

Aus der Abteilung Immunologie
(Leiterin: Univ. - Prof. Dr. med. Christine Schütt)
des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Thema: Psychischer Stress im Mausmodell: Differenzierung zwischen Glukokortikoid-
und Indolamin 2,3-Dioxygenase-vermittelten Effekten**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2008

vorgelegt von:
Solveig Drude
geb. am: 13.05.1985
in: Bonn-Beuel

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Christine Schütt

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Matthias Gunzer

Ort, Raum: Universität Greifswald, Seminarraum Biochemie, Fleischmannstraße 42-44

Tag der Disputation: 23.08.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	
2.1 Auswirkungen von psychischem Stress im Mausmodell	
2.1.1 Definition von Stress und Stressverarbeitungssysteme	3
2.1.2 Die HPA-Achse	5
2.1.3 Das Mausmodell und Stresseffekte	6
2.2 Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase im Stressmodell	
2.2.1 Indolamin 2,3-Dioxygenase	9
2.2.2 Konsequenzen der Behandlung chronisch gestresster Mäuse mit 1-MT	13
2.3 Inhibition der HPA-Achsenfunktion durch Glukokortikoidrezeptorblockade in Stressmodellen	15
2.3.1 Der Glukokortikoidrezeptor	15
2.3.2 Konsequenzen der Glukokortikoidrezeptorblockade in Stressmodellen	16
3. Zielstellung	19
4. Material und Methoden	
4.1 Material	
4.1.1 Chemikalien	20
4.1.2 Verbrauchsmaterial	21
4.1.3 Geräte	21
4.1.4 Kits	22
4.1.5 Bakterien und deren Anzucht	22
4.1.6 Versuchstiere und deren Behandlung	23
4.1.7 Computerprogramme	23

4.2	Methoden	
4.2.1	Rahmenbedingungen der Tierversuche	24
4.2.2	Die psychischen Stressmodelle	24
4.2.3	Die Behandlung mit RU486	25
4.2.4	Bestimmung der Plasma-Kortikosteronkonzentration	26
4.2.5	Bestimmung der Plasma-ACTH-Konzentration	26
4.2.6	ACTH-Test	26
4.2.7	Bestimmung der Leuko- und Lymphozytenzahl im peripheren Blut	26
4.2.8	Histologische Färbung	27
4.2.9	Morphologische Untersuchung des Thymuskortex	27
4.2.10	Morphologische Untersuchung der Nebennierenrinde	27
4.2.11	Experimentelle <i>E.coli</i> -Infektion	28
4.2.12	Bestimmung des Körpergewichts	28
4.2.13	Messung stressinduzierter Verhaltensänderungen (Stress Severity Score)	28
4.2.14	Messung der Indolamine im Plasma	30
4.2.15	Statistik	31
5.	Ergebnisse	
5.1	Etablierung der Interventionsstrategie mit RU486 im Stressmodell	
5.1.1	Nachweis der Wirksamkeit der Behandlung	32
5.1.2	Wahl des Lösungsmittels wichtig für Analyse von Stresseffekten	33
5.1.3	Nebenwirkungen durch Injektionsstress bei Interventionstherapie	37
5.2	RU486-sensitive Effekte im chronischen Stressmodell	40
5.2.1	RU486 vermindert die Gewichtsabnahme gestresster Mäuse	41
5.2.2	RU486 vermindert stressinduzierte Verhaltensänderungen	42

5.2.3	RU486 verhindert die stressinduzierte Leuko- und Lymphozytopenie	45
5.2.4	RU486 reduziert die stressinduzierte Thymuskortexinvolution	46
5.2.5	RU486 vermindert den Glukokortikoidanstieg im ACTH-Test gestresster Mäuse	49
5.3	RU486-insensitive Effekte im chronischen Stressmodell	
5.3.1	Stressinduzierte erhöhte bakterielle Dissemination nach experimenteller Infektion	52
5.3.2	Stressinduzierte Hyperplasie der Nebennieren	53
5.4	Beeinflussung stressinduzierter Veränderungen des Indolaminstoffwechsels im Plasma durch RU486	56
6.	Diskussion	
6.1	Modifikation der HPA-Achsenaktivität durch unterschiedliche Stressoren	
6.1.1	Nebeneffekte der Interventionstherapie im Stressmodell	62
6.1.2	RU486 vermindert den durch akuten psychischen Stress vermittelten Kortikosteronanstieg	67
6.2	Glukokortikoidvermittelte Stresskonsequenzen	
6.2.1	RU486- und 1-MT-sensitive Stresseffekte	68
6.2.2	RU486-sensitive Stresseffekte	72
6.3	Die stressbedingte Verstärkung der bakteriellen Dissemination ist IDO-vermittelt	74
6.4	Die stressbedingte Hyperplasie der Nebenniere ist weder Glukokortikoid- noch IDO-beeinflusst	76

