

LPS-induzierte Aktivierung des Enzyms
Indolamin 2,3-Dioxygenase beim Schwein:
Physiologische Konsequenzen und ihre
Blockade durch 1-Methyltryptophan

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Elisa Wirthgen

geb. am 19.04.1982 in Leipzig

Rostock, 28. Februar 2012

1. Gutachter: Prof. Ulrike Gimsa (FBN Dummerstorf)
2. Gutachter: Prof. Barbara Bröker (Universität Greifswald)

Verteidigung: 22.10.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
1.1 LPS als Modell zur inflammatorischen Stimulation	2
1.2 Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation	3
1.2.1 „Sickness Behaviour“	3
1.2.2 Strukturelle und funktionale Modulation der Immunantwort	4
1.2.3 Interaktion zwischen Tryptophan-Stoffwechsel und Immun- und Nervensystem	6
1.2.4 Regulation desIDO-Enzyms	8
1.3 1-MT als IDO-Inhibitor	10
1.4 Zielstellung der Arbeit	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Tiere und Haltungsbedingungen	13
2.2 Entnahme von Blut und Gewebe.....	13
2.3 Experimentelles Design.....	14
2.3.1 Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.....	14
2.3.2 Blockade IDO-induzierter Effekte durch 1-MT	17
2.4 Analytik	22
2.4.1 Chemikalien	22
2.4.2 Proteinbestimmung	23
2.4.3 Zytokine	23
2.4.4 Cortisol.....	23
2.4.5 Trp und Trp-Metaboliten	24
2.4.6 Leukozyten.....	25
2.4.7 Vollbluttest.....	25
2.4.8 PBMCs.....	26
2.4.9 MTT-Test.....	27
2.4.10 Differentialblutbild.....	28
2.4.11 Nachweis des IDO-Proteins im Westernblot	28
2.5 Erfassung LPS-induzierter Krankheitssymptome.....	32
2.5.1 Verhaltensbeobachtungen.....	32
2.5.2 Messung der Hauttemperatur	33
2.6 Statistik	33

3	Ergebnisse	35
3.1	Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.....	35
3.1.1	Zytokine und Cortisol.....	35
3.1.2	Trp und Trp-Metaboliten	36
3.1.3	IDO-Proteinexpression	38
3.1.4	Verhalten und Krankheitssymptome	39
3.1.5	Zahl von Leukozyten und PBMCs	41
3.1.6	Zytokin-Induzierbarkeit nach SEB-Stimulation <i>ex vivo</i>	41
3.1.7	Stimulation der Zellproliferation <i>in vitro</i>	42
3.1.8	LPS-Toleranz	43
3.2	Blockade von IDO-induzierten Effekten durch Applikation von 1-MT	46
3.2.1	Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe und Auswirkungen auf den Trp-Stoffwechsel	46
3.2.2	Einfluss von 1-MT und LPS auf die Konzentrationen von 1-MT, Trp und Trp-Metaboliten im Plasma.....	50
3.2.3	Einfluss von 1-MT und LPS auf die Konzentrationen von 1-MT, Trp und Kyn im Gewebe.....	56
3.2.4	Einfluss von 1-MT auf die LPS-induzierte Reaktion von TNF- α , IL-10 und Cortisol.....	58
3.2.5	Einfluss von 1-MT auf Verhalten und LPS-induzierte Krankheits- symptomatik.....	60
3.2.6	Einfluss von 1-MT und LPS auf Leukozyten und PBMCs	62
3.2.7	Einfluss von 1-MT und LPS auf die Zellproliferation <i>in vitro</i>	63
3.2.8	Einfluss von 1-MT und LPS auf das Differentialblutbild.....	64
3.2.9	Einfluss von 1-MT auf die Ausbildung einer LPS-Toleranz	66
4	Diskussion	72
4.1	Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.....	72
4.1.1	LPS als Modell zur inflammatorischen Stimulation	72
4.1.2	Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation.....	78
4.2	Blockade von IDO-induzierten Effekten durch Applikation von 1-MT	81
4.2.1	Anreicherung von 1-MT und Auswirkungen auf den Trp- Stoffwechsel.....	82
4.2.2	Blockade der LPS-induzierten IDO-Aktivierung	85
5	Schlussfolgerung	92
6	Zusammenfassung	95
7	Summary	97
8	Literaturverzeichnis	99
9	Anhang	XI
	Eigenständigkeitserklärung	XV
	Danksagung	XVI

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
Δ	Differenz
1-MT	1-Methyltryptophan
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
A. dest.	destilliertes Wasser (lat. <i>aqua destillata</i>)
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AHR	Arylhydrocarbon Rezeptor
Anti-hIDO	Antikörper gegen humanes IDO-Protein
APC	antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bin1	Protein Bin1 (engl. <i>Bridging integrator 1</i>)
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
D	D-Form von Zuckern und Aminosäuren (lat. <i>dexter</i> , rechts)
D4/D5/D6	Deuterierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ECL	engl. <i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
ELISA	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde(n)
HEPES	Puffer 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebenniere (engl. <i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
IFN-γR	Interferon-gamma-Rezeptor
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel

kbp	Kilobasenpaar
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
Kyn	Kynurenin
Kyn/Trp	Verhältnis von Kynurenin zu Tryptophan
Kyna	Kynurensäure (engl. <i>kynurenic acid</i>)
l	Liter
L	L-Form von Zuckern und Aminosäuren (lat. <i>laevis</i> , links)
LAT	L-Aminosäure-Transporter
LC-MS/MS	Kopplung von Liquid-Chromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
LM	Lebendmasse
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	engl. <i>least squares means</i>
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
Mol	molar
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
Myr	Myritol
n	Anzahl
N/L	Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten
NaB	Natriumbutyrat
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NAD ⁺	Nicotinamid
NF- κ B	engl. <i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nmol	nanomolar
NO	Stickoxid
Page	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFC	präfrontaler Cortex
pg	Picogramm
pH	Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
PHA	Phythämagglutinin
PI	Proliferationsindex
p-Wert	Signifikanzwert (engl. <i>probability</i> , Wahrscheinlichkeit)
RIPA	Radioimmunpräzipitations Assay
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> , Medium
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan (lat. <i>sub cutis</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	Standardfehler (engl. <i>standard error</i>)
SEB	<i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B
SIRS	engl. <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOCS3	Protein SOCS3 (engl. <i>suppressor of cytokine signalling 3</i>)
STAT1	Protein STAT1 (engl. <i>signal transducer and activator of transcription 1</i>)
Tab.	Tabelle
TBST	engl. <i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>
TCA	Trichloressigsäure (engl. <i>trichloroacetic acid</i>)
TDO	Tryptophan 2,3-dioxygenase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine
TLR	"Toll-Like-Rezeptor"
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
T _{regs}	regulatorische T-Zellen
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trp	Tryptophan
V	Volt
v/v	Verhältnis zweier Volumina
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Inflammatorische Stimulation durch LPS.	3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung von möglichen Tryptophan-Abbauwegen, beteiligten Enzymen und Aktivatoren.	7
Abb. 1.3	Schematische Darstellung einer LPS-induziertenIDO-Aktivierung in einem Monozyten und mögliche Regulationsmechanismen auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und posttranslati onaler Ebene.	10
Abb. 1.4	Blockade der Bildung immunmodulatorischer Metaboliten des Trp-Abbaus durch den IDO-Inhibitor 1-MT.	11
Abb. 2.1	Experimentelles Design der Blut- und Gewebeentnahmen zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.	15
Abb. 2.2	Schematischer Versuchsablauf zur Erstellung einer Kinetik von 1-MT nach einmaliger s.c. Injektion.	17
Abb. 2.3	Plasma-Konzentration von 1-MT nach einmaliger s.c. Injektion von 1-MT bzw. Myritol®.	18
Abb. 2.4	Modell für wiederholte s.c. Applikationen von 1-MT zur Sättigung der 1-MT-Konzentrationen im Plasma vor und nach der i.p. LPS/NaCl-Applikation.	19
Abb. 2.5	Experimentelles Design der Blut- und Gewebeentnahmen zur Blockade IDO-induzierter Effekte nach LPS-Applikation.	20
Abb. 2.6	Testung der Kreuzreaktivität des genutzten Anti-IDO-Antikörpers und Einfluss verschiedener Homogenisationsmethoden.	32
Abb. 3.1	Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	35
Abb. 3.2	Konzentrationen von Cortisol im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	36
Abb. 3.3	Konzentrationen von Trp, Kyn, Kyn/Trp, Kyna, Quin und 5-HT im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	37
Abb. 3.4	IDO-Proteinexpression im Blut vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	38
Abb. 3.5	IDO-Proteinexpression im Gewebe 6 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	39
Abb. 3.6	LPS-induzierte Effekte auf die Aktivität und den Krankheitsverlauf der Tiere.	40
Abb. 3.7	Zellzahlen von Leukozyten und PBMC im Blut vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	41
Abb. 3.8	Induzierbarkeit der Zytokine IFN- γ und TNF- α durch SEB-Stimulation im Vollbluttest nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	42
Abb. 3.9	Proliferationsindex von isolierten PBMCs nach SEB-Stimulation und PHA-Stimulation nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	43
Abb. 3.10	Charakterisierung der LPS-Toleranz von TNF- α , IL-10 und Cortisol im Plasma durch zusätzliche LPS-Applikation 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	44
Abb. 3.11	Kyn-Konzentration im Plasma nach zusätzlicher LPS-Applikation 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	45

Abb. 3.12	Induzierbarkeit des Zytokins TNF- α und desIDO-Proteins im Vollblutüberstand.	46
Abb. 3.13	Konzentrationen von 1-MT im Plasma während viermaliger s.c. Applikation von 1-MT.	47
Abb. 3.14	Konzentrationen von Trp, Kyn, Kyn/Trp, Kyna, Quin und 5-HT im Plasma vor i.p. LPS/NaCl-Applikation.	48
Abb. 3.15	1-MT-Konzentrationen in 12 Geweben des Schweins nach wiederholter s.c. 1-MT-Applikation.	49
Abb. 3.16	Einfluss von 1-MT auf die Konzentrationen von Trp im Gewebe.	50
Abb. 3.17	Einfluss von LPS/NaCl auf die 1-MT-Konzentration im Plasma.	51
Abb. 3.18	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Trp-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	52
Abb. 3.19	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Kyn-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	52
Abb. 3.20	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf das Verhältnis von Kyn/Trp im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	53
Abb. 3.21	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Kyna-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	54
Abb. 3.22	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Quin-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	55
Abb. 3.23	Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die 5-HT-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung.	55
Abb. 3.24	Einfluss von i.p. LPS/NaCl auf 1-MT-Konzentrationen im Gewebe.	56
Abb. 3.25	Konzentrationen von Trp und Kyn im Gewebe nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	57
Abb. 3.26	Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von TNF- α im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	58
Abb. 3.27	Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von IL-10 im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	59
Abb. 3.28	Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von Cortisol im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	59
Abb. 3.29	Effekte von 1-MT/Myr auf Änderung (Δ) der Körpertemperatur nach i.p. LPS- bzw. NaCl-Applikation.	60
Abb. 3.30	Effekte von 1-MT/Myr auf die Aktivität (A) und Krankheitssymptome (B) nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	61
Abb. 3.31	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zahl der Leukozyten nach i.p. LPS- bzw. NaCl-Applikation.	62
Abb. 3.32	Einfluss von 1-MT/Myr auf den PI von isolierten PBMCs nach PHA- und SEB-Stimulation nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	63
Abb. 3.33	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahl von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	65
Abb. 3.34	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahl von Myelozyten, stabkernigen und segmentkernigen Neutrophilen 6 h nach i.p. LPS-Applikation.	66
Abb. 3.35	Einfluss von 1-MT/Myr auf das N/L-Verhältnis nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	66
Abb. 3.36	Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von TNF- α nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	67

Abb. 3.37	Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von IL-10 nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	68
Abb. 3.38	Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von Cortisol nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	69
Abb. 3.39	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Plasmakonzentration von Kyn nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	70
Abb. 3.40	Einfluss 1-MT/Myr auf den Schweregrad der Erkrankung nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	71
Abb. A 1	Einfluss einer Futterrestriktion auf Trp und Kyn im Plasma.	XI
Abb. A 2	Einfluss einer Futterrestriktion auf die Cortisol-Konzentrationen im Plasma.	XI
Abb. A 3	Einfluss von LPS/NaCl auf den Änderung (Δ) der Kyna-Konzentrationen 1-MT/Myr-vorbehandelter Tiere.	XII
Abb. A 4	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Kyn-Konzentration in der Milz nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	XIII
Abb. A 5	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zahl der PBMCs im Blut nach i.p. LPS oder NaCl-Applikation.	XIII
Abb. A 6	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Hauttemperatur nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation.	XIV

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht der durchgeführten Experimente zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.	14
Tab. 2.2	Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte.	19
Tab. 2.3	Übersicht über die zur Analytik verwendeten Chemikalien.	22
Tab. 2.4	Differenzierung von Blutzellen im Differentialblutbild.	28
Tab. 2.5	Definition der erfassten Verhaltensweisen nach LPS/NaCl-Applikation.	33
Tab. 3.1	Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im Hirngewebe 6 und 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation.	36
Tab. 3.2	Relative Häufigkeit von Symptomen nach i.p. LPS-Applikation.	40
Tab. 3.3	Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahlen von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im Untersuchungszeitraum von 0 bis 24 h nach i.p. LPS/NaCl-Applikation.	64
Tab. 3.4	Effekt der LPS-Behandlung auf die Zahl spezifischer Immunzellen.	64
Tab. A 1	Verhältnis von 1-MT und Trp in 12 Geweben des Schweins nach wiederholter 1-MT-Applikation.	XII

1 Einleitung

Der tierische Organismus ist täglich einer Vielzahl von immunologischen Stressoren und Pathogenen ausgesetzt und reagiert durch eine entsprechende Immunantwort, was je nach Stressor zur Ausbildung eines spezifischen Krankheitsbildes führen kann. Dabei erfolgt nicht nur eine Aktivierung von peripheren Immunzellen, sondern auch eine Stimulation des Nervensystems und spezifischer Hormone, welche zusammengefasst auch als neuroendokrines System bezeichnet werden. Die Interaktion zwischen Immunsystem und Neuroendokrinum ist komplex reguliert. Dabei ist eine Balance zwischen entzündlichen (proinflammatorischen) und regulatorischen (antiinflammatorischen) Prozessen zur erfolgreichen Erregerabwehr notwendig. Ein Verlust dieser Balance führt entweder zu einer überschießenden Immunreaktion oder zu einer Suppression der Immunantwort, wobei beide Zustände lebensbedrohlich sein können. Eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt der Abbau von Tryptophan (Trp) über den sogenannten Kynurenin-Weg, der ein Bindeglied zwischen dem Immun- und Nervensystem darstellt (Mándi & Vécsei, 2011). Der initiale Schritt wird durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert, welches als Teil der angeborenen Immunantwort durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wird. Die immunsuppressive Funktion der IDO-Aktivierung zeigte sich erstmals in der murinen Plazenta, wo eine starke IDO-Aktivität die Immunantwort der Mutter lokal hemmt und so den Fetus vor einer Abstoßung durch den mütterlichen Organismus schützt (Munn et al., 1998). Auch in malignen Tumoren wurde eine erhöhte IDO-Aktivität nachgewiesen und begünstigt dort die Ausbildung einer Immuntoleranz des Tumors gegenüber der körpereigenen Abwehr (Liu et al., 2009). Bei Sepsis-Patienten ist eine erhöhte IDO-Aktivität und die damit verbundene systemische Immunsuppression mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko assoziiert und wird dort bereits als prognostischer Indikator für die Überlebenschancen eingesetzt (Osuchowski et al., 2006; Huttunen et al., 2010). Neben immunologischen Konsequenzen hat die Modulation des Trp-Stoffwechsels auch neurologische und verhaltensrelevante Auswirkungen. Die Aktivierung des Kynurenin-Wegs im Gehirn und der damit verbundene Verbrauch von Trp mit gleichzeitiger Bildung neurologisch aktiver Metaboliten stehen unter anderem im Zusammenhang mit Schizophrenie (Erhardt et al., 2007), Alzheimer (Guillemin et al., 2005) und Depressionen (Dantzer et al., 2011).

Ziel dieser Arbeit ist es, IDO-induzierte Effekte im Rahmen der angeborenen Immunantwort zu untersuchen. Mit Hilfe einer Blockade des Enzyms sollen die regulatorischen Funktionen der IDO-Aktivierung und ein möglicher therapeutischer

Nutzen derIDO-Blockierung *in vivo* aufgezeigt werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des Trp-Stoffwechsels zum Menschen wird das Schwein (*Sus scrofa*) als Modelltier zur Prüfung dieses Ansatzes eingesetzt.

1.1 LPS als Modell zur inflammatorischen Stimulation

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien zu denen Vertreter der Gattungen *Escherichia*, *Salmonella*, *Pseudomonas* oder *Bordetella* gehören. Es besteht aus einer hydrophilen Heteropolysaccharid-Komponente, die kovalent an ein Phosphoglycolipid, das sogenannte Lipid A gebunden ist, welches vorrangig die toxischen und immunstimulatorischen Eigenschaften von LPS vermittelt (Westphal & Lüderitz, 1954; Galanos et al., 1985; Rietschel et al., 1994). Da LPS von Bakterien nicht aktiv sezerniert, sondern erst im Falle einer Zelllyse freigesetzt wird, bezeichnet man es auch als Endotoxin. Die Applikation von LPS im Tiermodell wird häufig zur Simulation von inflammatorischen Zuständen, wie z.B. dem „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) oder bakteriellen Infektionen eingesetzt und stimuliert vor allem Parameter der angeborenen Immunabwehr (Bone et al., 1992, Parker & Watkins, 2001). LPS interagiert vorrangig über den „Toll-like-Rezeptor“ 4 (*Toll-like receptor 4*; TLR-4) (Darveau et al., 2004) mit zahlreichen Zelltypen, wie peripheren mononukleären Zellen (PBMCs), Endothelzellen, Zellen der glatten Gefäßmuskulatur, Granulozyten oder Thrombozyten (Rietschel et al., 1994). Dies führt zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und somit zur Genexpression zahlreicher inflammatorischer Mediatoren (Dauphinee & Karsan, 2006). Eine zentrale Rolle spielt die LPS-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*), welcher mehr als 150 Zielgene kontrolliert, die wiederum für die Expression von Zytokinen, Immunrezeptoren, antigenpräsentierenden Molekülen, Akute-Phase-Proteinen und regulatorischen Molekülen wie Transkriptionsfaktoren und Enzymen von Bedeutung sind (Pahl, 1999), was zur Aktivierung weiterer Systeme führen kann.

Die Aktivierung von peripheren Immunzellen wie Makrophagen durch LPS und die damit verbundene Zytokinausschüttung führt zu einer Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (*hypothalamic-pituitary-adrenal*, HPA-Achse) (Beishuizen & Thijs, 2003). Die Produktion des „Corticotropin-Releasing-Hormons“ bewirkt die Ausschüttung des Adrenocorticotropen Hormons, welches wiederum die Cortisol-Ausschüttung der Nebennierenrinde stimuliert.

Sowohl proinflammatorische Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) als auch Cortisol aktivieren den Abbau von Trp über den sogenannten Kynurenin-Weg. Cortisol aktiviert dabei die Degradierung von Trp in der Leber, während IFN- γ den Trp-Abbau in Immun-

und anderen Körperzellen induziert (Moffett & Namboodiri, 2003). Dabei entstehen Metaboliten wie Kynurenin (Kyn), Kynurensäure (*kynurenic acid*, Kyna) oder auch Chinolinsäure (*quinolinic acid*, Quin). Die Aktivierung des Kynurenin-Wegs ist ein Bindeglied zwischen dem Immun- und dem Nervensystem und wird als Teil der angeborenen Immunabwehr betrachtet (Mellor & Munn, 2004).

Zusätzlich zur parakrinen Wirkungsweise vieler Zytokine ermöglicht die Zytokin-Ausschüttung durch Makrophagen und dendritische Zellen im Vagus-Nerv eine schnelle Übertragung von Informationen aus der Peripherie zum Gehirn (Konsman, 2002). Dieser Weg der Kommunikation zwischen Immun- und Nervensystem wird auch als „cholinerg antiinflammatorischer Weg“ oder „inflammatorischer Reflex“ bezeichnet und stellt einen Mechanismus der neuronal gesteuerten antiinflammatorischen Regulation dar (Pavlov et al., 2003; Rosas-Ballina & Tracey, 2009).

Eine vereinfachte Darstellung der durch LPS stimulierten Systeme ist in **Abb. 1.1** gezeigt.

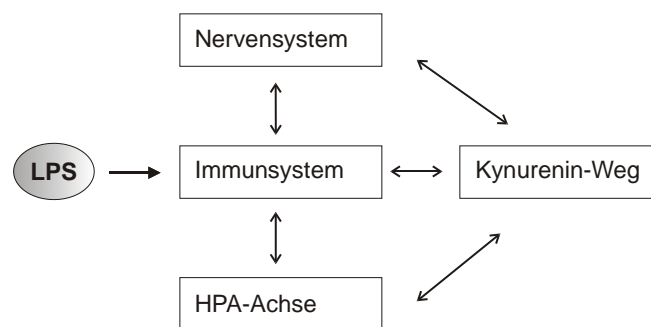


Abb. 1.1 Inflammatorische Stimulation durch LPS.

1.2 Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation

1.2.1 „Sickness Behaviour“

Die LPS-induzierte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin (IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) durch periphere Immunzellen verursacht die Ausprägung unspezifischer Krankheitssymptome wie Fieber, Appetitlosigkeit, Schläfrigkeit, Verminderung des Sozialverhaltens bis hin zur Ausprägung depressiven Verhaltens (Hart, 1988; Dantzer, 2001). Die Gesamtheit dieser Symptome wird auch als „Sickness Behaviour“ bezeichnet (Hart, 1988). Die Beeinflussung des Verhaltens durch proinflammatorische Zytokine zeigt sich auch bei Patienten, die im Rahmen onkologischer Erkrankungen mit IL-2, IFN- γ oder TNF- α behandelt werden. Bei diesen kommt es häufig zur Entwicklung depressiver Stimmungen, Lustlosigkeit, Ängstlichkeit oder kognitiven Beeinträchtigungen (Konsman, 2002). Die Wirkung der Zytokine kann sowohl durch afferente Neuronen als auch humoral vermittelt werden (Konsman,

2002). Neben der direkten Wirkung von Zytokinen im Gehirn spielt auch die Zytokin-induzierte Modulation des Trp-Stoffwechsels für die Ausprägung von Krankheitsverhalten eine bedeutende Rolle. Die Aktivierung Trp-degradierender Enzyme wieIDO führt zur Bildung neurologisch wirksamer Metaboliten, welche spezifische Verhaltensveränderungen hervorrufen können. Ebenso kann ein Mangel an Serotonin (auch 5-Hydroxytryptamin, 5-HT), bedingt durch den erhöhten Verbrauch von Trp im Rahmen inflammatorischer Prozesse, Auswirkungen auf das Verhalten haben (Ruddik et al., 2006).

1.2.2 Strukturelle und funktionale Modulation der Immunantwort

Durch bakterielle oder toxische Schädigung kommt es zu Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung des Blutbildes. Zahlreiche Studien haben belegt, dass die Applikation von Endotoxinen, wie LPS, ein wirksamer Stimulus der Hämatopoese, also der Bildung neuer Blutzellen aus dem Knochenmark ist. Es kommt dabei vor allem zu einer Erhöhung der Zahl neutrophiler Granulozyten (Neutrophilie). Diese ist durch eine Zunahme unreifer Zellen im Vergleich zu reifen Zellen bedingt und wird auch als Linksverschiebung bezeichnet (Lehner & Hartung, 2002). Es hat sich gezeigt, dass eine Erhöhung des Verhältnisses von Neutrophilen zu Lymphozyten (N/L) ein prognostischer Marker für systemische Inflammation oder eine Bakteriämie sein kann. So wiesen z.B. Patienten mit septischen Schock ein sehr hohes Verhältnis von Neutrophilen zu Lymphozyten auf und auch in Patienten mit abdominalen Infektionen oder nach chirurgischen Eingriffen war das Verhältnis deutlich erhöht (Zahorec, 2001; de Jager et al., 2010).

LPS stimuliert neben der proinflammatorischen Immunantwort auch antiinflammatorisch wirkende Parameter, welche einer überschießenden Immunreaktion regulatorisch entgegenwirken. Eine Schlüsselrolle für inhibitorische Effekte besitzt das Zytokin IL-10, welches von T-Zell-Subpopulationen, B-Zellen, Tumorzellen oder Monozyten/Makrophagen sezerniert wird. Die Stimulation erfolgt durch lösliche Mediatoren wie TNF- α , IFN- γ oder LPS, aber auch durch die Interaktion aktivierter T-Zellen oder Makrophagen (Lindsay & Hodgson, 2001). IL-10 supprimiert sowohl die Expression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen als auch die Expression antigenpräsentierender und kostimulatorischer Moleküle von Monozyten/Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen. Auch das Stresshormon Cortisol, welches nach LPS-Gabe ausgeschüttet wird, ist für immunsuppressive Effekte verantwortlich. Es führt unter anderem zu einer Umverteilung der zirkulierenden weißen Blutzellen, die mit einer Vermehrung von neutrophilen Leukozyten und verminderten Zahlen von Eosinophilen und Monozyten einhergeht. Es kommt zu einer Verminderung der Anzahl von T-Helferzellen bei

gleichzeitiger Vermehrung zytotoxischer T-Zellen. Glucocorticoide hemmen auch die Infiltration von Neutrophilen und Monozyten in das Gewebe. Weitere Studien konnten zeigen, dass Cortisol die mitogen- und antigen-stimulierte T-Zell-Proliferation hemmt (Cupps & Fauci, 1982; Sternberg & Parker, 1988).

Die Zytokin-induzierte Aktivierung des Enzyms IDO in antigenpräsentierenden Zellen (APCs) steht im Zusammenhang mit der Ausprägung immunsuppressiver Effekte, deren Bedeutung *in vivo* jedoch noch weitgehend ungeklärt ist. Durch die Aktivierung des Kynurenin-Wegs in IDO-kompetenten Zellen kommt es zu einem erhöhten Verbrauch von Trp. Der so entstehende lokale Trp-Mangel kann zu einer Hemmung der T-Zell-Proliferation und zu gesteigerter Apoptose führen, aber auch zur Induktion von regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), als Teil der antiinflammatorischen Immunantwort. Die Bildung immunregulatorischer Metaboliten des Kynurenin-Wegs induziert *in vitro* einen T-Zell-Arrest und den Zellzyklus-Arrest oder Tod natürlicher Killerzellen. Zusätzlich wurde die Ausbildung tolerogener APCs beschrieben, die wiederum suppressive Effekte vermitteln können (Gonzales et al., 2008).

Bereits die einmalige LPS-Exposition führt zur Ausprägung einer LPS-Toleranz. Lehner & Hartung (2002) definieren den Begriff „Endotoxin-Toleranz“ als verminderte Reaktion der Immunantwort und verminderte metabolische Veränderungen wie Fieber, Gewichtsverlust oder Letalität auf einen wiederholten LPS-Challenge. Die verminderte *in vivo* Induzierbarkeit von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 oder IFN- γ als Zeichen der LPS-Toleranz wurde bereits in zahlreichen Studien an verschiedenen Spezies wie Maus, Ratte, Schwein und Mensch belegt (Lehner & Hartung, 2002). Auch die Ausschüttung von Cortisol, als Antwort der HPA-Achsen-Stimulation durch LPS ist bei toleranten Tieren vermindert (Liu et al., 2011). Studien von Greisman et al. (1966, 1969) haben gezeigt, dass der Zustand der LPS-Toleranz in eine frühe unspezifische Phase und eine späte spezifische Phase unterschieden werden kann. Die frühe Phase beginnt bereits wenige Stunden nach der LPS-Exposition und kann ca. 48 h bis mehrere Tage andauern. Sie ist durch eine generelle Hyposensibilität gegenüber Endotoxinen gekennzeichnet, unabhängig davon, ob diese strukturell mit dem auslösenden Endotoxin verwandt sind. Die wiederholte Gabe von LPS führt nach einigen Tagen zur Ausprägung der späten Phase der LPS-Toleranz, die durch Antikörper vermittelt wird und spezifisch für das jeweilige Toleranz-induzierende Endotoxin ist.

Auch im Rahmen einer Endotoxin-induzierten Sepsis folgt auf die Phase der überschießenden Immunantwort eine kompensatorische Phase der Immunsuppression bis hin zur vollständigen Immunparalyse, die unter anderem durch eine LPS-Toleranz charakterisiert sein kann (Cavaillon et al., 2003). Die Aktivierung des Kynurenin-Wegs

ist mit einer schlechteren Überlebenschance assoziiert, da sie möglicherweise die Ausprägung einer systemischen Immunsuppression begünstigt (Osuchowski et al., 2006).

Der Zustand der LPS-Toleranz ist neben der Ausprägung *in vivo* auch *ex vivo* im Blut oder an isolierten Zellen nachweisbar und zeichnet sich dort ebenfalls durch die verminderte Induzierbarkeit von Zytokinen aus (Lehner & Hartung, 2002). Die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung der Toleranz führen, sind trotz intensiver langjähriger Studien noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist jedoch, dass die Ausbildung der Toleranz multiple Veränderungen verschiedener Signalkaskaden beinhaltet. Diese sind sowohl auf der Ebene der Genexpression als auch auf der Stufe der funktionalen Aktivität verschiedener Proteine zu finden. Offen bleibt derzeit, ob die Aktivierung des Kynurenin-Wegs im direkten Zusammenhang mit der Entstehung bzw. Aufrechterhaltung einer LPS-Toleranz verbunden ist.

1.2.3 Interaktion zwischen Tryptophan-Stoffwechsel und Immun- und Nervensystem

Trp kann als essentielle Aminosäure vom tierischen Organismus nicht selbst synthetisiert werden, sondern muss über die Nahrung z.B. in Form von Proteinen zugeführt werden. Aus dem Verdauungstrakt gelangt es dann über die Pfortader in die Leber, wo es für die Proteinsynthese genutzt, degradiert oder ins periphere Blut abgegeben wird (Moffett & Namboodiri, 2003). Ca. 95% des über die Nahrung aufgenommenen Trp wird in zahlreichen Zelltypen über den Kynurenin-Weg verstoffwechselt (Peters, 1991; Takikawa, 2005). Eine Übersicht über mögliche Trp-Abbauewege und deren biologische Funktion ist in Abb. 1.2 dargestellt. Es wurde lange Zeit angenommen, dass die vollständige Oxidation von Trp zu NAD⁺ (Koenzym) bzw. ATP (Energiespeicher) nur in Leberzellen stattfindet. Spätere Studien weisen jedoch darauf hin, dass dies auch extrahepatisch z.B. in Astrozyten möglich ist (Grant et al., 2000). In zahlreichen Zelltypen vermitteln die Metaboliten des Kynurenin-Wegs antiinflammatorische Effekte. In Zellen des zentralen Nervensystems können Metabolite wie Kyna oder Quin zudem auch neurologisch aktiv sein. Kyna wirkt dabei als Glutamatrezeptor-Antagonist neuroprotektiv, wogegen Quin als Glutamatrezeptor-Agonist neurotoxisch wirkt (Ruddik et al., 2006). Zusätzlich zum Kynurenin-Weg des Trp-Abbaus ist auch der 5-HT-Stoffwechsel von Bedeutung, welcher in Zellen der Zirbeldrüse zusätzlich zur Synthese von Melatonin führt. 5-HT hat vielfältige physiologische Funktionen, da es sowohl als Neurotransmitter als auch als Hormon agiert. Melatonin steht als Neurohormon unter anderem im Zusammenhang mit der Ausbildung circadianer Rhythmen wie dem Schlaf-Wach-Rhythmus (Stone & Darlington, 2002).

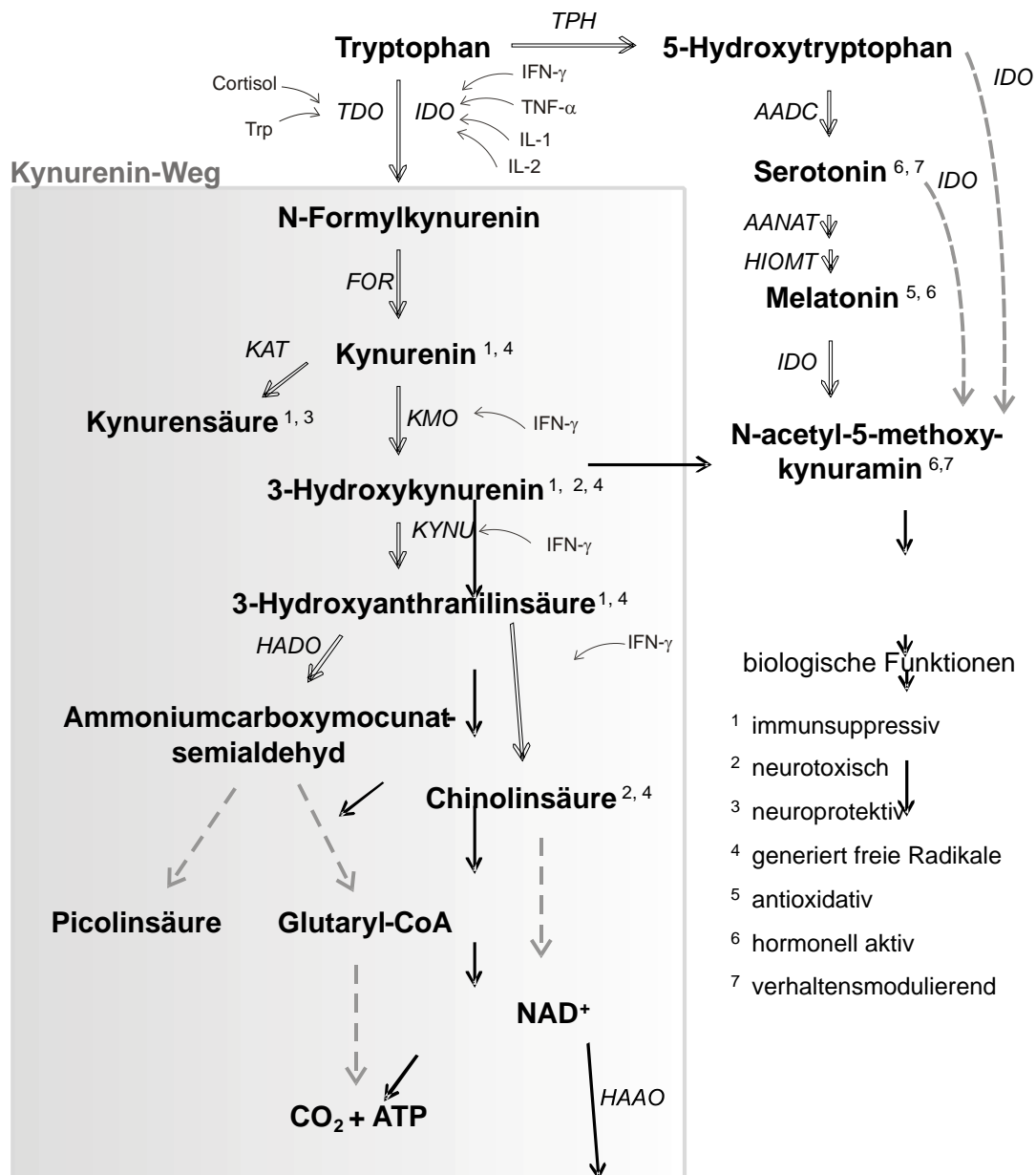


Abb. 1.2 Schematische Darstellung von möglichen Tryptophan-Abbauwegen, beteiligten Enzymen und Aktivatoren. Hochgestellte Zahlen geben biologische Effekte der jeweiligen Metaboliten an. Enzymatische Reaktionen sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. Gestrichelte Pfeile beinhalten mehr als einen Reaktionsschritt (modifiziert nach Stone & Darlington, 2002; King & Thomas, 2007; Liu et al., 2009; Mándi & Vécsei, 2011).

FOR = Foramidase, IDO = Indolamin 2,3-Dioxygenase; TDO = Tryptophan 2,3-Dioxygenase, TPH = Tryptophanhydroxylase; KAT = Kynurenin Aminotransferase, KMO = Kynurenin 3-Monooxygenase; KYNU = Kynureninase, HADO = 3-Hydroxyanthranilinsäure Dioxygenase; HAAO = 3-Hydroxyanthranilinsäure Oxidase, AADC = aromatische-L-Aminosäure Decarboxylase; AANAT = N-Acetyltransferase; HIOMT = Hydroxy-O-Methyltransferase

Die Expression der Enzyme des Kynurenin-Wegs unterscheidet sich zum Teil stark zwischen einzelnen Zelltypen in Abhängigkeit von deren Funktion im Organismus. Es ist jedoch eine grobe Einteilung in vier verschiedene Kompartimente möglich (Moffett & Nambodiri, 2003). Das erste Kompartiment beinhaltet somatische Gewebe wie die Lunge oder den Darm, wo vor allem die Synthese von Trp zu Kynurenin realisiert wird. Das zweite Kompartiment enthält Zellen des Immunsystems wie z.B. dendritische

Zellen oder Makrophagen, welche zahlreiche Enzyme des Kynurenin-Wegs exprimieren, jedoch Enzyme zur NAD^+ -Synthese fehlen. Das dritte Kompartiment wird durch hepatische Zellen charakterisiert, wobei dort alle Enzyme zur vollständigen Oxidation von Trp exprimiert werden. Im vierten Kompartiment, den Zellen des zentralen Nervensystems, findet der Trp-Abbau verstärkt in Richtung der Kyna statt, aber auch andere neurologische Metaboliten wie Quin können gebildet werden.

Eine Besonderheit des Trp-Abbaus ist, dass der geschwindigkeitsbestimmende Katalyse-Schritt von Trp zu Kyn sowohl durch das hepatische Enzym Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) als auch durch das ubiquitär exprimierte Enzym IDO (Taylor & Feng, 1991; Thomas & Stoker, 1999) generiert werden kann. TDO besitzt eine geringe Affinität zu Trp und wird erst durch erhöhte Plasma-Trp-Konzentrationen, aber auch durch Glucocorticoide und Glucagon aktiviert und bewirkt eine Homöostase der Trp-Konzentration im Organismus (Le Floch et al., 2011). IDO besitzt eine hohe Affinität für L-Trp, kann aber auch andere Substrate wie 5-HT oder Melatonin oxidieren und wird besonders im Rahmen inflammatorischer Prozesse induziert (King & Thomas, 2007). Es wurde lange angenommen, dass TDO ein rein hepatisches Enzym ist. Jedoch deuten neuere Studien an Mäusen darauf hin, dass TDO auch im Gehirn exprimiert wird (Ohira et al., 2009; Kanai et al., 2009). Die Existenz zweier Enzyme, die sich jedoch in ihrer Struktur, ihrer Substratspezifität und ihrer Aktivierung unterscheiden (Yoshida & Hayaishi, 1987) unterstützt dabei die Theorie, dass der Trp-Stoffwechsel neben der ernährungsphysiologischen Bedeutung auch eine zentrale Bedeutung als Regulationsmechanismus innerhalb der Immunantwort erfüllt.

1.2.4 Regulation des IDO-Enzyms

Das ubiquitär exprimierte intrazelluläre Enzym IDO ist eine Oxidoreduktase, die den Abbau von L-Trp zu N-Formylkynurenin synthetisiert, welches jedoch unter physiologischen Bedingungen schnell in Kyn konvertiert wird (Lancellotti et al., 2011). Über L-Aminosäure-Transporter (LAT) kann dabei bidirektional L-Trp in die Zelle und Kyn ins Blutplasma gelangen (Lancellotti et al., 2011). Die Aktivierung der IDO-Genexpression wird besonders durch proinflammatorische Zytokine induziert, jedoch wurde auch eine konstitutive Expression beschrieben (King & Thomas, 2007). Als besonders starker Aktivator der IDO-Genexpression gilt das Zytokin $\text{IFN-}\gamma$, das an den $\text{IFN-}\gamma$ -Rezeptor ($\text{IFN-}\gamma\text{R}$) bindet und über die Signalkaskade des Transkriptionsfaktors STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) die Transkription des IDO-Gens einleitet. Weiterhin sind LPS oder TNF-Moleküle als potente IDO-Aktivatoren beschrieben, welche an TLR bzw. TNF-Rezeptoren (TNFR) binden und über NF- κB assoziierte Signalkaskaden wirken (Kahler & Mellor, 2009).

IDO-Gene (*IDO*) wurden bereits in verschiedenen Säugetier-Spezies identifiziert (Yuasa et al., 2007). In den Spezies Mensch und Maus befindet sich *IDO* auf Chromosom 8 und umfasst 10 Exons mit ca. 15 kbp DNA (Mellor & Munn, 2004). Die humane IDO cDNA kodiert ein Protein aus 403 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht (MG) von ~ 45 kDa (King & Thomas, 2007). Das IDO-Enzym ist ein monomeres Protein mit einer prosthetischen Häm-Gruppe, welche für die katalytische Aktivität notwendig ist. Die oxidierte Form (IDO-Fe³⁺) stellt das inaktive Enzym dar. Die Bindung reduzierender Kofaktoren ermöglicht den Übergang in die aktive, reduzierte Form (IDO-Fe²⁺) (Taniguchi et al., 1979), durch welche die Bindung von Trp und Sauerstoff ermöglicht wird (Thomas & Stoker, 1999).

Die Aktivität des IDO-Enzyms unterliegt zahlreichen Regulationsmechanismen und wird sowohl auf transkriptionaler und posttranskriptionaler als auch auf posttranslationaler Ebene kontrolliert. Eine Übersicht über mögliche Regulationsmechanismen ist in **Abb. 1.3** dargestellt. Auf transkriptionaler Ebene wird die IFN- γ -induzierte IDO-Genexpression durch Proteine wie Bin 1 (*Bridging integrator 1*) oder Natriumbutyrat (NaB) kontrolliert. Eine verminderte Expression oder Aktivität des Tumorsuppressorgens *Bin1* wurde bei vielen Tumorerkrankungen gefunden (Lancellotti et al., 2011) und ermöglicht dort eine erhöhte IDO-Aktivität, welche wiederum die Ausbildung einer Immuntoleranz begünstigt (Uyttenhove et al., 2003; Munn & Mellor, 2004; Munn, 2006). NaB, eine im Darm gebildete Fettsäure, wirkt auf posttranskriptionaler und posttranslationaler Ebene. Es hemmt die IDO-Genexpression und vermittelt zugleich die Ubiquitinierung des IDO-Moleküls, was zur Inaktivierung und Vorbereitung zum proteosomalen Abbau führt (Jiang et al., 2010). Eine Form der posttranskriptionalen Kontrolle ist die Bildung verschiedener mRNA-Transkripte, wie sie bereits von Ball et al. (2009) beschrieben wurde. Thomas et al. (2007) konnten zeigen, dass Stickoxid (NO) die IDO-Aktivität reversibel inhibieren kann. NO induziert zusätzlich den proteosomalen Abbau von IDO, indem es die Bindung von SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*) vermittelt (Orabona et al., 2008; Pallotta et al., 2010).

Bei der Maus und dem Menschen wurde die Existenz eines zweiten IDO-Gens (*IDO2*) belegt, welches bei beiden Spezies ebenfalls auf Chromosom 8 in direkter Nachbarschaft zu dem bereits bekannten *IDO* liegt (Yuasa et al., 2007; Metz et al., 2007; Ball et al., 2009). Bei Mäusen wird *IDO2* in anderen Zelltypen als *IDO* exprimiert, was auf verschiedene Funktionen hinweist. Löb et al. (2009) konnten zeigen, dass *IDO2* auch in humanen Tumorzellen exprimiert, der physiologisch relevante Umsatz von Trp in Kyn jedoch hauptsächlich durch *IDO* realisiert wird.

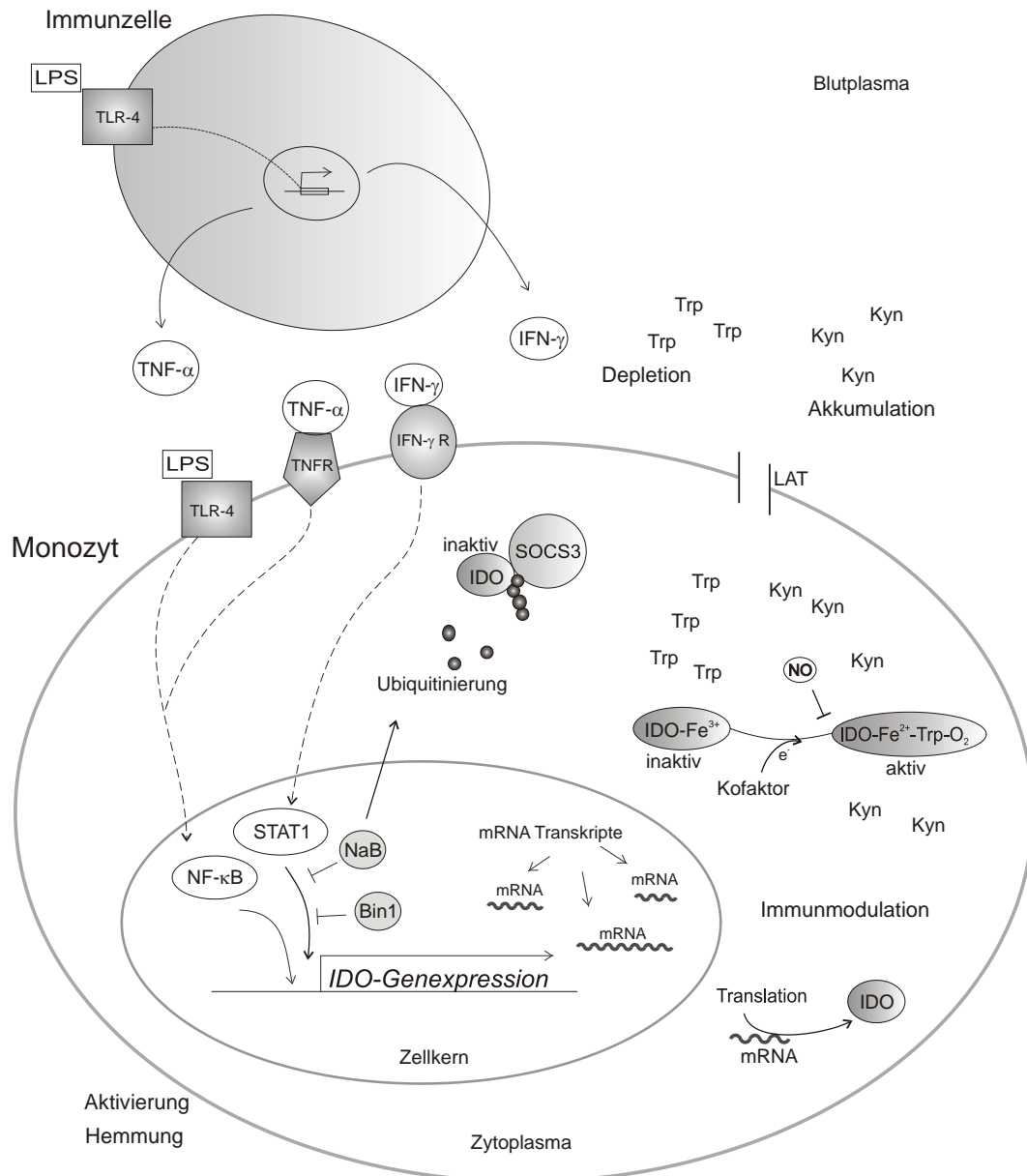


Abb. 1.3 Schematische Darstellung einer LPS-induzierten IDO-Aktivierung in einem Monozyten und mögliche Regulationsmechanismen auf transkriptionaler, posttranskriptionaler und posttranslatiionaler Ebene.

