

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

**Endothelzellvermittelte antivirale Aktivität:
Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Daniel Rüßing

2007

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Walter Däubener

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

*Meiner Mutter,
Jutta Rüßing,
und meinem Großvater,
Richard Engel,
gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Herpes Simplex Virus als Pathogen	1
1.1.1. HSV Typ I: Klinische Bedeutung	1
1.1.2. HSV Typ II: Klinische Bedeutung	4
1.2. Humorale Komponente des Immunsystems	5
1.3. Zelluläre Komponente des Immunsystems	7
1.4. Bedeutung der Cytokine im Immunsystem	9
1.5. Durch Interferone induzierbare antivirale Wirkmechanismen	13
1.5.1. Proteinkinase R (PKR)	14
1.5.2. Oligoadenylate Synthetase (OAS) und RNase L	15
1.5.3. Adenosin Deaminase ADAR1	17
1.5.4. Mx Protein GTPase	18
1.5.5. Induzierbare NO Synthase (iNOS)	20
1.5.6. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)	21
1.6. Tryptophanabbau durch die Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO)	21
1.6.1. Wirkmechanismus	21
1.6.2. Antibakterielle Effekte	24
1.6.3. Antiparasitäre Effekte	25
1.6.4. Immunregulatorische Effekte	26
1.6.5. Antivirale Effekte	28
1.7. Ziel der Arbeit	29
2. Material und Methoden	31
2.1 Material	31
2.1.1 Laborgeräte	31
2.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel	32
2.1.3 Chemikalien	32
2.1.4 Molekularbiologische Kits	35
2.1.6 Antikörper	37
2.2 Methoden	38
2.2.1 Zellen	38
2.2.2 Viren	39
2.2.3 Kultivierung und Ernte der Zelllinien HBMEC, HeLa S3, RT4	39
2.2.4 Kultivierung und Ernte der Zelllinie HUVEC	40
2.2.5 Aliquotierung der Viren	41
2.2.6 IDO-Aktivitätsmessung	41
2.2.7 RNA-Präparation	43
2.2.8 RT-PCR	44
2.2.9 DNA-Gelelektrophorese	45
2.2.10 Proteinpräparation und Bestimmung der Konzentration	46
2.2.11 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	46
2.2.12 Western Blot	47
2.2.13 Ponceau S-Färbung	48
2.2.14 Immunologischer Nachweis der IDO	48
2.2.15 Real Time PCR	48
2.2.16 HSV Real Time PCR	49
2.2.17 IDO Real Time PCR	51
3. Ergebnisse	52
3.1 Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase durch Interferon- γ in HBMEC	52
3.2 Induktion antiviraler Effekte in HBMEC durch IFN γ	55

3.3 Regulation der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität durch TNF α	58
3.4 Regulation der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität durch IL-1 β	62
3.5 Überprüfung der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität in HUVEC	68
3.6 Antivirale Effekte gegen HSV-2	72
3.7 Induktion antiviraler Effekte gegen HSV-2 durch IFN γ in HeLa-Zellen	78
4. Diskussion	82
4.1. Rolle der HBMEC bei Infektionen des ZNS.....	82
4.2. Antivirale Effekte in HUVEC	85
4.3. Costimulation mit TNF α und IL-1 β	88
4.4. Antivirale Effekte gegen HSV Typ II	91
4.5. Mögliche Interaktionen zwischen Tryptophanabbau und Virusreplikation.....	93
4.6. Mögliche antivirale Effekte der IDO in vivo	95
4.7. Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis.....	98
Abkürzungen	112
Danksagung.....	114
Erklärung.....	116
Curriculum vitae.....	117

1. Einleitung

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro*-Modellen für virale Infektionen und der Analyse zellulärer Abwehrmechanismen. Hierbei liegt ein Schwerpunkt auf der antiviralen Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), welche durch Stimulation der verwendeten Zellkulturen mit verschiedenen Cytokinen induziert werden konnte. Die Aktivität der IDO wurde mit photometrischen, immunologischen und molekularbiologischen Methoden untersucht.

Die hierzu durchgeführten Untersuchungen konzentrieren sich besonders auf verschiedene Endothelzellen, um mehr über ihre wichtige Funktion bei der Abwehr viraler Infektionen zu erfahren.

Als viraler Erreger dienen die Herpes Simplex Viren Typ I und Typ II. Deshalb möchte ich zunächst damit beginnen, die Bedeutung dieser Pathogene in der Klinik darzustellen.

1.1. Das Herpes Simplex Virus als Pathogen

1.1.1. HSV Typ I: Klinische Bedeutung

Das Herpes Simplex Virus Typ I ist ein doppelsträngiges DNA-Virus (120-200 kbp) aus der Familie der Herpesviridae. Ebenso wie das Herpes Simplex Virus Typ II und das Varicella Zoster Virus gehört es der Subfamilie der Alphaherpesviridae an, die sich durch einen kurzen Replikationszyklus und eine Zerstörung der befallenen Zellen auszeichnet. HSV I ist weltweit verbreitet, der Mensch stellt jedoch das einzige bekannte Virusreservoir dar. Die Durchseuchungsrate der deutschen Bevölkerung mit HSV I variiert nach Alter und sozioökonomischem Status und wird mit 50 – 90% angegeben. Das Virusgenom des HSV

Typ I codiert für ca. 90 Proteine, die in „Sofort-“ (Regulationsfunktionen), „Früh-“ (DNA-Synthese) und „Spät“-Proteine (Strukturproteine) eingeteilt werden (Whitley, 2002).

Klinisch treten nach Infektionen mit HSV I besonders Infektionen im Kopf- und Gesichtsbereich auf. Eine Erstinfektion tritt zumeist im Säuglings- oder Kindesalter auf und kann oftmals auf ein Rezidiv der Eltern zurückgeführt werden. Eine Eintrittspforte stellen häufig Zellen in verletzter Mund- und Lippenschleimhaut dar. Die häufigste klinische Manifestationsform der HSV-I-Infektion ist der Herpes labialis. Hierbei handelt es sich um ein bläschenförmiges Exanthem der Lippenschleimhaut mit Ulzerationen und Krustenbildung. Häufig tritt bei der Erstmanifestation der Erkrankung auch eine Gingivostomatitis mit Pharyngitis auf. In den meisten Fällen kommt die Krankheit nach 2-3 Wochen zur „Heilung“, womit ein Verschwinden der klinischen Symptomatik gemeint ist. Im Verlauf der Ersterkrankung tritt das Virus nämlich in Nervenzellfortsätze im infizierten Gewebe ein. Durch retrograden Transport gelangt das Virus schließlich innerhalb der Nervenzellen zu den Zellkörpern, die sich im Gesichtsbereich im Ganglion trigeminale befinden. Hier begibt sich das Virus dann in einen Zustand der Latenz, das heißt das Genom liegt in zirkularisierter Form vor und das Virus benötigt nur wenige Proteine zur Aufrechterhaltung dieses Status. Besonders günstig für das Virus ist die Tatsache, daß der Transport des Virus von der Eintrittspforte zum Latenzort rein intrazellulär erfolgt, so daß es für das Immunsystem des Wirtskörpers wenig Chancen gibt, sich mit dem infektiösen Agens auseinanderzusetzen. Multiple endogene und exogene Reize wie Streß, hormonelle Veränderungen, UV-Licht und Immunsuppressiva sind in der Folge in der Lage, zu einem Rezidiv zu führen. Dies kann sowohl asymptomatisch verlaufen als auch mit erneuten klinischen Symptomen vergesellschaftet sein.

Im Laufe einer Erstmanifestation der Erkrankung und auch während eines Rezidivs können mehrere Komplikationen auftreten. Zu nennen ist hier zum ersten das Eczema herpaticum. Hierbei handelt es sich um eine Herpesinfektion in einer durch ein Ekzem vorgeschädigten

Haut. Der Verlauf dieser Erkrankung kann durch zusätzliche bakterielle Superinfektionen auch einen letalen Ausgang nehmen. Auch der Hornhautbefall durch das Herpesvirus stellt eine schwere Komplikation dar. Hier wird zwischen der oberflächlichen Keratitis dendritica und der tiefen Keratitis disciformis unterschieden.

Eine seltene, aber sehr gefürchtete Komplikation ist die Herpesenzephalitis. Diese kann sowohl bei einer Erstmanifestation als auch bei einem Rezidiv auftreten und ist meist in den Temporallappen lokalisiert. Die Letalität dieser Enzephalitis ist hoch und wird mit ca. 70% angegeben, falls die Erkrankung nicht therapiert wird. Auch nach Überstehen der Erkrankung muß mit dem Fortbestehen von neurologischen Dauerschäden gerechnet werden (Hof et al., 2002).

In der Therapie der Herpesinfektion werden zur Zeit regelmäßig Chemotherapeutika wie Acyclovir, Valaciclovir und Famciclovir eingesetzt. Diese Medikamente werden durch die virale Thymidinkinase aktiviert und schließlich von der viralen DNA-Polymerase als Guanosinanaloga eingebaut, was zu einem DNA-Kettenabbruch führt, wodurch schließlich die Virusreplikation gestoppt wird. Die Vorteile dieser Chemotherapie sind allgemein anerkannt, allerdings stehen auch einige wenige Autoren dieser Therapie skeptisch gegenüber (Whitley et al., 2001). Gründe hierfür sind zum einen die starken Nebenwirkungen der Medikamente, die sowohl nephrotoxisch als auch hepatotoxisch wirken. Außerdem kommt es unter Acyclovirtherapie in vivo zu einer deutlich herabgesetzten Bildung von Antikörpern, Cytokinen und Interferon γ (Hashido et al., 1997, Liu et al., 2001). Dadurch wird die Wirkung des Medikaments zwar nicht abgeschwächt, allerdings ist die körpereigene Abwehr für den Fall eines Rezidivs nach Absetzen der Acyclovirtherapie deutlich eingeschränkt. Aus diesem Grund wird die Acyclovirtherapie bei immunsupprimierten Patienten auch kontrovers diskutiert. Zudem hat die Acyclovirtherapie keinen Effekt auf latente Viren, so daß auch nach erfolgreicher Therapie jederzeit Rezidive möglich sind.

An der Entwicklung eines Impfstoffs gegen das Herpesvirus hat man bis jetzt vergeblich gearbeitet und auch die körpereigenen antiviralen Mechanismen sind bisher wenig verstanden. Mit dieser Arbeit möchte ich einen Beitrag zum weiteren Verständnis dieser körpereigenen Mechanismen leisten, denn aus dem besseren Verständnis deren Prinzipien können eventuell in Zukunft verbesserte Therapieschemata für die Behandlung der HSV-Infektion abgeleitet werden.

1.1.2. HSV Typ II: Klinische Bedeutung

Wie bereits oben erwähnt gehört auch das Herpes Simplex Virus Typ II zur Familie der Herpesviridae und zur Subfamilie der Alphaherpesviridae.

Die klinische Hauptmanifestation einer HSV-II-Infektion stellt der Herpes genitalis dar. Hierbei kommt es zu Bläschenbildung und Ulzerationen am Genital, eventuell vergesellschaftet mit einer Schwellung der inguinalen Lymphknoten. Haupteintrittspforte bei einer Primärinfektion ist mit 85% der Genitalbereich, in 15% der Fälle dient der orale Bereich als Eintrittspforte. Nach durchgemachter Erstinfektion kommt es auch bei einer HSV-II-Infektion zu einem retrograden axonalen Transport des Virus, bei der häufigsten genitalen Infektion in die Lumbosakralganglien. Rezidive können in Folge ebenso wie bei HSV-I-Infektionen auftreten, allerdings liegt die Rezidivhäufigkeit bei HSV-II-Infektionen mit 60% noch deutlich höher als bei HSV-I-Infektionen (10-20%). Aufgrund der Übertragung der Erkrankung beim Geschlechtsverkehr steigt die Durchseuchung der Bevölkerung erst nach der Pubertät deutlich an und liegt in Deutschland bei ca. 15%.

Eine wichtige Komplikation der HSV-II-Infektion stellt der Herpes neonatorum dar. Hierbei kommt es bei Vorliegen einer Primärinfektion der Mutter während der Geburt zu einer Infektion des Säuglings im Geburtskanal. In Folge kann eine generalisierte Herpesinfektion des Neonatus auftreten, die ohne sofortige Therapie letal verlaufen kann. Bei einem maternalen Rezidiv unter der Geburt wird das Neugeborene zwar durch übertragene maternale

Antikörper vor einer generalisierten Infektion geschützt, es kann jedoch zu einem Befall des zentralen Nervensystems durch das HSV-II-Virus kommen. Aus diesem Grund wird bei einem manifesten Herpes genitalis die Entbindung mittels Sectio caesarea empfohlen (Hof et al., 2002).

Die Therapie einer HSV-II-Infektion wird analog zur Therapie der Infektion mit HSV I mit Chemotherapeutika wie Acyclovir durchgeführt. Auch hier ist die Wirksamkeit vielfach belegt (Marques et al., 2000; Miller et al., 2003; Tariq et al., 1999), allerdings schränken die gleichen Risiken und Nebenwirkungen die Anwendbarkeit der Therapie ein.

Umso mehr ist ein Verständnis der körpereigenen antiviralen Mechanismen von Nöten. Zu deren besseren Einordnung möchte ich nun einen kurzen Überblick über das menschliche Immunsystem geben, das grob in eine humorale und eine zelluläre Komponente eingeteilt werden kann.

1.2. Humorale Komponente des Immunsystems

Zur humoralen Komponenten des Immunsystems werden vor allem die Antikörper gezählt, die sich gelöst in den „Körperflüssigkeiten“ (humores) befinden, woher der Name dieser Komponente des Immunsystems seinen historischen Ursprung hat. Ferner kann auch das Komplementsystem bedingt zu dieser Kategorie des Immunsystems gerechnet werden, so daß ich auch auf dieses System im Verlauf eingehen werde.

Bei den Antikörpern handelt es sich um Y-förmige Moleküle, die an ihren Armen zwei identische Antigenbindungsstellen besitzen. Diese Bindungsstellen sind von Molekül zu Molekül sehr variabel, so daß eine sehr große Vielfalt von Antigenen durch die verschiedenen Antikörper erkannt werden kann. Der Stamm des „Y“ eines jeweiligen Antikörpers ordnet diesen in eine von insgesamt fünf Isotypen-Klassen ein und bestimmt seine funktionellen Möglichkeiten. Antikörper werden von Plasmazellen produziert, die sich wiederum von den

B-Lymphocyten, welche im Knochenmark heranreifen, ableiten. Die B-Lymphocyten tragen die Antikörper als Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Kommt es zu einem Kontakt mit einem zu dem Rezeptor der Zelle passenden Antigen, so erfolgt eine klonale Expansion dieses Lymphocyten mit einer anschließenden Umwandlung zu Plasmazellen, welche die Antikörper in die verschiedenen Gewebeflüssigkeiten und den Blutkreislauf sezernieren.

Die Antikörper verfügen nun über mehrere Möglichkeiten für eine Bekämpfung des spezifischen Pathogens. Durch Bindung an die antigenen Strukturen des Pathogens kann dieses in einem als Neutralisation bezeichneten Prozeß an der Invasion und Infektion von Zellen gehindert werden. Auf diese Weise können zum Beispiel bakterielle Toxine neutralisiert werden, aber auch Viren können so an der Invasion von Zellen und anschließender Replikation gehindert werden.

Bakterien, die sich außerhalb von Zellen vermehren, können allerdings durch das einfache Binden von Antikörpern nicht neutralisiert werden. Hier kommt ein Vorgang, welcher als „Opsonisierung“ bekannt ist, zum Tragen. Antikörper besitzen an ihrem konstanten Ende den so genannten F_c -Rezeptor. Bindet ein Antikörper an ein Bakterium, so kann dieser Rezeptor von Zellen des unspezifischen Immunsystems, wie zum Beispiel Makrophagen, erkannt werden und damit die Phagocytose des Bakterium und seine anschließende Zerstörung innerhalb des Makrophagen einleiten. Diese „Kennzeichnung“ der Pathogene für Zellen des unspezifischen Immunsystems durch die Antikörper wird als „Opsonisierung“ bezeichnet.

Eine dritte Funktion der Antikörper ist die Aktivierung einer Gruppe von Plasmaproteinen, die als Komplementsystem bezeichnet werden. Die Aktivierung des Komplementsystems durch gebundene Antikörper wird als „klassischer Pfad“ der Komplementaktivierung bezeichnet. Dieser beginnt mit dem Protein C1q, welches nach Aktivierung eine Reihe von Spaltungsreaktionen anderer Proteine zu der Aktivierung der so genannten C3-Konvertase führt. An dieser Stelle konvergiert der klassische Pfad der Komplementaktivierung mit den beiden anderen Aktivierungsmöglichkeiten, dem „alternativen Pfad“ und dem „Mannose-

bindenden-Lectin-Pfad“. Diese beiden Pfade werden durch die Bindung von Komplementbestandteilen an verschiedene Pathogenoberflächen ausgelöst und führen über eine Aktivierung von verschiedenen Proteinen ebenfalls letztendlich zu einer Aktivierung der C3-Konvertase. Die C3-Konvertase spaltet das Komplementprotein C3 in die aktiven Bestandteile C3a und C3b. C3a reagiert als Peptidmodulator einer Inflammationsreaktion und bewirkt eine Rekrutierung von Phagozyten des unspezifischen Immunsystems. C3b bindet an Pathogene und führt, ähnlich wie die Antikörper, zu einer Opsonisierung der verschiedenen Erreger. C3b kann nämlich in Folge von dem Komplementrezeptor der Phagozyten erkannt werden und führt im Anschluß zu einer Phagocytose des Komplement-Pathogen-Komplexes. In Verbindung mit der C3-Konvertase führt C3b zusätzlich zu der Spaltung der Komplementkomponente C5 in die aktiven Spaltprodukte C5a und C5b. C5a wirkt ähnlich wie C3a als ein Peptidmodulator der lokalen Entzündungsreaktion, wohingegen C5b die weiteren Komponenten C6-9 des Komplementsystems aktiviert und mit ihnen den sogenannten Membran-Angriffs-Komplex bildet. Dieser Komplex kann die Membranen von bestimmten Pathogenen und infizierten Zellen zerstören und führt damit zu einer weiteren potenten Wirkweise des Komplementsystems gegen die verschiedensten Pathogene. (Janeway et al., 2005)

1.3. Zelluläre Komponente des Immunsystems

Zum zellulären Immunsystem gehören unter anderem die Phagozyten und Makrophagen des unspezifischen Immunsystems, verschiedene Antigen-präsentierende Zellen und die B-Lymphocyten. An dieser Stelle will ich jedoch vor allem auf die zelluläre Komponente des spezifischen Immunsystems eingehen, nämlich die T-Lymphocyten.

Genau wie die B-Lymphocyten entstehen die T-Lymphocyten im Knochenmark. Allerdings verbleiben die T-Lymphocyten für ihren Reifungsprozeß nicht im Knochenmark, sondern wandern in den Thymus aus, wo die weitere Maturation der Zellen stattfindet.

Ein reifer T-Lymphocyt ist mit einem T-Zellrezeptor ausgestattet, der mit dem B-Zellrezeptor der B-Lymphocyten vergleichbar ist. Dieser T-Zellrezeptor besteht aus einer α - und aus einer β -Kette, die jeweils aus einer konstanten und einer variablen Komponente bestehen. Durch die variablen Komponenten ist es auch der Gesamtpopulation der T-Zellen möglich, eine große Zahl von Antigenen zu erkennen.

Nach unterschiedlichen Oberflächenmolekülen werden die T-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt, die sich auch in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Hierbei handelt es sich um die $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen und die $CD4^+$ T_H1 und T_H2 -Zellen.

Diese beiden verschiedenen Gruppen von T-Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß sie mit verschiedenen Varianten der MHC-Moleküle reagieren. MHC-Moleküle (major histocompatibility complex) kommen in zwei Formen vor: MHC Klasse I und MHC Klasse II. MHC Klasse I-Moleküle können von jeder Körperzelle produziert werden und dienen zur Präsentation von in der Zelle synthetisierten Proteinen auf der Zelloberfläche. Dieser Mechanismus spielt bei viralen Infektionen eine bedeutende Rolle, denn in diesem Fall wird in einer infizierten Zelle virales Protein translatiert, welches im Anschluß durch die MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Dieses Fremdprotein kann nun durch den T-Zellrezeptor der cytotoxischen T-Zellen erkannt werden und zu einer anschließenden Zerstörung der virusinfizierten Zelle durch die T-Zelle führen.

T_H1 -Zellen erkennen Proteine, die an MHC Klasse II-Moleküle gebunden sind. Diese MHC Klasse II-Moleküle können nur von wenigen Zellen des menschlichen Körpers synthetisiert werden, wie zum Beispiel Makrophagen und antigenpräsentierenden Zellen. Ihre Aufgabe ist es, Proteine auf der Zelloberfläche zu präsentieren, die sich in intrazellulären Vesikeln befinden und durch Phagozytose in die Zelle aufgenommen wurden. T_H1 -Zellen erkennen

Proteine, die von Pathogenen stammen und von Phagocyten auf diese Weise präsentiert werden. In Folge aktivieren die T_H1 -Zellen die Phagocyten und führen zu einer Fusion der intrazellulären Vesikel mit Lysosomen und damit zu einer Zerstörung des bereits phagocytierten Pathogens. Außerdem produzieren T_H1 -Zellen Cytokine und Chemokine, die weitere Makrophagen an die Stelle der Infektion locken.

T_H2 -Zellen stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der humoralen und der zellulären Komponente des spezifischen Immunsystems dar. Nur wenige Antigene können nämlich nach Bindung an einen B-Zellrezeptor die B-Zelle völlig selbständig aktivieren. In den meisten Fällen werden zusätzliche Signale durch T_H2 -Zellen benötigt, welche die B-Zellen dazu anregen zu proliferieren und sich in antikörpersezernierende Plasmazellen auszudifferenzieren. (Janeway et al., 2005)

Diese kurze Einführung in die humorale und zelluläre Komponente des spezifischen Immunsystems soll einen kurzen Überblick über die Verteidigungsmechanismen eines Wirtskörpers gegen verschiedene Pathogene geben. Neben dem spezifischen Immunsystem gibt es aber noch eine Vielzahl an weiteren körpereigenen Prozessen, die Krankheitserreger bekämpfen können. Auf diese Mechanismen will ich im Folgenden eingehen. Wegen der großen Bedeutung für die Ergebnisse dieser Arbeit möchte ich zunächst die Rolle der Cytokine in der Immunabwehr genauer darstellen.

1.4. Bedeutung der Cytokine im Immunsystem

Bei den Cytokinen handelt es sich um kleine Proteine, die nach einem aktivierenden Stimulus von verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers produziert werden können und die ihre Wirkung durch Bindung an spezielle Rezeptoren entfalten. Je nach Cytokin kann die Signaltransduktion autokrin, parakrin oder auch endokrin erfolgen. Aufgrund der Vielzahl an bekannten Cytokinen soll an dieser Stelle nur ein Überblick über die Produktion und Wirkung

der für diese Arbeit besonders relevanten Cytokine gegeben werden, nämlich $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und die Interferone, mit besonderem Gewicht auf $\text{IFN}\gamma$.

Bei dem Tumor-Nekrose-Faktor- α ($\text{TNF}\alpha$) handelt es sich um ein Cytokin, welches aus 157 Aminosäuren besteht und als Trimer vorliegt. Gebildet wird dieses Cytokin von Makrophagen, NK-Zellen und T-Zellen und spielt eine wichtige Rolle in der lokalen Entzündungsreaktion und der Aktivierung von Endothelzellen. Zusätzlich erhöht es die Permeabilität der lokalen Gefäße, was zu einem erhöhten Influx von Antikörpern, Komplement und Zellen der Immunabwehr aus der Blutbahn an den Ort der Inflammation führt. Gleichzeitig entsteht auf diese Weise eine erhöhte Lymphdrainage aus dem Entzündungsgebiet, wodurch immunkompetente Zellen in den Lymphknoten schnelleren Kontakt mit den Pathogenen bekommen und entsprechend auf sie reagieren können. Durch eine lokale Gerinnungsaktivierung, ausgelöst durch die Effekte des $\text{TNF}\alpha$ auf die Endothelzellen, kann es ebenfalls zu einer lokalen Eindämmung einer Entzündung beitragen. Auch systemisch kann $\text{TNF}\alpha$ wichtige Wirkungen entfalten. So verändert es zum Beispiel durch den Effekt auf Hepatocyten, im Zusammenspiel mit weiteren Cytokinen, die Proteinsynthese der Leber. Es kommt zur so genannten „Akute-Phase-Reaktion“ und der Synthese der entsprechenden Proteine. Als Beispiel kann das C-reaktive Protein genannt werden. Zusätzlich ist auch eine pyrogene Wirkung des $\text{TNF}\alpha$ bekannt. Allerdings spielt die systemische Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung des septischen Schocks. Die hierdurch ausgelöst generelle Vasodilatation führt zu einem Blutdruckabfall und durch die Wirkung auf das Endothel kann es zu der Auslösung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) kommen. (Janeway et al., 2005)

Das zweite, in dieser Arbeit bedeutende Cytokin ist das Interleukin 1β ($\text{IL-1}\beta$). Dieses Cytokin ist ein Protein, welches aus 153 Aminosäuren aufgebaut ist und als Monomer vorliegt. Produziert wird es von Makrophagen und epithelialen Zellen. Ähnlich wie $\text{TNF}\alpha$ aktiviert es vaskuläres Endothel und führt zu einer verstärkten Einwanderung von

immunkompetenten Zellen in das Entzündungsgebiet. Auch eine aktivierende Wirkung auf Lymphocyten ist bekannt. Systemisch wirkt es ebenfalls pyrogen und ist an der Initiation der „Akuten-Phase-Reaktion“ in der Leber beteiligt (Janeway et al., 2005).

Ein besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle den Interferonen zukommen. Bei Ihnen handelt es sich um eine multigene Familie von induzierbaren Cytokinen, welche vor allem antivirale Potentiale besitzen (Pestka et al., 1987). Die Interferone lassen sich in zwei Gruppen einteilen, nämlich Typ-I-Interferone (IFN α , IFN β und IFN ω) und Typ-II-Interferone (IFN γ). Typ-I-Interferone werden auch als virale Interferone bezeichnet, da den vorrangigen auslösenden Stimulus für ihre Synthese eine Virusinfektion der betroffenen Zelle darstellt. Somit ist auch die Mehrzahl der Zellen des menschlichen Körpers, die viral infiziert werden, in der Lage, diese Interferone zu produzieren. Im Gegensatz dazu wird das IFN γ auch als Immuninterferon bezeichnet. Es wird nämlich nur von bestimmten Zellen des Immunsystems synthetisiert, wie zum Beispiel NK-Zellen, CD4⁺ T_H1-Zellen und CD8⁺ cytotoxischen Zellen. Für die Produktion von IFN γ sind vor allem mitogene und antigene Stimuli verantwortlich.

Die Gene der Typ-I-Interferone sind im menschlichen Genom auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 lokalisiert, wohingegen das Gen des Typ-II-Interferons auf dem langen Arm des Chromosom 12 befindlich ist.

Alle Interferone entfalten ihre Wirkungen durch spezielle Zelloberflächenrezeptoren. Die Typ-I-Interferone wirken auf einen gemeinsamen Rezeptor, der aus zwei Untereinheiten besteht, IFNAR-1 und IFNAR-2. IFN γ wirkt auf einen eigenen Rezeptor, der jedoch ebenfalls aus zwei Untereinheiten aufgebaut ist, IFNGR-1 und IFNGR-2 (Bach et al., 1997).

Die Bedeutung der Rezeptoren für die Wirkung der Interferone konnte in mehreren „knock-out“-Studien belegt werden. Mäuse, die nicht über den Typ-I-Interferonrezeptor verfügen, sind hochanfällig für Infektionen mit einer Vielzahl an Viren (Hwang et al., 1995). Aber auch ein Ausschalten des IFN γ -Rezeptors führte zu einer erhöhten Anfälligkeit für virale Infektionen in den betroffenen Mäusen. Hier ist vor allem eine erhöhte Anfälligkeit für eine

Infektion mit dem Herpes Simplex Virus zu nennen (Cantin et al., 1999). Damit ist für das $\text{IFN}\gamma$ auch eine antivirale Aktivität neben den vielfältigen immunregulatorischen Wirkungsweisen bewiesen.

Nach Bindung der Interferone an ihren jeweiligen Rezeptor erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion über den JAK-STAT-Pfad. Als JAK werden Proteine aus der Familie der Janus-Tyrosin-Kinasen bezeichnet. Zu ihnen gehören Jak-1, Jak-2, Jak-3 und Tyk-2. Nach Aktivierung phosphorylieren diese Kinasen Tyrosinreste in einer Gruppe von latenten cytoplasmatischen Proteinen, welche als STAT (signal transducer and activator of transcription) bezeichnet werden. Zu dieser Gruppe zählen sieben Vertreter: Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b und Stat-6. An die Untereinheiten IFNAR-1 und IFNAR-2 des Interferon-Typ-I-Rezeptors sind Jak-1 und Tyk-2 gebunden. Kommt es zu einer Bindung von einem Typ-I-Interferon an den Rezeptor, so werden diese Kinasen aktiviert und phosphorylieren die Proteine Stat-1 (auch als p91 bezeichnet) und Stat-2 (auch bekannt als p113). Diese phosphorylierten Proteine bilden zusammen mit dem Protein IRF-9 (interferon regulatory factor, auch p48 genannt) einen Komplex, der ISGF-3 genannt wird (interferon stimulated gene factor 3). Dieser Komplex wird schließlich in den Nucleus transloziert, wo er an eine als ISRE (interferon stimulated response element) bezeichnete DNA-Sequenz bindet, welche sich in den interferoninduzierbaren Genen befindet. Damit wird die Transkription dieser Gene ausgelöst, wodurch die weiteren Wirkungen des Interferons hervorgerufen werden.

Bei den Typ-II-Interferonen läuft die intrazelluläre Signaltransduktion etwas anders ab, allerdings ebenfalls über den JAK/STAT-Pfad. An die Rezeptorelemente dieser Interferone (IFNGR-1 und IFNGR-2) sind hier Jak-1 und Jak-2 gebunden. Nach Interferonbindung phosphorylieren diese jeweils zwei Proteine Stat-1 (p91), die in diesem Zustand ein Dimer bilden. Dieses Dimer wird ebenfalls in den Nucleus transloziert, wo es an ein DNA-Element,

das als GAS (gamma activated sequence) bekannt ist, bindet und so die Transkription verschiedener Gene auslöst (Darnell et al., 1994).

Neben den beschriebenen Signaltransduktionswegen sind noch viele weitere Transkriptionsfaktoren an der Induktion von Genen durch die verschiedenen Interferone beteiligt. Zu nennen ist hier zum Beispiel IRF-1 (interferon regulatory factor), dessen Synthese durch $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$ induziert wird (Fujita et al., 1989; Kanzaki et al., 1998). Auch die Proteinkinase R und der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielen bei der Synthese von IRF-1 eine Rolle (Kumar et al., 1997b). Als Gegenspieler von IRF-1 ist auch noch IRF-2 zu nennen. Strukturell sind sich beide Faktoren ähnlich und sie erkennen auch die gleiche DNA-Sequenz. Allerdings stimuliert IRF-1 die Transkription, wohingegen IRF-2 sie hemmt. (Tanaka et al., 1993).

Nach der Transkription und Translation der interferonregulierten Gene entfalten sich die verschiedenen Wirkungen dieser Cytokine. Im Folgenden möchte ich, wegen der besonderen Bedeutung für diese Arbeit, vor allem auf das antivirale Potential der Interferone eingehen.

