

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene**

**Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer**

**Interferon- $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer  
Effektormechanismus und ihre Zytokin-vermittelte  
Regulation in Nabelschnurblutmakrophagen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine -Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Simone Andrea Roch

2007

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg

Referent: PD Dr. med. Colin MacKenzie

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Hartmut Hengel

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

McKenzie, C. R.; Gonzalez, R.; Kniep, E.; Roch, S.; Däubener, W.; 1999:  
Cytokine Mediated Regulation of Interferon gamma-induced IDO Activation.

Adv Exp Med Biol. 467:533

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	S. 1
1.1. <i>Toxoplasma gondii</i>	S. 1
1.1.1. Historie	S. 1
1.1.2. Entwicklung	S. 2
1.1.3. Pathogenese und Krankheitsbild	S. 6
1.2. Immunologische Abwehr gegen <i>Toxoplasma gondii</i>	S. 10
1.2.1. Humorale Immunität	S. 11
1.2.2. Zelluläre Immunantwort	S. 12
1.2.3. Die Rolle der humanen Makrophagen in der Immunabwehr	S. 15
1.2.4. Degradation von L-Tryptophan	S. 17
1.2.5. Oxidative Burst	S. 18
1.2.6. L-Arginin abhängige Produktion von Stickoxiden	S. 19
1.2.7. Nabelschnurblutmakrophagen	S. 20
1.3. Zielsetzung der Arbeit	S. 21
<b>2. Material und Methoden</b>	S. 23
2.1. Chemikalien, Reagenzien und Zytokine	S. 23
2.2. Geräte und Materialien	S. 24
2.3. Zellkultur	S. 24
2.3.1. Medien für die Zellkulturen	S. 24
2.3.2. Kultivierung und Ernte der Nabelschnurblutmakrophagen	S. 26
2.3.3. Humane adulte Makrophagen	S. 28
2.3.4. Herkunft der Mausfibroblasten	S. 28
2.3.5. Herkunft und Kultivierung von <i>Toxoplasma gondii</i>	S. 29

2.4. Nachweis der Indolamin 2,3-Dioxygenase-Aktivität	S. 31
2.5. Toxoplasmenproliferationstest	S. 33
2.5.1. Auswertung des Toxoplasmenproliferationstests	S. 35
<b>3. Ergebnisse</b>	S. 36
3.1. IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion in CBMDM	S. 36
3.2. IL-4 reguliert die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion	S. 39
3.3. IL-10 inhibiert die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion	S. 45
3.4. Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität durch 6-CDLT	S. 51
<b>4. Diskussion</b>	S. 55
4.1. IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer Mechanismus	S. 57
4.2. Die inhibitorische Wirkung von Interleukin-4	S. 62
4.3. Interleukin-10	S. 67
4.4. Das Analogon 6-chloro-D-L-Tryptophan (6-CDLT)	S. 73
<b>5. Zusammenfassung</b>	S. 76
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	S. 77
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	S. 79
<b>8. Lebenslauf</b>	S. 91
<b>9. Danksagung</b>	S.93

# 1. Einleitung

## 1.1. *Toxoplasma gondii*

### 1.1.1. Historie

*Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazelluläres Protozoon (Einzeller), das zu dem Stamm der Sporozoen gezählt wird. Diese Sporozoen sind durch die zur Infektion führenden „Sporen“ (Oozyste; Sporozyste) und durch einen charakteristischen Generationswechsel zwischen geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Formen gekennzeichnet. Entdeckt wurde *Toxoplasma gondii* (toxon: griech. Bogen) 1908 von Charles J.H. Nicolle und Louis H. Manceaux in dem afrikanischen Nagetier Gondi. *Toxoplasma gondii* ist der Erreger einer Anthroprotozoose, der Toxoplasmose. Der Mensch kann sich entweder durch die perorale Aufnahme der sogenannten Oozysten oder durch Verzehr von Fleisch, das Toxoplasmazysten enthält, infizieren. *Toxoplasma gondii* ist ubiquitär vorkommend und mit einer hohen Prävalenz in der Bevölkerung verbreitet. Durch eine geringe Wirtsspezifität ist das Protozoon zu einer Infektion eines breiten Artenspektrums warmblütiger Vertebraten fähig, z.B.: Katze, Schaf, Schwein, Mensch, Pferd. Einzig bekannter Endwirt ist allerdings nur die Hauskatze, hier allein finden sowohl die geschlechtliche als auch die ungeschlechtliche Zellteilung statt. Bei den Zwischen- bzw. Fehlwirten kommt es nur zur ungeschlechtlichen Vermehrung mit Bildung von Gewebszysten. Schätzungen zufolge soll etwa ein Drittel der Weltbevölkerung mit diesem Erreger infiziert sein. Die Durchseuchung beim Menschen nimmt mit jedem Lebensjahrzehnt um etwa 10 % zu und erreicht in der Altersgruppe der 60-65-jährigen bis zu 70 % (Hahn, 2004).

### 1.1.2. Entwicklung

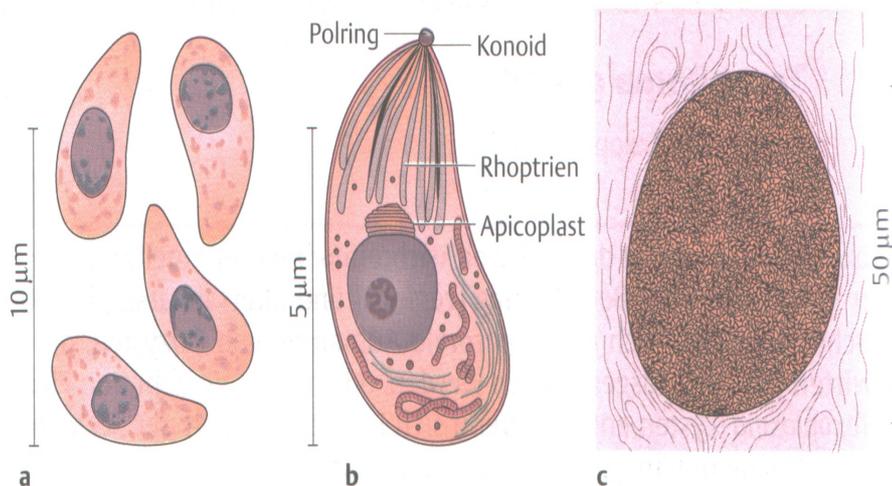
*Toxoplasma gondii* tritt in verschiedenen Stadien auf:

Die Endozoiten (Abb. 1.1) oder auch Tachyzoiten sind eine Proliferationsform, die sich innerhalb einer parasitophoren Vakuole in kernhaltigen Zellen des Wirtes durch eine besondere Art der Zweiteilung, durch Endodyogenie (griech.: Innere Zweiteilung), schnell vermehren. Hierbei entwickeln sich innerhalb der Mutterzelle zwei Tochterindividuen. Die Mutterzelle löst sich auf (Köhler, 2001). Diese Endozoiten sind sichelförmige Zellen, ca. 4-7 µm lang und 2-4 µm breit. Durch den asexuellen Vermehrungszyklus wird die parasitophore Vakuole nach und nach mit Tochterzellen ausgefüllt und dann als Pseudozyste bezeichnet. Am vorderen Pol (Apex) der Zelle befindet sich ein Apikalkomplex. Dieser beinhaltet vor allem das Konoid (konische Struktur aus spiralförmig angeordneten Mikrotubuli), mehrere Polringe und die Rhoptrien. Im Bereich der Polringe münden die Ausführungen der sogenannten Toxonemen. Die Toxonemen produzieren ein enzymatisches Produkt, was bei der Penetration durch die Wirtsmembran von entscheidender Bedeutung ist. Der Zellkern befindet sich in der hinteren Zellhälfte (Kayser, 1998). Da die Endozoiten in der Außenwelt nicht resistent sind und nach peroraler Aufnahme im Magen zerstört werden, sind sie für Tier und Mensch nicht infektiös. In Versuchstieren und in Gewebekulturen können sie sich aber vermehren (Eckert, 1998).

Die zweite morphologisch wichtige Proliferationsform sind die Zystozoiten oder auch Bradyzoiten genannt. Sie sind durch langsame Vermehrung innerhalb von Zysten gekennzeichnet. Die Zysten entwickeln sich intrazellulär in verschiedenen Geweben. Ihre Wand ist verdickt und widerstandsfähig, sie werden bis zu 150 µm groß. Durch viele Endodyogeniezyklen kann die Zyste zahlreiche Toxoplasmen beherbergen. In einem Wirt können sie lange persistieren. Diese Zysten sind Wartestadien. Gelangen solche Zysten durch Aufnahme von infiziertem Fleisch wieder in den Darm einer Katze, beginnt ein neuer Entwicklungszyklus. Die Besonderheit von *Toxoplasma gondii* ist, dass diese Zysten für Zwischenwirte wie Mensch und Tier ebenfalls infektiös sind und auch zur Bildung solcher Gewebiszysten führen. Die Zystozoiten werden auch vom Zwischen- bzw. vom

Fehlwirt durch zystenhaltiges Fleisch peroral aufgenommen (Eckert, 1998; Hahn, 2004).

Die dritte morphologisch wichtige Erscheinungsform sind die Oozysten. Diese Proliferationsform ist ein Dauerstadium. Die Oozysten sind rundlich, ca. 9 x 14 µm groß und von einer äußerst widerstandsfähigen Hülle umgeben. Sie stellen das Endprodukt eines im Darmepithel von katzenartigen Tieren ablaufenden geschlechtlichen Zyklus (Gamogonie) dar. Sie werden mit dem Katzenkot ausgeschieden und enthalten eine Zygote. Nach der Ausscheidung in die Außenwelt erfolgt innerhalb von 2-4 Tagen die Sporulation. Hier entstehen 2 Sporozysten mit je vier Sporozoiten. Sporulierte Oozysten sind sehr umweltresistent und für Mensch und Tier infektiös (Hahn, 2004).



**Abb. 1.1 *Toxoplasma gondii*, Endozoiten:**

a: lichtmikroskopische Darstellung;

b: elektronenmikroskopische Darstellung;

c: histologisches Präparat

aus Kayser/Bienz/Eckert/Zinkernagel, 1998

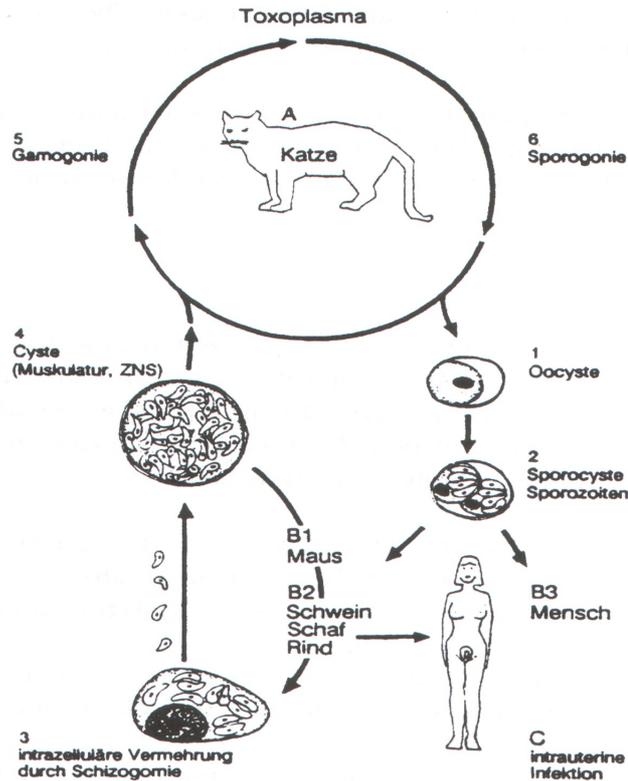
Die Entwicklung von *Toxoplasma gondii* wird in eine enteroepitheliale, eine externe und in eine extraintestinale Phase unterteilt (Abb. 1.2). Die enteroepitheliale Phase beinhaltet die Ausbildung von Geschlechtsformen und vollzieht sich nur in Endwirten. Als Endwirt sind nur die Hauskatze und einige andere, epidemiologisch aber unbedeutende katzenartige Tierarten relevant. In den

Zwischenwirten (Schaf, Schwein) oder in Fehlwirten (Mensch) findet nur die extraintestinale Entwicklung statt. Die Erstinfektion der Katze erfolgt peroral mit rohem, toxoplasmazystenhaltigem Fleisch, z.B. von Mäusen. Die in den Zysten enthaltenen Zystozoen überstehen unbeschadet die Magendarmpassage. Sie dringen in die Dünndarmepithelzellen ein und entwickeln sich zunächst in rezidivierenden ungeschlechtlichen Vermehrungsformen weiter (Schizogonie- und Endodyogeniezyklen). Daran schließt sich der geschlechtliche Vermehrungszyklus (Gamogonie) an. Die hierbei entstehenden Mikrogameten (männliche Geschlechtszellen) emigrieren aus den Dünndarmmucosazellen in das Darmlumen. Die Makrogameten (weibliche Geschlechtszellen) dagegen verbleiben bis zum Zeitpunkt der Befruchtung intrazellulär. Sie werden erst nach der Befruchtung als Oozysten in das Darmlumen entlassen (Dönges, 1988). Die Oozysten werden frühestens nach einer Präpatenzzeit von 3-9 Tagen mit dem Kot ausgeschieden. Infiziert sich die Katze nicht mit Toxoplasmazysten sondern mit sporulierten Oozysten, ist die Präpatenzzeit auf 20-35 Tage verlängert, da vor der enteroepithelialen Phase eine ungeschlechtliche extraintestinale Vermehrung stattfinden muss. Die Ausscheidung von Oozysten dauert nur wenige Tage bis Wochen, ist aber mit bis zu 600 Millionen Oozysten pro Tier sehr intensiv (Mehlhorn, 2002). Nach der Ausscheidung mit dem Kot an die Außenwelt erfolgt die externe Phase. Bei Zimmertemperatur sporulieren die Oozysten innerhalb von 2-4 Tagen. Dadurch werden sie infektiös. Sie sind sehr resistent und können bei feuchter Umgebung bis zu fünf Jahre infektiös bleiben. Durch die üblichen Desinfektionsmittel werden die sporulierten Oozysten nicht abgetötet. Nur bei Temperaturen über 55° C sterben sie ab.

Die extraintestinale Phase schließt sich an eine perorale Infektion an und kommt sowohl beim Endwirt als auch beim Zwischen- und Fehlwirt vor. Die Toxoplasmen gelangen vom Darm durch das Blut oder die Lymphe in verschiedene Organe und vermehren sich dort in kernhaltigen Wirtszellen. Die Toxoplasmen bevorzugen das retikuloendotheliale System (RES), hier insbesondere die Makrophagen, und verbreiten sich so hämatogen im ganzen Körper des Wirtes. In den kernhaltigen Wirtszellen finden wiederholte Endodyogeniezyklen statt. Dabei erweitert sich die Wirtszelle so sehr, dass darin bis zu 32 Tochterindividuen Platz haben. Danach platzt die Wirtszelle, die dabei frei werdenden Endozoen befallen die benachbarten Zellen. Dieser Ablauf führt

im befallenen Gewebe zu fokalen Nekrosen und entzündlichen Reaktionen. Hier sind insbesondere das Zentrale Nervensystem (ZNS) und die Muskulatur betroffen. Um den Ablauf der extraintestinalen Gewebsinfektion zu beschreiben, muss unbedingt zwischen den Bradyzoiten und den sich schnell vermehrenden Tachyzoiten unterschieden werden.

Die Tachyzoiten prägen das akut verlaufende Initialstadium der Infektion. Im Zytoplasma der Wirtszelle sind die Tachyzoiten in eine sogenannte parasitophore Vakuole eingeschlossen. Nach vielen Teilungsschritten ist die Wirtszelle vollständig von Parasiten ausgefüllt. Sie wird dann als Pseudozyste bezeichnet, weil die Parasitenansammlung nicht von einer echten Zystenwand, sondern nur vom Plasmalemma der Zelle umschlossen ist. Die Pseudozyste zerfällt und die Einzelparasiten dringen nach kurzer Zirkulation im Blut (Parasitämie) in neue Zellen ein. Etwa eine Woche nach der Infektion zeigt sich eine Immunreaktion des befallenen Wirtsorganismus. Zunehmend treten Antikörper und gegen *Toxoplasma*-Antigen sensibilisierte Lymphozyten auf (Köhler, 2001). Nach Einsetzen der Immunantwort, d.h. nach Erreichen einer gewissen Konzentration von Antikörpern, tritt das chronische Krankheitsstadium ein (Dönges, 1988). Die durch eine wesentlich länger dauernde Entwicklung gekennzeichneten Bradyzoiten vermehren sich zunächst auch in einer Wirtszelle. Anschließend sind sie zu mehreren von einer Zystenwand umgeben und stellen Dauerzysten dar. Diese Zysten können einen Durchmesser bis zu 150 µm erreichen und Hunderte von Einzelparasiten enthalten. Sie rufen in ihrer Umgebung keine entzündliche Reaktion mehr hervor und scheinen die Immunität des Wirtes aufrecht zu erhalten. Diese Zysten sind Dauerstadien, die lange im Gewebe erhalten bleiben, vor allem sind sie im ZNS, der Skelett- und Herzmuskulatur zu finden, seltener auch in der Retina oder der Uteruswand. Die Zysten können über Jahre im Wirt existieren, ohne diesen merklich zu schädigen. Die gelegentlich aus den Zysten emigrierenden Zystozoen werden bei bestehender Immunität entweder vernichtet oder sie bilden neue Zysten. Bei neu auftretender Immunsuppression wie z.B. durch eine HIV-Infektion kommt es dann zu einer Reaktivierung der Toxoplasmose (Eckert, 1998; Herold, 2001).



**Abb. 1.2 *Toxoplasma gondii*, Entwicklungszyklus**

Aus Mehlhorn und Piekarski, 2002

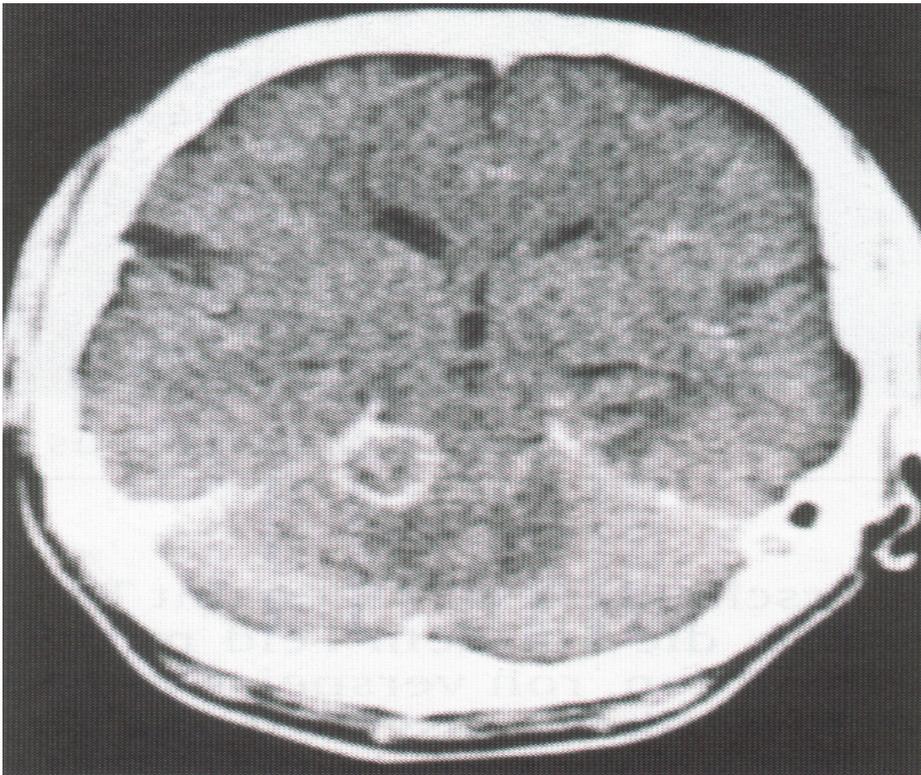
### 1.1.3. Pathogenese und Krankheitsbild

Grundlage für die Pathogenese bilden die fokal nekrotisierenden und entzündlichen Prozesse sowie die immunpathologische Reaktion. Infiziert sich ein Individuum mit *Toxoplasma gondii*, dann ist sowohl das Alter als auch der Immunstatus des Patienten von großer Bedeutung. Daraus ergibt sich ein vielgestaltiges Krankheitsbild der Toxoplasmose. Der Infektionsweg kann auf drei verschiedenen Wegen verlaufen. Das Individuum kann die Toxoplasmen zum einen durch den Verzehr von rohem zystenhaltigem Fleisch peroral aufnehmen. Hier spielt vor allem der Genuss von rohem Schweinemett eine große Rolle. Zum anderen ist ein zweiter peroraler Infektionsweg über die Aufnahme von sporozoitenhaltigen Oozysten möglich. Der dritte Infektionsweg verläuft auf hämatogen-diaplazentarem Weg, wenn sich die Mutter während der

Schwangerschaft erstinfiziert. Man unterscheidet die postnatal und pränatal erworbene Form (Heizmann, 1991). Bei der postnatalen Toxoplasmose muss auf den Zustand des Immunsystems des Wirtes eingegangen werden. Daher wird die postnatale Toxoplasmainfektion nochmals unterteilt. Die häufigste Form ist die Primärinfektion bei Immunkompetenten, hier verläuft sie meistens ohne klinische Manifestation. Nach einer Inkubationszeit von 1-3 Wochen kommt es zu leichtem Fieber, Mattigkeit, Kopfschmerzen, Muskel- und Gelenkschmerzen sowie gelegentlich zu Durchfällen. Bei etwa 1 % der akuten Infektionen findet sich im Halsbereich eine subakute Lymphadenitis. Diagnostiziert wird die Toxoplasmose über spezifische Antikörper im Serum. Die Infektion kann ein Leben lang persistieren und sich nur bei Immunsuppression reaktivieren (Herold, 2001).

Eine ebenfalls wichtige Form ist die Primärinfektion während der Schwangerschaft. Die Infektion der Mutter kann im Rahmen der Generalisation die Plazenta besiedeln und etwa 3-4 Wochen später auf den Fötus übertragen werden. Dies geschieht bei etwa der Hälfte der Fälle. Die Übertragung auf den Fötus und ihre Auswirkung sind jedoch trimenonabhängig. Aufgrund der Schwere der Erkrankung erlangt diese Form der Toxoplasmose besondere Bedeutung. Die pränatale Infektion des Fötus tritt nur bei Frauen auf, die sich während der Schwangerschaft erstmalig mit Toxoplasmen infizieren. Bei bereits bestehender latenter Infektion vor Beginn der Schwangerschaft weisen die Mütter Antikörper (IgG) auf, hier besteht keine Gefahr einer erneuten Infektion und die schon bestehende latente Infektion kann nicht auf den Fötus übergehen. Das Infektionsrisiko ist im ersten Trimenon der Schwangerschaft für den Fötus am geringsten und nimmt bis zum Ende der Schwangerschaft stetig zu. Infektionen zu Beginn der Schwangerschaft führen allerdings zu schwereren Schäden beziehungsweise zum Abort. Findet die Infektion später statt, so ist das Ausmaß der Schäden geringer. Die Folgen einer pränatalen Infektion sind bei 10 % klinisch gravierend mit Gehirnschäden wie Hydrozephalus oder intrazerebralen Verkalkungen. In 15 % der pränatalen Infektionen zeigt sich eine mildere Symptomatik mit Chorioretinitis, Gehirnschäden treten hier selten auf. In 75 % der Infektionen erscheinen die Neugeborenen klinisch unauffällig, allerdings können später im Säuglings- und Kleinkindalter Zeichen von Entwicklungsstörungen, geistige Retardierung und Augenschäden bis zur Erblindung auftreten (Hahn, 2004).

Außerdem muß auch die postnatale Infektion bei Immunsupprimierten erwähnt werden. Bei bestehender Immundefizienz mit erheblichen Störungen der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellfunktionen wie bei einer HIV-Infektion oder unter immunsuppressiver Therapie wie z.B. nach erfolgter Organtransplantation oder Chemotherapie kann es zu einer Primärinfektion oder zu einer Reaktivierungs-Toxoplasmose kommen (Eckert, 1998). Die Primärinfektion bei Immunsuppression äußert sich durch eine fieberhafte Allgemeinerkrankung mit makulopapulösem Exanthem, generalisierter Lymphadenitis, nekrotisierender interstitieller Pneumonie, Hepatosplenomegalie, Myokarditis, Meningoenzephalitis, Augenschäden. Bei mehr als 30 % tritt die symptomatische Form als nekrotisierende Enzephalitis auf, z.T. mit Dissemination in andere Organe. Hierbei ist der Verlauf durch die Immundefizienz ebenso wie bei der Reaktivierungs-Toxoplasmose sehr schwer. Unbehandelt hat die Infektion eine hohe Letalität.



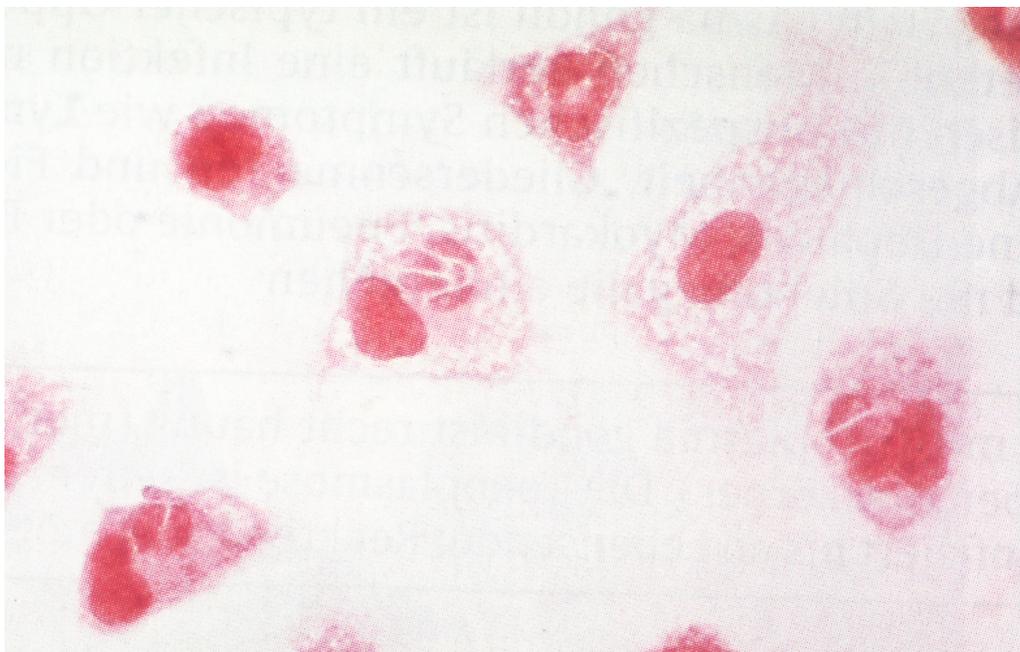
**Abb. 1.3 Toxoplasmenenzephalitis**

Aus Hof/Müller/Dörries, 2000

Die Reaktivierung geht von schon vorhandenen Gewebszysten aus, diese sind meist zerebral lokalisiert. Die Reaktivierungs-Toxoplasmose ist eine häufige Komplikation bei AIDS-Patienten, bis etwa 40 % der Patienten im manifesten AIDS-Stadium sind betroffen (Mehlhorn, 2002). Die Reaktivierung kann örtlich begrenzt oder generalisiert verlaufen. Die Toxoplasmenezephalitis (Abb. 1.3) ist verbunden mit multiplen Nekrosen, kleinherdigen Blutungen und Umgebungs-ödem. Seltener sind andere Organe betroffen, z.B. das Myokard oder die Lungen. *Toxoplasma gondii* verursacht somit eine opportunistische Infektion.

## 1.2. Immunologische Abwehr gegen *Toxoplasma gondii*

Verschiedene *Toxoplasma*-Antigene lösen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort im Wirt aus. Nach der Primärinfektion sind etwa eine Woche später zirkulierendes *Toxoplasma*-Antigen und spezifische Antikörper im Serum nachweisbar. Die aufgenommenen Parasiten werden von den Makrophagen phagozytiert. Dadurch wird zwar die Vermehrung der Endozoiten limitiert, aber die Makrophagen sind nicht in der Lage, die in ihnen befindlichen Tachyzoiten zu vernichten. Die Toxoplasmen können innerhalb der Makrophagen die Fusion mit den Lysosomen verhindern und entziehen sich damit der intrazellulären Zerstörung durch lysosomale Enzyme und Sauerstoffmetaboliten (Keller, 1994). Stattdessen vermehren sie sich ungeschlechtlich in den Fresszellen. Zusätzlich entziehen sich die Toxoplasmen mit der raschen Entwicklung von Zysten der Immunabwehr (Immunevasion). Nur so sind sie in der Lage, im immunkompetenten Wirt viele Jahre lang zu persistieren. Gleichzeitig halten sie durch die Persistenz einen Immunitätsstatus aufrecht, der vor einer Neuinfektion schützt.



