Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Abteilung Immunologie
Direktorin Univ. Prof. Dr. med. Barbara Bröker
der Universitätsmedizin Greifswald

Thema: Toxische Tryptophanmetabolite und deren Nachweis im septischen Syndrom.

Inauguraldissertation

zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der
Universitätsmedizin Greifswald

Greifswald
2013

vorgelegt von
Jan-Philip Zeden
am 27.08.2013

Gutacher

Erstgutachter:
Frau Professorin Dr. med. Barbara Bröker
Abteilung für Immunologie
Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin
Universitätsmedizin Greifswald

Zweitgutachter:
Prof. Jochen Hühn
Leiter der Forschungsgruppe ‚Experimentelle Immunologie'
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstraße 7
38124 Braunschweig

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar
Ort: Diagnostikzentrum Seminarraum J.04.33/34, Universitätsmedizin Greifswald
Tag der Disputation: 15. Mai 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **vii**

Tabellenverzeichnis **ix**

Abkürzungsverzeichnis **1**

1. Einleitung **7**

1.1. Immunregulation . . . 7
1.2. Tryptophanmetabolismus . . . 8
1.2.1. Biochemie von Tryptophan . . . 8
1.2.2. Kynureninabbauweg der Leber . . . 9
1.2.3. Tryptophan als Vorläufer von NAD . . . 9
1.2.4. Tryptophan 2,3-Dioxygenase . . . 9
1.3. Biochemie der Indoleamin 2,3-Dioxygenase . . . 11
1.3.1. IDO Induktion und exprimierende Gewebe . . . 12
1.3.2. Pathologische IDO Aktivität . . . 23
1.3.3. IDO in der Transplantationsmedizin . . . 24
1.3.4. Konkurrierende Stoffwechselwege für Tryptophan . . . 25
1.4. Indoleaminstoffwechsel bei Niereninsuffizienz . . . 26
1.5. Sepsis . . . 26
1.5.1. Definition und Epidemiologie . . . 26
1.5.2. Pathophysiologie . . . 29
1.5.3. Multiorganversagen (MOV) . . . 34
1.5.4. Therapie . . . 35
1.6. Arbeitshypothese und Fragestellung . . . 36

2. Materialien **39**

2.1. Geräte . . . 39
2.2. Laborzubehör . . . 40

2.3. Chemikalien und Reagenzien 40
2.4. Antikörper 41

3. Methoden **43**
3.1. Tandem-Massenspektrometrie (MS^2) 43
3.2. Klinische Studien 48
3.2.1. Klinische Studie chirurgischer intensivtherapierter Patienten 48
3.2.1.1. Routinelaboruntersuchungen 51
3.2.1.2. Messung der HLA-DR Rezeptordichte auf Monozyten 52
3.2.1.3. Klinische Scores und Definitionen 52
3.2.1.4. Statistische Analyse 53
3.2.2. Klinische Studie an Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz 54
3.2.2.1. Studienpopulation 54
3.2.2.2. Erfassung der Nierenfunktion und Messung von Parametern der chronischen Entzündungsaktivität 55
3.2.2.3. Statistik 56

4. Ergebnisse **57**
4.1. Etablierung der quantitativen Tandem-Massenspektrometrie 57
4.1.1. Qualitätsmanagement 57
4.2. Klinische Studie an intensivtherapierten Patienten 63
4.2.1. Patientencharakteristik 63
4.2.2. Aktivierung des Kynureninabbauweges in kritisch kranken Patienten . . . 64
4.2.3. Erhöhte Chinolinsäuresynthese geht der Ausbildung des septischen Syndroms voraus 66
4.2.4. Nierenversagen und Sepsis beeinflussen die Plasmaspiegel der Kynurenine unabhängig voneinander 71
4.3. Klinische Studie an Patienten mit chronischer Nierenerkrankung 74
4.3.1. Plasmakonzentrationen von Metaboliten des Kynureninabbauweges bei Patienten mit Niereninsuffizienz 74

5. Diskussion **79**
5.1. Methodenetablierung 79
5.2. Tryptophanmetabolismus bei kritisch kranken Patienten 80
5.3. Tryptophanmetabolismus in der Sepsis 82
5.4. Der Kynureninstoffwechsel in der Niereninsuffizienz 86

6. Zusammenfassung und Ausblick **89**

Literaturverzeichnis **93**

Danksagung **119**

A. Anhang **XI**

Abstracts XI

Publikationen XI

Abbildungsverzeichnis

1.1. Schema des Tryptophanstoffwechsels 10
1.2. Tertiärstruktur der Indoleamin 2,3-Dioxygenase 13
1.3. IDO Induktion 15
1.4. Signaltransduktion 17
1.5. Sepsisphasen und Sepsistypen 32

3.1. Ionenquelle 44
3.2. Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers 45
3.3. Fragmentierungsplot 45

4.1. Vergleich der Plasma- und Serumproben für TRP und KYN 60
4.2. Vergleich der Plasma- und Serumproben für KYNA und QUIN 60
4.3. Vergleich der Plasma- und Serumproben von OH-TRP und SER 61
4.4. Erfassung der zirkadianen Schwankung von TRP und KYN 62
4.5. Erfassung der zirkadianen Schwankung von KYNA und QUIN 62
4.6. Erfassung der zirkadianen Schwankung von OH-TRP und SER 63
4.7. Vergleich der Quotienten KYN/TRP und QUIN/TRP am ersten Tag 65
4.8. Vergleich von TRP und KYN am ersten Tag 66
4.9. Vergleich von KYNA und QUIN am ersten Tag 67
4.10. Vergleich von TRP/SER und SER am ersten Tag 68
4.11. Vergleich von HLA-DR am ersten Tag 68
4.12. Vergleich der Plasmaspiegel von Procalcitonin und C-reaktivem Protein 69
4.13. Kynureninstoffwechsel bei chronischer Nierenerkrankung 1 76
4.14. Kynureninstoffwechsel bei chronischer Nierenerkrankung 2 77

Tabellenverzeichnis

0.1. Verwendete Abkürzungen 1

1.1. Zelltypen mit der Fähigkeit zur IDO Expression. 14
1.2. IDO Induktoren 16
1.3. Neudefinition medizinischer Begriffe durch die Konsensus Konferenz der ACCP/SCCM 2001[107]. 27
1.4. Kriterien für die schwere Sepsis 28

2.1. Verwendete Geräte 39
2.2. Verwendetes Laborzubehör 40
2.3. Chemikalien und Reagenzien 40
2.4. Verwendete Antikörper 41

3.1. Probenzusammensetzung für die MS^2 46
3.2. MS Analyte 47
3.3. Patientencharakteristiken 48
3.4. Patientencharakteristiken bei Studieneintritt 49
3.5. Routineparameter 51
3.6. Studienpopulation der Studie an Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz . . 54

4.1. Intra-Assay Varianz 58
4.2. Gruppenvergleich der klinischen Scores und HLA-DR 64
4.3. ROC Analyse von Indoleamin Plasmawerten und Infektionsparamatern 70
4.4. Fallverteilung der randomisierten Stichprobe 71
4.5. Vergleich von Niereninsuffizienz und septischem Schock 73
4.6. Renale Funktionsparameter und Entzündungsmarker der drei Studiengruppen mit chronischer Nierenerkrankung 78

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 0.1.: Verwendete Abkürzungen

Abkürzung	*Bedeutung*
Abb(n).	Abbildung(en)
AHR	Arylhydrocarbonrezeptor
AML	akute myeloische Leukämie
ANOVA	Varianzanalyse
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
APP	Akute-Phasen-Proteine
AUC	Area Under The Curve
BD	Becton Dickinson
bzw.	beziehungsweise
CASP	Colon-Ascendes-Stent-Peritonitis
CD	Cluster of Differentiation
°C	Grad Celsius
chir.	chirurgisch
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CKD	chronische Nierenerkrankung
CLP	Cecal Ligation and Puncture
CpG	Cytosin-Phosphatidyl Guanin
cps	counts per second
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle
des	destilliert
Diff.-BB	Differentialblutbild
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid

Tabelle 0.1.: Fortsetzung: verwendete Abkürzungen

Abkürzung	*Bedeutung*
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
E.C.	Enzyme Comission Code
E. coli	*Escherichia coli*
Esi	Elektrospray Ionisationsquelle
ESRD	End-Stage Renal Disease
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FiO_2	inspriatorische O_2 Fraktion
FITC	Fluorescein-Thiocyanat
FSC	Forward Scatter
$Foxp^3$	Forkhead-Box-Protein P3
g	Gramm
GAS	Gamma-Activating Sequences
GCN2	General Control Non-Derepressible-2
GITR	Glucocorticoid-induzierter TNF Rezeptor
GMCSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gr.	griechisch
GvHR	Graft-versus-Host Reaktion
h	Stunde
(h)	human
H	Protonen
HDAC	Histondeacetylase
HMGB1	High-Mobility-Group-BOX 1
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hsCRP	High Sensitivity C reaktives Protein
HSP	Hitzeschockproteine
ICAM-1	Intercellular-Adhesion Molecule-1
ICU	Intensivpflegeeinheit
IDO	Indoleamin 2,3-Dioxygenase

Tabelle 0.1.: Fortsetzung: verwendete Abkürzungen

Abkürzung	*Bedeutung*
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon (alpha, beta und omega) Rezeptor
IFNGR	Interferon gamma Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Indo	Indoleamin 2,3-Dioxygenase-1 Gen
IRF1	Interferon-Regulatory Factor 1
ISR	Integrated Stress Response
ISRE	Interferon Stimulatory Response Elements
JAK	Janus Kinase
KI	Konfidenzintervall
KYN	Kynurenin
KYNA	Kynureninsäure
lat.	lateinisch
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LC	Liquid Chromatography
LPS	Lipopolysaccarid
M	Molekül
MAP	mittlerer arterieller Druck
MEF	Molecules of Equivalent Fluorochrome
MHC	Major Histocompartibility Complex
MIF	Makrophagen Migration Inhibitorischer Faktor
min	Minute(n)
mind.	mindestens
MNZ	mononukleäre Zellen
MOV	Multiorganversagen
MRM	Multiple-Reaction-Monitoring
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MS	Massenspektrometer
1-MT	1-Methyl-Tryptophan

Tabelle 0.1.: Fortsetzung: verwendete Abkürzungen

Abkürzung	*Bedeutung*
n	nano (10^{-9})
Na^+	Natrium
NF-κB	Nuclear Factor-κB
NI	Niereninsuffizienz
NKF	National Kidney Foundation
NKF KDOQI	National Kidney Foundation Disease Outcomes Quality Initiative
NK-Zelle	Natürliche Killerzellen
NLR	Nucleotide-Oligomerization Domain Leucine-rich Repeat Protein
NO	Stickoxid
NYHA	New York Heart Association
o.	oder
o.g.	oben genannt
5-OH-Trp	5-Hydroxytryptophan
PaO_2	Sauerstoffpartialdruck
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PARP	Polyadenosindiphosphat-Ribose Polymerase
Pat.	Patient
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCT	Procalcitonin
PDB	Protein Data Base
PDK	Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
PG-E_2	Prostaglandin-E_2
PI3K/AKT	Phosphoinositol-3-Kinase / Proteinkinase B
PRRs	Pattern Recognition Receptors
Quin	Chinolinsäure
QPRT	Chinolinat-Phosphoribosyltransferase
RIG-I	Retinoic-Acid-Inducible Gene I
RNA	Ribonukleinsäure

Tabelle 0.1.: Fortsetzung: verwendete Abkürzungen

Abkürzung	*Bedeutung*
ROC	Receiver Operating Characteristics
s	Sekunde
S.	Seite
SA	Standardabweichung
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SER	Serotonin
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TCR	T cell Receptor
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-alpha
T_{reg}	regulatorische T-Zelle
TRP	Tryptophan
TSST-1	Toxisches Schocksyndrom Toxin 1
μ	mikro (10^{-6})
μM	mikro Molarität, molar
VCAM-1	Vascular-Cell-Adhesion Molecule-1
VK	Variationskoeffizienten

1. Einleitung

1.1. Immunregulation

Die größte Leistung des Immunsystems ist die Wahrung der Balance zwischen Immunität und Toleranz. Auf der einen Seite hat es die Fähigkeit, wirksame Immunantworten zur Elimination von Krankheitserregern oder Neoplasien zu generieren, auf der anderen Seite wahrt es durch die Begrenzung von Immunreaktionen die Toleranz gegenüber den eigenen Antigenen, gegenüber der Kommensalflora oder dem genetisch fremden Föten in der Gravidität. Die Dominanz eines dieser Prinzipien, wie es für viele Krankheiten bekannt ist, führt zu schweren Krankheitsverläufen, beziehungsweise zu Autoimmunerkrankungen. Um ein solches Ungleichgewicht zu verhindern, verfügt das Immunsystem über Strategien, die die präzise Regulation der Mediatoren, sowie der Wechselwirkungen zwischen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems ermöglichen. Hierzu gehören auch das Beenden einer Immunreaktion, auf deren Höhepunkt antigenspezifische Lymphozyten einen großen Anteil der Immunzellen des peripheren Blutes ausmachen, und das Wiedererlangen einer Homöostase des Immunsystems nach Elimination des infektiösen Agens. Über die Mechanismen der Homöostase des Immunsystems ist bisher wenig bekannt. Neben der Beendigung einer Immunreaktion bedarf es Mechanismen, diese einzuschränken, um die Schädigung des Wirts durch sie zu begrenzen. Zusätzlich haben einige Gewebe ein sogenanntes Immunprivileg, wie die Plazenta, das Gehirn oder der Nebenhoden, die eine lokal differenzierte Immunität besitzen. Auch Schleimhäute, die einer hohen Antigendichte ausgesetzt sind, benötigen eine spezialisierte Immunregulation, welche adaptive Immunreaktionen dämpft.

Als essentieller Mechanismus zur Aufrechterhaltung einer lokalen Toleranz des adaptiven Immunsystems hat sich in der letzten Dekade eine Enzymaktivität herausgestellt, welche durch den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan und Bildung toxischer Metabolite adaptive Immunreaktionen am Ort ihrer Expression wirkungsvoll unterdrückt und ein tolerogenes Mikromileu erzeugt. Die Bedeutung dieses Mechanismus wurde von Munn und Mellor in 1998 erstmals aufgezeigt und belegt[141]. Durch die systemische Inhibition des Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) genannten Enzyms mittels des Inhibitors 1-Methyl-Tryptophan[27] bei

Mäusen kam es zur Aufhebung der physiologischen Toleranz des mütterlichen Immunsystems und zu einer T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion gegen die semiallogenen Föten[141]. Weitere Arbeiten erweiterten das Verständnis von IDO Aktivität hin zu der Auffassung, dass IDO ein weit verbreitetes immunregulatorisches Prinzip ist, welches adaptive Immunität am Ort seiner Aktivierung modifiziert.

1.2. Tryptophanmetabolismus

1.2.1. Biochemie von Tryptophan

1901 wurde die Aminosäure Tryptophan (TRP) von Hopkins und Cole bei der Spaltung von Casein mit Trypsin entdeckt[85]. TRP ist eine Aminosäure, die von allen Formen des Lebens für die Proteinbiosynthese und für andere wichtige metabolische Funktionen benötigt wird. Vertebraten besitzen jedoch nicht die enzymatische Ausstattung, um diese Aminosäure aus einfacheren Molekülen zu synthetisieren. Die primären Produzenten von TRP sind daher Bakterien, Pilze und Pflanzen, die in der Lage sind, aus beispielsweise Phosphoenolpyruvat, einem Intermediat des Glucosestoffwechsels, TRP zu synthetisieren. Auf Grund der fehlenden Syntheseleistung für TRP müssen Wirbeltiere diese essentielle Aminosäure über Nahrungsproteine zuführen, die im Darm gespalten, aufgenommen und über die Portalvene der Leber zugeleitet werden. Neben einem Rohstoff der Proteinbiosynthese ist TRP die einzige Substratquelle für die Produktion wichtiger Schlüsselmoleküle, wie beispielsweise dem biogenen Amin Serotonin und dem epiphysären Melatonin. Darüber hinaus ist TRP ein Provitamin. Bei dessen Abbau entsteht Nicotinsäuremononucleotid, das der Synthese von Nicotinamid-Adenindinucleotid (NAD^+) dient.

Als Bestandteil von Proteinen und Peptiden gehört L-Tryptophan zu den essentiellen Aminosäuren und besteht aus einem aromatischen Indol-Ringsystem sowie lipophilen Seitenketten. Das L-Enantiomer der proteinogenen Aminosäure wird dem menschlichen Körper mittels Nahrung zugeführt, die D-Form von TRP, ebenso wie das Racemat DL-Tryptophan spielen in der Natur eine untergeordnete Rolle. Eine weitere chemische Eigenschaft von TRP ist seine Lipophilie und es ist somit schlecht wasserlöslich. Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH Wert von 5,89. TRP ist die Aminosäure mit dem geringsten Vorkommen und macht nur etwa 1% aller Aminosäuren in zellulären Proteinen aus. Die neutrale Aminosäure ist zu etwa 95% an Plasmaprotein (Albumin) gebunden[36].

1.2.2. Kynureninabbauweg der Leber

Das über die Nahrung aufgenommene TRP wird über die Leber in den Körperkreislauf verteilt. Durch Aufnahme aus dem Gefäßsystem kann die Aminosäure von allen Körperzellen zur Synthese von Proteinen genutzt werden. Der Abbau des größten Teils des aufgenommenen TRPs (ca. 70%) erfolgt über den Kynureninabbauweg in der Leber. Dabei erfolgt zunächst die Spaltung des Pyrrolrings durch die Einführung von molekularem Sauerstoff (O_2). Verantwortlich dafür ist die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO, s. **1.2.4**, S. 9). Das Reaktionsprodukt Formyl-Kynurenin wird im Zytosol zu Formiat und Kynurenin (KYN) gespalten. Letzteres wird durch eine mitochondriale Oxygenase in Hydroxy-Kynurenin überführt. Die pyridoxalphosphatabhängige Katalase im Zytosol spaltet Alanin ab. Durch diese Kynureninasereaktion entsteht 3-Hydroxyanthranilsäure, ein Derivat der Benzoesäure. Im weiteren Abbauweg folgt die Abspaltung des Benzolringes von Hydroxyanthranilat durch eine Dioxygenase. Es entsteht Acroleyl-β-Aminofumarat. Dieses kann weiter zu Acetyl-CoA oder nach Bildung von Chinolinsäure und Verknüpfung mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) zu NAD^+ verstoffwechselt werden (s. Abb. **1.1**, S. 10).

1.2.3. Tryptophan als Vorläufer von NAD

NAD^+ ist ein essentieller Kofaktor vieler endergonischer zellulärer Reaktionen, die von der Adenosintriphosphat (ATP) Synthese bis zur DNA Reparatur reichen. Die Synthese von ATP ist abhängig von gleichbleibender Verfügbarkeit von NAD^+ in allen Zellen des Organismus. Ein Absinken des zellulären NAD^+ Gehaltes gefährdet die Zelle, insbesondere wenn sie unter Einfluss physiologischer Stressoren steht.

$NADP^+$ ist die phosphorylierte Form des NAD^+ und ist notwendig für eine große Anzahl biosynthetischer Redoxreaktionen in Zellen. Tryptophan ist die einzige Substratquelle für die endogene *de novo* Synthese von NAD^+ und $NADP^+$, wenn Nicotinamid oder Nicotinsäure nicht verfügbar sind. Nicotinsäure und Nicotinamid werden häufig unter dem Begriff Niacin zusammengefasst und sind auch bekannt als Vitamin B_3. Beide Nahrungsstoffe sind Substrate für die Synthese von NAD^+ und $NADP^+$ in den meisten Zellen und sind in der normalen Ernährung enthalten. Bei nicht ausreichender Zufuhr von Niacin über die Nahrung ist der Tryptophanmetabolismus die einzig verbleibende Quelle für die NAD^+ und $NADP^+$ Synthese.

1.2.4. Tryptophan 2,3-Dioxygenase

Hepatozyten exprimieren Tryptophan 2,3-Dioxgenase (TDO, EC 1.13.11.11). Diese katalysiert die Reaktion von L-Tryptophan zu N-Formyl-L-Kynurenin unter Aufwendung molekularen Sau-

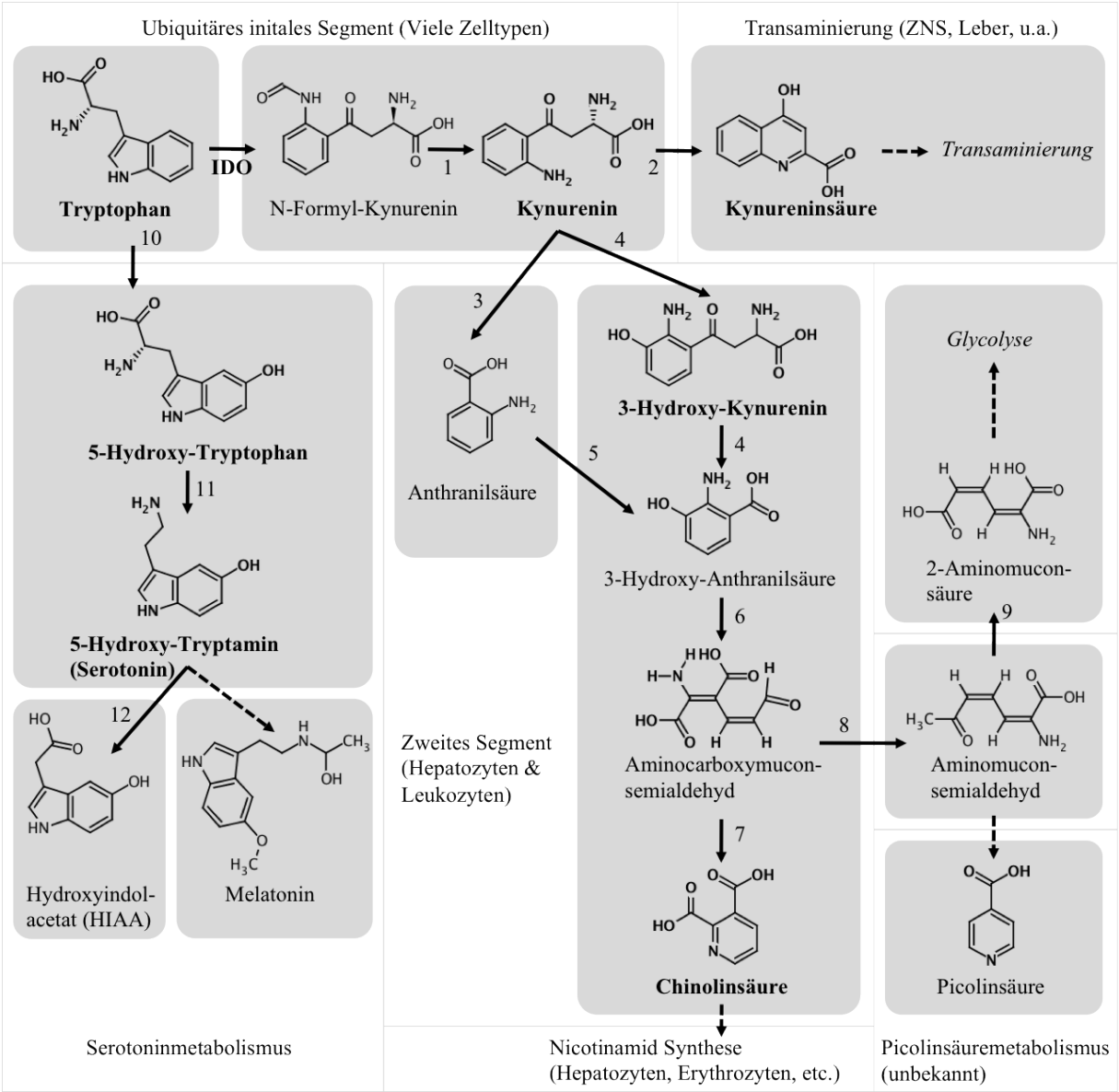

Abbildung 1.1.: Vereinfachtes Schema des Tryptophanstoffwechsels. Die beteiligten Enzyme sind durch Ziffern symbolisiert und nachfolgend mit dem Enzymnamen sowie dem Enzyme Comission Code (E.C.) aufgeführt. **1**: Kynureninformamidase, E.C.: 3.5.1.9; **2**: Kynureninaminotransferase (KAT), E.C.: 2.6.1.7, es existieren drei Proteine mit KAT Aktivität. KAT I ist zytoplasmatisch lokalisiert, KAT II mitochondrial. KAT III ist keinem subzellulären Kompartiment zugeordnet. **3**: Kynureninase, E.C. 3.7.1.3; **4**: Kynurenin 3-Monooxygenase, E.C.: 1 14.13.9; **5**: Anthranilat 3-Monooxygenase, E.C.: 1.14.16.3, **6**: 3-Hydroxyanthranilat 3,4-Dioxygenase, E.C.: 1.13.11.6; **7**: spontane nichtenzymatische Reaktion; **8**: Picolinatcarboxylase, E.C.: 4.1.1.45; **9**: Aminomuconatsemialdehyddehydrogenase, E.C.: 1.2.1.32; **10**: Tryptophan 5-Monooxygenase, E.C.:1.14.16.4, es existieren zwei Proteine mit dieser Enzymaktivität. Homolog 1 kommt ubiquitär vor, Homolog 2 ist spezifisch für Neurone. **11**: DOPA Decarboxylase, E.C.: 4.1.1.28, **12**: Monoaminooxidase (MAO), E.C.:1.4.3.4, es exisitieren zwei Homologe mit unterschiedlicher Substratpräferenz. MAO-A präferiert biogene Amine wie Serotonin und ist gewebespezifisch für Herz, Leber, Niere, Blutgefäße und Dünndarm. MAO-B ist nicht gewebespezifisch.[Quelle: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes]

erstoffs. Die Aktivität dieses Enzyms reguliert die Serumkonzentration von Tryptophan[175]. Die Regulation von TDO wiederum erfolgt durch Cortisol, Glukagon und der Tryptophankonzentration im portalvenösen System[5,184]. TDO besitzt eine höhere Substratspezifität im Vergleich zur IDO. Weitere bekannte Substrate sind Serotonin und 5-Hydroxytryptophan.

1.3. Biochemie der Indoleamin 2,3-Dioxygenase

Im Jahre 1967 wurde ein weiteres induzierbares Enzym Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO, EC 1.13.11.17) beschrieben[80]. Dieses Hämenzym ist eines von zwei bei Säugetieren konservierten Enzymen, welches die oxidative Spaltung der 2,3 Doppelbindung des Pyrrolringes von Tryptophan[40] vermittelt und stellt außerhalb der Leber das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Kynureninweges dar[99,121]. Als Dioxygenase trägt IDO ein Metall in der funktionellen Gruppe und katalysiert, anders als Monooxygenasen, den Einbau beider Sauerstoffatome in das Substrat ohne die Entstehung eines Moleküls Wasser (H_2O):

$$R + O_2 \longrightarrow R(O)_2$$

Eine weitere Besonderheit der IDO ist, dass sie zur Reaktion neben molekularem Sauerstoff auch ein Superoxidanion (O_2^-) umsetzen kann[217]. Dies hat zur Folge, dass IDO exprimierende Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entgiften[208].

Ein weiterer Unterschied zur TDO ist die geringere Substratspezifität der IDO. Sie kann neben L-TRP außerdem andere Indolamine, wie D-TRP, Serotonin, Melatonin und Tryptamin spalten[187], hat aber höhere Affinität zu TRP als zu TDO.

Reaktionsprodukt der Spaltung von TRP ist N-Formyl-Kynurenin, das autokatalytisch durch Abspaltung der Formylgruppe zu L-Kynurenin (L-KYN) zerfällt. Als stabiler Metabolit akkumuliert KYN im Überstand von IDO$^+$ Zellen. Die Konzentration dieses Metaboliten wird daher häufig in Überständen von Zell- und Gewebekulturen oder Serum gemessen, um die IDO Aktivität zu quantifizieren. Dabei besteht die Einschränkung der Aussagekraft dieses Parameters darin, dass manche Zelltypen den Enzymapparat zur weiteren Verstoffwechslung von KYN besitzen[194], so dass dieses daher nicht in größerem Umfang freigesetzt wird. Die biochemischen Veränderungen durch IDO Aktivität bestehen somit aus der Depletion von Tryptophan, der Reduktion von oxidativem Stress und der Produktion von biologisch aktiven Stoffwechselprodukten, den Kynureninen.

Bekannt sind zwei IDO Isotypen, von denen für IDO-1 die funktionelle Bedeutung belegt ist. IDO-2 wurde im Jahre 2003 zum ersten Mal sequenziert, jedoch ist bis heute die Signifikanz dieser Isoform für das humane System nicht vollständig geklärt[111,112]. Die murine IDO-2 wurde

vor allem in der Plazenta, im Uterus und im Gehirn gefunden[8]. Bekannt ist, dass die 2 Isoformen der IDO höchstwahrscheinlich nicht gleichsinnig durch bekannte Inhibitoren der IDO-1 gehemmt werden[111]. Die auffällige Verteilung der Isoform 2 legt eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs dieser Organe nahe, was jedoch bisher weder belegt noch untersucht worden ist.
Im Weiteren wird nur IDO-1 behandelt und vereinfacht als IDO bezeichnet.

Das Indoleamin 2,3-Dioxygenase-Gen enthält 10 Exone (15kbp) und ist beim Menschen auf dem kurzen Arm von Chromosom 8 (8p12-p11) lokalisiert[25]. Die Gentranskription von IDO unterliegt einer strikten Regulation. Sie wird vor allem durch Entzündungsmediatoren, wie Interferonen und Toll-like Rezeptorliganden, wie Lipopolysaccharid (LPS) oder unmethylierter Cytosin-phosphatidyl-Guanin Sequenzen (CpGs) über die JAK-STAT- (Janus activated kinase - signal transducer and activator of transcription) und die IRF1-Kaskade (Interferon-regulatory factor 1) induziert (s. Abb. **1.4**, S.17).

Spezifische Sequenzen, wie ISRE (interferon stimulatory response elements) und GAS (γ-activating sequences) im Bereich des IDO-Promoters vermitteln die Ablesung des Gens[31].

IDO-1-mRNA kodiert ein Protein mit 405 Aminosäuren mit einem molekularen Gewicht von 45 kDa. Die tertiäre Struktur des IDO-Proteins wird überwiegend durch α-helikale Substrukturen gebildet und liegt meist als Monomer vor. Zwischen der kleinen und großen Domäne ist ein Häm als prosthetische Gruppe lokalisiert[197] (s. Abb. **1.2**, S.13). IDO weist eine hohe Strukturhomologie zu anderen Häm-enthaltenden Proteinen, wie dem Myoglobin der Mollusken auf. Dies wird als Hinweis auf einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung gewertet[198].

1.3.1. IDO Induktion und exprimierende Gewebe

IDO exprimierende Gewebe und Zelltypen Allen Geweben, in denen IDO induzierbar ist, ist gemeinsam, dass sie eine immunologisch aktive Schleimhaut oder lymphatische Komponenten haben. Die IDO-positiven Zellen innerhalb dieser Gewebe erfüllen immunologische Aufgaben.

Zu diesen Geweben gehört der Dünndarm, wobei die Zahl der IDO exprimierenden Zellen vom Duodenum über Jejunum zum Ileum deutlich zunimmt. Dabei sind die IDO$^+$ Zellen vor allem im Interstitium und der Lamina propria der Villi lokalisiert, sowie in den Peyerschen Plaques[39].

In der Lunge zeigt sich ausgeprägte IDO Expression in den interstitiellen antigenpräsentierenden Zellen[199].

Die Milz sowie Gewebelymphknoten zeigen ebenfalls IDO Expression[202]. Dabei scheint sich die Expression auf die antigenpräsentierenden Zellen dieser Gewebe zu konzentrieren[39].

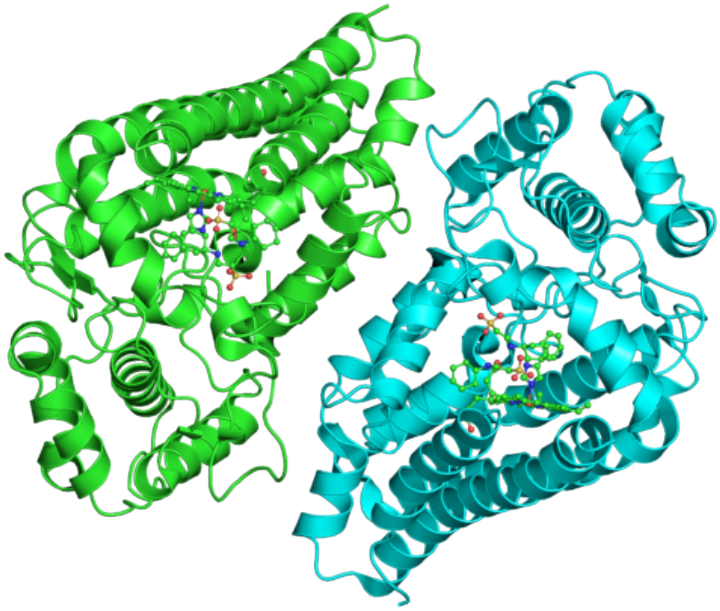

Abbildung 1.2.: Tertiärstruktur der Indoleamin 2,3-Dioxygenase[197].

Weiterhin sind Mikrogliazellen, Epithelzellen und Fibroblasten in der Lage, funktionelle IDO nach Stimulation zu exprimieren[28,34,79,169].

Eine Besonderheit stellen die besonders hohen Expressionen von IDO in der Plazenta[84,102] und der Epididymis dar[24]. Hier treffen die oben zugeordneten Eigenschaften IDO positiver Gewebe nicht zu.

IDO Induktoren und Signaltransduktion Die Expression der IDO kann durch Zytokine oder durch Ligandenbindung in der Zielzelle induziert werden. Die bekannten Induktoren haben entweder proinflammatorische oder immunregulatorische (toleranzerzeugende) Wirkungen. Eine Liste der bekannten Induktoren der IDO ist in Tabelle **1.2** (S.16) zusammengefasst.

Interferone (IFN) sind potente Induktoren der IDO-Gentranskription in spezialisierten IDO kompetenten Zelltypen[205]. Sie umfassen eine große Familie von Zytokinen, die in drei Klassen (Typen I, II und III) unterteilt werden und bei der schnellen angeborenen Immunantwort auf mikrobielle Infektionen produziert werden. Diese Zytokine kommen auch bei anderen Formen der Entzündung oder bei Gewebeverletzung und Tumorwachstum vor. Human- und Maus-IDO Gene enthalten sogenannte Interferon Stimulated Response-Elements (ISRE) und Gamma Interferon Associated Sites (GAS) Elemente in den proximalen Promotorregionen, welche auf Typ

Tabelle 1.1.: Zelltypen mit der Fähigkeit zur IDO Expression.

Zelltyp	Spezies	bekannte Induktoren	Referenz
Dendritische Zellen	Mensch	(h)CD40L, IFN-γ	90
CD19$^+$ plasmazytäre dendritische Zellen	Maus	CTLA4-Ig, IFN-α	4
Monozyten	Mensch	IFN-γ, IFN-β, LPS	28
Makrophagen	Mensch	(h)CD40L, IFN-γ	138
Fibroblasten	Mensch	IFN-γ	155
Epithelzellen	Mensch	IFN-γ	26
Mikrogliazellen	Mensch	IFN-γ	79
Zylinderepithelzellen des Caput epididymidis	Maus	konstitutiv	24
Synzytiotrophoblasten	Mensch	konstitutiv	95
Korneaepithelzellen	Mensch	unbekannt	201

I bzw. Typ II IFN vermittelte Signale reagieren[37,191]. Die Vielfalt der IFN Subtypen, welche von Zellen an den Orten einer Infektion oder Entzündung produziert werden, suggeriert, dass es funktionelle Spezifität oder Zelltypspezifität zwischen Subtypen gibt, obwohl wenig über differenzielle Funktionen der Subtypen der Interferone bekannt ist. Im Gegensatz zu IFN-α, welches von vielen Zelltypen während einer angeborenen Immunantwort produziert wird, wird IFN-γ (Typ II) zum größten Teil durch lymphoide Zellen, wie aktivierte CD4 $^+$ T-Zellen, während einer adaptiven Immunantwort freigesetzt. IFN Typ I (IFN-α/β) und Typ II (IFN-γ) induzieren IDO Transkription über Janus Kinase (JAK) / Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) aktivierte Signalwege, welche wiederum auf ISRE bzw. GAS in IDO Promotoren wirken[159]. In vielen Fällen stimulieren die IDO-Induktoren, aufgelistet in Tabelle **1.2** (S.16), IDO Expression indirekt durch Induktion von IFN-α über MyD88/IRF7-abhängige Signalwege. Auf diese Weise induzieren TLR-Liganden in plasmazytären dendritischen Zellen die Expression von IFN-α, welches wiederum eine IDO Induktion in IDO-kompetenten dendritischen Zellen

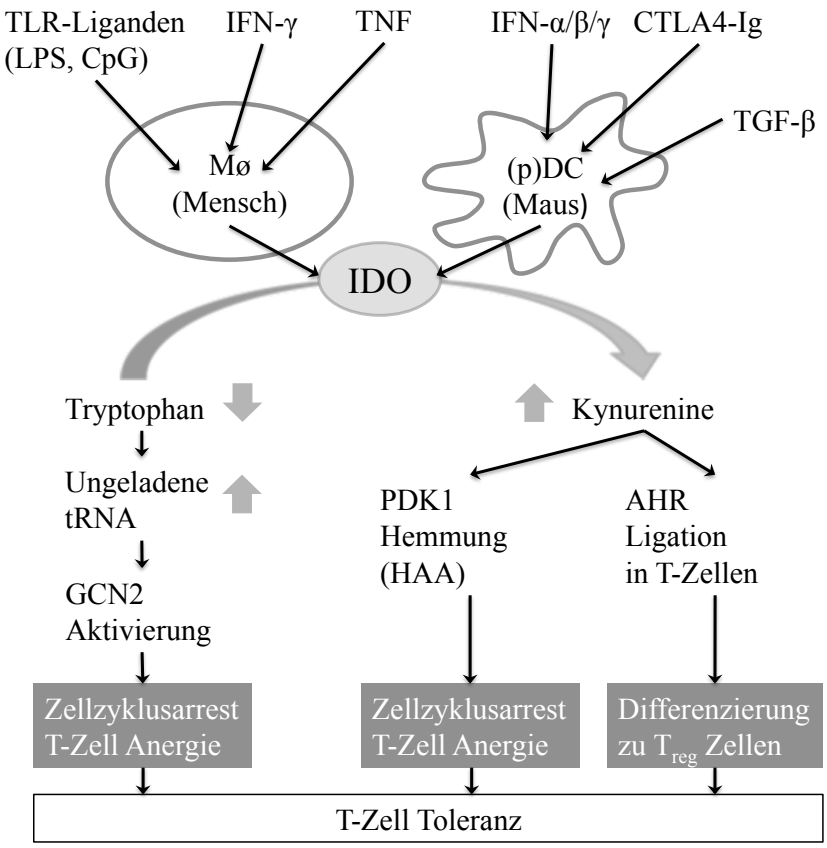

Abbildung 1.3.: Aktivierung und Wirkung von IDO Aktivität. Erweitert nach[94].

ermöglicht. Auch lösliches CTLA4 (CTLA4-Ig, ein B7-Ligand) induziert über IFN-α Produktion IDO Expression, obwohl in diesem Signalweg IDO Induktion Voraussetzung für die IFN-α Produktion ist[117]. Es handelt sich damit vermutlich um einen autokrinen Regelkreis, welcher die IDO Expression durch IFN-α-vermittelte Signaltransduktion über den eigenen Rezeptor (IFNAR) verstärkt.

IFN-γ induziert IDO Expression in einigen dendritischen Zellen, wie CD8α^+ dendritischen Zellen. Eine schematische Übersicht der beteiligten Signalwege ist in Abbildung **1.4** (S.17) dargestellt.

IDO vermittelte Inhibition der T-Zellproliferation Es gibt zwei Theorien darüber, worin die physiologische Funktion von IDO Aktivität besteht. Die ältere der beiden Theorien begreift IDO Aktivität als mikrobizides Prinzip. Sie geht von einer Publikation von Pfefferkorn et al. aus dem Jahr 1986 aus, die in Gewebekulturen von humanen Fibroblasten zeigen konnten, dass das Wachstum des intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* durch IFN-vermittelte IDO Induktion gehemmt werden konnte und dass dieser Effekt mit abnehmender Tryptophankon-

Tabelle 1.2.: IDO Induktoren (aktualisiert, erweitert und korrigiert nach[94]).

Substanz	Ligand	Rezeptor	Referenz
Zytokine	IFN-α/-β	IFNAR1, IFNAR2	4
	IFN-γ	IFNGR1, IFNGR2	224
	IL-10	IL-10R*	54, 139
	TGF-β	TGF-βRII, TGF-βRI	13
Fusionsproteine	CTLA-4Ig	B7-1/-2 (CD80/86)	4, 53, 65, 117, 126, 128
	CD28-Ig†	B7-1/-2 (CD80/86)	53
	CD200-Ig	CD200R	51, 53
	GITR-Ig	GITR‡	66
	anti-B7-1/-2 mAb	B7-1/-2 (CD80/86)	140
	anti-4-1BB mAb	4-1BB (CD137)	186
(h)IgE	anti-Fcϵ mAb	FcϵRI	214
TLR Liganden	LPS	TLR4	81, 92, 154
	Resiquimod, R848	TLR7/8	61
	CpG	TLR9	117, 127, 220
	ISS-ODN	TLR9	76
PG-E_2			23
HDAC§ Hemmer	SAHA/ITF2357	HDAC Klasse I & II	163

*IL-10 und TGF-β verstärken die IDO Expression in INF-γ aktivierten, reifen dendritischen Zellen
†in plasmazytären dendritischen Zellen behandelt mit siRNA zum Knockdown von SOCS3
‡Glucocorticoid-induzierbarer TNF Rezeptor
§Histondeacetylase

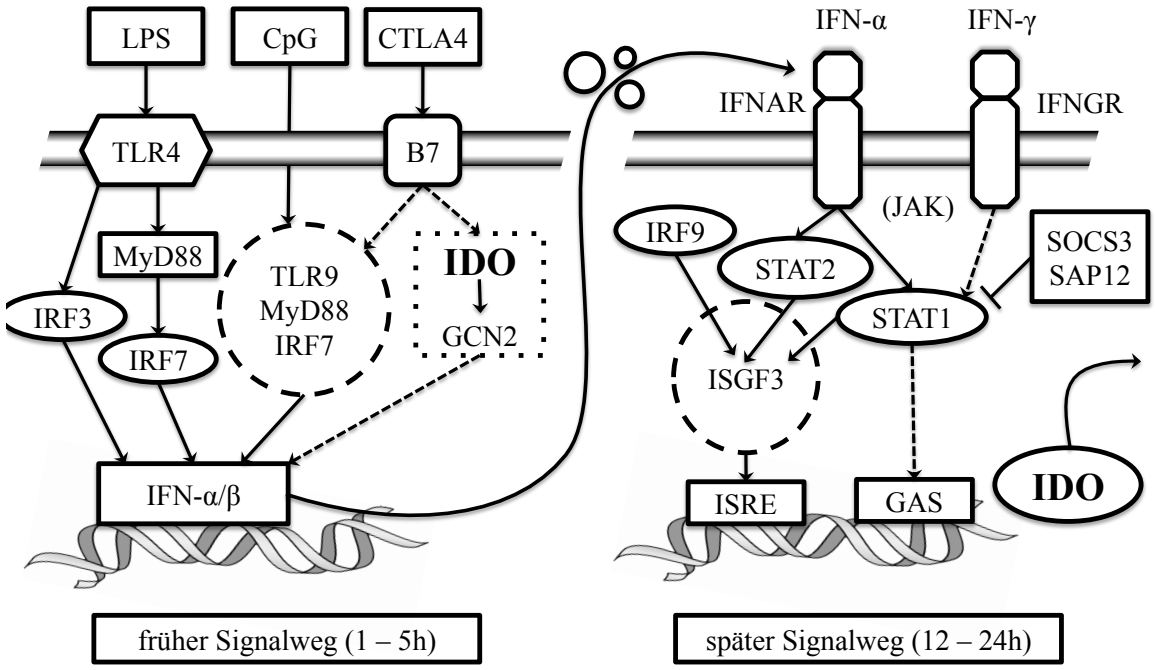

Abbildung 1.4.: Mögliche Signalwege nach TLR und B7 Ligation, welche in IDO-kompetenten Zellen IDO Expression induzieren. TLR4, TLR9 und B7-Liganden stimulieren IFN-α-Transkription über die dargestellten Signalwege. IFNAR Aktivierung durch IFN-α induziert die Formierung von ISGF3 Komplexen bestehend aus aktivierten STAT1-STAT2 Heterodimeren und IRF9. Diese wirken auf ISRE Motive in IDO Promotoren. Im Gegensatz dazu induziert IFN-γ IDO via STAT1-Homodimere, die wiederum GAS-Elemente binden. STAT-abhängige Signalwege können durch SOCS3 und DAP12 unterdrückt werden. Nach[94].

zentration im Kulturmedium einherging[156]. Dieser Aspekt der IDO Aktivität wird in Paragraph **1.3.1** (S. 21) weiter ausgeführt.

Weitere Erkenntnisse bestätigen die IDO Aktivität in ihrer großen Bedeutung für die Immunregulation. Dies wurde durch die Untersuchungen von Munn und Mellor 1998 erstmals aufgezeigt, welche durch die systemische Inhibition der IDO mittels des Inhibitors 1-Methyl-Tryptophan bei Mäusen zeigen konnten, dass IDO Aktivität in der Plazenta essentiell für die Aufrechterhaltung der Toleranz des maternalen Immunsystems gegenüber dem semiallogenen Foeten ist[141]. Die Hemmung funktioneller IDO in der Schwangerschaft hebt die physiologische Toleranz gegenüber dem fetalen semiallogenen Gewebe auf und verursacht eine T-Zell vermittelte Immunreaktion der Mutter. Ein Prozess, der einerseits das intakte maternale Immunsystem erfordert, da die T-Zell vermittelte Immunreaktion zum Abort führt, und andererseits väterli-

che Alloantigene benötigt, da bei syngenen Tieren dieser Effekt ausbleibt. Diese Beobachtung lieferte den ersten starken Anhaltspunkt dafür, dass IDO bei der Aufrechterhaltung oder Generierung einer Toleranz des adaptiven Immunsystems gegenüber Antigenen eine wichtige Rolle spielt.

Es existieren zwei grundlegende Hypothesen, auf welche Weise IDO Aktivität T-Zell Reaktionen unterdrückt. Die Tryptophandepletionshypothese besagt, dass T-Zellen eine reduzierte Verfügbarkeit an freiem Tryptophan in der Mikroumgebung wahrnehmen und darauf reagieren können.

Die Tryptophanutilisationhypothese besagt, dass T-Zellen auf die entstehenden Tryptophanmetabolite aus dem Kynureninabbauweg reagieren, welche bei IDO Aktivität im Mikromilieu akkumulieren[52]. Es gibt Belege für jede Hypothese, wobei sich jedoch die argumentativ eingesetzten Beobachtungen gegenseitig nicht ausschliessen. Einschränkend muss dennoch festgehalten werden, dass die meisten Studien *ex vivo* durchgeführt wurden, und es daher nicht als geklärt gelten kann, dass die gewonnenen Erkenntnisse repräsentativ für physiologische Situationen sind.

IDO vermittelte Induktion von regulatorischen T-Zellen Der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF-β) gilt als wichtiger Mediator in der Immunregulation.

In der Reifung des Thymus kommt es zur Deletion von hochaffinen selbstreaktiven T-Zellklonen. Das verbliebene breite T-Zell Repertoir muss in einem Gleichgewicht gehalten werden, sowohl für Klone mit Spezifität gegenüber Pathogenen als auch für selbstreaktive Klone. Letztgenannte sind autoreaktive Klone niedriger Affinität, die dem Selektionsprozess in der Reifung des Thymus entgangen sind. Für die Bewahrung und Überwachung dieses Repertoirs wird TGF-β als essentieller Faktor angesehen[108,118]. Die Kontrolle von T-Zell Toleranz in der Peripherie ist ebenfalls eine wichtige Funktion von TGF-β. Wirkungen sind die Inhibition von Effektor T-Zellen und die Induktion von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}). Die Balance dieser Zelltypen ist entscheidend für die Generierung einer angepassten Immunreaktion und Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion.

Dabei hat sich gezeigt, dass die Exekution von einem Teil der TGF-β zugeschriebenen Funktionen durch IDO übernommen wird. Die Differenzierung von Effektor T- Zellen wird einerseits durch TGF-β stark gehemmt[62]. Andererseits induziert TGF-β IDO über einen Phosphoinositol-3-Kinase / Proteinkinase B (PI3K/Akt) abhängigen Signalweg in dendritischen Zellen[13]. Der weitere Signalweg zur Expression des *Indo* Gens erfolgt über den sogenannten nicht-kanonischen NF-κB Signalweg[162]. Interessant ist hierbei, dass die dendritische Zelle durch autokrine TGF-β Sekretion[13], sowie durch die Wirkung des IDO Proteins als proexpressives Signalmolekül[149] die Transkription des *Indo* Gens stabilisiert und so zu einem stabilen tolerogenen Phänotyp

der dendritischen Zelle führt. Die tolerogene Funktion dieser dendritischen Zellen wiederum besteht in der Induktion des regulatorischen, Foxp^3, CD25$^+$ Phänotyps (T_{reg}) in T Zellen. Als Mechanismus wurde die Signaltransduktion via Kynurenin, welches als Konsequenz der IDO Induktion produziert wird, durch Ligation am Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) in T Zellen festgestellt[129]. Die Ligation führt zur Ausbildung des regulatorischen T-Zell-Phänotyps.

Damit gibt es den ersten direkten Nachweis der enzymatischen Funktion von IDO, beziehungsweise der immunologischen Wirkungsweise der Kynurenine.

Tryptophandepletionstheorie Antigenpräsentierende Zellen, die IDO exprimieren, induzieren einen Zellzyklusarrest und Apoptose in aktivierten T-Zellen bzw. bewirken T-Zell Anergie in nichtapoptotischen T-Zellen[64,90,127,137–139]. Dabei konnte ein Tryptophanüberschuss die T-Zellproliferation nach Aktivierung durch IDO$^+$ APCs wiederherstellen. Diese Beobachtung führte zu der Einschätzung, dass die Tryptophandepletion aus dem Mikromilieu die entscheidende biochemische Veränderung ist, welche durch IDO hervorgerufen wird. Weiterführende Untersuchungen bestätigten, dass T-Zellen, welche in einem chemisch definierten Tryptophanfreien Medium aktiviert wurden, einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase vor dem Erreichen der S-Phase (DNA-Synthese) zeigten. Bei anderen Kulturmedien, in denen beispielsweise Leucin oder Isoleucin fehlten, reichte der Zellzyklus bis nach der S-Phase. Dies ist mit einer Unterbrechung der Translation durch Aminosäuremangel konsistent. Daraus schlussfolgerte man, das T-Zellen die reduzierte Verfügbarkeit von Tryptophan wahrnehmen und darauf mit der Beendigung des Zellzyklus reagieren[106]. Als Signaltransduktor für diese Reaktion wurde GCN2 (general control non-derepressible 2) identifiziert[125]. GCN2 nimmt die reduzierte Verfügbarkeit von Aminosäuren wahr, wenn ungeladene tRNA an Ribosomen binden. Dies aktiviert die Kinase und führt zu einer Signalkaskade, welche als zelluläre integrierte Stressantwort (ISR, integrated stress response) bekannt ist und zum Zellzyklusarrest und Unterbrechung der Proteintranslation führt[49].

Tryptophanutilisationstheorie Der Tryptophanmetabolismus, eingeleitet durch IDO, führt in den Kynureninabbauweg, in dem die sogenannten Kynurenine entstehen (s. Abb. **1.1**, S. 10). Diese sind Abbauprodukte, die entweder über die Niere ausgeschieden werden oder in der NAD$^+$ Synthese utilisiert werden können. Am Ort einer IDO Induktion kommt es zu einer Akkumulation dieser Kynurenine. Einige dieser Metabolite sind in der Lage Apoptose in NK-Zellen, B-Zellen, sowie T-Zellen zu induzieren[58,207]. Im Falle der T-Helferzellen werden nur die proinflammatorischen TH_1-Zellen apoptotisch[52]. Dabei zeigten die Metabolite eine synergistische Wirkung. Eine halbmaximale Wirkung zeigte sich bei Konzentrationen von 14 μM der einzelnen Metabolite. Untersucht wurden KYN, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Chi-

nolinsäure (QUIN)[52]. Für 3-Hydroxyanthranilsäure wurde die Signaltransduktion aufgezeigt. Dabei kommt es zur Bindung und Deaktivierung von PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1), einem essentiellen Mediator der CD28-induzierten NF-κB Aktivierung in T-Zellen nach T-Zellrezeptorbindung[75]. Über die Konzentrationen dieser Metaboliten, die *in vivo* am Ort der IDO Aktivierung erreicht werden, gibt es keine Daten. Experimentelle Evidenz für eine physiologische Bedeutung ergibt sich aus Tiermodellversuchen für chronische Entzündungskrankheiten, wie der experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE), einem Modell für multiple Sklerose, bei dem nach Verabreichung von 3-Hydroxyanthranilsäure ein deutlicher Rückgang der Erkrankung nachweisbar war[160].

Kynurenin (KYN) Als erstes stabiles Produkt der IDO Aktivität gilt KYN, das in tierexperimentellen Untersuchungen eine Akkumulation unter Induktionsbedingungen zeigte[185]. Beim Menschen zeigt sich dieser Effekt unter Infektionsbedingungen mit *Salmonella inf.*, *Toxoplasma inf.*, Malaria und HIV durch ansteigende Plasmakonzentrationen dieses Metaboliten[115]. Der Quotient aus TRP und KYN gilt als Schätzmaß der systemischen IDO Aktivität, da plasmatische Tryptophanspiegel auch unter verschiedenen Ernährungsbedingungen stabil bleiben, wobei eine zirkadiane Rhythmik der Tryptophanspiegel bekannt ist[210]. Darüberhinaus ist die Tryptophandepletion unter IDO Induktionsbedingungen die (einzige) bisher bekannte Konstellation unter der sie auftritt.

Chinolinsäure (QUIN) QUIN stellt das Endprodukt des Tryptophanstoffwechsels über den Kynureninabbauweg in Monozyten dar. Nach Aktivierung durch proinflammatorische Mediatoren, wie zum Beispiel IFN-γ synthetisieren und akkumulieren Monozyten QUIN, scheinen es aber gleichzeitig nicht weiter zu verstoffwechseln[130]. Die Bedeutung dieses Umstandes ist nicht bekannt. Die Akkumulation von QUIN durch aktivierte Monozyten ist jedoch insofern interessant, als dass QUIN ein Intermediat der hochaktiven NAD^+ Synthese in der Leber ist[14]. Dort jedoch ist es, wie auch in anderen Geweben, sowie im peripheren Blut unter infektfreien Bedingungen nur in sehr geringen Mengen nachweisbar[131]. Ein deutlicher Anstieg der Plasmaspiegel nach systemischer Gabe eines Immunstimulans (Pokeweed Mitogen (PWM)) wurde tierexperimentell gezeigt[173]. Die Bildung des Quotienten aus QUIN und TRP soll die Aktivität des gesamten Kynureninabbauweges genauer erfassen. In Studien mit QUIN Antikörpern bei Ratten konnte gezeigt werden, dass viele Zelltypen des Immunsystems dieses synthetisieren können und es in mikromolaren Konzentrationen oder größeren Konzentrationen speichern. Monozyten und Makrophagen innerhalb des gesamten Körpers und den lymphoiden Organen, dendritischen Zellen in der Milz und Lymphknoten, Langerhans-Zellen in der Haut, Kupffer-Zellen in der Leber, B-Zellen in den Milzfollikeln, und T-Zellen im Thymus und in einem viel geringeren Maße auch Mikroglia im Gehirn können QUIN synthetisieren[131].

Kynureninsäure (KYNA) KYNA entsteht in einem Nebenzweig des Tryptophanabbaus aus KYN. KYNA gilt daher als Nebenprodukt des Kynureninmetabolismus und wird entweder renal ausgeschieden oder im Aminosäureintermediärstoffwechsel abgebaut (s. Abb. **1.1**, S. 10). KYNA wirkt als Antagonist des NMDA-Rezeptors und des α7-nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors. Es weist eine antagonistische Wirkung zu QUIN am NMDA-Rezeptor auf und wirkt über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPR35) auf Monozyten autokrin aktivierend (Rekrutierungsfunktion)[9,215]. Aufgrund der antagonistischen Wirkung zu QUIN wird den diesen Stoffwechselweg einleitenden Kynureninaminotransferasen (KAT) eine regulatorische Wirkung zugesprochen[72].

Tryptophandepletion als mikrobizides Prinzip Es ist bekannt, dass IDO im Rahmen bakterieller Infektionen in mononukleären Zellen am Ort einer Entzündung durch unterschiedliche Stimuli aktiviert wird (s. Tabelle **1.2**, S. 16). Aufgrund des präferenziellen Verbrauchs von Superoxidanionen bei der Degradation von Tryptophan durch IDO schlussfolgert man, dass der Abbau von Tryptophan auf Bereiche von Infektion oder Inflammation begrenzt ist, an denen aktivierte Leukozyten Superoxid produzieren[208]. Die entstehenden Stoffwechselprodukte des Kynureninabbauweges reichern sich am Ort der Entzündung an und lassen sich in der Folge auch vermehrt in Plasma und Urin nachweisen. Das verfügbare Tryptophan wird dadurch aus dem Mikromilieu entfernt. Die Bedeutung, dieses durch inflammatorische Stimuli induzierten Tryptophankatabolismus über den Kynureninabbauweg, ist bisher nicht vollständig verstanden.

Es existieren mehre Theorien darüber, welchem Zweck der Typtophankatabolismus dient und welche positiven und negativen Effekte dieser für den Wirt bedeutet.

Dabei waren die Arbeiten von Pfefferkorn et al. aus dem Jahr 1984 von wegweisender Bedeutung[155]. Sie konnten in Gewebekulturen von humanen Fibroblasten zeigen, dass das Wachstum des intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* durch IFN-vermittelte IDO Induktion gehemmt werden konnte und dass dieser Effekt mit abnehmender Tryptophankonzentration im Kulturmedium einherging. Die weiteren folgenden Studien führten zu der Auffassung die Tryptophandepletion als biostatischen Abwehrmechanismus zu verstehen. So führt IDO Induktion mittels IFN-γ in Kulturen vaskulärer endothelialer Zellen zur Bakteriostase von Staphylokokken[183]. In den meisten dieser *in vitro*-Studien führte das Auffüllen von Tryptophankonzentrationen in den Kulturmedien zu einer Wiederherstellung des Wachstums von Krebszellen, Bakterien oder Parasiten. Aus diesen Erkenntnissen wurde die sogenannte Tryptophandepletionstheorie entwickelt. Diese Theorie umfasst die Elimination von Tryptophan am Ort der IDO Expression als den antibakteriellen, antitumorösen oder immunsuppressiven Effekt.

Trotz der großen Zahl von *in vitro*-Nachweisen für die Tryptophandepletionstheorie der IDO Induktion gibt es eine Reihe von Gründen daran zu zweifeln, dass die Tryptophandepletion der

primäre oder alleinige Effekt im Zusammenhang mit IDO Induktion ist. Ein einfacher Grund ist, dass die große Mehrheit der Bakterien ihr benötigtes Tryptophan aus einfacheren, verfügbaren Molekülen synthetisieren kann[135]. Die meisten Bakterien sind in der Lage, sich in völliger Abwesenheit von Tryptophan zu reproduzieren, demgegenüber für die Wirtszellen Tryptophan eine essentielle Voraussetzung darstellt. Darüberhinaus besitzen viele Krankheitserreger die Fähigkeit, sich ändernde Tryptophanspiegel zu erkennen und ihren Stoffwechsel an diese Bedingung anzupassen. Dazu reagieren sie auf reduzierte Spiegel geladener Tryptophanyl tRNA (tRNATrp) mit einer Hochregulation der Genexpression von Enzymen, die bei der Tryptophan-Synthese beteiligt sind.

Anderseits regulieren Interferone die Synthese von tRNATrp Synthetase in vielen eukaryotischen Zelltypen. Dies deutet darauf hin dass beide, Wirt und Pathogen, während einer Infektion auf die veränderte Verfügbarkeit von Tryptophan reagieren, indem sie entweder die Synthese von Tryptophan oder die von tRNATrp erhöhen. Viele Mikroorganismen können ihr eigenes Tryptophan synthetisieren. Vertebraten sind demgegenüber von exogener Zufuhr abhängig. Als auxotrophe Organismen reagieren sie sensitiv auf den Abbau von Tryptophan durch IDO. Dennoch konnte in einer Reihe von Arbeiten gezeigt werden, dass die Proliferation von Mikroorganismen, wie Chlamydien[11,26,170], *Staphylokokkus aureus*, Gruppe B Streptokokken, Enterokokken[116] und Mykobakterien[76] *in vitro* durch eine IFN-γ stimulierte IDO-Expression in Fibroblasten[67,155] oder Makrophagen[114] unterdrückt werden kann[44,183]. Alle Erreger, für die diese Wachstumsinhibition gezeigt werden konnte, sind entweder intrazellulär oder leben in enger Verbindung mit der Wirtszelle. Neben Bakterien scheint auch die Replikation von Viren durch IDO verändert zu sein. Antivirale Immunreaktionen werden durch Typ I Interferone, wie auch durch das Typ II Interferon vermittelt. So wurde *in vitro* für Retinaepithelzellen gezeigt, dass durch die Stimulation mit IFN-γ und IFN-β die Replikation des Zytomegalievirus gehemmt werden kann[18]. Im Fall der IFN-γ Stimulation konnte der beobachtete antivirale Effekt durch Substitution von L-Tryptophan wieder aufgehoben werden. Die Inhibition der Virusreplikation durch das Typ I Interferon IFN-γ blieb durch die Zugabe von L-Tryptophan unbeeinflusst[18]. Dieser antivirale Effekt konnte inzwischen auch bei anderen Herpes Viren (Herpes simplex Virus Typ I und II), sowie für das Masernvirus und Vaccinavirus nachgewiesen werden[1,147,206].

Antiparasitäre Effekte der IDO Aktivität wurden hauptsächlich am intrazellulären Erreger *Toxoplasma gondii* untersucht. Wie bereits erwähnt, ist Pfefferkorns Arbeit wegführend[155]. Durch Substitution von Tryptophan kam es zur Aufhebung des antiparasitären Effektes. Nach Transfektion von rekombinanter IDO in humanen Fibroblasten konnte ebenfalls eine Inhibition des Parasitenwachstums gezeigt werden[38,69]. Nach Transfektion mit dem trpB Gen aus *Escherichia coli* und daraus resultierender Tryptophan-Prototrophie ist die Proliferation von

Toxoplasma gondii nicht mehr durch die IDO-Aktivität der Wirtszellen zu inhibieren[188]. In der Folge wurde für weitere humane Zellen, wie Epithelzellen, Astrozyten und Endothelzellen gezeigt, dass sie in der Lage sind den antiparasitären Effektormechanismus durch IFN-γ induzierte IDO-Expression zu generieren[43,44,46,146]. Weiterhin konnte für bekannte Kostimulatoren der IDO Induktion, wie IL-1β und TNF-α gezeigt werden, dass diese die IFN-γ induzierten antimikrobiellen Effekte verstärken können[45].