1.3 1-MT als IDO-Inhibitor

1-Methyltryptophan (1-MT) ist ein Trp-Analogen, welches bereits in präklinischen und Phase I-III- Studien zur Therapie von bösartigen Tumorerkrankungen eingesetzt wird (clinicaltrials.gov; NewLink genetics: clinical Trials). Es wurde erstmals 1991 (Cady & Sono) als kompetitiver IDO-Inhibitor beschrieben, der an den IDO-Fe-Komplex bindet, aber durch die zusätzliche Methylgruppe nicht katalytisch umgesetzt werden kann. 1-MT zeichnet sich durch geeignete pharmakokinetische Eigenschaften wie gute Resorption im Darm, geringe Clearance und eine geringe Bindung an plasmatische Proteine aus (Jia et al., 2008; Liu et al., 2009). Munn et al. (1998) konnten in Studien an Mäusen zeigen, dass die Applikation von 1-MT *in vivo* eine Abstoßung des Fetus im

Mutterleib begünstigt, was durch die Blockade des IDO-induzierten Immunprivilegs in der Plazenta erklärt wird. Weiterhin konnte durch die *in vivo* Behandlung mit 1-MT eine Verlangsamung des Tumorwachstums in verschiedenen Mausmodellen beobachtet werden, wobei jedoch kein vollständiger Arrest des Tumorwachstums erreicht wurde (Uyttenhove et al., 2003; Muller et al., 2005). Es zeigte sich ebenfalls, dass der Einsatz von 1-MT die Wirkung anderer Enzym-Inhibitoren positiv verstärkt, wobei als Mechanismus eine Reaktivierung des Immunsystems durch die IDO-Blockade angenommen wird (Yang et al., 2011). Die Wirkungsweise von 1-MT unterscheidet sich, je nachdem ob das L- oder das D-Stereoisomer eingesetzt wird. Das L-Isomer hat sich *in vitro* als der effektivere kompetitive IDO-Inhibitor gezeigt, während *in vivo* das D-Isomer eine bessere Wirksamkeit im Rahmen von Tumor- und Chemotherapien zeigte (Hou et al., 2007). 1-MT konnte aber auch *in vitro* eine Suppression der T-Zell-Proliferation in humanen Zellen verhindern (Liu et al., 2009). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass D-1-MT spezifisch IDO2 hemmt, während L-1-MT die IDO-Aktivität hemmt (Metz et al., 2007; Löb et al. 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass 1-MT auch unabhängig von IDO mit dem TLR interagiert und dadurch die Aktivierung inflammatorischer Signalkaskaden auslösen kann (Agaugué et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass 1-MT spezifisch die Enzymaktivität von IDO, aber nicht die von TDO hemmt (Cady & Sono, 1991). Als Grund dafür werden Unterschiede in der Bindung von Tryptophan an das aktive Zentrum von IDO bzw. TDO angenommen. Die Trp-Bindung an IDO führt zur Formation einer Tasche, welche auch die Methylgruppe aufnehmen kann. TDO bindet Trp jedoch über das Stickstoffatom, an welches bei 1-MT die Methylgruppe gebunden ist. Dadurch wird die Bindung von 1-MT an TDO verhindert (Forouhar et al., 2007). Das Prinzip der IDO-Blockade durch 1-MT ist in **Abb. 1.4** dargestellt.

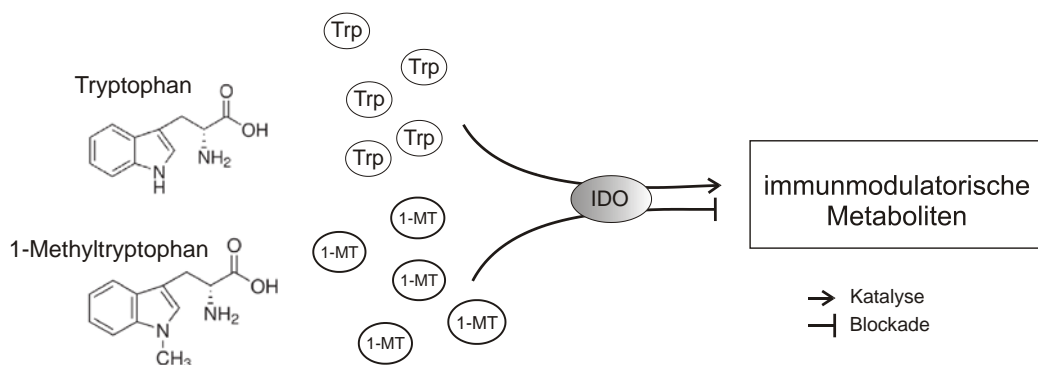


Abb. 1.4 Blockade der Bildung immunmodulatorischer Metaboliten des Trp-Abbaus durch den IDO-Inhibitor 1-MT.

1.4 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die funktionale Bedeutung derIDO-Aktivierung als Teil der angeborenen Immunabwehr zu untersuchen. Ein vermehrterIDO-induzierter Abbau von Trp zu immunologisch aktiven Metaboliten steht im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen oder Sepsis, während die Bildung neurologisch aktiver Metaboliten unter anderem mit Schizophrenie, Alzheimer und Depressionen assoziiert ist. Die genaue Bedeutung derIDO-Aktivität ist jedoch noch unzureichend geklärt. Durch die Blockade des Enzyms sollen die regulatorischen Funktionen derIDO-Aktivierung und ein möglicher therapeutischer Nutzen *in vivo* aufgezeigt werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des Trp-Stoffwechsels von Mensch und Schwein, eignet sich dieses Modelltier zur Prüfung der Fragestellung. Als Modell zurIDO-Aktivierung wurde eine einmalige LPS-Applikation gewählt. Die Blockade erfolgte durch denIDO-Inhibitor 1-MT. Die Arbeit basiert auf folgenden Hypothesen:

- Die Applikation von LPS führt zu einer systemischen Immunantwort und zurIDO-Aktivierung beim Schwein.
- Die Aktivierung vonIDO induziert einen Verbrauch von Trp und eine Anreicherung von Metaboliten des Kynurenin-Wegs, wodurch Effekte wie Immunsuppression und Verhaltensveränderungen vermittelt werden.
- Diese Effekte können durch eine Blockade vonIDO mittels 1-MT reduziert bzw. verhindert werden.

Die Hypothesen wurden in zwei experimentellen Komplexen bearbeitet. Im ersten Teil der Arbeit erfolgte eine Charakterisierung der physiologischen Konsequenzen einer LPS-Applikation *in vivo*. Zur Charakterisierung der LPS-induzierten Effekte wurden Parameter des Trp-Stoffwechsels, der Immunantwort, der HPA-Achse und des Verhaltens erfasst. Im zweiten Arbeitsteil wurde der spezifischeIDO-Inhibitor 1-MT zur Blockade der LPS-induziertenIDO-Aktivierung eingesetzt. Da 1-MT erstmals beim Schwein Anwendung fand, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modell zur Anreicherung des Wirkstoffs im Plasma und Gewebe etabliert, um zum Zeitpunkt der LPS-Applikation eine maximale Blockade derIDO-Aktivierung zu erreichen. Es wurde anschließend geprüft, ob die enzymatischeIDO-Aktivität blockiert werden konnte und welche Effekte die Behandlung mit 1-MT auf das Immunsystem, LPS-induzierte Effekte und die Ausbildung einer LPS-Toleranz hatte.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen: LALLF M-V/TSD/7221.3-2.1-005/08, LALLF M-V/TSD/7221.3-2.2-014/09, LALLF M-V/TSD/7221.3-2.2-003/10, LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-027/10).

In allen durchgeführten Experimenten wurden kastrierte männliche Läuferschweine der Deutschen Landrasse (*Sus scrofa domestica*) eingesetzt, welche in der Experimentalanlage Schwein des Leibniz Institutes für Nutztierbiologie, Dummerstorf geboren und unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen worden. Zum Zeitpunkt der LPS/NaCl-Applikation waren die Tiere in der 7. Lebenswoche. Um eine Kontrolle der Futteraufnahme und des Gesundheitszustandes vor und nach der Behandlung zu ermöglichen wurden die Tiere eine Woche vor Versuchsbeginn in Einzelhaltung verbracht. Jede Einzelbucht war mit einem Futtertrog und einer Nippeltränke ausgestattet. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn *ad libitum* mit kommerziell erhältlichem Futter („*Porcistart*“, Trede & von Pein) versorgt und hatten jederzeit freien Zugang zu Wasser. Um Stress vor der Behandlung zu vermeiden, wurden die Tiere ein bis drei Tage vor der intraperitonealen (i.p.) Applikation gewogen, um das Körpergewicht für den Tag der i.p. Applikation zu kalkulieren. Tiere, die gesundheitliche Beeinträchtigungen zeigten, die auf infektiöses Geschehen hindeuteten, wurden vom Versuch ausgeschlossen. Geschwistertiere wurden gleichmäßig auf die jeweiligen Behandlungsgruppen verteilt.

2.2 Entnahme von Blut und Gewebe

Die Blutentnahmen erfolgten durch Punktion der *Vena cava cranialis*, während die Schweine in Rückenlage fixiert wurden. Für die Extraktion des Plasmas wurde das Blut in eisgekühlte EDTA-Probenröhrchen überführt und anschließend für 10 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Blutplasma wurde bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Um Gewebeproben zu entnehmen, wurden die Tiere durch eine intravenöse (i.v.) Injektion mit T61 (Intervet, Deutschland) euthanasiert. Die Gewebe wurden unmittelbar danach entnommen, in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

2.3 Experimentelles Design

2.3.1 Charakterisierung LPS-induzierter Effekte

Zur Induktion einer Immunreaktion wurde den Tieren einmalig i.p. LPS (*Escherichia coli* 0111:B4; 200 µg LPS/mg; Sigma-Aldrich, Deutschland) mit einer Dosis von 100 µg/kg Lebendmasse (LM) appliziert (~ 2-5 ml). Als Kontrolle dienten Tiere, die eine sterile 0,9% Kochsalzlösung (NaCl, Roth, Deutschland) mit einem gewichtsbezogenen Volumen (ca. 2-5 ml) i.p. appliziert bekamen. Um eine Beeinflussung der Trp-Konzentrationen durch unterschiedliche Futteraufnahme innerhalb der Versuchsgruppen zu vermeiden, wurde das Futter eine Stunde vor der LPS/NaCl-Applikation entfernt. Bis zur Blutentnahme zum Zeitpunkt 6 h nach LPS/NaCl erhielten die Tiere kein Futter. Im Zeitraum von 6 bis 24 h nach i.p. Applikation wurde den Tieren 1 kg Futter zur Verfügung gestellt. Nach der letzten Blutentnahme zum Zeitpunkt 24 h wurde das Futter für jedes Tier zurückgewogen, um die Futteraufnahme während des Zeitraums nach LPS/NaCl zu ermitteln. Vor der i.p. Applikation (0 h) wurde jeweils eine Blutprobe gewonnen, um die basalen Plasma-Konzentrationen der getesteten Parameter zu ermitteln. Die i.p. Applikationen wurden stets zwischen 8.00 Uhr und 8.30 Uhr durchgeführt, so dass alle Durchgänge hinsichtlich der tageszeitlichen Dynamik vergleichbar waren. Innerhalb dieses Arbeits-Komplexes wurden verschiedene Fragestellungen in separaten Experimenten untersucht. Eine Übersicht über Behandlung, Tierzahl, Zahl der Durchgänge, Entnahmezeiten für Blut bzw. Gewebe und das verwendete experimentelle Design für die jeweilige Fragestellung ist in **Tab. 2.1** dargestellt. Das zugrunde liegende experimentelle Design ist in **Abb. 2.1** schematisch beschrieben.

Tab. 2.1 Übersicht der durchgeführten Experimente (E) zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte. Die i.p. LPS/NaCl-Applikation erfolgte zum Zeitpunkt (0 h). DG = Anzahl der Durchgänge. *Gewebeentnahme

E	Fragestellung	Behandlung	Tiere	DG	Blutentnahmen [h]	Design
1	Charakterisierung physiologischer Parameter	LPS NaCl	20 20	3	0, 1, 3, 6*, 24*	1
2	Zytokin-Induzierbarkeit	LPS NaCl	13 14	2	0, 6, 24	2
3	Proliferationsfähigkeit	LPS NaCl	15 16	3	0, 6, 24	2
4	LPS-Toleranz	LPS+LPS NaCl+LPS	12 12	2	0, 6, 24, 25, 27, 30, 48, 72	2
5	Einfluss von Futterrestriktion	Futterrestriktion adäquate Fütterung	5 5	1	0, 6, 24	-

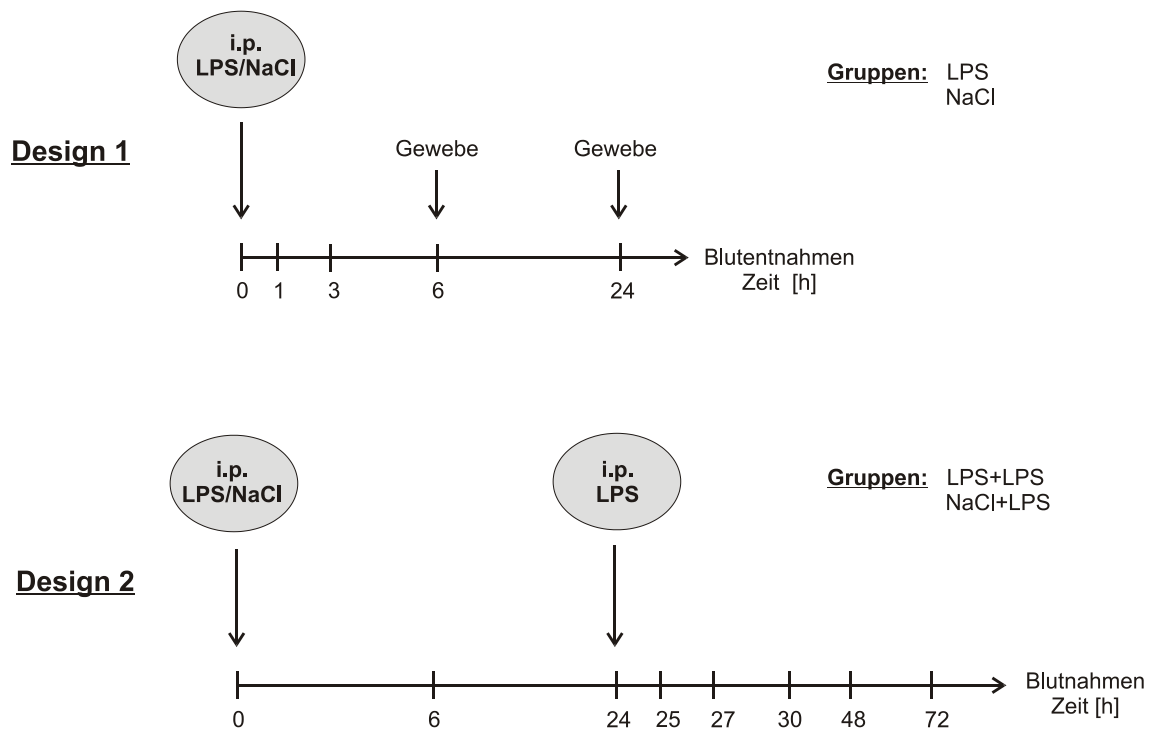


Abb. 2.1 Experimentelles Design der Blut- und Gewebeentnahmen zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte. Die Applikation von LPS bzw. NaCl erfolgte jeweils unmittelbar nach der Blutentnahme. Es sind die jeweiligen Behandlungsgruppen angegeben.

Experiment 1: Bestimmung physiologischer Parameter im Plasma und Gewebe

Zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte wurden jeweils vor LPS und 1, 3, 6 und 24 h nach i.p. LPS/NaCl Blutproben zur weiteren Analytik entnommen. Jeweils 10 Tiere pro Behandlung wurden bereits 6 h nach i.p. Applikation durch i.v. Injektion von T61 euthanasiert, um Gewebeproben zu entnehmen. Die verbliebenen 20 Tiere wurden nach 24 h gemerzt. Im Blutplasma wurden die Parameter TNF- α , IL-10, Cortisol, Trp, Kyn, Kyna, Quin, 5-HT und die IDO-Proteinexpression analysiert. In den Geweben Hippocampus und präfrontaler Cortex (PFC) wurden die Zytokine TNF- α und IL-10 bestimmt. Die IDO-Proteinexpression wurde in den peripheren Geweben Lunge, Leber und Muskel (*Musculus deltoideus*) und in den Hirnregionen Hippocampus, PFC, Hypophyse, Amygdala und Hypothalamus analysiert.

Experiment 2: Bestimmung von Leukozytenzahl, Zytokin-Induzierbarkeit und Verhaltensparametern

Es wurden jeweils vor sowie 6 und 24 h nach i.p. Applikation von LPS bzw. NaCl Blutproben entnommen. Zu allen 3 Zeitpunkten erfolgte die Bestimmung der Leukozytenzahlen im Blut. Die Zytokin-Induzierbarkeit wurde mit Hilfe des Vollbluttests sowohl 6 als auch 24 h nach LPS/NaCl gemessen. TNF- α wurde durch *ex vivo* Inkubation mit LPS bzw. *Staphylococcus* Enterotoxin B (SEB) induziert. Das Zytokin

IFN- γ wurde durch Stimulation mit SEB stimuliert. Im Rahmen des Vollbluttests wurde auch dieIDO-Proteinexpression der Tiere analysiert. Dazu wurden Überstände des kultivierten Blutes mit und ohne LPS/SEB-Stimulation zu den Zeiten 0, 6 und 24 h nach LPS genutzt. Im Zeitraum zwischen 0 und 4 h nach LPS bzw. NaCl wurden Verhaltensbeobachtungen durchgeführt. Dabei wurden die Aktivität und das Auftreten von Krankheitssymptomen erfasst.

Experiment 3: Bestimmung der PBMCs sowie der Zellproliferation

Zu den Zeitpunkten 6 und 24 h nach i.p. LPS bzw. NaCl wurden PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation separiert und deren Zellzahl am Counter bestimmt. Im MTT-Test wurde anschließend die Proliferationsfähigkeit durch Stimulation mit Phythämagglutinin (PHA) oder SEB bestimmt.

Experiment 4: Charakterisierung einer LPS-Toleranz

Um die Ausbildung einer LPS-Toleranz nach einmaliger i.p. LPS-Applikation zu untersuchen, erfolgte bei den Tieren 24 h nach der 1. Applikation von LPS eine zweite i.p. LPS-Applikation mit einer Dosis von 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ LM. Die Kontrolltiere erhielten am Tag 1 eine NaCl-Applikation und 24 h später ebenfalls eine LPS-Applikation. Es wurden Blutproben zu den Zeiten 0, 6, 24, 25, 27, 30 und 48 h nach i.p. Applikation entnommen, wo jeweils TNF- α , IL-10 und Cortisol, Trp und die Trp-Metaboliten bestimmt wurden. Für die Trp-Analytik wurde zusätzlich noch nach 72 h Blut entnommen, um mögliche längerfristige Veränderungen während der LPS-Toleranz zu untersuchen. Das Futter wurde an beiden Tagen jeweils 1 h vor der i.p. Behandlung entfernt und 6 h nach Versuchsbeginn wieder 1 kg eingewogen. Im Zeitraum von 48 bis 72 h bekamen die Tiere ebenfalls 1 kg Futter eingewogen.

Experiment 5: Einfluss der Futteraufnahme auf HPA-Achse, Trp und Trp-Metaboliten im Plasma

Zur Überprüfung des möglichen Einflusses des versuchsbedingten Futterentzugs über einen Zeitraum von sieben Stunden (-1 h bis 6 h nach i.p. LPS/NaCl), sowie der potentiell verminderten Futteraufnahme der LPS-behandelten Tiere, wurde den Tieren um 7.00 Uhr das Futter entzogen und ab 8.00 Uhr die erste Blutentnahme durchgeführt. Sechs Stunden nach der ersten Blutentnahme erfolgte die zweite Blutentnahme. Danach wurde einer Gruppe 0,1 kg Futter eingewogen, den Kontrolltieren hingegen 1 kg, um die verschiedenen Futteraufnahmen der NaCl- und LPS-behandelte Tiere zu simulieren. Es wurden die Plasma-Konzentrationen von Cortisol, Trp und Trp-Metaboliten bestimmt.

2.3.2 Blockade IDO-induzierter Effekte durch 1-MT

Die Blockade IDO-induzierter Effekte erfolgte in dieser Studie mit L-1-MT (95%, Sigma-Aldrich, Deutschland). Dieses wurde subkutan (s.c.) in die Kniefalten der Tiere appliziert (Tagesdosis = 1 g pro Tier). 1-MT wurde für die Applikation in einer Trägerlösung aus mittelkettigen Triglyceriden (Myritol®318, Cognis GmbH, Deutschland) gelöst, die für die subkutanen Injektionen geeignet ist. Pro Applikation wurden jeweils 0,5 g 1-MT rechts und 0,5 g 1-MT links appliziert. Das Volumen für eine s.c. Injektion betrug 4,2 ml. Die Kontrolltiere bekamen analog das gleiche Volumen der Myritol-Trägerlösung (Myr) appliziert.

Entwicklung eines Modells zur 1-MT-Applikation im Schwein

Um ein geeignetes Modell für die mehrfache Applikation von 1-MT zu entwickeln, wurde zunächst die Kinetik der 1-MT-Konzentration nach einmaliger s.c. Applikation erstellt. Der Versuchsablauf ist schematisch in **Abb. 2.2** dargestellt.

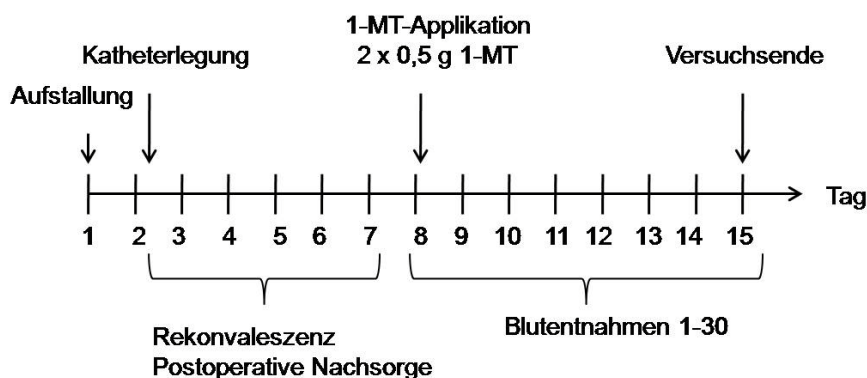


Abb. 2.2 Schematischer Versuchsablauf zur Erstellung einer Kinetik von 1-MT nach einmaliger s.c. Injektion

Für die wiederholten Blutentnahmen wurden vier Tiere vor der s.c. Applikation katheterisiert. In der Phase der postoperativen Nachsorge erhielten die Tiere Antibiotika Trimethosol (Selectavet Dr. Otto Fischer GmbH) und Metapyrin (Serumwerk Bernburg). Nach einer Phase der Rekonvaleszenz nach der Katheterlegung wurde drei Tieren s.c. 1-MT injiziert. Ein Tier wurde als Kontrolle eingesetzt und erhielt ein vergleichbares Volumen der Myr-Lösung. Es erfolgten insgesamt 30 Blutentnahmen, wobei die erste direkt vor der s.c. Injektion entnommen wurde. Die Blutentnahmen 2, 3 und 4 erfolgten im Abstand von je vier Stunden nach Versuchsbeginn. Die Blutproben 5 bis 30 erfolgten dann jeweils im Abstand von sechs Stunden. Insgesamt wurde ein Zeitraum von 0 bis 168 h nach der s.c. 1-MT-Applikation beprobt. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Kinetik von 1-MT im Plasma ist in **Abb. 2.3** dargestellt.

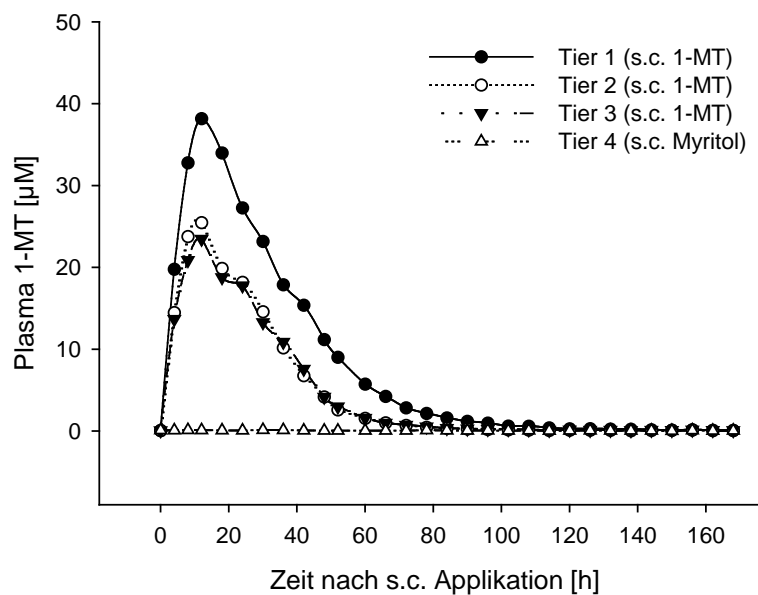


Abb. 2.3 Plasma-Konzentration von 1-MT nach einmaliger s.c. Injektion von 1 g 1-MT/Tier ($n = 3$) bzw. Myritol® ($n = 1$)

Die einmalige 1-MT-Applikation führte zu einem deutlichen Anstieg der Plasma-Konzentrationen (**Abb. 2.3**). Die maximalen 1-MT-Konzentrationen wurden 12 h nach der Applikation erreicht und wiesen im Durchschnitt eine Konzentration von 29,06 μM auf. Die 1-MT-Konzentration entsprach der zeitgleich bestimmten Plasma-Trp-Konzentration von 29,66 μM . Die höhere 1-MT-Konzentration von Tier 1 ist vermutlich auf das höhere Gewicht zum Zeitpunkt der 1-MT-Applikation zurückzuführen (Tier 1: 14,2 kg, Tier 2: 16,8 kg, Tier 3: 16,2 kg). Die 1-MT Dosis/kg LM war somit bei Tier 1 am höchsten und führte zu höheren Plasma-Konzentrationen.

Modell für wiederholte s.c. 1-MT-Applikationen vor i.p. LPS/NaCl-Applikation

Um eine Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe der Schweine zu erreichen, wurde eine mehrfache Applikation von 1-MT durchgeführt (**Abb. 2.4**). Den Kontrolltieren wurde ein vergleichbares Volumen der Myr-Lösung appliziert. Die höchste Konzentration von 1-MT sollte in dem verwendeten Modell zum Zeitpunkt der i.p. LPS-Applikation vorliegen. Insgesamt wurde an vier Tagen vor der LPS/NaCl-Gabe je 1 g 1-MT/Tier appliziert. Die Applikationen erfolgten jeweils um 20.00 Uhr im Abstand von 24 h, so dass die vierte Applikation 12 h vor der i.p. LPS/NaCl-Behandlung stattfand. Um hohe 1-MT-Plasma-Spiegel in der Phase der LPS-induzierten Effekte zu gewährleisten, wurde 12 h nach der i.p. Injektion ein fünftes Mal 1-MT appliziert (**Abb. 2.4**).

Modell für s.c. 1-MT-Applikation

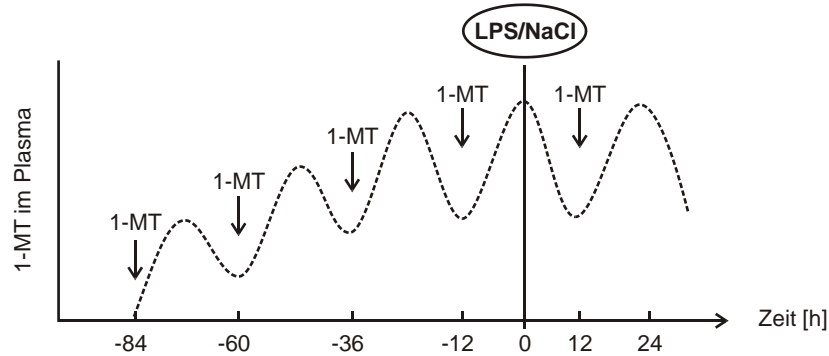


Abb. 2.4 Modell für wiederholte s.c. Applikationen von 1-MT zur Sättigung der 1-MT-Konzentrationen im Plasma vor und nach der i.p. LPS/NaCl-Applikation (berechnet von Prof. W. Weitschies, Institut für Pharmazie, Universität Greifswald).

Vor jeder 1-MT/Myr-Applikation erfolgte eine Blutentnahme, in der die Plasma-Konzentrationen von 1-MT, Trp und Trp-Metaboliten bestimmt wurden. An jedem Tag wurde zweimal der Gesundheitsstatus der Tiere kontrolliert. Die Futtermittelaufnahme an den 4 Tagen vor der LPS/NaCl-Gabe wurde täglich registriert und eine Erfassung der Körpertemperatur zum Zeitpunkt der Blutentnahmen durchgeführt. Das Futter wurde 12 h vor der i.p. LPS/NaCl-Applikation entfernt. Mit Hilfe des beschriebenen Modells wurden verschiedene Fragestellungen in separaten Experimenten untersucht. Eine Übersicht über Behandlung, Tierzahl, Zahl der Durchgänge, Entnahmezeiten für Blut bzw. Gewebe und das verwendete experimentelle Design für die jeweilige Fragestellung ist in **Tab. 2.2** dargestellt. Das zugrunde liegende experimentelle Design ist in **Abb. 2.5** schematisch beschrieben.

Tab. 2.2 Übersicht über die durchgeführten Experimente (E) zur Charakterisierung LPS-induzierter Effekte. Die i.p. LPS/NaCl-Applikation erfolgte zum Zeitpunkt (0 h). DG = Anzahl der Durchgänge. *Gewebentnahme

E	Fragestellung	Vorbehandlung	Behandlung	Tiere	DG	Blutentnahmen [h]	Design
6	Beeinflussung der LPS-induzierten Immunreaktion durch 1-MT	1-MT	LPS	12	3	-84, -60, -36, -12, 0, 1, 3, 6*, 12, 24*	3
		1-MT	NaCl	12			
		Myr	LPS	11			
		Myr	NaCl	12			
7	Effekt von 1-MT auf periphere Immunzellen und Induzierbarkeit einer LPS-Toleranz	1-MT	LPS+LPS	12	3	-84, -60, -36, -12, 0, 6, 12, 24, 25, 27, 30, 48	4
		1-MT	NaCl+LPS	12			
		Myr	LPS+LPS	12			
		Myr	NaCl+LPS	12			

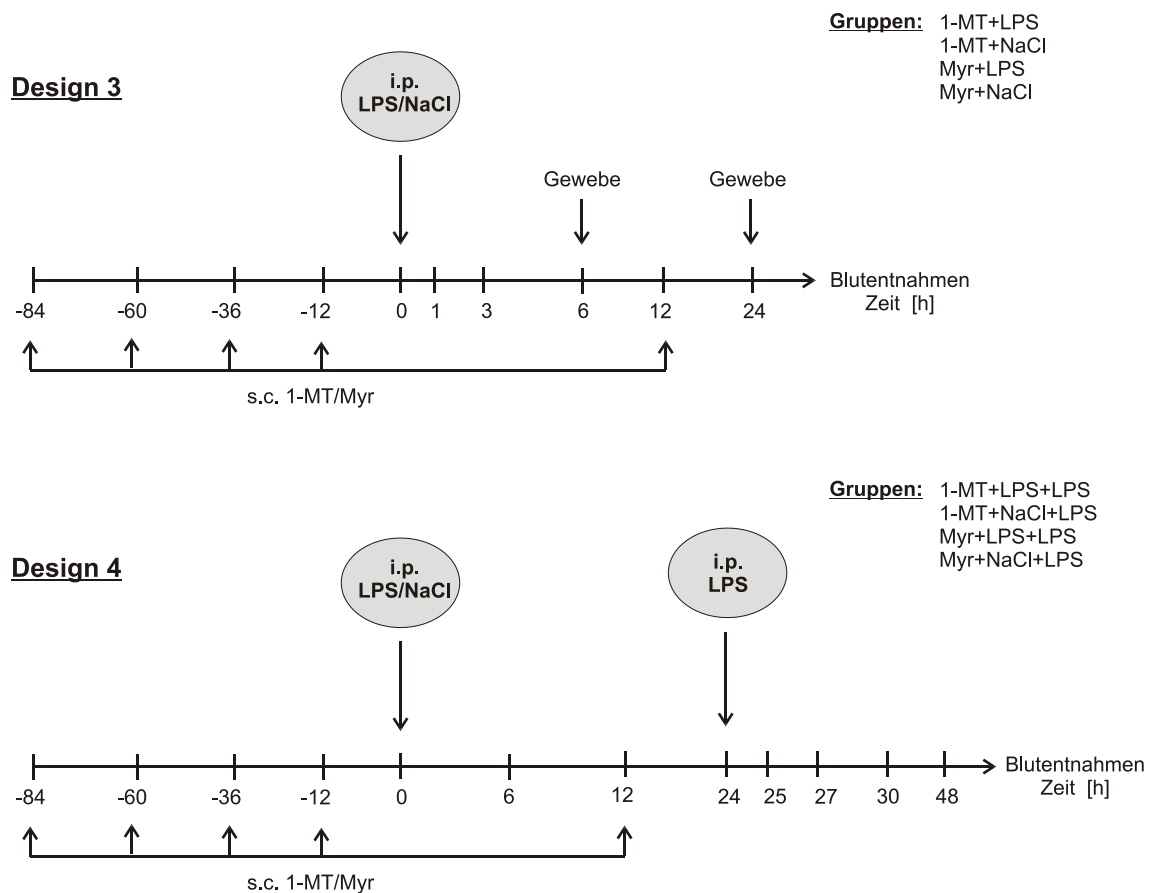


Abb. 2.5 Experimentelles Design der Blut- und Gewebeentnahmen zur BlockadeIDO-induzierter Effekte nach LPS-Applikation. Die Applikation von LPS/NaCl bzw. 1-MT/Myr erfolgte jeweils unmittelbar nach der Blutentnahme. Es sind die jeweiligen Behandlungsgruppen angegeben.

Experiment 6: Beeinflussung der LPS-induzierten inflammatorischen Reaktion durch 1-MT im Plasma und Gewebe

Zu den Zeiten -84, -60, -36 und -12 h vor der LPS/NaCl-Applikation wurde den Tieren s.c. 1-MT bzw. Myr appliziert, wobei jeweils vor der Applikation eine Blutprobe zur Analytik von 1-MT, Trp und den Trp-Metaboliten entnommen wurde. Es folgte die i.p. Applikation mit LPS mit einer Dosis von 50 µg/kg LM (*Escherichia coli* 0111:B4; 200 µg LPS/mg; Sigma-Aldrich, Deutschland) bzw. NaCl zum Zeitpunkt 0 h und anschließende Blutentnahmen zu den Zeiten 1, 3, 6 und 24 h nach der i.p. Applikation. Die Dosis wurde aufgrund des Wechsels der LPS-Charge entsprechend dem Endotoxingehalt neu eingestellt. Je 6 Tiere pro Behandlung wurden 6 h nach der i.p. Applikation durch i.v. Injektion von T61 (Intervet, Deutschland) euthanasiert, um Gewebeproben zu entnehmen. Die verbliebenen Tiere wurden 24 h nach der i.p. Applikation zur Gewebeentnahme gemezt. Im Blutplasma wurden die Parameter TNF-α, IL-10, Cortisol, 1-MT, Trp, Kyn, Kyna, Quin und 5-HT analysiert. In Homogenaten der peripheren Gewebe Herz, Lunge, Leber, Muskel (*Musculus deltoideus*), Schilddrüse, Milz und den Hirnarealen Amygdala, Hippocampus, Hypothalamus, Hypophyse und

PFC wurde 1-MT, Trp und Kyn analysiert. Die Tiere erhielten während der Versuchsphase keine erneute Futtergabe.

Experiment 7: Effekt von 1-MT auf periphere Immunzellen und die Induzierbarkeit einer LPS-Toleranz

Zu den Zeiten -84, -60, -36 und -12 h vor der LPS/NaCl-Applikation wurde den Tieren s.c 1-MT oder Myr appliziert, wobei jeweils vor der Applikation eine Blutprobe zur Analytik von 1-MT, Trp und den Trp-Metaboliten entnommen wurde. Es folgte die i.p. Applikation mit LPS (50 µg/kg LM) bzw. NaCl zum Zeitpunkt 0 h. Die zweite i.p. Applikation erfolgte 24 h später, wobei allen Tieren LPS (50 µg/kg LM) appliziert bekamen. Es wurden Blutproben zu den Zeitpunkten 0, 6, 24, 25, 27, 30 und 48 h nach der LPS/NaCl-Applikation entnommen. Zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 h nach LPS/NaCl wurde die Zahl der Leukozyten und PBMCs, sowie die Proliferationsfähigkeit nach PHA- oder SEB-Stimulation *in vitro* bestimmt. Darüber hinaus wurde zu den Zeitpunkten 0, 6 und 24 h ein Differentialblutbild erstellt. Im Blutplasma wurden zu allen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn die Parameter Cortisol, 1-MT, Trp und die Trp-Metaboliten analysiert. Die Analyse der Zytokine TNF-α und IL-10 erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 24, 25, 27, 30 und 48 h. Nach der Blutentnahme zum Zeitpunkt 6 h wurde den Tieren 500 g Futter angeboten, welches nach der 1-MT/Myr-Applikation zum Zeitpunkt 12 h wieder entfernt und rückgewogen wurde. Im Zeitraum von 0 bis 5 h und 24 bis 29 h nach LPS/NaCl und wurden Verhaltensbeobachtungen durchgeführt. Dabei wurden die Aktivität und das Auftreten von Krankheitssymptomen erfasst.

2.4 Analytik

2.4.1 Chemikalien

Tab. 2.3 Übersicht über die zur Analytik verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris)	Carl Roth GmbH, Deutschland
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT)	Roche Diagnostics GmbH, Deutschland
Acryl/Bisacrylamid Lösung	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
Desoxycholsäure Na-Salz (NaDOC)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Diatrizoat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Ficoll400	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Deutschland
Gentamycin	Biochrom AG, Deutschland
Giemsa-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Deutschland
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
L-Phenylmethyl-sulfonylfluorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
May-Grünwald-Lösung	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Deutschland
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamine (TEMED)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Chemie GmbH Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH, Deutschland
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
RPMI-1640	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
sodium dodecyl sulfate (SDS)	Carl Roth GmbH, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Tween20	Carl Roth GmbH, Deutschland

2.4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung im Plasma und in den Vollblutüberständen erfolgte mit Hilfe der Biuret-Reaktion nach Weichselbaum (1946). Für die Proteinbestimmung in den Gewebeproben wurde die Methode nach Lowry (1951) genutzt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm am UV/VIS Spektralphotometer DU[®] 640 (Beckman Coulter GmbH, Deutschland).

2.4.3 Zytokine

TNF- α , IL-10 und IFN- γ

Die Analyse der Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im EDTA-Plasma und Gewebe erfolgten mit Hilfe eines kommerziellen schweinespezifischen ELISA (Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay) in Doppelbestimmung entsprechend den Angaben des Herstellers (Biosource Invitrogen, USA). Für die Zytokin-Messung im Gewebe wurden die Proben in eiskaltem Puffer (*phosphate buffered saline*, PBS) mit Protease-Inhibitoren (1 mmol/l-Phenylmethyl-sulfonylfluorid, 1 μ g/ml Pepstatin A, 1 μ g/ml Aprotinin, 1 μ g/ml Leupeptin in PBS, pH 7,2; mit 0,05% Natriumazid und 0,5% Triton X-100) homogenisiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Das Homogenat wurde bei 20.000 g für 20 min bei 4°C ultrazentrifugiert und TNF- α und IL-10 wurden im Überstand analysiert. Die Sensitivität beider Tests lag unter 3 pg/ml. Die Intra-Assay-Varianz für TNF- α betrug 6,2% und die Inter-Assay-Varianz 8,2%. Die Intra- und Inter-Assay-Varianz von IL-10 lag bei 6,3% bzw. 9,4%. Die Bestimmung der Konzentrationen von IFN- γ erfolgte in den Zellkulturüberständen aus dem Vollbluttest mit Hilfe eines kommerziellen schweinespezifischen ELISA entsprechend den Angaben des Herstellers (Biosource Invitrogen, USA). Die untere Nachweisgrenze des ELISA betrug < 2 pg/ml. Die Intra-Assay-Varianz lag bei 4,9% und die Inter-Assay-Varianz bei 8,8%.

2.4.4 Cortisol

Die Analyse der Cortisol-Konzentrationen erfolgte im EDTA-Plasma in Doppelbestimmung. Dazu wurde ein kommerzieller Cortisol ELISA (EIA-1887, DRG Instruments GmbH, Deutschland) genutzt und die Proben nach Herstelleranleitung analysiert. Die Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers gegenüber Corticosteron und Progesteron wurde mit 45% bzw. 9% angegeben. Die Kreuzreaktivität gegenüber anderen Plasma-Steroiden betrug < 2%. Die Testsensitivität betrug 9,4 nmol/l. Die Intra- bzw. Inter-Assay-Variationen betragen 6,1% bzw. 9,4%. Der Assay wurde für die Anwendung im Schwein validiert.

2.4.5 Trp und Trp-Metaboliten

Die Analytik der Plasmaproben wurde am Institut für klinische Medizin und Laboratoriumsmedizin der Universität Greifswald durchgeführt. Die Analytik der Gewebeproben erfolgte am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Fakultät der Universität Greifswald.

Plasma

Die Analytik von Trp, 1-MT, Kyn, Kyna, Quin und 5-HT im EDTA-Plasma erfolgte nach isokratischer Elution (Fließmittel: Wasser versetzt mit 0,002% Ameisensäure: 50:50 v/v, Elutionsgeschwindigkeit 50 µl/min) mit einem MS/MS System („Wallac MS2“, Perkin Elmer, Deutschland) nach Elektrosprayionisation im positiven MRM („*multiple reaction monitoring*“) Modus.

Die Qualitätssicherung wurde mit gepoolten Kontrollproben (repräsentativ für den unteren und oberen Arbeitsbereich der Methodik) vor, während und nach den jeweiligen Messzyklen sichergestellt. Zur Probenvorbereitung wurden zu 100 µl einer Plasmaprobe 50 µl Trichloressigsäure (TCA, konz.), 40 µl *A. dest* und 10 µl einer Internen-Standard-Lösung (D5-Phenylalanin, D4-Kyna, D6-Kyn) pipettiert. Danach erfolgte eine zwölfstündige Inkubation bei 4°C. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 25.000 *g* zentrifugiert und ein 20 µl Aliquot des klaren und vorab separierten Überstandes in das System injiziert. Durch einen Austausch der Ionisationsquelle des Massenspektrometers sind die basalen Level von Trp, Kyn und Kyna in Experiment 6 und 7 im Vergleich zu vorangegangenen Messungen erhöht.

Gewebe

Zur Probenaufbereitung wurden die entnommenen Gewebeproben in gekühltem *A. dest.* für ca. 15 sec im Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend für 10 min bei 40.000 *g* bei 4°C ultrazentrifugiert. Die Amygdala und der Hypothalamus wurden aufgrund der geringen Größe in Eppendorf-Tubes mit Hilfe eines Stößels homogenisiert und dann wie beschrieben ultrazentrifugiert. Im Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt. Die Vermessung der aufgearbeiteten Gewebeproben erfolgte nach isokratischer Elution (Elution: Wasser pH 3; Ameisensäure 50:50 v/v; Elutionsgeschwindigkeit 200 ml/min; Trennsäule: RP-18 Atlantis HILIC®, Waters, Irland) mit einem LC-MS/MS System (Pumpe: Agilent Serie 1100, Agilent; Autosampler: PE Serie 200, Perkin Elmer; MS: API 2000, AB SCIEX, Deutschland) nach Elektrosprayionisation im positiven MRM Modus. Die Qualität der vorab validierten Analytik wurde durch die tägliche Herstellung und Vermessung einer alle Analyten beinhaltenden Kalibrierfunktion sowie Qualitätsproben gewährleistet, die die unteren, mittleren, sowie oberen Konzentrationsbereiche der jeweiligen

Kalibrierbereiche der Analyten repräsentierten und 10% des Gesamtprobeaufkommens darstellten. Die ermittelten Richtigkeits- und Präzisionswerte entsprachen zu jeder Zeit denen der Validierungsuntersuchungen. Die Probenvorbereitung erfolgte in der Weise, dass zu 500 µl eines Organhomogenats 10 µl der Internen-Standard-Lösung (D5-Phenylalanin) und anschließend 50 µl Perchlorsäure (70%) zugegeben wurde. Nach kurzer intensiver Durchmischung (10 sec) wurde die Probe erneut für 5 min bei 11.000 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 40 µl Ammoniumhydroxydlösung (32%) auf einen pH-Wert von ca. 3 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 11.000 g, RT) wurden 30 µl des klaren Überstandes in das LC-MS/MS-System (API 2000) injiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Beschaffenheit der Gewebe wurden die gemessenen Konzentrationen auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

2.4.6 Leukozyten

Die Zählung der Leukozyten erfolgte im heparinisierten Blut. Dazu wurde Blut in einer Leukozytenmischpipette 1:10 mit 3% Essigsäure verdünnt und 15 sec gemischt, so dass es zur Hämolyse der Erythrozyten kam. Die Auszählung der Leukozyten erfolgte in der Neubauer-Zählkammer, indem das Blut aus der Pipette in die Zählkammer eingebracht und 4 große Zählquadrate ausgezählt wurden. Zur Berechnung der Zellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Leukozytenzahl/ml} = \frac{\text{gezählte Leukozyten}}{\text{Anzahl Quadrate} \times \text{Kammerfläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnung}} \times 1000$$

Zählquadrate: 4

Kammerfläche: 1 mm²

Kammerhöhe: 0,1 mm

Verdünnung: 1:10

2.4.7 Vollbluttest

RPMI-Kulturmedium (KM):

RPMI-1640

10% FKS

50 µg/ml Gentamycin

2 mM L-Glutamine

0,05 mM β-Mercaptoethanol

Kulturansätze/Well

stimuliert		spontan	
1100 µl	RPMI KM	1100 µl	RPMI KM
400 µl	heparinisiertes Vollblut	400 µl	heparinisiertes Vollblut
500 µl	Mitogen (SEB/LPS), gelöst in Kulturmedium	500 µl	Kulturmedium ohne Mitogen

Die Kultivierung des Blutes erfolgte in RPMI-1640-Kulturmedium in einer 24 Well-Platte. Dabei wurde das Blut 1:5 verdünnt (Kulturansatz) und über 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Begasung im Brutschrank inkubiert. Für jede Blutprobe erfolgte ein spontaner Ansatz, ein Ansatz mit LPS-Stimulation (12,5 µg/ml, LPS aus *Escherichia coli* 055:B5; Sigma-Aldrich, Deutschland) und ein Ansatz mit SEB-Stimulation (1,5 µg/ml, Sigma-Aldrich, Deutschland). Anschließend wurde die Blutkultur für 10 min bei RT zentrifugiert (120 g). Die Analyse der Zytokine und der Proteinexpression erfolgte im Zellkulturüberstand, der bei -80°C gelagert wurde.