**Abb. 1.4 Intrazelluläre Vermehrung von *Toxoplasma gondii***

Hof/Müller/Dörrie, 2000

Die Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii* beruht zum Großteil auf zellulären Mechanismen (Däubener und Hadding, 1997) und auf der Bildung von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). Das beweisen Versuche, bei denen es gelang, Milz- und Lymphknotenzellen infizierter Zellen auf Hamster zu übertragen und diese Tiere damit immun gegenüber einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* werden zu lassen. Zahlreiche zytostatische Mittel können die Ausbildung einer Immunität unterdrücken oder sogar verhindern. Behandelt man latent infizierte Mäuse mit Antikörpern gegen IFN $\gamma$ , kann die Infektion durch die Zysten reaktiviert werden (Suzuki et al., 1988). Die Zystozoen sind in der Lage, aus den Zysten zu emigrieren. Bei Immunkompetenz werden sie lokal inaktiviert, aber bei bestehender Immundefizienz entfällt diese Kontrolle und die latente Infektion geht über in eine akute, manifeste Toxoplasmose. Damit steht im Einklang, dass bei AIDS-Patienten die latente Toxoplasma-Infektion normalerweise dann reaktiviert und symptomatisch wird, wenn die Zahl der CD4<sup>+</sup>-Zellen auf Werte unter ca. 200 pro  $\mu$ l abfällt (Alexander, 1999).

Bei der spezifischen Immunreaktion entwickelt der Organismus zwei grundsätzlich verschiedene Formen, die humorale und die zelluläre Immunität. Gewisse Immunreaktionen können nur mittels Serum (humorale Immunität), andere nur mittels Zellen (zelluläre Immunität) übertragen werden.

### **1.2.1. Humorale Immunität**

In der akuten Phase der Infektion ist die humorale Immunantwort besonders wichtig. Bei der humoralen Immunantwort wird nochmals zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität unterschieden. Ein als fremd erkannter Stoff, das Antigen, aktiviert zum einen das Komplementsystem (Schreiber und Feldmann, 1980), bestehend aus den Faktoren C1-C9 (unspezifische Abwehr). Zum anderen werden B-Zellen zur Bildung von Antikörpern und Immunoglobulinen (spezifische Abwehr) angeregt. Diese Produktion der Antikörper hat das Ziel, die Antigene - *Toxoplasma gondii* - an sich zu binden, diese zu markieren und für eine Vernichtung durch Immunzellen und

Komplementproteine zugänglich zu machen (Kirchner, 1994). Hierbei wirken Antikörper und das Komplementsystem synergistisch. Bindet die C3-Komponente des Komplementsystems allerdings an die Oberfläche eines *Toxoplasma gondii*, kann kein lytischer Komplex gebildet werden und die Kaskade des Komplementsystems bricht ab (Fuhrmann und Joiner, 1989). *Toxoplasma gondii* ist aufgrund der Membranbeschaffenheit in der Lage, dieses C3-Fragment in ein inaktives iC3-Fragment umzuwandeln.

Bei der chronischen Infektion mit *Toxoplasma gondii* scheint die humorale Immunantwort eine untergeordnete Rolle zu spielen, da bei immunsupprimierten Patienten trotz hoher Antikörpertiter die chronische Infektion wieder reaktiviert wird und zum Vollbild der Toxoplasmose führen kann. Hier ist also die zelluläre Immunität von großer Bedeutung.

### **1.2.2. Zelluläre Immunantwort**

Zelluläre Immunreaktionen sind unter anderem von Bedeutung bei der Abwehr gegenüber Pilzen, Viren und intrazellulär lebenden Bakterien bzw. Parasiten, wie z.B. Mykobakterien, Listerien, Brucellen und Toxoplasmen, da die humorale Immunantwort nicht in der Lage ist, die intrazelluläre Proliferation einzudämmen. Bei der zellulären Immunität wird ebenfalls eine unspezifische von einer spezifischen Form unterschieden. Bei der unspezifischen Form steht an erster Stelle die Phagozytose des Erregers, also der Toxoplasmen. Dazu sind die mononukleären Phagozyten (Makrophagen und Monozyten) sowie die polymorphkernigen Leukozyten (Granulozyten) in der Lage. Die verantwortlichen Zellen binden den Erreger mittels Oberflächenrezeptoren. Diese Rezeptoren erkennen das betreffende Antigen allerdings nur, wenn es in Verbindung mit bestimmten eigenen Strukturen präsentiert wird (Keller, 1994). Sobald das Antigen an der Oberfläche haftet, wird es durch „Umfließen“ in das Zytoplasma der Fresszelle aufgenommen. Hier wird das Antigen von einer Vakuole umschlossen - es entsteht das Phagosom. Die im Golgi-Apparat gebildeten Lysosomen geben ihren Inhalt in das Phagosom. Durch diese Fusion wird das

Antigen abgebaut. Toxoplasmen können sich dieser Phagozytose jedoch entziehen, da sie aktiv in solche Zellen eindringen und somit eine phagolysosome Vakuole entsteht. Die Toxoplasmen vermehren sich in dieser Vakuole, weil hier keine Fusion mit den Lysosomen stattfindet. Damit die Toxoplasmen in den phagolysosom Vakuolen erfolgreich vernichtet werden können, muss eine vorhergehende Aktivierung durch Zytokine oder die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern oder Komplement stattgefunden haben (Stadtsbaeder et al., 1975). Es wurde bewiesen, dass sowohl bei murinen als auch bei humanen Makrophagen eine verstärkte Phagozytose über den FC-Teil der Antikörper vermittelt wird (Anderson und Remington, 1974). Zudem konnte eine Aktivierung ruhender humaner und muriner Makrophagen durch Zytokine aufgezeigt werden (Hughes et al., 1987; Anderson et al., 1976). Hierbei spielt  $IFN\gamma$  in der Abwehr gegen *Toxoplasma gondii* die größte Rolle (Kayser, 1998). Dieses Zytokin wird von T-Zellen gebildet und ist zum einen an immunregulatorischen Prozessen beteiligt, wie z.B. der Expression von Major histocompatibility complex (MHC) Klasse I- und II-Antigenen. Zum anderen induziert es antibakterielle und antiparasitäre Effektormechanismen. Beispielsweise wurde eine Proliferationsinhibition auf Bakterien wie *Chlamydia psittaci* (Murray et al., 1985(a)) und eine mikrobizide Wirkung bei *Leishmania donovani* (Murray et al., 1985(b)) sowie bei *Schistosoma mansoni* (Esparza et al., 1987) nachgewiesen.

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ), der vorwiegend in aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet wird. Die Rolle des  $TNF\alpha$  im Immunsystem ist weniger in der anti-tumoralen Wirkung als in seiner zentralregulatorischen Rolle bei Entzündungs- und Immunreaktionen zu sehen.  $TNF\alpha$  wird bereits früh während der Entzündung gebildet und beeinflusst die beteiligten Immunzellen. Bei Granulozyten und Makrophagen wird dadurch eine Steigerung der Phagozytose und der antikörperabhängigen Zytotoxizität gegen Mikroorganismen, Parasiten und Tumorzellen erreicht (Kirchner, 1994). Außerdem verstärkt  $TNF\alpha$  die  $IFN\gamma$ -Wirkung und unterstützt so wesentlich die Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii* (Däubener et al., 1996). Zudem werden auch den Interleukinen-1, -2, -7 und -12 eine protektive Wirkungsweise zugeschrieben (Däubener und Hadding, 1997).

Um das Aktivieren des Immunsystems zu regulieren, wurde die Wirkung vor allem von Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) untersucht. IL-4 ist ein

Produkt von aktivierten T-Zellen, es ist ein stark glykosyliertes Protein mit einem Molekulargewicht von 25 Kilodalton. Wesentliche Eigenschaften dieses Interleukins sind die Steigerung der MHC-Klasse-II-Expression und der Antigenpräsentation, der IgG- und der IgE-Produktion durch B-Zellen, die Steigerung des T-Zell-Wachstums sowie die Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor für antigenspezifische T-Zellen in Verbindung mit IL-1 (Kirchner, 1994). Der bekannte antagonistische Effekt zu IFN $\gamma$  ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.

IL-10 wurde erstmals 1989 als Zytokin-inhibierender Faktor beschrieben (Fiorentino et al., 1989). Bereits kurz nach seiner Entdeckung wurde es als IL-10 in die Zytokine eingereiht. IL-10 ist ein 35 bis 40 Kilodalton großes säurelabiles Protein, dieses Zytokin wird von den T-Zellen produziert. Zum einen steigert IL-10 die humorale Immunantwort, zum anderen unterdrückt es die zelluläre Immunantwort. Neben IL-4 ist IL-10 der bekannteste stärkste IFN $\gamma$ -Antagonist (Kirchner, 1994). Der Krankheitsverlauf vieler Parasitosen wird durch IL-10 protrahiert, da das IL-10 die IFN $\gamma$ -Produktion und die zelluläre Immunantwort durch die T-Zellen unterdrückt.

Die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Toxoplasmenabwehr konnte in einem *in vitro*-Experiment bewiesen werden. Hierzu wurden Thymus- und T-Zell-defizienten Mäusen physiologische Lymphozyten verabreicht. Diese Tiere entwickelten nun im Vergleich zu vorher einen Infektionsschutz. Außer der lymphokinvermittelten Abwehr konnte den T-Zellen auch eine direkte Wirkung nachgewiesen werden (Lindberg und Frenkel, 1977). In weiteren Experimenten wurden intrazelluläre Toxoplasmen durch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen abgetötet und zwar sowohl in murinen als auch in humoralen Infektionsmodellen (Khan et al., 1990).

### **1.2.3. Die Rolle der humanen Makrophagen in der Immunabwehr**

Innerhalb einer Entzündungsreaktion nehmen die Zellen des mononukleären Phagozytensystems eine zentrale Stellung ein. Hierzu zählt man die Monozyten des Blutes und die aus ihnen hervorgehenden gewebsspezifischen Makrophagen. Ihre Aufgabe bei der körpereigenen Abwehr besteht hauptsächlich in der Aufnahme und Vernichtung von Mikroorganismen, Immunkomplexen und geschädigten Zellen, daher werden sie neben den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zu den professionellen Phagozyten gezählt (Klein, 1991). Monozyten entwickeln sich über mehrere Zwischenstufen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Sie zirkulieren für ca. 20 bis 30 Stunden (h) im Blut, danach wandern sie in die verschiedenen Organe und Gewebssysteme aus. Hier entwickeln sie sich zu ortsspezifischen Makrophagen und besitzen - durch das umliegende Gewebe geprägt - unterschiedliche zusätzliche Funktionen. Je nach Gewebetyp unterscheidet man die Makrophagen der Lunge (Alveolarmakrophagen), der Bauchhöhle (Peritonealmakrophagen), der Milz (Milzmakrophagen), der Leber (Kupffer-Zellen), des Gehirns (Mikroglia), der Nierenglomeruli (endothelständige Makrophagen), des Bindegewebes (Histiozyten) und des Knochens (Osteoklasten) (Heizmann, 1999). Im nicht entzündeten Gewebe beseitigen die Makrophagen gealterte Zellen. Außerdem produzieren sie eine große Zahl löslicher Faktoren, die für die Kommunikation innerhalb des Immunsystems wichtig sind. Durch die Mediatoren einer Entzündungsreaktion werden die Makrophagen aktiviert. Im aktivierten Zustand zeigen diese Zellen stark veränderte phänotypische und funktionelle Eigenschaften. Aktivierte Makrophagen haben einen erhöhten Metabolismus und sind zu einer gesteigerten Adhärenz, Zytotoxizität und Phagozytose fähig. Vor allem sind diese Makrophagen sekretorisch hochaktiv, sie setzen vermehrt Zytokine frei und greifen auf diesem Weg regulierend in die Immunantwort ein (Kirchner, 1994). Durch die Freisetzung von Zytokinen, Komplementkomponenten und proteolytischen Enzymen wie Elastase und Kollagenase tragen sie maßgeblich zur Induktion und Verstärkung von Entzündungsprozessen bei. Auf der anderen Seite werden auch entzündungshemmende Stoffe produziert wie z.B. der Transforming-Growth-Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) oder IL-10. Dadurch wird ein

entscheidender Einfluss auf die Suppression und Beendigung der Immunantwort ausgeübt. So wird eine ausgeglichene Immunreaktion gewährleistet und die Ausdehnung von entzündlichen Reaktionen wird begrenzt (Kirchner, 1994).

Bei der Phagozytose ist der erste Schritt die Anlagerung des Antigens an die Oberfläche des Makrophagen, dies geschieht über Rezeptormoleküle. Dieser Vorgang wird verstärkt, wenn der Mikroorganismus von Antikörpern oder der Komplementkomponente C3b umgeben ist. Während sich die Zytoplasmamembran des Makrophagen einzustülpen beginnt, wird der Erreger nun von Pseudopodien umschlossen und dann als sogenanntes Phagosom eingeschlossen. Im Zellinnern verschmelzen die Phagosomen mit Lysosomen. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die verschiedenen Abtötungsmechanismen. Zuerst kommt es nach der Fusion mit den Lysosomen zu einem drastischen pH-Abfall, was bereits für viele Bakterien toxisch ist. Außerdem enthalten die Lysosomen viele aggressive Substanzen, z.B. Lactoferrin, Proteasen, kationische Proteine, Säurehydrolasen und Lysozym. Diese Substanzen sind ebenfalls an der Vernichtung von Mikroorganismen beteiligt. Diese Mechanismen laufen sauerstoffunabhängig ab. Neben diesen sauerstoffunabhängigen Vorgängen generieren Makrophagen viele reaktive Sauerstoff- und Stickstoffmetabolite, die bei der Abtötung der phagozytierten Erreger ebenfalls eine große Rolle spielen. Einige Bakterien und Protozoen sind jedoch in der Lage, der intrazellulären Vernichtung zu entgehen. Entweder können sie die Fusion des Phagosoms mit Lysosomen hemmen, sind gegenüber lysosomalen Enzymen resistent oder sie wandern in das Zytoplasma des Phagozyten aus. Dies gilt insbesondere für fakultativ intrazellulär wachsende Erreger wie *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Toxoplasma gondii* (Kirchner, 1994). Diese intrazellulären Parasiten können sich in den Makrophagen vermehren und sind zusätzlich vor der zytotoxischen T-Zell-Antwort geschützt. Werden die Makrophagen allerdings zusätzlich durch Zytokine, insbesondere IFN $\gamma$  aktiviert, sind sie zu einer effektiven Toxoplasmostase fähig. Diesem Vorgang liegt ein spezieller Mechanismus zugrunde. Zur Abwehr intrazellulärer Parasiten sind aus der Literatur mehrere Effektormechanismen bekannt, auf die drei Wichtigsten soll hier eingegangen werden.

#### 1.2.4. Degradation von L-Tryptophan

Bei der Verstoffwechslung der für den menschlichen Körper essentiellen Aminosäure L-Tryptophan spielt das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO, EC 1.13.11.42) eine wichtige Rolle. Dieses flavinabhängige Enzym ist ubiquitär in menschlichem Gewebe vorhanden und wurde erstmals von Hayaishi im Jahre 1963 isoliert. Seitdem wurde die IDO in vielen humanen Zelltypen nachgewiesen, unter anderem in Makrophagen (Murray et al., 1989), in Monozyten (Carlin et al., 1989(a)) sowie in Glioblastomzellen (Däubener et al., 1993). In Anwesenheit von Sauerstoff katalysiert die IDO den Abbau von L-Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin und Kynurenin. Der Abbauweg des L-Tryptophan wird in den „Indolaminweg“ und in den „Kynureninweg“ unterteilt. Das Endprodukt des „Indolaminweges“ ist das Serotonin, im Verlauf des „Kynureninweges“ entstehen über Zwischenschritte Quinolin- und Kynureninsäure. Die Quinolinsäure (QUIN) kann weiter bis zur Entstehung von Nicotinsäuramid (Vitamin B-Komplex) abgebaut werden. Zusätzlich entsteht Acetyl-CoA (Stone, 1993; Kreutzig, 1993). Der Abbau des L-Tryptophan kann durch IFN $\gamma$  verstärkt werden. Die bereits bekannte potenzierende Wirkung des TNF $\alpha$  auf das IFN $\gamma$  konnte auch bei der IDO-Induktion nachgewiesen werden, während TNF $\alpha$  alleine keinen Stimulationseffekt auf die IDO hat (Däubener et al., 1996; de Titto et al., 1986). Die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmose wurde erstmalig in Fibroblasten nachgewiesen (Pfefferkorn, 1984). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt mit der Konzentration von L-Tryptophan korrelierte. Im Verlauf wurde für den ebenfalls intrazellulär wachsenden Parasiten *Chlamydia psittaci* dasselbe Ergebnis beschrieben (Carlin et al., 1989(b)). Der Effekt der IFN $\gamma$ -induzierten Toxoplasmose konnte durch Zugabe von L-Tryptophan komplett aufgehoben werden. Däubener et al. konnten 1993 diesen Vorgang in Fibroblasten und in Glioblastomzellen beweisen. Seitdem geht man davon aus, dass der oben beschriebene L-Tryptophanmangel der Mechanismus der IDO-abhängigen antiparasitären Wirkung ist und durch IFN $\gamma$  induziert wird.

Zusätzlich konnte der IDO-Induktion auch ein antibakterieller Effekt nachgewiesen werden. In Glioblastomzellen sowie in Nabelschnurblutmakrophagen (CBMDM) konnte eine IDO-induzierte Wachstumshemmung

extrazellulärer Streptokokken der Gruppe B (GBS) aufgezeigt werden (MacKenzie et al., 1998(a); MacKenzie et al., 1998 (b)).

### 1.2.5. Oxidative burst

Bei der Aktivierung eines Makrophagen phosphoryliert die Proteinkinase C, ein membranständiges Enzym, zweierlei Arten von Proteinen. Die eine Gruppe sind Proteine der Mikrofilamente, sie spielen bei der Aufnahme des Partikels in den Makrophagen eine wichtige Rolle. Die andere Gruppe sind Proteine des NADPH-Oxidase-Komplexes, deren Phosphorylierung führt zum sogenannten „Oxidative burst“ (Klein, 1991). Die dadurch entstehenden metabolischen Vorgänge sind an die mitochondriale Atmung geknüpft, es wird also Sauerstoff verbraucht. Durch den Sauerstoffverbrauch entstehen intrazellulär Sauerstoffmetaboliten bzw. Sauerstoffabfallprodukte und zwar das Peroxid ( $H_2O_2$ ) und das Superoxidation ( $O_2^-$ ). Diese Sauerstoffmetabolite, hierzu gehören auch die Hydroxyl- ( $\cdot OH$ ) und die Alloxylradikale ( $RO\cdot$ ), sind aufgrund ihrer Elektronenkonfiguration wesentlich reaktiver als der Ausgangsstoff (Lodish, 1996). Bei der Immunantwort werden die Sauerstoffmetabolite sowohl von humanen (Nathan et al., 1983) als auch den murinen (Murray et al., 1985(b)) Makrophagen nach Aktivierung mit  $IFN\gamma$  gebildet. Durch die Reaktivität der Sauerstoffmetabolite erhöht sich die antimikrobizide Wirkung der Makrophagen. *Toxoplasma gondii* besitzt allerdings endogene Katalasen. Damit entzieht sich das Protozoen der antimikrobiziden Wirkung der Sauerstoffmetabolite, da die Katalasen die Sauerstoffmetaboliten spalten und damit die antimikrobizide Wirkung aufheben (Murray et al., 1985(a)).

### 1.2.6. L-Arginin abhängige Produktion von Stickoxiden

In murinen Makrophagen wurde ein weiterer wichtiger Abwehrmechanismus beschrieben. Ding et al. entdeckte 1988 die Produktion von Stickstoffmonoxid NO. Durch die Aktivierung der Makrophagen mittels IFN $\gamma$  kommt es zur enzymatischen Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin, katalysiert durch das zytokininduzierbare Enzym „inducible NO synthase“ (iNOS). Diese Reaktion findet ebenfalls nur unter Sauerstoffverbrauch statt, dabei entsteht das Radikal NO. Diesem Radikal schreibt man die zytotoxische Wirkung aktivierter Makrophagen zu. Bei Enzymen, die in ihren katalytischen Zentren das Kation Fe<sup>2+</sup> enthalten, führt es zu einem Eisenverlust (Liew und Cox, 1991). Als Beispiel wären hier die Enzymkomplexe I und II der mitochondrialen Atmungskette anzuführen (Voet und Voet, 1992).

Die Produktion von NO in murinen Makrophagen ist ein anerkannter Mechanismus der Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii*. Auch in humanen Makrophagen konnten entsprechende Faktoren, wie z.B. das Vorkommen der iNOS-mRNA nachgewiesen werden (Bertholet et al., 1999). Allerdings wird kontrovers diskutiert, ob NO in effektiven Mengen gebildet wird und welche Bedeutung die Stickoxide als Abwehrmechanismus im menschlichen Organismus haben, insbesondere in Bezug auf die Vernichtung von *Toxoplasma gondii* (Weinberg et al., 1995).

### **1.2.7. Nabelschnurblutmakrophagen**

Die Rolle der humanen MDM in der Immunabwehr und ihre Wirkungsmechanismen sind weitestgehend bekannt. Für die Nabelschnurblutmakrophagen (CBMDM) wird eine ähnlich zentrale Stellung in der Immunabwehr angenommen. Die Wirkungsmechanismen sind hier allerdings noch nicht hinreichend geklärt. Nabelschnurblut findet mittlerweile als Quelle von Stammzellen therapeutische Verwendung z.B. bei Leukämien oder nach Chemotherapie. Es dient als Ersatz für allogene Knochenmarksspenden. Eine Übertragung von Nabelschnurblut ist wesentlich risikoärmer, v.a. im Hinblick auf eine „Graft versus Host Reaktion“ (GvHD) (Barker und Wagner, 2002). Zudem ist auf Nabelschnurblut wesentlich einfacher zurückzugreifen, anstatt einen passenden Knochenmarkspender ausfindig zu machen. Außerdem ist die Übertragung von Nabelschnurblut sehr viel kostengünstiger (Cohen et al., 2000). Aus diesen Gründen gewinnt Nabelschnurblut bei Knochenmarksuppression eine immer wichtigere Rolle. Das Begreifen dieser Wirkungsmechanismen der verschiedenen Zellen im Nabelschnurblut, insbesondere der CBMDM, ist also von größter Bedeutung. Vor allem die Erforschung der immunologischen Charakteristika verdient höchste Aufmerksamkeit. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit fast ausschließlich mit CBMDM gearbeitet.

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Die immunologischen Reaktionen im Rahmen einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* bei immunsupprimierten Patienten z.B. bei einer HIV-Infektion oder durch Therapien mit Immunsuppressiva nehmen einen immer größer werdenden Stellenwert ein. Nabelschnurblut wird therapeutisch unter anderem bei Leukämien mit Knochenmarksuppression eingesetzt und gewinnt anstelle von Knochenmarkspenden eine immer wichtigere Bedeutung.

Die bisher bekannten Abwehrmechanismen und ihre Rolle in der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten wurden zuvor in Kapitel 1.2.5.-1.2.7. beschrieben. Makrophagen, die auch in Nabelschnurblut enthalten sind, spielen eine große Rolle in der Immunabwehr von intrazellulären Parasiten, insbesondere *Toxoplasma gondii*. Allerdings dienen sowohl die MDM als auch die CBMDM den obligat intrazellulären Einzellern auch als Wirtszelle und Reservoir. Um diese komplizierten immunologischen Abläufe dieser Zellen zu verstehen, wurden sowohl humane MDM als auch CBMDM in verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht.

So konnte für humane MDM gezeigt werden, dass eine Stimulation dieser Zellen mit  $\text{INF}\gamma$  das tryptophanabbauende Enzym IDO induziert und somit das tryptophanabhängige Toxoplasmenwachstum hemmt. Die IDO als antiparasitärer Mechanismus unterliegt einer Immunregulation und wird durch verschiedene Effektoren des Immunsystems beeinflusst.

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, herauszufinden, ob die bisher gewonnenen Erkenntnisse der immunologischen Abläufe in humanen MDM auch auf CBMDM auszudehnen sind. Die Bedeutung der  $\text{INF}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivierung und dem daraus resultierenden Tryptophanabbau wurde in CBMDM untersucht. Es galt herauszufinden, ob diese Degradation des L-Tryptophans auch in CBMDM eine Toxoplasmostase auslösen kann. Des Weiteren sollten in dieser Arbeit auch regulierende Wirkungsmechanismen, die in die Degradation des L-Tryptophans eingreifen, untersucht werden. Für  $\text{TNF}\alpha$  konnte der bereits bekannte synergistische antiparasitäre Effekt auf die IDO-Induktion auch in CBMDM nachgewiesen werden. Danach sollten auch inhibitorische Effektormechanismen für die IDO-Induktion gefunden werden. Hierzu wurde mit bereits bekannten

inhibitorisch wirksamen Zytokinen wie IL-4 und IL-10 gearbeitet. Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität mit resultierendem beschleunigtem Tryptophanabbau auch durch ein Analogon des L-Tryptophans, nämlich das 6-chloro-D-L-Tryptophan (6-CDLT) inhibiert werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien, Reagenzien und Zytokine

Anti-IL-10 Antikörper	Genzyme, Cambridge, USA
6-Chloro-D-L-Tryptophan	Biosynth AG, Schweiz
DMSO	Merck, Darmstadt
Ehrlichsreagenz	Sigma Chemical Co.
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Seromed, Berlin
Ficoll-Paque	Amersham Pharmacia Biotech,Uppsala, Sweden
GM-CSF	Genzyme,Cambridge, USA
Heparin	Roche, Liquemin
<sup>3</sup> [H]-Uracil	Amersham Buchler, Braunschweig
Hydrocortison	Sigma, Chemical CO., St. Louis, USA
Interferon- $\gamma$	Thomae, Biberach
Interleukin-4	Genzyme, Cambridge, USA
Interleukin-10	Genzyme, Cambridge, USA
Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium	Gibco, Grand Island, New York, USA
L-Glutamine	Gibco, Grand Island, New York, USA
L-Tryptophan	Sigma, Chemical CO., St. Louis, USA
PBS	Serag Wiessner, Naila, Bayern
Pferdeserum	PAA Laboratories, Linz, Austria
RPMI-Medium	Gibco, Grand Island, New York, USA
Seromed	Biochrom KG 1640, FZ 1215
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt

Trypanblau	Sigma, Chemical CO., St. Louis, USA
Tumornekrosefaktor- $\alpha$	Genzyme, Cambridge, USA

## 2.2. Geräte und Materialien

Filter 0,2 $\mu$ m	Media Kap, Micrognon, Laguna Hill, USA
Mikrotiterplatte, Flachboden	Greiner, Nürtingen
Mikrotiterplatte, Spitzboden	Greiner, Nürtingen
Perfusoreinmalspritze, Vol.:50 ml	Braun, Meisungen AG
Zellkulturflaschen, Vol.: 50 ml	Costar, Cambridge, England
Zellkulturflaschen, Vol.: 250 ml	Costar, Cambridge, England
24-well-Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
96-well-Zellkulturplatten	Greiner, Nürtingen
Zellschaber	Greiner, Nürtingen
Zentrifugen PP-Röhrchen, Vol.: 15 ml	Greiner, Nürtingen
Zentrifugen PP-Röhrchen, Vol.: 50 ml	Greiner, Nürtingen

## 2.3. Zellkultur

### 2.3.1. Medien für die Zellkulturen

#### LTC-Medium:

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

Pferdeserum 12,5 % (v/v)

Inaktiviertes, fetales Kälberserum 12,5 % (v/v)

L-Glutamin 1 % (w/v)

Hydrocortison (1 $\mu$ M)

**IMDM 5 %:**

Iscove`s modifiziertes Dulbecco`s Medium mit Phenolrot und mit 5 % inaktiviertem, fetalem Kälberserum (FCS, Seromed, Berlin) versetzt.

**RPMI-Medium 5 %:**

RPMI 1640 Medium mit und ohne Phenolrot wurde als Fertigmedium (Gibco) bezogen und mit 5 % hitzeinaktiviertem FCS (Seromed) supplementiert.

**PBS-Puffer:**

Der sterile PBS-Puffer wurde als Waschpuffer verwendet.