1.5. Durch Interferone induzierbare antivirale Wirkmechanismen

Bereits vor ungefähr fünfzig Jahren wurden erste Forschungen angestellt, die auf die Bedeutung der Interferone bei der antiviralen Abwehr hinwiesen (Isaacs et al., 1957). Hier wurde erstmals ein von virusinfizierten Zellen sekretierter Faktor beschrieben, der einen virusresistenten Zustand hervorrufen konnte. Seit dieser Erstbeschreibung der Interferone sind viele Forschungen auf diesem Gebiet angestellt worden, die zu einem besseren Verständnis der Rolle der Interferone im Immunsystem, ihrer verschiedenen Rezeptoren mit der jeweiligen intrazellulären Signaltransduktion und der verschiedenen durch Interferone induzierten antiviralen Wirkungsmechanismen geführt haben.

Die bisher bekannten, durch Interferone induzierbaren antiviralen Wirkungsmechanismen möchte ich im Folgenden vorstellen.

Trotz der zahlreichen Forschungen zu den Interferonen muß vorangestellt werden, daß die Forschungen auf diesem Gebiet bei weitem nicht als abgeschlossen gelten können, da viele Details der verschiedenen Wirkmechanismen der Interferone und ihrer Rolle bei der Immunantwort bis heute nicht geklärt sind. Deshalb erhebt die nachfolgende Beschreibung der verschiedenen antiviralen Wirkungsmechanismen der Interferone keinen Anspruch auf Vollständigkeit; es werden lediglich die am besten erforschten Wirkmechanismen vorgestellt.

1.5.1. Proteinkinase R (PKR)

Die PKR ist eine interferoninduzierbare, RNA-abhängige Proteinkinase, die in der frühen Literatur auch als DAI, dsI, P1 Kinase, P1/eIF-2 α Kinase, p68 oder p69 bekannt war (Clemens et al., 1993). Sie ist intrazellulär vornehmlich im Cytoplasma und mit Ribosomen assoziiert zu finden. Bei der PKR handelt es sich um ein 551 Aminosäuren enthaltendes Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 62 kDa (Kuhlen et al., 1996).

Die PKR ist durch Interferone induzierbar, der Promotor des PKR Genes besitzt ein ISRE (Interfeon Stimulated Response Element) (Kuhlen et al., 1997).

Das PKR Protein wird durch Autophosphorylierung aktiviert. Dieser Prozess wiederum wird durch das Vorhandensein von doppelsträngiger RNA vermittelt, wie es in virusinfizierten Zellen der Fall ist. Mehrere Substrate der aktiven PKR sind beschrieben worden, wobei der Proteinsynthesefaktor eIF-2 α die wichtigste Stellung einnimmt. Eine durch die PKR katalysierte Phosphorylierung dieses Faktors führt im Folgenden zu einer Minderung der mRNA-Translation in der betroffenen Zelle, wodurch die Virusreplikation deutlich eingeschränkt wird (Gale et al., 2000).

Die Bedeutung der PKR als wichtiger antiviraler Effektormechanismus konnte in vielen Studien nachgewiesen werden. So war zum Beispiel die Virusreplikation in Zellen, die mit PKR cDNA transfiziert wurden, deutlich eingeschränkt (Meurs et al. 1992).

Zudem konnte eine erhöhte Anfälligkeit für verschiedene virale Infektionen in mutierten Mäusen nachgewiesen, bei denen das Gen der PKR ausgeschaltet war (Yang et al., 1995).

1.5.2. Oligoadenylate Synthetase (OAS) und RNase L

Einen weiteren durch Interferone induzierbaren Effektormechanismus stellt das System der 2',5'-Oligoadenylate Synthetase (OAS) und der RNase L dar. Beide Enzyme sind für die antivirale Wirkung dieses Systems von Bedeutung. Bei der OAS handelt es sich um ein Enzym von dem drei verschiedene Formen unterschieden werden können, die als OAS1, OAS2 und OAS3 bezeichnet werden (Rebouillat et al., 1999). Zwei verschieden große Proteine von 40 und 46 kDa Molekulargewicht, die durch alternatives Splicing entstehen, werden als OAS1 bezeichnet. Ebenso werden als OAS2 zwei Proteine von dem Molekulargewicht 69 und 71 kDa zusammengefasst. OAS3 bezeichnet ein einzelnes Protein mit dem Molekulargewicht von 100 kDa. Die Gene aller drei Gruppen der OAS sind auf Chromosom 12 lokalisiert (Hovnanian et al., 1998). OAS1 und OAS2 finden sich in ihrer funktionellen Form als Oligomere. So liegt die OAS1 als Tetramer und die OAS2 als Dimer vor. Die OAS3 ist als Monomer enzymatisch aktiv (Ghosh et al., 1997).

Die Transkription aller Formen der OAS kann durch Interferoneinfluss induziert werden, denn in den Genen aller drei Formen ist ein ISRE zu finden (Benech et al., 1987). Allerdings variiert die Induktion der verschiedenen Isoformen der OAS und der totalen enzymatischen Aktivität zwischen verschiedenen humanen Zelllinien.

Der antivirale Effektormechanismus durch die OAS kann wie folgt beschrieben werden: Unter Interferonstimulation kommt es zu einer erhöhten Transkription und Translation der

verschiedenen OAS-Isoformen. Durch doppelsträngige RNA, die sich in virusinfizierten Zellen findet, kommt es zu einer Aktivierung des OAS-Enzyms. In Folge katalysiert die OAS die Bildung von Oligoadenylaten, die eine 2',5'-Phosphodiesterbindung besitzen.

Eine Bindung dieser Oligoadenylate an die RNase L, einer latenten Endoribonuclease, führt zu einer Bildung von stabilen Homodimeren dieses Proteins und damit zur Aktivierung des Enzyms. Die aktivierte RNase L katalysiert den Abbau von sowohl zellulärer als auch viraler RNA, wodurch die Virusreplikation gehemmt werden kann.

Bei der humanen RNase L handelt es sich um ein Protein von 83 kDa Molekulargewicht, dessen Gen auf Chromosom 1 lokalisiert ist (Zhou et al., 1993).

Die RNase L wird in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert, allerdings kann deren Expression durch Stimulation mit Interferonen deutlich gesteigert werden.

Die antivirale Wirkung des Systems aus OAS und RNase L ist in vielen animalen und humanen Zelllinien untersucht worden. Hierbei konnte eine besondere Bedeutung dieses Systems bei der Hemmung der Replikation von Picornaviren festgestellt werden. So zeigten humane Zellen, die die cDNA exprimieren, die die 40 kDA-Form der OAS1 kodiert, eine Resistenz gegen Infektionen mit dem Encephalomyocarditis-Virus, nicht jedoch gegen das Varizella Zoster Virus (Rysiecki et al., 1989).

Auch Zellen, die OAS2 konstitutiv exprimierten, konnten eine Hemmung der EMC-Virusreplikation, nicht jedoch der VZV oder Reovirusreplikation bewirken (Ghosh et al., 2000).

Auch in vivo Studien mit RNase L „knock out“-Mäusen konnten die Bedeutung des OAS/RNase L-Systems bei der Abwehr viraler Infektionen beweisen. Diese Mäuse starben nämlich deutlich schneller an einer Infektion mit dem EMC-Virus als RNase L-positive Wildtyp-Mäuse (Zhou et al., 1997).

1.5.3. Adenosin Deaminase ADAR1

Bei der RNA-spezifischen Adenosin Deaminase ADAR1 handelt es sich um ein weiteres durch Interferone induzierbares Enzym, dessen Aktivität zu einer Hemmung der Virusreplikation in infizierten Zellen führen kann.

Zwei verschiedene Arten der ADAR1 können in humanen Zellen gefunden werden. Ein Protein von 110 kDa Molekulargewicht, welches konstitutiv exprimiert wird und ein weiteres Protein mit 150 kDa Molekulargewicht, das interferonabhängig exprimiert wird. Das konstitutiv exprimierte Protein ist fast ausschließlich im Nucleus lokalisiert, wohingegen das interferonabhängige Protein sowohl im Nucleus als auch im Cytoplasma anzutreffen ist (Patterson et al., 1995).

Das Gen der ADAR1 ist auf Chromosom 1 lokalisiert (Wang et al., 1995). Im Promoter des interferonabhängigen Proteins ist ein ISRE zu finden, das die Regulation durch Interferon belegt (George et al., 1999).

Neben der ADAR1 ist auch eine ADAR2 beschrieben, die jedoch interferonunabhängig exprimiert wird.

Die aktive ADAR1 katalysiert posttranscriptionale RNA-Modifikationen in Gestalt einer hydrolytischen C-6 Deamination von Adenosin zu Inosin. Die resultierende A-zu-I-Umwandlung destabilisiert die Helix der doppelsträngigen RNA durch gestörte Basenpaarung. Die stabilen AU-Bindungen werden nämlich in deutlich instabilere IU-Bindungen umgewandelt. Durch die postranscriptionalen RNA-Modifizierungen können viele biologische Prozesse beeinflusst werden, so kann durch Destabilisierung der doppelsträngigen RNA auch die Virusreplikation negativ beeinflusst werden.

Der Einfluß der ADAR1 auf die Replikation vieler Viren konnte belegt werden. So werden zum Beispiel virale RNA-Transkripte des dsDNA Polyomavirus durch ADAR1-Modifikation inaktiviert (Kumar et al., 1997a).

Für viele minussträngige RNA-Viren wird die Hypermuation durch die ADAR1 jedoch auch als mit einer persistierenden Infektion assoziiert angesehen (Murphy et al., 1991).

1.5.4. Mx Protein GTPase

Die Proteine MxA und Mx1 aus der Mx-Proteinfamilie zählen zu den am längsten bekannten, interferoninduzierbaren, antiviralen Effektormechanismen. Die Mx-Proteine sind GTPasen und gehören zu der Familie der Dynamin-ähnlichen GTPasen (Stacheli et al., 1993). Die GTPase-Aktivität der Mx-Proteine ist eine Voraussetzung für deren antivirale Aktivität (Pitossi et al., 1993). Es wurde festgestellt, daß die Mx-Proteine sowohl untereinander als auch mit Virusproteinen Komplexe bilden, was ebenfalls eine Rolle bei ihrer antiviralen Wirkung spielt (Ponten et al., 1997).

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, daß die Mx-Proteine durch IFN α und IFN β induzierbar sind, jedoch nicht durch IFN γ (Simon et al., 1991).

Das humane Genom enthält Informationen für zwei verwandte Mx-Proteine, MxA und MxB, die beide auf Chromosom 21 lokalisiert sind (Gardiner et al., 1990). Für MxB ist bisher keine antivirale Wirkung nachgewiesen worden (Haller et al., 1998). MxA hingegen hat einen deutlichen antiviralen Effekt. So war zum Beispiel die Replikation vieler Orthomyxoviridae, unter anderem Influenza A und C, in humanen Zellen, die konstitutiv das MxA-Protein exprimieren, deutlich eingeschränkt (Pavlovic et al., 1992). Auch eine Hemmung von Viren aus der Familie der Bunyaviridae (LaCrosse Virus, Hantavirus), Paramyxoviridae (Masernvirus, Parainfluenzavirus), Rhabdoviridae und Togaviridae durch das MxA-Protein konnte beobachtet werden. (Haller et al., 1998; Pavlovic et al., 1995)

Das MxA-Protein kumuliert im Cytoplasma von interferonstimulierten Zellen. Bei einer viralen Infektion formt es hier Komplexe mit dem viralen Nucleocapsid und verhindert so den

Import des Nukleokapsids in den Zellkern (Kochs et al., 1999). So kann eine virale Replikation effektiv verhindert werden.

Mx-Proteine spielen auch im murinen System eine wichtige Rolle bei der antiviralen Abwehr. Hier sind es die Proteine Mx1 und Mx2, die auf Chromosom 16 lokalisiert sind (Arnheiter et al., 1996). Ähnlich wie das humane MxB-Protein spielt das Mx2-Protein keine Rolle bei der viralen Abwehr in allen Stämmen von Labormäusen, da es durch eine Mutation inaktiviert ist (Staheli et al., 1988). Allerdings hat es in wildlebenden Mäusen antivirale Aktivität. Hier wirkt es ähnlich wie das humane MxA-Protein im Cytoplasma durch Komplexbildung mit viralen Nucleocapsiden (Jin et al., 1999). Das Mx1-Protein ist im Gegensatz dazu auch in Labormäusen antiviral aktiv, allerdings unterscheidet es sich in Lokalisation und Wirkungsweise vom humanen MxA-Protein. Mx1 ist nicht im Cytoplasma, sondern im Nucleus lokalisiert (Dreiding et al., 1985). Hier verhindert es zum Beispiel beim Influenzavirus die primäre Transkription, die durch die virionassoziierte Polymerase katalysiert wird (Krug et al., 1985).

Für die wichtige Stellung des MxA-Proteins unter den interferoninduzierten, antiviralen Effektormechanismen spricht ein interessantes Experiment. Transgene MxA-Mäuse mit Mutationen in den endogenen Mx1 und Mx2 Genen wurden mit IFNAR-1 mutierten Mäusen gekreuzt, denen diese IFN α/β -Rezeptor-Untereinheit fehlt. Damit waren in den gezüchteten Mäusen sämtliche anderen, interferoninduzierten antiviralen Mechanismen ausgeschaltet, da die Zellen dieser Mäuse wegen des defekten Rezeptors nicht mehr auf Interferonstimulation reagieren konnten. Allerdings wurde das MxA-Protein in den Zellen dieser Mäuse konstitutiv exprimiert. Die Mäuse zeigten eine Resistenz gegen das Thogoto- und das LaCrosse-Virus, die damit nur auf das MxA-Protein zurückgeführt werden kann (Hefti et al., 1999).

Dieses Experiment bestätigt die wichtige Rolle der Mx-Proteine bei der antiviralen Abwehr in vielen viralen Infektionen.

1.5.5. Induzierbare NO Synthase (iNOS)

Die NO-Synthasen katalysieren die NADPH-abhängige Oxidation von L-Arginin zu Stickstoffmonoxid (NO) und Citrullin. Zu den NO-Synthasen zählt man drei Enzymisoformen: die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS2), die neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS1) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS3). Eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Mikroorganismen spielt die iNOS. Diese induzierbare NO-Synthase kann durch IFN γ stimuliert werden. Für die Expression der iNOS nach IFN γ -Stimulation ist ein GAS-Element in der Promoterregion des iNOS-Gens verantwortlich (Gao et al., 1997).

Zusätzlich zu NO entstehen bei iNOS-Aktivität viele weitere zusätzliche reaktive Stickstoffverbindungen, die aus NO durch Oxidation, Reduktion oder Adduktion gebildet werden. Durch NO und diese Derivate kann zum Beispiel das Abtöten von infizierten Zellen vermittelt werden. Einige der cytotoxischen Effekte können durch die Interaktion von NO mit mehreren mitochondrialen Enzymen und einer resultierenden Hemmung der Atmungskette erklärt werden (MacMicking et al., 1997).

iNOS und NO spielen eine besonders wichtige Rolle in der antimikrobiellen Abwehr durch Makrophagen (Michel et al., 1997). Doch auch bei der viralen Abwehr ist die iNOS von Bedeutung. So konnte eine Hemmung der Virusreplikation durch die iNOS für einige Viren, wie zum Beispiel das Vaccinavirus und das Herpesvirus in murinen Makrophagen nachgewiesen werden (Karupiah et al., 1993). Zudem sind iNOS-„Knock-out“-Mäuse deutlich anfälliger für Infektionen mit dem Mauspockenvirus als Wildtypmäuse, wodurch die Bedeutung der iNOS auch für die Abwehr von Viren deutlich gemacht wird (Nathan, 1997).

1.5.6. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Bei der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) handelt es sich um ein durch IFN γ induzierbares Enzym, welches den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan katalysiert. Auf den genauen Wirkmechanismus des Enzyms und seine Bedeutung in der Immunregulation und der antiparasitären und antibakteriellen Abwehr werde ich im Folgenden eingehen. Bisher existieren allerdings nur wenige Forschungen zu der antiviralen Aktivität dieses Enzyms. Im Rahmen dieser Dissertation habe ich mich deshalb mit der antiviralen Kapazität der IDO gegen das Herpes Simplex Virus Typ I und Typ II befasst.

1.6. Tryptophanabbau durch die Indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO)

1.6.1. Wirkmechanismus

Im Menschen existieren zwei voneinander unabhängige Häm-enthaltende Enzyme, die die gleiche Reaktion katalysieren: Den oxidativen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Es handelt sich hierbei um die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) und die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO). Obwohl sie die gleiche Reaktion katalysieren, ist ihre Expression in den Zellen des menschlichen Körpers unterschiedlich verteilt. Die TDO wird fast ausschließlich in Hepatocyten exprimiert, hier erfolgt ihre Expression jedoch konstitutiv und ist nicht an äußere Stimuli gebunden. Bei der TDO handelt es sich demnach um ein so genanntes „housekeeping“-Enzym, das für die Regulation der Tryptophan-Homöostase zuständig ist. Die Rolle der IDO ist eine andere. Zunächst kann dieses Enzym von vielen humanen Zellen exprimiert werden und ist im Gegensatz zur TDO nicht an einen bestimmten Zelltyp gebunden. Allerdings handelt es sich bei der IDO nicht um ein konstitutiv exprimiertes Enzym. Die Transkription und Translation des Proteins sind von äußeren Stimuli

abhängig. Hierbei ist vor allem die Stimulation der jeweiligen Zellen mit Interferonen von Bedeutung. In der Promotorregion des IDO-Gens, welches auf Chromosom 8 lokalisiert ist, finden sich viele Elemente, die eine Empfindlichkeit des Gens für Typ I Interferone (IFN α,β) und in stärkerem Maße für Typ II Interferone (IFN γ) belegen (Hassanain et al., 1993). Nach Stimulation mit IFN γ konnte eine Expression der IDO in Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten, einigen Tumorzellen und Endothelzellen nachgewiesen werden.

Für die Regulierung der IDO-Expression nach Stimulation mit IFN γ sind sowohl STAT1 und IRF-1 von Bedeutung (Chon et al., 1996). So zeigt sich zum Beispiel bei Mäusen, denen IRF-1 oder IFN γ fehlt, keine IDO-Expression nach Infektion (Silva et al., 2002). In der Promotorregion des IDO-Gens sind sowohl eine GAS als auch zwei ISRE zu finden. (Konan et al., 1996). Allerdings spielen nicht nur die Interferone eine Rolle bei der Induktion der IDO. So konnte gezeigt werden, daß Lipopolysaccharid (LPS) die IDO-Expression in interferonstimulierten Zellen verstärken kann (Hissong et al., 1997). Auch die Cytokine Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) können eine Rolle bei der Regulation der IDO-Expression spielen. Deren Bedeutung für die IDO-Aktivität von interferonstimulierten Zellen habe ich auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Neben diesen Cytokinen könnten auch noch weitere Einfluß auf die IDO-Expression nehmen, so zum Beispiel IL4, IL10 und TGF β (MacKenzie et al., 1999a). Auch NO wurde in humanen Makrophagen als negativ regulatorisch auf die IDO-Induktion beschrieben (Thomas et al., 1994). Allerdings sind noch weitere Forschungen von Nöten, um das System der IDO-Regulation in Gänze zu verstehen.

Bei der IDO handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym mit einem Molekulargewicht von 40 kDa. Es gibt keinen Hinweis auf eine sekretierte oder extrazelluläre Form. Die IDO wurde als glyklysiertes, monomeres Enzym beschrieben, das Häm als prosthetische Gruppe enthält (Shimizu et al., 1978). Zu 60% wirkt das Superoxid-Anion O $_2^-$ als Cosubstrat für die katalysierte Reaktion, in den anderen Fällen kann auch Sauerstoff als Cosubstrat dienen

(Ohnishi et al., 1977). Wie auch die TDO katalysiert die IDO den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beim Abbau des Tryptophan entlang des so genannten Kynureninweges. Bei diesem Schritt handelt es sich biochemisch um die oxidative Spaltung des Indolrings des Tryptophans, wodurch N-Formylkynurenin entsteht. Dieses Produkt wird weiter zu Kynurenin und Formiat abgebaut. Dieser zweite Schritt geschieht in vitro spontan und wird in vivo durch die Formaminidase katalysiert. Der weitere Stoffwechsel des Kynurenin ist sehr komplex und verzweigt. Neben physiologisch relevanten Produkten, wie Chinolonsäure, Acetyl-CoA und Nicotinsäure können auch zelltoxische Metabolite entstehen. Einen weiteren wichtigen Punkt für das Verständnis der IDO-Regulation stellt die Tatsache dar, daß das IDO-Protein auch exprimiert werden kann, ohne daß es aktiv ist. So konnte zum Beispiel in humanen dendritischen Zellen das IDO-Protein per Western Blot nachgewiesen werden, eine Aktivität des Enzyms konnte jedoch nicht beobachtet werden. Diese war erst nach Stimulation der Zellen mit IFN γ nachweisbar (Munn et al., 2004).

Eine stringente Regulierung der IDO-Aktivität ist jedoch logisch, da ein exzessiver Abbau von Tryptophan für den Organismus toxisch wäre, da es sich bei Tryptophan um eine essentielle Aminosäure handelt. Wie eine posttransnationale Regulierung der IDO-Aktivität im Einzelnen erreicht wird, ist noch unklar, allerdings kommen hierfür einige Mechanismen in Frage. So könnten zum Beispiel eine Kontrolle der Cosubstrate des Enzyms (Häm, reaktive Sauerstoffspezies), posttranslationale Modifikationen des Enzyms, alternatives Splicing, eine Regulation der Proteinstabilität oder eine Hemmung der Enzymaktivität durch Antioxidantien oder NO eine Rolle spielen.

1.6.2. Antibakterielle Effekte

Die IDO gilt als ein wichtiger Mechanismus in der Abwehr von Pathogenen durch den Wirtsorganismus. Am längsten erforscht sind dabei die durch IDO vermittelten antibakteriellen Effekte. Obwohl viele Mikroorganismen in der Lage sind, ihr eigenes Tryptophan zu synthetisieren, so gibt es doch einige Bakterien, die auf exogenes Tryptophan angewiesen sind. Eine Empfindlichkeit dieser Bakterien gegen den durch die IDO vermittelten Tryptophanabbau scheint dadurch einleuchtend. Zu der antibakteriellen Aktivität der IDO sind einige Untersuchungen angestellt worden, bei denen es sich um in vitro-Experimente handelt, in denen eine Zellkultur mit IFN γ stimuliert wurde und die Effekte auf die Bakterienvermehrung in diesen Kulturen untersucht wurde. In diesen Experimenten konnte eine Hemmung des Wachstums von Chlamydien (Brown et al., 2001), Streptokokken der Gruppe B (MacKenzie et al., 1998), Staphylokokken (Schroten et al., 2001), Enterokokken (MacKenzie et al., 1999b) und Mycobakterien (Hayashi et al., 2001) nachgewiesen werden. In all diesen Experimenten konnte der IFN γ -vermittelte antibakterielle Effekt durch die Zugabe von einer überschüssigen Menge an Tryptophan aufgehoben werden, was beweist, daß der antibakterielle Effekt auf die Aktivität der IDO zurückzuführen ist und nicht durch einen anderen IFN γ -induzierten Mechanismus erklärlich ist. Die Menge an Experimenten mit vielen verschiedenen Bakterien unterstreicht die Rolle der IDO bei der antibakteriellen Abwehr, allerdings ist noch nicht geklärt, ob diese in vitro-Ergebnisse auch auf die in vivo-Situation übertragen werden können. Zwar sind zum Beispiel Mäuse, die kein IFN γ bilden können, deutlich empfindlicher für Infektionen mit Chlamydien (Rottenberg et al., 2000), allerdings ist nicht klar, ob diese erhöhte Empfindlichkeit auf das Fehlen der IDO-Aktivität oder auf das Fehlen eines anderen IFN γ -abhängigen Effektormechanismuses zurückzuführen ist. Zudem hat die IDO-Aktivität neben ihrer antibakteriellen Komponente auch noch eine immunregulatorische Komponente (siehe 1.6.4.) und es ist noch nicht

abschließend geklärt, ob in vivo die antibakterielle oder diese immunregulatorische Wirkung der IDO die größere Rolle spielt.

1.6.3. Antiparasitäre Effekte

Neben den antibakteriellen Effekten der IDO wurde auch die antiparasitäre Wirkung dieses Enzyms untersucht. Hierbei wurden besonders viele Experimente zu den Effekten der IDO auf die Vermehrung des obligat intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* durchgeführt. Die Hemmung des *T. gondii* Wachstums nach Stimulation mit IFN γ konnte in vielen Zelllinien, wie Fibroblasten (Pfefferkorn, 1984), Makrophagen (Murray et al., 1989) Monozyten (Carlin et al., 1989), Glioblastomzellen (Däubener et al., 1993) und Astrozyten (Däubener et al., 1996) nachgewiesen werden. Auch dieser antiparasitäre Mechanismus erwies sich als vollständig reversibel nach Tryptophansupplementation, was wiederum die Rolle der IDO in diesem Mechanismus belegt.

Auch in der Pathologie einiger anderer parasitärer Infektionen spielt der Tryptophanabbau durch die IDO eine Rolle. So konnte die Bedeutung der IDO-Aktivität für die Abwehr von Trypanosomen nachgewiesen werden (Vincendeau et al., 1999). Auch zur Rolle der IDO bei der Malaria wurden Nachforschungen unternommen (Hansen et al., 2000). Allerdings steht hier die IDO-Aktivität, die nach einer Infektion mit Malaria erhöht ist, im Verdacht, durch die Produktion von toxischen Tryptophanmetaboliten die Pathologie der cerebralen Malaria zu verstärken. Somit ist auch bei den antiparasitären Effekten der IDO nicht abschließend geklärt, welche Rolle sie tatsächlich bei der Abwehr der einzelnen Parasiten in vivo spielt.

1.6.4. Immunregulatorische Effekte

Lange Zeit wurde der IDO-Aktivität in interferonstimulierten Zellen allein die Rolle eines Verteidigungsmechanismus des Wirtskörpers gegen Infektionen zugeschrieben. Jüngere Forschungen deuten darauf hin, daß der IDO in vivo aber auch eine immunregulatorische Komponente zukommt. Munn et al. stellten 1999 fest, daß humane Makrophagen die Proliferation von T-Zellen in vivo hemmen konnten. Weitere Nachforschungen ergaben, daß die Makrophagen Tryptophan im Kulturmedium abgebaut hatten, was schließlich auf deren IDO-Aktivität zurückgeführt werden konnte. In nachfolgenden Experimenten stellte sich heraus, daß viele antigenpräsentierende Zellen IDO exprimieren und das ein Tryptophanmangel die Proliferation von T-Zellen hemmen kann. Dieser negative Effekt auf die T-Zellproliferation durch verschiedene antigenpräsentierende Zellen war jeweils durch die überschüssige Zugabe von Tryptophan zum Kulturmedium oder durch Zugabe von 1-Methyl-Tryptophan, eines Hemmers der IDO-Aktivität, vollständig reversibel (Munn et al., 2002). Genauere Untersuchungen der T-Zellen ergaben, daß sie nach Stimulation in tryptophanfreiem Medium zwar in der Lage waren, in den Zellzyklus einzutreten, dieser jedoch am Übergang von der G_0 in die S-Phase zum Stillstand kam (Lee et al., 2002). Interessanterweise waren die T-Zellen in der Lage in die S-Phase des Zellzyklus einzutreten, wenn sie in Medien kultiviert wurden in denen Tryptophan vorhanden war, jedoch Leucin oder Isoleucin fehlten, obwohl die Häufigkeit dieser Aminosäuren in humanen Proteinen ca. 10 mal größer ist als die des Tryptophan. Daraus kann geschlossen werden, daß der Tryptophanmangel für T-Zellen ein besonderes Signal darstellt, durch das deren Proliferation gehemmt wird. Der genaue Mechanismus dieses Signalwegs bleibt dabei noch ungeklärt. Eine weitere Erklärung für die Hemmung der T-Zellproliferation nach IDO-Aktivierung in antigenpräsentierenden Zellen könnte das Anfallen von toxischen Tryptophanmetaboliten sein, die auf die T-Zellen cytotoxisch wirken. Diese Cytotoxizität von Tryptophanmetaboliten

auf T-Zellen wurde *in vitro* nachgewiesen (Terness et al., 2002), allerdings bleibt fraglich, ob diese Cytotoxizität für die gehemmte T-Zellproliferation verantwortlich ist. Dagegen spricht, daß in den *in vitro* Modellen der negative IDO-Effekt auf die T-Zellproliferation jeweils durch Zugabe von hohen Mengen Tryptophan aufgehoben werden konnte. In diesen Fällen müsste aber eigentlich auch eine höhere Menge an toxischen Metaboliten entstehen und die T-Zellproliferation könnte sich nicht regenerieren, wenn die toxischen Metabolite wirklich die Ursache für den Proliferationsstopp wären. Obwohl also der genaue Mechanismus, mit dem die IDO-Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen auf T-Zellen wirkt, nicht abschließend geklärt ist, eröffnet diese Entdeckung weitreichende Möglichkeiten für die Bedeutung der IDO und Ansätze für mögliche therapeutische Konzepte. So konnte festgestellt werden, daß die IDO-vermittelte T-Zellhemmung eine wichtige Rolle in der Schwangerschaft spielt und ein wichtiger Faktor dafür ist, daß ein Fetus vom maternalen Immunsystem toleriert wird (Munn et al., 1998). Auch die T-Zelltoleranz, die bei manchen Tumoren besteht, scheint durch eine IDO-Expression deren Zellen erklärlich (Uyttenhove et al., 2003). Eine weitere Untersuchung dieses Mechanismus der Tumortoleranz könnte zu Durchbrüchen auf dem Gebiet der Onkologie und Tumorthherapie führen.

Auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen könnte die IDO-vermittelte T-Zellhemmung eine wichtige Rolle spielen. So konnten zum Beispiel in Mäusen Autoimmunerkrankungen durch eine Hemmung der IDO verstärkt werden (Gurtner et al., 2003).

Die T-Zellhemmung durch die IDO könnte auch in der Organtransplantation von Bedeutung werden. Erste Experimente belegen nämlich, daß transplantierte allogene Zellen, die die IDO exprimieren, eine Abstoßung durch den Empfängerorganismus verhindern können (Alexander et al., 2002).

Die Entdeckung der immunregulatorischen Komponente der IDO wirft auch ein neues Licht auf die Bedeutung der IDO in der Infektionsabwehr. Wie unter 1.6.2 und 1.6.3 dargestellt

wurde, hemmt ein IDO-vermittelter Tryptophanabbau in vitro das Wachstum von Bakterien und Parasiten. Ob allerdings eine IDO-Aktivierung bei einer Infektion in vivo ebenfalls das mikrobielle Wachstum hemmt oder ob es eher zu einer Hemmung von T-Zellen kommt, was dem Pathogen unter Umständen mehr nützt als dem Wirtskörper, muß in weiteren Untersuchung noch bestimmt werden.

1.6.5. Antivirale Effekte

Obwohl die antibakterielle und antiparasitäre Wirkung der IDO gut untersucht ist, gibt es doch zur Zeit noch wenige Untersuchungen zu einer möglichen antiviralen Wirkung der IDO. 1999 beschrieben Bodaghi et al. erstmals die IDO als einen antiviralen Wirkungsmechanismus. Sie stellten fest, daß die Replikation des Cytomegalievirus (CMV) in Retinoblastomzellen durch eine Stimulation mit IFN γ deutlich eingeschränkt werden konnte. Interessanterweise war dieser Effekt durch die Zugabe von Tryptophan zu den stimulierten Zellen fast vollständig reversibel. Daraus schlossen die Autoren, daß der IDO-vermittelte Tryptophanabbau der ursächliche Mechanismus für die Hemmung der CMV-Replikation sein mußte.