2.4.8 PBMCs

Die Isolierung von PBMCs, zu denen sowohl Lymphozyten als auch Monozyten zählen, wurde mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden zunächst je 3 ml heparinisiertes Blut mit 3 ml RPMI verdünnt und dann in Zentrifugenröhrchen vorsichtig auf 4 ml Ficoll-Diatrizoat-Gradienten I und II (Histopaque-1077) überschichtet. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 700 g und 4°C reicherten sich die PBMCs in der Grenzschicht zwischen Plasma und Trennmedium an. Diese PBMC-Schicht wurde mit einer Pipette aufgenommen, in 7 ml RPMI überführt und für 10 min bei 120 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet für 15 sec. mit 1 ml *A. dest.* versetzt, um vorhandene Erythrozyten zu lysieren. Die Lysis wurde durch Zugabe von 108 µl NaCl (8,8 %) beendet und anschließend wurde erneut für 5 min bei 55 g und 4°C zentrifugiert. Es erfolgten zwei weitere Waschschrte mit RPMI (120 g, 10 min, 4°C) bevor das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium aufgenommen wurde. Die Zählung der separierten PBMCs erfolgte am Cell-Counter (Coulter® Multisizer II, Beckman Coulter Electronics, Deutschland). Die Zellzahl wurde anschließend auf 2×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt.

Zusammensetzung der Gradienten

Gradient I (100ml)		Gradient II (100 ml)	
11,00 g	Diatrizoat	9,00 g	Diatrizoat
2,85 g	Ficoll400	2,85 g	Ficoll400
0,50 mM	EDTA	0,50 mM	EDTA
5,00 mM	Hepes	5,00 mM	Hepes

2.4.9 MTT-TestKulturansätze/Well

stimuliert		spontan	
100 µl	Zellsuspension	100 µl	Zellsuspension
100 µl	Mitogen-Medium-Gemisch (PHA/SEB)	100 µl	Kulturmedium ohne Mitogen

Für die Kultivierung der PBMCs wurden in 96-Well Kulturplatten mit Flachboden (Nunc GmbH & Co.KG, Deutschland) 2×10^5 Zellen in 100 µl Medium pro Kavität ausgesät. Die stimulierten Ansätze wurden mit weiteren 100 µl Kulturmedium, das PHA (6,25 µg/ml) bzw. SEB (1,5 µg/ml) enthielt, versetzt während zu den unstimulierten (spontanen) Kontrollansätzen 100 µl des Kulturmediums pipettiert wurden. Alle Ansätze erfolgten dreifach. Nach 72 h Kulturdauer im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Platten für 10 min bei 210 g und RT zentrifugiert, 100 µl Kulturüberstand abpipettiert und jede Kavität mit 10 µl MTT-Reagenz (Roche Diagnostics, Deutschland) versetzt. MTT ist ein membrangängiger Farbstoff, der durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen metabolisiert wird und zur Bildung von dunkelblauen Formazan-Kristallen führt. Nach weiterer vierstündiger Inkubation wurde durch Zugabe von 100 µl SDS-Reagenz eine Lyse der Zellen und eine Solubilisierung der Kristalle bewirkt. Die kolorimetrische Messung der Farbintensität der Lösung erfolgte im Mikrotiterplattenreader (Dynatech, Deutschland) bei einer Testwellenlänge von 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Zur Auswertung der Daten wurde ein Proliferationsindex (PI) aus dem Quotienten der optischen Dichte von stimulierten und spontanen Ansätzen gebildet.

2.4.10 Differentialblutbild

Es wurde ein Blutausschlag angefertigt, mindestens 2 h luftgetrocknet und nach Pappenheim angefärbt. Dazu wurde der Objektträger 2 min in May-Grünwald-Lösung inkubiert und danach mit *A. dest* gespült. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in Giemsa-Lsg (1:20 verdünnt). Nach einer Spülung mit *A. dest* wurde das Präparat luftgetrocknet. Zur Bestimmung der Leukozytenverteilung erfolgte eine Auszählung von 200 Leukozyten unter dem Mikroskop. Die Unterscheidung der Zelltypen erfolgte anhand der Zellform, Zellgröße, Kernform, Kerngröße, Kernstruktur, Plasmafarbe, Granulierung und Kern-Plasma-Relation (in Anlehnung an Niepage, 1989).

Tab. 2.4 Differenzierung von Blutzellen im Differentialblutbild. * Referenzwerte von 10-12 Wochen alten Läuferferkeln der Deutschen Landrasse (Kixmüller, 2004)

Differentialblutbild	Größe [μm]	Häufigkeit [%] *
basophile Granulozyten	10 - 15	0 – 1,34
eosinophile Granulozyten	12 - 17	0 – 4,92
neutrophile Granulozyten		
• Myelozyten (jung)	10 – 15	Keine Angabe
• stabkernige (jung)	10 – 15	0 – 3,86
• segmentkernige (reif)	10 - 15	21,4 - 49
Lymphozyten	6 - 18	46,7 – 75,1
Monozyten	14 - 22	0 – 2,52

2.4.11 Nachweis des IDO-Proteins im Westernblot

Antikörper und Positivkontrolle

Primärantikörper: Rabbit Anti-IDO (human), polyklonaler Antikörper (AB9898; Millipore, USA)

Sekundärantikörper: Goat Anti-Rabbit IgG-HRP (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert) , (sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, USA)

Positivkontrolle: IDO (h): 293T Lysate; sc-114136 (Santa Cruz Biotechnology, USA), Zelllysate aus der HEK (human embryonic kidney) -293-Zelllinie, welche zuvor mit dem humanen *IDO*-Gen (genetischer Locus: 8p11.22) transfiziert wurde

Verwendete Puffer und Lösungen für SDS Page und Westernblot

Trenngel 10 %: 2,50 ml Acryl/Biacrylamid Lösung
 1,88 ml 1,5 Mol Tris Puffer pH 8,8
 3,00 ml *A. dest.*
 75 µl 10% SDS
 75 µl APS (0,1 g/ml *A. dest.*)
 20 µl TEMED

Sammelgel: 1,25 ml Acryl/Biacrylamid Lösung
 1,90 ml 0,5 Mol Tris Puffer pH 8,8
 4,25 ml *A. dest.*
 75 µl 10% SDS
 150 µl APS (0,1 g/ml *A. dest.*)
 10 µl Temed

Elektrodenpuffer (in 1 l *A. dest.*): 30,4 g Tris
 144,0 g Glycin
 10,0 g SDS

Für die Gelelektrophorese wurde 40 ml dieser Stammlösung mit 360 ml *A. dest.* verdünnt und in die Gelkammer eingebracht.

Transferpuffer: 7,28 g Tris
 3,60 g Glycine
 0,05 g SDS
 250 ml Methanol

Die kristallinen Substanzen wurden in *A. dest.* gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde das Methanol zugegeben.

TBST: 24,2 g Tris
 80,0 g NaCl

Tris und NaCl wurden in *A. dest.* gelöst und auf 1 l aufgefüllt. Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt. Für den Gebrauch wurden 100 ml der Lösung mit 1 ml Tween20 versetzt und anschließend mit *A. dest.* auf 1 l aufgefüllt.

<u>RIPA-Puffer:</u>	5 ml 0,1 Mol Tris
	3 ml 0,5 Mol NaCl
	1 ml 0,1 Mol EDTA
	1 ml 10% SDS
	0,5 g NaDOC

Probenvorbereitung

Plasma und Vollblutüberstände wurden ohne weitere Vorbehandlung für die Westernblot-Analyse eingesetzt. Für die Analyse der Proteinexpression in den Organen wurden die Gewebe in RIPA-Puffer mit einem Stößel homogenisiert und anschließend bei 40.000 g für 1 h bei 4°C ultrazentrifugiert. Die Überstände wurden anschließend bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Für alle Proben wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt und als Bezugsgröße für die einzusetzende Menge im Gel genutzt. Für den Nachweis im Plasma wurden Proteinmengen von 50 µg/Tasche, im Vollblutüberstand 30 µg/Tasche und im Gewebe 20 µg/Tasche aufgetragen, welche zuvor experimentell ermittelt wurden.

Auftrennung der Proteine und Analyse durch Westernblot

Die Proteine wurden durch eine SDS-Page (Laemmli, 1970) nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gelelektrophorese erfolgte mit dem System BIORAD Mini Protean II. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben mit einem Ladepuffer (Roti®-Load 1, 4x-konzentriert) versetzt und nach Anleitung des Herstellers verdünnt. Das Gemisch wurde anschließend zur Denaturierung der Proteine für 5 min auf 95°C erhitzt und dann zügig in die Geltaschen eingebracht. Die Gelkammer wurde nach Anleitung des Herstellers mit Elektrodenpuffer aufgefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 25 min bei einer Spannung von 200 V und 60 mA. Danach wurde die Stromstärke bei gleichbleibender Spannung bis zum Ende der Auftrennung auf 80 mA eingestellt. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig entfernt und in Transferpuffer überführt, wo es für 10 min zum Quellen belassen wurde. Das Gel-Blotting-Papier (GB 005, Whatman GmbH) wurde ebenfalls für diese Zeit in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde das Gel auf eine PVDF-Membran (Millipore, USA) überführt, welche zuvor 1 min in Methanol aktiviert wurde. Unter die PVDF-Membran wurden 2 Schichten getränktes Filterpapier gelegt. Auf das Gel wurden ebenfalls 2 Schichten Filterpapier (Millipore, Whatman) gelegt und eventuelle Luftblasen aus dem Gelsandwich mit Hilfe eines Rollers entfernt. Das Blotting der Proteine erfolgte für eine Stunde bei 30 V und 160 mA für 2 Gele (7 × 8 cm) im ‚Semi-Dry‘ Elektrobloetter (PerfectBlue SEDEC M, Peqlab Biotechnologie GmbH, Deutschland). Nach dem

Blotten befanden sich die Proteine auf der PVDF-Membran. Diese wurde für 1,5 h in TBST (20mM Tris, 130 mM NaCl, pH 7,5; 0,1% Tween 20) mit 5% Milchpulver bei RT geblockt. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Anti-IDO) über Nacht im Kühlschrank auf einem Schüttler. Der Antikörper wurde 1:2000 in 10 ml TBST + 5% Milchpulver verdünnt. Es folgten drei Waschrunde für je 10 min mit TBST und anschließend die Inkubation mit dem zweiten Antikörper 1:5000 für 1 h bei RT. Anschließend wurde die PVDF-Membran fünfmal für 5 min mit TBST gewaschen. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte durch „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) mit ECL-Plus (GE Healthcare Bio-Science AB, Schweden). Dazu wurde die PVDF-Membran 5 min unter Lichtausschluss in ECL-Plus-Reagenz unter Schütteln inkubiert und anschließend in eine Röntgenkassette zwischen Klarsichtfolie gelegt. Die Sichtbarmachung des Lichtsignals erfolgte mit Hilfe des Hyperfilms ECL (GE Healthcare Bioscience AB, Schweden), welcher auf die PVDF-Membran aufgelegt wurde. Die Entwicklung des Hyperfilms wurde mit einer speziellen Entwickler und Fixierlösung (Hartenstein GmbH, Deutschland) durchgeführt. Nach der Fixierung konnte der Film dem Licht ausgesetzt werden. Zur graphischen Darstellung wurden die Filme eingescannt und mit einer Graphik-Software (Corel PHOTO-PAINT X3) bearbeitet. Proben, die sich auf verschiedenen Gelen befanden wurden durch eine Linie getrennt dargestellt. Proben, die sich auf einem Gel befanden, aber nicht direkt nebeneinander lagen wurden durch eine gestrichelte Linie getrennt.

Eignung des Anti-IDO-Antikörpers zum Nachweis für IDO im Schweine-Gewebe

Da es für das porcine IDO-Protein derzeit keinen verfügbaren Antikörper gibt, wurde ein Antikörper gegen humanes IDO (Anti-hIDO) genutzt. Um die Kreuzreaktivität des Antikörpers zu testen wurden Gewebe von Mensch (n = 1), Maus (n = 2) und Schweinen (n = 3) getestet, in denen IDO-Proteinexpression vermutet wurde. Für eine relativ genaue Größeneinordnung wurde zusätzlich ein spezieller Molekulargewichtsmarker eingesetzt (S-Tag Protein Marker, ECL DualVue Western Blotting Markers, GE Healthcare Bioscience AB, Schweden). Gewebe einer humanen Plazenta wurde vom Universitäts-Frauenklinikum Rostock nach einem Kaiserschnitt zur Verfügung gestellt und direkt nach der Entnahme bei -20°C eingefroren. Die Hirn- und Plazentagewebe der Maus stammten von institutseigenen Mäusen. Die porcinen Gewebe Milz und Muskel stammten von Schweinen, deren genaue Vorgeschichte unbekannt war. Die porcinen Plazentaprobe stammten aus vorangegangenen Versuchen, in denen Feten während der Trächtigkeit entnommen wurden. Die Ergebnisse sind in **Abb. 2.6** dargestellt und zeigen, dass in der humanen Plazenta eine Bande auf der Höhe der Positivkontrolle mit einem MG von ~ 39 kDa detektiert werden

konnte. Dabei war es unerheblich, ob der fetale oder maternale Teil der Plazenta untersucht wurde bzw. ob die Plazenta im Ultra-Turrax homogenisiert wurde (Spur 1) oder im flüssigen Stickstoff gemörsert (Spur 8) und in RIPA-Puffer aufgenommen wurde. Alle Plazentaprobeen zeigten zusätzlich eine Bande mit ~ 80 kDa, deren Ursprung in dieser Studie nicht weiter untersucht wurde. Im Hirngewebe und in der Plazenta der Maus konnten keine Banden detektiert werden. Ebenso wurde in der Plazenta des Schweins keine Bande nachgewiesen.

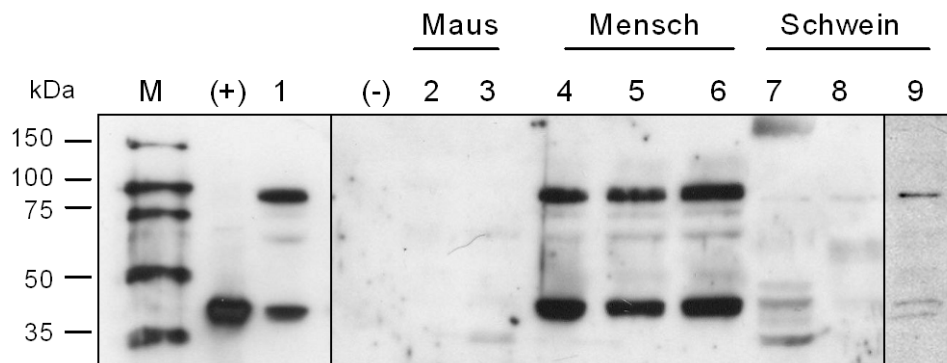


Abb. 2.6 Testung der Kreuzreaktivität des genutzten Anti-IDO-Antikörpers und Einfluss verschiedener Homogenisationsmethoden. Es wurden 10 µg Protein/Tasche eingesetzt.
M = Molekulargewichtsmarker; **(+)** = Positivkontrolle; **(-)** = Ladepuffer+A.dest; **1** = humane Plazenta (Ultra-Turrax); **2** = murines Gehirn; **3** = murine Plazenta; **4** = humane Plazenta (fetal); **5** = humane Plazenta (maternal); **6** = humane Plazenta (gemörsert); **7** = porciner Muskel; **8** = porcine Plazenta, **9** = porcine Milz

Eine zusätzliche Untersuchung zeigte, dass auch nach längerer Belichtungszeit und höherer Proteinkonzentration in der Plazenta vom Schwein kaum ein Signal detektiert werden konnte. Allerdings befand sich im Muskel in Höhe der Positivkontrolle eine schwache Bande, ebenso in der Milz. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass der genutzte Antikörper keine Kreuzreaktivität mit Geweben der Maus aufwies, jedoch mit denen des Schweins. Aufgrund der deutlich schwächeren Proteinexpression in den Schweingeweben im Vergleich zur humanen Plazenta, wurde für spätere Untersuchungen höhere Proteinkonzentrationen/Tasche eingesetzt, welche für die jeweiligen Gewebe experimentell ermittelt wurden.

2.5 Erfassung LPS-induzierter Krankheitssymptome

2.5.1 Verhaltensbeobachtungen

Um Verhaltensänderungen und das Auftreten von Krankheitssymptomen nach der i.p. LPS-Applikation zu erfassen, wurden Verhaltensbeobachtungen durchgeführt. Dazu wurden die Verhaltensweisen jedes Tieres über 4 (Experiment 2) bzw. 5 Stunden (Experiment 7) in Abständen von 5 min nach LPS- bzw. NaCl-Applikation erfasst. Dabei wurden diejenigen Verhaltensweisen notiert, die zum Zeitpunkt der Beobachtung

auftraten („scan sampling“). Für die Auswertung der Daten wurden Beobachtungszeiträume (1 h) mit jeweils 12 Beobachtungen/Tier gebildet, um auch zeitliche Veränderungen der Verhaltensweisen nach LPS bzw. NaCl zu dokumentieren. Die Verhaltensweisen ‚Aktiv‘ bzw. ‚Inaktiv‘, sowie die einzelnen Krankheitssymptome (**Tab. 2.5**) wurden als relative Häufigkeit in [%] berechnet. Tiere, die mindestens ein Krankheitssymptom aufwiesen wurden als krank definiert und in der Kategorie „Krankheitssymptome“ zusammengefasst. Das gleichzeitige Auftreten mehrerer Krankheitssymptome wurde zur Einschätzung des Schweregrades der LPS-induzierten Krankheitssymptome genutzt. Dazu wurden die Anzahl der beobachteten Symptome aufsummiert und anschließend die mittlere Anzahl berechnet.

Tab. 2.5 Definition der erfassten Verhaltensweisen nach LPS/NaCl-Applikation

Verhaltenskategorie	Beschreibung
Aktiv	Gehen, Trinken, Beschäftigung mit Futtertrog, Einstreu, Spielzeug oder mit Ferkel aus Nachbarbucht
Inaktiv	Liegen auf Bauch oder Seite, Sitzen, Stehen
Zittern	unwillkürliches, sich rhythmisch wiederholendes Zusammenziehen einander entgegengerichteter Muskelgruppen
Erschwerte Atmung	Starke Hebung und Senkung des Bauchraumes beim Ein- und Ausatmen
Erbrechen	Schwallartiges Entleeren von Mageninhalt über das Maul
Durchfall	Absetzen großer Mengen von Kot mit flüssiger Konsistenz
Schwacher Kreislauf	Blaue Verfärbung der Haut, besonders an Ohren oder Beinen

2.5.2 Messung der Hauttemperatur

Die Messung der Hauttemperatur erfolgte jeweils vor der Blutentnahme mit einem Infrarot-Thermometer (ThermoScan IRT 4020, Braun) im Leistenbereich der Tiere. Die Messung dauerte wenige Sekunden und war gut durchführbar, da die Leistengegend während der Blutentnahmen gut zugänglich war und die Messung somit keinen zusätzlichen Stress verursachte.

2.6 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit der SAS/STAT Software, Version 9.2 des SAS Systems für Windows, Copyright © 2009 SAS Institute Inc., durchgeführt (SAS Institute Inc. 2009, SAS/STAT® 9.2 User's Guide, Second Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc.) Die kontinuierlichen Merkmale der Blutparameter (TNF- α , IL-10, Trp, Trp-Metaboliten, 1-MT, Cortisol, Leukozyten, PBMCs, Zellproliferation, Zytokin-

Induzierbarkeit) und der Gewebeparameter (TNF- α , IL-10, Trp, Kyn, 1-MT), sowie die Futteraufnahme wurden mit der SAS-Prozedur MIXED analysiert. Dabei wurde für die Blutparameter der Experimente 1 – 5 (**Tab. 2.1**) ein Varianzanalysemodell mit den festen Faktoren Durchgang, Behandlung und Blutentnahmezeitpunkt, deren Wechselwirkungen und einem zufälligen Saueneffekt verwendet. Für die Blutparameter der Experimente 6 und 7 (**Tab. 2.2**) enthielt das Varianzanalysemodell die festen Faktoren Durchgang, Vorbehandlung, Behandlung und Blutentnahmezeitpunkt, deren Wechselwirkungen und einen zufälligen Saueneffekt. Die Stufen der festen Faktoren sind der **Tab. 2.1** bzw. der **Tab. 2.2** zu entnehmen. Wiederholte Messungen (Blutentnahmezeitpunkte) am gleichen Tier wurden mittels „repeated statement“ der Prozedur MIXED und einer Blockdiagonalstruktur der Restkovarianzmatrix berücksichtigt.

Das Varianzanalysemodell für die Gewebeparameter des Experiments 1 (**Tab. 2.1**) enthielt die festen Faktoren Durchgang, Behandlung und Entnahmezeitpunkt, deren Wechselwirkungen und einen zufälligen Saueneffekt. Das Modell für die Gewebeparameter des Experiments 6 (**Tab. 2.2**) wurde um den festen Faktor Vorbehandlung erweitert.

Die Verhaltensbeobachtungen von Krankheitssymptomen und Aktivität (relative Häufigkeiten) wurden mit der SAS-Prozedur GLIMMIX unter Verwendung eines logistischen Modells mit den festen Faktoren Durchgang, Vorbehandlung, Behandlung, Beobachtungszeitraum und deren Wechselwirkungen analysiert. Wiederholte Messungen am gleichen Tier wurden im „random statement“ der Prozedur GLIMMIX mit einer Blockdiagonalstruktur der Restkovarianzmatrix berücksichtigt. Für die Analyse der mittleren Anzahl der Verhaltensbeobachtungen (Schweregrad der Erkrankung) mit der SAS-Prozedur GLIMMIX wurde ein Poisson Modell (Setzen der Option: DISTRIBUTION=POISSON, LINK=LOG im „model statement“) mit den festen Faktoren Durchgang, Vorbehandlung, Behandlung, Beobachtungszeitraum und deren Wechselwirkungen verwendet. Wiederholte Messungen am gleichen Tier wurden im „random statement“ der Prozedur GLIMMIX mit einer Blockdiagonalstruktur der Restkovarianzmatrix unter Verwendung einer autoregressiven Struktur erster Ordnung berücksichtigt.

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden LS-Means (LSM) und deren Standardfehler (SE) für alle festen Effekte in den oben genannten Modellen berechnet und deren paarweise Differenzen getestet. Die multiplen Mittelwertvergleiche erfolgten mit dem Tukey-Kramer-Test. Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt, das heißt alle Testergebnisse mit p-Werten $< \alpha$ sind signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung LPS-induzierter Effekte

Als Modell zurIDO-Aktivierung wurde eine einmalige i.p. LPS-Applikation gewählt. Zu definierten Zeiten wurde geprüft, welche Effekte LPS auf das Immunsystem, die HPA-Achse und die IDO-Aktivierung hat. Die Kontrolltiere erhielten eine i.p. NaCl-Applikation.

3.1.1 Zytokine und Cortisol

Zur Charakterisierung der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort und HPA-Achsen-Aktivierung wurden die Zytokine TNF- α und IL-10 und das Stresshormon Cortisol nach einmaliger i.p. LPS-Applikation bestimmt.

LPS führte 1 h nach Applikation zu einer signifikanten Erhöhung der Plasma-TNF- α -Konzentrationen im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrolltieren, welche zu späteren Zeitpunkten nicht mehr signifikant erhöht waren (**Abb. 3.1A**). Auch IL-10 war 1 h nach LPS im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (**Abb. 3.1B**).

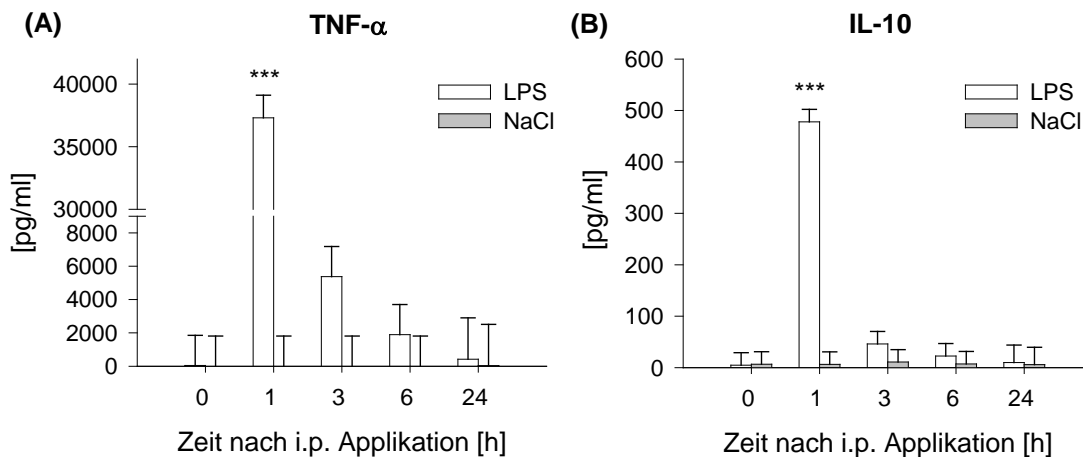


Abb. 3.1 Konzentrationen von TNF- α (A) und IL-10 (B) im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 20 pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), n = 10 pro Behandlung (24 h). Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** p < 0,001

Die Cortisol-Konzentrationen waren 1, 3 und 6 h nach LPS signifikant höher als bei den Kontrolltieren (**Abb. 3.2**). Im Gewebe der Hirnregionen Hippocampus und präfrontaler Cortex (PFC) konnten nach 6 bzw. 24 h keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen von TNF- α und IL-10 zwischen LPS und NaCl-behandelten Tieren festgestellt werden (**Tab 3.1**).

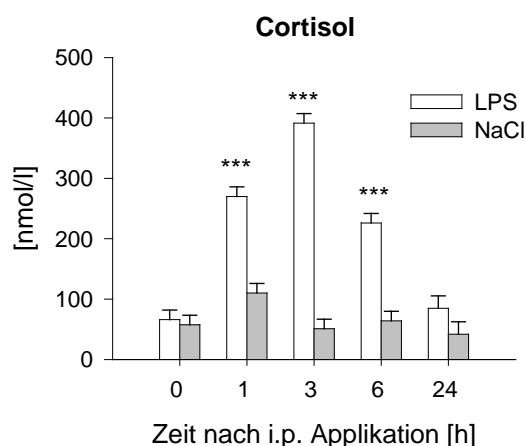


Abb. 3.2 Konzentrationen von Cortisol im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 20 pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), n = 10 pro Behandlung (24 h). Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** p < 0,001

Tab. 3.1 Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im Hirngewebe 6 und 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind als LSM \pm SE dargestellt. n = 10 pro Behandlung (6 h); n = 10 pro Behandlung (24 h)

	Zeit [h]	TNF- α [pg/mg]		IL-10 [pg/mg]	
		LPS	NaCl	LPS	NaCl
Hippocampus	6	172,16 \pm 7,81	173,52 \pm 7,81	3,96 \pm 0,25	4,00 \pm 0,25
	24	171,64 \pm 7,81	156,47 \pm 7,81	4,83 \pm 0,25	4,00 \pm 0,25
präfrontaler Cortex	6	150,21 \pm 10,88	156,71 \pm 10,88	2,70 \pm 0,19	2,80 \pm 0,19
	24	159,97 \pm 10,88	147,79 \pm 10,88	3,20 \pm 0,19	3,10 \pm 0,19

3.1.2 Trp und Trp-Metaboliten

Der Einfluss von LPS auf den Trp-Stoffwechsel wurde durch die Veränderungen der Plasma-Konzentrationen von Trp und seinen Metaboliten Kyn, Kyna, Quin und 5-HT charakterisiert. Die Behandlung mit LPS führte zu einem Abfall der Trp-Konzentrationen, was bereits nach 3 h zu signifikant verminderten Trp-Konzentrationen verglichen mit den Kontrollen führte. Die Trp-Konzentrationen blieben auch 6 und 24 h nach LPS signifikant geringer als bei den NaCl-behandelten Kontrolltieren (**Abb. 3.3A**). Die Kyn-Konzentrationen waren 3 und 6 h nach LPS signifikant erhöht und nach 24 h wieder auf dem Ausgangsniveau (**Abb. 3.3B**). Das Verhältnis von Kyn zu Trp war ebenfalls nach 3 und 6 h signifikant erhöht (**Abb. 3.3C**). Kyna war 3 und 6 h nach LPS signifikant erhöht, während nach 24 h wieder die Ausgangskonzentrationen erreicht waren (**Abb. 3.3D**). Die Konzentrationen von Quin waren 6 h nach der LPS-Gabe signifikant höher als bei den NaCl-behandelten Tieren, während zu den weiteren Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden konnten (**Abb. 3.3E**). Die 5-HT-Konzentrationen waren 6 h nach LPS signifikant erhöht, verglichen mit den Kontrollen. Innerhalb der LPS-behandelten

Gruppe waren die 5-HT-Konzentrationen jedoch 24 h nach LPS signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 0 h ($p < 0,01$), während sich innerhalb der Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen zeigten (**Abb. 3.3F**).

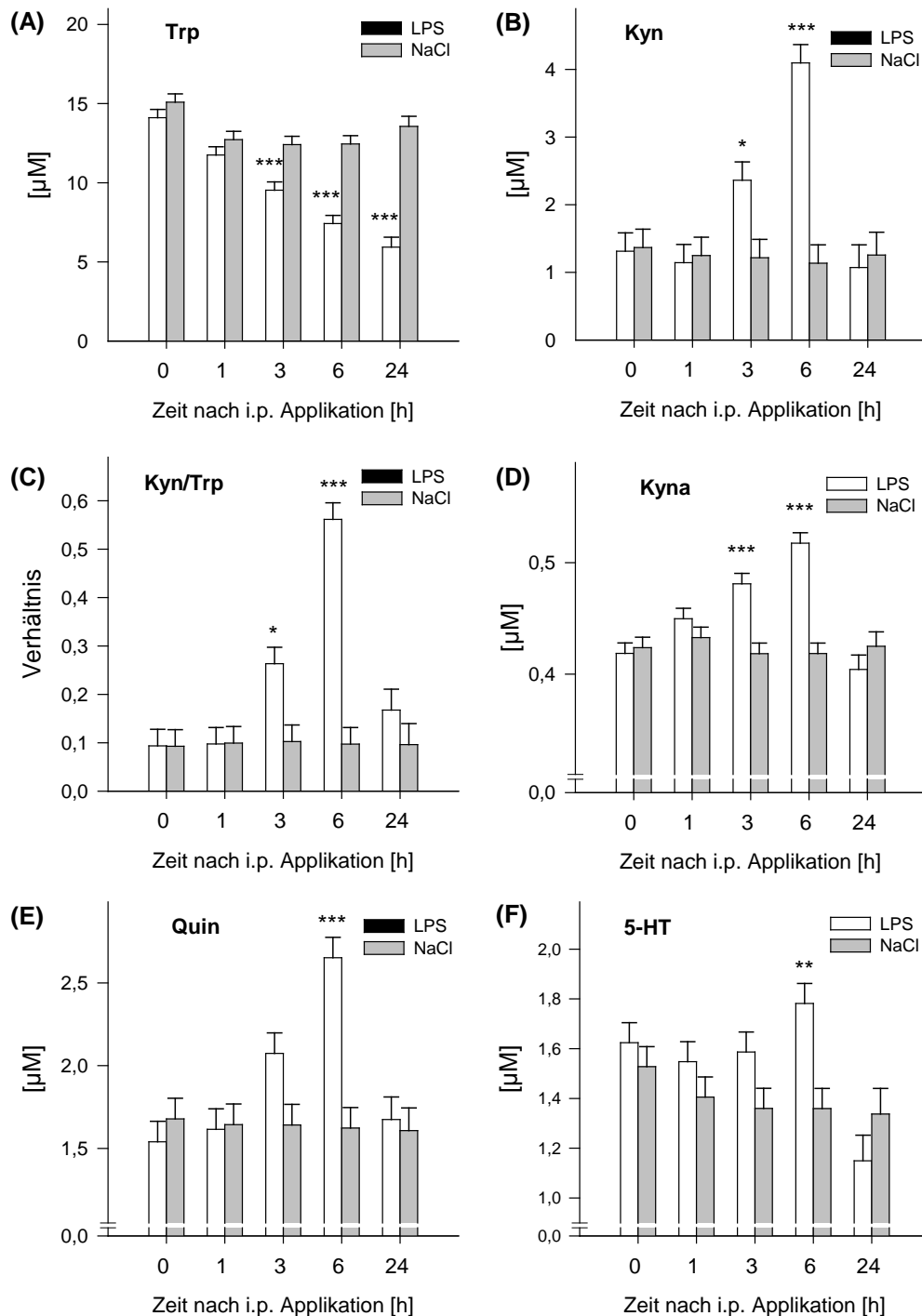


Abb. 3.3 Konzentrationen von Trp (A), Kyn (B), Kyn/Trp (C), Kyna (D), Quin (E) und 5-HT (F) im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 20$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 10$ pro Behandlung (24 h). Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

3.1.3 IDO-Proteinexpression

Proteinexpression im Blut

Für den Nachweis des porcinen IDO-Proteins wurden Plasmaproben vor und nach der LPS-Applikation mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und dann mit Hilfe der Westernblot-Methode detektiert (**Abb. 3.4A**). Bei allen untersuchten Zeitpunkten konnte eine konstitutiv exprimierte IDO-Form mit einem Molekulargewicht (MG) von ca. 50 kDa nachgewiesen werden. Der Antikörper detektierte 3 und 6 h nach i.p. LPS eine zusätzliche Bande mit einem MG von ca. 42 kDa. Diese Bande trat in der NaCl-behandelten Kontrollgruppe nicht auf. Die Intensität dieser LPS induzierten Banden war geringer als die der konstitutiven IDO-Form. Im Rahmen des Vollbluttests wurde ebenfalls die Proteinexpression im Vollblutüberstand untersucht (**Abb. 3.4B**). Dazu wurde Blut vor (0 h) und nach der Behandlung (6 h und 24 h) entnommen und für 24 Stunden ohne zusätzliche Stimulation im Medium kultiviert (spontaner Ansatz). Es zeigte sich ein ähnliches Proteinexpressionsmuster wie im Blutplasma mit annähernd gleichen Bandenintensitäten der konstitutiven und der LPS-induzierten Form.

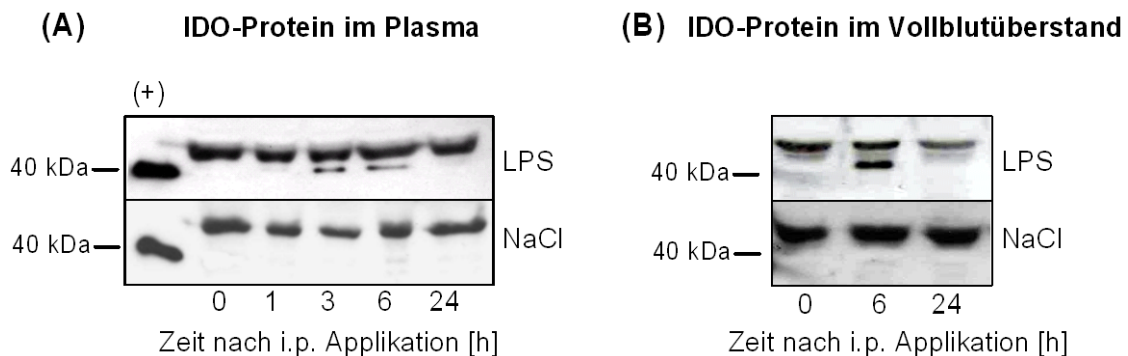


Abb. 3.4 IDO-Proteinexpression im Blut vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Für den Nachweis des porcinen IDO-Proteins wurde ein polyklonaler anti-hIDO Antikörper genutzt. Als Positivkontrolle (+) wurde „IDO (h): 293T Lysate“ genutzt. Für den Nachweis von IDO-Protein im Blutplasma (**A**) wurden 50 µg Protein/Tasche aufgetragen, n = 5 pro Behandlung. Für den Nachweis von IDO im Vollblutüberstand (**B**) wurden 30 µg Protein/Tasche aufgetragen, n = 3 pro Behandlung.

Proteinexpression im Gewebe

Im Gewebe wurde die IDO-Proteinexpression 6 h nach i.p. LPS oder NaCl untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die i.p. LPS-Applikation Einfluss auf die IDO-Proteinexpression in der Leber und in der Lunge hatte (**Abb. 3.5A**). In der Leber konnte eine behandlungsunabhängige konstitutive IDO-Form mit ~ 37 kDa MG nachgewiesen werden, die in der Lunge nicht exprimiert wurde. Sowohl in der Leber als auch in der Lunge verursachte die LPS-Applikation die Expression eines Proteins mit einem MG von ca. 34 kDa, das bei den NaCl-behandelten Kontrolltieren nicht auftrat. Diese Proteinexpression wurde auch 3 h nach LPS gefunden (nicht dargestellt).

Der Muskel zeigte keine LPS-induzierten Veränderungen, sondern gleichbleibend schwach detektierbare Banden in Höhe der Positivkontrolle. Zusätzlich zu den peripheren Geweben wurde geprüft, ob die i.p. Applikation von LPS auch in verschiedenen Regionen des Gehirns eineIDO-Proteinexpression bewirkt (**Abb. 3.5B**). Die Leber diente dabei als IDO-exprimierende Kontrolle. In den untersuchten Hirnregionen ließ sich 6 h nach LPS keine IDO-Proteinexpression nachweisen. Auch Untersuchungen im PFC und Hippocampus der Kontrolltiere zeigten keine IDO-Proteinexpression (n = 5 pro Behandlung, nicht dargestellt).

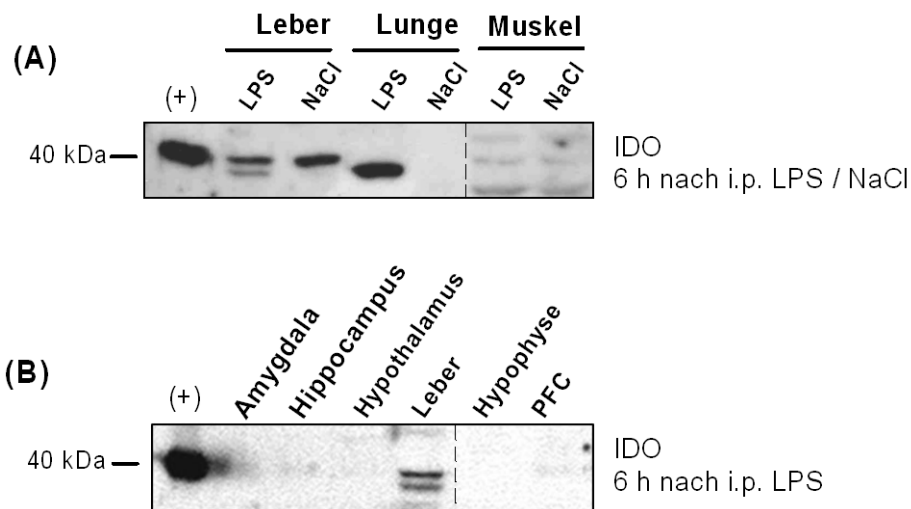


Abb. 3.5 IDO-Proteinexpression im Gewebe 6 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Als Positivkontrolle (+) wurde „IDO (h): 293T Lysate“ genutzt. Für den Nachweis von IDO-Protein im peripheren Gewebe (**A**) wurden 20 µg Protein/Tasche aufgetragen, n = 3 pro Behandlung. Für den Nachweis von IDO im Hirngewebe (**B**) nach i.p. LPS wurden ebenfalls 20 µg Protein/Tasche aufgetragen, n = 3 (Amygdala, Hypothalamus, Hypophyse), n = 5 (Hippocampus, präfrontaler Cortex).

3.1.4 Verhalten und Krankheitssymptome

Die Applikation von LPS führte zu einem ausgeprägten Krankheitsverhalten bei den Schweinen. Bei den LPS-behandelten Tieren konnten über einen Zeitraum von 4 h nach LPS-Gabe Symptome wie Zittern, erschwerte Atmung und Erbrechen beobachtet werden. Erbrechen trat dabei besonders in der ersten Stunde nach LPS auf, wogegen Zittern und eine erschwerte Atmung vor allem in Stunde 2 und 3 nach LPS gehäuft zu beobachten waren (**Tab. 3.2**). Durchfall trat kaum in den beobachteten Zeiträumen auf (1,4%). Die **Abb. 3.6A** zeigt, dass LPS-behandelte Tiere in der dritten und vierten Stunde nach LPS-Gabe weniger aktiv waren als die Kontrolltiere. In allen vier Beobachtungszeiträumen von jeweils einer Stunde zeigten die LPS-behandelten Tiere signifikant häufiger Krankheitssymptome als die Kontrolltiere (**Abb. 3.6B**).

Tab. 3.2 Relative Häufigkeit von Krankheitssymptomen nach i.p. LPS-Applikation Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 20 (LPS), n.a. = nicht aufgetreten

Zeit nach LPS [h]	Zittern [%]	Atmung [%]	Erbrechen [%]
1	13,79 \pm 3.66	2,47 \pm 1,03	5,07 \pm 1,44
2	27,90 \pm 4.60	9,76 \pm 3,15	3,87 \pm 1,25
3	27,06 \pm 4.56	12,25 \pm 3,77	0,38 \pm 0,38
4	13,87 \pm 3.67	7,47 \pm 2,55	n.a.

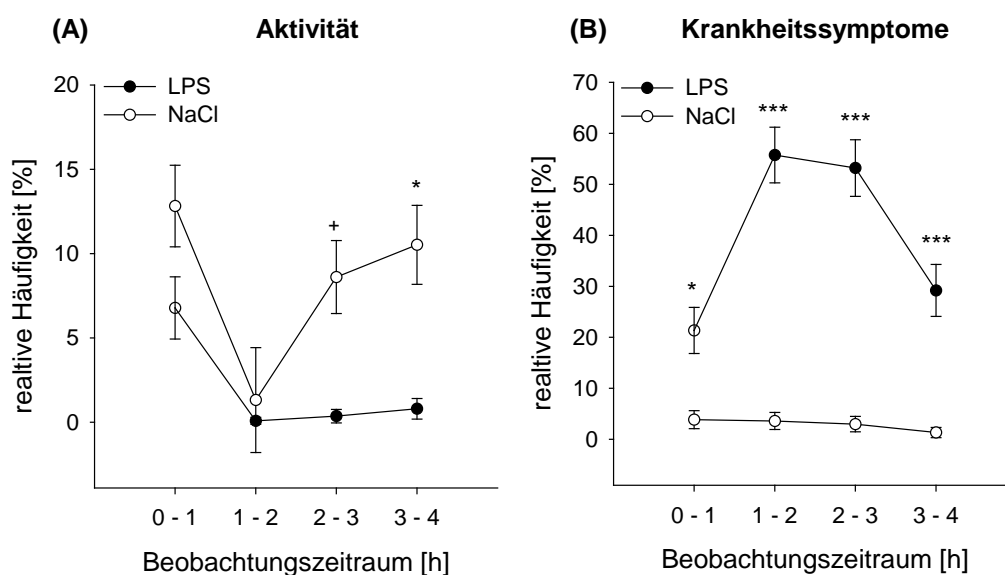


Abb. 3.6 LPS-induzierte Effekte auf die Aktivität **(A)** und den Krankheitsverlauf der Tiere **(B)**. Aktivität = Gehen oder Beschäftigung; Krankheitssymptome = ein oder mehrere Symptome treten auf, n = 20 pro Behandlung. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** p < 0,001; * p < 0,05; + p < 0,1

Die Futteraufnahme LPS-behandelter Tiere im Zeitraum von 6 bis 24 h nach der LPS-Applikation war signifikant geringer Futter als bei den NaCl-behandelten Kontrollen (p < 0,001; LPS: 0,14 \pm 0,05 kg; NaCl: 0,63 \pm 0,05; n = 10 pro Behandlung). Ein potentieller Einfluss dieser verminderten Nahrungsaufnahme auf Trp, Trp-Metaboliten und Cortisol wurde in Experiment 5 geprüft. Die Ergebnisse sind in **Abb. A 1** dargestellt. Es zeigte sich, dass eine geringere Futteraufnahme über 24 h (~ 0,1 kg) keine signifikant verminderten Trp-Konzentrationen im Vergleich zu normal gefütterten Tieren (1 kg) verursachte. Im Gegensatz zum LPS-induzierten Anstieg von Kyn, verursachte die 24-stündige Futterrestriktion signifikant verminderte Kyn-Konzentrationen verglichen mit den Kontrollen. Die verringerte Nahrungsaufnahme veränderte die Cortisol-Konzentrationen nicht signifikant (Abb. A 2).

3.1.5 Zahl von Leukozyten und PBMCs

Die Leukozytenzahl der LPS-behandelten Tiere war 6 h nach der Applikation signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren (**Abb. 3.7A**). Innerhalb der LPS-Gruppe fiel die Leukozytenzahl zum Messzeitpunkt 6 h nach Behandlung signifikant ab ($p < 0,001$) und stieg zum Messzeitpunkt 24 h wieder signifikant an ($p < 0,001$). Nach 24 h waren keine signifikanten Unterschiede zum Ausgangswert messbar. Die Zahl der PBMCs war sowohl 6 h als auch 24 h nach LPS signifikant niedriger im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrollen (**Abb. 3.7B**). Bei den LPS-behandelten Tieren war die Zahl der PBMCs 6 h nach LPS signifikant niedriger als 24 h nach LPS ($p < 0,001$).