NaCl 0,8 % (w/v)

KCl 0,02 % (w/v)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,135 % (w/v) x 2 H<sub>2</sub>O

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,025 % (w/v)

**FCS-Medium 5 %:**

IMDM mit Phenolrot in Pulverform (Gibco), gelöst in deionisiertem Wasser und versetzt mit:

NaHCO<sub>3</sub> 0,3 % (w/v)

Fetales Kälberserum (FCS, Seromed) 5 % (v/v) hitzeinaktiviert (56 °C/30 min)

Glutamin 1 % (w/v) (Gibco)

β-Mercaptoethanol 50 µM (Merck)

**Ehrlichsreagenz:**

300 mg Ehrlichsreagenz (Wirkstoff: p-Dimethylaminobenzaldehyd) in 25 ml 96 %-iger Essigsäure gelöst.

Alle verwendeten Medien wurden mit 0,2 µm MediaKap 5 Sterilfiltern (Microgon, Laguna Hill, USA) steril filtriert und anschließend im Kühlschrank gelagert. Zur Prüfung der Sterilität wurden jeweils zwei Aliquote von je 1 ml entnommen und für 48 h im Brutschrank bebrütet. Danach wurden die Sterilproben mikroskopisch auf Bakterien- und Pilzwachstum untersucht. Auf den Zusatz von Antibiotika wurde verzichtet, um sicherzustellen, dass eine bakterielle Kontamination schnell erkannt werden konnte.

### **2.3.2. Kultivierung und Ernte der Nabelschnurblutmakrophagen (CBMDM)**

Die CBMDM entstammten aus der nach der Entbindung abgeklemmten Nabelschnur von Säuglingen, die in der gynäkologischen Abteilung der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf geboren wurden. Das Nabelschnurblut, dessen Volumen weniger als 70 ml betrug, wurde freundlicherweise nach Absprache mit der Knochenmarksspendezentrale dem Institut für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene in steril abgepackter Form zur Verfügung gestellt. Zur Isolierung der CBMDM, die innerhalb von 24 h vollzogen sein sollte, wurde im Labor unter der sterilen Werkbank das Nabelschnurblut auf sterile Zentrifugenröhrchen (Zentrifugen PP-Röhrchen, Vol. 50 ml, Greiner, Nürtingen) verteilt, in die maximal 25 ml des Nabelschnurblutes pipettiert wurden. Mit PBS wurden die Röhrchen bis auf 50 ml aufgefüllt. Das mit PBS verdünnte Blut wurde vorsichtig mit einer Pipette in mit jeweils 15 ml Ficoll-Paque gefüllte sterile Zentrifugenröhrchen überführt, so dass sich 2 Schichten bildeten. Nach 30-minütigem ungebremstem Zentrifugieren bei 950 g und Raumtemperatur (RT) in einer Kühlzentrifuge (Minifuge GL, Haereus Christ, GmbH, Osterode) entstanden 4 Schichten in den Röhrchen. Die obere Schicht bestand aus Blutplasma, die Schicht darunter zeichnete sich durch eine leicht gelbliche Farbe aus, hier befanden sich die mononukleären Zellen. Die dritte Schicht bestand aus dem Ficoll und in der untersten Schicht lagerten sich die Erythrozyten und Granulozyten ab. Die mononukleären Zellen wurden nun mit der Pipette sorgfältig abgesaugt und erneut in sterile Zentrifugenröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden ebenfalls mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und mit 550 g für 10 min bei 4 °C

zentrifugiert. Es erfolgte noch ein Waschschrift, hierzu wurde der Überstand abgesaugt, nochmals mit 50 ml PBS versetzt und erneut für 10 min mit 550 g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die CBMDM, die sich nun in dem Zellpellet befanden, mit 25 ml LTC-Medium resuspendiert und in liegende 250 ml-Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge, England) gegeben. Kultiviert wurden die CBMDM bei 37 °C, wasserdampfgesättigter Luft mit 10 % CO<sub>2</sub>-Zusatz (Haereus Brutschrank, Typ 5060 EK-CO<sub>2</sub>). Nach 1 h wurden die nicht-adhärenen Zellen mit dem Medium abgewaschen und verworfen. Die verbleibenden adhärenen Zellen wurden mit neuem Medium versorgt und dann für 2-3 Wochen im Brutschrank kultiviert. Erst nach der Selektion durch die Adhärenz sind Monozyten vorhanden. Aus diesem Grund wurde frühestens nach 21 Tagen unter dem Mikroskop beurteilt, ob die CBMDM für eine Versuchsreihe geeignet waren. Die adhärenen Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche gespült. Als Spülung wurde entweder das sich in den Zellkulturflaschen befindliche Medium, oder auf 4 °C gekühltes PBS verwendet. Die gelösten CBMDM wurden samt dem LTC-Medium in sterile Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 250 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. In den hier durchgeführten Versuchsreihen wurden 2 x 10<sup>4</sup> CBMDM/well in 50 µl Medium eingesetzt. Zur Aufrechterhaltung der Zellkultur wurde alle 2 Wochen das Medium zur Hälfte durch frisches Medium ausgetauscht. Unter der Werkbank wurde aus den Zellkulturflaschen mit einer Pipette das alte Medium aus den Flaschen entnommen und in sterile Zentrifugenröhrchen gefüllt. Diese Röhrchen wurden für 10 min bei 250 g und 4 °C zentrifugiert, um die sich darin befindenden nicht adhärenen CBMDM nicht werfen zu müssen. Die CBMDM wurden mit 10 ml frischem LTC-Medium resuspendiert und zurück in das ursprüngliche Gefäß pipettiert, dazu wurden nochmals 15 ml frisches LTC-Medium gegeben.

Für die Zellzählung wurde mit der Neubauer-Zählkammer (Assistent, Tiefe: 0,100 mm, Fläche: 0,0025 mm<sup>2</sup>) gearbeitet. Die Zellsuspension wurde mit Tryptophanblau zu einer 1:2 Verdünnung vermischt. Nur vitale CBMDM stellen sich unter dem Mikroskop hell dar, da sie den Farbstoff nicht aufnehmen. Für eine Testreihe wurden mindestens 2 x 10<sup>4</sup> Zellen/well in einer 96 well-Platte benötigt. Die für die Experimente bestimmten Zellen wurden nach der Zählung mit dem Kulturmedium (IMDM 5 %) auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

### **2.3.3. Humane adulte Makrophagen (MDM)**

Auch mit Makrophagen von adulten Spendern wurden Testreihen durchgeführt. Dazu wurden 100 ml Vollblut von gesunden Spendern entnommen. Um eine Gerinnung zu vermeiden, wurde das Vollblut pro Perfusorspritze (Perfusor-einmalspritze, Vol. 50 ml, Braun, Meisungen AG) mit 0,5 ml Heparin verdünnt. Die Präparation der adulten mononukleären Zellen unterschied sich nicht von der der CBMDM-Kulturen, allerdings wurden die Monozyten direkt nach der Präparation gezählt und auf 96-well-Zellkulturplatten (Greiner, Nürtingen) verteilt (Minimum  $1 \times 10^6$  Zellen/well). Die Platten wurden im Brutschrank gelagert. Nach 1 h waren die adulten Monozyten zum Großteil bereits adhären. Die nicht adhären Zellen wurden mit PBS abgespült. Es blieben  $1 \times 10^5$  Zellen pro well adhären. Bei 37 °C und wasserdampfgesättigter Luft mit 10 % CO<sub>2</sub>-Zusatz konnten die Monozyten innerhalb von 8-10 Tagen zu Makrophagen heranreifen (Carlin et al., 1989(a); Hissong et al., 1994). Danach konnten die MDM für die Versuchsansätze verwendet werden, ohne die Zellen einem erneuten Erntevorgang unterziehen zu müssen. Die MDM wurden nach acht Tagen Kultivierung für Versuchsreihen benutzt. Ein Wechsel des Mediums war daher nicht von Nöten.

### **2.3.4. Herkunft der Mausfibroblasten**

Die Mausfibroblastenlinie L929 entstammte dem Subkutangewebe einer Maus, die 1940 als eine der Ersten von W. R. Earle etabliert wurde. Ursprünglich wurde sie von ATCC Rockville (Katalognr.CCL-1) Maryland, USA, bezogen. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um normale, aus dem Subkutangewebe der Maus stammende Zellen. Die Zellen der Mausfibroblastenlinie L929 wurden in 50 ml Zellkulturflaschen (Costar, Cambridge, England) bei 37 °C, 10 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Als Kulturmedium diente IMDM 5 %. Nach 3-5 Tagen bildeten die plastikadhären Fibroblasten einen Zellrasen, der den kompletten Boden der Kulturflasche bedeckte. Dieser Zellrasen wurde mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner, Nürtingen) sowie durch Abspülen mit dem

Medium vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. 1 ml dieser Zellsuspension wurde dabei jeweils in der Kulturflasche belassen, 4 ml frisches Medium wurde zur weiteren Kultivierung hinzugefügt. Die entnommene Zellsuspension wurde für 10 min bei 250 g, RT zentrifugiert. Das sich abgesetzte fibroblastenreiche Sediment wurde mit 3 ml Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl in der Zählkammer als Wirtszellen für *Toxoplasma gondii* verwendet.

### **2.3.5. Herkunft und Kultivierung von *Toxoplasma gondii***

*Toxoplasma gondii* des Stammes BK wurden von Prof. Seitz und Dr. Saathof, Institut für Medizinische Parasitologie, Universität Bonn, zur Verfügung gestellt. Da die Vermehrung von *Toxoplasma gondii* obligat intrazellulär durch Endodyogenie erfolgt, ist eine Wirtszelle für seine Kultivierung zwingend erforderlich. Als Wirtszelle diente die Mausfibroblastenlinie L929, wobei  $1-2 \times 10^6$  L929-Zellen pro  $1-5 \times 10^4$  Toxoplasmen in eine mit 5 ml IMDM 5 % gefüllte Kulturflasche gegeben wurden. Diese Zellkulturflaschen wurden für 3 Tage bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Luft mit 10 % CO<sub>2</sub>-Zusatz bebrütet (Flow Brutschrank IR 1500, Automatic CO<sub>2</sub> Incubator). In dem Zeitraum von 3 Tagen wurden nahezu alle Wirtszellen infiziert und nach mehreren Teilungszyklen der Toxoplasmen lysiert. Die sich nun größtenteils extrazellulär befindlichen Toxoplasmen wurden nach dieser Zeit von dem Flaschenboden gespült und aus der Kulturflasche entnommen. Diese Toxoplasmen wurden nun entweder für eine laufende Versuchsreihe verwertet oder verworfen. Für eine laufende Versuchsreihe wurde die Toxoplasmensuspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen (Zentrifugen PP-Röhrchen, Vol. 15 ml, Greiner, Nürtingen) überführt. Um die Toxoplasmen von den restlichen Mausfibroblasten zu trennen, wurde das Röhrchen mit 40 g für 10 min bei RT zentrifugiert. Die Toxoplasmen befanden sich im Überstand, der in ein neues 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Greiner, Nürtingen) überführt wurde. Durch erneute Zentrifugation dieses Überstandes diesmal mit 300 g für 10 min bei RT wurden die Toxoplasmen pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 2 ml RPMI-Med 5 % resuspendiert. Zur Zählung wurden von dieser Suspension 10 µl entnommen und

mit 90 µl Trypanblau vermischt, so dass eine 1:10-Verdünnung entstand. 10 µl dieser Verdünnung wurden in eine Neubauer-Zählkammer (Assistent, Tiefe: 0,100 mm, Fläche: 0,0025 mm<sup>2</sup>) gefüllt. Die Toxoplasmen wurden dann unter dem Mikroskop gezählt. Die vitalen Toxoplasmen stellen sich unter dem Mikroskop genau wie die CBMDM hell dar, da sie ebenfalls den Farbstoff nicht in sich aufnehmen. Die avitalen Toxoplasmen sind dazu nicht in der Lage, sie werden dunkel angefärbt. Für eine Versuchsreihe wurden mindestens  $2 \times 10^6$  Toxoplasmen pro 96-Multiwellplatte benötigt, das heißt mindestens  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well. Die für die Experimente bestimmten Zellen wurden nach der Zählung mit dem Kulturmedium (IMDM 5 %) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Zur weiteren Kultivierung wurde den verbliebenen Toxoplasmen L929-Zellen und frisches Medium wieder hinzugefügt und die Toxoplasmenkulturen wurden im Anschluß weiter bebrütet.

Regelmäßig wurden die Toxoplasmenkulturen und die L929-Zellen auf bakterielle bzw. auf Mykoplasmen-Kontamination geprüft.

## 2.4. Nachweis der Indolamin 2,3-Dioxygenase-Aktivität

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein intrazelluläres Enzym des Tryptophanstoffwechsels, das L-Tryptophan zu N-Formylkynurenin umsetzt. Das Stoffwechselprodukt N-Formylkynurenin wird von aktivierten Zellen über die gesamte Kulturdauer in die Überstände abgegeben. Durch Erhitzen bei 50 °C wird N-Formylkynurenin zu Kynurenin hydrolysiert. Die Menge des entstandenen Kynurenins lässt sich photometrisch ermitteln, dadurch ist eine indirekte Bestimmung der Aktivität der IDO möglich. Diese im Jahr 1994 von Däubener et al. etablierte Methode weist gegenüber dem in der Literatur beschriebenen Nachweis (Feng, 1989) der intrazellulären IDO-Aktivität einige Vorteile auf: Es war hier nicht notwendig, die Zellen vor der Messung durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen aufzuschließen, des Weiteren konnten die stimulierten Zellen nach Entnahme der Überstände in den Kulturplatten verbleiben und für weitere Experimente verwendet werden. Daher war es in den meisten Fällen möglich dieselben Zellen für weitere Toxoplasmenproliferationstests nach Entnahme der Überstände zur Bestimmung der Kynureininkonzentrationen, zu verwenden.

Zunächst wurde in einer 96-well-Zellkulturplatte (Greiner, Nürtingen) eine 1:2-Verdünnungsreihe mit IFN $\gamma$  angesetzt. Hierzu wurden Konzentrationen von 1000-0 U/ml IFN $\gamma$  verwendet. Jede Konzentration wurde als Dreifachbestimmung angelegt. Das letzte Triplet beinhaltete kein IFN $\gamma$  und wurde als Negativkontrolle genutzt. Danach wurden entweder TNF $\alpha$  oder Medium hinzugefügt, zuletzt wurden  $2 \times 10^4$  Zellen/well dazu gegeben. Das Endvolumen betrug 200  $\mu$ l/well. Die Platte wurde danach für 72 h im Brutschrank inkubiert (10 % CO $_2$ , 37 °C). Im Anschluss wurden von den Verdünnungsreihen unter der sterilen Werkbank je 160  $\mu$ l aus den Vertiefungen mit einer Pipette entnommen und in eine 96-well-Spitzboden-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) überführt. Da die CBMDM adhärenz waren, blieben sie am Boden der 96-well-Zellkulturplatte haften. In die Spitzboden-Mikrotiterplatte wurden jetzt 10  $\mu$ l Trichloroessigsäure (30 % in H $_2$ O, Merck, Darmstadt) pro well dazu pipettiert. Die Proben wurden für 30 min in einem schon vorgeheizten Wasserbad (Typ 3041, Köttermann, Häningsen 20-100 °C, Modell LTH 382312, Dinkelberg) bei 50 °C inkubiert, um N-Formylkynurenin zu Kynurenin zu hydrolysieren. Danach wurde

die Spitzbodenplatte mit den Proben 10 min bei 550 g zentrifugiert (Beckmann Plattenzentrifuge, Typ J-6-B). Dabei entstand in den Spitzbodenvertiefungen ein Sediment aus Zellen und präzipitierten Proteinen. Nun wurden je 100  $\mu$ l des Überstandes mit der Pipette in eine 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatte (Greiner, Nürtingen) überführt und mit 100  $\mu$ l Ehrlich-Reagenz (300 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd in 25 ml 96 %-iger Essigsäure gelöst) versetzt. Die Spitzbodenplatte wurde verworfen. Durch das Ehrlich-Reagenz verfärbte sich der Testansatz bei Vorhandensein von Kynurenin gelblich, wobei die Intensität der Verfärbung abhängig von der Konzentration des Kynurenins ist. Wurde kein Kynurenin gebildet, blieb der Testansatz farblos. Die Absorption wurde 10 min nach Zusatz des frisch angesetzten Ehrlich-Reagenz bei einer Extinktion von 492 nm gemessen (Nunc Immunoreader NJ 2000, Wiesbaden). Als Nullwert wurde die Absorption von Überständen unstimulierter Zellen herangezogen. Dadurch konnte indirekt die Induktion der IDO durch IFN $\gamma$  bestimmt werden. Weitere Experimente sollten zeigen, ob die IDO-Induktion durch Stimulierung der CBMDM mit IL-4 oder IL-10 regulierbar sei. Dazu wurden die CBMDM ( $2 \times 10^4$  Zellen/well) mit IL-4 oder IL-10 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert (IL-4: 4-100 U/ml; IL-10: 4-100 ng/ml) und mit IFN $\gamma$  in unterschiedlichen Konzentrationen für 72 h im Brutschrank inkubiert. Der Kynureningehalt der mit unterschiedlichen IFN $\gamma$ -Konzentrationen sowie mit TNF $\alpha$  versehenen und mit IL-4 oder IL-10 stimulierten Zellkulturen wurde mit der oben beschriebenen Methode bestimmt. Später wurde die Spezifität des Effektes von IL-10 auf die IDO-Induktion durch neutralisierenden anti-IL-10- Antikörper (anti-IL-10-AK) geprüft. Zu einem Teil der Zellen wurde IL-10 mit einer Konzentration von 50 ng/ml dazu gegeben, zu einem anderen Teil anti-IL-10-AK (6000 ng/ml). In dem letzten Abschnitt der Multiwellplatte wurde sowohl IL-10 als auch anti-IL-10-AK in die wells pipettiert. Nach 72 h Inkubation im Brutschrank wurde der Kynureningehalt mit der oben beschriebenen Methode gemessen.

Außerdem wurde die Wirkung von 6-CDLT, einem kompetitiven Hemmer des L-Tryptophans, auf die IDO-Aktivität untersucht. Dazu wurde eine 1:2-IFN $\gamma$ -Verdünnungsreihe in einer 96-well Flachboden-Mikrotiterplatte angelegt (1000-0 U/ml). Das 6-CDLT wurde in Konzentrationen von 200, 400 und 800  $\mu$ M dazu pipettiert. Nach 72-stündiger Inkubation wurde auch hier wie oben beschrieben der Kynureningehalt bestimmt.

## 2.5. Toxoplasmenproliferationstest

Im Gegensatz zur Säugetierzelle verfügt *Toxoplasma gondii* über das Enzym Uracil-Phosphoribosyltransferase, das Uracil in Uridylat überführt. Uridylat stellt einen Baustein in der Nucleotidsynthese von *Toxoplasma gondii* dar. Daher wird Uracil fast ausschließlich von den Toxoplasmen in deren DNS und RNS eingebaut (Pfefferkorn und Pfefferkorn, 1977; McLeod, 1979). Wird Tritium-markiertes Uracil ( $^3\text{[H]}$ -Uracil) einer Toxoplasmenpopulation zugegeben, so wird dieses Uracil zum Einbau in die DNS benutzt, anstatt neues Uracil zu synthetisieren. So lässt die Menge des eingebauten Isotops Rückschlüsse auf die Wachstumskinetik der Toxoplasmen zu. Auch das Wachstumsverhalten beeinflussende Faktoren, wie zum Beispiel bestimmte Zytokine, können so in ihrer Wirksamkeit nachgewiesen werden. Nach der Bestimmung der IDO-Induktion verblieben die adhärenen CBMDM und ein Restvolumen von 40  $\mu\text{l}$  pro well in den Multiwellplatten. Diese adhärenen Zellen wurden mit *Toxoplasma gondii* infiziert (Däubener et al., 1994). Hierzu erwies sich eine Infektionsrate von 1,5:2 als besonders geeignet. Hervorzuheben ist die Verwendung von tryptophan-freiem RPMI-Medium bei der Infektion mit *Toxoplasma gondii*, da die Wirkung des IDO-induzierten Tryptophanabbaus, also der daraus resultierende Tryptophanmangel, untersucht werden sollte. Die infizierten CBMDM wurden im Brutschrank inkubiert (10 %  $\text{CO}_2$ , 37 °C). Die Vermehrung von *Toxoplasma gondii* und die damit verbundene Zerstörung der CBMDM wurden unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach 24 h erfolgte die radioaktive Markierung mit 37 kBq  $^3\text{[H]}$ -Uracil pro Vertiefung (10  $\mu\text{l}$ ). Nach Zugabe des radioaktiv markierten Nukleotids wurden die Zellen für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Das Reproduktionsmaximum von *Toxoplasma gondii* konnte meist nach etwa 48 h beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Testreihen bei -20 °C eingefroren. Dadurch wurden die Toxoplasmen zerstört und die DNS freigesetzt.

Zum Nachweis der  $^3\text{[H]}$ -Uracil markierten DNS wurden die infizierten Zellkulturen zu einem späteren Zeitpunkt bei RT wieder aufgetaut und mit deionisiertem Wasser (Zellerntegerät Typ 1295-001, LKB Wallac, Turco, Finnland) gewaschen und durch einen Glasfaserfilter (Fläche 102 x 258 mm Preprinted Filtermat, LKB Wallac) abgesaugt. Dabei wurde die DNS im Glasfilter zurückgehalten. Nach etwa 20-minütigem Trocknen der Filter bei 100 °C wurden

diese unter Zugabe von 15 ml Szintillationsflüssigkeit (Beta Plate Scint, LKB, Wallac) einzeln in Plastikfolie (Sample Bag, LKB Wallac) eingeschweißt (Schweißgerät: Heat-Sealer 1295-012, LKB, Wallac) und in einem  $\beta$ -Szintillationszähler (Betaplate Typ 1205, LKB Wallac) ausgewertet. Die  $\beta$ -Strahlung (counts per minute; cpm) war somit ein Maß für die Menge des von den Toxoplasmen in die DNS eingebauten  $^3\text{[H]}$ -Uracils, letztlich also für die Proliferation der Toxoplasmenkultur. Nach Inkubation der CBMDM mit  $\text{INF}\gamma$  wurde das Wachstum der Toxoplasmen unter Zugabe verschiedener Zytokine und Interleukine untersucht. Die CBMDM wurden in einigen Experimenten neben  $\text{INF}\gamma$  zusätzlich mit rekombinantem, humanem  $\text{TNF}\alpha$  (100 U/ml) stimuliert. Nach der Toxoplasmeninfektion der Zellkulturen wurde der Proliferationstest wie oben beschrieben durchgeführt. In weiteren Testansätzen wurde untersucht, ob das Toxoplasmenwachstum durch IL-4 oder durch IL-10 beeinflussbar sei. Dabei wurden die CBMDM zusätzlich mit IL-4 (Konzentrationen: 10, 100, 500 U/ml) oder mit IL-10 (Konzentrationen: 10, 50, 100 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Toxoplasmeninfektion der CBMDM. Auch hier wurde der Toxoplasmenproliferationstest wie oben beschrieben fortgeführt. Mit Hilfe einiger Experimente sollte festgestellt werden, ob anti-IL-10-AK in der Lage ist, den Einfluss von IL-10 auf das Wachstum von *Toxoplasma gondii* in den CBMDM aufzuheben. Zum Schluss wurde die Wirkung von 6-CDLT auf die Toxoplasmenproliferation untersucht. Dazu wurde zuerst eine 1:4- $\text{INF}\gamma$ -Verdünnungsreihe mit Konzentrationen von 64-0 U/ml hergestellt. Anschließend wurde 6-CDLT in den Konzentrationen 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$  und 800  $\mu\text{M}$  dazu pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 72 h im Brutschrank. Die Toxoplasmeninfektion und der Proliferationstest verliefen wie oben beschrieben.

### **2.5.1. Auswertung der Toxoplasmenproliferationstests**

In jedem Proliferationstest wurden mindestens 3-fach-Bestimmungen durchgeführt, häufig sogar 8-fach-Bestimmungen. Alle dargestellten Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung aus den Mehrfachbestimmungen ermittelt. Die Meßwerte wurden nur dann in Form von Grafiken dargestellt, wenn sie in mehreren Experimenten (mindestens 3) reproduziert werden konnten.

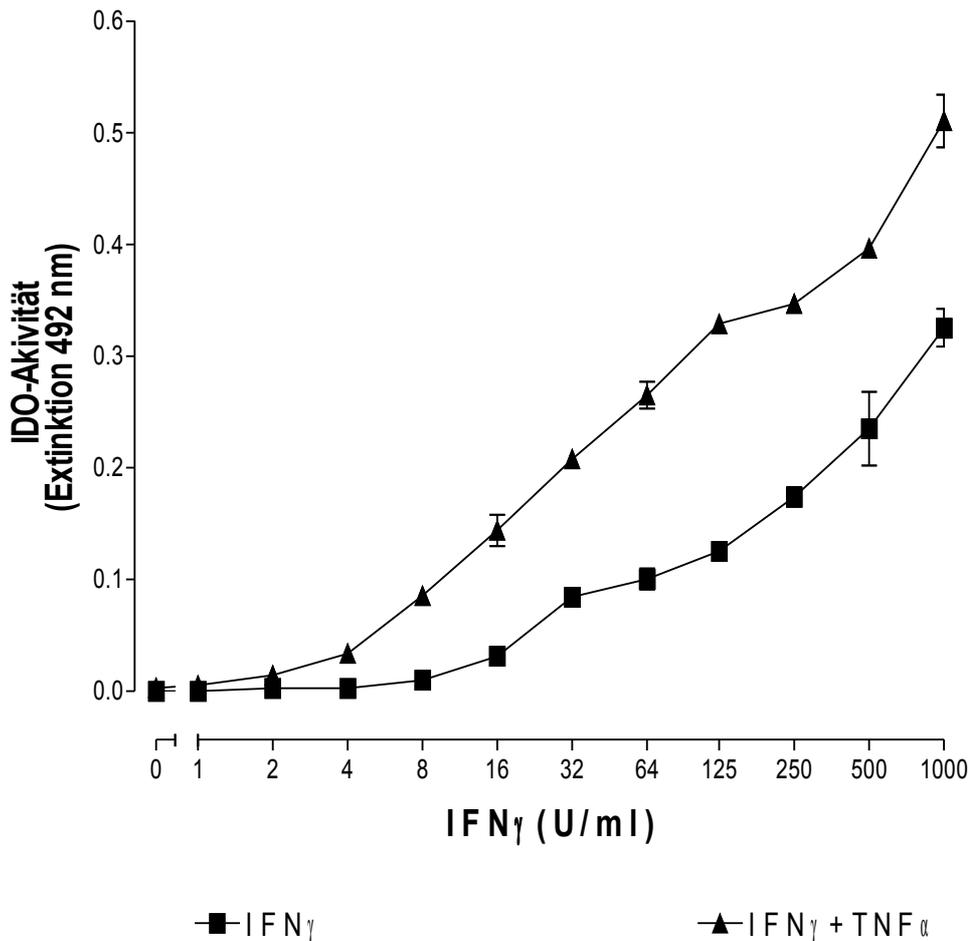
## 3. Ergebnisse

### 3.1. IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion in CBMDM

Die wichtigsten Wirkungsmechanismen in der Immunabwehr gegen *Toxoplasma gondii* wurden bereits in den Abschnitten 1.2.3.-1.2.6. beschrieben. Auf die Degradation von L-Tryptophan und der daraus resultierenden Toxoplasmostase soll jetzt näher eingegangen werden. Für Glioblastomzellen sowie für Fibroblasten wurde bewiesen, dass durch den Tryptophanabbau eine Toxoplasmostase entsteht (Däubener et al., 1993; Pfefferkorn, 1984). Auch in humanen MDM konnte dieser Effekt nachgewiesen werden (Türck, 2003). Daraufhin ergab sich die Frage, ob dieser Wirkungsmechanismus der Immunabwehr auch in CBMDM vorhanden ist, was in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Wie bereits in "Material und Methoden" beschrieben, wurden hierzu CBMDM mit IFN $\gamma$  in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 1000 bis 0 U/ml in 96-Multiwell-Platten für 72 h inkubiert. Genau wie bei den humanen MDM, den Glioblastomzellen und den Fibroblasten konnte auch bei den CBMDM ein synergistischer Effekt der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Aktivität durch die zeitgleiche Zugabe von TNF $\alpha$  erzielt werden (Däubener et al., 1996; Carlin und Weller, 1995; Türck, 2003).

In der Abbildung 3.1 sind Untersuchungsergebnisse mit CBMDM in einem typischen Experiment dargestellt. Die Abbildung zeigt deutlich, dass IFN $\gamma$  mit steigender Konzentration eine IDO-Aktivität induziert. Wird nun zusätzlich zu IFN $\gamma$  noch TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 100 U/ml zeitgleich dazugegeben, so wirkt das Zytokin auf IFN $\gamma$  synergistisch und potenziert den Effekt. Ohne IFN $\gamma$  kann TNF $\alpha$  jedoch keine Wirkung erzielen (siehe „Nullwert“ für IFN $\gamma$ ).



