bewirken Anxiolyse, Stimmungsaufhellung, steigern die Nahrungsaufnahme oder regulieren den Tag-Nacht-Rhythmus (5-HT<sub>1</sub>) (Baumgarten *et al.*, 1995). Durch diese Rezeptorvielfalt ist Serotonin ein sehr wichtiges Hormon im Stoffwechsel des zentralen Nervensystems. Der Abbau des Serotonins erfolgt durch die mitochondriale Monoaminoxidase Typ A (MAO A). Dadurch entsteht 5-Hydroxyindol-acetaldehyd. Durch eine anschließende Dehydrogenierung entsteht 5-Hydroxy-indolacetat, welches mit dem Urin ausgeschieden wird. In der Epiphyse (*Glandula pinealis* oder Zirbeldrüse) wird das Serotonin zu Melatonin abgebaut und bewirkt die Regulierung des Schlaf-Wach-Rhythmus. Die Sekretion von Melatonin wird durch fehlende Lichteinstrahlung getriggert und erfolgt in der Nacht. Dabei bewirkt Melatonin Müdigkeit und leitet die Tiefschlafphase ein. Veränderungen im Melatoninstoffwechsel können zu Depressionen und Schlafstörungen führen, welche zumeist im Winter oder bei Schichtarbeitern vorkommen können. Der Abbau des Melatonins erfolgt schließlich

durch eine Hydroxylase zu 6-Hydroxy-Melatonin, das anschließend mit Glucuronat konjugiert und über den Urin ausgeschieden wird (Konturek *et al.*, 2007).

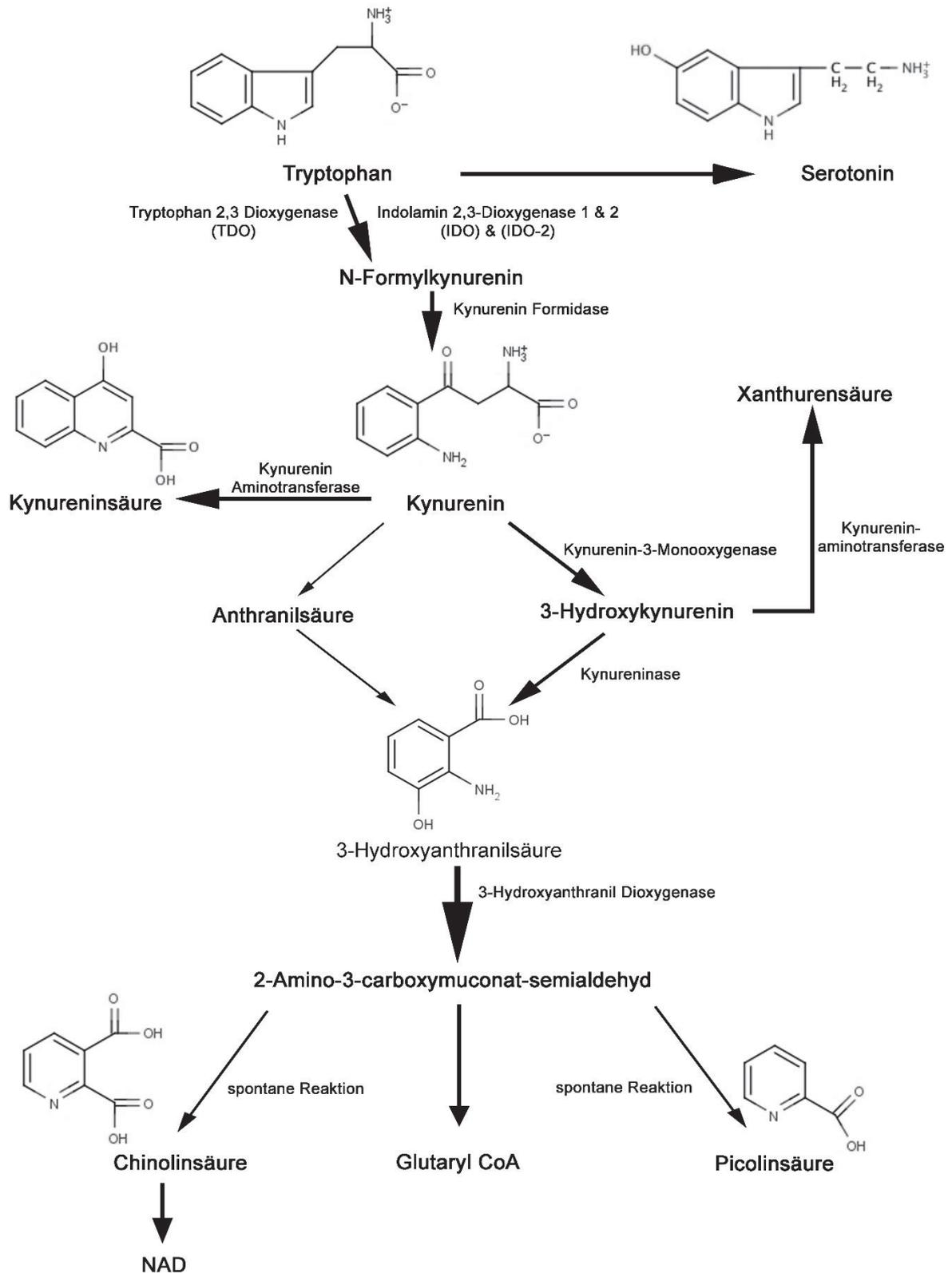
Eine weitere wichtige Rolle spielt Tryptophan im Transaminasen-Stoffwechsel, wo die Aminogruppe des Tryptophans auf  $\alpha$ -Ketoglutarat durch das Enzym Tryptophan Transaminase übertragen wird. Dabei entstehen (Indol-3-yl) Pyruvat und Glutamat. Als Co-Faktor bei dieser Reaktion fungiert Pyridoxal-Phosphat, auch als Vitamin B6 bekannt.

Der größte Teil des im Körper befindlichen Tryptophans, etwa 90%, wird über den Kynurenin-Stoffwechsel abgebaut. Als erstes erfolgt dabei die Oxygenierung von Tryptophan zu N-Formylkynurenin. Dieser geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird durch die Enzyme Indolamin 2,3-Dioxygenase-1 (IDO), die Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) oder die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) vermittelt. Diese Enzyme werden in unterschiedlichen Geweben und Organen exprimiert und in Kapitel 1.2. näher beschrieben. Das entstandene N-Formylkynurenin wird anschließend durch die Kynurenin Formidase unter Abspaltung von Ameisensäure zu Kynurenin umgewandelt (Abb. 1.2).



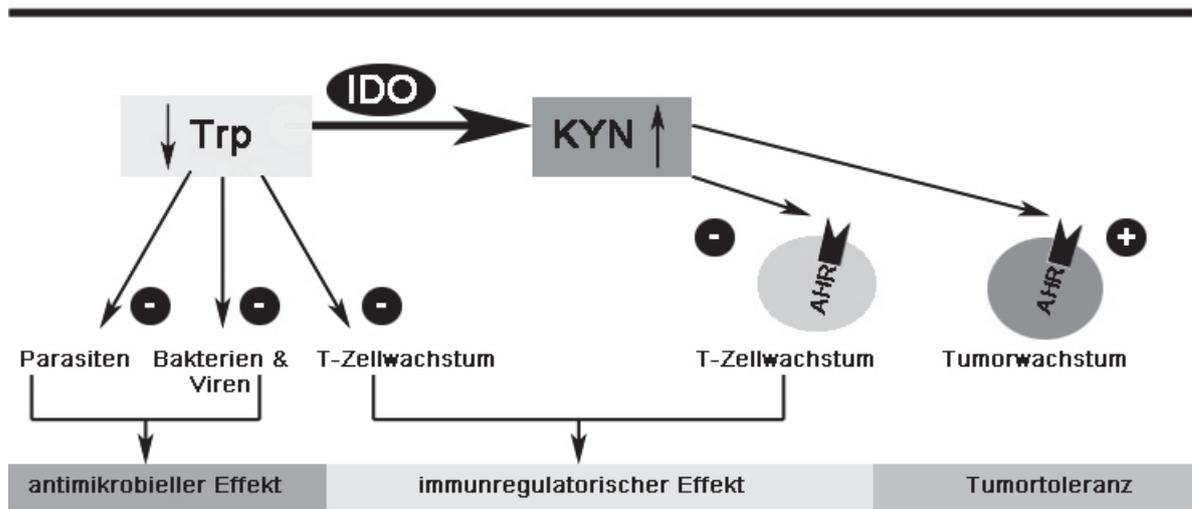
**Abb. 1.2: Abbau von Tryptophan zu Kynurenin.** Zu Beginn des Abbaus von Tryptophan erfolgt der geschwindigkeitsbestimmende Schritt durch die Enzyme Indolamin 2,3-Dioxygenase-1 (IDO), die Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) oder durch die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO). Hierbei wird unter Sauerstoffverbrauch das Indolringsystem des Tryptophan aufgespalten. Anschließend erfolgt durch das Enzym Kynurenin Formidase die Abspaltung von Ameisensäure. Das Reaktionsprodukt Kynurenin wird nun im Kynurenin-Stoffwechsel weiter abgebaut. Die dann entstandenen verschiedenen Abbauprodukte haben unterschiedliche Eigenschaften auf verschiedene Zellen im Organismus (siehe Kynurenin-Stoffwechsel).

Die so entstandene nicht proteinogene Aminosäure Kynurenin steht am Anfang einer Reihe weiterer Stoffwechselschritte (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Tryptophan- und Kynureninstoffwechsel.** Zur besseren Übersicht sind nicht alle an den Reaktionen beteiligten Enzyme und Zwischenprodukte aufgezeigt (Modifikation nach Soliman *et al.*, 2010).

Kynurenin wird durch verschiedene Enzyme wie die Kynurenin-Aminotransferase zu Kynureninsäure oder durch die Enzyme Kynurenin-3-Monooxygenase und Kynureninase zu Chinolinsäure abgebaut. Diese Abbauprodukte haben einen großen Einfluss auf neuroregulatorische Funktionen. So ist Chinolinsäure beispielsweise an unterschiedlichen neurologischen Erkrankungen wie Chorea Huntington, der Alzheimer Erkrankung oder Epilepsie beteiligt. Durch seine Fähigkeit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptoren im Gehirn zu aktivieren und übermäßig zu stimulieren, wirkt es neurotoxisch auf die Zellen und es kann zum Zelltod führen (Stone, Forrest, *et al.*, 2012; Pérez-De La Cruz *et al.*, 2012). Ebenfalls neurotoxisch wirkt 3-Hydroxykynurenin (3-HK), das durch die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies die Apoptose einleiten kann. Im Gegensatz zu Chinolinsäure und 3-Hydroxykynurenin vermittelt Kynureninsäure durch die Blockierung von NMDA-Rezeptoren und dem  $\alpha 7$ -nikotinergen Cholinrezeptor ( $\alpha 7$ NR) antikonvulsive und neuroprotektive Funktionen (Stone, Stoy, *et al.*, 2012). Kynurenin und seine Abbauprodukte haben allerdings nicht nur Effekte auf das Zentralnervensystem, sondern sind auch an der Regulation des Immunsystems beteiligt. So können 3-Hydroxyanthranilsäure und Chinolinsäure durch Aktivierung der Caspase 8 und Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien die Apoptose von TH-1 Zellen bewirken (Fallarino *et al.*, 2002). Die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) durch Kynurenin beeinflusst das T-Zell- und Tumorstadium. Der aktivierte Rezeptor transloziert in den Zellkern und aktiviert die Transkription von Zielgenen, die durch das *Dioxin-Responsive-Element* (DRE) reguliert werden. Dadurch kommt es bei T-Zellen zur Wachstumshemmung und Toleranzentwicklung. Bei Tumorzellen führt die Rezeptoraktivierung zu einer erhöhten Resistenz, Mobilität und Metastasierungsrate (Platten *et al.*, 2012; Stone, Stoy, *et al.*, 2012) (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Effekte nach Tryptophanabbau und Kynureninproduktion.** Durch den IDO vermittelten Abbau von Tryptophan (Trp) zu Kynurenin (Kyn) kommt es zur Hemmung von Bakterien-, Viren-, Parasiten- und T-Zellwachstum. Aufgrund der verminderten Immunantwort und durch die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AHR) durch Kynurenin kommt es zu einer erhöhten Tumoresistenz und Zellmobilität.

Manche der Abbauprodukte des Kynureninstoffwechsels werden am Ende teilweise zu Niacin umgewandelt. Das aus Chinolinsäure entstandene Niacin, auch bekannt als Vitamin B3, spielt dabei als Coenzym bei einer Vielzahl von Redoxreaktionen und Wasserübertragungen eine große Rolle (Soliman *et al.*, 2010).

Auch Tumorzellen exprimieren IDO und es folgt der IDO vermittelte Abbau von Tryptophan zu Kynurenin. Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese unterschiedlicher Zellen, denn es kommt durch den Tryptophanmangel zur Akkumulation von unbeladener tRNA, welche dann zur Aktivierung der GCN2 Kinase führt (Munn *et al.*, 2005). Dadurch erfolgt die Phosphorylierung des eIF-2 $\alpha$  Faktors, was zur Aktivitätsminderung führt und viele Translationen unterbindet. Folglich kommt es teilweise zur Überproduktion von anderen Stoffen, wie LIP, einer Isoform des immunregulatorischen Transkriptionsfaktors NF-IL6 (Hu *et al.*, 2000). Infolgedessen ist die Translation von IL-6 und anderen immunregulatorischen Zytokinen aktiviert. Die Folgen der Aktivierung dieses Signalweges sind unterschiedlich, doch allgemein gesprochen kommt es zur Unterstützung des Tumorstammes und der Metastasierung (Smith *et al.*, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass über den GCN2 Signalweg die Reifung und Entwicklung von Immunzellen beeinflusst wird (Platten *et al.*, 2012).

## 1.2 Charakterisierung der Tryptophan oxidierenden Enzyme

Die Enzyme Indolamin 2,3-Dioxygenase-1 (IDO), Indolamin 2,3-Dioxygenase-2 (IDO-2) und die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) katalysieren den limitierenden und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau von Tryptophan zu N-Formylkynurenin. Dabei dient molekularer Sauerstoff als Substrat für die oxidative Spaltung des Indolringsystems vom Tryptophan. Die Enzyme gehören daher in die Klasse der Dioxygenasen und werden im folgenden Kapitel näher charakterisiert und beschrieben.

### 1.2.1 Indolamin 2,3-Dioxygenase-1 (IDO)

Die IDO wurde erstmals 1967 im Darm von Kaninchen entdeckt (Yamamoto *et al.*, 1967). 1978 wurde sie von Shimizu und Mitarbeitern isoliert und näher beschrieben (Shimizu *et al.*, 1978). Das Enzym codierende Gen befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 8 (8p12-p11) (Burkin *et al.*, 1993) und besteht aus 10 Exons, mit einem offenen Leseraster von 1209 Nukleotiden. Es setzt sich aus 403 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa. Die IDO gehört wie Myoglobin in die Gruppe der Häm-bindenden Proteine und besteht aus einer großen und kleinen Untereinheit, die über eine Schleife miteinander verbunden sind. Das Häm wird dabei von den beiden Untereinheiten umgeben (Sugimoto *et al.*, 2006).

Die IDO wird in vielen Organen des menschlichen Körpers exprimiert. Dabei findet sich die höchste Aktivität in der Plazenta, der Lunge und dem Intestinum (Takikawa, 2005). Die Bildung der IDO wird von unterschiedlichen Mediatoren, wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren, CTLA4 membranständigen Rezeptoren induziert. Aber auch Gewebshormone wie Prostaglandine können eine Expression hervorrufen. Den größten Einfluss auf die Expression der IDO hat allerdings IFN- $\gamma$  durch die Aktivierung des JAK-STAT Signalweges (Darnell *et al.*, 1994). Dabei bindet IFN- $\gamma$  an seinen Rezeptor und durch Anlagerung eines weiteren IFN- $\gamma$  Rezeptors kommt es zur Dimerisierung. Durch eine anschließende Konformationsänderung am Rezeptor kommt es zur Autophosphorylierung der Janus-Kinasen (JAKs). Dies führt zur Phosphorylierung des Rezeptors selbst und zur Bindung des Transkriptionsfaktors STAT1. Dieser kann nun durch die Janus-Kinasen phosphoryliert und aktiviert

werden. Die aktivierten Transkriptionsfaktoren lagern sich anschließend zu Homodimeren zusammen und translozieren in den Zellkern wo sie an spezifische DNA-Abschnitte, den GAS (gamma-aktivierte Sequenzen) binden. Dadurch kommt es zur Transkription der IDO, welche anschließend noch verstärkt wird. Dies erfolgt durch zusätzliche Expression von IRF-1 (*interferon regulated elements*), welches dann an ISRE Sequenzen (*IFN-stimulated response element*) in der IDO Promotorregion binden und somit die IDO Expression verstärken (Schroder *et al.*, 2004). Eine weitere Verstärkung der Expression wird durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  ausgelöst, die auch die Aktivität der IDO Promotorregion erhöhen (Babcock *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu führen die Mediatoren IL-4 und IL-13 zur Hemmung der IFN- $\gamma$  stimulierten IDO mRNA Expression, beispielsweise während einer parasitären Infektion mit *Toxoplasma gondii*. Daraus resultiert eine Gegenregulation (negativer *Feedback*) der IFN- $\gamma$  stimulierten antiparasitären Wirkung (Chaves *et al.*, 2001).

### Funktion der IDO

Die IDO wandelt die essentielle Aminosäure Tryptophan in Kynurenin um und beeinflusst damit den Tryptophanhaushalt. Dies spielt eine große Rolle in der angeborenen Immunabwehr. Durch einen Tryptophanmangel kommt es zur Wachstumshemmung unterschiedlicher Mikroorganismen. So konnte Pfefferkorn 1984 zeigen, dass die IFN- $\gamma$ -stimulierte IDO Expression in humanen Fibroblasten zur Hemmung des Wachstums von *Toxoplasma gondii* führt (Pfefferkorn *et al.*, 1984). Die Hemmung wurde auf die Tryptophandepletion zurückgeführt, weil nach Tryptophanzugabe eine Aufhebung des Effektes zu erkennen war. Weitere Untersuchungen in den letzten Jahren zeigten, dass auch andere Tryptophan auxotrophe Mikroorganismen durch die IFN- $\gamma$  stimulierte IDO Expression gehemmt werden können. So wurde dieser Effekt auch für Bakterien wie z.B. *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001); Enterokokken (MacKenzie *et al.*, 1999) oder Chlamydien (Pantoja *et al.*, 2000) beschrieben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch das Wachstum von Viren wie Herpes simplex (Adams *et al.*, 2004), Cytomegalievirus (Bodaghi *et al.*, 1999) oder Dengue Virus (Becerra *et al.*, 2009) durch eine IDO Expression gehemmt werden konnte.

Die IDO vermittelte Tryptophandepletion hat allerdings nicht nur Auswirkungen auf das Wachstum von Mikroorganismen sondern auch auf das Immunsystem. 2001 konnte festgestellt werden, dass die IDO Aktivität den Fetus schützt. Durch die Tryptophandepletion wird die T-Zell-Differenzierung und somit eine Immunantwort gegen den Fetus in der Plazenta verhindert (Mellor *et al.*, 2001). Munn und Mitarbeiter zeigten, dass durch den IDO spezifischen Inhibitor 1-DL-Methyltryptophan eine Abstoßung von allogenen, aber nicht von syngeneten Feten trächtiger Mäuse bewirkt wird (Munn *et al.*, 1998). Dies ließ darauf schließen, dass der IDO vermittelte Tryptophanabbau in der Plazenta eine zentrale Stellung in der maternalen T-Zellregulation einnimmt.

Munn und Mitarbeiter konnten 1999 zeigen, dass das Wachstum von T-Zellen in Anwesenheit von IDO exprimierenden Makrophagen gehemmt werden konnte (Munn *et al.*, 1999). 5 Jahre später wurde in weiteren Experimenten herausgefunden, dass bestimmte Dendritische, IDO positive Zellen ebenfalls das Wachstum von T-Zellen beeinflussen können (Mellor *et al.*, 2004). Zusätzliche Untersuchungen zeigten, dass nicht nur der IDO-vermittelte Tryptophanmangel einerseits, sondern auch die Kynureninproduktion und dessen Abbauprodukte zur Wachstumshemmung führen (Fallarino *et al.*, 2002; Terness *et al.*, 2002). Diese IDO vermittelten regulatorischen Effekte spielen eine große Rolle bei der Immunantwort gegenüber Mikroorganismen.

Eine weitere wichtige Rolle spielt die IDO bei der Ausbildung einer Tumortoleranz. So konnte beschrieben werden, dass in Tumor drainierenden Lymphknoten IDO exprimierende dendritische Zellen die Bildung von regulatorischen T-Zellen fördern. Diese interagieren dann wiederum mit CTL4 Rezeptoren auf dendritischen Zellen und es erfolgt eine erhöhte IDO Expression. Daraufhin bewirkt die Tryptophandepletion eine Hemmung von spezifischen Tumor-Effektor-T-Zellen. Andererseits sind manche Tumoren in der Lage, IDO konstant oder durch inflammatorische Signale stimuliert zu exprimieren. Diese Expression führt ebenfalls zur Hemmung spezifischer Tumor-Effektor-T-Zellen und zur Bildung von regulatorischen T-Zellen (Munn *et al.*, 2007).

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

Ein weiteres Tryptophan abbauendes Enzym, die IDO-2, wurde erstmals 2007 beschrieben (Ball *et al.*, 2007). Dabei handelt es sich um ein der IDO ähnliches Protein. Untersuchungen ergaben, dass das Genom des „neuen“ Proteins genau wie das der IDO ebenfalls beim Menschen auf dem Chromosom 8 verschlüsselt ist. Anschließende Strukturanalysen zeigten, dass die Aminosäuresequenzen der IDO und IDO-2 bei Mäusen und Menschen zu 43% identisch sind (Ball *et al.*, 2009).

Die murine IDO-2 wird vor allem in der Niere, der Leber, dem Hoden und dem Nebenhoden exprimiert. Im Gegensatz dazu kommt die humane IDO-2 vor allem in der Plazenta, dem Uterus und dem Gehirn vor (Ball *et al.*, 2009). Auch konnte IDO-2 mRNA in Magen-, Dickdarm- und Nierentumoren nachgewiesen werden (Löb *et al.*, 2009). Dabei sind die genaue Funktion und der Mechanismus der Expression noch unbekannt. Eine Funktion der IDO-2 bei der Infektionsabwehr wird diskutiert. So wird während einer Malariainfektion bei Mäusen die IDO Expression nach IFN- $\gamma$  Stimulation (Hansen *et al.*, 2004) hochreguliert, allerdings bleibt die IDO-2 Expression unbeeinflusst oder wird sogar gehemmt (Ball *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass die IDO-2 mRNA im Gehirn von Mäusen, welche mit *Toxoplasma gondii* befallen waren, verstärkt exprimiert wurde (Divanovic *et al.*, 2012). Interessanterweise kam es in einigen Tumorzelllinien nach IFN- $\gamma$  Stimulation zu einer erhöhten Expression von IDO-2 mRNA (Löb *et al.*, 2009; Witkiewicz *et al.*, 2009). Die genaue biologische Funktion der IDO-2 ist bis heute noch unbekannt. Allerdings lässt ihr Vorkommen in der Niere, der Plazenta und in dendritischen Zellen darauf schließen, dass sie Einfluss auf die Nierenfunktion, die Fruchtbarkeit sowie das Immunsystem nimmt (Ball *et al.*, 2009). Diese unterschiedlichen Beobachtungen unterstreichen die Komplexität der Regulation der IDO-2 und ihre Rolle im Stoffwechsel der Zellen und Organismen (Fatokun *et al.*, 2013). Allerdings ist die enzymatische Wirkung der IDO-2 im Vergleich zur IDO um ein Wesentliches geringer.

### 1.2.3 Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO)

Ein weiteres Tryptophan abbauendes Enzym ist die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), die erstmals in den 1930ern beschrieben wurde. Sie konnte sowohl in

Eukaryoten als auch in Prokaryoten nachgewiesen werden (Kotake *et al.*, 1936). In Säugetieren kommt die TDO vor allem in der Leber, aber auch im Gehirn oder dem Nebenhoden vor (Haber *et al.*, 1993; Ishiguro *et al.*, 1993). Das TDO Gen ist beim Menschen auf dem 4. Chromosom (4q31.3) kodiert (Comings *et al.*, 1991). Strukturanalysen ergaben, dass die TDO, ebenso wie die IDO und IDO-2 zur Gruppe der Häm-bindenden Proteine zählt. Sie ist ein Homotetramer mit einem Molekulargewicht von etwa 190 kDa in Eukaryonten und etwa 120 kDa in Prokaryonten (Rafice *et al.*, 2009). Ein Strukturvergleich der IDO und TDO ergibt eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von etwa 10%. Dabei ähnelt sich das aktive Zentrum der Enzyme sehr stark, was darauf schließen lässt, dass die Bindung des Tryptophans auf ähnliche Weise vonstatten geht (Zhang *et al.*, 2007). Allerdings gibt es Unterschiede in der katalytischen Aktivität der Enzyme. So arbeitet die TDO, im Gegensatz zur IDO und IDO-2, relativ substratspezifisch und ist ausschließlich in der Lage, stereospezifisch L-Tryptophan zu N-Formylkynurenin abzubauen (Forouhar *et al.*, 2007). Auch die Expression der TDO erfolgt durch andere Stimuli im Vergleich zur IDO. So beeinflussen Hormone, wie Epinephrin oder Cortison die TDO-Expression (Knox *et al.*, 1955). Ein weiterer Regulationsmechanismus scheint die Tatsache zu sein, dass die TDO in der Leber eine hohe *Turn-over* Rate besitzt und durch Anwesenheit von L-Tryptophan induziert wird (Schimke *et al.*, 1965). Da die TDO in Säugern fast ausschließlich in der Leber vorkommt, war davon auszugehen, dass sie hauptsächlich zur Aufrechterhaltung der Tryptophan Homöostase nach Tryptophan Zufuhr dient. Allerdings konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die TDO, ähnlich der IDO, antimikrobielle als auch immunregulatorische Effekte besitzt. So wurde gezeigt, dass HeLa Zellen, die eine rekombinante TDO exprimieren, in der Lage waren, das Wachstum von Bakterien (*Staphylococcus aureus*), Parasiten (*Toxoplasma gondii*) oder Viren (*Herpes simplex*) zu hemmen (Schmidt *et al.*, 2009). TDO exprimierende Zellen waren ebenfalls in der Lage, T-Zell-Wachstum und IFN- $\gamma$  Produktion zu hemmen (Schmidt *et al.*, 2009).

#### **1.2.4 Therapeutische Beeinflussung der IDO und IDO-2 Aktivität durch 1-Methyltryptophan**

1-Methyltryptophan, ein synthetisches Tryptophan-Analogon, wurde zu Beginn der 90er Jahre als Inhibitor der IDO identifiziert und erforscht (Cady & Sono, 1991).

Dabei wurde es als 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT), 1-D-Methyltryptophan (1-D-MT) oder als Racemat 1-DL-Methyltryptophan (1-MT) eingesetzt. Seit dieser Zeit haben viele Arbeitsgruppen die hemmende Wirkung auf die Enzymfunktion von 1-MT untersucht und bei unterschiedlichen Lebewesen nachweisen können. Allerdings zeigte sich in den letzten Jahren, dass die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Wirkungen aufweisen. So wurde in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass 1-L-MT die IDO Aktivität von *humanen* dendritischen Zellen besser hemmt als 1-D-MT (Lob *et al.*, 2008). 2009 konnte gezeigt werden, dass 1-L-MT aber nicht 1-D-MT in der Lage war, den IDO-vermittelten T-Zellarrest in verschiedenen humanen *in vitro* Experimenten mit unterschiedlichen Zelllinien und Krebszellen aufzuheben (Qian *et al.*, 2009). Im gleichen Jahr fanden Löb und Mitarbeiter heraus, dass die IDO Aktivität in Proteinisolaten von verschiedenen humanen Darmkrebszellen durch 1-L-MT und nicht durch 1-D-MT gehemmt wird (Löb *et al.*, 2009). Dies zeigt, dass 1-L-MT im Vergleich zu 1-D-MT ein echter IDO Inhibitor ist.