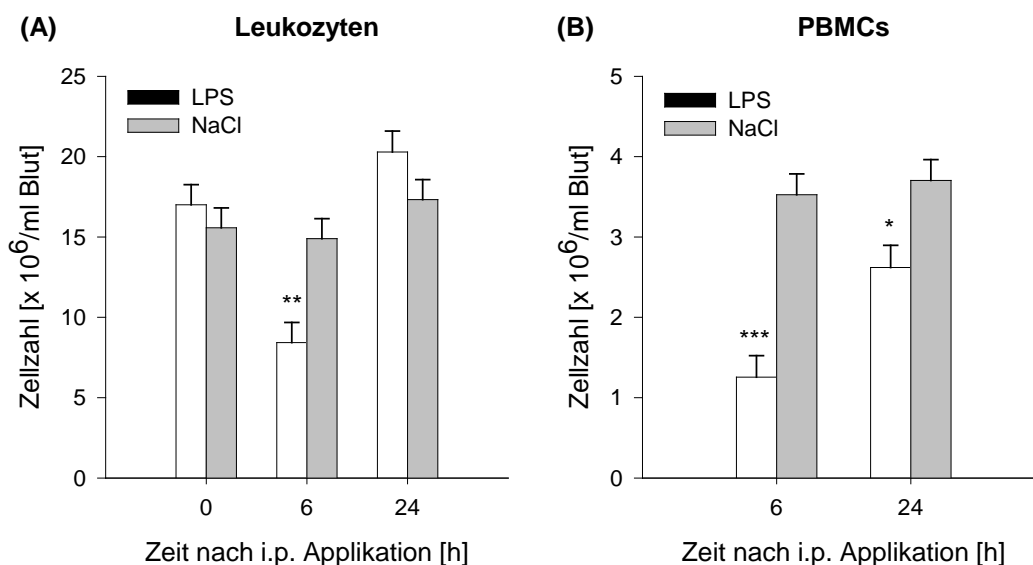


Abb. 3.7 Zellzahlen von Leukozyten **(A)** und PBMCs **(B)** im Blut vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. LPS: n = 13; NaCl: n = 14. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

3.1.6 Zytokin-Induzierbarkeit nach SEB-Stimulation *ex vivo*

Durch SEB-Stimulation im Vollbluttest wurde geprüft, ob die Behandlung mit LPS Einfluss auf die erneute Zytokin-Induzierbarkeit in Blutzellen hat. Dazu wurde entnommenes Blut nach der *in vivo* LPS- oder NaCl-Applikation in Kultur gebracht und 24 h mit oder ohne SEB-Stimulation inkubiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass IFN- γ 6 h nach i.p. LPS-Applikation im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrollen nicht mehr induzierbar war (**Abb. 3.8A**). 24 h nach LPS war die Induzierbarkeit noch tendenziell geringer als nach NaCl-Applikation. Innerhalb der LPS-Behandlung war die Induzierbarkeit 6 h nach LPS signifikant niedriger als 24 h danach ($p < 0,05$). In der Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der IFN- γ -Induzierbarkeit zwischen den jeweiligen Zeitpunkten. TNF- α ließ sich 6 h nach i.p. LPS signifikant weniger induzieren als bei den Kontrolltieren (**Abb. 3.8B**). Nach 24 h gab es keine signifikanten Unterschiede in der TNF- α -Induzierbarkeit

zwischen LPS- und NaCl-behandelten Tieren. Dies resultierte aus einer signifikant höheren Induzierbarkeit von TNF- α 24 h nach LPS im Vergleich zum Zeitpunkt 6 h ($p < 0,05$).

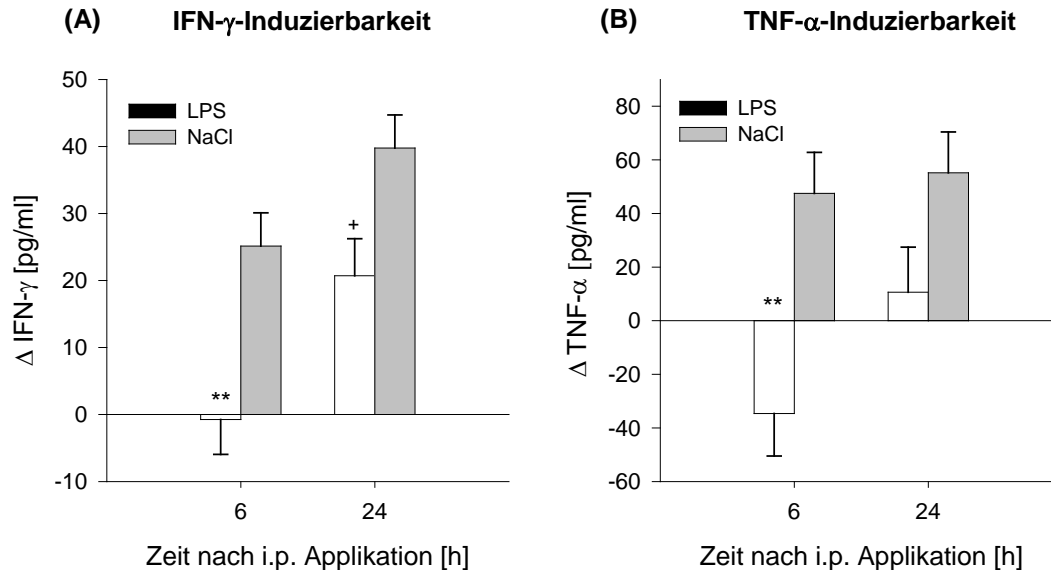


Abb. 3.8 Induzierbarkeit der Zytokine IFN- γ **(A)** und TNF- α **(B)** durch SEB-Stimulation im Vollbluttest nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. Δ = Differenz der Zytokin-Konzentrationen aus SEB-stimulierten und spontanen Kulturansätzen. LPS: n = 13, NaCl: n = 14. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: ** $p < 0,01$; + $p < 0,1$

3.1.7 Stimulation der Zellproliferation *in vitro*

Zur Überprüfung der Proliferationsfähigkeit von PBMCs nach i.p. LPS- bzw. NaCl-Applikation wurde der MTT-Test genutzt. Der errechnete PI wird als Marker für die Lebensfähigkeit und das Wachstum lebender Zellen genutzt und zeigt indirekt, ob Zellen auf einen Stimulus mit Zellproliferation reagieren. Die Ergebnisse zeigen, dass der SEB-induzierte PI 24 h nach LPS-Behandlung signifikant höher war als bei den NaCl-behandelten Tieren (**Abb. 3.9A**). Ebenso war in der LPS-behandelten Gruppe der PI 24 h nach LPS signifikant höher als 6 h nach LPS ($p < 0,01$). Durch Stimulation mit dem Mitogen PHA waren keine signifikanten Unterschiede im PI zwischen LPS- und NaCl-behandelten Tieren festzustellen (**Abb. 3.9B**). Auch innerhalb der LPS-behandelten Gruppe kam es nicht zu signifikanten Veränderungen zwischen den Zeitpunkten 6 h und 24 h nach LPS.

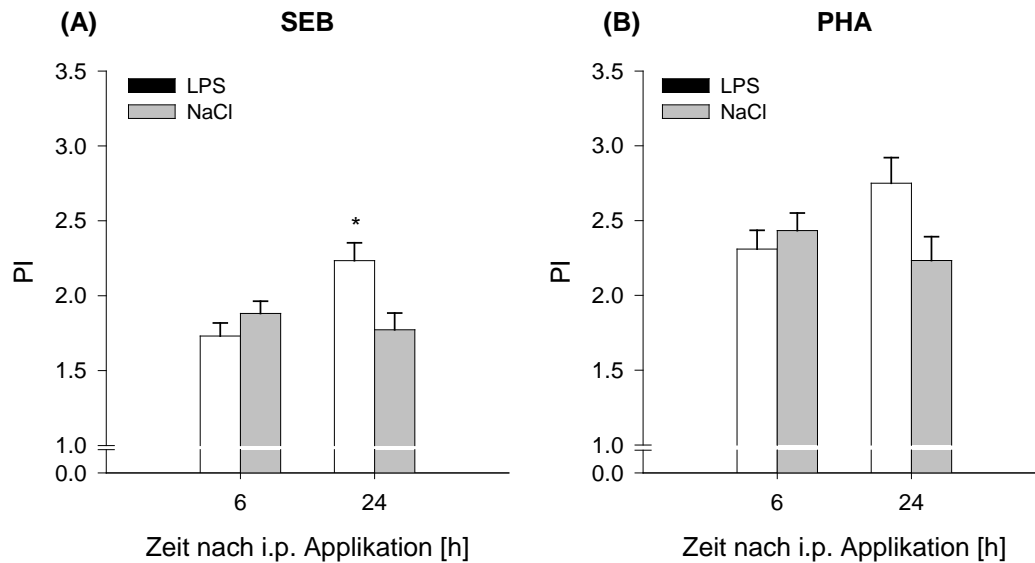


Abb. 3.9 Proliferationsindex (PI) von isolierten PBMCs nach SEB-Stimulation **(A)** und PHA-Stimulation **(B)** nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Der PI ergibt sich aus dem Quotient der optischen Dichte von stimulierten und spontanen Kulturansätzen. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. LPS: n = 15; NaCl: n = 16. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: * p < 0,05

3.1.8 LPS-Toleranz

Für die Charakterisierung einer möglichen LPS-Toleranz wurde den Tieren LPS bzw. NaCl appliziert (Tag 1) und 24 h später wurde allen Tieren i.p. LPS appliziert (Tag 2). Ebenfalls wurden im Vollbluttest die Induzierbarkeit von TNF- α und die IDO-Proteinexpression durch *ex vivo* Stimulation mit LPS nach i.p. LPS- oder NaCl-Behandlung geprüft.

Zytokine und Cortisol

Im Vergleich zu den Kontrolltieren (NaCl+LPS) bewirkte die LPS-Applikation *in vivo* an Tag 2 bei den Versuchstieren (LPS+LPS) keinen erneuten Anstieg von TNF- α im Plasma (**Abb. 3.10A**). Auch die IL-10-Reaktion war bei den LPS+LPS-behandelten Tieren signifikant geringer als bei den NaCl+LPS-behandelten Kontrollen (**Abb. 3.10B**). Dennoch zeigten die Versuchstiere 1 h nach der zweiten LPS-Gabe noch einen tendenziellen Anstieg der IL-10-Konzentrationen (p < 0,1). Die Cortisol-Konzentrationen von LPS+LPS-behandelten Tiere waren nach der zweiten Applikation signifikant niedriger als bei den NaCl+LPS-behandelten Kontrolltieren (**Abb. 3.10C**).

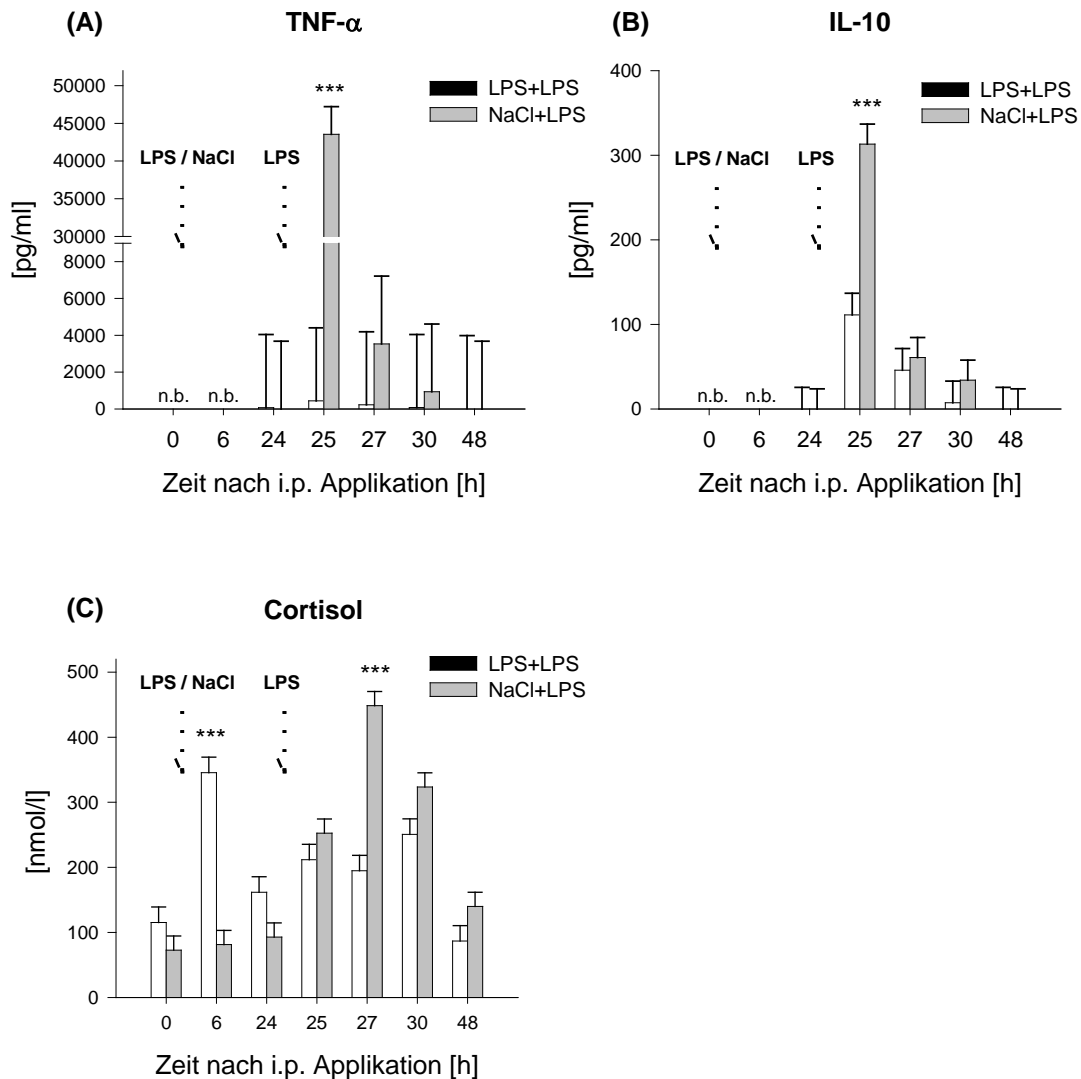


Abb. 3.10 Charakterisierung der LPS-Toleranz von TNF- α (A), IL-10 (B) und Cortisol (C) im Plasma durch zusätzliche LPS-Applikation 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Konzentration von TNF- α und IL-10 wurden zu den Zeiten 0 und 6 h nicht bestimmt (n.b.) Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 12 pro Behandlung. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: *** p < 0,001

Trp und Trp-Metaboliten

Bei den LPS+LPS-behandelten Tieren zeigte sich nach der zweiten LPS-Applikation an Tag 2 kein weiterer Abfall der Trp-Konzentrationen. Ebenfalls wurde nach der zweiten LPS-Gabe im Gegensatz zu Tag 1 keine erneute Auslenkung der Plasma-Konzentrationen von Kyn, Kyna, Quin und 5-HT beobachtet (nicht dargestellt). Die NaCl+LPS-behandelten Tiere zeigten dagegen ein LPS-induzierte Veränderung von Trp und Trp-Metaboliten, wodurch sich der zeitliche Verlauf den Parametern Trp, Kyn, Quin und 5-HT nach LPS-Gabe an Tag 2 signifikant bzw. tendenziell zwischen den LPS+LPS- und NaCl-LPS-behandelten Tieren unterschied (Trp, Kyn, Quin, 5-HT p < 0,001; Kyna p < 0,1). Als Indikator derIDO-Aktivierung sind in **Abb. 3.11** die Kyn-Konzentrationen im Plasma von LPS+LPS und LPS+NaCl-behandelten Tieren gezeigt. Die Kyn-Konzentrationen sind zum Zeitpunkt 30 h bei den Kontrolltieren (NaCl+LPS)

signifikant höher, als bei den LPS+LPS behandelten Tieren. Jedoch war die höchste Auslenkung der Kyn-Konzentration bei den NaCl+LPS-behandelten Tieren (30 h) signifikant niedriger als die der LPS+LPS-behandelten Tiere nach der ersten LPS-Applikation (6 h).

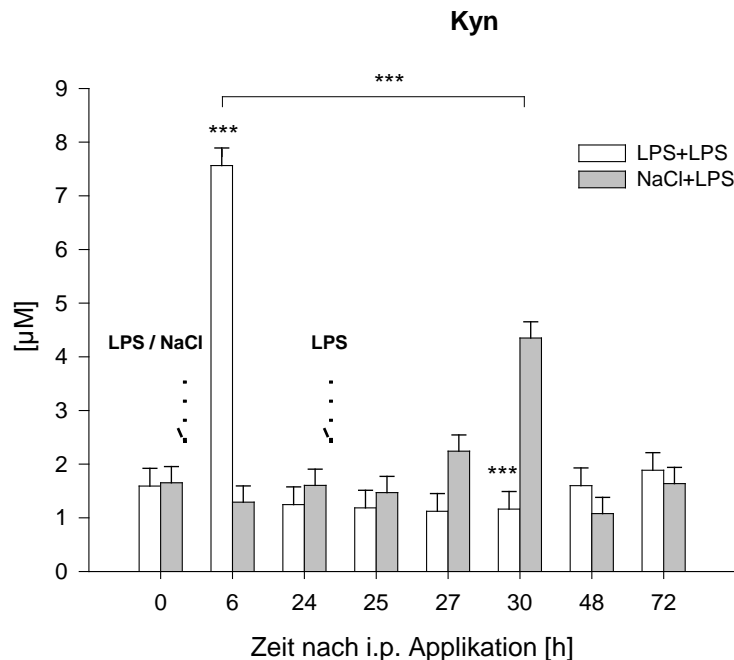


Abb. 3.11 Kyn-Konzentration im Plasma nach zusätzlicher LPS-Applikation 24 h nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 12 pro Behandlung. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes bzw. zwischen den Entnahmezeitpunkten dargestellt: *** p < 0,001

Induzierbarkeit von TNF- α und IDO-Proteinexpression durch ex vivo LPS-Stimulation

Durch LPS-Stimulation im Vollbluttest nach LPS-Applikation *in vivo* wurde geprüft, ob sich TNF- α *ex vivo* erneut induzieren lässt. Ebenso wurde getestet, ob durch 24-stündige Inkubation mit LPS die Expression des IDO-Proteins in der Vollblutkultur stimuliert wird. Im spontanen Ansatz des Vollbluts konnten keine signifikanten Veränderungen der TNF- α -Konzentrationen gemessen werden (**Abb. 3.12A**). Vor der *in vivo* LPS-Gabe war TNF- α durch die *ex vivo* LPS-Stimulation signifikant stärker induzierbar als 24 h nach der LPS-Applikation. Die Konzentrationen von TNF- α waren 6 h nach i.p. LPS in stimulierten und spontanen Kulturansätzen ähnlich. Die Ergebnisse der Westernblot-Analysen zeigten eine LPS-induzierte IDO-Proteinexpression ohne zusätzliche *ex vivo* Stimulation 6 h nach LPS, jedoch nicht zu den Zeitpunkten 0 und 24 h (**Abb. 3.12B**). Durch die Stimulation mit LPS im Vollbluttest war die IDO-Proteinexpression zum Zeitpunkt 0 h induzierbar. 6 h nach i.p. LPS bewirkte die *ex vivo* Stimulation keine Veränderung der bereits *in vivo* induzierten

Proteinexpression. Zum Zeitpunkt 24 h nach i.p. LPS war keine IDO-Proteinexpression durch zusätzliche *ex vivo* LPS-Stimulation induzierbar.

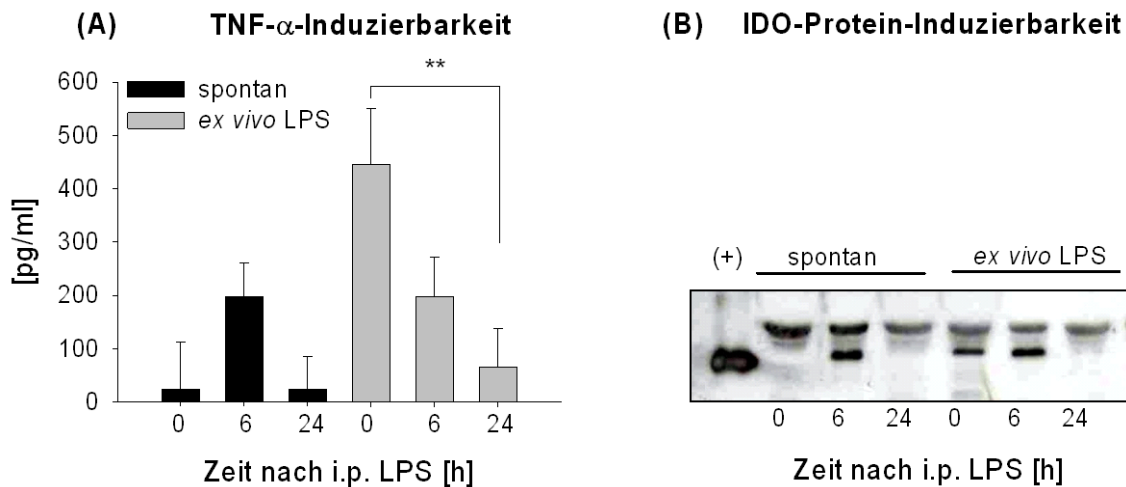


Abb. 3.12 Induzierbarkeit des Zytokins TNF- α (A) durch *ex vivo* LPS-Stimulation im Vollbluttest nach i.p. LPS. $n = 13$. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. ** $p < 0,01$. Für den Nachweis des IDO-Proteins (B) im Vollblutüberstand spontaner und *ex vivo* LPS-stimulierter Ansätze wurden 20 μ g Protein/Tasche aufgetragen, $n = 3$. (+) IDO-Positivkontrolle

3.2 Blockade von IDO-induzierten Effekten durch Applikation von 1-MT

Durch den Einsatz des spezifischen IDO-Inhibitors 1-MT sollten die Effekte der IDO-Aktivierung innerhalb der LPS-induzierten Effekte untersucht werden. Dazu wurde zunächst geprüft, ob 1-MT durch s.c. Applikation im Plasma und im Gewebe angereichert wurde und welche Effekte die wiederholte Applikation von 1-MT auf den Trp-Stoffwechsel hatte. Als Kontrolle wurden Tiere genutzt, die Myr (Trägerlösung für 1-MT) appliziert bekamen. Zur IDO-Aktivierung wurde den Tieren einmalig i.p. LPS appliziert, während die Kontrolltiere NaCl-erhielten.

3.2.1 Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe und Auswirkungen auf den Trp-Stoffwechsel

1-MT im Plasma

Zur Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe wurde den Tieren viermalig vor der i.p. Applikation von LPS/NaCl s.c. 1-MT appliziert. Vor jeder Applikation wurde Blut entnommen, so dass die 1-MT-Konzentrationen bestimmt werden konnten.

Bereits die erste Applikation führte zu einer signifikanten Erhöhung von 1-MT im Plasma (Abb. 3.13). Die zweite Applikation führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der 1-MT-Konzentrationen. Nach der dritten Applikation war ein signifikanter Abfall der 1-MT-Plasma-Konzentration zu beobachten. Bei den Myr-vorbehandelten war kein 1-MT nachweisbar (nicht dargestellt).

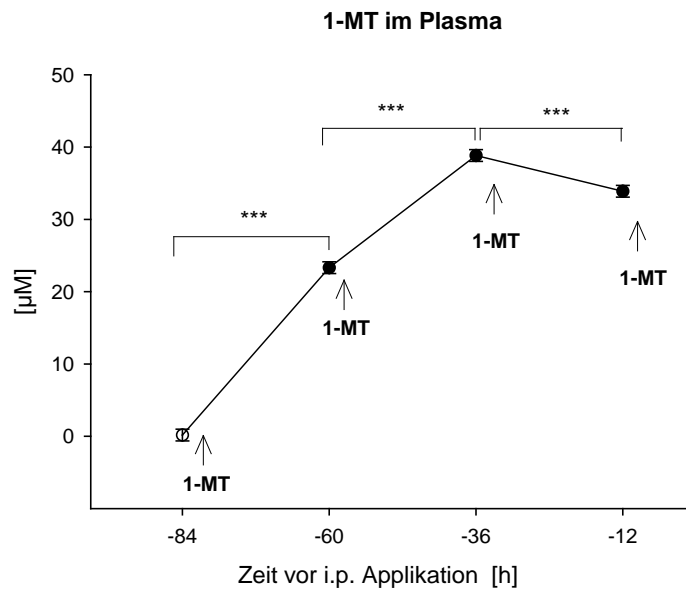


Abb. 3.13 Konzentrationen von 1-MT im Plasma während viermaliger s.c. Applikation von 1-MT. Die 1-MT-Applikation erfolgte jeweils direkt nach der Blutentnahme. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. 1-MT: n = 48. *** p < 0,001

Trp und Trp-Metaboliten im Plasma

Die mehrfache Applikation von 1-MT hatte Auswirkungen auf die Plasma-Konzentrationen von Trp und spezifischen Trp-Metaboliten. Durch die wiederholte 1-MT-Applikation kam es zu einem Anstieg der Plasma-Trp-Konzentrationen, welche zum Zeitpunkt -60, -36 und -12 h signifikant höher waren als bei den Myr-behandelten Kontrollen (**Abb. 3.14A**). Die absoluten Plasma-Konzentrationen von Kyn unterschieden sich weder zwischen den 1-MT bzw. Myr-vorbehandelten Tieren noch innerhalb beider Gruppen (**Abb. 3.14B**). Auch im Verlauf des Kyn/Trp-Verhältnisses wurden keine signifikanten Veränderungen innerhalb oder zwischen den Gruppen festgestellt (**Abb. 3.14C**). Die Vorbehandlung mit 1-MT führte zu einem signifikanten Anstieg von Kyna, so dass die Plasma-Konzentration zu den Zeitpunkten -60, -36 und -12 h signifikant höher war als bei den Myr-vorbehandelten Kontrollen (**Abb. 3.14D**). 1-MT-vorbehandelte Tiere hatten zum Zeitpunkt -36 und -12 h signifikant niedrigere Quin-Plasma-Konzentrationen im Vergleich zum Basalwert (-84 h), während die Kontrolltiere keine Veränderungen zeigten (**Abb. 3.14E**). Die 5-HT-Konzentrationen waren bei den Myr-vorbehandelten Tieren zum Zeitpunkt -12 h signifikant niedriger im Vergleich zu den Zeitpunkten -60 und -36 h vor der i.p. LPS-Applikation (**Abb. 3.14F**).

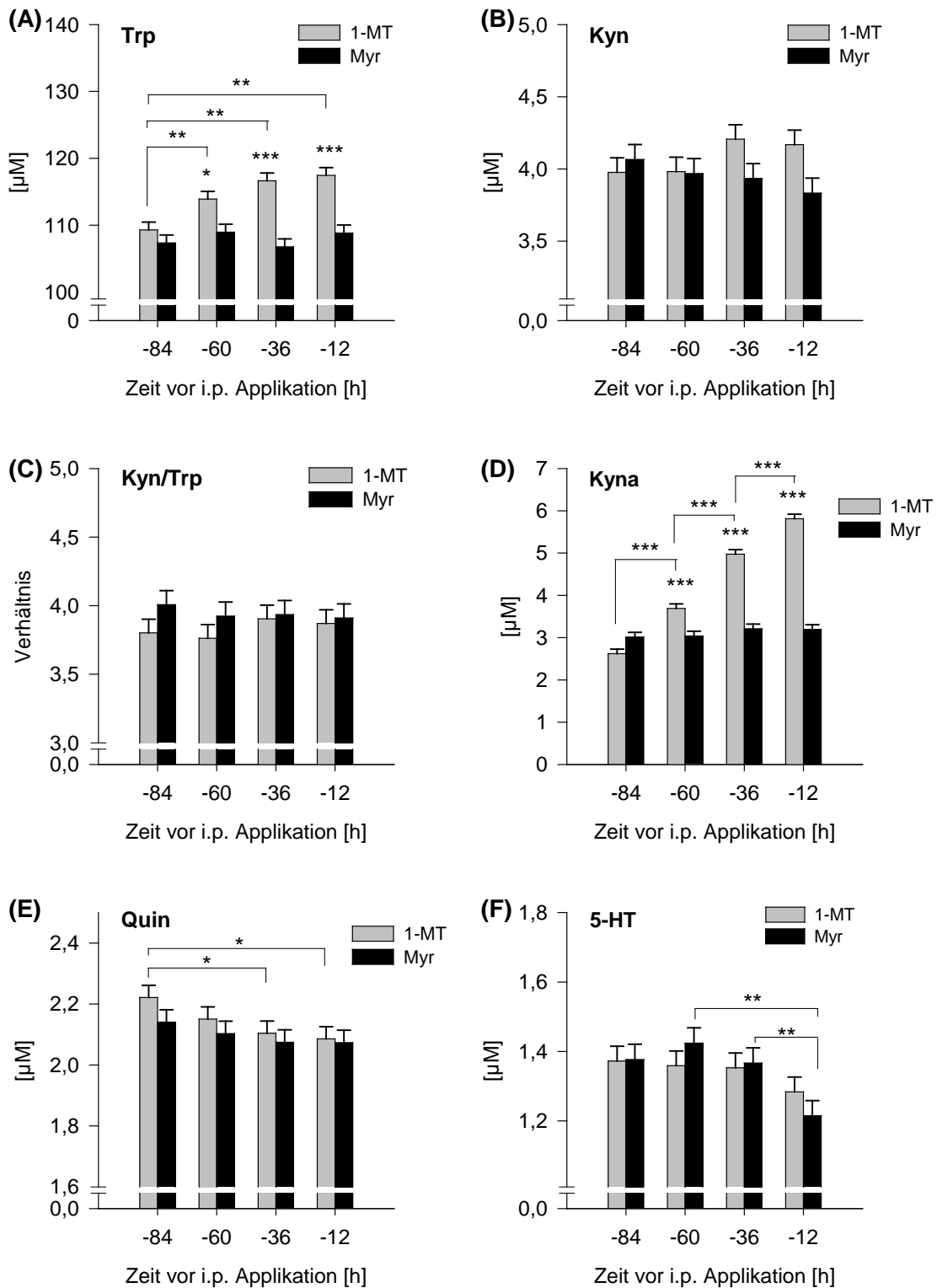


Abb. 3.14 Konzentrationen von Trp (A), Kyn (B), Kyn/Trp (C), Kyna (D), Quin (E) und 5-HT (F) im Plasma vor i.p. LPS/NaCl-Applikation. Nach jeder Blutentnahme wurde eine s.c. 1-MT/Myr-Applikation durchgeführt. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. 1-MT: n = 48, Myr: n = 46. Signifikanzen sind innerhalb bzw. zwischen den Entnahmezzeitpunkten dargestellt. *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,05

1-MT im Gewebe

Um zu prüfen, inwieweit die wiederholte s.c. Applikation zur Anreicherung von 1-MT im Gewebe führt, wurden 12 Gewebe der 1-MT-NaCl-behandelten Tiere untersucht. Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Entnahmezeitpunkten 6 und 24 h ergaben, wurden die Werte über beide Zeitpunkte gemittelt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.15** dargestellt und zeigen, dass in allen untersuchten Organen 1-MT nachgewiesen werden konnte. Die Konzentrationen unterschieden sich organspezifisch ($p < 0,001$). In der Niere, im Muskel und im Herz konnten besonders hohe Konzentrationen nachgewiesen werden. Als Trp-Analogen konkurriert 1-MT mit Trp bei der Bindung an Trp-abbauende Enzyme. Der Vergleich der Konzentrationen von Trp und 1-MT in den jeweiligen Geweben zeigte, dass die 1-MT-Konzentrationen in einigen Fällen ein Vielfaches über den gemessenen Trp-Konzentrationen lagen. Ein besonders hohes 1-MT/Trp-Verhältnis war im Muskel, im Herz und in der Lunge zu finden. Das niedrigste 1-MT/Trp-Verhältnis fand sich in der Amygdala. Eine Übersicht über das Verhältnis von 1-MT/Trp ist in **Tab. A1** gezeigt.

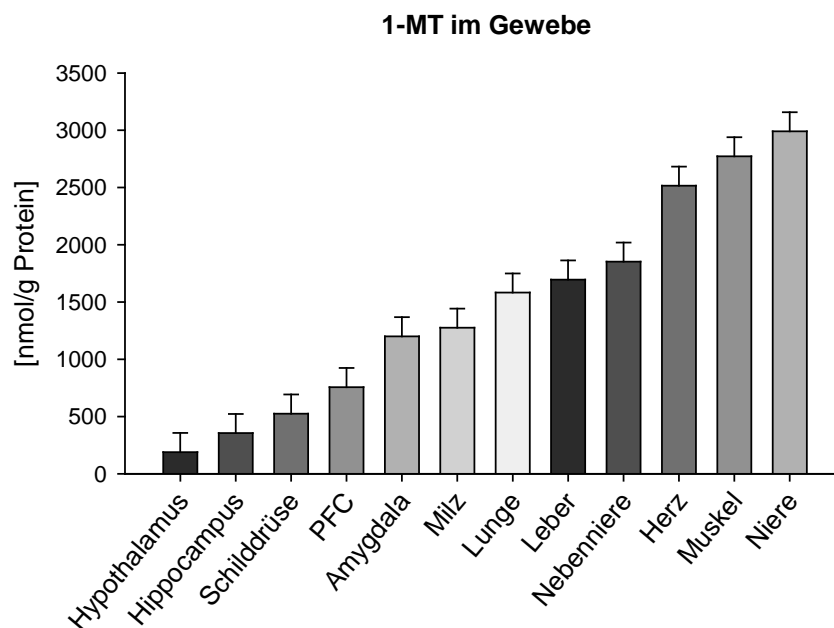


Abb. 3.15 1-MT-Konzentrationen in 12 Geweben des Schweins nach wiederholter s.c. 1-MT-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte der LSM \pm SE beider Entnahmezeitpunkte (6 und 24 h) nach i.p. NaCl-Applikation. 1-MT+NaCl: n = 12.

Trp und Kyn im Gewebe

Die wiederholte Applikation von 1-MT hatte in einigen untersuchten Geweben einen Effekt auf die Konzentrationen von Trp und Kyn. Es zeigte sich sowohl für Trp als auch für Kyn kein signifikanter Einfluss des Entnahmezeitpunktes. In den Geweben Leber,

Lunge, Muskel, Niere, und PFC wurden signifikant bzw. tendenziell höhere Trp Konzentrationen in den 1-MT-vorbehandelten Tieren im Vergleich zu Myr-vorbehandelten-Tieren gemessen. In der Schilddrüse waren die Trp-Konzentrationen dagegen signifikant niedriger (**Abb. 3.16**).

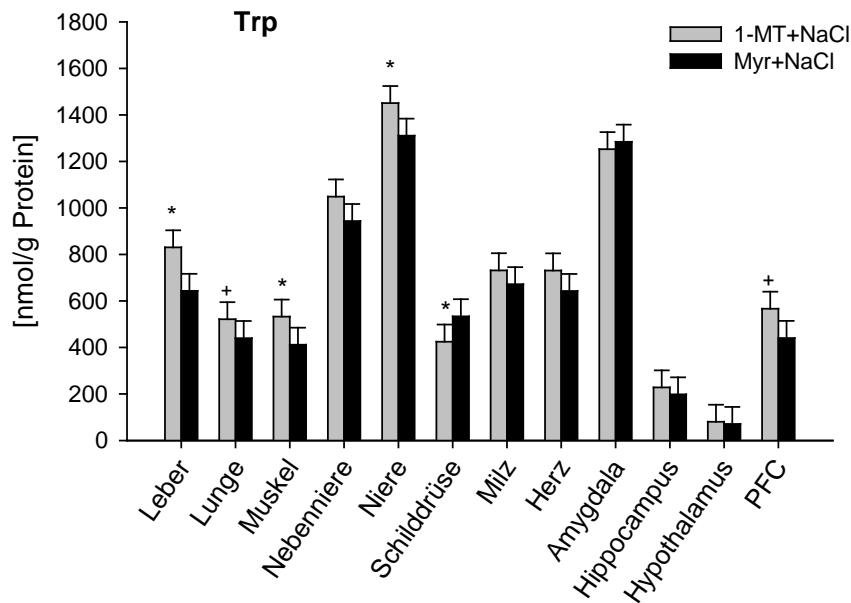


Abb. 3.16 Einfluss von 1-MT auf die Konzentrationen von Trp im Gewebe. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE beider Entnahmezeitpunkte (6 und 24 h) nach i.p. NaCl-Applikation. n = 12 pro Behandlung, Signifikanzen sind innerhalb eines Gewebes dargestellt: * p < 0,05; + p < 0,1

Mit Ausnahme der Leber, Lunge und des Hippocampus waren die Kyn-Konzentrationen der untersuchten Gewebe unter bzw. im Bereich der unteren Nachweisgrenze. 1-MT-vorbehandelte Tiere hatten in der Lunge tendenziell niedrigere Kyn-Konzentrationen als Myr-vorbehandelte Tiere (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.2 Einfluss von 1-MT und LPS auf die Konzentrationen von 1-MT, Trp und Trp-Metaboliten im Plasma

Die Vorbehandlung von 1-MT sollte eine Blockade der LPS-induziertenIDO-Aktivierung bewirken. Dies hätte Auswirkungen auf die LPS-induzierten Veränderungen von Trp und Trp-Metaboliten im Plasma verglichen mit den Myr-vorbehandelten Tieren. Ebenfalls wurde ein möglicher Einfluss von LPS auf die 1-MT-Konzentrationen im Plasma untersucht.

Einfluss von LPS auf 1-MT-Konzentrationen

Die 1-MT-Konzentrationen der LPS-behandelten Tiere waren nach 6, 12 und 24 h signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 0 h. Die NaCl-behandelten Tiere hatten zum Zeitpunkt 12 h ebenfalls signifikant niedrigere 1-MT-Konzentrationen, jedoch waren die 1-MT-Konzentrationen zum Zeitpunkt 24 h signifikant höher, als 12 h nach NaCl (**Abb. 3.17**).

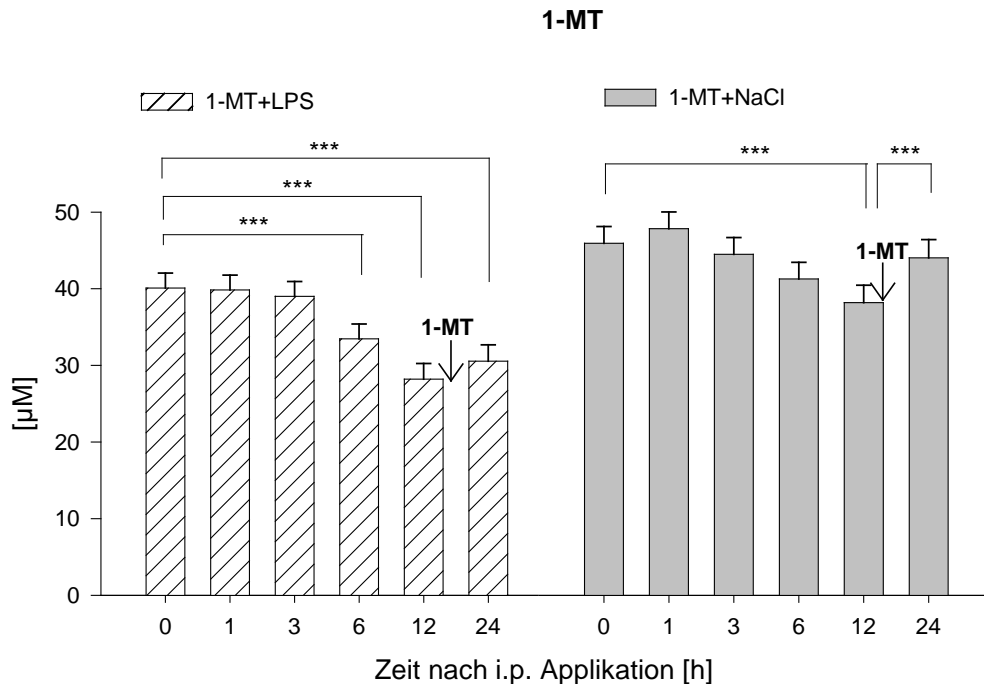


Abb. 3.17 Einfluss von LPS/NaCl auf die 1-MT-Konzentration im Plasma. Nach der Blutentnahme zum Zeitpunkt 12 h erfolgte eine Applikation von 1-MT. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 12 pro Behandlung. *** p < 0,001

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von Trp

Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (0 h) hatten die 1-MT behandelten Tiere im Plasma signifikant höhere Trp-Konzentrationen als die Myr-vorbehandelten Tiere (1-MT: $127,52 \pm 1,26$; Myr: $121,95 \pm 1,28$; p < 0,05). In **Abb. 3.18** sind die Trp-Konzentrationen der vier Behandlungsgruppen dargestellt. Bei den 1-MT+LPS behandelten Tieren waren die Trp-Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt nach LPS signifikant niedriger als zu Beginn der Blutentnahmen. In der Myr-vorbehandelten Gruppe waren die Trp-Konzentrationen 12 und 24 h nach i.p. LPS signifikant niedriger als zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, und 6 h. In den LPS-behandelten Gruppen beider Vorbehandlungen zeigte sich ein signifikanter Abfall der Trp-Konzentrationen vom Entnahmzeitpunkt 3 h zum Zeitpunkt 12 h. Die NaCl-Behandlung verursachte weder bei den 1-MT- noch bei den Myr-vorbehandelten Tieren signifikante Veränderungen zwischen den untersuchten Zeitpunkten.

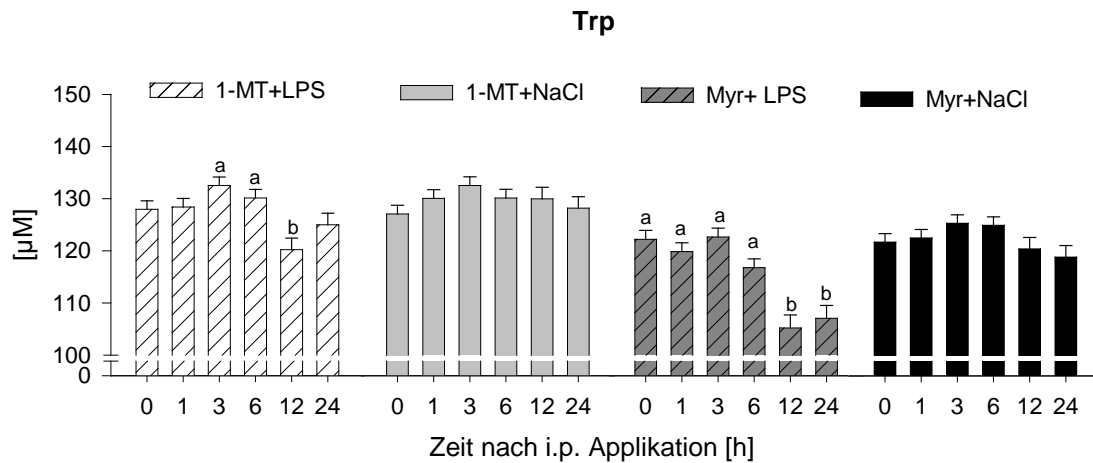


Abb. 3.18 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Trp-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) zwischen den Entnahmezzeitpunkten innerhalb einer Behandlungsgruppe sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von Kyn

In **Abb. 3.19** sind die Kyn-Konzentrationen der vier Behandlungsgruppen dargestellt. Sowohl in der 1-MT- als auch in der Myr-vorbehandelten Gruppe induzierte die LPS-Behandlung 6 h nach LPS signifikant erhöhte Kyn-Konzentrationen verglichen mit dem Zeitpunkt 0 h. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Vorbehandlung mit 1-MT und Myr. In den NaCl-behandelten Gruppen konnten keine signifikanten Veränderungen in den Kyn-Konzentrationen beobachtet werden.

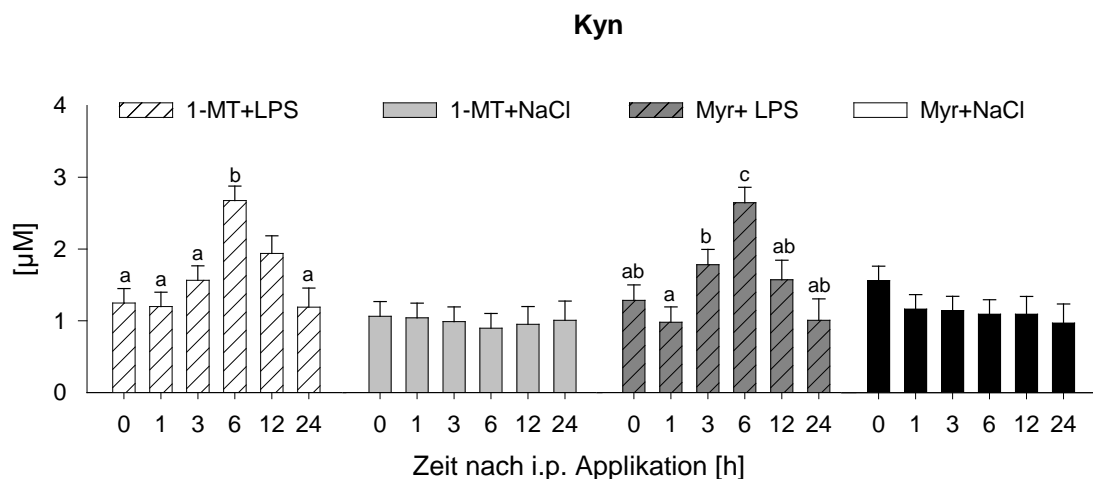


Abb. 3.19 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Kyn-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) zwischen den Entnahmezzeitpunkten innerhalb einer Behandlungsgruppe sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen des Verhältnisses von Kyn zu Trp

Die Vorbehandlung mit 1-MT hatte keinen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierten Erhöhung des Verhältnisses von Kyn/Trp (**Abb. 3.20**). Dieses war sowohl bei 1-MT- als auch bei Myr-vorbehandelten Tieren 6 h nach LPS signifikant gegenüber den NaCl-behandelten Tieren erhöht.