Adams et al. konnten 2004 nachweisen, daß die IFN γ -vermittelte IDO-Aktivität auch ursächlich für die Hemmung der Replikation des Herpes Simplex Virus Typ I (HSV Typ I) in Glioblastomzellen ist. Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich mit den möglichen Effekten der IDO-Aktivität auf die Replikation von HSV Typ I in Endothelzellen beschäftigt. Außerdem habe ich untersucht, ob auch eine Replikation des HSV Typ II in vitro durch Stimulation der IDO gehemmt werden kann.

1.7. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich mich besonders mit dem antiviralen Potential derIDO beschäftigt. Wie ich schon dargestellt habe, sind die Untersuchungen zu den antiviralen Effekten derIDO noch nicht sehr weit fortgeschritten, wohingegen zum antibakteriellen und antiparasitären Effekt derIDO schon viele Ergebnisse vorliegen. Deshalb wurde der Schwerpunkt auf die antiviralen Wirkungen derIDO gelegt.

Besondere Aufmerksamkeit soll hier dem antiviralen Potential derIDO in Endothelzellen geschenkt werden. Zu diesem Zweck wurden zwei Modelle etabliert. Zum einem die Infektion von Hirnendothelzellen (HBMEC) mit HSV Typ I, um die Bedeutung der Endothelien als Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke bei der Abwehr von Viren im Rahmen einer Meningoenzephalitis zu untersuchen und zum anderen die Infektion von Nabelschnurendothelien (HUVEC) mit dem gleichen Erreger, um die antiviralen Effekte in unterschiedlichen Endothelzellen zu vergleichen. In diesen Modellen wurden die Zellen nach Stimulation mit verschiedenen Cytokinen mit dem Erreger infiziert und anschließend das Viruswachstum mittels Real-Time-PCR bestimmt. Um eine ursächliche Beteiligung derIDO an möglichen antiviralen Effekten zu beweisen, wurden diese Experimente auch mit einer Tryptophansupplementation durchgeführt.

Zusätzlich wurde ein Modell für eine genitale HSV Typ II Infektion aufgestellt. Zu diesem Zweck wurden Cervixkarzinomzellen (HeLa) mit HSV II infiziert und im Anschluß an Stimulation mit verschiedenen Cytokinen auf ihre antivirale Aktivität untersucht. Auch hier erfolgte eine gleichzeitige Tryptophansupplementation von einem Teil der Einzelansätze, um wiederum dieIDO als antiviralen Effektormechanismus zu belegen.

Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich außerdem die Effekte von verschiedenen Cytokinen auf die unterschiedlichen Zelltypen im Bezug aufIDO-Aktivität und antivirale Wirkungsweise

untersuchen. Eine Induktion der IDO durch $\text{IFN}\gamma$ ist bereits gut belegt, aber nun soll auch die Wirkung von $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ auf den IDO-induzierten Tryptophanabbau und die damit verbundene antivirale Wirkung untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Agarosegelkammer	Pb 70, Febikon
Autoklav	Dampf-Autoklav, Melag
Blotkammer	LTF-1, LTF Labortechnik
CO ₂ -begaste Brutschränke	B5060 EK/CO ₂ , Heraeus Binder
Elektrophorese-Netzwerkgerät	EPS 301, Amersham pharmacia
ELISA-Reader	Spectra, SLT
Gelelektrophoresekammer	SDS, peQLab
Kühlzentrifugen	Heraeus Megafuge 1.0 R, Heraeus Biofuge 13, Heraeus Biofuge fresco
Lichtmikroskop	Axiovert 100, Zeiss
PCR-Gerät	Peltier-Thermal Cycler 200, Biozym
Pipetten	Finnpipetten, Labsystems
Pipettierhilfe	Pipetboy, Biosciences
Real Time PCR	TaqMan 5700 Sequence Detector, Applied Biosystems
Schüttler	Polymax 1040, Heidolph
Sterile Werkbank	BSB 6A, Gelaire Flow Laboratories
Ultrazentrifuge	Optima-L60, Beckmann
Wasserbad	Laktotherm 1, Dinkelberg; W 6, Preiss-Daimler
Zählkammer	Neubauer

2.1.2 Plastikwaren und sonstige Einwegartikel

Combitips	verschiedene Hersteller
Cryotube	Nunc
MicroAmp Optical	
96 Well TaqMan PCR Platten	Applied Biosystems
MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems
Multiwellplatten steril	Costar
Multiwellplatten unsteril	Greiner
Pipettenspitzen gestopft	Biozym
Pipettenspitzen ungestopft	Polylab
Reaktionsgefäße 1,0 u. 1,5 ml	Eppendorf
Sterilfilter	Millipore, Sterivex
Zellkulturflaschen 25 u. 75 cm ²	Costar
Zellschaber	Greiner
Zentrifugenröhrchen 15 u. 50 ml	Greiner

2.1.3 ChemikalienChemikalien und Lösungen für die Zellkulturen

Laborchemikalien und Farbstoffe wurden erhalten von:

Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Serva, Heidelberg; Sigma, Deisenhofen

Iskove's Medium	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA-Lösung	
0,05/0,02% (w/v)	Seromed, Berlin

Lösungen und Puffer

Alle prozentualen Angaben sind, wenn nicht anders erwähnt, (w/v)-Angaben

Acrylamid-Stocklösung	29,2% Acrylamid; 0,8% N,N'-Methylenbisacrylamid
Anodenpuffer 1	0,03 M Tris; 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	0,3 M Tris; 20% (v/v) Methanol
Blocking-Lösung	1% Blocking Reagenz (Boehringer) gelöst in 1x Maleinsäurepuffer
Cäsiumchlorid-Dichtekissen	5,7 M CsCl; 10 mM EDTA pH 7,5
Church-Puffer	0,25 M Natriumphosphatpuffer; 1 mM EDTA; 7% SDS
Detektionspuffer	0,1 M Tris-HCL pH 9,5; 0,1 Natriumchlorid
6x DNA-Ladepuffer	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene Cyanol 30% Glycerin
Ehrlich's Reagenz	p-Dimethylaminobenzaldehyd gelöst in 96% Essigsäure (12 mg/ml)
Elektrophoresepuffer für Proteingele	50 mM Tris; 0,4 M Glycin; 0,1% SDS
Entfärbelösung	7,5% (v/v) Essigsäure, 20% (v/v) Methanol
Gelfärbelösung	0,1% Coomassie Brilliantblau R 250, 7,5% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol
GSCN-Lösung	4 M GSCN; 0,02 M Natriumacetat pH 5,2; 0,1 mM DTT; 0,5% Natrium-N-Laurosylsarcosinat
Kathodenpuffer	0,025 M Tris; 0,04 M 6-Aminohexansäure; 20% Methanol

5x Maleinsäurepuffer	0,5 M Maleinsäure; 0,75 M Natriumchlorid pH 7,5
Methylenblau-Lösung	0,5 M Natriumacetat pH 5,2; 0,04% Methylenblau
Minimal TE Puffer	1 mM Tris-HCL pH 8; 0,01 mM EDTA
10x MOPS	0,2 M MOPS; 0,08 M Natriumacetat pH 7,4; 0,01 M EDTA
Natriumphosphatpuffer	0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat mit Phosphorsäure auf pH 7,2 eingestellt
PBS pH 7,3	0,8% Natriumchlorid; 0,02% Kaliumchlorid; 0,135% Dinatriumhydrogenphosphat; 0,025% Kaliumhydrogenphosphat
Proteinase K-Mix	100 µg/ml Proteinase K; 5 ml 10-PCR-Puffer; 0,5% Tween 20; 45 ml Aqua dest.
Proteinreagenz-Stammlösung	50 ml Ethanol 97%; 100 ml Phosphorsäure 85%; 100 mg Coomassie Glue G
Ponceau S-Stammlösung	2% Ponceau S; 30% Trichloressigsäure; 30% Sulfosalicylsäure
RNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 0,4% Bromphenolblau; 0,4 Xylencyanol
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCL pH 6,8; 0,1% SDS
5x SDS-Probenpuffer für Proteingele	10% SDS; 0,4 M Tris HCL pH 6,8; 25% (v/v) Glycerin; 5% β-Mercaptoethanol; 0,1% Bromphenolblau
20x SSC TaqMan Universal PCR Master Mix	0,3 M Natriumcitrat; 3 M Natriumchlorid mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt; 200 µM dNTP's und dUTP; 0,025 U/µl HotGoldStar™; 5 mM MgCl ₂

10x TBE-Puffer	0,89 M Tris; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA pH 7,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCL pH 8,8; 0,1% SDS
Trypanblau	0,16% Trypanblau; 0,85% Natriumchlorid in Aqua dest.
Waschpuffer 1	0,04 M Natriumphosphatpuffer; 1% SDS
Waschpuffer 2	1x Maleinsäurepuffer; 0,3% Tween 20

Cytokine

Rekombinantes humanes Interferon γ wurde von R&D Systems, England bezogen.

Rekombinanter humaner Tumor Nekrose Faktor (TNF) α wurde von R&D Systems, England bezogen.

Rekombinantes humanes Interleukin 1 β wurde von R&D Systems, England bezogen.

Chemikalien

L-Tryptophan wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Kynurenin wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.

Ethidiumbromid wurde von Sigma, Deisenhofen bezogen.

2.1.4 Molekularbiologische Kits

ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim)

GeneAmp PCR Reagent Kit (Perkin Elmar)

1st-strandTM cDNA Synthesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA)

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden bezogen von Metabion (Martinsried) und Pharmacia.

IDOUP 5`-TCA GGG AGA CCA GAG CTT TCA CAC-3`; Tm 64,4 °C

IDODO 5`-GCA AAT GCA AGA ACG GGA CAC T-3`; Tm 60,3 °C

Das Primer-Paar IDOUP/IDODO ist spezifisch für das Transkript der IDO. Es liefert Amplifikate mit einer Größe von 464 bp.

GAPDHUP 5`-CAG CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG-3`; Tm 66,0 °C

GAPDHDO 5`-ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC-3`; Tm 66,1 °C

Das Primer-Paar GAPDHUP/GAPDHDO ist spezifisch für das Transkript der GAPDH.

Es liefert Amplifikate mit einer Größe von 892 bp.

INOSDO 5`-TAT AGA ATT CTG GGG CAG CGG GAT GAC TTT-3`; 66,8 °C

INOSUP 5`-TAT AGA ATT CGT GAT GGC CGA CCT GAT GTT GC-3`; 68,2 °C

Das Primer-Paar INOSDO/INOSUP ist spezifisch für das Transkript der iNOS. Bei einer PCR entstehen Amplifikate mit einer Größe von 467 bp.

Primer und Sonden für die Real Time PCR

Die Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG in Ebersberg, die Sonden von der Firma Applied Biosystems aus Weitersberg bezogen.

HSV-1

F-Primer 5`-ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA-3`

R-Primer 5`-AGA A(GT)C GGA AGG AGC CGC-3`

Sonde 1 5`-FAM-CGG AGC GCA GCA GCA TCT CGT CCA-TAMRA-3`

Als Kontrolle wurde uns das HSV-1 Plasmid pSGHSVgB von PD Dr. Adams, Virologie Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

HSV-2

F-Primer 5`-ACC ATG ACC AAG TGG CAG GA-3`

R-Primer 5`-AGA A(GT)C GGA AGG AGC CGC-3`

Sonde 2 5`-FAM-TGG ACG AGA TGC TCC GCG CC-TAMRA-3`

Als Kontrolle wurde uns das HSV-2 Plasmid pSGHSV-2gB von PD Dr. Adams zur Verfügung gestellt.

IDO

F-Primer 5`-CGC CTT GCA CGT CTA GTT CTG-3`

R-Primer 5`-CGG ACA TCT CCA TGA CTC-3`

IDO S-1 Sonde 5`-*FAM*-ATG CAT CAC CAT GGC ATA TGT GTG GG-*TAMRA*-3`

Als Kontrolle diente uns der Vektor pGEMT mit einem 1212 bp großen Insert aus dem IDO Gen.

2.1.6 Antikörper

Anti-IDO-Antikörper

Ein monoklonaler Maus-anti-IDO-Antikörper (IDO-mAk) wurde von Osamu Takikawa, Dept. Of Chemistry and Australian Cataract Research Foundation, University of Wollongong, Australien, zur Verfügung gestellt. Nachweise des IDO-Proteins mit diesem Antikörper sind bereits publiziert (Heyes et al., 1992).

Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus)

Der Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus, IgG und IgM) wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf Zelllinien verwendet.

Die HBMEC (human brain microvascular endothelial cells) wurden uns von Professor Kwang Sik Kim (John Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Diese Zellen wurden aus einer Hirnbiopsieprobe, die bei einer Patientin nach Epilepsiechirurgie entnommen wurde, isoliert. Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften dieser Zelllinie wurden bereits ausreichend beschrieben (Stins et al., 1997).

Im Rahmen meiner Arbeit sollte diese Zelllinie auf das Verhalten nach IFN γ -Stimulation untersucht werden.

Die Zelllinie der HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) wurde aus der Nabelschnurvene gewonnen und von unserer Arbeitsgruppe präpariert und charakterisiert.

Auch diese Zelllinie wurde im Rahmen meiner Arbeit auf mögliche Effekte nach IFN γ -Stimulation untersucht.

Die Zelllinie RT4 (ATCC-Number HTB-2) stammt aus einem humanen uroepithelialen Karzinom und wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) bezogen. Sie wurde von Rigby und Franks (1970) etabliert und von O'Toole (1972) eingehend untersucht. In meiner Arbeit diente diese Zelle als Kontrolle, da sie als iNOS produzierende Zelle beschrieben wird.

Die Zelllinie HeLa S3 wurde ebenfalls von ATCC (Nr. CCL 2.2) bezogen. Es handelt sich hierbei um Zellen von einem humanen Cervixepithelkarzinom, die 1956 von T.T. Puck et al. etabliert und 1956 von S.J. Cיעiura eingehend untersucht wurden.

Die Zelllinie wurde in meiner Arbeit für die Experimente mit HSV-2 verwendet, um die Vorgänge bei einer genitalen HSV-2-Infektion abzubilden.

Die Zelllinie A 549 (ATCC CCL 185) stammt aus einem humanen Lungenkarzinom und wurde 1973 von D.J. Giard et al. etabliert und 1976 von M. Lieber et al. eingehend beschrieben. In meiner Arbeit dienten die Zellen zur Vermehrung und Aliquotierung der *Herpes simplex Virus* Isolate.

2.2.2 Viren

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Herpes Simplex Viren, HSV F (Typ 1) und HSV G (Typ 2) handelt es sich um Laborisolate aus der Universität Bonn. Sie wurden der Düsseldorfer Virologie von Prof. Wolf und Prof. Schneeiß zur Verfügung gestellt.

2.2.3 Kultivierung und Ernte der Zelllinien HBMEC, HeLa S3, RT4

Die Zellen dieser Linien wurden in liegenden 50 ml Zellkulturflaschen der Firma Costar in Heraeus-Brutschränken bei 37 °C in befeuchteter und mit 10% CO₂ angereicherter Atmosphäre in 15 ml Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium kultiviert. Das Medium wurde zudem mit 5% FCS (v/v) angereichert. Durch das Kohlensäure-Bicarbonat-Puffersystem des Kulturmediums wird eine pH-Konstanz gewährleistet.

Die Teilungsrate der Zellen betrug, unter der Voraussetzung eines ausreichenden Nährstoffangebots und Nichterreichens einer konfluierenden Einzelschicht, 1-3 pro Tag. War durch das Wachstum der Zellen eine konfluierende Einzelschicht erreicht, wurden die Zellen geerntet. Da die starke Adhärenz der Zellen ein Ablösen dieser durch Resuspendieren des Kulturmediums verhinderte, wurden die Zellen unter der Verwendung von Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Dazu wurden nach Entfernung des Kulturmediums und einmaligem Spülen mit PBS ca. 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für etwa 5 Minuten zu den Zellen gegeben. Das Trypsin bewirkt ein Andauen und Ablösen der Zellfortsätze vom Flaschenboden und ein

Abrunden der Zellen. Anschließend wurden sie unter Verdünnung und Neutralisierung des Trypsins mit 10 ml Iscove's Medium mit FCS aus der Kulturflasche geerntet und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1200 U/min und 4 °C und zwei Wasch-Schritten mit PBS wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 5-10 ml Medium resuspendiert. Dann wurde die Anzahl der lebenden Zellen in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt. Dazu wurden 100 µl der Zellsuspension mit Trypanblau geeignet verdünnt und das Gemisch in eine Neubauer-Zählkammer pipetiert. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden 1-2 ml der Zelllösung in die alte Kulturflasche mit 15 ml frischem Medium überführt.

2.2.4 Kultivierung und Ernte der Zelllinie HUVEC

Im Folgenden ist die Kultivierung und Ernte der Zelllinie HUVEC beschrieben, sofern sie von dem oben beschriebenen Vorgehen mit den übrigen Zelllinien abweicht.

Da es sich bei den HUVEC um eine native Zelllinie handelt, war es nötig, dem Kulturmedium einige weitere Zusätze beizufügen. Das Iscove's modifizierte Dulbecco's Medium wurde mit einer höheren Konzentration von 10% FCS supplementiert. Außerdem wurde ECGS in einer Konzentration von 50 µg/ml und Heparin in einer Konzentration von 50 µg/ml beigelegt.

Da die HUVEC über eine schwächer ausgeprägte Oberflächenadhärenz als andere Zelllinien verfügen, wurden die Zellkulturflaschen und die Multiwellplatten, die für verschiedene Experimente verwendet wurden, vor der Aussaat der HUVEC entsprechend vorbehandelt.

Zu diesem Zweck wurde 0,1% (w/v) in PBS gelöste Gelatine zunächst steril filtriert. Die gelöste Gelatine wurde in die Zellkulturflaschen bzw. die Multiwellplatten gegeben und für mindestens eine Stunde darin belassen. Im Anschluss erfolgte das Absaugen der verbliebenen Flüssigkeit. Die so behandelten Zellkulturflaschen und Multiwellplatten konnten eine ausreichende Adhärenz der Zellen gewährleisten.

In allen übrigen Punkten wurde die Kultivierung und Ernte der HUVEC durchgeführt, wie für die übrigen Zelllinien beschrieben.

2.2.5 Aliquotierung der Viren

Hierzu wurden humane Lungenkarzinomzellen der Zelllinie A 549 in 20 ml Iscove's Medium mit 10% FCS angezüchtet und nach drei Tagen mit 100 µl der oben beschriebenen HSV F bzw. HSV G Isolate beimpft. Nach 2-3 Tagen Inkubationszeit waren die Kulturen durchinfiziert und die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1800 U/min abzentrifugiert.

Der Überstand wurde dann zu je 0,5 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.6 IDO-Aktivitätsmessung

Alle funktionellen Tests wurden in 96-well Flachboden-Mikrotiterplatten (Costar) angesetzt. Das Endvolumen in den Vertiefungen betrug, wenn nicht anders erwähnt, immer 200 µl. Alle eingesetzten Cytokine und Chemikalien wurden in Iscove's Medium gelöst. Bei den angegebenen Konzentrationen von Cytokinen und Chemikalien handelt es sich immer um die für den Test erforderlichen Endkonzentrationen.

Für die IDO-Aktivitätsmessung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe von rekombinatem humanen Interferon γ von 1000 U/ml bis 0 U/ml (Kontrolle) vorgelegt, jeder Wert als Dreifachbestimmung. In manchen Versuchen wurde zusätzlich noch TNF α oder IL-1 β in einer Konzentration von 100 U/ml dazu pipettiert. Dann wurden 3×10^4 Zellen pro Vertiefung in 50 µl Medium zugegeben.

Um den Test mit Substrat anzureichern, wurde noch L-Tryptophan in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Das Kulturmedium selbst enthielt ca. 15 µg/ml Tryptophan. Die Anreicherung diente dem Zweck, möglichst viel von dem Endprodukt Kynurenin zu erhalten,

um die IDO-Aktivität gut darstellen zu können und die photometrische Auswertung zu erleichtern.

Die Testansätze wurden für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dann wurden 160 µl des Überstandes in eine Spitzbodenplatte pipetiert und 10 µl Trichloressigsäure (30%) zugesetzt, um vorhandene Proteine auszufällen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation in einem 50 °C warmen Wasserbad. Die ausgefällten Proteine wurden 10 Minuten bei 1800 U/min abzentrifugiert. Dann wurden 100 µl des Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt und mit 100 µl Ehrlich's Reagenz versetzt. Anschließend wurde die Absorption bei 492 nm im ELISA-Photometer (SLT Labinstruments, Crailsheim) gemessen.

Ehrlich's Reagenz reagiert mit Kynurenin zu einem gelben Azofarbstoff. Die Stärke der Absorption bei 492 nm repräsentiert die Menge an gebildetem Kynurenin (Däubener et al., 1994)

Um die Absorptionswerte in eine Kynureninkonzentration umrechnen zu können, wurde ein Kynureninstandard erstellt.

Zu diesem Zweck wurde Kynurenin in Iscove's Medium gelöst und in einer Flachbodenplatte eine Verdünnungsreihe erstellt, beginnend bei 200 µg/ml Kynurenin bis 0 µg/ml Kynurenin (Kontrolle). Das Volumen pro Vertiefung betrug 200 µl und die einzelnen Konzentrationen wurden wiederum als Dreifachbestimmung vorgelegt.

Je 160 µl der einzelnen Ansätze wurden nun in eine Spitzbodenplatte übertragen. Nach dem Zusatz von 10 µl Trichloressigsäure (30%) erfolgte die 30 minütige Inkubation in einem 50 °C warmen Wasserbad. Nach einer Zentrifugation der Ansätze bei 1800 U/min konnten 100 µl des gewonnenen Überstandes in eine Flachbodenplatte überführt werden und mit 100 µl Ehrlich's Reagenz versetzt werden. Die Auswertung erfolgte wiederum im ELISA-Photometer.

Anhand der gewonnenen Standardkurve konnten nun die Ergebnisse der einzelnen IDO-Aktivitätstests in Kynureninkonzentrationen umgerechnet werden.

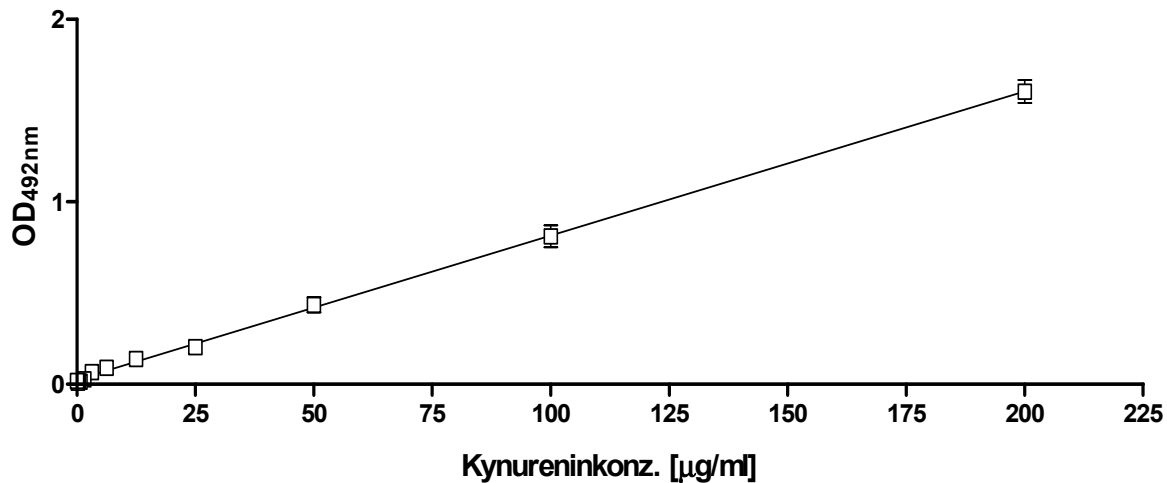


Abb. A1: Kynureninstandard

Durch eine Verdünnungsreihe von Kynurenin und anschließende Behandlung wie bei einer IDO-Aktivitätsmessung konnte der hier abgebildete Standard erstellt werden. Mit seiner Hilfe war es möglich, die Werte für die optische Dichte, die bei den IDO-Aktivitätstests anfielen, in die Konzentration an produziertem Kynurenin, angegeben in µg/ml, umzurechnen.

2.2.7 RNA-Präparation

Lösungen, die für Experimente mit RNA bestimmt waren, wurden immer mit 0,1% DEPC versetzt und nach Inkubation über Nacht autoklaviert (121 °C, 30 Minuten). Wenn der Zusatz von DEPC oder das Autoklavieren nicht möglich war, z.B. wenn Tris oder DTT enthalten waren, wurden die Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt. Alle Schalen und Gefäße, die mit RNA in Kontakt kamen, wurden vorher mit 3% Wasserstoffperoxid und DEPC-Wasser gespült.

Die gewählte Methode zur Präparation von Gesamt-RNA war die Guanidiniumthiocyanat-Methode mit anschließender Ultrazentrifugation in Cäsiumchlorid (Chirgwin et al., 1979). Die Methode wurde, mit leichten Modifikationen, wie von Sambrook et al. (1989) beschrieben, durchgeführt. 5×10^6 Zellen der Zelllinie HBMEC, RT4 und HeLa S3 wurden in 10 ml Kulturflaschen mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener Cytokine stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Nach 6-8 Stunden Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen dreimal mit ca. 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 4 ml Guanidinthiocyanat lysiert. Das Lysat wurde in Greiner-Röhrchen überführt und die Flaschen mit 3 ml DEPC-Wasser ausgespült, um das Zellysate quantitativ entfernen zu können. Diese 3 ml wurden mit 4 ml Lysat vereinigt.

In einem Polyallomer-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann) wurden 3 ml Cäsiumchlorid vorgelegt. Das Cäsiumchlorid wurde mit dem gesamten Lysat vorsichtig überschichtet. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit Parafinöl bis zum Rand gefüllt und austariert. Es folgte eine Zentrifugation (Ultrazentrifuge Beckmann Optima L60) bei 33000 rpm und 23 °C für 16 Stunden im SW41Ti-Rotor (Beckmann). Da RNA in Cäsiumchlorid eine höhere Schwebeschicht als andere Zellbestandteile hat, formt sie bei dieser Methode ein Pellet, während DNA, Membranlipide und Proteine im Überstand verbleiben.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und der Boden der Röhrchen mit einer glühenden Skalpellklinge abgetrennt. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, in 15 µl Tris HCL Puffer (pH 7,5) gelöst und die Lösung bei -80 °C aufbewahrt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden photometrisch bei 260 nm bzw. 280 nm bestimmt (DNA/ RNA Calculator II, Pharmacia Biotech). Die RNA wurde für weitere Versuche nur verwendet, wenn der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm $\geq 1,7$ war.

2.2.8 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase (RT) PCR diente der Überprüfung, ob mRNA-Transkripte der Enzyme IDO oder iNOS in den unstimulierten bzw. stimulierten Zellen vorhanden waren. Als Kontrolle diente der Nachweis der mRNA von GAPDH, eines Glykolyseenzym, welches in jeder kernhaltigen Zelle konstitutiv exprimiert wird.

Die cDNA-Erststrang Synthese erfolgte mit dem 1st-strand cDNA Synthesis Kit nach Anleitung des Herstellers. Dazu wurden 0,4-1 µg Gesamt-RNA in 11,5-12,1 µl DEPC-Wasser gelöst und 1 µl oligo-dT₁₈-Primer zugesetzt. Das Gemisch wurde für 2 Minuten auf 70 °C erhitzt und sofort danach auf Eis gestellt. Dann wurden zu jedem Ansatz 4 µl Puffer, 1 µl dNTP-Mix, 0,5 µl rekombinanter Rnase-Inhibitor und 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase zupipetiert. Die Ansätze wurden dann für eine Stunde auf 42 °C und anschließend für 4 Minuten auf 96 °C erhitzt. Abschließend wurden die Ansätze auf Eis gekühlt und mit 80 µl DEPC-Wasser auf 100 µl Gesamtvolumen verdünnt.

Für die nachfolgende PCR wurden 5 µl des Erststrang-Ansatzes als Template eingesetzt. Das Gesamtvolumen der PCR-Ansätze betrug 50 µl. Die Primer (siehe 2.1.5) wurden mit einer Endkonzentration von 0,4 µM eingesetzt. Verwendet wurde der ExpandTM High Fidelity Polymerase-Mix, wobei 5 µl MgCl₂ (Ek 1,5 mM) Haltige Expand HF Puffer, 8 µl dNTP's (Ek 2,5 mM), 0,5 µl Polymerase und 35,1 µl DEPC-Wasser und 0,2 µl je Primer pipetiert wurden.

Die Amplifikation erfolgte im Peltier Thermal Cycler 200 (Biozym) nach folgendem Zykluschema:

1. 3 Minuten 95 °C
2. 30 Sekunden 95 °C
3. 45 Sekunden 64 °C
4. 1 Minute 72 °C
5. 30 malige Wiederholung der Schritte 2-4
6. 4 Minuten 72 °C
7. Kühlung bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung

2.2.9 DNA-Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurde in 1,5% Agarosegelen mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Als Puffer diente 1xTBE. 15 µl der DNA Proben wurden mit 3 µl DNA-loading-buffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene Cyanol; 30% Glycerin)

vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard dienten die „1 kb DNA ladder“ und die „100 bp DNA ladder“ der Firma GibcoBRL.

Die Gele mit den Fragmenten aus der RT-PCR wurden anschließend mit dem Gelaufnahmegerät „Modul-Digit-Store-Duo“ (Intas, Göttingen) bei 340 nm fotografiert.

2.2.10 Proteinpräparation und Bestimmung der Konzentration

Für einen Nachweis der IDO auf Proteinebene wurden 3×10^6 Zellen der zu untersuchenden Zelllinie in 25 cm²-Flaschen überführt, mit verschiedenen Kombinationen der einzelnen Cytokine in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und danach drei Tage im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen.

Nach drei Tagen wurden die Zellen geerntet, abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet dreimal in Stickstoff getaucht und danach jeweils schnell wieder in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und danach in 100 ml A. dest. überführt. Durch diesen Vorgang wurden die Zellen lysiert. Das Lysat wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und 10 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde für nachfolgende Versuche verwendet.

Um die Konzentration der Proteine im Überstand zu bestimmen, wurde die Methode von Bradford (Bradford 1976) angewendet. Zur Erstellung der Eichgeraden wurde bovines Serum-Albumin (BSA) eingesetzt.

2.2.11 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in 9,5%tigen Polyacrylamidgelen (Dicke 0,8 mm) mit 0,1% SDS nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Vor dem Auftragen wurden 30 µg Protein für 10 Minuten bei 95 °C in

Probenpuffer denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte entweder bei 100 V im Sammelgel (siehe 2.1.3) und 250 V im Trenngel (siehe 2.1.3) oder bei 40 V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Low Range Standard“ (14,4-97,4 kDA) der Firma Biorad. (Hercules, CA, USA)

Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden die Trenngele für 1-2 Stunden in Gelfärbelösung (siehe 2.1.3) inkubiert. Zur Entfärbung des proteinfreien Hintergrundes wurde die Entfärbelösung eingesetzt.

2.2.12 Western Blot

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurde in Anlehnung an Kyhse-Andersen (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt. Bei diesem „semidry-transfer“ wurde ein Gel-Membran-Sandwich mit puffergetränkten Filterpapieren (Whatman 3 MM) zwischen die Elektroden einer Western Blot-Kammer (Carboglas, Schleicher & Schuell, Dassel) platziert und die Proteine elektrophoretisch eluiert.