Dabei werten die Autoren die Depletion von Tryptophan als den antibakteriellen, antiviralen bzw. antiparasitären Effekt. Der Abbau von Tryptophan entzieht den Erregern die Aminosäure zur Proteinbiosynthese. Als Bestätigung dieses Mechanismus wird die Beobachtung gewertet, dass sich die Replikation der Mikroorganismen bei exogener Zufuhr von Tryptophan wieder normalisiert. Als bisher einzige *in vivo* Evidenz für diesen Mechanismus wurde bei IFN-γ-defizienten Mäusen beobachtet, dass diese weniger in der Lage waren, Infektionen durch *Chlamydia pneumoniae* und *Toxoplasma gondii* zu kontrollieren[60,171,189]. Unbestätigt bleibt jedoch in diesen Arbeiten, ob dieser Beobachtung ein Mangel an IDO Aktivität oder einer der vielen fehlenden Effekte des IFN-γ zugrunde liegt.

1.3.2. Pathologische IDO Aktivität

Aufgrund der Tatsache, dass durch IDO Aktivität eine hochwirksame Suppression adaptiver Immunität vermittelt wird, hat sich das wissenschaftliche Interesse darauf fokussiert, in welchen pathologischen Prozessen IDO Aktivität eine Rolle spielt. Es haben sich daraus neue Erkenntnisse in der Tumorbiologie, bei autoimmunen Erkrankungen, sowie in der Transplantationsmedizin mit jeweils neuen Therapieansätzen ergeben.

Es gibt eine wachsende Anzahl von Tumorentitäten, von denen bekannt ist, dass diese IDO konstitutiv exprimieren. Dabei geht man davon aus, dass durch IDO Aktivität, ähnlich wie in der Plazenta, ein Mikromilieu geschaffen wird, welches eine T-Zell vermittelte Immunreaktion unterdrückt und damit die Tumorausbreitung begünstigt[136,211]. Für die akute myeloische Leukämie (AML) wurde darüber hinausgehend gezeigt, dass die IDO$^+$ Tumorzellen eine Expansion von regulatorischen T-Zellen bewirken und dadurch die T-Zellantwort weiter zu inhibieren vermögen[35].

Bei autoimmunen Erkrankungen konnte experimentell gezeigt werden, dass eine erhöhte IDO Aktivität zu einer milderen Verlaufsform und eine Hemmung der IDO zu einer schwereren Verlaufsform führt. So konnte für in Lungenzellen induziertes experimentelles allergisches Asthma eine durch IDO Induktion (via TLR-9 Liganden) vermittelte Hemmung der Entzündungsreaktion in der Lunge, sowie der Hyperreaktivität der Atemwege gezeigt werden[74]. Die Inhibition der IDO führte im selben experimentellen Aufbau zu einer Zunahme des experimentellen allergi-

schen Asthmas[74]. Der gleiche Effekt konnte in Tiermodellen der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE)[176] und der Trinitrobenzolsäure induzierten Colitis beobachtet werden[68].

1.3.3. IDO in der Transplantationsmedizin

Für die Transplantationsmedizin bietet IDO neue Ansatzpunkte zur Behandlung bzw. Unterdrückung der Hauptnebenwirkung nach Stammzelltransplantationen, der Transplantat-gegen-Wirt Reaktion (Graft-versus-host-Reaction (GvHR)). Nach einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen scheint die Ausprägung der GvHR mit der IDO-Induzierbarkeit im Zusammenhang zu stehen. Die IFN-γ-induzierte IDO-Aktivität von Monozyten und dendritischen Zellen von Patienten nach einer Stammzelltransplantation ist dabei umgekehrt proportional zur initialen Ausprägung der GvHR[193].

Eine T-Zell Dysfunktion, wie sie nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen beobachtet wird, scheint ebenfalls durch die Expression von IDO in den Monozyten der transplantierten Patienten vermittelt zu sein[70].

Des Weiteren zeichnet sich die immunregulatorische Rolle der IDO auch bei Organtransplantationen, wie von Leber und Niere ab. In einem Tiermodell konnten Transplantationen dieser Organe gezeigt werden, die durch eine spontane Toleranz durch IFN-γ vermittelt ist, und eine Inhibition der IDO die Überlebenszeit nach erfolgter Transplantation verkürzt[33,105,109].

In einem Tiermodell für Korneatransplantate konnte gezeigt werden, dass eine Hochregulation der IDO mRNA in Korneaendothelzellen eine Transplantatabstossungsreaktion unterdrücken kann[15].

Auch bei einer durch Gentransfer erzeugten, konstitutiven IDO-Expression konnte diese eine lokale Immunsuppression bewirken und damit eine Toleranz gegenüber dem exprimierenden Gewebe aufrechterhalten. Diese IDO transfizierten Lungentransplantate wurden trotz intakter allogener MHC-Barriere und Verzicht auf immunsuppressive Therapien durch das Immunsystem des Empfängers akzeptiert[110,199]. Durch eine Inhibition der IDO mit 1-Methyl-Tryptophan konnte in diesem Zusammenhang die Toleranz gegenüber den Transplantaten verringert werden.

Immunprivileg Es gibt Organe, die sich durch eine reduzierte Aktivierbarkeit der angeborenen und der erworbenen Immunantwort auszeichnen, zu denen die vordere Augenkammer, das Gehirn, die Hoden und die Plazenta gehören. Dieses Phänomen wird als Immunprivileg bezeichnet[195] und als Folge dessen werden allogene Transplantate verzögert in diesen Organen abgestoßen[120]. Entscheidend ist das Immunprivileg in der Plazenta, bei der das mütterliche Immunsystem den Fötus nicht abstoßen darf. Dieser besteht zur Hälfte aus väterlichen Ge-

nen und ist somit ein immunologisches Transplanat. Diese Toleranz gegenüber körperfremden Antigenen verhindert den Verlust von nicht ersetzbaren Zellen. Diese immunpriviligierten Organe sind durch hochgradig differenzierte Gewebe mit relativ geringer Regenerationsfähigkeit gekennzeichnet.

1.3.4. Konkurrierende Stoffwechselwege für Tryptophan

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, SER) gehört zu den biogenen Monoaminen und nimmt im Körper als Gewebshormon und als Neurotransmitter eine wichtige Rolle ein. Serotonin wird in den enterochromaffinen Zellen des Intestinaltraktes und im zentralen Nervensystem gebildet. Gespeichert wird Serotonin in den Vesikeln innerhalb der Präsynapse bzw. in den Thrombozyten und in Mastzellen. Außerhalb des ZNS vermittelt es z.B. die Regulation des Gefäßtonus, führt zu einer verstärkten Thrombozytenaktivität und zu verstärkter Darmperistaltik. Im ZNS ist Serotonin unter anderem an der Schmerzempfindung und an Gedächtnisleistungen beteiligt. Weiterhin beeinflusst es eine Vielzahl von emotionalen Prozessen, wie Angst und Aggression. Der Serotoninstoffwechselweg stellt einen konkurrierenden Metabolismus von TRP gegenüber dem Kynureninstoffwechselweg dar. Der Serotoninstoffwechselweg wird durch die Tryptophan-Hydrolase initiiert, die die Reaktion von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan katalysiert. Durch eine weitere Decarboxylierung entsteht Serotonin. Der Abbau von Serotonin erfolgt mittels Monoaminooxidasen und Aldehyddehydrogenase oder Aldehydoxidase:

$$Serotonin \longrightarrow 5 - Hydroxyindolacetaldehyd \longrightarrow Hydroxyindolacetat$$

Serotonin wird zudem weiter über N-Acetyl-5-Hydroxytryptamin in den Pinealozyten der Zirbeldrüse zu Melatonin verstoffwechselt, durch dessen Ausschüttung der Tag-Nacht-Rhythmus des Körpers gesteuert wird. Durch das Tageslicht wird die Ausschüttung des Hormons ins Blut gehemmt, erst nachts, bei fehlender Lichteinstrahlung, wird Melatonin aus den Speichern abgegeben und kann seine schlaffördernde Wirkung entfalten. Im Winter, wenn das Tageslicht nur wenige Stunden vorhält, bleibt der Melatoninspiegel auch tagsüber erhöht. Folglich können durch diesen Vorgang Müdigkeitserscheinungen, Schlafstörungen und auch Winterdepression hervorgerufen werden. Ein Großteil des Melatonins wird durch Cytochrom P450-Monooxygenasen zu 6-Hydroxymelatonin verstoffwechselt. Deren Derivate werden über den Urin ausgeschieden.

1.4. Indoleaminstoffwechsel bei Niereninsuffizienz

Durch Filtration werden Kynurenine schnell renal eliminiert. Bei einer Entzündungsreaktion kommt es zu einem vermehrten Ausscheiden von Kynureninen über den Harn. Im Fall einer insuffizienten Nierenfunktion ist auch die Ausscheidung der Kynurenine herabgesetzt und sie akkumulieren in der Zirkulation[151]. Die Bedeutung dieses Befundes ist bisher nicht geklärt. Aufgrund ihrer Zytotoxizität wird von einer pathophysiologischen Bedeutung im Rahmen der akuten und chronischen Niereninsuffizienz ausgegangen. Bekannt ist, dass es im Fall einer renalen Insuffizienz zu einer Ansammlung von verschiedenen Kynureninen kommt. Bei Untersuchungen anhand eines Tiermodells für Niereninsuffizienz wurde bei Ratten mit unilateraler Nephrektomie und Teilnephrektomie der verbliebenen Niere neben dem Anstieg der Plasmakonzentration der Kynurenine ein Abfall der Plasmakonzentrationen von Tryptophan beobachtet[152]. Als Ursache hierfür konnte einerseits eine Filtration von Tryptophan[83] und andererseits ein Anstieg der Expression der Tryptophan 2,3-Dioxygenase gezeigt werden[152,174]. Die gemessene Aktivität der IDO zeigte im Tiermodell keine Veränderung. Die Übertragbarkeit dieser Befunde ins humane System ist jedoch fraglich, besonders da die Niereninsuffizienz beim Menschen eine chronisch fortschreitende Erkrankung ist, deren Ätiologie als zunehmend eng im Zusammenhang mit chronischen inflammatorischen Prozessen stehend verstanden wird[29].

1.5. Sepsis

1.5.1. Definition und Epidemiologie

Der Begriff Sepsis kann als Fäulnis übersetzt werden und geht auf die Schriften von Hippokrates (ca. 460 bis 370 v.Chr.) zurück. Er leitet sich von gr. $\sigma\eta\pi\epsilon\iota\nu$ ("faul machen") ab und beschreibt das klinische Erscheinungsbild der Erkrankung im Endstadium. Robert Koch erkannte Bakterien als Krankheitserreger. Paul Ehrlich prägte 1900 den Begriff des *horror autotoxicus* (lat. *horror* Schrecken, gr. *auto* selbst, gr. *toxicum* Gift) in Erkenntnis der potentiell selbstschädigenden Wirkungen von Immunreaktionen gegen Krankheitserreger. Hugo Schottmüller beschrieb erstmals die Toxinwirkung von Bakterien und formulierte 1914 die erste Definition der Sepsis[181].

Durch den US-amerikanischen Intensivmediziner Roger C. Bone (1941-1997) wurde im Jahre 1989 Sepsis definiert und ist bis heute als allgemeingültige Definition der Sepsis akzeptiert[21]:

> Sepsis ist eine Invasion von Mikroorganismen und / oder ihrer Toxine in den Blutstrom, sowie die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen und pathophysiologischen Veränderungen, die als Reaktion auf diese gefährliche Invasion auftreten. Sie wird durch eine systemische Infektion mit Krankheitserscheinungen, die

Tabelle 1.3.: Neudefinition medizinischer Begriffe durch die Konsensus Konferenz der ACCP/SCCM 2001[107].

Begriff	*Definition*
Bakteriämie	Vorkommen lebensfähiger Bakterien im Blut
Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)	Generalisierte hyperinflammatorische Reaktion verschiedener Ursachen (z.B. Infektion, Verbrennung, Trauma)
Sepsis	SIRS hervorgerufen durch eine Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis mit Organdysfunktionen
Septischer Schock	Sepsis mit Schock

infolge konstanter oder periodischer Mikrobenaussaat von einem Herd aus in die Blutbahn auftreten, hervorgerufen. Ausgangspunkt einer Sepsis ist bei bakteriellen Erkrankungen ein lokaler bakterieller Entzündungsherd. Dieser Entzündungsherd wird als Sepsisherd definiert.

Der Organismus beginnt, um diese unkontrollierte Infektion zu eliminieren, mit Fieber, Leukozytose und Erhöhung der Atemfrequenz. Er reagiert jedoch auch auf diese Komplikation der Infektion mit einer Abfolge von inadäquaten und fatalen Reaktionsweisen. Das Immunsystem generiert gefährliche Dysregulationen, die medizinisch schwer beherrschbar sind. Die zunächst lokal begrenzte Infektion durch Bakterien, seltener durch Pilze, Viren oder Parasiten, tritt nach Nichtgelingen der Elimination ins benachbarte Gewebe über oder der Erreger wird über die Blutbahn in den gesamten Organismus verteilt. Nach Ausbreitung der Infektion können eine Immunparalyse oder ein Multiorganversagen zum Tode des Menschen führen.

Die Definition der Sepsis wurde 2001 von einer Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine weitergeführt. Dabei wurden einige medizinische Begriffe neu eingeführt bzw. neu definiert (s. Tab. **1.3** S. 27). Darüber hinaus wurde von der Konsensuskonferenz ein Kriterienkatalog für die Diagnose der Sepsis erstellt und von der Arbeitsgruppe Sepsis der European Society of Intensive Care Medicine modifiziert[107] (s. Tab. **1.4**, S. 28).

Epidemiologisch konnte mit Einführung der Antibiotikatherapie und der sich ständig fortentwickelnden intensivmedizinischen Behandlung die Sepsistherapie zwar verbessert werden, jedoch ist bis zum heutigen Tage noch keine zufriedenstellende Senkung der Mortalität er-

folgt[218]. Die Sterblichkeitsrate beim septischen Schock liegt immer noch bei etwa 50%[180]. In den meisten Fällen ist dies die Folge eines Multiorganversagens (MOV). Die häufig tödlich endende Erkrankung wurde demzufolge durch eine im Jahre 2001 veröffentlichte Studie zur Epidemiologie der Sepsis in den USA als immer noch eine weit verbreitete, hohe Kosten verursachende und häufig letal erfolgende Krankheit beschrieben[3]. In Deutschland liegt die Inzidenz dieser Erkrankung bei etwa 160 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr, von denen ca. 60.000 Patienten an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock versterben[164].

Tabelle 1.4.: Kriterien für die Sepsis, schwere Sepsis und den septischen Schock definiert durch die Konsensuskonferenz ACCP/SCCM 2001[107]. Der septische Schock ist unter Punkt IV. gesondert aufgeführt, zur Erklärung des Begriffs. Definitionsgemäß wird er unter schwerer Sepsis subsummiert. Aufgrund der verschiedenen Begriffe wird zusammenfassend von schwerer Sepsis und septischem Schock gesprochen.

I. Nachweis eines infektiösen Ursprungs der Inflammation (mind. eines der folgenden Kriterien):
- mikrobiologisch gesicherte Infektion
- klinisch gesicherte Infektion
- vermutete Infektion

II. Nachweis einer systemischen inflammatorischen Wirtsreaktion (SIRS) (mind. zwei der folgenden Kriterien):
- Hypo- ($< 36°C$) oder Hyperthermie ($> 38°C$)
- Tachykardie ($> 90/min$)
- Tachypnoe ($> 20/min$) und / oder arterieller $pCO_2 < 4,3kPa$ ($33mmHg$) und/oder maschinelle Beatmung
- Leukozytose $> 12.000/\mu l$ oder Leukopenie $< 4.000/\mu l$ und / oder Linksverschiebung $> 10\%$ im Differentialblutbild

Tabelle 1.4.: Fortsetzung

III. Infektionsbezogene Organdysfunktion (mind. eines der folgenden Kriterien):
- Akute Enzephalopathie (reduzierte Vigilanz, Unruhe, Desorientiertheit, Delir ohne Beeinflussung durch Psychotropika)
- Thrombozytopenie (Thrombozyten $< 100.000\mu l$ oder Thrombozytenabfall $> 30\%$ in 24 h ohne Blutverlust als Ursache)
- Arterielle Hypoxämie ($paO_2 < 10kPa$ ($75mmHg$) unter Raumluft, $paO_2/FiO_2 < 33kPa$ ($250mmHg$) ohne manifeste pulmonale o. kardiale Erkrankung als Ursache)
- Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck $< 90mmHg$ oder mittlerer arterieller Blutdruck$< 70mmHg$ über mind. 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr ohne andere Schockursachen, bzw. notwendiger Einsatz von Vasopressoren.)
- Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck $< 90mmHg$ oder mittlerer arterieller Blutdruck $< 70mmHg$ über mind. 1 Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr ohne andere Schockursachen)
- Renale Dysfunktion (Urinausscheidung $< 0,5ml/kg/h$ über > 1 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Anstieg des Serum-Kreatinins $> 2x$ über den Referenzbereich des jeweiligen Labors
- Metabolische Azidose (Basendefizit $> 5,0mEq/l$ oder eine Plasma-Laktat-Konzentration $> 1,5x$ oberhalb des Referenzbereichs des jeweiligen Labors)

IV. septischer Schock :
- Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck $< 90mmHg$ oder mittlerer arterieller Blutdruck $< 70mmHg$ über mind. 1 h trotz adäquater Volumenzufuhr ohne andere Schockursachen bzw. notwendiger Einsatz von Vasopressoren.)

1.5.2. Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der Sepsis ist trotz intensiver Forschungen noch nicht vollständig verstanden. Eine allgemeine Übereinkunft hat festgelegt, dass die Sepsis eine unkontrollierte entzündliche Reaktion im Wirt ist, die durch eine Infektion, unabhängig von den verursachenden Organismen, die bakterieller, viraler oder fungaler Art sein können, ausgelöst wird[32,86,104,165,167]. Die zugrundeliegenden Erreger sind hauptsächlich gram-positive und gram-negative Bakterien. Zu

den wichtigsten Vertretern der Sepsisverursacher zählen Enterobakterien, Kokken, Klebsiellen, Serratien und *Pseudomonas aeruginosa*. Pilze, darunter hauptsächlich Candida Spezies, sind nur in etwa 17% der Fälle der auslösende Sepsiserreger. Viren machen nur einen sehr kleinen Prozentsatz aus.

Der Sepsis geht die Invasion von Erregern in den menschlichen Organismus und der Ausbildung eines lokalen Entzündungsherdes voran. Ein solcher Sepsisherd kann in allen Körperregionen, wie dem Nabel (bei Neugeborenen), den Gefäßen (Gefäßkatheterinfektionen, Thrombophlebitis), der Haut (Wundinfektionen), im Hals-Nasen-Ohren Bereich (Tonsillitis), in der Lunge, dem Darm und den Gallenwegen entstehen. In mehr als der Hälfte der generalisierten bakteriellen Infektionen geht die Sepsis jedoch vom Urogenitalsystem aus. Ausgangspunkte stellen dabei unter anderem besiedelte Blasenkatheter dar.

Die Wirtsantwort auf die Infektion umfasst die Lokalisation, die Kontrolle der Invasion der Erreger sowie die Reparatur des geschädigten Gewebes. Sie beinhaltet weiterhin die Aktivierung zirkulierender und gewebsständiger Phagozyten, sowie die Produktion von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren. Das Syndrom entwickelt sich als eine Abfolge von komplexen, kaskadierten immunologischen Systemen, die durch Feedbackmechanismen reguliert sind.

Eingeleitet wird die Immunantwort durch Bindung pathogen-typischer molekularer Muster (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP) der Mikroorganismen durch Mustererkennungsrezeptoren (Pattern Recognition Receptors, PRRs) auf Immunzellen. Es sind drei Familien von PRRs bekannt. Diese sind Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like Rezeptoren (NLR, Nucleotide-Oligomerization Domain Leucine-rich Repeat Protein) und RIG-I-like Helikasen (Retinoic-Acid-Inducible Gene I). Beispielsweise wird das Peptidoglykan gram-positiver Bakterien von TLR-2 gebunden. Das Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien wird nach Bindung an das lipopolysaccharidbindende Protein (LBP) von TLR-4 erkannt.

Nach Bindung der mikrobiellen Bestandteile an PRRs kommt es zu einer Signalkaskade mit Aktivierung des zytosolischen Nuclear Factor-κB (NF-κB). Dieses bindet im Zellkern an Transkriptionsdomänen und induziert die Aktivierung von Genen der Immunantwort, wie proinflammatorischen Zytokinen (Tumor Nekrose-Faktor α (TNF-α), Interleukin-1 (IL-1)), Chemokinen (ICAM-1 (Intercellular-Adhesion Molecule-1), VCAM-1 (Vascular-Cell-Adhesion Molecule-1)) und Stickoxid (NO).

Aktivierte Granulozyten wiederum exprimieren Adhäsionsmoleküle, welche die Aggregation der Granulozyten, sowie deren Marginalisation an das Gefäßendothel vermitteln und damit die Diapedese durch die Gefäßwand und die Migration zum Entzündungsherd einleiten. Am Ort der Entzündung setzen die Granulozyten Mediatoren frei, die für die Kardinalsymptome einer Inflammation verantwortlich sind.

Der Entzündungsprozess ist durch proinflammatorisch und antiinflammatorisch wirkende Mediatoren von Makrophagen stark reguliert, welche durch die Invasion der Bakterien in das Gewebe aktiviert wurden. Zu den wichtigsten proinflammatorischen Mediatoren gehören IL-1 und TNF-α. Die Evidenz dafür, dass TNF-α eine wichtige Rolle bei der Sepsis einnimmt, ist besonders stark. Plasmaspiegel von TNF-α sind höher bei septischen Patienten als bei nicht-septischen Patienten mit Schock[158]. Weiter ist bekannt, dass Infusion von TNF-α Symptome ähnlich denen produziert, die im septischen Schock beobachtet werden[209]. Anti-TNF-α-Antikörper können Mäuse vor tödlichen Endotoxindosen schützen[16]. Die hohen Spiegel von TNF-α bei der Sepsis gehen zum Teil auf die Bindung von Endotoxin LPS an LBP und dessen anschliessende Übertragung an Cluster of Differentiation (CD) 14 auf Makrophagen, die TNF-α Freisetzung stimuliert, zurück[103].

Die Freisetzung von TNF-α ist durch autokrin wirkende Sekretion selbsterhaltend, während die Freisetzung anderer proinflammatorischer Mediatoren, wie IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 Plättchen aktivierender Faktor (PAF), Interferon-γ (IFN-γ) oder Eikosanoide die Sekretion anderer Mediatoren vorwiegend durch parakrine Sekretion ansteigen lässt. Ein proinflammatorisches Milieu führt zur Rekrutierung von weiteren Zelltypen des Immunsystems, wie Granulozyten und Makrophagen.

Abhängig von der Stärke der Immunantwort und der Pathogenität und Invasivität des Mikroorganismus ist der Wirt entweder imstande, die Infektion einzudämmen und zu sanieren, oder es kommt zur Ausbildung des septischen Syndroms.

Es entgleist dabei die initiale, proinflammatorische Immunantwort und es kommt zu überschießenden systemischen Zytokinausschüttung von IL-1, IL-6, IL-8 und TNF-α. Die systemische Infektion führt zu einer vollen Aktivierung aller Bestandteile des Immunsystems. Das Komplementsystem wird aktiviert und überschießende Mengen von C3a und C5a werden generiert.

Kann der Infektionsfokus nicht kontrolliert und saniert werden, kommt es zu kompensatorischen antiinflammatorischen Regulationen, welche durch erhöhte Spiegel von antiinflammatorischen Mediatoren gekennzeichnet ist.

Zytokine, die die Sekretion von TNF-α und IL-1 hemmen, werden als antiinflammatorische Mediatoren verstanden. Sie unterdrücken eine Immunantwort durch Hemmung der Zytokinproduktion von mononukleären Zellen und Monozyten-abhängigen T-Helferzellen. Dabei sind diese Mediatoren nicht universell antiinflammatorisch. IL-6 und IL-10 beispielsweise verstärken B-Zellfunktionen und die Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen.

Bereits zu Beginn des septischen Syndroms startet eine antiinflammatorische Antwort, bei der antiinflammatorische Mediatoren, wie IL-4, IL-10 und IL-1 Rezeptorantagonisten produziert

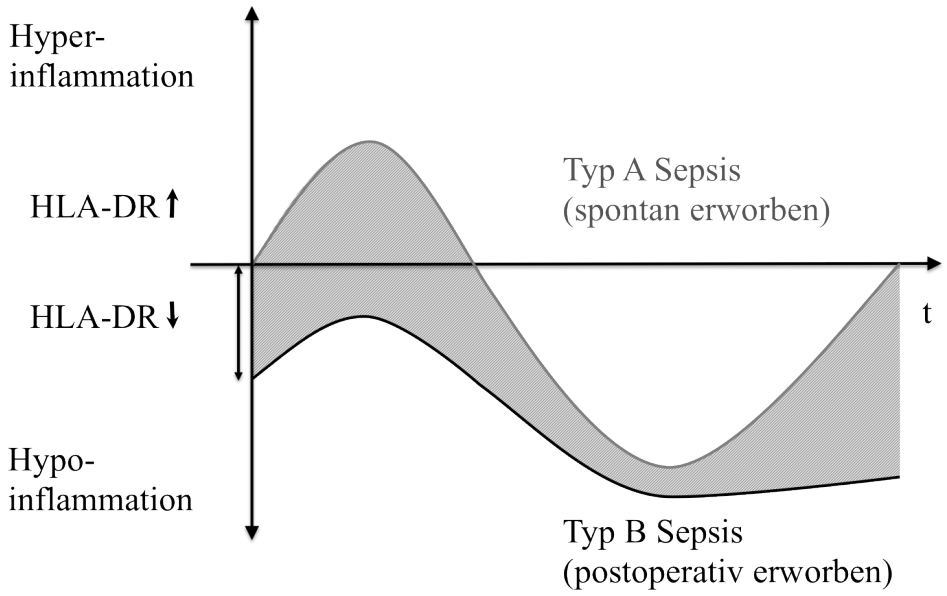

Abbildung 1.5.: Immunverlauf zweier Sepsistypen. Biphasisches Sepsismodell (modifiziert, nach Hotchkiss[86]). Unterschieden sind zwei verschiedene Verläufe einer Sepsis in Abhängigkeit von der Immunitätslage zum Ausgangszeitpunkt. Dabei ist zwischen der spontan erworbenen Sepsis (Typ A) und der postoperativ erworbenen Sepsis (Typ B) unterschieden. Der alternative schwere septische Verlauf, ausgehend vom Stadium der postoperativen Immunsuppression, geht mit einer stärker ausgeprägten und prolongierten hypoimmunen Phase einher und ist mit einer höheren Mortalität assoziiert als bei spontan akquirierter Sepsis ohne einem vorhergegangenen chirurgischen Eingriff.

werden und Apoptose in den aktivierten Immunzellen induzieren[32,167].

Die Balance dieser pro- und antiinflammatorischen Mediatoren reguliert den Entzündungsprozess.

Aus der Beobachtung der kompensatorischen Antiinflammation wurde das biphasische Sepsismodell entwickelt[86]. Während der ersten Phase dominiert die Hyperinflammation und die Hyperreaktion der Immunantwort des Wirtes, wobei im späteren Verlauf des Syndroms die antiinflammatorischen Prozesse überwiegen. In dieser Phase zeigt sich eine Anergie des Immunsystems (s. Abb **1.5**, S. 32).

Immunparalyse Als Immunparalyse bezeichnet man die anhaltende Hypoinflammation bei persistierender Infektion im septischen Syndrom[213]. Diese ist gekennzeichnet durch monozytäre Defekte der Phagozytose, der Antigenpräsentation und -verarbeitung, sowie der Zytokinsekretion. Um eine Immunparalyse festzustellen, kann die *ex vivo* Stimulierbarkeit der Monozyten zur Zytokinsekretion oder die Expressionsdichte von Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse II Molekülen (Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR) auf CD 14^+ Monozyten bestimmt werden. Die MHC Klasse II Antigenpräsentation ist für die Initiation einer adap-

tiven Immunantwort essentiell[97]. Die standardisierte Messung der HLA-DR Expressionsdichte erlaubt die Verlaufsbeurteilung des Immunstatus septischer Patienten sowie eine Prognoseabschätzung[48,133,172]. So ist eine anhaltende, stark erniedrigte Expressionsdichte von HLA-DR auf Monozyten mit einem vermehrten Auftreten sekundärer oder opportunistischer Infektionen sowie mit erhöhter Letalität assoziiert[86]. Der funktionelle Immunzelldefekt scheint maßgeblich für die Mortalität in der hypoimmunen Phase des septischen Syndroms verantwortlich zu sein, auf die der größere Teil der letalen Verläufe entfällt.

Bakterielle Toxine Als ein wesentlicher Auslöser der Sepsis gilt das in der Zellwand gram-negativer Bakterien befindliche Endotoxin LPS[134]. Dieses Endotoxin wurde zuerst durch Borden und Hall 1951 im Zusammenhang mit der Sepsis beschrieben[22]. Es besteht aus drei Komponenten, aus der äußeren hydrophilen O-Polysaccharidkette, dem Core-Oligosaccarid und dem kovalent verknüpften Lipidkomponent (Lipid A). Die Inflammationsreaktion des Endotoxins wird durch das Lipid A vermittelt[166] und durch die Bindung von LPS an LBP verstärkt. Der LPS-LBP-Komplex bindet an den CD14-Rezeptor, der für die Endotoxinwirkung bedeutend ist. Nach der Aggregation von CD14, dem Adapterprotein MD2 und des Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) kommt es zur Signaltransduktion[166]. In Monozyten erfolgt auf diesen Stimulus hin die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, von Produkten des Arachidonsäurestoffwechsels und von reaktiven Sauerstoffverbindungen[223]. Bei anhaltender Stimulation von Monozyten mit LPS kommt es zu einer Beeinträchtigung von deren Funktion. Dieses geht mit einer reduzierten HLA-DR-Expression auf der Zellmembran einher[221,222] (s. Abb **1.5**, S. 32). Endotoxin ist weiterhin fähig, die Expression von IL-6 und des Komplementaktivierungsprodukt C5a zu stimulieren.

Bei gram-positiven Bakterien sind die Exotoxine Peptidoglykan und Lipoteichonsäure die Faktoren, die die angeborene Immunität aktivieren. Weitere Bestandteile bakterieller Zellwände, wie Muramyldipeptid und bakterielle Stoffwechselprodukte, wie Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), toxisches Schocksyndrom Toxin-1 (TSST-1), Pseudomonas Exotoxin A oder das M Protein hämolytischer Gruppe A Streptokokken, sind in der Lage zu der Progression einer lokalen Infektion zu einer Sepsis beizutragen[203]. Der Zusammenhang von Toxinämie und Sepsis ist durch mehrere Beobachtungen gut belegt. Zum einen ist LPS im Blut septischer Patienten nachweisbar und zum anderen sind hohe Plasmakonzentrationen von LPS mit dem Auftreten eines septischen Schocks und des Multiorganversagens assoziiert[196].

1.5.3. Multiorganversagen (MOV)

Patienten mit einer unkontrollierten Infektion, schweren Verletzungen oder anderen schweren Krankheiten entwickeln häufig klinische und biochemische Anzeichen eines MOV, obwohl die betroffenen Organe möglicherweise nicht direkt von der ursprünglichen Erkrankung betroffen waren. Die Anzahl der dysfunktionalen Organsysteme korreliert dabei mit der Mortalität. Besonders bemerkenswert ist die Tatsache, dass das histologische Erscheinungsbild der versagenden Organe oft normal ist, mit minimaler oder keiner Apoptose oder Nekrose, selbst in den Organen der Patienten, die ihrer Krankheit erlegen sind[87]. Somit steht der Grad der Organdysfunktion nicht mit der zu erwartenden strukturellen Organschädigung in Übereinstimmung.

Da ein zunehmender Schweregrad der Sepsis mit einem progressiven Rückgang des Sauerstoffverbrauchs der Gewebe[101] und auch mit einem Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks in den betroffenen Geweben verbunden ist[19], liegt das Problem wahrscheinlich in einem reduzierten zellulären Umsatz von Sauerstoff, anstatt in einer Gewebehypoxie im eigentlichen Sinne. Das Multiorganversagen wird daher als ein Versuch des Körpers verstanden, das Überleben der Organe im Angesicht der anhaltenden kritischen Erkrankung zu gewährleisten, wobei die betroffenen Zellen in eine Art Ruhezustand oder Winterschlaf versetzt werden. Dieser Zustand ist prinzipiell reversibel und Patienten, die ein Multiorganversagen überlebt haben, brauchen beispielsweise selten dauerhaft eine Nierenersatztherapie[144]. Die Prognose und der Schweregrad der Erkrankung beziehungsweise eines MOV bei kritisch kranken Patienten kann mit verschiedenen Scoringsystemen erfasst werden, wie dem *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score* (APACHE II)[98] oder dem *Sepsis-related Organ Failure Assessment Score* (SOFA)[212]. Organe und abhängige Funktionen, die im Rahmen eines septischen MOV insuffizient werden, sind das Herz und damit das Kreislaufsystem, weiterhin die Leber (Entgiftung, Stoffwechselleistung, Gerinnung), Lunge, Gehirn, sowie das gastrointestinale System. Die Niere wird im folgenden Abschnitt separat behandelt.

Niere Die Kombination von akutem Nierenversagen und Sepsis ist mit einer erhöhten Sterblichkeit von bis zu 70% verbunden. Die Mechanismen, die das akute Nierenversagen durch die Sepsis und Endotoxinämie auslösen, sind noch nicht im Einzelnen verstanden.

In der Sepsis kommt es zu einer generalisierten arteriellen Gefäßerweiterung mit einer damit verbundenen Abnahme des systemischen Gefäßwiderstandes. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Achse, der nicht-osmotischen Freisetzung von Vasopressin und eine Zunahme der Herzleistung sind wesentliche körpereigene Reaktionen zur Aufrechterhaltung der Integrität der arteriellen Durchblutung, führen jedoch zu einer renalen Vasokonstriktion und in der Konsequenz zu akutem Nierenversagen.

Die arterielle Vasodilatation, die das septische Syndrom begleitet, wird zumindest teilweise durch Zytokine, wie TNF-α ausgelöst, die die Expression von induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase in dem Gefäßsystem regulieren.

Die glomeruläre Filtration wird durch den Differentialdruck zwischen den afferenten und efferenten Arteriolen über das glomeruläre Kapillarbett bestimmt. Noradrenalin, das zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks in der Sepsis verwendet wird, führt zu einer Konstriktion der afferenten glomerulären Arteriole. Dadurch sinkt der Filtrationsdruck, was den Verlauf des akuten Nierenversagens bei Patienten mit Sepsis verlängert. In der späteren Phase treten tubuläre Nekrosen aufgrund der Minderdurchblutung und der einhergehenden Hypoxämie auf und tragen zur Pathologie bei[182].

1.5.4. Therapie

Die Therapie der Sepsis umfasst, unabhängig vom Verlaufsmodell, kausale, supportive und additive Maßnahmen. Hauptansatz der Sepsistherapie ist die Diagnose und Sanierung des Sepsisherdes. Zum Nachweis des auslösenden Erregers werden mehrere und zu mehreren Zeitpunkten größere Blutproben gewonnen und zur Erregeranzucht kultiviert. Nicht selten handelt es sich jedoch um eine kryptogene Sepsis, deren Fokus auch nach umfangreicher Diagnostik nicht nachweisbar ist. Therapeutisch erfolgt zunächst eine kalkulierte antiinfektive Behandlung, welche die vermuteten und wahrscheinlichen Erreger erfasst. Das weitere Therapieziel ist die rasche Sanierung des Sepsisherdes durch geeignete Maßnahmen.

Die supportive Therapie dient der Unterstützung beeinträchtigter Organfunktionen. Dies umfasst vor allem die Aufrechterhaltung einer suffizienten Oxygenierung und Sauerstoffversorgung und der Aufrechterhaltung einer adäquaten Perfusion durch Vasopressor- und Volumentherapie sowie Beatmungsstrategien. Weitere supportive Maßnahmen sind Nierenersatztherapie, Corticosteroidtherapie und intensivierte Insulintherapie. Zu den additiven Therapiemaßnahmen gehören hauptsächlich Ernährungsstrategien.

Im Rahmen von Studien werden Therapieansätze verfolgt, welche die Elimination von Mediatoren der Sepsis und/oder die Rekonstitution von Immunfunktionen zum Ziel haben.

Immunrekonstitutive Therapie mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GMCSF) Viele Patienten mit Sepsis sterben im späteren Verlauf der Krankheit in einem Zustand der Hyporesponsivität und schweren Immunsuppression, ausgelöst durch eine antiinflammatorische Regulation (s. Paragraph **1.5.2** S. 32). Die Signifikanz dieser Tatsache wird gestützt durch die Beobachtung, dass die meisten Überlebenden der Sepsis sich spontan erholende Immunfunktionen zeigen[77].

GMCSF (Sargramostim, Molgramostim) ist ein 23-kD-Wachstumsfaktor mit ausgeprägter immunstimulatorischer Wirkung. GMCSF verstärkt die mikrobielle Abwehr durch Verbesserung der Reifung von Vorläuferzellen der Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Makrophagen, sowie der Differenzierung zu reifen Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Lymphozyten und Plasmazellen. Weiterhin werden Überleben, Proliferation, Phagozytose und Bakteriozidie von neutrophilen Granulozyten und Monozyten / Makrophagen verbessert[71]. Darüberhinaus kann GMCSF die Migration und Adhäsion von Neutrophilen fördern[71]. Für GMCSF wurde gezeigt, dass es die monozytäre HLA-DR-Expression und Endotoxin-induzierten proinflammatorischen Zytokin-Produktion in *ex vivo* Vollblutkulturen von Patienten mit schwerer Sepsis erhöht[55]. In Pilotversuchen zeigte sich, dass die dauerhafte Deaktivierung von Monozyten bei Sepsis *in vivo* durch die Anwendung von Immunstimulantien, wie GMCSF[143], IFN-γ[47], oder durch Entfernung von inhibitorischen Faktoren umgekehrt werden kann[177]. Bekannt ist, dass sich die Expression von monozytären HLA-DR durch die Gabe von GMCSF und IFN-γ stimulieren lässt[47,143].

Aus diesem Grund wurde der Wachstumsfaktor in mehreren kontrollierten klinischen Studien zur Rekonstitution des septischen Immundefekts eingesetzt. Eine Studie kam zu dem Ergebnis, dass GMCSF die peripheren neutrophilen Granulozyten erhöht, jedoch keinen Einfluss auf die Mortalität, Aufenthaltsdauer in der Intensivstation und im Krankenhaus hatte[161]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass GMCSF die Rate der infektiösen Komplikationen, die Dauer des Krankenhausaufenthaltes und die Dauer der Antibiotikatherapie reduziert, ohne dass die Mortalität jedoch beeinflusst wurde[148]. In einer dritten Studie ließ sich im Studienarm mit GMCSF Behandlung ein Trend zu einer kürzeren Dauer der mechanischen Beatmung (148 vs. 207 Stunden), zu einem kürzeren Krankenhausaufenthalt (59 vs. 69 Tage) und zu einem kürzeren Aufenthalt auf der Intensivstation (41 vs. 52 Tage) beobachten[123]. Aufgrund des bisher nicht nachgewiesenen Einflusses auf die Mortalität aufgrund der zu geringen Fallzahlen hat die immunmodulatorische Therapie mit GMCSF bisher keinen Eingang in die Therapie der Sepsis gefunden. Weitere Studien sind hier erforderlich.

1.6. Arbeitshypothese und Fragestellung

Durch die Arbeiten von Paul Ehrlich ist seit beinahe 120 Jahren bekannt, dass sich bei Infektionskrankheiten die Urinausscheidung von aromatischen Aminen erhöht[50]. Diese aromatischen Amine wurden Jahrzehnte später als Tryptophankatabolite des Kynureninabbauwegs identifiziert[100]. Die Ursache, sowie die physiologische beziehungsweise pathophysiologische Bedeutung dieser Befunde ist bisher nicht geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde an diese alten Er-

kenntnisse angeknüpft.

Die Akkumulation anfallender Metabolite des Kynureninabbauweges, sowie die Depletion von Tryptophan wirken durch Hemmung der Proliferation insbesondere von TH_1-Zellen suppressiv auf adaptive Immunfunktionen[10,52,58]. *In vitro* inhibieren IDO exprimierende Makrophagen und dendritische Zellen die Proliferation von T-Zellen und erhöhen deren Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion[106]. Die systemische Inhibition dieses Enzyms durch 1-Methyl-Tryptophan führt zu einer T-Zell-vermittelten Abstoßung allogener Föten[141]. Der Mechanismus der IDO-vermittelten Immunsuppression gewährleistet damit die immunologische Toleranz der Mutter gegenüber genetisch fremden Föten und erklärt somit ein lange bestehendes immunologisches Paradoxon. IDO ist als Schrittmacherenzym des Kynureninabbauweges vorwiegend in Zellen des angeborenen Immunsystems durch proinflammatorische Stimuli, wie IFN-γ[157] und TNF-α[168] induzierbar. Auch LPS gram-negativer Bakterien ist als wichtigstes Endotoxin in der Lage, IDO Expression in Monozyten zu induzieren[59]. Darüberhinaus wird für IDO- vermittelten Tryptophanmetabolismus ein antimikrobieller Effektormechanismus vermutet[42,78,114–116]. Dieser Mechanismus einer wirksamen Suppression adaptiver Immunreaktionen, der durch wichtige proinflammatorische Zytokine induziert wird, eröffnet Fragestellungen, unter welchen Umständen eine solche Regulation unter physiologischen aber auch pathophysiologischen Bedingungen relevant ist. Tatsächlich ist dieser Zusammenhang trotz umfangreicher Forschungsleistungen zu den Wirkmechanismen und Induktionsmechanismen von IDO Aktivität bisher nicht aufgeklärt worden. In Zusammenschau der Pathophysiologie des septischen Syndroms und den letztgenannten Wirkungen und Induktionsmechanismen der IDO Aktivität lassen sich Parallelen feststellen, die eine Untersuchung von IDO Aktivität in der Sepsis als interessant und notwendig erscheinen lassen. Durch klinische Studien sollte die Hypothese für eine Aktivierung der IDO im Rahmen des septischen Syndroms überprüft werden.

Folgende Fragestellungen wurden formuliert:

> Ist durch die Methode der quantitativen Tandem-Massenspektrometrie eine exakte Abbildung der Tryptophan-abhängigen Stoffwechselwege entlang des Kynurenin- und Serotoninweges aus peripherem Blut realisierbar?
>
> Läßt sich eine Aktivität des IDO-abhängigen Kynureninabbauweges in der Sepsis nachweisen und gibt es einen Zusammenhang mit dem Schweregrad einer Sepsis?
>
> Gibt es klinische Zustandsbilder, in denen der Kynureninabbauweg darüber hinaus aktiviert ist?

2. Materialien

2.1. Geräte

Tabelle 2.1.: Verwendete Geräte

Geräte	*Gerätetyp*	*Hersteller*
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson, Verviers, Belgien
Gefrierschrank (−20 °C)		Liebherr-International AG, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (−80 °C)		Forma Scientific, Thermo Electron Corporation,Langenselbold, Deutschland
Magnetrührer		Heidolph, Schwabach, Deutschland
Digitalwaage		Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tandem Massenspektrometer	Refurb Wallac MS2	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Vortex		IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	EBA 12 R	Hettich Zentrifugen GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2. Laborzubehör

Tabelle 2.2.: Verwendetes Laborzubehör

Artikel/Beschreibung	*Hersteller*
Pipettenspitzen 0,5μl-10μl	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 10μl-200μl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 1000μl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Handschuhe	Hartmann Peha soft Nr. 942161, Heidenheim, Deutschland
Mikropipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kryo-Röhrchen	Nunc Nr. 375418, Langenselbold, Deutschland
Laborflaschen Borosilikatglas	Neo Lab, Heidelberg, Deutschland
96-Well-Platten U-Boden (adhärent, Suspension)	Greiner Nr. 65000, Frickenhausen, Deutschland
Abdeckfolie für 96-Well PCR-Platten	Greiner Nr. 676070, Frickenhausen, Deutschland
EDTA-Vacutainer, K2E	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Röhrchen 5ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.3. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.3.: Chemikalien und Reagenzien

Produkt	*Hersteller*
Acetonitril	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
d_5-Tryptophan	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
d_5-Kynureninsäure	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA
Methanol	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Formiat	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Tabelle 2.3.: Fortsetzung, Chemikalien und Reagenzien

Produkt	*Hersteller*
Sulfosalizylsäure	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ddH_20	Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Plasma Standard	Recipe Chemicals München, Deutschland

2.4. Antikörper

Tabelle 2.4.: Verwendete Antikörper

Name	*Hersteller*
FITC Maus Anti-Human HLA-DR	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FITC Anti-Maus IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
TRI-COLOR Maus Anti-Human CD14	DAKO, Hamburg, Deutschland
QuantiBRITE Anti-HLA-DR PE /Anti-Monocyte PerCP-Cy5.5	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

3. Methoden

3.1. Tandem-Massenspektrometrie (MS^2)

Die Massenspektrometrie (MS) ist eine Analysetechnik zur Bestimmung freier Ionen im Hochvakuum. Es besteht aus einer Ionenquelle, die einen Strahl gasförmiger Ionen erzeugt, einem Masseanalysator, der die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) auftrennt, sowie einem Detektor. Zur massenspektrometrischen Analyse der Aminosäuremetabolite wurde ein Perkin Elmer Wallac MS^2 Massenspektrometer verwendet. Der Aufbau und die Einstellungen des Instrumentes mit Zusatzaggregaten wird nachfolgend erläutert. Der Zugang zum Gerät und der Methode wurde durch eine intensive Zusammenarbeit mittels Neugeborenenscreening von Herrn Dr. Fusch und Frau Dr. Müller der Kinderklinik der Universitätsmedizin Greifswald gewährleistet und ermöglicht.

Ionenquelle Als Ionenquelle zur Erzeugung von Ionen aus den Analyten wird in diesem Aufbau eine Elektrospray-Ionisationsquelle (ESI) eingesetzt. Hierbei werden die sich in Lösung befindlichen Analytmoleküle unter dem Einfluss einer Hochspannung (1-8 kV), sowie eines Stickstoffstroms versprüht. Dabei bilden sich zunächst kleine geladene Tröpfchen, die dann durch Verdampfung des Lösungsmittels an Größe abnehmen. Die Tröpfchen zerfallen aufgrund der Abstoßungskräfte zwischen gleichartigen Ladungen bei Erreichen des sogenannten Rayleigh-Limits in Coulomb-Explosionen zu noch kleineren Tröpfchen. Schliesslich kommt es zur Bildung freier gasförmiger Ionen. Die Elektrospray-Ionisation findet unter Atmosphärendruck statt. Da jedoch die Massenanalyse ein Hochvakuum erfordert, ist ein entsprechender Übergang, ein sogenanntes Interface, erforderlich. Die Hochspannung ist zwischen der ESI-Kapillare, über die die Probenzuleitung erfolgt, und dem Interface angelegt. Der entstehende Spraykegel wird auf eine Interfaceplatte mit runder Öffnung projiziert, hinter der sich eine sehr kleine weitere Öffnung (Orifice) von ca. 100 μm Durchmesser befindet. Zwischen den beiden Platten strömt Stickstoff als eine Art Vorhang dem Elektrospray entgegen und desolvatisiert die Ionen. Hinter dem kleinen Orifice kann ein Hochvakuum aufrechterhalten werden. Nachdem die Ionen das Orifice passiert haben, werden sie mit Hilfe der Ionenoptik weiter fokussiert.

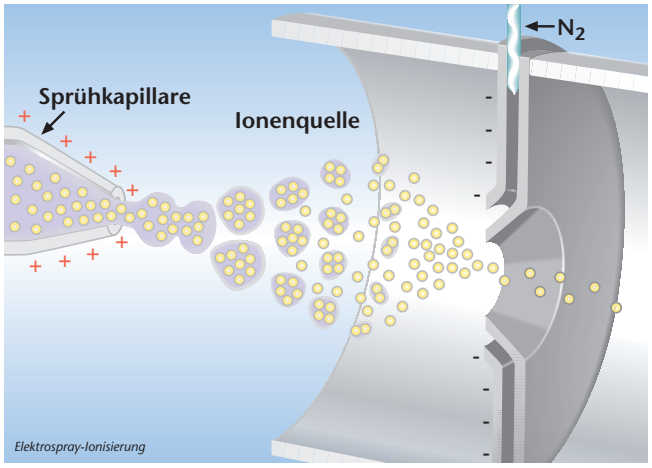

Abbildung 3.1.: Prinzip der Elektrospray-Ionisation. Quelle: http://www.magnet.fsu.edu

Massenspektrometer Als Massenspektrometer dient in einem Tandem- Massenspektrometer ein sogenanntes Triple-Quadrupol. Bei diesem Aufbau ermöglicht der erste Quadrupol der Massenanalyse, der zweite zum Hindurchleiten des Ionenstrahls durch eine mit Stickstoff gefüllte Kollisionskammer und der dritte zum Scannen der Ionen (s. Abb. **3.2**, S. 45). Diese Anordnung erlaubt eine gezielte Fragmentierung in der Kollisionszelle und die Massenanalyse der Fragmente, wie am Beispiel von 1-Methyl-Tryptophan in Abbildung **3.3** (S. 45) exemplarisch dargestellt. Als Analyseart wurde das Tochterionen-, bzw. Produktionen-Analyseverfahren, mit sogenanntem multiple-reaction-monitoring (MRM) verwendet. Dabei wird das erste Quadrupol auf das Masse-/Ladungsverhältnis des zu analysierenden Moleküls eingestellt. Nach der Fragmentierung in der Kollisionskammer werden die Massen der Fragmente analysiert. Die Fragmentierung erlaubt die genaue Identifizierung der chemischen Struktur des zuvor selektierten Ions. Die Einstellung der Ionenquelle erfolgt auf positive Spannung zur Erzeugung von Ionen durch Anlagerung von Protonen ($[M+H]^+$, Positivionenmodus).

Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie Die Vollblutproben der entsprechenden Patienten wurden mit Hilfe von Blutentnahmesystemen, beschichtet mit EDTA (Vacutainer, BD) mittels Venenpunktion entnommen. Zur Vermeidung eventueller zirkadianer Schwankungen des Aminosäurenstoffwechsels, fand die Entnahme immer zur gleichen Zeit statt (s. Par. **4.1.1** S. 61). Alle Arbeitsschritte nach der Blutentnahme bis zum Abschluss der Präparation der Proben erfolgten unter einer Laminar-Flow-Box. Zur Plasmapräparation wurde das Blut in 1,5ml Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt und 5 min bei 15.000g in einer Hämatokritzentrifuge zentrifugiert.

Zur Aufarbeitung der Proben für die massenspektrometrische Messung ist einerseits die Ausfällung der in der Plasmaprobe enthaltenen Proteine notwendig und andererseits die Zugabe

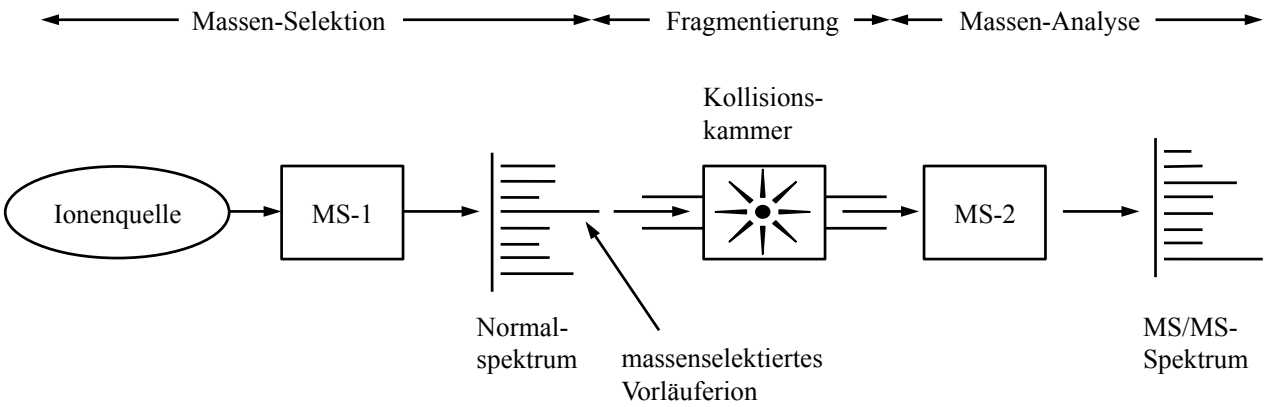

Abbildung 3.2.: Schematischer Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers. Das erste MS dient der Massenselektion, in der Kollisionskammer wird das selektierte Ion fragmentiert und im zweiten MS wird das Fragmentierungsspektrum analysiert.

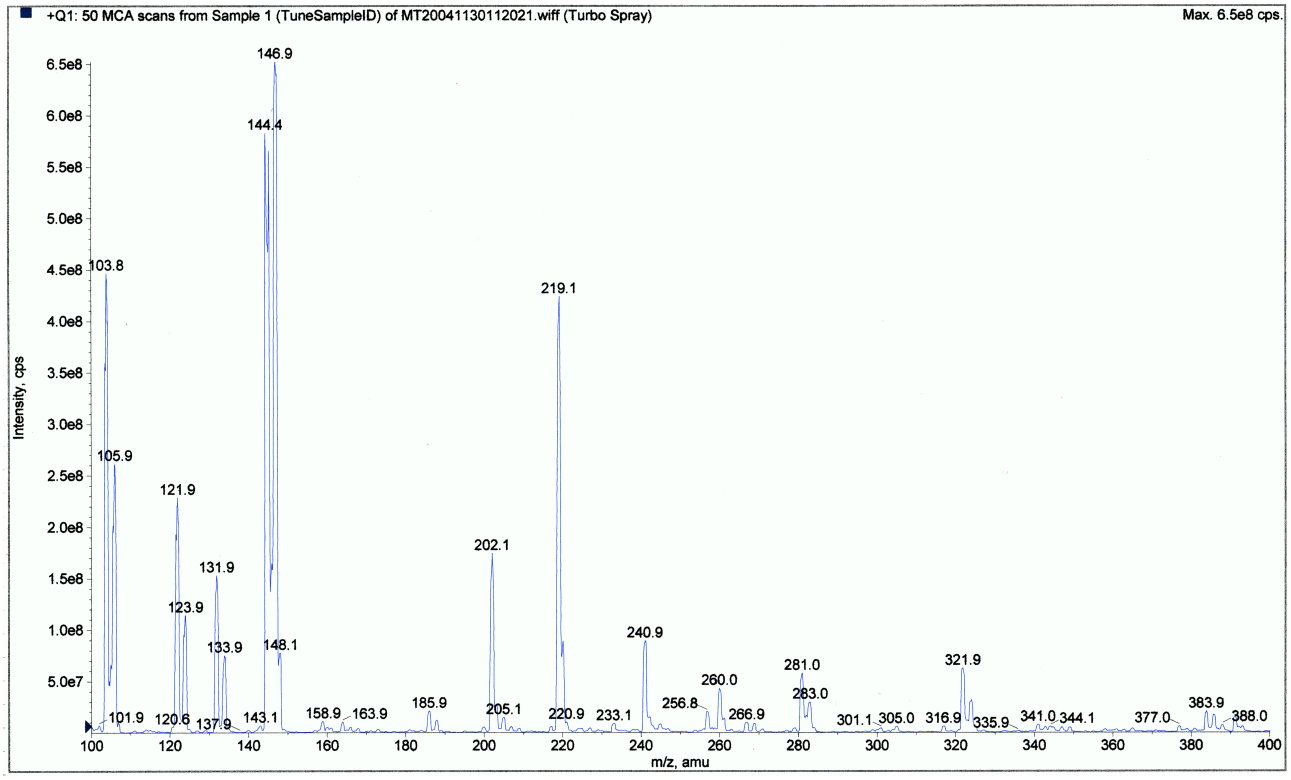

Abbildung 3.3.: Fragmentierungsplot am Beispiel von 1-Methyl-Tryptophan.

der internen Standards.

Als Enteiweißer diente Sulfosalizylsäure in einem Gehalt von $10g$, gelöst in $90ml$ Methanol. Dazu wurden $100\mu l$ des Überstandes der Hämatokritzentrifugation in $0{,}5ml$ Eppendorf Reaktionsgefäße vorgelegt. Die hinzugebenden Reagenzien wurden zuvor zu einem Ansatz der zu messenden Probenanzahl entsprechend gemischt. Von dem Ansatz erfolgte die Zugabe von $200\mu l$ zu einer Plasmaprobe. Die Zusammensetzung einer Probe ist in Tabelle **3.1** (S. 46) aufgeführt. Nachfolgend wurde die Probe mit dem Vortex $20s$ ausgiebig gemischt und für $30min$ bei 4 °C inkubiert, um eine maximale Fällung der Proteine zu erreichen. Nach erneutem Vortexen erfolgte die Zentrifugation bei $20.000g$ für $15min$ in einer Hämatokritzentrifuge bei 4 °C. $200\mu l$ des entstandenen Überstandes wurden in eine 96-Well Rundbodenplatte überführt. Die Platte wurde zum Schutz vor Verdunstung mit einer selbstklebenden Abdeckfolie versiegelt und unmittelbar im Massenspektrometer gemessen.

Tabelle 3.1.: Probenzusammensetzung für die MS^2

Name	*Volumen*
Plasma	$100\mu l$
Sulfosalizylsäure	$50\mu l$
d_5-Tryptophan	$10\mu l$
d_4-Kynureninsäure	$10\mu l$
Methanol	$25\mu l$
Aqua dest.	$115\mu l$
$\sum$	$300\mu l$

Probenzuleitung Die Probenzufuhr in das Spektrometer erfolgte durch einen Perkin Elmer 200 Autosampler mit einem Mikropumpensystem. Dieses bewerkstelligte die automatische Entnahme der Proben aus einer 96-Well Rundbodenplatte, die durch eine Abdeckfolie versiegelt wurde. Die Probe wurde in ein Fluss - und Lösungsmittel, bestehend aus 0,02% Formiat und 50%igem wasserverdünntem Azetonitril aufgenommen. Die Flussrate lag bei $50\mu l/min$, das injizierte Volumen betrug $20\mu l$.

Quantifizierung Das MRM Verfahren im Triple-Quadropol Massenspektrometer erlaubte die simultane Analyse einer großen Anzahl von Molekülen aus einer Probe in sehr kurzer Zeit. Zur Quantifizierung der Analyte aus einer Probe wurden interne Standards (IS) verwendet.

Das bedeutet, dass chemisch identische Standards der Analyte mit leicht abweichendem Masse-/Ladungsverhältnis in bekannter Konzentration den Proben zugegeben werden. Bei diesen Standards sind einige Wasserstoffatome/Protonen des Moleküls durch Deuterium ersetzt. Dies führt zu einer Massenzunahme des Moleküls ohne dessen Fragmentierungsverhalten zu beeinflussen.

Die verwendeten Standards sind in Tabelle **2.3** (S. 40) aufgelistet. Die Standards wurden mit einer Feinanalysewaage eingewogen und in bidestilliertem Wasser in kalibrierten Messzylindern gelöst. Daraus wurden zwei Verdünnungen erstellt, deren Konzentration jeweils im unteren und oberen erwarten Messbereich lagen um die Präzision im gesamten Messbereich überwachen zu können. Die gewonnenen Lösungen wurden aliquotiert und bei −80 °C gelagert. Zur Kalibrierung und Referenzierung erfolgte in gleicher Vorgehensweise die Herstellung von Lösungen der Reinsubstanzen der Analyte, auch diese wurden bei −80 °C gelagert. Das Einmessen der Analyte und Standards erfolgte unter Verwendung der Lösungen der Reinsubstanzen mit o. g. Einstellungen des Instrumentes. Die m/z der protonierten Übergangsionen der Analyte (s. Tab. **3.2**, S. 47) wurden im Spektrum des ersten Quadrupol identifiziert, eingestellt und die entstehenden Fragmente im dritten Quadrupol als Spektrum aufgezeichnet. Die stabilsten und signalstärksten Fragmente pro Analyt wurden nach Analyse des Spektrums mit Identifikation aller Fragmente für die Detektion ausgewählt. Nachfolgend wurden alle Steuerspannungen des ersten und dritten Quadrupol für die bestmögliche Ausbeute des gewählten Fragmentes optimiert. Die gewonnenen Einstellungsdaten wurden in eine Instrumenteneinstellungsdatei auf dem Steuer-PC des Spektrometers gesichert und für alle späteren Messungen verwendet.

Tabelle 3.2.: Verwendete Analyte in der MS^2 mit Angabe des Masse-/Ladungsverhältnisses der Vorläuferionen sowie des zur Detektion verwendeten Fragmentes.

Analyt	*m/z*	*Fragment [m/z]*
Tryptophan (TRP)	205	159
1-Methyl-Tryptophan (1-MT)	219	202
Kynurenin (KYN)	209	192
Kynureninsäure (KYNA)	190	144
Chinolinsäure (QUIN)	168	78
Hydroxy-Tryptophan (OH-TRP)	221	204
Serotonin (SER)	177	160
d_5-Tryptophan	210	193
d_4-Kynureninsäure	195	149

3.2. Klinische Studien

3.2.1. Prospektive empirische klinische Beobachtungsstudie an chirurgischen intensivtherapierten Patienten

Es wurden 100 konsekutive Patienten in die Studie miteinbezogen, die in die chirurgische Intensivmedizin in der Universitätsmedizin Greifswald verlegt wurden. Zu den Einschlusskriterien gehörten die schriftliche aufgeklärte Einwilligung des Patienten oder des gesetzlichen Vertreters, sowie ein Alter über 18 Jahren.

Die Ausschlusskriterien umfassten Schwangerschaft, Alter unter 18 Jahre, immunsuppressive Therapie / Medikation, hochdosierte Steroidtherapie, die Teilnahme an anderen Studien und moribunder Status. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät genehmigt. Zum Studieneinschluss wurden demographische Stammdaten aufgezeichnet und die Patientendaten für die Datenbearbeitung pseudonymisiert. Ab dem Zeitpunkt des Beginns der Verlaufsbeobachtung (Baseline) bis zum Studienaustritt durch Verlegung von der Intensivstation oder durch den Tod des Patienten wurden täglich klinische Verlaufsdaten, klinische Scores sowie Laborparameter aufgezeichnet. Venöse Vollblutproben zur Quantifikation der massenspektrometrischen Parameter, sowie zur Bestimmung der HLA-DR Rezeptordichte auf Monozyten wurden zum Zeitpunkt des Beginns der Verlaufsbeobachtung (Baseline) sowie zweimal wöchentlich abgenommen. Plasmaproben von 50 gesunden Freiwilligen dienten als Kontrollgruppe (Alter $35,1 \pm 12,5$ Jahre, 54% männlich).

Tabelle 3.3.: Patientencharakteristika (n = 100). Die Patienten wurden in (**A**) Patienten ohne Sepsis während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation, (**B**) Patienten mit einer schweren Sepsis und septischen Schock im späteren Verlauf ihres Aufenthalt auf der Intensivstation und (**C**) Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock bei Studienbeginn gruppiert. Stetig skalierte Parameter sind als Median dargestellt (25 % Quartil, 75 % Quartil).