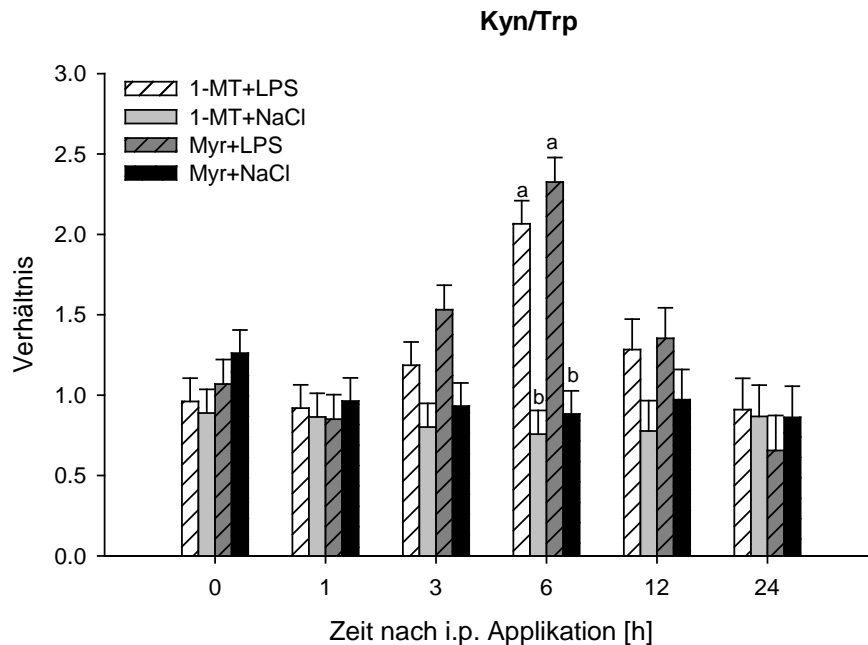


Abb. 3.20 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf das Verhältnis von Kyn/Trp im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM ± SE. n = 11-12 pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), n = 5-6 pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Entnahmezeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von Kyna

Die Vorbehandlung mit 1-MT führte über alle Zeitpunkte betrachtet zu signifikant höheren Kyna-Konzentrationen gegenüber den Myr-vorbehandelten Tieren (1-MT: $11,66 \pm 0,05 \mu\text{M}$; Myr: $2,07 \pm 0,05 \mu\text{M}$; $p < 0,001$). Die Kyna-Konzentrationen der Behandlungsgruppen sind in **Abb. 3.21** dargestellt. Die LPS-Behandlung führte bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren nach 1, 3, 6, 12 und 24 h zu erhöhten Kyna-Konzentrationen im Vergleich zum Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 h. Auch bei den 1-MT-NaCl-behandelten Tieren sind die Kyna-Konzentrationen zu diesen Zeitpunkten signifikant höher als die Ausgangskonzentrationen, jedoch ist Kyna zum Zeitpunkt 24 h signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 6 h und 12 h nach NaCl. Die Berechnung der Kyna-Differenzen (Δ Kyna) zeigte, dass die Behandlung mit LPS trotz der erhöhten Kyna-Konzentrationen durch die Vorbehandlung mit 1-MT einen Anstieg der Kyna-Konzentrationen im Vergleich zu den 1-MT+NaCl-behandelten Tieren induzierte. Zu

den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 24 h war Δ Kyna bei den 1-MT+LPS-behandelten Tieren signifikant höher ist als bei den 1-MT-NaCl-behandelten Tieren (**Abb. A 3**).

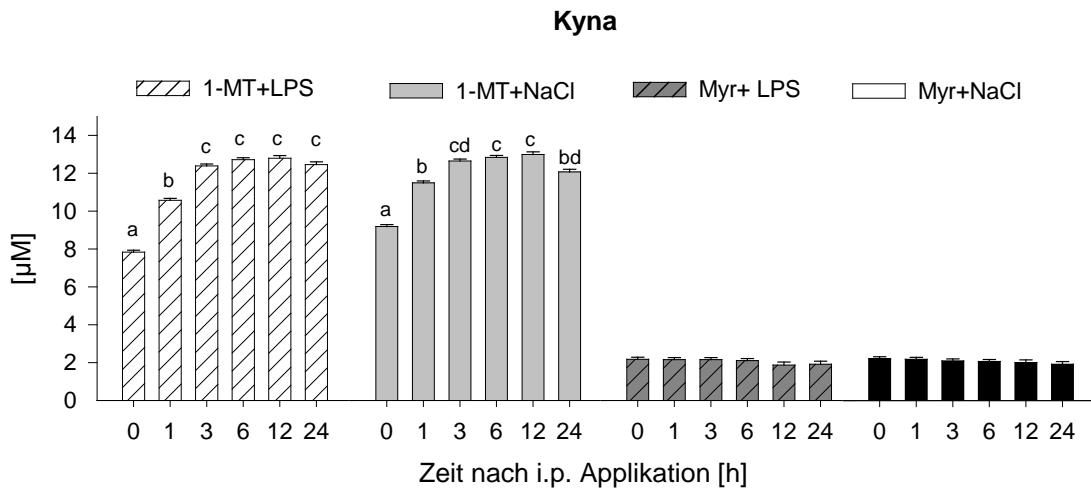


Abb. 3.21 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Kyna-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), n = 5-6 pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) zwischen den Blutentnahmen innerhalb einer Behandlungsgruppe sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von Quin

Die Vorbehandlung mit 1-MT führte über alle Zeitpunkte betrachtet zu signifikant niedrigeren Quin-Konzentrationen gegenüber den Myr-vorbehandelten Tieren (1-MT: $1,90 \pm 0,03 \mu\text{M}$; Myr: $2,05 \pm 0,03 \mu\text{M}$; $p < 0,01$). Die Quin-Konzentrationen der Behandlungsgruppen sind in **Abb. 3.22** dargestellt. Innerhalb der 1-MT+LPS-behandelten Tiere sind die Werte 12 h nach LPS signifikant höher als 24 h nach LPS. Innerhalb der Myr-vorbehandelten Gruppe sind die Quin-Konzentrationen 12 nach LPS signifikant höher als 1 h nach LPS. 24 h nach LPS sind die Werte signifikant niedriger als nach 12 h. Bei beiden NaCl-behandelten Gruppen wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

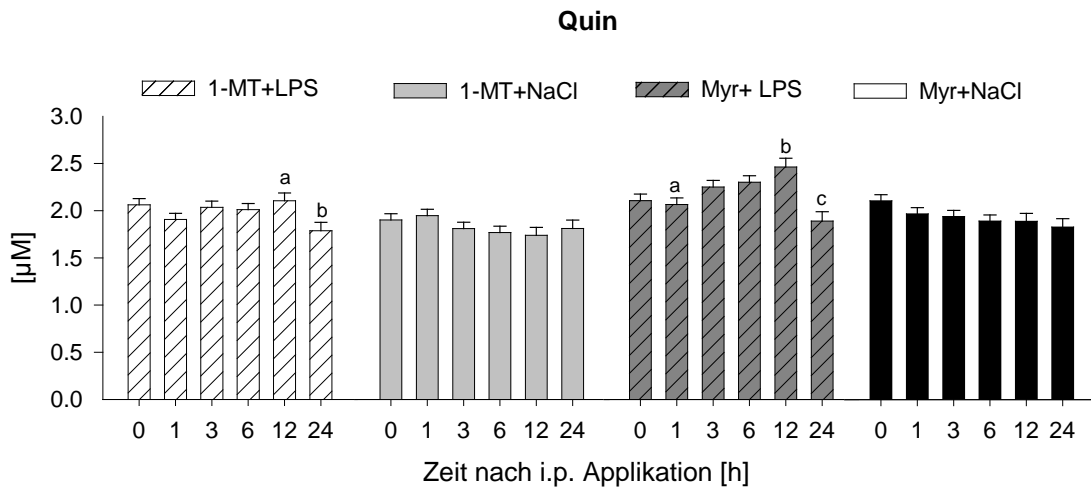


Abb. 3.22 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die Quin-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) zwischen den Entnahmezeitpunkten innerhalb einer Behandlungsgruppe sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von 5-HT

Die Vorbehandlung mit 1-MT bzw. Myr hatte keinen signifikanten Einfluss auf die 5-HT-Konzentrationen. Die 5-HT-Konzentrationen der einzelnen Entnahmezeitpunkte sind in **Abb. 3.23** dargestellt. Es ergeben sich durch die LPS-Behandlung keine signifikanten Unterschiede innerhalb bzw. zwischen den Behandlungsgruppen.

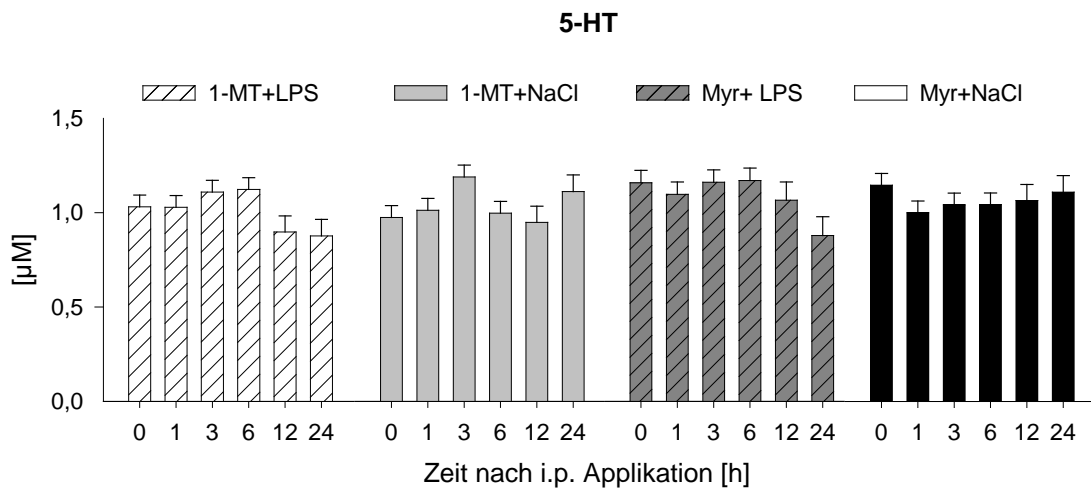


Abb. 3.23 Einfluss der Vorbehandlung 1-MT/Myr auf die 5-HT-Konzentrationen im Plasma nach i.p. LPS/NaCl-Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h).

3.2.3 Einfluss von 1-MT und LPS auf die Konzentrationen von 1-MT, Trp und Kyn im Gewebe

Einfluss von LPS auf 1-MT-Konzentrationen

In den Geweben Leber, Lunge, Niere, Milz und Herz waren die 1-MT-Konzentrationen nach der LPS-Behandlung signifikant geringer als bei den NaCl-behandelten Tieren (**Abb. 3.24**). In den Geweben Milz, Herz und Leber zeigte sich zusätzlich eine zeitliche Dynamik. In diesen Organen war die 1-MT-Konzentration zum Zeitpunkt 6 h nach i.p. Applikation in den LPS-behandelten Tieren signifikant niedriger als in den NaCl-behandelten Tieren ($p < 0,05$). Zum Zeitpunkt 24 h nach i.p. Applikation war der Unterschied in diesen Geweben nicht signifikant.

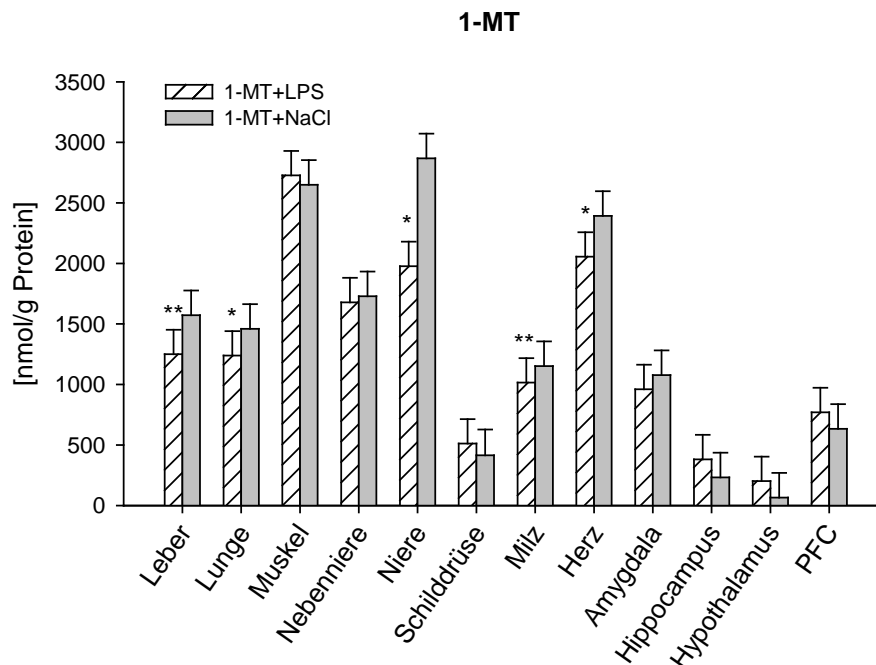


Abb. 3.24 Einfluss von i.p. LPS/NaCl auf 1-MT-Konzentrationen im Gewebe. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 12$ pro Behandlung beider Entnahmezeitpunkte (6 und 24 h) nach i.p. Applikation. Signifikanzen sind innerhalb eines Gewebes dargestellt: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen von Trp und Kyn

Es wurde geprüft, ob die LPS-Gabe zu einer Veränderung der Trp- und Kyn-Konzentrationen in den Organen führt. In sechs der untersuchten Organe hatte die Behandlung mit LPS, unabhängig von der Vorbehandlung mit 1-MT/Myr, einen signifikanten Effekt auf die durchschnittlichen Trp-Konzentrationen der Entnahmezeitpunkte 6 und 24 h nach i.p. Applikation (**Abb. 3.25A**). Die Trp-Konzentrationen in der Leber, Lunge, Muskel, Niere, Herz und Amygdala waren bei den LPS-behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den NaCl-behandelten Tieren. Die Vorbehandlung mit 1-MT/Myr hatte in den genannten Organen keinen signifikanten

Einfluss auf LPS-induzierte Effekte. Die Konzentrationen von Kyn konnten lediglich in 4 Organen ausgewertet werden, da die Konzentrationen in den übrigen untersuchten Geweben an oder unter der Nachweisgrenze lagen (**Abb. 3.25B**). Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit LPS zu signifikant erhöhten Kyn-Konzentrationen in der Lunge und in der Milz führte, wogegen in der Leber und im Hippocampus keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS- und NaCl-behandelten Tieren auftraten.

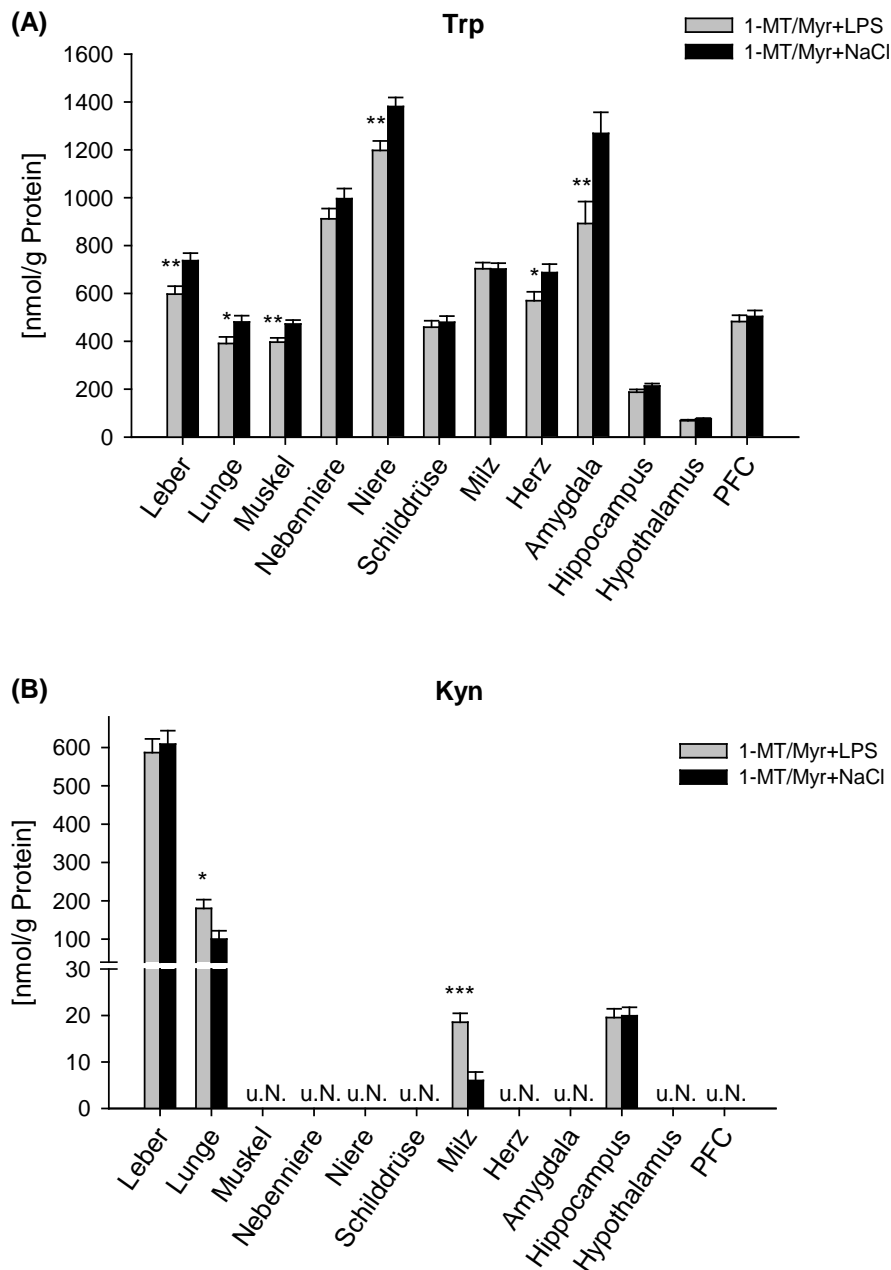


Abb. 3.25 Konzentrationen von Trp (**A**) und Kyn (**B**) im Gewebe nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE beider Entnahmezeitpunkte (6 und 24 h) und beider Vorbehandlungen (1-MT/Myr) nach LPS- oder NaCl-Applikation. LPS: n = 23, NaCl: n = 24. u.N. = die Mehrzahl der untersuchten Tiere befanden sich an oder unter der Nachweisgrenze. Signifikanzen sind innerhalb eines Gewebes dargestellt: *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,5

Sowohl in der Lunge als auch in der Milz hatte der Entnahmezeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf den LPS-induzierten Anstieg von Kyn (Behandlung*Zeit: $p < 0,01$). Die Kyn-Konzentrationen waren dabei in beiden Geweben 6 h nach der i.p. LPS-Applikation signifikant höher als 24 h nach LPS. In der Milz konnten zudem 6 h nach i.p. Applikation signifikante Unterschiede zwischen LPS und NaCl sowohl bei 1-MT- als auch bei Myr-vorbehandelten Tieren errechnet werden (**Abb. A 4**). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im LPS-induzierten Anstieg zwischen 1-MT- und Myr-vorbehandelten Tieren.

3.2.4 Einfluss von 1-MT auf die LPS-induzierte Reaktion von TNF- α , IL-10 und Cortisol

Es wurde geprüft, ob die Vorbehandlung mit 1-MT einen Einfluss auf die LPS-induzierte Reaktion der pro- und antiinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-10 und die HPA-Achsen-Aktivierung hatte. Die Ergebnisse zeigten, dass die Vorbehandlung mit 1-MT keinen signifikanten Effekt auf die LPS-induzierte Reaktion von TNF- α (**Abb. 3.26**) und IL-10 (**Abb. 3.27**) hatte. Sowohl die Myr- als auch die 1-MT-vorbehandelten Tiere hatten 1 h nach LPS signifikant höhere Konzentrationen als die NaCl-behandelten Kontrolltiere. Die numerisch geringere Konzentration von TNF- α und IL-10 der 1-MT-vorbehandelten Tiere jeweils 1 h nach der LPS-Applikation war jedoch nicht signifikant verschieden zu den Konzentrationen der Myr+LPS-behandelten Tiere.

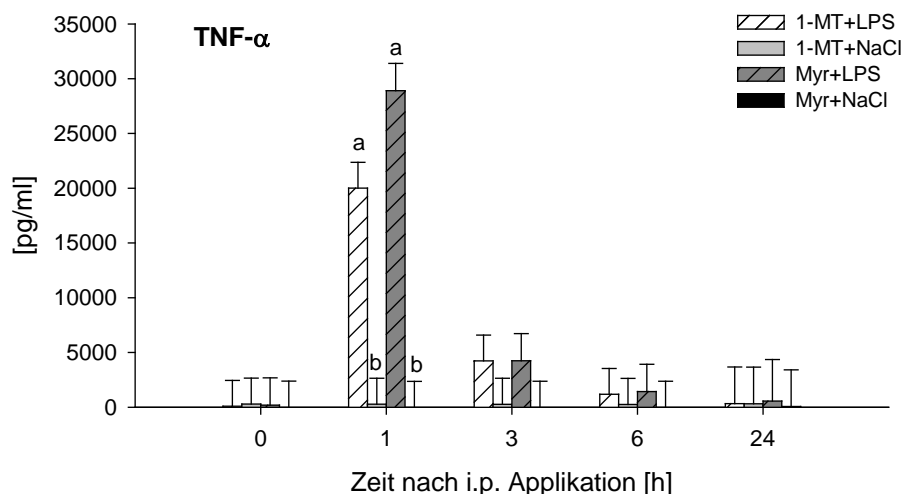


Abb. 3.26 Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von TNF- α im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Entnahmezeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

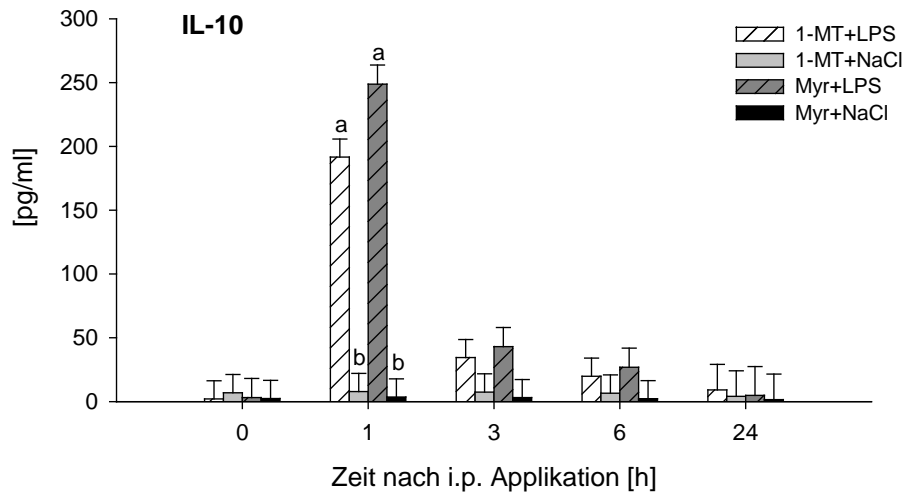


Abb. 3.27 Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von IL-10 im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Entnahmezeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Die Behandlung mit LPS induzierte sowohl bei 1-MT als auch bei Myr-vorbehandelten Tieren nach 1, 3 und 6 h signifikant erhöhte Cortisol-Werte im Vergleich zu den NaCl-behandelten Tieren (**Abb. 3.28**). Die LPS-induzierte Erhöhung von Cortisol unterschied sich zu den Zeitpunkten 1, 3 und 6 h nicht zwischen den 1-MT- und Myr-vorbehandelten Tieren.

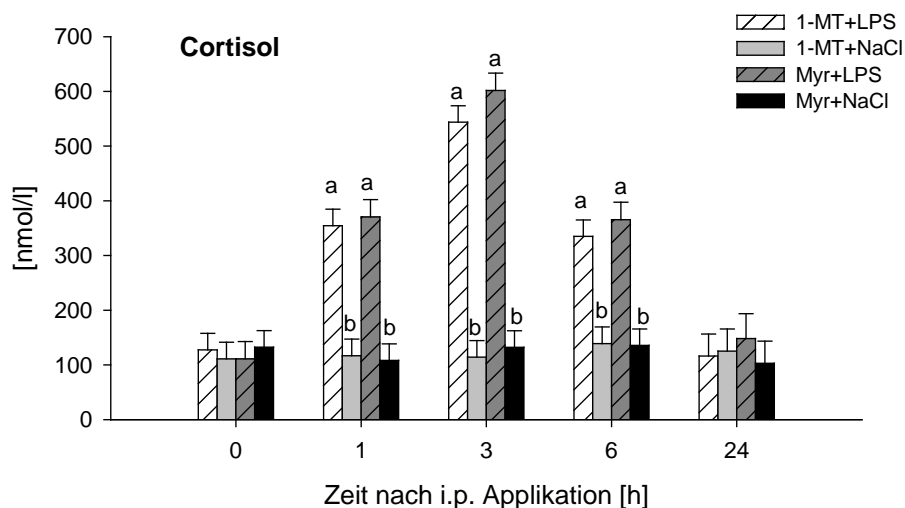


Abb. 3.28 Effekt von 1-MT/Myr auf die Konzentrationen von Cortisol im Plasma vor und nach i.p. LPS- oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung (0, 1, 3, 6 h), $n = 5-6$ pro Behandlung (12, 24 h). Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Zeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.2.5 Einfluss von 1-MT auf Verhalten und LPS-induzierte Krankheits-symptomatik

Es wurde untersucht, ob die Vorbehandlung mit 1-MT Verhaltensänderungen bzw. eine unterschiedliche Ausprägung von LPS-induzierten Krankheitssymptomen verursacht. Dazu wurden in einem Zeitraum von fünf Stunden nach LPS/NaCl-Applikation allgemeine Verhaltensweisen wie Aktivität und das Auftreten spezifischer Symptome sowie die Körpertemperatur erfasst.

Die Gabe von LPS führte über den betrachteten Versuchszeitraum zu einer signifikant erhöhten Hauttemperatur im Vergleich zu den NaCl-behandelten Kontrollen (LPS: $39,34 \pm 0,12^\circ\text{C}$; NaCl: $38,41 \pm 0,12^\circ\text{C}$; $p < 0,001$). Zwischen den vier Behandlungsgruppen gab es innerhalb eines Entnahmezeitpunktes keine signifikanten Unterschiede (nicht dargestellt). Eine Berechnung der Temperaturdifferenzen zum Basalwert ergab jedoch, dass über den gesamten Zeitraum betrachtet der Anstieg der Körpertemperatur bei den 1-MT-LPS-behandelten Tieren signifikant höher als bei den Myr-LPS-behandelten Tieren war (MT-LPS: $1,03 \pm 0,12^\circ\text{C}$; Myr-LPS: $0,55 \pm 0,12^\circ\text{C}$; $p < 0,01$). Dabei war die Differenz 3 h nach LPS bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren signifikant höher, als bei den Myr-vorbehandelten Tieren war (**Abb. 3.29**).

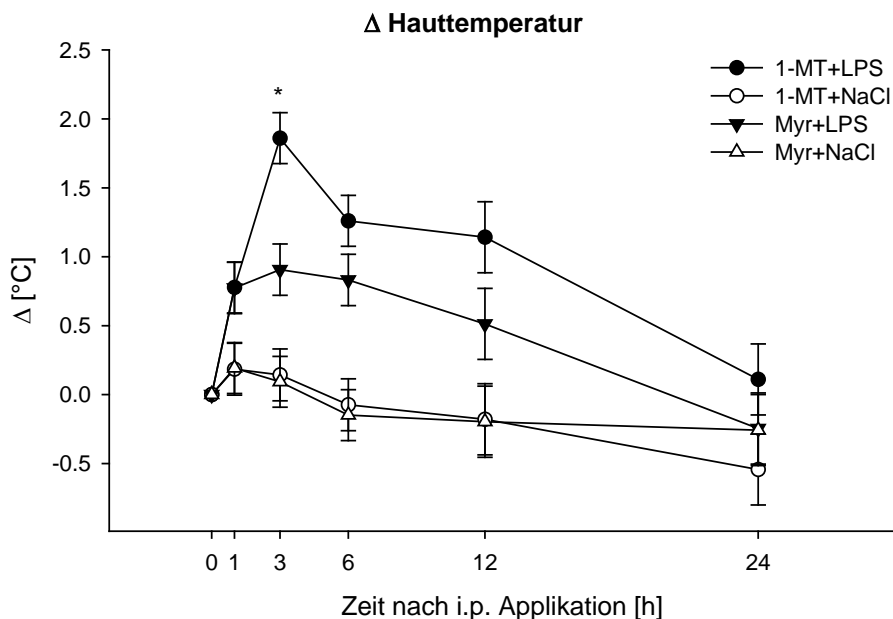


Abb. 3.29 Effekte von 1-MT/Myr auf Änderung (Δ) der Körpertemperatur nach i.p. LPS- bzw. NaCl-Applikation. Δ = Differenz der Hauttemperatur zum Zeitpunkt 0 h. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmezeitpunktes dargestellt: * $p < 0,05$

Für die Aktivität konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen 1-MT+LPS- und Myr+LPS-behandelten Tieren innerhalb der einzelnen Beobachtungszeiträumen festgestellt werden, jedoch waren die 1-MT-vorbehandelten NaCl-Kontrolltiere über die gesamte Beobachtungsdauer signifikant weniger aktiv, als die Myr-vorbehandelten Tiere (1-MT+NaCl: $12,7 \pm 1,3\%$; Myr+NaCl: $21,6 \pm 1,6\%$; $p < 0,001$). Die zeitliche Dynamik der Aktivität aller Behandlungsgruppen ist in **Abb. 3.30A** gezeigt.

LPS induzierte über die gesamte Beobachtungsdauer Krankheitssymptome wie erschwerte Atmung und Zittern, selten Erbrechen. Die Vorbehandlung mit 1-MT hatte jedoch keine signifikante Auswirkung auf das Auftreten von Krankheitssymptomen (relative Häufigkeit) (**Abb. 3.30B**) und auf den Schweregrad (mittlere Anzahl) der Erkrankung (siehe Kapitel 3.29 **Abb. 3.40**).

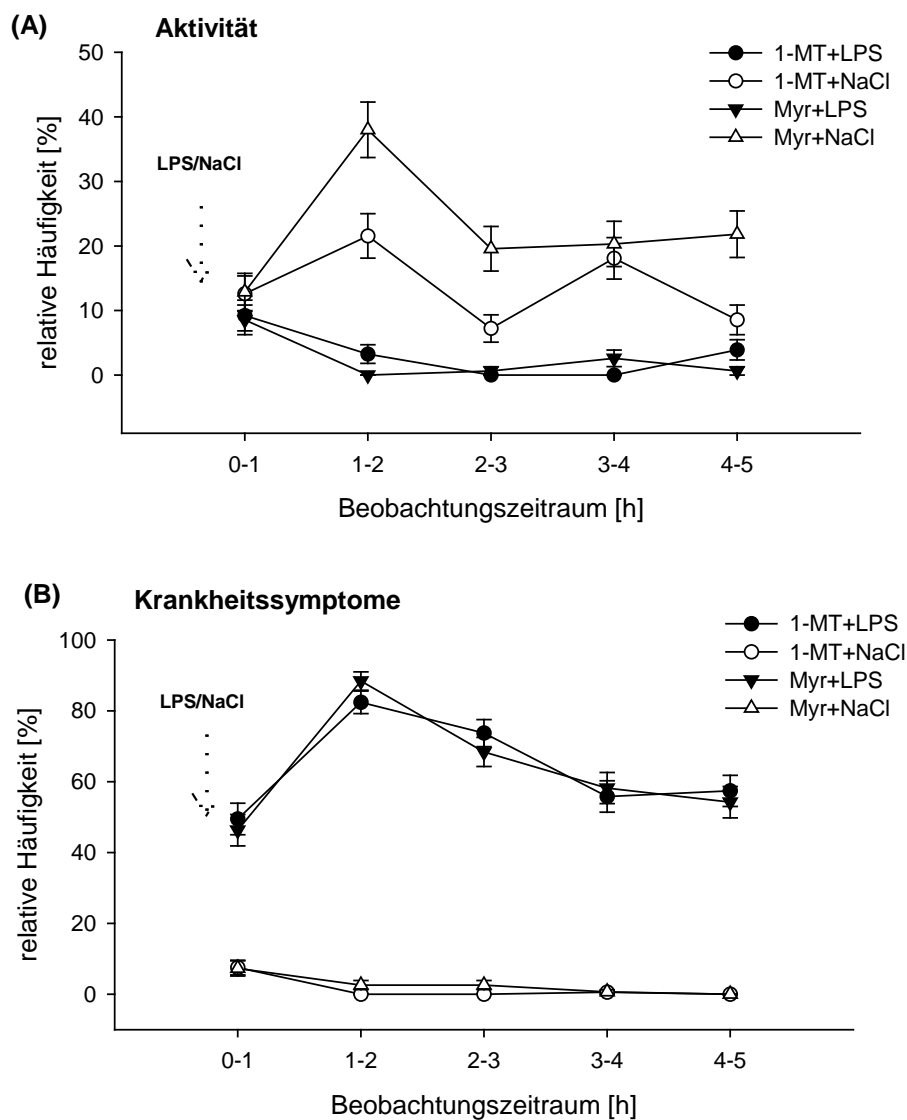


Abb. 3.30 Effekte von 1-MT/Myr auf die Aktivität der Tiere **(A)** und Krankheitssymptome **(B)** nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Aktiv = Gehen oder Beschäftigung; Krankheitssymptome = ein oder mehrere Symptome treten auf. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung.

3.2.6 Einfluss von 1-MT und LPS auf Leukozyten und PBMCs

Die Vorbehandlung mit 1-MT bzw. Myr hatte keinen signifikanten Effekt auf Zahl der Leukozyten. Innerhalb der Gruppe 1-MT+LPS fielen die Leukozyten zum Messzeitpunkt 6 h nach Behandlung signifikant ab und stiegen zum Messzeitpunkt 24 h wieder signifikant an (**Abb. 3.31**). Bei den Myr-vorbehandelten Kontrolltieren konnten keine signifikanten Veränderungen der Leukozytenzahlen durch die LPS-Applikation beobachtet werden. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zeigten die NaCl-behandelten Tiere. Zwischen den Behandlungsgruppen waren die Unterschiede zu den jeweiligen Messzeitpunkten nicht unterschiedlich.

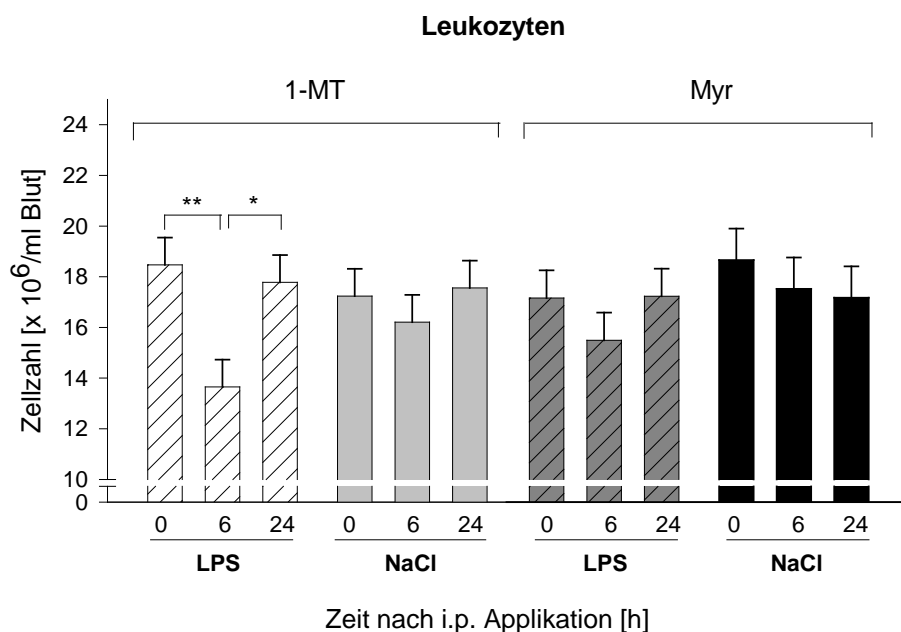


Abb. 3.31 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zahl der Leukozyten nach i.p. LPS- bzw. NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11 – 12 pro Behandlung. ** p < 0,01; * p < 0,05

Die Zahl der PBMCs war sowohl bei den 1-MT- als auch bei den Myr-vorbehandelten Tieren 6 h nach LPS signifikant geringer als bei den NaCl-behandelten Kontrollen (p < 0,001). Bei den LPS-behandelten Tieren war die PBMC-Zahl 6 h nach LPS signifikant niedriger als zum Zeitpunkt 24 h (**Abb. A 5**). Die Vorbehandlung hatte dabei keinen Einfluss auf den LPS induzierten Abfall der PBMCs.

3.2.7 Einfluss von 1-MT und LPS auf die Zellproliferation *in vitro*

Die Vorbehandlung mit 1-MT hatte einen signifikanten bzw. tendenziellen Einfluss auf die zeitliche Dynamik der LPS-NaCl-induzierten Veränderungen des PI durch die Stimulation mit PHA oder SEB (PHA, $p < 0,05$; SEB, $p < 0,1$). Innerhalb der 1-MT-vorbehandelten Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede sowohl beim PHA- als auch beim SEB-induzierten PI (**Abb. 3.32A+B**). Bei den Myr-vorbehandelten Tieren war der PHA- und SEB-stimulierte PI dagegen 6 h nach der i.p. LPS-Applikation signifikant niedriger als bei den NaCl-behandelten Kontrollen. Ebenso war der PI nach PHA und SEB-Stimulation zum Zeitpunkt 6 h signifikant geringer als 24 h nach LPS. Bei den NaCl-behandelten Kontrollen dagegen war der PHA-stimulierte PI nach 6 h signifikant höher als nach 24 h. Tendenziell war dieser Verlauf auch bei dem PI der SEB-stimulierten NaCl-behandelten Tiere zu beobachten.

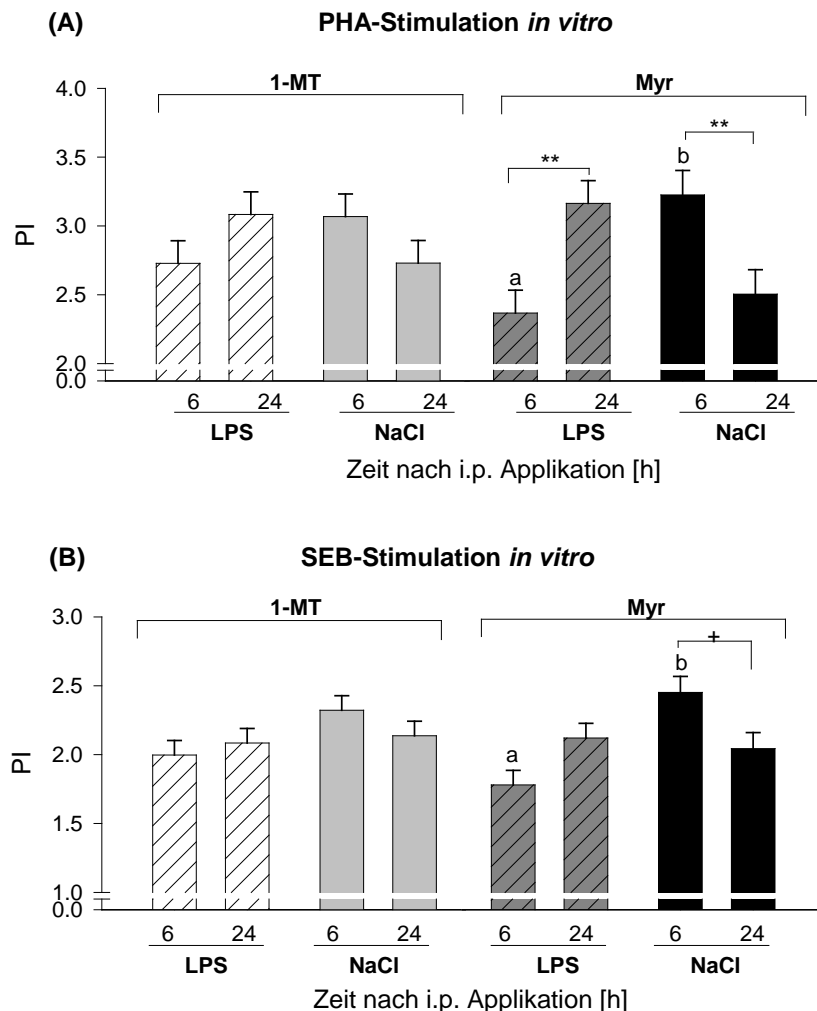


Abb. 3.32 Einfluss von 1-MT/Myr auf den PI von isolierten PBMCs nach PHA-Stimulation (**A**) und SEB-Stimulation (**B**) nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Der PI ergibt sich aus dem Quotient der optischen Dichte von stimulierten und spontanen Kulturansätzen. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung. ** $p < 0,01$, + $p < 0,1$, ^{a,b} $p < 0,05$

3.2.8 Einfluss von 1-MT und LPS auf das Differentialblutbild

Einfluss von 1-MT auf die Verteilung spezifischer Immunzellen

Die Vorbehandlung mit 1-MT hatte unabhängig von der Behandlung mit LPS oder NaCl einen Einfluss auf das Vorkommen spezifischer Immunzellen im Blut. Die 1-MT behandelten Tieren hatten über die Zeitpunkte 0, 6 und 24 h durchschnittlich eine signifikant höhere Zahl an Lymphozyten und signifikant niedrigere Zahl an neutrophilen Granulozyten. (**Tab. 3.3**). Dabei waren bei den Neutrophilen sowohl die unreifen Myelozyten und Stabkernigen als auch die reifen segmentkernigen Granulozyten signifikant niedriger als bei den Myr-vorbehandelten Tieren.

Tab. 3.3 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahlen von Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten im Untersuchungszeitraum von 0 bis 24 h nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. n = 23-24 pro Behandlung. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE der Entnahmezeitpunkte 0, 6 und 24 h.

Zelltyp	1-MT	Myr	p-Wert
Lymphozyten [x 10 ⁶ /ml]	8,33 \pm 0,58	7,11 \pm 0,60	< 0,01
Neutrophile Granulozyten [x 10 ⁶ /ml]	7,07 \pm 0,36	9,16 \pm 0,37	< 0,01
▪ Myelozyten	0,003 \pm 0,01	0,006 \pm 0,01	< 0,05
▪ Stabkernige	1,10 \pm 0,14	1,65 \pm 0,14	< 0,01
▪ Segmentkernige	6,54 \pm 0,27	7,34 \pm 0,28	< 0,05

Einfluss von 1-MT auf LPS-induzierte Veränderungen im Differentialblutbild

Die Behandlung mit LPS hatte im untersuchten Zeitraum einen signifikanten Effekt auf die Zellzahlen von Basophilen, Eosinophilen, Neutrophilen, Monozyten und der Lymphozyten unabhängig von der Vorbehandlung (**Tab. 3.4**).

Tab. 3.4 Effekt der LPS-Behandlung auf die Zahl spezifischer Immunzellen

Zelltyp	Behandlung*Zeit	Zellzahl nach LPS
Basophile	p < 0,001	↓
Eosinophile	p < 0,01	↓
Neutrophile	p < 0,01	↑
Lymphozyten	p < 0,001	↓
Monozyten	p < 0,01	↓

Bei einigen Zelltypen unterschied sich der LPS-induzierte Effekt jedoch in Abhängigkeit der Vorbehandlung. Bei den Myr-behandelten Kontrolltieren bewirkte LPS nach 6 h

eine signifikant erhöhte Zahl von neutrophilen Granulozyten und eine signifikant niedrigere Zahl von Lymphozyten im Vergleich zu den Zeiten 0 und 24 h (**Abb. 3.33A**). Die 1-MT-behandelten Tiere zeigten 6 h nach LPS ebenfalls signifikant verminderte Lymphozyten-Zahlen, jedoch keinen signifikanten Anstieg der neutrophilen Granulozyten (**Abb. 3.33B**).

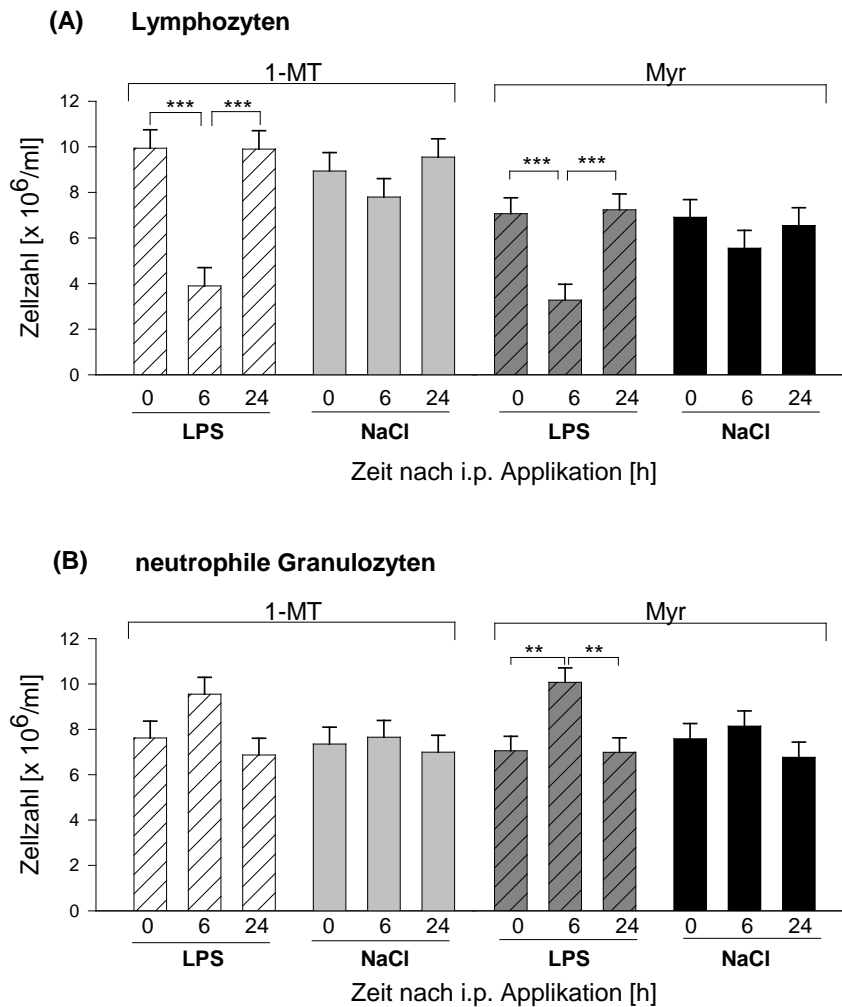


Abb. 3.33 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahl von Lymphozyten **(A)** und neutrophilen Granulozyten **(B)** nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung, *** p < 0,001; ** p < 0,01

Der verminderte LPS-induzierte Anstieg der Neutrophilen innerhalb der 1-MT-vorbehandelten Tiere beruhte vor allem auf dem signifikant niedrigeren LPS-induzierten Anstieg der unreifen Neutrophilen, das heißt den Myelozyten und stabkernigen Neutrophilen zum Zeitpunkt 6 h (**Abb. 3.34A+B**).

Bei den reifen Zellen, den segmentkernigen Neutrophilen zeigten sich dagegen keine Unterschiede in der LPS-induzierten Änderung in Abhängigkeit von der Vorbehandlung 1-MT/Myr (**Abb. 3.34C**).