Direkt nach der Elektrophorese wurden Gel, Membran (Protran, Schleicher & Schuell) und Filterpapiere in der folgenden Reihenfolge auf der Kathode der Blot-Kammer übereinander geschichtet:

1. 3 Filter, getränkt in Kathodenpuffer
2. Polyacrylamidgel
3. Nitrozellulosemembran, befeuchtet mit Anodenpuffer 1
4. 3 Filter, getränkt in Anodenpuffer 1
5. 3 Filter, getränkt in Anodenpuffer 2

Der Proteintransfer erfolgte bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche für 45 Minuten.

2.2.13 Ponceau S-Färbung

Um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen auf die Membran transferiert wurden, wurde die Membran direkt nach dem Transfer für ca. 5 Minuten mit Ponceau S-Lösung gefärbt (Stammlösung 1:10 verdünnt mit A. dest.). Anschließend wurde die Membran so lange gewässert, bis die gewünschte Färbung erreicht war. Der Membrananteil mit dem Molekulargewichtsstandard wurde abgetrennt und die Banden markiert. Sowohl hier als auch auf dem Membranteil mit den Proben wurde die Lauffront nachgezeichnet.

2.2.14 Immunologischer Nachweis der IDO

Die Membran wurde für eine Stunde mit Blockpuffer (5% (w/v) Milchpulver in PBS) und anschließend für eine Stunde mit dem monoklonalen anti-IDO-Antikörper, 1:4000 verdünnt in Blockpuffer, inkubiert. Nach dreimaligem 5 minütigem Waschen mit PBS wurden gebundene Antikörper mit einem entsprechenden HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus, IgG und IgM, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA; siehe 2.1.6) für eine Stunde markiert (1:2500 verdünnt in Blockpuffer). Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde für eine Minute ein Chemilumineszenzsubstrat (ECL Amersham, Buckinghamshire, England) auf die Membran gegeben. Die Visualisierung erfolgte durch enzymatischen Umsatz des Substrats und Exposition mit Röntgenfilm.

2.2.15 Real Time PCR

In meiner Arbeit wurde der Gene Amp 5700 Sequence Detector der Firma Applied Biosystems zur quantitativen Real Time PCR Bestimmung benutzt. Die Funktion dieser

Methode beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals, das während der Amplifikation entsteht. Hierfür wurden Sonden benutzt, die an ihrem 5'-Ende 6-FAM (6-Carboxyfluorescein), einen Reporter Fluoreszenzfarbstoff, und am 3'-Ende TAMRA (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin) als Quencher gebunden hatten. An die Sonde gebunden, war der Quencher in der Lage das vom Reporter ausgehende Signal zu unterdrücken.

Erst beim Polymerisations-Abschluss ist die Entfernung zwischen Reporter-Farbstoff und Quencher so groß, dass der hemmende Einfluss des Quenchers nicht mehr ausreicht, das Farbsignal vom Reporter zu unterdrücken.

Die Funktion des Gerätes beruht auf einem Linsensystem und einer Kamera, die die entstehende Fluoreszenz alle 7 Sekunden aufnimmt und zur Software des Computers weiterleitet. Als C_t - (threshold cycle) Wert bezeichnet man den Punkt, an dem die Intensität der Reporterfluoreszenzemission die des Hintergrundes überschreitet.

Der C_t -Wert liegt in der frühen exponentiellen Phase der Reaktion und ist als Messwert zuverlässiger als die Endpunktmessung der traditionellen PCR (Deborah S. Grove, 1999). Der C_t -Wert ist dabei umgekehrt proportional zu der Anzahl der Kopien der zu untersuchenden DNA. Benutzt man jetzt mehrere Standards mit bekannter Kopienzahl, so lässt sich über die C_t -Werte die genaue Kopienzahl der Proben errechnen.

2.2.16 HSV Real Time PCR

Diese Methode wurde in meiner Arbeit dazu benutzt, die HSV-Replikation unter verschiedenen Stimulationsbedingungen objektiv zu bestimmen.

Hierzu wurden in 96-Wellplatten 3×10^4 Zellen vorgelegt und mit verschiedenen Konzentrationen unterschiedlicher Cytokine, jeweils als Doppeltansatz, stimuliert. Dies erfolgte immer mit und ohne L-Tryptophan (jeweils 100µg/ml bei Ansatz des Versuches und nach 72 Stunden Inkubationszeit) Supplementation und einer Kontrolle mit unbehandelten Zellen. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit einer konstanten

Viruskonzentration beimpft. Nach weiteren drei Tagen Inkubation wurden die Platten zuerst mikroskopisch ausgewertet und dann der Überstand in den einzelnen Wells vorsichtig abgesaugt. Danach erfolgte eine Zugabe von 100 µl PBS in jede Vertiefung. Nach mehrmaligem Einfrieren und wieder Auftauen, um die Zelladhärenz zu lösen, wurden die einzelnen Ansätze mehrfach resuspendiert und in Eppendorf-Gefäße überführt. Hiernach erfolgte eine weitere Zugabe von 100 µl PBS pro Well und erneutes Resuspendieren, um sicherzustellen, dass keine Zellen zurückblieben. Hierbei erfolgte ein Poolen der Doppeltansätze. Nach 13 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde der Überstand erneut abgesaugt und das Zellpellet in 25 µl PBS und 50 µl Proteinase K-Mix aufgenommen. Die Proben wurden dann für 60 Minuten auf 56 °C und danach für 30 Minuten auf 96 °C erwärmt. Zur Messung der Proben wurde ein Standardschema aus der Diagnostik der Virologie der Düsseldorfer Universität verwendet. Hierzu wurden in jede Vertiefung einer 96 Well MicroAmp Optical Platte der Firma Applied Biosystems 25 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 5 µl HSV-TypF-Primer (300 nM), 5 µl HSV-TypR-Primer (300 nM) und 5 µl Aqua dest. vorgelegt. Dazu kamen dann entweder 5 µl HSV-Typ1-Sonde (100 nM) oder 5 µl HSV-Typ2-Sonde (200 nM) und 5 µl der zu messenden Probe. Als Standardkontrollen dienten hierbei die von PD Dr. Adams (Virologie Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellten Plasmide pSGHSVgB (HSV1) und pSGHSV-2gB (HSV2) in einer Kopienzahl von 5000, 500, 50 und 0, jeweils im Doppeltansatz. Um Verunreinigungen zu vermeiden wurde an einer separaten sterilen Werkbank und mit sterilem Kittel und Handschuhen gearbeitet. Die virushaltigen Proben wurden immer als Letztes in einem anderen Raum dazu pipettiert. Zum Verschließen der Wells dienten MicroAmp Optical Caps der Firma Applied Biosystems. Es folgte eine zweistündige, 40 Zyklen lange Messung im Gene Amp 5700 Sequence Detector (Applied Biosystems) und eine Auswertung in der dazu gehörigen Software.

2.2.17 IDO Real Time PCR

Um die nicht quantitativen Ergebnisse der RT-PCR zu quantifizieren, diente uns in dieser Arbeit die IDO Real Time PCR. Hierzu wurden zunächst cDNA-Stränge synthetisiert, wie es zuvor zur Bestimmung der mRNA-Synthese mittels RT-PCR geschehen war (siehe 2.2.8). Auch hier konnte der oben beschriebene Real Time PCR Standardansatz benutzt werden. Als Probe dienten uns je 5 µl der jeweiligen cDNA. Der IDO-F-Primer und der IDO-R-Primer (siehe 2. 1.5) wurden in einer Endkonzentration von 300 nM, die IDO S-1-Sonde in einer Endkonzentration von 200 nM, eingesetzt. Als Standard wurden 5000, 500 50 und 0 Kopien eines Ido-Plasmids (siehe 2.1.5) benutzt. Auch hier wurde die Fluoreszenzabgabe über 40 Zyklen gemessen und danach ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase durch Interferon- γ in HBMEC

Die nach IFN γ -Stimulation erfolgende Tryptophandegradation durch die Induktion derIDO konnte bereits in vielen Zelllinien als potenter antimikrobieller Effektormechanismus nachgewiesen werden. Zunächst wurde untersucht, ob dieser Mechanismus auch in den im Rahmen meiner Arbeit verwendeten HBMEC aktiv ist. Diese Untersuchung erfolgte zu Beginn auf mRNA-Ebene mittels einer RT-PCR. Nach einer 6-8-stündigen Stimulation der Zellen allein mit IFN γ , oder aber in verschiedenen Kombinationen mit TNF α und/oder IL-1 β , erfolgte die Präparation der RNA, wie unter 2.2.7 beschrieben. Anschließend wurden die cDNA-Erststrangsynthese (2.2.8), die Amplifikation (2.2.8) und die Gelelektrophorese durchgeführt. Das Ergebnis einer solchen RT-PCR ist in Abbildung 1 aufgeführt.

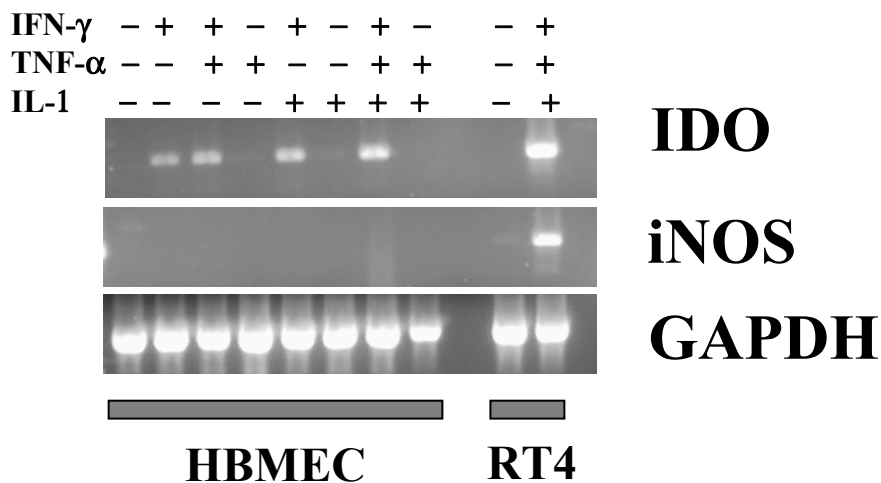


Abb. 1: IDO mRNA Nachweis in HBMEC

Hier sind die Ergebnisse einer RT-PCR zum Nachweis der mRNA von IDO, iNOS und GAPDH in verschiedenen stimulierten HBMEC dargestellt. Die mRNA wurde mit Oligo-dT-Primern in cDNA umgeschrieben und anschließend mit den unter 2.1.5 aufgeführten Oligonukleotiden als Primer amplifiziert. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel. Zum Vergleich wurden Daten der Urothelkarzinomzellen RT4 aufgeführt. Wie in der Beschriftung zu ersehen erfolgten die Stimulationen mit verschiedenen Kombinationen von IFN γ , TNF α und IL-1 β .

Zu sehen ist hier, dass die HBMEC, die unstimuliert keine nachweisbare IDO-mRNA produzieren, durch Stimulation mit IFN γ zur Expression der IDO mRNA angeregt werden können. Ebenfalls ist ersichtlich, dass sich die mRNA-Expression noch verstärken lässt, wenn eine Kostimulation der Zellen mit TNF α und/oder IL-1 β durchgeführt wird. Ohne gleichzeitige Stimulation mit IFN γ waren diese Zytokine jedoch nicht in der Lage, eine IDO-mRNA-Synthese zu induzieren. Auf diesen kostimulatorischen Effekt durch verschiedene Zytokine werde ich im weiteren Verlauf der Arbeit noch eingehen.

In dem durchgeführten Experiment wurde zusätzlich noch die Produktion von iNOS-mRNA untersucht. Die Induktion der iNOS durch IFN γ -Stimulation mit konsekutiver Erzeugung von NO konnte in vielen murinen und einigen humanen Zelllinien bereits als wirkungsvoller antimikrobieller Effektormechanismus nachgewiesen werden. Ebenfalls ist bekannt, dass sich die NO-Produktion negativ auf die Tryptophandegradation durch die IDO auswirkt. Aus der durchgeführten RT-PCR ist jedoch zu erkennen, dass in den HBMEC unter den verschiedenen Stimulationen keine Produktion von iNOS-mRNA nachweisbar ist. Als Positivkontrolle wurden hier auch Zellen der Urothelkarzinomzelllinie RT4 untersucht, deren iNOS-Aktivität nach IFN γ -Stimulation bereits in unserer Arbeitsgruppe bestätigt wurde. Auch in diesem Experiment zeigen die RT4- Zellen wie erwartet neben der Synthese von IDO-mRNA ebenfalls eine Expression der iNOS-mRNA.

Als weitere Kontrolle wurden alle Zellen auch auf die Expression von GAPDH-mRNA untersucht. Da es sich bei der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) um ein konstitutiv exprimiertes Glykolyseenzym handelt, muss deren mRNA gleichsam in stimulierten und unstimulierten Zellen vorhanden sein. Wie erwartet konnte dieses Ergebnis durch die RT-PCR bestätigt werden.

Nachdem eine Induktion der iNOS durch IFN γ in den HBMEC durch die durchgeführte RT-PCR ausgeschlossen werden konnte, konzentrierte ich mich im Folgenden auf die Induktion der IDO. Zunächst wurde untersucht, ob aus der Synthese der IDO-mRNA auch eine Aktivität

des entsprechenden Enzyms resultiert. Zu diesem Zweck wurde das durch IDO-Aktivität aus Tryptophan erzeugte Kynurenin mit Hilfe des Ehrlich-Reagenz photometrisch im Zellüberstand von unterschiedlich stark stimulierten Kulturen HBMEC gemessen. Diese Messung ist möglich, weil das intrazellulär erzeugte Kynurenin in den Extrazellulärraum abgegeben und nicht weiter degradiert wird. Die Ergebnisse mehrerer Experimente sind in Abbildung 2 zusammenfassend dargestellt.

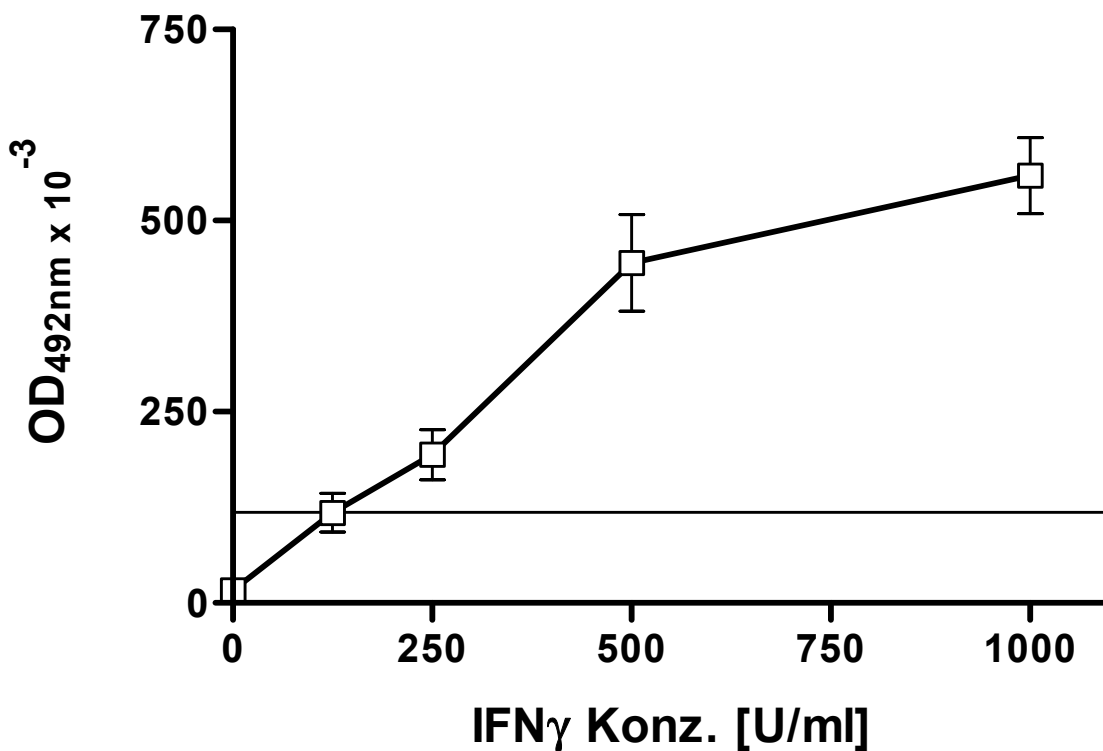


Abb. 2: IDO-Aktivität in IFN γ -stimulierten HBMEC

In diesem Experiment wurden 3×10^4 Zellen HBMEC pro Vertiefung ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Die Tests wurden zusätzlich mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan supplementiert, um möglichst viel von dem Reaktionsprodukt Kynurenin zu erhalten. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Kynurenins wie unter 2.2.6 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Die waagerechte Linie gibt die optische Dichte an, die nach Umrechnung mit Hilfe eines Standards einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin entspricht. Bei dieser Konzentration ist das gesamte, in einem un-supplementierten Kulturmedium enthaltene Tryptophan zu Kynurenin umgesetzt.

Aus diesen Experimenten ist zu ersehen, dass die HBMEC nach IFN γ -Stimulation eine deutliche IDO-Aktivität zeigen. Die Kynureninproduktion ist konzentrationsabhängig, durch höhere Dosen IFN γ kann eine stärkere IDO-Aktivität induziert werden. Allerdings nähert sich die dargestellte Kurve zwischen Konzentrationen von 500 und 1000 U/ml IFN γ einem Plateau an. Ein stärkerer Abbau des Tryptophan scheint durch alleinige Stimulation mit IFN γ nicht möglich zu sein. Rechnet man die Werte der photometrisch gemessenen optischen Dichte mit Hilfe eines Standards (siehe Abb. A1) in Kynureninkonzentrationen um, so ergibt sich, dass bei einer Stimulation mit 1000 U/ml IFN γ ca. 50-60% des supplementierten Tryptophan zu Kynurenin abgebaut werden konnte. Gleichzeitig zeigt die Abbildung, dass nach einer Stimulation mit >125 U/ml IFN γ das normalerweise im Medium vorhandene Tryptophan (ca. 15-17 μ g/ml, siehe Horizontale in der Abbildung) vollständig abgebaut wird.

3.2 Induktion antiviraler Effekte in HBMEC durch IFN γ

Durch die vorangegangenen Experimente konnten die Synthese der IDO-mRNA und auch die Aktivität des entsprechenden Enzyms ausreichend nachgewiesen werden. Die IFN γ -induzierte Tryptophandegradation durch die IDO konnte schon in vielen Zelllinien als wirkungsvoller Abwehrmechanismus gegen bakterielle, parasitäre und virale Krankheitserreger nachgewiesen werden. Im Rahmen meiner Arbeit beschäftigte ich mich besonders mit den antiviralen Effekten der IDO-Aktivität. Die HBMEC bilden in vivo einen wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke. Aus diesem Grunde interessierte mich vornehmlich ihre antivirale Aktivität gegen einen bekannten viralen Enzephalitiserreger. Folglich wählte ich für meine Experimente das Herpes-Simplex-Virus Typ1 (HSV-1), das die genannten Kriterien erfüllt. Um ausreichende Mengen an Viren für die durchzuführenden Experimente zu erhalten, wurde zunächst der HSV-1 Stamm auf Lungenepithelkarzinomzellen vermehrt und im Anschluss zu je 40 Portionen à 1ml bei -80°C eingefroren. Durch eine Real Time PCR wurde die Anzahl

der viralen DNA Kopien in den Aliquots bestimmt. Zur Messung der Anzahl der Viruskopien wurde das Plasmid pSGHSVgB verwendet, das PD Dr. Adams (Virologie Universität Düsseldorf) zur Verfügung stellte, um einen Standard für die genaue Bestimmung der Viruszahlen zu erhalten. In den Kopienzahlen 5000, 500, 50, und 0, jeweils im Doppeltansatz eingesetzt, diente es bei den nachfolgenden Experimenten als Standard. Die Virus-Kopienzahl in der Stammlösung lag bei ca. 1×10^6 Kopien/ μ l

In den folgenden Versuchen sollte zunächst untersucht werden, ob eine Replikation des HSV-1 in den HBMEC möglich ist. Danach sollte überprüft werden, ob ein mögliches Viruswachstum durch Stimulation der Zellkulturen mit IFN γ gehemmt werden konnte. Sollte eine solche Hemmung des Viruswachstums vorhanden sein, so muss im Anschluss überprüft werden, ob diese durch einenIDO-vermittelten Tryptophanabbau bedingt ist. Zu diesem Zweck sollte überprüft werden, ob eine mögliche Hemmung des Viruswachstums durch Zugabe von Tryptophan zu den Kulturen antagonisiert werden kann.

Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängig durchgeführten Real Time PCRs. Die HBMEC wurden über drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von IFN γ vorstimuliert. Bei einem Teil der Kulturen erfolgte beim Ansatz eine Zugabe von Tryptophan im Überschuss. Nach der Vorinkubation erfolgte die Virusinfektion in einer konstanten Verdünnung der Stammkultur (10^{-5}) und die weitere Inkubation über drei Tage. Zunächst erfolgte dann die mikroskopische Auswertung des Viruswachstums durch Beurteilung des cytopathischen Effektes und in Folge die Präparation der Ansätze und Durchführung der Real Time PCR, wie unter 2.2.16 beschrieben.

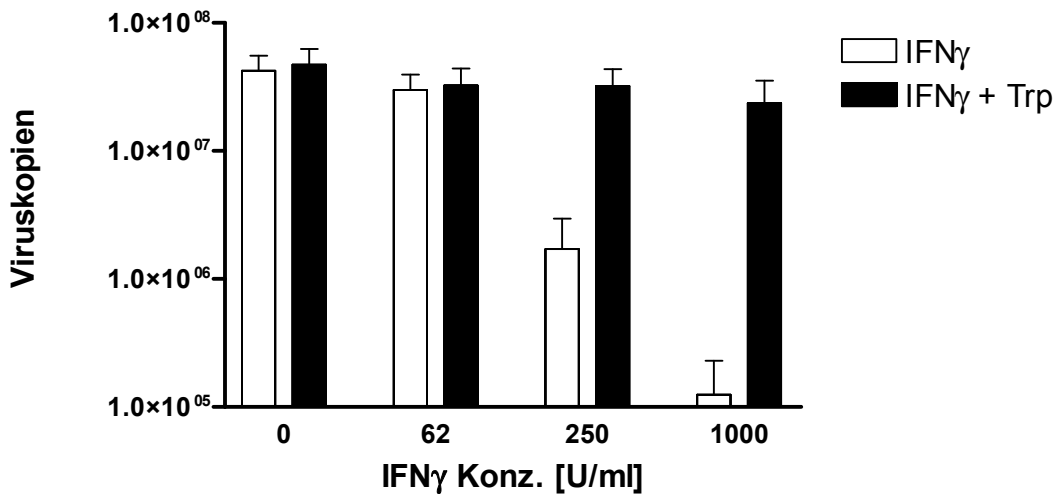


Abb. 3: IFN γ -induzierte Hemmung der HSV-1-Replikation in HBMEC

In diesen Experimenten wurden 3×10^4 HBMEC Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Die Hälfte der Einzelansätze wurde jeweils beim Ansatz der Kulturen und nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan supplementiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Infektion der Zellen mit einer konstanten Virusmenge (10^{-5} Verdünnung der HSV-1 Stammkultur). Nach erneuter Inkubation über 72 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und die Virusmenge wie unter 2.2.16 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit Standardabweichungen.

Bei den durchgeführten Experimenten ist gut zu erkennen, dass die Stimulation der Zellen mit IFN γ zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Viruswachstums führt. Durch Stimulation der HBMEC mit kleinen Dosen IFN γ (62 U/ml) kann noch kein Effekt auf die Virusreplikation beobachtet werden. Steigert man die IFN γ -Konzentration jedoch auf 250 U/ml, so ist bereits eine deutliche Hemmung des HSV-1-Wachstums nachzuweisen, die schon eine Zehnerpotenz beträgt. Bei einer Stimulation mit 1000 U/ml IFN γ ist sogar eine Hemmung der Virusvermehrung um ca. zweieinhalb Zehnerpotenzen zu verzeichnen. Dies entspricht einer Verminderung des Viruswachstums um >99%.

Die in Abbildung 3 schwarz gefärbten Balken stellen die Stärke der Virusvermehrung für die Kulturen dar, die zusätzlich zur IFN γ -Stimulation noch mit Tryptophan supplementiert

wurden. Hier wird ersichtlich, dass die Zugabe von Tryptophan den hemmenden Effekt des IFN γ auf die HSV-1-Replikation vollständig aufhebt. Daraus kann gefolgert werden, dass der IFN γ -vermittelte antivirale Effekt durch eine Tryptophandepletion in Folge der gesteigerten IDO-Aktivität bedingt ist.

Die Zugabe von Tryptophan im Überschuss konnte nämlich eine vollständige Aufhebung der IFN γ -vermittelten Virushemmung erreichen.

Obwohl in Abbildung 2 gezeigt wurde, dass eine Stimulation mit 1000 U/ml IFN γ nur einen Abbau von ca. 50-60% des vorhandenen Tryptophans bewirkt, reicht eine solche Stimulation aus, um eine Hemmung des Viruswachstums zu ermöglichen. Dies kann zum einen dadurch erklärt werden, dass bei den Ansätzen zur Messung der IDO-Aktivität zusätzlich eine Zugabe von Tryptophan in einer Konzentration von 100 μ g/ml erfolgte, um eine größere Menge des nachzuweisenden Reaktionsproduktes Kynurenin zu erhalten. Die Kulturen, die bei der Infektion mit HSV-1 eine Verminderung des Viruswachstums zeigten, wurden nicht mit Tryptophan supplementiert. Hier fand sich nur eine Tryptophankonzentration von 15-17 μ g/ml im Kulturmedium. Zum anderen wurde die Messung der Kynureninproduktion nach drei Tagen Inkubationszeit durchgeführt. Die Kulturen, in denen das Viruswachstum untersucht wurde, wurden erst nach drei Tagen Vorinkubation mit dem Virus infiziert und im Folgenden nochmals über drei Tage inkubiert. Durch diese längere Inkubationszeit konnte natürlich auch über eine längere Zeit Tryptophan durch die in den Zellen induzierte IDO-Aktivität abgebaut werden.

3.3 Regulation der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität durch TNF α

Bereits in der in Abbildung 1 gezeigten RT-PCR ist zu vermuten, dass HBMEC, die neben IFN γ zusätzlich mit TNF α stimuliert wurden, eine stärkere IDO-Expression zeigten. Daraus kann gefolgert werden, dass bei diesen Stimulationsbedingungen in den HBMEC mehr IDO-

mRNA transkribiert wird und IDO Protein produziert wird. Deshalb untersuchte ich im Folgenden, ob in den mit $\text{TNF}\alpha$ kostimulierten HBMEC auch eine stärkere IDO-Aktivität über eine verstärkte Kynureninproduktion nachzuweisen ist. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse aus drei verschiedenen Experimenten zusammengefasst. Dargestellt ist erneut eine photometrische Messung des Kynurenins im Zellüberstand durch Verwendung des Ehrlichreagenzes. Neben der Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von $\text{IFN}\gamma$ erfolgte in diesen Experimenten die Kostimulation mit einer konstanten Dosis von $\text{TNF}\alpha$ (100 U/ml). Zusätzlich sind die Ergebnisse für die alleinige Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ dargestellt.

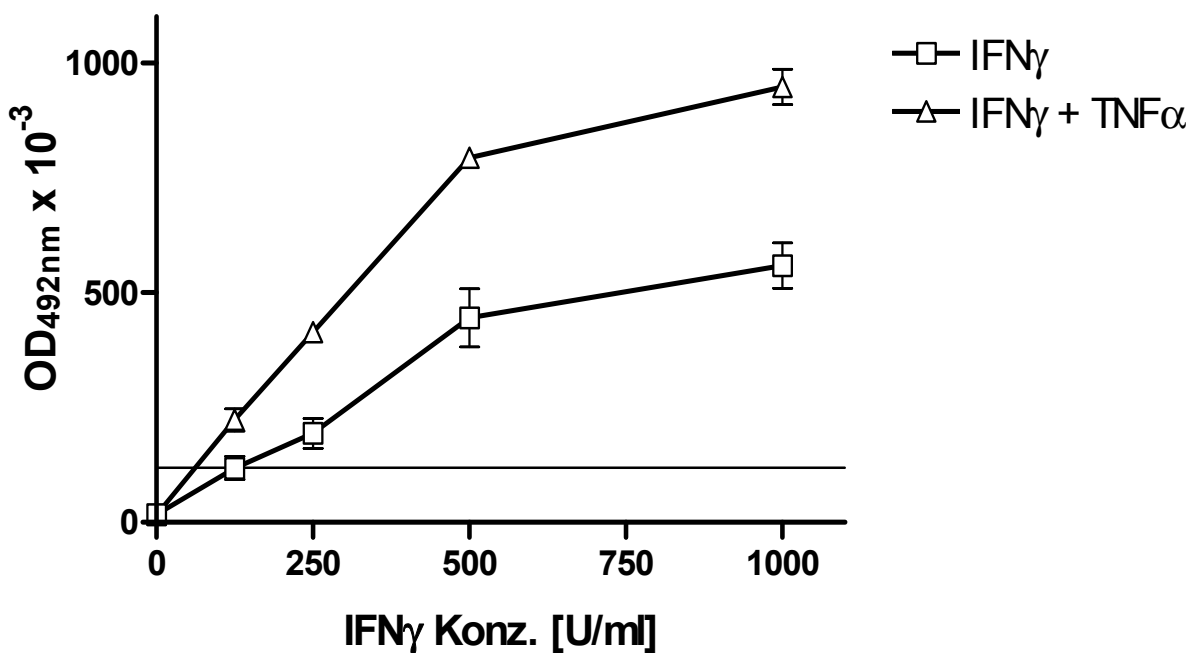


Abb. 4: Regulation der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität durch $\text{TNF}\alpha$ in HBMEC

In diesen Experimenten wurden erneut 3×10^4 Zellen HBMEC pro Vertiefung ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Neben der Supplementierung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan erfolgte zusätzlich die Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ in einer konstanten Dosis von 100 U/ml. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Kynurenins wie unter 2.2.6 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die waagerechte Linie gibt die optische Dichte an, die nach Umrechnung mit Hilfe eines Standards einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin entspricht. Bei dieser Konzentration ist das gesamte, in einem un-supplementierten Kulturmedium enthaltene Tryptophan zu Kynurenin umgesetzt.

Aus der gezeigten Abbildung ist klar zu ersehen, dass eine Kostimulation mit TNF α die IDO-Aktivität in den HBMEC stark steigern kann. Bei der Stimulation der Zellen mit Konzentrationen von 250-1000 U/ml IFN γ verstärkt die Kostimulation mit TNF α die Kynureninproduktion um ca. das doppelte. Rechnet man die hier aufgeführten Werte für die optische Dichte erneut mit Hilfe eines Standards (s. Abb. A1) in die Kynureninproduktion in $\mu\text{g/ml}$ um, so stellt man fest, dass die HBMEC, die mit einer Dosis von 1000 U/ml IFN γ und zusätzlich mit einer Dosis von 100 U/ml TNF α stimuliert wurden, nahezu das gesamte in den Kulturansätzen vorhandene Tryptophan (ca. 115 $\mu\text{g/ml}$) zu Kynurenin umsetzen.

Aus dem durchgeführten Experiment ist ebenfalls zu erkennen, dass eine alleinige Stimulation mit TNF α keinen Effekt auf die IDO-Aktivität hat. Dies ist in der Grafik bei einer IFN γ -Konzentration von 0 U/ml zu ersehen. Hier kann durch die Stimulation mit TNF α alleine keine Kynureninproduktion festgestellt werden.