Andere Forschungsgruppen postulierten, dass 1-D-MT viel effektiver eine IDO vermittelte Suppression von T-Zellen *in vivo* verhindert als 1-L-MT (Hou *et al.*, 2007). Um diese Diskrepanz zu erklären, wurde oftmals die Rolle der IDO-2 als ein weiterer Einflussfaktor bei *in vivo* Experimenten diskutiert, da dieses Enzym ebenfalls von manchen Tumoren exprimiert wird und insbesondere durch 1-D-MT in seiner enzymatischen Aktivität gehemmt werden kann (Löb *et al.*, 2009; Metz *et al.*, 2007). Allerdings wurde diese Beobachtung 2010 durch andere Arbeitsgruppen in Frage gestellt. So wurde gezeigt, dass 1-L-MT die enzymatische Aktivität der IDO-2 in verschiedenen Individuen (Maus, Opossum, Schnabeltier, Huhn, Fisch) besser hemmt als 1-D-MT (Yuasa *et al.*, 2010). Interessanterweise zeigte die Arbeitsgruppe um Opitz, dass 1-D-MT paradoxerweise in der Lage zu sein scheint die Expression von IDO mRNA in Tumorzellen zu erhöhen und somit eine Steigerung der Kynureninproduktion erreicht wird (Opitz *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse lassen ganz neue Interpretationsmöglichkeiten der IDO und IDO-2 Funktion im Bereich der Tumorabwehr und Immunregulation zu. So könnte die bessere Wirksamkeit von 1-D-MT in *in vivo* Experimenten auf der Tatsache beruhen, dass der Tryptophangehalt durch die verstärkte IDO Expression, nach 1-D-MT Supplementation, in den Tumorzellen so erniedrigt wird, dass sowohl Immunzellen als auch Tumorzellen durch den Tryptophanmangel in ihrem Wachstum gehemmt werden. Auch könnte die damit

verbundene erhöhte Kynureninkonzentration toxisch auf T-Zellen wirken und eine Immunantwort gegen Tumorzellen unterbinden.

Allerdings konnte die biologische Wirksamkeit von 1-L-MT in Kombination mit anderen Chemotherapeutika in vielen Untersuchungen verifiziert werden. So ist die Wirksamkeit von 1-L-MT in *in vivo* Experimenten in Kombination mit APO866, dem Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase Inhibitor, verstärkt, um Magen- oder Blasen-tumore im Mausmodell zu bekämpfen (Yang *et al.*, 2010). Auch die Kombination von 1-L-MT mit Paclitaxel konnte eine signifikante Überlebenszeitverlängerung, bei der Therapie des metastasierten Ovarialkarzinoms in Mäusen hervorrufen (Inaba *et al.*, 2009).

### **1.3. Infektionsmodelle, verwendete Pathogene**

#### **1.3.1 Bakterium *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)**

*Staphylococcus aureus* (griech. Staphyle, die Traube; griech. Coccus beeren-, kernartig; lat. aureus golden, gelb) ist ein gram-positives, kugelförmiges Bakterium. Beschrieben wurde es erstmals von Billroth einem deutschen Chirurgen Anfang der 1870er Jahre (Billroth, 1874). Es wird in die Gruppe der *Micrococcaceae* eingeordnet und liegt meist, durch seine Unbeweglichkeit, in haufenförmiger Konfiguration vor. Die Bakterien haben einen Durchmesser von etwa 0,5-1,5 µm und kommen ubiquitär vor (Hof, Dörris, 2004). Beim Menschen befinden sie sich zumeist auf der Haut und in den Atemwegen und verursachen normalerweise keine Infektion. Allerdings kann es bei Individuen mit einer Schwächung des Immunsystems zu einer Ausbreitung der Erreger und je nach Befall, zu unterschiedlichen Erkrankungen kommen. So führt eine übermäßige Ausbreitung auf der Haut zu Entzündungen der Hautanhangsgebilde (Talg- und Schweißdrüsen), was sich in der Ausbildung von Furunkeln, Karbunkeln oder Abszessen zeigen kann (Hof, Dörris, 2004). Bei Infektionen der oberen Atemwege oder der inneren Organe können schwere Pneumonien, Hirnabszesse, Endokarditiden oder Septikämien entstehen (Starnes *et al.*, 2008; Gillet *et al.*, 2001; Gillet *et al.*, 2002). Das ubiquitäre Vorkommen von *S. aureus* und seine hohe Umweltresistenz gegenüber Austrocknung, Sonnenlicht und Hitze sind wichtige Attribute, die ihn zu einem wichtigen und häufigen Krankheitserreger im klinischen Alltag machen. Seine verschiedenen Virulenzfaktoren beeinflussen dabei sowohl die

Abwehr des Betroffenen, als auch die Wahl der Therapie. Zu seinen Virulenzfaktoren zählen das Protein A, welches in der Lage ist, Antikörper des Menschen am Fc-Teil zu binden und somit der Opsonisierung und Phagozytose zu entgehen (Hof, Dörris, 2004). Weitere Virulenzfaktoren sind eine Kapsel und intrazelluläres Adhäsins, das aus linearem Poly-N-Acetylglucosamin besteht. Diese Faktoren stellen die Grundlage für Biofilme dar und können somit das ungestörte Wachstum von Bakterienkolonien innerhalb dieser Schleimschicht begünstigen (Hof, Dörris, 2004). Neben den Virulenzfaktoren besitzen die Bakterien noch andere Substanzen, wie Enzyme und Toxine. Die verschiedenen Enzyme ermöglichen es dem Erreger, sich im Gewebe auszubreiten zum Beispiel mit der Hyaluronidase, welche die extrazelluläre Matrix auflöst. Durch den Synergismus der Koagulase und des Clumping Faktors, die eine Ausfällung von Fibrin und die Bildung einer Fibrin-Abszesskapsel ermöglicht, wird durch die Staphylokinase andererseits das gebildete Fibrin wieder abgebaut und führt so zu einer ungestörten weiteren Ausbreitung des Erregers (Bokarewa *et al.*, 2006). Andere Enzyme wie die Hämolyse ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ ) und Leukozidine dienen der direkten Abwehr gegen Immunzellen. Leukozidin stört dabei die Funktion von Makrophagen und Leukozyten (Nishiyama *et al.*, 2006), wohingegen die Hämolyse eine Zerstörung von Erythrozyten und Parenchymzellen hervorrufen. Andere Pathogene stellen Toxine dar, zu denen das Exfoliatintoxin (5 % der *S. aureus* Stämme), das Enterotoxin (5 % der *S. aureus* Stämme) (Argudín *et al.*, 2010) und das Toxic shock syndrome toxin (TSST) (1 % der *S. aureus* Stämme) (Acha-Orbea, 1993) zählen. Das Exfoliatintoxin kann zur Epidermolyse führen, wohingegen es durch das Enterotoxin zu Lebensmittelvergiftungen kommen kann. In die Gruppe der Superantigene wird das TSST eingereiht, welches zu einer unkontrollierten Aktivierung von Lymphozyten, unabhängig von ihrer Antigenspezifität, führt. Dies bewirkt eine massiven Ausschüttung von Zytokinen und es kann zum klinischen Bild des toxischen Schocksyndroms kommen (Hof, Dörris, 2004). Eine weitere Besonderheit und von großem klinischem Interesse ist die Antibiotikaresistenz mancher *S. aureus* Stämme, wie z.B. dem sog. MRSA (Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*). Durch eine Mutation im Penicillin-Bindeprotein kommt es zu einer geringeren Affinität der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und dem Methicillin. Dieser Keim stellt somit ein besonderes Risiko im klinischen Alltag und für nosokomiale Infektionen dar. Die Behandlung dieses multiresistenten Keims verlangt die Verabreichung von Glykopeptid-Antibiotika (wie Vancomycin) oder Linezolid. Ende der 1990er Jahre wurden Fälle von

Infektionen mit Vancomycinresistenten Staphylokokken beschrieben (Hiramatsu, 1998). Diese Entwicklung hat eine sehr hohe klinische Brisanz, da Vancomycin ein sehr wichtiges Antibiotikum gegen MRSA darstellt.

Im Gegenzug zu den Antibiotika stehen dem Organismus zur Bekämpfung dieses Erregers unterschiedliche Strategien zur Verfügung. Eine dieser Strategien ist die indirekte Hemmung des Wachstums der Bakterien durch den Abbau von Tryptophan mit Hilfe der IFN- $\gamma$  stimulierbarenIDO. Die Aktivierung von zum Beispiel Lungen-Parenchymzellen mit IFN- $\gamma$  führt durch dieIDO vermittelte Verringerung der Tryptophankonzentration zu einer Hemmung des Wachstums des Tryptophan-auxotrophen *S. aureus* (Heseler *et al.*, 2008). Die Beeinflussung desIDO vermittelten Tryptophanabbaus durch 1-L-MT ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit.

### **1.3.2 Parasit *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) RH Stamm**

*Toxoplasma gondii* (altgriech. Toxo, Bogen und altgriech. plasma Gebilde) ist ein bogenförmiger obligat intrazellulär lebender Parasit. Er gehört taxonomisch zum Stamm der Apikomplexa, der Unterklasse der *Coccidia*, aus der Ordnung der *Eimeriida* und ist nahe verwandt mit dem Plasmodium, dem Erreger der Malaria (Levine, 1980). Der Entwicklungszyklus des Parasiten beinhaltet eine sexuelle und asexuelle Vermehrung (Dubey, 2009). Die sexuelle Vermehrung findet im Hauptwirt, in den Darmepithelzellen von Katzen, statt. Anschließend werden Oozysten ausgeschieden. Diese gelangen anschließend beispielsweise über mit Katzenkot verunreinigter Nahrung (Herbivorismus) (Teutsch *et al.*, 1979; Bowie *et al.*, 1997; Cook *et al.*, 2000) in den Nebenvirt (zum Beispiel Mensch, andere Säugetiere oder Vögel). Hier werden im Rahmen der Sporogonie aus einer Oozyste 2 Sporozysten gebildet, die dann zu insgesamt 8 Sporozoiten heranreifen. Die reifen Sporozoiten sind nun in der Lage, die Darmwand des Wirtes zu penetrieren und das retikuloendotheliale System zu befallen. Anschließend entstehen durch Endodyogenie aus einer Mutterzelle 2 Tochterzellen. Dieser Vorgang wiederholt sich solange bis die Wirtszelle ausgefüllt ist und aufplatzt. Der Vermehrungszyklus der Parasiten läuft nun sehr schnell ab. Sie breiten sich als Tachyzoiten über das Blut aus und infizieren weitere Gewebe und Organe (Hof, Dörris, 2004). Wichtige Prädilektionsstellen im menschlichen Körper stellen dabei das Gehirn, die Augen, die Lunge, die Plazenta und die Leber dar.

Allerdings wird bei immunkompetenten Menschen die Ausbreitung eingedämmt. Dem Körper stehen zur Bekämpfung des Erregers unterschiedliche Strategien zur Verfügung. So konnte gezeigt werden, dass eine IFN- $\gamma$  stimulierteIDO Aktivierung zu einer Tryptophandepletion führt und somit das Wachstum des Parasiten eingedämmt wird (Filisetti & Candolfi, 2004). Es erfolgt eine Umwandlung der Parasiten in Bradyzoiten und Gewebszysten. Erst bei Schwächung des Immunsystems werden Parasiten reaktiviert, was zum klinischen Bild einer Enzephalitis, Pneumonie oder Myokarditis führt (Kayser *et al.*, 1993). Bei der konnatalen Toxoplasmose tritt die Erstinfektion während der Schwangerschaft auf. Hier können vor allem im ersten Trimenon Aborte auftreten (Server *et al.*, 1988). Kommt es im zweiten oder dritten Trimenon zu einer Infektion, so kann dies Ursache für schwere Erkrankungen des Fetus sein. Dabei ist die Ausbildung von Fetopathien möglich, die mit Pneumonie, Myokarditis, Nephritis, Hepatitis oder hämorrhagischer Gastroenteritis einhergehen können. Sollte bereits eine Organmanifestation erfolgt sein, so ist eine Enzephalitis mit Ausbildung eines Hydrozephalus mit zerebralen Verkalkungen sowie Gehirnatrophie und geistiger Retardierung möglich (Hof, Dörris, 2004). Zur Prävention einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* wird empfohlen, dass Schwangere und Immunsupprimierte auf den Verzehr von rohem oder unvollständig gegartem Fleisch verzichten. Sollte doch eine Toxoplasmose vorliegen, erfolgt die Behandlung mit Ausnahme in der Frühschwangerschaft (bis 16. Woche), mit einer Kombinationstherapie aus Pyrimethamin und Sulfadiazin (Gross, 2004).

Die Inzidenz beim Menschen, sich mit *Toxoplasma gondii* zu infizieren, liegt bei 1 % pro Lebensjahr. In Deutschland liegt die Seroprävalenz von Toxoplasma-Antikörpern bei schwangeren Frauen bei 26 - 54 %. Allerdings liegen europaweit geographische Unterschiede vor. So ist die Prävalenz in Westeuropa fast doppelt so hoch wie in Mitteleuropa (90 % zu 54 %). Auch ein Unterschied in Deutschland ist zu erkennen, so sind die Seroprävalenzen sowohl bei Männern als auch bei Frauen im Osten Deutschlands deutlich höher als im Westen (Wilking *et al.* 2016.).

#### 1.4. Zielsetzung der eigenen Arbeit

Tryptophan, eine aromatische Aminosäure, steht im Mittelpunkt einer Reihe von Stoffwechselprozessen wie zum Beispiel der Proteinbiosynthese oder der Bildung von Hormonen wie Serotonin oder Melatonin. Sie gehört für den Menschen und andere Organismen zu den essentiellen Aminosäuren und muss regelmäßig aufgenommen werden. Die Regulation des Tryptophanhaushaltes stellt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel vieler Organismen dar. Der größte Teil des aufgenommenen Tryptophans wird über den Kynureninstoffwechsel abgebaut. Hierbei spielt vor allem das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) eine herausragende Rolle, da es den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Abbau des Tryptophans zu N-Formylkynurenin katalysiert. Die daraus folgende Tryptophandepletion hat nicht nur einen immunregulatorischen oder antimikrobiellen Effekt, sondern beeinflusst auch das Wachstum von Tumorzellen. Diese Eigenschaften können durch erneute Tryptophanzugabe aufgehoben werden. Allerdings wird nicht nur der Tryptophanmangel für die verschiedenen Eigenschaften verantwortlich gemacht, sondern auch die Abbauprodukte des Kynureninstoffwechsels selbst besitzen beispielsweise immunregulatorische Eigenschaften. So führen hohe Konzentrationen von Kynurenin, 3 - Hydroxyanthranilsäure oder Chinolinsäure beispielsweise zur Apoptose von T-Zellen.

Die IDO vermittelten Effekte können nicht nur durch Tryptophan antagonisiert werden, sondern auch durch Inhibitoren. Hier spielt vor allem der spezifische Inhibitor 1-Methyltryptophan in seinen beiden Isomerformen eine zentrale Rolle in der Forschung. So stellte sich in *in vitro* Experimenten 1-L-Methyltryptophan als sehr potenter und spezifischer Inhibitor der IDO heraus. Allerdings konnte diese Eigenschaft nicht in *in vivo* Experimenten beobachtet werden. Hier zeigte sich 1-D-Methyltryptophan als ein potenterer Inhibitor der IDO spezifischen Effekte. Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, dass 1-L-Methyltryptophan ebenso wie Tryptophan als proteinogene Aminosäure für verschiedene Zellen fungieren könnte und somit nicht nur die Enzymaktivität der IDO gehemmt wird, sondern gleichzeitig das Wachstum der Zellen ermöglicht wird.

Um diese Hypothese zu analysieren wurde im ersten Teil dieser Arbeit in *in vitro* Experimenten untersucht, ob die Wachstumshemmung von Mikroorganismen, wie *Staphylococcus aureus* oder *Toxoplasma gondii*, nach einem IDO induzierten Tryptophanabbau, nicht nur durch Tryptophanzugabe, sondern auch durch 1-L-Methyl-

tryptophanzugabe aufgehoben werden kann. Im nächsten Schritt wurde der Einfluss von 1-L-Methyltryptophan auf das Wachstum von humanen T-Zellen als auch Glioblastomzellen in Tryptophan-freiem Medium untersucht.

Um herauszufinden ob 1-L-Methyltryptophan als proteinogene Aminosäure fungieren könnte, wurde im zweiten Teil der Arbeit mit Hilfe der Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie-Kopplung ein möglicher Einbau von 1-L-Methyltryptophan in die Proteine von 86HG39 Glioblastomzellen und *Staphylococcus aureus* untersucht. Anschließend wurde mit Hilfe der HPLC und MALDI-MS Analyse die genaue Zusammensetzung von handelsüblichem 1-L-Methyltryptophan untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellen und Erreger

##### Zellen

Zelllinie	Verwendung	Quelle
HFF (humane Vorhaut Fibroblasten)	Wirtszellen für <i>T. gondii</i>	ATCC, Wesel
86HG39 (humane Astrozytomzellen)	Wirtszellen für <i>T. gondii</i> und Experimente	Institut für Neuropathologie, Universität Düsseldorf (Bilzer <i>et al.</i> , 1991)
HeLa T-REx™ (humanes Zervix Epithelzellkarzinom), mit pcDNA™6/TR transformiert)	Experimente	Invitrogen, Karlsruhe (transformierte Zellen selbst hergestellt)
PBL (periphere humane Blutlymphozyten)	Experimente	Von gesunden Spendern aus dem Labor (im Labor aus heparinisier- tem Vollblut aufbereitet)

**Tabelle 1: verwendete Zellen**

##### Erreger

Erreger	Quelle
<i>Staphylococcus aureus</i>	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universitätsklinikum Düsseldorf (aus Patientenproben gewonnen, isoliert und typisiert)
<i>Toxoplasma gondii</i> (RH-Stamm)	Dr. Seitz und Dr. Saathoff (Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn)

**Tabelle 2: verwendete Erreger**

## 2.1.2 Nährmedien, Puffer und Lösungen

### Nährmedien

Medium	Beschreibung	Verwendung
IMDM (Cambrex, München)	(Iscoves's Modified Dulbecco's Medium)	Experimente
FCS (PAN-Biotech, Aidenbach)	fötales Kälberserum	Bestandteil des Zellkultur-Mediums
Panexin (PAN-Biotech, Aidenbach)	Chemischer Serumersatz (ohne Tryptophan)	Bestandteil des Tryptophan-freien Zellkulturmedium
Zellkulturmedium	IMDM mit 5 % o. 10 % (v/v) fötalem Kälberserum	Experimente
Tryptophan-freies, konditioniertes Medium (ΔTrp-KM)	IMDM mit 5 % (v/v) fötalem Kälberserum, in dem 86HG39 o. HeLa T-REx™ Zellen mit 500 U/ml IFN-γ o. 15 ng/ml Tetrazyklin für 72 h stimuliert wurden um das beinhal- tende Trp zu entfernen	Experimente

**Tabelle 3: verwendete Nährmedien**

### Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Beschreibung	Verwendung
5 X DNA-Probenpuffer	15 % Ficoll Typ 400 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylenxanol in 5x TBE Puffer	Experimente
Blotting-Puffer	50 mL NuPage-Blot-Puffer (20x) (Invitrogen) 200 ml Methanol 750 ml dH <sub>2</sub> O (Sonderanfertigung)	Experimente
RPMI 1640 (Gibco customized Karlsruhe)	ohne Tryptophan ohne Glutamin	Experimente
Ehrlich's Reagenz	1,2 % 4-(Dimethylamin)benzaldehyd in 96 % Essigsäure	Kynurenin Mes- sung
Kryokonservierungslösung	12 % DMSO 88 % FCS	Kryokonservierung

Laufpuffer (Western-Blot)	50 mM MOPS 50 mM Tris-Base 0,1 % (w/v) SDS 1 mM EDTA pH 7,7	Western-Blot
PBS (Phosphate-buffered saline)	13,7 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM pH 7,4	Experimente

**Tabelle 4: verwendete Puffer und Lösungen**

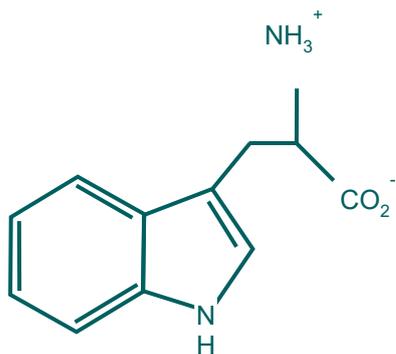
### 2.1.3 Zytokine/Antikörper

Zytokine/Antikörper	Verdünnung/Aufbewahrung	Quelle
OKT3 (Monoklonaler anti-CD3 Antikörper)	(1:3000 Endkonzentration), Überstand von Hybridomzellen	American Type Culture Collection, Rockville
Humanes Interferon $\gamma$	In RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan; ohne Glutamin) wurde eine Konzentration von $2 \times 10^5$ U/ml gelöst, anschließend in Ali- quots von 100 $\mu$ l überführt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert	R&D, Wiesbaden

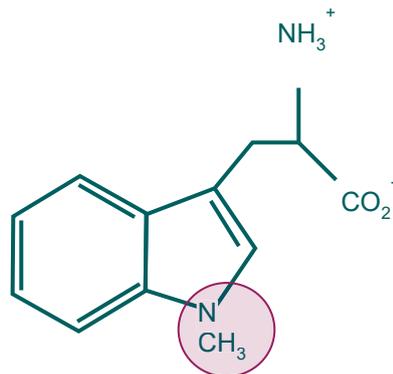
**Tabelle 5: verwendete Zytokine und Antikörper**

### 2.1.4 Chemikalien/Radiochemikalien

Ein Großteil der Experimente wurde unter Zugabe von L-Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Enzo Life Sciences Inc., Framingdale) durchgeführt. Die nachfolgende Abbildung (Abb. 2.1.1.) zeigt den strukturellen Unterschied der beiden Aminosäuren.



L-Tryptophan



1-L-Methyltryptophan

**Abb. 2.1.1 Strukturformeln von L-Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan:** 1-L-Methyltryptophan besitzt im Unterschied zu L-Tryptophan am Stickstoffatom (N) des Indolringes eine Methylgruppe (CH<sub>3</sub>).

### Chemikalien

Ampicillin-Natriumsalz	Boehringer, Mannheim
4-(Dimethylamin)benzaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Riedel-de Haen, Seelze
EGF (Epidermal-Growth-Factor)	Gibco, Karlsruhe
Essigsäure 96 %	Merck, Darmstadt
Ethanol 97 %	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Amersham, Braunschweig
Kynurenin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	BioChrom, Berlin
1-Methyl-D-Tryptophan (1-D-MT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
1-Methyl-L-Tryptophan (1-L-MT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen und Enzo Life Sciences Inc., Framingdale
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Proteinaseinhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Szintillationsflüssigkeit	Beta Plate Scint, LKB Wallac
Tetrazyklin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

D-Tryptophan (D-Trp)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Tryptophan (L-Trp)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

**Tabelle 6: verwendete Chemikalien.** Fortsetzung der Tabelle von Seite 23

### Radiochemikalien

[ <sup>3</sup> H]-Thymidin, 0,74 MBq/ml	Amersham, Braunschweig
[ <sup>3</sup> H]-Uracil, 1,23 MBq/ml	Amersham, Braunschweig
[ <sup>3</sup> H]-L-Tryptophan, 1MBq/ml	ARC (American Radiolabeled Chemicals, Inc.); St. Louis

**Tabelle 7: verwendete Radiochemikalien**

Gelöst wurden die Chemikalien in Tryptophan-freiem RPMI 1640 Medium (ohne L-Tryptophan; ohne Glutamin) und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **2.1.5 Gebrauchsmaterialien**

Deckgläschen, Glas ø 13mm	Hecht-Assistent, Sondheim
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen, 1-20 ml	Polylab Seoul, Korea
Einwegküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon Tubes 50ml	Greiner, Frickenhausen
Filterpapier Whatman 3 MM	VWR, Darmstadt
Glasfilter	Preprint Filtermat, LKB Wallac
Kanülen; Microlance, verschiedene Größen	BD Becton Dickinson, Heidelberg
Kryotubes	Nunc GmbH, Wiesbaden
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipetten	Thermo Scientific, München
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Zellschaber	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25-162 cm <sup>2</sup>	Costar, Bodenheim
Zellkulturschalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner, Frickenhausen
96 Flachboden-Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
96 V-Boden-Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen

**Tabelle 8: verwendete Gebrauchsmaterialien**

## 2.1.6 Sonstige Geräte und Materialien

Analysewaage	Chyo JL-180, Welabo, Düsseldorf
Beta-Counter, 1205 Betaplate	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Blottingkammer Semidry	Bio-Rad, München
Brutschränke	B5060 EK/CO <sub>2</sub> , Heraeus, Hanau
Digital-Kamera, Powershot G	Canon, Amsterdam, Niederlande
Elektrophoresekammern	AGS, Heidelberg
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln
Filme HyperfilmTM-ECL	GE Healthcare, München
Fluoreszenzmikroskop	Photomikroskop II, Zeiss, Köln
Geldokumentationssystem	BioDoc Analyze, Biometram, Göttingen
HPLC Anlage	Beckman Coulter, Krefeld
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
Ofen zum Trocknen der Filterplatten	Binder, Tuttlingen, Germany
Photometer	DU 640, Beckman-Coulter, München
Pipetten	Finnpipette Labsystems, München
Plattenphotometer (RainBow)	Tecan, Crailsheim
Röntgenfilmkammer	REGO, Haan
SDS-Gelelektrophoresekammer	XCell, Invitrogen, Karlsruhe
Spannungsgeber	Electrophoresis constant Power Supply EPS 500/400, Amersham Biosciences, Braunschweig
Steril-Werkbank (Gelaire BSB 4A)	Flow Laboratories, Meckenheim
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät	Harvester Basic 96, Satron Instruments, Tampere, Finnland
Zentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Hanau; Heraeus Biofuge fresco, Hanau

**Tabelle 9: sonstige Geräte und Materialien**

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### Zelllinienkultivierung

Die Zelllinien HeLa T-REx™ und 86HG39 wurden in 75 cm<sup>2</sup> oder 162 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen in IMDM Medium, welches mit 5 % hitzeinaktiviertem (30 Minuten bei 56 °C) fötalem Kälberserum (FCS) versetzt wurde, kultiviert. Zum Ernten und Splitten nach 3-4 Tagen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen durch Zugabe von PBS gewaschen und anschließend nach Entfernen des PBS mit 3 ml Trypsin-EDTA (0,25 %) abgelöst. Es erfolgte eine optische Kontrolle. Nach weiterer Zugabe von 10 ml Zellkulturmedium wurde das Trypsin neutralisiert. Die Zellsuspension wurde danach in einem Verhältnis von 1:6 in neue Zellkulturflaschen mit frischem IMDM + 5 % FCS – Medium überführt.

HFF Zellen wurden in IMDM + 10 % FCS in 162 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflaschen kultiviert. Nach 4-5 Tagen erfolgten zum Ernten das Waschen der Zellen mit kaltem PBS und das vorsichtige Ablösen mittels Zellschaber vom Flaschenboden. Anschließend wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 in neue Zellkulturflaschen überführt und mit frischem IMDM + 10 % FCS versetzt.

#### Zellzahlbestimmung

Für die Zählung lebender Zellen wurde die Zellsuspension mit Trypanblau in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt. Jeweils 10 µl der Verdünnung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die nicht angefärbten (lebenden) Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt.

#### Herstellung von Tryptophan-freiem konditioniertem Medium ( $\Delta$ Trp-KM)

Zur Erzeugung von Tryptophan-freiem, konditioniertem Medium wurden entweder  $6,48 \times 10^6$  HeLa-TDO oder 86HG39 Zellen in 162 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen zusammen mit 43,2 ml IMDM + 5 % FCS überführt. Anschließend erfolgte die Stimulation der HeLa-TDO Zellen mit 30 ng/ml Tetrazyklin, um eine TDO Expression zu

erreichen. Die 86HG39 Zellen wurden mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert um eineIDO Expression zu bewirken. Nach 72 Stunden wurden die Überstände geerntet und filtriert. Zur Sicherstellung des Tryptophanabbaus erfolgte eine Kynureninmessung und der Nachweis der Wachstumshemmung von Tryptophan auxotrophem *Staphylococcus aureus* in den konditionierten Medien.