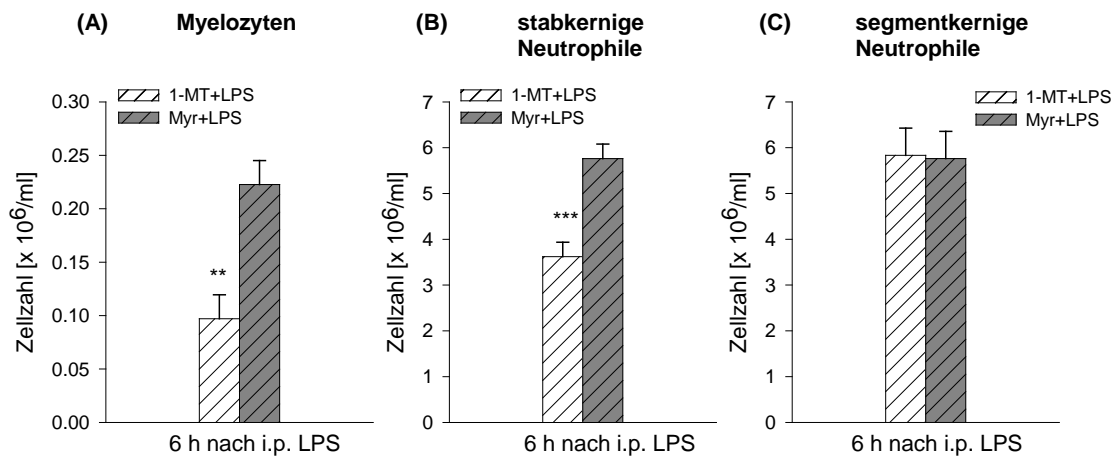


Abb. 3.34 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zellzahl von Myelozyten **(A)**, stabkernigen Neutrophilen **(B)** und segmentkernigen Neutrophilen **(C)** 6 h nach i.p. LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

Die LPS-induzierte Veränderung der Neutrophilen und Lymphozyten führte unabhängig von der Vorbehandlung mit 1-MT/Myr zu einer signifikanten Erhöhung des N/L-Verhältnisses 6 h nach LPS verglichen mit den NaCl-behandelten Kontrolltieren (**Abb. 3.35**). Jedoch war diese Erhöhung bei den 1-MT-LPS-behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den Myr+LPS-behandelten Tieren.

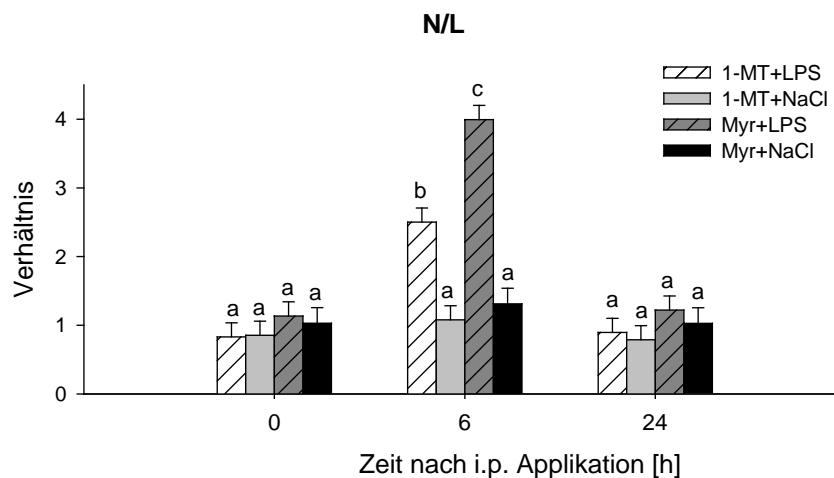


Abb. 3.35 Einfluss von 1-MT/Myr auf das N/L-Verhältnis nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung. Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.2.9 Einfluss von 1-MT auf die Ausbildung einer LPS-Toleranz

Die LPS-Toleranz ist durch eine verminderte Immunreaktion nach einem wiederholten LPS-Challenge gekennzeichnet. Es wurde geprüft, ob die wiederholte s.c. Applikation von 1-MT einen Einfluss auf die Ausbildung einer LPS-Toleranz nach einmaliger i.p. LPS-Applikation hatte. Der Zustand der Toleranz wurde durch eine zweite LPS-Gabe charakterisiert.

Einfluss von 1-MT auf Zytokine und Cortisol im Plasma

Die zweite Applikation von LPS induzierte bei keiner Behandlungsgruppe einen signifikanten Anstieg des Zytokins TNF- α im Plasma (**Abb. 3.36**). Dagegen hatten die 1-MT/Myr+NaCl+LPS-behandelten Tiere signifikant höhere TNF- α -Konzentrationen 1 h nach LPS (25 h) als Tiere die bereits die zweite LPS-Applikation erhielten. Die LPS-induzierte Erhöhung der TNF- α -Konzentrationen von 1-MT-vorbehandelten Tieren war signifikant niedriger als bei den Myr-vorbehandelten Tieren.

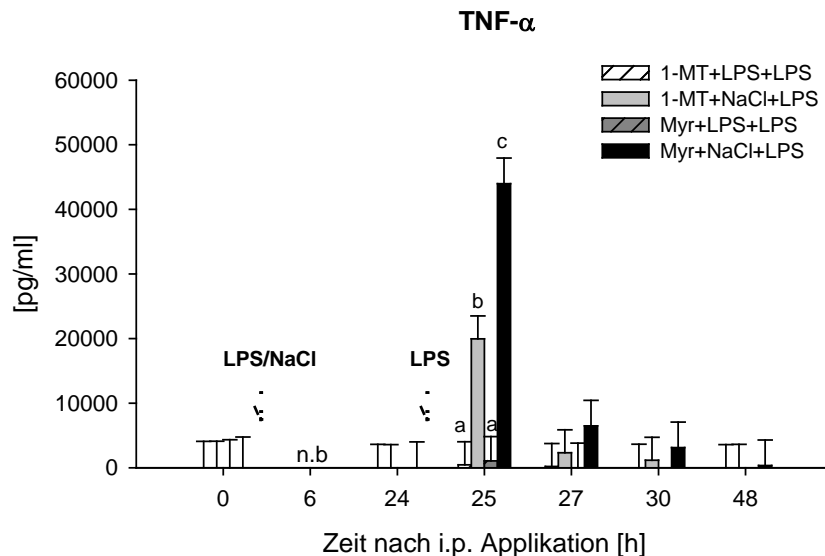


Abb. 3.36 Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von TNF- α nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung. Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Zeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Die zweite Applikation von LPS induzierte bei keiner Behandlungsgruppe einen signifikanten Anstieg des Zytokins IL-10 im Plasma (**Abb. 3.37**). Die Tiere, die zum ersten Mal LPS appliziert bekamen, (1-MT/Myr+NaCl+LPS) hatten 1 h nach LPS signifikant erhöhte IL-10-Konzentrationen (Entnahmezeitpunkt 25 h). Die LPS-induzierte Erhöhung von IL-10 war bei den 1-MT+NaCl+LPS-behandelten Tieren signifikant niedriger als bei den Myr+NaCl+LPS-behandelten Tieren.

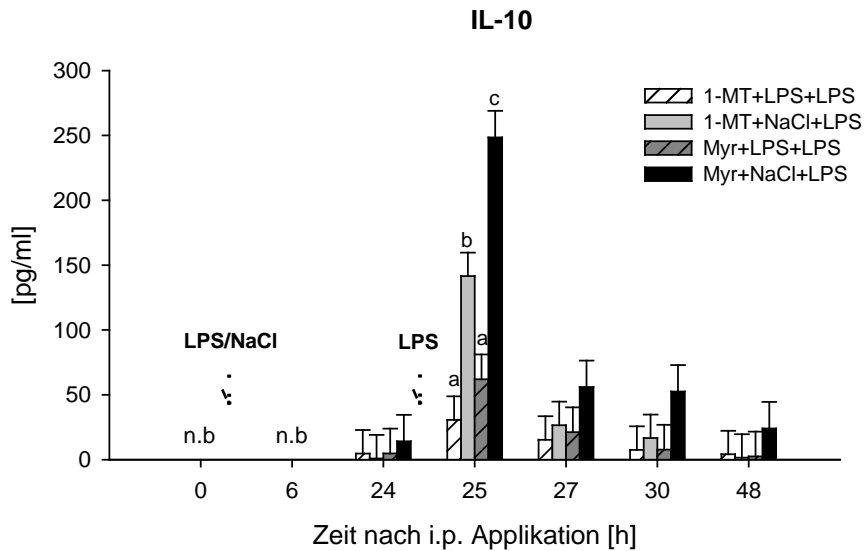


Abb. 3.37 Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von IL-10 nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung. Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Zeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Die erste LPS-Applikation induzierte bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren, nicht jedoch bei den Myr-vorbehandelten Tieren 6 h nach Applikation signifikant erhöhte Cortisol-Werte gegenüber den NaCl-behandelten Tieren (**Abb. 3.38**).

Die LPS+LPS-behandelten Tiere zeigten nach der zweiten LPS-Applikation keinen Anstieg der Cortisol-Konzentrationen im Plasma. Die NaCl-LPS-behandelten Tiere zeigten einen Anstieg der Cortisol-Konzentrationen, welcher in beiden Gruppen (1-MT/Myr) zum Zeitpunkt 27 h nach i.p. NaCl-Applikation signifikant gegenüber den LPS+LPS-Tieren war. Zum Zeitpunkt 30 h waren die Cortisol-Konzentrationen der NaCl+LPS-Gruppen gegenüber den LPS+LPS-behandelten Gruppen noch signifikant erhöht. Die Vorbehandlung mit 1-MT oder Myr hatte zu keinem Entnahmezeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die LPS-induzierte Erhöhung der Cortisol-Konzentrationen im Plasma.

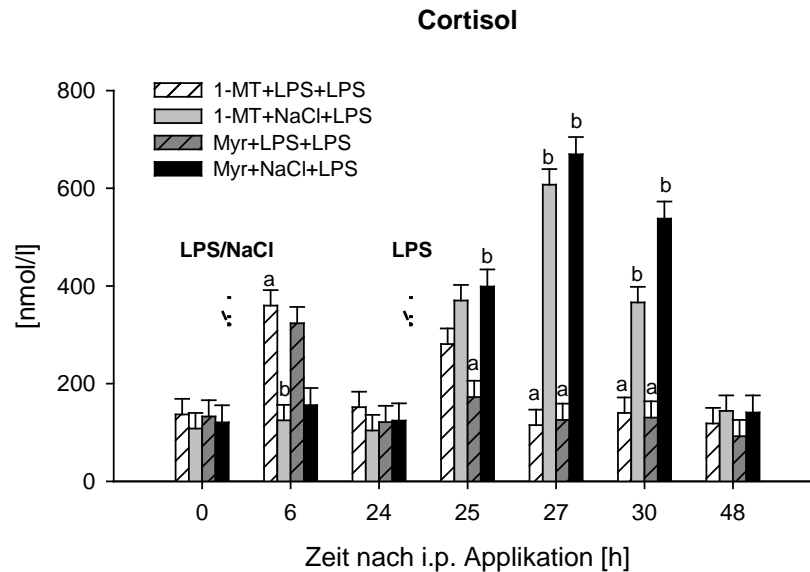


Abb. 3.38 Einfluss von 1-MT/Myr auf Plasma-Konzentration von Cortisol nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. $n = 11-12$ pro Behandlung. Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Zeitpunktes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Einfluss von 1-MT auf Kyn im Plasma

Als Indikator derIDO-Aktivierung wurden die Kyn-Konzentrationen im Plasma untersucht. Die Vorbehandlung mit 1-MT verursachte über den gesamten Entnahmezeitraum signifikant niedrigere Kyn-Konzentrationen verglichen mit den Myr-vorbehandelten Tieren (1-MT: $5,92 \pm 0,24 \mu\text{M}$, Myr: $6,67 \pm 0,25 \mu\text{M}$, $p < 0,001$). Zum Zeitpunkt der ersten LPS/NaCl-Applikation (0 h) war die Kyn-Konzentration bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren signifikant niedriger im Vergleich zur Myr-vorbehandelten Gruppe (1-MT: $5,50 \pm 0,31 \mu\text{M}$, Myr: $7,20 \pm 0,34 \mu\text{M}$, $p < 0,01$). Die Tiere, die zum Zeitpunkt 0 h LPS appliziert bekamen, zeigten einen LPS-induzierten signifikanten Anstieg der Kyn-Konzentrationen (**Abb. 3.39**). Zum Zeitpunkt 6 h nach LPS unterschieden sich Kyn-Konzentrationen der Gruppen 1-MT+LPS+LPS und Myr+LPS+LPS signifikant ($p < 0,01$). Die zweite LPS-Gabe verursachte sowohl bei den 1-MT- als auch bei den Myr-vorbehandelten Tieren keinen erneuten Anstieg der Kyn-Konzentrationen im Plasma. Die Kontrolltiere der Gruppe Myr+NaCl+LPS zeigten zum Zeitpunkt 30 h signifikant höhere Kyn-Konzentrationen als unmittelbar vor der LPS-Applikation (24 h), wogegen dies in der 1-MT+NaCl+LPS-Gruppe nicht der Fall war.

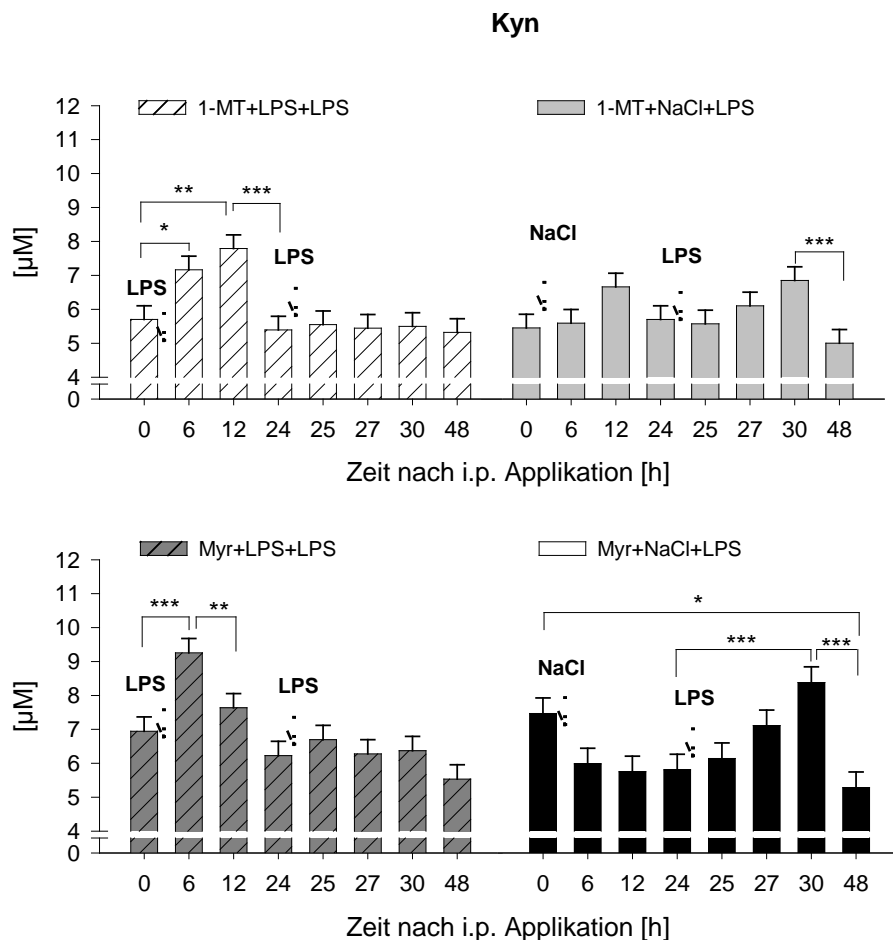


Abb. 3.39 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Plasmakonzentration von Kyn nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung. *** p < 0,001; ** p < 0,01; * p < 0,05

Einfluss von 1-MT auf das Auftreten von Krankheitssymptomen

Nach dem LPS-Challenge am Tag 2 des Versuchs zeigten alle Tiere Krankheitssymptome. Die Vorbehandlung mit 1-MT/Myr hatte keinen signifikanten Einfluss auf die relative Häufigkeit kranker Tiere, bei denen ein oder mehrere Krankheitssymptome auftraten. Die Tiere, die zum zweiten Mal LPS-appliziert bekamen, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 bis 29 h signifikant weniger häufig Krankheitssymptome als die Kontrolltiere, die erstmals LPS appliziert bekamen (LPS+LPS: $0,47 \pm 0,02$; NaCl+LPS: $0,83 \pm 0,02$; p < 0,001). Anders als im Zeitraum von 0-5 h nach LPS/NaCl hatte die Vorbehandlung mit 1-MT/Myr im Beobachtungszeitraum von 24-29 h einen signifikanten Einfluss auf den Schweregrad der Erkrankung der NaCl+LPS behandelten Kontrolltiere (**Abb. 3.40**). Dabei war die Ausprägung des Schweregrades bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren signifikant geringer als bei den Myr-vorbehandelten Tieren.

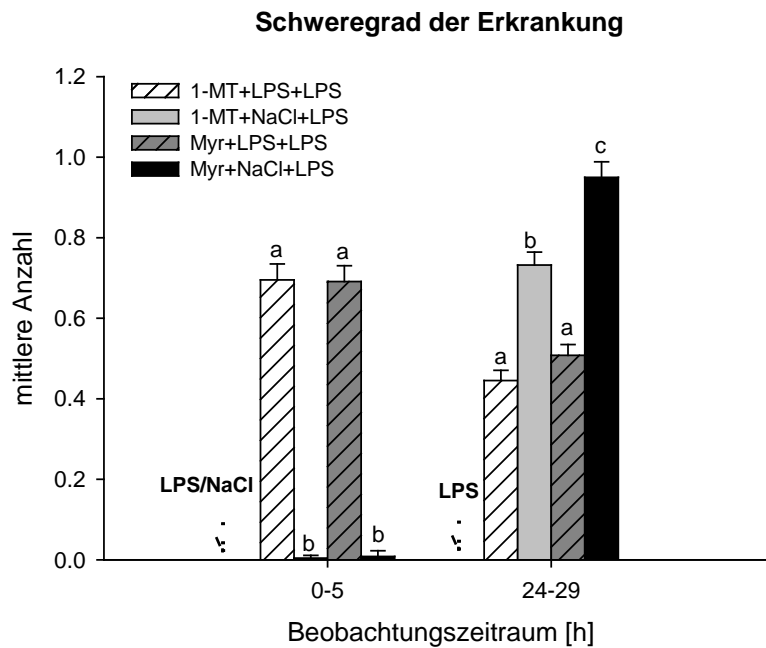


Abb. 3.40 Einfluss von 1-MT/Myr auf den Schweregrad der Erkrankung nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE über die Beobachtungszeiträume 0-5 und 24-29 h. n = 11-12 pro Behandlung. Signifikante paarweise Vergleiche ($p < 0,05$) innerhalb eines Beobachtungszeitraumes sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Ein Vergleich der gemessenen Hauttemperaturen zeigte, dass 1-MT-vorbehandelte Tiere im Zeitraum von 24 bis 48 h nach LPS/NaCl eine durchschnittlich höhere Temperatur von $0,43 \pm 0,18^\circ\text{C}$ aufwiesen, als die Myr-vorbehandelten Tiere ($p < 0,05$). Die Applikation von LPS zum Zeitpunkt 24 h führte bei allen Tieren zu einer Erhöhung der Hauttemperatur 27 h nach LPS (24 h: $38,45 \pm 0,17^\circ\text{C}$; 27 h: $39,23 \pm 0,17^\circ\text{C}$, $p < 0,001$). Der Verlauf der gemessenen Hauttemperaturen aller Behandlungsgruppen im Zeitraum von 0 - 48 h nach LPS/NaCl-Applikation ist in **Abb. A 6** gezeigt.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung LPS-induzierter Effekte

Die i.p. Applikation von LPS diente als Modell zur inflammatorischen Stimulation. Sie führte zu einem Anstieg pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Plasma und zur Aktivierung der HPA-Achse. Die Verringerung der Plasma-Konzentrationen von Trp bei gleichzeitiger Konzentrationserhöhung der Metaboliten Kyn, Kyna und Quin belegen eine Aktivierung des Trp-Abbaus über den Kynurenin-Weg durch die LPS-Applikation. Die LPS-Applikation induzierte die Expression desIDO-Proteins in Blutzellen und in den peripheren Geweben Leber und Lunge, was ebenfalls auf eine Aktivierung des Kynurenin-Wegs hinweist. Das LPS-induzierte Auftreten von Krankheitssymptomen verbunden mit einer verminderten Aktivität der Tiere ist ein Ausdruck von „Sickness Behaviour“. Weitere Ergebnisse belegen, dass die LPS-Applikation eine Modulation der Immunantwort verursachte. Auf struktureller Ebene zeigte sich eine veränderte Zahl von Leukozyten und PBMCs. Funktionale Veränderungen waren die Verminderung der Zytokin-Induzierbarkeit *ex vivo* und eine erhöhte Zellproliferation *in vitro* nach zusätzlicher Stimulation mit SEB oder PHA. Die Applikation von LPS führte zur Ausbildung einer LPS-Toleranz, welche sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* nachgewiesen werden konnte. Eine zweite LPS-Applikation führte nicht zur erneuten Aktivierung von inflammatorischen Zytokinen, der HPA-Achse, des Kynureninwegs und der IDO-Proteinexpression. Die nachgewiesenen funktionalen Veränderungen sind Hinweise für die Ausprägung einer Immunsuppression durch die *in vivo* LPS-Applikation.

4.1.1 LPS als Modell zur inflammatorischen Stimulation

Induktion inflammatorischer Zytokine und Aktivierung der HPA-Achse

Frühere Studien an Schweinen haben gezeigt, dass die Applikation von LPS *in vivo* zu einem Anstieg der Konzentrationen des proinflammatorischen TNF- α und des antiinflammatorischen IL-10 im Plasma führt (Webel et al., 1997; Li et al., 2006; Lipcsey et al., 2008). Die Daten der vorliegenden Arbeit beim Schwein zeigen, dass sowohl TNF- α als auch IL-10 1 h nach LPS signifikant erhöht waren. Zu den späteren Messzeitpunkten war bei beiden Zytokinen keine signifikante Erhöhung mehr nachweisbar. Es wurde lange angenommen, dass IL-10 erst 24 – 48 h nach einem inflammatorischen Stimulus gebildet wird (de Waal et al., 1991) und somit eine andere zeitliche Dynamik aufweist als proinflammatorische Zytokine. Jedoch konnten Li et al. (2006) bereits 3 h Stunden nach einer i.p. LPS-Applikation beim Schwein erhöhte IL-10-Konzentrationen nachweisen. Auch Studien an Mäusen bestätigen eine frühe

IL-10-Ausschüttung, da bereits 1 h nach i.p. LPS signifikant erhöhte IL-10-Konzentrationen im Plasma gemessen wurden (Jung et al., 2009). Es wird angenommen, dass IL-10 vor allem immunsuppressive Funktionen, wie die Blockade der Proteinsynthese und der Antigen-Präsentationen, vermittelt, welche ein Überschießen der Immunantwort nach einem inflammatorischen Stimulus verhindern (Asadullah et al., 2003). In Studien an humanem und murinem IL-10 konnte aber gezeigt werden, dass IL-10 auch immunstimulatorische Effekte auf B-Lymphozyten und auf die Differenzierung zytotoxischer T-Zellen haben kann (Linsay & Hodgson, 2001). Die hier gemessene frühe Ausschüttung von IL-10 im Schwein unterstützt daher die Theorie, dass IL-10 *in vivo* möglicherweise nicht nur immunsuppressiv wirkt, sondern auch regulatorische Funktionen innerhalb der Immunantwort erfüllt.

Die Ausschüttung von Zytokinen im Plasma kann eine Induktion der Zytokinproduktion im Gehirn bewirken (Gutierrez et al., 1993; Pavlov et al., 2003; Rosas-Ballina & Tracey, 2009). Daher wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von LPS auf die Zytokin-Konzentration im Gehirn untersucht. Es konnte jedoch weder 6 noch 24 h nach LPS eine gesteigerte Konzentration von TNF- α im Hippocampus bzw. im PFC nachgewiesen werden. Studien an Mäusen haben gezeigt, dass die periphere Applikation von LPS zur mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine im Gehirn führt, was wiederum die Grundlage für eine gesteigerte Zytokin-Induktion darstellt (Layé et al., 1994; Breder et al., 1994). Die Expression von mRNA korreliert aber nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression, so dass in diesen Studien offen bleibt, ob auch die Konzentrationen der Zytokine im Hirngewebe erhöht waren. Neben TNF- α wurde am Schwein erstmals auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 im Gehirn untersucht, welches ebenfalls keine signifikanten LPS-induzierten Veränderungen zeigte. Da die zeitliche Dynamik der Zytokinantwort nach peripherer LPS-Applikation beim Schwein noch ungeklärt ist, waren die gewählten Entnahmezeitpunkte für den Nachweis eines LPS-induzierten Anstiegs der Konzentrationen von TNF- α und IL-10 im Gehirn möglicherweise nicht geeignet. Ebenfalls wäre denkbar, dass die einmalige periphere Applikation keinen Anstieg der Zytokine im Gehirn verursachte. Im Rattenhirn wurden erhöhte TNF- α -Konzentrationen im Cortex bzw. im Hippocampus bei entzündlichen Prozessen innerhalb des Gehirns als Folge einer Enzephalitis nachgewiesen (Srivastava et al., 2011), oder aber 3 h nach einer traumatischen Hirnverletzung (Atkins et al., 2007).

Frühere Studien haben belegt, dass die LPS-induzierte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zur Stimulation der HPA-Achse führt, was mit einer Erhöhung der Cortisol-Konzentrationen im Plasma verbunden ist (Beishuizen & Thijs, 2003). Die Aktivierung der HPA-Achse kann wiederum einen Einfluss auf die

Ausprägung LPS-induzierter Effekte wie Fieber (Coelho, 1992) oder die Ausprägung von Sickness-Behaviour haben (Konsman et al., 2002). Im Schwein führte die i.p. Applikation von LPS zu einem Anstieg des Plasma-Cortisols mit einer maximalen Auslenkung zwischen 2 und 4 h nach dem Challenge (Wright et al., 2000; Webel et al., 1997; Warren et al., 1996). Die eingesetzte Dosis und der genutzte LPS-Serotyp hatten dabei einen Einfluss auf die Auslenkung und die zeitliche Dynamik der Cortisol-Antwort.

Die hier gefundenen Ergebnisse bestätigen, dass LPS einen signifikanten Anstieg von Cortisol im Plasma induziert, wobei 3 h nach dem Challenge die maximale Konzentration erreicht wurde. Der versuchsbedingte Futterentzug in den ersten sechs Stunden nach der i.p.-Applikation hatte bei den NaCl-behandelten Tieren keinen signifikanten Effekt auf die Cortisol-Konzentrationen, so dass Futterstress als Ursache für den Cortisol-Anstieg ausgeschlossen werden kann. Auch die verminderte Futteraufnahme als Folge der LPS-Behandlung wurde in einem zusätzlichen Versuch mit restriktiv und adäquat gefütterten Tieren getestet und verursachte dort keinen signifikanten Cortisol-Anstieg.

IDO-Aktivierung

Beim Schwein gibt es bereits Hinweise, dass IDO durch die Gabe von Freund's Adjuvans aktiviert wird (Melchior et al., 2003). Als Marker diente dabei ein erhöhter Verbrauch von Plasma-Trp während einer induzierten Entzündungsreaktion. Es wurden aber keine veränderten Kyn-Konzentrationen im Plasma als Nachweis für die IDO-Aktivierung gefunden. Jedoch konnten im Rahmen weiterer Untersuchungen erhöhte Konzentrationen von Kyn in der Lunge und anderen peripheren Organen nachgewiesen werden (Melchior et al., 2005; Le Floc'h et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals beim Schwein die IDO-Aktivierung *in vivo* durch i.p. LPS untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die LPS-Applikation sowohl einen Verbrauch von Trp als auch einen Anstieg von Kyn im Plasma induzierte. Daraus resultierte ein signifikanter Anstieg des Kyn/Trp-Verhältnisses, das häufig als prognostischer Indikator bei Tumor-Erkrankungen bzw. bei Sepsis- und Trauma-Patienten eingesetzt wird (Changsirivathanathamrong et al., 2011; de Jong et al., 2011). Der Vergleich von restriktiv und adäquat gefütterten Tieren zeigte, dass die verminderte Futteraufnahme innerhalb eines Tages nicht zu signifikant verminderten Trp-Konzentrationen führt. Zudem löste die Futterrestriktion keinen Anstieg von Kyn aus, sondern führte sogar zu verminderten Kyn-Konzentrationen gegenüber adäquat gefütterten Tieren zum Zeitpunkt 24 h. Die Daten bestätigen die Annahme, dass der Trp-Verbrauch und der Anstieg von Kyn 6 h nach der LPS-Applikation nicht durch

verminderte Nahrungsaufnahme, sondern durch LPS induziert wurde. Die verminderte Futteraufnahme der LPS-behandelten Tiere könnte jedoch ein Grund dafür sein, dass die Trp-Konzentrationen auch 24 h nach LPS noch im Vergleich zu den Kontrolltieren vermindert blieben, da im Zeitraum von 6 bis 24 h nach LPS wenig oder kein Trp über die Nahrung aufgenommen wurde.

Die LPS-Applikation führte in der vorliegenden Studie zur Bildung der spezifischen Trp-Metaboliten Kyna und Quin. Damit wurde erstmals eine LPS-induzierte Erhöhung dieser Trp-Metaboliten beim Schwein nachgewiesen. Zuvor wurde Kyna beim Schwein nur in der Galle und im Pankreassaft gemessen, wobei die Konzentrationen in etwa den hier gemessenen Basalwerten im Plasma entsprachen (Paluszkiewicz et al., 2009). Im Serum von Rennmäusen konnte durch die i.p. Applikation von LPS allein keine Erhöhung der Plasma-Quin-Konzentrationen induziert werden, jedoch durch die Applikation von LPS und Galaktosamin. Die Erhöhung der Quin-Konzentrationen zeigte dabei die gleiche zeitliche Dynamik wie Kyn (Ohashi et al., 2004). Auch in der hier vorliegenden Studie waren die Quin-Konzentrationen zum Zeitpunkt der höchsten Kyn-Auslenkung maximal. Als besonders starke Produzenten von Quin gelten aktivierte Monozyten (Moffett & Namboodiri, 2003), was die erhöhten Konzentrationen im Blutplasma erklärt. Mit einer ähnlichen zeitlichen Dynamik wie Kyn waren auch die Konzentrationen von Kyna nach LPS erhöht. Der Abbau von Trp zu Kyna findet aufgrund seiner neuroprotektiven Eigenschaften verstärkt im ZNS statt (Moffett & Namboodiri, 2003), kann jedoch auch in Makrophagen generiert werden (Moroni et al., 2012).

Durch den erhöhten Verbrauch von Trp im Rahmen inflammatorischer Prozesse kann ein Mangel an 5-HT entstehen, der wiederum Auswirkungen auf das Verhalten haben kann (Ruddik et al., 2006). Studien an Ratten haben bereits gezeigt, dass die 5-HT-Konzentrationen nach einem i.p. LPS-Challenge im Gehirn anstiegen, während gleichzeitig die Aktivität der Tiere stark eingeschränkt war (Linthorst et al., 1996). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie zeigen ebenfalls, dass LPS eine Erhöhung von 5-HT im Plasma gegenüber den Kochsalz-behandelten Tieren induzierte. 5-HT fiel anschließend jedoch ab, so dass die LPS-behandelten Tiere 24 h nach der Behandlung signifikant niedrigere 5-HT-Konzentrationen als vor der LPS-Applikation aufwiesen. Zwischen den Behandlungsgruppen unterschieden sich die Konzentrationen 24 h nach LPS/NaCl nicht signifikant. Ob der Abfall von 5-HT innerhalb der LPS-behandelten Tiere unmittelbar mit der Aktivierung des Kynurenin-Wegs zusammenhängt, konnte in dieser Studie nicht geklärt werden. Möglicherweise eignet sich ein Modell mit einer chronischenIDO-Aktivierung zur Prüfung dieser Frage.

Die Konvertierung von Trp zu Kyn kann sowohl von TDO (Kotake & Masayama, 1936) als auch vonIDO (Higuchi & Hayaishi, 1967) generiert werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass LPS sowohl die Ausschüttung von TNF- α als auch von Cortisol induziert, wodurch sowohl TDO als auch IDO induziert werden können. Um zu prüfen, ob LPS IDO induziert hat, wurde daher die IDO-Proteinexpression im Blut und im Gewebe untersucht. Derzeit liegen keine Untersuchungen über die IDO-Proteinexpression beim Schwein vor. Es ist jedoch bekannt, dass die humane IDO cDNA für ein Protein mit einem MG von ca. 45 kDa kodiert (King & Thomas, 2007). Die Expression eines IDO-Proteins mit einem MG von 45 kDa wurde auch in der Plazenta der Maus detektiert (Suzuki et al., 2001). Eine besonders hohe IDO-Aktivität wurde für die Lunge beschrieben (González et al., 2008). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine LPS-induzierte IDO-Proteinexpression sowohl im Blut als auch im Gewebe nachgewiesen werden konnte. Im Plasma zeigte sich 3 und 6 h nach LPS eine Bande mit ca. 42 kDa, was mit den Zeiten der erhöhten Kynurenin-Konzentrationen im Plasma übereinstimmt. Die Proteinexpression 6 h nach LPS zeigte sich besonders deutlich durch den *ex vivo* Nachweis, bei dem das Blut 6 h nach i.p. LPS entnommen und anschließend ohne weitere Stimulation (spontaner Ansatz) für 24 h kultiviert wurde. Möglicherweise eignet sich diese Methodik besser zum Nachweis der Proteinexpression, da das Protein nicht so schnell degradiert wird wie *in vivo*. Weiterhin zeigte sich, dass 24 h nach LPS keine induzierte Proteinexpression detektiert werden konnte, was ebenfalls mit der zeitlichen Dynamik der Kyn-Konzentrationen im Plasma übereinstimmt. Zusätzlich zum Blut wurde die Proteinexpression auch in peripheren Geweben und verschiedenen Hirnarealen untersucht. Als Kontrolle wurde der Muskel gewählt, bei dem bisher keine Veränderung der IDO-Proteinexpression durch LPS beschrieben wurde. LPS induzierte in der Leber und in der Lunge eine Bande, deren MG mit ~34 kDa jedoch geringer war als das IDO-Protein im Blut mit ~42 kDa. Dies unterstützt die Ergebnisse früherer Studien, in denen eine gewebsspezifische IDO-Expression beschrieben wurde (González et al., 2008). Die Lunge zeigte erwartungsgemäß eine starke IDO-Proteinexpression. Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die IDO-Aktivierung besonders in der Lunge eine zentrale Bedeutung als antimikrobieller und immunregulatorischer Effektor-mechanismus besitzt, da dieses Organ besonders häufig mit Erregern aus der Atemluft in Kontakt kommt (Heseler et al., 2008; Fujigaki et al., 2003). Der antimikrobielle Effekt der IDO-Aktivierung ist dabei auf den IDO-induzierten Trp-Mangel zurückzuführen, der das Wachstum von Erregern beeinträchtigt. Es wurde lange angenommen, dass der Trp-Abbau in der Leber hauptsächlich durch TDO und nicht durch IDO katalysiert wird (Taylor & Feng, 1991; Thomas & Stoker, 1999), jedoch konnten neuere Studien

zeigen, dass während einer Entzündung der Leber auch eine erhöhte Expression der IDO mRNA erfolgt, was auf eine IDO-Aktivierung hindeutet (Larrea et al., 2007).

In den für die vorliegende Arbeit untersuchten Hirnarealen konnte keine IDO-Proteinexpression nachgewiesen werden. Die ausbleibende LPS-induzierte Proteinexpression im Hippocampus und PFC sowie die unveränderten Zytokin-Konzentrationen von IL-10 und TNF- α deuten darauf hin, dass die i.p. LPS Applikation keine IDO-Aktivierung im Gehirn induziert hat. Möglicherweise wird IDO im Gehirn hauptsächlich durch lokale Infektionen oder im Rahmen neurologischer Erkrankungen induziert. So konnten Studien an Mäusen nachweisen, dass die intracerebroventriculare Applikation von LPS einen Anstieg der Expression von IDO mRNA im Hippocampus verursachte (Fu et al., 2010).

Neben der LPS-induzierten IDO-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit auch eine konstitutiv exprimierte Proteinexpression sowohl im Blut als auch in der Leber gefunden. Auch in humanen eosinophilen Granulozyten konnten Odemuyiwa et al. (2004) eine konstitutive (~45 kDa) und eine IFN- γ induzierbare Form (~42 kDa) nachweisen. Andere Studien zeigten eine konstitutive Genexpression von IDO in Geweben mit einer großen mukosalen Oberfläche wie der Lunge oder dem Gastrointestinaltrakt (Kahler & Mellor, 2009), wobei IDO aber nur von wenigen spezifischen Zellen, wie lymphoiden Zellen oder Epithelzellen konstitutiv exprimiert wurde. Es ist bekannt, dass IDO auf posttranskriptionaler Ebene modifiziert werden kann. Die Expression verschieden großer mRNA-Transkripte könnte ebenfalls zur Expression verschieden großer Proteinvarianten führen (Ball et al., 2009). Da in der vorliegenden Arbeit sowohl im Gewebe als auch im Blut jeweils 2 Banden gefunden wurden, könnte dies auch ein Hinweis auf eine posttranslationale Modifikation wie z.B. Ubiquitinierung sein.

Es gibt bereits Belege, dass IDO durch die Bindung von Ubiquitin modifiziert und so vermutlich für den proteosomalen Abbau vorbereitet wird (Orabona et al., 2008; Palotta et al., 2010; Jiang et al., 2010). Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Ubiquitinierung von Proteinen neben der Einleitung zum proteosomalen Abbau auch an der Steuerung zahlreicher intrazellulärer Prozesse, z.B. im Rahmen von Infektionen, beteiligt ist (Burrows & Johnston, 2012). Dabei ist entscheidend, ob eine Mono- oder eine Polyubiquitinierung vorliegt (Ravid & Hochstrasser, 2008). Die Vorbehandlung mit SDS zur gelelektrophoretischen Auftrennung bewirkt eine Denaturierung von Proteinen, jedoch nicht die Aufspaltung kovalenter Bindungen. Ubiquitin kann kovalent an Lysinreste des Substrat-Proteins gebunden werden (Ravid & Hochstrasser, 2008). Dadurch würde ein IDO-Ubiquitin-Protein ein höheres MG aufweisen als ein unmodifiziertes IDO-Protein. Ob die hier nachgewiesene konstitutiv exprimierte IDO-

Bande ubiquitiniert ist, kann durch weitere Analysen, wie z.B. Immunpräzipitation geklärt werden. Auch die hier aufgezeigte Möglichkeit, dieIDO-Proteinexpression *ex vivo* nach einer *in vivo*IDO-Aktivierung nachzuweisen, könnte zur Klärung beitragen, da während der Kultivierung eine Beeinflussung von regulatorischen Prozessen, wie der Ubiquitinierung, möglich ist.

4.1.2 Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation

„Sickness Behaviour“ und Veränderungen im Blutbild

Es ist bekannt, dass die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine im Zusammenhang mit der Ausprägung unspezifischer Krankheitssymptome wie Fieber, Schläfrigkeit oder Appetitlosigkeit steht (Konsman et al., 2002). Auch beim Schwein wurden in verschiedenen Studien nach LPS-Applikation eine verminderte Aktivität und Futteraufnahme und eine erhöhte Körpertemperatur festgestellt (Johnson & von Borell, 1994; Parrott et al., 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die i.p. Applikation von LPS zu einer verminderten Aktivität und Futteraufnahme und zu einer deutlichen Ausprägung von Krankheitssymptomen wie Zittern, erschwerte Atmung, seltener auch Erbrechen führte.

Studien von Lipcsey et al. (2008) zeigten, dass die Applikation von LPS und die damit verbundene Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine einen zeitlich begrenzten Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blut von Schweinen induzierte. Dieser Befund wird durch die vorliegende Studie bestätigt. LPS führte hier zunächst zu einem Abfall und anschließend wieder zu einem Anstieg der Leukozytenzahl, so dass 24 h nach LPS keine signifikante Veränderung zu den Kontrolltieren mehr erkennbar war. Neben der Leukozytenzahl wurde die Zahl der PBMCs untersucht, welche nur die Populationen der Lymphozyten, Monozyten und natürlichen Killerzellen, nicht aber der Granulozyten beinhaltet. Es zeigte sich, dass die Zahl dieser Zelltypen sowohl 6 h als auch 24 h nach LPS verringert war. Dies deutet darauf hin, dass der Anstieg der Leukozytenzahl vor allem durch die Neubildung neutrophiler Granulozyten bedingt war. Die Erhöhung der Zahl neutrophiler Granulozyten erfolgt durch die Bildung neuer Zellen aus dem Knochenmark und ist eine physiologische Reaktion auf Stimuli wie Endotoxine (Lehner & Hartung, 2002). Die verringerte Zahl der der PBMCs könnte durch eine Abwanderung von Zellen in lymphatisches Gewebe z.B. in peritoneale Lymphknoten bedingt sein, aber auch durch eine Abwanderung von Monozyten zum Entzündungsherd (Jungi, 2000).

Immunsuppressive Effekte

Die in der vorliegenden Arbeit gefundene LPS-induzierte Ausschüttung von IL-10 im Plasma bestätigt, dass die Applikation von LPS neben der proinflammatorischen auch die antiinflammatorische Immunantwort induziert. Antiinflammatorische Effekte können eine verminderte Induzierbarkeit von proinflammatorischen Zytokinen oder auch eine verminderte Mitogen-stimulierte Zellproliferation bewirken (Asadullah et al., 2003; Cupps & Fauci, 1982). Mithilfe des Vollbluttests wurde geprüft, ob die Produktion der proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α nach der LPS-Applikation *in vivo* durch eine *ex vivo* Stimulation mit dem Superantigen SEB erneut induzierbar ist. Die Stimulation von Vollblut durch Mitogene ist geeignet, um zelluläre Immunfunktionen zu testen und zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus (Petrovsky & Harrison, 1995; Bocchieri et al., 1995). Durch SEB werden dabei vorrangig T-Zellen aktiviert (Janeway, 2002; Webb & Gascoigne, 1994). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Produktion von IFN- γ und TNF- α nach LPS gehemmt bzw. vermindert war, wobei die Hemmung 6 h nach LPS am deutlichsten ausgeprägt war. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Studien an humanem Blut gefunden. Dabei wurde festgestellt, dass die Exposition von Kindern mit hohen Endotoxin-Konzentrationen zu einer verminderten *ex vivo* Stimulierbarkeit von TNF- α und IFN- γ durch SEB führt (Braun-Fahrländer et al., 2002). Auch eine verminderte Zahl mononukleärer Zellen kann Ursache für eine verminderte Zytokinausschüttung sein. In der vorliegenden Studie spricht jedoch die vollständige Hemmung der Zytokinausschüttung 6 h nach LPS eher für eine funktionale Blockade der Zytokin-Induzierbarkeit zu diesem Zeitpunkt. Eine funktionale Blockade stellt einen Regulationsmechanismus dar, um eine überschießende Immunreaktion auf einen erneuten Stimulus zu verhindern.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von LPS *in vivo* zu einer Aktivierung von T-Zellen führt (Milner et al., 1983). Die Stimulation von T-Zellen mit T-Zell-Mitogenen wie SEB oder PHA im MTT-Test ist eine Möglichkeit immunsuppressive bzw. stimulierende Effekte der i.p. LPS-Applikation zu charakterisieren (Mosmann, 1983; Carmichael et al., 1987). Beim MTT-Test wird durch die Bildung eines Farbstoffs die Aktivität spezifischer Enzyme bestimmt, welche ein Indikator für die zelluläre metabolische Aktivität und daher ein indirektes Maß für die Zellproliferation ist (Menge, 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigen die Ergebnisse des MTT-Tests, dass LPS 24 h nach der Applikation eine erhöhte Stimulierbarkeit der Zellproliferation im Vergleich zu den NaCl-behandelten Tieren induzierte. Eine Hemmung der T-Zellproliferation, wie sie z.B. nach Traumen oder operativem Stress beschrieben wurden (Howard & Simmons, 1974; Dimitrijević et al., 2011) konnte nach einmaliger i.p LPS-Gabe nicht beobachtet werden und ist möglicherweise nur mit

länger anhaltendem immunologischen Stress assoziiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass die Applikation von LPS *in vivo* zu einer Aktivierung von T-Zellen führt, so dass diese auf eine erneute Aktivierung mit vermehrter Zellteilung als physiologische Antwort auf einen inflammatorischen Stimulus reagieren.

LPS-Toleranz

Die LPS-Toleranz ist neben einer verminderten *in vivo* Induzierbarkeit von Zytokinen unter anderem durch eine schwächere HPA-Achsen-Antwort als Reaktion auf eine erneute LPS-Exposition gekennzeichnet und wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben (Lehner & Hartung, 2002; Liu et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde neben Zytokinen und Cortisol erstmals auch die Induzierbarkeit des Kynurenin-Wegs, des serotonergen Systems und derIDO-Proteinexpression im Schwein geprüft. Die Ergebnisse bestätigen, dass die LPS-Vorbehandlung zu einer Hemmung bzw. Reduktion der Ausschüttung von TNF- α , IL-10 und Cortisol als Reaktion auf einen erneuten LPS-Challenge führt. Bei NaCl-vorbehandelten Tieren wurde dagegen eine inflammatorische Antwort durch den LPS-Challenge induziert. Ebenso wurde eine verminderte Induzierbarkeit des Kynurenin-Wegs nachgewiesen. Diese war dadurch gekennzeichnet, dass kein weiterer Abfall von Trp und kein erneuter Anstieg von Kyn, Kyna oder Quin gemessen wurden. Auch der serotonerge Weg des Trp-Abbaus wurde nach dem zweiten Challenge mit LPS nicht erneut aktiviert. Dies führte dazu, dass die 5-HT-Konzentrationen im Vergleich zum Basalwert gleichbleibend niedrig blieben. Die Daten von Trp und den Trp-Metaboliten zeigen, dass der zweite LPS-Challenge keine erneute Aktivierung des Trp-Abbaus über den Kynurenin-Weg induzierte.

Im Vollbluttest wurde geprüft, ob sich die IDO-Proteinexpression durch die *ex vivo* LPS-Stimulation induzieren lässt. Gleichzeitig wurde TNF- α als proinflammatorischer Parameter und potentieller IDO-Aktivator gemessen. Vor der LPS-Applikation war sowohl TNF- α als auch die IDO-Proteinexpression *ex vivo* durch LPS-stimulierbar. Zum Zeitpunkt 6 h nach i.p. LPS waren TNF- α und IDO bereits im spontanen Kulturansatz induziert. Die zusätzliche LPS-Stimulation hatte darauf keinen weiteren Einfluss. Zum Zeitpunkt 24 h nach LPS waren weder TNF- α noch IDO im spontanen Kulturansatz stimuliert. Es konnte zudem *ex vivo* keine erneute TNF- α -Ausschüttung und keine erneute IDO-Proteinexpression durch LPS induziert werden, was auf die Ausbildung einer LPS-Toleranz hindeutet. Es ist bekannt, dass die IDO-Aktivierung abhängig von inflammatorischen Stimuli wie TNF- α oder IFN- γ ist (King & Thomas, 2007). Es ist daher wahrscheinlich, dass IDO aufgrund der fehlenden Zytokin-Reaktion in der hier gezeigten Arbeit nicht erneut induziert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings nur die frühe unspezifische Phase der LPS-Toleranz untersucht. Einige

Studien konnten zeigen, dass es im weiteren Verlauf der LPS-Toleranz zu weitreichenden strukturellen und funktionalen Veränderungen von Immunzellen kommt. In LPS-toleranten Mäusen und Ratten wurden z.B. erhöhte Zahlen von zirkulierenden neutrophilen Zellen und Makrophagen in der Leber beschrieben, die auch mit einer gesteigerten Phagozytose assoziiert waren (Yamamoto et al., 1993; Bautista & Spitzer, 1995; Lehner et al., 2001). Solche Veränderungen während der späten spezifischen Phase der LPS-Toleranz könnten zu einer erneuten Aktivierung vonIDO führen.