Parameter	*keine Sepsis (n=50)* ***(A)***	*vor Sepsis (n=18)* ***(B)***	*Sepsis (n=32)* ***(C)***
Alter [Jahre]	66 (55; 72)	65 (50; 75)	66 (65; 75)
männlich, n (%)	29 (58)	9 (50)	20 (62,5)
Dauer der Intensivtherapie [Tage]	5 (3; 10.3)	17 (6,8; 40,8)	22 (6,3; 33,8)
Elektive Chirurgie, n (%)	28 (56)	9 (50)	12 (37,5)

Tabelle 3.3.: Fortsetzung, Patientencharakteristiken

Parameter	*keine Sepsis (n=50)* ***(A)***	*vor Sepsis (n=18)****(B)***	*Sepsis (n=32)****(C)***
chir. Notfall, n (%)	9 (18)	7 (38,9)	17 (53,1)
kein chir. Eingriff, n (%)	13 (26)	2 (11,1)	3 (9,4)
Patienten verstorben, n (%)	6 (12)	3 (16,7)	16 (50)
Septischer Focus, n (%)			
Pneumonie		4 (22)	(15,6)
Peritonitis		7 (39)	17 (53)
Mediastinitis		-	2 (6,3)
Pankreatitis (akut nekrotisierend)		2 (11,1)	5 (15,6)
Harnwegsinfektion		2 (11,1)	-
Wundinfektion		2 (11,1)	2 (6,3)
Septischer Fokus unbekannt		1 (5,5)	1 (3)
Vorerkrankungen, n (%)			
Diabetes mellitus	11 (22)	2 (11,1)	5 (15,6)
chron. Niereninsuffizienz	5 (10)	3 (16,7)	6 (18,8)
Maligne Neubildung	16 (32)	6 (33,3)	11 (34,4)
Immunsuppression	0	0	0

Tabelle 3.4.: Klinische Scores und zu Studienbeginn (n = 100). Die Patienten wurden in (**A**) Patienten ohne Sepsis während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation, (**B**) Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock im späteren Verlauf ihres Aufenthalt auf der Intensivstation und (**C**) Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock bei Studienbeginn gruppiert. Stetig skalierte Parameter sind als Median dargestellt (25 % Quartil, 75 % Quartil).

Parameter	*keine Sepsis (n=50)* ***(A)***	*vor Sepsis (n=18)* ***(B)***	*Sepsis (n=32)****(C)***
SIRS positiv, n (%)	24 (48)	13 (72,2)	32 (100)

Tabelle 3.4.: Fortsetzung, Patientencharakteristiken bei Studieneintritt

Parameter	*keine Sepsis (n=50)* ***(A)***	*vor Sepsis (n=18)****(B)***	*Sepsis (n=32)****(C)***
SOFA Score	4 (3; 7)	7 (6; 11)	8 (6; 13)
APACHE II Score	19 (15; 25)	21 (17; 26)	22 (19; 29)
HLA-DR < 5000 [MEF], n (%)	21 (42)	11 (61,1)	31 (96,9)
Temperatur [°C]	37 (36,6; 37,5)	37,5 (36,6; 37,9)	37,2 (36; 38,2)
Herzfrequenz [n/min]	89 (70; 98)	93 (82; 102)	105 (93; 116)
Mittlerer arterieller Druck (MAP) [mmHg]	83 (60; 90)	72 (67; 82)	63 (51; 70)
Leukozyten [gpt/l]	11,4 (8,5; 14,9)	12,4 (8,2; 17,1)	13,5 (9,9; 20,5)
Lymphozyten [gpt/l]	1,2 (0,84; 1,6)	0,84 (0,54; 1,27)	0,96 (0,57; 1,39)
Neutrophile [gpt/l]	8,9 (6,4; 10,8)	12,2 (6,6; 16,1)	10,9 (7,5; 17,7)
Thrombozyten [gpt/l]	180 (140; 240)	183 (67; 319)	130 (84; 238)
Glucose [mmol/l]	7,5 (6,4; 9,1)	6,5 (5,75; 8,6)	8,1 (6,2; 11,2)
arterieller pH	7,44 (7,40; 7,48)	7,43 (7,35; 7,48)	7,37 (7,28; 7,44)
Natrium [mmol/l]	136 (130; 141)	139 (134, 145)	137 (133; 141)
Bilirubin [μmol/l]	9,5 (6,9; 18,5)	10,85 (6,6; 68,5)	13,05 (7,68; 36,55)
Glasgow Coma Scale	11 (4; 14)	13 (12; 14)	12 (10; 13)

Tabelle 3.4.: Fortsetzung, Patientencharakteristiken bei Studieneintritt

Parameter	*keine Sepsis (n=50)* ***(A)***	*vor Sepsis (n=18)****(B)***	*Sepsis (n=32)****(C)***
PaO_2 [mmHg]	95	81	80,75
	(86,65; 99)	(74,5; 94)	(72,43; 97,78)
FiO_2 [mmHg]	28	38	36
	(21; 41)	(30; 47)	(21; 52)
Hämatokrit [%]	30	28,2	29,6
	(27,3, 34,4)	(26,2; 36,5)	(26,4; 32,1)
Norepinephrin, n (%)	11 (22)	0	32 (100)
Maximale Dosis [$\mu g/kg/min$]	0,13	-	0,14
	(0,07; 0,32)		(0,07; 0,41)
Osmolarität [mosmol/kg]	292	303	309
	(282; 303)	(288; 317)	(300; 319)
Akutes Nierenversagen, n (%)	4 (8)	6 (33,3)	15 (46,9)
Kreatinin [$\mu mol/l$]	70	86,5	118,5
	(59; 100)	(62,8; 132)	(81; 168,5)
Patn. maschinell beatmet, n (%)	11 (22)	16 (88,9)	30 (93,8)
Atemfrequenz [n/min]	19	20	20
	(13; 23)	(18,3; 30)	(16; 22)

3.2.1.1. Routinelaboruntersuchungen

Die Routinelaboruntersuchungen wurden durch das Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universitätsmedizin Greifswald nach den dort üblichen Methoden und Standards analysiert.

Tabelle 3.5.: Verwendete Routinelaborparameter.

Analyt	*Einheit*
Procalcitonin	ng/l

Tabelle 3.5.: Fortsetzung, Routinelaborparameter.

Analyt	*Einheit*
C-reaktives Protein	mg/l
Differentialblutbild	gpt/l
Glucose	$mmol/l$
pH Wert	dimensionslos
Osmolarität	$mosmol/kg$
Kreatinin	$\mu mol/l$

3.2.1.2. Messung der HLA-DR Rezeptordichte auf Monozyten

Die standardisierte quantitative Bestimmung der HLA-DR Expression auf $CD14^+$ Monozyten aus peripherem Blut erfolgte durchflusszytometrisch mittels des QuantiBRITE Testsystems (BD). Zur Färbung der Monozyten diente dabei ein Phycoerythrin-konjugierter anti-HLA-DR-Ak sowie zur Populationsmarkierung ein anti-CD14-Ak. Das Testsystem basierte auf der Messung von Phycoerythrin-beladenen Beads. Die Farbintensitäten im entsprechenden Farbkanal für die Beads dienten zur Eichung. Dadurch ließ sich aus der Farbintensität der mit anti-HLA-DR-Ak beladenen $CD14^+$ Zellen die Anzahl der Rezeptordichte bestimmen. Sie wurden als [MEF] (molecules of equivalent fluorochrome) angegeben. Eine Expressionsdichte von unter 5000 MEF wurde als Immunparalyse gewertet.

3.2.1.3. Klinische Scores und Definitionen

Für jeden Studientag wurden folgende klinische Scores zur Schweregrad- und Verlaufsbeurteilung der Sepsis erhoben:

- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score II (APACHE II)[98]
- Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA)[17,212]
- Severe Inflammatory Response Syndrome Kriterien / Score (SIRS)[20]
- Sepsiskriterien (SCCM / ACCP)[107]

Als Kriterien für Sepsis, schwere Sepsis und septischen Schock wurden die ACCP/SCCM Kriterien angewandt[107]. Diese sind in Tabelle **1.4** (S. 28) zusammengefasst.

Eine akute Niereninsuffizienz wurde anhand der dem SOFA Score zugrundeliegenden Grenzwerte ab einem Anstieg des Serumkreatinins auf >120 $\mu mol/l$ festgestellt.

3.2.1.4. Statistische Analyse

Die Berechnung der angegebenen Quotienten KYN/TRP, QUIN/TRP bzw. SER/TRP erfolgte wie folgt: 100 x X/TRP. Für kategoriale Daten wurden deren prozentuale Anteile angegeben. Kontinuierliche Daten wurden in Abbildungen und Tabellen als Mittelwert und Standardabweichungen bzw. der Median mit der 25. und 75. Perzentile ausgewiesen. Als univariate Analyse wurde für kategoriale Daten der exakte Fisher Test verwendet. Für stetige Daten kam der Mann-Whitney U-Test zur Anwendung. Bei mehr als zwei ungepaarten Gruppen beziehungsweise diskreten Daten wurde der Kruskal-Wallis Test angewendet und bei normalverteilten Daten der t-Test.

Im Fall der Varianzanalyse von Messungen zwischen Studiengruppen und Kontrollgruppen wurden abhängige Variablen log-transformiert. Dieses ermöglichte eine bessere Entsprechung (Homoskedastizität) der Modellvoraussetzungen aufgrund der unterschiedlichen Varianzen. Dies ermöglichte eine Verminderung der abhängigen Variablen durch das Auftreten teils sehr hoher/-niedriger Werte. Alter und Geschlecht wurden als Kovarianzen einbezogen zur Kontrolle ihres Einflusses, aufgrund der Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und Intensivpatienten für diese Parameter. Die paarweise durchgeführten post-hoc Tests wurden nach der Bonferroni-Methode für multiple Paarvergleiche korrigiert.

Bei der Berechnung des prädiktiven Wertes der gemessenen Parameter für die Entwicklung einer septischen Komplikation (positives Ereignis) wurden nichtparametrische Receiver-Operating-Characteristics (ROC) Analysen durchgeführt, um die potentielle diagnostische Güte der Parameter für die Sepsis zu berechnen. Um eine Tendenz zu Grenzwerten mit niedriger Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) durch die geringere Zahl positiver Ereignisse zu vermeiden, erfolgte für die Bewertung und Darstellungen die Wahl optimaler Grenzwerte, bei denen die Sensitiviät und Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) vergleichbar hoch waren. Aus der ROC Analyse wurden die positiven und negativen prädiktiven Werte, sowie die Fläche unter der Kurve (area under the curve, AUC) angegeben. Für den Vergleich von Indoleaminspiegeln für die beiden klinischen Zustände, Nierenversagen und Sepsis, wurden eine Varianzanalyse angewendet, wobei auch die Interaktion der Varianzen der beiden Variablen ausgegeben wurde (interaction term). Für die Analyse wurde ein randomisierter Wert pro Patient durch die Software ausgewählt, um Abhängigkeiten innerhalb der Daten eines Patienten zu vermeiden. Die Charakteristik der sich ergebenen Gruppen ist in Tabelle **4.3** (S. 70) angegeben. Dargestellt wurden die vom Modell prognostizierten angepassten Mittelwerte (Mittelwerte der kleinsten Quadrate). p Werte

Tabelle 3.6.: Studienpopulation und Charakteristika der Patientengruppe (n = 40) und der Kontrollgruppe (n = 40). Angegeben sind für stetige Daten Mittelwerte und Standardabweichungen, sowie Prozentwerte für kategoriale Daten.

Studiengruppe	*Parameter*	*Wert*
Patienten	Alter	57 (± 14)
	Geschlecht männlich	21 (52,5)
	Kreatinin (Serum)	4,5 mg/dl (± 2,7)
	Harnstoff (Serum)	101,4 mg/dl (± 42,0)
	geschätzte GFR	22,4 ml/min/1,73m^2 (± 13,6)
	Kreatininausscheidung (Clearance)	21,6 ml/min (± 14,3)
	Körpergewicht	67,1 kg (± 2,8)
	Körpergröße	165,5 cm (± 9,4)
Kontrollprobanden	Alter	34 (± 9)
	Geschlecht männlich	26 (65)
	Kreatinin (Serum)	1,1 (± 0,2)
	Körpergewicht	72 kg (± 3,9)

$< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und entsprechend ausgewiesen, beziehungsweise der exakte p Wert benannt. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS (Version 11.5, Chicago, IL, USA) und R (Version 2.7.0, GPL (general public license)). Die Graphiken wurden mit GraphPad Prism (Version 5, La Jolla, CA, USA) erstellt.

3.2.2. Prospektive klinische Beobachtungsstudie an Patienten in verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz

Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke und Herrn PD Dr. med. Jörg Schefold der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin im Virchow Klinikum der Charité durchgeführt. Die Studienleitung, die Aquisition der Patienten, die klinischen Daten und Labordaten sowie die Auswertung erfolgte durch Herrn PD Dr. med. Schefold. Im folgenden werden die wichtigsten Schwerpunkte dieses Bereiches dargelegt.

3.2.2.1. Studienpopulation

In eine prospektive Studie wurden 40 Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) eingeschlossen. Diese wurden nach folgenden Kriterien, den KDOQI Kriterien der National Kidney Foundation (NKF)[57], der Stadien drei bis fünf, welche im Virchow Klinikum der Charité in

Berlin und der Universitätsmedizin Greifswald hospitalisiert waren, definiert. Darunter waren siebzehn Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (End-Stage Renal Disease, ESRD), welche regelmäßige Hämodialyse benötigten (drei Mal wöchentlich für 4 h). Die Grunderkrankungen, welche zur Nierenerkrankung führten, waren diabetische Nephropathie (n=19, 48%), hypertensive Nephropathie (n = 16, 40%), Glomerulonephritis (n = 4, 10%) und IgA-Nephropathie (n = 1, 0.3%). Hauptnebenerkrankungen waren koronare Herzkrankheit (n = 32, 80%), Hyperlipoproteinämie (n = 26, 65%) und dekompensierte Herzinsuffizienz (n = 14, New York Heart Association (NYHA) Stadium 1 und 2, 35%). 40 gesunde freiwillige Probanden dienten als Kontrollgruppe. Bei allen Probanden erfolgte eine morgendliche Blutentnahme, um den systematischen Fehler durch die tageszeitabhängigen Schwankungen des Tryptophanspiegels zu kontrollieren (siehe Paragraph **4.1.1**).

Die Charakteristika sind in Tabelle **3.6** (S. 54) aufgeführt.

Einschlusskriterien waren ein Alter über 18 Jahren, sowie die Hospitalisierung aus anderen Gründen als Infektionen oder akute Entzündungserscheinungen. Ausschlusskriterien waren demzufolge Zeichen der systemischen oder lokalisierten Infektion (bakteriell, viral, fungal) wie Husten, Expektoration, Zeichen für entzündliche Infiltrate im Röntgen Thorax, Harnwegsinfektion oder Diarrhoe. Malignome, akute Leukämie oder Vorhandensein einer Medikation welche mit dem Tryptophanmetabolismus interferiert (z. B. Serotonin Wiederaufnahmehemmer) führten ebenfalls zum Ausschluss. Die Durchführung der Studie erfolgte in Übereinstimmung mit den Anforderungen der Deklaration von Helsinki. Alle beteiligten Patienten gaben ihr aufgeklärtes Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

3.2.2.2. Erfassung der Nierenfunktion und Messung von Parametern der chronischen Entzündungsaktivität

Zur Detektion der Nierenfunktion wurden folgende Parameter erfasst:

- geschätzte Kreatininausscheidung (Clearance, mg/dl) nach der Cockroft-Gault Formel
- Harnstoffkonzentrationen (Serum mg/dl)
- geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) nach MDRD Formel.

Zur Messung chronischer Entzündungsaktivität wurden folgende Parameter in einem zertifizierten Labor gemessen:

- hsCRP (high sensitivity C reaktives Protein), immunturbidimetrisch gemessen, mg/dl
- Leukozytenzahlen in gpt/l

- Thrombozytenzahlen in gpt/l
- sTNFR-I, löslicher TNF Rezeptor 1, pg/ml, Messbereich > 15,6 und < 1000 pg/ml.

Probengewinnung und Aufarbeitung für die massenspektrometrische Messung erfolgte wie in Abschnitt **3.1** (S. 43) angegeben. Die venösen Vollblutproben wurden am Morgen (zwischen 7:00 Uhr und 8:30 Uhr) und am Nachmitttag (zwischen 13:00 Uhr und 14:30 Uhr) oder, im Fall von Patienten mit End-Stage Renal Disease (ESRD) direkt vor und 20 min nach der Hämodialyse. Die Plasmaproben wurden nach o.g. Protokoll gewonnen und bis zur Messung bei −80 °C gelagert.

3.2.2.3. Statistik

Für alle Daten wurde die Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test bestätigt. Zum Vergleich der Gruppen bezüglich der Schlüsselmetabolite des Kynureninstoffwechsels erfolgten Varianzanalysen. P Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant bewertet und entsprechend ausgewiesen. Die Ergebnisse in den Tabellen wurden als Mittelwerte ± Standardabweichungen dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism (Version 5, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung der quantitativen Tandem-Massenspektrometrie von Tryptophanderivaten

Zur Messung der Aktivität des Kynureninstoffwechsels wurde die massenspektrometrische Messung von Schlüsselparametern (s. Tabelle 3.2, S. 47) des Stoffwechsels aus Plasmaproben etabliert. Die Evaluation der Methode ist nachfolgend beschrieben.

4.1.1. Qualitätsmanagement

Die Präzision bzw. Reproduzierbarkeit beschreibt die Übereinstimmung zwischen Ergebnissen, die durch Wiederholung von Messvorgängen erhalten wurden. Mit der Präzision werden zufällige Fehler erfasst. Ein Maß dafür ist die Standardabweichung (SA) bzw. die Varianz über der SA. Mit Varianz werden Bereiche definiert, innerhalb derer ein Einzelwert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit anzutreffen ist. Als Maß für die Richtigkeit ist die Wiederfindungsrate üblich. Sie beschreibt den prozentualen Anteil der wiedergefundenen Konzentration an der wahren Konzentration. Zur Validierung und Qualitätskontrolle wurden daher wichtige Messeigenschaften der Methode bestimmt, beziehungsweise als Qualitätskontrolle bei jeder Messung überprüft.

Die für die Validierung erforderlichen Kriterien Präzision für den Messbereich, der Linearitätsnachweis, sowie die Untersuchung auf Matrixeffekte wurden bereits in Abschnitt 3.1 (S.43) beschrieben. Die Spezifität und Selektivität wurden bei der Einmessung der Analyte durch das spezifische Fragmentierungsmuster der Reinsubstanzen nachgewiesen, sowie eine Kalibrationskurve erstellt.

Die im Rahmen des Qualitätsmanagements erfasste inter- und intraserielle Präzision, Richtigkeit, sowie die Berücksichtigung von Störeinflüssen wird nachfolgend beschrieben.

Inter-Assay Varianz Zur Erfassung der interseriellen Präzision sowie zur Qualitätskontrolle der Methode wurden als Kalibrierproben zwei Plasmapoolproben von 11 gesunden Spendern einmal mit subphysiologischen Konzentrationen und mit superphysiologischen (10fach konzentriert) Konzentrationen gespiket. Die Proben wurden aliquotiert und bei −80 °C gelagert. Jeweils eine dieser „high“ und „low“ Proben wurde einer Probenserie voran- und nachgestellt, um die Qualität der Messungen verfolgen zu können.

Intra-Assay Varianz Die Intra-Assay-Varianz ist ein Maß für die intraserielle Präzision und Reproduzierbarkeit eines Analyseverfahrens. Im Gegensatz zum Versuchsansatz zur Bestimmung der Inter-Assay-Varianz wurden die gleichen Proben jedoch nicht zu mehreren Zeitpunkten hinweg gemessen, sondern in vielfacher Bestimmung zu einem Messzeitpunkt.

Zur Bestimmung der Intra-Assay Varianz wurde eine Plasmaprobe eines gesunden Probanden in fünf Probenansätze unterteilt und jeweils separat zur Messung aufgearbeitet (s. Par. **3.1**, S. 44). Diese fünf Proben wurden nachfolgend in fünf technischen Replikaten gemessen. Zur statistischen Trennung von Messvarianz und Prozessvarianz wurden die Standardabweichungen und Variationskoeffizienten (VK) der 5 zusammengehörenden Proben einer Aufarbeitung errechnet und von den SA und VK aller Proben subtrahiert. Dies wurde näherungsweise als Prozessvarianz (Vergleich zwischen den fünf Aufarbeitungen) und Messvarianz (Vergleich von SA und VK aller fünf Proben in fünf Replikaten abzüglich SA und VK der fünf Aufarbeitungen) interpretiert (s. Tab. **4.1**, S. 59). In der Intra-Assay Varianz zeigten sich bei KYNA, QUIN und OH-TRP erhöhte Variationskoeffzienten. Ursächlich hierfür ist das abnehmende Signal- zum Rauschverhältnis (Sensitivität) des Messaufbaus im Nanomolbereich unterhalb von $1 \mu mol/l$. Tatsächlich zeigten sich bei Plasmaproben, denen die Analyte zusätzlich zugefügt wurden, deutlich geringere Variationskoeffizienten. Für KYNA lag diese bei 2,5%, für QUIN bei 6% und für OH-TRP bei 2,5%.

Tabelle 4.1.: Intra-Assay Varianz der MS/MS Analyse der Analyte. Die Standardabweichungen (SA) sind angegeben in $\mu mol/l$, die Variationskoeffizienten (VK) sind angegeben in %.

Analyt	Gesamtvarianz		Prozessvarianz		Messvarianz	
	SA	*VK*	*SA*	*VK*	*SA*	*VK*
Tryptophan (TRP)	2,77	5,1	2,42	4,5	0,35	0,59
Kynurenin (KYN)	0,26	5,4	0,24	4,9	0,023	0,44
Kynureninsäure (KYNA)	0,027	18,3	0,023	15,3	0,005	3
Chinolinsäure (QUIN)	0,95	24,8	0,62	17,4	0,32	7,3

Tabelle 4.1.: Fortsetzung, Intra-Assay Varianz

Analyt	Gesamtvarianz		Prozessvarianz		Messvarianz	
	SA	*VK*	*SA*	*VK*	*SA*	*VK*
OH-Tryptophan (OH-TRP)	0,064	31,9	0,055	27,3	0,009	4,6
Serotonin (SER)	0,11	9,5	0,09	8,3	0,014	1,1

Richtigkeit Mit Hilfe der Präzision eines Analyseverfahrens lässt sich nur seine Reproduzierbarkeit charakterisieren. Auch gut reproduzierbare Analysenwerte können trotzdem falsch sein, das heisst, die ermittelte Konzentration des Analyten kann sich von seiner wahren Konzentration in der Probe deutlich unterscheiden. Die sogenannte systematische Abweichung zwischen dem Mittelwert und dem wahren Wert ist als Richtigkeit definiert. Der Fehler eines einzelnen Konzentrationswertes setzt sich somit aus den zufälligen (Präzision und Reproduzierbarkeit) und systematischen Abweichungen (Richtigkeit) zusammen.

Richtige Analysenwerte erhält man über unabhängige und alternative Methoden oder über Standardreferenzmaterial. In diesem Fall wurde mit Standardreferenzmaterial gearbeitet. Bei dem Versuch zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde ein Standardreferenzplasma der Firma Recipe Chemicals in Mehrfachbestimmung gemessen, um die Richtigkeit der Methode zu evaluieren. Für das Standardplasma war allerdings nur der genaue Inhalt von TRP bekannt, für die übrigen gemessenen Analyte existierte kein Referenzmaterial. Bei der Mehrfachmessung des Referenzplasmas zeigte sich eine Standardabweichung, die innerhalb der Standardabweichung der Inter-Assay Varianzen lag und somit als hohe Wiederfindungsrate und sehr gute Richtigkeit gewertet wurde. Da die Kalibrierung für alle Analyte in gleicher Weise vorgenommen wurde, konnte eine gute Richtigkeit für die gesamte Methode abgeleitet werden. Anhand des Referenzplasmas war diese jedoch nicht überprüfbar.

Matrixauswahl Bei der Messung von humanem Probenmaterial im Massenspektrometer ist die vorherige Reduktion des in der Probe enthaltenen Proteinanteils notwendig um Verunreinigungen der Messapparatur zu minimieren. Trotz des höheren Proteingehalts ist Plasma als Ausgangsmaterial dem Serum vorgezogen worden. Hintergrund ist die Freisetzung von Serotonin, mutmasslich aus aktivierten Thrombozyten, welche Serotonin intrazellulär speichern. So ist der einzig signifikante Unterschied von Serumproben gegenüber Plasmaproben der erhöhte Serotoninspiegel (s. Abb. **4.1** S. 60 bis Abb. **4.3** S. 61).

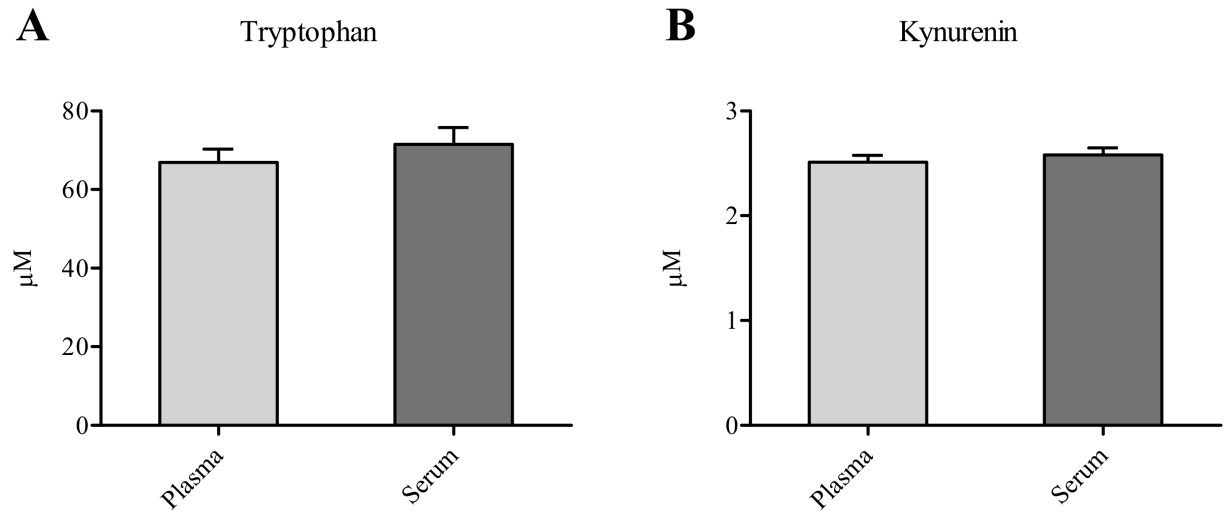

Abbildung 4.1.: Vergleich der Plasma- und Serumproben für die Analyte TRP (**a**) und KYN (**b**) mittels MS/MS. Dieser Versuch basierte auf n=9 Probanden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die dargestellten Analyte zwischen den beiden Matrizes.

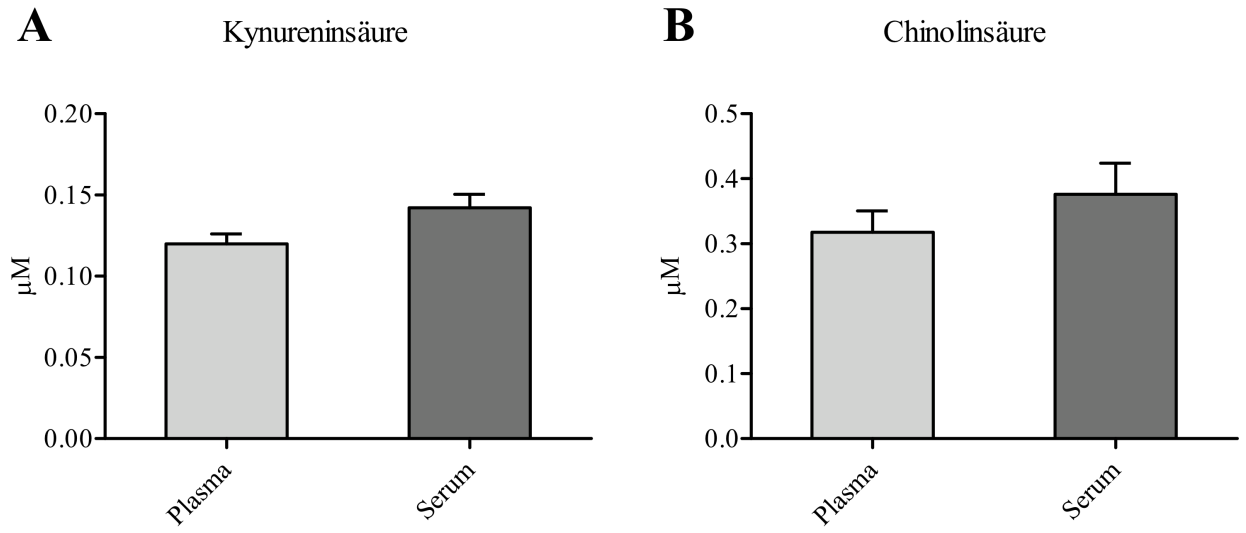

Abbildung 4.2.: Vergleich der Plasma- und Serumproben für die Analyte KYNA (**a**) und QUIN (**b**) mittels MS/MS. Dieser Versuch basierte auf n=9 Probanden. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die dargestellten Analyte zwischen den beiden Matrizes.

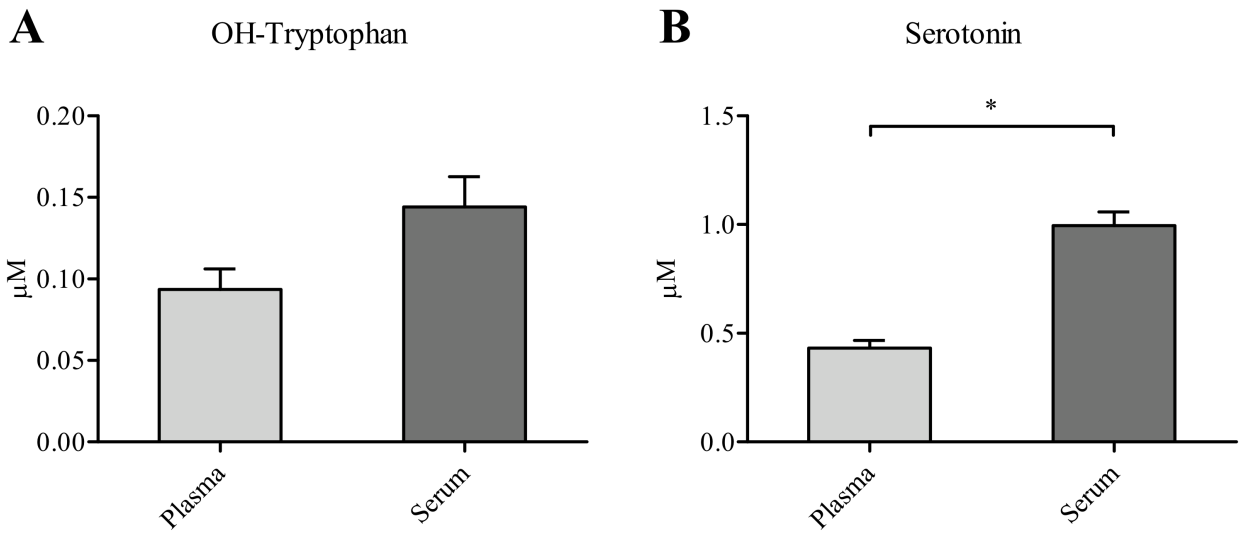

Abbildung 4.3.: Vergleich der Plasma- und Serumproben für die Analyte OH-TRP (**a**) und SER (**b**) mittels MS/MS. Dieser Versuch basierte auf n=9 Probanden. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied für SER zwischen den beiden Matrizes ($p < 0,05$).

Zirkadiane Veränderungen des Serumspiegels der Analyte Der Serumspiegel von Tryptophan unterliegt einem zirkadianen Rhythmus[210] mit hohen Spiegeln in den Morgenstunden, die im Tagesverlauf abfallen. Ob Metabolite des Kynureninabbauweges ebenfalls einer zirkadianen Schwankung unterliegen, ist bisher nicht bekannt. Es ist daher für eine korrekte Bestimmung der Aktiviät des Kynureninabbauweges notwendig, Einflussfaktoren auf die Serumspiegel von Tryptophan sowie der Metabolite zu kontrollieren. Deshalb wurden Serumproben von neun Probanden zu zwei unterschiedlichen Tageszeiten um 8 Uhr und 15 Uhr analysiert. Diese zeigten die zu erwartenden hohen Tryptophanspiegel in den Morgenstunden und demgegenüber einen Abfall zum Messzeitpunkt am Nachmittag (s. Abb. **4.4** S. 62). Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentrationen von KYNA im Vergleich zur morgendlichen Analyse (s. Abb. **4.5** S. 62). Die weiteren gemessenen Metaboliten des Kynureninabbauweges zeigten keine tageszeitabhängigen Schwankungen (s. Abbn. **4.5** S. 62, **4.6** S. 63). Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass für die weiteren Arbeiten feste Abnahmezeitpunkte erforderlich sind, um die Vergleichbarkeit von Messungen zu gewährleisten.

Die erfolgreiche Etablierung der massenspektrometrischen Quantifikation von Schlüsselmetaboliten des Kynureninstoffwechsels mit Validierung der Methode, Kontrolle der Messqualität durch eine kontinuierliche Qualitätskontrolle, sowie die Kontrolle von Störeinflüssen ermöglichte Messungen mit hohem Probenaufkommen bei gleichbleibender Qualität. Damit waren die methodischen Voraussetzungen zur Anwendung im Rahmen von klinischen Studien erfüllt.

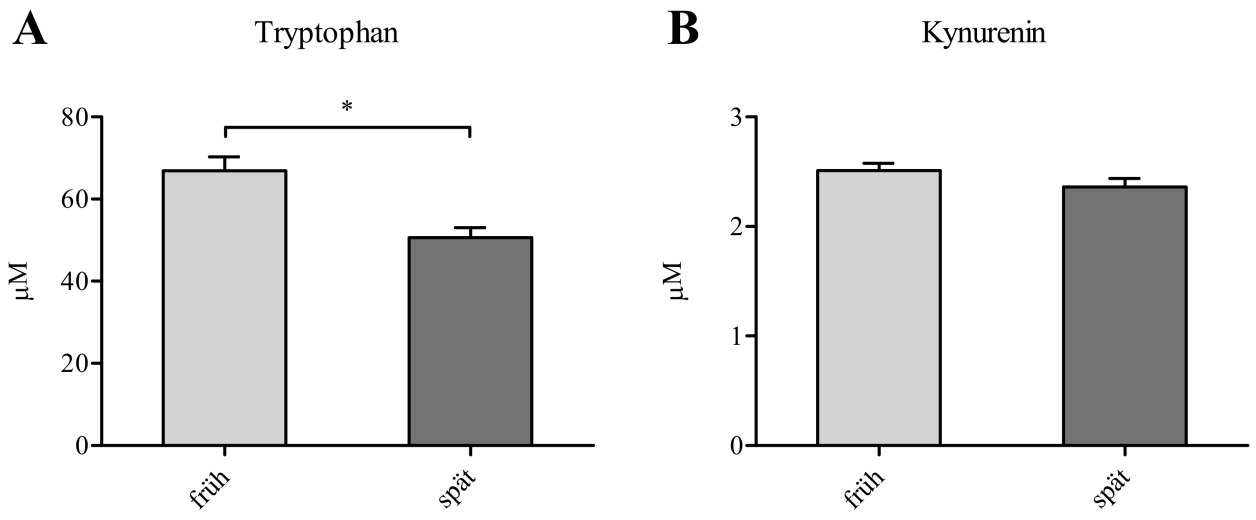

Abbildung 4.4.: Erfassung der zirkadianen Schwankung für die Analyte TRP (**a**) und KYN (**b**) mittels MS/MS zum Zeitpunkt 8 Uhr (früh) und 15 Uhr (spät). Dieser Versuch basierte auf n=9 gesunden Probanden. Für TRP zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen den Abnahmezeitpunkten ($p < 0,05$).

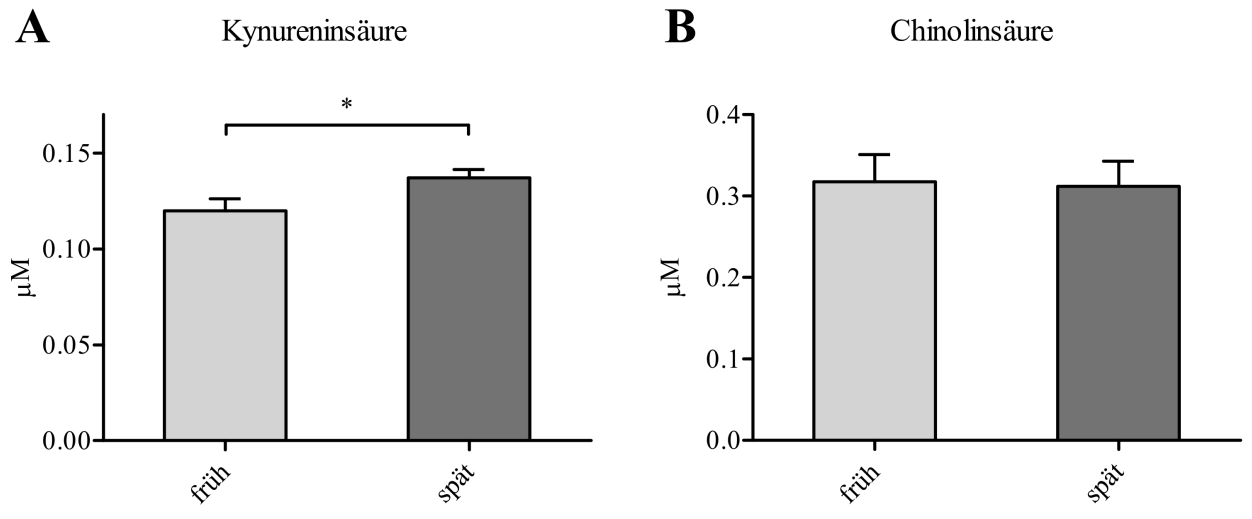

Abbildung 4.5.: Erfassung der zirkadianen Schwankung für die Analyte KYNA (**a**) und QUIN (**b**) mittels MS/MS zum Zeitpunkt 8 Uhr (früh) und 15 Uhr (spät). Dieser Versuch basierte auf n=9 gesunden Probanden. Für KYNA zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen den Abnahmezeitpunkten ($p < 0,05$).

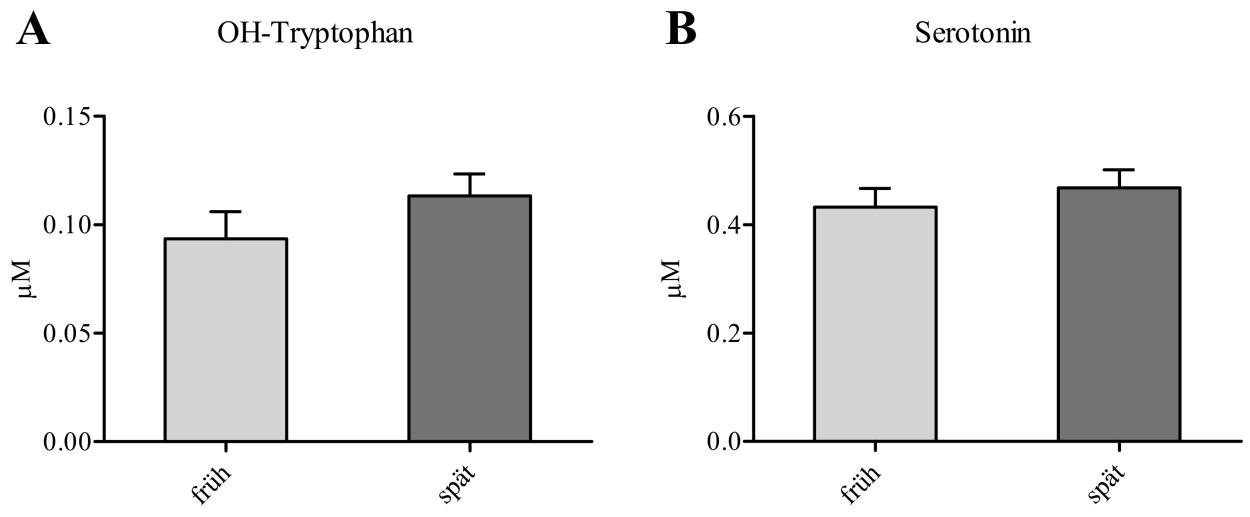

Abbildung 4.6.: Erfassung der zirkadianen Schwankung für die Analyte von OH-TRP (**a**) und SER (**b**) mittels MS/MS zum Zeitpunkt 8 Uhr (früh) und 15 Uhr (spät). Dieser Versuch basierte auf n=9 gesunden Probanden. Tageszeitabhängige Schwankungen zeigten sich für die dargestellten Metabolite nicht.

4.2. Klinische Studie an intensivtherapierten Patienten

Um die systemische Aktivität des durch IDO eingeleiteten Kynureninabbauweges aus humanen Plasmaproben zu bestimmen, wurden die Plasmakonzentrationen von TRP, KYN, QUIN, KYNA und SER von 100 Patienten während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation in ihrem Verlauf gemessen. Als Einflussfaktoren auf die Aktivität des Kynureninstoffwechsels, beziehungsweise die Plasmaspiegel der Metaboliten, wurde die Nierenfunktion als bedeutsam bewertet, da Kynurenine über die Niere aus der Zirkulation eliminiert werden. In der Untersuchung wurde daher zusätzlich der Einfluss der Niereninsuffizienz auf die Plasmawerte der gemessenen Metaboliten erfasst.

Die Ausprägung von beobachteten Veränderungen wurde mit laborchemischen Routineparametern, immunologischen Laborparametern sowie klinischen Parametern verglichen, um Aussagen über die Signifikanz der IDO-vermittelten Aktivität des Kynureninabbauweges zu ermöglichen.

4.2.1. Patientencharakteristik

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 100 Patienten zusammen, welche konsekutiv auf der allgemeinchirurgischen Intensivstation der Universitätsmedizin Greifswald behandelt wurden, davon waren 42 Patienten weiblich. Der Altersmedian der Patienten lag bei 65±14 Jahren (Spanne 20

Tabelle 4.2.: Vergleich zwischen den drei Gruppen **A** (keine Sepsis), **B** (vor Sepsis) und **C** (Sepsis) für die klinischen Scores SIRS, SOFA und APACHE II, sowie für die HLA-DR Expressionsdichte auf Monozyten zum ersten Messzeitpunkt.

Verleich	*SIRS**	*SOFA**	*APACHE II**	*HLA-DR*†
A vs. **B**	0,001	0,00001	0,03	n.s.
A vs. **C**	0,0003	0,00001	0,007	0,00001
B vs. **C**	n.s.	n.s.	n.s.	0,0003

*Kruskal-Wallis Test
†t-Test

- 85 Jahre). Die mittlere Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation betrug 17 Tage. Zur Auswertung wurden im ersten Schritt nur die ersten Messzeitpunkte nach Studieneintritt betrachtet. Post-hoc erfolgte die Einteilung der Patienten in 3 Gruppen, abhängig vom klinischen Verlauf. In die erste Gruppe wurden Patienten eingeteilt, die während des gesamten Beobachtungszeitraums keine Sepsis entwickelten (**A**, nicht septisch, n=50). 32 Patienten erfüllten bereits zum ersten Messzeitpunkt nach Studieneintritt die Kriterien einer Sepsis (**C**, septisch). Von den Patienten, die zum Studieneintritt keine Sepsis hatten, entwickelten 18 eine Sepsis nach einem mittleren Verlauf von drei Tagen (2; 7, (25%; 75% Quartil)) (**B**, vor Sepsis). Die demographischen Daten und Charakteristiken, beziehungsweise die klinischen Scores und deren zugrunde liegenden Daten sind in den Tabellen **3.2.1** (S. 49) und **3.2.1** (S. 51) aufgeführt. Die Gruppen unterschieden sich statistisch nicht hinsichtlich ihrer Geschlechts- und Altersverteilung. Im Gruppenvergleich zeigten sich signifikant höhere SIRS, SOFA und APACHE II Scores von septischen (**C**) und Patienten vor einer Sepsis (**B**) im Vergleich zu nicht septischen (**A**) Patienten. Die HLA-DR Expression auf Monozyten war im Vergleich von septischen und vor septischen gegenüber nicht septischen Patienten signifikant herabgesetzt (s. Tabelle **4.2** S. 64). Septische Patienten hatten signifikant mehr Fälle von akutem Nierenversagen und eine erhöhte Mortalität ($p < 0,05$).

4.2.2. Aktivierung des Kynureninabbauweges in kritisch kranken Patienten

Es wurden die Plasmawerte der wichtigsten Metaboliten des Kynureninstoffwechsels zusammen mit wichtigen Laborparametern und immunologischen Parametern von 100 Patienten mit intensivmedizinischer Behandlungsbedürftigkeit in ihrem Verlauf aufgezeichnet.

Zur Beschreibung der Aktivität des Tryptophankatabolismus im kynureninergen System wur-

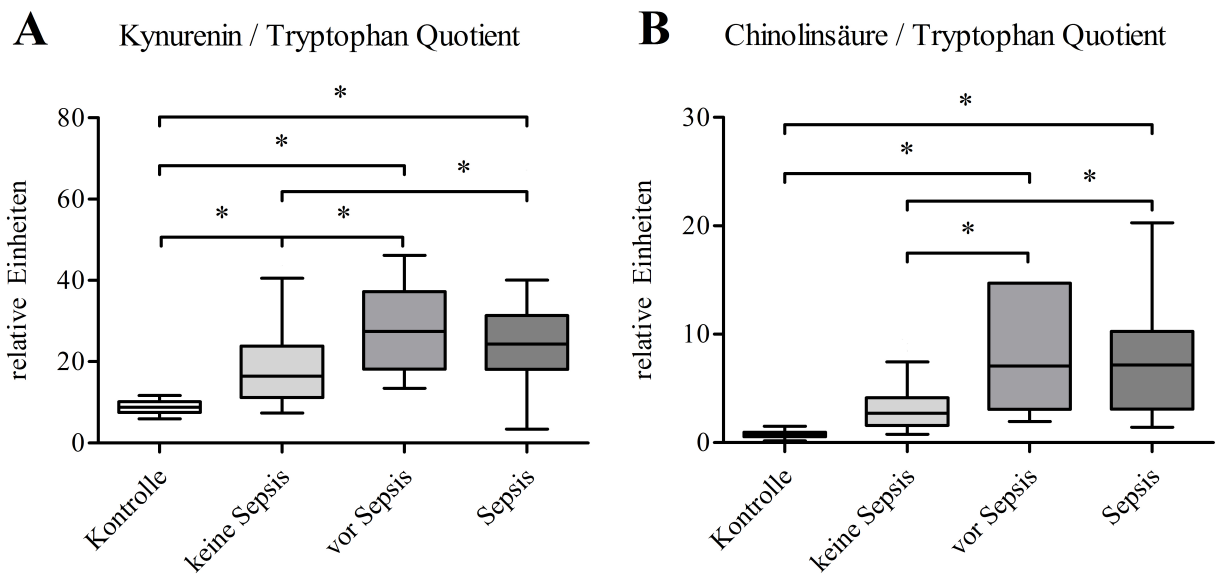

Abbildung 4.7.: Vergleich der Quotienten KYN/TRP und QUIN/TRP in den Studiengruppen am ersten Tag Dargestellt sind die Quotienten aus KYN und TRP (**A**) sowie QUIN und TRP (**B**) bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten die im späteren Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickelten (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=39).

den die Plasmakonzentrationen von Schlüsselparametern dieses Systems gemessen (s. Abb. **1.1** S. 10). Als Maß für die IDO Aktivität gilt der Kyn/Trp Quotient.

Zum ersten Messzeitpunkt zeigte sich bei nicht septischen, kritisch kranken Patienten ein signifikant erhöhter KYN/TRP Quotient im Vergleich zu gesunden Kontrollen (s. Abb. **4.7 A**, S. 65). Bei getrennter Betrachtung der Parameter (s. Abb. **4.8** S. 66) imponiert dieser als isolierter Abfall der Plasmaspiegel von TRP und weniger als ein begleitender Anstieg von KYN.

Dennoch gibt es bei kritisch Kranken Anhaltspunkte für eine Aktivierung des Kynureninabbauweges aufgrund des signifikanten Anstiegs der Plasmakonzentrationen von QUIN (s. Abb. **4.9 B**, S. 67).

Die reduzierten TRP-Plasmaspiegel bei kritisch kranken Patienten waren begleitet von reduzierten Serotoninplasmaspiegeln, sowie reduzierten TRP/SER Quotienten (s. Abb. **4.10** S. 68).

Die beschriebenen Beobachtungen lassen folgende Schlussfolgerungen zu. Der in der Literatur überwiegend verwendete KYN/TRP Quotient erlaubt für sich allein keine ausreichend zuverlässige Aussage über die IDO Aktivität. Die Analyte sollten für sich getrennt betrachtet werden. Zudem wurde trotz eines Anstiegs des Plasmaspiegels von QUIN, dem Produkt eines nachge-

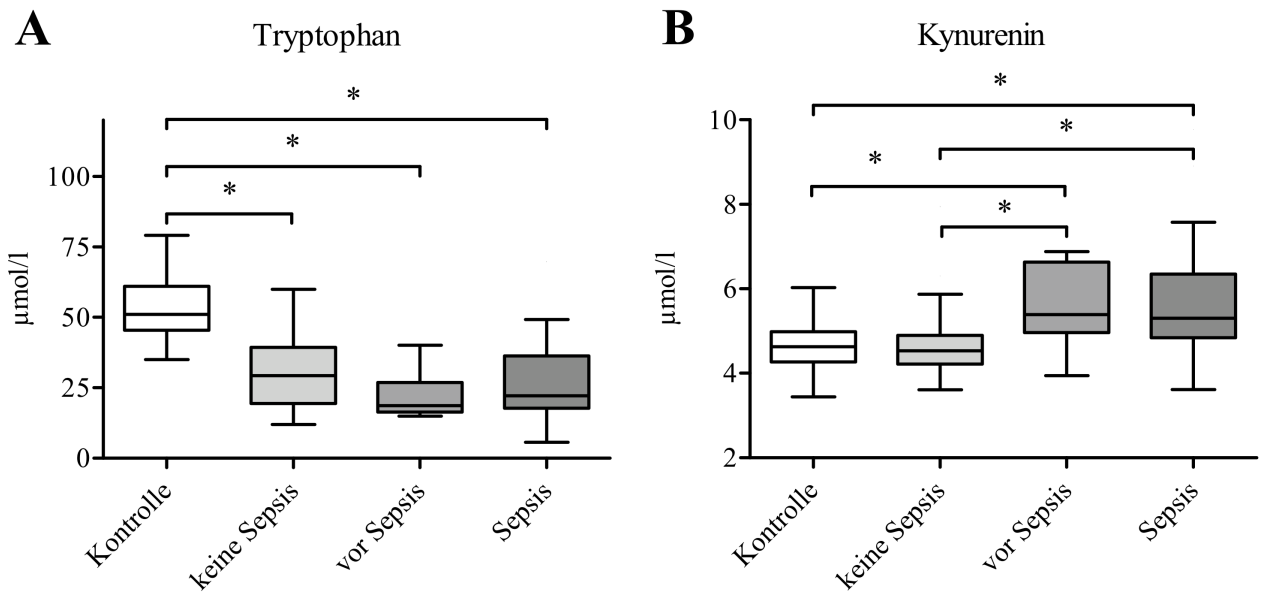

Abbildung 4.8.: Vergleich der Metabolite TRP und KYN in den Studiengruppen am ersten Tag Dargestellt sind die Plasmaspiegel von TRP (**A**) und KYN (**B**) bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten, die im Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickeln (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=39).

schalteten Schrittes des Stoffwechsels, keine Akkumulation von KYN beobachtet. Eine hohe oder gleichsinnig induzierte Aktivität von Enzymen des gesamten Stoffwechselweges könnte die Ursache für diese Beobachtung sein. Für diese Interpretation gibt es Hinweise in der Literatur[12]. Es ergeben sich außerdem Hinweise auf eine Substratkonkurrenz beziehungsweise Verschiebung des Tryptophanstoffwechsels von der Serotoninsynthese zum Kynureninstoffwechsel.

Zusammenfassend ist für die korrekte Beurteilung der Aktivität des Stoffwechsels die Messung aller Schlüsselmoleküle des Stoffwechsels, sowie von konkurrierenden Stoffwechselwegen erforderlich.

4.2.3. Erhöhte Chinolinsäuresynthese geht der Ausbildung des septischen Syndroms voraus

Kritisch kranke Patienten zeigten bereits Hinweise für eine Aktivierung des Kynureninabbauweges. Verglichen mit diesen sind bei Patienten mit einer Sepsis zum ersten Messzeitpunkt signifikant erhöhte Plasmaspiegel von KYN (s. Abb. **4.8 B**, S. 66), QUIN, KYNA (s. Abb. **4.9 A, B**, S. 67), KYN/TRP und QUIN/TRP (s. Abb. **4.7 A, B**, S. 65) zu verzeichnen. Signifikante Unterschiede zwischen vor-septischen und septischen Patienten fanden sich nur für

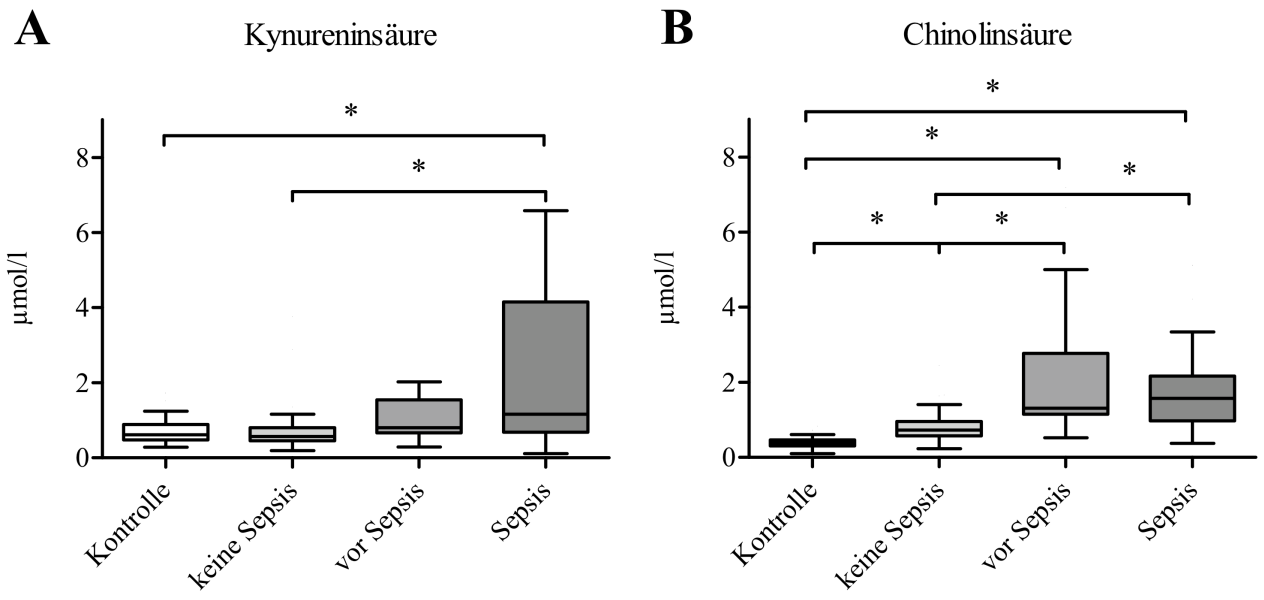

Abbildung 4.9.: Vergleich der Metabolite KYNA und QUIN in den Studiengruppen am ersten Tag Dargestellt sind die Plasmaspiegel von KYNA (**A**) und QUIN (**B**) bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten, die im Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickeln (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=39).

den Quotienten aus TRP und dem Endprodukt des Kynureninabbauweges in lymphatischen Zellen QUIN (QUIN/TRP, s. Abb. **4.7 B**, S. 65). Es zeigte sich eine ausgeprägte Aktivität des kynureninergen Stoffwechsels bei Patienten im vor-septischen Stadium (**B**, vor Sepsis) zum ersten Messzeitpunkt für die Parameter KYN/TRP, QUIN/TRP, TRP, KYN and QUIN (s. Abbn. **4.7** S. 65, **4.8** S. 66, **4.9 B**, S. 67). Darüber hinaus diskriminierten die beiden Quotienten KYN/TRP und QUIN/TRP zwischen nicht septischen und vor-septischen Patienten zu diesem Zeitpunkt.

Daher wurden ROC Analysen durchgeführt, um die Diskriminationsfähigkeit der Indoleaminplasmaspiegel bezüglich der Unterscheidung zwischen nicht septischen und vor septischen Patienten zu untersuchen (s. Tab. **4.3** S. 70). Dabei zeigten sich hohe Trennschärfen für alle Metabolite des Kynureninstoffwechsels beziehungsweise deren Quotienten. Insbesondere der QUIN/TRP Quotient, sowie QUIN zeigten hohe prädiktive Werte (QUIN/TRP: AUC 0,835 [95%-KI, 0,719-0,952], QUIN: AUC 0,832 [95%-KI, 0,710-0,954]) bei hoher Sensitivität und Spezifität (s. Tab. **4.3** S. 70). KYNA als Produkt eines Seitenzweiges des Kynureninabbauweges (s. Abb. **1.1** S. 10) hatte den geringsten Vorhersagewert aller untersuchten Kynurenine und deren Quotienten. CRP, PCT und die monozytäre Expressionsdichte von HLA-DR (Daten nicht gezeigt) zeigten keine signifikante Diskriminationsfähigkeit von nicht septischen gegenüber

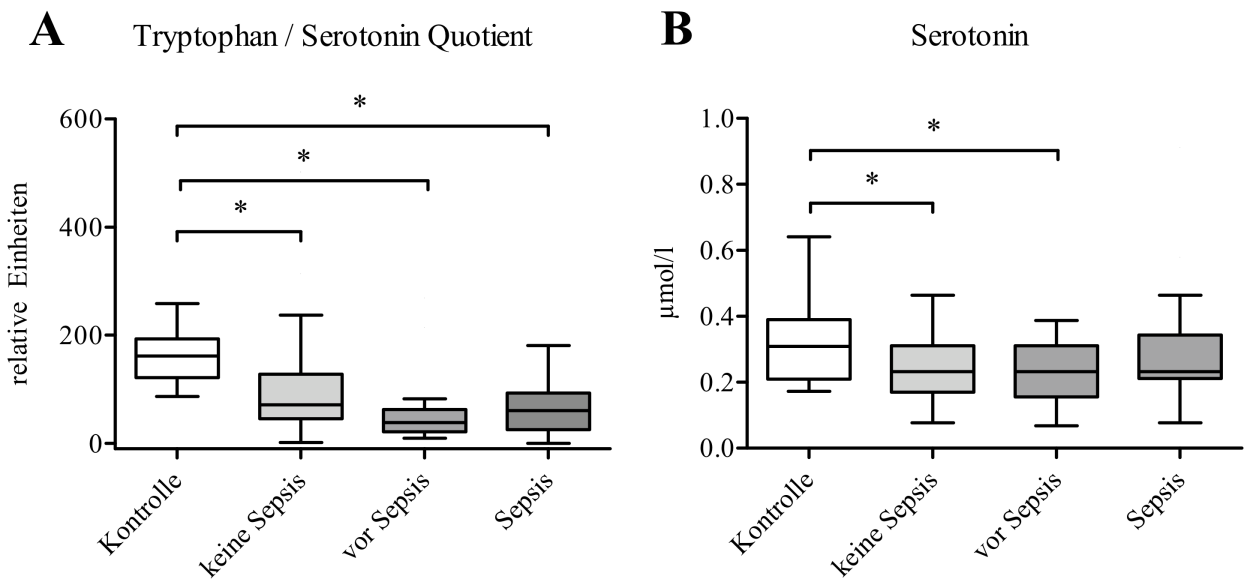

Abbildung 4.10.: Vergleich des Quotienten TRP/SER und des Metaboliten SER in den Studiengruppen am ersten Tag Dargestellt sind der Quotient aus TRP und SER (**A**) sowie die Plasmaspiegel von SER (**B**) bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten, die im Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickelten (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=39).

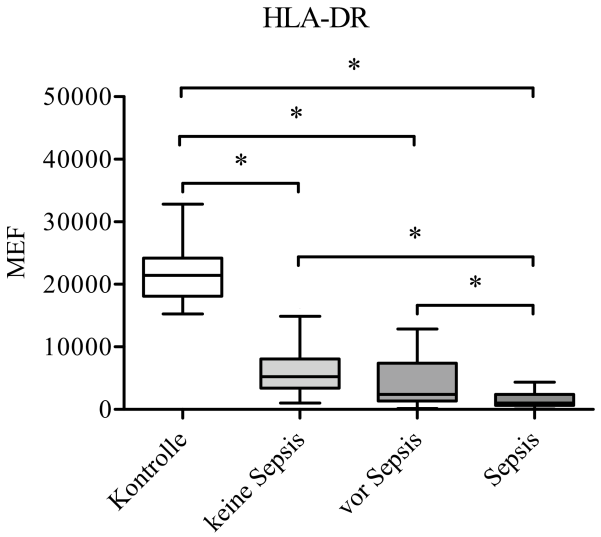

Abbildung 4.11.: Vergleich monozytären HLA-DR Expression in den Studiengruppen am ersten Tag Dargestellt ist die monozytäre Expressionsdichte von HLA-DR bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten die, im Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickelten (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32) im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=39).

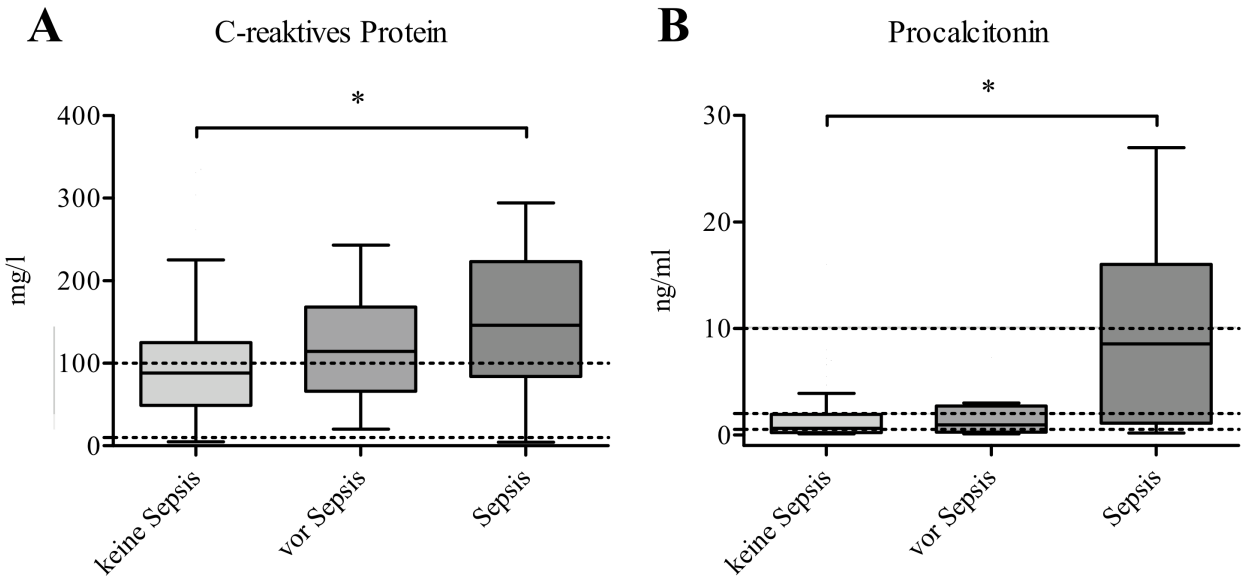

Abbildung 4.12.: Vergeich der Plasmaspiegel von Procalcitonin und C-reaktivem Protein Dargestellt sind die Plasmaspiegel von Procalcitonin und C-reaktivem Protein bei Patienten, die keine septischen Komplikationen während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation entwickelten (keine Sepsis n=50), bei Patienten, die im Verlauf eine schwere Sepsis während ihres Aufenthaltes entwickelten (vor Sepsis n=18) und Patienten mit einer schweren Sepsis und septischem Schock (septischer Schock n=32). Die unterbrochenen Linien indizieren die klinische Signifikanz bzw. Grenzwerte der Plasmaspiegel: für CRP: $< 10mg/l$: Normalbereich, $> 100mg/l$: schwere Erkrankung. Für Procalcitonin: $0 - 0,5ng/ml$: systemische bakterielle Infektion unwahrscheinlich. Lokale bakterielle Infektion möglich. $0,5 - 2ng/ml$: systemische bakterielle Infektion möglich. $2 - 10ng/ml$: systemische Infektion ist anzunehmen solange andere Ursachen ausgeschlossen sind. $> 10ng/ml$: signifikante systemische entzündliche Reaktion - Sepsis.

vor-septischen Patienten.