### Zelllinienstimulation

In Flachboden-Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen wurden  $3 \times 10^4$  Hela-TDO oder 86HG39 Zellen pro Vertiefung eingesetzt. Anschließend fand die Stimulation der Zellen mit Tetrazyklin oder IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe jeweiliges Experiment) statt. Nach 72 Stunden erfolgte eine Kynureninmessung oder gegebenenfalls eine Infektion mit Bakterien oder Parasiten.

### Herstellung einer 20 mM Tryptophan und Methyltryptophan Lösung

In 50 ml RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan; ohne Glutamin) wurden je 204 mg L-Tryptophan oder D-Tryptophan unter Erwärmung auf 36°C im Wasserbad gelöst und anschließend wurde die so hergestellte 20 mM Stocklösung steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

In 1 ml NaOH wurden jeweils 218 mg 1-L-Methyltryptophan oder 1-D-Methyltryptophan gelöst und mit 50 ml RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan; ohne Glutamin) versetzt. Anschließend wurde die 20 mM Stocklösung steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

### Kryokonservierung von Zelllinien

Die zu konservierenden Zellen wurden geerntet und jeweils  $1 \times 10^7$  Zellen mit 200  $\mu$ l Kryokonservierungslösung (siehe Lösungen/Puffer) versetzt. Danach wurden die Zellen in Kryotubes pipettiert und auf -80 °C gekühlt. Nach 24 Stunden erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff.

### Auftauen kryokonservierter Zelllinien

Die kryokonservierten Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und anschließend im 37 °C warmen IMDM + 5 % FCS Medium (2ml) aufgenommen. Danach erfolgte das 10 minütige Zentrifugieren der Zellen bei 20 °C und 1200 rpm, um das DMSO von den Zellen zu trennen. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit frischem IMDM + 5 % FCS Nährmedium gelöst und in Zellkulturflaschen überführt.

### Kultivierung von 86HG39 Zellen in Tryptophan-freiem Medium ( $\Delta$ Trp-KM)

86HG39 Zellen wurden in Tryptophan-freies konditioniertes Medium mit 100 µg/ml Tryptophan oder 100 µg/ml 1-L-Methyltryptophan oder ohne Supplementation in (162 cm<sup>2</sup>) große Zellkulturflaschen überführt. Als Medium fungierte konditioniertes Medium (siehe Herstellung von  $\Delta$ Trp-KM).

Nach 96 Stunden wurden die Zellen geerntet (siehe Zelllinienkultivierung) und 3 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung eingesetzt.

### Messung des Wachstums von 86HG39 Zellen

Die in 4 unterschiedlichen Nährmedien vorkultivierten 86HG39 Zellen (siehe Ergebnisteil) wurden in 96 Flachboden-Mikrotiterplatten, (3 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung), in  $\Delta$ Trp-KM überführt. Als  $\Delta$ Trp-KM fungierten Tryptophan-freie Überstände von Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen. Anschließend wurden dem Medium unterschiedliche Mengen L-Trp und 1-L-MT (siehe Ergebnisteil) supplementiert. Zur Wachstumsbestimmung erfolgte nun die Zugabe von 10 µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin (7,5 mBq). Nach 72-stündiger Inkubationszeit wurden die Platten bis zur Auswertung bei -20 °C gelagert. Zur Auswertung wurden die Platten aufgetaut und die Zellen mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfilter übertragen. In einem Ofen erfolgte das Trocknen der Filter bei 100 °C. Anschließend wurden die Glasfilter zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Folien eingeschweißt und die Proben in einem Szintillationsmessgerät ausgezählt. Die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung wurde als Zerfälle pro Minute (cpm = *counts per minute*) angegeben.

## Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut

Diese Studie erhielt die Ethikgenehmigung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Studie Nr. 3838) (Schmidt *et al.*, 2012).

Für jedes Experiment wurden die PBL frisch gewonnen und aufgereinigt. Dazu wurde Prof. Dr. Däubener 50 ml Vollblut entnommen und dieses mit 2000 I.E. Heparin versetzt. Anschließend erfolgte die Verdünnung des Blutes mit PBS in einem Verhältnis von 1:1. Danach wurden 15 ml Ficoll-Paque in ein 50 ml Falcon Tube vorgelegt und mit 35 ml Blut-PBS-Gemisch langsam aufgefüllt. Schließlich erfolgte für 30 Minuten die Zentrifugation der Zellen ohne starke Beschleunigung und ohne starkes Abbremsen, bei 2400 rpm und 6 °C. Durch die Zentrifugation kam es zur Separierung der Blutbestandteile entlang des Dichtegradienten. Nun wurde die oberste Serum-PBS Schicht vorsichtig abgesaugt und die Blutlymphozyten konnten aus der Interphase vorsichtig mittels Glaspipette abgetragen und in ein frisches 50 ml Falcon Tube überführt werden. Das restliche Erythrozyten-Ficoll-Gemisch wurde verworfen. Die separierten PBL's wurden nun mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und zur Entfernung der Thrombozyten für 10 Minuten bei 1800 rpm und 6°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte das Absaugen des Überstandes bis auf 5 ml, das Resuspendieren des Pellet's und das Auffüllen mit frischem PBS auf 50 ml. Nach einer erneuten 10 minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm und 6°C wurden die Überstände erneut vorsichtig abgesaugt. Die im Pellet befindlichen PBL wurden nun wiederholt mit 50 ml PBS aufgefüllt und es erfolgte die letzte Zentrifugation der Zellen für 10 Minuten bei 800 rpm und 6 °C. Nach erneutem Absaugen der Überstände wurde das Zellpellet in 10 ml RPMI Medium gelöst und resuspendiert.

## Experimente mit T-Zellen

Jeweils  $1,5 \times 10^5$  PBLs pro Vertiefung wurden in 180 µl konditioniertes, Tryptophan-freies Medium oder IMDM + 5% FCS Nährmedium gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von L-Trp oder 1-L-MT in verschiedenen Konzentrationen (siehe Legenden im Ergebnisteil). Das Wachstum der T-Zellen wurde durch Zugabe von 10 µl monoklonalem anti-CD3 Antikörper OKT3 (1 : 3.000 Endkonzentration) aktiviert.

### Ermittlung der T-Zell Proliferation

Die PBL's wurden für 72 Stunden unter den gewünschten Bedingungen kultiviert (siehe Legende im Ergebnisteil). Anschließend wurde den PBLs zur Wachstumsbestimmung 10 µl [<sup>3</sup>H]-Thymidin (7,5 mBq) supplementiert und nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Lagerung der Platten bei -20 °C bis zur Analyse. Zur Auswertung wurden die Platten aufgetaut und die Zellen mit Hilfe eines Zellerntege­r­ätes auf einen Glasfilter übertragen. Bei 100 °C erfolgte die Trocknung der Filter in einem Ofen. Anschließend wurden die Glasfilter zusammen mit 10 ml Szintillations­flüssigkeit in Folien eingeschweißt und die Proben in einem Beta-Counter ausge­zählt. Die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung wurde als Zerfälle pro Minute (cpm = *counts per minute*) ausgegeben.

### Bestimmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Tryptophan in T-Zellen

Alle Versuche wurden in 96 Flachboden-Mikrotiterplatten angesetzt. Den T-Zellen wurde am Tag des Versuchansatzes 0,75 µg/ml [<sup>3</sup>H]-Tryptophan pro Vertiefung zu­ge­geben. Nach 48 Stunden erfolgte die Überführung der T-Zellen zusammen mit dem Überstand in 96 V-Boden-Mikrotiterplatten. Die Platten wurden nun bei 1800 rpm und 20 °C für 10 Minuten in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Danach wurden die Überstände abgenommen und die T-Zell-Pellets in 20 µl PBS gelöst. Schließlich erfolgte das Einfrieren und Lagern der Proben bei -20 °C. Im letzten Schritt wurden die Zellen durch das Auftauen lysiert und manuell auf Glasfilter auf­ge­tragen. Bei 100 °C erfolgte die Trocknung der Filter in einem Ofen. Anschließend wurden die Glasfilter zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Folien ein­ge­schweißt und die Proben in einem Beta-Counter ausgezählt. Der [<sup>3</sup>H]-Tryptophan Einbau wurde ebenfalls mit der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie ermittelt (siehe [<sup>3</sup>H]-Thymidin Methode).

### Kynureninmessung

Die Bestimmung von Kynurenin in Zellkultur- und Gewebeüberständen erfolgte mit­te­ls Ehrlich's Reagenz (4-(Dimethylamin)benzaldehyd). Diese bildet mit der aroma­ti­schen Aminogruppe des Kynurenins ein Imin, dessen Absorption bei einer

Wellenlänge von 492 nm ermittelt werden kann. Durch die produzierte Kynureninmenge lassen sich Rückschlüsse auf die Aktivität der IDO oder TDO schließen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivität der IDO klar mit der Konzentration von Kynurenin in den Zellkulturüberständen korreliert (Däubener *et al.*, 1994). Mit Hilfe eines Standards kann die Kynurenin-Konzentration in der Probe berechnet werden (Takikawa *et al.*, 1988). Überstände von unstimulierten Zellen dienten als Negativkontrolle. Von den zu messenden Überständen wurden jeweils 160 µl auf 96 V-Boden-Mikrotiterplatten gegeben und mit 10 µl 30 % TCA zur Fällung der Proteine versetzt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei 50 °C im Wasserbad, zur Hydrolyse des N-Formyl-Kynurenins zu Kynurenin, wurden die Proben in einer Plattenzentrifuge für 10 Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl der Überstände in 96 Flachboden-Mikrotiterplatten überführt und mit 100 µl Ehrlich Reagenz (1,2 % (w/v) in 96 %iger Essigsäure) vermischt. Die Messung des Kynurenin Gehaltes erfolgte durch die Absorption des produzierten Azofarbstoffes, die bei einer Wellenlänge von 492 nm mittels Photometer bestimmt wurde.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### Kultivierung von *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* (RH Stamm) wurden in humanen Vorhaut Fibroblasten (HFF) kultiviert. HFF-Zellen wurden in kleinen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen gezüchtet, bis mikroskopisch ein Monolayer zu erkennen war. Anschließend erfolgte die Beimpfung der Zellen mit Toxoplasmen in einem Verhältnis von 4:1. Die Wachstumskontrolle der Parasiten fand mikroskopisch statt. Nach Lyse der HFF-Zellen durch die Toxoplasmen, wurden die extrazellulären Tachyzoiten von *T. gondii* geerntet oder auf frische HFF-Zellen überführt.

### Ernten von *Toxoplasma gondii*

Überstände mit extrazellulären Tachyzoiten von *T. gondii* aus HFF-Zellkultivierung wurden aus 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen entnommen und in 50 ml Falcon Tubes überführt. Nach Zentrifugation bei 600 rpm und 20 °C für 10 Minuten lagen die Zellreste der HFF-Zellen als Pellet am Boden des Tubes. Der Überstand mit den

Toxoplasmen wurde in ein neues 50 ml Falcon Tube überführt und erneut bei 2200 rpm und 20 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Toxoplasmen-Pellet in 5 ml RPMI 1640 (ohne L-Tryptophan; ohne Glutamin) gelöst.

#### Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Die geernteten Tachyzoiten des *Toxoplasma gondii* RH Stammes wurden mit Trypanblau (Verdünnung 1:10) versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Infektion der Zellkulturen erfolgte mit  $3 \times 10^4$  Tachyzoiten pro Vertiefung.

#### Ermittlung der Toxoplasmenproliferation

Alle Toxoplasmen Experimente wurden in 96 Flachboden-Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Wirtszellen für die Parasiten dienten jeweils  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung. 72 Stunden vor der Toxoplasmeninfektion wurden die Zellen mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert um ein Tryptophan-freies Milieu zu schaffen. Die Bestimmung des Parasitenwachstums erfolgte mit Hilfe von [ $^3\text{H}$ ]-Uracil Einbau (Pfefferkorn *et al.*, 1977). Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Toxoplasmen das Enzym Uracil-Phosphoribosyl-Transferase besitzen, welches die direkte Inkorporation von Uracil in die RNA erlaubt. Den infizierten Zellkulturen wurde 48 Stunden nach Infektion [ $^3\text{H}$ ]-Uracil zugegeben. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank konnten die Zellkulturplatten bei -20 °C eingefroren und gelagert werden. Zur Auswertung wurden die Zellkulturplatten aufgetaut, wodurch es zur Lyse der Parasiten kam. Die Toxoplasmen RNA konnte nun mittels Zellerntegerät auf Glasfilter aufgetragen werden. Die Filter wurden in einem Ofen bei 100 °C getrocknet. Anschließend wurden sie zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in Folien eingeschweißt und in einem Beta-Counter ausgezählt. Die durch den radioaktiven Zerfall des Tritiums in der Szintillationsflüssigkeit erzeugte Cerenkow-Strahlung wurde als Zerfälle pro Minute (cpm = *counts per minute*) angegeben.

### Bestimmung der Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Tryptophan in Toxoplasmen

Alle Versuche wurden in 96 Flachboden-Mikrotiterplatten mit 86HG39 Zellen als Wirtszellen angesetzt. Den infizierten Zellen wurde am Tag der Infektion 15 µg/ml [<sup>3</sup>H]-Tryptophan pro Vertiefung zugegeben. Nach 72 Stunden erfolgte die Überführung der ausgestiegenen Toxoplasmen von den Flachboden-Mikrotiterplatten auf V-Boden-Mikrotiterplatten. Danach wurden die Platten bei 20 °C mit 800 rpm für 10 Minuten in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Die sich im Überstand befindenden Toxoplasmen wurden nun auf neue V-Boden-Mikrotiterplatten pipettiert und bei 2200 rpm und 20 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 20 µl PBS gelöst. Im letzten Schritt konnten die Zellen durch ein Zellern-tegerät geerntet und auf Glasfilter übertragen werden. Anschließend fand die Messung des [<sup>3</sup>H]-Tryptophan Einbaus ebenfalls mit der Flüssig-Szintillations-Spektrometrie statt (siehe [<sup>3</sup>H]-Uracil Methode). Als Kontrollgruppe fungierten 86HG39 Zellen unter gleichen Kulturbedingungen, allerdings ohne Parasiteninfektion (siehe Ergebnisteil).

### Infektion mit *Staphylococcus aureus*

Zur Infektion mit Bakterien wurden *Staphylococcus aureus* Bakterienkolonien auf Blut Agarplatten kultiviert. Nach 24 Stunden wurde eine auf der Blut Agarplatte gewachsene Bakterienkolonie mit 5 ml PBS vermengt und anschließend mit PBS auf 1 : 100.000 weiterverdünnt (je ca. 10 – 100 Kolonie-erzeugende Einheiten [cfu = Colony forming units] pro Vertiefung). Die Bakterieninfektion erfolgte mit 10 µl des Bakteriengemisches pro Vertiefung.

### Ermittlung des *Staphylococcus aureus* Wachstums

Zur Bestimmung des *Staphylococcus aureus* Wachstums wurde die infizierte Zellkultur in den 96 Mikrotiterplatten resuspendiert um die Bakterien gleichmäßig zu verteilen. Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte mittels Plattenphotometer bei 620 nm.

### Herstellung von 86HG39 Zelllysaten

Zur Analyse des Einbaus von L-Trp und 1-L-MT in die Proteine von 86HG39 Zellen wurden diese in mittleren Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) für 15 Wochen in RPMI 1640 Medium mit einem chemischen Serumersatz (Panexin 10 %; Tryptophan-frei) und Zugabe von 100 µg/ml L-Trp oder 1-L-MT kultiviert. Die Zellen wurden alle 4 Tage unter der Verwendung von 0,25 % Trypsin-EDTA im Verhältnis 1 : 10 umgesetzt. Nach 15 Wochen erfolgte das Ernten der Zellen und das Zentrifugieren für 10 Minuten bei 1800 rpm und 20 °C. Das entstandene Pellet wurde erneut mit PBS gewaschen und danach in 1 ml PBS mit Proteinaseinhibitor gelöst. Dann wurden die Zellen durch 5-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und durch anschließendes Auftauen im 37 °C warmen Wasserbad lysiert. Die aufgebrochenen Zellen konnten nun in Eppendorf-Reaktionsgefäße umgefüllt und bei 1300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert werden. Das gewonnene Zelllysate wurde daraufhin in 100 µl Mengen aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

#### Herstellung von Bakterienlysaten

Zur Analyse des Einbaus von L-Trp und 1-L-MT in die Proteine von Bakterien wurden diese für 18 Stunden in RPMI 1640 Medium mit 10 % Tryptophan-freiem Panexin und Zugabe von 100 µg/ml L-Tryptophan oder 1-L-Methyltryptophan kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml PBS mit Proteinaseinhibitor gelöst und durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen lysiert.

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Lysate der Zellen wurden im Verhältnis 1 : 5 mit SDS Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 100 °C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden je 20 µl der Lysate pro Probentasche auf ein 10 % SDS-Polyacrylamid-Gel (NuPage – Polyacrylamidgel, Invitrogen Karlsruhe) aufgetragen. Die aufzutrennenden Proteine wurden mit Hilfe des Sammelgels im oberen Teil des Polyacrylamid-Gels fokussiert und im Trenngel durch Elektrophorese ihrer Ladung nach aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte bei 160 Volt für circa 2 Stunden. Die Proteinwanderungsgeschwindigkeit war dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse. Die Auftrennung des Markers SeeBlue™Plus2 (Invitrogen, Karlsruhe) diente zur Größenabschätzung.

## Western-Blot-Analyse

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe der Semi-dry-Blotting Methode auf eine Protein-bindende Nitrozellulosemembran geblottet. Um die Proteinbindestellen der Membran zu aktivieren, wurde dem Puffer Methanol beigemischt. Somit konnten die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran gebunden werden. Um ein durchgehendes Puffersystem zu erhalten, wurden alle Bestandteile des Systems vor dem Aufbau in Transferpuffer getränkt. Als Puffersystem dienten getränkte Filterpapiere. Das System bestand im unteren Teil (Anode) aus einer Graphitplatte. Darauf folgten drei Lagen Filterpapier, auf denen eine Nitrozellulosemembran gelegt wurde. Darüber folgte das SDS-Gel. Auf das Gel wurden anschließend weitere 6 Lagen Filterpapier gestapelt und das System mit der zweiten Graphitplatte (Kathode) verschlossen. Bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membran und einer Zeit von 90 Minuten erfolgte der Proteintransfer. Die Membran konnte nach dem Transfer direkt verwendet oder bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  zwischen 2 feuchten Filterpapieren gelagert werden.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Silvia Eller für die Unterstützung bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen bedanken.

## HPLC (*high performance liquid chromatography*)-Analyse

Zur Analyse von Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan wurden die Aminosäuren in Tryptophan-freiem Zellkulturmedium mit einer Konzentration von  $4 \text{ mg/ml}$  gelöst. Anschließend erfolgte die Mischung von  $200 \text{ } \mu\text{l}$  der Aminosäure Lösung mit  $200 \text{ } \mu\text{l}$  PBS und  $400 \text{ } \mu\text{l}$  3-Nitrotyrosin als interne Kontrolle. Danach wurden die sich darin enthaltenen Proteine mit 30 % Trichloressigsäure (v/v 1 : 9) ausgefällt. Dann fanden die Zentrifugation und Auswertung der Überstände statt. Die Tryptophan-, 1-L-Methyltryptophan- und Kynureninmengen konnten mit Hilfe des Gold-Universal-Grad System (Beckman Coulter, Krefeld, Germany) gemessen werden. Das System bestand aus einem 126 Löser-Modul, einem 166 Detektor und einer  $3 \text{ } \mu\text{m}$  Umkehrphasensäule (RP-C18endcapped, Merck, Darmstadt, Germany). Natriumacetat ( $50 \text{ mM/pH } 4,2$ ) mit ansteigenden Werten von Acetonitril fungierte als Puffer. Die

Flussrate betrug 1,0 ml/min. Die Absorption der Durchflusssäulen erfolgte bei 280 nm. Alle Peaks wurden mit zuvor gemessenen Standardlaufzeiten verglichen.

### Flüssigchromatographie mit Tandem Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) Analyse (extern durchgeführte Messungen)

Die Peptide wurden mit Hilfe des Ultimate 3000 RSLCnano HPLC Systems (NO Thermo Fisher Scientific, Idstein, Germany) aufgetrennt. Bei humanen Zellkulturen wurde die HPLC zusammen mit einem „LTQ Velos“ Instrument (Thermo Fisher Scientific Bremen, Germany) gekoppelt. Bei Bakterien erfolgte die Verbindung des Systems mit dem „LTQ Orbitrap Velos“ Instrument (Thermo Fisher Scientific Bremen, Germany). Zur Auftrennung der Peptide wurde eine C18 RP nano LC Säule (75 µm Innendurchmesser, 250 mm, Teilchen Größe 2 µm PepMap, Dionex LC Packings) sowie ein zweiteiliges Lösungssystem, bestehend aus 0,1 % (v/v) Ameisensäure (Lösung A) und 0,1 % Ameisensäure in 84 % (v/v) Acetonitril (Lösung B) verwendet. Die Separierung erfolgte mittels eines linearen Gradienten, der beginnend bei 5 % innerhalb von 35 Minuten auf 40 % (Lösung B) und anschließend von 40 auf 95 % (Lösung B) innerhalb von 5 Minuten anstieg. Die Arbeitstemperatur der Säulen wurde konstant bei 60 °C gehalten. Die Flüssigchromatographie war mit dem jeweiligen Massenspektrometer durch Elektrospray Ionisation (Thermo Fisher Scientific) und mit distal beschichteten Siliciumdioxid Nadeln (FS360-20-10-D, New Objective, Woburn, MA) verbunden.

Für die „LTQ Velos“ Messungen wurde das volle MS-Spektrum im erweiterten Modus für m/z 300-1500 aufgezeichnet. Die fünf intensivsten Ionen wurden für die datenabhängige Fragmentierung (MS/MS) wegen ihres geringen Energiebedarfs bei der Kollisions-induzierten Dissoziation in der linearen Ionenfalle ausgewählt. Bei der „LTQ Orbitrap Velos“ Analyse, Übersichtsscan bei (300 - 2000 m/z), wurde mit einer Auflösung von 30000 für m/z = 400 gearbeitet. Die datenabhängige Fragmentation erfolgte für die 20 stärksten Ionen und die Fragment-Ionen konnten in der linearen Ionenfalle analysiert werden. Bei beiden Instrumenten wurde versucht, durch dynamische Ausschaltung die Zertrümmerung der zuvor ausgewählten Vorläufer zu verhindern.

Die Raw-Dateien wurden unter Verwendung von Proteome Discoverer 1,2 (Thermo Fisher Scientific) verarbeitet. Die MS/MS-Spektren wurden mit Hilfe des Mascot

Suchalgorithmus gegen folgende Datenbanken abgeglichen: Swissprot (SwissProt 57,15, Taxonomie: *Homo sapiens* (Mensch), 20.266 Sequenzen) für die humanen Zellkultur Proben und UniProt (Taxonomie: Bakterien (Eubakterien), 323.530 Sequenzen) für die bakteriellen Proben. Der Suchdurchlauf erfolgte mit den folgenden Einstellungen: Vorstufe und Bruchstück mit einer Massentoleranz von 0,4 Da für LTQ Velos Daten und 5 ppm/0.4 Da für die LTQ Orbitrap Daten. Als variable Modifikationen dienten eine verpasste Spaltung, Oxidation von Methionin und Methylierung von Tryptophan. Die Identifikation der Peptide wurde mit einem FDR (*false discovery rate*) von 1 % durchgeführt. Aktiviert und berücksichtigt wurden nur Protein-gruppierungen und Peptide ersten Ranges. Andere Peptide mit gleichem Ergebnis wurden ausgeschlossen.

#### „Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Massenspektrometrie“ (MALDI-MS) Analyse (extern durchgeführte Messungen)

Für die MALDI-MS-Analyse wurden verschiedene 1-L-Methyltryptophan Chargen (Sigma-Aldrich, Taufkirchen und Enzo Life Sciences Inc., Framingham) in Wasser mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst. Die Messungen erfolgten mit einem MALDI-TOF Voyager-DE-STR (AB Sciex, Framingham, Massachusetts; USA) mit einem Stickstoff-Laser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ), der im Reflektor-Modus mit 25 kV Beschleunigungsspannung arbeitet. Die Proben wurden mit Hilfe des trockenen Tröpfchen Verfahrens durch Mischen von 0,5 ml Probenlösung mit 2 ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) als Matrix-Lösung (10 mg in 1 ml Wasser) hergestellt. Anschließend fand das Trocknen der Tropfen durch einen sanften Luftstrom statt. Die interne Kalibrierung erfolgte mittels Monomer-Ionen der Matrix. Die Spektren wurden durch ungefähr 100 Laserschüsse erhalten.

An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei Katja Kuhlmann und Helmut Meyer aus dem Medizinischen Proteom-Center-Ruhr-Universität Bochum, für die Durchführung der HPLC-Analysen und der LC-MS/MS, sowie bei Sabine Metzger für die MALDI-MS Analysen bedanken.

### **2.2.3 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Graph Pad Prism Programmes und die Daten wurden mittels Standard t-Test für gepaarte bzw. ungepaarte Proben berechnet. Alle Ergebnisse wurden bei Einzelexperimenten als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aufgeführt. Bei Zusammenfassung mehrerer Experimente erfolgte das Aufführen als Mittelwert  $\pm$  SEM. Das Signifikanzniveau wurde mit 5% festgelegt.

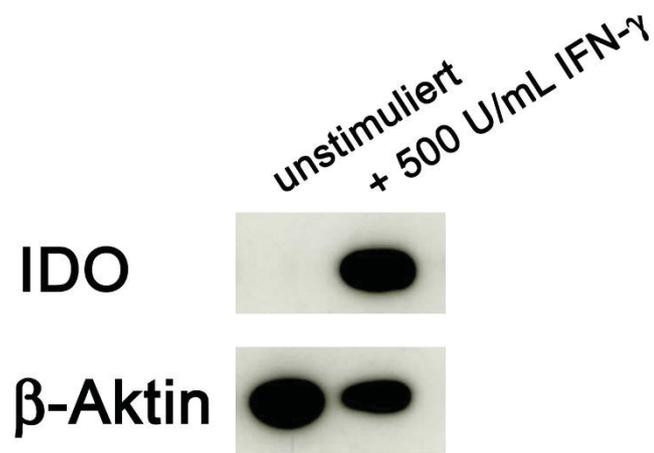
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Wachstum unterschiedlicher Zellen in Tryptophan-freiem Medium nach Zugabe von 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT)

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von 1-L-Methyltryptophan, einem spezifischen Inhibitor der IDO, auf das Wachstum und die Funktion von verschiedenen Mikroorganismen, Immunzellen und Tumorzellen untersucht werden. Im zweiten Teil wurde die Zusammensetzung von handelsüblichem 1-L-Methyltryptophan analysiert und gezeigt, dass 1-L-Methyltryptophan nicht in die Proteine der Zellen eingebaut wird.

Tryptophan ist für den Menschen und viele Mikroorganismen eine essentielle Aminosäure. Die lokale Tryptophankonzentration wird durch das Enzym IDO beeinflusst, das beispielsweise in Makrophagen, Fibroblasten, Endothel-, Epithel- und Tumorzellen zu finden ist. Pfefferkorn *et al.* zeigten 1984, dass das Wachstum von *Toxoplasma gondii* in IFN- $\gamma$  stimulierten humanen Fibroblasten gehemmt wird. Darauf folgende Veröffentlichungen untersuchten die IFN- $\gamma$  induzierte IDO abhängige Hemmung von Bakterien und anderen Pathogenen. Diese antimikrobiellen Effekte wurden auf den lokalen Abbau von Tryptophan zurückgeführt, der durch die IDO vermittelt wird.

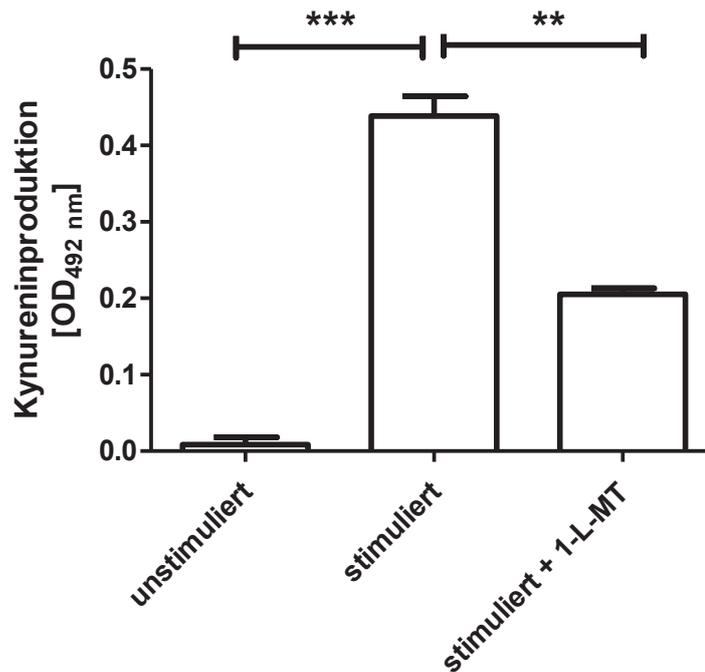
Abbildung 3.1 zeigt einen Westernblot, in dem die IDO Expression in humanen 86HG39 Glioblastomzellen nach Stimulation mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  dargestellt ist. Als interne Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin.