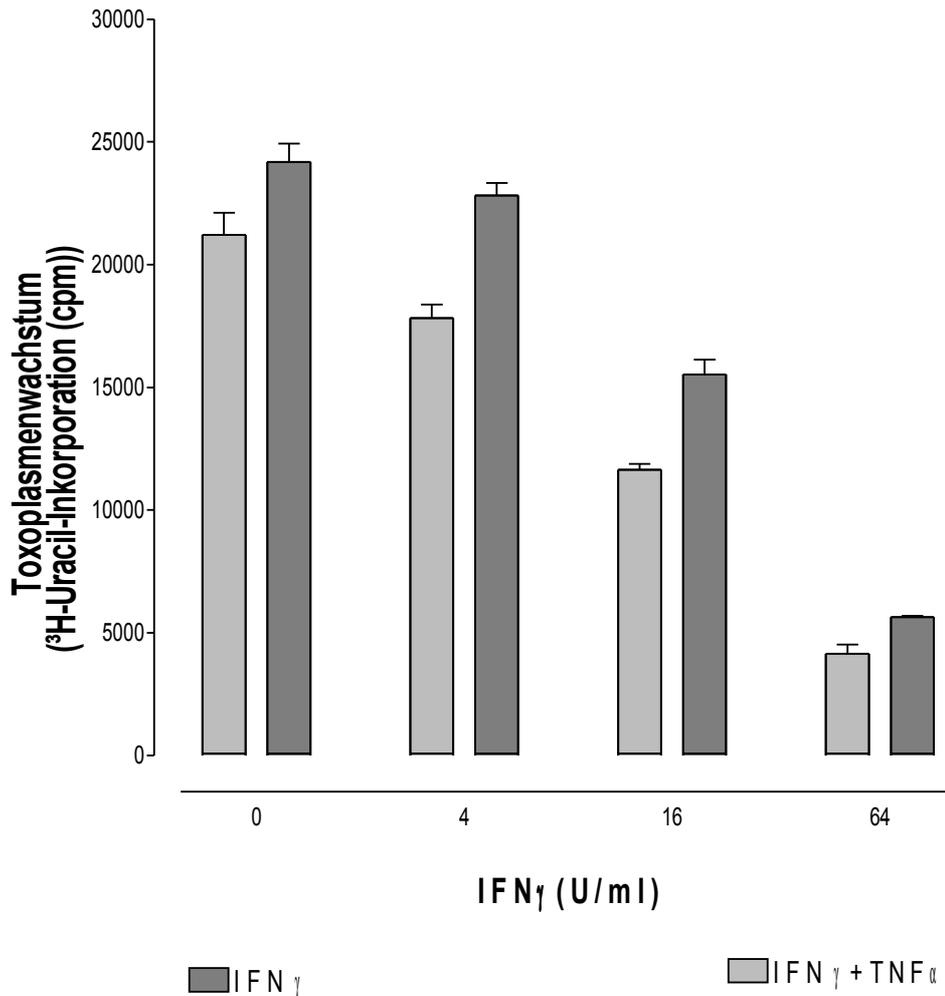
**Abb. 3.1 Die IFN $\gamma$  vermittelte IDO-Induktion in CBMDM und der synergistische Effekt von TNF $\alpha$**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit und ohne TNF $\alpha$  (100 U/ml) für 72 h inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und der Tryptophanabbau indirekt gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen +/- Standardabweichung.

Nachdem die IDO-Aktivität in den Zellüberständen der CBMDM bestimmt worden war, erfolgte die Infektion der Zellen mit *Toxoplasma gondii*. Das Toxoplasmenwachstum konnte nach anschließender Inkubation über den  $^3\text{[H]}$ -Uracil Einbau bestimmt werden. Bei zunehmender IFN $\gamma$ -Konzentration zeigte sich auch eine zunehmende Toxoplasmostase. Diese Wachstumshemmung ist in der Abbildung 3.2 dargestellt. Der Graph verläuft zur Abbildung 3.1 reziprok, das bedeutet, dass bei höheren IFN $\gamma$ -Konzentrationen eine Abnahme der

Toxoplasmenproliferation erfolgt.  $\text{TNF}\alpha$  wirkt auch hier synergistisch, durch die Zugabe von  $\text{TNF}\alpha$  wird ein verstärkter, antiparasitärer Effekt erzielt.

Die Resupplementierung von L-Tryptophan zu diesem Infektionsmodell führte allerdings nicht zu einer Aufhebung der Toxoplasmostase.



**Abb. 3.2 Die IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmostase in CBMDM ist konzentrationsabhängig**

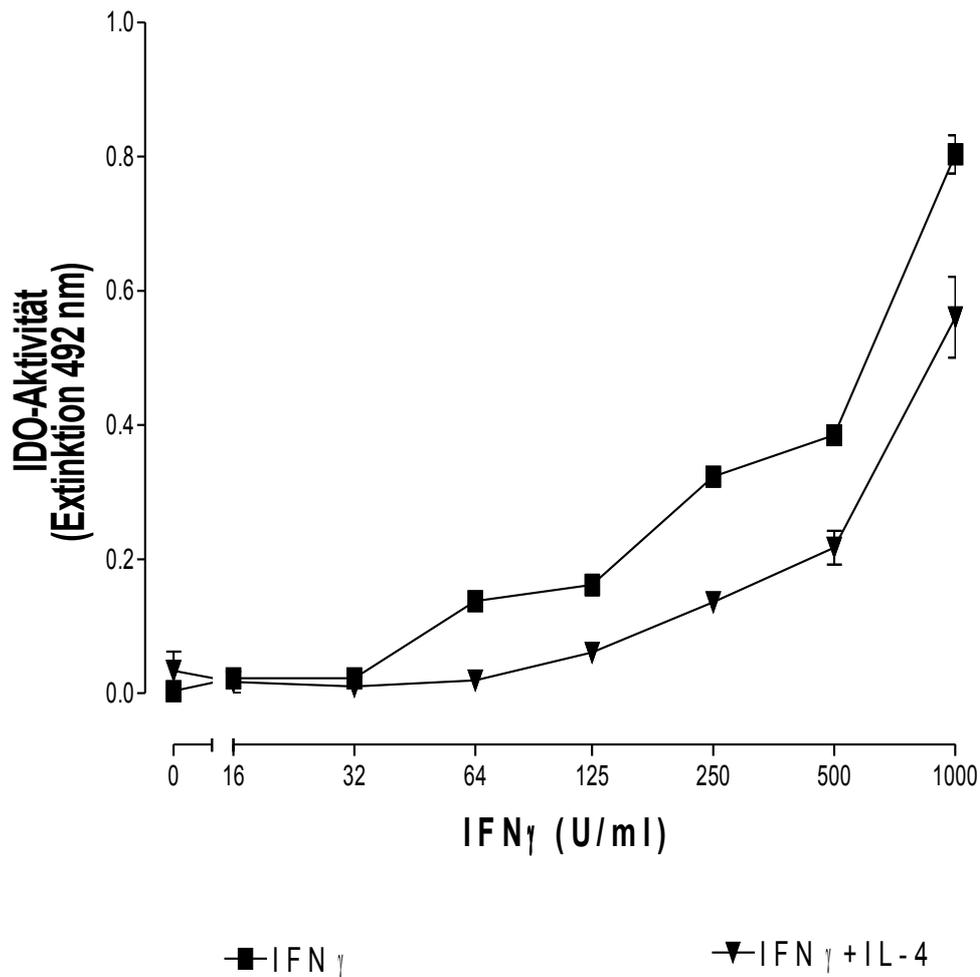
CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit und ohne TNF $\alpha$  (100 U/ml) für 72 h inkubiert und danach mit  $1,5 \times 10^4$ /well Toxoplasmen infiziert. Nach weiteren 24 h im Brutschrank wurden die Kulturen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst. 24 h später wurde das Toxoplasmenwachstum durch die erfolgte  $^3\text{H}$ -Uracil-Inkorporation gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen +/- Standardabweichungen.

### 3.2. IL-4 reguliert die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion

Der unmittelbare Zusammenhang zwischen der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Induktion und der antiparasitären Wirkung auf *Toxoplasma gondii* konnte in CBMDM gezeigt werden. Im Anschluss daran sollten Mechanismen untersucht werden, die die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion regulieren.

Auf der Suche nach derart eingreifenden Wirkungsweisen wurde unter anderem mit IL-4 gearbeitet. Der bereits bekannte antagonistische Effekt zu IFN $\gamma$  (Kirchner, 1994) ist sicherlich besonders hervorzuheben. IL-4 ist in der Lage, Immunantworten, die durch IFN $\gamma$  induziert wurden, wieder zu antagonisieren. Die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität wird als wichtigste Immunantwort zur Bekämpfung einer *Toxoplasma gondii*-Infektion diskutiert. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Wechselwirkung dieser Zytokine von besonderer Bedeutung. Bereits in humanen MDM konnte dieser antagonistische Effekt des IL-4 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität bestätigt werden. Diese Wirkungsweise führte zu einer Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität (Türk, 2003). In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen auf die CBMDM ausgedehnt. Es sollte gezeigt werden, ob und inwieweit IL-4 Einfluss auf die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Aktivität hat. Zusätzlich sollte geprüft werden, ob IL-4 auch Einfluss auf die IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmostase nimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.3 dargestellt. Diese Grafik zeigt deutlich, dass IL-4 die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität hemmt.

Es wurden weitere Versuchsreihen mit höheren IL-4 Konzentrationen (bis zu 500 U/ml) durchgeführt, hier war eine Zunahme der inhibitorischen Wirkung von IL-4 zu verzeichnen. Diese Ergebnisse wurden hier nicht zusätzlich dargestellt.

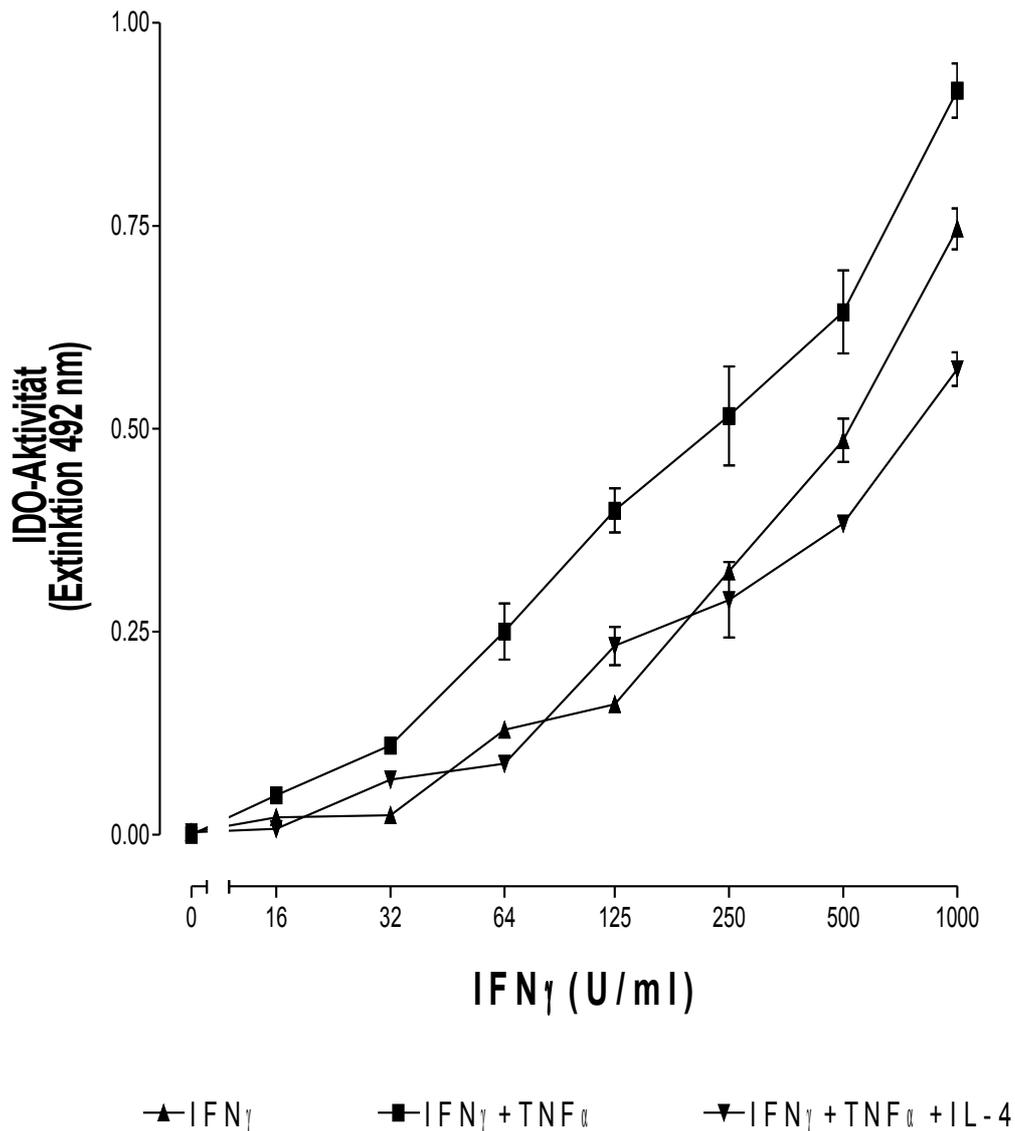


**Abb. 3.3 IL-4 inhibiert die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Induktion in CBMDM**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit oder ohne IL-4 (50 U/ml) stimuliert und für 72 h inkubiert. Danach erfolgte die photometrische Messung des Kynureningehaltes im Überstand.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

Damit konnte die bekannte inhibitorische Wirkung des IL-4 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität auf die CBMDM ausgedehnt werden. Nun stellte sich im nächsten Schritt die Frage, wie der potenzierende Effekt des TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität durch die Zugabe von IL-4 beeinflusst wird. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.4 dargestellt. Hier zeigt sich deutlich, dass sich der in Abbildung 3.1 dargestellte synergistische Effekt des TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität durch Zugabe von IL-4 aufgehoben wird.



**Abb. 3.4 IL-4 verringert den synergistischen Effekt von TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM**

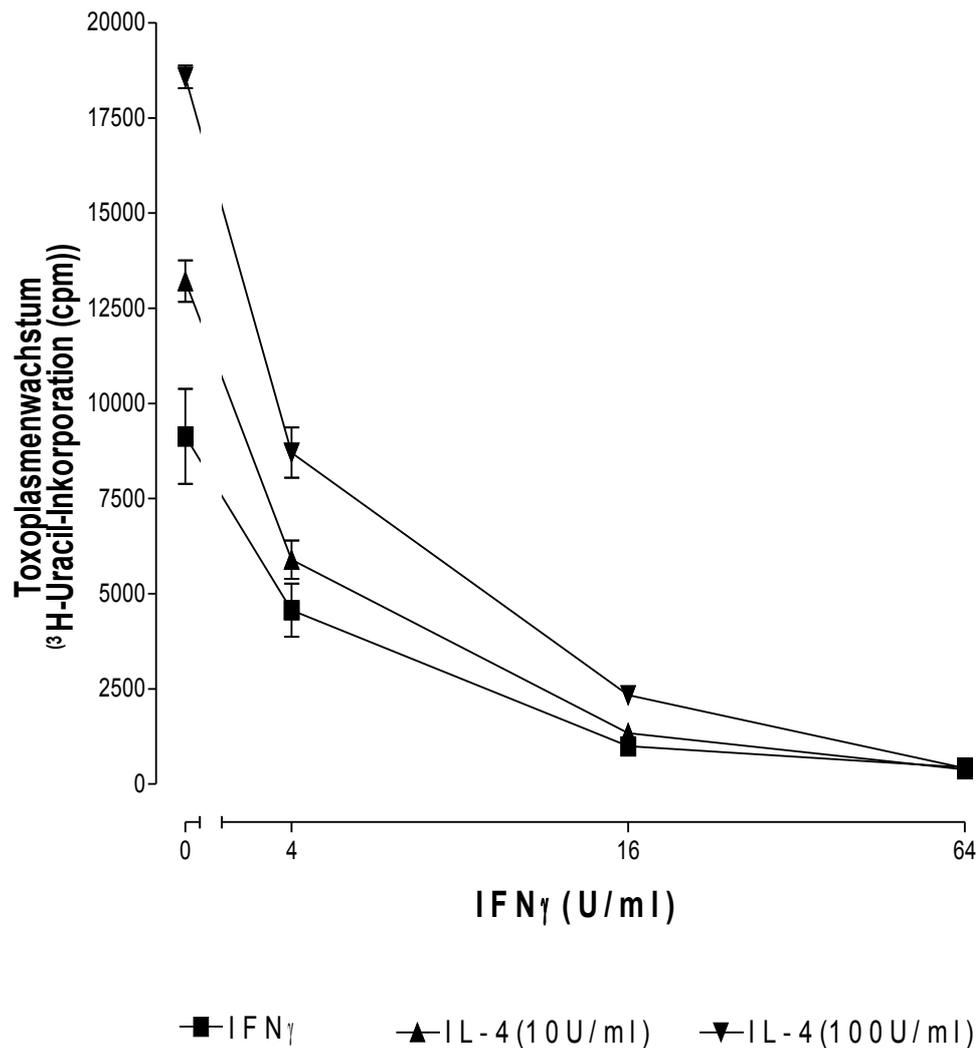
CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden in einer 1:2-Verdünnungsreihe mit IFN $\gamma$  (1000-0 U/ml), TNF $\alpha$  (100 U/ml) mit und ohne IL-4 (50 U/ml) in 96-multiwell-Platten für 72 h inkubiert. Danach wurde der Überstand entnommen und der Kynureningehalt photometrisch bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung.

Im Anschluss an die Bestimmung der IDO-Aktivität wurden die CBMDM dieser Testreihe ebenfalls mit *Toxoplasma gondii* infiziert. In der Abbildung 3.5 wurden diese Ergebnisse ausgewertet. Diese Grafik zeigt deutlich, dass die durch IFN $\gamma$  hervorgerufene Toxoplasmostase in CBMDM durch die Zugabe von IL-4 aufgehoben wird. Dieser antagonistische Effekt ist allerdings sowohl konzentrationsabhängig von IFN $\gamma$  als auch konzentrationsabhängig von IL-4. Je höher also die IL-4-Konzentration, je mehr wird die durch IFN $\gamma$  hervorgerufene Toxoplasmostase inhibiert. Andererseits findet bei einer IFN $\gamma$ -Konzentration von 64 U/ml in dieser Testreihe immer eine Toxoplasmostase statt. Bei dieser Konzentration des IFN $\gamma$  ist kein Toxoplasmenwachstum messbar, unabhängig von der Konzentration des IL-4. Damit konnte der bereits bekannte antagonistische Effekt des IL-4 auf das IFN $\gamma$  sowohl für die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion als auch für die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM bestätigt werden - allerdings abhängig von der Konzentration.

Zusätzlich kann man erkennen, dass IL-4 bei Nichtvorhandensein von IFN $\gamma$  das Toxoplasmenwachstum offensichtlich steigert. Bei der Konzentration des IL-4 von 100 U/ml und der Konzentration des IFN $\gamma$  von 0 U/ml ist ein doppelt so hohes Toxoplasmenwachstum zu verzeichnen, als bei Nichtvorhandensein von IL-4.

Allerdings verlaufen die Kurven in der Abbildung 3.5 ziemlich gleich, so dass es möglich wäre, dass IL-4 das Toxoplasmenwachstum fördert oder sogar eine spontane Hemmung von nicht stimulierten Zellen aufhebt und zwar unabhängig von IFN $\gamma$ .

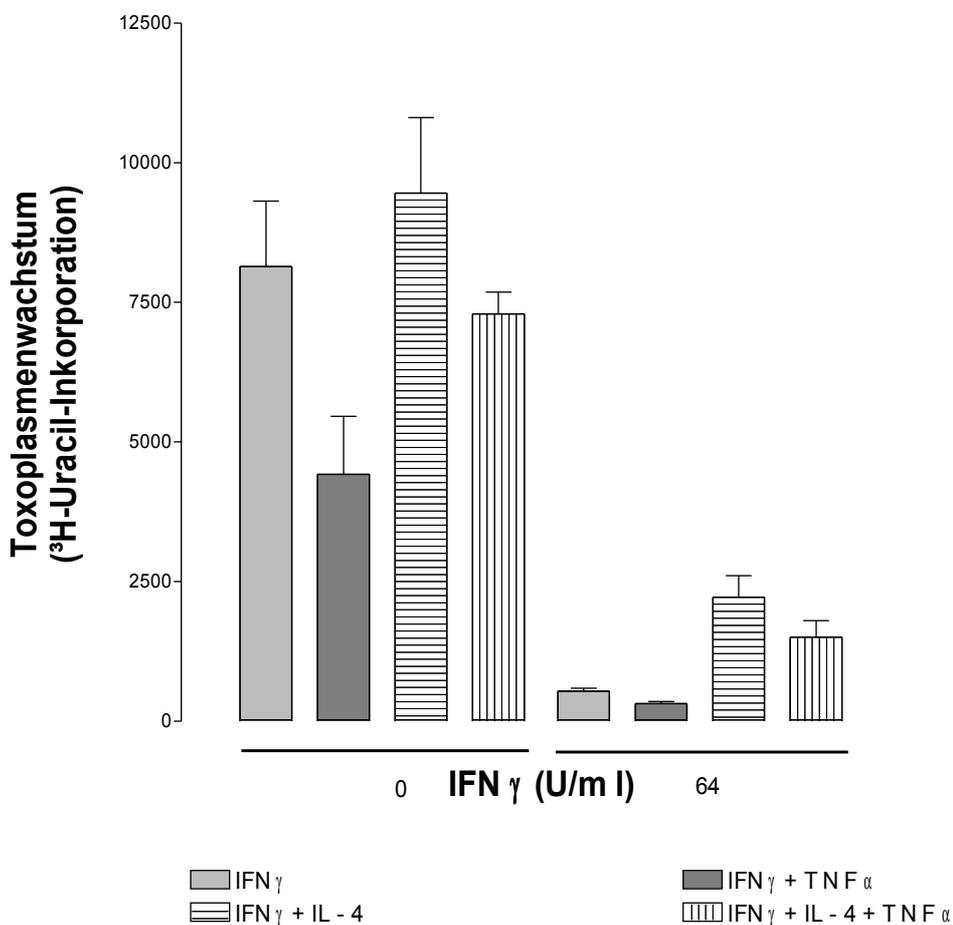


**Abb. 3.5 Die Inhibitorische Wirkung des IL-4 auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden in einer IFN $\gamma$  1:2-Verdünnungsreihe mit oder ohne IL-4 (50 U/ml, 100 U/ml) stimuliert und für 72 h inkubiert. Danach erfolgte die Infektion mit  $1,5 \times 10^4$  Toxoplasmen/well. Nach weiterer Inkubation von 24 h wurden die Zellen mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst und dann das Toxoplasmenwachstum über die  $^3\text{H}$ -Uracil Inkorporation gemessen.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

Danach sollte die Wechselwirkung von IL-4 und TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase überprüft werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.6 dargestellt. Der Graph zeigt hier deutlich, dass schon eine geringe Konzentration von IFN $\gamma$  (64 U/ml) ausreichend ist, um eine Toxoplasmostase zu bewirken. Dieser Effekt wird von IL-4 geringfügig gehemmt. Ist kein IFN $\gamma$  vorhanden, ist das Wachstum von *Toxoplasma gondii* größer. Dieser Effekt wird durch IL-4 noch verstärkt. Das bedeutet, dass IL-4 die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase geringfügig hemmt.



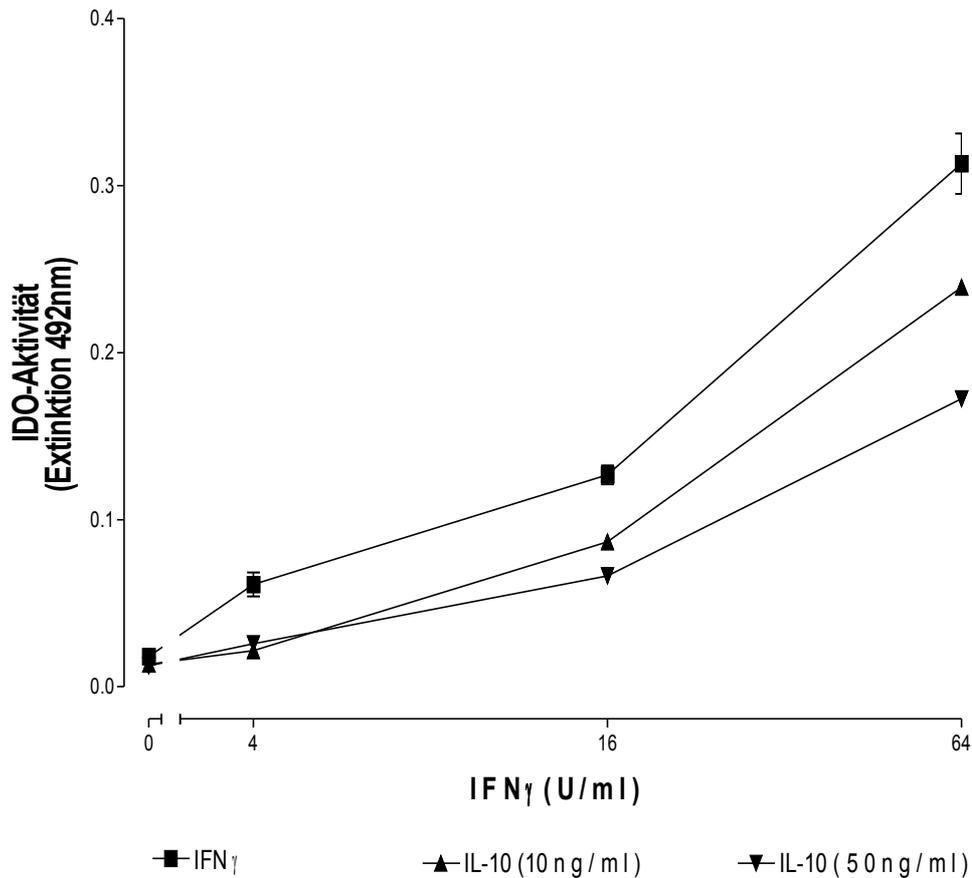
**Abb. 3.6 Die inhibitorische Wirkung des IL-4 auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM wird durch TNF $\alpha$  aufgehoben**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$ , IL-4 (50 U/ml) und mit und ohne TNF $\alpha$  (100 U/ml) für 72 h inkubiert und danach mit  $1,5 \times 10^4$ /well Toxoplasmen infiziert. Nach weiteren 24 h wurde mit  $^3$ [H]-Uracil gepulst. 24 h später wurde das Toxoplasmenwachstum durch die  $^3$ [H]-Uracil-Inkorporation bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/- Standardabweichung.

### **3.3. IL-10 inhibiert die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion**

Um weitere Faktoren zu finden, die an der Regulierung der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivierung und den daraus resultierenden Effekten beteiligt sind, wurde auch das inhibitorisch wirksame Zytokin IL-10 untersucht. Neben IL-4 ist IL-10 der bekannteste stärkste IFN $\gamma$ -Antagonist. Der Krankheitsverlauf vieler Parasitosen wird durch IL-10 protrahiert, da das produzierte IL-10 die IFN $\gamma$ -Produktion unterdrückt (Kirchner, 1994). Für viele andere Zellen wurde eine Inhibition der Immunantwort durch IL-10 beschrieben. In humanen MDM wurde durch Stimulation mit IL-10 eine Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität erzielt (Türck, 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit sollten nun die Auswirkungen von IL-10 auf das vorliegende Infektionsmodell in CBMDM untersucht werden. Zu einem Teil der IFN $\gamma$ -stimulierten Nabelschnurblutmakrophagen wurde IL-10 mit der Konzentration von 10 ng/ml oder von 50 ng/ml hinzugefügt. Nach der üblichen Inkubationszeit wurde der Überstand entnommen und die IDO-Aktivität photometrisch bestimmt. Die Ergebnisse zeigten zum einen die konkordante Zunahme der IDO-Aktivität bei steigender IFN $\gamma$ -Konzentration. Zum anderen wurde deutlich, dass IL-10 die IFN $\gamma$ -induzierte Wirkung inhibiert. Die Stärke der hemmenden Wirkung von IL-10 ist dabei konzentrationsabhängig. So wirkt IL-10 in einer Konzentration von 50 ng/ml wesentlich stärker inhibitorisch auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als IL-10 in einer Konzentration von 10 ng/ml. Diese Aussagen werden in der Abbildung 3.7 graphisch belegt.