Auch hier stimmen die Ergebnisse auf Ebene der Enzymaktivität mit denen auf der mRNA-Ebene überein. In Abbildung 1 ist nämlich ersichtlich, dass durch eine alleinige Stimulation der HBMEC mit TNF α auch in der RT-PCR keine IDO-mRNA nachgewiesen werden konnte. Damit ist zunächst bestätigt, dass die Kostimulation mit TNF α sowohl die IFN γ -induzierte Transkription der IDO-mRNA als auch die daraus folgende IDO-Aktivität verstärken kann, wohingegen eine alleinige Stimulation mit diesem Zytokin keine IDO-Induktion hervorruft.

Der nächste Schritt war es nun, zu überprüfen, ob die in Abbildung 3 gezeigte Hemmung der HSV-1-Replikation in HBMEC durch IFN- γ ebenso durch Kostimulation mit TNF α verstärkt werden kann.

Zu diesem Zweck wurden die HBMEC wie oben beschrieben über drei Tage mit verschiedenen Konzentrationen von IFN γ vorstimuliert, bevor dann die Infektion mit einer konstanten Verdünnung der HSV-1-Stammkultur (10^{-5}) und weitere Inkubation über drei Tage erfolgte. Zusätzlich erfolgte diesmal jedoch neben der Stimulation mit IFN γ der Zusatz von TNF α in der konstanten Konzentration von 100 U/ml. Die Anzahl der Viruskopien wurde

wieder durch die Real Time PCR (2.2.16) bestimmt, wie im vorangegangenen Text beschrieben.

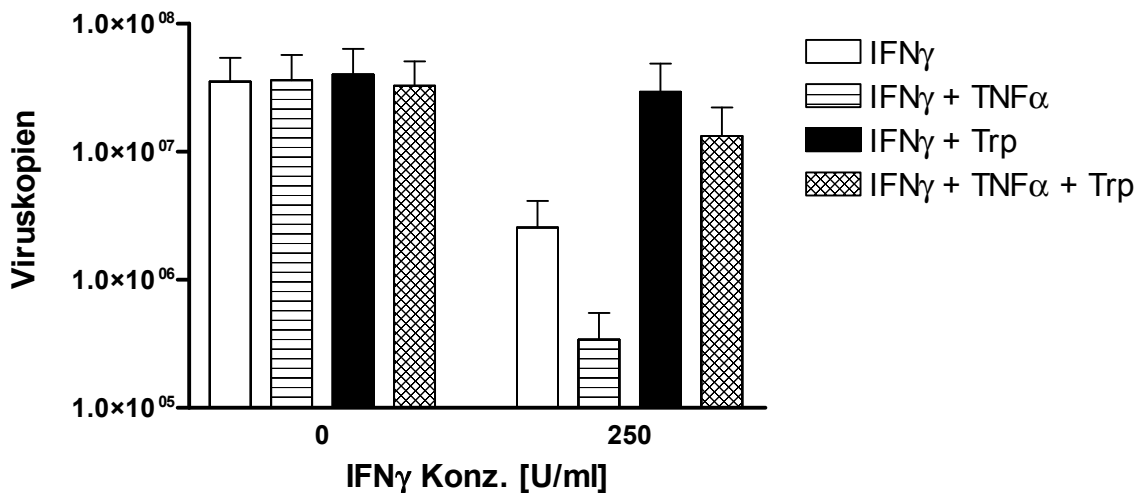


Abb. 5: Regulation der IFN γ -induzierten Hemmung der HSV-1-Replikation in HBMEC durch TNF α

3×10^4 HBMEC Zellen pro Vertiefung wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Kostimulation mit TNF α in einer konstanten Dosis von 100 U/ml. Die Hälfte der Einzelansätze wurde jeweils beim Ansatz der Kulturen und nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 100 μ g/ml Tryptophan supplementiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Infektion der Zellen mit einer konstanten Virusmenge (10^{-5} Verdünnung der HSV-1 Stammkultur). Nach erneuter Inkubation über 48 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und die Virusmenge wie unter 2.2.16 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit Standardabweichungen.

Die alleinige Stimulation der Zellen mit TNF α hatte wie erwartet keinen Effekt auf die Virusreplikation. Wirken allerdings IFN γ in einer Dosis von 250 U/ml und TNF α in einer Konzentration von 100 U/ml zusammen, so kann der virushemmende Effekt des IFN γ um eine weitere Zehnerpotenz verstärkt werden.

Sowohl der antivirale Effekt des IFN γ als auch seine Verstärkung durch TNF α konnten durch Tryptophanzugabe vollständig antagonisiert werden. Damit ist wiederum bewiesen, daß die

Inhibition der Virusvermehrung durch Kostimulation mit $\text{IFN}\gamma/\text{TNF-}\alpha$ auf die dadurch gesteigerte IDO-Aktivität und den folgenden Tryptophanabbau zurückzuführen sind.

$\text{TNF}\alpha$ wirkt also regulatorisch auf den $\text{IFN}\gamma$ -Effekt in HBMEC. Es verstärkt die Transkription der IDO-mRNA, woraus ein stärkerer Tryptophanabbau und somit eine gesteigerte antivirale Aktivität gegen HSV-1 resultiert.

3.4 Regulation der $\text{IFN}\gamma$ -induzierten IDO-Aktivität durch IL-1 β

In Abbildung 1 ist zu erkennen, dass neben $\text{TNF}\alpha$ auch das Cytokin IL-1 β in Kombination mit $\text{IFN}\gamma$ die IDO-mRNA-Bande in dieser RT-PCR verstärken kann.

Deshalb wurde im Weiteren untersucht, ob IL-1 β auch ähnlich kostimulatorisch auf die IDO-Aktivität und auf die Hemmung der HSV-1-Replikation in HBMEC wirkt wie $\text{TNF}\alpha$.

Zunächst wurde wiederum die Kynureninproduktion nach Stimulation der HBMEC mit $\text{IFN}\gamma$ in ansteigenden Konzentrationen und einer konstanten Menge mit IL-1 β (100 U/ml) nach der bekannten Methode photometrisch gemessen. Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten.

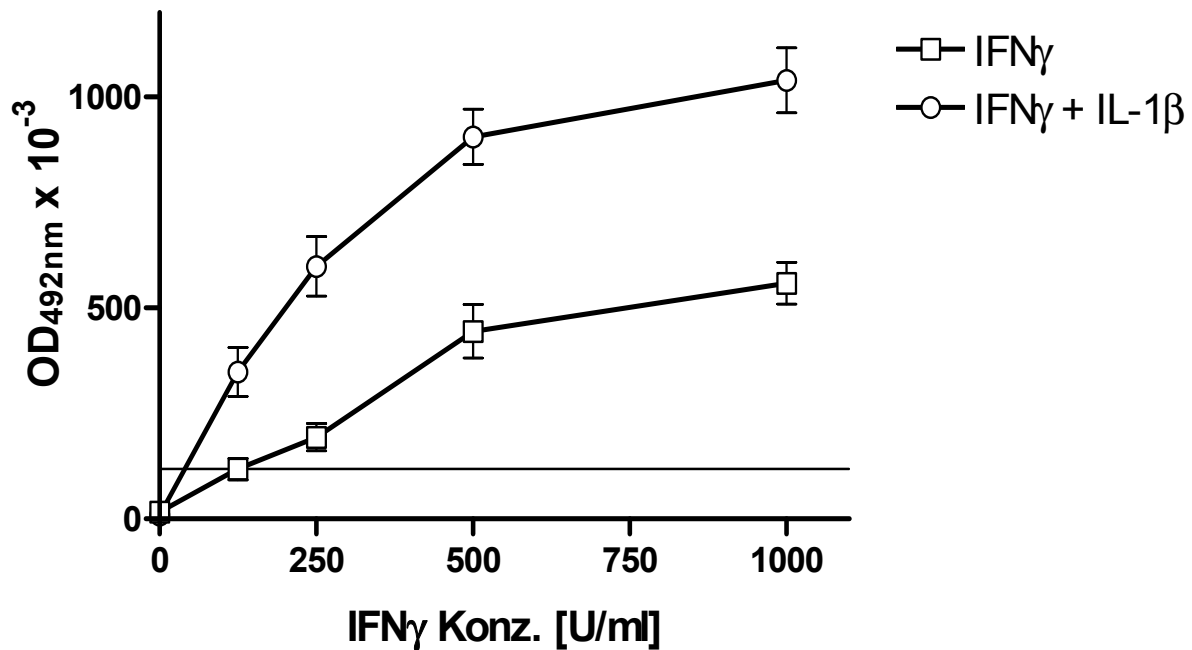


Abb. 6: Regulation der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität durch IL-1 β in HBMEC

In diesen Experimenten wurden erneut 3×10^4 Zellen HBMEC pro Vertiefung ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Neben der Supplementierung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan erfolgte zusätzlich die Kostimulation mit IL-1 β in einer konstanten Dosis von 100 U/ml. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Kynurenins wie unter 2.2.6 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Die waagerechte Linie gibt die optische Dichte an, die nach Umrechnung mit Hilfe eines Standards einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin entspricht. Bei dieser Konzentration ist das gesamte, in einem un-supplementierten Kulturmedium enthaltene Tryptophan zu Kynurenin umgesetzt.

Hier wird deutlich, dass, im Vergleich zu Abbildung 4 der kostimulatorische Effekt von IL-1 β sogar noch stärker ausgeprägt ist als der von TNF α . Die Kynureninproduktion wird hier in den Konzentrationen zwischen 250-1000 U/ml IFN γ mehr als verdoppelt. Rechnet man die Werte für die optische Dichte mit dem Kynureninstandard (Abb. A1) in Kynureninkonzentrationen um, so kann man davon ausgehen, dass bei einer Kostimulation mit IL-1 β zusätzlich zu einer IFN γ -Stimulation in Konzentrationen zwischen 500 und 1000 U/ml die IDO-Aktivität der HBMEC ausreicht, um das gesamte Tryptophan in der Kultur umzusetzen.

Die Daten in Abbildung 6 zeigen auch, dass IL-1 β genau wie TNF α ohne gleichzeitige Stimulation mit IFN γ keinen Einfluss auf die IDO-Aktivität hat. Auch hier werden die Ergebnisse aus Abbildung 1 bestätigt, denn auch dort zeigte sich, dass in HBMEC, die nur mit IL-1 β behandelt wurden, keine IDO-mRNA-Bande nachweisbar war.

Somit ist auch für die Kostimulation der HBMEC mit IL-1 β zusätzlich zu IFN γ bewiesen, dass hierdurch eine verstärkte Transkription von IDO-mRNA stattfindet, die auch eine gesteigerte Aktivität des Enzyms zur Folge hat.

Nun ergab sich natürlich die Frage, ob, ähnlich wie bei der Kostimulation mit TNF α , durch die Kostimulation mit IL-1 β der IFN γ -induzierte antivirale Effekt auf die HSV-1-Replikation in den HBMEC verstärkt werden konnte. Um eine Antwort zu erhalten wurden wieder HBMEC-Kulturen angesetzt und mit ansteigenden Dosen IFN γ stimuliert. Zusätzlich wurde zu den Ansätzen IL-1 β in einer konstanten Konzentration von 100 U/ml beigefügt. Ein Teil der Einzelansätze wurde auch wieder jeweils beim Ansatz der Kulturen und nach 72 Stunden Inkubationszeit mit Tryptophan supplementiert, um zu untersuchen, ob der IFN γ -induzierte Effekt wiederum IDO-vermittelt ist. Nach Stimulation über 3 Tage erfolgte, wie schon beschrieben die Virusinfektion, gefolgt von einer weiteren dreitägigen Inkubation. Zur Bestimmung der Anzahl der Viruskopien wurden die Zellen erneut, wie unter 2.2.16 beschrieben präpariert und danach die Messung mittels der Real Time PCR durchgeführt (s. 2.2.15).

Abbildung 7 zeigt die Ergebnisse aus zwei verschiedenen Experimenten.

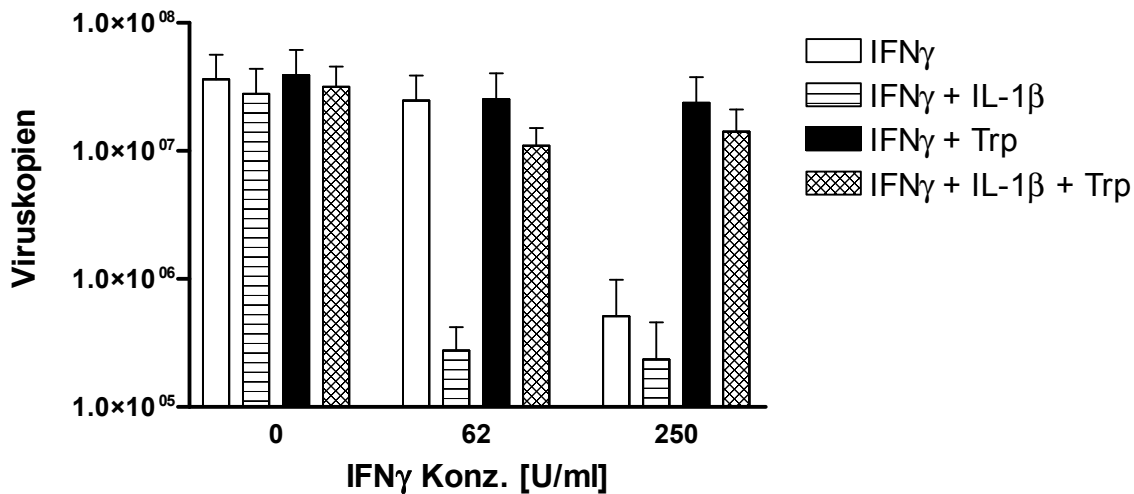


Abb. 7: Regulation der IFN γ -induzierten Hemmung der HSV-1-Replikation in HBMEC durch IL-1 β

3×10^4 HBMEC Zellen pro Vertiefung wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Zusätzlich erfolgte die Kostimulation mit IL-1 β in einer konstanten Dosis von 100 U/ml. Die Hälfte der Einzelansätze wurde jeweils beim Ansatz der Kulturen und nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 100 μ g/ml Tryptophan supplementiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Infektion der Zellen mit einer konstanten Virusmenge (10^{-5} Verdünnung der HSV-1 Stammkultur). Nach erneuter Inkubation über 72 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und die Virusmenge wie unter 2.2.16 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit Standardabweichungen.

Das durchgeführte Experiment zeigte, dass die Kostimulation mit IL-1 β zu einer Verminderung der HSV-1-Replikation bereits nach Stimulation mit geringen Dosen IFN γ führt. Eine Stimulation mit IFN γ allein führt in einer Konzentration von 62 U/ml noch zu keinem Effekt auf die Virusheftung. Auch eine Kostimulation mit TNF α hatte hier noch keinen Effekt auf die Virusvermehrung. (Diese Werte wurden in Abbildung 5 nicht gezeigt.)

Durch die Kostimulation mit IL-1 β kann aber bereits bei einer Konzentration von 62 U/ml IFN γ eine Verminderung des Viruswachstums um ca. zwei Zehnerpotenzen erreicht werden, das entspricht etwa 99%.

Aus der gezeigten Abbildung ist auch zu ersehen, dass die Stimulation der HBMEC allein mit einer Konzentration von 100 U/ml IL-1 β ohne Einfluss von IFN γ (siehe IFN γ -Konzentration 0 U/ml in Abbildung 7) zu keinem Effekt auf die Virusvermehrung führt. Auch hier scheint

sich IL-1 β ähnlich zu verhalten wie TNF α . Es verstärkt den Effekt des IFN γ , ist aber allein nicht in der Lage einen direkten Effekt auf das Viruswachstum auszuüben.

Auch der durch Kostimulation mit IL-1 β erreichte verstärkte virushemmende Effekt konnte durch Zugabe von Tryptophan im Überschuss vollständig antagonisiert werden. Damit ist wiederum gezeigt, dass der IFN γ -induzierte antivirale Wirkmechanismus in den HBMEC auf eine Tryptophandegradation in Folge erhöhter IDO-Aktivität zurückzuführen ist.

Somit konnte nachgewiesen werden, dass neben TNF α auch IL-1 β regulatorisch auf die Effekte des IFN γ in HBMEC wirkt. Es verstärkt die IDO-mRNA-Expression (siehe Abbildung 1), es erhöht die Kynureninproduktion in HBMEC-Kulturen (Abbildung 6) und es führt zu einer deutlichen Hemmung der HSV-1-Vermehrung bereits bei Stimulation mit geringen Mengen IFN γ (Abbildung 7).

Eine abschließende Frage, die sich stellte, war, ob die in Abbildung 6 dargestellte, durch IL-1 β vergrößerte Kynureninproduktion durch eine größere Menge des IDO-Enzym oder durch eine Verstärkung dessen Aktivität erreicht werden konnte. Abbildung 1 lässt vermuten, dass durch Kostimulation mit IL-1 β ein größere Menge IDO-Protein für die Verstärkung der Kynureninproduktion sorgt, da hier für diesen Fall eine stärkere IDO-mRNA-Bande nachgewiesen werden konnte. Ob dieser Anstieg in der Menge der mRNA auch in eine größere Quantität von IDO-Protein translatiert wird, sollte nun durch einen Western Blot untersucht werden.

Für dieses Experiment wurden die Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen von IFN γ mit oder ohne Zusatz von IL-1 β über drei Tage inkubiert und danach wie unter 2.2.10 beschrieben präpariert. Im Anschluss wurden die Proteine in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.11) und dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (2.2.12).

Nun erfolgte die Detektion des IDO-Proteins (2.2.14) mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen dieses Protein (2.1.6) und eines Sekundärantikörpers (2.1.6). Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung 8 dargestellt.

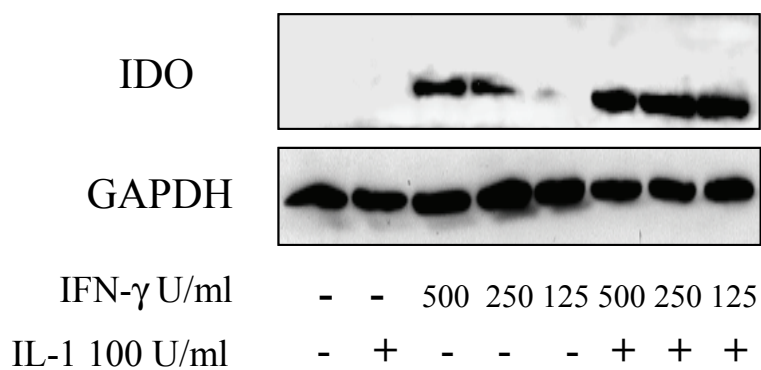


Abb. 8: IDO Protein Nachweis in IFN γ -stimulierten HBMEC

Dargestellt ist der Nachweis des IDO-Proteins in verschiedenen stimulierten HBMEC. Zur Durchführung dieses Experimentes wurden die Zellen, wie unter 2.2.10 beschrieben, stimuliert und eine Protein-Präparation hergestellt. Mittels einer SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Proteine (2.2.11), um im Anschluss den Transfer auf eine Nitrozellulosemembran durchzuführen (2.2.12). Nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen die IDO (2.1.6) erfolgte die Detektion (2.2.14) mit Hilfe eines Sekundärantikörpers (2.1.6).

Auch hier wurde der Nachweis des GAPDH-Proteins als Kontrolle verwendet, da es als Glykolyseenzym konstitutiv in den Zellen vorhanden ist und nicht von der IFN γ -Stimulation beeinflusst wird.

Zu erkennen ist in diesem Versuch, dass die Stimulation mit 125 U/ml IFN γ noch zu einer geringen IDO-Protein-Bande führt, die sich aber mit Erhöhung der IFN γ -Konzentration verstärkt. Bei einer Kostimulation mit IL-1 β in einer Dosis von 100 U/ml konnte bereits mit 125 U/ml IFN γ eine deutlich stärkere IDO-Protein-Bande gefunden werden. Zur Kontrolle

sind hier die GAPDH-Banden gezeigt werden, die in allen Gruppen gleich stark ausgeprägt sind. Daraus kann geschlossen werden, dass in allen Gruppen gleichviel Protein zur Analyse aufgetragen wurde.

Auch dieses Experiment zeigt, wie erwartet, dass eine alleinige Stimulation der Zellen mit IL-1 β nicht zur Translation des IDO-Proteins führt.

Somit konnte abschließend nachgewiesen werden, dass eine Kostimulation der HBMEC mit IL-1 β im Zusatz zu IFN γ zur Transkription einer größeren Menge von IDO-mRNA führt, die in eine erhöhte Menge von IDO-Protein translatiert wird. Aus dieser vergrößerten Proteinmenge resultiert dann der gesteigerte Umsatz von Tryptophan zu Kynurenin in den HBMEC. Der entstehende Tryptophanmangel ist letztendlich die Ursache für den antiviralen Effekt, den die stimulierten HBMEC gegen HSV-1 zeigen.

3.5 Überprüfung der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität in HUVEC

Nachdem die Induktion der IDO durch IFN γ in HBMEC nachgewiesen wurde, sollte nun eine andere Endothelzellreihe auf ihre IDO-Aktivität überprüft werden. Hierzu wurden HUVEC (2.2.1) ausgewählt. Diese Endothelzellen unterscheiden sich jedoch in einigen Punkten von den zuvor verwendeten HBMEC. Zunächst stammen die Zellen von unterschiedlichen Lokalisationen im menschlichen Körper. Die HBMEC stammen aus Hirngefäßen, wohingegen die HUVEC aus Nabelschnurgefäßen gewonnen wurden. Außerdem handelt es sich bei den HBMEC um mikrovaskuläre Endothelien, die HUVEC sind im Gegensatz dazu makrovaskuläre Endothelzellen.

Bei den verwendeten HBMEC handelte es sich zudem um eine immortalisierte Zelllinie. Die HUVEC sind hingegen native Zellen. Ferner mussten hierdurch auch verschiedene andere Kulturbedingungen für HUVEC und HBMEC eingehalten werden. So wurden die Zellkulturflaschen und die Mikrotiterplatten für HUVEC vor Aussaat der Zellen mit 0,1%iger

Gelatine beschichtet um eine bessere Adhärenz der Zellen zu gewährleisten. Das Kulturmedium musste zudem mit ECGS und Heparin supplementiert werden. Das bei den IDO-Aktivitätstests verwendete Medium konnte allerdings ohne diese Zusätze verwendet werden.

Zunächst erfolgte die Überprüfung einer möglichen IDO-Aktivität in den HUVEC durch eine photometrische Messung des im Überstand der IFN γ -stimulierten Zellen vorhandenen Kynurenins mit Hilfe des Ehrlichreagenzes.

Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 9 dargestellt. Zum Vergleich ist nochmals die Kynureninproduktion in stimulierten HBMEC dargestellt.

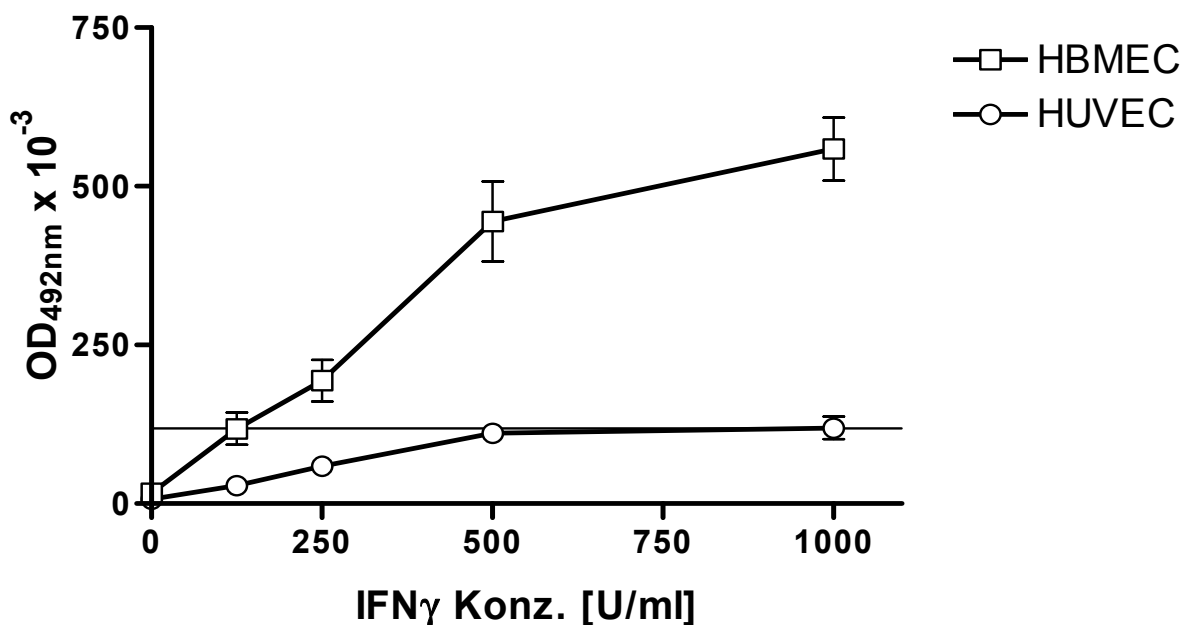


Abb. 9: Vergleich der IFN γ -induzierten IDO-Aktivität in HBMEC und HUVEC

In diesem Versuch wurden 3×10^4 Zellen HUVEC pro Vertiefung ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Die Tests wurden zusätzlich mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan supplementiert, um möglichst viel von dem Reaktionsprodukt Kynurenin zu erhalten. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Kynurenins wie unter 2.2.6 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Zum Vergleich sind die Ergebnisse dieses Experiments mit HBMEC aufgeführt. Die waagerechte Linie gibt die optische Dichte an, die nach Umrechnung mit Hilfe eines Standards einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin entspricht. Bei dieser Konzentration ist das gesamte, in einem un-supplementierten Kulturmedium enthaltene Tryptophan zu Kynurenin umgesetzt.

In diesem Experiment ist klar zu erkennen, dass die HUVEC, im Gegensatz zu den HBMEC, nur eine sehr schwache Kynureninproduktion zeigen. Auch bei Verwendung von hohen Konzentrationen des IFN γ konnten, wenn man die Werte für die optische Dichte erneut mit Hilfe des Standards (Abb. A1) in Kynureninkonzentrationen umrechnet, nur etwas mehr als 10% des eingesetzten Tryptophan in Kynurenin umgesetzt werden. Eine Stimulation mit 1000 U/ml IFN γ reicht nur knapp aus, um das in einem un-supplementierten Medium vorhandene Tryptophan (15- 17 μ g/ml) zu Kynurenin abzubauen.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob in den HUVEC antivirale Effekte gegen HSV-1 durch IFN γ -Stimulation hervorgerufen werden können und ob sich diese, wenn vorhanden, durch die geringereIDO-Aktivität der HUVEC erklären lassen.

Zu diesem Zweck wurden die HUVEC wie auch zuvor die HBMEC mit ansteigenden Konzentrationen IFN γ stimuliert und über drei Tage inkubiert. Ein Teil der Einzelansätze wurde zudem mit Tryptophan im Überschuss supplementiert. Am dritten Tag erfolgten die Infektion mit HSV-1 und eine erneute Inkubation für drei Tage. Dann wurde die Präparation der Zellen wie unter 2.2.16 beschrieben durchgeführt, um im Anschluss die Anzahl der Viruskopien mit der Real Time PCR zu bestimmen.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

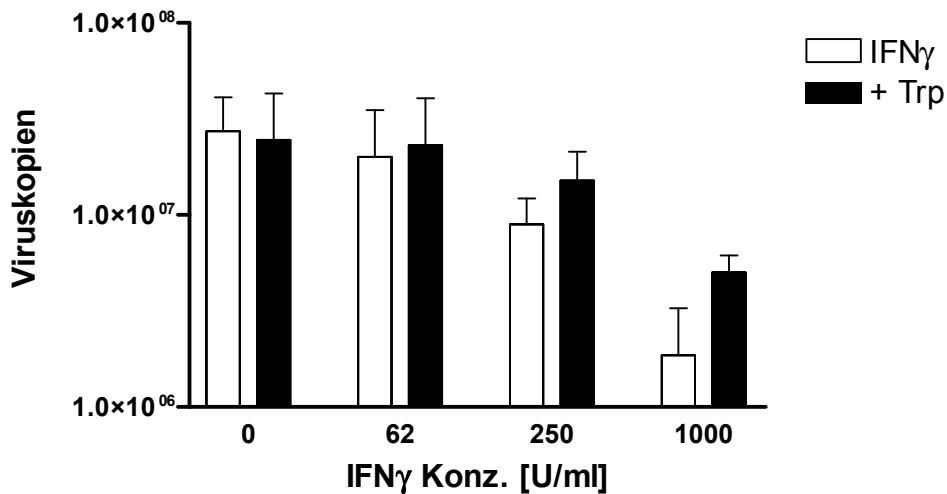


Abb. 10: IFN γ -induzierte Hemmung der HSV-1-Replikation in HUVEC

In diesen Experimenten wurden 3×10^4 HUVEC Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Die Hälfte der Einzelansätze wurde jeweils beim Ansatz der Kulturen und nach 72 Stunden Inkubationszeit mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan supplementiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Infektion der Zellen mit einer konstanten Virusmenge (10^{-5} Verdünnung der HSV-1 Stammkultur). Nach erneuter Inkubation über 72 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und die Virusmenge wie unter 2.2.16 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit Standardabweichungen.

Zu erkennen ist, dass die HUVEC nur bei maximaler Stimulation mit 1000 U/ml IFN γ eine Hemmung des HSV-1-Wachstums zeigen. Diese ist deutlich geringer ausgeprägt als bei den HBMEC, allerdings wird die Anzahl der Viruskopien dennoch um eine Zehnerpotenz gesenkt, das entspricht einer Reduktion der Virusreplikation um 90%.

Allerdings ist dem Experiment auch zu entnehmen, dass die Virusheftung nicht ausreichend durch Tryptophanzugabe antagonisiert werden kann. Damit ist die Tryptophandepletion durch die IDO-Aktivität zumindest nicht der alleinige Mechanismus, der für die IFN γ -induzierte Wachstumshemmung des HSV-1 in den HUVEC verantwortlich zu machen ist. Mehrere andere IFN γ -induzierte antivirale Effektormechanismen sind in der Literatur bekannt und könnten bei den HUVEC neben der ja nur recht schwach ausgeprägten IDO-Aktivität für die Hemmung der Virusreplikation verantwortlich sein.

Welcher der Unterschiede zwischen den HBMEC und den HUVEC für ihre unterschiedlich starke IDO-Aktivität und das verschiedene antivirale Verhalten verantwortlich ist, muss noch geklärt werden. Hier könnten sowohl die unterschiedliche Herkunft der Zellen, wie auch der Gegensatz mikro-/makrovaskulär und die unterschiedlichen Kulturbedingungen eine Rolle spielen. Auch ein unterschiedliches Verhalten zwischen Tumorzellen und nativen Zellen könnte für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Zelllinien verantwortlich sein.

3.6 Antivirale Effekte gegen HSV-2

Nachdem die durch die IDO vermittelten antiviralen Effekte gegen HSV-1 in den IFN γ -stimulierten HBMEC nachgewiesen worden waren, stellte sich als nächstes die Frage, ob die IFN γ -vermittelte antivirale IDO-Aktivität auch gegen andere Viren wirksam ist. Unserer Arbeitsgruppe war es bereits in einer Kooperation gelungen, auch eine IDO-vermittelte Hemmung der Replikation von Masernviren in IFN γ -stimulierten HBMEC nachzuweisen.

Ich beschäftigte mich mit der Aufgabe, nachdem die Effekte gegen HSV-1 untersucht worden waren, eine IDO-vermittelte antivirale Aktivität gegen HSV-2 zu untersuchen.