6.5	Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf erhöhte IDO-Aktivität nach chronischem psychischem Stress	77
6.6	Tabellarische Zusammenfassung der Behandlungseffekte	80
7.	Zusammenfassung	81
8.	Literaturverzeichnis	83
9.	Danksagung	98

1. Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
5-HT	5-Hydroxytryptamin
11 β -HSD2	11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ II
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AP-1	Aktivierungsprotein 1
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2-like
BSA	Bovines Serumalbumin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRH	<i>Corticotropin releasing hormone</i>
DC	<i>Dendritic cells</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fetal calf serum
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GC	Glukokortikoide
GITR	Glukokortikoid-induzierter Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
GITRL	GITR-Ligand
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	<i>Glucocorticoid-responsive element</i>
HPA-Achse	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> , Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HSP	Hitzeschockprotein
IFN γ	Interferon gamma
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
KBE	Koloniebildende Einheiten
KCyc	Kontrolle mit Cyclodextrininjektion
KG	Körpergewicht

KÖI	Kontrolle mit Sesamölinjektion
KRU	Kontrolle mit RU486-Injektion
Kyn-Trp-Quotient	Kynurenin-Tryptophan-Quotient
LB	Lysogeny broth
LPS	Lipopolysaccharid
MC-Rezeptor	Melanocortin-Rezeptor
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF-κB	Nukleärer Faktor-kappaB
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NS	Nervensystem
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
RU486	Mifepriston
s. c.	subkutan
SCyc	Stress mit Cyclodextrininjektion
SNS	Sympathisches Nervensystem
SÖI	Stress mit Sesamölinjektion
SRU	Stress mit RU486-Injektion
SSS	Stress Severity Score
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
TH2-Zelle	Typ2-T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor

2. Einleitung

2.1 Auswirkungen von psychischem Stress im Mausmodell

2.1.1 Definition von Stress und Stressverarbeitungssysteme

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die neuroendokrinen, metabolischen und psychischen Regelkreise eines Organismus in einem relativen Gleichgewicht (Homöostase). In diesem Gleichgewicht ist der Körper an die gegebenen Umweltbedingungen angepasst. Die Störung dieser Homöostase kann als Stress definiert werden ¹. Ein Stressor kann entweder physischer (Kälte, Hitze, Anstrengung, Infektion, Verletzung etc.) oder psychischer Natur (Ängste, Konflikte) sein und zu einer potenziellen Bedrohung für die psychobiologische Integrität des Individuums werden ².

Normalerweise ist der Organismus in der Lage, sich den neuen Umweltbedingungen schnell anzupassen und wieder ein Gleichgewicht herzustellen. Diese Adaptation an geänderte Umweltbedingungen wird Allostase genannt und wurde von Hans Selye bereits im frühen 20. Jahrhundert als „generelles Adaptations-Syndrom“ bezeichnet ^{3, 4}. Die phylogenetisch älteste Stresswahrnehmungsebene, das autonome Nervensystem, vermittelt physiologische Reaktionen wie Erhöhung des Blutdrucks und der Herzfrequenz sowie Bereitstellung von Energie und erfolgt durch die Aktivierung von Zentren im Hirnstamm und sympathische sowie parasympathische Fasern ^{4, 5, 6}. Der Hirnstamm kommuniziert über noradrenerge Neuronen aus dem Locus coeruleus mit dem limbischen System (u. a. Hippocampus, Amygdala, präfrontaler Kortex und Hypothalamus), wo der Stressor mit einer emotionalen Komponente besetzt wird ^{4, 5, 6, 7}. Bei Menschen ist darüber hinausgehend auch eine kognitive Einordnung des Stressimpulses durch den Neokortex nachgewiesen, der auf Erfahrung und Kontextwissen beruht ^{5, 7, 8}.