**Abb. 3.1: IDO Expression in 86HG39 Zellen nach IFN- $\gamma$  Stimulation.** Die Zellen wurden für 72 h mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Anschließend wurde die Expression des IDO Proteins mittels Western Blot Analyse bestimmt. Als Kontrolle fungierte  $\beta$ -Aktin.

IDO baut Tryptophan über den Kynurenin Weg zu Kynurenin ab. Cady und Sono identifizierten 1991 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT) als spezifischen IDO Inhibitor (Cady *et al.*, 1991). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass 1-L-Methyltryptophan die enzymatische Wirkung der IDO hemmt und somit die antimikrobiellen Effekte des Enzyms aufgehoben werden können.

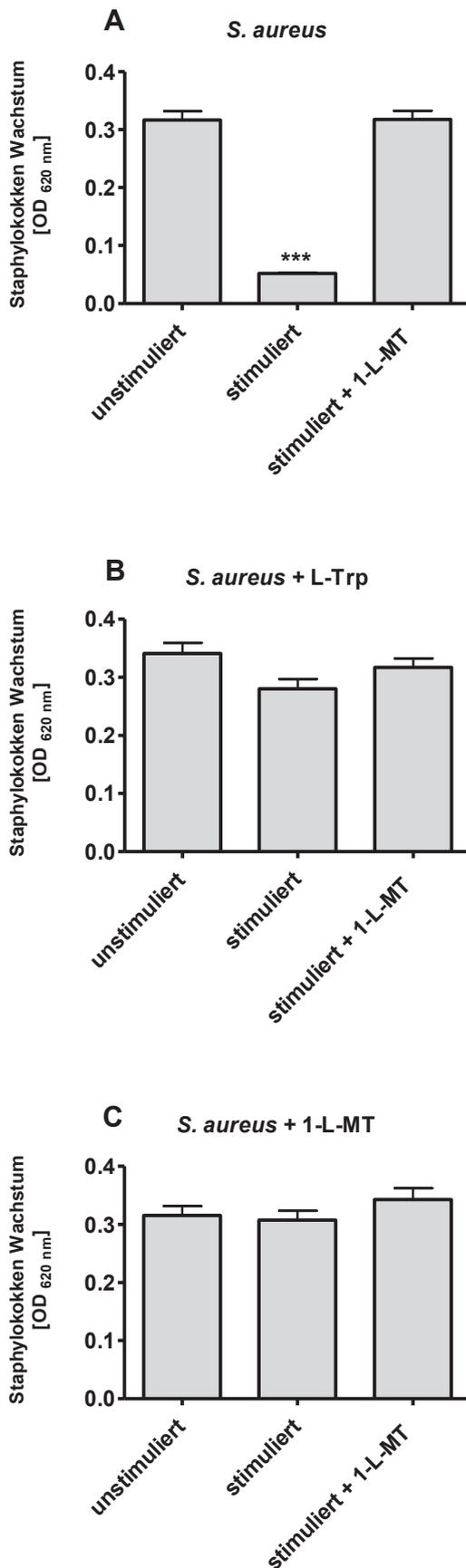
Die Abb. 3.2 zeigt die Kynureninproduktion von IFN- $\gamma$  stimulierten (500 U/ml) 86HG39 Zellen, mit einer Absorptionsrate von 0,46 bei einer OD von 492 nm. Man sieht, dass unstimulierte Zellen nicht in der Lage waren, das im Kulturmedium beinhaltete Tryptophan (1,5 mmol) in Kynurenin umzuwandeln. Im Vergleich dazu konnte die Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  einen signifikanten Anstieg der Kynureninproduktion hervorrufen. Bei Zugabe von 1-L-Methyltryptophan zum Zeitpunkt der Stimulation wurde die IDO vermittelte enzymatische Aktivität um die Hälfte vermindert und eine Absorption von 0,2 gemessen. Im Vergleich zu den stimulierten Zellen erfolgte zwar eine signifikante Verminderung allerdings keine vollständige Hemmung der Enzymaktivität.



**Abb. 3.2: 1-L-Methyltryptophan hemmt die IDO abhängige Kynureninproduktion.** 86HG39 Zellen wurden in IMDM Medium zusammen mit 1,5 mmol Tryptophan und IFN- $\gamma$  (500 U/ml) in Mikrotiterplatten inkubiert. Zusätzlich wurde 1,5 mmol 1-L-Methyltryptophan zum Zeitpunkt der IFN- $\gamma$  Stimulation hinzugeben. Die Kynureninmenge im Überstand wurde photometrisch gemessen. Nach IFN- $\gamma$  Stimulation konnte eine signifikant erhöhte Kynureninmenge gemessen werden (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Durch die 1-L-MT-Zugabe zum Zeitpunkt der Stimulation kam es zu einer signifikant geringeren Kynureninproduktion (\*\*)  $p < 0,01$ ). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von 2 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz.

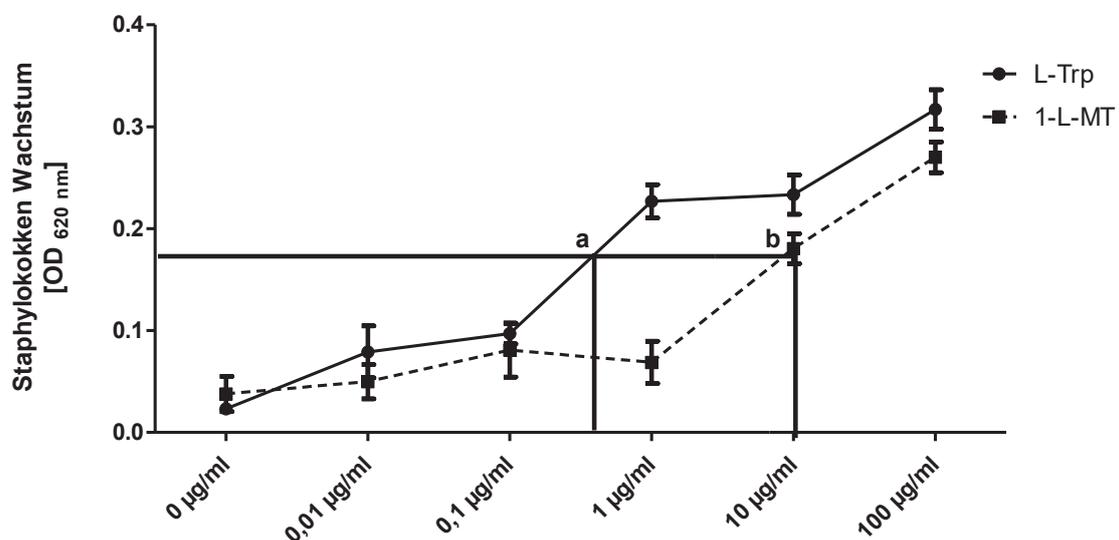
Durch den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin vermitteln IDO-exprimierende Tumorzellen einen antimikrobiellen Effekt auf Tryptophan-auxotrophe Mikroorganismen. Die Abb. 3.3 zeigt diesen Effekt von IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Glioblastomzellen. Dazu wurden die Tumorzellen für 72 Stunden in IMDM Medium mit 5 % FCS mit oder ohne Zugabe von 1-L-Methyltryptophan (330  $\mu\text{g/ml}$ ) mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Das nach 3 Tagen gewonnene Tryptophan-freie, konditionierte Medium ( $\Delta\text{Trp-KM}$ ) wurde als Kulturmedium für einen Tryptophan-auxotrophen *Staphylococcus aureus* Stamm (*S. aureus*) eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Infektion erfolgte entweder keine Zugabe von Aminosäuren (Abb. 3.3.A), eine Zugabe von 330  $\mu\text{g/ml}$  L-Trp (Abb. 3.3.B) oder 330  $\mu\text{g/ml}$  1-L-MT (Abb. 3.3.C). Die Abbildung 3.3.A zeigt, dass *Staphylococcus aureus* in konditioniertem Medium von unstimulierten 86HG39 Zellen wachsen konnte, da es zuvor nicht zum Abbau von Tryptophan durch die IDO kam. In konditioniertem Medium von IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen war das Wachstum der Bakterien allerdings signifikant gehemmt. Betrachtet man das Bakterienwachstum in den Überständen von stimulierten 86HG39 Zellen, welche mit 1-L-

Methyltryptophan kultiviert wurden, erkennt man, dass das 1-L-MT den antimikrobiellen Effekt hemmen konnte (Abb. 3.3.A). Die Bestätigung, dass der antimikrobielle Effekt auf eine Verringerung der Tryptophan-Konzentration zurückzuführen ist, zeigt Abb. 3.3.B. Die Bakterien, welche zum Zeitpunkt der Infektion zusammen mit L-Tryptophan (L-Trp) in die konditionierten Medien überführt wurden, konnten in allen Experimentalgruppen wachsen. Nach Substitution von 1-L-Methyltryptophan (Abb. 3.3.C.) konnte interessanterweise ebenfalls ein Bakterienwachstum in konditioniertem Medium gemessen werden. Hierbei ist eine Interaktion des 1-L-MT mit der IDO jedoch unwahrscheinlich, da das 1-L-MT zusammen mit den Bakterien in ein zellfreies, konditioniertes Medium überführt wurde. Somit scheint 1-L-MT nicht nur ein spezifischer Inhibitor der IDO zu sein, sondern auch einen Einfluss auf das Wachstum von Mikroorganismen zu haben, welcher nicht auf eine Beeinflussung der IDO Enzymaktivität zurückzuführen ist.



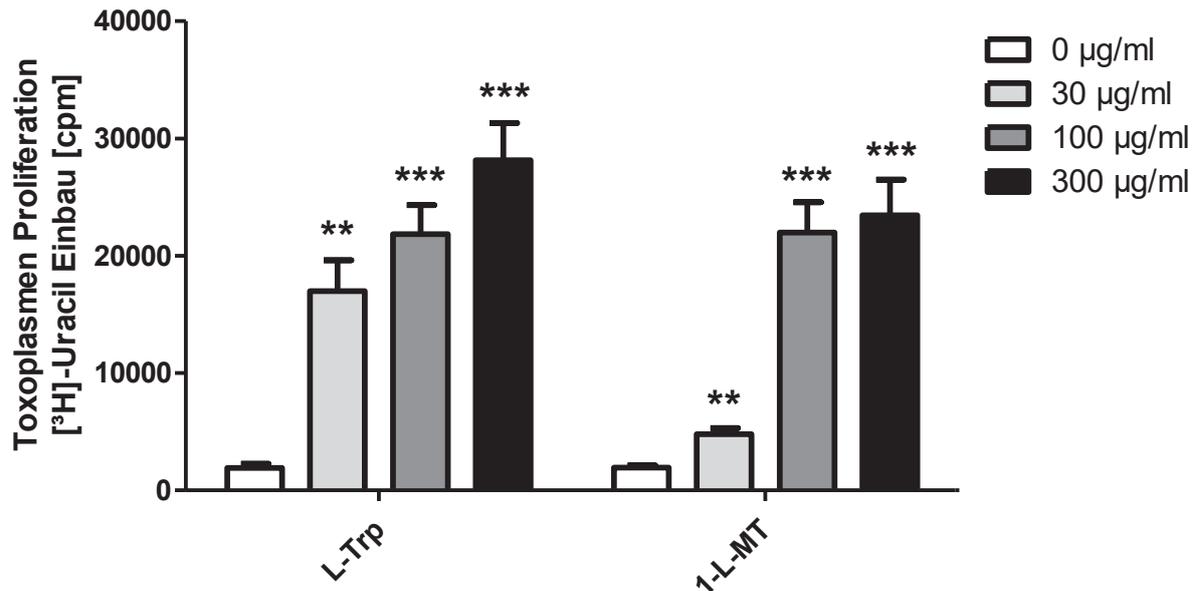
**Abb. 3.3: L-Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan heben den IDO vermittelten antimikrobiellen Effekt auf.**  $3 \times 10^4$  86HG39 Zellen pro Vertiefung wurden für 72 Stunden mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  in Mikrotiterplatten stimuliert oder unstimuliert (Kontroll-gruppe) kultiviert. Einigen Zellen wurde zum Zeitpunkt der Stimulation zusätzlich 1-L-MT (330  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Nach 3tägiger Inkubationszeit dienten die gewonnenen Überstände als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus*. Zum Zeitpunkt der Infektion wurde entweder kein Substrat (A), 330  $\mu$ g/ml L-Tryptophan (L-Trp) (B) oder 330  $\mu$ g/ml 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT) (C) supplementiert. Das Bakterienwachstum wurde nach weiteren 24 Stunden photometrisch bestimmt. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung des Bakterienwachstums (\*\*\*)  $p < 0,001$ ). Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von 3 Experimenten mit jeweils vierfachem Ansatz.

Im folgenden Schritt wurde der Einfluss von 1-L-Methyltryptophan auf das Bakterienwachstum in  $\Delta$ Trp-KM näher untersucht. Zur Gewinnung des konditionierten Mediums ( $\Delta$ Trp-KM) wurden 86HG39 Zellen mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert um eine IDO Expression zu erreichen. Nach 72 Stunden Inkubationszeit dienten die geernteten Tryptophan-freien Überstände als Kulturmedium für *S. aureus*. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden unterschiedliche Konzentrationen L-Trp und 1-L-MT (0-100  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Das Bakterienwachstum wurde 24 Stunden später bestimmt. Abb. 3.4 zeigt, dass das Bakterienwachstum in  $\Delta$ Trp-KM ohne Substrat-Zusatz gehemmt ist. Erst die Zugabe von L-Trp erlaubte, wie erwartet, dosisabhängig ein deutliches Bakterienwachstum (durchgezogene Linie). Erstaunlicherweise konnte auch nach 1-L-MT Zugabe ein Bakterienwachstum gemessen werden (gestrichelte Linie). Allerdings fand sich hier ein quantitativer Unterschied, da das halbmaximale Wachstum der Bakterien nach Tryptophan-Zugabe bei etwa 0,6  $\mu$ g/ml erreicht wurde (a), wohingegen bei 1-L-MT eine Konzentration von etwa 10  $\mu$ g/ml notwendig war (b). Im Vergleich zu L-Trp scheint 1-L-MT ein schlechteres Substrat für die Bakterien zu sein. Allerdings wurde das maximale Bakterienwachstum nach Supplementation von größeren Mengen 1-L-MT (100  $\mu$ g/ml) ebenfalls erreicht.



**Abb. 3.4: Bakterienwachstum in Tryptophan-freiem konditioniertem Medium, nach Supplementation von L-Tryptophan (L-Trp) und 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).** Zur Gewinnung Tryptophan-freier konditionierter Überstände wurden  $6,48 \times 10^6$  86HG39 Zellen pro Zellkulturflasche (162 cm<sup>2</sup>) mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden dienten die geernteten Zellüberstände als Kulturmedium für Bakterien. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden dem Medium zusätzlich unterschiedliche Mengen L-Trp und 1-L-MT (0 - 100  $\mu$ g/ml) hinzugegeben. Das Bakterienwachstum wurde nach 24 Stunden photometrisch bestimmt. Die L-Trp und 1-L-MT Konzentrationen zum Erreichen des halbmaximalen Bakterienwachstums sind mit a und b gekennzeichnet. Die Daten sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von 3 Experimenten, die jeweils mit vierfachem Ansatz durchgeführt wurden.

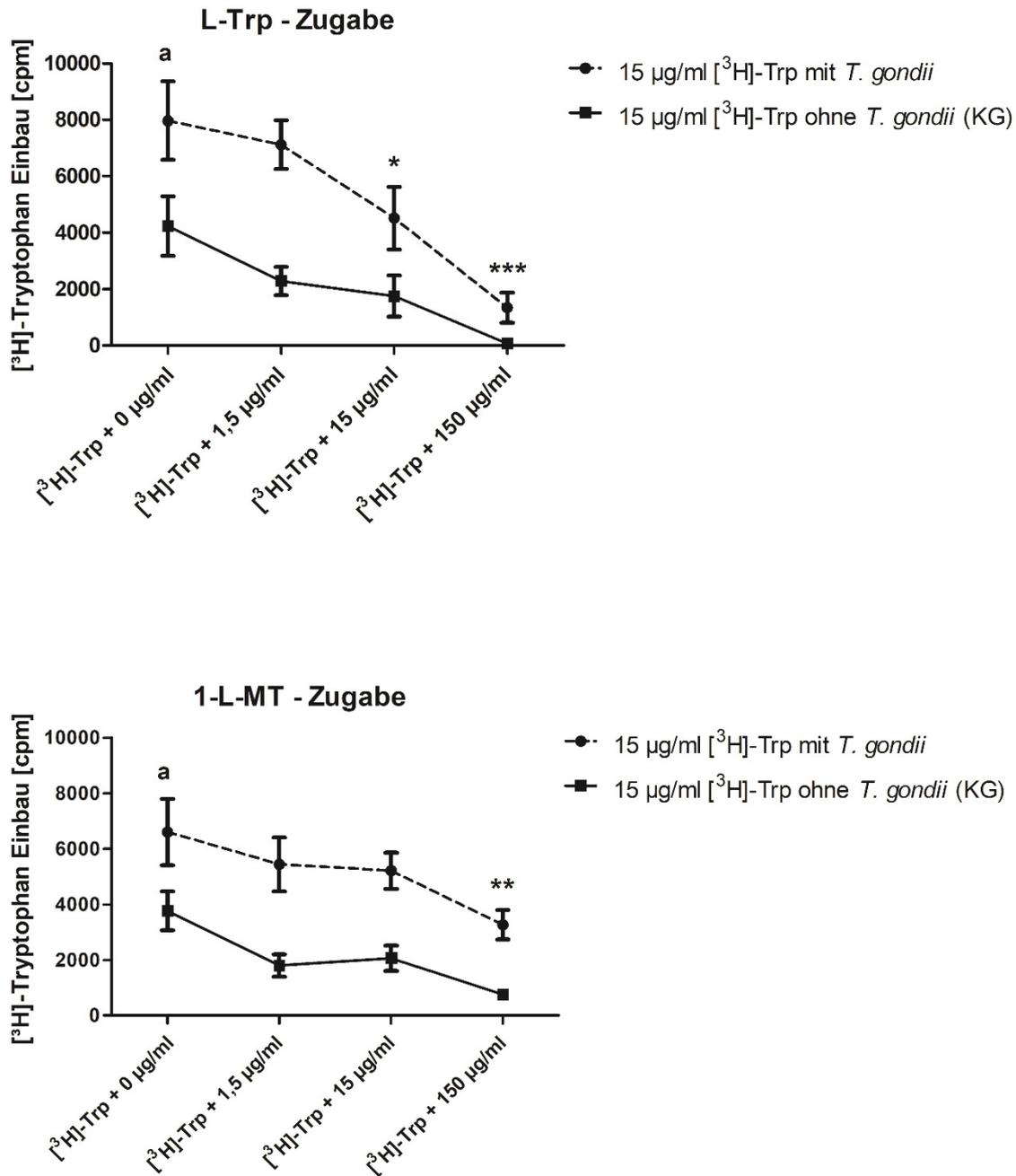
Der Effekt, dass Bakterien mit 1-L-MT wachsen können, ließ sich nicht auf die Hemmung derIDO spezifischen Tryptophan-Depletion zurückführen. Vielmehr scheint 1-L-MT als Tryptophanersatz zu fungieren. Um sicherzustellen, dass 1-L-MT auch ein möglicher Nährstoffersatz für andere Mikroorganismen ist, wurde es als Tryptophanersatz für *Toxoplasma gondii* untersucht. Hierzu erfolgte die Stimulation von 86HG39 Zellen mit IFN- $\gamma$  (100 U/ml), um ein Tryptophan-freies Medium für das Parasitenwachstum zu schaffen. Nach 72 Stunden wurden die Zellen mit  $3 \times 10^4$  Parasiten pro Vertiefung zusammen mit unterschiedlichen Mengen L-Trp und 1-L-MT (0 - 300  $\mu\text{g/ml}$ ) infiziert. Das Toxoplasmenwachstum wurde mittels [ $^3\text{H}$ ]-Uracil Einbau ermittelt. Abb. 3.5 zeigt, dass die Toxoplasmen in stimulierten Zellen nicht in der Lage waren zu proliferieren (weiße Balken). Nach Zugabe unterschiedlicher Mengen L-Trp oder auch 1-L-MT konnte ein signifikantes Parasitenwachstum gemessen werden. Allerdings zeigt der Vergleich der Wachstumsraten auch in diesem Experiment, dass L-Trp das effektivere Substrat ist, da für das halbmaximale Parasitenwachstum nur etwa 30  $\mu\text{g/ml}$  L-Trp im Vergleich zu 100  $\mu\text{g/ml}$  1-L-MT benötigt wurden. 1-L-MT scheint damit ein qualitativ schlechteres Substrat für *Toxoplasma gondii* zu sein. Größere Mengen (100 - 300  $\mu\text{g/ml}$ ) Tryptophan oder 1-L-Methyltryptohan führten zu einem vergleichbaren Parasitenwachstum (schwarze Balken).



**Abb. 3.5: Toxoplasmenwachstum unter Tryptophan-freien Kulturbedingungen nach Supplementation von L-Tryptophan (L-Trp) und 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).** 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$  /Vertiefung) wurden für 72 Stunden mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  in IMDM Medium stimuliert, um eineIDO Expression zu induzieren. Nach 72 Stunden wurden  $3 \times 10^4$  *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten/Vertiefung, zusammen mit unterschiedlichen Mengen L-Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan (0-300  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Parasitenwachstum durch den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Uracil gemessen. Die Sterne kennzeichnen das signifikante Wachstum der Parasiten, nach Supplementation von L-Trp oder 1-L-MT (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) Die Daten sind als [<sup>3</sup>H]-Uracil Einbau  $\pm$  Standardabweichung aus 4 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz angegeben.

Im folgenden Schritt sollte überprüft werden, ob 1-L-MT in die Toxoplasmen aufgenommen und eingebaut wird. Dazu diente radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-Tryptophan ([<sup>3</sup>H]-Trp), das in Toxoplasmen eingebaut wurde und mittels Szintillationsmessgerätes bestimmt werden konnte. Es wurde überprüft, ob der Einbau von [<sup>3</sup>H]-Trp durch Zugabe von nicht radioaktiv markiertem L-Trp und 1-L-MT kompetitiv antagonisiert werden kann. Hierzu wurden wie im vorherigen Experiment  $3 \times 10^6$  86HG39 Zellen pro Vertiefung für 72 Stunden mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Anschließend wurden die Parasiten zusammen mit 15  $\mu\text{g/ml}$  [<sup>3</sup>H]-Trp und unterschiedlichen Mengen unmarkiertem L-Trp und 1-L-MT (0 - 150  $\mu\text{g/ml}$ ) versetzt. Nach weiteren 72 Stunden wurde der Einbau des [<sup>3</sup>H]-Trp mit Hilfe der Szintillations-Spektroskopie in *counts per minute* (cpm) gemessen. Als Kontrollgruppe fungierten 86HG39 Zellen unter gleichen Kulturbedingungen, allerdings ohne Parasiteninfektion (durchgezogene Linie). Die Abb. 3.6 zeigt die Ergebnisse der kompetitiven Inkorporation von unmarkiertem L-Trp oder 1-L-MT anstelle von [<sup>3</sup>H]-Trp in Toxoplasmen. Es zeigte sich, dass in Abwesenheit von unmarkiertem L-Trp oder 1-L-MT die höchsten Messwerte für den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Trp in die Toxoplasmen detektiert werden konnten (a). Dieser Einbau konnte durch Zugabe

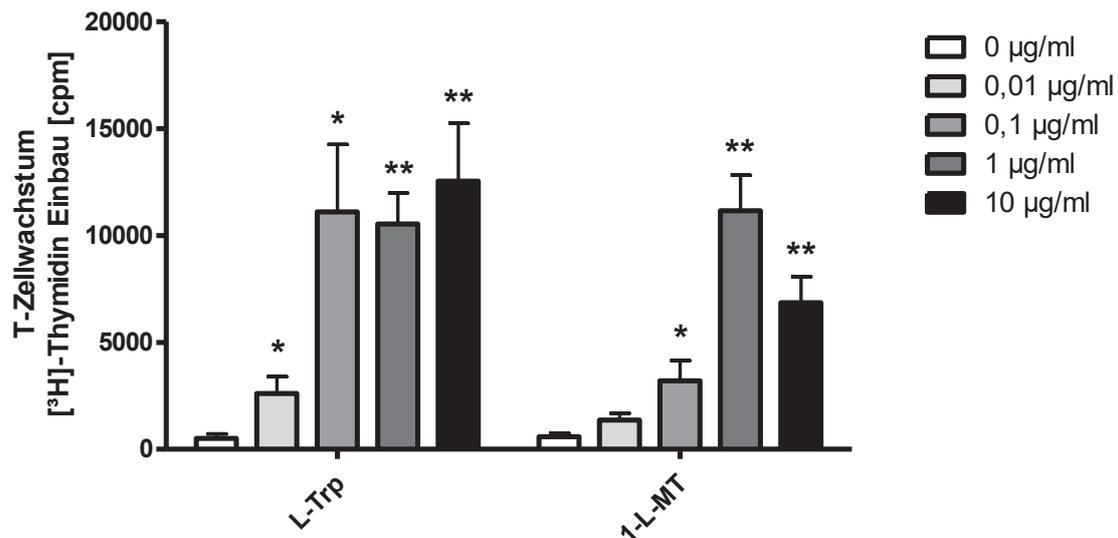
verschiedener Mengen unmarkiertem L-Trp (0 - 150 µg/ml) dosisabhängig signifikant vermindert werden. Auch unmarkiertes 1-L-MT bewirkte eine signifikante dosisabhängige Antagonisierung des Einbaus von radioaktivem Tryptophan. Wie zuvor war auch hier ein quantitativer Unterschied zwischen L-Trp und 1-L-MT festzustellen. L-Trp konnte wesentlich effektiver dem Einbau von radioaktivmarkiertem Tryptophan entgegenwirken. Die Kontrollgruppe verhielt sich analog zu der Parasitengruppe. Allerdings waren die Messwerte kleiner, was auf die additive Aufnahme von [<sup>3</sup>H]-Trp in die Toxoplasmen zurückgeführt werden konnte.



**Abb. 3.6: Antagonisierung des Einbaus von radioaktivem [<sup>3</sup>H]-Tryptophan, in *Toxoplasma gondii*, durch unmarkiertes L-Tryptophan (L-Trp) und unmarkiertes 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).** 86HG39 Zellen ( $3 \times 10^4$  Zellen/Vertiefung), wurden mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  für 72 Stunden in IMDM Medium stimuliert, um eine IDO Expression zu induzieren. Danach erfolgte die Infektion mit  $3 \times 10^4$  *Toxoplasma gondii* Tachyzoiten/Vertiefung (a), außer in der Kontrollgruppe (KG). Im Anschluss wurden unterschiedliche Mengen unmarkiertes L-Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan (0 - 150 µg/ml) sowie radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-Tryptophan ([<sup>3</sup>H]-Trp) der infizierten Zellkultur supplementiert. Nach weiteren 72 Stunden wurde der Einbau des [<sup>3</sup>H]-Trp in die Toxoplasmen mittels Szintillations-Spektroskopie gemessen. (\* und \*\*\*) kennzeichnen die signifikante Verminderung des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Trp durch unmarkiertes L-Trp (\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). (\*\*) bezeichnet die Antagonisierung des [<sup>3</sup>H]-Trp Einbaus durch 1-L-MT (\*\*  $p < 0,01$ ). Die Daten werden als [<sup>3</sup>H]-Tryptophan Einbau  $\pm$  Standardfehler (SEM) aus 3 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz angegeben.