Eine Aktivierung des Kynureninstoffwechsels eingeleitet durch IDO Aktivität konnte bei Patienten in einer Sepsis, sowie in einer sich entwickelnden Sepsis nachgewiesen werden. IDO wird als Schrittmacherenzym des Kynureninstoffwechsels frühzeitig im Rahmen einer Immunreaktion durch proinflammatorische Mediatoren als Antwort auf einen Antigenkontakt induziert. Bei Patienten, die im Verlauf von 3 weiteren Tagen eine Sepsis entwickelten, ließ sich bereits eine Aktivierung des Kynureninstoffwechsels signifikant nachweisen. Die ROC Analyse weist hohe Trennschärfen von QUIN, KYN, QUIN/TRP und KYN/TRP, welche den in der klinischen Routine eingesetzten Parametern CRP und PCT im untersuchten Patientengut deutlich überlegen ist. Eine Evaluation der Parameter zur frühzeitigen Diagnostik einer sich entwickelnden Sepsis erscheint aussichtsreich.

Tabelle 4.3.: ROC Analyse von Schlüsselmetaboliten des Kynureninstoffwechsels und Serotonin sowie von Infektionsparametern zur Evaluation als Prognosemarker zur Vorhersage von schwerer Sepsis und septischem Schock. Angegeben sind die p Werte des Mann-Whitney U-Tests mit Bonferronikorrektur. Die Ergebnisse Der ROC Analyse sind als Area under the curve (AUC) Werte mit Konfidenzintervallen (95% KI) angegeben. Die Sensitivität (SN), Spezifität (SP), positiver (PPW) und negativer prädiktiver Wert (NPW) sind durch die Wahl des besten Cut-Offs optimiert.

	vor Sepsis (n=18)	*keine Sepsis (n=32)*	*p Wert*	*AUC (95% KI)*	*Cut-Off*	*SN*	*SP*	*PPW*	*NPW*
KYN/TRP	61,45 (42,1; 73,6)	33,06 (22,5; 47,1)	0,001	0,788 (0,644 − 0,912)	≤ 43,5	73,3	70,0	42,3	89,7
QUIN/TRP	23,7 (10,3; 49,3)	9,16 (5,33; 13,86)	< 0,001	0,835 (0,719 − 0,952)	≤ 18,2	73,3	86,0	61,1	91,5
TRP [μM]	19,87 (17,4; 27,7)	31.28 (27,07; 41,0)	0.018	0,715 (0,583 − 0,847)	≤ 28,5	73,3	62,0	36,7	88,6
KYN [μM]	5,16 (4,76; 6,25)	4,34 (4,05; 4,68)	< 0,001	0,785 (0,632 − 0,937)	≤ 4,74	80,0	82,0	57,1	93,2
QUIN [μM]	4,68 (4,21; 9,4)	2,57 (2,08; 3,35)	< 0,001	0,832 (0,710; 0,954)	≤ 4,1	80,0	80,0	54,5	93,0
KYNA [μM]	0,187 (0,156; 0,327)	0,133 (0,108; 0,182)	0,02	0,709 (0,561 − 0,858)	≤ 0,153	80,0	54,0	34,3	90,0
SER [μM]	0,68 (0,45; 0,83)	0,68 (0,51; 0,90)	ns.	0,565 (0,393 − 0,736)	≤ 0,72	66,7	42,0	25,6	80,8
CRP [mg/l]	114,8 (67; 158,5)	90,5 (53,65; 125,5)	ns.	0,557 (0,400 − 0,713)	≤ 102	61,1	56,0	33,3	80,0
PCT [ng/ml]	0,95 (0,24; 2,6)	0,605 (0,24; 1,8)	ns.	0,576 (0,417 − 0,734)	≤ 0,89	58,8	56,0	31,3	80,0

Tabelle 4.4.: Die Kombination der zwei klinischen Zustände Niereninsuffizienz (NI) und septischer Schock ergab nach randomisierter Stichprobe von jedem der 100 Studienpatienten die dargestellte Fallverteilung. Der Einfluss dieser Parameter auf die Plasmaspiegel der Metabolite des Kynureninabbauweges wurde durch eine multivariate Varianzanalyse untersucht.

	keine NI (n=78)	*NI (n=22)*
kein septischer Schock (n=77)	**A** (n=66)	**B** (n=11)
septischer Schock (n=23)	**C** (n=12)	**D** (n=11)

4.2.4. Nierenversagen und Sepsis beeinflussen die Plasmaspiegel der Kynurenine unabhängig voneinander

Kynurenine werden renal eliminiert. Ein akutes Nierenversagen im Rahmen des septischen Multiorganversagens könnte somit zu einer Akkumulation der Kynurenine im Plasma führen und zu gleichsinnigen Veränderungen der Plasmaspiegel führen, wie ein erhöhter Stoffwechsel im Kynureninabbauweg. Um den Einfluss des Vorliegens einer Sepsis sowie des eines Nierenversagens auf die Plasmaspiegel der Parameter zu charakterisieren, wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Es wurden dazu alle Messzeitpunkte nach dem Vorliegen der zwei klinischen Zustandsbildern septischer Schock, als schwerste Zustandsform der Sepsis, und Vorliegen eines Nierenversagens bezeichnet, um eine Varianzanalyse durchführen zu können, welche die aus den zwei klinischen Zuständen resultierenden vier Kombinationsmöglichkeiten berücksichtigte (s. Tab. **4.4** S. 71).

Für die Analyse wurden die Verlaufsdatensätze aller Patienten genutzt. Um eine Schiefe der zugrundeliegenden Daten aufgrund von unterschiedlich langen Verläufen der Studienpatienten zu vermeiden, wurde ein randomisiert ausgewählter Zeitpunkt pro Patient in die Analyse eingeschlossen und der entsprechenden klinischen Konstellation zugeordnet. Das Ergebnis der randomisierten Stichprobe ist in Tabelle **4.4** (S. 71) zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass Nierenversagen (**B**) und septischer Schock (**C**) unabhängig mit einer signifikanten plasmatische Akkumulation der Kynurenine assoziiert sind (s. Tab. **4.5** S. 73) ($p < 0,05$). Die Interaktion der beiden Faktoren, das heißt ein besonderer Effekt auf die Indoleaminplasmaspiegel, welcher bei Faktorstufenkombination auftritt, war für die meisten Kynurenine und TRP, außer für KYNA, nicht signifikant. Bei Patienten ohne Nierenversagen und septischem Schock waren die Plasmakonzentrationen von KYN und QUIN am geringsten (**A**, 4,5μM resp. 4μM). Die beiden Parameter zeigten eine deutliche Kovarianz mit erhöhten Plasmaspiegeln bei dem Vorliegen eines Nierenversagens (**B**, 5,8μM resp. 10,8μM) oder eines septischen Schocks (**C**, 5,2μM und 6,2μM) (s. Tab. **4.5** S. 73). Bei den Plasmaspiegeln von

KYN und QUIN war der weitere Anstieg bei gleichzeitigem Vorliegen von Nierenversagen und septischem Schock (Wechselwirkung, **D**) nicht signifikant. Somit liegt hier lediglich ein additiver und kein multiplikativer Effekt zugrunde. Bei KYNA, dem Produkt eines Seitenzweiges des Kynureninabbauweges, zeigte sich ein Anstieg der Plasmaspiegel bei isoliertem Nierenversagen (**B**) und isoliertem septischen Schock (**C**) verglichen mit der Konstellation ohne Nierenversagen und septischem Schock (**A**) (0,8μM und 0,3μM vs. 0,2μM $p < 0,05$). Es kam für diesen Parameter zu einem signifikanten weiteren durchschnittlichen Anstieg von 2,4μM bei gleichzeitigem Vorliegen beider Bedingungen (**D**).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die klinischen Zustandsbilder septischer Schock und Nierenversagen unabhängig voneinander mit erhöhten Plasmaspiegeln der Kynurenine assoziiert sind. Ein signifikanter Einfluss auf die Plasmaspiegel von TRP zeigte sich nicht. Für die sich aus der Beobachtung der erhöhten Plasmakonzentrationen der Kynurenine im Nierenversagen ableitende Frage, inwieweit der Anstieg durch eine Akkumulation der Metabolite aufgrund einer reduzierte Clearance oder durch eine Aktivierung des Kynunreninstoffwechsels bedingt ist, ergibt sich, aufgrund des fehlenden Einflusses auf die Plasmaspiegel von TRP, keine Evidenz.

Tabelle 4.5.: Ergebnisse der Varianzanalyse (ANOVA) der Metabolite des Kynureninstoffwechsels im Plasma von Patienten, angewendet für die dichotomen Merkmale Niereninsuffizienz (NI) und septischer Schock (keine NI und kein septischer Schock: **A**, NI: **B**, septischer Schock: **C**, NI und septischer Schock: **D**). Die Berechnung erfolgte auf der Grundlage einer Stichprobe aus dem vollständigen Verlaufsdatensatz aus dem randomisiert ein Zeitpunkt pro Patient gezogen wurde (Tab. **4.4** S. 71). Die dargestellten Werte sind die vom Modell prognostizierten angepassten Mittelwerte ("least square means") mit einem 95% Konfidenzintervall (KI).

Mittelwert (95% KI)	*A (n=66)*	*B (n=11)*	*C (n=12)*	*D (n=11)*
100xKYN/TRP	37,7 (33,4; 42,1)	56,9† (46,5; 67,3)	42,8 (32,8; 52,7)	54,2 (43,8; 64,7)
100xQUIN/TRP	15,7 (6,7; 24,8)	47,9* (26,2; 69,5)	24,1‡ (3,4 ;44,9)	68,4 (46,7; 90,0)
TRP [μM]	31,7 (27,2; 36,1)	24,2 (13,6; 34,9)	39,6 (29,3; 49,8)	34,0 (23,3; 44,7)
KYN [μM]	4,5 (4,3; 4,8)	5.8* (5,2; 6,4)	5,2* (4,6; 5,7)	7,3 (6,7; 7,9)
QUIN [μM]	4,0 (2,1; 5,9)	10.8* (6,3; 15,3)	6,2† (1,9; 10,6)	18,1 (13,6; 22,6)
KYNA [μM]	0,16 (-0,03; 0,34)	0.77* (0,33; 1,22)	0,32‡ (-0,10; 0,74)	2,37‡ (1,93; 2,81)
SER [μM]	0,7 (0,6; 0,8)	0,9 (0,7; 1,1)	0,9 (0,7; 1,1)	0,9 (0,7; 1,1)

$^{*}p < 0,001$
$^{\dagger}p < 0,01$
$^{\ddagger}p < 0,05$

4.3. Klinische Studie an Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

4.3.1. Plasmakonzentrationen von Metaboliten des Kynureninabbauweges bei Patienten mit Niereninsuffizienz

Es wurden TRP und dessen Katabolite auf Korrelationen mit Parametern für Nierenfunktion (Kreatinin, Kreatininausscheidung, GFR) und den Stadien der chronischen Nierenerkrankung untersucht. Die renalen Funktionsparameter der Patientengruppen in den Schweregraden 3 bis 5 sind in Tabelle **4.6 C** (S. 78) aufgelistet. Die Gruppen unterschieden sich voneinander signifikant. Bei TRP zeigte sich keine Veränderung in Abhängigkeit von den Stadien der Nierenerkrankung, sowie keine Korrelation mit den Parametern für die Nierenfunktion (s. Abb. **4.13 C** S. 76).

Der KYN/TRP Quotient als Maß der IDO Aktivität stieg mit den Stadien der CKD an. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien der CKD ergaben sich nicht (s. Abb. **4.13 A** S. 76). Es zeigten sich signifikante Korrelationen zu Kreatinin und zur Kreatininausscheidung (Clearance) (jeweils $p \leq 0,05$). Die KYN Plasmaspiegel allein zeigten ebenfalls einen Anstieg verglichen mit den Kontrollen. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Stadien der CKD ergaben sich nicht (s. Abb. **4.13 D** S. 76). Signifikante Korrelationen mit den Parametern für die Nierenfunktion ergaben sich ebenfalls nicht (s. Abb. **4.13 D** S. 76).

Für QUIN zeigten sich auch erhöhte Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. CKD Stadium 5 wiederum unterschied sich von den beiden niedergradigen Stadien durch einen signifikanten Anstieg der Plasmaspiegel (s. Abb. **4.14 B** S. 77). QUIN Plasmaspiegel korrelierten mit Kreatinin und mit der Kreatininausscheidung (jeweils $p \leq 0,05$).

Das Produkt des Seitenzweiges des Kynureninabbauweges KYNA zeigte deutlich erhöhte Plasmaspiegel bei Patienten mit CKD. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der einzelnen Stadien untereinander. Der Vergleich der Plasmakonzentrationen zwischen den Stadien 3 und 4 sowie 4 und 5 resultierten jeweils in einer Verdopplung der Plasmaspiegel und scheinen somit in den Endstadien der Nierenerkrankung in einen exponentiellen Zusammenhang zu stehen (s. Abb. **4.14 A** S. 77). Entsprechend ausgeprägt sind die Korrelationen mit den Parametern der Nierenfunktion Kreatinin ($p < 0,0001, r = 0,74$), Kreatininausscheidung ($p < 0,0001, r = -0,65$) und GFR ($p = 0,0046, r = -0,53$).

OH-TRP Plasmaspiegel stiegen mit dem CKD Schweregrad an und zeigten eine Korrelation zu Kreatinin ($p < 0,0001, r = 0,57$), Kreatininausscheidung ($p < 0,0001, r = -0,59$) und GFR ($p < 0,006, r = -0,51$).

Die SER Plasmaspiegel waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen bei hochgradiger CKD erhöht, korrelierten jedoch nicht mit der Nierenfunktion.

Im Rahmen dieser Studie wurden zusätzlich Parameter für Entzündungsaktivität (Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, hochsensitives CRP und löslicher TNF Rezeptor I) mit den Plasmakonzentrationen der Metabolite des Kynunreninstoffwechsels auf Korrelationen getestet, wobei sich signifikante Korrelationen sowohl zu den Metaboliten als auch zu den Parametern der Nierenfunktion ergaben. In einer multivariaten Varianzanalyse korrelierte der TRP/KYN Quotient mit hsCRP und sTNFR-I ($p = 0.03, r = 0.42$ bzw. $p = 0.01, r = 0.56$) unabhängig vom Serumkreatininwert ($p = 0.27, r = 0.12$), Alter ($p = 0.50, r = 0.11$) und Körpergewicht ($p = 0.57, r = 0.16$)[178].

Zusammenfassend zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der eingeschränkten Nierenfunktion bei der hochgradigen chronischen Nierenerkrankung von den Plasmaspiegeln der Parameter des Kynureninstoffwechsels. Ein begleitender Abfall der TRP Spiegels als Hinweis auf einen erhöhten Substratumsatz ließ sich auch in diesem Patientengut nicht beobachten. Es kann jedoch durch die Korrelations- und Varianzanalysen Evidenz für die nachweisbare Entzündungsaktivität als Determinante des erhöhten Stoffwechsels erbracht werden. Einschränkend gilt für diese Ergebnisse, dass das hier untersuchte chronische Nierenversagen aufgrund verschiedener zugrundeliegender Pathomechanismen nicht mit dem in der Sepsis auftretenden akuten Nierenversagen vergleichbar ist und sich somit die Beobachtungen nicht übertragen lassen.

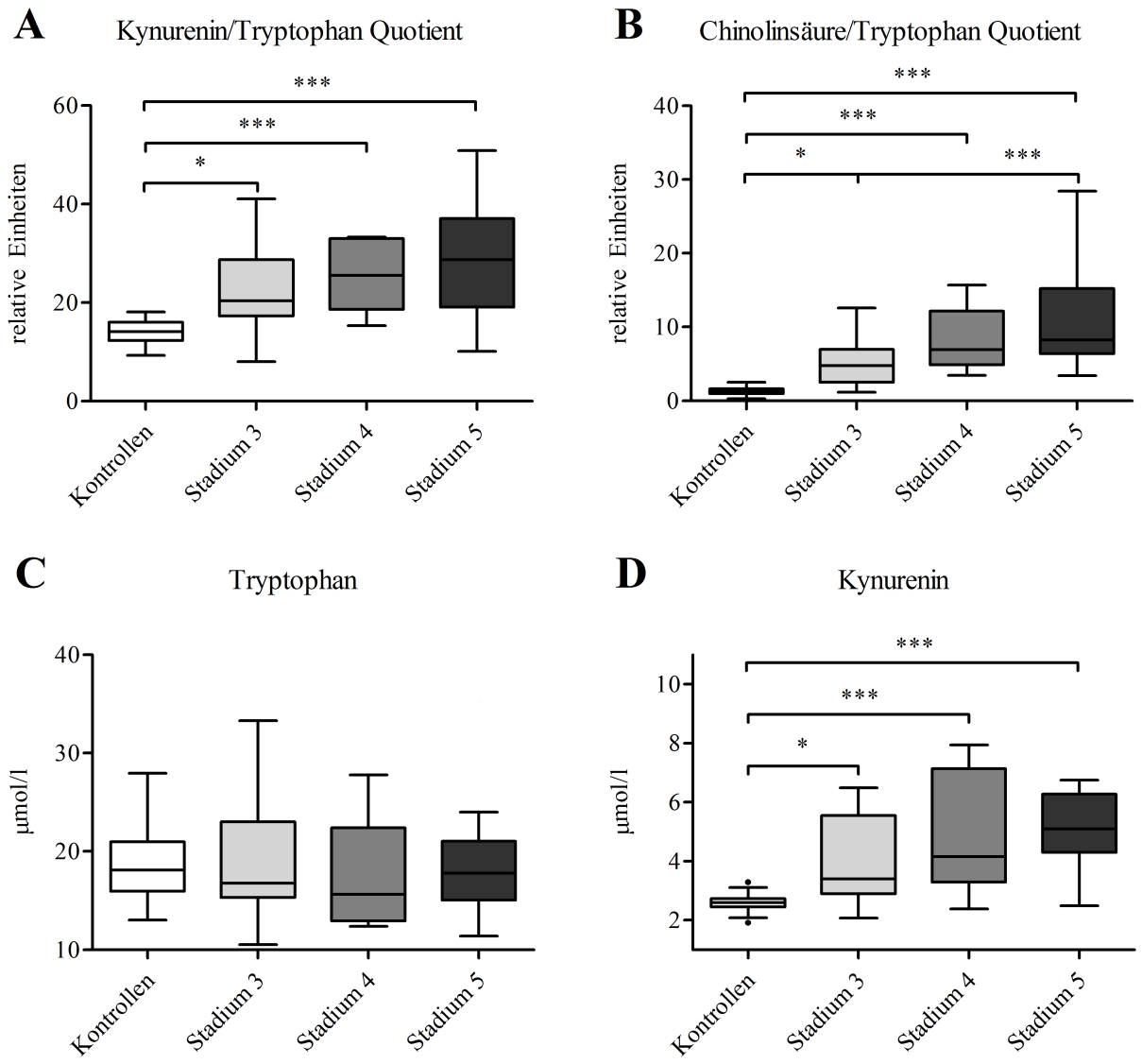

Abbildung 4.13.: Darstellung der Quotienten KYN/TRP und QUIN/TRP sowie TRP und KYN bei Patienten mit hochgradiger chronischer Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen Die Quotienten aus KYN und TRP (**A**), QUIN und TRP (**B**) sowie TRP (**C**) und KYN (**D**) sind von 41 Patienten im Stadium 3 (GFR $30 - 59ml/min/1,73m^2$, n=10), 4 (GFR $15 - 29ml/min/1,73m^2$, n=14) und 5 (GFR $< 15ml/min/1,73m^2$, n=17) der chronischen Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=40) dargestellt. Signifikante Testergebnisse sind mit den Signifikanzniveaus $p < 0,05 : *$, $p < 0,01 : **$ und $p < 0,001 : ***$ bezeichnet.

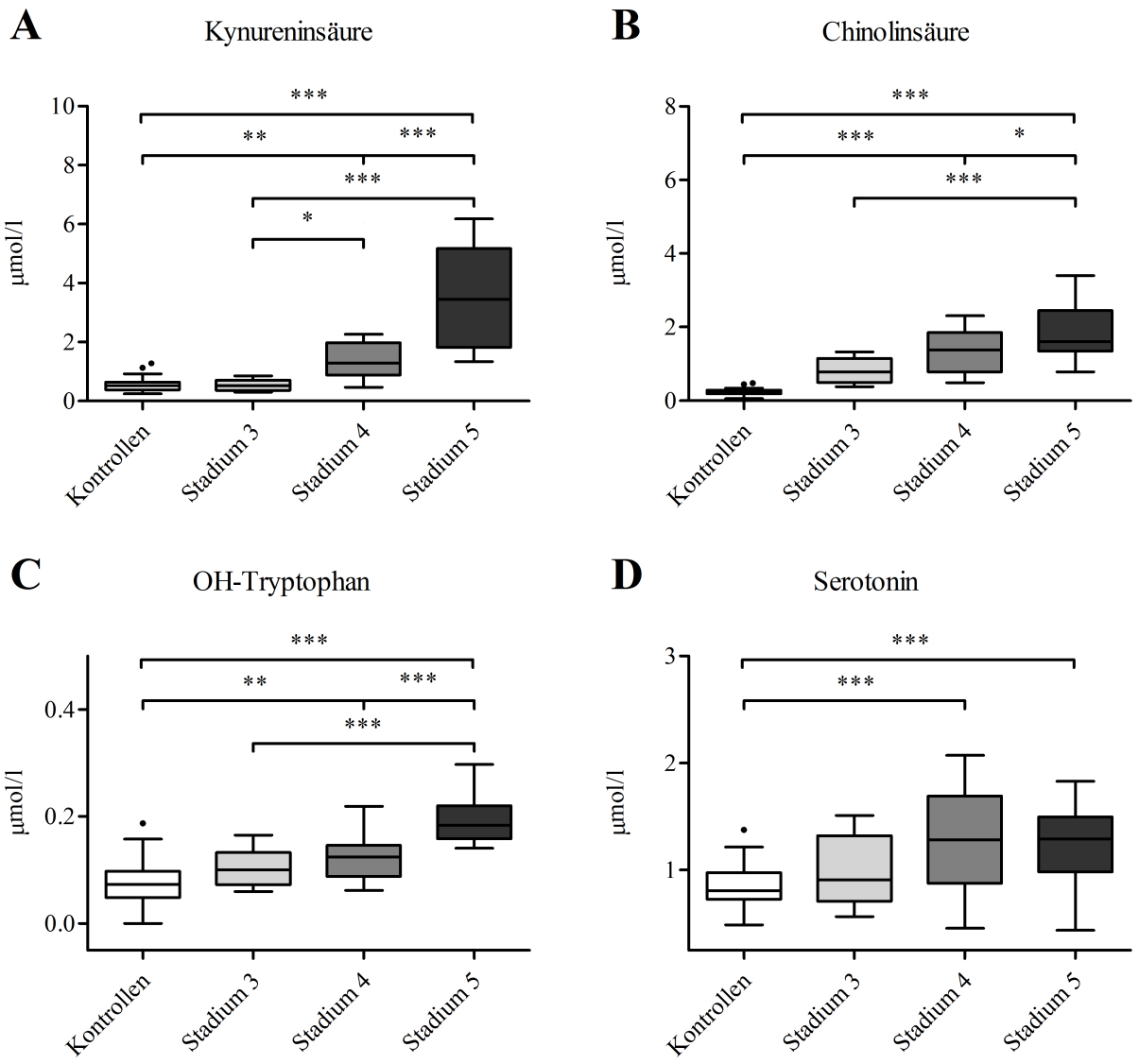

Abbildung 4.14.: Darstellung der Plasmaspiegel von KYNA, QUIN, OH-TRP und SER bei Patienten mit hochgradiger chronischer Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen Die Plasmaspiegel von KYNA (**A**), QUIN (**B**), OH-TRP (**C**) sowie SER (**D**) sind von 41 Patienten im Stadium 3 (GFR $30-59ml/min/1,73m^2$, n=10), 4 (GFR $15-29ml/min/1,73m^2$, n=14) und 5 (GFR $< 15ml/min/1,73m^2$, n=17) der chronischen Nierenerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollen (n=40) dargestellt. Signifikante Testergebnisse sind mit den Signifikanzniveaus $p < 0,05 : *$, $p < 0,01 : **$ und $p < 0,001 : ***$ bezeichnet.

Tabelle 4.6.: Retentionsparameter, errechnete verbliebene Filtrationsleistung, sowie Parameter der chronischen Inflammation der drei beobachteten Patientengruppen mit chronischer Nierenerkrankung. Die Stadieneinteilung erfolgt in die Stadien 3 bis 5 anhand der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Stadium 3: GFR $30 - 59 ml/min/1,73m^2$, Stadium 4: GFR $15 - 29 ml/min/1,73m^2$ und Stadium 5: GFR $< 15 ml/min/1,73m^2$. Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben.

Parameter	*Stadium 3* *n=10*	*Stadium 4* *n=14*	*Stadium 5* *n=17*
Kreatinin $[\mu mol/l]$	$160,3 \pm 25,9$	$326,1 \pm 68,2$	$563,6 \pm 130,6$
Kreatinin $[mg/dl]$	$2,0 \pm 0,7^{*,\ddagger}$	$3,7 \pm 1,3^{*}$	$6,6 \pm 1,5$
Kreatininausscheidung $[ml/min]$	$41,9 \pm 12,5^{\dagger,\ddagger}$	$20,7 \pm 5,2^{\S}$	$10,3 \pm 3,9$
GFR $[ml/min/1,73m^2]$	$34,5 \pm 8,99^{*,\ddagger}$	$17,02 \pm 3,97^{\ddagger}$	$8,1 \pm 1,8$
Leukozyten [gpt/l]	$8,5 \pm 3,3$	$8,7 \pm 6,4$	$7,9 \pm 3,2$
Thrombozyten [gpt/l]	$200,6 \pm 93,8$	$240,6 \pm 113,1$	$243,6 \pm 142$
hochsensitives CRP [mg/l]	$0,7 \pm 0,6^{\P}$	$2,4 \pm 2,1$	$3,2 \pm 2,5$
löslicher TNF Rezeptor I [pg/ml]	$4365,6 \pm 4154,1^{\P,\parallel}$	$8594,8 \pm 5443,1^{**}$	$12617,2 \pm 4935$

$^{*}p \leq 0,001$ versus Stadium 4
$^{\dagger}p \leq 0,01$ versus Stadium 4
$^{\ddagger}p \leq 0,001$ versus Stadium 5
$^{\S}p \leq 0,01$ versus Stadium 5
$^{\P}p \leq 0,005$ versus Stadium 5
$^{\parallel}p \leq 0,04$ versus Stadium 4
$^{**}p \leq 0,04$ versus Stadium 5

5. Diskussion

5.1. Methodenetablierung

Die Methode der quantitativen Massenspektrometrie von Schlüsselparametern des Kynureninstoffwechsels, sowie des Indoleaminstoffwechsels mittels MS/MS und vorgeschaltetem automatischen Probengeber wurde entwickelt, um eine simultane Messung aller Analyte aus einer Plasmaprobe in kurzer Zeit zu ermöglichen. Dabei konnte eine sehr gute Präzision und gute Sensitivität erreicht werden. Die Methode wurde weiterhin für die Messeigenschaften Richtigkeit, Kalibration, intra- und interserielle Präzision, Linearität, Spezifität und Selektivität validiert.

In der Literatur finden sich einige wenige Beispiele der Messung einzelner Metabolite des Tryptophanstoffwechsels mittels LC-MS/MS Anordnungen, um die Detektion zu optimieren (Flüssigkeitschromatographie - Tandemmassenspektrometrie)[2,41]. In der hier verwendeten Methode wurde keine chromatographische Aufreinigung der Proben durchgeführt. Daher ist die hier verwendete Methode der HPLC und der LC-MS/MS hinsichtlich des Probendurchsatzes deutlich überlegen. Die simultane Messung aller Analyte aus einer Probe wird dabei ebenso ermöglicht. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil gegenüber LC basierten Methoden dar, deren Aufwand mit der Anzahl der Analyte ansteigt.

Die Messung der Schlüsselmetabolite des Kynureninabbauweges KYN, KYNA und QUIN bietet erweiterte Informationen über den Kynureninstoffwechselweg gegenüber dem in der Literatur verwendeten Quotienten aus TRP und KYN als näherungsweise Bestimmung der IDO Aktivität aus humanem Plasma[219]. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass den genannten Metaboliten immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Weiterhin wurden, zur Erfassung von Einflüssen durch konkurrierende Stoffwechselwege für TRP zwei Schlüsselmetabolite des Serotoninstoffwechsels in die Messung miteinbezogen.

Damit wurde eine Methode etabliert, die sich für Screening Untersuchungen oder klinische Studien mit hohem Probenaufkommen sehr gut eignet. Beschränkungen der Aussagekraft ergeben sich für das humane System aus dem eingeschränkten Zugang zu repräsentativem Probenmaterial. IDO Expression ist für Gewebe mit lymphatischen Eigenschaften belegt und nicht für (mononukleäre) Zellen des peripheren Blutes. Tiermodelle der Sepsis, wie z.B. das CASP (Co-

lon-Ascendes-Stent-Peritonitis) Mausmodell oder CLP (Cecal Ligation and Puncture) Mausmodell können die Möglichkeit eröffnen, Metabolitenkonzentrationen an Orten der IDO Expression aus Gewebeproben zu messen, um damit die Signifikanz der IDO in der Sepsis weiter zu untersuchen. Erste Messungen der Parameter aus Organproben von Mäusen wurden dazu bereits durchgeführt und die Methode erfolgreich etabiliert (Daten nicht gezeigt).

5.2. Kritisch kranke Patienten zeigen einen erhöhten Tryptophanmetabolismus

Kritisch kranke Patienten auf der Intensivstation zeigten deutlich reduzierte Tryptophanspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen (s. Abb. **4.8 A**, S. 66). Von den Indikatoren des Kynureninstoffwechsels zeigte nur QUIN einen leichten Anstieg (s. Abb. **4.9 B**, S. 67). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Pellegrin et al., die ein solches Reaktionsmuster des Tryptophanspiegels bei 22 Patienten nach Trauma beschrieben[153], sowie mit eigenen Messungen von Patientenproben aus einem perioperativen Beobachtungszeitraum nach großer abdomineller Chirurgie. Die beobachteten metabolischen Veränderungen sind vor dem Hintergrund einer Homöostasestörung zu betrachten, wie sie nach ausgedehnten Gewebeschäden durch Traumata oder Operationen auftritt. Die Gesamtheit der metabolischen Veränderungen werden pathophysiologisch unter dem Begriff Postaggressionssyndrom subsummiert. Im Postaggressionssyndrom kommt es zur Freisetzung der katabolen Hormone Adrenalin, Noradrenalin, Cortisol und Glucagon. Glucagon und Katecholamine stimulieren die Gluconeogenese, Cortisol und Glucagon fördern die Proteolyse. Unter Einfluss der genannten Hormone, sowie durch Freisetzung von Zytokinen kann es darüberhinaus zu einem ebenfalls typischen und uniformen Reaktionsmuster immunologischer und klinischer Parameter kommen, die als systemisches inflammatorisches Response Syndrom (SIRS) zusammengefasst werden.

In metabolischen Parametern resultieren ein Hypermetabolismus, eine Hyperglykämie durch periphere Insulinresistenz, eine Lipolysesteigerung und eine erhöhte Harnstoffproduktion mit negativer Eiweißbilanz. Hierdurch wird einerseits durch Mobilisation der endogenen Energiereserven der Energiebedarf der Organe gedeckt, andererseits werden wichtige energieverbrauchende Syntheseleistungen ermöglicht. Das Überwiegen des Proteinabbaus über die Proteinbiosynthese mit resultierender Nettoproteinkatabolie ist dabei die kritische Größe des Postaggressionsstoffwechsels. Durch die proteinkatabole Stoffwechsellage kommt es zu einem Anstieg der freien Aminosäuren im Plasma[82,91,145,150]. Interessanterweise bildet die essentielle Aminosäure TRP eine Ausnahme[82], hier kommt es zu einem Abfall der Plasmaspiegel. Die Ursachen des Abfalls der Plasmaspiegel von TRP in dieser proteinkatabolen Stoffwechsellage sind bisher

nicht bekannt. Es gibt mehrere Modelle, die in diesem pathophysiologischen Kontext möglich erscheinen.

Als Ursache für einen erhöhten Tryptophankatabolismus kommt die Hochregulation der konstitutiv aktiven TDO in der Leber durch Glucocorticoide infrage. Die Aktivität dieses Enzyms erhält unter physiologischen Bedingungen die Homöostase der Plasmaspiegel von TRP[179]. Sie wird neben dem Tryptophanspiegel im portalvenösen Blut durch Glucocorticoide heraufreguliert[122,142,179,184].

TRP ist das Ausgangsprodukt der NAD^+ Synthese. Ein vermehrter Tryptophanabbau in der Leber durch erhöhten NAD^+ Bedarf führt jedoch zu einem Mangel in anderen Geweben und Organsystemen und widerspricht der Homöostaseleistung der Leber für die Tryptophanspiegel, sowie der These des Postaggressionsstoffwechsels, wonach die katabole Stoffwechsellage der Deckung eines erhöhten Energiebedarfs des Organismus dient.

Weiterhin Einfluss auf den Tryptophanspiegel hat dessen Bindung an Serumalbumin. Zum einen können sich schwankende Serumalbuminkonzentration auf die Tryptophanspiegel auswirken, zum anderen können freie Fettsäuren die Tryptophanbindungsstellen besetzen. Eine weitere mögliche Ursache für den beobachteten Tryptophanmangel bietet zudem der besondere Umstand, dass TRP anders als andere Aminosäuren im Plasma nichtkovalent an Albumin gebunden ist[36,190]. Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gebundenem und freiem TRP, wobei die freie Fraktion etwa 10% des plasmatischen TRPs ausmacht[192,200]. Es ist bekannt, dass freie Fettsäuren TRP aus den Bindungsstellen des Albumins verdrängen[7], und somit hohe Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren zu einem Anstieg der freien plasmatischen Fraktion von TRP führen. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass die Größe der freien Fraktion die periphere Ausschöpfung des plasmatischen TRPs determiniert[192,200]. Über diese Mechanismen ist im Zusammenspiel mit der hepatischen TDO der plasmatische Tryptophanspiegel unter physiologischen Bedingungen reguliert. So werden etwa 90% der freien plasmatischen Fraktion des über die Nahrung aufgenommenen TRPs in der Leber resorbiert und verstoffwechselt[5]. Eine Depletion des gesamten plasmatischen TRPs unter den Umständen einer Hypoalbuminämie und einer Hyperlipidämie wie sie im Postaggressionsstoffwechsel auftreten, könnte für eine vermehrte Verstoffwechslung des plasmatischen TRPs sprechen.

Untersuchungen trächtiger Ratten haben gezeigt, dass bei einem Anstieg der freien Fraktion des plasmatischen TRPs nicht nur die Ausschöpfung in der Leberpassage ansteigt, sondern auch die Verstoffwechslung von TRP im Gehirn[6]. Es ist folglich auch möglich, dass reduzierte Plasmaspiegel von TRP unter den Bedingungen einer Hypoalbuminämie und Hyperlipidämie Ausdruck einer erhöhten peripheren Verfügbarkeit sind. Ob dieser Zusammenhang auch unter den pathophysiologischen Bedingungen des katabolen Stoffwechsels im Postaggressionsyndroms

zutrifft, erscheint fraglich. Dagegen spricht, dass die Plasmaspiegel der um TRP konkurrierenden Synthese von Serotonin bei kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation (s. Abb. **4.10**, S. 68) und postoperativ nach großen chirurgischen Eingriffen signifikant abfallen, und somit ein vermindertes Tryptophanangebot im Postaggressionssyndrom plausibler erscheint.

Weiterhin ist eine Tryptophandepletion durch IDO-Induktion am Ort des Gewebetraumas als mögliche Ursache denkbar. Gewebeschäden oder Gewebehypoxie, die nach Trauma oder Operationen auftreten, führen zur nekrosebedingten Freisetzung endogener Alarmine, wie High-Mobility-Group-Box (HMGB) Proteinen, Hitzeschockproteinen (HSP), Nukleosomen oder ATP[30]. Diese binden ebenfalls an Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs), durch die IDO mittels PAMPs, wie LPS[59] und CpG Motiven[127] in Monozyten induzierbar ist, bzw. sie induzieren IDO über einen Toll-unabhängigen Signalweg, wie es für dendritische Zellen gezeigt werden konnte[119]. Eine Induktion von IDO durch endogene Alarmine ist jedoch bisher nicht systematisch untersucht. Erste Ergebnisse, welche diese These stützen, ist die IDO Induktion durch extrazelluläres ATP in dendritischen Zellen[119]. In den untersuchten kritisch kranken Patienten ohne septische Komplikationen kam es nur zu einem geringgradigen, systemisch messbaren Anstieg der QUIN, so dass dieser Beobachtung eine Aktivierung des Kynureninstoffwechsels zugrunde liegen könnte.

Zusammenfassend finden sich in der beobachteten Patientenpopulation der kritisch kranken, chirurgisch intensivmedizinisch behandelten Patienten deutlich reduzierte Plasmaspiegel der essentiellen Aminosäure TRP, welche eine wichtige Substratquelle für den Energiestoffwechsel unter Mangelbedingungen darstellt. Die Konsequenz dieser Beobachtung kann im Rahmen dieser Studie nicht weiter beurteilt werden, ist jedoch von potentiellem Interesse für additive Therapiestrategien bei Patienten im postaggressiven Stoffwechsel und in der Sepsis.

5.3. Tryptophanmetabolismus im Kynureninabbauweg in der Sepsis

Frühe Aktivierung des Kynureninabbauweges im septischen Syndrom Bei der Entwicklung eines septischen Syndroms zeigten sich bereits zu einem Zeitpunkt Veränderungen des Kynureninstoffwechsels, zu dem weder klinisch noch paraklinisch eine Sepsis manifest war (s. **4.2.3**). Insbesondere die Plasmakonzentrationen der QUIN waren zu diesem Zeitpunkt bereits signifikant angestiegen.

Die Tatsache, dass in der Patientengruppe ohne Sepsis kein ausgeprägter Anstieg der Kynurenine im Plasma nachweisbar war, sowie der Umstand eines frühzeitigen Anstiegs der Kynurenine vor Beginn des septischen Syndroms, ließen die Evaluation dieser Parameter als potentielle Sepsismarker interessant erscheinen. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Diskrimina-

tionsfähigkeit der Parameter des Kynureninstoffwechsels zwischen einem SIRS und einer sich entwickelnden Sepsis über der des C-reaktiven Proteins und des Procalcitonin liegt. Das potentielle diagnotische Potenzial der einzelnen Metaboliten, sowie deren Quotienten wurde mittels ROC Analysen, der Ermittlung der AUC und des prädiktiven Wertes aufgezeigt. Die Quotienten ermöglichten zu einem frühen Zeitpunkt eine überlegene Aussage über eine sich entwickelnde Sepsis. Dieses Ergebnis wurde von anderen Autoren bestätigt[113]. Bekannt ist, dass die paraklinischen Entzündungsparameter C-reaktives Protein und Procalcitonin einen deutlichen Anstieg im frühen postoperativen Verlauf zeigen, ohne dass sich infektiöse Komplikationen im Verlauf manifestieren[124]. Auch in der vorliegenden Studienpopulation ließsich dieser Effekt dokumentieren (s. Abb. 4.12).

Die Diskriminationsfähigkeit der Parameter scheint in dem Umstand begründet zu sein, dass während eines Postaggressionssyndroms / SIRS kein deutlicher Anstieg der Kynurenine im Plasma stattfindet. CRP und Procalcitonin zeigten unter diesen Bedingungen bereits einen deutlichen Anstieg, daher leidet ihre Diskriminationsschärfe.

Aktivierung des Kynureninstoffwechsels in der Sepsis Bei Patienten in der Sepsis zeigte sich eine deutliche Aktivierung des Kynureninabbauweges im Vergleich zu gesunden Kontrollen, sowohl durch einen Abfall der Tryptophanspiegel im Plasma als auch durch den Anstieg aller gemessenen Kynurenine. Der Quotient aus TRP und KYN als Maß der IDO Aktivität, sowie TRP und QUIN als Maß der Aktivität des Kynureninstoffwechsels sind ebenfalls deutlich angestiegen. Beim Vergleich zu kritisch kranken Patienten fällt auf, dass der Tryptophanspiegel nur geringfügig weiter abfällt. Die Plasmaspiegel aller Kynurenine zeigten jedoch signifikant gesteigerte Konzentrationen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine ausgeprägte Aktivierung des Kynureninabbauweges bei septischen Patienten ableiten, wodurch diese sich von kritisch kranken intensivtherapierten Patienten unterscheiden.

Im Fall einer sich entwickelnden Sepsis ist aufgrund der multifokalen oder generalisierten Inflammation, ausgelöst durch Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) oder deren Bestandteile (PAMPs), wie Lipopolysaccharid und der darauffolgenden Freisetzung hoher Spiegel proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α und IFN-γ, eine stark ausgeprägte Aktivierung von IDO Aktivität zu erwarten. Eine systemische Aktivierung von IDO könnte somit zu deutlich höheren Konzentrationen von Kynureninen führen, ähnlich wie sie bei einer begrenzten bakteriellen Infektion lokal erreicht werden. Zu den *in vivo* wirksamen und erreichten Konzentrationen gibt es jedoch bisher nur begrenzte Erkenntnisse. Im Mausmodell *in vivo* ist ein systemisch nachweisbarer Anstieg der Kynurenine als Reaktion auf eine systemische Gabe von LPS ($20\mu g$) bereits gezeigt worden[225]. Ein Anstieg von Kynureninen im Urin/Blut im Rahmen bakterieller Infektionen ist umfassend bekannt[173]. Als Lokalisation der IDO Expression kommen vor allem mukosale

und lymphatische Gewebe infrage, wie es durch immunhistochemische Arbeiten zum Nachweis von IDO Protein und QUIN gezeigt wurde[132]. Die Folge dieser systemischen Aktivierung ist demzufolge ein Anstieg der Plasmakonzentrationen der immunmodulatorischen Kynurenine, wie sie bei Patienten mit sich entwickelndem septischen Syndrom nachweisbar war. Damit einhergehend kam es zu einem weiteren Abfall der Tryptophanspiegel im Plasma (s. Abb. **4.8**, S. 66). Über die Konzentrationen, in welchen die Kynurenine ihre immunsuppressive Wirkung *in vivo* entfalten, sowie über die am Ort der IDO Aktivierung *in vivo* erreichten Konzentrationen der Kynurenine und des TRPs, gibt es ebenfalls wenig *in vivo* Daten. In einer Arbeit von Fujigaki et al. mit Mäusen, welche intraperitoneal mit *Toxoplasma gondii* infiziert wurden, konnte aus gewonnenem Lungengewebe im Vergleich zu unbehandelten Tieren mehr als 10fach erhöhte Kynureninwerte ermittelt werden[60]. Konsekutiv waren die Tryptophankonzentrationen auf unter 10% des Ausgangsniveaus gesunken. Beim Vergleich zu den Konzentrationen von KYN im Plasma zeigte sich lediglich ein Anstieg um den Faktor 3 auf etwa 4,5$\mu mol/l$[60]. *In vitro* zeigten sich zytotoxische Effekte der einzelnen Metabolite auf T- und B-Lymphozyten, sowie auf NK Zellen in hohen mikromolaren Konzentrationen[52]. Wurden die Metabolite hingegen als Gemisch eingesetzt, reichte eine Konzentration der einzelnen Metabolite von 14$\mu mol/l$ aus, um ausgeprägte zytotoxische Effekte auf die genannten Zelltypen nachzuweisen. Zusätzlich zeigte sich eine Abhängigkeit der Zytotoxizität von der Expositionszeit, die nach 3 Tagen Exposition, insbesondere von aktivierten T-Zellen exponentiell zunahm[207].

Fallarino et al. konnten unter diesen Bedingungen *in vitro* für 10μM Konzentrationen von KYN, 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxykynurenin und QUIN hohe Apoptoseraten bei murinen Thymozyten nachweisen[52].

Die systemisch nachweisbaren Plasmakonzentrationen der gemessenen Kynurenine im septischen Syndrom erreichten die *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell wirksamen Konzentrationen und übertrafen diese zum Teil deutlich. Die Beurteilbarkeit der Signifikanz dieses Ergebnisses ist vor dem Hintergrund fehlender *in vivo* Daten aus dem humanen System limitiert. Jedoch ist festzuhalten, dass bereits zu einem frühen Zeitpunkt im septischen Syndrom ein immunsuppressiver Mechanismus aktiv und nachweisbar ist und eine Ausprägung erreicht, welche sich *in vivo* und im Tiermodell als wirksam erwiesen haben.

Sonderstellung für QUIN Die frühzeitige und ausgeprägte Akkumulation der QUIN im septischen Syndrom mag der besonderen Rolle dieses Metaboliten im Kynureninstoffwechsel von Immunzellen geschuldet sein.

Die Degradation von TRP zu KYN unter dem Einfluss von IFN-γ ist eine in vielen Zelltypen vorhandene Reaktionsweise. Der weitere Abbau von KYN zu QUIN scheint demgegenüber auf Hepatozyten und Zellen des Immunsystems limitiert zu sein. Immunhistochemische Untersu-

chungen zum Nachweis von QUIN in Gewebeschnitten haben gezeigt, dass Hepatozyten dennoch keine QUIN intrazellulär akkumulieren[130]. Auch die hochdosierte Zufuhr von KYN führte zu keiner Akkumulation, wohingegen unter den gleichen Bedingungen Immunzellen deutlich für QUIN positiv waren[130]. Dieser auffällige Unterschied in der intrazellulären Akkumulation von QUIN zwischen diesen Zelltypen legt unterschiedliche Substratspeicherung und Syntheseleistungen dieser Zelltypen nahe. In Hepatozyten findet eine weitere Verstoffwechslung der QUIN zu NAD^+ statt, wodurch die ausbleibende Akkumulation erklärbar ist. Hinter der Eigenschaft von Immunzellen QUIN intrazellulär zu speichern, wird die mangelnde Enzymaktivität der Chinolinat-Phosphoribosyltransferase (QPRT) in diesen Zelltypen vermutet[56]. Die Tatsache, dass QUIN in bestimmten Leukozytenpopulationen akkumuliert, widerspricht früheren Einschätzungen, dass das weitere metabolische Schicksal der Kynurenine allein in der Ausscheidung über die Nieren besteht. Es existieren mehrere mögliche Erklärungen für die Produktion und Akkumulation bzw. intrazelluläre Aufnahme der Kynurenine und insbesondere QUIN in Immunzellen. Zum einen wirken sie als Immunregulatoren durch die Induktion von Apoptose in T-Zellen. Zum anderen gibt es Hinweise dafür, dass Immunzellen dadurch am Ort der IDO Induktion ein Substrat für die NAD^+ Synthese und die Poly-ADP-Ribose-Polymerase Reaktion zur Reparatur oxidationsbedingter DNA Strangbrüche bereitstellen[63]. Da für die meisten extrahepatischen Zelltypen die notwendige Enzymausstattung für die Synthese von NAD^+ aus TRP nicht bekannt ist, lässt sich diese Hypothese nicht weiter belegen.

Interessant ist diese metabolische Kompartmentierung des Tryptophanabbaus an Orten der IDO Induktion noch aus der oben angeführten Sicht des beobachteten systemischen Tryptophanmangels. So ist unter Trytophanmangelbedingungen bei gleichzeitiger kataboler Stoffwechsellage möglicherweise die Substratzufuhr für die Proteinbiosynthese und den Energiestoffwechel in Geweben, welche häufig nur mittelbar durch die pathophysiologischen Prozesse der Sepsis betroffen sind, beeinträchtigt. Dazu passt die Beobachtung von Hotchkiss et al., dass Gewebe von Organen, die sich im septischen Multiorganversagen befanden, sich in einem Zustand eines zellulären Winterschlafes (Hibernation) befanden[88]. Als molekulare Basis dieses Mechanismus wurde durch Hotchkiss et al. die Arbeit von Khan et al. angeführt, die zeigen konnten, dass immunstimulierte Enterozyten einen verminderten Sauerstoffverbrauch als Resultat der Depletion von NAD^+ infolge der Aktivierung der Polyadenosindiphosphat-Ribose-Polymerase (PARP) unter oxydativem Stress aufwiesen[96]. Die Konstellation des Tryptophanstoffwechsels, wie er sich bereits vor der sich entwickelnden Sepsis zeigt, bietet interessante Anknüpfungspunkte zur weiteren Untersuchung der Immunpathophysiologie des septischen Immundefektes und des septischen Multiorganversagens.

Für die Konsequenzen der systemischen Aktivierung des Kynureninabbauweges in der Sepsis

kann jedoch anhand der erhobenen Daten wenig weitere Evidenz erbracht werden. Es liessen sich signifikante Korrelationen zwischen den Parametern des Kynureninstoffwechsels und wichtigen Leukozytenpopulationsparametern feststellen. In den Varianzanalysen zeigten sich jedoch keine signifikanten Zusammenhänge. Andere Arbeitsgruppen haben nach Veröffentlichung dieser Daten ebenfalls einen gesteigerten Kynureninstoffwechsel bei septischen Patienten nachweisen können und bestätigten die vorliegenden Resultate[204]. Darüber hinaus konnte die beobachtete Kovarianz des aktivierten Kynurneninstoffwechsels mit dem klinischen Zustandsbild des septischen Schocks von anderen Arbeitsgruppen mittlerweile bestätigt werden, beziehungsweise weitere Evidenz für die Signifikanz des gesteigerten Kynureninstoffwechsels in der Sepsis erbracht werden. Die stärker gepowerte Studie von Huttunen et al. konnte sogar einen Zusammenhang hoher Stoffwechselaktivität von IDO, gemessen als KYN/TRP Quotient, mit der Schwere der Sepsis und der Mortalität nachweisen[89].

Erstmals hat man auch einen Zusammenhang mit der Pathophysiologie des septischen Schocks herstellen können. So sind IDO Knock-Out Mäuse resistent gegenüber einem durch LPS ausgelösten Endotoxinschock. Als ursächlich hierfür konnte eine vasodilatatorische Wirkung von Kynurenin nachgewiesen werden, welche wie im Fall von Stickoxid (NO) über die Synthese von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) erfolgt[93]. Als Ort der Kynureninsynthese konnte in Mäusen die Endothelzellen der Widerstandsgefäße des arteriellen Gefäßsystems (Arteriolen) lokalisiert werden[216].

Um diese Zusammenhänge weiter zu untersuchen, bedürfte es eines Tiermodells, welches die septische Immunparalyse nachbildet. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre eine Interventionsstudie am Tiermodell der Sepsis mit IDO Inhibitoren.

5.4. Der Kynureninstoffwechsel in der Niereninsuffizienz

Bei den untersuchten kritisch kranken Patienten war eine eingeschränkte Nierenfunktion mit erhöhten Plasmaspiegeln der Kynurenine assoziiert. Bei septischen Patienten, die im Rahmen des septischen Syndroms ein akutes Nierenversagen entwickelten, kam es zu einem besonders starken Anstieg der Kynurenine im Plasma. Durch eine Varianzanalyse wurde diese Beobachtung bestätigt (s. Abb. **4.5**, S. 73). Interessant war in diesem Zusammenhang, dass das Auftreten eines Nierenversagens mit besonders niedrigen Plasmaspiegeln von TRP vergesellschaftet war. Diese Beobachtung lässt die naheliegende Schlussfolgerung der einfachen Akkumulation der renal eliminierten Kynurenine als alleinige Ursache des Anstiegs der Plasmaspiegel bei kompromittierter Nierenfunktion nicht plausibel erscheinen und legt eine zusätzliche Induktion der IDO über nicht bekannte Mechanismen nahe. Um diesen Zusammenhang getrennt von den zuvor be-

obachteten Bedingungen der kritisch kranken Patienten auf der chirurgischen Intensivstation und während einer Sepsis untersuchen zu können, wurden in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke und Herrn PD Dr. med. Jörg C. Schefold der Klinik für Nephrologie und Intensivmedizin im Virchow Klinikum der Charité Berlin Patienten in verschiedenen Stadien fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankung untersucht (s. Abb. **4.3**, S. 74)[178]. Bei dieser Patientenpopulation zeigten sich signifikant erhöhte Plasmaspiegel der TRP Abbauprodukte des Kynureninabbauweges, einschließlich des Transaminierungszweiges. Diese stiegen mit dem Schweregrad der Erkrankung an. Auffallend war bei der Untersuchung dieser Patientengruppe, dass die TRP-Spiegel für keinen Schweregrad der Niereninsuffizienz einen signifikanten Abfall zeigten und entsprechend keine Korrelation zum Schweregrad aufwiesen.

Die Parameter für die Nierenfunktion (Kreatinin, eGFR), der chronischen Entzündung (hs-CRP, sTNFR-I), sowie der IDO Aktivität bzw. des Kynureninstoffwechsels korrelierten zueinander. Bei einer multiplen Regressionsanalyse blieb die Kovarianz der Kynurenine mit hsCRP und sTNFR-I unabhängig von Alter, Körpergewicht und Serumkreatinin. Das letztgenannte Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, dass die chronische Inflammation mit der erhöhten Aktivität des Kynureninstoffwechsels im Rahmen des CKD im Zusammenhang steht, mit den Retentionsparametern jedoch nur mittelbar. Diese Korrelation mit Markern der chronischen Entzündung lässt eine Rolle des durch IDO eingeleiteten Kynureninstoffwechsels für die chronische Niereninsuffizienz möglich erscheinen. Dies wird durch pathogenetische Charakteristika der chronischen Niereninsuffizienz gestützt. So ist eine Veränderung der Leukozytenbildung und -funktion bei Patienten mit Urämie bekannt, einhergehend mit einem Immundefekt[73]. Es kommt zu einer Lymphozytopenie und zur Atrophie von lymphatischen Strukturen. Experimentell lässt sich die Funktion von Lymphozyten durch urämisches Serum negativ beeinflussen[73].

Zusammenfassend mit den zuvor angeführten Ergebnissen aus der Studie an septischen Patienten lässt sich ableiten, dass die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen des induzierten Kynureninstoffwechsels im Fall des akuten Nierenversagens im Rahmen des septischen Multiorganversagens mit denen des chronischen Nierenversagens möglicherweise nicht identisch sind.

Die Tatsache der besonders niedrigen TRP Spiegel im Rahmen des akuten Nierenversagens im septischen MOV kann auch der besonderen Schwere des septischen Syndroms in dieser Situation geschuldet sein und ist daher, die These der erhöhten IDO Aktivität in der Sepsis stützend, mit besonders hohen Plasmaspiegeln der Kynurenine und eben besonders niedrigen Plasmaspiegeln von TRP verbunden. Alternativ ist eine zusätzliche IDO-Induktion bei Auftreten des akuten Nierenversagens in der Sepsis durch unbekannte Mechanismen möglich.

Für die erhöhten Plasmaspiegel der Kynurenine bei gleichzeitig unveränderten Plasmaspie-

geln von TRP im Kontext der chronischen Niereninsuffizienz sind folgende Ursachen denkbar. Zum einen kann es bei chronischer Entzündungsaktivität mit chronischer Aktivierung des Kynureninstoffwechsels zu einer Rekompensation der Tryptophanplasmaspiegel kommen. Zum anderen kommt eine Akkumulation der Kynurenine mit abnehmender Ausscheidungsleistung der Niere als Ursache infrage. Gegen diese Hypothese spricht die Korrelation der Plasmaspiegel der Kynurenine mit den Parametern der chronischen Inflammation hsCRP und sTNFR-I[178]. Daten von Tiermodellen für Niereninsuffizienz legen ebenfalls eine Beteiligung anderer Mechanismen als die einer schlechten renalen Ausscheidung der Metabolite nahe, da es in diesem Modell zu einem Anstieg der Metabolite im Plasma ohne gleichzeitige wesentliche Abnahme der Nierenfunktion kam[174]. Folgende Limitationen der Studie sind zu diskutieren. Ernährungseinflüsse auf die Tryptophanspiegel oder speziell die Aufahme von Aminosäuren wurden nicht berücksichtigt. Gegen einen Einfluss des Ernährungsverhaltens auf die Tryptophanspiegel spricht, dass die morgendlichen und nachmittaglichen Tryptophanspiegel der niereninsuffizienten Patienten vor und nach Hämodialyse sich nicht unterschieden. Weiterhin unterschied sich das Altersmittel der Kontrollpopulation von dem der Patienten. In der multiplen Regressionsanalyse zeigte sich keine Abhängigkeit für alle Parameter, sowohl in der Kontroll- als auch in der Studiengruppe vom Alter.

Zusammenfassend konnte die Studie zeigen, dass die Aktivität des Kynureninabbauweges, eingeleitet durch IDO Aktivität, mit dem Schweregrad, sowie mit Markern der chronischen Entzündung der chronischen Nierenerkrankung korreliert. In der multiplen Regressionsanalyse waren die Parameter unabhängig von Alter, Körpergewicht und Serumkreatininwerten. Der um TRP konkurrierende Stoffwechselweg zu SER zeigte sich in der chronischen Nierenerkrankung ebenfalls erhöht. Für die Mechanismen hinter diesem Befund kann im Rahmen dieser Analyse kein Anhalt geboten werden. Möglich sind eine verringerte Aufnahme von SER in Thrombozyten in der Urämie und eine erhöhte Serotoninproduktion von enterochromaffinen Zellen im Dünndarm als Reaktion auf den chronischen inflammatorischen Reiz. Die Ergebnisse dieser Studie wurden publiziert[178].

6. Zusammenfassung und Ausblick

Die Mechanismen der Immunregulation sind bisher wenig verstanden. Als ein hoch wirksamer Mechanismus zur Generierung und Aufrechterhaltung einer lokalen Toleranz des adaptiven Immunsystems wurde die durch inflammatorische Stimuli wie IFNγ, TNFα oder Lipopolysaccharide induzierbare Enzymaktivität der Indoleamin 2,3-Dioxygenase erkannt, welche durch den Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan die Bildung toxischer/immunregulativer Metabolite, der Kynurenine, initiiert, und dadurch adaptive Immunreaktionen durch Bildung eines tolerogenen Milieus am Ort ihrer Expression wirkungsvoll unterdrückt. So erzeugt IDO Aktivität zum Beispiel in der Plazenta ein immunsupprimierendes Milieu und unterbindet dadurch die Immunisierung der Mutter gegenüber dem genetisch fremden Föten[141]. Das immunologische Paradoxon der Gravidität konnte durch diese Entdeckung erklärt werden.

Das in der Sepsis beobachtete Versagen des Immunsystems wird als Immunparalyse bezeichnet. Darunter wird die anhaltende Hypoinflammation bei persistierender Infektion im septischen Syndrom verstanden[213]. Der funktionelle Immunzelldefekt, durch den die septische Immunparalyse gekennzeichnet ist, scheint maßgeblich für die Mortalität in der hypoimmunen Phase des septischen Syndroms verantwortlich zu sein, auf die der größere Teil der letalen Verläufe entfällt. So ist eine anhaltende, stark erniedrigte Expressionsdichte von HLA-DR auf Monozyten als Maß der Immunparalyse mit einem vermehrten Auftreten sekundärer oder opportunistischer Infektionen, sowie mit erhöhter Letalität assoziiert[86].

Seit etwa 120 Jahren ist bekannt, dass sich bei Infektionskrankheiten die Urinausscheidung von aromatischen Aminen erhöht[50]. Diese wurden später als Tryptophankatabolite des Kynureninabbauwegs identifiziert[100]. Die Bedeutung und Ursache dieses Befund ist bisher nicht ausreichend untersucht.

Die zuvor genannten Beobachtungen führen zu der Frage, inwieweit eine Steigerung des durch IDO eingeleiteten Kynureninabbauweges im septischen Syndrom beobachtet werden kann, und ob sich ein Zusammenhang mit dem Schweregrad des Syndroms und damit mit der Pathophysiologie der Sepsis herstellen lässt.

Die frühere und richtige Erkennung einer Sepsis bei gefährdeten Patienten würde einen bedeutenden Vorteil bei der erfolgreichen Behandlung gewähren. Ein besseres Verständnis der immunregulativen und immunsuppressiven Mechanismen in der Sepsis kann von entscheiden-

der Relevanz für die Beeinflussung der mortalitätsdeterminierenden Immunparalyse und damit für die erfolgreiche Behandlung der Sepsis sein. Aus diesem Verständnis ließen sich immunmodulatorische / immunrekonstitutive Therapieansätze ableiten.

Zur Bestimmung der Kynureninstoffwechselaktivität bei septischen Patienten wurde eine Methode zur simultanen Quantifizierung von Schlüsselmetaboliten dieses Stoffwechsels mittels quantitativer Tandemmassenspektrometrie etabliert. Dies ermöglichte die näherungsweise Bestimmung der IDO Aktivität, sowie der Aktivität des durch sie eingeleiteten Stoffwechselweges aus humanen Plasmaproben.

Im Rahmen einer klinischen Studie an 100 intensivtherapierten chirurgischen Patienten wurde der Verlauf der Plasmakonzentrationen der Schlüsselmetabolite während des Intensivaufenthaltes gemessen und mit intensivmedizinischen Routinelaborparametern, immunologischen Laborparametern, sowie klinischen Parametern und Scores verglichen.

Eine weitere Studie wurde an Patienten in verschiedenen Stadien der chronischen Niereninsuffizienz durchgeführt, um den beobachteten Zusammenhang von reduzierter Nierenfunktion und einer erhöhten Aktivität des Kynureninstoffwechsels detaillierter zu untersuchen.

Bei kritisch kranken, intensivmedizinisch behandelten Patienten zeigten sich deutlich verminderte Tryptophanspiegel im Vergleich zu gesunden Probanden. Die Plasmakonzentrationen von Kynurenin sowie von Serotonin als Repräsentanten der beiden um Tryptophan konkurrierenden Stoffwechselwege sind gleichzeitig nicht gesteigert. Das Endprodukt des Kynureninstoffechsels in vielen Zelltypen, die Chinolinsäure, zeigt demgegenüber eine signifikante plasmatische Akkumulation in der genannten Patientenpopulation. Eine Aktivierung des Kynureninstoffwechsels ist somit bei diesen Patienten bereits nachweisbar. Der von anderen Arbeitsgruppen verwendete Kynurenin/Tryptophan Quotient ist hier nicht sensitiv und führt zu falsch negativen Ergebnissen.