4.2 Blockade vonIDO-induzierten Effekten durch Applikation von 1-MT

Ziel dieses Arbeitskomplexes war, durch eineIDO-Blockade Veränderungen in der inflammatorischen Antwort, im Krankheitsverhalten und in der Ausprägung von immunsuppressiven Effekten zu induzieren. Dadurch können Rückschlüsse über den Einfluss vonIDO innerhalb der LPS-induzierten Veränderungen gezogen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte durch wiederholte Applikation von 1-MT dieses im Plasma und Gewebe angereichert werden. Zum Zeitpunkt derIDO-Induktion durch LPS wurde der höchste Plasmaspiegel von 1-MT erreicht, was Grundlage für eine möglichst effektiveIDO-Blockade war. Es zeigte sich, dass die 1-MT-Applikation zur Erhöhung der Trp-Konzentrationen im Plasma und Gewebe führte. Ebenfalls wurde ein 1-MT-induzierter Anstieg von Kyna im Plasma gemessen. Der LPS-induzierte Anstieg von Kyn im Plasma und im Gewebe wurde durch die Behandlung mit 1-MT nicht vermindert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit 1-MT nicht zu einer Blockade des Abbaus von Trp über den Kynurenin-Weg führte. Jedoch beeinflusste 1-MT sowohl immunologische und verhaltensrelevante Parameter als auch die LPS-induzierten Veränderungen. 1-MT behandelte Tiere zeigten unabhängig von der LPS-Behandlung eine verminderte Aktivität, erhöhte Hauttemperaturen, eine veränderte Zusammensetzung peripherer Immunzellen und eine veränderte Stimulierbarkeit der Zellproliferation. Die Behandlung mit 1-MT hatte keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Auslenkung von inflammatorischen Zytokinen und Cortisol nach einmaliger LPS-Applikation. Dennoch zeigten 1-MT-vorbehandelte Tiere einen verminderten Anstieg des N/L-Verhältnisses und stärkere Erhöhung der Hauttemperatur nach LPS. Die Ausbildung einer LPS-Toleranz war bei 1-MT-vorbehandelten Tieren nicht beeinträchtigt.

4.2.1 Anreicherung von 1-MT und Auswirkungen auf den Trp-Stoffwechsel

Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe

Frühere Studien haben gezeigt, dass 1-MT *in vivo* durch einmalige und wiederholte Applikation im Plasma bzw. Gewebe angereichert werden kann. Als Applikationsformen wurden die orale Applikation (Kiank et al., 2010), die i.v. bzw. i.p. Injektion (Jia et al., 2008; Jung et al., 2009) und die s.c. Applikation in Form von 1-MT-Pellets (Grohmann et al., 2002; Romani et al., 2008) beschrieben. In der hier vorgestellten Arbeit wurde 1-MT erstmals beim Schwein eingesetzt. Es wurde eine s.c. Injektion von 1-MT gewählt, da diese eine zuverlässige Applikation einer definierten Menge von 1-MT pro Tier ermöglichte und in der Kniefalte des Schweins gut durchzuführen war. Zusätzlich verhinderten die unterschiedlichen Applikationsorte von 1-MT und LPS eine gegenseitige Beeinflussung der Wirkstoffe am Injektionsort. Die Ergebnisse zeigen, dass die wiederholte Applikation zu einer Anreicherung von 1-MT im Plasma führte und dass zum Zeitpunkt der LPS-Applikation die höchsten Plasma-Konzentrationen erreicht wurden. Auch in den peripheren Geweben und im Gehirn wurde 1-MT angereichert, wobei besonders hohe Konzentrationen in den Geweben Niere, Muskel und Herz gefunden wurden, während die Konzentrationen im Gehirn deutlich niedriger waren. Diese Ergebnisse unterstützen Befunde in Mäusen, bei denen nach oraler Applikation die höchsten 1-MT-Konzentrationen in den peripheren Geweben Niere, Leber und Herz nachgewiesen wurden, wogegen die Konzentrationen im Gehirn deutlich geringer waren (Jia et al., 2008). Es ist wahrscheinlich, dass 1-MT, ähnlich wie Trp, durch aktive Transportmechanismen über die Bluthirnschranke aufgenommen wird, so dass eine Erhöhung der Konzentration im peripheren Blut nicht zwangsläufig zu zeitgleich erhöhten Konzentrationen im Gehirn führt. In der hier vorgestellten Arbeit wies die Amygdala die höchsten Konzentrationen von 1-MT und Trp innerhalb der fünf untersuchten Hirnareale auf. Im Hypothalamus wurden dagegen die geringsten Konzentrationen von 1-MT und Trp gemessen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass 1-MT ähnlich wie Trp transportiert und daher in ähnlichen Konzentrationen angereichert wird. Studien von Karunakaran et al. (2008) konnten zeigen, dass 1-MT ein lösliches Substrat für spezifische Aminosäuretransporter darstellt, durch welche auch Trp transportiert wird.

Einfluss von 1-MT auf Trp und Trp-Metaboliten im Plasma und Gewebe

In der vorliegenden Studie hatte die Applikation von 1-MT Auswirkungen auf den Trp-Stoffwechsel und führte zu einer Erhöhung der Plasma-Konzentrationen von Trp und Kyna, wogegen die Konzentration von Quin innerhalb der Behandlungsgruppe sank. Auch in einigen Geweben konnten erhöhte Trp-Konzentrationen gemessen werden.

Die Erhöhung des Plasma-Trp war bereits nach der ersten s.c. 1-MT Applikation nachweisbar. Die Plasma-Konzentrationen von Trp und Trp-Metaboliten werden sowohl von TDO als auch IDO beeinflusst. Eine Blockade von konstitutiv aktiviertem IDO durch 1-MT könnte zu einem verminderten Grundumsatz von Trp über den Kynurenin-Weg führen und somit die erhöhten Trp-Konzentrationen im Plasma und Gewebe erklären. Ob es einen Grundumsatz von Trp durch konstitutiv exprimiertes IDO gibt und wie hoch dieser ist, kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden. Die Homöostase der Trp-Konzentrationen im Organismus wird vor allem durch TDO reguliert (Le Floch et al., 2011), welches durch 1-MT nicht blockiert wird (Cady & Sono, 1991; Forouhar et al., 2007). Erhöhte Plasma-Konzentrationen von Trp können zu einer Erhöhung der TDO-Aktivität in der Leber und somit zu einem gesteigerten Abbau von Trp über den Kynurenin-Weg führen. Das könnte die hier gefundenen erhöhten Konzentrationen von Kyna erklären.

Analysen des hier verwendeten 1-MT haben bestätigt, dass dieses wie vom Hersteller angegeben eine Reinheit von ca. 95% besitzt. Es konnten etwa 5% Trp nachgewiesen werden. Der Trp-Anteil des in dieser Studie genutzten Futters liegt bei ca. 2 g pro kg Futter. Die Tiere nahmen während der viertägigen Behandlung mit 1-MT/Myr ca. 600-800 g Futter pro Tag auf (nicht dargestellt), was einer Aufnahme von ca. 1,2 -1,6 g Trp täglich entspricht. Pro Tag wurde 1 g 1-MT und damit auch 50 mg Trp s.c. appliziert. Diese 50 mg Trp entsprechen etwa 3-5% des durch die Nahrung zugeführten Trp. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Trp-Supplementation im Zuge der 1-MT-Applikation einen Einfluss auf den Anstieg der Trp-Konzentrationen im Plasma und Gewebe hatte. Wie stark dieser Einfluss ist, könnte ein zusätzlicher Versuch mit einer vergleichbaren s.c. Applikation von Trp klären. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass das applizierte 1-MT im Organismus metabolisiert wurde. Oxidative Prozesse, z.B. an der Injektionsstelle, könnten eine Demethylierung verursachen, wodurch Trp entsteht, welches dann weiter metabolisiert werden kann.

Der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Anstieg von Kyna zeigt, dass der Abbau von Trp über den Kynurenin-Weg nicht blockiert, sondern aktiviert wurde. Studien an Ratten haben belegt, dass eine erhöhte Aufnahme von Trp zu einer erhöhten Exkretion von Trp-Abbauprodukten wie Kyna über den Urin führt (Okuno et al., 2008). Studien an Mäusen zeigten weiterhin, dass eine mehrtägige Behandlung mit 1-MT zu signifikant erhöhten Kyna-Konzentrationen im Plasma führte (Kiank et al., 2010). In den vorliegenden Untersuchungen konnten trotz der erhöhten Kyna-Konzentrationen weder im Plasma noch im Gewebe erhöhte Kyn-Konzentrationen detektiert werden. Neuere Studien weisen darauf hin, dass sowohl IDO als auch TDO *in vitro* 1-L-MT enzymatisch abbauen können, wobei die Bildung von Kyn bzw. Methyl-Kyn beschrieben wird

(Chauhan et al., 2009; Schmidt, Diss. 2010). Jedoch stellt 1-MT ($K_m = 150 \mu\text{M}$) ein wesentlich schlechteres Substrat für das humane IDO-Enzym dar als Trp ($K_m = 7 \mu\text{M}$) (Basran et al., 2008). Die Bildung von Methyl-Kyn aus 1-MT anstelle von Kyn könnte eine Erklärung dafür sein, dass die Kyn-Konzentrationen im Plasma unverändert blieben.

Auch im Gewebe wurde der Einfluss von 1-MT auf die Trp- und Kyn-Konzentrationen geprüft. In der Leber, Lunge, Muskel, Niere, und PFC wurden signifikant bzw. tendenziell höhere Trp Konzentrationen in den 1-MT-vorbehandelten Tieren im Vergleich zu Myr-vorbehandelten Tieren gemessen. In der Schilddrüse waren die Trp-Konzentrationen dagegen signifikant niedriger. Nur in der Lunge waren die Kyn-Konzentrationen tendenziell niedriger, während in den anderen Geweben kein Effekt von 1-MT auf Kyn nachgewiesen werden konnte. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass erhöhte Trp-Konzentrationen die IDO-Genexpression inhibieren kann (Okamoto et al., 2007), was möglicherweise zu einem geringeren Umsatz von Trp zu Kyn in der Lunge führen könnte. Da die Lunge eine starke IDO-Aktivität aufweist (González et al., 2008), zeigte sich dieser Effekt möglicherweise nur in diesem Organ. Die erhöhten Trp-Konzentrationen im Plasma und Gewebe könnten also sowohl zu einer Inhibition von IDO als auch zu einer Aktivierung von TDO führen. Dies würde unterschiedliche Befunde in Organen und im Plasma erklären. Neuere Studien deuten zudem darauf hin, dass das D-Isomer von 1-MT *in vitro* zu einer Erhöhung der IDO-Gen- und Proteinexpression sowie zu einer erhöhten Kyn-Produktion führt (Opitz et al., 2011). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu bisher veröffentlichten Daten und zugrunde liegende Mechanismen sind derzeit noch weitgehend ungeklärt. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die hier gefundene Aktivierung des Kynurenin-Wegs auch durch eine 1-MT-induzierte Aktivierung von IDO ausgelöst wurde. Analysen der Gen- und Proteinexpression könnten Aufschluss darüber geben, ob TDO und/oder IDO für die gefunden Veränderungen im Trp-Stoffwechsel verantwortlich sind.

Eine erhöhte Verfügbarkeit von Trp wird häufig mit einer Erhöhung von 5-HT in Verbindung gebracht. Bei Ferkeln konnte durch Trp-Supplementation über das Futter eine Erhöhung der 5-HT-Konzentration im Hypothalamus festgestellt werden (Koopmans et al. 2006; Shen et al., 2012). Im Hypothalamus und anderen Geweben sowie im Plasma ergaben sich in der hier durchgeführten Studie aber keine Hinweise auf eine erhöhte 5-HT-Synthese als Folge der durch 1-MT erhöhten Trp-Konzentrationen (Daten nicht gezeigt). Das deutet darauf hin, dass die Trp-Erhöhung bei den 1-MT-behandelten Tieren nicht zu einer Veränderung der 5-HT-Synthese geführt hat.

4.2.2 Blockade der LPS-induziertenIDO-Aktivierung

Einfluss von 1-MT auf physiologische Parameter

Die viertägige Behandlung mit 1-MT verursachte in dieser Studie, unabhängig von der LPS-Behandlung, Veränderungen im Blutbild, im Verhalten und in der Körpertemperatur. Bei Ratten und Hunden finden sich bisher keine Hinweise, dass eine mehrfache Gabe von 1-MT zu signifikanten Veränderungen bei Blutparametern und im Verhalten führt (Jia et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich nach Applikation von hohen Dosen Trp beim Schwein, wo ebenfalls weder signifikante Veränderungen im Blutbild noch in anderen klinisch relevanten Parametern beschrieben wurden (Chung et al., 1991). Die in der vorliegenden Studie festgestellte verminderte Aktivität der Tiere und die erhöhte Hauttemperatur bei 1-MT-vorbehandelten Tieren könnten Ausdruck einer Form von „Sickness Behaviour“ im Rahmen einer entzündlichen Reaktion sein. Darauf weisen auch die erhöhten Lymphozytenzahlen bei 1-MT-behandelten Tieren hin. Ein vermehrtes Auftreten von Lymphozyten im peripheren Blut wird häufig bei viralen Infektionen, als Spätreaktion auf Entzündungen und bei chronischen Entzündungsreaktionen beschrieben (Schettler, 1998). Die Erhöhung der Körpertemperatur ist ein physiologischer Mechanismus, der unter anderem die Rekrutierung von Lymphozyten in das lymphatische System und die Zellproliferation durch nichtspezifische Mitogene begünstigt (Hasday & Singh, 2000). Da die Myr-behandelten Tiere die genannten Veränderungen nicht zeigten, ist anzunehmen, dass die Behandlung mit 1-MT und nicht die s.c. Applikationsform diese Effekte verursacht. *In vitro* Untersuchungen an humanen DCs konnten zeigen, dass 1-MT ein TLR-Ligand ist und somit TLR-assoziierte Signalkaskaden stimulieren kann (Agaugué et al., 2006). Die Aktivierung immunologisch relevanter Gene durch 1-MT-induzierte Signaltransduktion könnte eine Erklärung für die entzündungsähnliche Reaktion auf 1-MT sein. IDO-unabhängige Mechanismen von 1-MT sind bisher nur wenig untersucht, könnten aber erklären, warum teils widersprüchliche Ergebnisse beim Einsatz von 1-MT beschrieben werden. Die deutliche Erhöhung der Kyn-Konzentrationen könnte ebenfalls Änderungen immunologischer Parameter verursachen, wobei aber bei Untersuchungen in Mäusen eher immunsuppressive Effekte beschrieben wurden (Moroni et al., 2012).

Einfluss von 1-MT auf die LPS-induzierte IDO-Aktivierung

In Kapitel 3.12. wurde gezeigt, dass die Aktivierung von IDO beim Schwein einen Abfall von Trp und einen Anstieg von Kyn, Kyna und Quin im Plasma verursachte. Frühere Studien an Labortieren bzw. in der Zellkultur haben gezeigt, dass die Blockade von IDO mit 1-L-MT die Bildung von Metaboliten des Kynurenin-Weges reduziert, wodurch

weniger Trp verbraucht wird (Okamoto et al., 2007; Hou et al., 2007; Qian et al., 2009; Kiank et al., 2010). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass bei 1-MT-vorbehandelten Schweinen nach 24 h im Vergleich zu den Kontrolltieren kein signifikanter Abfall von Trp vom Basalwert durch die einmalige LPS-Applikation induziert werden konnte. Bei der LPS-induzierten Bildung von Kyn war jedoch kein Unterschied nachweisbar. Auch der LPS-induzierte Anstieg des Kyn/Trp Verhältnisses, einem Marker derIDO-Aktivität wurde durch 1-MT nicht beeinflusst. Es ist allerdings möglich, dass die 1-MT-induzierte Erhöhung der Trp-Konzentrationen den Verlauf der LPS-induzierten Trp-Auslenkung beeinflusst. Im Zeitraum von 3-12 h nach LPS fand, ähnlich wie bei den Myr+LPS-behandelten Tieren, auch bei den 1-MT-behandelten Tieren ein signifikanter Abfall der Trp-Konzentrationen statt. Es ist daher anzunehmen, dass der LPS-induzierte Trp-Verbrauch nicht blockiert wurde. Die erneute Applikation von 1-MT und der damit verbundene Trp-Anstieg zum Zeitpunkt 12 h nach LPS könnte eine Ursache dafür sein, dass die Trp-Werte bei den 1-MT-Tieren im Gegensatz zu den Myr-behandelten Tieren 24 h nach LPS nicht mehr signifikant niedriger waren als zum Zeitpunkt 0 h.

Die Ergebnisse in den Geweben Leber, Lunge, Muskel, Niere, Herz und Amygdala bestätigten, dass 1-MT keinen Einfluss auf den LPS-induzierten Verbrauch von Trp hatte. Ein LPS-induzierter Anstieg von Kyn konnte in den Geweben Lunge und Milz nachgewiesen werden, wobei sich auch dort kein Einfluss der Vorbehandlung zeigte. Besonders deutlich zeigte sich dieser Effekt in der Milz. Ähnlich wie im Plasma war auch hier der Kyn-Anstieg 6 h nach LPS signifikant. Im Plasma von 1-MT-vorbehandelten Tieren zeigte sich außerdem, dass LPS eine zusätzliche Auslenkung der bereits im Basalwert stark erhöhten Kyna-Konzentrationen induzierte, wogegen Quin anders als bei Myr-vorbehandelten Tieren nicht signifikant anstieg. Die Daten vor und nach der LPS-Behandlung deuten darauf hin, dass durch 1-MT der Abbau von Trp verstärkt in Richtung Kyna stattfinden könnte. Eine Erklärung dafür wurde nicht gefunden.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung konnte bei keiner der Behandlungsgruppen eine signifikante Änderung der 5-HT-Konzentrationen im Plasma nach LPS, wie sie in Kapitel 3.1.2 beschrieben wurde, reproduziert werden. Die wiederholte Applikation von 1-MT und die damit verbundenen Blutentnahmen und/oder der Umgang mit den Tieren könnten Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

Insgesamt liefern die Ergebnisse im Plasma und im Gewebe keine Belege, dass die LPS-induzierte IDO-Aktivierung durch 1-MT blockiert wurde. Möglicherweise waren die Konzentrationen im Plasma zu gering, um eine effektive Blockade zu erreichen. In

Studien an Mäusen konnten allerdings mit einer ähnlichen 1-MT-Konzentration im Plasma (~30-50 μM) *in vivo* Effekte erzielt werden (Kiank et al., 2010). In *in vitro* Studien wurden andererseits Effekte erst bei wesentlich höheren Konzentrationen von 1-MT in der Zellkultur erzielt. So konnten Okamoto et al. (2007) die Bildung von Kyn *in vitro* durch Zugabe von 200 μM 1-L-MT, jedoch nicht bei 1-MT-Konzentrationen von 2 und 20 μM reduzieren. In Studien an humanen Krebszellen wurden sogar Konzentrationen von 1 mM 1-L-MT eingesetzt, um die IFN- γ -induzierte Kyn-Synthese zu blockieren (Quian et al., 2009). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur IDO-Blockade hohe Konzentrationen von 1-MT in Mikromilieu der Zellen vorliegen müssen. Am Beispiel der Milz konnte in der hier vorgestellten Arbeit gezeigt werden, dass die Konzentration von 1-MT 75% höher war als die von Trp, wodurch zumindest ein Teil der Trp-Bindungsstellen durch 1-MT besetzt werden sollte. Dennoch wurde keine Reduktion des LPS-induzierten Kyn-Anstiegs gemessen, was darauf hindeutet, dass *in vivo* keine IDO-Blockade beim Schwein erzielt werden konnte. Es wurde weiterhin festgestellt, dass LPS auch zu einem Abfall von 1-MT im Plasma führte, der gegenüber dem kinetisch bedingten Abfall der 1-MT+NaCl-Kontrolltiere schon 6 h nach LPS signifikant zum Ausgangswert vor LPS war. Selbst nach erneuter 1-MT-Applikation konnte kein erneuter Anstieg beobachtet werden. Auch in einigen Geweben wurde ein LPS-induzierter Abfall von 1-MT gemessen, welcher besonders deutlich zum Zeitpunkt 6 h nach LPS war und somit nicht durch eine verminderte subkutane Resorption von 1-MT 12 h nach LPS zu erklären ist. Diese Ergebnisse deuten an, dass LPS nicht nur eine Metabolisierung von Trp, sondern auch von 1-MT bewirkt. Ursache dafür könnte, wie bereits unter 4.2.1 genannt, eine Umsetzung von 1-MT durch TDO oder IDO sein. Ebenso könnte im Rahmen LPS-induzierter oxidativer Prozesse (Lima et al., 2011) eine Demethylierung von 1-MT erfolgen, z.B. durch inflammatorische Enzyme. Eine Inkubation von 1-MT mit L-Aminosäure-Oxidasen oder Monooxygenasen könnte Aufschluss über die Möglichkeit einer Abspaltung der Methylgruppe von 1-MT geben.

Einfluss von 1-MT auf die LPS-induzierte Induktion inflammatorischer Zytokine und die Aktivierung der HPA-Achse und die Krankheitssymptomatik

1-MT hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Auslenkung von TNF- α , IL-10 und Cortisol nach einmaliger LPS-Applikation. Jedoch zeigten 1-MT+NaCl+LPS-behandelte Tiere im Rahmen der Untersuchungen der LPS-Toleranz einen signifikant niedrigeren LPS-induzierten Anstieg von TNF- α und IL-10 nach LPS als Myr+NaCl+LPS-behandelte Tiere. Die 1-MT-vorbehandelten Tiere hatten 24 h vor LPS bereits eine Applikation mit NaCl und 12 h vor LPS eine fünfte 1-MT-Applikation erhalten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Behandlung mit 1-MT die LPS-induzierte

Immunantwort modulieren kann. In Mäusen induzierte die Applikation von 1-MT *in vivo* eine veränderte Balance der LPS-induzierten Zytokin-Antwort nach LPS-Challenge zugunsten des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (Jung et al., 2009). In der hier vorgestellten Studie war jedoch sowohl die pro- als auch die antiinflammatorische Immunantwort reduziert. Möglicherweise stehen die erhöhten Kyna-Konzentrationen damit im Zusammenhang. In Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Kyna *in vitro* eine reduzierte TNF- α -Antwort nach LPS-Stimulation verursacht. Weiterhin verursachte die Applikation von Kyna *in vivo* bei Mäusen ebenfalls eine verminderte LPS-induzierte TNF- α -Antwort in einer *ex vivo* Zellkultur (Kiank et al., 2010). Einige Studien beschreiben bereits, dass Kyna vor allem immunsuppressive Effekte vermittelt (Moroni et al., 2012). Möglicherweise wird dadurch generell die Reaktivität der Immunantwort herabgesetzt, was die verminderten Zytokin-Reaktionen erklären würde. Der zugrundeliegende Mechanismus ist derzeit noch ungeklärt. Offen bleibt auch, warum sich die verminderte Zytokin-Reaktion von TNF- α und IL-10 erst bei den NaCl+LPS Tieren zeigten, nicht jedoch nach einer einmaligen LPS-Gabe ohne NaCl-Vorbehandlung. Sowohl die Blutentnahmen am Tag der NaCl-Applikation als auch die längere Behandlung mit 1-MT könnten den Immunstatus zusätzlich beeinflusst haben. Weitere Untersuchungen, z.B mit einer längeren 1-MT-Applikation könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Es ist bekannt, dass durch inflammatorische Zytokine, insbesondere TNF- α , auch die Ausprägung von „Sickness Behaviour“ reguliert wird (Dantzer, 2001). Die hier nachgewiesene verminderte Zytokin-Reaktion von TNF- α am zweiten Behandlungstag könnte daher ein Grund für den verminderten Schweregrad der Erkrankung der 1-MT-vorbehandelten Tiere sein.

Nach einmaliger LPS-Applikation am ersten Behandlungstag waren keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Reaktion und im Schweregrad der Erkrankung zwischen 1-MT+LPS und Myr+LPS-behandelten Tieren nachweisbar. Jedoch zeigte sich ein Einfluss von 1-MT auf den LPS-induzierten Temperaturanstieg der Tiere. *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Kyna ein Agonist des Arylhydrocarbon Rezeptors (AHR) ist (DiNatale et al., 2010). Es konnte bereits beobachtet werden, dass die Aktivierung dieses Rezeptors in Verbindung mit inflammatorischen Signalen synergistisch zu einer Induktion von IL-6 in der Zellkultur führte (Hollingshaed et al., 2008). Studien an IL-6-knock-out Mäusen, bei denen die i.p. LPS-Applikation im Vergleich zum Wildtyp kein Fieber auslöste, belegen, dass IL-6 pyrogen wirken kann (Nilsberth et al., 2009). Ein Einfluss der 1-MT-induzierten Erhöhung der Kyna-Konzentrationen auf die Thermoregulation ist somit in der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen. Eine weitere Ursache der veränderten Regulation der Körpertemperatur könnte die

Stimulation TLR-assoziiertes Signalkaskaden durch 1-MT selbst sein (Agaugué et al., 2006). Dadurch könnte die Expression von Mediatoren wie Prostaglandin E₂ oder IL-6 beeinflusst werden, welche in die Thermoregulation involviert sind (Oka et al., 2000). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die durch 1-MT erhöhten Trp-Konzentrationen ebenfalls einen Einfluss auf die Thermoregulation hatten. Bei Mäusen hatte die Gabe von Trp einen Einfluss auf die Endotoxin-induzierte Temperaturänderung (Moon & Berry, 1968). Koopmans et al. (2012) konnten jedoch beim Schwein keinen Einfluss erhöhter Plasma-Trp-Konzentrationen auf die LPS-induzierte Fieberreaktion feststellen.

Einfluss von 1-MT auf die Zellproliferation und Differentialblutbild

In vitro Studien haben gezeigt, dass durch 1-MT eine Mitogen-induzierte Verminderung der T-Zell-Proliferation verhindert werden kann (Liu et al., 2009). In Blutzellen von Patienten, die bedingt durch eine HIV-Infektion eine verminderte PHA-induzierte Zelleproliferation zeigten, konnte durch den Zusatz von 1-MT *in vitro* die PHA-induzierte Antwort, spezifisch von CD4⁺-positiven T-Zellen, wiederhergestellt werden (Boasso et al., 2007).

In der hier durchgeführten Studie hatte die *in vivo* Applikation von 1-MT einen Einfluss auf die zeitliche Dynamik der LPS-induzierten Veränderungen im PI. Bei den Myr+LPS-behandelten Tieren war der PI durch die LPS-Behandlung zunächst erniedrigt und stieg dann an, während dies bei den Myr+NaCl-Kontrolltieren umgekehrt war. In der Myr-vorbehandelten Gruppe war der Mitogen-induzierte PI zudem 6 h nach LPS signifikant niedriger als der PI der NaCl-behandelten Kontrolltiere. Dies deutet auf eine zeitlich begrenzte verminderte Teilungsaktivität der Zellen aufgrund der LPS-Behandlung hin, die allerdings 24 h nach LPS wieder ausgeglichen ist. Bei den 1-MT-vorbehandelten Tieren ergaben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im PI zwischen LPS- und NaCl-behandelten Tieren. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Teilungsaktivität durch 1-MT nach LPS im Gegensatz zu den Myr+LPS-behandelten Kontrollen nicht eingeschränkt war. Jedoch ergaben sich auch innerhalb der 1-MT+NaCl-behandelten Tiere keine signifikanten Unterschiede im PI, wodurch ein genereller Einfluss der 1-MT-Behandlung auf die Zellproliferation nicht ausgeschlossen werden kann. Eine Ursache könnten die 1-MT-induzierten erhöhten Kyna-Konzentrationen sein, die wie bereits erwähnt, immunmodulatorische Effekte haben. Die zeitliche Dynamik der Zellproliferation war bei Myr+NaCl/LPS-behandelten Tieren anders als bei LPS/NaCl-behandelten Tieren der vorangegangenen Untersuchungen. Wie in Kapitel 3.1.7 gezeigt, führte die LPS-Applikation dort zu einer Aktivierung der Zellproliferation 24 h nach LPS. Die in diesem Arbeitskomplex zusätzliche

Vorbehandlung mit Myr bewirkte, dass die Zellproliferation durch LPS zunächst signifikant reduziert wurde und sich 24 h nach LPS nicht signifikant von den Myr+NaCl-Kontrollen unterschied. Die Ergebnisse zeigen, dass das Versuchsdesign einen Einfluss auf die LPS-induzierte Immunantwort hat.

Zahlreiche Studien haben belegt, dass die Applikation von Endotoxinen wie LPS ein wirksamer Stimulus der Hämatopoese ist. Es kommt dabei vor allem zu einer Erhöhung der Zahl neutrophiler Granulozyten (Neutrophilie), die durch eine Zunahme unreifer Zellen im Vergleich zu den reifen Zellen bedingt ist (Lehner & Hartung, 2002). Die Ergebnisse der hier durchgeführten Arbeit bestätigen, dass LPS zunächst eine Vermehrung von neutrophilen Granulozyten bewirkt, wogegen die Zellzahlen von basophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten absanken. Das N/L-Verhältnis war 6 h nach LPS signifikant erhöht. Nach 24 h fand bereits eine Normalisierung aller gemessenen Blutparameter statt. Das N/L-Verhältnis kann ein prognostischer Marker für systemische Inflammation oder eine Bakteriämie sein (Zahorec, 2001; de Jager et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit bewirkte die Behandlung mit 1-MT einen signifikant verminderten Anstieg des N/L-Verhältnisses 6 h nach LPS. Dieser begründet sich vor allem auf die verminderte Neubildung unreifer Neutrophiler im Vergleich zu den Myr+LPS-behandelten Tieren. Die verminderte Neubildung Neutrophiler könnte auch eine Ursache dafür sein, dass LPS bei 1-MT-vorbehandelten Tieren einen signifikanten Abfall der Gesamtzahl von Leukozyten bewirkte, wogegen dieser Abfall bei Myr-behandelten Tieren nicht signifikant war. Bisher ist ein derartiger Effekt von 1-MT auf Blutzellen noch nicht beschrieben worden. Eine Erklärung für mögliche Ursachen kann im Rahmen dieser Arbeit nicht gegeben werden. TLR-assoziierte Effekte durch 1-MT, aber auch die erhöhten Kyn-Konzentrationen könnten einen Einfluss auf die Nachreifung der Granulozyten haben. Aufgrund ihrer Bedeutung im Rahmen einer erfolgreichen Immunabwehr, hätte die verminderte Neubildung neutrophiler Granulozyten eine Beeinträchtigung der Immunantwort nach inflammatorischer Stimulation zur Folge und kann daher als immunsuppressiver Effekt angesehen werden.

Einfluss von 1-MT auf die Ausprägung einer LPS-Toleranz

Es konnte kein Einfluss von 1-MT auf die Ausbildung einer LPS-Toleranz festgestellt werden. Sowohl die Zytokin-Ausschüttung von TNF- α und IL-10 als auch die Reaktivität der HPA-Achse waren bei 1-MT+LPS+LPS-Tieren signifikant reduziert. Ebenfalls konnte kein erneuter Anstieg von Kyn im Plasma beobachtet werden. Somit ist auch bei den 1-MT+LPS+LPS-Tieren eine LPS-Toleranz induziert worden. Da in dieser Arbeit keine hinreichenden Belege für eineIDO-Blockade gefunden werden

konnten, bleibt die Frage offen, ob IDO an der Ausprägung einer LPS-Toleranz beteiligt ist.

Im Rahmen der Untersuchungen zur LPS-Toleranz wurde zusätzlich zum Krankheitsverhalten an Tag 1 auch das Krankheitsverhalten nach der LPS-Applikation an Tag 2 beobachtet. Dabei wurde festgestellt, dass LPS-tolerante Tiere signifikant weniger Krankheitsverhalten zeigten, als Tiere, die zum ersten Mal LPS appliziert bekamen. Dennoch trat bei toleranten Tieren noch in 47% des Beobachtungszeitraumes Krankheitsverhalten auf. Die Induktion von Krankheitsverhalten in Abwesenheit von erhöhten TNF- α -Konzentrationen verdeutlicht, dass die Ausprägung von „Sickness-Behaviour“ durch ein Zusammenspiel verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α oder IL-1 β und nicht durch ein einzelnes Zytokin reguliert wird. Die erneute Fieberreaktion nach zweimaliger LPS-Applikation zeigt weiterhin, dass die Ausbildung einer LPS-Toleranz je nach Parameter zeitlich unterschiedlich verläuft. Auch im Mausmodell benötigte die Toleranzausbildung gegen Fieber mehrere Tage (Beeson, 1947), während bekannt ist, dass die Toleranzausbildung von inflammatorischen Zytokinen in anderen Tiermodellen schon einige Stunden nach der LPS-Exposition einsetzt (Lehner & Hartung, 2002). Im Rahmen der Untersuchungen zum Einfluss von 1-MT auf die Ausprägung einer LPS-Toleranz wurde auch die Kyn-Auslenkung nach der ersten LPS-Applikation gemessen (Kapitel 3.2.9). Hierbei zeigte sich ein Einfluss von 1-MT auf die zeitliche Dynamik der Kyn-Auslenkung. Während bei den Myr+LPS-behandelten Tieren die maximale Konzentration 6 h nach LPS gemessen wurde, war diese bei 1-MT+LPS-behandelten Tieren erst 12 h nach LPS am höchsten. Trotz der gefundenen Unterschiede in der zeitlichen Dynamik der LPS-induzierten Kyn-Auslenkung zwischen 1-MT- und Myr-behandelten Tieren zeigte sich auch hier, dass die LPS-induzierte Aktivierung des Kynurenin-Wegs nicht durch 1-MT blockiert wurde. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass 1-MT die zeitliche Dynamik LPS-induzierter Änderungen von Trp und Trp-Metaboliten beeinflusst.

5 Schlussfolgerung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionale Bedeutung derIDO-Aktivierung als Teil der angeborenen Immunantwort zu untersuchen. Durch die Blockade desIDO-Enzyms sollten mögliche regulatorische Funktionen und ein therapeutischer Nutzen innerhalb inflammatorischer Prozesse *in vivo* aufgezeigt werden. Als Modell zur inflammatorischen Stimulation wurde eine einmalige LPS-Applikation beim Schwein gewählt. Da die LPS-induzierteIDO-Aktivierung in dieser Arbeit erstmals an diesem Tiermodell untersucht wurde, erfolgte nach der LPS-Applikation eine Charakterisierung der physiologischen Konsequenzen und derIDO-Aktivierung.

Die Ergebnisse dieses experimentellen Komplexes belegen, dass die einmalige Applikation von LPS zu einer systemischen Immunantwort und zurIDO-Aktivierung beim Schwein führt. Die Immunantwort war durch einen Anstieg der Konzentrationen pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie die Aktivierung der HPA-Achse charakterisiert. Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation waren die Ausprägung von „Sickness Behaviour“ sowie eine Modulation der Immunantwort. Es konnten immunsuppressive Effekte wie eine verminderte Zytokin-Induzierbarkeit im Blut und die Ausbildung einer LPS-Toleranz nachgewiesen werden. Zudem wurde durch den Nachweis einer LPS-induzierten Erhöhung der Zellproliferation ein stimulierender Effekt ermittelt. DieIDO-Aktivierung wurde durch einen Verbrauch von Trp und einen Anstieg von Kyn im Plasma belegt. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal beim Schwein die LPS-induzierteIDO-Proteinexpression sowohl im Blut als auch Gewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde erstmalig in diesem Tiermodell der LPS-induzierte Anstieg von Kyna und Quin im Plasma nachgewiesen, der ebenfalls eine Aktivierung des Trp-Abbaus über den Kynurenin-Weg belegt. Es kann geschlussfolgert werden, dass die einmalige i.p. LPS-Applikation ein geeignetes Modell zurIDO-Aktivierung beim Schwein ist und daher eine geeignete Grundlage für die Untersuchung der Blockade des Enzyms *in vivo* darstellt.

DieIDO-Aktivierung sollte in der vorliegenden Arbeit durch den Einsatz des spezifischenIDO-Inhibitors 1-MT blockiert werden. Dieser Wirkstoff wurde bisher noch nicht beim Schwein eingesetzt, so dass zunächst ein geeignetes Modell zur Anreicherung von 1-MT etabliert wurde. Anhand der Kinetik nach einmaliger s.c. Applikation konnte ein Modell für die wiederholte Applikation erstellt werden, durch welches eine maximale Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe erreicht werden konnte. Zum Zeitpunkt derIDO-Aktivierung durch LPS war im Plasma die höchste 1-MT-Konzentration messbar, so dass die kompetitive Hemmung durch 1-MT gewährleistet sein sollte. Die wiederholte Applikation von 1-MT führte jedoch auch zu

einer Akkumulation von Trp und Kyna im Plasma. Die Erhöhung der Kyna-Konzentrationen im Plasma deutet auf eine Aktivierung des Kynurenin-Wegs bereits vor der LPS-Applikation hin. Ob die erhöhten Trp-Konzentrationen diese Aktivierung verursachten, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Ebenfalls ungeklärt bleibt, ob die erhöhten Trp-Konzentrationen durch Metabolisierung von 1-MT oder durch Veränderungen im Trp-Stoffwechsel verursacht wurden.

Trotz der unterschiedlichen Kyna- und Trp-Konzentrationen zwischen 1-MT- und Myr-vorbehandelten Tieren zum Zeitpunkt der IDO-Aktivierung, wurde IDO in beiden Gruppen durch LPS aktiviert. Es konnte nicht belegt werden, dass die IDO-Aktivierung durch 1-MT blockiert wurde. Weder der Verbrauch von Trp noch der Anstieg von Kyn wurden signifikant von der Vorbehandlung beeinflusst. Auch in Geweben, in denen LPS eine IDO-Aktivierung induzierte, zeigten sich keine Einflüsse von 1-MT auf den Verbrauch von Trp und den Anstieg von Kyn. Dennoch hatte die Behandlung mit 1-MT Einfluss auf das Immunsystem und das Verhalten der Tiere. 1-MT verursachte einen moderaten Anstieg der Hauttemperatur und eine verminderte Verhaltensaktivität, was als „Sickness Behaviour“ bewertet wird. Die erhöhten Lymphozytenzahlen unterstützen die Annahme, dass durch die 1-MT-Applikation eine inflammatorische Immunantwort induziert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die 1-MT-Applikation einen stimulierenden Effekt auf das Immunsystem hatte. Darüber hinaus wurde auch die LPS-induzierte Immunantwort durch 1-MT verändert. Die verminderte LPS-induzierte Neubildung unreifer neutrophiler Granulozyten deutet darauf hin, dass die 1-MT-Gabe zu einer Veränderung der funktionalen Immunantwort führt. Im Falle einer Infektion könnte dies eine Beeinträchtigung der Erregerabwehr zur Folge haben.

Da eine IDO-Blockade in der hier vorgestellten Studie nicht belegt werden konnte, bleibt weiterhin ungeklärt, welche der LPS-induzierten Effekte durch IDO beeinflusst werden. Es ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass 1-MT *in vivo* auch IDO-unabhängige Effekte vermittelt, was besonders relevant für den therapeutischen Einsatz von 1-MT in der Humanmedizin ist. Derzeitig wird 1-MT vor allem zur Behandlung von malignen Tumoren geprüft, so dass immunmodulatorische Effekte von 1-MT Einfluss auf den langfristigen Erfolg der Therapie haben könnten.

Zusammenfassend wird geschlussfolgert, dass das hier etablierte Modell der IDO-Aktivierung beim Schwein für grundlegende Untersuchungen der IDO-Blockade geeignet ist. Der in der vorliegenden Arbeit verfolgte Ansatz bietet die Möglichkeit, den Einfluss potentieller IDO-Inhibitoren sowohl auf die Immunantwort als auch auf das Verhalten und den Trp-Stoffwechsel umfassend zu analysieren. Diese Arbeit liefert somit die Grundlagen zur Untersuchung IDO-induzierter Effekte am Tiermodell

Schwein und stellt damit einen wichtigen Beitrag für die biomedizinische Erforschung von IDO und den therapeutischen Einsatz von 1-MT, aber auch anderen IDO-Inhibitoren *in vivo* dar.

6 Zusammenfassung

Eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort spielt der Abbau von Tryptophan (Trp) über den sogenannten Kynurenin-Weg, der ein Bindeglied zwischen dem Immun- und dem Nervensystem darstellt. Der initiale Schritt wird durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert. Die entstehenden Metaboliten wie Kynurenin (Kyn), Kynurensäure (Kyna) und Quinolinsäure (Quin) haben wiederum immun- bzw. neuromodulatorische Eigenschaften. Die IDO-Aktivierung erfolgt durch inflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharide (LPS) oder proinflammatorische Zytokine wie TNF- α . Eine erhöhte IDO -Aktivität wurde in vielen malignen Tumoren, aber auch in neurologischen Erkrankungen wie Schizophrenie oder Alzheimer festgestellt. Bei Sepsis-Patienten ist eine erhöhte IDO-Aktivität mit einem gesteigerten Mortalitätsrisiko assoziiert und wird dort bereits als prognostischer Indikator der Überlebenschance eingesetzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die funktionale Bedeutung der IDO-Aktivierung als Teil der angeborenen Immunantwort zu untersuchen. Durch die Blockade des IDO-Enzyms sollten mögliche regulatorische Funktionen und ein therapeutischer Nutzen innerhalb inflammatorischer Prozesse *in vivo* aufgezeigt werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit im Trp-Stoffwechsel zum Menschen, eignet sich das Schwein als Modelltier zur Prüfung dieses Ansatzes.

Die IDO-Aktivierung wurde durch einmalige intraperitoneale LPS-Applikation induziert und durch Plasma-Trp-Metaboliten und die IDO-Proteinexpression charakterisiert. Weiterhin wurden die pro- und antiinflammatorische Immunantwort, die HPA-Achsen-Aktivierung und physiologische Veränderungen wie Immunsuppression, Veränderungen des Blutbildes und die Ausprägung von krankheitsspezifischem Verhalten untersucht. Zur Blockade der LPS-induzierten IDO-Aktivierung wurde der spezifische IDO-Inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT) eingesetzt. Aufgrund der erstmaligen Anwendung von 1-MT beim Schwein, wurde eine Kinetik nach einmaliger subkutaner Applikation von 1-MT erstellt, anhand derer ein Modell für die wiederholte Applikation kalkuliert wurde.

Die Ergebnisse belegen, dass die einmalige Applikation von LPS zu einer systemischen Immunantwort und zur IDO-Aktivierung beim Schwein führt. Die Immunantwort war durch einen Anstieg pro- und antiinflammatorischer Zytokin-Konzentrationen sowie durch die Erhöhung der Cortisol-Konzentrationen im Plasma charakterisiert. Physiologische Konsequenzen der LPS-Applikation waren die Ausprägung von „Sickness Behaviour“, eine Modulation der Immunantwort und die Ausbildung einer LPS-Toleranz. Die IDO-Aktivierung wurde durch einen Verbrauch von

Trp mit gleichzeitigem Anstieg von Metaboliten des Kynurenin-Wegs im Plasma nachgewiesen. Erstmals beim Schwein wurde die IDO-Proteinexpression untersucht, welche ebenfalls die IDO-Aktivierung durch LPS belegte.

Die wiederholte Applikation von 1-MT führte zu einer Anreicherung des Wirkstoffs im Plasma und Gewebe. Es konnten keine Belege gefunden werden, dass die IDO-Aktivierung durch 1-MT blockiert wurde. Weder der Verbrauch von Trp noch der Anstieg von Kyn wurden signifikant von der Vorbehandlung beeinflusst. Auch in Geweben, in denen LPS eine IDO-Aktivierung induzierte, zeigten sich keine Einflüsse von 1-MT auf den Verbrauch von Trp und den Anstieg von Kyn. Dennoch hatte die Behandlung mit 1-MT, unabhängig von LPS, einen Einfluss auf das Immunsystem und das Verhalten. 1-MT verursachte eine Erhöhung der Lymphozytenzahlen, einen moderaten Anstieg der Hauttemperatur und eine verminderte Aktivität der Tiere. Auch die LPS-induzierte Immunantwort wurde durch 1-MT verändert. Dabei war die LPS-induzierte Neubildung unreifer neutrophiler Granulozyten durch 1-MT vermindert, wogegen die Fieberreaktion verstärkt war.

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine einmalige LPS-Applikation ein geeignetes Modell zur IDO-Aktivierung beim Schwein darstellt. Eine Blockade von IDO *in vivo* konnte jedoch trotz der Anreicherung von 1-MT im Plasma und Gewebe nicht belegt werden. Es ergaben sich aber Hinweise darauf, dass 1-MT *in vivo* auch IDO-unabhängige Effekte vermittelt, die eine Modulation der Immunantwort bewirken. Diese grundlegenden Untersuchungen zu IDO-induzierten Effekten und deren Blockade am Modelltier Schwein sind besonders im Kontext des therapeutischen Einsatzes von 1-MT beim Menschen relevant und sollten daher bei der derzeitigen Entwicklung von Therapiestrategien zur IDO-Blockade berücksichtigt werden.

7 Summary

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is a rate-limiting enzyme for the degradation of tryptophan (Trp) along the kynurenine pathway to biological active metabolites such as kynurenine (Kyn), kynurenic acid (Kyna) or quinolinic acid (Quin). This pathway of Trp metabolism is a link between the immune and the nervous system and plays a crucial role in the regulation of the immune response. IDO expression is induced by inflammatory stimuli like lipopolysaccharide (LPS) or the proinflammatory cytokine TNF- α . An increased IDO activity was found in malignant tumors and is assumed to be associated with neurologic disorders like schizophrenia or Alzheimer's disease. In septic patients, the increased IDO activity is associated with a higher mortality risk and is used as a prognostic indicator for survival.

This study investigates the role of IDO activation as part of the innate immunity. Regulatory functions of IDO *in vivo* and potential therapeutic effects of its inhibition were proved. The pig was used as an animal model for this study because of the high similarity of its Trp metabolism to that of humans.

The activation of IDO was experimentally induced by a single intraperitoneal LPS administration and characterized by Trp metabolites in plasma and IDO protein expression. Furthermore, the pro- and the anti-inflammatory immune response, the activation of the HPA-axis and physiological consequences such as immunosuppression, changes of white blood count and sickness behaviour were analyzed. For inhibition of IDO activity, the specific IDO inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT) was used. Since nobody had applied 1-MT in pigs before, the kinetic for a single subcutaneous 1-MT administration was characterized. Based on this kinetic, a model for repeated 1-MT application was calculated.