Die Aktivierung des autonomen NS und des limbischen Systems durch einen Stressor erfolgt innerhalb kürzester Zeit. Das limbische System und der Locus coeruleus beeinflussen sich gegenseitig durch stimulierende Signale wie z.B. *Corticotropin-releasing hormone* (CRH) und Noradrenalin. Zentral erfolgt eine Feinregulation der Stress-Achsen: Serotonin aus Raphe-Kernen und Acetylcholin aus parasympathischen Neuronen aktivieren Hypothalamus und Locus coeruleus,

während endogene Opiate aus Hirnstamm, präfrontalem Kortex und Hypothalamus sowie γ -Amino-Buttersäure (GABA) aus Neuronen der Stria terminalis inhibierend auf Hypothalamus und Locus coeruleus wirken. Nach Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse (s. u.) und des Sympathikus kommt es in der Peripherie zur Ausschüttung der Stresshormone Kortisol/Kortikosteron und Noradrenalin. Glukokortikoide regulieren ihre eigene Produktion über Feedback-Inhibition der Mediatoren der HPA-Achse und verhindern dadurch eine überschießende Stressantwort^{9, 10, 11}.

Es ist wichtig, zwischen akutem und chronischem Stress zu unterscheiden. Kurz andauernder, akuter Stress (Minuten bis Stunden) bewirkt eine so genannte „*fight-or-flight*-Reaktion“, die es dem Individuum ermöglicht, die ungewohnte, neue Situation zu erkennen, zu bewerten und damit adäquat umzugehen^{12, 13, 14}. Als ein wichtiges System ist das Immunsystem schnell aktiviert, um eindringende Pathogene sofort lokal bekämpfen zu können^{12, 15, 16}. Akuter Stress dient vorrangig zur Adaptation an die neue Situation^{12, 17}. Überschreitet das Maß an Stress eine kritische Schwelle, bestimmt durch Qualität (physisch/psychisch, mild/stark) und Quantität (akut/chronisch), kann es zu einem „Versagen der Stressverarbeitungssysteme“ kommen^{1, 18}. Chronischer Stress (Tage bis Wochen) kann lang anhaltende Veränderungen der Funktion des Immunsystems, des Metabolismus und des Verhaltens hervorrufen^{19, 13, 14}. Wichtig ist, dass chronischer psychischer Stress eine Immunsuppression hervorrufen kann^{20, 21, 22, 23-26}. Diese wird durch gehäufte Apoptosen immunkompetenter Zellen, eine antiinflammatorische Zytokinproduktion und eine daraus resultierende erhöhte Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen charakterisiert²¹. Darüber hinaus kann chronischer Stress und die damit verbundenen neuroendokrinen Störungen auch die Entwicklung eines Diabetes mellitus, Stammfettsucht, kardiovaskulären Störungen oder einer Hyperlipidämie fördern^{20, 27}. Als Bestandteile des metabolischen Syndroms bekommen diese Krankheitsbilder in der heutigen modernen westlichen Gesellschaft immer mehr Gewicht²⁸. Gegensätzlich dazu kann chronischer Stress aber auch eine Anorexie hervorrufen²⁹, was zu vermindertem Körpergewicht aufgrund der reduzierten Nahrungsaufnahme führt. Anorektische Störungen können ein Bestandteil von Gemütsschwankungen sein, die wie andere psychische Störungen, z.B. Depressionen oder Angststörungen, häufig mit chronischem Stress in Verbindung gebracht werden^{14, 30, 31, 32}.

Die Kenntnis über die Ursachen der Stresseffekte und ein geeigneter Umgang mit Stressoren sind deshalb als überlebenswichtig anzusehen.

2.1.2 Die HPA-Achse

Stressoren entwickeln ihren Einfluss auf den Organismus wie oben bereits beschrieben über unterschiedliche Transmittersysteme, vorrangig über das sympathische Nervensystem und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse.