Die Aufhebung des IDO vermittelten antimikrobiellen Effektes durch 1-L-Methyltryptophan wurde an Bakterien (*S. aureus*) und Parasiten (*Toxoplasma gondii*) nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass es sich dabei nicht um eine Hemmung der spezifischen IDO Enzymaktivität handelt, sondern, dass 1-L-Methyltryptophan selber als Nährstoff fungiert und dadurch den Tryptophanmangel ausgleicht.

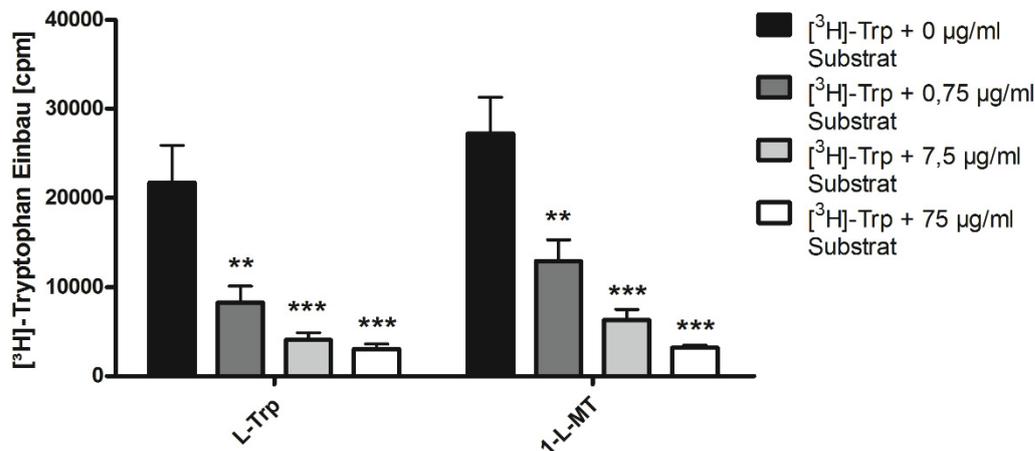
Im nächsten Schritt sollte nun überprüft werden, ob auch humane Zellen in der Lage sind, 1-L-Methyltryptophan als Nährstoff zu nutzen. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit Immunzellen durchgeführt. Dafür wurden humane PBL's aus heparinisierten Blutproben gewonnen (siehe Material und Methoden). Anschließend dienten die Überstände von IFN- $\gamma$  (500 U/ml) stimulierten 86HG39 Zellen als Tryptophan-freies Nährmedium für die T-Zellen. Darüber hinaus wurden die Ansätze mit unterschiedlichen Mengen L-Trp oder 1-L-MT (0 - 10  $\mu$ g/ml) supplementiert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulierung der T-Zellen durch OKT3 Zugabe. Nach 48 Stunden konnte das Wachstum der Immunzellen mit Hilfe des Einbaus von [ $^3$ H]-Thymidin ermittelt werden. In Abb. 3.7. sieht man, dass T-Zellen in  $\Delta$ Trp-KM nicht wachsen konnten (weiße Balken). Erst die Zugabe von L-Trp oder auch 1-L-MT erlaubte ein signifikantes Wachstum der Zellen. Auch in diesem Experiment war L-Trp ein qualitativ besserer Nährstoff als 1-L-Methyltryptophan, da für das maximale Wachstum der OKT3 stimulierten T-Zellen nur 10 % der Substratmenge im Vergleich zu 1-L-Methyltryptophan benötigt wurde.



**Abb. 3.7: T-Zellwachstum in Tryptophan-freiem konditioniertem Medium, nach Zugabe von L-Tryptophan (L-Trp) und 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).**  $6,48 \times 10^6$  86HG39 Zellen wurden pro Zellkulturflasche ( $162 \text{ cm}^2$ ) mit  $500 \text{ U/ml IFN}\gamma$  für 72 Stunden stimuliert. Anschließend wurde das Tryptophan-freie konditionierte Medium geerntet und diente als Kulturmedium für frisch isolierte PBL.  $1,5 \times 10^5$  Immunzellen pro Vertiefung wurden mit unterschiedlichen Mengen Tryptophan und 1-L-Methyltryptophan (0 -  $10 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) supplementiert und mittels OKT3 stimuliert. Nach weiteren 48 h wurde das T-Zell-Wachstum mit Hilfe des  $[^3\text{H}]$ -Thymidin Einbaus gemessen. Die Sterne kennzeichnen das signifikante T-Zellwachstum nach L-Trp- und 1-L-MT-Zugabe (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ) im Vergleich zum Tryptophan-freien konditionierten Medium. Die Daten sind angegeben als  $[^3\text{H}]$ -Thymidineinbau  $\pm$  Standardfehler (SEM) von 2 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz.

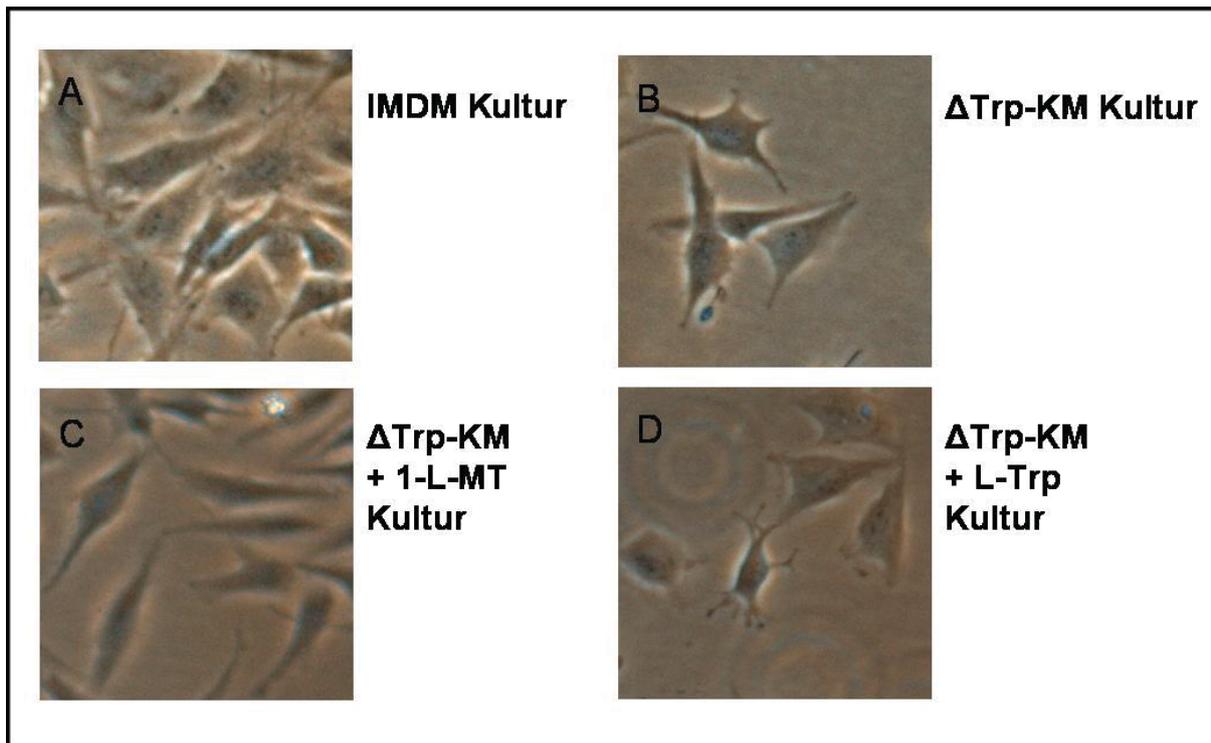
Um herauszufinden ob 1-L-MT die Aufnahme von L-Trp in T-Lymphozyten antagonisieren kann, wurde analog zu den Toxoplasmen der kompetitive Einbau von  $[^3\text{H}]$ -Trp in die T-Zellen untersucht. Hierbei sollten, wie zuvor bei den Parasiten (Abb. 3.6), sowohl unmarkiertes L-Trp als auch unmarkiertes 1-L-MT den Einbau von  $[^3\text{H}]$ -Trp kompetitiv antagonisieren. Dazu wurden die Immunzellen in  $\Delta\text{Trp-KM}$  von  $\text{IFN-}\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen zusammen mit  $0,75 \text{ }\mu\text{g/ml } [^3\text{H}]\text{-Trp}$  und unterschiedlichen Mengen unmarkiertem L-Trp als auch unmarkiertem 1-L-MT ( $0\text{-}75 \text{ }\mu\text{g/ml}$ ) kultiviert. Nach 48 stündiger Inkubationszeit erfolgte die Bestimmung des  $[^3\text{H}]$ -Trp Einbaus mittels Szintillationsmessgerät. Abb. 3.8. beschreibt den kompetitiven Einbau von radioaktivem Tryptophan in T-Zellen, gemessen als *counts per minute* (cpm) mittels Flüssig-Szintillations-Spektroskopie. Die gemessene Inkorporation des  $[^3\text{H}]$ -Trp in die Zellen war am höchsten in Abwesenheit von unmarkiertem L-Trp oder unmarkiertem 1-L-MT (schwarze Balken), da somit das  $[^3\text{H}]$ -Trp als einziges Substrat vorlag. In Gegenwart von unmarkiertem L-Trp als auch unmarkiertem 1-L-MT verringerte sich hingegen der Einbau von  $[^3\text{H}]$ -Trp in die Zellen signifikant. Dieser Effekt war sowohl bei 1-L-MT als

auch L-Trp dosisabhängig. Hohe Mengen der Aminosäuren antagonisierten in vergleichbarem Maße den Einbau von [<sup>3</sup>H]-Trp in die T-Zellen.



**Abb. 3.8: Antagonisierung des Einbaus von radioaktivem [<sup>3</sup>H]-Tryptophan in T-Zellen, durch unmarkiertes L-Tryptophan (L-Trp) und unmarkiertes 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).** 6,48 x 10<sup>6</sup> 86HG39 Zellen pro Zellkulturflasche (162 cm<sup>2</sup>) wurden mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  für 72 Stunden stimuliert. Anschließend wurde das Tryptophan-freie konditionierte Medium geerntet und diente als Kulturmedium für frisch isolierte T-Zellen. 1,5 x 10<sup>5</sup> Immunzellen pro Vertiefung wurden zusammen mit 0,75 µg/ml radioaktiv markiertem Tryptophan [<sup>3</sup>H]-Trp und unterschiedlichen Mengen unmarkiertem L-Trp oder unmarkiertem 1-L-MT (0 - 75 µg/ml) kultiviert und mit OKT3 stimuliert. Nach 48 Stunden Proliferationszeit wurde der Einbau des [<sup>3</sup>H]-Trp mittels Szintillations-Spektroskopie in *counts per minute* (cpm) gemessen. Die Sterne kennzeichnen die signifikante Antagonisierung des [<sup>3</sup>H]-Trp Einbaus durch L-Trp und 1-L-MT (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001). Die Daten sind als [<sup>3</sup>H]-Tryptophan Einbau  $\pm$  Standardabweichung aus 2 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz angegeben.

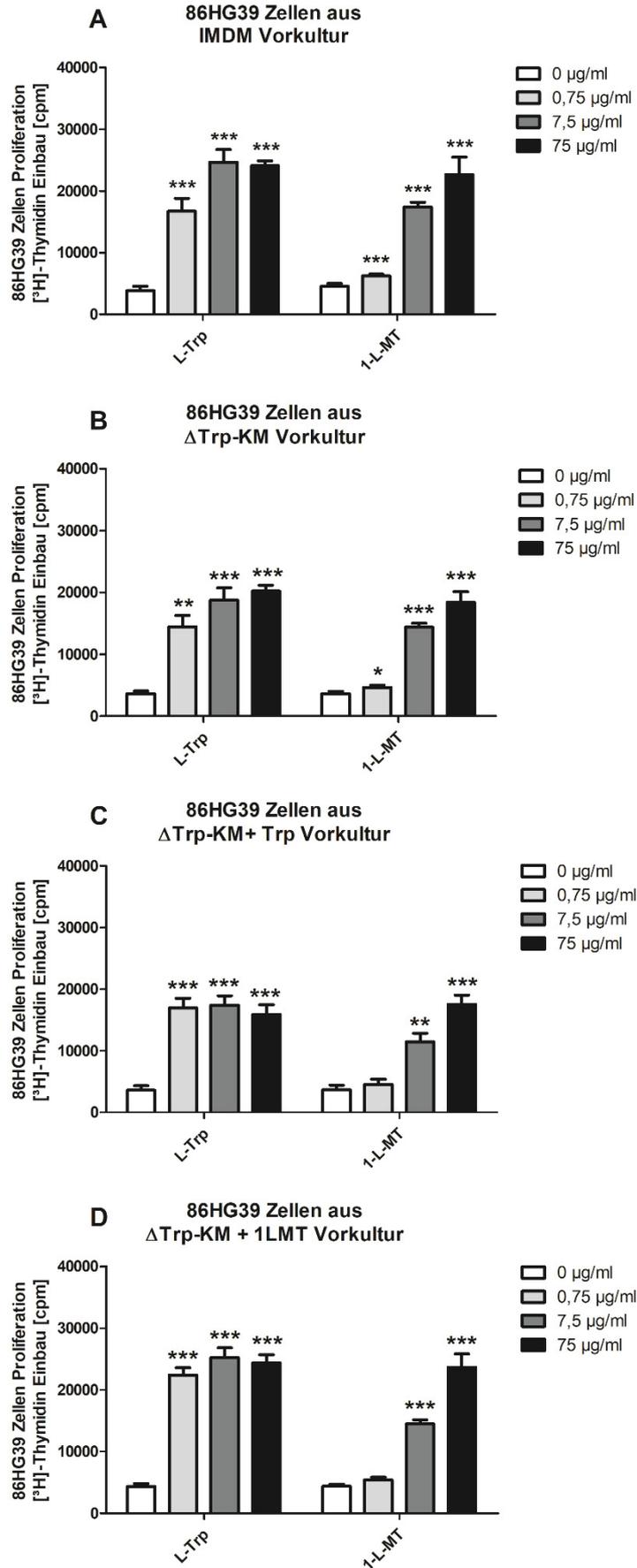
Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob Tumorzellen (86HG39 Glioblastomzellen) auch unter Tryptophanmangel überleben können. Hierzu wurden die Zellen ohne Nährstoff, nämlich in  $\Delta$ Trp-KM oder in  $\Delta$ Trp-KM mit einem Überschuss an 1-L-MT für längere Zeit kultiviert. So wurde untersucht, ob es durch den Tryptophanmangel oder das 1-L-MT Überangebot zu Zellschädigungen kommt. Anschließend wurde überprüft, ob diese Zellen noch in der Lage sind,IDO zu exprimieren und somit Bakterienwachstum hemmen zu können. Dazu wurden die 86HG39 Zellen in 4 verschiedenen Medien (IMDM,  $\Delta$ Trp-KM, mit und ohne Zugabe von L-Trp (100  $\mu$ g/ml) oder 1-L-MT (100  $\mu$ g/ml) vorkultiviert. Als konditioniertes Medium für die Vorkultur fungierten Tryptophan-freie Überstände von Tetrazyklin (15 ng/ml) stimulierten HeLa-TDO Zellen. Somit konnte ein unspezifischer IFN- $\gamma$  Effekt auf die Zellen ausgeschlossen werden. Das Wachstum der Zellen in den unterschiedlichen Medien wurde im Phasenkontrast mikroskopiert und fotografisch erfasst. Abb. 3.9 zeigt die Tumorzellen nach 96 stündiger Kultivierung. Das stärkste Wachstum erreichten die Zellen in 5 %igem IMDM Medium (A). In  $\Delta$ Trp-KM konnten die Zellen nicht oder kaum wachsen (B). Interessanterweise konnte ein stärkeres Wachstum der Zellen in konditioniertem Medium mit Zugabe von 1-L-MT (C) beobachtet werden, im Vergleich zu denen mit Zugabe von L-Trp (D). Die so kultivierten Tumorzellen wurden anschließend in weiteren Experimenten auf ihre Proliferations- und Funktionsfähigkeit überprüft.



**Abb. 3.9: Wachstum von 86HG39 Zellen in Tryptophan-freiem, konditioniertem Medium ( $\Delta$ Trp-KM) nach Supplementation von L-Tryptophan (L-Trp) und 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT).**  $3 \times 10^6$  86HG39 Zellen pro Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) wurden in IMDM + 5 % FCS Medium (A) oder in  $\Delta$ Trp-KM (B) mit zusätzlicher (C) 1-L-Methyltryptophan (100  $\mu$ g/ml) oder (D) L-Tryptophan (100  $\mu$ g/ml) Supplementation kultiviert. Als  $\Delta$ Trp-KM für die 86HG39 Zellen dienten die Überstände von Tetrazyklin (15 ng/ml) stimulierten HeLa-TDO Zellen. Anschließend wurden die adhärenenten Zellen nach 96 Stunden Inkubation mit einem Phasenkontrastmikroskop mikroskopiert und fotografiert.

Für die Proliferations- und Funktionstestung wurden die Zellen nach 4 Tagen geerntet und mit den 4 verschiedenen Medien erneut für 3 Tage kultiviert. Nach insgesamt 7 Tagen Kultivierung in den 4 verschiedenen Medien wurden die Zellen geerntet und auf ihre Proliferationsfähigkeit untersucht. Zu diesem Zweck diente, für die 86HG39 Zellen aus den 4 verschiedenen Vorkulturen,  $\Delta$ Trp-KM von Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen als Kulturmedium. Den Zellen wurden zum Wachstum unterschiedliche Mengen L-Trp oder 1-L-MT (0 - 75  $\mu$ g/ml) supplementiert. Die Proliferationsbestimmung erfolgte mit Hilfe der Messung des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die 86HG39 Zellen. Abb. 3.10 zeigt das Wachstum der Tumorzellen aus den verschiedenen Kulturbedingungen. Deutlich zu erkennen ist, dass keine Zellen aus den verschiedenen Vorkulturen im konditionierten Medium ohne Zugabe von L-Trp wachsen konnten (weiße Balken). Nach Zugabe von L-Trp und 1-L-MT konnte ein signifikantes Wachstum der Zellen gemessen werden. Wiederholt erwies sich L-Trp als ein besseres Substrat für die Zellen, da für das Erreichen der halbmaximalen Wachstumsrate nur etwa 10 % der Substratmenge von 1-L-MT benötigt wurde.

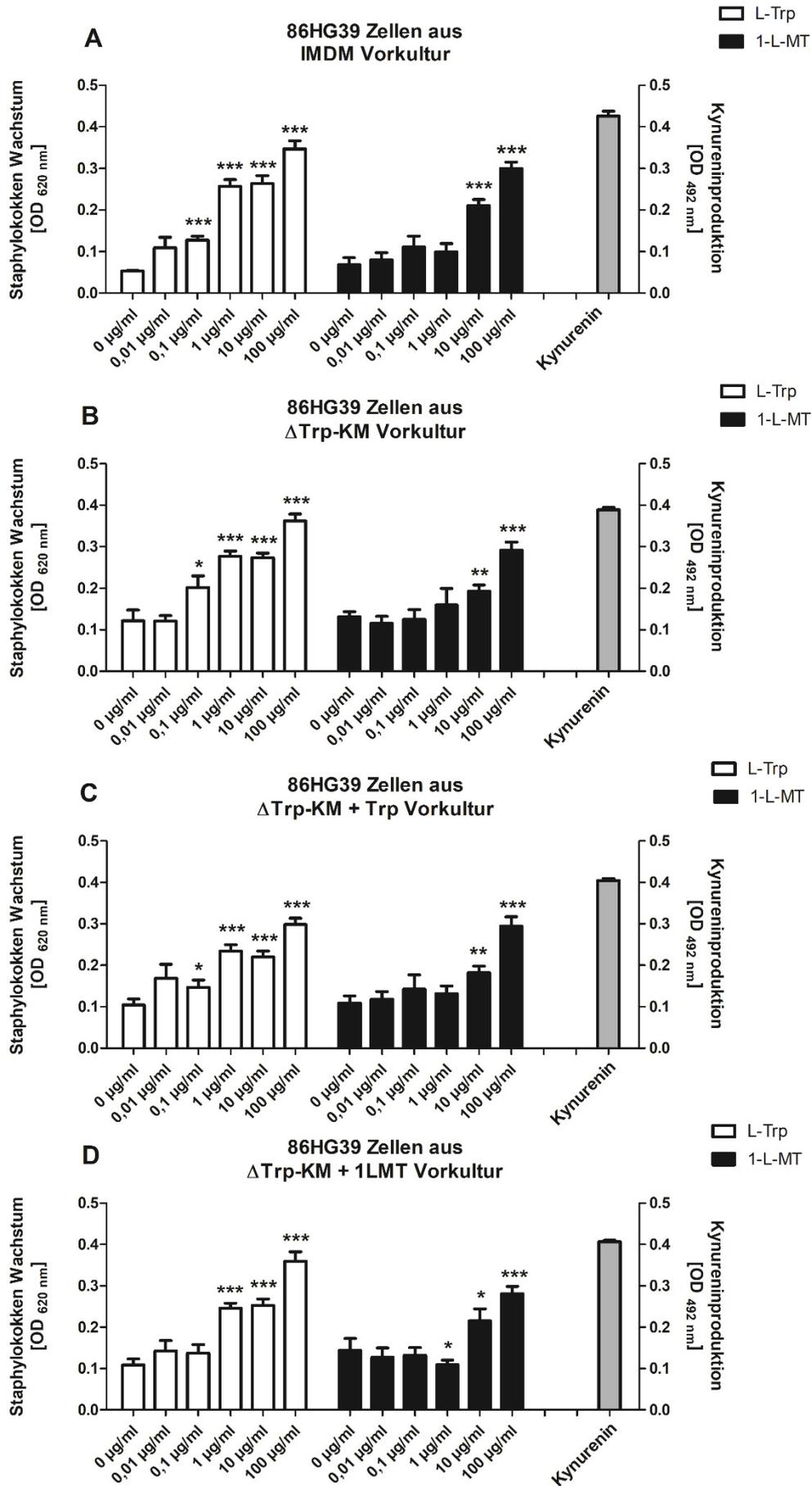
Vergleicht man das Proliferationsmaximum der Zellen aus den unterschiedlichen Vorkulturen, so zeigt sich, dass die Zellen aus der IMDM Kultur im Vergleich zu den Zellen aus dem  $\Delta$ Trp-KM mit und ohne Tryptophan-Zusatz knapp 10 000 cpm mehr aufwiesen. Interessanterweise war das Proliferationsmaximum der Zellen aus der IMDM Kultur und der  $\Delta$ Trp-KM + 1-L-MT Kultur mit maximal knapp 30 000 cpm vergleichbar. Dies scheint darauf hinzuweisen, dass die Zellen durch die Zugabe von 1-L-MT in  $\Delta$ Trp-KM gut kultiviert werden konnten. Ein Hinweis darauf war schon bei der Mikroskopie der Zellen nach 4 Tagen Kultivierung zu erkennen. Denn das Wachstum der Zellen in  $\Delta$ Trp-KM mit 1-L-MT-Zugabe war annähernd vergleichbar mit dem Wachstum der Zellen aus der IMDM Kultur (Abb. 3.9.A/C).



**Abb. 3.10: A-D Wachstum von 86HG39 Zellen aus Vorkultur, in Tryptophan-freiem konditioniertem Medium ( $\Delta$ Trp-KM), nach Supplementation von L-Tryptophan (L-Trp) und 1-L-Methyl-tryptophan (1-L-MT).** 86HG39 Zellen wurden für 7 Tage in IMDM + 5 % FCS Medium (A),  $\Delta$ Trp-KM (B), in  $\Delta$ Trp-KM mit 100  $\mu$ g/ml L-Trp (C) oder 100  $\mu$ g/ml 1-L-MT (D) vorkultiviert. Nach Gewinnung der Zellen wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung zusammen mit unterschiedlichen Mengen L-Trp oder 1-L-MT (0 - 75  $\mu$ g/ml) in  $\Delta$ Trp-KM gegeben. Nach 72 h wurde der Einbau von [ $^3$ H]-Thymidin mittels Szintillations-Spektroskopie gemessen. Als  $\Delta$ Trp-KM fungierten die Tryptophan-freien Überstände von Tetrazyklin (15 ng/ml) stimulierten HeLa-TDO Zellen. Die Sterne kennzeichnen das signifikante Wachstum der Zellen nach L-Trp und 1-L-MT Zugabe (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Daten sind als [ $^3$ H]-Thymidineinbau  $\pm$  Standardabweichung aus 3 Experimenten mit jeweils dreifachem Ansatz angegeben.

Für den Funktionstest wurden die Zellen aus den verschiedenen Vorkulturen auf ihre Fähigkeit untersucht, nach IFN- $\gamma$  Stimulation IDO zu exprimieren und durch Tryptophandepletion das Wachstum von Bakterien zu hemmen. Hierzu wurden die Zellen aus den unterschiedlichen Vorkulturen geerntet und je  $3 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung zusammen mit 5 %igem IMDM Medium auf Mikrotiterplatten überführt. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit 500 U/ml IFN- $\gamma$ . Nach 72 Stunden wurde die entstandene Kynureninmenge gemessen (Abb. 3.11. grauer Balken). Die Kynureninkonzentrationen waren in den Überständen der 86HG39 Zellen aus den verschiedenen Vorkulturen vergleichbar und es lag eine OD 492 nm von etwa 0,4 vor. Anschließend wurde untersucht, ob Bakterien in den Überständen der IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen wachsen konnten. So dienten die entstandenen Tryptophan-freien Überstände als Kulturmedium für *S. aureus*. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden den Überständen unterschiedliche Mengen L-Trp und 1-L-MT (0 - 100  $\mu$ g/ml) supplementiert. Nach 24stündiger Inkubation erfolgte die Messung des Bakterienwachstums photometrisch. Abb. 3.11. zeigt, dass das Wachstum der Bakterien in den  $\Delta$ Trp-KM der 86HG39 Zellen aus den 4 Vorkulturen gehemmt ist. Erst nach Zugabe unterschiedlicher Mengen L-Trp oder 1-L-MT kam es zu signifikantem Wachstum der Bakterien. Allerdings gab es messbare Unterschiede bei der Hemmung des Bakterienwachstums in den verschiedenen Tryptophan-freien Überständen. So war das Wachstum der Bakterien durch die IDO Expression der Zellen aus der IMDM Kultur am stärksten gehemmt. Hier lag die gemessene Absorption bei etwa 0,05 bei einer Wellenlänge von 620 nm. In den Zellüberständen der anderen 86HG39 Zellen lag eine geringere Hemmung vor. Die Absorption lag mit einem Wert von 0,1 bei einer Wellenlänge von 620 nm vor. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Tumorzellen aus allen vier Vorkulturen überlebt haben, weiterhin wachsen konnten und in der Lage waren nach IFN- $\gamma$  Stimulation IDO zu exprimieren. Außerdem waren die Zellen in der Lage, auch nach längerer

Kultivierung (über 2 Wochen) in Tryptophan-freiem, konditioniertem Medium, sowie in  $\Delta$ Trp-KM mit 1-L-MT Zugabe, zu überleben und ihre antimikrobiellen Eigenschaften zu erhalten. Der genaue Mechanismus ist zurzeit unbekannt. Es ist jedoch denkbar, dass die Zellen während der Kultivierung bei Tryptophanmangel in Arrest gehen oder ihren Stoffwechsel herunterregulieren, um so zu überleben.



**Abb. 3.11: Erhalt der Funktionalität von 86HG39 Zellen, die in IMDM +5 % FCS Medium, Tryptophan-freiem konditioniertem Medium ( $\Delta$ Trp-KM), mit und ohne Zugabe von 100  $\mu$ g/ml L-Tryptophan oder 100  $\mu$ g/ml 1-L-Methyltryptophan vorkultiviert wurden.** 86HG39 Zellen wurden 7 Tage in IMDM + 5 % FCS Medium (A),  $\Delta$ Trp-KM (B), in  $\Delta$ Trp-KM mit Supplementation von (100  $\mu$ g/ml) Tryptophan (L-Trp) (C) oder (100  $\mu$ g/ml) 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT) (D) kultiviert. Anschließend wurden  $3 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung in IMDM + 5 % FCS Medium überführt und mit 500 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die Kynureninproduktion gemessen (grauer Balken). Danach wurden die Tryptophan-freien Überstände mit *Staphylococcus aureus* infiziert und unterschiedliche Mengen L-Trp und 1-L-MT (0 - 100  $\mu$ g/ml) supplementiert. 24 Stunden nach Infektion wurde das Bakterienwachstum photometrisch gemessen. Die Sterne kennzeichnen das signifikante Wachstum der Bakterien nach L-Trp- und 1-L-MT-Zugabe (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus 3 Experimenten mit jeweils vierfachem Ansatz angegeben.