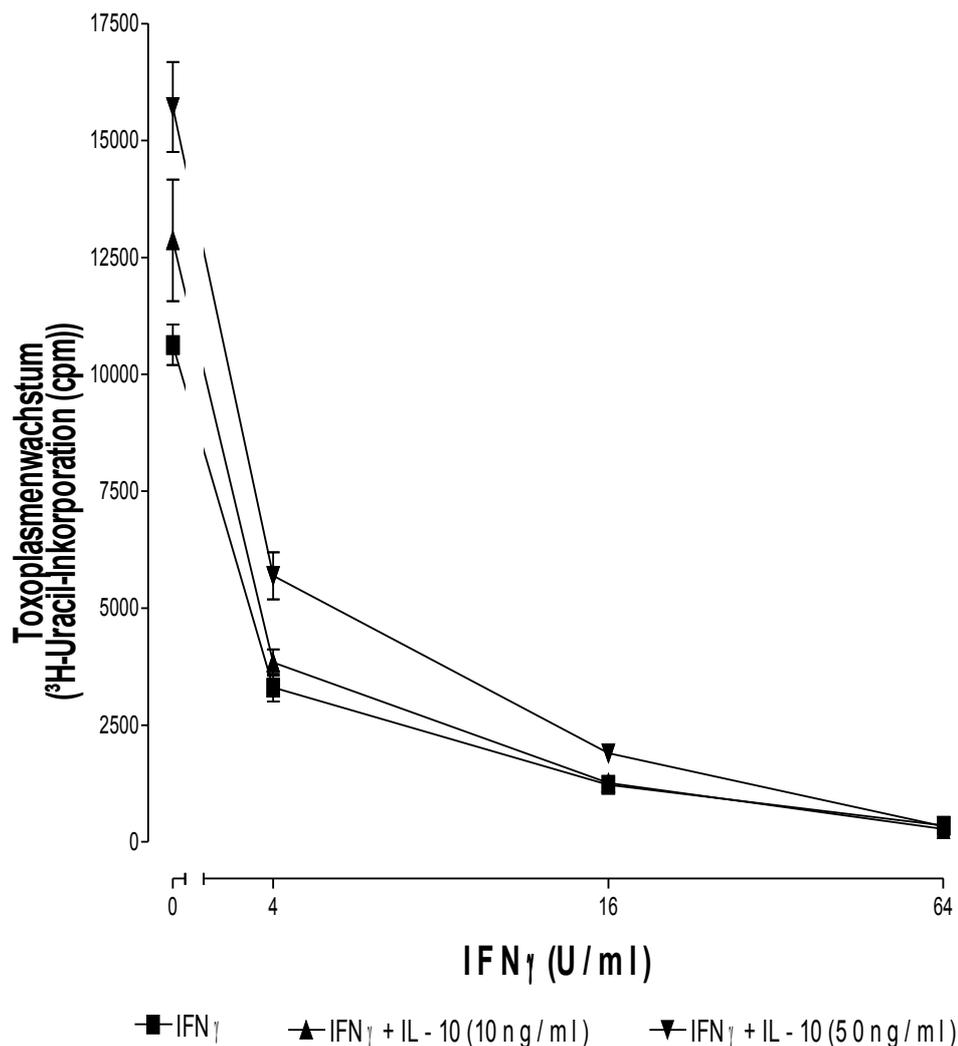
**Abb. 3.7 Die inhibitorische Wirkung des IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM**

*2 x 10<sup>4</sup>/well CBMDM wurden mit IFN $\gamma$  (0-64 U/ml) mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml; 50 ng/ml) für 72 h inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der IDO-Aktivität über die photometrische Messung im Überstand. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen +/- Standardabweichung.*

Nachdem der vermutete hemmende Einfluss von IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM bewiesen worden war, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase ebenfalls durch die Zugabe von IL-10 aufgehoben bzw. verringert werden kann.

Hierbei zeigte sich die Aufhebung der IFN $\gamma$ -induzierten Toxoplasmostase, wobei der inhibitorische Effekt des IL-10 auch hier wieder dosisabhängig ist. Ist die Konzentration von IFN $\gamma$  jedoch hoch genug (64 U/ml), kommt es auch in Anwesenheit des IL-10 zu der IFN $\gamma$ -induzierten Hemmung des Wachstums von *Toxoplasma gondii*. Das bedeutet, IL-10 kann die IFN $\gamma$ -induzierte

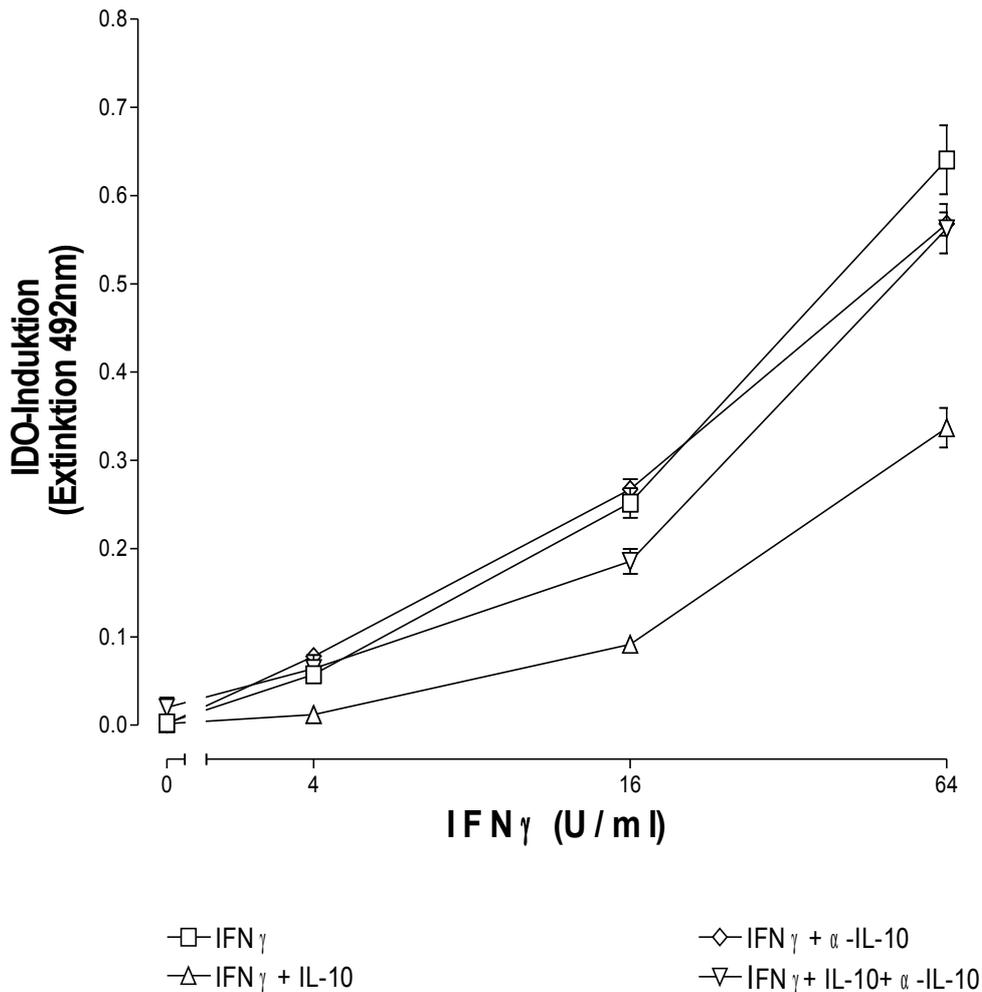
Toxoplasmostase nur bei niedriger Dosis des  $\text{IFN}\gamma$  hemmen. Allerdings kann man einen Effekt erkennen, den IL-10 in Abwesenheit von  $\text{IFN}\gamma$  verursacht. Es handelt sich um eine Steigerung des Toxoplasmenwachstums. Bei einer Konzentration des IL-10 von 50 ng/ml ist eine 1,5-fache Wachstumssteigerung zu verzeichnen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.8 dargestellt.



**Abb. 3.8 IL-10 inhibiert die  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM**  
 CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit einer 1:2- $\text{IFN}\gamma$ -Verdünnungsreihe angesetzt. Die Zellen wurden mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml, 50 ng/ml) für 72 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit *Toxoplasma gondii* ( $1,5 \times 10^4$ /well) infiziert und nach weiteren 24 h mit  $^3\text{H}$ -Uracil gepulst. Über den  $\beta$ -counter wurde das Toxoplasmenwachstum bestimmt.  
 Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Messungen +/- Standardabweichung.

Um diese hemmende Wirkung nun wirklich IL-10 zuzuschreiben, musste die Spezifität dieses Effektes belegt werden. Aus diesem Grund wurde bei den folgenden Versuchsreihen zusätzlich ein neutralisierender IL-10-Antikörper verwendet. Bezogen wurde der  $\alpha$ -IL-10-AK von der Firma Genzyme. Hier wird 1 ng/ml des Zytokins IL-10 durch 30 ng/ml  $\alpha$ -IL-10-AK neutralisiert. In weiteren Testansätzen, deren Ergebnisse hier nicht dargestellt wurden, konnte gezeigt werden, dass der  $\alpha$ -IL-10-AK alleine keinen Effekt auf die CBMDM besitzt. Die Versuchsreihen wurden wie üblich angesetzt, wobei zu einem Teil der well entweder IL-10,  $\alpha$ -IL-10-AK oder beides dazu gegeben wurde. Durch den nun zusätzlich anwesenden Antikörper konnte die inhibierende Wirkung des IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität wieder aufgehoben werden. Damit konnte die Spezifität von IL-10 bewiesen werden.

Nach diesen Versuchsansätzen bleibt die Aussage, dass IL-10 die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität hemmt, bestehen. Veranschaulicht wird das in der Abbildung 3.9. Zunächst kommen hier die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität sowie die inhibitorische Wirkung des IL-10 zur Darstellung. Ebenfalls wird deutlich, dass  $\alpha$ -IL-10-AK alleine keine Wirkung auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität besitzt, denn diese Kurve verläuft identisch mit der Kurve des IFN $\gamma$ . Die graphische Darstellung der IDO-Aktivität in Anwesenheit von IL-10 plus  $\alpha$ -IL-10-AK nimmt ebenfalls denselben Verlauf. Diese Kurve beweist, dass die inhibitorische Wirkung des IL-10 durch den  $\alpha$ -IL-10-AK komplett aufgehoben wird.



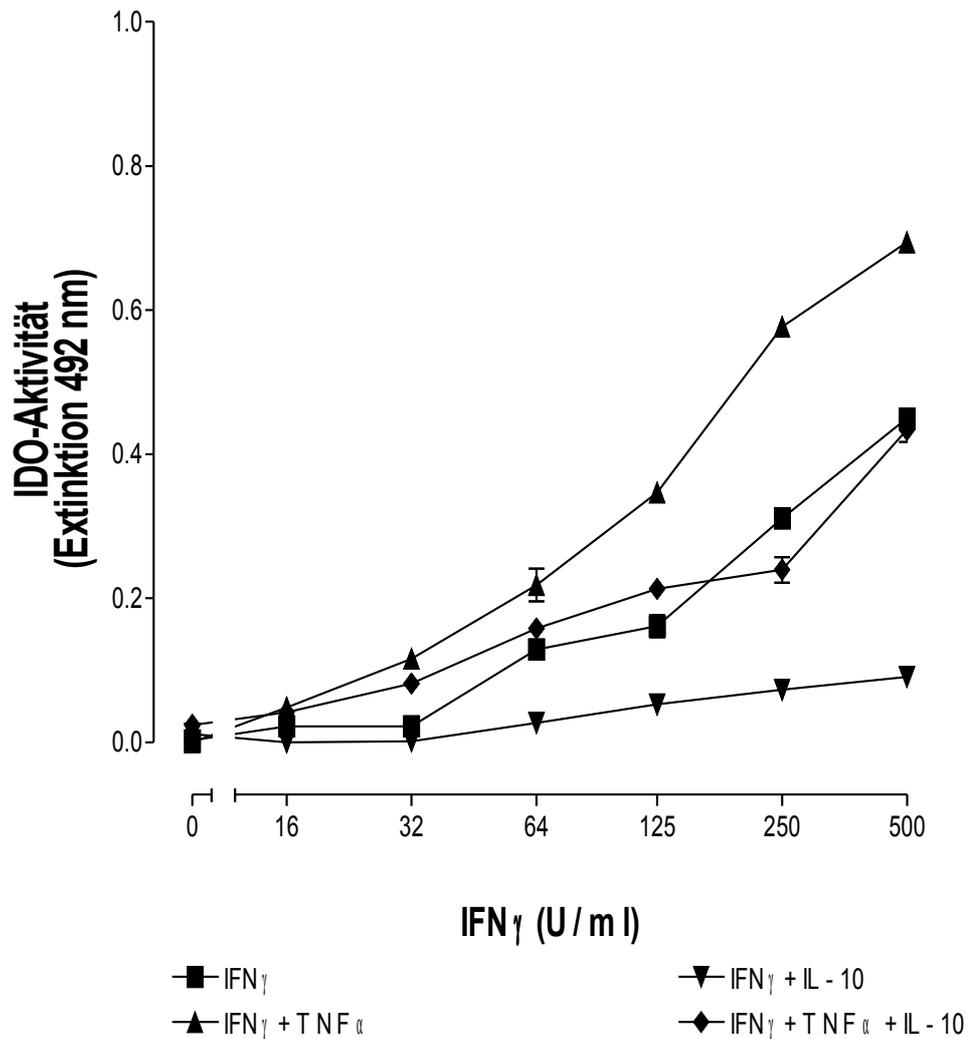
**Abb. 3.9 Die inhibitorische Wirkung des IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM wird durch  $\alpha$ -IL-10-AK aufgehoben**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  mit und ohne IL-10 (50 ng/ml) oder IL-10 (50 ng/ml) und  $\alpha$ -IL-10-Ak oder nur mit  $\alpha$ -IL-10-Ak in 96-multiwell-Platten für 72 h inkubiert. Anschließend folgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach-Bestimmungen +/-Standardabweichung.

Im Anschluss daran sollte untersucht werden, was für eine Wirkung die Zugabe des IL-10 auf den synergistischen Effekt des TNF $\alpha$  im Hinblick auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität besitzt. Die so erzielten Ergebnisse wurden in der Abbildung 3.10 graphisch festgehalten. Zunächst zeigt sich hier die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität. Des Weiteren lässt sich gut der synergistische Effekt des TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität erkennen. Die bereits bewiesene

inhibitorische Wirkung des IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität kommt ebenfalls zur Darstellung. Der additive Effekt des TNF $\alpha$  wird durch Zugabe von IL-10 aufgehoben. In der Graphik verläuft diese Kurve nahezu identisch mit der IFN $\gamma$ -Kurve.



**Abb. 3.10 Der synergistische Effekt des TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM wird durch IL-10 aufgehoben**

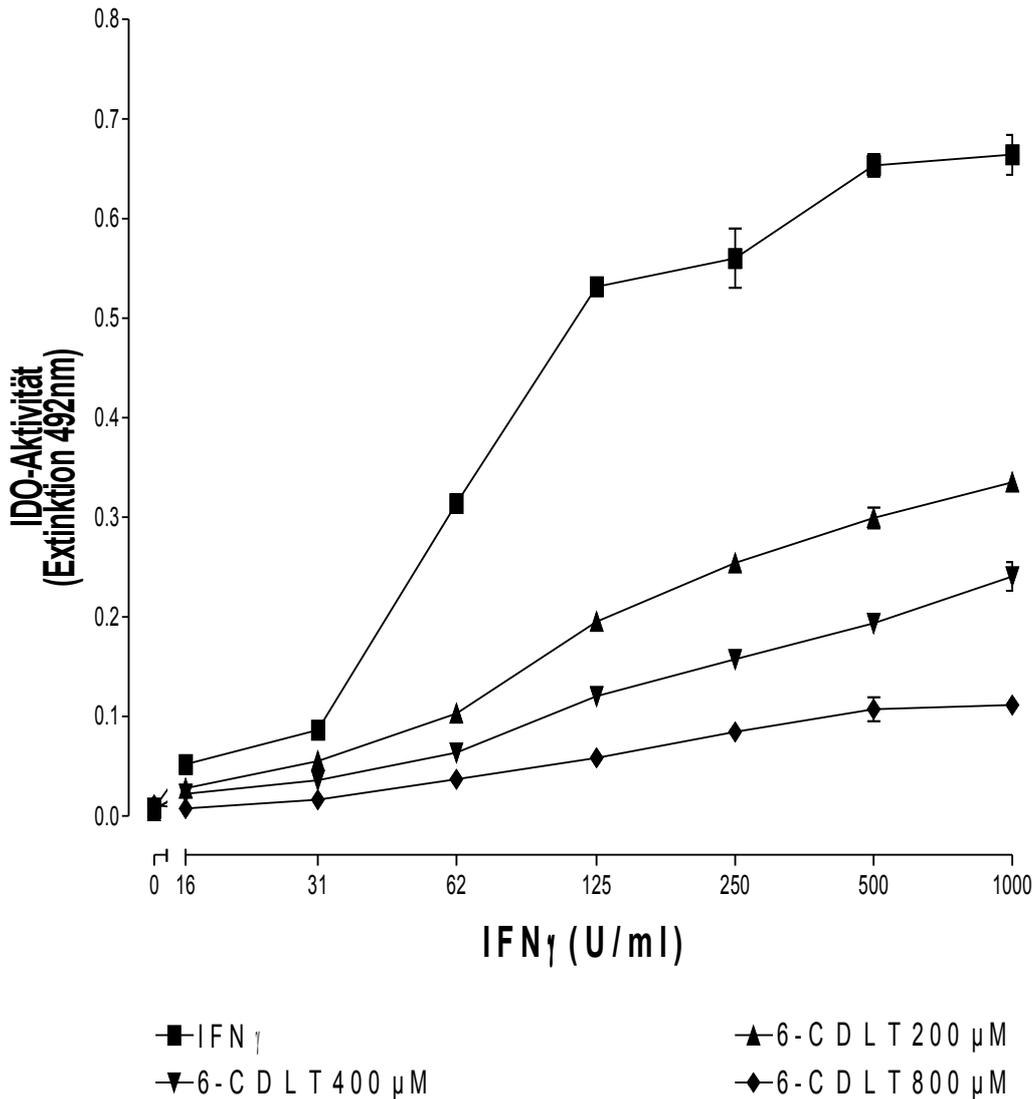
CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$ , mit oder ohne TNF $\alpha$  (100 U/ml) und mit oder ohne IL-10 (10 ng/ml) für 72 h inkubiert. Im Anschluss wurde die IDO-Aktivität photometrisch im Überstand bestimmt.

Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen +/-Standardabweichung.

### **3.4. Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität durch 6-Chloro-D-L-Tryptophan in CBMDM**

Die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität und auch die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase liegen begründet in dem beschleunigten Abbau des L-Tryptophans, einer essentiellen Aminosäure.

Sowohl in Fibroblasten als auch in Glioblastomzellen wurde bereits nachgewiesen, dass die antiparasitäre IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität durch ein Analogon des L-Tryptophan, nämlich das 6-CDLT, aufgehoben werden konnte (MacKenzie et al., 1999(b)). Dieses Analogon entfaltet auch in Makrophagen seine Wirkung. In einer weiteren Untersuchungsreihe sollte nun überprüft werden, in wieweit diese Aussage auf die CBMDM übertragbar ist. Dazu wurden erneut IFN $\gamma$ -Verdünnungsreihen (1000-0 U/ml) mit CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) in 96-multiwell-Platten angesetzt und diese mit und ohne 6-CDLT in verschiedenen Konzentrationen (200, 400 und 800  $\mu$ M) versetzt und für 72 h inkubiert. Die maximale Konzentration des 6-CDLT, die für die CBMDM tolerabel war, lag bei 800  $\mu$ M. Höhere Konzentrationen des 6-CDLT waren für diese Zellen toxisch. Durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau konnte bei dieser Konzentration (800  $\mu$ M) des 6-CDLT gezeigt werden, dass die CBMDM noch vital waren. Durch die anschließende photometrische Bestimmung des Kynureningehaltes in den Überständen konnte die IDO-Aktivität indirekt gemessen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.11 graphisch erfasst. Hier zeigt sich deutlich, dass IFN $\gamma$  die IDO-Aktivität induziert. Je höher die IFN $\gamma$ -Konzentration, umso höher der gemessene Kynureningehalt. Im Gegensatz dazu hemmt 6-CDLT signifikant die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM. Alle Konzentrationen des 6-CDLT erzielen eine Inhibition. Aber auch hier ist eine dosisabhängige Wirkung anschaulich dargestellt. Bei der höchsten Konzentration des 6-CDLT (800  $\mu$ M) bleibt die IDO-Aktivität nahezu bei Null und steigt auch bei Zugabe hoher IFN $\gamma$  Konzentrationen (1000 U/ml) kaum.



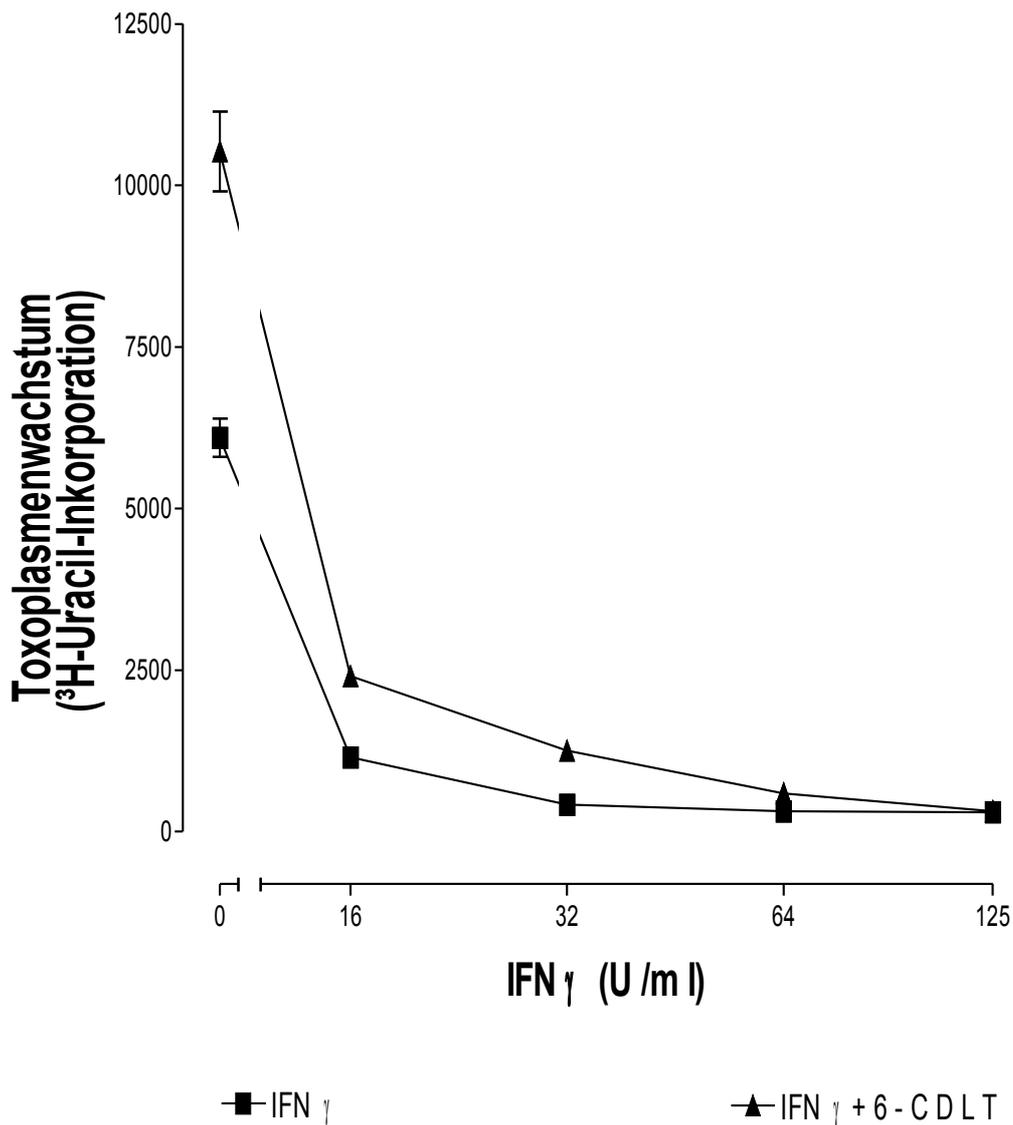
**Abb. 3.11 Die hemmende Wirkung des 6-CDLT auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Induktion in CBMDM ist dosisabhängig.**

*CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  (0-1000 U/ml) und mit oder ohne 6-CDLT in verschiedenen Konzentrationen (200  $\mu$ M, 400  $\mu$ M oder 800  $\mu$ M) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von 72 h erfolgte die photometrische Bestimmung der IDO-Aktivität im Überstand.*

*Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Bestimmungen +/- Standardabweichung.*

Nachdem die inhibitorische Wirkung des 6-CDLT auf die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Aktivität in CBMDM bewiesen wurde, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob der inhibitorische Einfluss des 6-CDLT in CBMDM auch für die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmenproliferationshemmung zutrifft. Nach der üblichen Inkubationszeit wurden die Zellen mit *Toxoplasma gondii* ( $1,5 \times 10^4$ /well) infiziert und nach weiteren 24 h Inkubationszeit mit  $^3\text{[H]}$ -Uracil gepulst. Nochmals 24 h später wurde das Toxoplasmenwachstum in den CBMDM über den  $\beta$ -counter gemessen.

In diesen Versuchsansätzen zeigte sich, dass 6-CDLT nicht in der Lage ist, die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostasis komplett aufzuheben. Ist kein IFN $\gamma$  vorhanden, ist das Toxoplasmenwachstum hoch, in Anwesenheit von 6-CDLT sogar fast doppelt so hoch. Doch sobald IFN $\gamma$  hinzugefügt wird, auch in geringer Konzentration von 16 U/ml, wird die Toxoplasmenproliferation inhibiert und zwar mit und ohne Vorhandensein von 6-CDLT. Ab einer IFN $\gamma$ -Konzentration von 64 U/ml verlaufen beide Kurven nahezu identisch, d.h. ab einer gewissen Konzentration des IFN $\gamma$  hat das 6-CDLT keinen Einfluss auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmenproliferationshemmung. Diese Ergebnisse sind in der Abbildung 3.12 dargestellt.



**Abb. 3.12 Die Wirkung des 6-CDLT auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM**

CBMDM ( $2 \times 10^4$ /well) wurden mit IFN $\gamma$  (0-125 U/ml) mit oder ohne 6-CDLT (800  $\mu$ M) stimuliert und für 72 h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit *Toxoplasma gondii* ( $1,5 \times 10^4$ /well) infiziert und nach weiteren 24 h Inkubationszeit mit <sup>3</sup>[H]-Uracil gepulst. Nach weiteren 24 h wurde das Toxoplasmenwachstum über den  $\beta$ -counter bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3-fach Messungen +/- Standardabweichung.