In septischen Patienten ist der durch IDO eingeleitete Kynureninabbauweg deutlich aktiviert. Die Aktivierung des Abbauweges erfolgt sehr früh im septischen Syndrom und differenziert in dem untersuchten Patientengut septische von nicht septischen Patienten besser als Procalcitonin. In einer multivariaten Varianzanalyse konnte ein Zusammenhang besonders hoher Plasmakonzentrationen der Kynurenine mit dem Zustand des septischen Schocks, sowie mit dem septischen Nierenversagen nachgewiesen werden.

Die plasmatische Akkumulation der Kynurenine in der Niereninsuffizienz wurde im Rahmen einer weiteren Studie an Patienten in verschiedenen Stadien einer Niereninsuffizienz näher untersucht. Ein Anstieg der Plasmakonzentrationen der Kynurenine in Abhängigkeit von der Schwere der Niereninsuffizienz konnte in dieser Studie auch unabhängig von dem Vorliegen einer Sepsis gezeigt werden.

Niedrige Tryptophanspiegel im Plasma von kritisch kranken und septischen Patienten sprechen für eine verminderte Verfügbarkeit von Tryptophan für abhängige Stoffwechselwege, wie die Synthese von Indoleaminen und als Substratquelle für den zellulären Energiestoffwechsel. Die beobachteten Konzentrationen der Kynurenine erreichen Werte, welche *in vitro* und *in vivo* im Mausmodell durch eine zytotoxische Wirkung auf NK-, B- und insbesondere T-Zellen als immunregulatorisch wirksam nachgewiesen wurden.

Es kann somit festgehalten werden, dass bei septischen Patienten ein immunsuppressiver Mechanismus zu einem sehr frühen Zeitpunkt aktiviert wird und eine systemische Ausprägung erfährt, die sich experimentell als hoch wirksam erwiesen hat. Die Beobachtung der erhöhten Konzentrationen der Kynurenine bei gleichzeitigem Abfall der Tryptophanspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz stützen die These, sowie neuere Erkenntnisse einer chronischen Inflammation als zugrundeliegenden Pathomechanismus des Nierenversagens.

Der Nachweis einer Tryptophanmangelsituation bei kritisch kranken, intensivtherapierten und septischen Patienten gehörte nicht zu den Zielen der Studie. Daher ist anhand der gewonnenen Daten keine ausreichende Quantifikation des Tryptophankatabolismus möglich, beziehungsweise keine ausreichende Evidenz für das Vorliegen einer Tryptophanmangelsituation gegeben.

Es ergeben sich viele Anhaltspunkte für eine Rolle der IDO in der Pathophysiologie der Sepsis. Zum direkten Nachweis der Beteiligung des Kynureninstoffwechsels an der Pathophysiologie der Sepsis sind Interventionsstudien beziehungsweise Tiermodelle erforderlich.

Die niedrigen Tryptophanspiegel bei kritisch kranken Patienten und Patienten mit einer Sepsis werfen die Frage auf, ob bei diesen Patienten eine Tryptophanmangelsituation vorherrscht, die eine Beeinträchtigung abhängiger Stoffwechselprozesse zur Folge hat. Insbesondere als potentieller pathophysiologischer Mechanismus für den bei betroffenen Organen im septischen Multiorganversagen beobachtete, durch NAD^+-Mangel hervorgerufene, zelluläre Minimalstoffwechsel (Hibernation) bietet diese Beobachtung einen interessanten Ansatz für weitere Arbeiten. Mit einer Erweiterung des Messspektrums, mit dem Ziel den Tryptophanverbrauch zu quantifizieren, beispielsweise durch Messung der Metabolite im Urin sowie durch Messung von Abbauprodukten des NAD^+- (Nicotinamid) und Serotoninstoffwechsels in Urin und Blut, wäre es möglich, die Bedeutung der reduzierten Tryptophanspiegel bei kritisch kranken und septischen Patienten zu ergründen.

Die vorliegenden Ergebnisse liefern darüber hinaus neue Erkenntnisse über einen immunsuppressiven Mechanismus, welcher in der Sepsis bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Syndroms aktiviert wird und eine mögliche Bedeutung für die Entstehung des septischen Schocks, des akuten Nierenversagens sowie der septischen Immunparalyse hat.

Ein möglicher Ansatz für weitere Arbeiten wäre in einem Tiermodell der Sepsis Inhibitoren der IDO, wie beispielsweise 1-Methyltryptophan, einzusetzen um die Bedeutung des Metabolismus für die Entstehung der septischen Immunparalyse zu untersuchen. Dazu bietet sich mit IDO Inhibitoren eine potentielle Interventionsmöglichkeit für die Entwicklung von immunrekonstitutiven Therapien.

Es ist bekannt, dass IDO Induktion vor allem im Darm, in der Lunge, in der Milz und in der Niere stattfindet und im Gewebe hohe Konzentrationen der Metabolite gemessen werden können. Die Messung der Metabolite aus Gewebehomogenisaten wurde bereits erfolgreich durchgeführt und bietet im Tiermodell die Möglichkeit, die Aktivität des Stoffwechsels in den Organen zu quantifizieren.

Eine potentielle Anwendung der Ergebnisse stellt das Screening von gefährdeten Patienten durch Quantifizierung des Kynureninabbauweges dar, um die Methode prospektiv zu evaluieren und in der Zukunft eine sich entwickelnde Sepsis frühzeitig und richtig erkennen zu können.

Literaturverzeichnis

[1] Adams, O., Besken, K., Oberdörfer, C., MacKenzie, C. R., Takikawa, O., and Däubener, W. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol 78*, 5 (Mar 2004), 2632–6.

[2] Amirkhani, A., Heldin, E., Markides, K. E., and Bergquist, J. Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 780*, 2 (Nov 2002), 381–387.

[3] Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., and Pinsky, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the united states: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med 29*, 7 (Jul 2001), 1303–10.

[4] Baban, B., Hansen, A. M., Chandler, P. R., Manlapat, A., Bingaman, A., Kahler, D. J., Munn, D. H., and Mellor, A. L. A minor population of splenic dendritic cells expressing cd19 mediates ido-dependent t cell suppression via type i ifn signaling following b7 ligation. *International Immunology 17*, 7 (Jul 2005), 909–19.

[5] Badawy, A. A. The functions and regulation of tryptophan pyrrolase. *Life Sci 21*, 6 (Sep 1977), 755–68.

[6] Badawy, A. A. Effects of pregnancy on tryptophan metabolism and disposition in the rat. *Biochem J 255*, 1 (Oct 1988), 369–72.

[7] Badawy, A. A., Morgan, C. J., Davis, N. R., and Dacey, A. High-fat diets increase tryptophan availability to the brain: importance of choice of the control diet. *Biochem J 217*, 3 (Feb 1984), 863–4.

[8] Ball, H. J., Yuasa, H. J., Austin, C. J. D., Weiser, S., and Hunt, N. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol 41*, 3 (Mar 2009), 467–71.

[9] Barth, M. C., Ahluwalia, N., Anderson, T. J. T., Hardy, G. J., Sinha, S., Alvarez-Cardona, J. A., Pruitt, I. E., Rhee, E. P., Colvin, R. A., and Gerszten, R. E. Kynurenic acid triggers firm arrest of leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *J Biol Chem 284*, 29 (Jul 2009), 19189–95.

[10] Bauer, T. M., Jiga, L. P., Chuang, J.-J., Randazzo, M., Opelz, G., and Terness, P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic t-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int 18*, 1 (Jan 2005), 95–100.

[11] Beatty, W. L., Morrison, R. P., and Byrne, G. I. Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev 58*, 4 (Dec 1994), 686–99.

[12] Belladonna, M. L., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Schwarcz, R., Fallarino, F., and Puccetti, P. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional ido. *J Immunol 177*, 1 (Jul 2006), 130–7.

[13] Belladonna, M. L., Volpi, C., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Pallotta, M. T., Boon, L., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Grohmann, U., and Puccetti, P. Cutting edge: Autocrine tgf-beta sustains default tolerogenesis by ido-competent dendritic cells. *J Immunol 181*, 8 (Oct 2008), 5194–8.

[14] Bender, D. A. The kynurenine pathway of tryptophan metabolism. *In: Stone TW, ed. Quinolinic acid and the kynureninesâ*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA (Jan 1989), 4–38.

[15] Beutelspacher, S. C., Pillai, R., Watson, M. P., Tan, P. H., Tsang, J., McClure, M. O., George, A. J. T., and Larkin, D. F. P. Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur. J. Immunol. 36*, 3 (Mar 2006), 690–700.

[16] Beutler, B., Milsark, I. W., and Cerami, A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science 229*, 4716 (Aug 1985), 869–71.

[17] Bochicchio, G. V., Napolitano, L. M., Joshi, M., McCarter, R. J., and Scalea, T. M. Systemic inflammatory response syndrome score at admission independently predicts infection in blunt trauma patients. *J Trauma 50*, 5 (May 2001), 817–20.

[18] Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J. L., and Michelson, S. Role of ifn-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol 162*, 2 (Jan 1999), 957–64.

[19] Boekstegers, P., Weidenhöfer, S., Pilz, G., and Werdan, K. Peripheral oxygen availability within skeletal muscle in sepsis and septic shock: comparison to limited infection and cardiogenic shock. *Infection 19*, 5 (Jan 1991), 317–23.

[20] Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., and Sibbald, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. the accp/sccm consensus conference committee. american college of chest physicians/society of critical care medicine. *Chest 101*, 6 (Jun 1992), 1644–55.

[21] Bone, R. C., Fisher, C. J., Clemmer, T. P., Slotman, G. J., Metz, C. A., and Balk, R. A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. methylprednisolone severe sepsis study group. *Crit Care Med 17*, 5 (May 1989), 389–93.

[22] BORDEN, C. W., and HALL, W. H. Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *N Engl J Med 245*, 20 (Nov 1951), 760–5.

[23] Braun, D., Longman, R. S., and Albert, M. L. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (ido) activity during dendritic-cell maturation. *Blood 106*, 7 (Oct 2005), 2375–81.

[24] Britan, A., Maffre, V., Tone, S., and Drevet, J. R. Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res 324*, 2 (May 2006), 301–10.

[25] Burkin, D. J., Kimbro, K. S., Barr, B. L., Jones, C., Taylor, M. W., and Gupta, S. L. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (ido) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics 17*, 1 (Jul 1993), 262–3.

[26] Byrne, G. I., Lehmann, L. K., and Landry, G. J. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular chlamydia psittaci replication in t24 cells. *Infection and Immunity 53*, 2 (Aug 1986), 347–51.

[27] Cady, S. G., and Sono, M. 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. *Arch Biochem Biophys 291*, 2 (Dec 1991), 326–33.

[28] Carlin, J. M., Borden, E. C., Sondel, P. M., and Byrne, G. I. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol 45*, 1 (Jan 1989), 29–34.

[29] Carrero, J. J., and Stenvinkel, P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol 4 Suppl 1* (Dec 2009), S49–55.

[30] Castellheim, A., Brekke, O.-L., Espevik, T., Harboe, M., and Mollnes, T. E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scandinavian Journal of Immunology 69*, 6 (Jun 2009), 479–491.

[31] Chon, S. Y., Hassanain, H. H., and Gupta, S. L. Cooperative role of interferon regulatory factor 1 and p91 (stat1) response elements in interferon-gamma-inducible expression of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene. *J Biol Chem 271*, 29 (Jul 1996), 17247–52.

[32] Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature 420*, 6917 (Jan 2002), 885–91.

[33] Cook, C. H., Bickerstaff, A. A., Wang, J.-J., Nadasdy, T., Pelle, P. D., Colvin, R. B., and Orosz, C. G. Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory"dendritic cells and ido. *J Immunol 180*, 5 (Mar 2008), 3103–12.

[34] Currier, A. R., Ziegler, M. H., Riley, M. M., Babcock, T. A., Telbis, V. P., and Carlin, J. M. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *J Interferon Cytokine Res 20*, 4 (Apr 2000), 369–76.

[35] Curti, A., Aluigi, M., Pandolfi, S., Ferri, E., Isidori, A., Salvestrini, V., Durelli, I., Horenstein, A. L., Fiore, F., Massaia, M., Piccioli, M., Pileri, S. A., Zavatto, E., D'Addio, A., Baccarani, M., and Lemoli, R. M. Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia 21*, 2 (Feb 2007), 353–5.

[36] Curzon, G., Friedel, J., and Knott, P. J. The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein. *Nature 242*, 5394 (Mar 1973), 198–200.

[37] Dai, W., and Gupta, S. L. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon-gamma. upstream control region discriminates between interferon-gamma and interferon-alpha. *J Biol Chem 265*, 32 (Nov 1990), 19871–7.

[38] Dai, W., Pan, H., Kwok, O., and Dubey, J. P. Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits toxoplasma gondii growth in fibroblast cells. *J Interferon Res 14*, 6 (Dec 1994), 313–7.

[39] Dai, X., and Zhu, B. T. Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. *J Histochem Cytochem 58*, 1 (Jan 2010), 17–28.

[40] Daley-Yates, P. T., Powell, A. P., and Smith, L. L. Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol 96*, 2 (Nov 1988), 222–32.

[41] Danaceau, J. P., Anderson, G. M., McMahon, W. M., and Crouch, D. J. A liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the analysis of serotonin and related indoles in human whole blood. *J Anal Toxicol 27*, 7 (Oct 2003), 440–444.

[42] Däubener, W., Hucke, C., Seidel, K., Hadding, U., and MacKenzie, C. R. Interleukin-1 inhibits gamma interferon-induced bacteriostasis in human uroepithelial cells. *Infection and Immunity 67*, 11 (Nov 1999), 5615–20.

[43] Däubener, W., Pilz, K., Zennati, S. S., Bilzer, T., Fischer, H. G., and Hadding, U. Induction of toxoplasmostasis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol 43*, 1-2 (Mar 1993), 31–8.

[44] Däubener, W., Posdziech, V., Hadding, U., and MacKenzie, C. R. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. no production. *Med Microbiol Immunol 187*, 3 (Mar 1999), 143–7.

[45] Däubener, W., Remscheid, C., Nockemann, S., Pilz, K., Seghrouchni, S., Mackenzie, C., and Hadding, U. Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Eur. J. Immunol. 26*, 2 (Feb 1996), 487–92.

[46] Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K. S., and Schroten, H. Restriction of toxoplasma gondii growth in human brain microvascular

endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity 69*, 10 (Oct 2001), 6527–31.

[47] Dcke, W. D., Randow, F., Syrbe, U., Krausch, D., Asadullah, K., Reinke, P., Volk, H. D., and Kox, W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by ifn-gamma treatment. *Nat Med 3*, 6 (Jun 1997), 678–681.

[48] Döcke, W.-D., Höflich, C., Davis, K. A., Röttgers, K., Meisel, C., Kiefer, P., Weber, S. U., Hedwig-Geissing, M., Kreuzfelder, E., Tschentscher, P., Nebe, T., Engel, A., Monneret, G., Spittler, A., Schmolke, K., Reinke, P., Volk, H.-D., and Kunz, D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic hla-dr expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem 51*, 12 (Dec 2005), 2341–7.

[49] Dong, J., Qiu, H., Garcia-Barrio, M., Anderson, J., and Hinnebusch, A. G. Uncharged trna activates gcn2 by displacing the protein kinase moiety from a bipartite trna-binding domain. *Mol Cell 6*, 2 (Aug 2000), 269–79.

[50] Ehrlich, P. Über eine neue harnprobe. *Charité-Annalen 8* (Dec 1883), 1–27.

[51] Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to cd200 receptor engagement. *J Immunol 173*, 6 (Sep 2004), 3748–54.

[52] Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ 9*, 10 (Oct 2002), 1069–1077.

[53] Fallarino, F., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Asselin-Paturel, C., Fioretti, M. C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *International Immunology 17*, 11 (Nov 2005), 1429–38.

[54] Finger, E. B., and Bluestone, J. A. When ligand becomes receptor–tolerance via b7 signaling on dcs. *Nat Immunol 3*, 11 (Nov 2002), 1056–7.

[55] Flohé, S., Börgermann, J., Domínguez, F. E., Majetschak, M., Lim, L., Kreuzfelder, E., Obertacke, U., Nast-Kolb, D., and Schade, F. U. Influence

of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (gm-csf) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis. *Shock 12*, 1 (Jul 1999), 17–24.

[56] Foster, A. C., and Schwarcz, R. Characterization of quinolinic acid phosphoribosyltransferase in human blood and observations in huntington's disease. *J Neurochem 45*, 1 (Jul 1985), 199–205.

[57] Foundation, N. K. K/doqi clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis 39*, 2 Suppl 1 (Feb 2002), S1–266.

[58] Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G. B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of t and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med 196*, 4 (Aug 2002), 459–68.

[59] Fujigaki, S., Saito, K., Sekikawa, K., Tone, S., Takikawa, O., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., and Seishima, M. Lipopolysaccharide induction of indoleamine 2,3-dioxygenase is mediated dominantly by an ifn-gamma-independent mechanism. *Eur J Immunol 31*, 8 (Aug 2001), 2313–2318.

[60] Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H., and Seishima, M. L-tryptophan-l-kynurenine pathway metabolism accelerated by toxoplasma gondii infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity 70*, 2 (Feb 2002), 779–86.

[61] Furset, G., Fløisand, Y., and Sioud, M. Impaired expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in monocyte-derived dendritic cells in response to toll-like receptor-7/8 ligands. *Immunology 123*, 2 (Feb 2008), 263–71.

[62] Gorelik, L., Fields, P. E., and Flavell, R. A. Cutting edge: Tgf-beta inhibits th type 2 development through inhibition of gata-3 expression. *J Immunol 165*, 9 (Nov 2000), 4773–7.

[63] Grant, R. S., Passey, R., Matanovic, G., Smythe, G., and Kapoor, V. Evidence for increased de novo synthesis of nad in immune-activated raw264.7 macrophages: a self-protective mechanism? *Arch Biochem Biophys 372*, 1 (Dec 1999), 1–7.

[64] Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Vacca, C., Orabona, C., Uyttenhove, C., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. Il-6 inhibits the tolerogenic function of cd8 alpha+ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol 167*, 2 (Jul 2001), 708–14.

[65] Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C., and Puccetti, P. Ctla-4-ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol 3*, 11 (Nov 2002), 1097–1101.

[66] Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M. L., Ayroldi, E., Nocentini, G., Boon, L., Bistoni, F., Fioretti, M. C., Romani, L., Riccardi, C., and Puccetti, P. Reverse signaling through gitr ligand enables dexamethasone to activate ido in allergy. *Nat Med 13*, 5 (May 2007), 579–86.

[67] Gupta, S. L., Carlin, J. M., Pyati, P., Dai, W., Pfefferkorn, E. R., and Murphy, M. J. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infection and Immunity 62*, 6 (Jun 1994), 2277–84.

[68] Gurtner, G. J., Newberry, R. D., Schloemann, S. R., McDonald, K. G., and Stenson, W. F. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase augments trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. *Gastroenterology 125*, 6 (Dec 2003), 1762–73.

[69] Habara-Ohkubo, A., Shirahata, T., Takikawa, O., and Yoshida, R. Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity 61*, 5 (May 1993), 1810–3.

[70] Hainz, U., Obexer, P., Winkler, C., Sedlmayr, P., Takikawa, O., Greinix, H., Lawitschka, A., Pötschger, U., Fuchs, D., Ladisch, S., and Heitger, A. Monocyte-mediated t-cell suppression and augmented monocyte tryptophan catabolism after human hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood 105*, 10 (May 2005), 4127–34.

[71] Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol 8*, 7 (Jul 2008), 533–44.

[72] Hartai, Z., Klivenyi, P., Janaky, T., Penke, B., Dux, L., and Vecsei, L. Kynurenine metabolism in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand 112*, 2 (Aug 2005), 93–6.

[73] Hauser, A. B., Stinghen, A. E. M., Kato, S., Bucharles, S., Aita, C., Yuzawa, Y., and Pecoits-Filho, R. Characteristics and causes of immune dysfunction related to uremia and dialysis. *Perit Dial Int 28 Suppl 3* (Jun 2008), S183–7.

[74] Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D. H., Carson, D. A., and Raz, E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest 114*, 2 (Jul 2004), 270–9.

[75] Hayashi, T., Mo, J.-H., Gong, X., Rossetto, C., Jang, A., Beck, L., Elliott, G. I., Kufareva, I., Abagyan, R., Broide, D. H., Lee, J., and Raz, E. 3-hydroxyanthranilic acid inhibits pdk1 activation and suppresses experimental asthma by inducing t cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA 104*, 47 (Nov 2007), 18619–24.

[76] Hayashi, T., Rao, S. P., Takabayashi, K., Uden, J. H. V., Kornbluth, R. S., Baird, S. M., Taylor, M. W., Carson, D. A., Catanzaro, A., and Raz, E. Enhancement of innate immunity against mycobacterium avium infection by immunostimulatory dna is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and Immunity 69*, 10 (Oct 2001), 6156–64.

[77] Heidecke, C. D., Weighardt, H., Hensler, T., Bartels, H., and Holzmann, B. [immune paralysis of t-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. correlation of immune function with survival]. *Chirurg 71*, 2 (Feb 2000), 159–65.

[78] Heseler, K., Spekker, K., Schmidt, S. K., Mackenzie, C. R., and Däubener, W. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of ifn-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunol Med Microbiol 52*, 2 (Mar 2008), 273–81.

[79] Heyes, M. P., Achim, C. L., Wiley, C. A., Major, E. O., Saito, K., and Markey, S. P. Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J 320 (Pt 2)* (Dec 1996), 595–7.

[80] Higuchi, K., and HAYAISHI, O. Enzymic formation of d-kynurenine from d-tryptophan. *Arch Biochem Biophys 120*, 2 (May 1967), 397–403.

[81] Hissong, B., Byrne, G., and Padilla. . . , M. Upregulation of interferon-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase in human macrophage cultures by lipopolysaccharide, muramyl tripeptide, and interleukin-1. *Cellular immunology* (Jan 1995).

[82] Hol, J. W., Klimek, M., van der Heide-Mulder, M., Stronks, D., Vincent, A. J., Klein, J., Zijlstra, F. J., and Fekkes, D. Awake craniotomy induces fewer changes in the plasma amino acid profile than craniotomy under general anesthesia. *J Neurosurg Anesthesiol 21*, 2 (Apr 2009), 98–107.

[83] Holmes, E. W., and Kahn, S. E. Tryptophan distribution and metabolism in experimental chronic renal insufficiency. *Exp Mol Pathol 46*, 1 (Feb 1987), 89–101.

[84] Hönig, A., Rieger, L., Kapp, M., Sütterlin, M., Dietl, J., and Kämmerer, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase (ido) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance. *J Reprod Immunol 61*, 2 (Apr 2004), 79–86.

[85] Hopkins, F. G., and Cole, S. W. A contribution to the chemistry of proteids: Part i. a preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J Physiol (Lond) 27*, 4-5 (Dec 1901), 418–28.

[86] Hotchkiss, R. S., and Karl, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med 348*, 2 (Jan 2003), 138–50.

[87] Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., Buchman, T. G., and Karl, I. E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Critical Care Medicine 27*, 7 (Jul 1999), 1230–51.

[88] Hotchkiss, R. S., Swanson, P. E., Freeman, B. D., Tinsley, K. W., Cobb, J. P., Matuschak, G. M., Buchman, T. G., and Karl, I. E. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med 27*, 7 (Jul 1999), 1230–1251.

[89] Huttunen, R., Syrjänen, J., Aittoniemi, J., Oja, S. S., Raitala, A., Laine, J., Pertovaara, M., Vuento, R., Huhtala, H., and Hurme, M. High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock 33*, 2 (Feb 2010), 149–54.

[90] Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., and Young, H. A. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of t cell proliferation. *J Immunol 164*, 7 (Apr 2000), 3596–9.

[91] Johnston, I. D., Dale, G., Craig, R. P., Young, G., Goode, A., and Tweedle, D. E. Plasma amino acid concentrations in surgical patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr 4*, 2 (Jan 1980), 161–4.

[92] Jung, I. D., Lee, C.-M., Jeong, Y.-I., Lee, J. S., Park, W. S., Han, J., and Park, Y.-M. Differential regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide and interferon gamma in murine bone marrow derived dendritic cells. *FEBS Lett 581*, 7 (Apr 2007), 1449–56.

[93] Jung, I. D., Lee, M.-G., Chang, J. H., Lee, J. S., Jeong, Y.-I., Lee, C.-M., Park, W. S., Han, J., Seo, S.-K., Lee, S. Y., and Park, Y.-M. Blockade of indoleamine 2,3-dioxygenase protects mice against lipopolysaccharide-induced endotoxin shock. *J Immunol 182*, 5 (Mar 2009), 3146–54.

[94] Kahler, D. J., and Mellor, A. L. T cell regulatory plasmacytoid dendritic cells expressing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Handb Exp Pharmacol*, 188 (Jan 2009), 165–96.

[95] Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M., and Sekiba, K. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta Med Okayama 45*, 3 (Jun 1991), 135–9.

[96] Khan, A. U., Delude, R. L., Han, Y. Y., Sappington, P. L., Han, X., Carcillo, J. A., and Fink, M. P. Liposomal nad(+) prevents diminished o(2) consumption by immunostimulated caco-2 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282*, 5 (May 2002), L1082–91.

[97] Klein, C., Lisowska-Grospierre, B., LeDeist, F., Fischer, A., and Griscelli, C. Major histocompatibility complex class ii deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. *J Pediatr 123*, 6 (Dec 1993), 921–8.

[98] Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., and Zimmerman, J. E. Apache ii: a severity of disease classification system. *Crit Care Med 13*, 10 (Oct 1985), 818–29.

[99] KNOX, W. E., and MEHLER, A. H. The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. i. the coupled tryptophan peroxidase-oxidase system forming formylkynurenine. *J Biol Chem 187*, 1 (Nov 1950), 419–430.

[100] Kotake, Y. Studien über den intermediären stoffwechsel des tryptophans. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie 214*, 1-2 (Jan 1933), 1–32. doi: 10.1515/bchm2.1933.214.1-2.1.

[101] Kreymann, G., Grosser, S., Buggisch, P., Gottschall, C., Matthaei, S., and Greten, H. Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. *Critical Care Medicine 21*, 7 (Jul 1993), 1012–9.

[102] Kudo, Y., Boyd, C. A. R., Spyropoulou, I., Redman, C. W. G., Takikawa, O., Katsuki, T., Hara, T., Ohama, K., and Sargent, I. L. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol 61*, 2 (Apr 2004), 87–98.

[103] Lamping, N., Dettmer, R., Schröder, N. W., Pfeil, D., Hallatschek, W., Burger, R., and Schumann, R. R. Lps-binding protein protects mice from septic shock caused by lps or gram-negative bacteria. *J Clin Invest 101*, 10 (May 1998), 2065–71.

[104] Landry, D. W., and Oliver, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med 345*, 8 (Aug 2001), 588–95.

[105] Laurence, J. M., Wang, C., Park, E. T., Buchanan, A., Clouston, A., Allen, R. D. M., Mccaughan, G. W., Bishop, G. A., and Sharland, A. F. Blocking indoleamine dioxygenase activity early after rat liver transplantation prevents long-term survival but does not cause acute rejection. *Transplantation 85*, 9 (May 2008), 1357–61.

[106] Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H., and Mellor, A. L. Tryptophan deprivation sensitizes activated t cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology 107*, 4 (Dec 2002), 452–60.

[107] Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J.-L., Ramsay, G., and Conference, I. S. D. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive Care Med 29*, 4 (Apr 2003), 530–8.

[108] Li, M. O., and Flavell, R. A. Tgf-beta: a master of all t cell trades. *Cell 134*, 3 (Aug 2008), 392–404.

[109] Lin, Y. C., Goto, S., Tateno, C., Nakano, T., Cheng, Y. F., Jawan, B., Kao, Y. H., Hsu, L. W., Lai, C. Y., Yoshizato, K., and Chen, C. L. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in livers following hepatectomy prolongs survival of allogeneic hepatocytes after transplantation. *Transplant Proc 40*, 8 (Oct 2008), 2706–8.

[110] Liu, H., Liu, L., Fletcher, B. S., and Visner, G. A. Sleeping beauty-based gene therapy with indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits lung allograft fibrosis. *FASEB J 20*, 13 (Nov 2006), 2384–6.

[111] Lob, S., Konigsrainer, A., Schafer, R., Rammensee, H.-G., Opelz, G., and Terness, P. Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the ido activity of human dendritic cells. *Blood 111*, 4 (Feb 2008), 2152–4.

[112] Löb, S., Königsrainer, A., Zieker, D., Brücher, B. L. D. M., Rammensee, H.-G., Opelz, G., and Terness, P. Ido1 and ido2 are expressed in human tumors: levo- but not dextro-1-methyl tryptophan inhibits tryptophan catabolism. *Cancer Immunol Immunother 58*, 1 (Jan 2009), 153–7.

[113] Lögters, T. T., Laryea, M. D., Altrichter, J., Sokolowski, J., Cinatl, J., Reipen, J., Linhart, W., Windolf, J., Scholz, M., and Wild, M. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock 32*, 1 (Jul 2009), 29–34.

[114] MacKenzie, C. R., Hadding, U., and Däubener, W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group b streptococci. *J Infect Dis 178*, 3 (Sep 1998), 875–8.

[115] MacKenzie, C. R., Heseler, K., Müller, A., and Däubener, W. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antimicrobial defence and immuno-regulation: tryptophan depletion versus production of toxic kynurenines. *Curr Drug Metab 8*, 3 (Apr 2007), 237–44.

[116] MacKenzie, C. R., Hucke, C., Müller, D., Seidel, K., Takikawa, O., and Däubener, W. Growth inhibition of multiresistant enterococci by interferon-gamma-activated human uro-epithelial cells. *J Med Microbiol 48*, 10 (Oct 1999), 935–41.

[117] Manlapat, A. K., Kahler, D. J., Chandler, P. R., Munn, D. H., and Mellor, A. L. Cell-autonomous control of interferon type i expression by indoleamine 2,3-dioxygenase in regulatory cd19+ dendritic cells. *Eur. J. Immunol. 37*, 4 (Apr 2007), 1064–71.

[118] Marie, J. C., Liggitt, D., and Rudensky, A. Y. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the t cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity 25*, 3 (Sep 2006), 441–54.

[119] Marteau, F., Gonzalez, N. S., Communi, D., Goldman, M., Boeynaems, J.-M., and Communi, D. Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular atp in human dendritic cells. *Blood 106*, 12 (Dec 2005), 3860–6.

[120] MEDAWAR, P. B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol 29*, 1 (Feb 1948), 58–69.

[121] MEHLER, A. H., and KNOX, W. E. The conversion of tryptophan to kynurenine in liver. ii. the enzymatic hydrolysis of formylkynurenine. *J Biol Chem 187*, 1 (Nov 1950), 431–438.

[122] MEHLER, A. H., McDANIEL, E. G., and HUNDLEY, J. M. Changes in the enzymatic composition of liver. ii. influence of hormones on picolinic carboxylase and tryptophan peroxidase. *J Biol Chem 232*, 1 (May 1958), 331–5.

[123] Meisel, C., Schefold, J. C., Pschowski, R., Baumann, T., Hetzger, K., Gregor, J., Weber-Carstens, S., Hasper, D., Keh, D., Zuckermann, H., Reinke, P., and Volk, H.-D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: A double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 180*, 7 (Oct 2009), 640–648.

[124] Meisner, M., Tschaikowsky, K., Hutzler, A., Schick, C., and Schüttler, J. Postoperative plasma concentrations of procalcitonin after different types of surgery. *Intensive care medicine 24*, 7 (Jul 1998), 680–4.

[125] Mellor, A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of t cell immunity. *Biochem Biophys Res Commun 338*, 1 (Dec 2005), 20–4.

[126] Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P., Marshall, B., Jhaver, K., Hansen, A., Koni, P. A., Iwashima, M., and Munn, D. H. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses t cell clonal expansion. *J Immunol 171*, 4 (Aug 2003), 1652–5.

[127] Mellor, A. L., Baban, B., Chandler, P. R., Manlapat, A., Kahler, D. J., and Munn, D. H. Cutting edge: Cpg oligonucleotides induce splenic cd19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent t cell regulatory functions via ifn type 1 signaling. *J Immunol 175*, 9 (Nov 2005), 5601–5.

[128] Mellor, A. L., Chandler, P., Baban, B., Hansen, A. M., Marshall, B., Pihkala, J., Waldmann, H., Cobbold, S., Adams, E., and Munn, D. H. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent t cell regulatory functions following ctla4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *International Immunology 16*, 10 (Oct 2004), 1391–401.

[129] Mezrich, J. D., Fechner, J. H., Zhang, X., Johnson, B. P., Burlingham, W. J., and Bradfield, C. A. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory t cells. *J Immunol 185*, 6 (Sep 2010), 3190–8.

[130] Moffett, J. R., Blinder, K. L., Venkateshan, C. N., and Namboodiri, M. A. Differential effects of kynurenine and tryptophan treatment on quinolinate immunoreactivity in rat lymphoid and non-lymphoid organs. *Cell Tissue Res 293*, 3 (Sep 1998), 525–34.

[131] Moffett, J. R., Espey, M. G., and Namboodiri, M. A. Antibodies to quinolinic acid and the determination of its cellular distribution within the rat immune system. *Cell Tissue Res 278*, 3 (Dec 1994), 461–9.

[132] Moffett, J. R., and Namboodiri, M. A. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol 81*, 4 (Aug 2003), 247–65.

[133] Monneret, G., Lepape, A., Voirin, N., Bohé, J., Venet, F., Debard, A.-L., Thizy, H., Bienvenu, J., Gueyffier, F., and Vanhems, P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-dr expression predicts mortality in septic shock. *Intensive care medicine 32*, 8 (Aug 2006), 1175–83.

[134] Morrison, D. C., and Ulevitch, R. J. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. a review. *Am J Pathol 93*, 2 (Nov 1978), 526–618.

[135] Müller, A., Heseler, K., Schmidt, S. K., Spekker, K., Mackenzie, C. R., and Däubener, W. The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med 13*, 6 (Jun 2009), 1125–35.

[136] Munn, D. H., and Mellor, A. L. Ido and tolerance to tumors. *Trends Mol Med 10*, 1 (Jan 2004), 15–8.

[137] Munn, D. H., Pressey, J., Beall, A. C., Hudes, R., and Alderson, M. R. Selective activation-induced apoptosis of peripheral t cells imposed by macrophages. a

potential mechanism of antigen-specific peripheral lymphocyte deletion. *J Immunol 156*, 2 (Jan 1996), 523–32.

[138] Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L. Inhibition of t cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med 189*, 9 (May 1999), 1363–72.

[139] Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., and Mellor, A. L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science 297*, 5588 (Sep 2002), 1867–70.

[140] Munn, D. H., Sharma, M. D., and Mellor, A. L. Ligation of b7-1/b7-2 by human cd4+ t cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol 172*, 7 (Apr 2004), 4100–10.

[141] Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A. L. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science 281*, 5380 (Aug 1998), 1191–3.

[142] Nakamura, T., Shinno, H., and Ichihara, A. Insulin and glucagon as a new regulator system for tryptophan oxygenase activity demonstrated in primary cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem 255*, 16 (Aug 1980), 7533–5.

[143] Nierhaus, A., Montag, B., Timmler, N., Frings, D. P., Gutensohn, K., Jung, R., Schneider, C. G., Pothmann, W., Brassel, A. K., and Esch, J. S. A. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive care medicine 29*, 4 (Apr 2003), 646–51.

[144] Noble, J. S., MacKirdy, F. N., Donaldson, S. I., and Howie, J. C. Renal and respiratory failure in scottish icus. *Anaesthesia 56*, 2 (Feb 2001), 124–9.

[145] Nunn, J. F., Sharer, N. M., Bottiglieri, T., and Rossiter, J. Effect of short-term administration of nitrous oxide on plasma concentrations of methionine, tryptophan, phenylalanine and s-adenosyl methionine in man. *Br J Anaesth 58*, 1 (Jan 1986), 1–10.

[146] Oberdörfer, C., Adams, O., Mackenzie, C. R., Groot, C. J. A. D., and Däubener, W. Role of ido activation in anti-microbial defense in human native astrocytes. *Adv Exp Med Biol 527* (Jan 2003), 15–26.

[147] Obojes, K., Andres, O., Kim, K. S., Däubener, W., and Schneider-Schaulies, J. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol 79*, 12 (Jun 2005), 7768–76.

[148] Orozco, H., Arch, J., Medina-Franco, H., Pantoja, J. P., González, Q. H., Vilatoba, M., Hinojosa, C., Vargas-Vorackova, F., and Sifuentes-Osornio, J. Molgramostim (gm-csf) associated with antibiotic treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg 141*, 2 (Feb 2006), 150–3; discussion 154.

[149] Pallotta, M. T., Orabona, C., Volpi, C., Vacca, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Servillo, G., Brunacci, C., Calvitti, M., Bicciato, S., Mazza, E. M. C., Boon, L., Grassi, F., Fioretti, M. C., Fallarino, F., Puccetti, P., and Grohmann, U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol 12*, 9 (Sep 2011), 870–8.

[150] Parry-Billings, M., Baigrie, R., Lamont, P., Morris, P., and Newsholme, E. Effects of major and minor surgery on plasma glutamine and cytokine levels. *Arch Surg 127*, 10 (Oct 1992), 1237–1240. 10.1001/archsurg.1992.01420100099017.

[151] Pawlak, D., Pawlak, K., Malyszko, J., Mysliwiec, M., and Buczko, W. Accumulation of toxic products degradation of kynurenine in hemodialyzed patients. *International urology and nephrology 33*, 2 (Jan 2001), 399–404.

[152] Pawlak, D., Tankiewicz, A., Matys, T., and Buczko, W. Peripheral distribution of kynurenine metabolites and activity of kynurenine pathway enzymes in renal failure. *J Physiol Pharmacol 54*, 2 (Jun 2003), 175–89.

[153] Pellegrin, K., Neurauter, G., Wirleitner, B., Fleming, A. W., Peterson, V. M., and Fuchs, D. Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma. *Shock 23*, 3 (Mar 2005), 209–15.

[154] Penberthy, W. T. Pharmacological targeting of ido-mediated tolerance for treating autoimmune disease. *Curr Drug Metab 8*, 3 (Apr 2007), 245–66.

[155] Pfefferkorn, E. R. Interferon gamma blocks the growth of toxoplasma gondii in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA 81*, 3 (Feb 1984), 908–12.

[156] Pfefferkorn, E. R., Eckel, M., and Rebhun, S. Interferon-gamma suppresses the growth of toxoplasma gondii in human fibroblasts through starvation for tryptophan. *Mol Biochem Parasitol 20*, 3 (Sep 1986), 215–24.

[157] Pfefferkorn, E. R., Rebhun, S., and Eckel, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res 6*, 3 (Jun 1986), 267–79.

[158] Pinsky, M., Vincent, J., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R., and Dupont, E. Serum cytokine levels in human septic shock. relation to multiple- system organ failure and mortality. *Chest 103*, 2 (Feb 1993), 565–575.

[159] Platanias, L. C. Mechanisms of type-i- and type-ii-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol 5*, 5 (May 2005), 375–86.

[160] Platten, M., Ho, P. P., Youssef, S., Fontoura, P., Garren, H., Hur, E. M., Gupta, R., Lee, L. Y., Kidd, B. A., Robinson, W. H., Sobel, R. A., Selley, M. L., and Steinman, L. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science 310*, 5749 (Nov 2005), 850–5.

[161] Presneill, J. J., Harris, T., Stewart, A. G., Cade, J. F., and Wilson, J. W. A randomized phase ii trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 166*, 2 (Jul 2002), 138–43.

[162] Puccetti, P., and Grohmann, U. Ido and regulatory t cells: a role for reverse signalling and non-canonical nf-kappab activation. *Nat Rev Immunol 7*, 10 (Oct 2007), 817–23.

[163] Reddy, P., Sun, Y., Toubai, T., Duran-Struuck, R., Clouthier, S. G., Weisiger, E., Maeda, Y., Tawara, I., Krijanovski, O., Gatza, E., Liu, C., Malter, C., Mascagni, P., Dinarello, C. A., and Ferrara, J. L. M. Histone deacetylase inhibition modulates indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent dc functions and regulates experimental graft-versus-host disease in mice. *J Clin Invest 118*, 7 (Jul 2008), 2562–73.

[164] Reinhart, K., Brunkhorst, F., Bone, H., Gerlach, H., Gründling, M., Kreymann, G., Kujath, P., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stüber,

F., Weiler, N., Welte, T., Werdan, K., and e.V, D. S.-G. [diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the german sepsis society inc. and the german interdisciplinary society for intensive and emergency medicine]. *Anaesthesist 55 Suppl 1* (Jun 2006), 43–56.

[165] Reinhart, K., Brunkhorst, F. M., Bone, H.-G., Gerlach, H., Gründling, M., Kreymann, G., Kujath, P., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Stüber, F., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Weiler, N., Welte, T., and Werdan, K. [diagnosis and therapy of sepsis]. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society 95*, 8 (Aug 2006), 429–54.

[166] Rensing, H. [endotoxins. pathogenetic meaning of sepsis]. *Anaesthesist 52 Suppl 1* (Dec 2003), S7–S13.

[167] Riedemann, N. C., Guo, R.-F., and Ward, P. A. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med 9*, 5 (May 2003), 517–24.

[168] Robinson, C. M., Hale, P. T., and Carlin, J. M. The role of ifn-gamma and tnf-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res 25*, 1 (Jan 2005), 20–30.

[169] Robinson, C. M., Shirey, K. A., and Carlin, J. M. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by ifn-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res 23*, 8 (Aug 2003), 413–21.

[170] Roshick, C., Wood, H., Caldwell, H. D., and McClarty, G. Comparison of gamma interferon-mediated antichlamydial defense mechanisms in human and mouse cells. *Infection and Immunity 74*, 1 (Jan 2006), 225–38.

[171] Rottenberg, M. E., Rothfuchs, A. G., Gigliotti, D., Ceausu, M., Une, C., Levitsky, V., and Wigzell, H. Regulation and role of ifn-gamma in the innate resistance to infection with chlamydia pneumoniae. *J Immunol 164*, 9 (May 2000), 4812–8.

[172] Sáenz, J. J., Izura, J. J., Manrique, A., Sala, F., and Gaminde, I. Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive care medicine 27*, 6 (Jun 2001), 970–7.

[173] Saito, K., Crowley, J. S., Markey, S. P., and Heyes, M. P. A mechanism for increased quinolinic acid formation following acute systemic immune stimulation. *J Biol Chem 268*, 21 (Jul 1993), 15496–503.

[174] Saito, K., Fujigaki, S., Heyes, M. P., Shibata, K., Takemura, M., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., and Seishima, M. Mechanism of increases in l-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficiency. *Am J Physiol Renal Physiol 279*, 3 (Sep 2000), F565–72.

[175] Saito, K., Nagamura, Y., Ohta, Y., Sasaki, E., and Ishiguro, I. Characterization of the l-tryptophan transport system in the liver of growing rats. *Life Sci 49*, 7 (Jan 1991), 527–34.

[176] Sakurai, K., Zou, J.-P., Tschetter, J. R., Ward, J. M., and Shearer, G. M. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol 129*, 1-2 (Aug 2002), 186–96.

[177] Schefold, J. C., Haehling, S. V., Corsepius, M., Pohle, C., Kruschke, P., Zuckermann, H., Volk, H.-D., and Reinke, P. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock 28*, 4 (Oct 2007), 418–25.

[178] Schefold, J. C., Zeden, J.-P., Fotopoulou, C., Haehling, S. V., Pschowski, R., Hasper, D., Volk, H.-D., Schuett, C., and Reinke, P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (ido) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant 24*, 6 (Jun 2009), 1901–8.

[179] SCHIMKE, R. T., SWEENEY, E. W., and BERLIN, C. M. The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase. *J Biol Chem 240* (Jan 1965), 322–31.

[180] Schoenberg, M. H., Weiss, M., and Radermacher, P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after icu treatment. *Langenbecks Arch Surg 383*, 1 (Mar 1998), 44–8.

[181] Schottmüller, H. Wesen und behandlung der sepsis. *Innere Medizin 31* (1914), 257–280.

[182] Schrier, R. W., and Wang, W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med 351*, 2 (Jul 2004), 159–69.

[183] Schroten, H., Spors, B., Hucke, C., Stins, M., Kim, K. S., Adam, R., and Däubener, W. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of staphylococcus aureus by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics 32*, 4 (Aug 2001), 206–10.

[184] Schutz, G., Beato, M., and Feigelson, P. Messenger rna for hepatic tryptophan oxygenase: its partial purification, its translation in a heterologous cell-free system, and its control by glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA 70*, 4 (Apr 1973), 1218–21.

[185] Schwarz. Immunsystem im therapeutische visier. *Neurotransmitter* (Sep 2009), 1–4.

[186] Seo, S. K., Choi, J. H., Kim, Y. H., Kang, W. J., Park, H. Y., Suh, J. H., Choi, B. K., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. 4-1bb-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med 10*, 10 (Oct 2004), 1088–94.

[187] Shimizu, T., Nomiyama, S., Hirata, F., and Hayaishi, O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. purification and some properties. *J Biol Chem 253*, 13 (Jul 1978), 4700–4706.

[188] Sibley, L. D., Messina, M., and Niesman, I. R. Stable dna transformation in the obligate intracellular parasite toxoplasma gondii by complementation of tryptophan auxotrophy. *Proc Natl Acad Sci USA 91*, 12 (Jun 1994), 5508–12.

[189] Silva, N. M., Rodrigues, C. V., Santoro, M. M., Reis, L. F. L., Alvarez-Leite, J. I., and Gazzinelli, R. T. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with toxoplasma gondii: induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1. *Infection and Immunity 70*, 2 (Feb 2002), 859–68.

[190] Smith, S. A., and Pogson, C. I. The metabolism of l-tryptophan by isolated rat liver cells. effect of albumin binding and amino acid competition on oxidatin of tryptophan by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem J 186*, 3 (Mar 1980), 977–86.

[191] Sotero-Esteva, W. D., Wolfe, D., Ferris, M., and Taylor, M. W. An indoleamine 2,3-dioxygenase-negative mutant is defective in stat1 dna binding: differential response to ifn-gamma and ifn-alpha. *J Interferon Cytokine Res 20*, 7 (Jul 2000), 623–32.

[192] Spano, P. F., Szyszka, K., Galli, C. L., and Ricci, A. Effect of clofibrate on free and total tryptophan in serum and brain tryptophan metabolism. *Pharmacol Res Commun 6*, 2 (Apr 1974), 163–73.

[193] Steckel, N. K., Kuhn, U., Beelen, D. W., and Elmaagacli, A. H. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation and in pregnant women: association with the induction of allogeneic immune tolerance? *Scand J Immunol 57*, 2 (Feb 2003), 185–91.

[194] Stone, T. W. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev 45*, 3 (Sep 1993), 309–79.

[195] Streilein, J. W. Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol 5*, 3 (Jun 1993), 428–32.

[196] Suffredini, A. F., Fromm, R. E., Parker, M. M., Brenner, M., Kovacs, J. A., Wesley, R. A., and Parrillo, J. E. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med 321*, 5 (Aug 1989), 280–7.

[197] Sugimoto, H., ichiro Oda, S., Otsuki, T., Hino, T., Yoshida, T., and Shiro, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase: catalytic mechanism of o2 incorporation by a heme-containing dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA 103*, 8 (Feb 2006), 2611–6.

[198] Suzuki, T., Yokouchi, K., Kawamichi, H., Yamamoto, Y., Uda, K., and Yuasa, H. J. Comparison of the sequences of turbo and sulculus indoleamine dioxygenase-like myoglobin genes. *Gene 308* (Apr 2003), 89–94.

[199] Swanson, K. A., Zheng, Y., Heidler, K. M., Mizobuchi, T., and Wilkes, D. S. Cdllc+ cells modulate pulmonary immune responses by production of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Am J Respir Cell Mol Biol 30*, 3 (Mar 2004), 311–8.

[200] Tagliamonte, A., Biggio, G., Vargiu, L., and Gessa, G. L. Increase of brain tryptophan and stimulation of serotonin synthesis by salicylate. *J Neurochem 20*, 3 (Mar 1973), 909–12.

[201] Takikawa, O., Littlejohn, T. K., and Truscott, R. J. Indoleamine 2,3-dioxygenase in the human lens, the first enzyme in the synthesis of uv filters. *Exp Eye Res 72*, 3 (Mar 2001), 271–7.

[202] Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R., and Hayaishi, O. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem 261*, 8 (Mar 1986), 3648–53.

[203] Tapper, H., and Herwald, H. Modulation of hemostatic mechanisms in bacterial infectious diseases. *Blood 96*, 7 (Oct 2000), 2329–37.

[204] Tattevin, P., Monnier, D., Tribut, O., Dulong, J., Bescher, N., Mourcin, F., Uhel, F., Tulzo, Y. L., and Tarte, K. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J Infect Dis 201*, 6 (Mar 2010), 956–66.

[205] Taylor, M. W., and Feng, G. S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J 5*, 11 (Aug 1991), 2516–22.

[206] Terajima, M., and Leporati, A. M. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in antiviral activity of interferon-gamma against vaccinia virus. *Viral Immunol 18*, 4 (Jan 2005), 722–9.

[207] Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. Inhibition of allogeneic t cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med 196*, 4 (Aug 2002), 447–57.

[208] Thomas, S. R., and Stocker, R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep 4*, 5 (Jan 1999), 199–220.

[209] Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., Zentella, A., and Albert, J. D. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science 234*, 4775 (Oct 1986), 470–4.

[210] Tsai, P. J., Wu, W. H., and Huang, P. C. Circadian variations in plasma neutral and basic amino acid concentrations in young men on an ordinary taiwanese diet. *J Formos Med Assoc 99*, 2 (Feb 2000), 151–7.

[211] Uyttenhove, C., Pilotte, L., Théate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Eynde, B. J. V. D. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med 9*, 10 (Oct 2003), 1269–74.

[212] Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., Mendonça, A. D., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M., and Thijs, L. G. The sofa (sepsis-related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure. on behalf of the working group on sepsis-related problems of the european society of intensive care medicine. *Intensive Care Med 22*, 7 (Jul 1996), 707–10.

[213] Volk, H. D., Reinke, P., and Döcke, W. D. Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol 74* (Jan 2000), 162–77.

[214] von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M. L., Hanau, D., de la Salle, H., and Bieber, T. Fcepsilonri induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating t cell responses. *J Immunol 169*, 4 (Aug 2002), 1810–6.

[215] Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., and Ling, L. Kynurenic acid as a ligand for orphan g protein-coupled receptor gpr35. *J Biol Chem 281*, 31 (Aug 2006), 22021–8.

[216] Wang, Y., Liu, H., McKenzie, G., Witting, P. K., Stasch, J.-P., Hahn, M., Changsirivathanathamrong, D., Wu, B. J., Ball, H. J., Thomas, S. R., Kapoor, V., Celermajer, D. S., Mellor, A. L., Keaney, J. F., Hunt, N. H., and Stocker, R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med 16*, 3 (Mar 2010), 279–85.

[217] Werner, E. R., and Werner-Felmayer, G. Substrate and cofactor requirements of indoleamine 2,3-dioxygenase in interferon-gamma-treated cells: utilization of oxygen rather than superoxide. *Curr Drug Metab 8*, 3 (Apr 2007), 201–3.

[218] Wheeler, A. P., and Bernard, G. R. Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med 340*, 3 (Jan 1999), 207–14.

[219] Widner, B., Werner, E. R., Schennach, H., Wachter, H., and Fuchs, D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by hplc. *Clin Chem 43*, 12 (Dec 1997), 2424–6.

[220] Wingender, G., Garbi, N., Schumak, B., Jüngerkes, F., Endl, E., von Bubnoff, D., Steitz, J., Striegler, J., Moldenhauer, G., Tüting, T., Heit, A., Huster, K. M., Takikawa, O., Akira, S., Busch, D. H., Wagner, H., Hämmerling, G. J., Knolle, P. A., and Limmer, A. Systemic application of cpg-rich dna suppresses adaptive t cell immunity via induction of ido. *Eur. J. Immunol. 36*, 1 (Jan 2006), 12–20.

[221] Wolk, K., Döcke, W., Baehr, V. V., Volk, H., and Sabat, R. Comparison of monocyte functions after lps- or il-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology 67*, 5-6 (Jan 1999), 253–6.

[222] Wolk, K., Döcke, W. D., von Baehr, V., Volk, H. D., and Sabat, R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood 96*, 1 (Jul 2000), 218–23.

[223] Woltmann, A., Hamann, L., Ulmer, A. J., Gerdes, J., Bruch, H. P., and Rietschel, E. T. Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg 383*, 1 (Mar 1998), 2–10.

[224] Yasui, H., Takai, K., Yoshida, R., and Hayaishi, O. Interferon enhances tryptophan metabolism by inducing pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase: its possible occurrence in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A 83*, 17 (Sep 1986), 6622–6626.

[225] Yoshida, R., and Hayaishi, O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA 75*, 8 (Aug 1978), 3998–4000.

Danksagung

Allen voran möchte ich Frau Professorin Dr. Christine Schütt für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Integration in die Arbeitsgruppe sehr herzlich danken. Die ausgesprochen konstruktive Kritik und die diskussionsfreudige Atmosphäre in den Gruppenbesprechungen haben dazu beigetragen, einen fundierten Einblick in wissenschaftliches Arbeiten und in die Grundlagen und Anforderungen der Forschungstätigkeit zu bekommen. Ihr stetiges Interesse am Fortgang der Forschungsarbeit und die vielfältige Unterstützung haben sehr zu dem Gelingen beigetragen. Dabei hat Frau Professorin Schütt mir die Freiheit gelassen, selbständig Ideen zu entwickeln und Fragestellungen zu behandeln. Herzlichen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen.

Ebenfalls sehr herzlich möchte ich mich bei Frau Professorin Dr. Barbara Bröker als Leiterin des Graduiertenkollegs 8401 für die Aufnahme in das Kolleg und die finanzielle Förderung meiner Arbeit, sowie darüber hinaus für die engagierte Ausgestaltung des wissenschaftlichen Austausch- und Bildungsprogramms, wie dem Journal Club und anderen interdisziplinären Veranstaltungen des Graduiertenkollegs bedanken. Danken möchte ich ihr sehr für die Übernahme der fakultäts- und institutsinternen Vertretung dieser Dissertation, wodurch der Abschluß meiner Promotion erst möglich wurde.

Ebenso bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Immunologie für die professionelle Einführung in die Labormethoden, sowie insbesondere bei Herrn Dr. Uwe Grunwald für die Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen im Rahmen der Studie.

Bei dem externen Gutachter bzw. der externen Gutachterin bedanke ich mich für die Übernahme der Begutachtung dieser Dissertation und für die dafür aufgewendete Zeit.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. Grazyna Domanska für ihre engagierte Unterstützung, viele wichtige Anregungen, ihre tatkräftige Hilfe und Gesprächsbereitschaft. Außerdem danke ich ihr für die konstruktive Kritik bei der Anfertigung der Dissertationsschrift.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Gerhard Fusch und auch bei Frau Dr. Cornelia Müller für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Etablierung und Durchführung der Massenspektrometrie sowie für den Zugang zur Messapparatur.

Bei Herrn PD Dr. Jörg Schefold bedanke ich mich für die überaus fruchtbare und inspirierende Kooperation.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Mathias Gründling und Frau Dr. Alexandra Busemann, geb. Westerholt für die wertvolle Hilfe bei Konzeption und Durchführung der klinischen Studie an intensivtherapierten Patienten sowie für die Hilfe bei der Acquise der klinischen Daten bei Schwester Liane Guderian.

Besonders möchte ich meiner Familie danken, die mich stets mit Liebe und Motivation getragen hat.

Meiner lieben Ehefrau Marike danke ich von ganzem Herzen. Sie hat durch ihre Liebe, Geduld, Motivation und ihre unermüdliche und beharrliche Korrekturarbeit die Vollendung der Promotionsschrift mit herbeigeführt.

Jan-Philip Zeden

September 2013

A. Anhang

Abstracts

Nguyen NT, Zeden J-P, Kiank C, Westerholt A, Haas JP, Schütt C. *2004.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an executioner enzyme of LPS tolerance. 1st International Alfried Krupp Kolleg-Symposium on Stress, Behavior and Immune Response, Greifswald.

Kiank C, Zeden J-P, Nguyen TN, Westerholt A, Wilke C, Mller CE, Schütt C. *2004* Chronic psychological stress in mice. II: Activation of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). 1st International Alfried Krupp Kolleg-Symposium on Stress, Behavior and Immune Response, Greifswald.

Zeden J-P, Nguyen NT, Kiank C, Otten W, Westerholt A, Fusch G, Fürll B, Schütt C. *2004.* Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediates a link between behavior and immune functions. 1st International Alfried Krupp Kolleg-Symposium on Stress, Behavior and Immune Response, Greifswald.

Publikationen

Zeden J.-P., Fusch G., Holtfreter B., Schefold J.C.,Reinke P., Domanska G., Haas J.P. Gruendling M., Westerholt A. und **Schuett C.** Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care 38, 2* (Mar 2010), 307-16.

Eigenleistung: Konzeption, Durchführung und Auswertung der Studie (in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. M. Gründling und Frau Dr. med. A. Busemann), Massenspektrometrie, Konzeption und Verfassen der Publikation (in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. C. Schütt), die Statistiken wurden in Kooperation mit Frau Dr. B. Holtfreter durchgeführt.

Anaesth Intensive Care 2010; **38:** 307-316

Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients

J.-P. ZEDEN*, G. FUSCH†, B. HOLTFRETER‡, J. C. SCHEFOLD§, P. REINKE**, G. DOMANSKA††, J.-P. HAAS‡‡, M. GRUENDLING§§, A. WESTERHOLT***, C. SCHUETT†††

Department of Immunology, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, Greifswald, Germany

SUMMARY

It has recently been shown that an increased plasma level of the tryptophan catabolite kynurenine is an early indicator for the development of sepsis in major trauma patients. We examined the predictive value of kynurenine pathway activity for ongoing sepsis in patients being admitted to a surgical intensive care unit for different reasons. In addition, we asked whether an accumulation of kynurenines in patients' plasma depends on reduced renal clearance. We conducted a prospective observational study including 100 consecutive patients and monitored laboratory variables, physiological and adverse events, sepsis and outcome. Using tandem mass spectrometry, we quantified the five indoleamines tryptophan, serotonin (5-HT), kynurenine, quinolinic acid and kynurenic acid at baseline and twice a week during the intensive care unit stay. Among the patients enrolled, 50 did not develop sepsis in the intensive care unit (non-septic), 18 patients did not have sepsis at baseline but developed sepsis later on (pre-septic) and 32 patients already fulfilled the criteria of severe sepsis and septic shock at baseline (septic). In general, non-septic critically ill patients showed activation of the kynurenine pathway, but septic shock coincided with an exacerbation of kynurenine pathway activity even in the absence of renal failure. Importantly, plasma concentrations of quinolinic acid (area under the curve 0.832 [95% confidence interval 0.710 to 0.954]) and the Quin/Trp ratio (area under the curve 0.835 [95% confidence interval; 0.719 to 0.952]) showed the best discrimination between non-septic and pre-septic patients at baseline. These findings open new avenues for further investigations on the pathophysiology of sepsis.

Key Words: intensive care unit, kynurenine, quinolinic acid, indoleamine 2,3-dioxygenase, immunosuppression, infection

Of the dietary tryptophan (Trp) that is not used for protein biosynthesis, the majority is catabolised along the quinolinic branch of the kynurenine (Kyn) pathway to provide NAD^+ (Figure 1). The amino acid Trp is the sole source of substrate for de novo NAD^+ synthesis[1-3]. Two enzymes are able to catalyse the initial, rate-limiting step of Trp catabolism: indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2,3-dioxgenase (TDO). Previous in vitro and animal studies on macrophages or dendritic cells showed that bacterial products, such as the toll-like receptors ligands lipopolysaccaride or bacterial DNA[4,5], proinflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor and interferon[1,6], or glucocorticoids[7] induce the upregulation of IDO[8]. In contrast, TDO, a house-keeping gene of hepatocytes, is not inducible by bacterial products or cytokines. Downstream of IDO or TDO, other kynurenine pathway enzymes[2,9] promote the formation of various Trp catabolites, collectively known as kynurenines, e.g. kynurenine, quinolinic acid (Quin) or kynurenic acid (Kyna). In addition to Trp shortage, these Trp catabolites were identified as dampening proinflammatory immune responses[7, 10-13]. T cells undergo cell cycle arrest when deprived of Trp, and become more sensitive to signals inducing apoptosis[14-16]. Additionally, several Kyns have pro-apoptotic functions themselves. They preferentially act on T helper 1 cells, thereby effectively reducing inflammation[15]. Recently, Kyna has been identified as blocking the LPS-inducible

* M.D., Resident Physician.
† Ph.D., Biochemist, Department of Pediatrics, University Hospital Greifswald.
‡ Ph.D., Mathematician, Department of Mathematics, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald.
§ M.D., Nephrologist, Department of Nephrology and Intensive Care Medicine, Charité University Medicine CVK, Berlin.
** M.D., Professor, Department of Nephrology and Intensive Care Medicine, Charité University Medicine CVK, Berlin.
†† M.Sc., Biochemist.
‡‡ M.D., Professor, Department of Pediatrics, University Hospital Greifswald.
§§ M.D., Anaesthetist, Department of Anesthesiology and Intensive Care, University Hospital Greifswald
***M.D., Surgeon, Department of Surgery, University Hospital Greifswald.
†††M.D., Professor, Department of Immunology, University Hospital Greifswald.

Address for correspondence: Professor C. Schuett, Department of Immunology, University Hospital Greifswald, Neubau P-Sauerbruchstrasse, 17485 Greifswald, Germany.

Accepted for publication on October 5, 2009.

TNF production of human monocytes in vitro[17]. Last but not least, IDO+ plasmacytoid dendritic cells create a suppressive microenvironment via activation of peripheral regulatory T cells[11,18]. In addition, the depletion of Trp is known to reduce the pool of molecular precursors for serotonin (5-HT) synthesis, leading to depression-like features[19]. Thus, excessive systemic kynurenine pathway activity might contribute to post-inflammatory immunodeficiency and increase the risk of infections. Recently, Lögters et al showed that Trp shortage and increased Kyn plasma levels predict the development of sepsis in major trauma patients[20].

Here we evaluated whether the quinolinic branch and/or the transamination side branch of the kynurenine pathway of Trp catabolism (leading to Quin or Kyna, respectively; Figure 1), become activated in severely ill patients who develop sepsis, and whether the increase of circulating Kyns results from impaired renal function.