The results show that a single administration of LPS induced a systemic inflammatory immune response and IDO activation in pigs. The immune response was characterized by increased pro- and anti-inflammatory cytokine concentrations and increased levels of cortisol in plasma. LPS treatment induced sickness behaviour, a modulation of the immune response and LPS tolerance. The IDO activation was documented by a depletion of Trp and an accumulation of metabolites of the kynurenine pathway. IDO protein expression was demonstrated for the first time in pigs and found to be inducible by LPS.

The repeated application of 1-MT caused an accumulation of 1-MT in plasma and tissue. However, there were no indications that IDO activity was inhibited by 1-MT. Neither the depletion of Trp nor the accumulation of Kyn in blood plasma were affected by the pretreatment with 1-MT. Likewise, there was no effect on LPS-induced changes

of Trp and Kyn by 1-MT in tissue. Nevertheless, the treatment with 1-MT influenced the immune system and the animals' behaviour independent from IDO activation. 1-MT-treated pigs showed increased numbers of lymphocytes, an elevated skin temperature and a reduced behavioural activity. In addition, a reduced LPS-induced generation of immature neutrophile granulocytes and increased fever in 1-MT treated pigs indicate a modulation of the immune response after LPS.

In conclusion, the data of this study demonstrate that a single administration of LPS is an appropriate model for the activation of IDO in pigs. Although 1-MT was accumulated in plasma and tissue, there was no evidence for an inhibition of the IDO activity *in vivo*. However, there were indications for immunomodulatory effects of 1-MT independently from IDO-activation. These results are highly relevant for a possible medical application because 1-MT is currently surveyed for a therapeutic treatment in humans.

8 Literaturverzeichnis

- Agaugué S, Perrin-Cocon L, Coutant F, André P, Lotteau V (2006): 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *Journal of Immunology* 177(4): 2061-71
- Asadullah, K, Sterry W, and Volk HD (2003): Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacological Reviews* 55(2): 241-69
- Atkins CM, Oliva AA Jr, Alonso OF, Pearse DD, Bramlett HM, Dietrich WD (2007): Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 208(1): 145-58
- Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH (2009): Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 41(3): 467-71
- Basran J, Rafice SA, Chauhan N, Efimov I, Cheesman MR, Ghamsari L, Raven EL (2008): A kinetic, spectroscopic, and redox study of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochemistry* 47(16):4752-60
- Bautista AP, Spitzer JJ (1995): Acute endotoxin tolerance downregulates superoxide anion release by the perfused liver and isolated hepatic nonparenchymal cells. *Hepatology* 21(3):855-62
- Beeson PB; With the Technical Assistance of Elizabeth Roberts (1947): Tolerance to bacterial pyrogens : I. Factors influencing its development. *The Journal of Experimental Medicine* 86(1): 29-38
- Beishuizen A, Thijs LG (2003): Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Journal of Endotoxin Research* 9(1): 3-24
- Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, Shearer GM (2007): HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 109(8): 3351-9
- Bocchieri MH, Talle MA, Maltese LM, Ragucci IR, Hwang CC, Goldstein G (1995): Whole blood culture for measuring mitogen induced T cell proliferation provides superior correlations with disease state and T cell phenotype in asymptomatic HIV-infected subjects. *Journal of Immunological Methods* 181(2): 233-43
- Bone RC, Sprung CL & Sibbald WJ (1992): Definitions for sepsis and organ failure. *Crit Care Med* 20: 724-726.
- Braun-Fahrlander C, Riedler J, Herz U, Eder W, Waser M, Grize L, Maisch S, Carr D, Gerlach F, Bufe A, Lauener RP, Schierl R, Renz H, Nowak D, von Mutius E; Allergy and Endotoxin Study Team (2002): Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. *The New England Journal of Medicine* 347(12): 869-77
- Breder CD, Hazuka C, Ghayur T, Klug C, Huginin M, Yasuda K, Teng M, Saper CB (1994): Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(24): 11393-7
- Burrows JF, Johnston JA (2012): Regulation of cellular responses by deubiquitinating enzymes: an update. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library* 17: 1184-200
- Cady SG, Sono M (1991): 1-Methyl-DL-tryptophan, beta-(3-benzofuranyl)-DL-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and beta-[3-benzo(b)thienyl]-DL-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 291(2): 326-33.

- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987): Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Research* 47(4): 936-42
- Cavaillon JM, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M (2003): Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *Journal of Endotoxin Research* 9(2): 101-7
- Changsirivathanathamrong D, Wang Y, Rajbhandari D, Maghzal GJ, Mak WM, Woolfe C, Duflo J, GebSKI V, dos Remedios CG, Celermajer DS, Stocker R (2011): Tryptophan metabolism to kynurenine is a potential novel contributor to hypotension in human sepsis. *Critical Care Medicine* 39(12): 2678-83
- Chauhan N, Thackray SJ, Rafice SA, Eaton G, Lee M, Efimov I, Basran J, Jenkins PR, Mowat CG, Chapman SK, Raven EL (2009): Reassessment of the reaction mechanism in the heme dioxygenases. *Journal of the American Chemical Society* 131(12): 4186-7
- Chung TK, Gelberg HB, Dorner JL, Baker DH (1991): Safety of L-tryptophan for pigs. *Journal of Animal Science* 69(7): 2955-60
- Coelho MM, Souza GE, Pelá IR (1992): Endotoxin-induced fever is modulated by endogenous glucocorticoids in rats. *The American Journal of Physiology* 263(2 Pt 2): R423-7
- Cupps TR, Fauci AS (1982): Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunological Reviews* 65: 133-55
- Dantzer R (2001): Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain, Behavior, and Immunity* 15(1): 7-24
- Dantzer R, O'Connor JC, Lawson MA, Kelley KW (2011): Inflammation-associated depression: from serotonin to kynurenine. *Psychoneuroendocrinology* 36(3): 426-36
- Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM (2004): Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infection and Immunity* 72(9): 5041-51
- Dauphinee SM, Karsan A (2005): Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 86(1): 9-22
- de Jager CP, van Wijk PT, Mathoera RB, de Jongh-Leuvenink J, van der Poll T, Wever PC (2010): Lymphocytopenia and neutrophil-lymphocyte count ratio predict bacteremia better than conventional infection markers in an emergency care unit. *Critical Care* 14(5): R192
- de Jong RA, Nijman HW, Boezen HM, Volmer M, Ten Hoor KA, Krijnen J, van der Zee AG, Hollema H, Kema IP (2011): Serum tryptophan and kynurenine concentrations as Parameters for indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with endometrial, ovarian, and vulvar cancer. *International Journal of Gynecological Cancer* 21(7): 1320-7
- de Waal M R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE (1991): Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 174(5): 1209-20
- Dimitrijević MV, Dudvarski ZR, Vucićević SS, Nesić VS, Pavlović BM (2011): [T lymphocyte function in laryngectomized patients]. *Acta Chirurgica Lugoslavica* 58(1): 67-72
- DiNatale BC, Murray IA, Schroeder JC, Flaveny CA, Lahoti TS, Laurenzana EM, Omiecinski CJ, Perdew GH (2010): Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicological Sciences: an Official Journal of the Society of Toxicology* 115(1): 89-97
- Erhardt S, Schwieler L, Nilsson L, Linderholm K, Engberg G (2007): The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiology & Behavior* 92: 203-09

- Forouhar F, Anderson JL, Mowat CG, Vorobiev SM, Hussain A, Abashidze M, Bruckmann C, Thackray SJ, Seetharaman J, Tucker T, Xiao R, Ma LC, Zhao L, Acton TB, Montelione GT, Chapman SK, Tong L (2007): Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(2): 473-8
- Fu X, Zunich SM, O'Connor JC, Kavelaars A, Dantzer R, Kelley KW (2010): Central administration of Lipopolysaccharide induces Depressive-like behavior in vivo and activates brain Indoleamine 2,3 Dioxygenase in murine organotypic hippocampal slice Cultures. *Journal of Neuroinflammation* 7: 43
- Fujigaki S, Takemura M, Hamakawa H, Seishima M, Saito K (2003): The mechanism of interferon-gamma induced anti Toxoplasma gondii by indoleamine 2,3-dioxygenase and/or inducible nitric oxide synthase vary among tissues. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 527: 97-103.
- Galanos C, Lüderitz O, Rietschel ET, Westphal O, Brade H, Brade L, Freudenberg M, Schade U, Imoto M, Yoshimura H, et al. (1985): Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 148(1): 1-5.
- González A, Varo N, Alegre E, Díaz A, Melero I (2008): Immunosuppression routed via the kynurenine pathway: a biochemical and pathophysiologic approach. *Advanced Clinical Chemistry* 45: 155-197
- Grant RS, Naif H, Espinosa M, Kapoor V (2000): IDO induction in IFN-gamma activated astroglia: a role in improving cell viability during oxidative stress. *Redox report: Communications in Free Radical Research* 5(2-3): 101-4
- Greisman SE, Young EJ, Woodward WE (1966): Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *The Journal of Experimental Medicine* 124(5):983-1000
- Greisman SE, Young EJ, Carozza FA Jr (1969): Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *Journal of Immunology* 103(6): 1223-36
- Grohmann, U., C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, P. Puccetti. (2002): CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nature Immunology* 3: 1097-1101.
- Guillemin G J, Meininger V, Brew BJ (2005): Implications for the kynurenine pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative Diseases* 2(3-4): 166-176
- Gutierrez EG, Banks WA, Kastin AJ (1993): Murine tumor necrosis factor alpha is transported from blood to brain in the mouse. *Journal of Neuroimmunology* 47(2): 169-76
- Hart BL (1988): Biological basis of the behavior of sick animals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 12(2): 123-37
- Hasday JD, Singh IS (2000): Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *Cell stress & Chaperones* 5(5): 471-80
- Heseler K, Spekker K, Schmidt SK, MacKenzie CR, Däubener W (2008): Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 52(2): 273-81
- Higuchi K and Hayaishi O (1967): Enzymic formation of d-kynurenine from d-tryptophan. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 20(2): 397-403
- Hollingshead BD, Beischlag TV, Dinatale BC, Ramadoss P, Perdew GH (2008): Inflammatory signaling and aryl hydrocarbon receptor mediate synergistic induction of interleukin 6 in MCF-7 cells. *Cancer Research* 68(10): 3609-17

- Hou DY, Muller AJ, Sharma MD, DuHadaway J, Banerjee T, Johnson M, Mellor AL, Prendergast GC, Munn DH (2007): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses. *Cancer Research* 67(2): 792-801
- Howard RJ, Simmons RL (1974): Acquired immunologic deficiencies after trauma and surgical procedures. *Surgery, Gynecology & Obstetrics* 139(5): 771-82
- Huttunen R, Syrjänen J, Aittoniemi J, Oja S, Raitala A, Laine J, Pertovaara M, Vuento R, Huhtala H, Hurme M (2010): High activity of Indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock* 33(2): 149-54
- Janeway CA jr., Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002): Immunologie. 5. Auflage-Heidelberg; Berlin: Spektrum, Akademischer Verlag ISBN 3-8274-1079-7
- Jia L, Schweikart K, Tomaszewski J, Page JG, Noker PE, Buhrow SA, Reid JM, Ames MM, Munn DH (2008): Toxicology and pharmacokinetics of 1-methyl-d-tryptophan: absence of toxicity due to saturating absorption. *Food and Chemical Toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46(1): 203-11
- Jiang GM, He YW, Fang R, Zhang G, Zeng J, Yi YM, Zhang S, Bu XZ, Cai SH, Du J (2010): Sodium butyrate down-regulation of indoleamine 2, 3-dioxygenase at the transcriptional and post-transcriptional levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42(11): 1840-6
- Johnson RW, von Borell E (1994): Lipopolysaccharide-induced sickness behavior in pigs is inhibited by pretreatment with indomethacin. *Journal of Animal Science* 72(2): 309-14
- Jung ID, Lee MG, Chang JH, Lee JS, Jeong YI, Lee CM, Park WS, Han J, Seo SK, Lee SY, Park YM (2009): Blockade of Indoleamine 2,3-dioxygenase protects Mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *The Journal of Immunology* 182(5): 3146-54
- Jungi W (2000): Klinische Veterinärimmunologie. Stuttgart, © Enke im Hippokrates Verlag ISBN 3-7773-1431-5
- Kahler DJ, Mellor AL (2009): T cell regulatory plasmacytoid dendritic cells expressing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Handbook of Experimental Pharmacology* 188: 165-96
- Kanai M, Nakamura T, Funakoshi H (2009): Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene: differential regulation in the mouse nervous system during development. *Neuroscience Research* 64(1): 111-7
- Karunakaran S, Umapathy NS, Thangaraju M, Hatanaka T, Itagaki S, Munn DH, Prasad PD, Ganapathy V (2008): Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB0,+) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy. *The Biochemical Journal* 414(3): 343-55
- Kiank C, Zeden JP, Drude S, Domanska G, Fusch G, Otten W, Schuett C (2010): Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans. *PLoS One* 5(7): e11825
- King, NJC and Thomas SR. (2007): Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(12): 2167-72
- Kixmüller M (2004): Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie. Dissertation, München
- Klosterhalfen B, Hörstmann-Jungemann K, Vogel P, Flohé S, Offner F, Kirkpatrick CJ, Heinrich PC (1992): Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochemical Pharmacology* 43(10): 2103-9
- Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002): Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends in Neurosciences* 25(3): 154-9

- Koopmans SJ, Guzik AC, van der Meulen J, Dekker R, Kogut J, Kerr BJ, Southern LL (2006): Effects of supplemental L-tryptophan on serotonin, cortisol, intestinal integrity, and behavior in weanling piglets. *Journal of Animal Science* 84(4): 963-71
- Koopmans SJ, van der Staay FJ, Le Floc'h N, Dekker R, van Diepen JT, Jansman AJ (2012): Effects of surplus dietary L-tryptophan on stress, immunology, behavior, and nitrogen retention in endotoxemic pigs. *Journal of Animal Science* 90(1): 241-51
- Kotake Y and Masayama T (1936): Über den Mechanismus der Kynureninbildung aus Tryptophan. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 243: 237-244
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-85
- Lancellotti S, Novarese L, De Cristofaro R (2011): Biochemical properties of indoleamine 2,3-dioxygenase: from structure to optimized design of inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 18(15): 2205-14
- Layé S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R (1994): Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain research: Molecular Brain Research* 27(1): 157-62
- Le Floc'h N, Otten W, Merlot E (2011): Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids* 41(5): 1195-205
- Le Floc'h N, Melchior D and Sève B (2008): Dietary tryptophan helps to preserve tryptophan homeostasis in pigs suffering from lung inflammation. *Journal of Animal Science* 86(12): 3473-79
- Lehner MD, Hartung T (2002): Endotoxin tolerance-mechanisms and beneficial effects in bacterial infection. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 144: 95-141
- Lehner MD, Ittner J, Bundschuh DS, van Rooijen N, Wendel A, Hartung T (2001): Improved innate immunity of endotoxin-tolerant mice increases resistance to Salmonella enterica serovar typhimurium infection despite attenuated cytokine response. *Infection and Immunity* 69(1):463-71
- Li J, Li DF, Xing JJ, Cheng ZB, Lai CH (2006): Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotrophic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 84(9): 2374-81.
- Lima Trajano ET, Sternberg C, Caetano M, Santos Silva MA, Porto LC, Santos JC, Ribeiro ML, Magalhães CB, Zin WA, Benjamim CF, Valença SS (2011): Endotoxin-induced acute lung injury is dependent upon oxidative response. *Inhalation Toxicology* 23(14): 918-26
- Lindsay, J. O. and Hodgson H. J. F (2001): The immunoregulatory cytokine interleukin-10--a therapy for Crohn's disease? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 15(11): 1709-16
- Linthorst AC, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM (1996): Activation of serotonergic and noradrenergic neurotransmission in the rat hippocampus after peripheral administration of bacterial endotoxin: involvement of the cyclo-oxygenase pathway. *Neuroscience* 72(4): 989-97
- Lipcsey M, Larsson A, Eriksson MB, Sjölin J (2008): Effect of the administration rate on the biological responses to a fixed dose of endotoxin in the anesthetized pig. *Shock* 29(2): 173-180
- Liu X, Newton RC, Friedman SM, Scherle PA (2009): Indoleamine 2,3-dioxygenase, an emerging target for anti-cancer therapy. *Current Cancer Drug Targets* 9(8): 938-952
- Liu S, Zhu X, Liu Y, Wang C, Wang S, Tang X, Ni X (2011): Endotoxin tolerance of adrenal gland: attenuation of corticosterone production in response to lipopolysaccharide and adrenocorticotrophic hormone. *Critical Care Medicine* 39(3): 518-26.

- Löb S, Königsrainer A, Zieker D, Brücher BL, Rammensee HG, Opelz G, Terness P (2009): IDO1 and IDO2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 58(1): 153-7
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-75
- Mándi Y, Vécsei L (2011): The kynurenine system and immunoregulation. *Journal of Neural Transmission* 119(2):197-209.
- Melchior D, Le Floch N, Sève B (2003): Effects of chronic lung inflammation on tryptophan metabolism in piglets. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 527: 359-62
- Melchior D, Mézière N, Sève B, Le Floch N (2005): Is tryptophan catabolism increased under indoleamine 2,3 dioxygenase activity during chronic lung inflammation in pigs? *Reproduction, Nutrition, Development* 45(2): 175-83
- Mellor, A L. and Munn D H (2004): IdO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nature Reviews Immunology* 4(10): 762-74
- Menge C, Neufeld B, Hirt W, Bauerfeind R, Baljer G, Wieler LH (1999): Phenotypical characterization of peripheral blood leucocytes in the newborn calf. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 46(8): 559-65
- Metz R, Duhadaway JB, Kamasani U, Laury-Kleintop L, Muller AJ, Prendergast GC (2007): Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Research* 67(15): 7082-7
- Milner EC, Rudbach JA, Von Eschen KB (1983): Cellular responses to bacterial lipopolysaccharide: LPS facilitates priming of antigen-reactive T cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 18(1): 29-35
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65(1-2):55-63
- Moffett J R. and Namboodiri M A (2003): Tryptophan and the immune response. *Immunology & Cell Biology* 81(4): 247-65
- Moon RJ, Berry LJ (1968): Effect of Tryptophan and Selected Analogues on body Temperature of Endotoxin-poisoned mice. *Journal of Bacteriology* 95(3): 764
- Moroni F, Cozzi A, Sili M, Mannaioni G (2012): Kynurenic acid: a metabolite with multiple actions and multiple targets in brain and periphery. *Journal of Neural Transmission* 119(2):133-9
- Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, Sutanto-Ward E, Prendergast GC (2005): Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppressor gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nature Medicine* 11(3): 312-9
- Munn DH, Mellor AL (2004): IDO and tolerance to tumors. *Trends in Molecular Medicine* 10(1): 5-8
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL (1998): Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281(5380): 1191-1193
- Munn DH (2006): Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Current Opinion in Immunology* 18(2): 220-225
- Niepage H (1989): Methoden der praktischen Hämatologie für Tierärzte. Parey; Auflage: 2. neubearb. Aufl. ISBN 3489514165
- Nilsberth C, Elander L, Hamzic N, Norell M, Lönn J, Engström L, Blomqvist A (2009): The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced fever by mechanisms independent of prostaglandin E2. *Endocrinology* 150(4): 1850-60

- Odemuyiwa SO, Ghahary A, Li Y, Puttagunta L, Lee JE, Musat-Marcu S, Ghahary A, Moqbel R. (2004): Cutting Edge: Human Eosinophils Regulate T Cell Subset Selection through Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *The Journal of Immunology* 2004; 173(10): 5909-5913
- Ohashi H, Saito K, Fujii H, Wada H, Furuta N, Takemura M, Maeda S, Seishima M (2004): Changes in quinolinic acid production and its related enzymes following D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic injury. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 428(2): 154-9
- Ohira K, Hagihara H, Toyama K, Takao K, Kanai M, Funakoshi H, Nakamura T, Miyakawa T (2009): Expression of tryptophan 2,3-dioxygenase in mature granule cells of the adult mouse dentate gyrus. *Molecular Brain* 3(1): 26
- Oka T, Oka K, Scammell TE, Lee C, Kelly JF, Nantel F, Elmquist JK, Saper CB (2000): Relationship of EP(1-4) prostaglandin receptors with rat hypothalamic cell groups involved in lipopolysaccharide fever responses. *The Journal of Comparative Neurology* 428(1): 20-32
- Okamoto T, Toné S, Kanouchi H, Miyawaki C, Ono S, Minatogawa Y (2007): Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue : Down-regulation of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) transcription by tryptophan and its analogue. *Cytotechnology* 54(2): 107-13
- Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K (2008): Urinary excretory ratio of anthranilic acid/kynurenic acid as an index of the tolerable amount of tryptophan. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72(7): 1667-72
- Opitz CA, Litzenburger UM, Opitz U, Sahm F, Ochs K, Lutz C, Wick W, Platten M (2011): The indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) inhibitor 1-methyl-D-tryptophan upregulates IDO1 in human cancer cells. *PLoS One* 6(5): e19823
- Orabona C, Pallotta MT, Volpi C, Fallarino F, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P (2008): SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(52): 20828-33
- Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG (2006): Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *Journal of Immunology* 177(3): 1967-74
- Pahl HL (1999): Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18(49): 6853-66
- Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Grohmann U, Puccetti P, Fallarino F (2010): Proteasomal Degradation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in CD8 Dendritic Cells is Mediated by Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3). *International Journal of Tryptophan Research* 3: 91-7
- Paluszkiwicz P, Zgrajka W, Saran T, Schabowski J, Piedra JL, Fedkiv O, Rengman S, Pierzynowski SG, Turski WA (2009): High concentration of kynurenic acid in bile and pancreatic juice. *Amino Acids* 37(4): 637-41
- Parker SJ, Watkins PE (2001): Experimental models of Gram-negative sepsis. *British Journal of Surgery* 88: 22-30
- Parrott RF, Vellucci SV, Goode JA, Lloyd DM, Forsling ML (1997): Interrelated adrenocortical and neurohypophysial responses associated with fever in endotoxin-treated pigs. *The American Journal of Physiology* 273(3 Pt 2): R1046-52
- Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ (2003): The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine* 9(5-8): 125-34
- Peters JC (1991): Tryptophan nutrition and metabolism: an overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 294: 345-58

- Petrovsky N, Harrison LC (1995): Cytokine-based human whole blood assay for the detection of antigen-reactive T cells. *Journal of Immunological Methods* 186(1): 37-46
- Qian F, VILLELLA J, WALLACE PK, Mhaweche-Fauceglia P, Tario JD Jr, Andrews C, Matsuzaki J, Valmori D, Ayyoub M, Frederick PJ, Beck A, Liao J, Cheney R, Moysich K, Lele S, Shrikant P, Old LJ, Odunsi K (2009): Efficacy of levo-1-methyl tryptophan and dextro-1-methyl tryptophan in reversing indoleamine-2,3-dioxygenase-mediated arrest of T-cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* 69(13): 5498-504
- Ravid T, Hochstrasser M (2008): Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9(9): 679-90
- Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zähringer U, Seydel U, Di Padova F, et al. (1994): Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *The FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 8(2): 217-25
- Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T, Vacca C, Bistoni F, Fioretti MC, Grohmann U, Segal BH, Puccetti P (2008): Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature* 451(7175): 211-5
- Rosas-Ballina M, Tracey KJ (2009): Cholinergic control of inflammation. *Journal of Internal Medicine* 265(6): 663-79
- Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA (2006): Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert reviews in Molecular Medicine* 8(20):1-27
- Schettler G & Greten H, Hrsg. (1998): *Innere Medizin. Verstehen, Lernen, Anwenden*. Thieme Verlag, Stuttgart: 9. Aufl. ISBN 3-13-552209-1.
- Schmidt SK (2010): Antimikrobielle und immunregulatorische Eigenschaften der Tryptophan 2,3-Dioxygenase und die Analyse der funktionellen Effekte des Tryptophan-Analogons 1-Methyl-Tryptophan. Dissertation, Düsseldorf
- Shen YB, Voilqué G, Kim JD, Odle J, Kim SW (2012): Effects of elevating tryptophan intake on growth and physiological changes in nursery pigs. *Journal of Animal Science* [Epub ahead of print]
- Srivastava R, Kalita J, Khan MY, Misra UK (2011): Status of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in different brain regions of a rat model of Japanese encephalitis. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society* [Epub ahead of print]
- Sternberg EM, Parker CW (1988): Immunopharmacologic aspects of lymphocyte regulation. *Lymphocyte Structure and function* (edited by Marchalonis JJ), New York: 1-53
- Stone TW, Darlington LG (2002): Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nature reviews. Drug Discovery* 1(8): 609-20
- Suzuki S, Toné S, Takikawa O, Kubo T, Kohno I, Minatogawa Y (2001): Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan 2,3-dioxygenase in early concepti. *The Biochemical Journal* 355(Pt 2): 425-9
- Takikawa O (2005): Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated l-tryptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1): 12-19
- Taniguchi T, Sono M, Hirata F, Hayaishi O, Tamura M, Hayashi K, Iizuka T, Ishimura Y (1979): Indoleamine 2,3-dioxygenase. Kinetic studies on the binding of superoxide anion and molecular oxygen to enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* 254(9): 3288-94
- Taylor MW, Feng GS (1991): Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5(11): 2516-22

- Thomas SR, Stocker R (1999): Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Report: Communications in Free Radical Research* 4(5): 199-220
- Thomas SR, Terentis AC, Cai H, Takikawa O, Levina A, Lay PA, Freewan M, Stocker R (2007): Post-translational regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase activity by nitric oxide. *The Journal of Biological Chemistry* 282(33): 23778-87
- Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ (2003): Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nature Medicine* 9(10): 1269-74
- Warren EJ, Finck BN, Arkins S, Kelley KW, Scamurra RW, Murtaugh MP, Johnson RW (1997): Coincidental changes in behavior and plasma cortisol in unrestrained pigs after intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology* 138(6): 2365-2371
- Webb SR, Gascoigne NR (1994): T-cell activation by superantigens. *Current Opinion in Immunology* 6(3): 467-75
- Webel DM, Finck BN, Baker DH, Johnson RW (1997): Time course of increased plasma cytokines, cortisol, and urea nitrogen in pigs following intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 75(6): 1514-1520
- Weichselbaum TE (1946): An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *American Journal of Clinical Pathology: Technical Section* 10: 40-49.
- Westphal O, Lüderitz O (1954): Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angewandte Chemie* 66 (13-14): 407-17
- Wright KJ, Balaji R, Hill CM, Dritz SS, Knoppel EL, Minton JE (2000): Integrated adrenal, somatotrophic, and immune responses of growing pigs to treatment with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science* 78(7): 1892-9
- Yamamoto C, Yoshida S, Taniguchi H, Qin MH, Miyamoto H, Mizuguchi Y (1993): Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infection and Immunity* 61(5): 1972-9
- Yang HJ, Yen MC, Lin CC, Lin CM, Chen YL, Weng TY, Huang TT, Wu CL, Lai MD (2011): A combination of the metabolic enzyme inhibitor APO866 and the immune adjuvant L-1-methyl tryptophan induces additive antitumor activity. *Experimental Biology and Medicine* 235(7): 869-76
- Yoshida R, Hayaishi O (1987): Indoleamine 2,3-dioxygenase. *Methods in Enzymology* 142: 188-95
- Yuasa HJ, Takubo M, Takahashi A, Hasegawa T, Noma H, Suzuki T. (2007): Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. *Journal of Molecular evolution* 65(6): 705-14
- Zahorec R (2001): Ratio of neutrophil to lymphocyte counts--rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill. *Bratislavské Lekárske Listy* 102(1): 5-14

Internetquellen:

clinicaltrials.gov: <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=1-Methyl-D-tryptophan> (Stand vom 15.02.2012)

NewLink genetics: clinical Trials: <http://www.linkp.com/trials/index.html> (Stand vom 15.02.2012)

9 Anhang

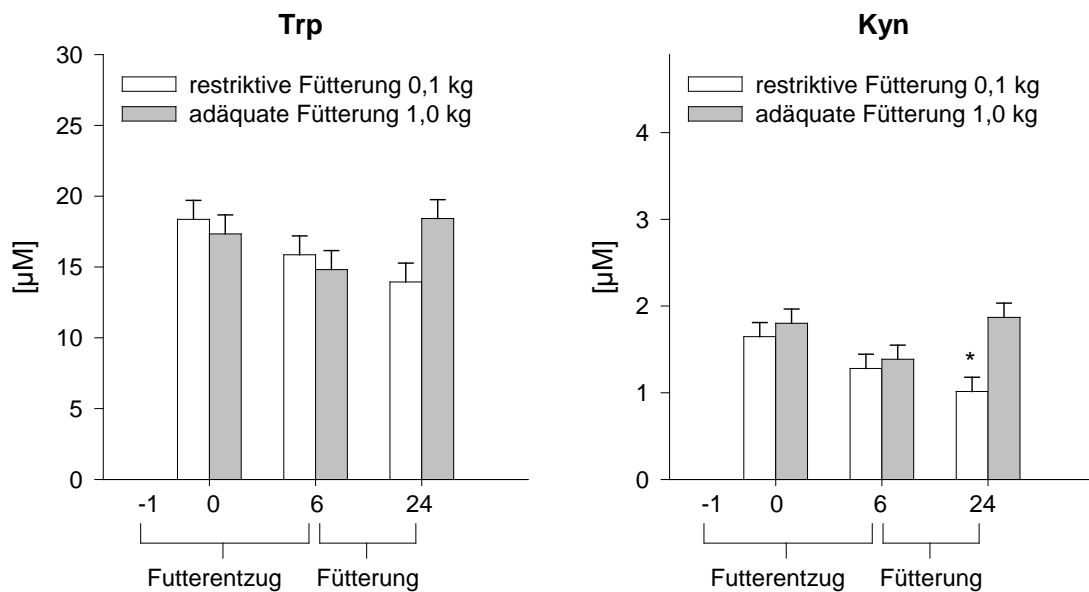


Abb. A 1 Einfluss einer Futterrestriktion auf Trp und Kyn. Im Zeitraum von -1 h bis 6 h wurde das Futter entzogen. Danach erhielten die Tiere 1 bzw. 0,1 kg Futter. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 5 pro Gruppe. * $p < 0,5$

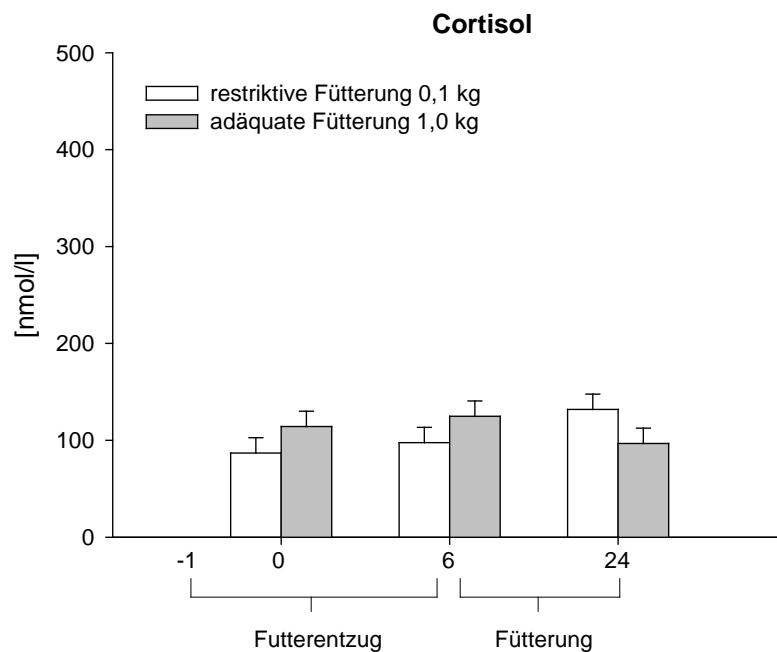


Abb. A 2 Einfluss einer Futterrestriktion auf Cortisol-Konzentrationen. Im Zeitraum von -1 h bis 6 h wurde das Futter entzogen. Danach erhielten die Tiere 1 bzw. 0,1 kg Futter. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 5 pro Gruppe.

Tab. A 1 Verhältnis von 1-MT und Trp in 12 Geweben des Schweins nach wiederholter 1-MT-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE der Entnahmzeitpunkte 6 und 24 h nach i.p. NaCl-Applikation. 1-MT+NaCl: n = 12

Organ	MT/Trp
Amygdala	0,93 \pm 0.27
Schilddrüse	1,27 \pm 0.27
PFC	1,36 \pm 0.27
Hippo	1,54 \pm 0.27
Milz	1,78 \pm 0.27
Nebenniere	1,83 \pm 0.27
Niere	2,09 \pm 0.27
Hypothalamus	2,15 \pm 0.27
Leber	2,21 \pm 0.27
Lunge	3,19 \pm 0.27
Herz	3,79 \pm 0.27
Muskel	5,42 \pm 0.27

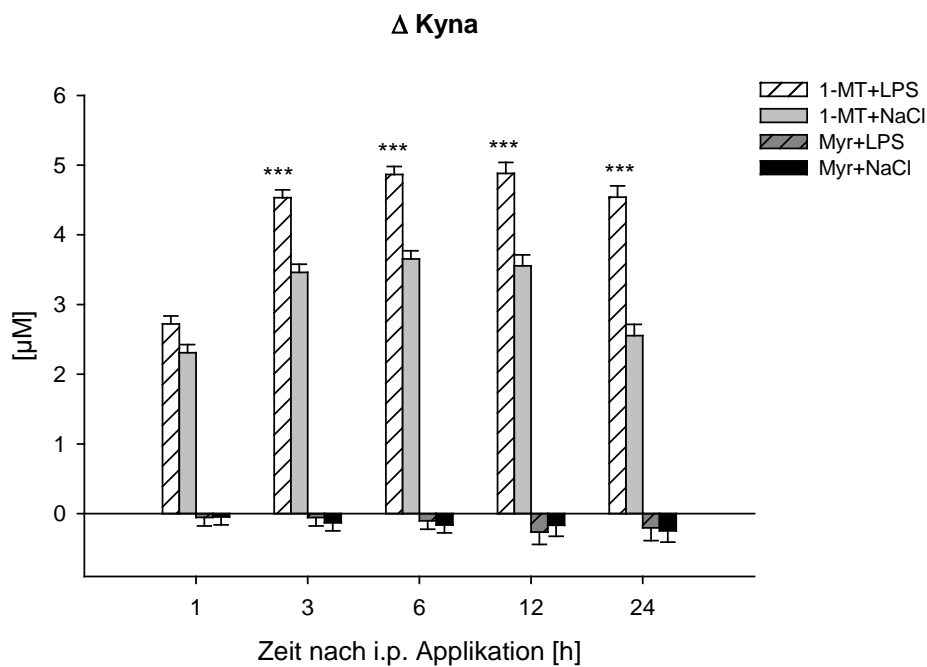


Abb. A 3 Einfluss von LPS/NaCl auf die Änderung (Δ) der Kyna-Konzentrationen 1-MT/Myr-vorbehandelter Tiere. Δ = Differenz zum Zeitpunkt 0 h. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung. Signifikanzen sind innerhalb eines Entnahmzeitpunktes dargestellt: *** p < 0,001

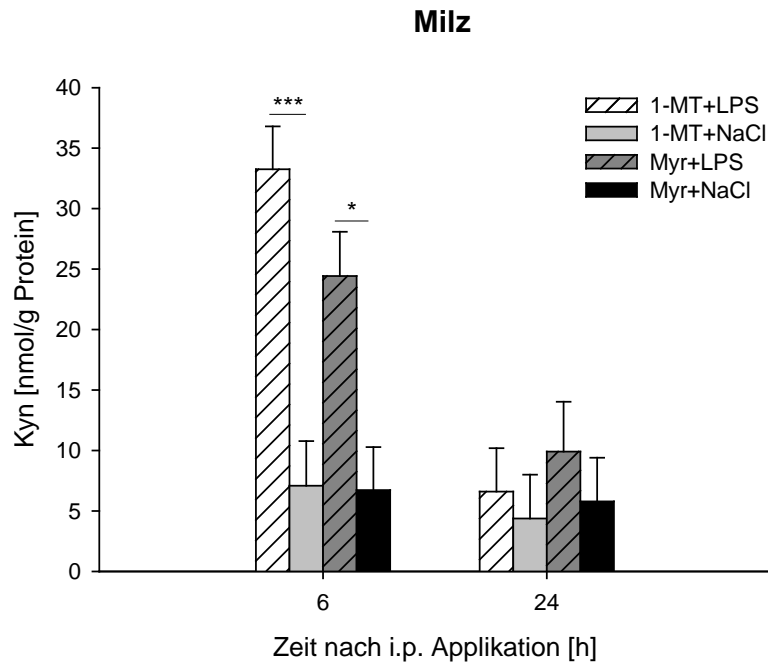


Abb. A 4 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Kyn-Konzentration in der Milz nach i.p. LPS/NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 6 pro Behandlung und Entnahmezzeitpunkt. *** p < 0,001; * p < 0,05

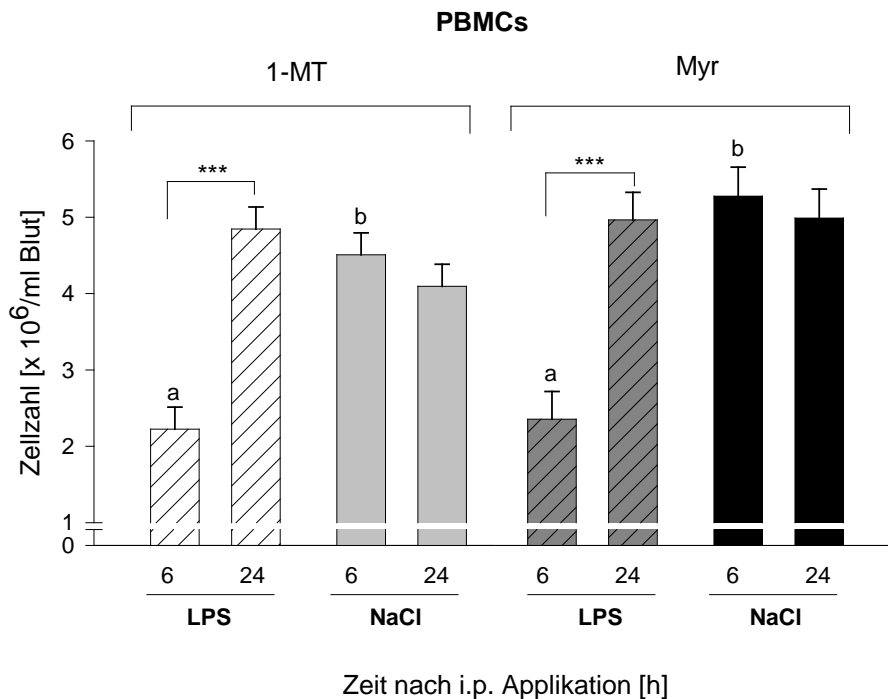


Abb. A 5 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Zahl der PBMCs im Blut nach i.p. LPS oder NaCl-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE. n = 11-12 pro Behandlung. *** p < 0,001, ^{a,b} p < 0,05

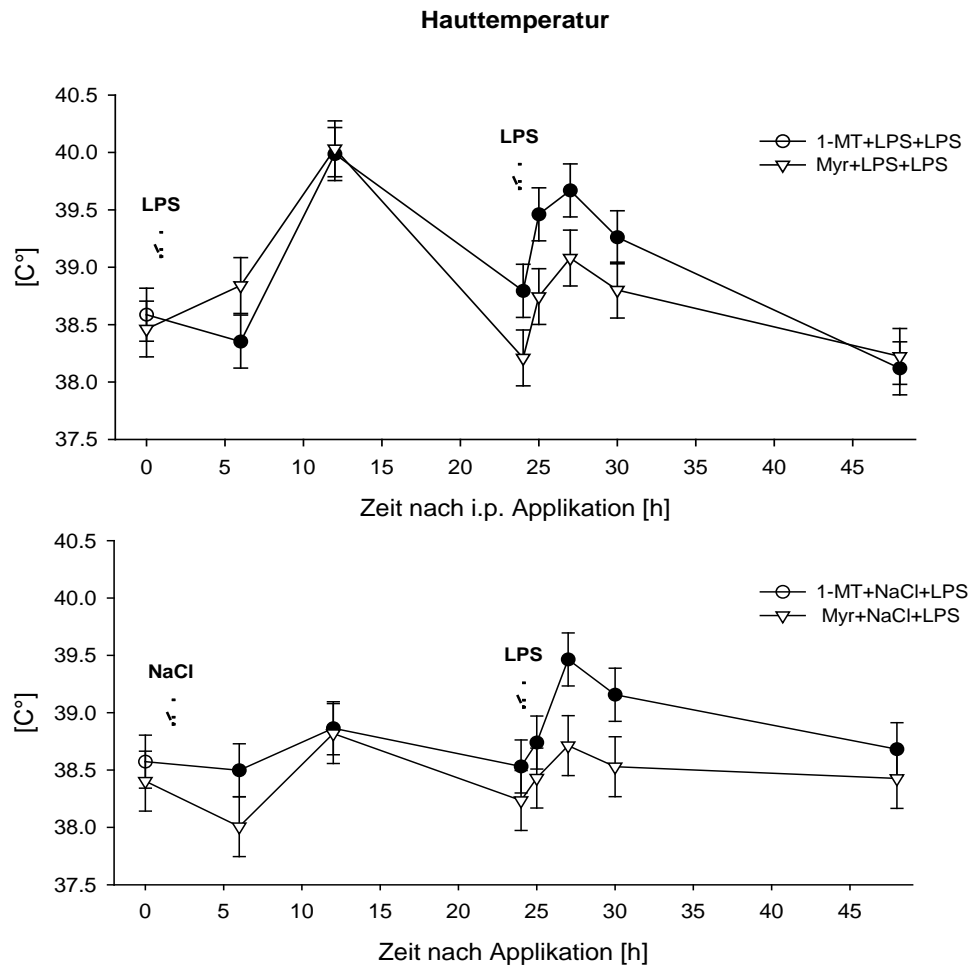


Abb. A 6 Einfluss von 1-MT/Myr auf die Hauttemperatur nach i.p. LPS/NaCl-Applikation und nachfolgender LPS-Applikation. Die Ergebnisse sind dargestellt als LSM \pm SE.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Weiterhin erkläre ich hiermit, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei Allen bedanken, die mich bei dem experimentellen Teil und der Fertigstellung dieser Dissertationsschrift unterstützt haben.

Ich danke Herrn Dr. Winfried Otten und Frau Dr. Ellen Kanitz für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser äußerst interessanten Fragestellung und für die fachliche Betreuung von der Versuchsplanung und Durchführung bis hin zum Anfertigen der Dissertationsschrift.

Frau Dr. Margret Tuchscherer danke ich vor allem für ihre Unterstützung bei der Bearbeitung der immunologischen Fragestellungen in dieser Arbeit und für ihre Anregungen und Korrekturen während der schriftlichen Abfassung dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Armin Tuchscherer für die sehr gute fachliche Betreuung zur statistischen Auswertung und für seine stets offene Tür bei Fragen und Problemen.

Ich danke Frau PD Dr. Ulrike Gimsa für die Übernahme der Dissertations-Betreuung im Namen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät und die damit verbundene Betreuung des Projektes.

Ich bedanke mich weiterhin bei unseren Kooperationspartnern in Greifswald ohne deren fachlichen Ratschläge, Mitwirkung und Ideen dieses Projekt nicht hätte verwirklicht werden können:

Ich danke Frau Prof. Dr. Barbara Bröker, Frau Prof. Dr. Christine Schütt und Frau Dr. Grazyna Domanska für die gute Zusammenarbeit während des gesamten Promotionsprojektes. Herrn Dr. Gerhard Fusch und Frau Dr. Cornelia Müller danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Weitschies und Frau Dr. Anne Seidlitz für die hervorragende Beratung in Fragen zur Anwendung von 1-MT und die Berechnung eines Modells zur 1-MT-Applikation. Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe für die Aufarbeitung und Bereitstellung des 1-MT vor jedem Versuchsdurchgang.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Werner Siegmund und Herrn Dr. Eberhard Scheuch für die Durchführung der Trp-Analytik im Gewebe und für wichtige Denkanstöße zur Auswertung der Daten. Herrn Dr. Scheuch möchte ich weiterhin für sein persönliches Engagement bezüglich des Projektes danken und dafür, dass er stets Zeit zur Klärung von Fragen und Problemen fand.

Ich danke allen Mitarbeitern des Fachbereichs Verhaltensphysiologie, ohne deren tatkräftige Hilfe, sowohl innerhalb als auch außerhalb der regulären Arbeitszeiten, die praktische Umsetzung dieses Projektes unmöglich gewesen wäre. Das gilt sowohl für Arbeiten im Labor als auch die Vorbereitung und die Durchführung der tierexperimentellen Arbeiten:

Mein Dank gilt Birgit Sobczak, Regina Wal, Petra Müntzel, Dagmar Mähling, Silvia Langhoff und Martina Pohlmann für ihre Hilfe im Labor und im Stall und für das stets angenehme Arbeitsklima. Ebenfalls danke ich Heinz Deike für seine Unterstützung und sein Ideenreichtum bei technischen Fragen sowie die Unterstützung im Stall, wenn Not am Mann war. Weiterhin danke ich Evelin Normann für ihre spontane Hilfe bei Versuchen rund um das Verhalten. Ich danke Dr. Sandra Döpjan für ihre Hilfe bei verhaltensrelevanten Fragestellungen. Ich danke weiterhin Evelyne Hamel und Jutta Hoffmann für ihre Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten.

Ich danke ebenfalls dem Stallpersonal der Experimentalanlage Schwein, Heide Lore Sievert, Dirk Ameling, Frank Hintze, Heidrun Wieck und Heidrun Schumann, die besonders zum Gelingen der tierexperimentellen Arbeiten beigetragen haben.

Ich danke weiterhin Frau Dr. Karin Wollenhaupt für die fachlichen Hinweise rund um Fragen zur Proteinanalytik und für die stets kooperative Zusammenarbeit, wenn es um die Nutzung der Dunkelkammer ging. Ich danke Frau Hannelore Klückmann und Frau Gesine Krüger für die Weitergabe von Tipps und Tricks zur Proteinanalytik.

Für den stets konstruktiven Austausch von Ideen und die moralische Unterstützung während der Promotionszeit danke ich weiterhin Theresa Hameister. Dr. Wolfgang Ruth sei für seine interessanten Denkanstöße rund um den Einsatz von 1-MT gedankt.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern und meiner Schwester, die mich stets unterstützt haben. Insbesondere danke ich Kerstin Wirthgen für ihre Hilfe bei letzten kurzfristigen Korrekturen.

Ich danke meinen Freunden und Kollegen Mario Hlawitschka, Anita Karcz, Katharina Graunke und Pia Klöckner für ihr stets offenes Ohr und den Erfahrungsaustausch.

Zu guter Letzt danke ich Christian Manteuffel dafür, dass er mir immer den Rücken frei gehalten hat, für seine Hilfe bei allen computertechnischen Problemen und für die fachliche und moralische Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Für die Finanzierung meiner Promotion danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem FBN Dummerstorf.