## 4. Diskussion

Das Protozoon *Toxoplasma gondii* ist ubiquitär verbreitet und hat dadurch zu einer hohen Durchseuchungsrate in der Bevölkerung geführt. Die Primärinfektion in der Schwangerschaft mit *Toxoplasma gondii* wird aufgrund der möglichen verheerenden Auswirkungen für den Fötus gefürchtet. Davon abgesehen wurde der Toxoplasmose lange Zeit wenig Beachtung geschenkt. Bei immunsupprimierten Patienten ist die Toxoplasmose jedoch eine häufige und oft letale Komplikation. Durch die steigenden Zahlen von HIV-Infizierten, durch vermehrt durchgeführte Organtransplantationen und durch zunehmende Anwendung von immunsuppressiven Therapien tritt die manifeste Toxoplasmose wesentlich häufiger auf und hat aus diesem Grund an Bedeutung gewonnen. Im Zentrum des Interesses stehen die ablaufenden Immunreaktionen während einer Infektion. *Toxoplasma gondii* ist ein obligat intrazellulär lebendes Protozoon und kann sich in vielen Zelltypen vermehren. In humanen *in vitro*-Infektionsmodellen wurde das Wachstum von *Toxoplasma gondii* in Fibroblasten (Pfefferkorn et al., 1984), in Endothelzellen (Murray et al., 1985 (a)), in Monozyten (McLeod et al., 1983; Catteral et al., 1987) sowie in Glioblastomzellen (Däubener et al., 1993) bewiesen. Außerdem wurden humane MDM als Wirtszellen für *Toxoplasma gondii* beschrieben (Anderson et al., 1976; Catteral et al., 1987; Türck, 2003). Diese humanen MDM sind an den immunologischen Abläufen gegen diese Parasiten beteiligt und weisen sowohl unter bestimmten Versuchsbedingungen als auch *in vivo* eine effektive Toxoplasmose auf. Allerdings dienen genau diese Zellen nach einer Toxoplasmeninfektion für den obligat intrazellulär lebenden Erreger als Wirtszelle und auch als Reservoir. Es bestehen komplexe Zusammenhänge zwischen der humoralen und der zellulären Immunabwehr. In immunkompetenten Individuen wird *Toxoplasma gondii* vorwiegend durch das zelluläre Immunsystem, den CD4+- und den CD8+-T-Zellen bekämpft. Dabei werden von diesen Zellen Zytokine produziert, die unter anderem antiparasitäre Effektormechanismen induzieren. Nachdem in unserer Arbeitsgruppe die immunologischen Mechanismen untersucht worden sind, die im Rahmen einer Toxoplasmose in humanen MDM von Bedeutung sind (Türck, 2003), sollte dieses Infektionsmodell auf CBMDM ausgedehnt werden. Nabelschnurblut wird

therapeutisch als eine alternative Quelle für eine Stammzelltransplantation nach Knochenmarkssuppression wie z.B. bei Leukämie oder Lymphomen verwendet und gewinnt anstelle von Knochenmarktransplantation oder anderen Stammzelltransplantationen eine immer größere Bedeutung. Der Grund hierfür sind wesentlich geringere Risiken, niedrigere Kosten und eine viel größere Verfügbarkeit (Lewis, 2002). Deshalb war es von großer Wichtigkeit, die CBMDM und ihre immunologischen Mechanismen gegen *Toxoplasma gondii* zu untersuchen. Dazu wurden CBMDM kultiviert und anschließend mit *Toxoplasma gondii* infiziert. Es wurde eine Quantifizierung der Toxoplasmenvermehrung in den CBMDM durchgeführt und die Wirkung der IFN $\gamma$ -vermitteltenIDO-Induktion auf die Proliferation des Parasiten hin untersucht. Zusätzlich sollten immunregulatorische Effektormechanismen, die in den IFN $\gamma$ -induzierten beschleunigten Tryptophanabbau regulierend eingreifen, ermittelt werden. Dieser IFN $\gamma$ -vermittelte Tryptophanabbau ist neben der Produktion von Sauerstoffradikalen und der L-Arginin-abhängigen Produktion von Stickoxiden ein wichtiger antiparasitärer Mechanismus.

#### **4.1. IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer Mechanismus**

In humanen MDM wird die Rolle der IDO in der Toxoplasmenabwehr bisher kontrovers diskutiert. Nach IFN $\gamma$ -Stimulation wird in allen Zellen eine Toxoplasmostase beobachtet. Carlin et al. postulierten 1987 die durch IFN $\gamma$  vermittelte IDO-Aktivität mit daraus resultierendem Tryptophanabbau in peripheren Blutmonozyten als antitoxoplasmatischen Mechanismus. Im Gegensatz dazu diskutierten Murray et al. 1989 den IFN $\gamma$ -induzierten Tryptophanabbau als Oxidative-burst-unabhängigen Mechanismus mit resultierender Toxoplasmostase. Sowohl in Blut- als auch in Gewebsmakrophagen konnte IFN $\gamma$  den Oxidative-burst-unabhängigen Effektormechanismus vermitteln, wobei er nicht für alle diese Populationen relevant erscheint. So ist beispielsweise für aktivierte Alveolarmakrophagen ein verminderter Effekt beschrieben (Murray et al., 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde der antimikrobielle Effekt der IDO-Induktion in CBMDM untersucht. Durch das bereits beschriebene Infektionsmodell konnte in den stimulierten CBMDM eine IFN $\gamma$ -induzierte Wachstums-hemmung von *Toxoplasma gondii* erzielt werden (Abbildung 3.2). In diesen Untersuchungen wurde auch deutlich, dass die IFN $\gamma$ -vermittelte Toxoplasmostase in CBMDM konzentrationsabhängig ist, denn die Toxoplasmenproliferationshemmung nahm mit ansteigender Konzentration des IFN $\gamma$  zu. Die Ergebnisse der dazugehörigen IDO-Messung (Abbildung 3.1) ließen eine Übereinstimmung zwischen dem Auftreten des antiproliferativen Effektes und der Bildung von messbarem Kynurenin erkennen. Damit könnte der Mangel der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan für die antiparasitäre Wirkung in CBMDM verantwortlich sein. Allerdings konnte durch Resupplementierung des abgebauten L-Tryptophans in diesem Infektionsmodell eine Aufhebung der Toxoplasmostase nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Hemmung des Toxoplasmenwachstums wahrscheinlich nicht alleine auf die Abwesenheit des L-Tryptophans beruht. Ähnliche Ergebnisse wurden bei humanen MDM beobachtet, wobei ebenfalls eine Resupplementierung von L-Tryptophan die bereits eingesetzte Toxoplasmostase nicht verringern konnte (Türck, 2003). Hier verhalten sich sowohl humane MDM als auch CBMDM konträr zu humanen Fibroblasten und Glioblastomzellen, bei denen die Toxoplasmostase durch eine

Resupplementierung von L-Tryptophan aufgehoben werden konnte (Däubener et al., 2001; Woodmann et al., 1991).

In der Gruppe von Fujigaki et al. wurde 2002 der antitoxoplasmatische Effekt in murinen Zellen sorgfältig untersucht. Auch hier war eine Induktion der Toxoplasmostase durch  $\text{IFN}\gamma$  möglich. Allerdings zeigte sich hier, dass der antiparasitäre Effektormechanismus in den murinen Zellen nicht über die IDO, sondern über die iNOS induziert wird. In dieser Untersuchung wurde die Wirkung einer Toxoplasmeninfektion auf die IDO in Mäusen, die nicht in der Lage waren,  $\text{IFN}\gamma$  zu produzieren ( $\text{IFN}\gamma$ -KO Mäuse), verglichen mit der Wirkung in Wildtyp-Mäusen. Eine mögliche Kreuzregulierung zwischen IDO und iNOS wurde sowohl in murinen als auch in humanen Zellen postuliert. Der hauptsächliche antiparasitäre Effektormechanismus scheint vom Zelltypus, von der Gewebeart und von der Spezies abhängig zu sein.

In anderen Versuchen konnte gezeigt werden (Thomas et al., 1994), dass murine Makrophagen, die normalerweise nicht zu einer IDO-Induktion in der Lage sind, unter bestimmten Umständen trotzdem diesen Stoffwechselweg durchführen können. Diese Zellen induzieren die IDO nur dann, wenn kein L-Arginin im Medium vorhanden ist oder in Anwesenheit von N(G)-monomethyl-L-Arginin (N(G)MMA), einem Inhibitor der NO-Produktion. Aber auch bei minimal vorhandener NO-Konzentration kann trotzdem die IDO induziert werden. Auch diese Ergebnisse sprechen für eine Verknüpfung von IDO und iNOS. Für humane MDM und murine Astrozyten ist bekannt, dass sie in der Lage sind, nach  $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation das Toxoplasmenwachstum zu hemmen. Allerdings konnte in diesen Zellen die Toxoplasmostase sowohl durch die Resupplementierung mit L-Tryptophan als auch durch die Zugabe von N(G)MMA nicht gehemmt werden (Halonen und Weiss, 2000; MacKenzie et al., 1999(a)). Dies deutet darauf hin, dass hier weder die IDO-Induktion noch die iNOS der tragende antiparasitäre Effektormechanismus sein kann.

Der Toxoplasmostasemechanismus wurde auch in humanen Uroepithelcarcinomzellen untersucht (Däubener et al., 1999(a)). Dabei wurde zunächst eine durch  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität gemessen, durch die eine Toxoplasmostase erzielt wurde. Nach Stimulation dieser Zellen mit IL-1 und  $\text{IFN}\gamma$  wurden aber die IDO-Aktivität und ebenso die Toxoplasmostase reduziert. Stattdessen konnte eine Induktion der iNOS beobachtet werden. Dieser Vorgang konnte durch Zugabe von

N(G)MMA wieder aufgehoben werden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität ein wichtiger Mechanismus gegen *Toxoplasma gondii* ist, aber auch, dass die NO-Produktion in die Regulierung der IDO-Aktivität involviert sein könnte. IFN $\gamma$  scheint in ein und derselben Spezies sowohl die IDO als auch die iNOS induzieren zu können und so den L-Tryptophanabbau als auch den L-Argininstoffwechsel zu beeinflussen (Melillo et al., 1993).

In der Literatur wird vermutet, dass nicht nur die Abwesenheit der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan eine Toxoplasmostase auslösen kann. So sind humane MDM im Gegensatz zu beispielsweise Glioblastomzellen und dermalen Fibroblasten in der Lage, das aus L-Tryptophan entstehende L-Kynurenin weiter zu verstoffwechseln (Werner-Feldmeyer et al., 1989). Allerdings wird nur der erste Schritt im L-Tryptophanmetabolismus durch IFN $\gamma$  induziert. Im weiteren Abbau des L-Tryptophans entstehen verschiedene Stoffwechselprodukte, die zum Teil toxisch sind wie zum Beispiel die Quinolinsäure (QUIN). Diese kann eine Auslösung der Apoptose bewirken (Stone, 1993). QUIN ist ein neuroaktiver Metabolit des L-Tryptophans und ist in Blut und ZNS zu finden. Nur wenige Zellen sind in der Lage, das L-Tryptophan bis zur QUIN zu verstoffwechseln, hier sind vor allem die MDM zu nennen (Saito, 1993). Bei entzündlichen neurologischen Erkrankungen tritt QUIN in hohen Konzentrationen im Liquor auf, korrelierend zur Schwere der Erkrankung, beispielsweise beim HIV (Martin et al., 1992). Möglicherweise könnten sich diese Stoffwechselprodukte hemmend auf das Toxoplasmenwachstum auswirken oder auch stimulierend für weitere Stoffwechselreaktionen sein. Wäre dieser Mechanismus der tragende anti-parasitäre Effekt in humanen MDM und in CBMDM, könnte diese These die fehlende Aufhebung der Toxoplasmostase durch eine Resupplementierung mit L-Tryptophan erklären.

Die potenzierende Wirkung durch das Vorhandensein von TNF $\alpha$  auf IFN $\gamma$  ist bei vielen antitumoralen und immunologischen Antworten bekannt (Sugarman et al., 1985). Auch auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO hat das TNF $\alpha$  eine potenzierende Wirkung. Dieser synergistische Effekt wurde in vielen verschiedenen Zelllinien, wie z.B. in murinen sowie humanen Fibroblasten, Glioblastomzellen, Astrozyten und Endothelzellen nachgewiesen (Sibley et al., 1991; Däubener et al., 1996;

Däubener et al., 1997). Der Synergismus von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  bewirkte in allen diesen Zellen auch eine Potenzierung des antiparasitären Effektes, so dass ebenfalls die Toxoplasmostase gesteigert wurde. In humanen Fibroblasten wurde ebenfalls eine Potenzierung des antiparasitären Effektes durch IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach Toxoplasmeninfektion beobachtet, wobei die Toxoplasmostase durch Zugabe von L-Tryptophan allerdings kaum aufgehoben werden konnte. Dieses Ergebnis ist gegensätzlich zur alleinigen Stimulation mit IFN $\gamma$ . Dadurch ist fraglich, ob die Wirkung des TNF $\alpha$  nicht über einen anderen Mechanismus läuft (Chaves et al., 2001). Auch für Streptokokken der Gruppe B (GBS) wurde in humanen MDM eine größere antimikrobielle Wirkung bei gleichzeitigem Vorhandensein von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  beobachtet (MacKenzie et al., 1998(b)). Es ist bekannt, dass humane und murine MDM als Antwort auf eine Infektion mit GBS TNF $\alpha$  sezernieren (Williams et al., 1993; Goodrum et al., 1995). In unserer Arbeitsgruppe konnte bei humanen MDM nach Infektion mit *Toxoplasma gondii* die gleiche synergistische Wirkung des TNF $\alpha$  auf das IFN $\gamma$  nachgewiesen werden. DieIDO-Induktion und damit der Abbau von L-Tryptophan wurden durch diesen Synergismus potenziert. Allerdings blieb ein potenzierender Effekt auf die Toxoplasmostase aus (Türck, 2003). In den Versuchsreihen der hier vorliegenden Arbeit mit CBMDM erzielte TNF $\alpha$ , wie bereits in der Literatur beschrieben (Däubener et al., 1996; de Titto et al., 1986), alleine keine Induktion derIDO-Aktivität. Die simultane Stimulation der CBMDM mit IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  brachte den synergistischen Effekt von TNF $\alpha$  zum Vorschein (Abbildung 3.1). Des Weiteren zeigte sich in CBMDM allerdings auch ein Synergismus von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  hinsichtlich der Toxoplasmostase. TNF $\alpha$  wirkte ebenfalls potenzierend auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase (Abbildung 3.2). Dieser Effekt ist bei den CDMDM stärker ausgeprägt als bei den humanen MDM.

Die regulatorisch wirksame Beeinflussung der zytokin-induzierten antiparasitären Effektormechanismen ist sicherlich noch lange nicht geklärt. Nach den Versuchsreihen mit CBMDM am oben erläuterten Infektionsmodell scheint jedoch die Degradation des L-Tryptophans über die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Induktion einen wichtigen antiparasitären Mechanismus darzustellen, allerdings ist dieser Effekt nicht alleine für die Toxoplasmostase verantwortlich. Neben der Degradation des L-Tryptophans sind noch viele weitere Mechanismen zur Abwehr intrazellulärer

Parasiten bekannt. Am Wichtigsten zu nennen sind hier die Produktion toxischer Sauerstoffradikale und die Bildung von Stickoxiden. Was bisher nicht geklärt werden konnte, ist, ob und wie diese antimikrobiellen Mechanismen zusammenarbeiten. Eine andere Frage, die hier nicht beantwortet werden konnte, ist, ob die durch die IDO entstehenden Metaboliten von L-Tryptophan bzw. Kynurenin in diesen Effektormechanismus eingreifen und eine Toxoplasmostase verursachen. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig.

## 4.2. Die inhibitorische Wirkung von Interleukin-4

Nachdem die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM untersucht wurde, sollte im Anschluss daran überprüft werden, ob und wie verschiedene Zytokine in diesen anti-parasitären Regulationsmechanismus eingreifen.

Da bei IL-4 bereits ein allgemeiner antagonisierender Effekt zu IFN $\gamma$  bekannt ist (Kirchner, 1994), war es von großer Bedeutung, herauszufinden, inwieweit dieser antagonistische Effekt auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität übertragbar ist. IL-4 wurde erstmalig 1982 als eine Substanz beschrieben, die das B-Zell-Wachstum fördert. Das IL-4-Gen liegt auf dem Chromosom 5 des Menschen. IL-4 ist ein Zytokin vom T<sub>H2</sub>-Typ und wird von aktivierten T-Zellen produziert. Es hat sowohl in der Proteinsequenz als auch in der Genstruktur einige Homologien mit IFN $\gamma$  (Kirchner, 1994). Diese Homologien werden für den antagonisierenden Effekt zu IFN $\gamma$  verantwortlich gemacht. IL-4 wird eine duale Rolle in der Abwehr mononukleärer Phagozyten zugeschrieben und zwar sowohl eine induzierende als auch eine supprimierende Rolle (Musso et al., 1994). Auf der einen Seite ist bekannt, dass IL-4 die Aktivierung einiger Abwehrzellen hemmen kann (Cox et al., 1991). Außerdem ist IL-4 in der Lage, Immunantworten, die durch IFN $\gamma$  oder durch IL-2 induziert wurden, wieder zu antagonisieren. So greift IL-4 beispielsweise hemmend in die Produktion von TNF $\alpha$  (Hart et al., 1989), IL-6 (Te Velde et al., 1990; Cheung et al., 1990) und IL-1 ein (Donnelly et al., 1990). Diese Zytokine aktivieren Makrophagen, daher ist die supprimierende Rolle von IL-4 also eine makrophagen-deaktivierende Funktion (Bogdan und Nathan, 1993). IL-4 ist somit ein wirksamer Antagonist für einige IFN $\gamma$ -induzierte Effekte. Die Aktivierung von Monozyten wird über diese reziproke Regulation von IFN $\gamma$  und IL-4 geregelt (Donnelly et al., 1990).

Auf der anderen Seite wird das IL-4 auch für viele makrophagen-aktivierende Wirkungen verantwortlich gemacht. In der Literatur wurde beschrieben, dass IL-4 in murinen MDM die *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse I und II Antigen-Expression induziert (Stuart et al., 1988). Andere Forschungen konnten außerdem zeigen, dass IL-4 die Sekretion von kolonie-stimulierenden Faktoren (CSF) für Makrophagen vermittelt (Wieser et al., 1989). Außerdem wurden für IL-4 eine Induktion zur Steigerung des T-Zell-Wachstums sowie eine Wirkung als autokriner Wachstumsfaktor für antigenspezifische T-Zellen in Verbindung mit

IL-1 beschrieben (Kirchner et al., 1994). Zusätzlich wurde entdeckt, dass durch IL-4 eine Induktion des IL-1-Rezeptors Typ I und II ausgelöst wird (Colotta et al., 1993; Colotta et al., 1996). Diese Induktion kann allerdings sowohl durch IFN $\gamma$  als auch durch IL-10 wieder antagonisiert werden (Dickensheets und Donnelly, 1997). Um dieses diffizile Zusammenspiel der Zytokine besser zu verstehen, war das Ziel unserer Untersuchungen, herauszufinden, ob und in welcher Weise IL-4 zu einer Beeinflussung der IFN $\gamma$ -vermittelten IDO-Induktion in CBMDM führt. Außerdem sollte geklärt werden, ob IL-4 in die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM eingreift und welche immun-regulatorischen Funktionen IL-4 dabei übernimmt. In unseren Untersuchungen wurde deutlich, dass IL-4 eine inhibitorische Wirkung auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität besitzt. In Abbildung 3.3 wird dieser Effekt dargestellt. Aber es wird auch deutlich, dass der inhibitorische Effekt des IL-4 durch hohe Konzentrationen von IFN $\gamma$  aufhebbar ist.

Im Anschluss daran wurde der immunregulatorische Einfluss von IL-4 auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase überprüft. Hier zeigte sich eine deutliche Aufhebung der Toxoplasmostase in CBMDM in Anwesenheit von IL-4. Diese Inhibition der Toxoplasmostase war IL-4- und IFN $\gamma$ -dosisabhängig (Abb. 3.5). Damit konnte der bereits bekannte antagonistische Effekt des IL-4 auf das IFN $\gamma$  sowohl für die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion als auch auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM ausgedehnt werden. Allerdings scheint IL-4 nicht nur eine Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität zu erzielen, sondern auch alleine eine proliferierende Wirkung auf *Toxoplasma gondii* zu haben. Schon früher wurde in der Literatur beschrieben, dass IL-4 einen inhibitorischen Effekt auf die IDO-Induktion in humanen Monozyten besitzt und damit den Stoffwechsel des L-Tryptophans negativ beeinflusst (Musso et al., 1994). Früh wurde auch erkannt, dass die Wirkungsweise der Zytokine sowohl von ihrer Konzentration als auch von dem Differenzierungs- und Aktivierungsgrad der Makrophagen abhängig ist (Bogdan und Nathan, 1993). Bei Stimulation humaner MDM mit IFN $\gamma$  in Gegenwart von IL-4 zeigte sich ebenfalls ein IL-4-vermittelter inhibitorischer Effekt auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität (Türck, 2003). Die daraus resultierende Beeinflussung des Toxoplasmenwachstums zeigte sich in einer Aufhebung der Toxoplasmostase. Auch für humane Fibroblasten ist die IFN $\gamma$ -induzierte IDO als der wichtigste antiparasitäre Effektormechanismus gegen

*Toxoplasma gondii* bekannt. In den Untersuchungen von Chaves et al. im Jahre 2001 wurde dieser antitoxoplasmatische Effekt in den humanen Lungenfibroblastenzelllinien LL24 und MRC5 durch IL-4 signifikant inhibiert. Gleichzeitig wurde ein verminderter L-Tryptophankatabolismus und weniger IDO-mRNA-Expression verzeichnet. Es wurde nachgewiesen, dass IL-4 die durch IFN $\gamma$  induzierte Transkription des IDO-Gens hemmt. Gleichzeitig wurde die durch IFN $\gamma$ -induzierte Zelloberflächen-Expression von HLA-DR und CD2 inhibiert.

In murinen Makrophagen läuft der antiparasitäre Effektormechanismus über die iNOS, auch dieser Mechanismus wird durch IFN $\gamma$  induziert. Dadurch werden Parasiten wie *Schistosoma mansoni* bekämpft. Dieser Mechanismus wird durch IL-4, IL-10 oder TGF- $\beta$  inhibiert (Oswald et al., 1992). Die Kombination dieser drei Zytokine erreichte eine deutliche Steigerung der Inhibition der iNOS. Auch bei einer Infektion von murinen Makrophagen mit *Candida albicans* wurde dieses Ergebnis erzielt (Cenci et al., 1993) und eine Inhibition der iNOS sowie des antifungalen Effektes beschrieben. Bei einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* kann IL-4 sowohl eine protektive als auch eine destruierende Rolle spielen. Ergebnisse von Roberts et al. im Jahre 1996, die den Verlauf einer Infektion mit *Toxoplasma gondii* in IL-4 Gen Knockout Mäusen (IL-4  $-/-$ ) und Wildtypmäusen (IL-4  $+/+$ ) untersuchten, zeigten, dass die Sterblichkeit bei den IL-4  $-/-$  Mäusen signifikant höher war als bei den Wildtypmäusen. Das bedeutet, dass die reduzierte Mortalität bei den Wildtypmäusen von der antiinflammatorischen Wirkung des IL-4 und damit von der Reduzierung des IFN $\gamma$  abhängig sein könnte.

Somit scheinen die Interaktionen zwischen inflammatorischen und regulatorischen Zytokinen sensibel ausbalanciert zu sein. Die Abwesenheit oder die überdimensionale Produktion einer dieser beiden Waagschalen kann die Morbidität und auch die Mortalität deutlich erhöhen.

Im Anschluss an die Versuche mit IL-4 wurde im nächsten Schritt unserer Arbeit die Interaktion zwischen IL-4 und TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM untersucht. Wir haben bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass der inhibitorische Effekt von IL-4 auf die IDO-Aktivität nicht nur in der zuvor beschriebenen Hemmung der TNF $\alpha$ -Produktion in humanen MDM lag. Durch die Zugabe von IL-4 wurde in humanen MDM eine viel stärkere Inhibition der IDO erzielt als durch die Zugabe neutralisierender TNF $\alpha$ -Antikörper. In

Anwesenheit von IL-4 und TNF $\alpha$ -Antikörper konnte allerdings kein Synergismus im Sinne einer verstärkten Inhibition der IDO-Aktivität erreicht werden (MacKenzie et al., 1999(a)). Daher wurde davon ausgegangen, dass IL-4 und TNF $\alpha$  entweder denselben Regulationsmechanismus haben oder das IL-4 auf einer zentraleren Ebene wirkt als TNF $\alpha$ . In der Literatur wurde der inhibitorische Effekt von IL-4 in einem vermehrten Abbau der Zytokin-mRNA beschrieben (Wang et al., 1995).

In diesem Zusammenhang sollte die Interaktion zwischen IL-4 und TNF $\alpha$  auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität in CBMDM untersucht werden. In unserem beschriebenen Infektionsmodell zeigte sich ebenfalls, dass das Vorhandensein von TNF $\alpha$  und IL-4 keine synergistische Wirkung auf das IFN $\gamma$  hat. Die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität wird in Anwesenheit von TNF $\alpha$  potenziert und in Anwesenheit von IL-4 inhibiert. Sind TNF $\alpha$  und IL-4 gleichzeitig vorhanden, scheint sich ihre Wirkung gegenseitig aufzuheben (Abbildung 3.4). Die Auswirkung der Interaktion zwischen dem inhibierenden IL-4 und dem potenzierenden TNF $\alpha$  wurde auch im Hinblick auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase untersucht. Hier zeigte sich die bereits bekannte Aufhebung der Toxoplasmostase durch IL-4. Bei zeitgleichem Vorhandensein von TNF $\alpha$  war die Aufhebung der Toxoplasmostase geringer, wobei TNF $\alpha$  auch in Abwesenheit von IFN $\gamma$  die inhibierende Wirkung des IL-4 geringfügig verminderte (Abb. 3.6).

In der Literatur wurde beschrieben, dass der inhibierende Effekt von IL-4 auf der Ebene der Transkription des IDO-Gens beginnt. Außerdem soll IL-4 eine biologische Relevanz auf den L-Tryptophankatabolismus haben, der den inhibitorischen Effekt des IFN $\gamma$  antagonisiert (Chaves et al., 2001). Während die IFN $\gamma$ -Induktion über den Weg des STAT1 läuft, ist der Hauptsignalweg, der von IL-4 getriggert wird, STAT6 (Hou et al., 1994; Schindler et al., 1994). Durch IL-4-induzierte STAT6-Homodimere können sogar effektiv mit STAT1-Homodimeren um den Interferon-Regulationsfaktor-1 (IRF-1) kompetitiv konkurrieren, ohne die positive transaktivierende Funktion der STAT1-Homodimere zu vermitteln. So wird eine negative Regulation der IFN $\gamma$ -induzierbaren Gene erzielt (Ohmori und Hamilton, 1997). Interessanterweise besitzt IL-4 keinerlei hemmende Wirkung auf die durch IFN $\beta$ - und TNF $\alpha$ -aktivierte IDO-Induktion, denn dieser Mechanismus läuft über den STAT1/STAT2 Weg, worauf IL-4 keinen Einfluss nehmen kann (Schindler und

Darnell, 1995). Eine andere Alternative wäre die Induktion des Interferon-Regulationsfaktor-2 (IRF-2) durch IL-4, der mit IRF-1 um die gemeinsame Bindung an der DNA konkurriert. IRF-1 wird durch IFN $\gamma$  induziert (Paludan et al., 1999) und ist zugleich von höchster Wichtigkeit für IDO-Genexpression (Du et al., 2000).

Die Ergebnisse durch Stimulation der CBMDM mit IL-4 lassen erkennen, dass eine sensible immunologische Kontrolle des Tryptophanmetabolismus existiert. Die bereits bekannte inhibitorische Wirkung des IL-4 konnte auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität ausgedehnt werden.

Die IDO-Induktion steht damit sowohl unter dem positiven, verstärkenden Einfluss des IFN $\gamma$ , als auch unter einem inhibitorischen Effekt des IL-4. Inwieweit IL-4 das Entstehen toxischer Metabolite des L-Tryptophans verhindert und dadurch die Toxoplasmostase inhibiert, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Die bisher in der Literatur beschriebenen Möglichkeiten des IL-4, das IFN $\gamma$  über den STAT6-Weg oder den IRF-2 Weg kompetitiv zu hemmen, könnten für den inhibitorischen Wirkungsmechanismus von IL-4 in Frage kommen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass IL-4 einen anderen durch IFN $\gamma$  induzierten antiparasitären Effektormechanismus, der bis jetzt noch nicht bekannt ist, inhibitorisch beeinflusst.

Eine Beurteilung von Immunreaktionen *in vivo*, auf der Basis von Ergebnissen aus *in vitro*-Versuchen mit isolierten CBMDM ist aufgrund verschiedener Wirkungsweisen in Abhängigkeit vom Zelltyp und gegenseitiger Beeinflussung multipler Faktoren schwierig und bedarf weiterer intensiver Forschung.