MATERIAL AND METHODS

Patients

1. Prospective observational study

One hundred unselected consecutive patients who were admitted for different reasons to the surgical intensive care unit (ICU) of the university hospital of Greifswald, Germany, were enrolled. Inclusion criteria included informed consent for participation and age less than 18 years. The exclusion criteria were pregnancy, immunosuppression from cytotoxic therapy, high-dosage steroid therapy, participation in another trial, or moribund state. Patients or their

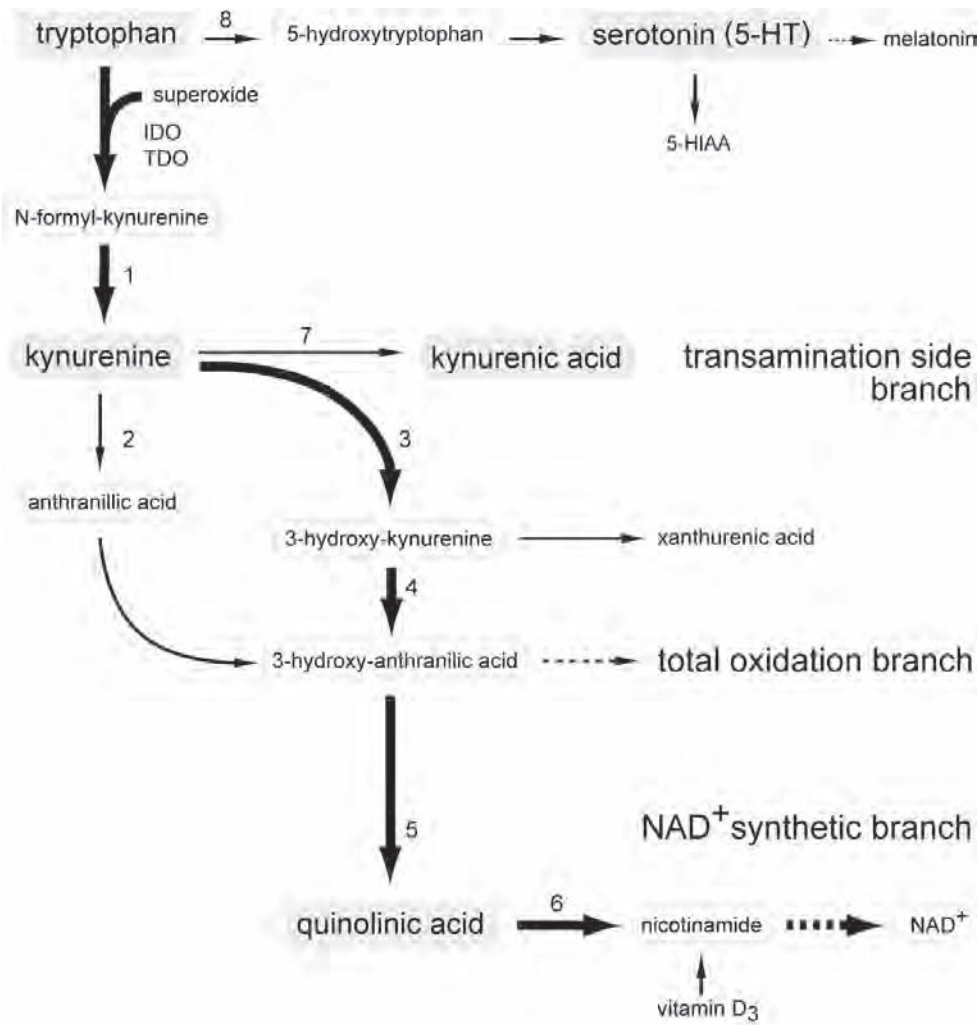

FIGURE 1: Major pathways of tryptophan catabolism. Trp is catabolised along the kynurenine pathway (bold arrows) providing NAD+. Alternative pathways are the conversion of Trp to serotonin (5-HT) and then to melatonin, or to tryptamine and then to kynurenamines (not shown). Indoleamines analysed in this study are shaded in gray. 1=Kyn formamidase, 2=kynureninase, 3=kynurenine3-hydroxylase, 4=kynureninase, 5=3-hydroxyanthranilic acid oxidase (3-HAO), 6=quinolinic acid phosphoribosyltransferase (QPRT), 7=kynurenine aminotransferases (KAT), 8=tryptophan hydroxylase. IDO=idoleamine 2,3-dioxgenase, TDO=tryptophan 2,3-dioxgenase.

authorised representatives gave written informed consent. The study was approved by the local Institutional Review Board. At baseline, demographic variables were collected.

Systematic inflammatory response syndrome (SIRS) was defined by the criteria of Bone et al[21] as the presence of at least two of the following four signs: abnormal body temperature (>38°C or <36°C), tachycardia (greater than 90 beats/min), tachypnoea (more than 20 breaths/min) and abnormal white blood cell count ($>12\times10^9$/l, $<4\times10^9$/l). Sepsis is defined as SIRS due to a presumed or known infection. Severe sepsis was defined as sepsis with an associated acute organ failure. Septic shock, a subset of severe sepsis, was defined as a systolic arterial blood pressure of less than 90 mmHg or a reduction of greater than 40 mmHg from baseline values despite adequate fluid resuscitation, or as the need for administration of a vasopressor to maintain adequate arterial blood pressure. In the presence of a suspected or diagnosed clinical infection, all patients with shock who met SIRS criteria were considered to suffer from sepsis and therefore from septic shock. At baseline and daily thereafter, clinical and laboratory data, such as markers of disease severity and organ function, were obtained until discharge or death. Plasma samples for the quantification of indoleamines were collected from each patient at baseline and twice a week thereafter until discharge or death.

2. Post-hoc analysis of indoleamines in septic patients under selective extracorporeal immunoadsorption (IA) of LPS, IL6 and C5a

It was shown in a previous study[22] that simultaneously reducing circulating endotoxin, IL6 and C5a levels by selective immunoadsorption reverses monocyte deactivation and improves organ function in patients with severe sepsis and septic shock. We used the panel of plasma samples of these 11 IA-treated patients to answer the question of whether kynurenine pathway activity declines along with patients' recovery. Patients' characteristics were described in detail elsewhere[22]. Indoleamine plasma concentrations were analysed prior to (baseline), during (study day four) and after receiving immunotherapy (study day seven) in order to monitor tryptophan catabolism.

Healthy volunteers

Normal values of plasma indoleamine concentrations were obtained from the analysis of peripheral blood of 50 healthy blood donors (age 35.1±12.5 years; 54% males).

Analytical methods

Plasma indoleamine concentrations

Samples of 100 μl plasma were analysed after addition of 50 μl sulfosalicylic acid (Sigma, Deisenhofen, Germany) (10 g in 90 ml methanol), 40 μl water and 10 μl internal standard solutions (d5-Trp, and d5-Kyna, Euriso-top, Paris, France). Samples were mixed, stored at 4°C for 30 minutes and centrifuged (20,000 g, 10 minutes). The supernatant was measured. A Wallac MS2 tandem mass spectrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) equipped with an electrospray ion source was used to record Trp, d5-Trp, Kyn, Quin, 5-HT, Kyna and d5-Kyna. Ions were detected in a positive ion mode using multiple reaction monitoring. The first quadrupole selected the protonated ions at m/z 205, 210, 177, 209, 168, 190 and 195 for Trp, d5-Trp, 5-HT, Kyn, Quin, Kyna and d5-Kyna, respectively. Nitrogen served as the collision gas. Fractioned ions at m/z 188 for Trp, 193 for d5-Trp, 160 for 5-HT, 192 for Kyn, 78 for Quin, 144 for Kyna and 149 for d5-Kyna were detected in Q3. Flow solvent (0.02% formic acid in 50% aqueous acetonitrile) was delivered at a flow rate of 75 μl/min. For quantification, plasma samples were spiked with standards. Calibration curves were fitted by linear least-square regression and correlated to the concentration of d5-Trp and d5-Kyna as internal standards. Methanol, acetonitrile and water were purchased from Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Statistical analyses

Categorical data were expressed as percentages; for continuous data, mean with standard deviation or median with 25th and 75th percentiles were provided. Univariate analysis was performed with Fisher's exact test for categorical data and Kruskal-Wallis test (greater than two unpaired groups) or Mann-Whitney U-test (two unpaired groups) for continuous data. To evaluate differences in Kyns between controls and defined patient groups at baseline, variance analyses were applied. Dependent variables were log-transformed to better fulfill model assumptions. Analyses accounted for differences in age and gender between healthy controls and ICU patient groups. P values for post-hoc pairwise comparisons were corrected with Bonferroni's adjustment for multiple testing. $P<0.05$ was considered as statistically significant.

Non-parametric receiver operating characteristic analyses were applied to assess the predictive value of indoleamines regarding the development of sepsis during the ICU stay (positive event). To avoid

a tendency towards cut-offs with lower sensitivity due to low frequency of the positive event, optimal cut-offs were chosen such that sensitivity and specificity are approximately equal. Positive and negative predictive values were calculated.

To analyse differences in means of indoleamine values in renal failure (RF) or septic shock, analyses of variance were performed, also taking the interaction of the two factors into account. For variance analyses, samples were chosen randomly, including one value per patient to avoid dependencies within patients. Randomisation resulted in 66 cases without septic shock or RF, 11 cases with RF (B), 12 cases with septic shock (C), and 11 cases with both RF and septic shock (D). Dependent variables were log-transformed because of large skewness within groups. Mean values of indoleamines were determined as predicted by the model.

To evaluate changes in indoleamine values during IA-treatment, repeated measures analyses of variance with post-hoc tests (paired t-tests and Wilcoxon signed rank tests as appropriate) were applied. Multiple testing *P* values were corrected according to Bonferroni's adjustment. Statistical analyses were carried out with SPSS (Version 11.5, Chicago, IL, USA) and R 2.7.0 (free shareware).

RESULTS

To analyse circulating indoleamine levels in critically ill patients, we monitored the kinetics of plasma concentrations of Trp, Kyn, Quin, Kyna and 5-HT of 100 patients during their stay in the ICU. Patients' demographics and baseline characteristics are shown in Table 1. Among the 100 patients enrolled in the study, 50 did not develop sepsis during their stay in the ICU (A, non-septic). Eighteen patients did not have sepsis at baseline but developed it later within three days (25th to 75th, 2 to 7) (B, pre-septic). Thirty-two patients already fulfilled the criteria of severe sepsis and septic shock at baseline (C, septic). Compared with non-septic and pre-septic patients, patients with septic shock presented significantly increased SIRS and sequential organ failure assessment scores and a decreased monocytic HLA-DR expression at baseline, a higher percentage of acute renal failure, and significantly higher ICU mortality ($P < 0.05$).

Activation of the kynurenine pathway in critically ill patients

The plasma Kyn/Trp ratio is considered to be a specific marker for IDO activity[20,23]. At baseline, non-septic patients showed a significant increase of the plasma Kyn/Trp ratio when compared with a group of healthy volunteers ($P < 0.001$; Figure 2A). However, this resulted merely from a Trp shortage (Figure 2C) rather than from rising Kyn concentrations at that point in time (Figure 2D). Nevertheless, an activation of the kynurenine pathway in the critically ill was evident, because patients revealed increased levels of Quin (Figure 2E). This is underlined by an increased Quin/Trp ratio (Figure 2B). Consistently, Trp depletion in the critically ill accompanied reduced serotonin plasma levels (Figure 2G).

Quinolinic branch activity of Trp catabolism predicts sepsis

Although non-septic critically ill patients showed signs of activation of the kynurenine pathway, the levels of Kyn, Quin, Kyna and the Quin/Trp ratio indicated a significant difference ($P < 0.001$) between those patients and septic patients at baseline (Figure 2A and 2B), suggesting either a further increase of Trp catabolism or damming of Kyns due to reduced renal clearance in patients with septic shock. Surprisingly, there was no significant difference between septic and pre-septic patients for any variable tested, whereas the quantification of Trp, Kyn, Quin and Kyna at baseline allowed the discrimination of patients who will or will not develop sepsis later on (Figure 2). Therefore, we evaluated the ability of indoleamines to discriminate between non-septic and pre-septic patients at baseline applying receiver operating characteristic analyses (Table 2). The Quin/Trp ratio was of the highest discriminatory power (AUC 0.835, 95% CI 0.719 to 0.952) followed by Quin (AUC 0.832, 95% CI 0.710 to 0.954), whereas Kyna, the product of the side branch of the kynurenine pathway (Figure 1), was of less predictive value. For a Quin/Trp ratio ≥ 18.2, 73.3% of pre-septic patients and 86.0% of non-septic patients were classified correctly. Positive and negative predictive values were comparatively high. The fact that the concentrations of C-reactive protein and procalcitonin in the pre-septic group did not significantly differ from that of non-septic patients (Table 2) underscores their pre-septic state.

Both renal failure and sepsis independently augment Kyn values

Indoleamines are rapidly cleared by renal filtration. It has been consistently shown that renal insufficiency leads to an accumulation of various Kyns[24]. Therefore, we asked whether RF exclusively contributed to the accumulation of Kyns during

TABLE 1

Patient characteristics and clinical monitoring at baseline (n=100). Patients were grouped post-hoc into (A) patients without sepsis during ICU stay, (B) patients developing severe sepsis and septic shock during ICU stay and (C) patients suffering from severe sepsis and septic shock at baseline. Data are presented as numbers (percentages) or median (25th; 75th percentile). Groups were compared with Fisher's exact test for categorical data and Kruskal Wallis-test for continuous data.

	A: non-septic (n=50)	B: pre-septic (n=18)	C: septic shock (n=32)
Age, y	64 (55; 72)	65 (50; 75)	66 (56; 75)
Male	29 (58%)	9 (50%)	20 (62.5%)
Elective surgery	28 (56%)	9 (50%)	12 (37.5%)
Emergency surgery	9 (18%)	7 (38.9%)	17 (53.1%) *
No history of surgery	13 (26%)	2 (11.1%)	3 (9.4%)
Pre-existing condition			
Diabetes	11 (22%)	2 (11.1%)	5 (15.6%)
Renal dysfunction	5 (10%)	3 (16.7%)	6 (18.8%)
Cancer	16 (32%)	6 (33.3%)	11 (34.4%)
Immunosuppression	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Septic focus			
Pneumonia	–	4 (22%)	5 (15.6%)
Peritonitis	–	7 (39%)	17 (53%)
Mediastinitis	–	0 (%)	2 (6.3%)
Pancreatitis (acute necrotizing)	–	2 (11%)	5 (15.6%)
Urinary tract infection	–	2 (11%)	0 (%)
Wound infection	–	2 (11%)	2 (6.3%)
Focus unknown	–	1 (5.5%)	1 (3%)
Length of stay, days	5 (3; 10.3)	17 (6.8; 40.8) *	22 (6.3; 33.8) *
Death during ICU stay	6 (12%)	3 (16.7%)	16 (50%) * #
Temperature, °C	37 (36.6; 37.5)	37.5 (36.6; 37.9)	37.2 (36; 38.2) * #
Heart rate, bpm	89 (70; 98)	93 (82; 102) *	105 (93; 116) * #
Mean arterial pressure, mmHg	83 (60; 90)	72 (67; 82) *	63 (51; 70)
Norepinephrine	11 (22%)	0 (0%)	32 (100%) * #
Maximum dose, μg/kg/min	0.13 (0.07; 0.32)	–	0.14 (0.07; 0.41)
SIRS positive	24 (48%)	13 (72.2%)	32 (100%) * #
SOFA score	4 (3; 7)	7 (6; 11)	8 (6; 13) **
APACHE II	19 (15; 25)	21 (17; 26)	22 (19; 29)
HLA-DR <5000, MEF[1]	21 (42%)	11 (61.1%)	31 (96.9%) * #
Leucocytes, Gpt/l	11.4 (8.5; 14.9)	12.4 (8.2; 17.1)	13.5 (9.9; 20.5)
Lymphocytes, Gpt/l	1.2 (0.84; 1.6)	0.84 (0.54; 1.27)	0.96 (0.57; 1.39)
Neutrophils, Gpt/l	8.9 (6.4; 10.8)	12.2 (6.6; 16.1)	10.9 (7.5; 17.7)
Platelets, Gpt/l	180 (140; 240)	183 (67; 319)	130 (84; 238)
Glucose, mmol/l	7.5 (6.4; 9.1)	6.5 (5.75; 8.6)	8.1 (6.2; 11.2)
pH	7.44 (7.40; 7.48)	7.43 (7.35; 7.48)	7.37 (7.28; 7.44)
Osmolarity, mosmol/kg	292 (282; 303)	303 (288; 317)	309 (300; 319) *
Acute renal failure	4 (8%)	6 (33.3%)	15 (46.9%) *
Creatinine, μmol/l	292 (180; 471)	130 (130; 168)	175 (125, 298)
Mechanical ventilation	11 (22%)	16 (88.9%) *	30 (93.8%) *

1 monocytic HLA-DR expression (MEF=median of equivalent fluorochromes) * P <0.05 versus non-septic group; # P <0.05 versus pre-septic group. ICU=intensive care unit, SIRS=systematic inflammatory response syndrome, SOFA=sequential organ falure assessment, APACHE=acute physioilogy and chronic heatlh evaluation.

septic shock. To answer this question, we used the follow-up data sets of all patients. To avoid dependencies within patients, we used one randomly selected time point per patient for ANOVA and assigned the corresponding clinical constellation regarding the following four criteria: 1) neither septic shock nor RF, 2) RF without septic shock, 3) septic shock without RF, and 4) RF with septic shock. As shown in Table 3, it became evident that both RF (column B) and septic shock (column C) independently potentiated the accumulation of Kyns significantly (P <0.05). The interaction of the two factors, i.e. further augmentation of Kyn values in patients with both RF and severe sepsis, was not significant for most Kyns, except for Kyna. Kyna values increased independently in RF and septic

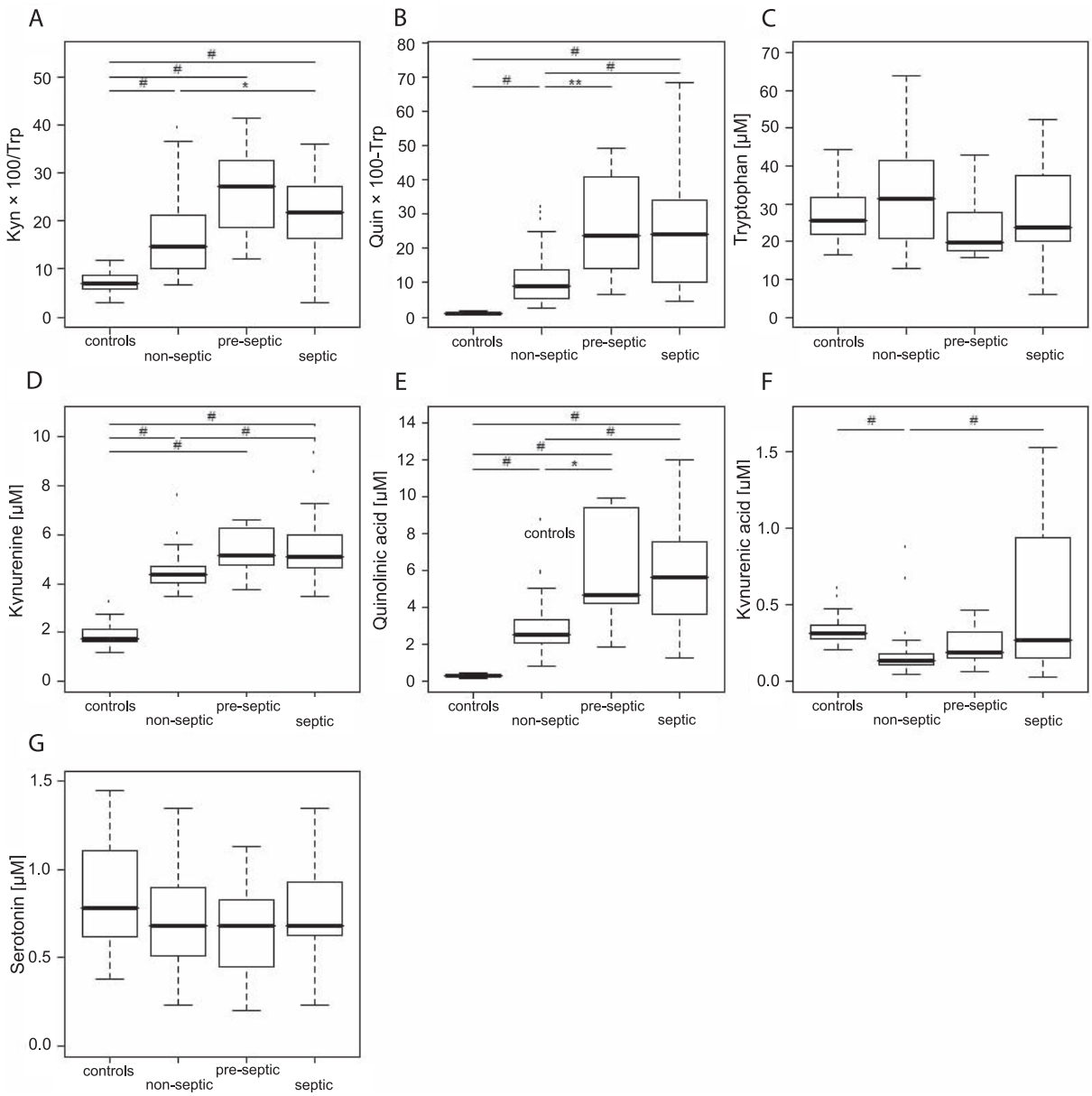

FIGURE 2: Plasma concentrations of Trp and its catabolites in healthy controls and ICU patients at baseline. The Kyn/Trp ratio (A), Quin/Trp ratio (B) and the concentrations (μM) of tryptophan (C), kynurenine (D), quinolinic acid (E), kynurenic acid (F) and serotonin (G) of patients who did not acquire septic complications during intensive care unit stay (non-septic, n=50), patients who developed severe sepsis and septic shock after baseline (pre-septic, n=18) and patients with severe sepsis and septic shock at baseline (septic, n=32) were compared with healthy controls (n=50). Differences in kynurenines between controls and patient groups were evaluated using variance analyses accounting for differences in age and gender distribution. Dependent variables were log-transformed. P values for post-hoc pairwise comparisons were corrected according to Bonferroni. (*) P <0.1, * P <0.05, ** P <0.01, # P <0.001. Boxes show the 25th, median and 75th percentiles; whiskers correspond to the smallest and largest non-outlier.

shock patients compared with those without RF and septic shock (0.8 μM and 0.3 μM vs 0.2 μM, respectively, P <0.05), and further increased to 2.4 μM on average in patients exhibiting both conditions. In contrast, Quin values which were lowest in patients without RF and septic shock (4 μM) increased independently in the presence of RF and septic shock (10.8 μM and 6.2 μM, respectively, P <0.05), but the presence of both RF and severe sepsis (interaction term) did not further augment Quin values in any relevant manner (P >0.05).

Plasma indoleamines as markers for disease severity in septic patients

In order to obtain an initial indication of whether the rise of plasma Kyns correlates with the severity of sepsis, we quantified indoleamines in the plasma of 11 patients enrolled in a recent study treating severe sepsis by a novel selective extracorporeal immunoadsorption approach to remove LPS, IL6 and C5a from the circulation. This intervention therapy led to recovery of monocytic HLA-DR expression and a significant decline in disease severity, as described in detail recently[22]. This selected

TABLE 2

Evaluation of indoleamine-related and infection parameters as prognostic tool for severe sepsis and septic shock during intensive care unit stay. For the Mann-Whitney U-test P values with Bonferroni's correction are given. Area under the curve (AUC) values and their confidence intervals (95% CI) are shown. Sensitivity (SN), specificity (SP), positive (PPV) and negative predictive value (NPV) correspond to the optimised cut-off value. At maximum three values are missing.

	Pre-septic (n=18)*	Non-septic (n=50)*	*P* value	AUC (95% CI)	Cut-off	SN	SP	PPV	NPV
100×Kyn/Trp	61.45 (42.1; 73.6)	33.06 (22.5; 47.1)	<0.001	0.788 (0.644-0.912)	≥43.5	73.3	70.0	42.3	89.7
100×Quin/Trp	23.7 (10.3; 49.3)	9.16 (5.33; 13.86)	<0.001	0.835 (0.719-0.952)	≥18.2	73.3	86.0	61.1	91.5
Trp, μM	19.87 (17.4; 27.7)	31.28 (21.07; 41.0)	0.018	0.715 (0.583-0.847)	≥28.5	73.3	62.0	36.7	88.6
Kyn, μM	5.16 (4.76; 6.25)	4.34 (4.05; 4.68)	<0.001	0.785 (0.632-0.937)	≥4.74	80.0	82.0	57.1	93.2
Quin, μM	4.68 (4.21; 9.4)	2.57 (2.08; 3.35)	<0.001	0.832 (0.710-0.954)	≥4.1	80.0	80.0	54.5	93.0
Kyna, μM	0.187 (0.156; 0.327)	0.133 (0.108; 0.182)	0.02	0.709 (0.561-0.858)	≥0.153	80.0	54.0	34.3	90.0
5-HT, μM	0.68 (0.45; 0.83)	0.68 (0.51; 0.90)	ns	0.565 (0.393-0.736)	≤0.72	66.7	42.0	25.6	80.8
CRP, mg/l	114.8 (67; 158.5)	90.5 (53.65; 125.5)	ns	0.557 (0.400-0.713)	≥102	61.1	56.0	33.3	80.0
PCT, ng/ml	0.95 (0.24; 2.6)	0.605 (0.24; 1.8)	ns	0.576 (0.417-0.734)	≥0.89	58.8	56.0	31.3	80.0

* Median (25th; 75th quartile). ns=not significant

TABLE 3

Comparison of adjusted means (with 95% confidence interval [CI]) for plasma indoleamines in patients without septic shock or renal failure (A), with either renal failure (B) or septic shock (C), or both (D). For each patient one blood sample throughout their whole ICU stay was randomly chosen. Measured indoleamines were evaluated in ANOVA, analysing the impact of the presence of RF, presence of septic shock and the corresponding interaction term as factors. Significant P values for factors and the interaction are indicated in the corresponding columns. Model predicted means (with 95% CI) are provided in the Table.

Mean [95% CI]	A (n=66)	B (n=11)	C (n=12)	D (n=11)
100×Kyn/Trp	37.7 [33.4; 42.1]	56.9 [46.5; 67.3] **	42.8 [32.8; 52.7]	54.2 [43.8; 64.7]
100×Quin/Trp	15.7 [6.7; 24.8]	47.9 [26.2; 69.5] #	24.1 [3.4; 44.9] *	68.4 [46.7; 90.0]
Trp [μM]	31.7 [27.2; 36.1]	24.2 [13.6; 34.9]	39.6 [29.3; 49.8]	34.0 [23.3; 44.7]
Kyn [μM]	4.5 [4.3; 4.8]	5.8 [5.2; 6.4] #	5.2 [4.6; 5.7] #	7.3 [6.7; 7.9]
Quin [μM]	4.00 [2.1; 5.9]	10.8 [6.3; 15.3] #	6.2 [1.9; 10.6] **	18.1 [13.6; 22.6]
Kyna [μM]	0.16 [-0.03; 0.34]	0.77 [0.33; 1.22] #	0.32 [-0.10; 0.74] *	2.37 [1.93; 2.81] *
5-HT [μM]	0.7 [0.6; 0.8]	0.9 [0.7; 1.1]	0.9 [0.7; 1.1]	0.9 [0.7; 1.1]

* P <0.05; ** P <0.01; # P <0.001. ANOVA=analyses of variance, ICU=intensive care unit, RF=renal failure.

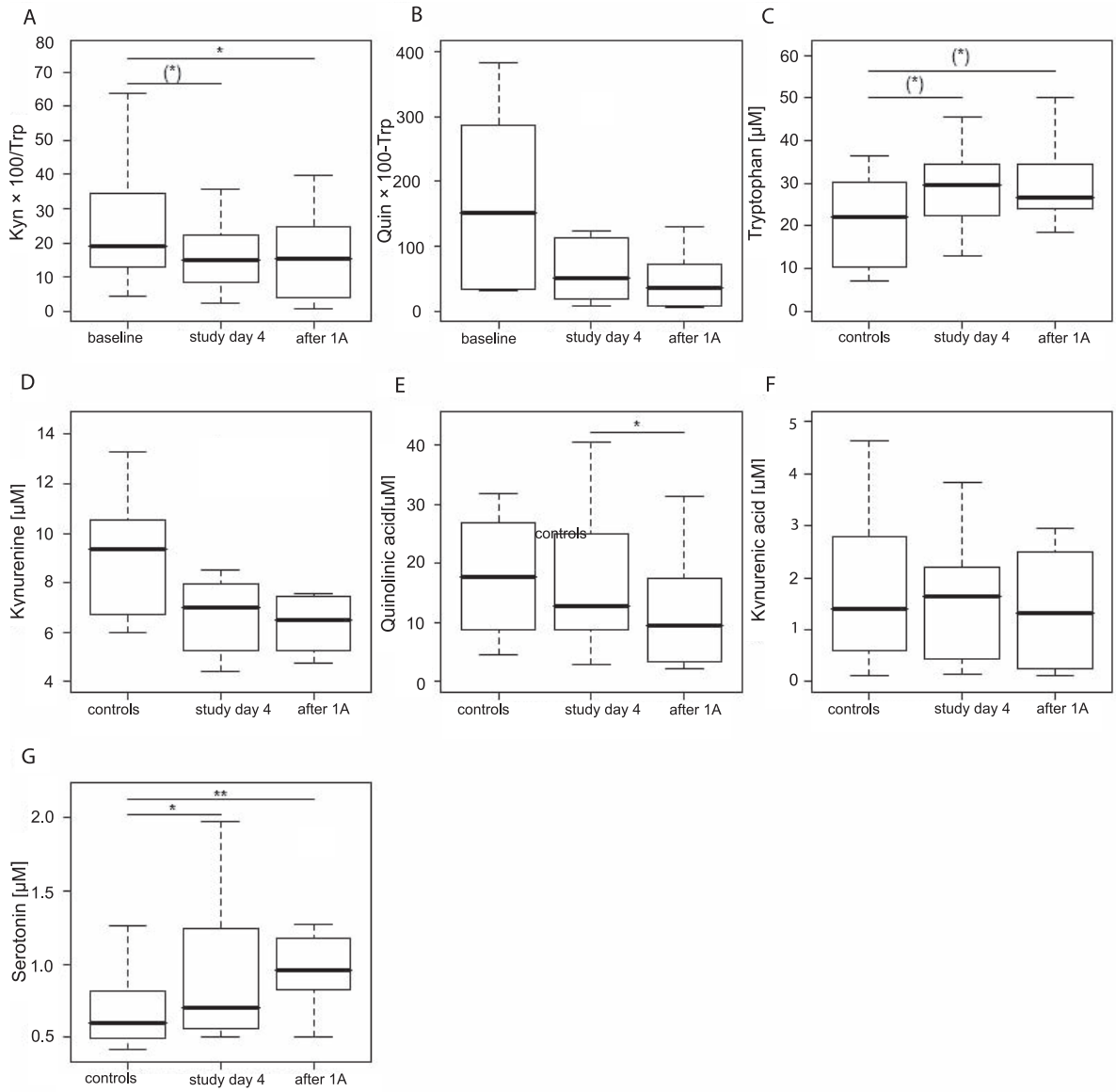

FIGURE 3: Course of circulating indoleamines (μM) at baseline, study day 4 and after therapy (study day 7) in patients (n=11) with severe sepsis and septic shock receiving selective extracorporeal immunadsorption (IA). In this study, patients in the IA group received 7.5 h of IA to remove endotoxin, interleukin-6 and complement activating product 5a (C5a) on 5 consecutive days, in addition to best supportive intensive care [22]. The ratio of Kyn/Trp (A) or Quin/Trp (B) as well as concentrations of Trp (C), Kyn (D), Quin (E), Kyna (F) and serotonin (G) are given. To analyse changes in indoleamine values during IA-treatment, repeated analyses of variance with post-hoc tests for paired designs were applied. *P* values were corrected according to Bonferroni. (*) <0.1, * P <0.05, ** P <0.01.

patient population had extremely high levels of Kyns (e.g. quinolinic acid up to 129 μM), which declined during treatment (Figure 3). In particular, circulating Trp and 5-HT levels recovered along with the recovery of patients. Thus, kynurenine pathway activity seems to be a marker for the severity of illness.

DISCUSSION

Almost 120 years ago, Ehrlich[25] established that febrile infectious illnesses caused increased urinary excretion of aromatic amines which were identified several decades later as Trp catabolites of the kynurenine pathway[26]. This knowledge was virtually forgotten. Here, we show that Kyns, such as Kyn, Quin or Kyna, accumulate in the circulation when sepsis is developing. This raises the question of whether augmented Trp degradation is specific for infections. Our results show that this is not the case. Augmented Trp catabolism is a consistent finding in the heterogeneous population of severely ill patients. This may be explained by the fact that not

only pathogen-associated molecular patterns but also endogenous alarmins, such as high mobility group box proteins, heat shock proteins or nucleosomes, contain hydrophobic motifs and are recognised by toll-like receptors[27-29]. Thus, tissue injury or hypoxia may contribute to the supposed inducibility of IDO activity in the critically ill without infection, which is documented by a shortage of plasma Trp, no significant increase of Kyn, but significantly increased concentrations of Quin and Kyna. The pattern of subsequent Trp catabolites is determined by the particular set of downstream enzymes that are differentially expressed or activated in various cell types[2]. Thus, the half-life of certain types of Kyns may vary depending on the rate of flow along the pathway. Our results agree with observations by Pellegrin et al[23], who reported on 22 trauma patients with Trp shortage but unchanged Kyn levels seen as early as day one after trauma.

Given that basal levels of Trp in the blood are mainly controlled by TDO, which does not respond to pro-inflammatory mediators, one can speculate that during severe illness, TDO activity is up-regulated by stress-induced glucocorticoids[30], leading to increased amino acid uptake by the liver and thereby lowering circulating Trp. This might be accompanied by the induction of IDO at sites of tissue injury in order to adapt to increased NAD^+ demand. The amount of NAD^+ in a cell indicates how much energy is available, either from glycolytic reactions to generate ATP and NADH or from oxidative phosphorylation using NADH via the electron transport chain. Plasma levels of indoleamines in non-septic critically ill patients illustrated such a proposed adaptation process. However, long-lasting severe depletion of Trp to 40% of normal values as shown in septic patients could have undesirable effects, such as successive NAD^+ depletion leading to tissue pathology. The cellular environment may become functionally hypoxic even in the presence of oxygen, and cellular hibernation in sepsis-associated organ dysfunction may at least in part reflect an underlying Trp shortage. Paradoxically, NAD^+ precursor molecules such Kyn or Quin accumulate in the circulation of septic patients, suggesting either an impaired cellular re-uptake, which has been identified by Romani et al[18], or inactive intracellular downstream enzymes. As a result, these immunoactive Kyns may compromise immune functions.

In agreement with Lögters et al[20], we found that when sepsis occurs, the concentration of circulating Kyn significantly exceeds that induced by stress, trauma or hypoxia in the non-septic critically ill. They measured Trp and Kyn and used the Kyn/Trp ratio to predict sepsis in 60 major trauma patients. In our study of 100 ICU patients admitted for different reasons, we analysed a broad spectrum of Kyns and identified the Quin/Trp ratio as having the best predictive value (AUC 0.835), superior to the Kyn/Trp ratio (AUC 0.788). In addition, we showed that an accumulation of Kyns in the circulation does not necessarily depend on renal failure. Thus, an inability of septic patients to use Quin for NAD^+ synthesis has to be taken into account.

The potential importance of monitoring indoleamines is illustrated by the results from patients with severe sepsis and septic shock who underwent extracorporeal immunoadsorption, showing that removal of LPS, IL6, and C5a both beneficially influenced the overall progress of the study patients[22] and restored Trp and 5-HT concentrations within five days of treatment. Taken together, our results showed that excessive Trp degradation could be a risk factor for critically ill patients who, in principle, fulfill all the requirements for compromised immune and organ functions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the patients and clinical and laboratory staff who participated in this study. This work was supported in part by the German Research Foundation (DFG grant Research Training Group 840 to AW and CS).

REFERENCES

1. Grant R, Kapoor V. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN-gamma stimulated astroglioma cells decreases intracellular NAD levels. Biochem Pharmacol 2003; 66:1033-1036.
2. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. Immunol Cell Biol 2003; 81:247-265.
3. Khan AU, Delude RL, Han YY, Sappington PL, Han X, Carcillo JA et al. Liposomal NAD^+ prevents diminished O^2 consumption by immunostimulated Caco-2 cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 282:L1082-1091.
4. Yoshida R, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75:3998-4000.
5. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. Nat Med 2004; 10:187-192.
6. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. Blood 2005; 106:2375-2381.
7. Grohmann U, Volpi C, Fallarino F, Bozza S, Bianchi R, Vacca C et al. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. Nat Med 2007; 13:579-586.

8. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat Rev Immunol 2007; 7:817-823.
9. Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov 2002; 1:609-620.
10. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science 1998; 281:1191-1193.
11. Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou De-Yan, Singh N, Yagita H. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. J Clin Invest 2007; 117:2570-2582.
12. Penberthy WT. Pharmacological targeting of IDO-mediated tolerance for treating autoimmune disease. Curr Drug Metab 2007; 8:245-266.
13. Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM et al. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. Science 2005; 310:850-855.
14. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. J Immunol 2006; 176:6752-6761.
15. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. Cell Death Differ 2002; 9:1069-77.
16. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D et al. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. Immunity 2005; 22:633-642.
17. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, Tian H et al. Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. J Biol Chem 2006; 281:22021-22028.
18. Romani L, Fallarino F, De Luca A, Montagnoli C, D'Angelo C, Zelante T et al. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. Nature 2008; 451:211-215.
19. Wichers MC, Koek GH, Robaeys G, Verkerk R, Scharpe S, Maes M. IDO and interferon-alpha-induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. Mol Psychiatry 2005; 10:538-544.
20. Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. Shock 2009; 32:29-34.
21. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992; 101:1644-1655.
22. Schefold JC, von Haehling S, Corsepius M, Pohle C, Kruschke P, Zuckermann H et al. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. Shock 2007; 28:418-425.
23. Pellegrin K, Neurauter G, Wirleitner B, Fleming AW, Peterson VM, Fuchs D. Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma. Shock 2005; 23:209-215.
24. Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. Nephrol Dial Transplant 2009; 24:1901-1908.
25. Ehrlich P. Ueber eine Harnprobe. Charité Annalen 1883; 8:140-166.
26. Kotake V, Sakata H, Shirabe V, Otani S. Studien ueber den intermediaeren Stoffwechsel des Tryptophans VIII. Zur Frage der Abstammung des Urochroms. Z physiol Chem 1931; 195:184-191.
27. Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. J Biol Chem 2002; 277:15107-15112.
28. Seong SY, Matzinger P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. Nat Rev Immunol 2004; 4:469-478.
29. Levy RM, Mollen KP, Prince JM, Kaczorowski DJ, Vallabhaneni R, Liu S. Systemic inflammation and remote organ injury following trauma require HMGB1. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007; 293:R1538-1544.
30. Rapoport MI, Beisel WR. Studies of tryptophan metabolism in experimental animals and man during infectious illness. Am J Clin Nutr 1971; 24:807-814.

Schefold J.C., Zeden J.-P., Pschowski R., Hammoud B.,Fotopoulou C., Hasper D., Fusch G.,Von Haehling S., Volk H.D., Meisel C., Schuett C. und Reinke P.: Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis 42, 3* (Mar 2010), 164-71.

Eigenleistung: Konzeption der Studie, Massenspektrometrie, Auswertung (in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. J. Schefold).

Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2009; Early Online, 1–8

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE

Treatment with granulocyte–macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock

JOERG C. SCHEFOLD[1], JAN-PHILIP ZEDEN[2], RENE PSCHOWSKI[1], BEN HAMMOUD[3], CHRISTINA FOTOPOULOU[4], DIETRICH HASPER[1], GERHARD FUSCH[5], STEPHAN VON HAEHLING[6], HANS-DIETER VOLK[3], CHRISTIAN MEISEL[3], CHRISTINE SCHÜTT[2] & PETRA REINKE[1]

From the [1]Department of Nephrology and Intensive Care Medicine, Charité University Medicine, Campus Virchow, Berlin, [2]Department of Immunology, University of Greifswald, Greifswald, [3]Department of Medical Immunology, University Medicine Berlin, Charité Campus Mitte, Berlin, [4]Department of Gynaecology, Charité University Medicine, Campus Virchow Clinic, Berlin, [5]Department of Paediatrics, University of Greifswald, Greifswald, [6]Department of Cardiology, Charité University Medicine, Campus Virchow Clinic, Berlin, Germany

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

Abstract

The immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) controls tryptophan metabolism and is induced by pro-inflammatory stimuli. We investigated whether immunostimulatory treatment with granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) influences IDO activity and tryptophan metabolism in sepsis. Thirty-six patients with severe sepsis/septic shock and sepsis-associated immunosuppression (assessed using monocytic human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR) expression) were assessed in a controlled trial of GM-CSF or placebo treatment for 8 days. Using tandem mass spectrometry, levels of tryptophan, kynurenine, kynurenic acid, quinolinic acid, 5-hydroxytryptophan, serotonin, and estimated IDO activity were determined in a blinded fashion over a 9-day interval. At baseline, tryptophan and metabolite levels did not differ between the study groups. Although tryptophan levels were unchanged in both groups over the treatment interval (all $p > 0.8$), IDO activity was markedly reduced after GM-CSF treatment (35.4 ± 21.0 vs 21.6 ± 9.9 (baseline vs day 9), $p = 0.02$). IDO activity differed significantly between the 2 groups after therapy ($p = 0.03$). Metabolites downstream of IDO (kynurenine, quinolinic acid, kynurenic acid) were all induced in sepsis and declined in the GM-CSF group, but not in controls. Serotonin pathway metabolites remained unchanged in both groups (all $p > 0.15$). Moreover, IDO activity correlated with procalcitonin ($p < 0.0001$, $r = 0.56$) and mHLA-DR levels ($p = 0.005$, $r = -0.28$) in the overall samples group. Thus, GM-CSF therapy is associated with decreased IDO activity and reduced kynurenine pathway catabolites in sepsis. This may be due to an improved antibacterial defence.

Introduction

Tryptophan (Trp) is an essential amino acid and is involved in a number of key biological processes. Two main pathways of Trp metabolism have been identified: one pathway yields (via 5-hydroxytryptophan, OH-Trp) formation of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) and melatonin. The second 'kynurenine pathway' leads to the synthesis of metabolites collectively referred to as 'kynurenines'. These include kynurenine (Kyn), kynurenic acid (Kyna), and quinolinic acid (Quin), which are intracellular messengers with neuroactive, pro-apoptotic and immunoregulatory activities [1–4]. These metabolites participate in energy supply via acetyl-CoA and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) generation and have been implicated in conditions associated with tissue inflammation and injury [1,4–6]. Importantly, the key step in Trp metabolism along the kynurenine pathway is regulated by the intracellular haem protein enzyme, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) [1,3,4,6,7].

Correspondence: J. C. Schefold, University Medicine Berlin, Charité-Campus Virchow Clinic, Department of Nephrology and Intensive Care Medicine, Augustenburger Platz 1, D-13353 Berlin, Germany. Tel: +49 30 450 665537. Fax: +49 30 450 553915. E-mail: schefold@charite.de

(Received 7 August 2009; accepted 12 October 2009)

ISSN 0365-5148 print/ISSN 1651-1980 online © 2009 Informa UK Ltd. (Informa Healthcare, Taylor & Francis AS)
DOI: 10.1080/00365540903405768

RIGHTSLINK

IDO is an important immune regulator [7] and IDO activity is induced by a number of pro-inflammatory stimuli including lipopolysaccharides (LPS), bacterial DNA [8], type I/II interferons (e.g. interferon-γ) [4,7], and soluble cytokine receptors [7]. Mounting data suggest that IDO controls the flux between pathways leading to pro- or anti-inflammatory cytokine production [9]. Not surprisingly, IDO activity, which may be assessed via the Kyn/Trp ratio, is induced in patients with sepsis/septic shock and trauma [10–12]. Induction of IDO activity is associated with adverse outcome and independently predicts severe disease and fatality [11,12]. Recent reports indicate that inhibition or blockade of IDO activity may also serve as a new therapeutic option in the therapy of solid tumours, acute and chronic infection, transplant rejection, and autoimmunity [13–15]. Moreover, monitoring of IDO may help to identify beneficial immunomodulatory interventions in patients with sepsis.

In human sepsis, sepsis-induced immune dysfunction/immunosuppression, which may typically be observed in the later stage of the disease, are prognosis-relevant findings [16–21]. Consequently, recent therapeutic approaches have aimed to beneficially modulate this condition in patients with sepsis [17,20,21]. Such approaches include immunostimulation using granulocyte–macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) [22–24], interferon-γ [19], and extracorporeal removal of inhibitory factors [25].

Besides its role as a haematopoietic cell survival and/or proliferation factor, GM-CSF is a potent pleiotropic pro-inflammatory cytokine with distinct immunomodulatory functions, as it controls differentiation and activation of immune cells, including antigen-presenting cells (APC), monocytes/macrophages, and dendritic cells (DC) [26]. Treatment with GM-CSF in human sepsis reverses monocytic deactivation, i.e. re-activates monocytic phagocytosis, antigen presentation, and cytokine production [23,24]. In sepsis, GM-CSF treatment may also improve the clinical course of respective patients, as treatment with GM-CSF may shorten the length of both mechanical ventilation and stay in the intensive care unit (ICU) [23].

It is currently unknown whether GM-CSF therapy induces changes in Trp metabolism and/or IDO activity in sepsis. This is of interest as both IDO and GM-CSF are key modulators of cell-mediated immunity and GM-CSF treatment is currently being investigated as an adjunctive treatment option in human sepsis. Moreover, few data exist on whether IDO activity and metabolites of the kynurenine pathway reflect disease severity in sepsis. In this study we aimed to elucidate the interplay between GM-CSF and IDO activity/Trp metabolism in patients with severe sepsis and septic shock.

Methods

Study participants and study design

The analysis presented here is a previously planned subinvestigation of a double-blind, randomized, placebo-controlled multicentre trial investigating the clinical and immunological effects of GM-CSF in patients with severe sepsis/septic shock and immunoparalysis [23]. In brief, patients with severe sepsis and septic shock and immunoparalysis (reduced monocytic human leukocyte antigen-DR (mHLA-DR) expression, <8000 molecules per CD14+ cell) were included. Exclusion criteria were: pregnancy, known hypersensitivity to study medication, systemic autoimmune disease, haematological disease (neoplasm, acute leukaemia), transplant recipients, steroid medication (eq. >10 mg/day prednisolone), HIV positivity, DNR order present, moribund patients. Full details are given elsewhere [23]. After inclusion at study day 0, patients were randomized to receive subcutaneous injections of either 4 μg/kg body weight GM-CSF (Leukine®; Berlex Laboratories, Richmond, CA, USA) or placebo (0.9% sodium chloride) for 8 consecutive days beginning on the day after enrolment (day 1, baseline). In 2 cases of unchanged mHLA-DR expression (mHLA-DR <15,000 molecules at day 5), 8 μg/kg body weight GM-CSF was given from study days 5 to 8 [23]. For the assessment of IDO activity and Trp metabolism, heparinized plasma samples were drawn from central venous catheters on day 0 (baseline), day 5 and day 9 in the morning of each respective day. All samples were stored at –80°C until analysis. Samples of 2 patients from the overall trial could not be assessed and were thus not entered into the analysis (total $N = 36$, 18 per group). The study was approved by the local ethics committee on human research and was designed in adherence to the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from the patient or their respective legal representative.

Assessment of Trp levels, metabolite levels, and estimated IDO activity

One hundred microlitres heparinized plasma samples drawn from central venous catheters were measured after the addition of 50 μl sulfosalicylic acid (10 g in 90 ml methanol, Sigma), 40 μl water and 10 μl internal standard solutions (5-times deuterized Trp and 5-times deuterized Kyna; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA). All samples were mixed, stored (4°C, 30 min) and centrifuged (20,000 *g*, 10 min), and the supernatant was collected. A Wallac MS2 tandem mass spectrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) equipped with an electrospray ion source served to record the levels

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

RIGHTSLINK

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

of Trp, 5-times deuterized-Trp, Kyn, Quin, 5-HT, Kyna, and 5-times deuterized Kyna. Respective ions were detected in a positive ion mode using multiple reaction monitoring. The first quadrupole (Q1) selected the protonated ions at a mass-to-charge ratio (*m*/*z*) of 205, 210, 177, 209, 168, 190, and 195 for Trp, 5-times deuterized Trp, 5-HT, Kyn, Quin, Kyna and 5-times deuterized Kyna, respectively. Nitrogen was chosen as a collision gas. Fractioned ions *m*/*z* 188 for Trp, 193 for 5-times deuterized Trp, 160 for 5-HT, 192 for Kyn, 78 for Quin, 144 for Kyna, and 149 for 5-times deuterized Kyna were detected in quadrupole 3 (Q3). Flow solvent (0.02% formic acid in 50% aqueous acetonitrile) was delivered at a flow rate of 75 μl/min. For quantification, plasma samples were spiked with standards. Calibration curves were fitted by linear least-square regression and correlated to the concentration of 5-times deuterized Trp and 5-times deuterized Kyna as internal standards. Estimated IDO activity was assessed using the Kyn $\times$ 100/Trp ratio as demonstrated elsewhere [27].

Assessment of mHLA-DR expression, interleukin-10, interleukin-6, procalcitonin, and GM-CSF levels

For the assessment of monocytic function, the mHLA-DR expression and monocytic cytokine release (ex vivo monocytic tumour necrosis factor-α (TNF-α) release after 4 h of stimulation with LPS) was measured using standardized tests (reported elsewhere [18]). Interleukin (IL)-10 and IL-6 serum levels (detection limit >5 pg/ml and >2 pg/ml, respectively) were determined at baseline and study days 5 and 9 using the IMMULITE™ automatic chemiluminescent immunoassay system (Siemens Medical Solutions, Bad Nauheim, Germany). Procalcitonin (PCT), a surrogate marker for systemic infection [28,29], was assessed using a commercial immunoluminometric assay (BRAHMS, Hennings-dorf, Germany; detection limit <80 pg/ml). GM-CSF serum levels were assessed using a commercially available colorimetric sandwich ELISA kit (R&D Systems, Wiesbaden, Germany; sensitivity limit <3 pg/ml, range 7.8–500 pg/ml).

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using MedCalc 10.1.3 software (MedCalc, Mariakerke, Belgium). Statistical methods included analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, Student's paired and unpaired *t*-test, and Fisher's exact test as appropriate. Subgroup analysis was performed using ANOVA with Fisher's post-hoc test. All data were checked for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test. Results are reported as means ± standard deviations (SD), if not indicated otherwise. Significance was assigned when $p < 0.05$.

Results

Characterization of study patients

Thirty-six patients (31 male, mean age 63.3 ± 13.9 y) with severe sepsis or septic shock (acute physiology and chronic health evaluation (APACHE)-II score 22.1 ± 6.3, sepsis-related organ failure assessment (SOFA) score 8.6 ± 4.4, procalcitonin level 13.7 ± 34.2) were investigated (Table I). Patients entered the study after a mean interval of 7.2 ± 4.3 days of ICU treatment. The major aetiologies of sepsis were peritonitis and pneumonia. Thirteen patients (36%) had evidence of a Gram-positive infection, 11 patients (31%) a mixed Gram-positive/-negative infection, 8 patients (22%) a Gram-negative infection, and 2 patients (6%) had a fungal infection. There were no differences in age, gender, weight, and body mass index between the 2 groups at baseline. As renal function may induce changes in Trp metabolism [27], renal function was assessed in the study cohort. Renal function assessed by serum creatinine levels and need for dialysis was not different between the 2 groups at baseline, or at study days 5 or 9 (all $p > 0.1$).

Course of Trp and Trp metabolite levels

Trp levels were unchanged in the overall samples analysis and in both study groups over the 9-day study period (Figure 1A, $p > 0.5$ for all comparisons). Trp levels did not differ between the study groups at any point of assessment (Figure 1A).

Although Kyn levels were unchanged over the study period in the overall samples analysis (all $p > 0.5$) and in the placebo-treated individuals (Figure 1B, all not significant (NS)), they significantly declined in patients treated with GM-CSF (Figure 1B,

Table I. Baseline study patient characteristics.

	Control group ($n = 18$)	GM-CSF group ($n = 18$)	*p*-Value
Gender (male)	15 (83%)	16 (89%)	1.0
Age (y)	62.8 ± 14.7	63.7 ± 13.4	0.84
BMI (kg/m²)	26.5 ± 4.6	27.6 ± 6.3	0.53
Platelet count ($\times 10^9$/l)	164 ± 112	239 ± 135	0.1
APACHE-II score (baseline)	22 ± 7	22 ± 6	0.79
28-day mortality	4/18 (22%)	3/18 (17%)	0.9

GM-CSF, granulocyte–macrophage colony-stimulating factor; BMI, body mass index; APACHE score, acute physiology and chronic health evaluation score.

RIGHTSLINK

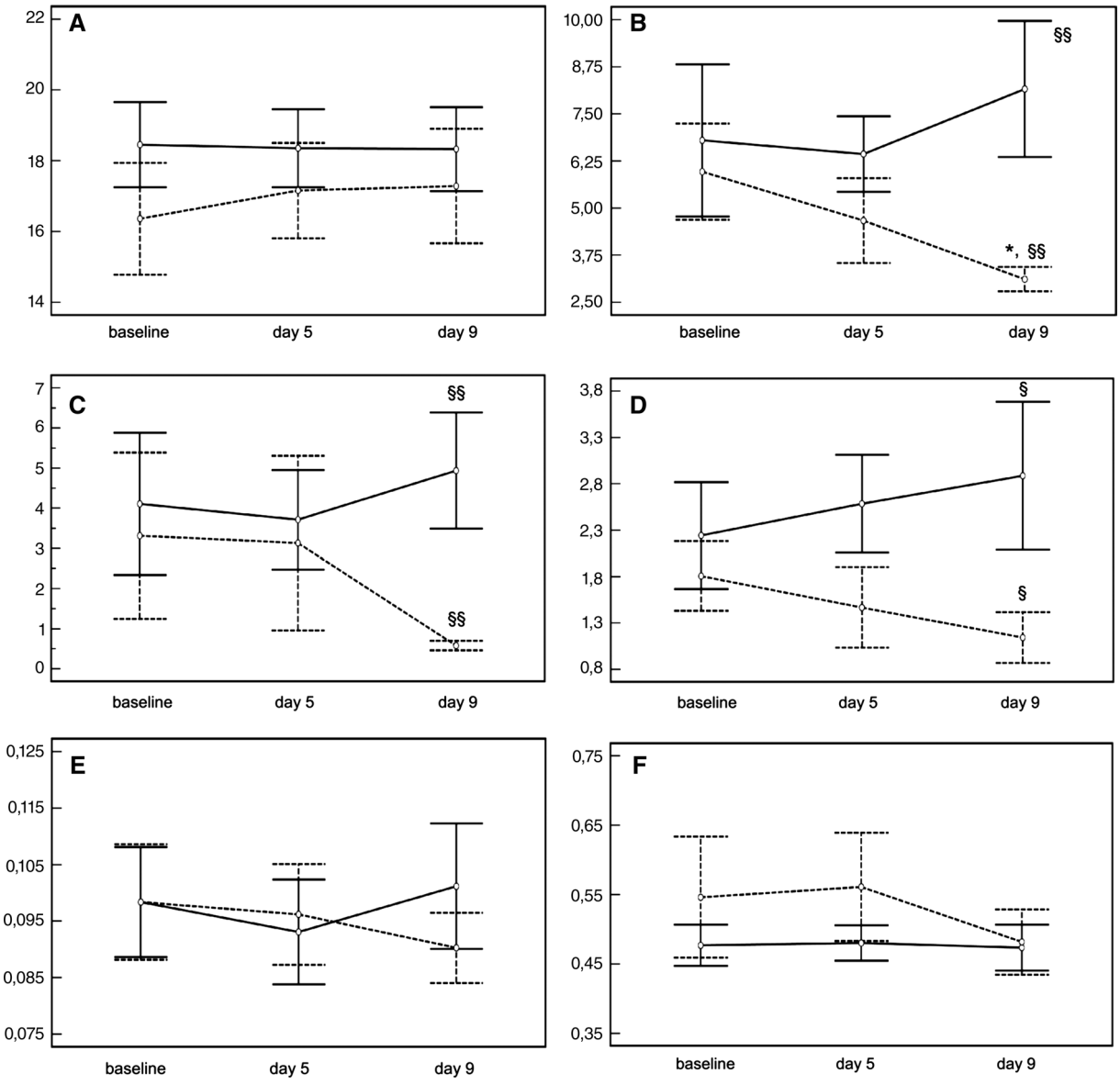

Figure 1. Course of (A) tryptophan (μM), (B) kynurenine (μM), (C) kynurenic acid (μM), (D) quinolinic acid (μM), (E) hydroxytryptophan (μM), and (F) serotonin (μM) serum levels in placebo-treated (solid line) and GM-CSF-treated (dashed line) individuals assessed at baseline, study day 5, and study day 9. $^{*}p<0.05$ in the same group vs day 1; $^{\S}p<0.05$ and $^{\S\S}p<0.01$ between group differences on the same day. Means ± standard errors of the means are given.

$p=0.04$ study day 9 vs baseline). A significant between-groups difference (GM-CSF vs placebo) was noted at study day 9 ($p=0.009$).

Kyna levels decreased in the GM-CSF group (Figure 1C, all NS) and tended to increase in placebo-treated individuals (Figure 1C, NS (baseline vs day 9)). Kyna levels differed significantly between the 2 groups at day 9 ($p=0.008$, Figure 1C).

The course of Quin levels was unchanged in the overall samples analysis (all $p>0.8$). Quin levels decreased in GM-CSF treated patients (Figure 1D), and increased in the placebo group (all NS, Figure 1D). Quin levels differed significantly between the 2 groups at day 9 (all $p=0.04$, Figure 1D).

The serotonin pathway metabolites OH-Trp (Figure 1E) and 5-HT (Figure 1F) were also assessed. OH-Trp and 5-HT levels were unchanged in the overall samples and the 2 study groups at every point of assessment (all $p>0.15$). Between-groups differences in OH-Trp and 5-HT levels were not seen (all $p>0.2$, Figure 1E and 1F).

Course of estimated IDO activity

When compared to healthy controls, baseline IDO activity was induced in patients with sepsis (about factor 3) [11,12,27]. IDO activity in the overall sample ($N=36$ patients) was unchanged until study day 9.

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

RIGHTSLINK

In the GM-CSF group, a significant decline in baseline IDO activity (35.4 ± 21.0) was noticed over the study period (21.6 ± 9.9 at study day 9, $p = 0.02$ vs baseline; Figure 2). In the placebo group, baseline IDO activity increased over the 9-day study period (NS). A significant between-groups difference in IDO activity was noted at study day 9 ($p = 0.03$, Figure 2).

IDO activity and course of mHLA-DR expression and IL-10

Monocytic function was assessed by measurement of mHLA-DR expression [18]. An inverse correlation of mHLA-DR levels with IDO activity was noted ($p = 0.005$, $r = -0.28$, 95% confidence interval (CI) –0.44 to –0.1, Figure 3). This was confirmed in a rank sum analysis ($p < 0.0001$, Spearman's rho –0.43, 95% CI for rho –0.57 to –0.25). A scatter diagram with regression line is shown in Figure 3. In addition, monocytic cytokine release (i.e. ex vivo TNF-α release) was measured in order to assess an additional aspect of monocytic function. A significant correlation of IDO activity with LPS-induced monocytic TNF-α release was identified ($p = 0.029$, $r = -0.27$, 95% CI –0.49 to –0.029). At study day 5, Kyn, Kyna, and Quin were also found to correlate with mHLA-DR ($p = 0.02$, $r = -0.405$; $p = 0.05$, $r = -0.33$; and $p = 0.01$, $r = -0.41$, respectively). At study day 9, Kyn, Kyna, and Quin were all found to significantly correlate with mHLA-DR (all $p < 0.03$, all $r > -0.33$), whereas indices of the serotonergic pathway of Trp metabolism did not correlate with mHLA-DR at any point of assessment.

IL-10 [30] was also tested for correlations with Trp metabolism and IDO activity. In the overall samples analysis, a significant correlation of IL-10 levels with IDO activity was noted ($p = 0.0001$, $r = 0.37$, 95% CI 0.19–0.52). Moreover, Kyn, Kyna, and Quin significantly correlated with IL-10 levels at study days 5 and 9 (day 5: all $p < 0.001$, $r > 0.5$; day 9: all $p < 0.04$, $r > 0.35$).

IDO activity and course of procalcitonin and GM-CSF serum levels

Procalcitonin (PCT) levels were found to correlate with IDO activity (Figure 4). This is interesting as PCT levels may reflect the degree of 'bacterial burden' in sepsis [28,29,31] and may provide further evidence that IDO activity is indeed induced in clinical situations associated with increased 'bacterial burden'. In detail, the overall level of significance was $p < 0.0001$ ($r = 0.56$, 95% CI 0.40–0.68, Figure 4, overall samples analysis). This was confirmed in a rank sum analysis ($p < 0.0001$, Spearman's rho 0.51, 95% CI for rho 0.35–0.64). In addition, GM-CSF serum levels were tested for direct correlations with IDO activity and a trend towards a significant correlation was identified ($p = 0.1$, $r = 0.16$).

Discussion

We demonstrate herein that immunostimulatory therapy with GM-CSF induces changes in Trp metabolism in patients with severe sepsis and septic

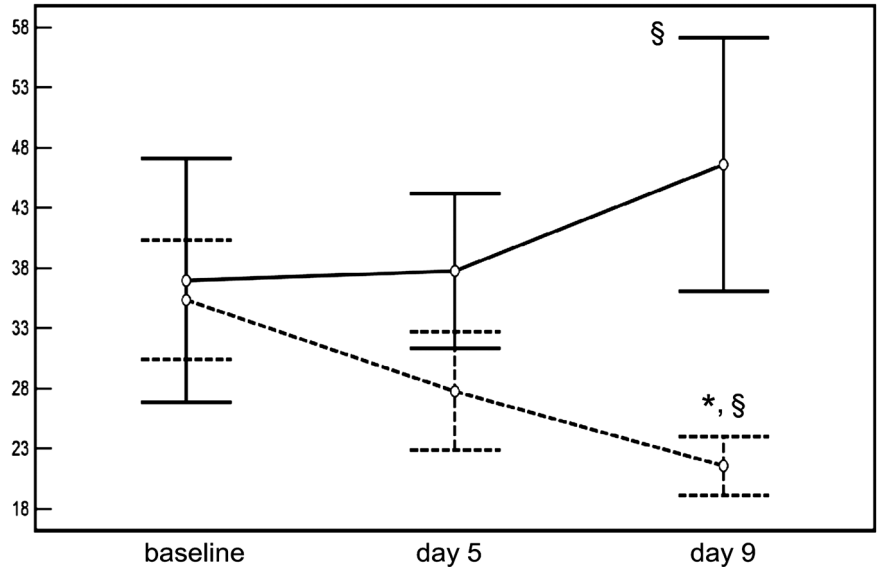

Figure 2. Course of 2,3-indoleamine dioxygenase (IDO) activity (Kyn × 100/Trp) in both study groups from baseline to study days 5 and 9. Placebo-treated individuals (solid line) and GM-CSF-treated individuals (dashed line) are shown. $^{*}p = 0.02$ in the same group vs day 1; $^{\S}p = 0.03$ between-groups difference on the same day. Means ± standard errors of the means are given.