Bei den Untersuchungen zu HSV-1 hatten sich die HBMEC als gutes Modell für die in vivo Situation einer HSV-1-Enzephalitis angeboten, da diese Zellen ja aus Hirngefäßen stammen. HSV-2 ist dafür bekannt, hauptsächlich der Erreger von genitalen Infektionen zu sein. Um ein besseres Modell für eine solche Infektion zu erstellen, wurde beschlossen, die möglichen antiviralen IDO-Effekte in HeLa-Zellen zu untersuchen. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die aus einem Zervixkarzinom isoliert wurde und die damit besser als die HBMEC geeignet ist, die Vorgänge bei einer genitalen Infektion abzubilden, da Ihre Herkunft im genitalen Bereich liegt.

Zuerst war es natürlich notwendig, zu untersuchen, ob die HeLa-Zellen überhaupt über eine IFN γ -induzierte IDO-Aktivität verfügen. Zu diesem Zweck erfolgte zunächst die bekannte

photometrische Messung des produzierten Kynurenin im Zellüberstand von IFN γ -stimulierten HeLa-Kulturen mit Hilfe des Ehrlichreagenzes.

Das Ergebnis eines solchen Experiments ist in Abbildung 11 dargestellt.

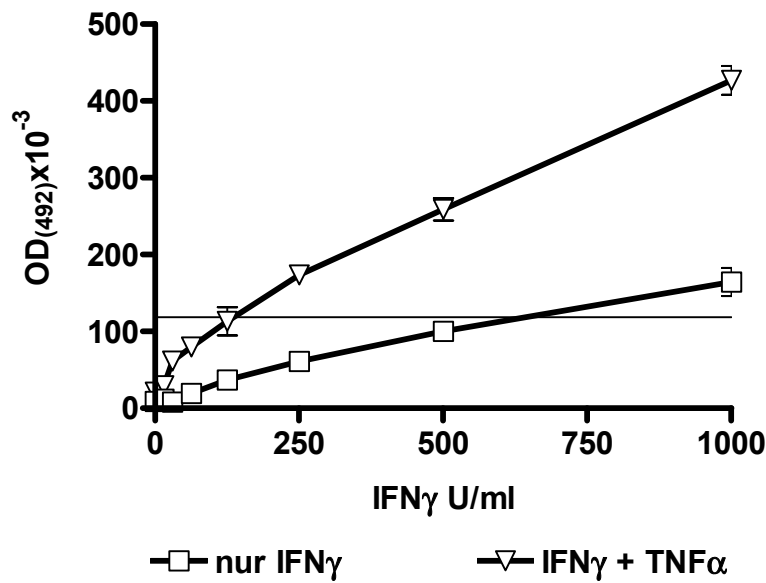


Abb. 11: IDO-Aktivität in IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen

In diesem Experiment wurden 3×10^4 HeLa-Zellen pro Vertiefung ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Neben der Supplementierung mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Tryptophan erfolgte bei einem Teil der Zellen zusätzlich die Kostimulation mit TNF α in einer konstanten Dosis von 100 U/ml. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die photometrische Messung des Kynurenins wie unter 2.2.6 beschrieben. Dargestellt sind die Ergebnisse für die alleinige Stimulation mit IFN γ sowie für die Kostimulation mit TNF α jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung von je drei angesetzten Kulturen. Die waagerechte Linie gibt die optische Dichte an, die nach Umrechnung mit Hilfe eines Standards einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin entspricht. Bei dieser Konzentration ist das gesamte, in einem unsupplementierten Kulturmedium enthaltene Tryptophan zu Kynurenin umgesetzt.

In dieser Abbildung ist zu ersehen, dass die HeLa-Zellen über eine IDO-Aktivität verfügen. Allerdings ist sie deutlich schwächer ausgeprägt als bei den HBMEC und liegt nur leicht über dem Niveau der HUVEC. Erst bei einer Stimulation mit IFN γ -Konzentration von knapp über 500 U/ml sind die HeLa-Zellen in der Lage, das in einem unsupplementierten Kulturmedium vorhandene Tryptophan (15-17 $\mu\text{g/ml}$) vollständig abzubauen (siehe Schnittpunkt der Kurve

mit der horizontalen Linie in Abbildung 11). Um zu klären, ob diese schwache IDO-Aktivität eventuell noch verstärkt werden könnte, wurden zusätzlich photometrische Messungen der Kynureninproduktion von HeLa-Zellen durchgeführt, die neben $\text{IFN}\gamma$ zusätzlich mit $\text{TNF}\alpha$ kostimuliert wurden. Der regulatorische Effekt des $\text{TNF}\alpha$ auf die IDO-Aktivität wurde ja bereits in den HBMEC nachgewiesen. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind ebenfalls in Abbildung 11 aufgeführt. Hier ist ersichtlich, dass bei Kostimulation mit $\text{TNF}\alpha$ in den HeLa-Zellen eine etwa gleich hohe Kynureninproduktion wie in den allein mit $\text{IFN}\gamma$ -stimulierten HBMEC zu erreichen war.

Bevor ein möglicher IDO-vermittelter antiviraler Effekt gegen HSV-2 in HeLa-Zellen untersucht werden konnte, sollte noch geprüft werden, ob die Erhöhung des Tryptophanabbaus bei Kostimulation der HeLa-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ im Zusatz zu $\text{IFN}\gamma$ durch eine erhöhte Menge des IDO-Proteins bedingt ist, so wie es in den HBMEC bei Kostimulation mit $\text{IL-1}\beta$ der Fall war, oder ob sich die verstärkte Kynureninproduktion über eine größere Aktivität des Enzyms erklären lässt.

Diese Frage sollte erneut durch die Durchführung eines Western Blots beantwortet werden.

Die HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von $\text{IFN}\gamma$ mit oder ohne Zusatz von $\text{TNF}\alpha$ über drei Tage inkubiert und danach wie unter 2.2.10 beschrieben präpariert. Im Anschluss erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in einem Polyacrylamid-Gel (2.2.11) und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran (2.2.12).

Die Detektion des IDO-Proteins (2.2.14) erfolgte, wie bereits zuvor beschrieben, mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen dieses Protein (2.1.6) und eines Sekundärantikörpers (2.1.6).

In Abbildung 12 ist der durchgeführte Western Blot dargestellt.

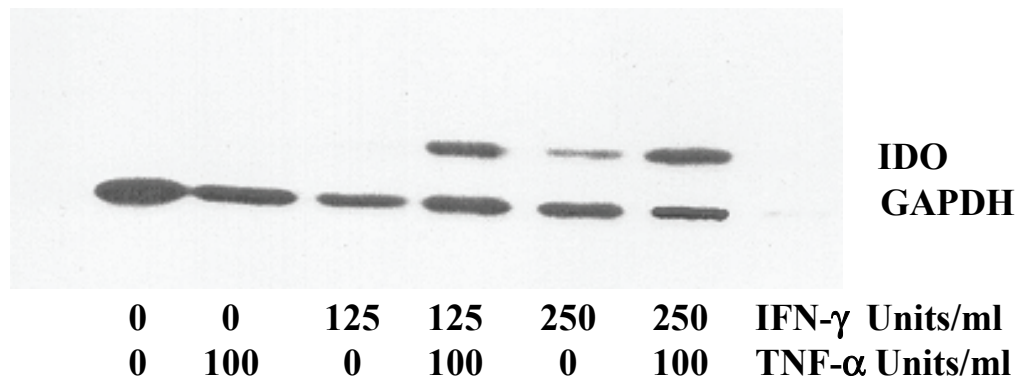


Abb. 12: IDO Protein Nachweis in IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen

Dargestellt ist der Nachweis des IDO-Proteins in verschiedenen stimulierten HeLa-Zellen. Zur Durchführung dieses Experimentes wurden die Zellen, wie unter 2.2.10 beschrieben, stimuliert und eine Protein-Präparation hergestellt. Mittels einer SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Proteine (2.2.11), um im Anschluss den Transfer auf eine Nitrozellulosemembran durchzuführen (2.2.12). Nach Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen die IDO (2.1.6) erfolgte die Detektion (2.2.14) mit Hilfe eines Sekundärantikörpers (2.1.6).

Hier ist deutlich zu erkennen, dass die Stimulation der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von IFN γ zu einer Verstärkung der Proteinbanden führt. Ebenso kann der Abbildung entnommen werden, dass die Kostimulation mit TNF α zu einer Verstärkung der Banden und somit zu einer größeren Menge des IDO-Proteins führt. So ist zum Beispiel bei einer alleinigen Stimulation der Zellen mit 125 U/ml IFN γ noch keine IDO-Bande zu sehen, bei einer Kostimulation mit 100 U/ml TNF α ist diese deutlich auszumachen. Auch die bei Stimulation mit 250 U/ml IFN γ vorhandene Bande kann durch Kostimulation mit TNF α verstärkt werden. TNF α ohne Zusatz von IFN γ ist wiederum nicht in der Lage, eine IDO-Bande hervorzurufen.

Als Kontrolle wurde nochmals das GAPDH-Protein der Glykolyse verwendet. Es sollte in seiner Menge nicht durch Stimulationen mit IFN γ oder TNF α beeinflusst werden, und die Banden zeigen hier auch wie erwartet bei allen verschiedenen Ansätzen ein nahezu identisches Aussehen.

Ein letzter Schritt vor dem Beginn der Experimente zur HSV-2-Replikation war es jetzt, nachzuweisen, ob die erhöhte Proteinmenge auch durch eine erhöhte Anzahl von IDO-mRNA-Kopien bedingt ist. Zu diesem Zweck sollte diesmal keine RT-PCR benutzt werden, bei der die mRNA-Quantität allenfalls abgeschätzt werden kann, sondern die Anzahl der mRNA-Kopien durch eine Real Time PCR (2.2.15) genau bestimmt werden.

Hierzu wurden, wie bei der RT-PCR, aus verschiedenen vorstimulierten Zellen zunächst die cDNA-Erststränge synthetisiert (2.2.8) und amplifiziert (2.2.8). Je 5 μ l der IDO-cDNA wurden als Probe verwendet; zusätzlich wurden die Primer (2.1.5) in einer Endkonzentration von 300 nM und die Sonde in der Endkonzentration 200 nM eingesetzt. Zur genauen Bestimmung der mRNA-Kopienanzahl wurde ein IDO-Plasmid in den Konzentrationen 5000, 500, 50 und 0 Kopien jeweils im Doppeltansatz als Standard verwendet. Als Kontrolle wurden für jede Probe zusätzlich die Anzahl an Kopien der GAPDH-mRNA mittels der Real time PCR mit Hilfe des GAPDH Taq-Man endogenous control kit bestimmt. Die Ergebnisse der Real Time PCR sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt hier in der Anzahl der IDO-mRNA-Kopien bezogen auf die Anzahl der GAPDH-mRNA-Kopien.

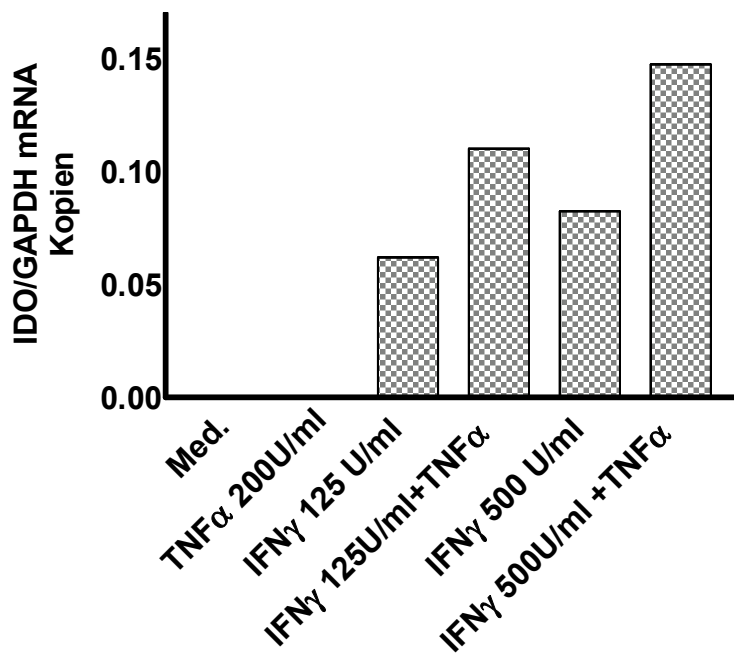


Abb. 13: Quantitative Bestimmung der IDO mRNA in IFN γ -stimulierten HeLa-Zellen

Dargestellt ist das Ergebnis einer Real Time PCR zur quantitativen Bestimmung der IDO mRNA in unterschiedlich stimulierten HeLa-Zellen. Die Stimulation erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen von IFN γ mit oder ohne Kostimulation durch TNF α . Als Kontrolle wurden unstimulierte Zellen untersucht. Die Präparation der Zellen erfolgte wie unter 2.2.7 beschrieben. Die Durchführung der IDO Real Time PCR ist unter 2.2.17 erläutert.

In diesem Experiment konnte nun bestätigt werden, dass die erhöhte Kynureninproduktion in HeLa-Zellen nach IFN γ -Stimulation durch eine erhöhte Menge an IDO-Protein bedingt ist, die wiederum auf eine Vermehrung der IDO-mRNA Kopien zurückzuführen ist.

Aus der dargestellten Real Time PCR ist klar zu erkennen, dass bei Stimulation der HeLa-Zellen mit ansteigenden Konzentrationen IFN γ auch die Anzahl der in den Zellen gebildeten

IDO-mRNA Moleküle steigt. Durch Kostimulation mit TNF α konnte die Anzahl der mRNA-Kopien jeweils nochmals im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit IFN γ gesteigert werden. Die Stimulation mit TNF α ohne IFN γ konnte wie erwartet keine erhöhte Transkription von IDO-mRNA bewirken.

3.7 Induktion antiviraler Effekte gegen HSV-2 durch IFN γ in HeLa-Zellen

Nachdem durch dieses Experiment eine induzierbare IDO-Aktivität in den HeLa-Zellen nachgewiesen worden war, konnten die Versuche zur HSV-2-Vermehrung und deren mögliche Hemmung in diesen Zellen beginnen.

Um vom HSV-2 möglichst große Mengen zu erhalten, wurden auch die HSV-2-Virusstämme auf Lungenepithelkarzinomzellen angezüchtet und im Anschluss zu 40 Portionen à 1ml bei -80°C eingefroren. Die Virusanzahl in den einzelnen Aliquots wurde erneut per Real Time PCR bestimmt und lag bei ca. 0.5×10^4 Kopien/ μ l.

Für die durchzuführenden Experimente wurden die HeLa-Zellen über drei Tage mit verschiedenen Dosen IFN γ vorstimuliert um dann mit HSV-2 in einer konstanten Verdünnung der Stammkultur infiziert zu werden. Um nachzuweisen, ob die möglichen antiviralen Effekte durch einen Tryptophanabbau bedingt sind, wurde ein Teil der Einzelansätze mit Tryptophan im Überschuss supplementiert. Ein Teil der Ansätze wurde ebenfalls mit einer konstanten Konzentration von 100 U/ml TNF α kostimuliert, um eine mögliche Verstärkung eines antiviralen Effekts zu untersuchen. Nach der Infektion wurden die Zellen noch über drei weitere Tage inkubiert. Dann erfolgte die Präparation der Zellen (2.2.16) und die anschließende Messung der Anzahl der Viruskopien mittels der Real Time PCR (2.2.16). Um die Viruskopien in ihrer Anzahl genau zu bestimmen, benötigten wir auch für das HSV-2 einen Standard. Zu diesem Zweck stellte uns PD Dr. Adams (Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) das Plasmid pSGHSV-2gb zur Verfügung. Es wurde in den

Kopienzahlen 5000, 500 50 und 0 im Doppeltansatz als Standard eingesetzt. Die Ergebnisse aus sechs solcher Experimente sind in Abbildung 14 zu sehen.

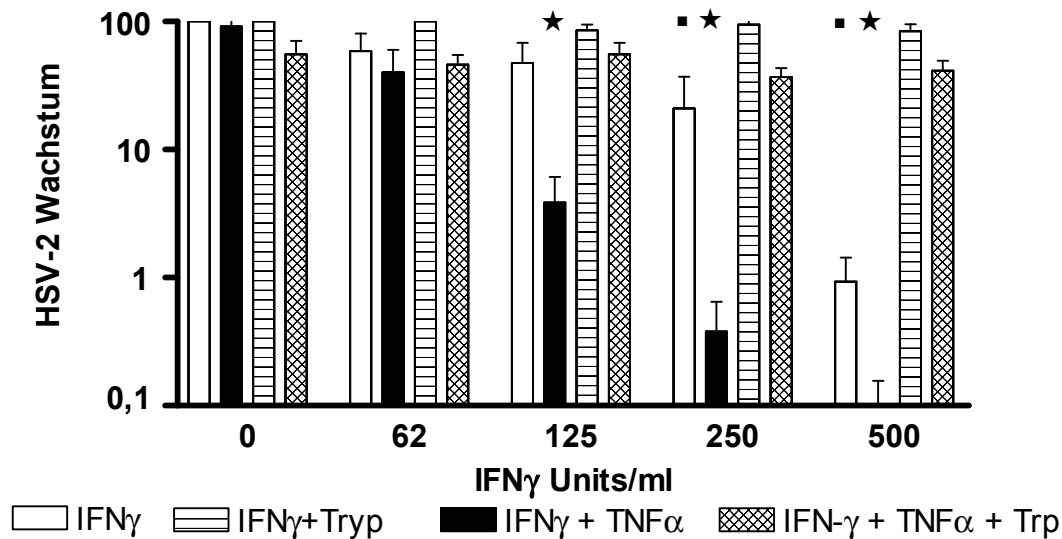


Abb.14: IFN γ -induzierte Hemmung der HSV-2 Replikation in HeLa-Zellen

In diesen Experimenten wurden 3×10^4 HeLa-Zellen pro Vertiefung in Mikrotiterplatten ausgesät und mit unterschiedlichen Konzentrationen von IFN γ stimuliert. Die Hälfte der Einzelansätze wurde jeweils am ersten und am dritten Tag des Versuchs mit 100 μ g/ml Tryptophan supplementiert. Nach 72 Stunden Inkubationszeit erfolgte die Infektion der Zellen mit einer konstanten Virusmenge. Nach erneuter Inkubation über 72 Stunden wurden die Zellen mikroskopisch untersucht und die Virusmenge wie unter 2.2.16 beschrieben bestimmt. Dargestellt sind die Werte aus sechs voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen mit Standardabweichungen. Eine signifikante Reduktion des Viruswachstums ($P < 0,05$) im Vergleich mit den unbehandelten Zellen ist mit einem schwarzen Kästchen gekennzeichnet; ein signifikanter Unterschied des Viruswachstums im Vergleich zu den allein mit TNF α behandelten Zellen ist durch einen schwarzen Stern markiert.

In dem Experiment wurde gezeigt, dass auch die HSV-2-Replikation durch IFN γ -Stimulation in HeLa-Zellen gehemmt werden konnte. Bei einer Konzentration von 250 U/ml IFN γ konnte das Viruswachstum nur kaum reduziert werden, erst bei einer Stimulation der Zellen mit 500 U/ml IFN γ nahm die Virusvermehrung sogar um zwei Zehnerpotenzen ab. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Befunden aus Abbildung 11, denn dort konnte gezeigt werden, dass erst ab

einer Stimulation der HeLa-Zellen mit 500 U/ml IFN γ ein ausreichender Abbau des im Kulturmedium vorhandenen Tryptophans erreicht werden konnte.

Im Gegensatz zum dem antiviralen Effekt des IFN γ gegen HSV-1 in den HUVEC, konnte bei dem hier gezeigten antiviralen Effekt gegen HSV-2 in den HeLa-Zellen der Tryptophanabbau durch die IDO als Wirkmechanismus ausgemacht werden. Durch eine Supplementierung von Tryptophan konnte nämlich der durch HeLa Zellen vermittelte anti-HSV-2-Effekt vollständig antagonisiert werden.

In dem gezeigten Experiment wurde auch der verstärkende Effekt des TNF α auf den IFN γ -vermittelten antiviralen Effekt bestätigt. Bei Stimulation der HeLa-Zellen mit 125 U/ml IFN γ konnte noch kein Effekt auf die HSV-2-Replikation festgestellt werden. Erfolgte aber zusätzlich die Kostimulation mit 100 U/ml TNF α , so konnte das Viruswachstum bereits um eine Zehnerpotenz gesenkt werden. Durch die Kostimulation mit TNF α konnte des weiteren bei einer Konzentration von 250 U/ml IFN γ eine Hemmung der Virusreplikation um zwei Zehnerpotenzen und bei einer Konzentration von 500 U/ml IFN γ sogar um drei Zehnerpotenzen erreicht werden, das entspricht ca. 99.9% Wachstumsverminderung.

Auch der durch TNF α verstärkte antivirale Effekt konnte durch Tryptophansupplementierung vollständig aufgehoben werden und ist somit ebenfalls als IDO-bedingt anzusehen.

TNF α konnte, wie zuvor bei den HBMEC, alleine keinen antiviralen Effekt auslösen.

Im Weiteren sollte noch überprüft werden, ob die beobachtete IFN γ -vermittelte Hemmung der Virusreplikation nicht auch durch einen durch Tryptophanmangel ausgelösten cytotoxischen Effekt erklärt werden könnte. Zu diesem Zweck wurden zunächst HeLa-Zellen mit IFN γ und TNF α über drei Tage stimuliert und anschließend geerntet. Dann wurde die Anzahl an toten Zellen mit der Trypanblauexklusionsmethode bestimmt. Hier konnte festgestellt werden, dass die Anzahl der toten Zellen sowohl in verschiedenen stimulierten als auch unstimulierten Zellen jeweils unter 5% lag. Im Folgenden sollte nun die Beeinflussung der Zellproliferation untersucht werden. Erneut wurden gleiche Mengen HeLa-Zellen mit IFN γ , TNF α und mit

einer Kombination aus beiden Zytokinen über drei Tage inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellanzahl bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 zu sehen.

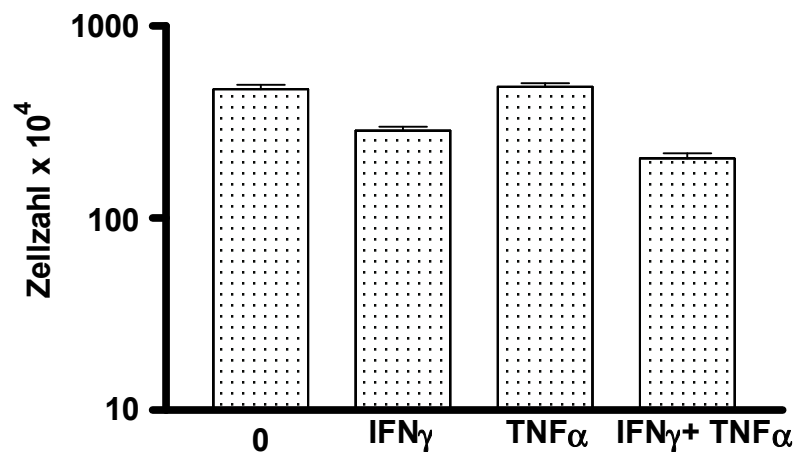


Abb.15: Wirkung von IFN_γ und TNF_α auf die Proliferation von HeLa-Zellen

In diesem Versuch wurde die geerntete Zellzahl nach einer dreitägigen Inkubation mit IFN_γ (500 U/ml) und /oder TNF_α (100 U/ml) bestimmt. Hier sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung dargestellt.

Aus diesem Experiment ist zu entnehmen, dass eine Inkubation der Zellen mit 500 U/ml IFN_γ bzw. IFN_γ/TNF_α zu einer geringen Verminderung der Zellproliferation im Vergleich zu unstimulierten Zellen führt. TNF_α alleine hat keinen Effekt auf die Zellproliferation.

Damit steht fest, dass die Verminderung der Zellvermehrung durch Tryptophanabbau allenfalls einen geringen Teil zu dem beobachteten antiviralen Effekt beiträgt, denn hier betrug die Verminderung des Viruswachstums bei höchster Stimulation ungefähr drei Zehnerpotenzen, das heißt eine Verminderung um den Faktor 1000. Die Zellproliferation ist nur ca. um den Faktor 2 vermindert.

4. Diskussion

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit antiviralen Abwehrmechanismen in humanen Zelllinien nach Stimulation mit diversen Cytokinen, insbesondere $\text{IFN}\gamma$. Untersucht wurde hier vor allem der antivirale Effektormechanismus durch eine Tryptophandepletion, welche wiederum durch die Aktivität der Indolamin 2,3-Dioxygenase ausgelöst wird.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Pathogenen handelte es sich um das Herpes Simplex Virus Typ I und Typ II. Deren Rolle als Krankheitserreger in der klinischen Praxis habe ich bereits in der Einleitung dargestellt.

Bei den verwendeten Zelllinien wurde besonderes Gewicht auf Endothelzellen gelegt, es wurden die antiviralen Aktivitäten von Hirnendothelien (HBMEC) und Nabelschnurendothelien (HUVEC) untersucht. Im Folgenden möchte ich zunächst auf die bisher bekannte Rolle von Endothelzellen in der Immunabwehr eingehen und die im Rahmen dieser Arbeit entstanden Ergebnisse in die bisherigen Erkenntnisse einordnen.

4.1. Rolle der HBMEC bei Infektionen des ZNS

In dieser Arbeit wurden Hirnendothelien verwendet, um deren mögliche Rolle bei der Abwehr einer Infektion des Zentralnervensystems mit dem Herpes Simplex Virus Typ I zu untersuchen. Die wichtige Rolle der Endothelzellen bei der Infektion des ZNS ist in vielen Studien belegt worden. So konnte eine Mitwirkung dieser Zellen bei der Abwehr von bakteriellen, parasitären und viralen Infektionserregern nachgewiesen werden (Huang et al., 2001). In diesem Zusammenhang spielen sie eine Rolle in Gerinnungsprozessen (Esmon et al., 2004), sie dienen als Zielzellen für verschiedene Pathogene, sind an der Rekrutierung von Leukocyten beteiligt und vermitteln antibakterielle und antiparasitäre Effekte. Zusätzlich existieren Hinweise auf eine antivirale Aktivität der Hirnendothelien (Kraus et al., 2004).

Die Reaktion von verschiedenen Endothelzelllinien auf einen Kontakt mit dem in dieser Arbeit verwendeten Herpes Simplex Virus Typ I konnte bereits in einigen Untersuchungen näher bestimmt werden. So konnten Chirathaworn et al. im Jahr 2004 zeigen, daß eine humane Endothelzelllinie als Reaktion auf eine Infektion mit dem HSV I eine Hochregulierung von Lipoproteinrezeptoren zeigt. Eine Veränderung der Expression von Oberflächenantigenen in humanen Endothelzellen aus dermalen und cerebralen Herkunft konnte ebenfalls in verschiedenen Studien belegt werden (Brankin et al., 1995; Larcher et al., 2001). Auch in vivo-Studien belegen die wichtige Rolle von cerebralen Endothelien bei viralen Infektionen. So konnten Boivin et al. im Jahr 2002 eine weitreichende immunologische Antwort in Hirnendothelien von HSV Typ II-infizierten Mäusen nachweisen.

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse belegen, daß das Herpes Simplex Virus Typ I in der Lage ist, HBMEC zu infizieren und sich in diesen zu replizieren. Außerdem konnte eine drastische Reduktion dieser Virusreplikation nach Stimulation der Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ nachgewiesen werden. Als ursächlicher Mechanismus dieser Reduktion der Virusreplikation konnte die durch dieIDO vermittelte Tryptophandepletion verantwortlich gemacht werden. Die wichtige Rolle derIDO in der Abwehr von verschiedenen Pathogenen konnte in den vergangenen Jahren mehrfach belegt werden (Hayashi et al., 2001; Rottenberg et al., 2000; Pfefferkorn et al., 1984). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnten wir die antibakteriellen Effekte gegen mehrere verschiedene bakterielle Erreger und die antiparasitären Effekte derIDO-Aktivität nachweisen (MacKenzie et al., 1998, 1999b; Däubener et al., 1993). Neben anderen Zelllinien wurden schließlich in unserer Arbeitsgruppe auch die antibakteriellen und antiparasitären Potentiale der HBMEC untersucht. Hierbei konnte eineIDO-vermittelte antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* gefunden werden (Schroten et al., 2001). Auch ein durch Tryptophanabbau vermittelter antiparasitärer Effekt gegen den Parasiten *Toxoplasma Gondii* konnte in den HBMEC nachgewiesen werden (Däubener et al., 2001).

Das Konzept derIDO-vermittelten Tryptophandepletion als antiviraler Effektormechanismus ist hingegen noch recht neu und bisher wenig erforscht. Bodaghi et al. waren 1999 die Ersten, die diesen Mechanismus für die antivirale Aktivität von Retinoblastomzellen gegen das Cytomegalievirus verantwortlich machten. Seitdem gab es auf diesem Gebiet jedoch wenige weitere Ergebnisse. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich deshalb mit den potentiellen antiviralen Effekten gegen das Herpes Simplex Virus Typ I, die durch IDO-Aktivität in verschiedenen Zellen vorliegen könnten. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine humane Glioblastomzelllinie auf mögliche Effekte dieser Art untersucht, da sie als gutes Beispiel für die Zielzellen des HSV Typ I im Rahmen einer Meningoenzephalitis diente. In diesen Untersuchungen konnte erstmals eine IDO-vermittelte antivirale Aktivität gegen das Herpes Simplex Virus Typ I nachgewiesen werden (Adams et al., 2004). Nach diesen Ergebnissen untersuchte ich in meiner experimentellen Arbeit, ob sich ein ähnlicher Effekt auch in Hirnendothelien feststellen ließ. Wie im Ergebnisteil demonstriert, konnte eine solche Wirkweise auch in den Endothelien festgestellt werden. Dieser Effekt könnte in vivo eine ähnlich wichtige Rolle spielen, wie ein antiviraler Effekt in Gliazellen. Eventuell ist die antivirale Aktivität in den Endothelien sogar von größerer Bedeutung, denn potentielle virale Pathogene müssen, um eine ZNS-Infektion zu verursachen, zunächst die Blut-Hirn-Schranke passieren und kommen somit zunächst in Kontakt mit den Hirnendothelien. Der antivirale Wirkmechanismus dieser Zellen könnte die Viren jedoch in vivo an einer Invasion des ZNS hindern und somit auch das klinische Bild der Meningoenzephalitis verhindern. Auch wenn die Tryptophandepletion durch die Hirnendothelien nicht ausreichen sollte, um die Viren an einer Invasion des ZNS zu hindern, so könnte sie doch mit der Tryptophandegradation durch andere IDO-positive Zellen innerhalb des ZNS zusammenwirken. Wie zuvor erwähnt konnte von unserer Arbeitsgruppe nämlich auch eine IDO-Aktivität in Glioblastomzellen bewiesen werden, was für eine ähnliche Aktivität von Astrozyten in vivo spricht. Guillemín et al. konnte zudem im Jahr 2005 eine IDO-Aktivität von humanen Astrozyten, Mikroglia und

Neuronen nachweisen. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, daß all diese IDO-positiven Zellen im Falle einer Infektion den Tryptophangehalt des Hirngewebes in Konjugation drastisch senken können, was eine für Bakterien, Parasiten und Viren negative Umgebung schaffen würde. Die IDO-Aktivität der Hirnendothelien könnte hierbei die Rolle eines „Torwächters“ spielen, da sie als wichtiger Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke den Tryptophaneinfluß ins Hirnparenchym drosseln könnten, wohingegen die anderen IDO-positiven Zellen innerhalb des Hirngewebes die Konzentration an vorhandenem Tryptophan weiter reduzieren. In vivo könnten all diese Effekte zusammenwirken und damit einen wichtigen Schutzmechanismus gegen Infektionen des ZNS mit multiplen Erregern darstellen.