Wird der Sympathikus aktiviert, kommt es zur Ausschüttung von Noradrenalin aus sympathischen Nervenenden und von Adrenalin aus dem Nebennierenmark. Über alpha- und beta-adrenerge Rezeptoren entfalten die Katecholamine (Noradrenalin und Adrenalin) ihre Wirkungen zum Beispiel an Gefäßen^{33 (Review)}, am Magen-Darm-Trakt³⁴, am Herzen³⁵ und auch an Zellen des Immunsystems^{36, 37, 38}.

Die HPA-Achse vermittelt die Produktion und Ausschüttung von Glukokortikoiden aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde^{20, 21, 29, 31, 32, 39, 40, 41, 42}. Bei Menschen ist Kortisol das Hauptglukokortikoid, bei Mäusen ist es Kortikosteron^{7, 43}. Der Nucleus paraventricularis des Hypothalamus wird von unterschiedlichen Gehirnzentren durch neuronale und humorale Einflüsse zur CRH-Produktion stimuliert^{9, 44 (Review), 45}. Aktivierende Stimuli auf den Nucleus paraventricularis sind neben Neurotransmittern aus dem limbischen System^{7, 44} einige proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL) 1, IL6 und Tumornekrosefaktor (TNF)^{5, 9, 45}. CRH wird in einen Venenplexus abgegeben, durch welchen das Hormon zum anterioren Teil der Hypophyse (Adenohypophyse) gelangt und dort über eine Bindung an CRH1-Rezeptoren die Ausschüttung von Adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in den peripheren Blutkreislauf anregt. ACTH gelangt über den Blutweg zur Nebennierenrinde, um dort in der Zona fasciculata die Bildung und Ausschüttung von Glukokortikoiden (GC) zu stimulieren^{44, 45}. Glukokortikoide hemmen ihre eigene Produktion durch die Bindung an Glukokortikoidrezeptoren im Hypothalamus, in der Hypophyse und der Nebenniere, woraufhin die Genexpression von CRH, ACTH oder Glukokortikoiden inhibiert wird^{30, 32, 40, 41, 42}.

GC gehören zur Gruppe der Steroidhormone und beeinflussen den Stoffwechsel, den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Herz-Kreislaufsystem und das

Nervensystem. Sie wirken außerdem antiinflammatorisch, immunsuppressiv und proapoptotisch^{39, 46}.

Der Metabolismus wird im weitesten Sinne durch Transaktivierung oder Transrepression GC-abhängiger Gene, die für bestimmte anabole oder katabole Enzyme kodieren, reguliert.

Durch die Beeinflussung der Zytokinausschüttung immunkompetenter Zellen wirken GC antiinflammatorisch und können damit eine Immunsuppression induzieren. Dies geschieht zum Einen durch eine Hemmung der Produktion proinflammatorischer Mediatoren (TNF, IFN γ , IL6) und oxidativen Mediatoren (Sauerstoff- und Stickstoffradikale), zum Anderen durch die Steigerung der Abgabe antiinflammatorischer Zytokine (IL10, TGF β , IL4) aus immunkompetenten Zellen^{19, 20, 21, 47, 48, 49, 50}. Weiterhin wird die Phagozytose und Antigenpräsentation von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen (DC) durch GC gehemmt und verstärkt Apoptose, vorrangig von Lymphozyten, induziert^{19, 20, 21, 30, 41, 47, 48}.

Wichtig zu beachten ist, dass Glukokortikoide nicht nur die klassisch beschriebene antiinflammatorische Wirkung haben, sondern auch einige proinflammatorische, antibakterielle Eigenschaften besitzen. So sind sie in der Lage, den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD) von aktivierten T-Lymphozyten durch Inhibition der Expression des „Todesliganden“ Fas-Ligand zu verhindern⁵¹. Darüber hinaus beobachten Dhabhar et al. in einem Ratten-Modell, dass Glukokortikoide nach akutem Stress auf die Immunantwort in der Haut stimulierend wirken: Im Rahmen einer *delayed type hypersensitivity* (DTH) wandern vermehrt aktivierte Lymphozyten, Granulozyten und NK-Zellen in die Haut und lokale Lymphknoten und vermitteln dort eine antigenspezifische Immunreaktion, welche direkt nach akutem Stress signifikant stärker ist als nach chronischem Stress oder im Vergleich zu ungestressten Tieren¹⁶. Diese GC-Funktion ist unter dem Hinblick, dass eine akute Verletzung zunächst die Haut betreffen würde und diese dann eine Eintrittspforte für Keime wäre, stimmig.