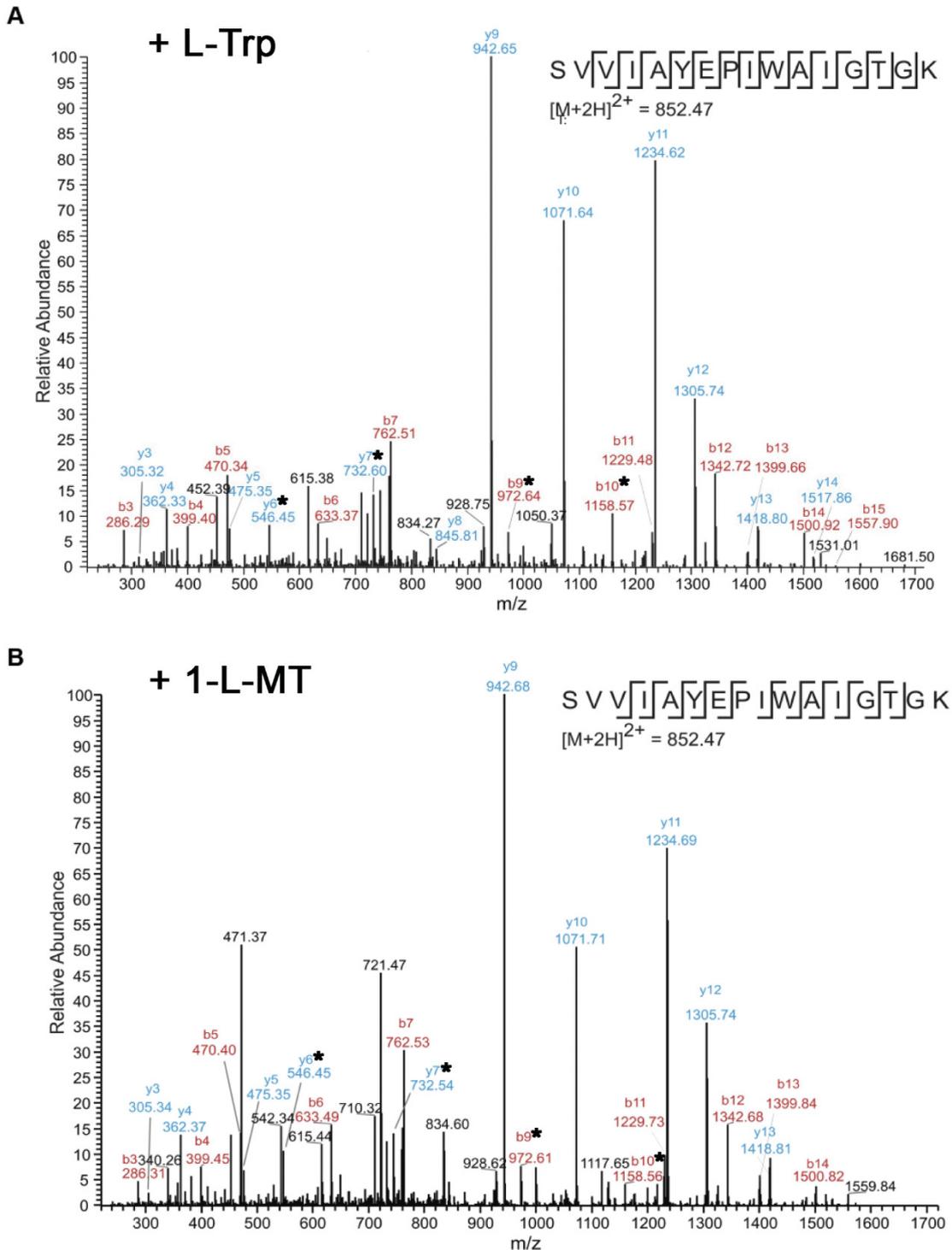
### 3.2 Analyse von 1-L-Methyltryptophan

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde untersucht, warum 1-L-MT in der Lage ist, die antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekte derIDO aufzuheben, ohne denIDO vermittelten Tryptophanabbau kompetitiv zu hemmen. Die beobachteten Ergebnisse ließen darauf schließen, dass die Zellen, welche in einem  $\Delta$ Trp-KM kultiviert wurden, mit 1-L-MT anstelle von L-Trp wachsen konnten und dass 1-L-MT in die Proteine eingebaut werden konnte.

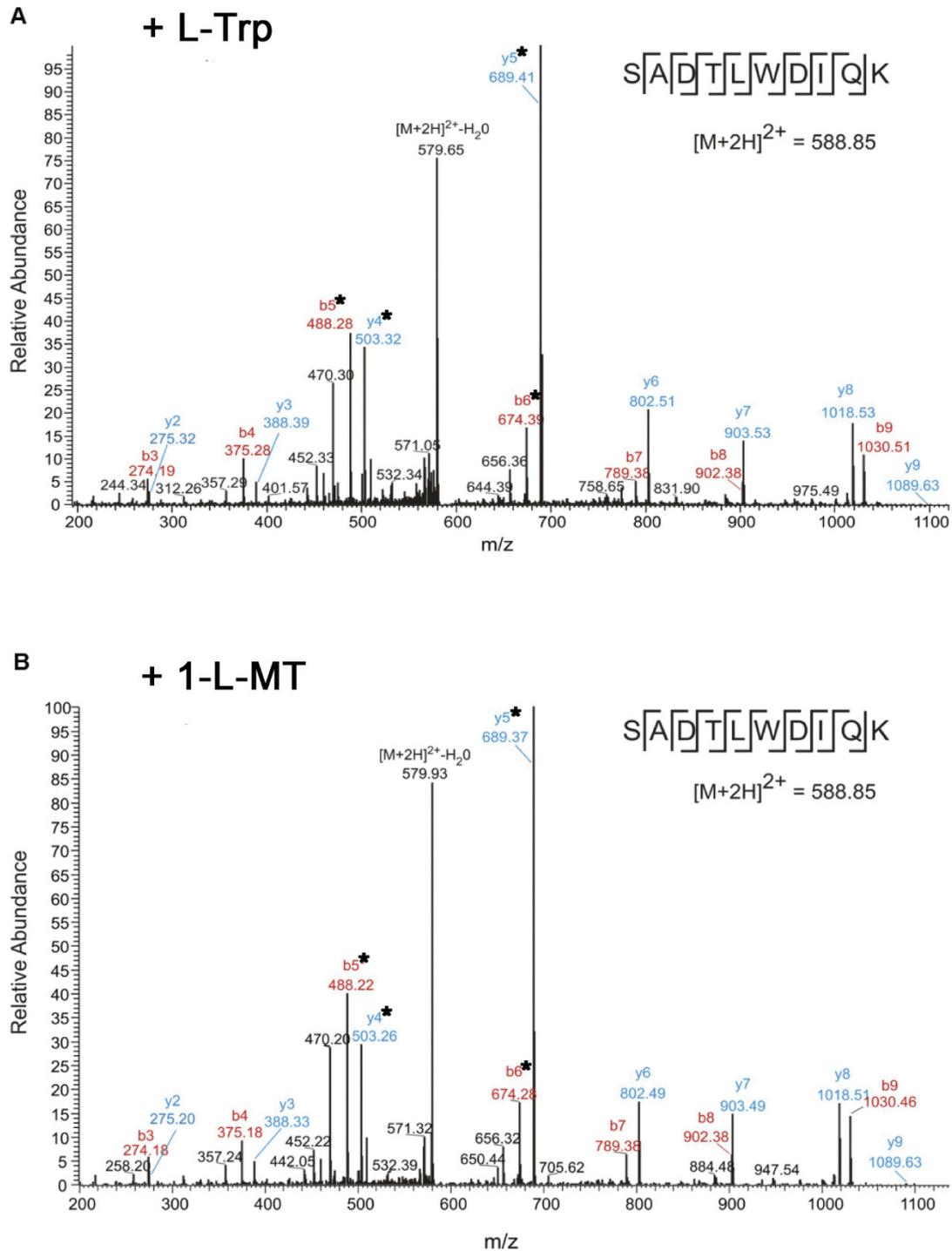
Zur Überprüfung, dass 1-L-MT das L-Trp in den Proteinen ersetzt, erfolgte die Untersuchung von Proteinen aus Bakterien und Tumorzellen. Dazu wurden Peptide von *S. aureus* mittels Massenspektroskopischer Analyse auf das Vorhandensein von 1-L-MT untersucht. Hierzu erfolgte die Kultivierung der Bakterien in Tryptophan-freiem Medium, welches aus RPMI und Panexin, einem chemisch hergestellten Serumersatz, bestand. Diesem Tryptophan-freien Medium wurden zum Zeitpunkt der Infektion 100  $\mu$ g/ml L-Trp (Abb. 3.12.A) oder 100  $\mu$ g/ml 1-L-MT (Abb. 3.12.B) hinzugegeben. Nach 18h wurden die Bakterien geerntet und lysiert, um die Peptide mit Hilfe der Massenspektroskopie zu untersuchen. Abb. 3.12 zeigt beispielhaft das Peptid SVVIAYEPIWAIGTGK der Triosephosphat Isomerase aus beiden Kulturen. Es ist deutlich zu erkennen, dass Tryptophan in dem Peptid der beiden Experimentalgruppen enthalten ist (Sternchen). Allerdings konnte kein Nachweis von 1-L-Methyltryptophan erfolgen. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass 1-L-Methyltryptophan anstelle von Tryptophan in Proteine der Bakterien eingebaut wird und dass das ermittelte Wachstum aus den Experimenten im ersten Teil der Arbeit alleine durch den Austausch von Tryptophan gegen 1-L-Methyltryptophan hervorgerufen wird.

Nach der Feststellung, dass 1-L-MT nicht in Proteine von Bakterien eingebaut wird, erfolgte eine Proteinanalyse von menschlichen 86HG39 Glioblastom-Zellen. Hierzu

wurden die Tumorzellen, ähnlich wie die Bakterien, in Tryptophan-freiem Medium (RPMI +10 % Panexin) in der Anwesenheit von 100 µg/ml L-Trp (Abb. 3.13.A) oder 100 µg/ml 1-L-MT (Abb. 3.13.B) für 15 Wochen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Mittels Massenspektroskopischer Analyse erfolgte die Untersuchung des Peptides SADTLWDIQK, der menschlichen L-Laktat Dehydrogenase aus der B-Untereinheit, von 86HG39 Zellen (Abb. 3.13). Auch hier war deutlich zu erkennen, dass das Peptid aus beiden Kulturen Tryptophan (mit Sternchen markiert), aber niemals 1-L-MT enthielt. Somit konnte festgestellt werden, dass auch das beobachtete Wachstum der humanen Zellen nicht auf den bloßen Austausch von L-Trp durch 1-L-MT in den Proteinen zurückzuführen war.

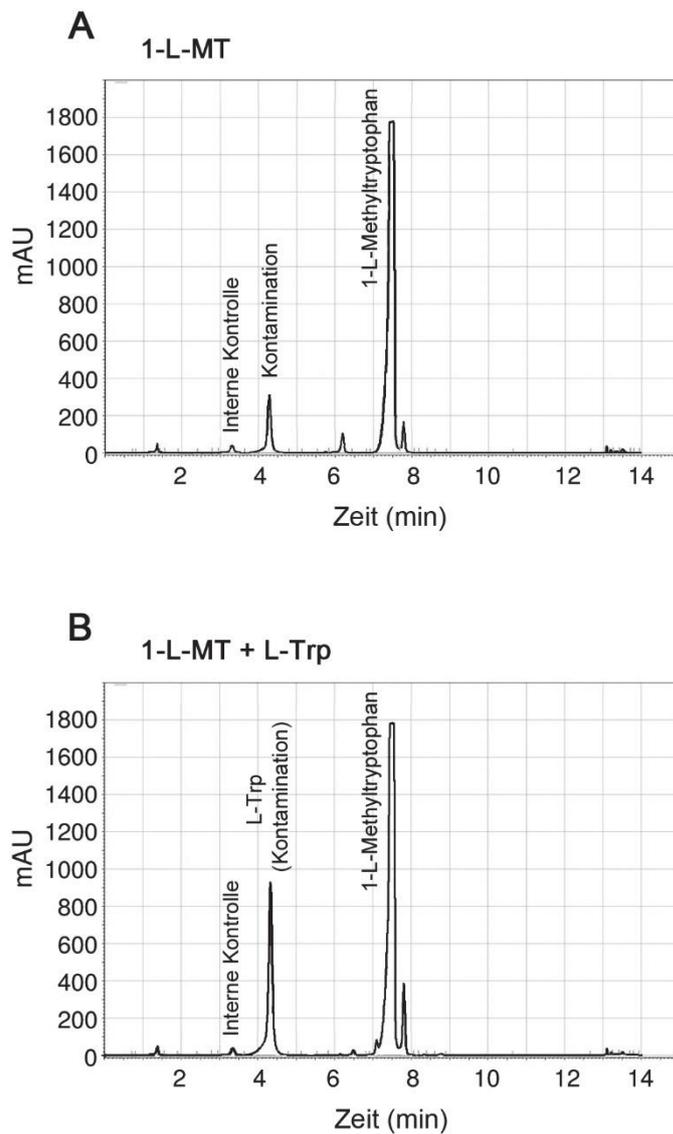


**Abb. 3.12: MS/MS Spektroskopische Analyse eines Tryptophan enthaltenden Proteins aus *S. aureus*.** *S. aureus* wurde in der Anwesenheit von L-Tryptophan (A) oder 1-L-Methyltryptophan (B) für 18 h kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien lysiert und das Peptid SVVIA<sup>+</sup>YEPIWAIGTGK der Triosephosphat Isomerase, von *S. aureus* mittels Massenspektroskopie analysiert. Die Auswertung des MS/MS-Spektren erfolgte mit Hilfe des Mascot Suchalgorithmus. Das untersuchte Protein enthält in beiden Experimentalgruppen L-Tryptophan und kein 1-L-Methyltryptophan (W = L-Trp). Die detektierten Tryptophanüberstände sind gut sichtbar und mit einem Sternchen markiert (\*) (Schmidt *et al.*, 2012).



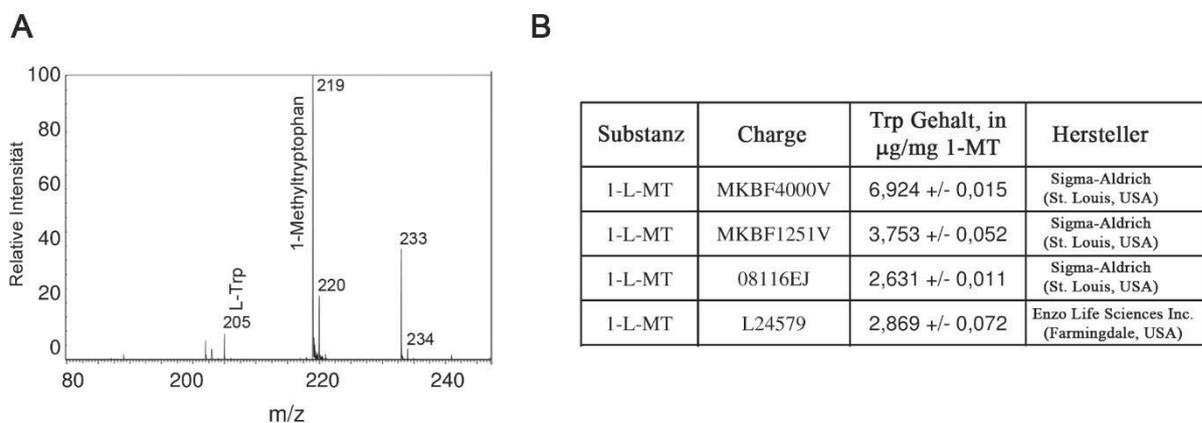
**Abb. 3.13: MS/MS Spektroskopie eines Tryptophan enthaltenden Proteins von 86HG39 Zellen.** 86HG39 Zellen wurden in der Anwesenheit von L-Tryptophan (L-Trp) (A) oder 1-L-Methyltryptophan (1-L-MT) (B) für 15 Wochen kultiviert. Die geernteten Zellen wurden lysiert und anschließend das Peptid SADTLWDIQK der menschlichen L-Laktat Dehydrogenase auf der B-Kette mittels Massenspektroskopie analysiert. Unter Verwendung des Mascot Suchalgorithmus erfolgte die Auswertung der MS/MS-Spektren. Das analysierte Peptid enthält in beiden Experimentalgruppen L-Trp und kein 1-L-MT ( $W = L-Trp$ ). Die detektierten Tryptophanüberstände sind gut sichtbar und mit einem Sternchen markiert (Schmidt *et al.*, 2012).

Zur Erklärung des Effektes, dass Zellen mit 1-L-MT wachsen können, allerdings kein Nachweis des Einbaus von 1-L-MT in den Proteinen der Zellen zu erreichen war, wurde nun handelsübliches 1-L-Methyltryptophan auf seine Zusammensetzung hin untersucht, weil eine mögliche Verunreinigung des 1-L-Methyltryptophan verantwortlich für diese Ergebnisse sein könnte. Der Hersteller des 1-L-Methyltryptophans gibt eine Reinheit von mindestens 95 % an. Eine Angabe zur Art der 5 %igen Verunreinigung wurde nicht gemacht. Um eine mögliche Kontamination des 1-L-MT mit anderen Aminosäuren auszuschließen, erfolgte die Analyse verschiedener Chargen auf ihre Zusammensetzung. Dafür wurde 1-L-MT in Tryptophan-freiem RPMI Medium gelöst und mit Hilfe der HPLC Chromatographie auf seine Zusammensetzung hin untersucht. Abb. 3.14.A zeigt eine deutliche Detektion des 1-L-MT-Peaks bei einer Retentionszeit von 7,6 min. Nach 4,2 min konnte ein zusätzlicher Peak verzeichnet werden, der die Verunreinigung darstellt. Um die Zusammensetzung der Verunreinigung zu analysieren, erfolgte nun die zusätzliche Zugabe von L-Trp in die 1-L-MT-Probe. Dadurch konnte die Laufzeit des Kontaminationspeaks und des Tryptophanpeaks miteinander verglichen werden. Bei der anschließenden Messung wurde das supplementierte Tryptophan zur gleichen Zeit gemessen (4,2 min), wie der Peak der Verunreinigung in der vorherigen Messung. Somit gelang der Nachweis, dass es sich bei der Verunreinigung des 1-L-Methyltryptophans mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Tryptophan handelt.



**Abb. 3.14: HPLC-Analyse von 1-L-Methyltryptophan, das in Tryptophan-freiem RPMI Medium gelöst wurde.** Das dargestellte HPLC Chromatogramm zeigt den 1-L-MT-Peak bei einer Zeit von 7,6 min und den Peak der Kontamination nach 4,2 min (B). Nach Zugabe von L-Tryptophan in die zuvor analysierte Probe konnte der Tryptophan-Peak zur gleichen Zeit wie der Peak der Kontamination detektiert werden. Zur internen Kontrolle der Analyse wurde 3-Nitrotyrosin (mit einer Laufzeit von 3,5 min) eingesetzt (Schmidt *et al.*, 2012).

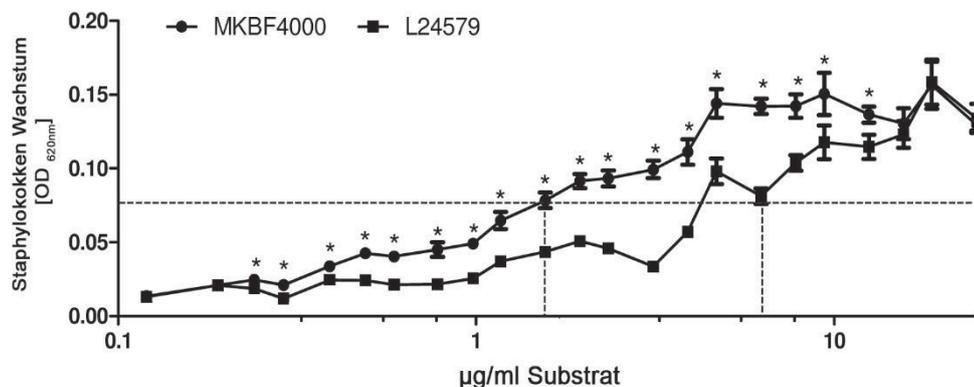
Zur Bestätigung der Tryptophan-Kontamination wurde anschließend das 1-L-Methyltryptophan mit Hilfe der Massenspektroskopischen Analyse nochmals untersucht. Auch in der MS Analyse gelang der Nachweis von Tryptophan in der 1-L-Methyltryptophan-Probe (Abb. 3.15.A). Daraufhin wurden weitere 1-L-Methyltryptophan Chargen mittels HPLC Chromatogramm auf eine mögliche Tryptophan Kontamination untersucht. Es zeigte sich, dass alle untersuchten Chargen mit Tryptophan kontaminiert waren (Abb. 3.15.B). Allerdings gab es messbare Unterschiede in der Höhe der Tryptophankonzentration. So zeigte sich die höchste Konzentration mit 6,924  $\mu\text{g}/\text{mg}$  1-L-MT in der MKBF4000V Charge.



**Abb. 3.15: Massenspektroskopie Analyse von 1-L-MT.** Handelsübliches 1-L-MT wurde in Tryptophan-freiem RPMI Medium gelöst und anschließend mittels MS Analyse untersucht. Es konnten sowohl 1-L-MT ( $m/z$  von 219) als auch Tryptophan ( $m/z$  von 205) detektiert werden (A)  $n = 1$ . Die Tabelle gibt die Tryptophan-Menge in  $\mu\text{g}/\text{mg}$  1-Methyltryptophan in den unterschiedlichen 1-L-MT-Chargen an (B) (Schmidt *et al.*, 2012).

Diese Ergebnisse zeigten eindeutig, dass handelsübliches 1-L-Methyltryptophan mit Tryptophan kontaminiert war. Somit ist das beobachtete Wachstum nach 1-L-MT Zugabe mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf die Tryptophan Kontamination zurückzuführen. Da allerdings die einzelnen 1-L-MT Chargen unterschiedliche Mengen L-Trp enthalten, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, ob diese Tryptophankonzentrationsunterschiede einen Einfluss auf das Bakterienwachstum haben. So wurde in Analogie zu den vorherigen Experimenten für das Bakterienwachstum ein Tryptophan-freies Medium verwendet. Anders als in den Experimenten im ersten Teil der Arbeit stammte das Medium nicht von IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen, sondern es wurde Tryptophan-freies RPMI-Medium mit einem chemischen Serumzusatz (Panexin 10 %) verwendet. So konnten eine unzureichende Tryptophandepletion und eine

Kontamination mit Tumorzellbestandteilen ausgeschlossen werden. Die Bakterien wurden in das Tryptophan-freie Medium zusammen mit unterschiedlichen Mengen 1-L-Methyltryptophan (0 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) überführt. Das Bakterienwachstum wurde 16 h nach Infektion photometrisch gemessen. Abb. 3.16 zeigt das Wachstum mit 1-L-Methyltryptophan aus 2 verschiedenen Chargen (MKBF4000V; L24579). Gut zu erkennen ist, dass die Bakterien dosisabhängig mit 1-L-MT aus beiden Chargen wachsen konnten. Allerdings gab es Unterschiede beim Bakterienwachstum. So konnte ein signifikant stärkeres Bakterienwachstum ( $p < 0,05$ ) mit dem 1-L-MT aus Charge MKBF4000 gemessen werden. Die benötigte 1-L-MT Menge zum Erreichen des halbmaximalen Wachstums lag für Charge MKBF4000V bei etwa 2  $\mu\text{g/ml}$ . Im Gegensatz dazu lag die benötigte Menge 1-L-MT aus Charge L24579 für das gleiche Wachstum bei etwa 6  $\mu\text{g/ml}$ . Vergleicht man nun die Tryptophankontamination der Chargen (Abb. 3.15.B), so fällt auf, dass Charge MKBF4000 eine mehr als doppelt so hohe Tryptophan Menge pro mg 1-L-Methyltryptophan aufweist als Charge L24579 (6,924  $\mu\text{g/mg}$  1-LMT zu 2,869  $\mu\text{g/mg}$  1-L-MT)



**Abb. 3.16: Bakterienwachstum in Tryptophan-freiem Medium mit 1-L-MT aus unterschiedlichen Chargen.** *S. aureus* wurde in Tryptophan-freies RPMI-Medium mit 10 % Panexin überführt. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden unterschiedliche Mengen 1-L-Methyltryptophan (0 - 200  $\mu\text{g/ml}$ ) aus verschiedenen Chargen (MKBF4000; L24579) supplementiert. Nach 16 h wurde das Wachstum photometrisch bestimmt. Die Sterne markieren das signifikant stärkere Wachstum der Bakterien mit dem 1-L-MT aus der Charge MKBF4000 ( $p < 0,05$ ) (Schmidt *et al.*, 2012).

Dieses Ergebnis bestätigt, dass das Wachstum der einzelnen Zellen abhängig von der Höhe der jeweiligen Tryptophankontamination im untersuchten 1-L-MT ist.

Zusammenfassend zeigen die beobachteten Effekte, dass 1-L-Methyltryptophan die IDO vermittelten Effekte in *in vitro* Experimenten aufheben kann und es außerdem Bakterien, Toxoplasmen, T-Zellen und Tumorzellen ermöglicht, in Tryptophan-freiem Medium zu wachsen. Dazu erfolgte eine Analyse von Proteinen aus Bakterien und Tumorzellen, auf den Einbau von 1-L-MT anstelle von L-Trp. Die Untersuchung ergab keinen Nachweis von 1-L-MT in den Proteinen der Zellen. Anschließend wurde 1-L-MT aus verschiedenen Chargen auf seine Reinheit überprüft. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Chargen 1-L-MT mit unterschiedlichen Mengen L-Trp kontaminiert sind. Somit waren die beobachteten Effekte durch die Tryptophankontamination erklärbar.

## 4. Diskussion

Die Beeinflussung des Tryptophanhaushaltes spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel vieler Lebewesen. Tryptophan ist der zentrale Ausgangspunkt für die Bildung verschiedenster Stoffwechselprodukte, z.B. der Hormone Serotonin und Melatonin oder ist als Baustein bei der Proteinbiosynthese von wesentlicher Bedeutung.

Der größte Teil (etwa 90%) des Tryptophans wird allerdings über den Kynurenin Stoffwechselweg abgebaut. Dabei wird der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt, nämlich die oxidative Spaltung des Indolringes des Tryptophans zu N-Formylkynurenin durch die Enzyme IDO, IDO-2 und TDO katalysiert. Anschließend kommt es dann durch die Kynurenin-Formidase zur Bildung von Kynurenin. Die IDO vermittelte Aktivität spielt durch die Bildung von Kynurenin eine wichtige und zentrale Rolle bei der Tumortoleranz, als auch bei der Immunantwort (Löb *et al.*, 2009).

In den letzten Jahren wurden die IDO-vermittelten antimikrobiellen Eigenschaften in Bezug auf verschiedene Parasiten, wie *Toxoplasma gondii* oder *Neospora caninum* untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass der Abbau des Tryptophans durch die IFN- $\gamma$  stimulierte IDO, eine Hemmung des Wachstums von *Toxoplasma gondii* (Pfefferkorn 1984) oder *Neospora caninum* hervorruft (Spekker *et al.*, 2009). Die beobachtete Wachstumshemmung wurde durch den IDO vermittelten Tryptophanabbau und den damit verbundenen Tryptophanmangel hervorgerufen, denn durch Tryptophanzugabe konnten die antimikrobiellen Effekte aufgehoben werden.