Nachdem die antiviralen Effekte in den Hirnendothelien ausreichend untersucht waren, konzentrierte ich mich im Anschluß darauf, auch andere Endothelzelllinien auf mögliche antivirale Effekte zu untersuchen. Die hierbei gefundenen Ergebnisse möchte ich im Weiteren diskutieren.

4.2. Antivirale Effekte in HUVEC

In dieser Arbeit wurden als weitere Endothelzellen die HUVEC auf antivirale Effekte untersucht. Diese unterscheiden sich jedoch in einigen wesentlichen Punkten von den zuvor untersuchten HBMEC. Als Erstes ist natürlich der andere Ursprungsort der Zellen zu nennen. Die HBMEC stammen aus Hirngefäßen, die HUVEC hingegen aus Nabelschnurgefäßen. Eine Gemeinsamkeit der beiden Zelllinien besteht jedoch darin, daß sie beide an wichtigen Schrankenfunktionen beteiligt sind. So stellen die HBMEC einen wichtigen Teil der Blut-Hirn-Schranke dar, die HUVEC hingegen regeln als Bestandteil der Nabelschnurgefäße den Stoffaustausch zwischen Mutter und Fetus. Allerdings liegen noch weitere Unterschiede zwischen den beiden Endothelzelllinien vor. So handelt es sich bei den HBMEC um

Mikroendothelien, bei den HUVEC um Makroendothelien. Zudem wurden die HBMEC als immortalisierte Zellen verwendet, in den Experimenten mit HUVEC wurde mit nativen Zellen gearbeitet. Aus diesem Grund mussten zudem bei der Kultivierung der HUVEC andere Bedingungen eingehalten werden. Im Besonderen ist hier zu nennen, daß das Kulturmedium der HUVEC zusätzlich mit einem Wachstumsfaktor (ECGS) und Heparin versetzt war, um für diese Zellen nötige Wachstumsbedingungen zu schaffen.

In dieser Arbeit konnte dann schließlich auch ein anderes Verhalten der HUVEC im Bezug auf Aktivität derIDO und antivirale Wirkungen festgestellt werden. Im Ergebnisteil konnte demonstriert werden, daß die HUVEC zwar in der Lage sind, nach Stimulation mit IFN γ Tryptophan zu Kynurenin abzubauen, allerdings ist diese Reaktion deutlich schwächer ausgeprägt als in den HBMEC. Erst eine maximale Stimulation mit IFN γ konnte einen Abbau des im normalen Kulturmedium vorhandenen Tryptophan bewirken. Dementsprechend anders stellt sich auch die antivirale Aktivität der HUVEC gegen HSV Typ I dar. Erst bei einer maximalen Stimulation mit IFN γ konnte eine Reduktion des Viruswachstums um ca. 90% erreicht werden. Bei niedrigeren Stimulationsdosen zeigte sich kein nennenswerter antiviraler Effekt. Einen weiteren wichtigen Punkt stellt die Tatsache dar, daß eine Tryptophansupplementation der Kulturansätze hier, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit den HBMEC, nicht in der Lage war, eine vollständige Antagonisierung des antiviralen Effektes zu erreichen. Die Virusreplikation wurde in Ansätzen mit Zugabe von Tryptophan fast ebenso stark eingeschränkt, wie in den un-supplementierten Tests. Daraus kann gefolgert werden, daß im Falle der HUVEC zwar ein antiviraler Effekt nach IFN γ -Stimulation vorliegt, dieser jedoch zumindest in großen Teilen nicht durch einen Tryptophanabbau durch dieIDO zu erklären ist. In den HUVEC scheint ein anderer antiviraler Effektormechanismus zum Tragen zu kommen. Um welchen es sich dabei handelt, muß in der Zukunft noch geklärt werden. Hierfür gibt es einige Möglichkeiten, die ich bereits in der Einleitung dieser Arbeit vorgestellt

habe. Zu nennen sind zum Beispiel die Proteinkinase R (s. 1.5.1.), die OAS und die RNase L (s. 1.5.2.) die ADAR1 (s. 1.5.3.) oder die iNOS (1.5.5).

In der bisherigen Literatur sind allerdings wenige Hinweise darauf zu finden, welcher Mechanismus hier eine Rolle spielen könnte. Allerdings konnten bereits antibakterielle Effekte der HUVEC nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ auf intrazelluläre *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen werden (De Assis et al., 2000). Diese antibakterielle Aktivität konnte durch die Bildung von Superoxid und Wasserstoffperoxid erklärt werden. Ein genauer antiviraler Effektmechanismus in HUVEC nach $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation wurde jedoch noch nicht beschrieben und muß in weiteren Forschungen genauer bestimmt werden. Hierbei könnte es hilfreich sein, zu untersuchen, ob sich der antivirale Effekt auch nach Stimulation mit anderen Cytokinen, wie zum Beispiel Typ-I-Interferonen, auslösen läßt und ob es möglich ist, den $\text{IFN}\gamma$ -vermittelten Effekt durch Costimulation mit anderen Cytokinen, wie zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ zu verstärken oder abzuschwächen.

Zudem gilt es noch zu klären, welcher der zuvor genannten Unterschiede zwischen den HUVEC und den HBMEC für ihr unterschiedliches antivirales Verhalten verantwortlich zu machen ist. Natürlich ist es möglich, daß die unterschiedliche Herkunft als Ursache zu nennen ist, da damit natürlich auch eine andere Funktionalität der verschiedenen Zelllinien einhergeht, die ein anderes Verhalten bei einer viralen Infektion gut erklärt. Unwahrscheinlich erscheint es nach neueren Ergebnissen in unserer Arbeitsgruppe jedoch, daß der Unterschied zwischen den immortalisierten HBMEC und den nativen HUVEC für ihr unterschiedliches Verhalten verantwortlich zu machen ist. In nativen HBMEC konnte nämlich auch eineIDO-Aktivität nach Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ festgestellt werden. Diese nativen HBMEC müssen nun noch abschließend auf ihr antivirales Potential untersucht werden.

Einen interessanten Erklärungsversuch für die schwache IDO-Aktivität der HUVEC und das unterschiedliche Verhalten nach Virusinfektion gegenüber den HBMEC stellen die unterschiedlichen Kulturbedingungen dar. Wie oben erwähnt wurden die HUVEC mit Zusatz

von ECGS und Heparin kultiviert. 1995 konnten Däubener et al. bereits nachweisen, daß Heparin in der Lage ist, die Aktivität der IDO nach Stimulation einer Glioblastomzelllinie mit IFN γ deutlich einzuschränken. Zudem konnte in der genannten Arbeit gezeigt werden, daß auch ein bekannter, IDO-vermittelter, antiparasitärer Effekt gegen Toxoplasmen durch Heparineinfluß zu behindern war.

Zwar wurden die Experimente zur IDO-Aktivität und zum antiviralen Verhalten der HUVEC aufgrund dieser Erkenntnisse in heparinfreiem Medium durchgeführt, es ist allerdings möglich, daß bereits die Vorkultur in heparinhaltigem Medium die HUVEC in Bezug auf IDO-Aktivität bzw. IFN γ -Reaktivität nachhaltig beeinflusst hat.

Zusammenfassend lässt sich sagen, daß in dieser Arbeit eine antivirale Aktivität gegen HSV Typ I in HUVEC festgestellt werden konnte, daß sich diese jedoch insofern von der antiviralen Aktivität in HBMEC unterscheidet, als daß sie nicht durch einen IDO-vermittelten Tryptophanabbau zu erklären ist. Der genaue Wirkmechanismus muß in weiteren Studien geklärt werden.

4.3. Costimulation mit TNF α und IL-1 β

Nachdem die IDO-Aktivierung nach einer Stimulation mit IFN γ in HBMEC und der daraus resultierende antivirale Effekt in dieser Arbeit demonstriert werden konnte, ging es im Folgenden darum, zu prüfen, ob andere Cytokine in der Lage waren, diese interferonvermittelten Effekte zu beeinflussen. Zunächst lag ein Schwerpunkt darin, zu untersuchen, ob eine Costimulation der Zellen mit TNF α in der Lage sein konnte, die IDO-Aktivität zu beeinflussen. Sollte dies der Fall sein, so sollte im Anschluß untersucht werden, ob sich diese mögliche Beeinflussung der IDO-Aktivität auch auf das antivirale Verhalten der Zellen auswirkt.

Ein Synergismus von IFN γ und TNF α ist in der Literatur im Bezug auf viele verschiedene Effekte bereits mehrfach vorbeschrieben. So wirken diese beiden Cytokine synergistisch bei einer Aktivierung von polymorphkernigen Neutrophilen zur Wachstumshemmung von *Candida albicans* mit (Djeu et al., 1986). Auch in der Beeinflussung von NK-Zellen wirken beide Cytokine in Konjugation (Degliantoni et al., 1985). Carlin et al. beschrieben bereits 1987 den synergistischen Effekt von IFN γ und TNF α auf die IDO-Aktivität in humanen mononuclearen Zellen des peripheren Blutes.

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde die costimulatorische Wirkung von TNF α auf den IFN γ -Effekt bereits untersucht. So konnte zum Beispiel eine Verstärkung der interferoninduzierten IDO-Aktivität durch TNF α in humanen Glioblastomzellen nachgewiesen werden (Däubener et al., 1996). Hier konnte zudem gezeigt werden, daß die Verstärkung der IDO-Aktivität durch TNF α ebenfalls in der Lage war, den interferonvermittelten, antiparasitären Effekt gegen *Toxoplasma gondii* zu steigern. Ähnliche Untersuchungen wurden auch für die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendeten HBMEC durchgeführt. Auch hier konnte bereits gezeigt werden, daß eine Costimulation mit TNF α in dieser Zelllinie ebenfalls in der Lage ist, die IDO-Aktivität und sowohl die resultierenden antiparasitären Effekte gegen *Toxoplasma gondii* (Däubener et al., 2001) als auch die antibakteriellen Effekte gegen *Staphylococcus aureus* (Schroten et al., 2001) zu verstärken.

In meiner Arbeit konnte ich die Verstärkung der IDO-Aktivität durch TNF α in HBMEC noch einmal belegen und zusätzlich zeigen, daß auch der interferonvermittelte, antivirale Effekt gegen HSV Typ I durch eine Costimulation mit TNF α deutlich gesteigert werden kann. Diese verstärkende Wirkung des TNF α auf antivirale Effekte konnte später zudem auch bei dem IDO-vermittelten, antiviralen Effekt gegen HSV Typ II in HeLa-Zellen nachgewiesen werden, worauf ich im Verlauf noch genauer eingehen werde.

Robinson et al. konnten 2003 zeigen, daß eine neue Gamma-Aktivierungssequenz (GAS-3) für die durch IFN γ und TNF α ausgelöste IDO-Transkription verantwortlich ist.

Nachdem der costimulatorische Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf die interferonvermittelte IDO-Aktivität in HBMEC nachgewiesen war, sollte nun untersucht werden, ob auch das Cytokin IL-1 β in der Lage war, einen ähnlichen Einfluß zu nehmen. Allerdings war in diesem Zusammenhang fraglich, ob dieses Cytokin die IDO-Aktivität ebenfalls verstärken oder vielleicht sogar abschwächen würde. Babcock et al. konnten im Jahr 2000 nachweisen, daß sowohl IL-1 β als auch $\text{TNF}\alpha$ in der Lage waren, die IDO-Transkription in interferonstimulierten HeLa-Zellen zu steigern. 2006 zeigten Shirey et al., daß die Costimulation von HeLa-Zellen mit $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ bzw. $\text{IFN}\gamma$ und IL-1 β jeweils in der Lage war, die Expression von $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu erhöhen und daß sie auf diesem Wege zu einer Verstärkung der IDO-Induktion führt. Allerdings konnten Hucke et al. im Jahr 2004 zeigen, daß eine Costimulation der uroepithelialen Zelllinie RT4 mit $\text{IFN}\gamma$ und IL-1 β die IDO-Aktivität in den untersuchten Zellen im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit $\text{IFN}\gamma$ deutlich absenkt. Durch diese Absenkung der IDO-Aktivität nach IL-1 β -Costimulation konnte auch der zuvor beobachtete antibakterielle Effekt, den die Zellen nach alleiniger Interferonstimulation gegen *Staphylococcus aureus* zeigten, unterbunden werden. In der zitierten Arbeit wurde davon ausgegangen, daß eine Verstärkung der NO-Produktion durch eine Aktivierung der iNOS bei der Costimulation mit IL-1 β zu einem vergrößerten proteasomalen Abbau der IDO führt. Zusätzlich wurde zuvor schon eine direkte Hemmung der IDO durch NO beschrieben (Thomas et al., 1994). In meiner Arbeit konnte jedoch für die HBMEC gezeigt werden, daß sie sowohl nach alleiniger $\text{IFN}\gamma$ -Stimulation als auch bei Costimulation mit $\text{TNF}\alpha$ bzw. IL-1 β keine iNOS-mRNA transkribierten. Daraus lässt sich auch erklären, daß ich eine deutlich Steigerung der IDO-Aktivität nach Costimulation mit IL-1 β beobachten konnte, die sogar noch stärker ausfiel, als die Verstärkung, die bei Costimulation mit $\text{TNF}\alpha$ nachgewiesen wurde. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in den Endothelzellen HBMEC und den uroepithelialen Zellen RT4 scheint durch unterschiedliche Muster in der Aktivierung der iNOS erklärlich. In RT4 führte eine Costimulation mit IL-1 β zu einer Steigerung der iNOS-

Aktivität und einer daraus folgenden Einschränkung der IDO-Aktivität. In den HBMEC wurde die iNOS jedoch bei dieser Costimulation nicht verstärkt, so daß die IDO-Aktivität in dieser Zelllinie nicht eingeschränkt sondern vielmehr vergrößert werden konnte. Da in humanen Zellen eine iNOS-Aktivierung mit anschließender NO-Produktion nach IFN γ -Stimulation eher die Ausnahme als die Regel ist, kann man davon ausgehen, daß die hier gezeigte Verstärkung der IDO-Aktivität nach Costimulation mit IL-1 β ein besseres Modell für die in vivo vorliegenden Bedingungen darstellt. Im Anschluß konnte in dieser Arbeit auch demonstriert werden, daß der gezeigte costimulatorische Effekt des IL-1 β auf die IDO-Aktivität in HBMEC auch in der Lage war, den interferonvermittelten antiviralen Effekt gegen HSV Typ I zu potenzieren. Die Forschungen auf dem Gebiet der Auswirkungen von anderen Cytokinen auf die interferonvermittelte IDO-Aktivität sind jedoch noch lange nicht abgeschlossen. So konnten zum Beispiel MacKenzie et al. bereits 1999(a) zeigen, daß die Cytokine IL-4, IL-10 und TGF β einen inhibitorischen Effekt auf die IDO-Aktivität ausüben. Bei der Vielzahl an bekannten Cytokinen stehen allerdings noch weitere Studien bezüglich deren Einfluß auf die interferoninduzierte IDO-Aktivierung aus.

4.4. Antivirale Effekte gegen HSV Typ II

Ein weiterer wichtiger Schritt in dieser Arbeit war es, die antiviralen Effekte, die nach IDO-Induktion nun in mehreren Zelltypen gegen HSV Typ I nachgewiesen werden konnten, auch im Bezug auf ihr Potential gegen andere Viren zu testen. Zu diesem Zweck wurde das Herpes Simplex Virus Typ II gewählt, das mit dem HSV Typ I eng verwandt ist. Da dieses Virus klinisch häufig genitale Infektionen verursacht, wurde als Modell für eine solche Situation die Infektion von HeLa-Zellen, die sich von einem Cervixkarzinom ableiten, mit diesem Virus gewählt. Die HeLa-Zellen zeigten nach IFN γ -Stimulation eine ausreichende, wenn auch recht geringe IDO-Aktivität und konnten in folgenden Experimenten auch die HSV Typ II-

Replikation nach IFN γ -Stimulation deutlich verringern. Dieser antivirale Effekt konnte durch Tryptophansupplementierung vollständig antagonisiert werden, wodurch wiederum die IDO-Aktivität als Ursache dieser antiviralen Wirkweise belegt werden konnte.

Diese Ergebnisse stellen einen bedeutenden Schritt bei der weiteren Erforschung des antiviralen Potentials der IDO dar, denn bisher ist dies in der Literatur nur im Bezug auf zwei verschiedene Viren beschrieben. Bodaghi et al. beschrieben 1999 in ihrer von mir bereits mehrfach zitierten Arbeit den antiviralen Effekt der IDO-Aktivität gegen das Cytomegalievirus in Retinoblastomzellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte diesen Effekt gegen HSV Typ I in Glioblastom- und Endothelzellen und nun erstmals auch gegen HSV Typ II in HeLa-Zellen zeigen. Allerdings bezogen sich all diese Ergebnisse auf DNA-Viren aus der Familie der Herpesviridae, so daß noch nicht abschließend geklärt war, ob es sich bei dem beschriebenen Effekt um einen generellen, antiviralen Wirkmechanismus handelt, oder ob dieser nur gegen eine spezielle Virusfamilie wirksam war. Im Jahr 2005 konnten Obojes et al. in Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe erstmals die Wirksamkeit des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus gegen die Replikation des Masernvirus in epithelialen und endothelialen Zellen nachweisen. Die Arbeit ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil hier erstmals die antivirale IDO-Aktivität gegen ein Virus, welches nicht aus der Familie der Herpesviridae stammt, nachgewiesen werden konnte. Bei dem Masernvirus handelt es sich zudem, im Gegensatz zu den bisher untersuchten Viren, um ein RNA-Virus. Somit legen die hier gewonnenen Ergebnisse die Vermutung nahe, daß durch die Induktion der IDO eine antivirale Aktivität gegen viele verschiedene Viren erreicht werden kann. Dieses Feld bietet somit noch viel Raum für weitere Forschungen, da noch viele Viren auf ihre Empfindlichkeit gegen den IDO-vermittelten Tryptophanabbau untersucht werden müssen. Ein erster Schritt könnte es sein, die von Bodaghi erreichten Ergebnisse gegen CMV in Retinoblastomzellen auch in HBMEC zu untersuchen, da Lathey et al. bereits 1989 nachweisen konnten, daß diese Zellen permissiv für eine Infektion mit dem Cytomegalievirus sind.

Außerdem muß in der Zukunft noch untersucht werden, über welchen Mechanismus sich die Tryptophandepletion negativ auf die Virusreplikation auswirkt. Diese Frage möchte ich im weiteren Verlauf diskutieren.

4.5. Mögliche Interaktionen zwischen Tryptophanabbau und Virusreplikation

Die antibakterielle und die antiparasitäre Wirkungsweise der IDO können über den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan erklärt werden. Bakterien, wie zum Beispiel Streptokokken, und Parasiten, wie zum Beispiel *Toxoplasma gondii*, benötigen diese Aminosäure für die Vermehrung. Folglich kann nach Abbau der Aminosäure kein weiteres Wachstum dieser Erreger mehr erfolgen. Fraglich war allerdings, wie die Wirtszellen den Tryptophanmangel überleben, da diese Aminosäure auch für ihr Fortbestehen erforderlich ist und sie eigentlich von dem Tryptophanabbau in ähnlichem Maße beeinflusst werden müssten wie die Pathogene. Flohr et al. schlugen im Jahr 1992 ein Erklärungsmodell für diese Frage vor. Durch IFN γ wird nämlich auch die Expression und Aktivierung der Tryptophan tRNA-Synthase ausgelöst. Diese könnte als ein Reservoir an Tryptophan für die Proteinsynthese der Wirtszellen dienen, welches den Bakterien und Parasiten nicht zur Verfügung steht.

Dieses Modell kann allerdings den hemmenden Effekt der Tryptophandepletion auf die Virusreplikation nicht erklären, denn Viren nutzen für die Replikation den Proteinbiosyntheseapparat der infizierten Wirtszelle. Somit steht ihnen auch das intrazelluläre, an tRNA gebundene Tryptophan für ihre Replikation zur Verfügung. Trotzdem gibt es eine Reihe an Erklärungsansätzen für den antiviralen Effekt der IDO-vermittelten Tryptophandepletion. Zum einen ist es möglich, daß virale Proteine deutlich mehr Tryptophan benötigen als Proteine der Wirtszelle. In diesem Fall ist es nachvollziehbar, daß der Tryptophanabbau die Virusreplikation deutlich stärker einschränkt als die Zellproliferation. Für diese These spricht die Tatsache, daß Tryptophan in humanen Proteinen nicht im

Übermaß vorkommt. In einigen wichtigen humanen Proteinen, wie zum Beispiel dem Insulin, fehlt es sogar vollständig. Im Gegensatz dazu enthalten alle HSV Typ I Proteine Tryptophan, was ebenfalls die Anfälligkeit des Virus auf Tryptophanmangel erklären kann. Auch für die Proteinsynthese anderer Viren ist Tryptophan von Bedeutung. So enthält zum Beispiel das Protein gp41 des Humanen Immunodefizienz Virus Typ I (HIV) eine tryptophanreiche Region, die die Bildung von Helices in der Proteinsekundärstruktur verursacht (Schibli et al., 2001).

Aber es gibt noch weitere mögliche Ursachen für den antiviralen Effekt des Tryptophanabbaus. So könnte ein Mangel dieser Aminosäure oder ein Überfluß an ihren Abbauprodukten ein intrazelluläres „Gefahrensignal“ darstellen, welches den Metabolismus der Wirtszelle beeinflusst. Diese These des Tryptophanstoffwechsels als intrazelluläres Signal wurde bereits von Munn et al. mehrfach vorgestellt (Munn et al., 1998; 1999). Allerdings ist genaueres über diesen möglichen Signalweg bisher nicht bekannt. Terness et al. beschrieben 2002 jedoch, daß sich Abbauprodukte des Tryptophan entlang des Kynureninpfades, wie zum Beispiel Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilic Acid, auf das Zellwachstum auswirken. Es wäre ebenfalls vorstellbar, daß sich diese Mediatoren auch auf das Viruswachstum auswirken.

Einen weiteren Erklärungsansatz für die antiviralen IDO-Effekte bieten die Ergebnisse von van Wissen et al. aus dem Jahr 2002. Sie konnten zeigen, daß die IDO-vermittelte Tryptophandepletion zu einer Stabilisierung von verschiedenen intrazellulären mRNAs führt. So könnte es möglich sein, daß IFN γ einen antiviralen Mechanismus in Gang setzt, der allerdings selbständig nicht in der Lage ist, die Virusreplikation einzuschränken. Einige Beispiele für mögliche Mechanismen dieser Art habe ich bereits in der Einleitung dieser Arbeit dargestellt (s. 1.5.). Eine IDO-vermittelte mRNA-Stabilisierung könnte diesen Mechanismus ausreichend verstärken, so daß er im Anschluß sein antivirales Potential entfalten kann.

All diese Erklärungsmodelle oder auch eine Kombination hieraus könnten die Ursache für den antiviralen Effekt der IDO-vermittelten Tryptophandegradation darstellen. Allerdings müssen diese Hypothesen in zukünftigen Experimenten noch auf ihre Gültigkeit überprüft werden, um den in dieser Arbeit beschriebenen, antiviralen Effekt besser zu verstehen.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die mögliche Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo*. Darauf möchte ich nun noch kurz eingehen.

4.6. Mögliche antivirale Effekte der IDO *in vivo*

Eine Übertragung der *in vitro* gewonnenen Daten zur antiviralen IDO-Aktivität auf die Situation *in vivo* stellt eine große Herausforderung dar. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, daß Herpesviren in der Lage sind, die Synthese von interferonregulierten Proteinen zu stimulieren (Nicholl et al., 2000), sie andererseits jedoch auch über die Möglichkeit verfügen, körpereigene, antivirale Mechanismen zu umgehen. Zum Beispiel konnte von Cassady et al. 2002 beschrieben werden, daß Herpesviren die Wirkungen der Proteinase R (s. 1.5.1.) umgehen können. Ob die Viren *in vivo* auch Möglichkeiten besitzen, um die antivirale Wirkung der IDO abzuschwächen, muß noch untersucht werden.

Für die Situation *in vivo* konnte jedoch eine verstärkte IDO-Aktivität in Folge von IFN γ -Einfluß in Patienten festgestellt werden. Dieser Anstieg der IDO-Aktivität konnte sowohl im Rahmen einer Infektionserkrankung (Heyes et al., 1992) als auch bei Patienten, die eine Therapie mit IFN γ erhielten (Byrne et al., 1986) nachgewiesen werden. Allerdings hat der IDO-vermittelte Tryptophanabbau auch eine immunregulatorische Komponente, die von mir bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben wurde (s. 1.6.4.). Sowohl Munn et al. (1998, 1999) als auch Hwu et al. (2000) konnten den inhibitorischen Effekt der IDO auf die T-Zell-Aktivierung und Proliferation zeigen. Auch durch die IDO-Aktivität in HeLa-Zellen konnte eine Hemmung von T-Zellen erreicht werden (Logan et al., 2002). Ergebnisse aus

unserer Arbeitsgruppe belegen ebenfalls den IDO-vermittelten, antiproliferativen Effekt auf T-Zellen. Dieser konnte von uns auch durch mesenchymale Stammzellen ausgelöst werden (Meisel et al., 2004). Auch die in dieser Arbeit verwendeten HBMEC konnten gleiche IDO-vermittelte Effekte auf T-Zellen auslösen.

Diese hemmende Wirkung der IDO-Aktivierung auf T-Zellen könnte in vivo eine negative Wirkung auf die antivirale Verteidigung haben, da T-Zellen hierbei eine wichtige Rolle spielen. Ob die Hemmung der Virusreplikation oder die Hemmung von T-Zellen in vivo die größere Rolle spielt, muß noch herausgefunden werden. Allerdings ist auch ein regulativer Kreislauf zwischen beiden Wirkungen vorstellbar. Eine virale Erkrankung würde zunächst zu einer Einwanderung von T-Zellen in das Gebiet der Infektion führen. Hier erfolgten deren Aktivierung und die Produktion von Cytokinen wie $\text{IFN}\gamma$. Durch $\text{IFN}\gamma$ -Wirkung könnten nun in dem infizierten Gewebe eine IDO-Induktion und eine damit verbundene Tryptophandegradation einsetzen. Dies wirkt sich zunächst antiviral gegen die Pathogene aus. Um jedoch einen übermäßigen Tryptophanmangel im Gewebe zu verhindern, der sich auch negativ auf die Wirtszellen auswirken würde, bewirkt der Tryptophanabbau ebenfalls eine Hemmung der T-Zellen, wodurch eine überschießende Produktion von $\text{IFN}\gamma$, welche durch weitere IDO-Aktivierung dem Gewebe sämtliches Tryptophan entziehen würde, verhindert werden könnte. Dieses Modell stellt eine Möglichkeit für das Zusammenspiel der antiviralen und der immunregulatorischen Komponente dar. Ob sich dieses Modell in vivo nachweisen lässt, muß noch erforscht werden.

Die Untersuchungen von Karupiah et al. aus dem Jahr 1998 könnten für eine Rolle der IDO bei der antiviralen Wirkung gegen das Influenza Virus in vivo im murinen System sprechen. Hier ließ sich nämlich in Mäusen, die iNOS-defizient waren, durch $\text{IFN}\gamma$ -Behandlung ein starker antiviraler Effekt gegen eine Infektion mit dem Influenzavirus feststellen. Dieses Ergebnis spricht allein noch nicht unbedingt dafür, daß eine IDO-Aktivierung für diesen antiviralen Effekt verantwortlich war, da auch eine Vielzahl von anderen,

interferonvermittelten, antiviralen Effektormechanismen bekannt sind (s. 1.5.). Allerdings konnte der hier beschriebene Effekt in der Gegenwart von NO vollständig geblockt werden. Wie von mir bereits zuvor angeführt, ist NO als ein potenter Hemmer derIDO-Aktivität vorbeschrieben, womit die Ergebnisse dieser Veröffentlichung möglicherweise erstmals einenIDO-vermittelten, antiviralen Effekt in vivo beschreiben.

4.7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit konnte die Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase durch Interferon γ in verschiedenen Zelltypen nachgewiesen werden. Ein besonderer Schwerpunkt lag hierbei auf Endothelzellen. Diese IDO-Aktivität konnte in Hirnendothelien zudem als potenter, antiviraler Effektormechanismus gegen das Herpes Simplex Virus Typ I identifiziert werden. In Nabelschnurendothelien konnte ebenfalls eine antivirale Wirkung nach IFN γ -Stimulation beschrieben werden, die sich aber allenfalls zum Teil durch eine IDO-Induktion erklären lässt. Hier scheint ein anderer, antiviraler Mechanismus bedeutender zu sein, der noch in weiteren Forschungen bestimmt werden muß. Zudem konnte in dieser Arbeit auch die Rolle der IDO-Induktion bei der Abwehr von Infektionen mit dem Herpes Virus Typ II in HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin leistet die Arbeit einen Beitrag zur Klärung der genauen Regulierung der IDO-Induktion. In den verwendeten Endothelzellen waren die Cytokine TNF α und IL-1 β in der Lage sowohl die Aktivität der IDO als auch ihre antivirale Wirkungsweise zu potenzieren.

Für eine Übertragung der hier in vitro erlangten Ergebnisse auf die Situation in vivo sprechen wichtige Hinweise, allerdings müssen zukünftige Arbeiten die Rolle der IDO bei der antiviralen Abwehr in vivo noch genau klären.