2.1.3 Das Mausmodell und Stresseffekte

Um Ursachen und Konsequenzen von Stresseffekten zu untersuchen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein murines Stressmodell entwickelt. Ein allgemein anerkanntes Maus-Modell für psychischen Stress ist der Einsatz von Immobilisationsstress in gut belüfteten Zentrifugenröhrchen, der in der hier gezeigten

Arbeit mit einem akustischen Stressor kombiniert wird. Der akustische Stressor besteht aus einem Ultraschallton, der randomisiert intermittierend mit wechselnder Frequenz ausgesendet wird. Durch diese Unvorhersehbarkeit des Stressimpulses soll eine Habituation der Mäuse an den Stress im chronischen Versuchsaufbau umgangen werden.

Unterschiedliche Mausstämme reagieren abhängig von ihrem genetischen Hintergrund unterschiedlich auf chronischen Stress. Zum Beispiel ist die Anfälligkeit von CBA-Mäusen auf chronischen Stress geringer als die von BALB/c-Mäusen, d. h., CBA-Mäuse zeigen im Gegensatz zu BALB/c-Mäusen nach chronischem psychischem Stress weder eine antiinflammatorische Zytokinproduktion noch T-Lymphozyten-Apoptosen²¹. Doch nicht nur der Mausstamm, auch das Geschlecht bestimmt die Anfälligkeit gegenüber Stresseffekten. Bei BALB/c-Mäusen zeigen Männchen unter Stressexposition stärkere körperliche und psychische Veränderungen als Weibchen²¹. Weiterhin spielen Tages- und Jahreszeit bei der Stressanfälligkeit eine Rolle: Morgens und im Winter sind die Stresseffekte bei BALB/c-Mäusen stärker ausgeprägt als abends und im Sommer^{21, 22}.

Darüber hinaus findet man interindividuelle Unterschiede bei der *stress coping ability*, die unabhängig von experimentellen Faktoren, Geschlecht und Tierstamm sind.

Alle Versuche für diese Arbeit wurden an weiblichen BALB/c-Mäusen durchgeführt, die nach akuter und nach chronischer psychischer Stressexposition signifikant erhöhte Plasma-Kortikosteronkonzentrationen^{19, 21, 53, 22} und eine Erhöhung der ACTH-Sensitivität der Nebennierenrindenzellen aufwiesen (unveröffentlichte Daten). Eine durch psychischen Stress induzierte Erhöhung der Kortikosteronspiegel im Plasma von Mäusen konnte auch von anderen Arbeitsgruppen mehrfach gezeigt werden^{16, 19, 25, 29, 30, 32, 41, 48, 52}. Als Zeichen einer hohen Beanspruchung durch starke Aktivierung der HPA-Achse ist die Nebennierenrinde chronisch gestresster Mäuse stark hyperplastisch verändert^{53, 54, 55}. Besonders die Zona fasciculata als Bildungsort der Glukokortikoide ist verbreitert und bei der morphologischen Untersuchung ist bei gestressten Mäusen eine erhöhte Anzahl der Parenchymzellen an diesem Ort zu erkennen⁵⁵.

Glukokortikoide sind katabol wirksame Hormone^{56, 57, 58, 59}. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass in unserer und anderen Arbeitsgruppen ein signifikanter Gewichtsverlust der Versuchstiere nach chronischer Stressexposition beobachtet wurde^{21, 53, 60-62, 63-66}. Diese Gewichtsabnahme geht mit einer veränderten

Genexpression in der Leber gestresster Mäuse einher: Die Expression von Genen der Schlüsselenzyme für Glukoneogenese, Proteolyse und Lipolyse ist hochreguliert⁵³, was auf die Entwicklung einer hyperkatabolen Stoffwechsellage mit erhöhter Energiebereitstellung im chronischen Stress hindeutet.