### 4.3. Interleukin-10

Das humane IL-10 ist genau wie IL-4 als anti-inflammatorisch wirksames Zytokin bekannt. IL-10 ist ein ca. 40 Kilodalton großes, säurelabiles Protein, sein Gen liegt auf Chromosom 1. IL-10 wurde erstmals 1989 von Fiorentino et al. als Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor (CSIF) beschrieben. Bereits kurz nach seiner Entdeckung wurde es als IL-10 in die Zytokine eingereiht. IL-10 wird nur von T<sub>H0</sub>- und T<sub>H2</sub>-Zellen produziert. IL-10 ist ein Zytokin mit pleiotropischen Effekten. Es unterdrückt die Proliferation von T<sub>H1</sub>-Zellen und inhibiert vor allem deren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Andererseits fördert IL-10 allerdings die Reifung von T<sub>H2</sub>-Zellen. Somit steigert IL-10 die humorale Immunantwort und unterdrückt die zelluläre Immunantwort (Kirchner, 1994). In der Literatur wurde ebenfalls beschrieben, dass IL-10 in der Lage ist, die zellvermittelten Immunreaktionen, insbesondere die Zytokin-Synthese, zu bremsen (Opal et al., 1998). Bei der Unterdrückung der Zytokinproduktion nimmt IL-10 sogar eine zentrale Rolle ein. Neben IL-4 ist IL-10 der stärkste IFN $\gamma$ -Antagonist, da es die MHC-Klasse-II-Expression auf den meisten Zellen vermindert. Die MHC-Klasse-II-Expression auf B-Zellen wird jedoch durch IL-10 gesteigert, was zur Förderung der humoralen Immunantwort passt (Kirchner, 1994). Identifiziert und lokalisiert wurde das humane IL-10 durch Kreuzhybridisierungen unter Verwendung von cDNA-Klonen des Mäuse-IL-10. Die DNA-Sequenzen der beiden Zytokine stimmten in mehr als 80 % überein (Kim et al., 1992). Auch das humane IL-10 zeigte ebenso wie das IL-4 in der Tertiärstruktur deutliche Übereinstimmungen mit IFN $\gamma$  (Zdanov et al., 1996). Durch Ho et al. wurde 1993 erstmals eine Ähnlichkeit zwischen der Konstitution des IFN $\gamma$ -Rezeptors und des Rezeptors des IL-10 bewiesen. Hierdurch lässt sich auch zum Teil die gegenseitige antagonisierende Wirkung beider Zytokine erklären. Beide zeigten eine hohe Rezeptoraffinität und wurden in verschiedenen Zelllinien gefunden. IL-10 wird durch das Vorhandensein von Endotoxinen induziert und dann von verschiedenen Zelltypen produziert. Dazu gehören unter anderem CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Keratinozyten (Pajkrt et al., 1997). Allerdings sind MDM hauptverantwortlich für die IL-10 Synthese (de Vries et al., 1995; de Waal Malefyt et al.; 1991). Hier ist eine Aktivierung auf der Transkriptionsebene durch Interaktion von „nuclear factor

$\kappa B$ “ (NF $\kappa B$ ) und zyklischem Adenosin-monophosphat (cAMP) beschrieben (Moore et al., 1993). Diese ist zeitlich verzögert zur proinflammatorischen Immensekretion, welche durch IL-1, IL-12 und TNF $\alpha$  gesteuert wird. Erst viel später beginnt die Aktivierung von IL-10 (Van der Poll et al., 1997). Das Ergebnis dieser zeitlichen Verzögerung unterstützt die Annahme, dass die spätere Ausschüttung von IL-10 ein natürlicher Regulationsmechanismus ist, um eine protrahierte Entzündungsreaktion zu unterbinden. Außerdem wird durch das Vorhandensein von IL-10 die Synthese von IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, Granulozyten-colony stimulating factor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-colony stimulating factor (GM-CSF), Stickstoffmonoxid (NO), TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  inhibiert (Gazinelli et al., 1992; Smith et al., 1996). Darüber hinaus wird aber auch die Produktion von IL-10 gesteuert. Hierfür sind Zytokine wie das IL-4, IFN $\gamma$  und IL-1 $\beta$  verantwortlich (Chomarat et al., 1993). Interessanterweise kann sich IL-10 selbst durch die IL-10 mRNA-Expression in aktivierten humanen MDM herunterregulieren (Brown et al., 1996). Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass IL-10 eine wichtige autoregulatorische negative Feedback-Schleife besitzt (de Waal Malefyt et al. 1991 und 1993).

IL-10 kann nicht einfach als „Aktivator“ oder als „Suppressor“ beschrieben werden. Es sind zwei gegensätzliche Wirkungsweisen für das IL-10 im Körper bekannt. Auf der einen Seite der antiinflammatorische Effekt, durch diesen wird eine Vielzahl der entzündlichen Aktivitäten antigenpräsentierender Zellen deaktiviert (Bogdan et al., 1991). Auf der anderen Seite besitzt IL-10 auch eine immunstimulatorische Komponente. Dadurch werden die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zellen des Immunsystems sowie antikörperabhängige zelluläre zytotoxische Reaktionen induziert (Moore et al., 1993). Die bisherigen Infektionsmodelle zeigten, dass die Wirkungsweise von IL-10 sowohl abhängig vom Infektionsort als auch vom infizierenden Pathogen ist. Für die Pathogenese immunsuppressiver Vorgänge bei Infektionen mit Leishmanien, Schistosomen und *Mycobacterium leprae* sowie *Toxoplasma gondii* ist eine Beteiligung von IL-10 bereits bekannt (Finkelmann et al., 1991; Heinzl et al., 1991; Yamamura et al., 1991; Neyer et al., 1997). Aus diesem Grund war für unsere Arbeitsgruppe interessant, inwieweit und auf welche Weise IL-10 auch regulierend in eine Infektion von CBMDM mit *Toxoplasma gondii* eingreift. In der Literatur wurde schon ein Infektionsmodell mit *Toxoplasma gondii* in Mäusen

beschrieben (Khan et al., 1995). Hier konnte in den infizierten Mäusen eine IL-10-vermittelte Immunsuppression bestätigt werden. Außerdem konnte in dieser Studie die Produktion von IL-10 in Makrophagen und in T-Zellen der *Toxoplasma gondii* infizierten Mäusen nachgewiesen werden. Nach Infektion mit dem Pathogen wurde am 7. Tag des Experiments eine Reduktion der IFN $\gamma$ -Konzentration im Zellüberstand gemessen. Zusätzlich wurde eine verminderte Expression der IFN $\gamma$ -mRNA nachgewiesen. Khan et al. zeigten durch Zugabe von  $\alpha$ -IL-10-AK, dass dieser Effekt IL-10 spezifisch war. Auch dieses Ergebnis unterstützte die Annahme, dass IL-10 und IFN $\gamma$  gegensätzliche Wirkungsweisen haben und sich gegenseitig regulieren.

Die Rolle des IL-10 im murinen Immunsystem ist mittlerweile gut untersucht. Allerdings sind in murinen Zellen andere Effektormechanismen zur Abwehr von *Toxoplasma gondii* bekannt als in humanen Zellen. Es ist bewiesen, dass durch IFN $\gamma$  stimulierte murine Makrophagen hohe Mengen iNOS produzieren. Die Produktion und die Expression von iNOS wurden auch in murinen Makrophagen durch IL-10 inhibiert. Auf diesem Weg kann die Wirkung des IFN $\gamma$  durch IL-10 antagonisiert werden (Cunha et al., 1992).

Trotzdem wurde in einer anderen Versuchsreihe gezeigt, dass Mäuse mit einem fehlendem IL-10 Gen (IL-10 $^{-/-}$ ) im Gegensatz zu den Wildtypmäusen bei einer akuten Infektion mit *Toxoplasma gondii* eine Mortalität von 100 % zeigten (Neyer et al., 1997). Diese frühe Mortalität der IL-10 $^{-/-}$  Mäuse korrelierte mit höheren IFN $\gamma$ -Serumspiegeln. Die Anwesenheit von IL-10 während einer Immunreaktion und die dadurch erreichte Suppression der Immunantwort scheinen für den Wirt lebenswichtig zu sein (Neyer et al., 1997; Gazinelli et al., 1996). Im Gegensatz dazu beschrieb Corradin et al. 1993 eine Induktion der NO-Produktion durch IL-10 in murinen MDM. Und te Velde et al. schlossen 1992 aus ihren Beobachtungen, dass IL-10 nicht länger als genereller Inhibitor von Immunantworten beschrieben werden kann.

In vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich der Wirkung von IL-10 auf denIDO-vermittelten L-Tryptophanabbau stellte sich heraus, dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität durch IL-10 in humanen MDM inhibiert wurde (Türck, 2003). Diese Wirkung konnte durch Zugabe von neutralisierenden  $\alpha$ -IL-10-AK komplett aufgehoben werden, als Nachweis für eine IL-10-

spezifische Wirkung. Die daraufhin erwartete Hemmung der Toxoplasmostase in humanen MDM blieb dabei jedoch aus.

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, welchen Einfluß IL-10 auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Induktion und auf die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 eine inhibitorische Wirkung auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität besitzt, welche konzentrationsabhängig ist (Abb. 3.7). Auf welche Art und Weise das Zytokin auf die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität wirkt, ist allerdings unklar. Eine deutliche Aufhebung der Toxoplasmostase in CBMDM in Anwesenheit von IL-10 blieb auch hier aus. Nur bei einer geringen Konzentration des IFN $\gamma$  (4 U/ml) war IL-10 in der Lage, die Toxoplasmostase um ca. 50 % zu verringern. (Abb. 3.8). Damit konnte der bereits bekannte antagonistische Effekt des IL-10 auf IFN $\gamma$  bestätigt werden und zusätzlich ein antagonistischer Effekt auf die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion in CBMDM nachgewiesen werden. Für die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM ist dieser antagonistische Effekt nur bei niedrigen IFN $\gamma$ -Konzentrationen ausgeprägt. Allerdings scheint IL-10 alleine sogar eine proliferierende Wirkung auf *Toxoplasma gondii* zu besitzen. Durch simultane Zugabe eines neutralisierenden  $\alpha$ -IL-10-AK wurde der antagonistische Effekt auf die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion wieder komplett aufgehoben und so die IL-10-Spezifität für den inhibierenden Effekt auf die IFN $\gamma$ -vermittelte IDO-Induktion bestätigt (Abbildung 3.9).

Im Anschluss sollte überprüft werden, wie und in welcher Weise IL-10 auf die Wirkungsweise des TNF $\alpha$  im Hinblick auf die IDO-Aktivität in CBMDM Einfluss nimmt. Die potenzierenden Effekte des TNF $\alpha$  auf die IDO-Aktivität sind bereits bekannt (s. 4.1.2.). In unserer Versuchsreihe mit CBMDM wurde dieser synergistische Effekt des TNF $\alpha$  auf das IFN $\gamma$  durch die Anwesenheit von IL-10 allerdings aufgehoben (Abbildung 3.10). TNF $\alpha$  wird wie viele andere Substanzen z.B. nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder GBS von humanen MDM gebildet (Goodrum et al., 1995). Danach stimuliert TNF $\alpha$  die Freisetzung von IFN $\gamma$  mit seinen antiparasitären Effekten aus NK- und spezifischen T-Zellen. Um hier überschießende Immunreaktionen und Folgen, wie z.B. eine Sepsis zu vermeiden, müssen gegenregulatorische Effekte greifen. In diesem Zusammenhang werden in komplizierten klinischen Fällen Therapien mit inhibitorischen Substanzen diskutiert (Pajkrt et al., 1997; Gomez-Jimenez et al.,

1995). Hierzu zählt auch IL-10 als potenter Inhibitor von TNF $\alpha$ . Der schnelle Anstieg des IL-10 während einer Endotoxikämie scheint eine natürliche anti-inflammatorische Antwort zu sein, um die Zytokinproduktion zu kontrollieren (Marchant et al., 1994). Die TNF $\alpha$ -Produktion von IFN $\gamma$ -induzierten MDM wird durch IL-10 deutlich supprimiert, dabei scheint das IL-10 frühzeitig auf die Zytokinproduktion zu wirken, indem es die Degradation der Zytokin-mRNA fördert (Bogdan et al., 1992).

In der Literatur wird die IL-10-induzierte Inhibition der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen in humanen Monozyten, wie beispielsweise TNF $\alpha$ , durch eine Blockierung der Gen-Transkription erklärt (Wang et al., 1995). Diese erfolgt über eine Hemmung des Transfers des „nuclear factor  $\kappa$ B“ (NF $\kappa$ B) vom Zytoplasma zum Kern, welche auch bei der zuvor erwähnten Aktivierung der IL-10-Synthese involviert ist (Moore et al., 1993). Es ist möglich, dass in dem von uns verwendeten *in vitro*-System eine Beteiligung dieses Faktors vorliegt und hierdurch die IFN $\gamma$ -induzierteIDO-Aktivität potenziert wird. Durch die zuvor beschriebene IL-10-vermittelte Transferhemmung des Faktors wäre dann beispielsweise der hemmende Effekt auf das IDO-System zu erklären. Eine andere Möglichkeit wäre, dass IL-10 einen direkten Effekt auf die IDO-Induktion besitzt. IL-10 wird auch mit einem verminderten Transfer des STAT6-Weges zum Zellkern assoziiert (Dickensheets und Donnelly, 1997). In der Literatur wird angenommen, dass die inhibierende Wirkungsweise des IL-10 auf das IFN $\gamma$  über den JAK/STAT1-Weg läuft. Zusätzlich induziert IL-10 die Expression von SOCS3-Gen (Suppressor of cytokine signaling 3-Gen) und greift auf diesem Weg in die Suppression der STAT1-Phosphorylierung ein (Ito et al., 1999). Eine Herunterregulation der IDO-Aktivität könnte möglicherweise auch über eine Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden (Dickensheets und Donnelly, 1997). Außerdem scheint der immunhemmende Effekt von IL-10 sowohl von der Wirtsspezies als auch vom stimulierenden Pathogen abhängig zu sein.

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-10 den IFN $\gamma$ -vermittelten L-Tryptophanabbau in CBMDM inhibiert, während das Toxoplasmenwachstum in CBMDM wesentlich weniger beeinflusst wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die IDO als einziger Effektormechanismus im Rahmen der Toxoplasmenabwehr in CBMDM eher unwahrscheinlich.

Durch die Zytokine wird der Verlauf einer Immunantwort geregelt. Wird dieses komplexe Regulationssystem richtig verstanden, könnte das Immunsystem durch die Gabe von Zytokinen beeinflusst werden. Dadurch ließe sich das Immunsystem in den gewünschten Funktionen verstärken und in den unerwünschten Funktionen unterdrücken. Ansätze hierfür gibt es in der modernen Immuntherapie, bei der Zytokine direkt gegeben oder Zellen *in vitro* mit diesen vorinkubiert werden. Einen weiteren Ansatz bietet die Gentherapie, hier werden Zellen *in vivo* zur Produktion von Zytokinen angeregt.

In diesem Zusammenhang scheint IL-10 trotz der oben genannten Ergebnisse eine interessante Perspektive für die Behandlung infektiöser und entzündlicher Erkrankungen darzustellen. In der Therapie von bakteriellen und parasitären Infektionen kann die Kombination eradizierender Medikamente mit dem Zytokin IL-10 eine effektive und schonende Behandlung darstellen. So konnte in ersten Experimenten mit Hasen bei einer durch Listerien verursachten Meningitis mit Hilfe einer derartigen Kombinationstherapie bereits ein Benefit für das infizierte Individuum bewirkt werden (Paris et al., 1997). Auf diese Weise könnten verheerende Krankheitsverläufe, wie ein septischer Schock, limitiert werden (Opal et al., 1997).

#### 4.4. Das Analogon 6-chloro-D-L-Tryptophan

In dem Infektionsmodell der hier vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die IDO durch  $\text{IFN}\gamma$  in CBMDM induziert wird und dass durch die IDO-Aktivität eine verstärkte Degradation des L-Tryptophans erzielt wird. Der IDO-vermittelte L-Tryptophanabbau konnte aber für die Inhibition des Toxoplasmenwachstums in CBMDM nicht verantwortlich gemacht werden, da die Resupplementierung von L-Tryptophan die Toxoplasmostase in CBMDM aufgehoben hat. Dieses Ergebnis wurde auch in Versuchen mit MDM erbracht (Türck, 2003). Hingegen bewirkte die Resupplementierung von L-Tryptophan in anderen Zelllinien wie Glioblastomzellen eine Aufhebung der Toxoplasmostase (Däubener et al., 1993). Daher scheint in CBMDM der L-Tryptophanmangel nicht alleine für die Toxoplasmostase verantwortlich zu sein. Allerdings könnten durch den Tryptophanabbau toxische Metabolite entstehen, die für die Toxoplasmostase verantwortlich sind. Um die Rolle der IDO in CBMDM weiter zu klären, sollte überprüft werden, ob eine Inhibition der  $\text{IFN}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität auch zu einer Aufhebung der  $\text{IFN}\gamma$ -induzierten Toxoplasmostase führt. Dafür wurde 6-CDLT verwendet, ein Substratanalogon des L-Tryptophans, das als kompetitiver Inhibitor des L-Tryptophans fungiert. 6-CDLT entfaltet in humanen MDM seine inhibitorische Wirkung und ist erst in höheren Konzentrationen toxisch. Es wird durch das Enzym IDO zu 4-chloro-3-hydroxyanthranilat verstoffwechselt, ein weiterer Abbau ist nicht möglich. Der Stoffwechselabbau des L-Tryptophans zu Quinolinsäure (QUIN) wird damit blockiert (Saito et al., 1993). Bei kompletter Oxidation des L-Tryptophans entsteht am Ende des Stoffwechselabbaus NAD. In Astrogliazellen konnte durch die  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität und dem daraus resultierenden L-Tryptophan-Abbau ein erhöhter NAD-Spiegel gemessen werden (Grant und Kapoor, 2003). Dieser Energie-lieferant wirkt bei neuroinflammatorischen Erkrankungen zellprotektiv. Durch die Inhibition der IDO mittels 6-CDLT wird auch die *de novo*-Synthese des NAD gehemmt. Das bedeutet weniger Energie und geringere Zellaktivität (Grant und Kapoor, 2003). In der Literatur wurde bereits eine Aufhebung der antiparasitären Mechanismen durch Substratanaloga des L-Tryptophans in Mäusen beschrieben (Munn et al., 1998). Auch in humanen Zellen wie beispielsweise Glioblastomzellen konnte ebenfalls die antiparasitäre  $\text{IFN}\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität durch das

Analogon 6-CDLT aufgehoben werden (MacKenzie et al., 1999(b)). Das bedeutet, dass die Toxoplasmostase durch den kompetitiven Inhibitor des L-Tryptophans aufgehoben werden konnte. Untersuchungen mit humanen MDM kamen zu einem anderen Ergebnis. Hier wurde zwar die IDO-Aktivität durch das Substratanalogon 6-CDLT inhibiert, die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase blieb davon jedoch unberührt und konnte nicht aufgehoben werden (MacKenzie et al., 1999(b)). Ähnliche Ergebnisse erzielten unsere Untersuchungen. Hierbei zeigte sich wie bei den humanen Glioblastomzellen und den MDM eine Aufhebung der IDO-Aktivität. Diese Aufhebung war vor allem abhängig von der Konzentration des 6-CDLT (s. Abbildung 3.11). Die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in CBMDM konnte aber auch genau wie bei den humanen MDM in Anwesenheit des Substratanalogons 6-CDLT nicht aufgehoben werden (Abbildung 3.12). Diese Ergebnisse bestätigten nochmals, dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität nicht als alleiniger wesentlicher antiparasitärer Mechanismus in CBMDM angesehen werden kann.

Die antitoxoplasmostatischen Mechanismen in CBMDM erscheinen sehr komplex. Nach wie vor unklar ist auch die Rolle des IDO-vermittelten L-Tryptophanmetabolismus bei der Toxoplasmostase in humanen MDM. In humanen MDM wird im Gegensatz zu murinen MDM durch die iNOS keine Toxoplasmostase erzielt und der Oxidative burst wird von *Toxoplasma gondii* durch endogene Katalasen neutralisiert (MacKenzie et al., 1999(a); Murray et al., 1985 (a)). In CBMDM wird die Toxoplasmostase genau wie bei den MDM durch IFN $\gamma$  induziert. Zytokine, wie beispielsweise das TNF $\alpha$ , haben einen synergistischen Effekt auf das IFN $\gamma$ , besitzen alleine jedoch keine antiparasitäre Wirkung. Andere Zytokine, wie IL-4 oder IL-10, wirken inhibierend auf das IFN $\gamma$ . Die IDO-Aktivität wird durch IFN $\gamma$  induziert. Dadurch wurde ein vermehrter L-Tryptophanabbau mit konsekutiver Toxoplasmostase erzielt. Durch Resupplementierung von L-Tryptophan kam es allerdings nicht wieder zu einer Aufhebung der Toxoplasmostase in CBMDM. Dadurch kann die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als Hauptmechanismus gegen *Toxoplasma gondii* ausgeschlossen werden. Das Analogon 6-CDLT führte zu einer Inhibition der IDO, eine Aufhebung der Toxoplasmostase blieb jedoch aus. Dies ist ein weiterer Hinweis, dass die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität nicht allein als antitoxoplasmatischer

Effektormechanismus fungieren kann. Da das 6-CDLT auch das Entstehen der QUIN verhindert, wird dadurch auch die Hypothese, dass toxische Metabolite des L-Tryptophans für die Toxoplasmostase verantwortlich sind, in Frage gestellt. Denn diese toxischen Metabolite entstehen bei dem Abbau des 6-CDLT nicht, trotzdem war eine Aufhebung der Toxoplasmostase nicht möglich. Da die IDO-Hemmung nicht vollständig war, ist es jedoch möglich, dass Metabolite in geringeren Konzentrationen produziert werden, die eine inhibitorische Rolle spielen. Falls die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität eine Rolle bei der Toxoplasmostase in CBMDM spielt, so scheint dieser Mechanismus im Kynureninstoffwechsel zu liegen und zwar zwischen L-Kynurenin und QUIN, da in diesen Stoffwechselfvorgängen das 6-CDLT nicht einzugreifen vermag. Wie die IFN $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität dann als antiparasitärer Effektormechanismus wirken könnte, ist nicht klar, da die IDO selbst durch den kompetitiven Inhibitor 6-CDLT ausgeschaltet wird. Eine andere Hypothese wäre, dass eine Proliferationshemmung von *Toxoplasma gondii* in CBMDM unabhängig von dem Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan abläuft. Welche Mechanismen hierfür in Frage kommen, ist bisher ungeklärt und bedarf weiterer intensiver Forschungen.

## 5. Zusammenfassung

*Toxoplasma gondii* ist ein ubiquitär verbreitetes Protozoon. Eine Infektion kann verheerende Auswirkungen haben, insbesondere bei einer Infektion während der Schwangerschaft und bei Immunsuppression. Als ein wichtiger antiparasitärer Effektormechanismus ist die Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) bekannt. Dieses Enzym katalysiert die Degradation der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan, der dadurch vermehrter L-Tryptophanabbau wird für die Toxoplasmostase verantwortlich gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde die IDO als antiparasitärer Effektor-mechanismus in humanen Nabelschnurmakrophagen (CBMDM) unter dem Einfluß von verschiedenen Zytokinen untersucht. Die Stimulation von CBMDM durch Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) induzierte das Enzym IDO, dies führte zu einer Toxoplasmostase. Bei simultaner Stimulation mit dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) zeigte sich ein synergistischer Effekt auf die IDO und ebenfalls auf die Toxoplasmostase. Des weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die IDO-Aktivität durch die Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10) inhibiert wird. Dabei beeinflusste IL-4 die IFN $\gamma$ -induzierte Toxoplasmostase in Form einer Aufhebung, hingegen war ein Effekt auf diesen antiparasitären Mechanismus für IL-10 nur geringfügig vorhanden. Somit unterliegt die IDO als antiparasitärer Effektormechanismus in CBMDM einer Immunregulation. Ebenfalls bewirkte eine Inhibition der IFN $\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität mittels 6-chloro-D-L-Tryptophan (6-CDLT), welches als kompetitiver Inhibitor des L-Tryptophans fungiert, keine Aufhebung der Toxoplasmostase. Die Vermutung, dass toxische Metabolite des L-Tryptophans für den antiparasitären Effekt verantwortlich sind, erscheint unwahrscheinlich, weil 6-CDLT eine Verstoffwechslung des L-Tryptophans und somit auch die Entstehung toxischer Metabolite verhindert. Insgesamt scheint die IDO-Aktivität einer komplexen Immunregulation zu unterliegen und nicht der einzige antiparasitäre Mechanismus in CBMDM zu sein. Aus diesem Grund müssen weitere antiparasitäre Effektormechanismen in Erwägung gezogen werden. Welche weiteren Mechanismen in Frage kommen und inwieweit diese Ergebnisse auf die *in vivo*-Situation übertragbar sind, lässt sich abschließend nicht klären.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrom
Bq	Becquerel
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CSIF	Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor
cpm	Counts per minute
DNA(S)	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
FCS	Fetales Kälberserum
g	Fallbeschleunigung
G	Granulozyten
GM	Granulozyten-Makrophagen
GBS	Streptokokken der Gruppe B
GvHD	Graft-versus-host Reaktion
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIV	Human immunodeficiency virus
IDO	Indolamin 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modifiziertes Dulbecco's Medium
iNOS	Induzierbare Stickoxid-Synthase
IRF	Interferon-Regulationsfaktor
JAK	Janus family of cytoplasmic tyrosine kinases
LPS	Lipopolysaccharid
L-Tryp	L-Tryptophan
MDM	Monocyte derived macrophages
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAD(PH)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NfκB	Nuclear factor κB
N(G)MMA	N(G)-monomethyl-L-Arginin
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RES	Retikulohistiozytäres System
QUIN	Quinolinsäure
RNA(S)	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SD	Standardabweichung
TGF	Tumor-growth-factor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
trypB-Gen	Tryptophansynthesegen
U	Units
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7. Literaturverzeichnis

Alexander, K.; Daniel, W. G.; Diener, H.-C.; Freund, M.; Köhler, H.; Matern, S.; Maurer, H. H.; Michel, B. A.; Nowak, D.; Risler, T.; Schaffner, A.; Scherbaum, W. A.; Sybrecht, G. W.; Wolfram, G.; Zeitz, M.; 1999: Thiemes Innere Medizin. (1. Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).

Anderson, S.E.; Remington, J.S.; 1974: Effect of normal and activated macrophages on *Toxoplasma gondii*. J. Exp. Med. 139:1154.

Anderson, S.E.; Bautista, S.; Remington, J.S.; 1976: Induction of resistance to *Toxoplasma gondii* in human macrophages by soluble lymphocytes products. J. Immunol. 117:381.

Barker, J. N.; Wagner, J. E.; 2002: Umbilical cord blood transplantation: current state of the art. Curr. Opin. Oncol. 14(2):160.

Bertholet, S.; Tzeng, E.; Felley-Bosco, E.; Muel, J.; 1999: Expression of the inducible NO-synthase in human monocytic U937 cells allow high output nitric oxide production. J. Leukocyte Biology 65:50.

Bogdan, C.; Vodovotz, Y.; Nathan, C.; 1991: Macrophage deactivation by Interleukin 10. J. Exp. Med. 174:1549.

Bogdan, C.; Paik, J.; Vodovotz, Y.; Nathan, C.; 1992: Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by Transforming Growth Factor- $\beta$  and Interleukin-10. J. Biol. Chem. 267(32):23301.

Bogdan, C. and Nathan, C.; 1993: Modulation of macrophages function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. Ann. NY. Acad. Sci. 685:713.

Brown, C. Y.; Lagnado, C. A.; Vadrás, M. A.; Goodall, G. J.; 1996: Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10. J. Biol. Chem. 271(33):20108.

Carlin, J. M.; Borden, E.C.; Sondel, P. M.; Byrne, G. I.; 1987: Biological response modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. J. Immunol. 139(7):2414.

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

Carlin, J. M.; Borden, E.C.; Byrne, G.I.; 1989(b): Interferon induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. J. Interferon Res. 9:329.

- Carlin, J. M., Weller, J.B.; 1995: Potentiation of interferon-mediated inhibition of chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect. Immun.* 63:1870.
- Catteral, J. R.; Black, C. M.; Levnthal, J. P.; Rizk, N. W.; Wachtel, J. S.; Remington, J. S.; 1987: Nonoxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* 55(7):1635.
- Cenci, E.; Romani, L.; Menacci, A.; Spaccapelo, R.; Schiaffella, E.; Puccetti, P.; Bistoni, F.; 1993: Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur. J. Immunol.* 23:1034.
- Chaves, A. C. L.; Ceravolo, I. P.; Gomes, J. A. S.; Zani, C. L.; Romnaha, A. J.; Gazzinelli, R. T.; 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- $\gamma$ . *Eur. J. Immunol.* 31:333.
- Cheung, D. L.; Hart, P. H.; Vitti, G. F.; Whitty, G. A.; Hamilton, J. A.; 1990: Contrasting effects of interferon-gamma and interleukin-4 on the interleukin-6 activity of stimulated human monocytes. *Immunol.* 71:70.
- Chomarat, P.; Rissoan, M.-C.; Bancherau, J.; Miossec, P.; 1993: Interferon  $\gamma$  inhibits interleukin 10 production by monocytes. *J. Exp. Med.* 177:523.
- Cohen, S. B.; Wang, X. N.; Dickison, A.; 2000: Can cord blood support the cytokine storm in GvHd? *Cytokine Growth Factor Rev.* 11(3):185.
- Colotta, F.; Re, F.; Muzio, M.; Bertini, R.; Polentarutti, N.; Sironi, M.; Giri, J.; Dower, S. K.; Sims, J. E.; Mantovani, A.; 1993: Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261:472.
- Colotta, F.; Saccani, S.; Giri, J.; Dower, S.; Sims, J.; Introna, M.; Mantovani, A.; 1996: Regulated expression and release of the IL-1 decoy receptor in human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.* 156:2534.
- Corradin, S. B.; Fasel, N.; Buchmüller-Rouiller, Y.; Ransijn, A.; Smith, J.; Muel, J.; 1993: Induction of macrophage nitric oxide production by interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  is enhanced by interleukin-10. *Eur. J. Immunol.* 23:2045.
- Cox, G. W.; Chattopadhyay, U.; Oppenheim, J. J.; Varesio, L.; 1991: IL-4 inhibits the costimulatory activity of IL-2 or picolinic acid but not of lipopolysaccharide on IFN $\gamma$ -treated macrophages. *J. Immunol.* 147:3809.
- Cunha, F. Q.; Moncada, S.; Liew, F. Y.; 1992: Interleukin-10 (IL-10) inhibits the Induction of Nitric Oxide Synthase by Interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 182(3):1155.
- Däubener, W.; Pilz, K.; Seghrouchni, S.; Bilzer, T.; Fischer, H.-G.; Hadding, U.; 1993: Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by IFN $\gamma$ . *J. Neuroimmunol.* 43:31.