Andere Untersuchungen konnten ebenfalls einen Einfluss der IDO auf das Immunsystem und bei der Abwehr gegenüber Bakterien nachweisen. So wurde in *in vitro* Experimenten beschrieben, dass die IDO das Wachstum unterschiedlicher Bakterien, wie Streptokokken der Gruppe B (MacKenzie *et al.*, 1998), Enterokokken (MacKenzie *et al.*, 1999) oder *Staphylococcus aureus* (Schroten *et al.*, 2001) hemmen konnte. Ebenso kann durch die IDO Aktivierung und den damit verbundenen Tryptophan Abbau das Wachstum von intrazellulär wachsenden Bakterien wie *Rickettsia conorii* gehemmt werden (Feng & Walker, 2000). Auch das Wachstum von Chlamydien (*Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia muridarum*) wird durch die IFN- $\gamma$  stimulierte IDO gehemmt. Hierbei scheint ebenfalls der Abbau von Tryptophan eine maßgebliche Rolle zu spielen (Roshick *et al.*, 2006). Vor allem *Chlamydia pneumoniae* reagiert besonders sensitiv auf eine Tryptophandepletion (Huston *et al.*, 2014). Allerdings kommt

es hierbei nicht nur zu einer Unterbindung der akuten Infektion, sondern dieser Stamm ist in der Lage bei Tryptophanmangel in der Zelle zu persistieren und nach Abklingen der Immunantwort, sowie Normalisierung der Tryptophankonzentration wieder zu wachsen und erneut eine Infektion auszulösen (Huston *et al.*, 2014). Solch ein Mechanismus könnte theoretisch auch bei der chronischen Form einer *Toxoplasma gondii* Infektion eine Rolle spielen.

DieIDO vermittelt ihre antibakterielle und antiparasitäre Wirkung durch den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin. Dabei spielen zum einen die Tryptophandepletion und zum anderen auch die direkte toxische Wirkung von Kynurenin und seiner Abbauprodukte, wie z.B. 3-Hydroxy-Kynurenin, welches beispielsweise besonders potent gegen *Listeria monocytogenes* (Niño-Castro *et al.*, 2014) oder *Escherichia coli* (Narui *et al.*, 2009) wirkt, eine Rolle. Allerdings scheint für die direkte toxische Wirkung von Kynurenin und seiner Abbauprodukte, eine sehr hohe Konzentration für die vollständige Hemmung des Wachstums notwendig zu sein, was *in vivo* wohl nicht ohne weiteres vorstellbar wäre.

Nicht nur antimikrobielle oder antiparasitäre, sondern auch immunmodulatorische Effekte werden durch eineIDO vermittelte Reaktion hervorgerufen. So wird beispielsweise das Wachstum von T-Zellen durch eineIDO-Aktivierung gehemmt (Munn *et al.*, 1998; Munn *et al.*, 1999).

Diese Ergebnisse zeigen, dass es durch dieIFN- $\gamma$  stimulierte,IDO vermittelte Tryptophandepletion zu diesen antimikrobiellen und immunregulatorischen Effekten kommt. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte zusätzlich durch andereIFN- $\gamma$  stimulierte Stoffwechselwege, wie der Aktivierung der ebenfalls antimikrobiell wirksamen NO-Synthase (iNOS) (Nathan, 1992), hervorgerufen werden können. Wie bereits zitiert können Rickettsien viaIDO aber auch via iNOS gehemmt werden. Dabei ist auffällig, dass in humanen Zellen zumeist dieIDO an der Erregerabwehr beteiligt ist, im Gegensatz aber bei murinen Zellen die iNOS Antwort überwiegt (Feng & Walker, 2000). Interessanterweise kommt es *in vivo* durch iNOS produziertes NO zu einer Hemmung derIDO Aktivität. Dies verdeutlicht, dass beideIFN- $\gamma$  stimulierten Enzyme unabhängig voneinander antimikrobielle Effekte aufweisen, aber sich *in vivo* gegenseitig beeinflussen können (Hucke *et al.*, 2004).

Zusätzlich untersuchte man, ob andere Enzyme, welche Tryptophan zu Kynurenin abbauen in der Lage sind, diese Effekte hervorzurufen. Dabei wurde die bis dato noch wenig erforschte TDO auf ihre antimikrobiellen und immunregulatorischen Wirkungen

hin untersucht. 2009 konnte erstmals nachgewiesen werden, dass auch via rekombinant exprimierter TDO das Wachstum von *Toxoplasma gondii*, *Staphylococcus aureus* und von T-Zellen gehemmt werden konnte (Schmidt *et al.*, 2009). Dabei war es möglich, die beschriebenen wachstumshemmenden Effekte durch die nachträgliche Zugabe von Tryptophan wieder rückgängig zu machen. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten Wirkungen der IDO und auch der TDO auf die „Tryptophanverarbeitung“ des Nährmediums zurückzuführen sind und nicht auf zusätzliche Nebeneffekte.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand das Zusammenwirken der IDO mit dem Tryptophanstoffwechsel und den damit verbundenen immunologischen, antimikrobiellen und tumorspezifischen Effekten. Dabei wurden vor allem die Eigenschaften des spezifischen Inhibitors der IDO, dem 1-MT untersucht. Dieses Tryptophanalogon kommt in unterschiedlichen Isoformen, dem 1-L-MT, 1-D-MT und dem Racemat 1-DL-MT vor. In der Literatur werden dabei die Wirksamkeiten der unterschiedlichen Isoformen in *in vitro* oder in *in vivo* Experimenten kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass durch das L-Isomer die IDO-Enzymaktivität in unterschiedlichen menschlichen Zellen, wie zum Beispiel Lungen-, Tumor- oder dendritischen Zellen in *in vitro* Experimenten besser gehemmt werden kann als durch 1-D-MT (Heseler *et al.*, 2008; Löb *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2009). Es konnte dargestellt werden, dass 1-D-MT kein effizienter Inhibitor der IDO Enzymaktivität ist. So liegt die  $K_i$  von 1-L-MT bei 19  $\mu\text{mol/l}$ , von 1-DL-MT bei 34  $\mu\text{mol/l}$  und von 1-D-MT wurde bis 100  $\mu\text{mol/l}$  keine IDO Inhibition gefunden (Hou *et al.*, 2007). Dabei ist 1-D-MT nicht in der Lage die Aktivität der IDO oder der IFN- $\gamma$  stimulierten IDO in Tumorzellen zu hemmen (Hou *et al.*, 2007). Ferner ist die Affinität der IDO zu 1-L-MT um das 10fache höher im Vergleich zu 1-D-MT (Peterson *et al.*, 1994.). Diese Ergebnisse zeigten, dass nur 1-L-MT ein potenter Inhibitor der IDO-Enzymaktivität *in vitro* ist.

Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen der Wirksamkeit der Isoformen in *in vivo* Studien eine Diskrepanz der zuvor beschriebenen Effekte. Bei der Verwendung des IDO spezifischen Inhibitors 1-MT, zur Aufhebung des IDO vermittelten „Tumor-escape“, stellte sich das 1-MT Racemat als ein effektiver Inhibitor heraus (Uyttenhove *et al.*, 2003; Friberg *et al.*, 2002). In den folgenden Jahren wurde sowohl die D- als auch die L-Isoform auf ihre immunregulatorische Wirkung in *in vivo* Experimenten einzeln untersucht. So konnte gezeigt werden, dass 1-D-MT im Maus-Modell eine größere Anti-Tumor-Wirkung besitzt als 1-L-MT, obwohl 1-D-MT kein kompetitiver Hemmer der IDO ist (Hou *et al.*, 2007). Außerdem zeigte sich, dass 1-D-MT mit einer Kombination

verschiedener Chemotherapeutika wie Cyclophosphamid, Paclitaxel oder Gemcitabin effektiver wirkt als 1-L-MT (Hou *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu wurde 2009 beschrieben, dass vor allem 1-L-MT in der Lage sei, die von Tumorzellen exprimierte IDO zu inhibieren und damit den Tryptophanabbau aufzuheben (Löb *et al.*, 2009). Weiterhin konnte 2010 bewiesen werden, dass die Wirksamkeit von 1-L-MT auf Magen- oder Blasen Tumoren *in vivo* durch die Kombination mit APO866, einem Nicotinamid-Phosphoribosyl-Transferase-Inhibitor, verstärkt wird (Yang *et al.*, 2010). Hierbei wird vor allem eine Kombination der Wirkungen auf die Tumorzellen und das Immunsystem verantwortlich gemacht. So kommt es durch APO866 zu einer Reduzierung des NAD in murinen Tumorzellen und 1-L-MT führt zu einer Aktivierung des Immunsystems, indem es durch die Hemmung der IDO von dendritischen Zellen zur Aktivierung des T-Zellwachstums kommt. Im Gegensatz dazu konnte eine Kombination von 1-D-MT mit Paclitaxel eine signifikante Überlebenszeitverlängerung bei der Therapie des metastasierten Ovarialkarzinom in Mäusen bewirken (Inaba *et al.*, 2009). Hierbei wirkt 1-D-MT nicht zytotoxisch, sondern verstärkt die toxische Wirkung des Chemotherapeutikums auf IDO exprimierende Tumoren.

Zur Erklärung warum 1-D-MT eine bessere Anti-Tumorwirkung in *in vivo* Experimenten aufweist, wurde diskutiert ob die Hemmung der IDO-2, einem weiteren, der IDO ähnlichen, Tryptophan-abbauenden Enzym, dafür verantwortlich ist (Metz *et al.*, 2007). Beide Enzyme besitzen eine 43 %ige Homologie in ihren Aminosäuresequenzen (Ball *et al.*, 2007). Ihr Vorkommen unterscheidet sich allerdings voneinander. Während die humane IDO vor allem in der Lunge, dem Intestinum und der Plazenta ihre höchste Konzentration aufweist (Takikawa, 2005), wurde die IDO-2 mRNA vor allem in Zellen von Pankreastumoren (Witkiewicz *et al.*, 2009), Magen-, Kolon- oder Nierentumoren nachgewiesen (Löb *et al.*, 2009).

Die Beeinflussung der IDO-2 durch 1-L-MT oder 1-D-MT wird kontrovers diskutiert. So wird von anderen Arbeitsgruppen 1-L- und nicht 1-D-MT als wirksameren Inhibitor der IDO-2 beschreiben (Austin *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2012; Yuasa *et al.*, 2010). Außerdem scheint es unwahrscheinlich, dass die IDO-2 eine direkte Rolle durch den Abbau von L-Trp spielt, da der  $K_m$ -Wert der humanen IDO-2 für L-Trp, mit etwa 6,8 mM um ein hundertfaches höher ist als die physiologische Tryptophankonzentration. Somit ist die enzymatische Aktivität der IDO-2 sehr viel geringer als die der IDO oder der TDO und erscheint somit vernachlässigbar (Pantouris *et al.*, 2014).

Andere Studien zeigten, dass der immunregulatorische Wirkmechanismus des 1-D-MT weder auf der Hemmung der IDO-Enzymaktivität in dendritischen Zellen noch in Tumorzellen basiert (Löb *et al.*, 2009; Löb *et al.*, 2008). 2011 konnte gezeigt werden, dass 1-D-MT in der Lage ist, die Kynureninproduktion in Folge einer verstärkten Expression der IDO mRNA in Tumorzellen zu steigern (Opitz *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass das Racemat des Methyltryptophans das IFN- $\gamma$  induzierte IDO Protein in seiner Expression und somit gleichzeitig auch die Kynureninproduktion hemmt (Okamoto *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel für die mögliche Wirkungsweise von 1-MT ist die Tatsache, dass das Racemat 1-DL-MT die Toll-like Rezeptor Signalweiterleitung in dendritischen Zellen (Agaugué *et al.*, 2006) beeinflusst, indem es zu einem Anstieg der Phosphorylierung von p38 und ERK MAPKs und zu einer dauerhaften Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Fos kommt.

In dieser Arbeit wurde eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete unterschiedliche Wirkung der 1-MT Isomere identifiziert. Bei der Recherche zur spezifischen Inhibierung der IDO war auffällig, dass in allen *in vitro* Studien der spezifische Inhibitor 1-L-MT nicht in der Lage war, eine vollständige Hemmung der Kynureninproduktion hervorzurufen (Cady *et al.*, 1991; Heseler *et al.*, 2008). Auch große Mengen des 1-L-MT (3 mM) ergaben nur eine Verringerung der Kynureninproduktion um 65% (Schmidt *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass bereits kleine Mengen (0,5 mM) des Inhibitors ausreichen, um zum Beispiel die IDO-vermittelte antibakterielle Wirkung aufzuheben, obwohl keine vollständige Hemmung der IDO-Aktivität hervorgerufen wird.

Zur genaueren Untersuchung dieser Beobachtung wurden 86HG39 Zellen für 72 Stunden in IMDM Medium mit 5 % FCS mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Einigen Zellen wurde zum Zeitpunkt der Stimulation 1-L-MT zugegeben. Die nach 3tägiger Inkubationszeit gewonnenen Überstände dienten nun als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus*. Nach 24stündiger Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Bakterienwachstums. Dabei zeigte sich deutlich, dass das Bakterienwachstum in den Überständen der stimulierten Zellen ohne zusätzliche Zugabe von 1-L-MT signifikant gehemmt war (siehe Abbildung 3.3.A). Dieser Effekt ist auf den IDO vermittelten Abbau des für Staphylokokken essentiellen L-Trp zu Kynurenin zurückzuführen. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Bakterien in den Überständen mit 1-L-MT Zugabe, zum Zeitpunkt der Stimulation, ungehemmt möglich. Dies zeigt, dass die Hemmung

der IDO durch 1-L-MT effektiv genug ist, um ein Bakterienwachstum zu ermöglichen. Zur Bestätigung, dass der antimikrobielle Effekt vor allem auf eine Verringerung der Tryptophan-Konzentration zurückzuführen ist, wurde den konditionierten Überständen zum Zeitpunkt der Infektion L-Trp hinzugegeben (siehe Abb. 3.3.B). Dies hatte ein Bakterienwachstum zur Folge. Im nächsten Schritt wurde den Überständen 1-L-MT gemeinsam mit den Bakterien zugegeben. Zu erwarten wäre weiterhin eine Hemmung des Bakterienwachstums gewesen. Doch erstaunlicherweise war auch nach 1-L-MT Zugabe zu diesem späten Zeitpunkt ein vollständiges Bakterienwachstum möglich (3.3.C). Zur Erklärung dieses Effektes konnte eine Beeinflussung des 1-L-MT auf die IFN- $\gamma$  stimulierte IDO Enzymaktivität der 86HG39 Zellen ausgeschlossen werden, weil die Bakterien in den zellfreien Überständen der IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 kultiviert wurden. Somit war eine Interaktion des 1-L-MT mit der IFN- $\gamma$  stimulierten IDO unmöglich. Unverständlich war, warum der Inhibitor selbst in der Lage war, die Wachstumshemmung aufzuheben, ohne die IDO Enzymaktivität selbst zu beeinflussen. Dabei stellte sich die Frage ob 1-L-MT als Tryptophan-Analogon und somit als Nährstoff für Bakterien fungiert oder über einen IDO unabhängigen Weg wirkt.

Um zu überprüfen, ob 1-L-MT von Bakterien als Tryptophan-Ersatz verwendet werden kann, wurde im nächsten Schritt untersucht, ab welcher 1-L-MT Konzentration ein Wachstum von *Staphylococcus aureus* möglich ist. Als Grundlage für dieses Experiment diente ebenfalls ein durch IFN- $\gamma$  stimulierte 86HG39 Zellen Tryptophan depletierendes Medium. Zum Zeitpunkt der Infektion wurden dem Medium unterschiedliche Mengen L-Trp oder 1-L-MT hinzugegeben. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von *Staphylococcus aureus* in Tryptophan depletiertem Medium gehemmt war. Allerdings konnten die Bakterien nach Supplementation von L-Trp, aber auch von 1-L-MT wachsen. Dabei stellte sich 1-L-MT als ein schlechteres Wachstumssubstrat dar, weil für das Erreichen des halbmaximalen Wachstums ungefähr die 20fache Konzentration von 1-L-MT, im Vergleich zu Tryptophan benötigt wurde.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung war, dass 1-L-MT ein Nährstoff für Tryptophan auxotrophe Bakterien darstellt. Diese Beobachtung konnte auch auf Parasiten übertragen werden. Dabei wurde die biologische Wirkung des 1-L-MT auf *Toxoplasma gondii* untersucht. Als Wirtszellen für die Toxoplasmen dienten 86HG39 Zellen, die 72 h vor der Infektion mit Toxoplasmen, mit 100 U/ml IFN- $\gamma$  stimuliert wurden. Durch die Stimulation der Zellen mit IFN- $\gamma$  und der somit einhergehenden IDO Aktivierung kommt es zur Tryptophandepletion in den Überständen. Es zeigte sich, dass das

Wachstum der Parasiten in dem Tryptophan-freien Medium gehemmt war. Erst nach Zugabe von Trp oder 1-L-MT zum Zeitpunkt der Infektion konnten die Toxoplasmen wachsen. Dabei ist eine Interaktion des 1-L-MT mit der IFN- $\gamma$  stimulierten IDO Enzymaktivität eher auszuschließen, da die Infektion und die Substitution des 1-L-MT 72 h nach dem IDO vermittelten Tryptophanabbau erfolgte. Auch hier waren die Konzentrationen des 1-L-MT zum Erreichen des halbmaximalen Wachstums im Vergleich zum Tryptophan um ebenfalls das 20fache höher.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob auch T-Zellen in Tryptophan-freiem Medium nach 1-L-MT Zugabe wachsen konnten. Dabei wurden auch die T-Zellen in Tryptophan-freiem Medium von IFN- $\gamma$  stimulierten 86HG39 Zellen kultiviert. Ein Wachstum der Zellen war ohne Zugabe von Trp oder 1-L-MT nicht möglich. Erst die Substitution der Aminosäuren ermöglichte ein Wachstum. Auch hier war eine 20fach höhere Konzentration von 1-L-MT im Vergleich zu Trp notwendig, um das halbmaximale Wachstum der Zellen zu erreichen. Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse lässt 1-L-MT als einen Tryptophanersatz für Tryptophan auxotrophe Mikroorganismen und Zellen vermuten. Unklar war allerdings, wie 1-L-MT das Zellwachstum ermöglicht. Mögliche Erklärungen könnten sein, dass 1-L-MT in die Zellen aufgenommen wird und dann durch Demethylierung zu Tryptophan umgewandelt wird oder das 1-L-MT selbst als Tryptophan-Analogon in die Proteine eingebaut wird.

Zur Kontrolle ob 1-L-MT anstelle von Tryptophan in die Zellen aufgenommen wird, diente radioaktiv markiertes [ $^3\text{H}$ ]-Tryptophan ([ $^3\text{H}$ ]-Trp), welches in Toxoplasmen und in T-Zellen aufgenommen wurde und mittels Szintillationsmessgerät bestimmt werden konnte. Es wurde überprüft, ob die Aufnahme von [ $^3\text{H}$ ]-Trp durch Zugabe von nicht radioaktiv markiertem L-Trp oder 1-L-MT kompetitiv antagonisiert werden kann. Dabei zeigte sich, dass die Aufnahme des [ $^3\text{H}$ ]-Trp sowohl durch L-Trp aber auch durch 1-L-MT antagonisiert werden konnte. Allerdings war in diesen Experimenten das Tryptophan ein qualitativ besseres Substrat für die Zellen, weil schon geringe Mengen des L-Trp ausreichten, damit die Aufnahme des [ $^3\text{H}$ ]-Trp in die Zellen antagonisiert werden konnte. Dies verfestigte die Vermutung, dass 1-L-MT anstelle von L-Trp in die Zellen aufgenommen und eventuell in die Proteine eingebaut wird. Alternativ wurde in der Literatur beschrieben, dass 1-L-MT ebenso ein Inhibitor des L-Trp- Transportsystems sei (Kudo & Boyd, 2001). Somit wäre die Beobachtung, dass 1-L-MT die Aufnahme des [ $^3\text{H}$ ]-Trp antagonisiert, auf eine Hemmung des Trp-Transport-systems zurückzuführen und nicht darauf, dass 1-L-MT in die Zellen aufgenommen wird. Eine

weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Transportsysteme durch das IFN- $\gamma$ , welches sich in den konditionierten Überständen der 86HG39 Zellen befand, war unwahrscheinlich, da IFN- $\gamma$  keinen Einfluss auf die L-Trp-Aufnahme besitzt (Kudo & Boyd, 2001). Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt, dass Mikroorganismen und Immunzellen in der Lage waren mit 1-L-MT zu wachsen und dass 1-L-MT die Aufnahme von L-Trp in die Zellen antagonisiert. Unklar war, ob Zellen in Anwesenheit von 1-L-MT über längere Zeit überleben und ob sie ihre Funktionalität behalten.

Um die Langzeitwirkung von 1-L-MT genauer zu untersuchen wurden Tumorzellen (86HG39 Glioblastom-Zellen) in vier verschiedenen Medien, IMDM + 5 % FCS, Tryptophan-freiem konditionierten Medium ( $\Delta$ Trp-KM), mit und ohne Zugabe von L-Trp (100  $\mu$ g/ml) oder mit 1-L-MT (100  $\mu$ g/ml), kultiviert. Damit eine spätere Beeinflussung der 86HG39 Zellen durch IFN- $\gamma$ , aus den Überständen ausgeschlossen werden konnte, dienten als konditioniertes Medium die Tryptophan-freien Überstände von Tetrazyklin (15 ng/ml) stimulierten HeLa-TDO Zellen. Damit ließen sich eine sekundäre IDO Induktion durch IFN- $\gamma$  aus dem konditionierten Medium sowie eine Aktivierung IFN $\gamma$  abhängiger Stoffwechselwege der 86HG39 Zellen ausschließen. Die Glioblastomzellen wurden für mindestens 7 Tage in diesen Medien kultiviert und das Wachstum mikroskopisch und fotografisch erfasst (Abb. 3.9). Wie im Ergebnisteil beschrieben, konnten die Zellen in  $\Delta$ Trp-KM nicht oder nur kaum proliferieren. Nach Zugabe von 1-L-MT wurde ein verstärktes Wachstum beobachtet. Auffallend ist, dass die Zugabe von großen Mengen L-Trp nur zu einer geringen Wachstumssteigerung führt.

Diese so vorkultivierten Tumorzellen wurden anschließend geerntet und auf ihre Proliferationsfähigkeit in Kurzzeitkulturen untersucht. Die Analysen erfolgten ebenfalls im konditionierten Medium von Tetrazyklin stimulierten HeLa-TDO Zellen mit Zugabe von unterschiedlichen Mengen L-Trp oder 1-L-MT. Es zeigte sich nach Zugabe beider Substrate ein signifikantes Wachstum der Zellen, es gab jedoch quantitative Unterschiede. Vergleichbar zu den vorherigen Experimenten erwies sich Tryptophan abermals als ein besseres Substrat für das Wachstum der Zellen, weil für das Erreichen der halbmaximalen Wachstumsrate nur etwa 10 % der Substratmenge von 1-L-MT benötigt wurde. Die Proliferationsmaxima der Zellen aus den unterschiedlichen Vorkulturen, Zellen aus der IMDM bzw. der  $\Delta$ Trp-KM + 1-L-MT Vorkultur, waren vergleichbar. Hierbei scheinen auch die Zellen in dem 1-L-MT haltigen Vorkulturmedium gut

überlebt zu haben (Abb. 3.10). Ein Hinweis dafür gaben die mikroskopischen Analysen (Abb. 3.9).

Eine Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktors AHR sein. Dieser Faktor wird in die Gruppe der PAS (Per-Arnt-Sim) Familie eingeordnet und wird normalerweise durch Xenobiotica wie Benzo(a)pyren oder 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin aktiviert (Gramatzki *et al.*, 2009). Er wird in manchen Tumorzellen kontinuierlich exprimiert. Dabei kommt es nach der Aktivierung zur Translokation in den Zellkern und zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen, die durch das *Dioxin-Responsive-Element* (DRE) reguliert werden. Bei Tumorzellen führt die Rezeptoraktivierung zu einer Begünstigung der Zellbewegung und Steigerung des Tumorüberlebens *in vivo* als auch *in vitro* (Platten *et al.*, 2012; Stone, Stoy, *et al.*, 2012). Untersuchungen zur Beeinflussung des AHR ergaben, dass auch Kynurenin in der Lage ist, eine Aktivierung des AHR-Stoffwechselweges hervorzurufen (Opitz *et al.*, 2011) und somit das Tumorüberleben zu fördern. In unseren Experimenten wurden die Glioblastomzellen in Tryptophan-freiem, konditioniertem Medium, welches Kynurenin beinhalten, kultiviert. Dies könnte erklären, warum die Zellen auch nach 2wöchiger Kultur in konditioniertem Medium mit Tryptophandepletion überleben konnten.

Eine weitere Auffälligkeit war, dass die gemessenen Proliferationsmaxima der Zellen aus der Vorkultur mit  $\Delta\text{Trp-KM} + \text{L-Trp}$  niedriger waren gegenüber den Zellen aus der Vorkultur  $\Delta\text{Trp-KM} + 1\text{-L-MT}$  (Abb. 3.10.). Hierbei schienen die Zellen aus der  $\Delta\text{Trp-KM} + \text{L-Trp}$  Vorkultur schlechter zu wachsen. Dieses Ergebnis war zum Zeitpunkt der Experimente nicht erklärbar. Mittlerweile ist aber bekannt, dass es über die AHR Rezeptoraktivierung in Tumorzellen durch Kynurenin, beispielsweise über die AHR-IL-6-STAT3-IDO Signalschleife, zur Expression und Aktivierung von IDO kommt (Litzenburger *et al.*, 2014). Hierbei könnte es durch die AHR induzierte IDO-Aktivierung zur Kynureninakkumulation, sowie zur Akkumulation von weiteren, für die Glioblastomzellen toxischen Stoffen, gekommen sein. Beispielsweise könnte es zur Anreicherung von 3-Hydroxykynurenin (3-HK) einem neurotoxischen Substrat (Stone, Stoy, *et al.*, 2012) und somit zum Zellarrest oder Apoptose gekommen sein. Dies könnte erklären, weshalb die Zellen aus der  $\Delta\text{KM-Trp} + \text{L-Trp}$  Vorkultur mikroskopisch schlechter wuchsen (Abb. 3.9.) und ein geringeres Proliferationsmaximum im Vergleich zu den Zellen aus der  $\Delta\text{KM-Trp} + 1\text{-L-MT}$  Vorkultur aufwiesen (Abb. 3.10.). Hierzu müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden, die zeigen, ob eine erhöhte

Kynurenin-Konzentration in den Medien der  $\Delta$ Trp-KM + Trp Vorkulturen nachzuweisen ist und ob dies eine Beeinflussung oder sogar "toxische" Wirkung auf die Zellen hat.

Im weiteren Schritt wurden die Glioblastomzellen aus den unterschiedlichen Vorkulturen auf Ihre Funktionalität überprüft. Dazu wurden die Zellen aus den Vorkulturen geerntet, in IMDM Medium + 5 % FCS kultiviert und mit IFN- $\gamma$  stimuliert. Anschließend dienten die so hergestellten Tryptophan depletierten Kulturüberstände der IFN- $\gamma$  stimulierten Glioblastomzellen, als Kulturmedium für *Staphylococcus aureus*. 24 Stunden nach Beimpfung der Kulturüberstände und nach Zugabe unterschiedlicher Mengen L-Trp oder 1-L-MT wurde das Bakterienwachstum ermittelt (3.11.). Dabei zeigte sich, dass die Zellen aus den unterschiedlichen Vorkulturen in der Lage waren, nach IFN- $\gamma$  Stimulation IDO zu exprimieren, Tryptophan zu Kynurenin abzubauen und das Bakterienwachstum zu hemmen. Interessanterweise waren auch die Tumorzellen, welche ebenfalls über längere Zeit (2 Wochen) in Tryptophan-freiem konditioniertem Medium mit Zugabe von 1-L-MT kultiviert wurden, noch vital und konnten nach IFN- $\gamma$  Stimulation IDO exprimieren und antibakteriell wirken. So scheinen auch die Tumorzellen mit 1-L-MT zu wachsen. Zur weiteren Analyse dieser Beobachtung musste untersucht werden, welche Wirkung 1-L-MT in den Zellen entfaltet. Im nächsten Schritt war zu analysieren, ob 1-L-MT in die Proteine sowohl von Tumorzellen als auch von Bakterien eingebaut wird.