Literaturverzeichnis

Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie C R, Takikawa O, and Däubener W
Role of Indoleamine-2,3-Dioxygenase in Alpha/Beta and Gamma Interferon-Mediated
Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections
J Virol. 2004; 78(5): 2632–2636

Alexander A M, Crawford M, Bertera S, Rudert, W A, Takikawa O, Robbins P D, and Trucco
M
Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival
after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes.
Diabetes. 2002; 51(2): 356–365

Arnheiter H, Frese M, Kambadur R, Meier E, and Haller O
Mx transgenic mice--animal models of health.
Curr Top Microbiol Immunol. 1996; 206: 119–147

Babcock T A and Carlin J M
Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis
factor alpha in interferon-treated epithelial cells.
Cytokine. 2000; 12(6): 588–594

Bach E A, Aguet M, and Schreiber R D
The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling.
Annu Rev Immunol. 1997; 15: 563–591

Benech P, Vigneron M, Peretz D, Revel M, and Chebath J
Interferon-responsive regulatory elements in the promoter of the human 2',5'-oligo(A)
synthetase gene.
Mol Cell Biol. 1987; 7(12): 4498–4504

Bodaghi B, Goureau O, Zipeto D, Laurent L, Virelizier J L, and Michelson S
Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase
in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells.
J Immunol. 1999; 162(2): 957–964

Boivin G, Coulombe Z, and Rivest S
Intranasal herpes simplex virus type 2 inoculation causes a profound thymidine kinase
dependent cerebral inflammatory response in the mouse hindbrain.
Eur J Neurosci. 2002; 16(1): 29–43

Bradford M M
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing
the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. 1976; 72:248-254

- Brankin B, Hart M N, Cosby S L, Fabry Z, and Allen I V
Adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion to cerebral endothelium: effects of measles virus and herpes simplex 1 virus.
J Neuroimmunol. 1995; 56(1): 1–8
- Brown J, Howie S E, and Entrican G
A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep.
Vet Immunol Immunopathol. 2001; 82(1-2): 107–119
- Byrne G I, Lehmann L K, Kirschbaum J G, Borden E C, Lee C M, and Brown R R
Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity.
J Interferon Res. 1986; 6(4): 389–396
- Cantin E, Tanamachi B, and Openshaw H
Role for Gamma Interferon in Control of Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation
J Virol. 1999; 73(4): 3418–3423
- Carlin J M, Borden E C, Sondel P M, and Byrne G I
Biologic-response-modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures.
J Immunol. 1987; 139(7): 2414–2418
- Carlin J M, Borden E C, Sondel P M, and Byrne G I
Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.
J Leukoc Biol. 1989; 45(1): 29–34
- Cassady K A, and Gross M
The Herpes Simplex Virus Type 1 U_S11 Protein Interacts with Protein Kinase R in Infected Cells and Requires a 30-Amino-Acid Sequence Adjacent to a Kinase Substrate Domain
J Virol. 2002; 76(5): 2029–2035
- Chirathaworn C, Pongpanich A, Poovorawan Y
Herpes simplex virus 1 induced LOX-1 expression in an endothelial cell line, ECV 304.
Viral Immunol. 2004; 17(2):308-14
- Chirgwin J M, Przybyla A E, MacDonald R J, Rutter W J
Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.
Biochemistry. 1979; 18(24):5294-5299
- Chon S Y, Hassanain H H, and Gupta S L
Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (STAT1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene.
J Biol Chem. 1996; 271(29): 17247–17252
- Cieciura S J, Marcus P I, and Puck T T
Clonal growth in vitro of epithelial cells from normal human tissues.
J Exp Med. 1956; 104(4): 615–628

- Clemens M J, Hershey J W, Hovanessian A C, Jacobs B C, Katze M G, Kaufman R J, Lengyel P, Samuel C E, Sen G C, and Williams B R
PKR: proposed nomenclature for the RNA-dependent protein kinase induced by interferon.
J Interferon Res. 1993; 13(3): 241
- Darnell Jr J E, Kerr I M, and Stark G R
Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.
Science. 1994; 264(5164): 1415–1421
- Däubener W, Pilz K, Seghrouchni Zennati S, Bilzer T, Fischer H G, and Hadding U
Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma.
J Neuroimmunol. 1993; 43(1-2): 31–38
- Däubener W, Wanagat N, Pilz K, Seghrouchni S, Fischer H G, and Hadding U
A new, simple, bioassay for human IFN-gamma.
J Immunol Methods. 1994; 168(1): 39–47
- Däubener W, Nockemann S, Gutsche M, and Hadding U
Heparin inhibits the antiparasitic and immune modulatory effects of human recombinant interferon-gamma.
Eur J Immunol. 1995; 25(3): 688–692
- Däubener W, Remscheid C, Nockemann S, Pilz K, Seghrouchni S, Mackenzie C, and Hadding U
Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha.
Eur J Immunol. 1996; 26(2): 487–492
- Däubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim K S, and Schrotten H
Restriction of *Toxoplasma gondii* Growth in Human Brain Microvascular Endothelial Cells by Activation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase
Infect Immun. 2001; 69(10): 6527–6531
- De Assis M C, Da Costa A O, Barja-Fidalgo T C, Plotkowski M C
Human endothelial cells are activated by interferon-gamma plus tumour necrosis factor-alpha to kill intracellular *Pseudomonas aeruginosa*.
Immunology. 2000; 101(2):271-278
- Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis M K, Perussia B, and Trinchieri G
Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon.
J Exp Med. 1985; 162(5): 1512–1530
- Djeu J Y, Blanchard D K, Halkias D, and Friedman H
Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor.
J Immunol. 1986; 137(9): 2980–2984

- Dreiding P, Staeheli P, and Haller O
Interferon-induced protein Mx accumulates in nuclei of mouse cells expressing resistance to influenza viruses.
Virology. 1985; 140(1): 192–196
- Esmon C T
Interactions between the innate immune and blood coagulation systems.
Trends Immunol. 2004; 25(10): 536–542
- Flohr T, Bange F C, von Euch A, Kiekenbeck M, and Böttger E C
Depletion of tryptophan is not involved in expression of tryptophanyl-tRNA synthetase mediated by interferon.
Infect Immun. 1992; 60(10): 4418–4421
- Fujita T, Reis L F, Watanabe N, Kimura Y, Taniguchi T, and Vilcek J
Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1989; 86(24): 9936–9940
- Gale Jr M, Tan S, and Katze M G
Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes
Microbiol Mol Biol Rev. 2000; 64(2): 239–280
- Gao J, Morrison D C, Parmely T J, Russell S W, and Murphy W J
An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide.
J Biol Chem. 1997; 272(2): 1226–1230
- Gardiner K, Horisberger M, Kraus J, Tantravahi U, Korenberg J, Rao V, Reddy S, and Patterson D
Analysis of human chromosome 21: correlation of physical and cytogenetic maps; gene and CpG island distributions.
EMBO J. 1990; 9(1): 25–34
- George C X, and Samuel C E
Human RNA-specific adenosine deaminase *ADARI* transcripts possess alternative exon 1 structures that initiate from different promoters, one constitutively active and the other interferon inducible
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(8): 4621–4626
- Ghosh A, Sarkar S N, Guo W, Bandyopadhyay S, and Sen G C
Enzymatic activity of 2'-5'-oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein.
J Biol Chem. 1997; 272(52): 33220–33226
- Ghosh A, Sarkar S N, and Sen G C
Cell growth regulatory and antiviral effects of the P69 isozyme of 2-5 (A) synthetase.
Virology. 2000; 266(2): 319–328

Giard D J, Aaronson S A, Todaro G J, Arnstein P, Kersey J H, Dosik H, and Parks W P
In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors.

J Natl Cancer Inst. 1973; 51(5): 1417–1423

Grove D S

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for the Core Facility Using TaqMan and the Perkin-Elmer/ Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector
Nucleic Acid Facility, Life Sc. Cons., The Penn. State University, USA

Guillemin G J, Smythe G, Takikawa O, and Brew B J

Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons.

Glia. 2005; 49(1): 15–23

Gurtner G J, Newberry R D, Schloemann S R, McDonald K G, and Stenson W F

Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice.

Gastroenterology. 2003; 125(6): 1762–1773

Haller O, Frese M, and Kochs G

Mx proteins: mediators of innate resistance to RNA viruses.

Rev Sci Tech. 1998; 17(1): 220–230

Hansen A M, Driussi C, Turner V, Takikawa O, and Hunt N H

Tissue distribution of indoleamine 2,3-dioxygenase in normal and malaria-infected tissue.

Redox Rep. 2000; 5(2-3): 112–115

Hashido M, Kawana T

Herpes simplex virus-specific IgM, IgA and IgG subclass antibody responses in primary and nonprimary genital herpes patients.

Microbiol Immunol. 1997; 41(5):415-20

Hassanain H H, Chon S Y, and Gupta S L

Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor.

J Biol Chem. 1993; 268(7): 5077–5084

Hayashi T, Rao S P, Takabayashi K, Van Uden J H, Kornbluth R S, Baird S M, Taylor M W, Carson D A, Catanzaro A, and Raz E

Enhancement of Innate Immunity against *Mycobacterium avium* Infection by Immunostimulatory DNA Is Mediated by Indoleamine 2,3-Dioxygenase

Infect Immun. 2001; 69(10): 6156–6164

Hefti H P, Frese M, Landis H, Di Paolo C, Aguzzi A, Haller O, and Pavlovic J

Human MxA Protein Protects Mice Lacking a Functional Alpha/Beta Interferon System against La Crosse Virus and Other Lethal Viral Infections

J Virol. 1999; 73(8): 6984–6991

Heyes M P, Brew B J, Saito K, Quearry B J, Price R W, Lee K, Bhalla R B, Der M, and Markey S P

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

J Neuroimmunol. 1992; 40(1): 71–80

Hissong B D and Carlin J M

Potential of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1.

J Interferon Cytokine Res. 1997; 17(7): 387–393

Hof H, Dörries R

Medizinische Mikrobiologie

2. korrigierte Auflage, 2002 Georg Thieme Verlag GmbH Stuttgart

Hovnanian A, Rebouillat D, Mattei M G, Levy E R, Marié I, Monaco A P, and Hovanessian A G

The human 2',5'-oligoadenylate synthetase locus is composed of three distinct genes clustered on chromosome 12q24.2 encoding the 100-, 69-, and 40-kDa forms.

Genomics. 1998; 52(3): 267–277

Huang S H and Jong A Y

Cellular mechanisms of microbial proteins contributing to invasion of the blood-brain barrier.

Cell Microbiol. 2001; 3(5): 277–287

Hucke C, MacKenzie C R, Adjogble K D Z, Takikawa O, and Däubener W

Nitric Oxide-Mediated Regulation of Gamma Interferon-Induced Bacteriostasis: Inhibition and Degradation of Human Indoleamine 2,3-Dioxygenase

Infect Immun. 2004; 72(5): 2723–2730

Hwang S Y, Hertzog P J, Holland K A, Sumarsono S H, Tymms M J, Hamilton J A, Whitty G, Bertoncello I, and Kola I

A null mutation in the gene encoding a type I interferon receptor component eliminates antiproliferative and antiviral responses to interferons alpha and beta and alters macrophage responses.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(24): 11284–11288

Hwu P, Du M X, Lapointe R, Do M, Taylor M W, and Young H A

Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation.

J Immunol. 2000; 164(7): 3596–3599

Isaacs A, Lindenmann J

Virus interference I. The interferon.

Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957;147(927):258-67

Janeway Jr C A, Travers P, Walport M, Shlomchik M J

Immunobiology, the immune system in health and disease

6th Edition, 2005 Garland Science Publishing, New York, NY, USA

- Jin H K, Takada A, Kon Y, Haller O, and Watanabe T
Identification of the Murine *Mx2* Gene: Interferon-Induced Expression of the Mx2 Protein from the Feral Mouse Gene Confers Resistance to Vesicular Stomatitis Virus
J Virol. 1999; 73(6): 4925–4930
- Kanzaki M, Morris P L
Identification and regulation of testicular interferon-gamma (IFN γ) receptor subunits: IFN γ enhances interferon regulatory factor-1 and interleukin-1 β converting enzyme expression.
Endocrinology. 1998;139(5):2636-44
- Karupiah G, Xie Q W, Buller R M, Nathan C, Duarte C, and MacMicking J D
Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide synthase.
Science. 1993; 261(5127): 1445–1448
- Karupiah G, Chen J H, Mahalingam S, Nathan C F, and MacMicking J D
Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice.
J Exp Med. 1998; 188(8): 1541–1546
- Kochs G, and Haller O
Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999; 96(5): 2082–2086
- Konan K V and Taylor M W
Importance of the two interferon-stimulated response element (ISRE) sequences in the regulation of the human indoleamine 2,3-dioxygenase gene.
J Biol Chem. 1996; 271(32): 19140–19145
- Kraus A A, Raftery M J, Giese T, Ulrich R, Zawatzky R, Hippenstiel S, Suttorp N, Krüger D H, and Schönrich G
Differential Antiviral Response of Endothelial Cells after Infection with Pathogenic and Nonpathogenic Hantaviruses
J Virol. 2004; 78(12): 6143–6150
- Krug R M, Shaw M, Broni B, Shapiro G, and Haller O
Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product.
J Virol. 1985; 56(1): 201–206
- Kuhen K L, Shen X, and Samuel C E
Mechanism of interferon action sequence of the human interferon-inducible RNA-dependent protein kinase (PKR) deduced from genomic clones.
Gene. 1996; 178(1-2): 191–193

Kuhen K L and Samuel C E

Isolation of the interferon-inducible RNA-dependent protein kinase Pkr promoter and identification of a novel DNA element within the 5'-flanking region of human and mouse Pkr genes.

Virology. 1997; 227(1): 119–130

Kumar A, Yang Y L, Flati V, Der S, Kadereit S, Deb A, Haque J, Reis L, Weissmann C, and Williams B R

Deficient cytokine signaling in mouse embryo fibroblasts with a targeted deletion in the PKR gene: role of IRF-1 and NF-kappaB.

EMBO J. 1997a; 16(2): 406–416

Kumar M, and Carmichael G G

Nuclear antisense RNA induces extensive adenosine modifications and nuclear retention of target transcripts

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997b; 94(8): 3542–3547

Kyhse-Andersen J

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

J Biochem Biophys Methods. 1984; 10(3-4):203-209

Laemmli U K

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 1970; 227(5259):680-685

Larcher C, Gasser A, Hattmannstorfer R, Obexer P, Furhapter C, Fritsch P, Sepp N

Interaction of HSV-1 infected peripheral blood mononuclear cells with cultured dermal microvascular endothelial cells: a potential model for the pathogenesis of HSV-1 induced erythema multiforme.

J Invest Dermatol. 2001; 116(1):150-156

Lathey J L, Wiley C A, Verity M A, and Nelson J A

Cultured human brain capillary endothelial cells are permissive for infection by human cytomegalovirus.

Virology. 1990; 176(1): 266–273

Lee G K, Park H J, Macleod M, Chandler P, Munn D H, and Mellor A L

Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division

Immunology. 2002; 107(4): 452–460

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, and Todaro G

A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.

Int J Cancer. 1976; 17(1): 62–70

Liu T, Khanna K M, Carriere B N, and Hendricks R L

Gamma Interferon Can Prevent Herpes Simplex Virus Type 1 Reactivation from Latency in Sensory Neurons

J Virol. 2001; 75(22): 11178–11184

- Logan G J, Smyth C M, Earl J W, Zaikina I, Rowe P B, Smythe J A, Alexander I E
HeLa cells cocultured with peripheral blood lymphocytes acquire an immuno-inhibitory phenotype through up-regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity.
Immunology. 2002; 105(4):478-487
- MacKenzie C R, Hadding U, and Däubener W
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. 1998; 178(3): 875–878
- MacKenzie C R, González R G, Kniep E, Roch S, and Däubener W
Cytokine mediated regulation of interferon-gamma-induced IDO activation.
Adv Exp Med Biol. 1999a; 467: 533–539
- MacKenzie C R, Hucke C, Müller D, Seidel K, Takikawa O, and Däubener W
Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells.
J Med Microbiol. 1999b; 48(10): 935–941
- MacMicking J D, North R J, LaCourse R, Mudgett J S, Shah S K, and Nathan C F
Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94(10): 5243–5248
- Marques A R, Straus S E
Herpes simplex type 2 infections--an update.
Dis Mon. 2000; 46(5): 325-359
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, and Dilloo D
Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation.
Blood. 2004; 103(12): 4619–4621
- Meurs E F, Watanabe Y, Kadereit S, Barber G N, Katze M G, Chong K, Williams B R, and Hovanessian A G
Constitutive expression of human double-stranded RNA-activated p68 kinase in murine cells mediates phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 and partial resistance to encephalomyocarditis virus growth.
J Virol. 1992; 66(10): 5805–5814
- Michel T and Feron O
Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?
J Clin Invest. 1997; 100(9): 2146–2152
- Miller K E, Ruiz D E, Graves J C.
Update on the prevention and treatment of sexually transmitted diseases.
Am Fam Physician. 2003; 67(9): 1915-1922

Munn D H, Zhou M, Attwood J T, Bondarev I, Conway S J, Marshall B, Brown C, and Mellor A L

Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.

Science. 1998; 281(5380): 1191–1193

Munn D H, Shafizadeh E, Attwood J T, Bondarev I, Pashine I, and Mellor A L

Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.

J Exp Med. 1999; 189(9): 1363–1372

Munn D H, Sharma M D, Lee J R, Jhaver K G, Johnson T S, Keskin D B, Marshall B, Chandler P, Antonia S J, Burgess R, Slingluff Jr C L, and Mellor A L

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

Science. 2002; 297(5588): 1867–1870

Munn D H, Sharma M D, and Mellor A L

Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells.

J Immunol. 2004; 172(7): 4100–4110

Murphy D G, Dimock K, and Kang C Y

Numerous transitions in human parainfluenza virus 3 RNA recovered from persistently infected cells.

Virology. 1991; 181(2): 760–763

Murray H W, Szuro-Sudol A, Wellner D, Oca M J, Granger A M, Libby D M, Rothermel C D, and Rubin B Y

Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages.

Infect Immun. 1989; 57(3): 845–849

Nathan C

Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?

J Clin Invest. 1997; 100(10): 2417–2423

Nicholl M J, Robinson L H, and Preston C M

Activation of cellular interferon-responsive genes after infection of human cells with herpes simplex virus type 1.

J Gen Virol. 2000; 81(Pt 9): 2215–2218

Obojes K, Andres O, Kim KS, Daubener W, Schneider-Schaulies J.

Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon.

J Virol. 2005; 79(12):7768-7776

Ohnishi T, Hirata F, and Hayaish O

Indoleamine 2,3-dioxygenase. Potassium superoxide as substrate.

J Biol Chem. 1977; 252(13): 4643–4647

- O'Toole C, Perlmann P, Unsgaard B, Moberger G, and Edsmyr F
Cellular immunity to human urinary bladder carcinoma. I. Correlation to clinical stage and radiotherapy.
Int J Cancer. 1972; 10(1): 77–91
- Patterson J B and Samuel C E
Expression and regulation by interferon of a double-stranded-RNA-specific adenosine deaminase from human cells: evidence for two forms of the deaminase.
Mol Cell Biol. 1995; 15(10): 5376–5388
- Pavlovic J, Haller O, and Staeheli P
Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle.
J Virol. 1992; 66(4): 2564–2569
- Pavlovic J, Arzet H A, Hefti H P, Frese M, Rost D, Ernst B, Kolb E, Staeheli P, and Haller O
Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein.
J Virol. 1995; 69(7): 4506–4510
- Pestka S, Langer J A, Zoon K C, and Samuel C E
Interferons and their actions.
Annu Rev Biochem. 1987; 56: 727–777
- Pfefferkorn E R
Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81(3): 908–912
- Pitossi F, Blank A, Schröder A, Schwarz A, Hüssi P, Schwemmle M, Pavlovic J, and Staeheli P
A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins.
J Virol. 1993; 67(11): 6726–6732
- Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, and Kochs G
Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity.
J Virol. 1997; 71(4): 2591–2599
- Puck T T, Marcus P I, and Cieciura S J
Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer.
J Exp Med. 1956; 103(2): 273–283
- Rebouillat D and Hovanessian A G
The human 2',5'-oligoadenylate synthetase family: interferon-induced proteins with unique enzymatic properties.
J Interferon Cytokine Res. 1999; 19(4): 295–308

Rigby C C and Franks L M

A human tissue culture cell line from a transitional cell tumour of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure.

Br J Cancer. 1970; 24(4): 746–754

Robinson C M, Shirey K A, and Carlin J M

Synergistic Transcriptional Activation of Indoleamine Dioxygenase by IFN- γ and Tumor Necrosis Factor- α

J Interferon Cytokine Res. 2003; 23(8): 413–421

Rottenberg M E, Gigliotti Rothfuchs A, Gigliotti D, Ceausu M, Une C, Levitsky V, and Wigzell H

Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with Chlamydia pneumoniae.

J Immunol. 2000; 164(9): 4812–4818

Rysiecki G, Gewert D R, and Williams B R

Constitutive expression of a 2',5'-oligoadenylate synthetase cDNA results in increased antiviral activity and growth suppression.

J Interferon Res. 1989; 9(6): 649–657

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Edition

Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, 1989

Schibli D J, Montelaro R C, and Vogel H J

The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles.

Biochemistry. 2001; 40(32): 9570–9578

Schroten H, Spors B, Hucke C, Stins M, Kim K S, Adam R, and Däubener W

Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of Staphylococcus aureus by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase.

Neuropediatrics. 2001; 32(4): 206–210

Shimizu T, Nomiyama S, Hirata F, and Hayaishi O

Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties.

J Biol Chem. 1978; 253(13): 4700–4706

Shirey K A, Jung J, Maeder G S, and Carlin J M

Upregulation of IFN- γ Receptor Expression by Proinflammatory Cytokines Influences IDO Activation in Epithelial Cells

J Interferon Cytokine Res. 2006; 26(1): 53–62

Silva N M, Rodrigues C V, Santoro M M, Reis L F L, Alvarez-Leite J I, and Gazzinelli R T

Expression of Indoleamine 2,3-Dioxygenase, Tryptophan Degradation, and Kynurenine Formation during In Vivo Infection with *Toxoplasma gondii*: Induction by Endogenous

Gamma Interferon and Requirement of Interferon Regulatory Factor 1

Infect Immun. 2002; 70(2): 859–868

- Simon A, Fäh J, Haller O, and Staeheli P
Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines.
J Virol. 1991; 65(2): 968–971
- Staeheli P and Sutcliffe J G
Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene.
Mol Cell Biol. 1988; 8(10): 4524–4528
- Staeheli P, Pitossi F, and Pavlovic J
Mx proteins: GTPases with antiviral activity.
Trends Cell Biol. 1993; 3(8): 268–272
- Stins M F, Gilles F, and Kim K S
Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells.
J Neuroimmunol. 1997; 76(1-2): 81–90
- Tanaka N, Kawakami T, and Taniguchi T
Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system.
Mol Cell Biol. 1993; 13(8): 4531–4538
- Tariq A, Ross J D
Viral sexually transmitted infections: current management strategies.
J Clin Pharm Ther. 1999; 24(6):409-14
- Terness P, Bauer T M, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, and Opelz G
Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites.
J Exp Med. 2002; 196(4): 447–457
- Thomas S R, Mohr D, and Stocker R
Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes.
J Biol Chem. 1994; 269(20): 14457–14464
- Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, and Van den Eynde B J
Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.
Nat Med. 2003; 9(10): 1269–1274
- van Wissen M, Snoek M, Smids B, Jansen H M, and Lutter R
IFN-gamma amplifies IL-6 and IL-8 responses by airway epithelial-like cells via indoleamine 2,3-dioxygenase.
J Immunol. 2002; 169(12): 7039–7044
- Vincendeau P, Lesthelle S, Bertazzo A, Okomo-Assoumou M C, Allegri G, Costa C V
Importance of L-tryptophan metabolism in trypanosomiasis.
Adv Exp Med Biol. 1999; 467:525-531 Review

- Wang Y, Zeng Y, Murray J M, and Nishikura K
Genomic organization and chromosomal location of the human dsRNA adenosine deaminase gene: the enzyme for glutamate-activated ion channel RNA editing.
J Mol Biol. 1995; 254(2): 184–195
- Whitley R J, Miller R L
Immunologic approach to herpes simplex virus.
Viral Immunol. 2001; 14(2):111-118 Review
- Whitley R J
Herpes simplex virus infection.
Semin Pediatr Infect Dis. 2002; 13(1): 6–11
- Yang Y L, Reis L F, Pavlovic J, Aguzzi A, Schäfer R, Kumar A, Williams B R, Aguet M, and Weissmann C
Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase.
EMBO J. 1995; 14(24): 6095–6106
- Zhou A, Hassel B A, and Silverman R H
Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: a uniquely regulated mediator of interferon action.
Cell. 1993; 72(5): 753–765
- Zhou A, Paranjape J, Brown T L, Nie H, Naik S, Dong B, Chang A, Trapp B, Fairchild R, Colmenares C, and Silverman R H
Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L.
EMBO J. 1997; 16(21): 6355–6363

Abkürzungen

6-FAM	6-Carboxyfluorescein
Abb.	Abbildung
ADAR	Adenosine Deaminase Acting on RNA = Adenosin Deaminase mit Wirkung auf RNA
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Copy DNA
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	CoenzymA
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation = Disseminierte Intravaskuläre Gerinnung
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	Doppelstränige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECGS	endothelial cell growth supplement = Endothelzell Wachstumszusatz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay = Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EMC	Encephalomyocarditis Virus
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS	foetal calf serum = fötales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS	gamma activated sequence = Gamma Aktivierte Sequenz
GTP	Guanosintriphosphat
HBMEC	Human Brain Microvascular Cells
HeLa-Zellen	Henrietta Lacks -Zellen (Cervixkarzinomzellen)
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HRP	Horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase
HSV	Herpes Simplex Virus
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFNAR	Interferon Alpha Rezeptor
IFNGR	Interferon Gamma Rezeptor
IFN α	Interferon α
IFN β	Interferon β
IFN γ	Interferon γ
IFN ω	Interferon ω
IL10	Interleukin 10

IL-1 β	Interleukin-1 β
IL4	Interleukin 4
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRF	interferon regulatory factor = Interferon Regulations Faktor
ISGF	interferon stimulated gene factor = Interferon Stimulierter Gen Faktor
ISRE	interferon stimulated response element = Interferon Stimuliertes Antwort Element
JAK	Janus Kinase
kb	Kilobasen(paare)
kDA	Kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
MOPS	2-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
OAS	2',5'-Oligoadenylate Synthetase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline = Phosphat- gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
PKR	Proteinkinase R
RNA	Ribonucleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate = Natriumdodecylsulfat
STAT	signal transducer and activator of transcription = Signalüberträger und Aktivator der Transkription
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TGF β	Transforming Growth Factor β = Transformierender Wachstumsfaktor β
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Trp	Tryptophan
U	Units
UV	Ultraviolet
VZV	Varizella Zoster Virus
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Däubener für die exzellente Betreuung, die stets freundliche Arbeitsatmosphäre und für die Begutachtung meiner Arbeit und deren Vertretung vor der medizinischen Fakultät.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. H. Hengel für die Übernahme des Koreferates.

PD Dr. O. Adams danke ich für die umfangreiche Hilfe bei allen virologischen Fragen und Problemen.

Ich danke dem Direktor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Dr. Christian Hucke und Tanja Vogel möchte ich für die nette und kompetente Einarbeitung danken. Ebenso geht mein Dank an Dr. Koku Adjogble, Dr. Aziz Aliyati, „Winni“ Schwippert, Silke Stuhlsatz, Claudia Woite und an alle weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe Däubener für die nette und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Bei Niko Range und Stephan Siebel möchte ich mich für die jahrelange Freundschaft bedanken.

Auch meinem Onkel, Martin Rübing, und seiner Familie möchte ich für ihre großzügige Unterstützung während meines Studiums danken.

Für die besondere Unterstützung während meines Studiums geht ein großes Dankeschön an meinen Großvater, Richard Engel, dem diese Arbeit auch mit gewidmet wurde.

Ein weiterer Dank geht an meine Schwester, Julia Rüßing, für sowohl meine Unterstützung als auch für die Pflege meiner Mutter, für die ich während meines Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation nicht immer ausreichend Zeit hatte.

Bruce Springsteen möchte ich für seine Musik danken, die mich seit Beginn des Studiums in allen Lebenslagen unterstützt hat.

Zum Abschluß danke ich meinen Eltern, Jutta und Friedhelm Rüßing, ohne deren Erziehung und ständige Unterstützung mein Medizinstudium und die Anfertigung dieser Arbeit niemals möglich gewesen wären.

Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht worden.

Ich bin mir darüber klar, daß der Bruch der obigen eidesstattlichen Versicherung in jedem Fall zur Folge hat, daß die Fakultät die Promotion widerruft.

Freiburg, den 27.10.2007

Daniel Rüßing

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Daniel Rüßing
Adresse	Rüggeberger Str. 166, 58256 Ennepetal
Telefon	02333/602730
E-Mail	danielruessing@gmx.de
Geschlecht	männlich
Geburtsdatum	27. März 1979
Geburtsort	Wuppertal
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch

Schulbildung

1985 - 1989	Grundschule Ennepetal-Rüggeberg
1989 - 1998	Reichenbach Gymnasium Ennepetal

Zivildienst

1998 - 1999	Zivildienst im Pflegebereich des Marienhospitals Schwelm
-------------	---

Studium

2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
2002	Ablegen der ärztlichen Vorprüfung mit der Note „ <i>sehr gut</i> “ (1.33)
2003	Ablegen des ersten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „ <i>gut</i> “ (2.0)
2005	Ablegen des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „ <i>gut</i> “ (2.0)
2005 - 2006	Praktisches Jahr im Marienhospital Düsseldorf in den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Urologie
2006	Ablegen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung mit der Note „ <i>sehr gut</i> “ (1.0) Abschluß des Medizinstudiums mit der Gesamtnote „ <i>gut</i> “ (1.66) und Approbation als Arzt

Ausländische Examina

2004	Ablegen der <i>United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 1</i> mit dem Score 238/96
2005	Ablegen der <i>United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 Clinical Knowledge</i> mit dem Score 242/98
2006	Ablegen der <i>United States Medical Licensing Examination (USMLE) Step 2 Clinical Skills</i> und Ausstellung des ECFMG Certificate

Famulaturen und Praktika

2002	Einmonatige Famulatur in der internistischen Praxis Khan/Prange in Schwelm
2003	Einmonatige Famulatur am Institut für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
2004	Zweimonatige Famulatur in der neurochirurgischen Klinik des Bethesda Krankenhauses Wuppertal
2004	Zweiwöchiges gynäkologisches Praktikum im Bethesda Krankenhaus Wuppertal
2004	Zweiwöchiges allgemeinmedizinisches Praktikum in der Praxis Edmund Mussner in Klausen/Südtirol, Italien

Berufserfahrung

08.-10.2006	Anstellung als Assistenzarzt in der neurochirurgischen Abteilung des Gemeinschaftskrankenhauses Herdecke
Seit dem 15.08.2007	Anstellung als Assistenzarzt in der neurochirurgischen Klinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	Sehr gut
Französisch	Gut
Latein	Latinum

Interessen

Englische Literatur, zeitgenössische Musik,
Skifahren, Kino, Freunde und Familie

Sonstiges

2000-2006

Nebenberufliche Tätigkeit im Altenzentrum
Marienstift Schwelm zur Finanzierung des
Studiums

Freiburg, den 27.10.2007

Endothelzellvermittelte antivirale Aktivität: Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase

Abstract

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit *in vitro*-Modellen für virale Infektionen in Endothelien. Ein Schwerpunkt liegt auf mikrovaskulären Hirnendothelien (HBMEC) und Nabelschnurothelien (HUVEC). In beiden Zelllinien wurde die Aktivität des tryptophanabbauenden Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) nach Stimulation mit Interferon γ untersucht. Es konnte sowohl in HBMEC als auch in HUVEC eine Aktivität des Enzyms festgestellt werden, wobei diese in den HBMEC deutlich stärker ausgeprägt war.

Des Weiteren wurde die Wirkung des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus auf die Replikation von Viren in den entsprechenden Zellen untersucht. In dieser Arbeit wurde als Modell das Herpes Simplex Virus Typ I verwendet.

Die Ergebnisse der Arbeit können zeigen, daß in interferonstimulierten HBMEC die Replikation des Virus deutlich eingeschränkt ist. Dieser antivirale Effekt konnte auf den IDO-vermittelten Tryptophanabbau zurückgeführt werden.

Auch in interferonstimulierten HUVEC wird die Replikation des HSV Typ I gehemmt, allerdings deutlich schwächer als in den HBMEC und außerdem spielt hier der IDO-vermittelte Tryptophanabbau nur eine untergeordnete Rolle. Die dominanten antiviralen Effektormechanismen in HUVEC müssen in der Zukunft noch identifiziert werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Koregulation der IDO Aktivität durch andere Cytokine untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß sowohl das Cytokin IL-1 β als auch das Cytokin TNF α in der Lage waren, die durch Interferon γ induzierte IDO-Aktivität zu verstärken, obwohl sie allein keine IDO-Aktivität induzieren konnten. Auch der IDO-vermittelte, antivirale Effekt konnte durch Kostimulation mit diesen Cytokinen gesteigert werden.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die antivirale Wirkung des IDO-vermittelten Tryptophanabbaus gegen das Herpes Simplex Virus Typ II untersucht. Zum Modell einer genitalen Infektion wurden in diesem Teil der Arbeit HeLa-Zellen verwendet. Auch gegen dieses Virus konnte in den Zellen eine IDO-vermittelte antivirale Aktivität festgestellt werden, die ebenfalls durch Kostimulation mit dem Cytokin TNF α noch gesteigert werden konnte.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Aktivität der IDO in Endothelzellen nicht nur, wie bereits bekannt, antibakterielle und antiparasitäre Effekte vermittelt, sondern auch eine wichtige Rolle in der antiviralen Abwehr spielt.