Däubener, W.; Wangat, N.; Pilz, K.; Seghrouchni-Zennati, S.; Fischer, H.-G.; Hadding, U.; 1994: A new, simple bioassay for human IFN $\gamma$ . J. Immunol. Meth. 168:39.

Däubener, W.; Remscheid, C.; Nockenmann, S.; Pilz, K.; Seghrouchni, S.; MacKenzie, C.; Hadding, U.; 1996: Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Eur. J. Immunol. 26:487.

Däubener, W. und Hadding, U.; 1997: Cellular immune reactions directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the central nervous system. Med. Microbiol. Immunol. 185:195.

Däubener, W.; Posdziech, V.; Hadding, U.; MacKenzie, C. R.; 1999(a): Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. Med. Microbiol. Immunol. 187:143.

Däubener, W. and MacKenzie, C.; 1999(b): IFN $\gamma$  activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and a antibacterial effector mechanism. Tryptophan, Serotonin and Melatonin: Basic Aspects and Applications. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY.

Däubener, W.; Spors, B.; Hucke, C.; Adam, R.; Stins, M.; Kim K. S.; Schroten, H.; 2001: Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase. Infect Immun. 69(10):6527.

de Titto, E. H.; Catteral, J. R.; Remington, J. S.; 1986: Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 137:1342.

de Vries, J. E.; 1995: Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of Interleukin 10. Ann. Med. 27:537.

de Waal Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G.; de Vries, J. E.; 1991: Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J. Exp. Med. 174(5):1209.

de Waal Malefyt, R.; Figdor, C. G.; Huijbens, R.; Mohan-Peterson, S.; Bennett, B.; Culpepper, J.; Dang, W.; Zurawski, G.; de Vries, J. E.; 1993: Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation By IFN-gamma or IL-10. J. Immunol. 151(1):6370.

Dickensheets, H. L. and Donnelly, R. D.; 1997: IFN- $\gamma$  and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes. J. Immunol. 159:6226.

Ding, A.H.; Nathan, C.F.; Stuehr, D.J.; 1988: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J. Immunol. 141:2407.

- Dönges, J.; 1988: Parasitologie. (2. Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
- Donnelly, R. P.; Fenton, M. J.; Finbloom, D.S.; Gerrard, T. L.; 1990: Differential regulation of IL-1 production in human monocytes by IFN- $\gamma$  and IL-4. *J. Immunol.* 145:569.
- Du, M. X.; Sotera-Esteva, W. D.; Taylor, M. W.; 2000: Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma. *J. Interferon Cytokine Res.* 20(2):133.
- Eckert, J.; 1998: Protozoologie, *Toxoplasma gondii*. Medizinische Mikrobiologie. (8. Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
- Esparza, I.; Männel, D.; Ruppel, A.; Falk, W.; Krammer, P. H.; 1987: Interferon  $\gamma$  and lymphotoxin or tumor necrosis factor act synergistically to induce macrophage killing of tumor cells and schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 166:589.
- Feng, W.; Taylor, M.W.; 1989: Interferon- $\gamma$  resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7144.
- Finkelmann, F. D.; Pearce, E. J.; Urban, J. F.; Sher, A.; 1991: Regulation and biological function of helminth induced cytokine responses. *Immunol. Parasitol. Today.* 12:A62.
- Fiorentino, D. F.; Bond, M. W.; Mosmann, T. R.; 1989: Two types of mouse helper T cell. IV. TH2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by TH1 clones. *J. Exp. Med.* 170:2081.
- Fuhrmann, S. A.; Joiner, K. A.; 1989: *Toxoplasma gondii*: Mechanism of resistance to complement – mediated killing. *J. Immunol.* 142(3):940.
- Fujigaki, S.; Saito, K.; Takemura, M.; Maekawa, N.; Yamada, Y.; Wada, H., Seishima, M.; 2002: L-Tryptophan-L-Kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma Interferon-Gene-Deficient Mice: Cross-Regulation between Inducible Nitric Oxide Synthase and Indoleamine-2,3-Dioxygenase. *Inf. Immun.* 70(2):779.
- Gazinelli, R.T.; Oswald, I. P.; James, S. L.; Sher, A.; 1992: IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. *J. Immunol.* 148(6):1792.
- Gazinelli, R. T.; Wysocka, M., Hieny, S.; Scharon-Kersten, T.; Cheever, A.; Kühn, R.; Müller, W.; Trinchieri, G.; Sher, A.; 1996: In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to lethal immune response dependent on CD<sup>4+</sup>-T-cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ . *J. Immunol.* 157:798.

Gomez-Jimenez, J.; Martin, M. C.; Sauri, R.; Segura, R. M.; Esteban, F.; Ruiz, J. C.; Nuvials, X.; Boveda, J. L.; Peracaula, R.; Salgado, A.; 1995: Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J. Infect. Dis.* 171:472.

Goodrum, K. J.; Dierksheide, J.; Yoder, B.J.; 1995: Tumor necrosis factor alpha acts as an autocrine second signal with gamma interferon to induce nitric oxide in group-B streptococcus-treated macrophages. *Infect. Immun.* 63(9):3715.

Grant, R.; Kapoor, V.; 2003: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN- $\gamma$  stimulated astrogloma cells decreases intracellular NAD levels. *Biochem. Pharmacol.* 66:1033.

Hahn, H.; Falke, D.; Kaufmann, S. H. E.; Ullmann, U.; 2004: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* (5. Auflage) / (Springer-Verlag, Berlin).

Halonen, S. K. and Weiss, L. M.; 2000: Investigation into the mechanism of gamma Interferon-mediated inhibition of *Toxoplasma gondii* in murine astrocytes. *Infect. Immun.* 68(6):3426.

Hart, P. H.; Vitti, G. F.; Burgess, D. R.; Whitty, G. A.; Piccoli, D. S.; Hamilton, J. A.; 1989: Potential antiinflammatory effects of interleukin 4: supression of human monocyte tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 1 and prostaglandin  $E_2$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:3803.

Heinzel, F. P.; Sadick, M. D.; Mutha, S. S.; Locksley, R.S.; 1991: Production of interferon- $\gamma$ , interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes *in vivo* during healing and progressive leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7011.

Heizmann, W. R.; Döllner, G.; 1999: *Medizinische Mikrobiologie.* (2. Auflage) / (Schattauer-Verlag)

Herold, G.; 2001: *Innere Medizin.* Köln.

Heyes, M. P.; Chen, C. Y.; Major, E. O.; Saito, K.; 1997: Different kynurenine pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *J. Biol.* 326:351.

Hissong, B. D.; Byrne, G. I.; Pallida, M. L.; Carlin, J. M.; 1994: Upregulation of Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide and interleukin-1. *Cell. Immun.* 160:264.

Ho, A. S. Y.; Liu, Y.; Khan, T. A.; Hsu, D-H.; Bazan, J. F; Moore, K. W.; 1993: A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11267.

Hof, H.; Müller, R. L.; Dörries, R.; 2000: *Duale Reihe Mikrobiologie.* (1. Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).

- Hou, J.; Schindler, U.; Henzel, W. J.; Ho, T. C.; Brasseur, M.; McKnight, S. L.; 1994: An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. Science 265(5179):1701.
- Hughes, H. P. A.; Speer, C. A.; Kyle, J. E.; Dubey, J. P.; 1987: Activation of murine macrophages and a bovine cell line by bovine lymphokines to kill the intracellular pathogens *Eimeria bovis* and *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 55(3):784.
- Ito, S.; Ansari, P.; Sakatsume, M.; Dickensheets, H.; Vazquez, N.; Donnelly, R. P.; Lerner, A. C.; Finbloom, D. S.; 1999: Interleukin-10 inhibits expression of both Interferon  $\alpha$ - and Interferon  $\gamma$ -induced genes by suppressing Tyrosine Phosphorylation of STAT1. Blood 93(5):1456.
- Kayser, F. H.; Bienz, K. A.; Eckert, J.; Zinkernagel, R. M.; 1998: Medizinische Mikrobiologie (9. Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
- Keller, R.; 1994: Immunologie und Immunpathologie (4.Auflage) / (Thieme Verlag, Stuttgart).
- Khan, I. A.; Smith, K. A.; Kasper, L. H.; 1990: Induction of antigen-specific human cytotoxic T-cells by *Toxoplasma gondii*. J. Clin. Invest. 85:1879.
- Khan, I. A.; Matsuura, T.; Kasper, L. H.; 1995: IL-10 mediates immunosuppression following primary infection with *Toxoplasma gondii* in mice. Paras. Immun. 17:185.
- Kim, J. M.; Brannan, C. I.; Copeland, N. G.; Jenkins, M. A.; Khan, T. A.; Moore, K. W.; 1992: Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal location of the mouse and human genes. J. Immunol. 148:3618.
- Kirchner, H.; Kruse, A.; Neustock, P.; Rink, L. 1994: Cytokine und Interferone. (1. korrigierter Nachdruck) / (Spektrum Akademischer Verlag).
- Klein, J.; 1991: Immunologie. (1. Auflage) / (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim).
- Köhler, W., Eggers, H. J.; Fleischer, B.; Marre, R.; Pfister, H.; Pulverer, G.; 2001: Medizinische Mikrobiologie. (8. Auflage) / (Urban & Fischer Verlag, München).
- Kreutzig, T.; 1993: Biochemie. (7. Auflage) / (Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm).
- Lewis, I. D.; 2002: Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. Internal Medicine Journal 32(12):601.
- Liew, F. Y.; Cox, F. E. G.; 1991: Nonspecific defence mechanism: Role of nitric oxide. Immunol. Parasitol. Today 3:17.
- Lindberg, R. E.; Frenkel, J. K.; 1977: Toxoplasmosis in nude mice. J. Parasitol. 63(2):219.

Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S. L.; Matsudaira, P.; Darnell, J.; 1996: Molekulare Zellbiologie. (2. Auflage) / (W. de Gruyter-Verlag, Berlin).

MacKenzie, C. R.; Willberg, C. B.; Däubener, W.; 1998(a): Inhibition of group B streptococcal growth by IFN  $\gamma$ -activated human glioblastoma cells. J. Neuroimmun. 89:191.

MacKenzie, C. R.; Hadding, U.; Däubener, W.; 1998(b): Interferon- $\gamma$ -induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. J. Infect. Dis. 178:875.

MacKenzie, C. R.; Gonzalez, R. G.; Kniep, E.; Roch, S.; Däubener, W.; 1999(a): Cytokine Mediated Regulation of Interferon-gamma-induced IDO Activation. Adv. Exp. Med. Biol. 467:533.

MacKenzie, C. R.; Langen, R.; Takikawa, O.; Däubener, W.; 1999(b): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon- $\gamma$ -induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmosis. Eur. J. Immunol. 29:3254.

Marchant, A.; Bruyns, C.; Vandenabeele, P.; Ducarme, M.; Gerard, C.; Delvaux, A.; De Groote, D.; Abramowicz, D.; Velu, T.; Goldman, M.; 1994: Interleukin-10 controls interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. Eur. J. Immunol. 24:1167.

Martin, A.; Heyes, M. P.; Salazar, A. M.; Kampen, D.; Williams, J.; 1992: Progressive slowing of reaction time and increasing cerebrospinal fluid concentrations of quinolinic acid in HIV-infected individuals. J. Neuropsychol. Clin. Neurosci. 4:270.

McLeod, R. and Remington, J. S.; 1979: A method to evaluate the capacity of monocytes and macrophages to inhibit multiplication of an intracellular pathogen. J. Immunol. Methods 27:19.

McLeod, R.; Estes, R.; Mack, D. G.; McLeod, E. G.; 1983: Effects of human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes on *T. gondii*. J. Infect. Dis. 147:957.

Mehlhorn, H.; Piekarski, G.; 2002: Grundriss der Parasitenkunde. (6. Auflage) / (G. Fischer Verlag, Stuttgart).

Melillo, G.; Cox, G. W.; Radzioch, D.; Varesio, L.; 1993: Picolinic acid, a catabolite of L-Tryptophan, is a costimulus for the induction of reactive nitrogen intermediate production in murine macrophages. J. Immunol. 150(9):4031.

Moore, K.; O'Garra, A.; de Waal Malefyt, R.; Vieira, P.; Mosmann, T.; 1993: Interleukin-10. Ann. Rev. Immunol. 11:165.

Munn, D. H.; Zhou, M.; Attwood, J. T.; Bondarev, I.; Conway, S. J.; Marshall, B.; Brown, C.; Mellor, A. L.; 1998: Prevention of allogeneic lethal rejection by tryptophan catabolism. Science 281:1191.

- Murray, H. W.; Rubin, B. Y.; Carriero, S. M.; Harris, A.M.; Jaffe, E. A.; 1985(a): Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanism: Oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. J. Immunol. 134(3):1982.
- Murray, H. W.; Spitalny, G. L.; Nathan, C. F.; 1985(b): Activation of mouse peritoneal macrophages in vitro and vivo by interferon- $\gamma$ . J. Immunol. 134(3):1619.
- Murray, H. W.; Szuro-Sudol, A.; Wellner, D.; Oca, M. J.; Granger, A. M.; Libby, D. M.; Rothermel, C. D.; Rubin, B. Y.; 1989: Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. Infect. Immun. 57(3):845.
- Musso, T.; Gusella, L. G.; Brooks, A.; Longo, D. L.; Varesio, L.; 1994: Interleukin-4 inhibits Indoleamine 2,3-dioxygenase Expression in human monocytes. Blood 83(5):1408.
- Nathan, C. F.; Murray, H. W.; Wiebe, M. E.; Rubin, B. Y.; 1983: Identification of Interferon- $\gamma$  as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and microbial activity. J. Exp. Med. 158:670.
- Neyer, L. E.; Grünig, G.; Fort, M.; Remington, J. S.; Rennick, D.; Hunter, C. A.; 1997: Role of Interleukin-10 in regulation of T-Cell-Dependent and T-Cell-Independent mechanisms of resistance to *Toxoplasma gondii*. Infect. Immun. 65(5):1675.
- Ohmori, Y. und Hamilton, T. A.; 1997: IL-4-induced STAT6 suppress IFN- $\gamma$  stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. J. Immunol. 159:5474.
- Opal, S.; Cross, A.; 1997: The microbial consequences of antimediator therapy for sepsis. Sepsis 1:55.
- Opal, S. M.; Wherry, J. C.; Grint, P.; 1998: Interleukin-10: potential benefits and possible risks in clinical infectious diseases. Clin. Inf. Dis. 27(6):1497.
- Oswald, I. P.; Gazzinelli, R. T.; Sher, A.; James, S. L.; 1992: IL-10 synergizes with IL-4 and Transforming Growth Factor- $\beta$  to inhibit macrophage cytotoxic activity. J. Immunol. 148(11):3578.
- Paludan, S. R.; Ellermann-Eriksen, S.; Lovmand, J., Mogensen, S. C.; 1999: Interleukin-4-mediated inhibition of nitric oxide production in interferon-gamma-treated and virus-infected macrophages. Scand J. Immunol 49(2):169.
- Pajkrt, D.; Camoglio, L.; Tiel-van Buul, M. C. M.; de Bruin, K.; Cutler, D. L.; Affrime, M. B.; van der Poll, T.; ten Cate, J. W., van Deventer, S. J. H.; 1997: Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia: effect of timing of recombinant human IL-10 administration. J. Immunol. 158:3971.

Paris, M.; Hickey, S.; Trujillo, M.; Ahmed, A.; Olsen, K.; McCracken, G. jr.; 1997: The effect of interleukin-10 on meningeal inflammation in experimental bacterial meningitis. *J. Infect. Dis.* 176:1239.

Pfefferkorn, E. R.; Pfefferkorn, L. C.; 1977: Specific labeling of intracellular *Toxoplasma gondii* with uracil. *J. Protozool.* 24(3):449.

Pfefferkorn, E. R. 1984: Interferon  $\gamma$  blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:908.

Roberts, C. W.; Ferguson, D. J. P.; Jebbari, H.; Satoskar, A.; Bluethmann, H.; Alexander, J.; 1996: Different Roles for Interleukin-4 during the Course of *Toxoplasma gondii* Infection. *Infect. Immun.* 64(3):897.

Saito, K.; Chen, C. Y.; Masana, M.; Crowley, J. S.; Markey, S. P.; Heyes, M. P.; 1993: 4-Chloro-3-hydroxyanthranilate, 6-chlorotryptophan and norharmane attenuate quinolinic acid formation by interferon- $\gamma$ -stimulated monocytes (THP-1 cells). *J. Biochem.* 291:11.

Schindler, C.; Kashleva, H.; Pernis, A.; Pine, R.; Rothmann, P.; 1994: STF-IL-4: a novel IL-4-induced signal factor. *The Embo Journal* 13(6):1350.

Schindler, C. and Darnell, J. E. jr.; 1995: Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 64:621.

Schreiber, R. D.; Feldmann, H. A.; 1980: Identification of the activator system for antibody to *Toxoplasma* as the classical complement pathway. *J. Infect. Dis.* 141(3):366.

Sibley, L. D.; Adams, L. B.; Fukumoti, Y.; Krahenbuhl, J. L.; 1991: Tumor necrosis factor- $\alpha$  triggers anti-toxoplasmal activity of IFN- $\gamma$  primed macrophages. *J. Immunol.* 147:2340.

Smith, S. R.; Terminelli, C.; Denhardt, G.; Narula, S.; Thorbecke, G. J.; 1996: Administration of Interleukin-10 at the time of priming protects *Corynebacterium parvum* – primed mice against LPS – and TNF- $\alpha$ -induced lethality. *Cell. Immunol.* 173(2):207.

Stadtsbaeder, S.; Nguyen, B. T.; Calvin-Preval, M. C.; 1975: Respective role of antibodies and immune macrophages during acquired immunity against toxoplasmosis in mice. *Ann. Inst. Past./Immunol.* 126:461.

Stone, T. W., 1993: Neuropharmacology of quinolonic and kynurenic acids. *Pharmacol. Rev.* 45(3):309.

Stuart, P. M.; Zlotnik, A.; Woodward, J. G.; 1988: Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B Cell Stimulatory Factor 1). *J. Immunol* 143:3020.

Sugarman, B.J.; Aggarwal, B.B.; Hess, P.E.; Figari, I.S., Palladino, M. A.; Shepherd, H.M.; 1985: recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 230:943.

Suzuki, Y.; Orellana, M. A.; Schreiber, R. D.; Remington, J. S.; 1988: Interferon- $\gamma$ : The major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240:516.

te Velde, A. A.; Huijbens, R. J. F.; Heije, K.; de Vries, J. E.; Figdor, C. G.; 1990: Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 $\beta$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$  and IL-6 by human monocytes. *Blood* 76 (7):1392.

te Velde, A. A.; de Waal Malefijt, R.; Huijbens, R. J. F.; de Vries, J. E.; Figdor, C. G.; 1992: IL-10 stimulates monocyte Fc $\gamma$ R surface expression and cytotoxic activity. Distinct Regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-10. *J. Immunol.* 149(12):4048.

Thomas, S. M.; Mohr, D.; Stocker, R.; 1994: Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in Interferon- $\gamma$  primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 269(20):14457.

Türck, E.-M.; 2003: Zytokin-vermittelte Regulation der Interferon-gamma-induziertenIDO-Aktivität als antiparasitärer Effektormechanismus. Medizinische Dissertation, Institut für med. Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Van der Poll, T.; de Waal Malefijt, R.; Coyle, S.; Lowry, S.; 1997: Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxaemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10 and IL-13. *J. Infect. Dis.* 175:118.

Voet, D.; Voet, J. G.; 1992: Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Wang, P.; Wu, P.; Siegel, M. I.; Egan, R. W.; Billah, M. M.; 1995: Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* 270:9558.

Weinberg, J. B.; Misukonis, M. A.; Shami, P. J.; Mason, S. N.; Sauls, D. L.; Dittmann, W. A.; Wood, E. R.; Smith, G. K.; McDonald, B.; Bacus, K. E.; Haney, A. F.; Granger, D. L.; 1995: Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase: analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin, and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86(3):1184.

Werner-Feldmeyer, G.; Werner, E. R.; Fuchs, D.; Hausen, A.; Reibnegger, G.; Wachter, H.; 1989: Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1012:140.

Wieser, M.; Bonifer, R.; Oster, W.; Lindemann, A.; Mertelsmann, R.; Herrmann, F.; 1989: Interleukin-4 induces secretion of CSF for granulocytes and CSF for macrophages by peripheral blood monocytes. *Blood* 73(5):1105.

Williams, P. A.; Bohnsack, J. F.; Augustine, N. H.; Drummond, C. E.; Rubens and Hill; 1993: Production of tumor necrosis factor by human cells in vitro and in vivo induced by group B streptococci. *J. Pediatr.* 123:292.

Woodmann, J. P.; Dimier, I. H.; Bout, D. T.; 1991: Human endothelial cells are activated by IFN- $\gamma$  to inhibit *Toxoplasma gondii* replication. *J. Immunol.* 147:2019.

Yamamura, M.; Uyemura, K.; Deans, R. J.; Weinberg, K.; Rea, T. H.; Bloom, B. R.; Modlin, R. L.; 1991: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 255:277.

Zdanov, A.; Schalk-Hihi, C.; Wlodawer, A.; 1996: Crystal structure of human interleukin-10 at 1.6Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor. *Protein Sci.* 5 (10):1955.

# **Interferon- $\gamma$ -induzierte IDO-Aktivität als antiparasitärer Effektor- mechanismus in Nabelschnurblutmakrophagen und ihre Zytokin-vermittelte Regulation**

vorgelegt von Simone Andrea Roch

2007

Durch Stimulation von humanen Nabelschnurblutmakrophagen (CBMDM) mit Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) wird das Enzym Indolamin 2,3-dioxygenase (IDO) induziert. Dieses Enzym katalysiert die Degradation der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan. In der Literatur ist bekannt, dass durch den IDO-vermittelten Tryptophanabbau das Wachstum einiger intrazellulärer Parasiten, wie z.B. *Toxoplasma gondii* in humanen Glioblastomzellen oder in Fibroblasten inhibiert wird.

Unsere Ergebnisse konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen dem IFN $\gamma$ -vermittelten Tryptophanabbau und dem Auftreten eines antitoxoplasmatischen Effektes in humanen CBMDM beweisen. In Resupplementationsversuchen wurde keine Aufhebung des antitoxoplasmatischen Tryptophanmangels erreicht, so dass davon ausgegangen werden muss, dass es sich bei dem IFN $\gamma$ -induzierten Tryptophanmangel nicht um den einzigen antitoxoplasmatischen Mechanismus humaner CBMDM handelt. Neben der Entstehung toxischer Metabolite ist die IFN $\gamma$ -vermittelte Induktion weiterer, eventuell parallel ablaufender Immunreaktionen zu diskutieren.

Die IDO als antiparasitärer Effektormechanismus unterliegt einer Immunregulation. Unsere Arbeit zeigt, dass sie in humanen CBMDM durch IFN $\gamma$  induziert und durch simultane Stimulation mit dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) verstärkt wird. Darüber hinaus besteht eine Inhibition dieses antiparasitären Effektormechanismus durch die Zytokine Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin 10 (IL-10). Bei beiden Zytokinen ist ein antagonistischer Effekt zu IFN $\gamma$  bekannt. Die simultane Verstärkung des IFN $\gamma$  durch TNF $\alpha$  wird ebenfalls aufgehoben. Eine Aufhebung der Toxoplasmostase konnte für IL-4 nachgewiesen werden, für IL-10 zeigte sich dagegen nur eine geringe Inhibition der Toxoplasmostase. Die Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors des L-Tryptophans, das Analogon 6-Chloro-D-L-Tryptophan (6-CDLT), führte zu einer signifikanten IDO-Inhibition, eine Aufhebung der Toxoplasmostase konnte hier allerdings nicht nachgewiesen werden. Dadurch muss auch die Hypothese, dass toxische Metabolite des L-Tryptophans für die Toxoplasmostase verantwortlich sind, in Frage gestellt werden.

Simone Andrea Roch

PD Dr. med. Colin MacKenzie

## 8. Lebenslauf

<b>Persönliche Daten:</b>	Simone Andrea Roch geb. am 05.06.1972 in Düsseldorf Familienstand ledig
<b>Wohnort:</b>	Fleherstr. 113 40223 Düsseldorf
<b>Schulausbildung:</b> 1982-1992	Carl-Humann Gymnasium Essen Abschluss: Abitur
<b>Studium:</b> 04/1993-05/2001	Humanmedizin, Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf
08/1995	Ärztliche Vorprüfung
03/1997	1. Staatsexamen
03/2000	2. Staatsexamen
05/2001	3. Staatsexamen
<b>Famulaturen:</b>	
03/1996	Neurochirurgie, Hofrat Primarius Prof. Dr. med. Diemath, LNK Salzburg, Österreich
08/1997	Plastische Chirurgie, Prof. Dr. med. Olbrisch, Diakonie Kaiserswerth, Düsseldorf
02/1998	Allgemeinchirurgie, Hottentots Hollands Hospital, Summerset West, Süd-Afrika
07/1998	Medizinische Mikrobiologie, Prof. Dr. med. Hadding, HHU Düsseldorf
09/1998	Psychiatrie, Prof. Dr. med. Gaebels, Rheinische Landeskliniken Düsseldorf
03/1999	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Prof. Dr. med. Kurzeja, EVK Düsseldorf
04/1999	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, Prof. Dr. Dr. med. Sailer, Universitätsspital Zürich, Schweiz
05/1999	Herzchirurgie, Prof. Dr. med. Turina, Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz

**Praktisches Jahr:**

04/2000-08/2000	Chirurgie, Prof. Dr. med. Krämling, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf
08/2000-12/2000	Innere Medizin, clinical Senior Lecturer Dr. Jayathissa, Masterton Hospital, Masterton, Neuseeland
12/2000-03/2001	Gynäkologie, PD Dr. Med. Meier, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf

**Berufstätigkeit:**

04/1991-05/1991	Praktikum als Chemielaborantin, Stadtwerke Essen AG
09/1992-10/1992	Pflegepraktikum, Orthopädie, Evangelischen Krankenhaus Essen
10/1992-11/1992	Pflegepraktikum, Allgemein Chirurgie, St. Josef Krankenhaus Essen
12/1992-04/1993	Sprechstundenhilfe, Gynäkologie, Praxis Dr. med. Pott, Essen
04/1993-03/1994	Studentische Nachtwache, MNR- Klinik, HHU Düsseldorf
04/1994-09/2001	Studentische Nachtwache Innere Medizin, Marienhospital Düsseldorf, 12/1995 Wechsel in die Ambulanz
10/2001-03/2003	Ärztin im Praktikum, Chirurgie, PD Dr. med. Krieg, Krankenhaus Maria-Hilf Krefeld
seit 04/2003	Assistenzärztin, Chirurgie, PD Dr. med. Krieg, Krankenhaus Maria-Hilf Krefeld
seit 07/2005	Notärztin für die Stadt Krefeld
28/02/2007	Facharztprüfung Allgemein Chirurgie vor der Ärztekammer Nordrhein

**Promotion:**

10/1996-01/2007	Institut für Medizinische und Krankenhaushygiene, H-H-U Düsseldorf, Thema: Immunologie, induzierbare antiparasitäre Effektormechanismen in Nabelschnurblutmakrophagen
-----------------	--

## Publikation:

Adv Exp Med Biol. 467:533;  
Cytokine Mediated Regulation of  
Interferon gamma induced IDO  
Activation

## **9. Danksagung**

Prof. Dr. U. Hadding danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, sowie für die Betreuung und Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. Colin MacKenzie für seine intensive Betreuung dieser Arbeit, seine stete Hilfsbereitschaft, zahlreiche wertvolle Ratschläge, Geduld und Unterstützung in jeglicher Weise.

Raquel Gonzalez danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in experimentellen und labortechnischen Fragen.

Recht herzlicher Dank geht auch an alle nicht gesondert aufgeführten Mitarbeiter des Instituts für Mikrobiologie und Krankenhaushygiene für die Kollegialität und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem danke ich meinen Eltern, die mich in jeglicher Form unterstützt haben und mir mein Studium ebenso wie diese Arbeit ermöglicht haben.

Bei meinen Freunden bedanke ich mich für die „offenen Ohren“ und die „seelische“ Unterstützung.