Dafür wurden die Aminosäuresequenzen spezifischer Proteine von 86HG39 Glioblastom-Zellen und von *Staphylococcus aureus* mittels MS/MS Spektroskopie auf das Vorhandensein von L-Trp und 1-L-MT untersucht. Hierzu erfolgte im Gegensatz zu den Vorexperimenten die Kultivierung sowohl der Tumorzellen als auch der Bakterien in Tryptophan-freiem Medium mit einem Tryptophan-freien Serumersatz (RPMI + 10% Panexin) mit Zugabe von L-Trp oder 1-L-MT. Somit konnte eine Verunreinigung der Überstände mit IFN $\gamma$ , Tetrazyklin oder Zelldetritus und so eine Beeinflussung der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Tumorzellen wurden nach 15wöchiger, die Bakterien nach 18stündiger Inkubationszeit geerntet und lysiert. Anschließend erfolgte die MS/MS Spektroskopie-Analyse spezifischer Peptide auf das Vorhandensein von Trp und 1-L-MT durch Katja Kuhlmann und Helmut Meyer aus dem Medizinischen Proteom-Center-Ruhr-Universität Bochum. Das Peptid der L-Laktat-Dehydrogenase, der Tumorzellen und das Peptid der Triosephosphat-Isomerase von *Staphylococcus aureus*, enthielten Trp aber kein 1-L-MT. Eine Erklärung dieser Beobachtung könnte sein,

dass das 1-L-MT beispielsweise vor der Aufnahme in die Zelle oder in der Zelle während der Translationsphase demethyliert wird. Dabei scheint eine Modifizierung des 1-L-MT in der Zelle ausgeschlossen, weil bei den MS/MS Analysen kein Hinweis auf das Vorhandensein von Methyl-Resten bestand. Eine weitere mögliche Erklärung der Ergebnisse ist, dass eine Verunreinigung des 1-L-MT mit L-Tryptophan besteht. Es erfolgte eine Literaturrecherche von welchen Firmen das in verschiedenen Veröffentlichungen verwendete 1-L-MT stammt. Dabei fiel auf, dass viele Experimente mit dem 1-L-MT der Firma Sigma-Aldrich durchgeführt wurden (Uyttenhove *et al.*, 2003; Hou *et al.*, 2007; Löb *et al.*, 2008; Qian *et al.*, 2009; Löb *et al.*, 2009; Heseler *et al.*, 2008). Zur Klärung einer möglichen Kontamination des handelsüblichen 1-L-MTs mit Tryptophan wurden nun unterschiedliche Chargen des Aminosäureanalogons, von zwei verschiedenen Produzenten (Sigma Aldrich und Enzo Life Sciences), qualitativ mittels HPLC-Analyse untersucht. Dabei zeigte sich ein Kontaminationspeak des 1-L-MT nach einer Retentionszeit von 4,2 min. Zur Aufschlüsselung der Kontamination wurde in einem zweiten Schritt dem 1-L-MT, L-Trp hinzugegeben und die Laufzeiten der Stoffe untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass L-Trp seinen Peak ebenfalls nach einer Retentionszeit von 4,2 min hat, wie der Kontaminationspeak des 1-L-MT. Somit konnte die Kontamination als Tryptophan identifiziert werden. Im nächsten Schritt wurden die Proben nun mittels Massenspektroskopieanalyse auf die Quantität der Tryptophankonzentration hin untersucht. Dabei konnten in 4 untersuchten Proben von zwei unterschiedlichen Produzenten jeweils unterschiedliche Mengen Tryptophan nachgewiesen werden. Die dabei festgestellten Mengen der Verunreinigung variierten allerdings. In einigen Chargen konnte eine Verunreinigung von bis zu 7 µg/mg 1-L-MT festgestellt werden. Interessanterweise wurde in vielen Experimenten festgestellt, dass 200 µg 1-L-MT ausreichen, um ein normales Wachstum *in vitro* zu erreichen, somit sind in 200 µg 1-L-MT etwa 1 µg Trp (Schmidt *et al.*, 2012). Dabei liegt der Tryptophan-gehalt innerhalb des kommerziell erhältlichen 1-L-MT durchaus hoch genug, um ein maximales Wachstum verschiedener Zellen und Mikroorganismen hervorzurufen. Denn für ein normales Wachstum sind nur etwa 1 µg/ml Tryptophan notwendig (Schmidt *et al.*, 2012).

Die vorliegenden Ergebnisse sprechen zusammenfassend nicht für den Austausch von Tryptophan durch 1-L-MT, sondern am ehesten für eine Verunreinigung des 1-L-MT mit Tryptophan.

Nun ist es wichtig zu untersuchen, inwiefern die *in vivo* und *in vitro* beschriebenen Effekte des 1-L-MT auf eine IDO Hemmung oder auf die Verunreinigung mit Tryptophan zurückzuführen sind. Dabei müssen die Bindungsaffinitäten der beiden Aminosäuren, Tryptophan und 1-L-MT, an der IDO berücksichtigt werden. Denn am aktiven Zentrum kommt es zu einer Konkurrenz der beiden Substanzen. So bindet die IDO Tryptophan mit einer hohen Affinität ( $K_m = 20 \text{ mM}$ ) wohingegen der spezifische Inhibitor 1-L-MT mit einer niedrigeren Affinität ( $K_i = 34,4 \text{ mM}$ ) bindet. Tryptophan bindet also durch seine größere Affinität bevorzugt am aktiven Zentrum. Dies führt zu einem Tryptophanabbau und einer Kynureninproduktion, bevor das Enzym durch 1-L-MT vollständig gehemmt wird. Somit könnte das entstandene Kynurenin zusätzlich das Wachstum der Immunzellen in der Umgebung des Tumors beeinflussen und durch eine Interaktion mit dem AHR Transkriptionsfaktor eine Tumorprogression begünstigen. Dies könnte die schlechtere Wirkung von 1-L-MT in *in vivo* Experimenten erklären, da die Veränderung der Kynureninkonzentration im Mikromillieu des Tumors eine Immunantwort unterdrückt. Auch könnte es durch das im 1-L-MT enthaltene Tryptophan zu einem verstärkten Tumorwachstum kommen.

Die Beobachtung, dass nach 1-L-MT Supplementation die IDO vermittelte Wachstumshemmung von T Zellen antagonisiert werden kann, wurde immer als eine Enzymhemmung der IDO durch 1-L-MT interpretiert (Qian *et al.*, 2009; Curti *et al.*, 2010). Jedoch wurde eine mögliche Kontamination des 1-L-MT mit Tryptophan nicht in Betracht gezogen. Deshalb muss dies bei der Interpretation der Daten retrospektiv berücksichtigt werden.

Allerdings können diese neuen Erkenntnisse nicht vollständig erklären, warum 1-D-MT eine stärkere Antitumorwirkung *in vivo* im Vergleich zu 1-L-MT aufweist. Sicher ist, dass 1-D-MT ein schlechterer Inhibitor sowohl der IDO als auch der IDO 2 ist (Qian *et al.*, 2009; Austin *et al.*, 2010). Es ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung des Tumorwachstums über andere bzw. zusätzliche Mechanismen funktioniert. So könnten Isomer spezifische Faktoren die Antitumorwirkung von 1-D-MT ausmachen. Dabei kann es von Interesse sein, dass die IDO Isomer-unspezifisch arbeitet und sowohl L-Tryptophan als auch D-Tryptophan spalten kann (Capece *et al.*, 2010).

Am ehesten ist von einer Kontamination von 1-D-MT mit D-Tryptophan auszugehen. D-Trp ist im Gegensatz zu L-Trp keine proteinogene Aminosäure und kann daher keine wachstumsfördernden Effekte vermitteln. Zusätzlich ist unklar, ob sich die biologischen Wirkungen der Tryptophan-Degradationsprodukte von D-Trp und L-Trp unterscheiden. Die Untersuchung der Funktionsweise der IDO durch Capece *et al.* 2010 erfolgte in *in vitro* Systemen mit gereinigten Enzymen, wo Störgrößen wie beispielsweise Substratverfügbarkeit ausgeschlossen werden konnten. In biologischen Systemen ist neben der Enzymaktivität auch die Substrataufnahme in die Zelle wichtig. Dazu sind spezifische Transportsysteme für die Tryptophanaufnahme zuständig, deren Aufbau, Spezifität und Arbeitsweise verschieden und teilweise noch unklar sind.

Die bisher bekannten Systeme unterscheiden sich dabei vor allem in der Affinität zum Tryptophan (Seymour *et al.*, 2006). Somit wäre es denkbar, dass die verschiedenen Tryptophan-Transportsysteme unterschiedliche Fähigkeiten für den Transport von 1-L-MT bzw. 1-D-MT besitzen. Ferner sind in unterschiedlichen Zellen auch verschiedene Transportsysteme vorhanden. Es wäre beispielsweise möglich, dass z.B. dendritische Zellen 1-D-MT effektiver transportieren gegenüber „normalen Körperzellen“. Dies könnte die stärkere immunregulatorische Wirkung von 1-D-MT in Bezug auf die Hemmung der T-Zellantwort erklären. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu wissen, ob auch 1-D-MT, genauso wie 1-L-MT als ein Substrat für die IDO fungiert (Chauhan *et al.*, 2009), langsam abgebaut wird und ob das Abbauprodukt vielleicht einen anderen stereoselektiven Stoffwechselweg beeinflussen kann.

Es konnte gezeigt werden, dass 1-D-MT und 1-L-MT die Möglichkeit besitzen, die Aktivität des Hauptstoffwechsel-Regulators mTOR zu beeinflussen. Dabei zeigte sich, dass es bei Tryptophanmangel zur Hemmung des mTOR, einen Sensor der Aminosäureversorgung, kommt. Durch die Hemmung des Sensors kommt es zur Unterdrückung der mTOR-Aktivität und letztlich zur Autophagie. Diese Reaktion kann allerdings über einen unbekanntem Mechanismus, durch 1-D-MT, 1-L-MT oder auch Trp-Zugabe gestoppt werden (Metz *et al.*, 2012). Offen bleibt allerdings, ob 1-D-MT, 1-L-MT, L-Trp und D-Trp quantitativ unterschiedlich starke Effekte vermitteln.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass eine detaillierte Analyse der 1-D-MT und 1-L-MT Wirkungen mit chemisch reinen Substanzen durchgeführt werden muss, um den Einfluss verschiedener Tryptophanisomere, bzw. deren Abbauprodukte, auf die Zellen näher zu untersuchen.

Zur Klärung der unterschiedlichen Wirkung von 1-D-MT und 1-L-MT in *in vivo* und *in vitro* Experimenten sollten zusätzlich Untersuchungen zur Zusammensetzung des 1-D-MT und einer möglichen Kontamination mit D-Trp erfolgen. Weiterhin sollten Untersuchungen zur Wirksamkeit von D-Trp auf das Zellwachstum durchgeführt werden, da mögliche Randeffekte in der Verwendung des 1-D-MT auf das Wachstum der Zellen nicht auszuschließen sind.

## 5. Literaturverzeichnis

- Acha-Orbea, H., 1993. Bacterial and viral superantigens: roles in autoimmunity? *Annals of the rheumatic diseases*, 52 Suppl 1, pp.S6–16. A.
- Adams, O. *et al.*, 2004. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *Journal of virology*, 78(5), pp.2632–6.
- Argudín, M.Á., Mendoza, M.C. & Rodicio, M.R., 2010. Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins*, 2(7), pp.1751–73.
- Austin, C.J.D. *et al.*, 2010. Biochemical characteristics and inhibitor selectivity of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase-2. *Amino acids*, 39(2), pp.565–78.
- Babcock, T.A. & Carlin, J.M., 2000. Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells. *Cytokine*, 12(6), pp.588–94.
- Ball, H.J. *et al.*, 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*, 396(1), pp.203–13.
- Ball, H.J. *et al.*, 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(3), pp.467–71.
- Baumgarten, H.G. & Grozdanovic, Z., 1995. Psychopharmacology of central serotonergic systems. *Pharmacopsychiatry*, 28 Suppl 2, pp.73–9.
- Becerra, A. *et al.*, 2009. Increased activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in serum from acutely infected dengue patients linked to gamma interferon antiviral function. *The Journal of general virology*, 90(Pt 4), pp.810–7.
- Billroth, T., 1874 Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica und Verbreitung der accidentellen Wundkrankheiten. 1. Auflage. Berlin: Reimer, G.
- Bodaghi, B. *et al.*, 1999. Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162(2), pp.957–64.
- Bokarewa, M.I., Jin, T. & Tarkowski, A., 2006. Staphylococcus aureus: Staphylokinase. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(4), pp.504–9.
- Bowie, W.R. *et al.*, 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. The BC Toxoplasma Investigation Team. *Lancet*, 350(9072), pp.173–7.

- Burkin, D.J. *et al.*, 1993. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics*, 17(1), pp.262–3.
- Cady, S.G. & Sono, M., 1991. 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 291(2), pp.326–33.
- Capece, L. *et al.*, 2010. Substrate stereo-specificity in tryptophan dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proteins*, 78(14), pp.2961–72.
- Chaves, A.C. *et al.*, 2001. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. *European journal of immunology*, 31(2), pp.333–44.
- Cihák, A., 1979. L-Tryptophan action on hepatic RNA synthesis and enzyme induction. *Molecular and cellular biochemistry*, 24(3), pp.131–42
- Comings, D.E. *et al.*, 1991. Human tryptophan oxygenase localized to 4q31: possible implications for alcoholism and other behavioral disorders. *Genomics*, 9(2), pp.301–8.
- Cook, A.J. *et al.*, 2000. Sources of toxoplasma infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7254), pp.142–7.
- Curti, A. *et al.*, 2010. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. *Haematologica*, 95(12), pp.2022–30.
- Darnell, J.E., Kerr, I.M. & Stark, G.R., 1994. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5164), pp.1415–21.
- Däubener, W. *et al.*, 1994. A new, simple, bioassay for human IFN- $\gamma$ . *Journal of Immunological Methods*, 168(1), pp.39–47.
- Divanovic, S. *et al.*, 2012. Opposing biological functions of tryptophan catabolizing enzymes during intracellular infection. *The Journal of infectious diseases*, 205(1), pp.152–61.
- Dubey, J.P., 2009. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International journal for parasitology*, 39(8), pp.877–82.
- Fallarino, F. *et al.*, 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell death and differentiation*, 9(10), pp.1069–77.

- Fatokun, A.A., Hunt, N.H. & Ball, H.J., 2013. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2) and the kynurenine pathway: characteristics and potential roles in health and disease. *Amino acids*, 45(6), pp.1319–29.
- Feng, H.M. & Walker, D.H., 2000. Mechanisms of intracellular killing of *Rickettsia conorii* in infected human endothelial cells, hepatocytes, and macrophages. *Infection and immunity*, 68(12), pp.6729–36.
- Fernstrom, J.D., 2012. Effects and side effects associated with the non-nutritional use of tryptophan by humans. *The Journal of nutrition*, 142(12), p.2236S–2244S.
- Filisetti, D. & Candolfi, E., 2004. Immune response to *Toxoplasma gondii*. *Annali dell'Istituto superiore di sanità*, 40, pp.71–80.
- Forouhar, F. *et al.*, 2007. Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2), pp.473–8.
- Friberg, M. *et al.*, 2002. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *International journal of cancer. Journal internationale du cancer*, 101(2), pp.151–5.
- Gillet, Y. *et al.*, 2001. [Severe staphylococcal pneumonia in children]. *Archives de pédiatrie : organe officiel de la Société française de pédiatrie*, 8 Suppl 4, p.742s–746s.
- Gillet, Y. *et al.*, 2002. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*, 359(9308), pp.753–9.
- Gramatzki, D. *et al.*, 2009. Aryl hydrocarbon receptor inhibition downregulates the TGF-beta/Smad pathway in human glioblastoma cells. *Oncogene*, 28(28), pp.2593–605.
- Gross, U., 2004. [Prevalence and public-health-aspects of toxoplasmosis]. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 47(7), pp.692–7.
- Haber, R. *et al.*, 1993. Identification of tryptophan 2,3-dioxygenase RNA in rodent brain. *Journal of neurochemistry*, 60(3), pp.1159–62.
- Hansen, A.M. *et al.*, 2004. Increased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine malaria infection is predominantly localised to the vascular endothelium. *International journal for parasitology*, 34(12), pp.1309–19.
- Heseler, K. *et al.*, 2008. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS immunology and medical microbiology*, 52(2), pp.273–81.
- Hiramatsu, K., 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 1(2), pp.135–50.

- Hof, H., Dörries, R. 2004. Medizinische Mikrobiologie, 3. komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart, S. 297-306; S. 509-513
- Hou, D.-Y. *et al.*, 2007. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer research*, 67(2), pp.792–801.
- Hu, H.M. *et al.*, 2000. The C/EBP bZIP domain can mediate lipopolysaccharide induction of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of biological chemistry*, 275(21), pp.16373–81.
- Hucke, C. *et al.*, 2004. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and immunity*, 72(5), pp.2723–30.
- Huston, W.M. *et al.*, 2014. Evolution to a Chronic Disease Niche Correlates with Increased Sensitivity to Tryptophan Availability for the Obligate Intracellular Bacterium *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 196(11), pp.1915–1924.
- Inaba, T. *et al.*, 2009. Role of the immunosuppressive enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase in the progression of ovarian carcinoma. *Gynecologic oncology*, 115(2), pp.185–92.
- Ishiguro, I. *et al.*, 1993. Skin L-tryptophan-2,3-dioxygenase and rat hair growth. *FEBS letters*, 329(1-2), pp.178–82.
- Kayser, K. *et al.*, 1993. Detection of the lymphokine migration inhibitory factor in normal and disease-affected lung by antibody and by its major binding protein, the interferon antagonist sarcolectin. *Pathology, research and practice*, 189(9), pp.992–5.
- KNOX, W.E. & AUERBACH, V.H., 1955. The hormonal control of tryptophan peroxidase in the rat. *The Journal of biological chemistry*, 214(1), pp.307–13.
- Kudo, Y. & Boyd, C.A.R., 2001. The role of L-tryptophan transport in L-tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase in human placental explants. *The Journal of Physiology*, 531(2), pp.417–423.
- Konturek, S.J. *et al.*, 2007. Role of melatonin in upper gastrointestinal tract. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, 58 Suppl 6, pp.23–52.
- Kotake Y., Masayama I. (1936). The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan. *Z Physiol Chem*; 243:237-44.
- Levine, N.D., 1980. Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *The Journal of parasitology*, 66(5), pp.830–4.

- Litzenburger, U.M. et al., 2014. Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. *Oncotarget*, 5(4), pp.1038–1051.
- Löb, S. et al., 2008. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. *Blood*, 111(4), pp.2152–4.
- Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., et al., 2009. IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 58(1), pp.153–7.
- Löb, S., Königsrainer, A., Rammensee, H.-G., et al., 2009. Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nature reviews. Cancer*, 9(6), pp.445–52.
- Löffler, G., Petrides P. E., 2002. Biochemie & Pathobiochemie 7. Auflage. Springer Verlag Berlin S. 46-50
- MacKenzie, C.R. et al., 1999. Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells. *Journal of medical microbiology*, 48(10), pp.935–41.
- MacKenzie, C.R., Hadding, U. & Däubener, W., 1998. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *The Journal of infectious diseases*, 178(3), pp.875–8.
- Mellor, A.L. et al., 2001. Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nature immunology*, 2(1), pp.64–8.
- Mellor, A.L. & Munn, D.H., 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature reviews. Immunology*, 4(10), pp.762–74.
- Metz, R. et al., 2012. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Onc-immunology*, 1(9), pp.1460–1468.
- Metz, R. et al., 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer research*, 67(15), pp.7082–7.
- Millan, M.J. et al., 2008. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in pharmacological sciences*, 29(9), pp.454–64.
- Munn, D.H. et al., 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity*, 22(5), pp.633–42.

- Munn, D.H. *et al.*, 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *The Journal of experimental medicine*, 189(9), pp.1363–72.
- Munn, D.H. *et al.*, 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5380), pp.1191–3.
- Munn, D.H. & Mellor, A.L., 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *The Journal of clinical investigation*, 117(5), pp.1147–54.
- Narui, K. *et al.*, 2009. Anti-infectious activity of tryptophan metabolites in the L-tryptophan-L-kynurenine pathway. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 32(1), pp.41–4.
- Nathan, C., 1992. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(12), pp.3051–64.
- Niño-Castro, A. *et al.*, 2014. The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against *Listeria monocytogenes*. *Innate immunity*, 20(4), pp.401–11.
- Nishiyama, A. *et al.*, 2006. Assembly of staphylococcal leukocidin into a pore-forming oligomer on detergent-resistant membrane microdomains, lipid rafts, in human polymorphonuclear leukocytes. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(6), pp.1300–7.
- Okamoto, T. *et al.*, 2007. Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue : Down-regulation of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) transcription by tryptophan and its analogue. *Cytotechnology*, 54(2), pp.107–13.
- Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Sahm, F., *et al.*, 2011. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 478(7368), pp.197–203.
- Opitz, C.A., Litzemberger, U.M., Opitz, U., *et al.*, 2011. The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PloS one*, 6(5), p.e19823.
- Pantoja, L.G. *et al.*, 2000. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* replication in human aortic smooth muscle cells by gamma interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase activity. *Infection and immunity*, 68(11), pp.6478–81.
- Pantouris, G. *et al.*, 2014. Human indoleamine 2,3-dioxygenase-2 has substrate specificity and inhibition characteristics distinct from those of indoleamine 2,3-dioxygenase-1. *Amino acids*, 46(9), pp.2155–63.
- Pérez-De La Cruz, V., Carrillo-Mora, P. & Santamaría, A., 2012. Quinolinic Acid, an endogenous molecule combining excitotoxicity, oxidative stress and other toxic mechanisms. *International journal of tryptophan research : IJTR*, 5, pp.1–8.

- Peterson, A.C. et al., Evaluation of functionalized tryptophan derivatives and related compounds as competitive inhibitors of indoleamine 2,3-dioxygenase. , 3, pp.531–544.
- Pfefferkorn, E.R. & Guyre, P.M., 1984. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infection and immunity*, 44(2), pp.211–6.
- Pfefferkorn, E.R., 1984. 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 of the United States of America*, 81(3), pp.908–12.
- Platten, M., Wick, W. & Van den Eynde, B.J., 2012. Tryptophan catabolism in cancer: beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer research*, 72(21), pp.5435–40.
- Prendergast, G.C., 2008. Immune escape as a fundamental trait of cancer: focus on IDO. *Oncogene*, 27(28), pp.3889–900.
- Prendergast, G.C. et al., 2014. Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, 63(7), pp.721–35.
- Qian, F. et al., 2009. Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer research*, 69(13), pp.5498–504.
- Rafice, S.A. et al., 2009. Oxidation of L-tryptophan in biology: a comparison between tryptophan 2,3-dioxygenase and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Biochemical Society transactions*, 37(Pt 2), pp.408–12.
- Rassow, J., et al., 2006. Biochemie 1. Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart S. 55; 160; 640
- Roshick, C. et al., 2006. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infection and immunity*, 74(1), pp.225–38.
- Schimke, R.T., Sweeney, E.W. & Berlin, C.M., 1965. The Roles of Synthesis and Degradation in the Control of Rat Liver Tryptophan Pyrrolase. *The Journal of biological chemistry*, 240, pp.322–31.
- Schmidt, S.K. et al., 2009. Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *European journal of immunology*, 39(10), pp.2755–64.
- Schmidt, S.K., 2010. Antimikrobielle und immunregulatorische Eigenschaften der Tryptophan 2, 3- Dioxygenase und die Analyse der funktionellen Effekte des Tryptophan- Analogons 1-Methyl-Tryptophan. Inaugural-Dissertation, Düsseldorf

- Schroder, K. *et al.*, 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*, 75(2), pp.163–89.
- Schroten, H. *et al.*, 2001. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*, 32(4), pp.206–10.
- Sever, J.L. *et al.*, 1988. Toxoplasmosis: maternal and pediatric findings in 23,000 pregnancies. *Pediatrics*, 82(2), pp.181–92.
- Seymour, R.L. *et al.*, 2006. A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. *Journal of leukocyte biology*, 80(6), pp.1320–7.
- Shimizu, T. *et al.*, 1978. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *The Journal of biological chemistry*, 253(13), pp.4700–6.
- Sikander, A., Rana, S.V. & Prasad, K.K., 2009. Role of serotonin in gastrointestinal motility and irritable bowel syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 403(1-2), pp.47–55.
- Smith, C. *et al.*, 2012. IDO is a nodal pathogenic driver of lung cancer and metastasis development. *Cancer discovery*, 2(8), pp.722–35.
- Spekker, K. *et al.*, 2009. Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infection and immunity*, 77(10), pp.4496–501.
- Stone, T.W., Forrest, C.M. & Darlington, L.G., 2012. Kynurenine pathway inhibition as a therapeutic strategy for neuroprotection. *The FEBS journal*, 279(8), pp.1386–97.
- Stone, T.W., Stoy, N. & Darlington, L.G., 2012. An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends in pharmacological sciences*.
- Sugimoto, H. *et al.*, 2006. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of O<sub>2</sub> incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), pp.2611–6.
- Takikawa, O. *et al.*, 1988. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *The Journal of biological chemistry*, 263(4), pp.2041–8.
- Takikawa, O., 2005. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), pp.12–9.

- Terness, P. *et al.*, 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *The Journal of experimental medicine*, 196(4), pp.447–57.
- Teutsch, S.M. *et al.*, 1979. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *The New England journal of medicine*, 300(13), pp.695–9.
- Uyttenhove, C. *et al.*, 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature medicine*, 9(10), pp.1269–74.
- Wilking, H. *et al.*, 2016. Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: A representative, cross-sectional, serological study. *Scientific Reports*, 6(February), pp.1–9.
- Witkiewicz, A.K. *et al.*, 2009. Genotyping and expression analysis of IDO2 in human pancreatic cancer: a novel, active target. *Journal of the American College of Surgeons*, 208(5), pp.781–7; discussion 787–9.
- Yamamoto, S. & Hayaishi, O., 1967. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *The Journal of biological chemistry*, 242(22), pp.5260–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6065097> [Accessed February 26, 2013].
- Yang, H.-J. *et al.*, 2010. A combination of the metabolic enzyme inhibitor APO866 and the immune adjuvant L-1-methyl tryptophan induces additive antitumor activity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(7), pp.869–76.
- Yuasa, H.J. *et al.*, 2010. 1-L-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-D-methyltryptophan. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 157(1), pp.10–5.
- Zhang, Y. *et al.*, 2007. Crystal structure and mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase, a heme enzyme involved in tryptophan catabolism and in quinolinate biosynthesis. *Biochemistry*, 46(1), pp.145–55.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei allen bedanken, die mich in der langen Zeit der Dissertation unterstützt, angetrieben und begleitet haben. Es war eine lange Zeit in der es viele Höhen und Tiefen zu überwinden galt.

Wir haben zusammen viel erlebt und es erfüllt mich mit Stolz diesen Weg mit Euch bestritten zu haben.

Ich danke von ganzem Herzen...

... Herrn Prof. Dr. med. Walter Däubener, für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sowie für die Möglichkeit meine Doktorarbeit bei Ihm, in seinem Team zu schreiben. Außerdem danke ich Ihm für die fachliche, persönliche und berufliche Weiterentwicklung welche er stets gefördert hat.

... Herrn Prof. Dr. med. Pfeffer für die Möglichkeit meine Dissertation in seinem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene anzufertigen zu dürfen.

... meiner Betreuerin Dr. Silva Eller (geb. Schmidt), welche mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne sie, wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Außerdem danke ich insbesondere für die Zusammenarbeit bei den Experimenten zum 1-L-MT Einbau.

... allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt hierbei den Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe: Kathrin Heseler, Vanessa Ince, Margret Leineweber, Marc Quambusch, Katrin Spekker, Silke Stuhlsatz, Wilfried Schwippert und Claudia Woite, die mir alle jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

... Katja Kuhlmann und Helmut Meyer aus dem Medizinischen Proteom-Center-Ruhr-Universität Bochum, für die Durchführung der HPLC und LC-MS/MS, sowie Sabine Metzger für die MALDI-MS Analysen.

... Franziska Leibnitz für die jahrelange und uneingeschränkte Unterstützung, ohne sie gäbe es diese Dissertation nicht.

... Julia Wellms, die mich immer wieder ermutigte das Beste aus mir heraus zu holen, mich auch in schweren Zeiten wiederaufbaute und an meiner Seite war.

... Nathalie Bahn, die mir neue Kraft, Lebensfreude, Antrieb und eine Zukunft gibt und mein größter Schatz ist.

... meiner Familie dafür, dass sie immer hinter mir steht und in schweren Zeiten an meiner Seite ist. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Eltern.

## 9. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die angegebenen benutzt habe.

Düsseldorf, den 23.06.2019

---

Stephan Siepmann