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

RIGHTSLINK

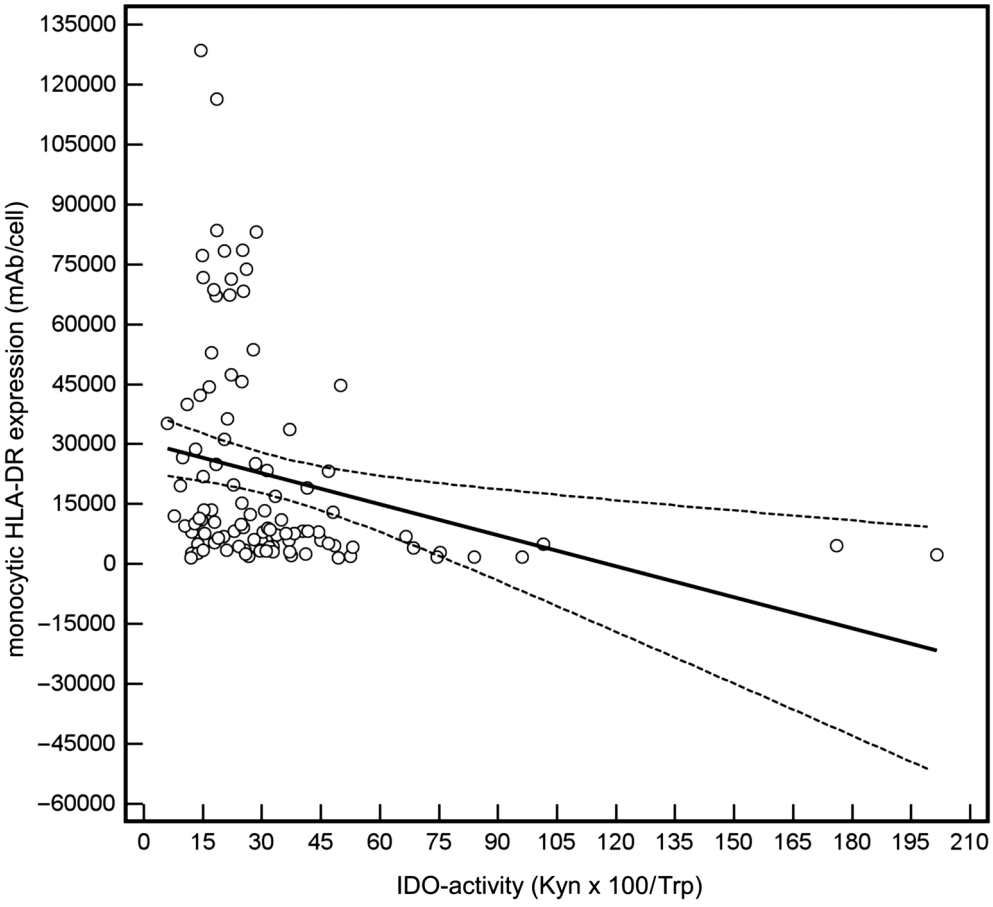

Figure 3. Overall samples analysis (n = 105): scatter diagram with regression line demonstrating a correlation of IDO activity with mHLA-DR expression (given in monoclonal antibodies (mAb) per cell). Dashed line indicates the 95% confidence interval; $p = 0.005$, $r = -0.28$ (95% CI –0.44 to –0.1).

shock. When compared to controls, systemic IDO activity was significantly reduced after 8 days of GM-CSF therapy (Figure 2). Moreover, metabolites downstream of IDO (i.e. Kyn, Kyna, Quin) were reduced in patients receiving GM-CSF (Figure 1B–D), whilst serotonin pathway metabolites remained unchanged (Figure 1E,F).

In line with previous findings [11], we confirm in our analysis that IDO activity and kynurenines are induced in patients with severe sepsis and septic shock (Figure 2). Indeed, when compared to previous data from healthy controls, baseline IDO activity was increased in the study cohort by a factor of about 3 [11,12,27] and IDO activity decreased under GM-CSF treatment. Nevertheless, although we were unable to elucidate the mechanism behind the observed effects, the decline in elevated IDO activity and kynurenine levels was associated with normalization of monocytic function (assessed by mHLA-DR expression and monocytic TNF-α release), as well as diminished PCT serum levels (Figure 4). This may provide evidence that in sepsis, monocytic immune reconstitution and clinical convalescence is accompanied by decreased levels of both IDO activity and metabolites downstream of IDO.

Moreover, in the analysis presented here we noted a significant correlation of IL-10 serum levels with systemic IDO activity in human sepsis. This is in line with previous reports indicating that IL-10 serum levels reflect clinical severity in patients with severe sepsis and septic shock [30]. Products 'downstream' of IDO (i.e. Kyn, Kyna, Quin), but not metabolites of the serotonin pathway of Trp metabolism, were also found to significantly correlate with IL-10 levels at study days 5 and 9. Our data thus underline the fact that GM-CSF therapy induces changes in cytokine expression profiles in human sepsis.

GM-CSF treatment has been shown to reverse monocytic deactivation in patients with sepsis [23]. We were therefore interested in whether recovery of monocytic function (i.e. increase in both mHLA-DR expression and ex vivo LPS-induced monocytic TNF-α release) is associated with a decline in IDO activity. Indeed, an inverse correlation of both mHLA-DR and ex vivo TNF-α release with IDO activity was noted. As a mounting body of data indicates that the levels of

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

RIGHTSLINK

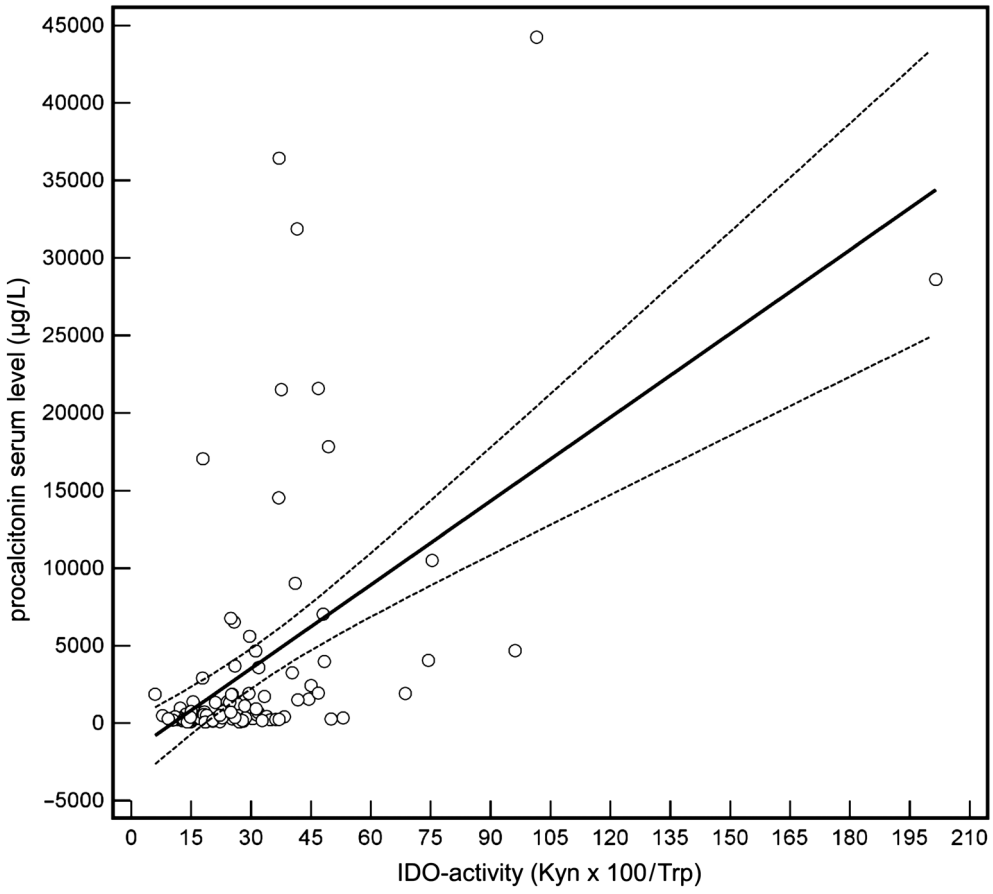

Figure 4. Overall samples analysis ($n = 100$): scatter diagram with regression line demonstrating a correlation of IDO activity (Kyn × 100/Trp) with procalcitonin serum levels (μg/l). Dashed line indicates the 95% confidence interval; $p < 0.0001$, $r = 0.56$ (95% CI 0.40–0.68).

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

mHLA-DR expression reflect the functional status of cell-mediated immunity in patients with sepsis [17,20,21], this may point to a link between cellular immunity/cytokine expression profiles and Trp metabolism in septic patients. In addition, we were interested in whether a decrease in PCT levels, which may indicate a diminished degree of 'bacterial burden' in patients with sepsis [28,29,31], also correlates with a decrease in IDO activity. We identified a significant correlation between IDO activity and PCT levels (Figure 4). In addition, we tested whether IDO activity directly correlates with GM-CSF serum levels and disease severity (assessed by the APACHE-II score). We found that both GM-CSF serum levels and APACHE-II scores showed a trend towards a significant correlation with IDO activity (data not shown).

Some limitations of this analysis deserve further discussion, among these being the fact that renal function is often impaired in sepsis. Recently we have shown a direct relationship between the severity of chronic kidney disease and the degree of IDO activity and 'downstream' levels of Trp catabolites [27]. Although no differences in creatinine serum levels and the need for renal replacement therapy were observed between the study groups, we cannot exclude an effect of kidney injury on our data with certainty. Second, we did not assess the activity of the hepatic enzyme tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), which catabolizes about 1% of Trp. However, as TDO is not inducible by cytokines or bacterial products, we believe that TDO activity may only be of minor importance in sepsis [4,7]. Third, a surrogate marker for bacterial infection (i.e. PCT) [28,29,31] was used in the analysis presented here. Thus, respective data should therefore be interpreted with caution. Lastly, as mentioned before, the study sample size is rather limited and further studies in larger sepsis populations are needed.

In conclusion, our data show that GM-CSF-induced reconstitution of monocytic function is associated with substantial changes in IDO activity and Trp metabolism in septic patients. As IDO has previously been shown to be induced mainly by mediators referred to as 'pro-inflammatory', we propose a differentiated regulation of IDO in sepsis. Our finding that treatment with GM-CSF reduces IDO activity is supported by the fact that metabolites 'downstream' of IDO, but not metabolites of the serotonin

RIGHTSLINK

pathway, are influenced by GM-CSF therapy. Although the exact mechanisms behind the capacity of GM-CSF to decrease IDO activity in human sepsis remain to be elucidated, our data underline the importance of IDO in the context of immune regulation in patients with severe sepsis and septic shock.

Acknowledgements

The authors thank Tycho Baumann and Katrin Hetzger as well as all the doctors, nurses, and technicians of the nephrology, intensive care and medical immunology departments, Charité University Medicine, Berlin, Germany for their dedicated help and support.

Declaration of interest: The authors declare that they have no competing interests, financial or otherwise.

References

[1] Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. Immunol Cell Biol 2003;81:247–65.
[2] Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. Pharmacol Rev 1993;45:309–79.
[3] Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK. Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. Biochem Soc Trans 2008;36:1120–3.
[4] Zelante T, Fallarino F, Bistoni F, Puccetti P, Romani L. Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host. Microbes Infect 2009;11:133–41.
[5] Belladonna ML, Puccetti P, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Volpi C, et al. Immunosuppression via tryptophan catabolism: the role of kynurenine pathway enzymes. Transplantation 2007;84(Suppl):S17–20.
[6] Cherayil BJ. Indoleamine 2,3-dioxygenase in intestinal immunity and inflammation. Inflamm Bowel Dis 2009;15:1391–6.
[7] Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. Nat Rev Immunol 2007;7:817–23.
[8] Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. Nat Med 2004;10:187–92.
[9] Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, et al. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. Eur J Immunol 2007;37:3054–62.
[10] Ploder M, Spittler A, Schroecksnadel K, Neurauter G, Pelinka LE, Roth E, et al. Tryptophan degradation in multiple trauma patients: survivors compared with non-survivors. Clin Sci (Lond) 2009;116:593–8.
[11] Huttunen R, Syrjanen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. Shock 2009 May 18 [Epub ahead of print].
[12] Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine–tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. Shock 2009; 32:29–34.
[13] Costantino G. New promises for manipulation of kynurenine pathway in cancer and neurological diseases. Expert Opin Ther Targets 2009;13:247–58.
[14] Platten M, Ho PP, Youssef S, Fontoura P, Garren H, Hur EM, et al. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. Science 2005;310: 850–5.
[15] Tan P, Bharath A. Manipulation of indoleamine 2,3-dioxygenase; a novel therapeutic target for treatment of diseases. Expert Opin Ther Targets 2009;13:987–1012.
[16] Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. Lancet 2005;365:63–78.
[17] Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature 2002;420:885–91.
[18] Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. Clin Chem 2005;51: 2341–7.
[19] Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. Nat Med 1997;3: 678–81.
[20] Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. Mol Med 2008;14:64–78.
[21] Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Sepsis: time has come to focus on the later stages. Med Hypotheses 2008;71: 203–8.
[22] Carr R, Brocklehurst P, Dore CJ, Modi N. Granulocyte–macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial. Lancet 2009;373:226–33.
[23] Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, et al. GM-CSF to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind randomized placebo-controlled multicenter trial. Am J Respir Crit Care Med 2009;180:640–8.
[24] Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, et al. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. Intensive Care Med 2003; 29:646–51.
[25] Schefold JC, von Haehling S, Corsepius M, Pohle C, Kruschke P, Zuckermann H, et al. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. Shock 2007;28:418–25.
[26] Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. Nat Rev Immunol 2008;8:533–44.
[27] Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. Nephrol Dial Transplant 2009;24:1901–8.
[28] Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. Crit Care Med 2008;36:941–52.
[29] Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? Crit Care Clin 2006;22:503–19, ix–x.
[30] Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. J Leukoc Biol 2005;77:3–15.
[31] de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiriou J, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. Intensive Care Med 2008;34:518–22.

Scand J Infect Dis Downloaded from informahealthcare.com by Univ Klin Benjamin Franklin
For personal use only.

RIGHTSLINK

Schefold J.C., Zeden J.-P., Fotopoulou C., Von Haehling S., Pschowski R., Hasper D., Volk H.D., Schuett C. und Reinke P.: Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant 24, 6* (Jun 2009), 1901-8.

Eigenleistung: Idee und Konzeption der Studie, Massenspektrometrie, Auswertung (in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. J. Schefold).

14. O'Hare A, Vittinghoff E, Hsia J *et al*. Renal insufficiency and the risk of lower extremity peripheral arterial disease: results from the heart and estrogen/progestin replacement study (HERS). *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1046–1051
15. Stevens LA, Stoycheff N. Standardization of serum creatinine and estimated GFR in the kidney early evaluation program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 2008; 51(Suppl 2): S77–S82
16. Myers GL, Miller WG, Coresh J *et al*. Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the laboratory working group of the national kidney disease education program. *Clin Chem* 2006; 52: 5–18
17. Lavery LA, Armstrong DG, Vela SA *et al*. Practical criteria for screening patients at high risk for diabetic foot ulceration. *Arch Intern Med* 1998; 158: 157–162
18. Dinh TL, Veves A. A review of the mechanisms implicated in the pathogenesis of the diabetic foot. *Low Extrem Wounds* 2005; 4: 154–159
19. Bohlender JM, Franke S, Stein G *et al*. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: F645–F659
20. Rüster C, Bondeva T, Franke S *et al*. Advanced glycation end-products induce cell cycle arrest and hypertrophy in podocytes. *Nephrol Dial Transplant* 2008; 23: 2179–2191
21. Goova MT, Li J, Kislinger T *et al*. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 2001; 159: 513–525
22. Wendt TM, Tanji N, Guo J *et al*. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003; 162: 1123–1137
23. Pham TT, Sim JJ, Kujubu DA *et al*. Prevalence of nondiabetic renal disease in diabetic patients. *Am J Nephrol* 2007; 27: 322–328
24. Mühlhauser I, Overmann H, Bender R *et al*. Social status and the quality of care for adult people with type I (insulin-dependent) diabetes mellitus-a population-based study. *Diabetologia* 1998; 41: 1139–1150
25. Bryson CL, Ross HJ, Boyko EJ *et al*. Racial and ethnic variations in albuminuria in the US third national health and nutrition examination survey (NHANES III) population: associations with diabetes and level of CKD. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 720–726
26. McCabe CJ, Stevenson RC, Dolan AM. Evaluation of a diabetic foot screening and protection programme. *Diabet Med* 1998; 15: 80–84
27. Cavanagh PR, Lipsky BA, Bradbury AW *et al*. Treatment for diabetic foot ulcers. *Lancet* 2005; 366: 1725–1735

Received for publication: 31.8.08; Accepted in revised form: 3.12.08

Nephrol Dial Transplant (2009) 24: 1901–1908
doi: 10.1093/ndt/gfn739
Advance Access publication 20 January 2009

Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms

Jörg C. Schefold[1], Jan-Philip Zeden[2], Christina Fotopoulou[3], Stephan von Haehling[4], Rene Pschowski[1], Dietrich Hasper[1], Hans-Dieter Volk[5], Christine Schuett[2] and Petra Reinke[1]

[1]Department of Nephrology and Intensive Care, Charité University Medicine, Campus Virchow Clinic, Berlin, [2]Department of Immunology, University of Greifswald, Greifswald, [3]Department of Obstetrics and Gynecology, Charité University Medicine, Campus Virchow Clinic, [4]Department of Cardiology, University Medicine Berlin, Charité Virchow Clinic and [5]Department of Medical Immunology, University Medicine Berlin, Charité Campus Mitte, Berlin, Germany

Correspondence and offprint requests to: Jörg C. Schefold; E-mail: schefold@charite.de

Abstract

Background. Tryptophan (Trp) is catabolized by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Changes in Trp metabolism and IDO activity in chronic kidney disease (CKD) have not been widely studied, and the impact of haemodialysis is uncertain. Here we investigate Trp catabolism, IDO activity and the role of inflammation in moderate to very severe CKD and haemodialysis.

Methods. Eighty individuals were included in a prospective blinded endpoint analysis. Using tandem mass spectrometry, serum levels of Trp, kynurenine (Kyn), kynurenic-acid (Kyna), quinolinic-acid (Quin), 5-hydroxytryptophan (OH-Trp), serotonin (5-HT), estimated IDO activity and inflammatory markers were assessed in 40 CKD patients (age 57 ± 14 years, 21 male, creatinine 4.5 ± 2.7, $n = 17$ receiving haemodialysis), and in 40 healthy controls (age 34 ± 9 years, 26 male).

Results. Trp levels were unchanged in CKD ($P = 0.78$ versus controls). Serum levels of Kyn, Kyna and Quin increased with CKD severity (stages 4, 5 versus controls all $P \leq 0.01$). IDO activity was significantly induced in CKD and correlated with disease severity (stages 3–5 versus controls, all $P \leq 0.01$) and inflammatory markers [high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP), soluble TNF-receptor-1 (sTNFR-I); both $P \leq 0.03$]. IDO products (Kyn, Kyna, Quin) correlated also with hsCRP and sTNFR-I (all $P \leq 0.04$). Haemodialysis did not influence IDO activity ($P = 0.26$) and incompletely removed Kyn, Kyna, Quin, OH-Trp

© The Author [2009]. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

and 5-HT by 22, 26, 50, 44 and 34%, respectively. In multiple regression, IDO activity correlated with hsCRP and sTNFR-I (both $P \leq 0.03$) independent of serum creatinine, age and body weight.

Conclusions. IDO activity and serum levels of tryptophan catabolites of the kynurenine pathway increase with CKD severity. In CKD, induction of IDO may primarily be a consequence of chronic inflammation.

Keywords: IDO; immune system; infection; kynurenine; renal failure

Introduction

Catabolism of the essential amino acid tryptophan (Trp) is tightly regulated in healthy individuals, occurs via two distinct pathways (Figure 1), and is controlled to ~99% by the rate-limiting enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO). Induced IDO activity leads to the formation of kynurenine (Kyn), kynurenic acid (Kyna) and quinolinic acid (Quin) [1, 2]. This may contribute to the restoration of energy supplies via formation of acetyl-CoA (glutarate pathway) and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD pathway) (Figure 1).

Trp catabolites have been demonstrated to be involved in the development of key uraemic symptoms. This includes, among others, neurotoxicity [3–5], lipid metabolism disorders and atherosclerosis [6] and increased susceptibility to infection [7,8]. IDO itself has been demonstrated as a key player in immunologic processes including infection, autoimmunity, allergic reaction, chronic inflammation and renal injury [9–17]. IDO activity, which may be estimated via the Kyn/Trp ratio, is induced by a number of pro-inflammatory stimuli including endotoxin (LPS), bacterial DNA [18,19], pro-inflammatory T_H1-cytokines such as interferon-γ [10,20,21] and soluble cytokine receptors [10]. Increased IDO activity may thus be observed in states of chronic infection [22], malignant disease [23] and neuropsychiatric diseases [24].

Few data from animal models suggest that Trp and metabolites of the kynurenine pathway are excreted via the kidneys. However, Trp metabolism and IDO activation in chronic kidney disease (CKD) have not been widely studied, and the impact of haemodialysis on Trp and respective catabolites remains uncertain. This seems of interest as CKD is strongly attended by the presence of chronic inflammation, which has been convincingly demonstrated to be associated with adverse outcomes in CKD.

Here, we investigate the relationship between tryptophan, downstream Trp catabolites and IDO activity with measures of kidney function, clinical CKD stages and prognostically relevant indices of chronic inflammation, such as high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and the soluble TNF-receptor-1 (sTNFR-I).

Subjects and methods

Study population

In a prospective study, 40 consecutive Caucasian patients [21 male, age 57 ± 14 years, serum creatinine 4.5 ± 2.7, serum urea 101.4 ± 42.0 mg/dl, estimated glomerular filtration rate (eGFR) 22.4 ± 13.6 ml/min/1.73 m^2, creatinine clearance 21.6 ± 14.3 ml/min, body weight 67.1 ± 2.8 kg and body height 165.5 ± 9.4 cm] with CKD according to National Kidney Foundation (NKF) stages 3–5 hospitalized in the Charité University Hospital, Berlin, and the University Hospital of Greifswald, Germany, were included in this analysis (Table 1). Seventeen patients were in stage 5 (end-stage renal disease, ESRD) and received chronic haemodialysis (three times per week, 4 h per session). Major underlying kidney disease was diabetic nephropathy ($n = 19$, 48%), hypertensive nephropathy ($n = 16$, 40%), glomerulonephritis ($n = 4$, 10%) and IgA-nephropathy ($n = 1$, 0.3%). Major concomitant diseases were coronary artery disease ($n = 32$, 80%), hyperlipoproteinaemia ($n = 26$, 65%) and congestive heart failure ($n = 14$, New York Heart association class 1–2, 35%). Forty healthy Caucasian volunteers (age 34 ± 9 years, 26 male, serum creatinine 1.1 ± 0.2, body weight 72 ± 3.9 kg) served as controls.

For inclusion into the analysis, participants were required to meet the following criteria: age >18 years and hospitalization related to any cause other than infection or acute inflammation. Patients were excluded when signs of systemic or localized infection (bacterial, fungal or viral) were present (dry cough, expectoration, positive chest X-ray, signs of urinary infection or diarrhoea). Patients with malignoma, and acute leukaemia, or patients on a medication known to interfere with Trp metabolism (e.g. selective serotonin reuptake inhibitors) were also excluded. The study was performed in accordance with the *Declaration of Helsinki.* Informed consent was achieved.

Assessment of kidney function and indices of inflammation

Kidney function was assessed using the following indices: serum creatinine (mg/dl), estimated creatinine clearance (Cockroft-Gault formula), serum urea (mg/dl) and estimated GFR [modification of diet in renal disease (MDRD) formula]. For assessment of chronic inflammation, the following indices were measured in a certified laboratory: hsCRP (assessed using immunoturbidimetry, mg/dl), white blood cell (WBC) count ($\times 10^9$/l), platelet count ($\times 10^9$/l) and sTNFR-I (pg/ml, upper and lower limit of detection 15.6–1000 pg/ml). For assessment of Trp metabolism, plasma ethylene-diaminetetraacetic acid samples were collected in the morning before breakfast (7:00–8:30 am) and in the early afternoon (1:00–2:30 pm), or directly before and 20 min after haemodialysis [for patients in kidney disease outcomes quality initiative (KDOQI) stage 5], respectively. All samples were peripheral venous blood samples and were stored at −80°C until assay.

Analysis of Trp metabolism

One hundred microlitre plasma was analysed after addition of 50 μl sulfosalicylic acid, 40 μl water and 10 μl standard solution [tryptophan-indole-d5 (d5-Trp) and 5-times deuterized kynurenic acid (d5-Kyna), Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA]. The samples were mixed, stored at 4°C (30 min) and centrifuged (20 000*g*, 10 min). For recording, a Wallac MS2 tandem mass spectrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) equipped with an electrospray ion source was used. Ions were detected in a positive ion mode using multiple reaction monitoring. The first quadrupole selected the protonated ions at mass-to-charge ratio (*m*/*z*) 205, 210, 177, 209, 168, 190 and 195 for Trp, d5-Trp, 5-HT, Kyn, Quin, Kyna and d5-Kyna, respectively. Nitrogen served as collision gas. Fractioned ions *m*/*z* 188 for Trp, 193 for d5-Trp, 160 for 5-HT, 192 for Kyn, 78 for Quin, 144 for Kyna and 149 for d5-Kyna were detected in quadrupole Q3 (Q3) (flow solvent: 0.02% formic acid in 50% aqueous acetonitrile, flow rate 75 μl/min). For quantification, plasma samples were spiked with standards. Calibration curves were fitted by linear least-square regression and correlated with the concentration of d5-Trp and d5-Kyna.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the MedCalc 9.0.1 software (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). All data were tested for normal distribution using the Kolmogorov–Smirnov test and were found to be normally distributed. The coefficient of determination is provided, when applicable. Univariate and multivariate regression analyses were applied to assess factors that independently predicted IDO activity. A

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

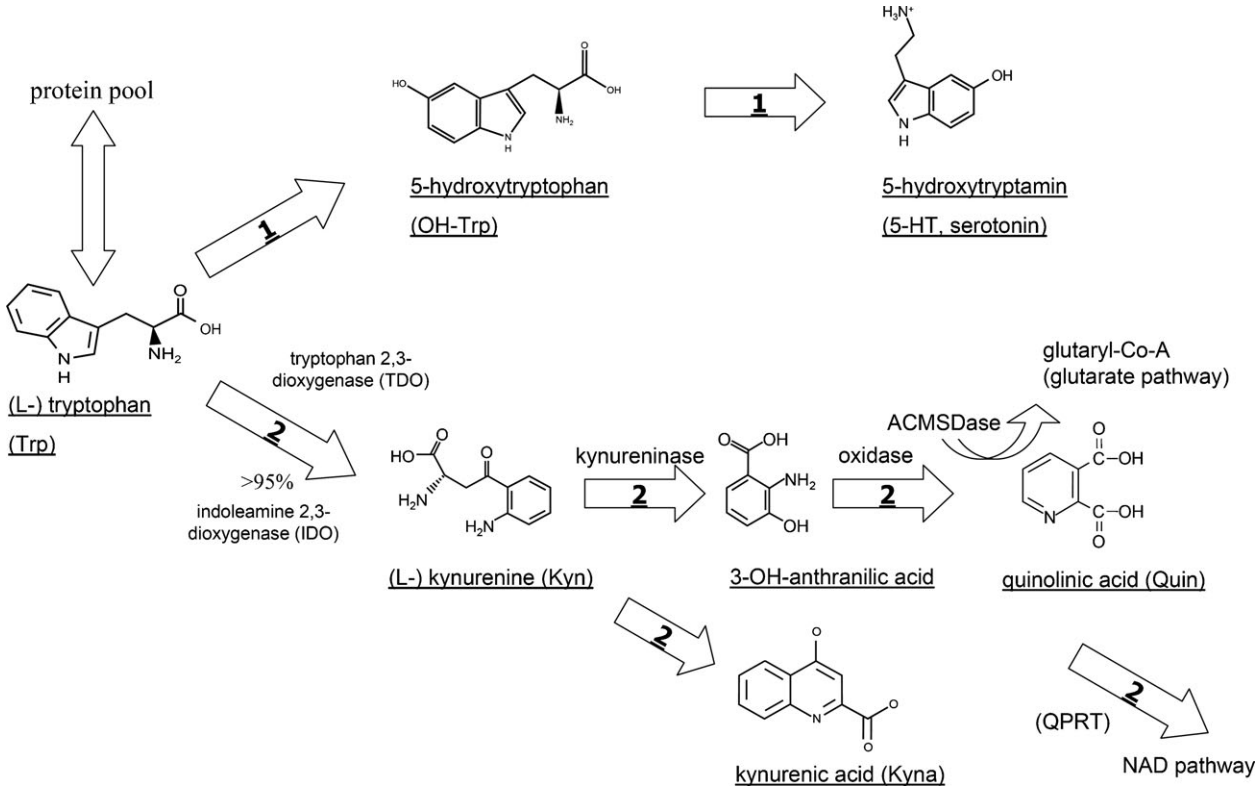

Fig. 1. Overview of Trp catabolism and the role of IDO. Two distinct pathways of Trp catabolism are indicated: 1 = 5-HT branch, 2 = kynurenine branch including both quinolinic branch and transamination branch. ACMSDase, amino-carboxymuconate-semialdehyde. QPRT, quinolinic acid phosphoribosyltransferase.

Table 1. Kidney function and indices of inflammation in CKD stages 3–5

	CKD stage 3 (30–59 ml/min/ 1.73 m^2) $n = 10$ (25%)	CKD stage 4 (15–29 ml/min/ 1.73 m^2) $n = 14$ (35%)	CKD stage 5 (<15 ml/min/ 1.73 m^2) $n = 17$ (42%)
Serum creatinine (mg/dl)	$2.0 \pm 0.7^{*, **}$	$3.7 \pm 1.3^{**}$	6.6 ± 1.5
Serum urea (mg/dl)	89.7 ± 37.0	102.6 ± 47.6	107.8 ± 40.9
Creatinine clearance (ml/min)	$41.9 \pm 12.5^{\#, \#\#\#}$	$20.7 \pm 5.2^{\#\#}$	10.3 ± 3.0
White blood cell count ($\times 10^9$/l)	8.5 ± 3.3	8.7 ± 6.4	7.9 ± 3.2
Platelet count ($\times 10^9$/l)	200.6 ± 93.8	240.6 ± 113.1	243.6 ± 142.0
High-sensitivity C-reactive protein (mg/dl)	$0.7 \pm 0.6^{\S}$	2.4 ± 2.1	3.2 ± 2.5
Soluble TNF receptor I (pg/ml)	$4365.6 \pm 4154.1^{\S, \S\S}$	$8594.8 \pm 5443.1^{\S\S\S}$	12617.2 ± 4935.0

$^*P = 0.001$ versus stage 4; $^{**}P < 0.0001$ versus stage 5; $^{\#}P \leq 0.01$ versus stage 4; $^{\#\#}P \leq 0.01$ versus stage 5; $^{\#\#\#}P < 0.001$ versus stage 5; $^{\S}P \leq 0.005$ versus stage 5; $^{\S\S}P = 0.04$ versus stage 4; $^{\S\S\S}P = 0.04$ versus stage 5.

value of $P < 0.05$ was considered to be significant. Results and relative changes are reported as means ± standard deviations (SD), if not indicated otherwise.

Results

Trp metabolism in controls

In controls ($n = 40$), the mean morning Trp level was 19.04 ± 3.7 μM. The following mean levels were measured in the morning of the respective day of assessment (Figure 2a–g): Kyn 2.6 ± 0.26 μM, Kyna 0.55 ± 0.23 μM, Quin 0.23 ± 0.09 μM and IDO activity 14.04 ± 2.4. In the 5-HT branch, OH-Trp levels were 0.07 ± 0.04 μM and 0.84 ± 0.19 μM (5-HT).

Trp and Trp catabolites over time

In order to assess potential changes in the levels of Trp, downstream Trp catabolites and IDO activity across the

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

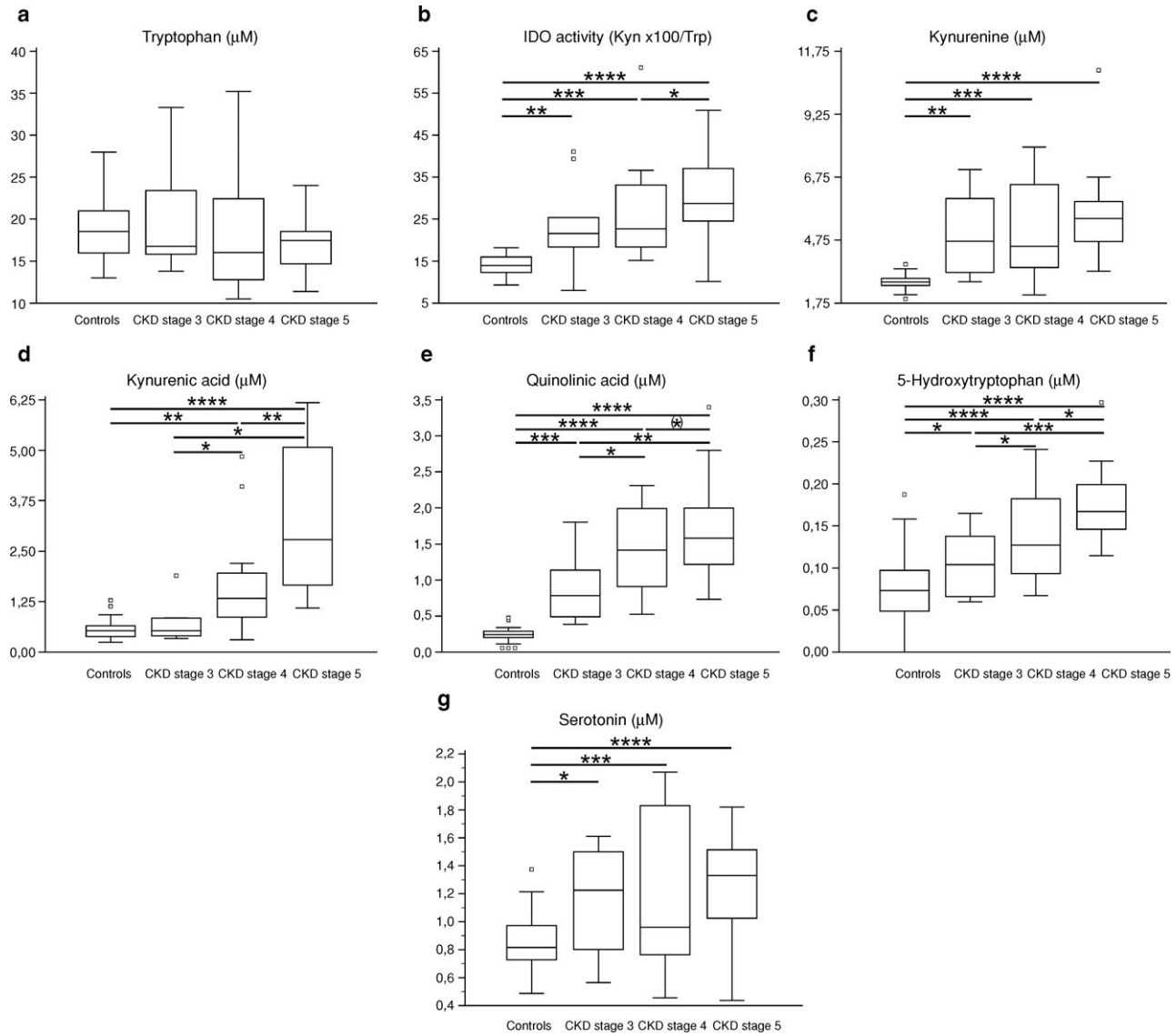

Fig. 2. Box and whisper plots demonstrating the course of tryptophan and respective metabolites through the clinical stages of CKD (a–g). $^{*}P \leq 0.05$; $^{**}P \leq 0.01$; $^{***}P \leq 0.005$; $^{****}P \leq 0.0001$.

day, morning and afternoon samples (or before and after haemodialysis for study patients receiving haemodialysis, i.e. CKD stage 5) were analysed. In all study cohorts, morning and afternoon samples were not found to differ significantly (all $P > 0.06$).

Trp metabolism, IDO activity and kidney function/clinical CKD stages

Trp and catabolites were checked for correlations with measures of kidney function (creatinine, urea, creatinine clearance, eGFR) and CKD stages.

(Trp): Trp levels were unchanged in CKD and did not correlate with measures of kidney function (*n.s.* versus all groups, Figure 2a).

(IDO): IDO activity increased with CKD severity (Figure 2b) and correlated with creatinine and creatinine clearance (both $P \leq 0.05$).

(Kyn): Kyn levels significantly increased in CKD stages 3–5 (Figure 2c) but did not directly correlate with kidney function (all $P \leq 0.05$).

(Kyna): Kyna levels increased significantly with respective CKD stages (Figure 2d) and correlated with serum creatinine ($P < 0.0001$, $r = 0.74$), creatinine clearance ($P < 0.0001$, $r = -0.65$) and eGFR ($P = 0.0046$, $r = -0.53$).

(Quin): Quin levels increased with respective CKD stages (Figure 2e) and correlated with serum creatinine, and creatinine clearance (both $P \leq 0.04$).

(OH-Trp): OH-Trp increased with CKD severity (Figure 2f) and correlated with creatinine ($P = 0.0001$,

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

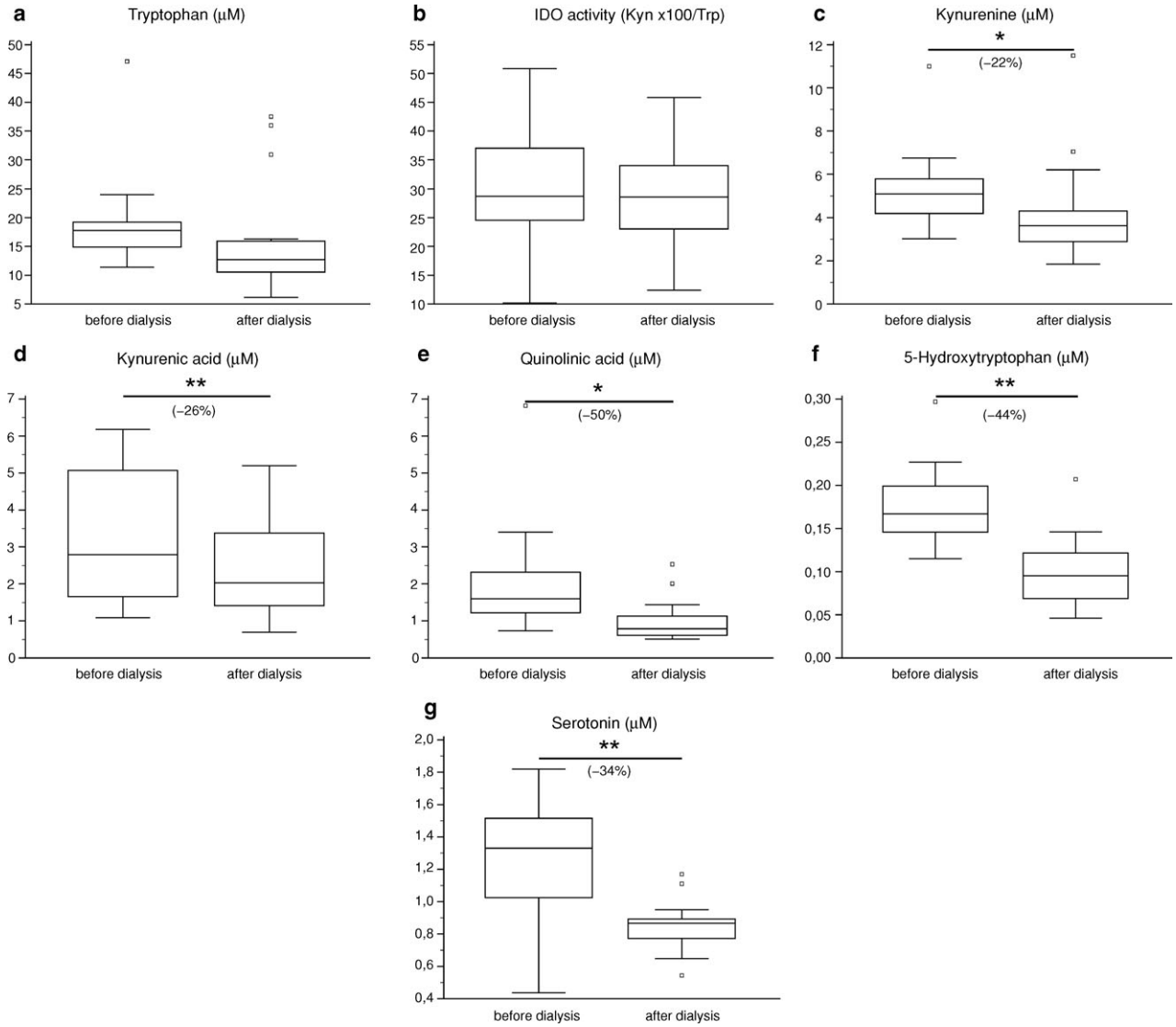

Fig. 3. Box and whisper plots indicating the levels of tryptophan and respective metabolites in patients before and after haemodialysis (a–g, $n = 17$). Respective changes (%) are indicated. $^{*}P \leq 0.002$; $^{**}P \leq 0.0001$.

$r = 0.57$), creatinine clearance ($P < 0.0001$, $r = -0.59$) and eGFR ($P = 0.006$, $r = -0.51$).

(5-HT): 5-HT levels increased in CKD (Figure 2g) but did not correlate with kidney function.

Markers of inflammation, Trp catabolism and kidney function

Markers of inflammation (WBC and platelet counts, hsCRP and sTNFR-I) were tested for correlations with Trp, respective catabolites and indices of kidney function. IDO, downstream catabolites and indices of kidney function correlated with hsCRP and sTNFR-I but not with WBC or platelet counts. Haemodialysis did not influence IDO activity ($P = 0.26$) and incompletely removed Kyn, Kyna, Quin, OH-Trp and 5-HT by 22, 26, 50, 44 and 34%, respectively (Figure 3).

HsCRP and sTNFR-I levels correlated with serum creatinine ($P = 0.0001$, $r = 0.58$ and $P = 0.04$, $r = 0.33$, respectively), creatinine clearance ($P = 0.0002$, $r = -0.56$ and $P = 0.02$, $r = -0.38$) and eGFR ($P = 0.04$, $r = -0.31$ and $P = 0.03$, $r = -0.27$). IDO activity, Kyn, Kyna, Quin and OH-Trp (but not Trp and 5-HT) correlated with hsCRP levels (all $P \leq 0.04$). IDO activity correlated with sTNFR-I levels ($P = 0.01$, $r = 0.4$). Moreover, sTNFR-I levels correlated with products downstream of IDO such as Kyn ($P = 0.04$, $r = 0.31$), Kyna ($P = 0.0002$, $r = 0.56$) and Quin ($P = 0.001$, $r = 0.50$). WBC counts did not correlate with respective parameters of Trp metabolism (all $P > 0.05$). Platelet counts correlated with Kyn and Kyna (both $P = 0.02$, $r = 0.27$), Quin ($P = 0.005$, $r = -0.31$)

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

and Trp ($P = 0.01$, $r = 0.28$), but not with IDO activity, 5-HT or OH-Trp.

Between-group comparison for indices of inflammation

WBC, platelet count, hsCRP and sTNFR-I levels were measured in order to assess the degree of chronic inflammation in the study population. WBC and platelet counts were rather unchanged, whereas hsCRP and sTNFR-I levels increased throughout CKD stages 3–5 (Table 1).

Multiple regression analysis

In multiple regression, IDO activity correlated with hsCRP and sTNFR-I ($P = 0.03$, $r = 0.42$ and $P = 0.01$, $r = 0.56$) independently of serum creatinine ($P = 0.27$, $r = 0.12$), age ($P = 0.50$, $r = -0.11$) and body weight ($P = 0.57$, $r = -0.16$). In this analysis, the multiple correlation coefficient was 0.59. The overall significance level for the analysis of variance was $P = 0.021$. IDO activity remained independent when eGFR instead of body weight entered the analysis ($P = 0.69$, $r = 0.03$).

Discussion

We found that Trp levels were relatively unchanged in CKD. Increasing CKD severity yielded elevated levels of Trp catabolites of the kynurenine pathway including both the quinolinic and transamination branch (Figure 1). When compared to controls, Kyn, Kyna and Quin levels increased in very severe kidney failure by about a factor 2, 6 and 8, respectively (Figure 2c–e). In addition, a significant correlation of Kyna and Quin with serum creatinine and creatinine clearance was noticed. IDO activity was found induced in CKD, correlated with CKD disease severity and with key inflammatory markers (hsCRP, sTNFR-I). Moreover, a correlation of catabolites downstream of IDO (Kyn, Kyna, Quin) with hsCRP and sTNFR-I was found. In multiple regression, IDO activity correlated with hsCRP and sTNFR-I independently of age, body weight and serum creatinine. This may indicate that induction of IDO in CKD may primarily be induced by inflammatory mechanisms.

Moreover, we found that low-flux haemodialysis did not influence IDO activity and only partially removed Kyn, Kyna, Quin, OH-Trp and 5-HT (Figure 3). Toxic Trp catabolites, which have been implicated in the pathogenesis of key uraemic syndromes [3,5–7,15,24–26,41], may thus only be incompletely removed under 4 h of routine low-flux haemodialysis. Such incomplete removal may be due to protein-binding characteristics, respective distribution volumes, washout effects and turnover of the respective molecules. Thus, although not investigated in the present analysis, even high-flux haemodialysis may not sufficiently remove respective mediators [27].

Chronic inflammation is a well-known feature in CKD. Mounting data points to an important cross-link of inflammation and cardiovascular disease as inflammation has been shown as an integral part of atherosclerosis [34]. Epidemiologically, this seems important as cardiovascular disease is the major cause of morbidity and mortality in CKD and end-stage renal disease (ESRD). Recent prospective epidemiological studies have linked elevated CRP with atherosclerosis in CKD. CRP has consistently been shown to predict cardiovascular and all-cause mortality, and independently predicts death in ESRD [28–33]. The strong association of elevated CRP with inflammation, atherosclerosis and cardiovascular mortality in CKD and ESRD is intriguing, as a single CRP assessment may predict future cardiovascular events [35, 36]. Moreover, sTNFR-I levels have been shown to be elevated in CKD, and a direct link to progression of CKD, vasculopathy and prognosis was established [37–40]. In the present analysis, we found that increased hsCRP and sTNFR-I levels, but not WBC or platelet counts, correlated with decreased kidney function. Indeed, this may indicate the presence of chronic inflammation and increased cardiovascular risk in the study cohort.

Although it was suggested that decreased glomerular filtration *per se* might lead to decreased excretion of Trp catabolites via the kidneys, data from animals models of renal insufficiency suggest the involvement of mechanisms other than just simple renal excretion failure as respective catabolites may also increase without a relevant decline in renal function [26]. However, IDO activity has previously been demonstrated to be induced by a number of immune activators including LPS, neopterin, IFN-γ, soluble cytokine receptors and others [10]. In the present analysis, we demonstrate that IDO activity correlates with CKD severity (Figure 2b). When compared to controls, an about 2-fold increase in IDO activity was observed from moderately reduced kidney function to very severe kidney failure (Figure 2b) and a significant correlation of IDO activity with hsCRP and sTNFR-I was noticed. In multiple regression, we found that IDO activity correlates with hsCRP and sTNFR-I independently of age, body weight and serum creatinine. This may indicate that although IDO activity is induced in CKD, induction of IDO may primarily be due to inflammatory stimuli. Next to inflammation, IDO activation in CKD may be influenced by factors other than inflammatory stimuli. This may include upregulation of hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase, decreased Kyn metabolism, oxidative stress and increased Trp turnover.

About 1% of Trp catabolism occurs via the serotonin (5-HT) pathway (Figure 1). In this analysis, OH-Trp and 5-HT were noticed to increase in CKD (Figure 2f, g). The mechanism behind this may include a diminished 5-HT uptake by platelets in the uraemic environment and increased 5-HT production in intestinal enterochromaffin cells in response to inflammatory stimuli. However, the mechanism behind the increase in OH-Trp and 5-HT is beyond the scope of this analysis and deserve further analyses in subsequent investigations.

Some limitations of this analysis demand discussion. First, we did not access the dietary amino acid intake of our study population. Although Trp levels in CKD have also

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

been documented to differ from that of controls [27,41], we observed rather unchanged Trp levels in CKD (Figure 2a) and under haemodialysis (Figure 3a). This may reflect a relatively good nutritional condition of our study patients. However, although short-term dietary amino acid intake might be of minor impact on overall Trp and Trp catabolite levels, we are unable to rule out an effect of dietary intake. Nevertheless, morning and afternoon Trp levels were found unchanged in all CKD stages investigated. Secondly, we did not directly measure enzymatic IDO activity [42]. Although this might be performed in subsequent studies, estimated IDO activity has previously been shown to accurately assess respective enzymatic activities. Third, KDOQI stage 2 patients were not analysed. This was done in order to concentrate on patients with at least a moderately reduced kidney function. However, it may be interesting to assess Trp catabolism in the very early stages of CKD in subsequent analyses. Moreover, mean age was different between the CKD and control groups. Nevertheless, estimated IDO activity and respective Trp metabolites were found to be independent of age in both CKD patients and in controls.

Here, we demonstrate that Trp catabolites accumulate in CKD. These products, which have been shown to be crucially involved in the pathogenesis of key uraemic syndromes, are only partially removed under routine haemodialysis. IDO activity was found to be induced with increasing CKD disease severity but was not influenced by routine haemodialysis. In multiple regression, IDO activity was found to correlate with hsCRP and sTNFR-I independently of age, body weight and serum creatinine. Our results provide further evidence for the presence of chronic inflammation in CKD, and we propose a role for IDO in this context.

Acknowledgements. The authors thank Maik Stein for contributing to and for supporting the analysis and Gerhard Fusch for performing tandem mass spectrometry measurements. JCS, JPZ, CS and PR planned, developed and analysed all aspects of the analysis and coordinated the input of all authors. RP, CF, SvH and DH collected data, performed statistical tests, and participated in the interpretation of all data. HDV planned, developed and revised the manuscript for important intellectual content. All authors had full access to all of the data, and approved the final version of the manuscript.

Conflict of interest statement. None declared.

References

1. Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 609–620
2. Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 247–265
3. Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 1993; 45: 309
4. Moronil F. Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites. *Eur J Pharm* 1999; 375: 887
5. Widner B, Leblhuber F, Walli J *et al*. Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 133
6. Rudzite V, Jurika E. Kynurenine and lipid metabolism. *Adv Exp Med Biol* 1991; 294: 463–466
7. Bertazzo A, Punzi L, Bertazzolo N *et al*. Tryptophan catabolism in synovial fluid of various arthropathies and its relationship with inflammatory cytokines. *Adv Exp Med Biol* 1999; 467: 565
8. Sakai N, Saito K, Kaufman S *et al*. Induction of neopterin synthesis is not required for cytokine-stimulated tryptophan metabolism. *Biochem J* 1993; 295: 543
9. Munn DH, Zhou M, Attwood JT *et al*. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281: 1191–1193
10. Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 817–823
11. Grohmann U, Volpi C, Fallarino F *et al*. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat Med* 2007; 13: 579–586
12. Sharma MD, Baban B, Chandler P *et al*. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007; 117: 2570–2582
13. Penberthy WT. Pharmacological targeting of IDO-mediated tolerance for treating autoimmune disease. *Curr Drug Metab* 2007; 8: 245–266
14. Platten M, Ho P, Youssef S *et al*. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science* 2005; 310: 850–855
15. Mohib K, Wang S, Guan Q *et al*. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression promotes renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F226–F234
16. Holmes-EW, Russel-PM, Kinzler-GJ *et al*. Inflammation-associated changes in the cellular availability of tryptophan and kynurenine in renal transplant recipients. *Clin Chim Acta* 1994; 227: 1–15
17. Suliman ME, Qureshi AR, Stenvinkel P *et al*. Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *Am J Clin Nutr* 2005; 82: 342–349
18. Yoshida R, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 3998–4000
19. Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T *et al*. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 2004; 10: 187–192
20. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 2005; 106: 2375–2381
21. Grant R, Kapoor V. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in IFN-gamma stimulated astroglioma cells decreases intracellular NAD levels. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 1033–1036
22. Fuchs D, Forsman A, Hagberg L *et al*. Immune activation and decreased tryptophan in patients with HIV-1 infection. *J Interferon Res* 1990; 10: 599–603
23. Huang A, Fuchs D, Widner B *et al*. Tryptophan decrease in advanced colorectal cancer correlates with immune activation and impaired quality of life. *Br J Cancer* 2002; 86: 1691–1696
24. Topczewska-Bruns J, Pawlak D, Tankiewicz A *et al*. Kynurenine metabolism in central nervous system in experimental chronic renal failure. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 177–182
25. Widner B, Leblhuber F, Walli J *et al*. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2000; 107: 343–353
26. Saito K, Fujigaki S, Heyes M *et al*. Mechanism of increases in L-kynurenine and quinolinic acid in renal insufficency. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 279: F565
27. Lesaffer G, De Smet R, Lameire N *et al*. Intradialytic removal of protein-bound uraemic toxins: role of solute characteristics and of dialyser membrane. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 50–57
28. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease: the hidden enemy. *Nephrology* 2006; 11: 36–41
29. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein as a predictor of all-cause mortality: implications for research and patient care. *Clin Chem* 2008; 54: 234–237
30. Oparil S, Oberman A. Nontraditional cardiovascular risk factors. *Am J Med Sci* 1999; 317: 193–207

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

31. Rao M, Guo D, Perianayagam MC *et al*. Plasma interleukin-6 predicts cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005; 45: 324–333
32. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A *et al*. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55: 648–658
33. Zoccali C, Tripepi G, Mallamaci F. Predictors of cardiovascular death in ESRD. *Semin Nephrol* 2005; 25: 358–362
34. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease—a fire that burns within. *Contrib Nephrol* 2005; 149: 185–199
35. Ridker PM, Rifai N, Rose L *et al*. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347: 1557–1565
36. Whicher J, Biasucci L, Rifai N. Inflammation, the acute phase response and atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 495–503
37. Bolton CH, Downs LG, Victory JG *et al*. Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1189–1197
38. Pereira BJ, Shapiro L, King AJ *et al*. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. *Kidney Int* 1994; 45: 890–896
39. Knight EL, Rimm EB, Pai JK *et al*. Kidney dysfunction, inflammation, and coronary events: a prospective study. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1897–1903
40. Tonelli M, Sacks F, Pfeffer M *et al*. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Trial Investigators. Biomarkers of inflammation and progression of chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005; 68: 237–245
41. Martinsons A, Rudzite V, Cernevskis H *et al*. The influence of L-tryptophan peroral load on glomerular filtration rate in chronic glomerulonephritis and chronic renal failure. *Adv Exp Med Biol* 2003; 527: 37–45
42. Braun D, Longman RS, Albert ML. A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation. *Blood* 2005; 106: 2375–2381

Received for publication: 15.10.08; Accepted in revised form: 9.12.08

Nephrol Dial Transplant (2009) 24: 1908–1918
doi: 10.1093/ndt/gfn745
Advance Access publication 20 January 2009

Acetaminophen, aspirin and progression of advanced chronic kidney disease

Marie Evans[1], Carl Michael Fored[2], Rino Bellocco[3,4], Garrett Fitzmaurice[5], Jon P. Fryzek[6,7], Joseph K. McLaughlin[6,7], Olof Nyrén[3,7] and Carl-Gustaf Elinder[1]

[1]Nephrology Unit, Department of Clinical Sciences Intervention and Technology, Karolinska Institutet and University Hospital, Stockholm, Sweden, [2]Clinical Epidemiology Unit, Department of Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, [3]Department of Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden, [4]Department of Statistics, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy, [5]Department of Psychiatry, Harvard Medical School, Boston, MA, USA, [6]International Epidemiology Institute, Rockville, MD and [7]Department of Medicine, Vanderbuilt University Medical Center, Nashville, TN, USA

Correspondence and offprint requests to: Marie Evans; E-mail: marie.evans@ ki.se

Abstract

Background. Although many studies have investigated the possible association between analgesic use (acetaminophen and aspirin) and the development of chronic kidney disease (CKD), the effect of analgesics on the progression of established CKD of any cause has not yet been investigated.

Methods. In this population-based Swedish cohort study, we investigated the decline over 5–7 years in estimated glomerular filtration rate (eGFR) among 801 patients with incident, advanced CKD (serum creatinine >3.4 mg/dL for men, >2.8 mg/dL for women for the first time) and with different analgesic exposures. Lifetime analgesic use and current regular use were ascertained through in-person interviews at inclusion while data on analgesic use during the follow-up was abstracted from the medical records at the end of the study period. A linear regression slope, based on their eGFR values during the follow-up, provided a summary of within-individual change. In the final multivariate analyses, a linear mixed effects model was implemented to assess the relation of analgesic use and change in eGFR over time.

Results. The progression rate for regular users of acetaminophen was slower than that for non-regular users (regular users progressed 0.93 mL/min/1.73 m^2 per year slower than non-regular users; 95% CI 0.03, 1.8). For regular users of aspirin, the progression rate was significantly slower than that for non-regular users (regular users progressed 0.80 mL/min/1.73 m^2 per year slower than non-regular users; 95% CI 0.1, 1.5). Different levels of lifetime cumulative dose of acetaminophen and aspirin did not significantly affect the progression rate.

Conclusion. We suggest that single substance acetaminophen and aspirin may be safe to use by patients

© The Author [2009]. Published by Oxford University Press on behalf of ERA-EDTA. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oxfordjournals.org

Downloaded from http://ndt.oxfordjournals.org at Ernst Moritz Arndt University on August 16, 2010

Kiank C., Zeden J.-P., Drude S., Domanska G., Fusch G.,Otten W. und Schuett C.: Psychological stress-induced, IDO1-dependent tryptophan catabolism: implications on immunosuppression in mice and humans. *PLoS ONE 5, 7* (Jan 2010), e11825.

Eigenleistung: Hypothese, Massenspektrometrie, Auswertung (in Zusammenarbeit mit Frau Dr. C. Nussbaum, geb. Kiank).

Psychological Stress-Induced, IDO1-Dependent Tryptophan Catabolism: Implications on Immunosuppression in Mice and Humans

Cornelia Kiank[1¤]*, Jan-Philip Zeden[1], Solveig Drude[1], Grazyna Domanska[1], Gerhard Fusch[2], Winfried Otten[3], Christine Schuett[1]

1 Department of Immunology, DFG Graduate School GK840, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany, 2 Department of Pediatrics, Ernst-Moritz-Arndt University of Greifswald, Greifswald, Germany, 3 Research Unit Behavioural Physiology, Research Institute for the Biology of Farm Animals (FBN), Dummerstorf, Germany

Abstract

It is increasingly recognized that psychological stress influences inflammatory responses and mood. Here, we investigated whether psychological stress (combined acoustic and restraint stress) activates the tryptophan (Trp) catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase 1(IDO1) and thereby alters the immune homeostasis and behavior in mice. We measured IDO1 mRNA expression and plasma levels of Trp catabolites after a single 2-h stress session and in repeatedly stressed (4.5-days stress, 2-h twice a day) naïve BALB/c mice. A role of cytokines in acute stress-induced IDO1 activation was studied after IFNγ and TNFα blockade and in IDO1$^{-/-}$ mice. RU486 and 1-Methyl-L-tryptophan (1-MT) were used to study role of glucocorticoids and IDO1 on Trp depletion in altering the immune and behavioral response in repeatedly stressed animals. Clinical relevance was addressed by analyzing IDO1 activity in patients expecting abdominal surgery. Acute stress increased the IDO1 mRNA expression in brain, lung, spleen and Peyer's patches (max. 14.1±4.9-fold in brain 6-h after stress) and resulted in a transient depletion of Trp (−25.2±6.6%) and serotonin (−27.3±4.6%) from the plasma measured 6-h after stress while kynurenine levels increased 6-h later (11.2±9.3%). IDO1 mRNA up-regulation was blocked by anti-TNFα and anti-IFNγ treatment. Continuous IDO1 blockade by 1-MT but not RU486 treatment normalized the anti-bacterial defense and attenuated increased IL-10 inducibility in splenocytes after repeated stress as it reduced the loss of body weight and behavioral alterations. Moreover, kynurenic acid which remained increased in 1-MT treated repeatedly stressed mice was identified to reduce the TNFα inducibility of splenocytes *in vitro* and *in vivo*. Thus, psychological stress stimulates cytokine-driven IDO1 activation and Trp depletion which seems to have a central role for developing stress-induced immunosuppression and behavioral alteration. Since patients showed Trp catabolism already prior to surgery, IDO is also a possible target enzyme for humans modulating immune homeostasis and mood.

Citation: Kiank C, Zeden J-P, Drude S, Domanska G, Fusch G, et al. (2010) Psychological Stress-Induced, IDO1-Dependent Tryptophan Catabolism: Implications on Immunosuppression in Mice and Humans. PLoS ONE 5(7): e11825. doi:10.1371/journal.pone.0011825

Editor: Derya Unutmaz, New York University, United States of America

Received April 7, 2010; **Accepted** July 1, 2010; **Published** July 28, 2010

Copyright: © 2010 Kiank et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Grant support: Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, GRK-840, projects B1, C1); Fonds der Chemischen Industrie (C.S.); Alfried Krupp von Bohlen and Halbach Stiftung, Essen, Germany (C.S.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: ckiank@mednet.ucla.edu

¤ Current address: Center for Neurobiology of Stress, CURE: Digestive Diseases Research Center, University of California Los Angeles Department of Medicine, GLA VA HS, Los Angeles, California, United States of America

Introduction

There is increasing understanding that social and psychological stressors such as anxiety, social isolation or insecurity affect health. Stressed individuals become more susceptible to infection, tumors, hypertension, heart attack, stroke, autoimmunity or affective disorders. Depression, for example, was the 4th leading contributor to the global burden of disease in 2000 and was projected to be in second place in 2020 [1–5].

Physical, chemical and emotional stress stimulate the autonomous nervous system including the efferent sympathetic and vagal pathways and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis resulting in glucocorticoid (GC) secretion into the circulation [3]. A prolonged stimulation of the stress axes causes long-term neuroendocrine disturbances which are well characterized [6–10] but vary depending on the individual's genetics and environmental factors, affecting fetal and postnatal neurochemical and endocrine differentiation [11].

Adapted from a murine model where mechanisms of stress-induced reactivation of colitis was studied [12], we recently showed that repeated combined acoustic and restraint stress, which is a model of severe stress involving physical restraint and emotional stress, induces depression-like alterations and immunosuppression in BALB/c mice. Stress-induced alterations included an increased lymphocyte apoptosis, an anti-inflammatory cytokine bias and a reduced anti-bacterial response [8,13]. Spontaneous dissemination of bacteria into extra-intestinal sites which is found in repeatedly stressed mice [13] may be of gut origin since stress sensitive intestinal "leakage" was described for both, the large and small intestine [14–19].

The consequences of such bacterial translocation on immune function and behavior are not entirely characterized. Interestingly, both immune and behavioral regulatory systems [20–24] as well as

bacterial growth [25,26] depend on the availability of tryptophan (Trp). Under basal conditions in mammals, Trp catabolism is mediated by tryptophan dioxygenase (TDO) activation - mainly in the liver - which is controlled by GCs [22,27]. Additional Trp catabolic pathways can be recruited by the activation of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1). IDO1 is inducible by bacterial products (LPS, CpG) and proinflammatory mediators including TNFα or IFNγ [22,27,28] and is susceptible for various internal and external stimuli, such as hormones, stress and immune activation [29]. It was demonstrated that increased tryptophan depletion via the IDO1 pathway increases the generation of kynurenines (see Fig. 1) which inhibit T cell responses and cause the development of dendritic cells with tolerogenic properties [22,27].

In addition, mammals use 1% of dietary tryptophan for the synthesis of serotonin (5-HT, see Fig. 1). About 10% of this conversion is found in the brain [29]. When Trp as the precursor of serotonin is depleted, mood alterations develop even in healthy humans [30,31]. Moreover, there is increasing evidence that the activation of the IDO1-driven Trp catabolic pathway has clinical implication for humans: shown for sepsis or trauma [32,33], depression [34,35] and schizophrenia [34].

Bringing together that bacterial products potentially induce IDO1 activity [20,22,28,36] and that repeatedly stressed BALB/c mice show an increased bacterial burden, an anti-inflammatory cytokine bias and behavioral alteration as well as Trp shortage [7,8,13], we hypothesize that stress induces IDO1 activity.

Therefore, the aims of this study were to identify whether stress exposure results in IDO1-dependent Trp catabolism and whether this mediates immunosuppression and behavioral alterations in repeatedly stressed mice. Finally, we conducted a pilot study to analyze whether similar pathways are activated in humans undergoing surgery.

Results

Enhanced tryptophan catabolism in repeatedly stressed mice

The analysis of Trp-kynurenine pathway metabolites in repeatedly stressed mice showed that plasma Trp and serotonin levels were reduced and Kyna accumulated while other kynurenines were not altered (Table 1). Preliminary data give evidence that ip injection of Kyn is followed by an increase of plasma Kyna levels within the next 30 minutes whereas peripheral Quin levels remain unaffected in BALB/c mice (Suppl. Fig. S1), indicating that Kyna accumulates in mice whereas Quin may be rapidly catabolized for NAD^+ synthesis (see Fig. S1).

We blocked GC-receptors using RU486, to study the role of glucorticoids (GCs) on Trp catabolism and immunosuppression in stressed mice. RU486 treatment did not prevent Trp depletion (Suppl. Fig. S2A) and failed to restore the antibacterial defense in repeatedly stressed animals (Suppl. Fig. S2B,C) – even resulted in a higher bacterial load in the blood 24-h after experimental infection with *E. coli* (Suppl. Fig. S1C) which indicates that other mediators than GCs mediate activation of the Trp-kynurenine catabolic pathway in BALB/c mice.

Stress-induced IDO1 activation depends on IFNγ and TNFα

Knowing that acute stress alters the intestinal barrier function and induce a systemic low-grade inflammation in BALB/c mice [37], we thought that this may active IDO1-dependent Trp catabolism in these animals.

Indeed, we found transiently increased IDO1 mRNA expression in several tissues (whole organ homogenates) with a highest response in the brain (14.17±3.83-fold) 6-h after acute stress (Fig. 2A). An up-regulation of IDO1 mRNA expression was also measured in the lung (3.17±2.79-fold) immediately after acute stress (Fig. 2B), as well as in the spleen (4.33±3.67-fold) and in isolated Peyer's patches (2.67±1.63-fold) 12-h after termination of stress (Fig. 2C,D). One day later, IDO1 mRNA levels were back to normal (Fig. 2A–D). The detailed mechanisms for the different time kinetics of IDO1 induction in different organs remains to be elucidated.

Both TNFα and IFNγ antibody treatments blocked the induction of IDO1 mRNA in the brain (Fig. 2E) indicating that a proinflammatory response to stress is essential for IDO1 induction.

Importantly, we showed that IDO1 is not only expressed on the mRNA level but is enzymatically active leading to an early decrease of plasma Trp (Fig. 2F) and serotonin levels (Fig. 2I) and transiently increased Kyn concentrations at 6- and 12-h after acute stress (Fig. 2G) whereas Quin levels were not significantly changed (Fig. 2J) and Kyna levels were not significantly altered until 12-h after stress exposure (Fig. 2K). The Kyn/Trp ratio indicating IDO1-driven metabolism was significantly increased at 6-h after termination of stress (Fig. 2H). One day after acute stress, plasma Trp and Kyn were back to normal whereas Kyna and serotonin concentrations were significantly decreased (Fig. 2F–K).

Blocking IDO1 activity abrogates chronic stress-induced immunosuppression

Since GCs did not mediate repeated stress-induced loss of the anti-bacterial defense and we found that already acute stress induces IDO1 expression, we next studied whether the activation of the IDO1-dependent Trp catabolic pathway affects repeated stress-induced immunosuppression and depression-like behavior by competitively inhibiting IDO1 with 1-MT. After 5 days 1-MT treatment, we measured pharmacological concentrations of 33.43±7.18 μmol/l 1-MT in the plasma (n = 6 healthy female BALB/c mice) which was associated with an increased serotonin turnover in the brain of healthy mice (Suppl. Fig. S3).

IDO1 blockade reduced the drop-down of plasma Trp levels in repeatedly stressed mice which normalized the Kyn/Trp ratio (Figure 3A,B). We found that repeatedly stressed mice without treatment showed significantly reduced serotonin levels (Tab. 1) whereas 1-MT treated, stressed mice showed no difference compared with non-stressed control animals (data not shown) and by trend higher levels than the non-treated, stressed group (2.0±0.05 μM in 1-MT treated vs. 1.79±0.07 μM in non-treated repeatedly stressed mice; n = 12 mice, p = 0.06).

IDO blockade attenuated the behavioral stress response which is reflected by a reduced Stress Severity Score (SSS, Fig. 3C). The SSS assesses the individual reaction of mice using a standardized protocol including the evaluated of urination, defecation/diarrhea, fur condition/grooming, reduction of activity/huddling behavior and reduction of muscle tone. We found that 1-MT treatment primarily increased the activity of mice and prevented the loss of exploratory behavior after repeated stress (data not shown). 1-MT treated mice also did not lose as much body weight as repeatedly stressed mice without 1-MT did (Fig. 3D).

In vivo 1-MT treatment attenuated the increased IL-10 inducibility in repeatedly stressed mice (Fig. 3E), which was measured in the supernatant of splenocyte cultures after 24-h of *ex vivo* stimulation with LPS. Most importantly, IDO blockade improved the anti-bacterial defense which is shown by a reduced stress-induced increase of the bacterial load of spleen, liver and blood 24-h after experimental infection with *E. coli* (Fig. 3F–H). Supportively, IDO1-deficient repeatedly stressed mice display a by

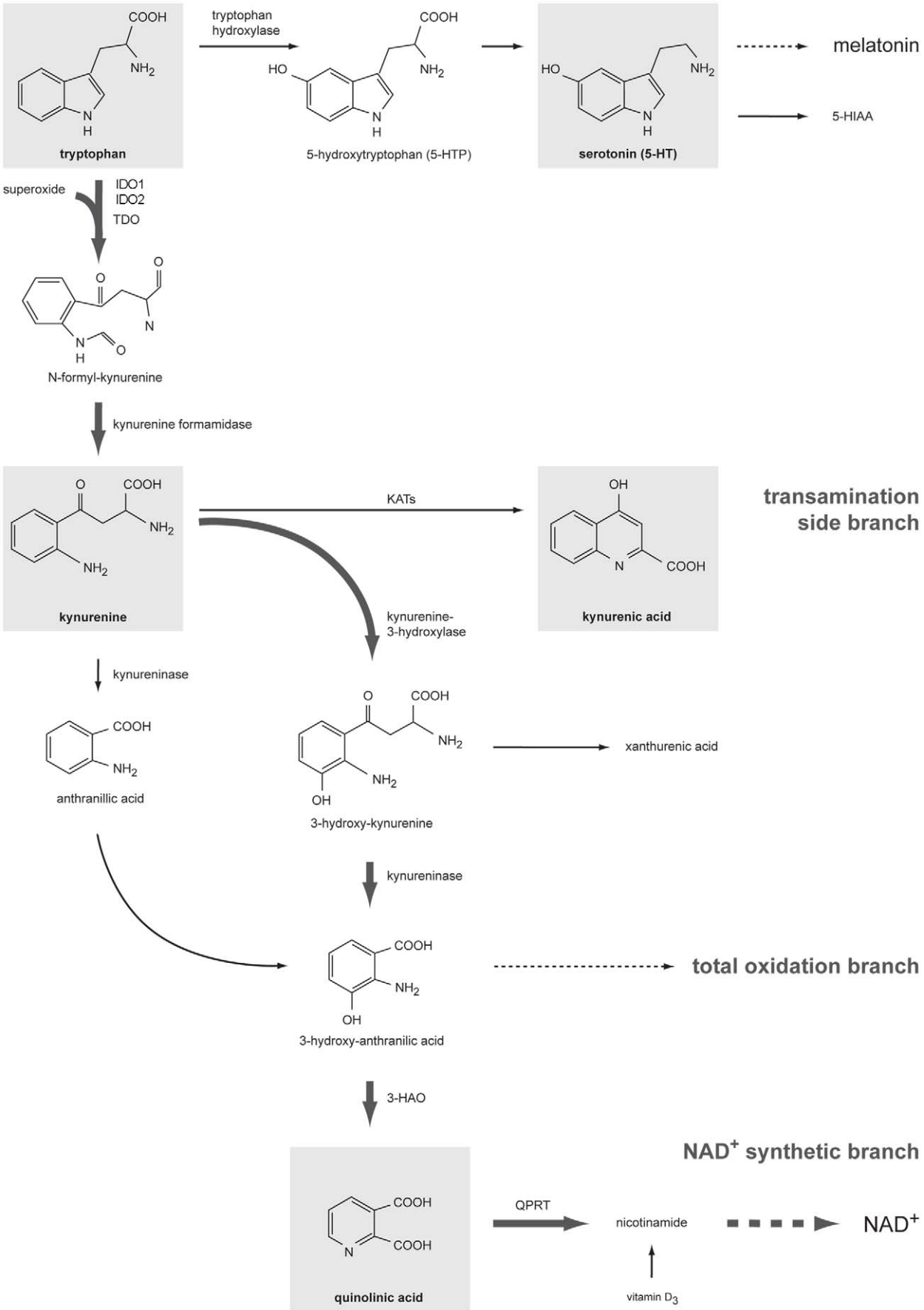
tryptophan
tryptophan hydroxylase
5-hydroxytryptophan (5-HTP)
serotonin (5-HT)
melatonin
5-HIAA
superoxide
IDO1
IDO2
TDO
N-formyl-kynurenine
kynurenine formamidase
kynurenine
KATs
kynurenic acid
transamination side branch
kynurenine-3-hydroxylase
kynureninase
anthranillic acid
3-hydroxy-kynurenine
xanthurenic acid
kynureninase
3-hydroxy-anthranilic acid
total oxidation branch
3-HAO
NAD+ synthetic branch
quinolinic acid
QPRT
nicotinamide
NAD+
vitamin D3

Figure 1. Major pathways of tryptophan (Trp) catabolism. Dietary Trp is essential for protein biosynthesis, but the majority is catabolized along the kynurenine pathway (bold arrows) providing NAD^+ for cellular redox- and energy homeostasis. Alternative pathways are the conversion of Trp to serotonin (serotonin) and then to melatonin, or to tryptamine and then to the kyurenamines (not shown). Indoleamines analysed in this study are shaded in grey. Abbreviations: 3-HAO, 3-hydrox-anthranilic acid oxidase; 5-HIAA, 5-hydroxy-indole acetic acid; IDO1 and 2, indoleamine 2,3-dioxgenase 1 and 2; KATs, kynurenine aminotransferases; NAD+,nicotinamide adenine dinucleotide; MAO monoamine oxidase; QPRT, quinolinic acid phosphoribosyltransferase; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase.
doi:10.1371/journal.pone.0011825.g001

trend reduced bacterial dissemination into the liver (Suppl. Fig. 4A) and a significantly reduced bacteremia 24-h after experimental infection with *E. coli* (Suppl. Fig. S4B).

Kynurenic acid blocks TNFα inducibility in splenocytes

Although the blockade of IDO1 activity significantly reduced the depletion of tryptophan, plasma levels of Kyna remained elevated after repeated stress (Fig. 4A). Separate analysis of Kyna levels in mice treated for 5-days with 1-MT vs. naïve mice revealed a significantly increase in plasma Kyna concentrations (1-MT: 0.916 ± 0.088 μM vs. control: 0.616 ± 0.038 μM, $p = 0.045$, $n = 12$ mice by Mann-Whitney test). This indicates that the 1-MT treatment causes Kyna accumulation by a yet unknown pathway. This went along with a reduced LPS-induced TNFα release of splenocytes (Fig. 4B), lymphocytopenia (Fig. 4C), and thymic atrophy (Fig. 4D) which were not affected by IDO1 blockade.

Reduced TNFα inducibility in mouse splenocytes is also found after *in vitro* Kyna treatment which is demonstrated by preventing the LPS-induced TNFα response (Fig. 5,A,B). In addition, we found that *in vivo* ip Kyna injection dampened the LPS-induced TNFα secretion in primary splenocyte cultures (Fig. 5C). Thus, high Kyna levels are capable to alter the TNFα responsivness *in vivo*.

Enhanced Trp catabolism in patients during the peri-operative stress response

To analyze whether psychological stress-induced activation of the kynurenine pathway is also relevant in humans, we conducted a pilot study monitoring the kinetics of Kyn/Trp ratio in the plasma of 18 patients prior to and after elective major abdominal surgery (esophagectomy, gastrectomy, pancreatic resection, colorectal resection) without postoperative complications. Although all patients received benzodiazepines to dampen the HPA axis reactivity prior to surgery, they all, independently of gender, presented an increased Kyn/Trp ratio already in the pre-operative period which remained increased up to 7-days after surgery (Fig. 6). Thus, activation of IDO1 activity was also measurable in patients who expected surgery and is even enhanced in the post-operative period which may contribute to postoperative immunosuppressive states.

Table 1. Tryptophan and serotonin shortage, as well as increased concentrations of kynurenic acid in the plasma of repeatedly stressed mice compared with non-stressed controls.

metabolite [μmol/l]	repeatedly stressed	non-stressed	p
tryptophan (Trp)	40.03 ± 3.98	49.15 ± 5.03	.0003
kynurenine (Kyn)	1.68 ± 0.34	1.80 ± 0.65	n.s.
kynurenic acid (Kyna)	0.90 ± 0.39	0.53 ± 0.10	.024
quinolinic acid (Quin)	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.04	n.s.
serotonin (5-HT)	1.82 ± 0.32	2.2 ± 0.31	.0003

$n = 9$ mice/group, comparison of repeatedly stressed and non-stressed female BALB/c mice by Mann-Whitney U-test, n.s. = not significant
doi:10.1371/journal.pone.0011825.t001

Discussion

Trp catabolism: a role in stress-induced energy expenditure and immunosuppression in mice

In this study, we show for the first time that already an acute stress exposure causes a rapid up-regulation of IDO1 mRNA expression in different organs – most prominently in the brain. We found that sustained Trp catabolism reduces the anti-bacterial defense and induces behavioral alteration in repeatedly stressed BALB/c mice.

Although, we did not determine the cell population which induced IDO1 expression in our study, it was recently shown that IDO1 protein is detectable in a number of cells and tissues such as antigen-presenting cells of epididymis, placenta, spleen, thymus, lung and digestive tract [38] which remains to be investigated in the murine stress model.

Acute stress-induced up-regulation of IDO expression is likely linked to increased dissemination of commensal bacteria into mesenteric lymph nodes and liver which provokes a transiently increased proinflammatory cytokine bias in acutely stressed mice [37]. Other authors showed that pro-inflammatory cytokines such as TNFα and IFNγ induce IDO1 activity *in vitro* and *in vivo* [23,28,39]. In line with this, both TNFα and IFNγ blockade prevented the up-regulation of IDO1 expression in acutely stressed mice. We hypothesize that a TNFα-dependent IFNγ-inducing pathway is activated by stress due to increased bacterial load of extra-intestinal sites [37].

It was recently shown that TNFα up-regulates a whole set of enzymes including IDO1 supplying the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) synthesis pathway (see Figure 1; [40]). We suggest that kynurenines which are generated in stressed mice are rapidly used for NAD^+ synthesis because of a high energy demand in stressful situations [29,40].

Moreover, our study revealed that prolonged activation of the Trp catabolic pathway during repeated stress alters the capacity to cope with infection in mice. Surprisingly, GCs which primarily activate the TDO-driven Trp catabolism [22,27] don't have the leading role for Trp depletion or for the loss of the antibacterial defense in our model of repeated stress. In contrast, GCs seem to be essential for the early antibacterial response [41,42] and, thus, blockade of GC receptor signaling was detrimental after experimental *E. coli* infection.

Two isoforms of IDO are described which both can be blocked by 1-Methyl-L-tryptophan [43] but there is evidence that only activation of the IDO1 isotype, not IDO2, alters immune function [43]. For the first time, our data show that L-1-MT treatment attenuated Trp depletion, restores the antibacterial defense and simultaneously reduces depression-like alterations in repeatedly stressed mice. It would be interesting to see whether IDO blockade could also prevent the spontaneous spreading of commensal bacteria into the body as shown in our previous studies [13].

The generation of pro-apoptotic kynurenines which preferentially affect T helper (Th)-1 and Th17 cells induce a Th2 and T regulatory (Treg)-driven anti-inflammatory cytokine bias [21,22,28] which is reflected in increased IL-10 levels after repeated stress. 1-MT treatment normalized the IL-10 release of LPS-stimulated splenocytes of stressed mice which was paralleled with an improved defense of experimental *E. coli* infection. We hypothesize that primarily increased IL-10 levels account for the

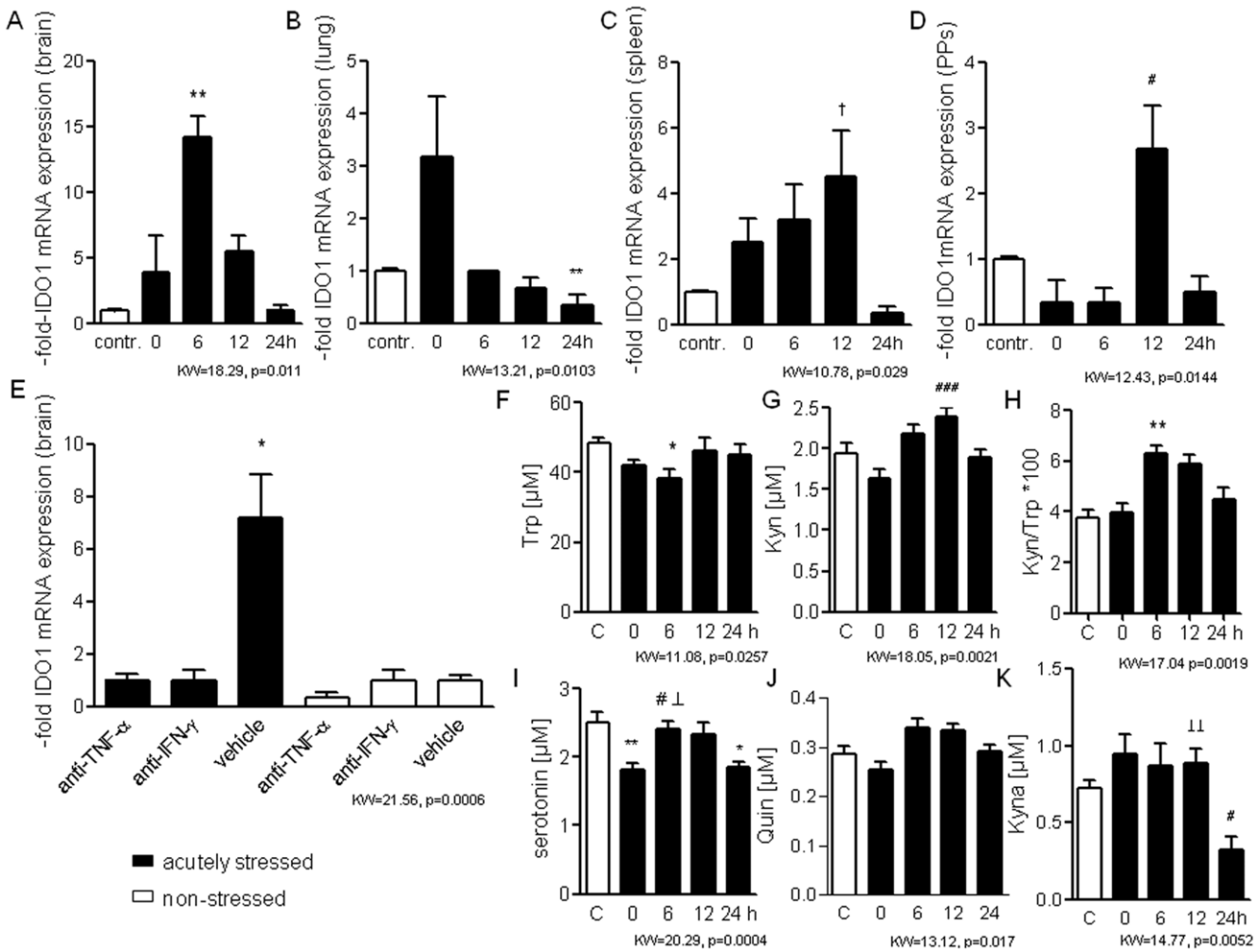

Figure 2. Transient activation of Trp catabolism after acute psychological stress. A–E. Kinetics of IDO1 mRNA expression induced in brain (A), lung (B), spleen (C) and Peyer's patches (D) within 24-h after termination of 2-h-stress exposure (n = 6 mice/time, n = 6 controls; average values of basal expression levels in non-stressed mice were assigned as value of 1), and IDO1 mRNA expression in the brain of TNFα antiserum- and IFNγ antiserum treated vs. vehicle-treated animals 6-h after acute stress (E, n = 6 mice/group, average values of basal expression levels in vehicle treated, non-stressed mice assigned as value of 1). **F–I.** Kinetics of plasma concentrations of Trp (F), Kyn (G), the Kyn/Trp ratio (H) and of the levels of serotonin (I), Quin (J) and Kyna (K) following 2-h-stress exposure (n = 6 mice/time) compared with basal levels of healthy controls (n = 15 mice/group). All panels depict data of one representative experiment of two: *p<.05; **p<.01; ***p<.001 compared with non-stressed controls; #p<.05; ##p<.01; ###p<.001 compared with mice immediately after acute stress (0-h) and ⊥<.05 ⊥⊥<0.01, ⊥⊥⊥<0.001 compared with mice 24-h after stress exposure by Kruskal-Wallis testing with *post-hoc* Dunn Multiple comparison testing (KW- and p-values are indicated in the graph).

doi:10.1371/journal.pone.0011825.g002

reduced anti-bacterial defense after prolonged stressful experience than a reduced inducibility of TNFα which was not affected by 1-MT treatment in our study. The impact of IDO1 activation in repeated stress-induced loss of the anti-bacterial defense is underlined by the yet preliminary findings that stressed IDO1$^{-/-}$ mice were capable to cope with an *E.coli* infection comparable to non-stressed, wild-type mice (see Suppl. Fig. 4).

Supportively, IDO-induced formation of kynurenines in mice during mycobacterial infection alters the differentiation of Th1 and Th17 lymphocytes which increases the bacterial dissemination by reducing the availability of IFNγ which is essential of the antibacterial defense [44]. In addition, a positive correlation of IDO1 activity and plasma LPS levels in HIV-infected humans was linked to a decreased Th17/Treg ratio which is linked to disease progression [45]. Our results suggest, that prolonged stressful experiences may aggravate the risk of suffer from infections in different disease states via IDO1 activation.

To our surprise, 1-MT treatment did not prevent that Kyna levels increased in repeatedly stress mice and it also did not reconstitute the inducibility of TNFα in splenocytes. It was recently demonstrated that Kyna inhibits LPS-induced TNFα secretion in human peripheral blood mononuclear cells via gpr35 activation [46]. Thus, we hypothesize that peripherally increased Kyna concentration is a potent inhibitor of TNFα production *in vivo* in mice. Since Kyna can be produced by commensal bacteria and is found in pancreatic and bile juices [47,48] formation of the molecule does not essentially dependent on IDO1 activity. Low-grade but significantly increased bacterial dissemination after intestinal barrier dysfunction [13,37] may explain increased Kyna levels after repeated stress which may not be prevented by 1-MT treatment but is not investigated, yet.

Finally, in a preliminary study with a small sample size and mostly male patients, we demonstrate that patients undergoing surgery who suffer from increased anxiety, helplessness and social isolation show

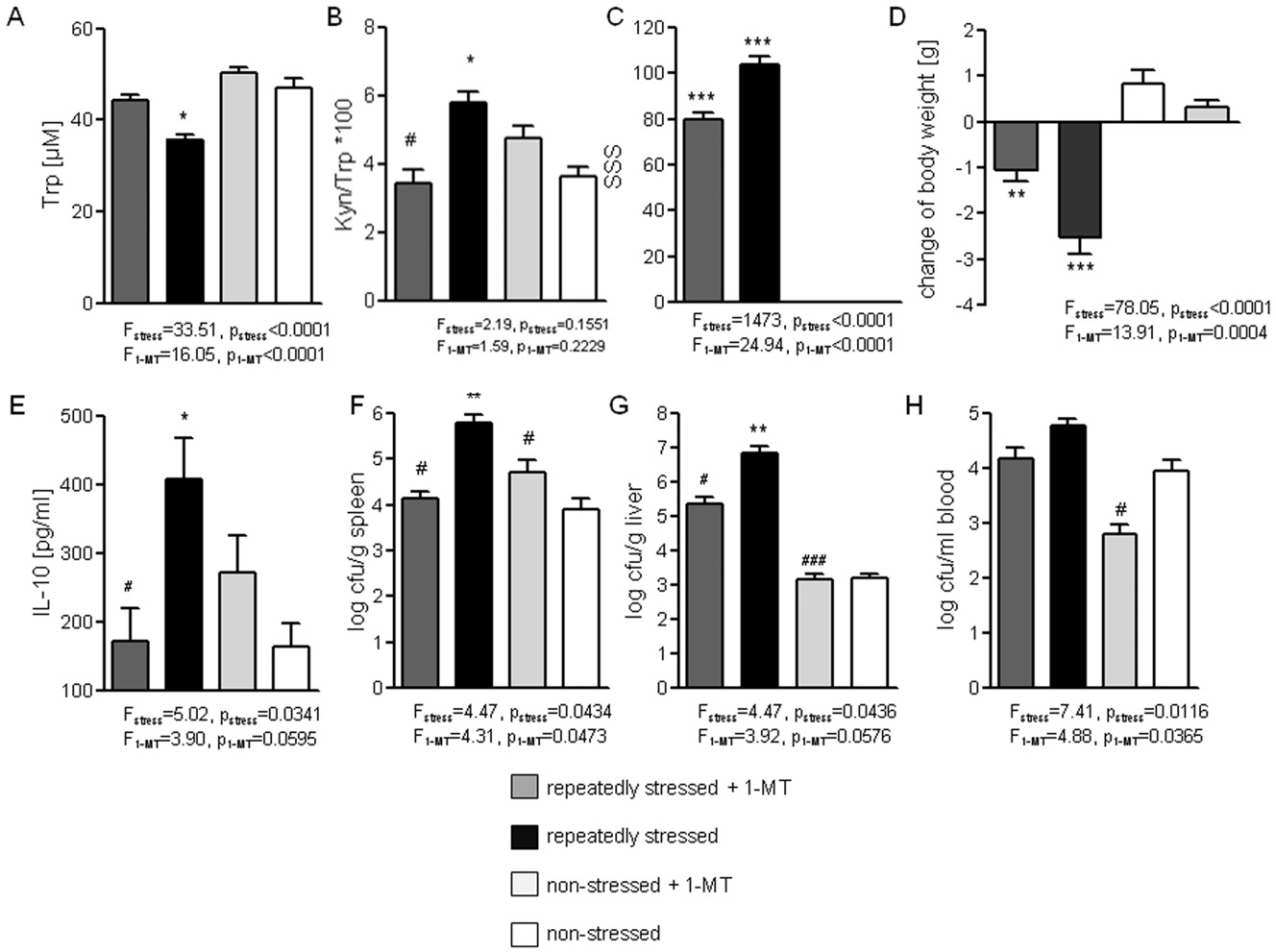

Figure 3. Effects of pharmacological IDO1 blockade on Trp catabolism, IL-10 inducibility and anti-bacterial defense in repeatedly stressed mice. A–E. Plasma concentrations of tryptophan (A) and the Trp/Kyn ratio (B), Stress Severity Score evaluating the behavioral stress response (C), change of body weight during repeated stress (D) and IL-10 levels in the supernatant of splenocytes after *ex vivo* stimulation with LPS (*from S. abortus equi*, 1-µg/ml) (E) of repeatedly stressed and non-stressed mice, with or without 1-MT treatment which were measured immediately after the termination after the ninth stress exposure. **F–H.** Bacterial burden in spleen (F), liver (G) and blood (H) 24-h after ip infection with *E. coli* ATCC 25922 in mice with or without 1-MT treatment after repeated stress and of non-stressed mice (injection was performed immediately after the ninth stress exposure); n = 8 mice/group, summary of two independent experiments; *p<.05, **p<.01, ***p<.001 compared with non-stressed, without 1-MT-treatment, #p<.05; ##p<.01; ###p<.001 compared with repeatedly stressed mice by Kruskal-Wallis testing with *post-hoc* Dunn's Multiple comparison testing. Two-way ANOVA and *post-hoc* Bonferroni's Multiple comparison test were used for testing the overall influences of stress and treatment (ANOVA F- and p-values for the influence of stress and 1-MT are indicated in the graph).
doi:10.1371/journal.pone.0011825.g003

IDO1 activation [49,50]. In the current study we didn't include measurements of the influence of physical stress due to the underlying disease which needs to be addressed in further studies but demonstrated that this patient group showed an activation of Trp catabolic pathways already in the pre-operative period which might contribute to the well-known increased infection risk and metabolic disturbances after major abdominal surgery [51]. In trauma patients, in fact, the Kyn/Trp ratio has recently been shown to be of predictive value for ongoing sepsis [52] and is under evaluation as target for preventing immunosuppression.

Trp catabolism: a role in stress-induced behavioral alterations

Depletion of Trp, the precursor molecule of serotonin, promotes mood alterations in healthy individuals [29–31] and depression-like behavior in stressed animals [29]. In line with this, 1-MT treatment prevented both serotonin depletion and behavioral alterations. Increased intake of tryptophan leads to an acute increase of cerebral 5-HT and/or 5-HIAA in various species [29] and a rapid depletion of tryptophan which results in impaired cerebral 5-HT formation in mammals and humans [29,53]. In line with this, 1-MT treatment increased the 5-HT/5-HIAA ratio in the brain of naïve mice and prevented that systemic Trp levels dropped-down in repeatedly stressed mice which was associated with reduced behavioral alterations.

In our study, we showed for the first time that activation of the Trp catabolism in BALB/c mice caused a peripheral accumulation of Kyna which is a (N-methyl-D-aspartat) NMDA receptor antagonist and is known to contribute to the development of disorders such as depression and schizophrenia [34]. Both, peripheral blood and central spinal fluid (CSF) concentration of kynurenine seem to correlate with the levels of Quin and Kyna in the CSF predicting depressive symptoms in patients after IFNα therapy [54]. This emphasizes the clinical relevance of our data

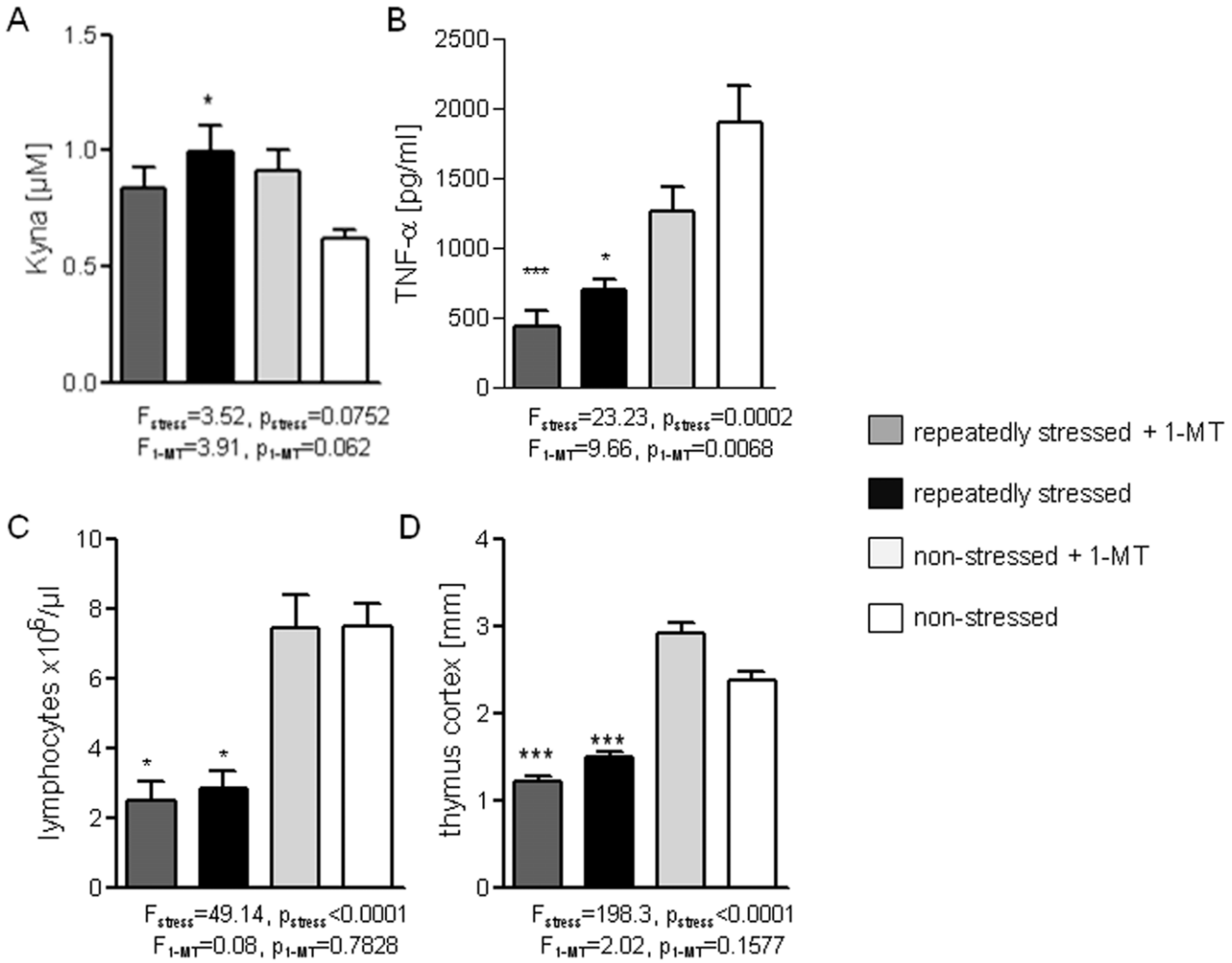

Figure 4. 1-MT treatment: effects on Kyna levels, TNFα inducibility, lymphocytes and thymus cortex atrophy in repeatedly stressed mice. Plasma kynurenic acid concentrations (A), TNFα levels in the supernatant of splenocytes (B) after *ex vivo* stimulation with LPS (*from S. abortus equi*, 1-µg/ml), absolute lymphocyte counts in the blood (C) and thickness of the thymic cortex (D) of repeatedly stressed and non-stressed mice with or without 1-MT treatment; n = 8 mice/group, summary of two independent experiments; *p<.05, **p<.01, ***p<.001 compared with non-stressed, without 1-MT-treatment, #p<.05; ##p<.01; ###p<.001 compared with repeatedly stressed mice by Kruskal-Wallis testing with *post-hoc* Dunn's Multiple comparison testing. Two-way ANOVA and *post-hoc* Bonferroni's Multiple comparison test were used for testing the overall influences of stress and treatment (ANOVA F- and p-values for the influence of stress and 1-MT are indicated in the graph).
doi:10.1371/journal.pone.0011825.g004

giving supplementary evidence for a role of stress in the pathogenesis of mental and mood disorders.

Conclusion

This study highlights a new stress-inducible pathway which adds up to the neuroendocrine circuits known to suppress immune functions: (1) acute stress-induced low-grade inflammation induces transient IDO1-mediated tryptophan-catabolism and (2) prolonged Trp shortage due to expanded stressful episodes as well as the formation of kynurenines are immunosuppressive and simultaneously may induce mood alterations.

Materials and Methods

Animals

Female BALB/c and IDO1$^{-/-}$ mice (BALB/c background) derived from our own breeding facility (University of Greifswald, Germany). The female mice were kept in groups (6–9 mice/cage) under controlled conditions with 12/12 light cycle and food and water available *ad libitum*. Animal experiments were approved by the Animal Protection Committee of Mecklenburg-Vorpommern, Germany.

Stress models

The repeated psychological stress model was described recently [7,8,13]. Mice at the age of 10–14-wks were exposed to combined acoustic and restraint stress for 4.5-days. Acute psychological stress was defined as a single 2-h-stress session in the morning to prevent influences of circadian rhythm on results. All successive analyses in mice with our without treaments were performed starting at 10 AM after the last stress exposure.

Intervention studies

1-Methyl-L-tryptophan was administered in the drinking water (1-MT, 2-mg/ml) starting one day prior to the first stress session. Polyclonal TNFα-antiserum from sheep, IFNγ antiserum from

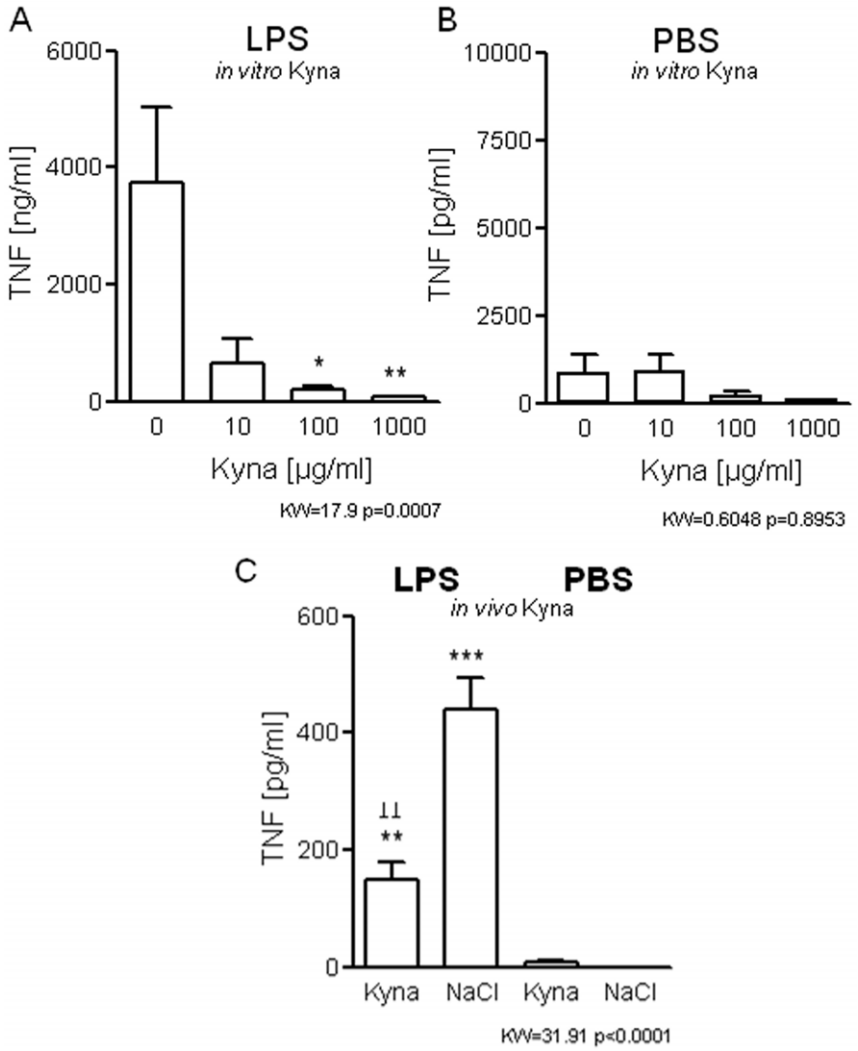

Figure 5. *In vivo* and i*n vitro* Kyna effects on TNFα inducibility, in naïve mice. Dose-dependent effects of Kyna on TNFα secretion into the supernatant (A) 16-h after stimulation with LPS (*E. coli* O55:B5, 500-ng/ml) or on spontaneous release in PBS-treated splenocyte cultures (B), and of LPS-stimulated splenocytes obtained from mice that were pre-treated with 250-ng Kyna/g BW or saline 6-h prior to *ex vivo* stimulation of splenocytes (C) n = 6 mice/group, summary of two independent experiments. *p<.05, **p<.01, ***p<.001 compared with NaCl control treatment, $^{\perp\perp}$<0.01 compared LPS control treatment by Kruskal-Wallis testing with *post-hoc* Dunn's Multiple comparison testing (KW- and p-values are indicated in the graph).
doi:10.1371/journal.pone.0011825.g005

rabbit (both kindly provided by G. Tiegs, University of Erlangen), or for vehicle normal sheep or rabbit serum (Roth, Karlsruhe, Germany) were administered ip at 200-µl volume. Sera/antisera were injected immediately prior to acute stress. Kynurenine (Kyn) and kynurenic acid (Kyna) (both from Sigma) were diluted in NaCl by ultrasound sonication, adjusted to pH 7.4. Kyn was injected ip at 100 µg/g BW and 30-min, 1-h and 2-h after administration plasma Trp catabolite levels were analyzed. Kyna was injected ip at 250 ng/g BW and 6-h later TNFα-inducibility of splenocytes was measured. The GC receptor blocker RU486 (from Sigma) was administered subcutaneously (sc) at 50 µg/g BW (diluted in cylodextrin, from Sigma) in 50 µl volume at 6 PM daily starting one day before the first stress session continuing during repeated stress exposure.

Stress Severity Score (SSS)

The individual reaction of mice to each stress-exposure was monitored by an observational SSS as described in detail earlier [8]. After each stress-session the amount of released urine and feces in the tube was documented and assigned as a value of 0–6 points: no urination (0 points), wet area around urethra (1), wet parts of the ventral fur (2), wet ventral fur (3), additionally wet dorsal parts (4), wet body (5), completely wet animal (6); no feces (0), 1–5 pellets (1), 6–10 pellets (2) etc. up to more than 25 pellets (6). If diarrhea was detected, the value of defecation was doubled. After placing the animal back into its home cage the condition of fur was recorded (0–6 points): normal fur (0), fur of the head and the neck ruffled (1), dorsal fur partially ruffled (2), dorsal fur completely ruffled (3), additionally parts of the ventral fur ruffled (4), dorsal and ventral fur ruffled (6), whole animal's fur strongly ruffled (6). Activity scores (locomotor activity, explorative activity, huddling, 0–6 points), and muscle tone (0–3 points) were also estimated: normal activity (0 points), slightly reduced exploration (1), reduced exploration with short intervals without activity (2), longer intervals without activity (3), strongly reduced activity and huddling (4), huddling and lethargy but reaction to environmental

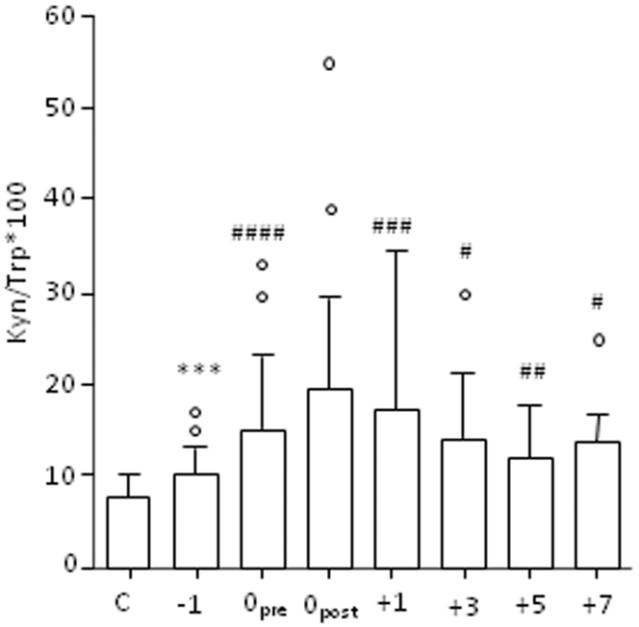

Figure 6. Tryptophan catabolism along the kynurenine pathway during the peri-operative stress response of patients undergoing elective abdominal surgery without complications. Preoperative, intraoperative and postoperative Kyn/Trp ratios in the plasma of 18 patients compared with Kyn/Trp ratios of 20 healthy volunteers ***p<.001 compared with healthy controls, #p<.05, ##p<.01, ###p<.001, ####p<.0001 compared with values from pre-operative day -1.
doi:10.1371/journal.pone.0011825.g006

stimuli (5), no reaction to environmental stimuli (6); normal muscle tone (0 points), slightly reduced muscle tone with temporary drop down of the tail (1), reduced muscle tone with longer intervals of trailing the tail (2), strongly reduced muscle tone with a constant trailing of the tail during the first 5 min after bringing the mice back into the home cage (3). The SSS for each mouse finally consists of points rated by the investigator during nine stress cycles ranging from 0 to 297 points of maximum performance.

Harvesting of blood and organ samples

For anesthesia, 75-µg/g BW Ketamin Curamed® (CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Germany) and 16-µg/g BW Rompun® (Bayer AG, Leverkusen, Germany) were diluted in pyrogen-free 0.9% sodium chloride (Braun, Melsungen, Germany) and injected intraperitoneally prior to harvesting of blood by retro-orbital puncture. K_2E-EDTA-plasma samples were stored at -20°C until use. Spleens were aseptically removed and put into sterile cold VLE RPMI 1640 medium (Biochrom KG Berlin, Germany) and single cell suspensions for inducing cytokine production were prepared within one hour after organ harvesting. For histological analysis thymus was isolated, immediately frozen in Tissue-Tek® (O.C.T.TM compound, Sakura, Netherlands) in liquid nitrogen and then stored at −80°C until use.

For analysis of gene expression whole brain, lung, liver and the first 4–5 Peyer's patches (PPs) proximal of the ileocecal junction (dissected from the ileal tissue) were removed and immediately frozen in liquid nitrogen.

Lymphocyte counts and *ex vivo* inducibility of cytokines

Absolute lymphocyte numbers in whole blood were analyzed by a hemocounter (Sysmex K-4500, SYSMEX GmbH, Germany). Splenocytes were adjusted to 1×10^7 cells/ml in culture medium (VLE RPMI 1640 from Biochrom KG, Berlin, Germany; with 200 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine from Biochrom KG, Berlin, Germany; 100 mM Na-pyruvate from GIBCO BRL, Paisley, Scotland; 2% D(+)-glucose from Sigma, Steinheim, Germany, 10% FCS from Biochrom KG, Berlin, Germany). 500 µl of cell suspensions were transferred into sterile covered 5 ml-tubes (Greiner, Frickenhausen, Germany). For measuring cytokine inducibility lipopolysaccharide was added to the cultures with a final concentration of 1 µg/ml LPS from *S. abortus equi* or 500 ng/ml LPS form *E. coli* O55:B5. For studying *in vitro* effects of Kyna, the catabolite was added to get 0, 10, 100, 100 µM solutions (all chemicals from Sigma). Cells were incubated for 42-h at 37°C and 5% CO_2. Supernatants were analyzed by Inflammation-Cytometric Beads Array following the manufacturer's protocol (CBATM, BD Pharmingen).

Histological analysis

Frozen sections (6-µm thin) from thymus were stained by Hemalaun + Eosin (H/E) using conventional protocols and thymic cortex diameter (10 measurements/section) was analyzed by Metamorph Imaging software 4.5.

Infection with *E. coli*

Mice were infected by intraperitoneal injection (ip) with 3×10^5 cfu of *E. coli* ATCC 25922. 24-h later bacterial load of liver and blood was determined by directly plating homogenates or blood on Columbia agar plates (BD, Heidelberg, Germany).

IDO1 mRNA expression

Total RNA was isolated using Trizol Reagent (Invitrogen, Ontario, CA). All tissue samples were separately homogenized on ice in sterile tubes containing 1 ml of ice-cold Trizol Reagent per 50–100 mg using a homogenizer at 24,000 rpm for 3-min. Homogenized samples were incubated for 15-min at RT. Bromo-chloro-propan (0.2 ml, Sigma, Germany) was added to 1 ml Trizol reagent and vigorously shaken for 30-s, incubated for 10-min at RT and centrifuged at 9,500 rpm for 15-min at 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and RNA was precipitated by adding 0.5 ml isopropanol (Sigma, Germany). Samples were incubated for 15-min at RT and centrifuged at 9,500 rpm for 10-min at 4°C. RNA pellet was briefly dried and dissolved in RNase-free water and stored at −80°C until use.

Reverse transcription of mRNA was performed with the mouse MGB IDO1 primer mixture (Gene Expression Assays: Mm00492586_m1) and mouse GAPDH primers (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time PCR was carried out in an ABI PRISM 7000 SDS (50°C, 2-min and 95°C, 10-min, 40-cycles 95°C,15-s and 60°C 1-min; Applied Biosystems). IDO1 mRNA was quantified by Ct method normalized to GAPDH using ABI Prism 7000 software. (GAPDH expression in control mice and acutely stressed animals was comparable, e.g. in brain IDO1-signal detectable at cycle: 17.33±1.46 in non-stressed mice, 16.83±1.73 at 2-h and 16.38±0.58 6-h after acute stress). Expression of IDO1mRNA was measured in whole brain, lung and liver homogenates and in homogenates of 4–5 isolated Peyer's patches (PPs).

Quantification of plasma indoleamines

Concentrations of tryptophan (Trp), kynurenine (Kyn), kynurenic acid (Kyna), quinolinic acid (Quin), and serotonin in plasma samples were analyzed by tandem mass spectrometry. 100 µl samples of plasma were analyzed after adding 50 µl sulfosalicylic

acid (Sigma, 10-g in 90-mlmethanol), 40 µl water and 10 µl internal standard (d5-Trp, and d5-Kyna, Euriso-top, Paris, France). Samples stored at 4°C for 30-min and centrifuged (20,000-g, 10-min). Supernatant was measured. A Wallac MS2 tandem mass spectrometer (Perkin Elmer, Rodgau, Germany) equipped with an electrospray ion source was used to record Trp catabolites and standards. Ions were detected in a positive ion mode using multiple reaction monitoring. Calibration curves were fitted by linear least-square regression and correlated to the concentration of d5-Trp and d5-Kyna as internal standards.

Brain serotonin turnover

Concentrations of serotonin and 5-HIAA in brain were determined by HPLC with electrochemical detection. Samples of half mouse brains were homogenised in 4 ml of 0.2 M perchloric acid followed by centrifugation at 45,000-g at 4°C. Pooled supernatants of two repeated extractions were again centrifuged at 45,000-g and aliquots of 20 µl were injected into the HPLC system, equipped with a 125×4 mm column packed with Prontosil C18 AQ (Bischoff Analysentechnik, Leonberg, Germany). The mobile phase consisted of 58 mM sodium hydrogen phosphate buffer containing 1.2 mM octanesulfonic acid, 0.3 mM EDTA, 0.2 mM potassium chloride and 6% methanol at pH 3.5. Electrochemical dectection was achieved by an ISAAC cell with a glassy carbon working electrode set at a potential of 600 mV (Axel Semrau, Sprockhövel, Germany). As an index of serotonin turnover, the ratio between 5-HIAA and serotonin concentrations was calculated.

Human peri-operative stress response

18 patients (15 male, 3 female, 37–89 yrs, Caucasian ethnicity) who underwent elective major surgery of the gastrointestinal tract (esophagectomy, gastrectomy, pancreatic resection, colorectal resection mostly related to cancer) at the University hospital of Greifswald were enrolled in a prospective observational study to analyze indoleamines. Inclusion criteria comprised given informed consent for participation and age >18 years. The exclusion criteria were pregnancy, immunosuppression from cytostatic therapy, high-dosage steroid therapy, or moribund state. Patients or their authorized representatives gave written informed consent. The study was approved by the local Institutional Review Board. At baseline, demographic variables were collected. To dampen their preoperative stress response, they received benzodiazepines as pre-anaesthetic medication (Midazolam 3.75 to 7.5 mg) one day and 2-h before surgery. They were anesthetized with Remifentanyl, Propofol i.v. (duration of operation: 185–497 min). For postoperative pain relief, all patients received anaesthetics (0.2% Ropivacain, 0.5 µg/ml Sufentanyl) through a peridural catheter. Blood sample were collected in the morning of the preoperative day (-1), preoperatively (0_{pre}), postoperatively (0_{post}) and in the morning of postoperative days +1, +3, +5 and +7. Blood was collected in K_2E-EDTA vacutainers (BD VacutainerTM, Plymouth, UK). Plasma samples were stored at −20°C until use. Plasma indoleamine concentrations were measured described above. Data were compared to those of 20 age-matched healthy controls (15 male, 5 female, 27–85 yrs, Caucasian ethnicity).

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Differences between two groups were analyzed by the Mann-Whitney U-test and of more than two groups without additional treatment by Kruskal-Wallis test with *post hoc* Dunn's Multiple Comparison test which are non-parametric tests not assuming Gaussian distribution. Comparison of data from stressed and non-stressed mice in studies with additional treatment was performed by two-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni's Multiple Comparison test. Kruskal Wallis statistics (KW) or Bonferroni F-values (F) and p-values are indicated in the graphs. The data are depicted as mean ± SEM; $p<0.05$ was considered statistically significant. If not differentially indicated, data are representative of at least two independent experiments.

Supporting Information

Figure S1 Kyn-degradation pathway a in mice. Healthy female mice were ip injected with Kyn at concentration of 100 µg/g BW. At 30-min, 1-h and 2-h after injection mice were sacrified and plasma levels of kynurenine (Kyn), kynurenic acid (Kyna) and quinolinic acid (Quin) were quantified. Data from 3 mice/time of a pilot study were shown. *p<.05 compared with non-stressed mice by Wilcoxon-test.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011825.s001 (0.03 MB TIF)

Figure S2 Effects of pharmacological glucocorticoid receptor blockade by RU-486 on plasma Trp levels and antibacterial defense in repeatedly stressed BALB/c mice. Plasma Trp concentrations in chronically stressed and non-stressed animals which were treated with RU486 or vehicle cyclodextrine (A); and bacterial burden in the spleen (B) blood 24-h (C) after experimental ip infection with 3×10^5 cfu of E.coli ATCC25922 in repeatedly stressed (black bars) or non-stressed mice (white bars) that were daily treated with RU486 (50 µg/g BW/d, sc) or the vehicle. n = 6 mice/group. *p<.05, **p<.01, ***p<.001 compared with non-stressed, without 1-MT-treatment, #p<.05; ##p<.01; ###p<.001 compared with repeatedly stressed mice by Kruskal-Wallis testing with post-hoc Dunn's Multiple comparison testing. Two-way ANOVA and post-hoc Bonferroni's Multiple comparison test were used for testing the overall influences of stress and treatment (ANOVA F- and p-values for the influence of stress and 1-MT are indicated in the graph).
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011825.s002 (0.07 MB TIF)

Figure S3 Proof of pharmacological 1-MT treatment in mice. Serotonin turnover in the brain of healthy 1-MT treated and non-treated mice shown as ratio between 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) and serotonin; n = 5 mice/group, representative example of two independent experiments. *p<.05 compared with non-treated mice by Mann-Whitney test.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011825.s003 (0.02 MB TIF)

Figure S4 Bacterial dissemination in repeatedly stressed and non-stressed IDO knock-out mice. Bacterial burden in liver (A) and blood (B) 24-h after ip infection with E. coli ATCC 25922 in mice with or without 1-MT treatment after repeated stress and of non-stressed mice (injection was performed immediately after the ninth stress exposure); n = 6 mice/group result from one preliminary experiment; number of mice showing detectable bacterial load/mice in group is indicated in the graphs; *p<.05 compared with non-stressed, without 1-MT-treatment, #p<.05 compared with repeatedly stressed mice by Kruskal-Wallis testing with post-hoc Dunn's Multiple comparison testing.
Found at: doi:10.1371/journal.pone.0011825.s004 (0.04 MB TIF)

Acknowledgments

The authors thank C. Müller (Greifswald, Germany) for assisting in quantification of indoleamines, and M. Moser (Brussels, Belgium) providing $IDO1^{-/-}$ mice with the permission of A. Mellor (Augusta, Georgia, U.S.A.).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CK CS. Performed the experiments: CK JPZ SD GD WO. Analyzed the data: CK JPZ SD GD GF WO. Contributed reagents/materials/analysis tools: GF WO. Wrote the paper: CK CS.

References

1. Olesen J, Baker MG, Freund T, di LM, Mendlewicz J, et al. (2006) Consensus document on European brain research. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77 Suppl 1: i1–49.
2. WHO publication (2010) Mental health, depression. http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/: online publication.
3. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. Annu Rev Physiol 67: 259–284.
4. Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. JAMA 267: 1244–1252.
5. Schmidt MV, Sterlemann V, Muller MB (2008) Chronic stress and individual vulnerability. Ann N Y Acad Sci 1148: 174–183.
6. Calcagni E, Elenkov I (2006) Stress system activity, innate and T helper cytokines, and susceptibility to immune-related diseases. Ann N Y Acad Sci 1069: 62–76.
7. Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Volker U, et al. (2008) Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. Endocrinology 149: 2714–2723.
8. Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, et al. (2006) Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. Brain Behav Immun 20: 359–368.
9. Kiank C, Entleutner M, Furll B, Westerholt A, Heidecke CD, et al. (2007) Stress-induced immune conditioning affects the course of experimental peritonitis. Shock 27: 305–311.
10. Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, et al. (2003) A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 1920–1925.
11. Koolhaas JM (2008) Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. Brain Behav Immun 22: 662–667.
12. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM (1999) The role of CD4+ lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. Nat Med 5: 1178–1182.
13. Kiank C, Daeschlein G, Schuett C (2008) Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice. Brain Behav Immun 22: 1173–1177.
14. Groschwitz KR, Hogan SP (2009) Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. J Allergy Clin Immunol 124: 3–20.
15. Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH (2008) Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 295: G452–G459.
16. Demaude J, Salvador-Cartier C, Fioramonti J, Ferrier L, Bueno L (2006) Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. Gut 55: 655–661.
17. Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W (2002) Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. Gut 51: 507–513.
18. Santos J, Yates D, Guilarte M, Vicario M, Alonso C, et al. (2008) Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. Psychoneuroendocrinology 33: 1248–1256.
19. Barreau F, Cartier C, Leveque M, Ferrier L, Moriez R, et al. (2007) Pathways involved in gut mucosal barrier dysfunction induced in adult rats by maternal deprivation: corticotrophin-releasing factor and nerve growth factor interplay. J Physiol 580: 347–356.
20. Connor TJ, Starr N, O'Sullivan JB, Harkin A (2008) Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? Neurosci Lett 441: 29–34.
21. Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, Baccarani M, Lemoli RM (2009) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. Blood 113: 2394–2401.
22. Mellor AL, Munn DH (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. Nat Rev Immunol 4: 762–774.
23. Moffett JR, Namboodiri MA (2003) Tryptophan and the immune response. Immunol Cell Biol 81: 247–265.
24. O'Connor JC, Lawson MA, Andre C, Moreau M, Lestage J, et al. (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. Mol Psychiatry 14: 511–522.
25. Mackenzie CR, Worku D, Daubener W (2003) Regulation of IDO-mediated bacteriostasis in macrophages: role of antibiotics and anti-inflammatory agents. Adv Exp Med Biol 527: 67–76.
26. Muller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, Mackenzie CR, et al. (2008) The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. J Cell Mol Med. JCMM542 [pii];10.1111/j.1582-4934.2008.00542.x [doi].
27. Brenk M, Scheler M, Koch S, Neumann J, Takikawa O, et al. (2009) Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. J Immunol 183: 145–154.
28. O'Connor JC, Andre C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, et al. (2009) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. J Neurosci 29: 4200–4209.
29. Russo S, Kema IP, Bosker F, Haavik J, Korf J (2009) Tryptophan as an evolutionarily conserved signal to brain serotonin: molecular evidence and psychiatric implications. World J Biol Psychiatry 10: 258–268.
30. Firk C, Markus CR (2009) Mood and cortisol responses following tryptophan-rich hydrolyzed protein and acute stress in healthy subjects with high and low cognitive reactivity to depression. Clin Nutr 28: 266–271.
31. Robinson OJ, Sahakian BJ (2009) Acute tryptophan depletion evokes negative mood in healthy females who have previously experienced concurrent negative mood and tryptophan depletion. Psychopharmacology (Berl) 205: 227–235.
32. Huttunen R, Syrjanen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, et al. (2010) High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. Shock 33: 149–154.
33. Tattevin P, Monnier D, Tribut O, Dulong J, Bescher N, et al. (2010) Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. J Infect Dis 201: 956–966.
34. Muller N, Schwarz MJ (2006) Neuroimmune-endocrine crosstalk in schizophrenia and mood disorders. Expert Rev Neurother 6: 1017–1038.
35. Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpe S, Steinbusch H, et al. (2007) Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. J Affect Disord 98: 143–151.
36. Wang Y, Lawson MA, Dantzer R, Kelley KW (2009) LPS-induced indoleamine 2,3-dioxygenase is regulated in an interferon-gamma-independent manner by a JNK signaling pathway in primary murine microglia. Brain Behav Immun, S0889-1591(09)00376-6 [pii];10.1016/j.bbi.2009.06.152 [doi].
37. Kiank C, Voss S, Starke A, Zeden J, Domanska G, et al. (2009) Proinflammatory cytokines mediate acute stress-induced loss of intestinal barrier function in the terminal ileum which enhances tryptophan catabolism in BALB/C mice. Brain Behav Immun 23: S42–S43 (Abstract).
38. Dai X, Zhu BT (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase tissue distribution and cellular localization in mice: implications for its biological functions. J Histochem Cytochem 58: 17–28.
39. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. Nat Rev Neurosci 9: 46–56.
40. Iqbal J, Zaidi M (2006) TNF regulates cellular NAD+ metabolism in primary macrophages. Biochem Biophys Res Commun 342: 1312–1318.
41. Dhabhar FS (2009) Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. Neuroimmunomodulation 16: 300–317.
42. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA (1997) Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. J Exp Med 185: 1185–1192.
43. Lob S, Konigsrainer A, Schafer R, Rammensee HG, Opelz G, Terness P (2008) Levo- but not dextro-1-methyl tryptophan abrogates the IDO activity of human dendritic cells. Blood 111: 2152–2154.
44. Desvignes L, Ernst JD (2009) Interferon-gamma-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis. Immunity 31: 974–985.
45. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, et al. (2010) Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. Sci Transl Med 2: 32ra36. 2/32/32ra36 [pii];10.1126/scitranslmed.3000632 [doi].
46. Wang J, Simonavicius N, Wu X, Swaminath G, Reagan J, et al. (2006) Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. J Biol Chem 281: 22021–22028.
47. Kuc D, Zgrajka W, Parada-Turska J, Urbanik-Sypniewska T, Turski WA (2008) Micromolar concentration of kynurenic acid in rat small intestine. Amino Acids 35: 503–505.
48. Paluszkiewicz P, Zgrajka W, Saran T, Schabowski J, Piedra JL, et al. (2009) High concentration of kynurenic acid in bile and pancreatic juice. Amino Acids 37: 637–641.
49. Kim WS, Byeon GJ, Song BJ, Lee HJ (2010) Availability of preoperative anxiety scale as a predictive factor for hemodynamic changes during induction of anesthesia. Korean J Anesthesiol 58: 328–333.
50. Valenzuela MJ, Barrera Serrano JR, Ornelas Aguirre JM (2010) Anxiety in preoperative anesthetic procedures. Cir Cir 78: 147–151.

51. Weighardt H, Heidecke CD, Westerholt A, Emmanuilidis K, Maier S, et al. (2002) Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. Ann Surg 235: 560–567.
52. Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, et al. (2009) Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. Shock 32: 29–34.
53. Jans LA, Riedel WJ, Markus CR, Blokland A (2007) Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. Mol Psychiatry 12: 522–543.
54. Raison CL, Dantzer R, Kelley KW, Lawson MA, Woolwine BJ, et al. (2010) CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. Mol Psychiatry 15: 393–403.