Weiterhin beeinflussen GC die Stimmungslage und das Verhalten. In der Folge von chronischem psychischen Stress entwickeln Mäuse eine depressionsähnliche Stimmungslage^{20, 21, 67, 68, 69}: Die soziale Interaktion, das Erkundungsverhalten und die allgemeine lokomotorische Aktivität der gestressten Mäuse sind in ihrer gewohnten Umgebung gegenüber ungestressten Kontrolltieren signifikant herabgesetzt^{20, 21}. Interessanterweise ist dieses als depressiv eingestufte Verhalten hoch signifikant mit dem im Stress beobachteten Kortikosteronanstieg im Plasma der einzelnen Mäuse korreliert²¹. Als mögliche Ursache für dieses Phänomen ist bereits bekannt, dass Glukokortikoide die Expression von 5-HT-Rezeptoren im Hippocampus hemmen können^{70, 71, 72} und durch die fehlende Serotoninwirkung Depressionen entstehen.

Besonders intensiv hat sich unsere Arbeitsgruppe bislang mit der Charakterisierung einer stressinduzierte Immunsuppression beschäftigt. Im peripheren Blut chronisch und auch akut gestresster Mäuse entwickeln sich eine Leuko- und eine Lymphozytopenie^{21, 47}. Dieses Absinken der Zellzahlen ist im akuten Stress innerhalb von wenigen Stunden transient⁷³ und kann durch eine Umverteilung der Zellen in peripheres Gewebe erklärt werden^{12, 16, 17, 52}. Die Leuko- und Lymphozytopenie im chronischen Stress kann auf Apoptosen in lymphatischen Organen zurückgeführt werden, die in früheren Experimenten²¹ und von anderen Arbeitsgruppen⁷⁴ bereits gezeigt werden konnten.

So kann eine Apoptose immunkompetenter Zellen vor allem im Thymus chronisch gestresster Nager nachgewiesen werden^{21, 74}. Durch den Zelltod von Thymozyten kommt es bei gestressten Tieren zu einer signifikanten Thymuskortexinvolution.

Neben dieser Beeinflussung des Lebenszyklus von T-Lymphozyten modifizieren Stresshormone wie Glukokortikoide und Katecholamine, wie bereits beschrieben, auch die Fähigkeit dieser Zellen, Zytokine zu produzieren^{21, 75-81}. So ist in unserem Stressmodell die *ex-vivo*-Zytokininduzierbarkeit von IL10 in Milzzellkulturen gestresster BALB/c-Mäuse erhöht, die von TNF und IFN γ dagegen erniedrigt²¹. Darüber hinaus ist bekannt, dass apoptotische Zellen, wie sie in chronisch gestressten Tieren messbar sind, zur Produktion antiinflammatorischer Mediatoren in

Monozyten und Makrophagen führen⁸²⁻⁸⁴. Chronischer Stress verursacht folglich bei immunkompetenten Zellen die Entwicklung eines antiinflammatorischen Zytokinprofils.

Diese Immunsuppression mündet bei BALB/c-Mäusen in einem Verlust der Fähigkeit, unter anderem eine experimentelle *Escherichia coli* (*E. coli*)-Infektion adäquat zu bekämpfen²¹. In ähnlicher Weise, wie von anderen Autoren gezeigt, ist die Abwehr anderer Bakterien, wie *Streptococcus* der Gruppe G oder *Listeria monocytogenes*, die durch Induktion einer proinflammatorische Typ1 T-Helfer Zelle (TH1-Zelle)-Antwort bekämpft werden, beeinträchtigt^{47, 85}.

Die Konsequenzen von psychischem Stress im NagermodeLL zeigen sich zusammengefasst in der Entwicklung eines hyperkatabolen Syndroms, einer depressiven Stimmungslage und einer Immunsuppression mit verminderter antibakterieller Abwehr.

2.2 Rolle der Indolamin 2,3-Dioxygenase im Stressmodell

2.2.1 Indolamin 2,3-Dioxygenase

In unserer Arbeitsgruppe kann bei Mäusen, die chronischem psychischem Stress unterzogen wurden, neben den bisher beschriebenen Veränderungen eine massive Zerstörung des terminalen Ileums beobachtet werden, deren initiale Ursachen genauer untersucht wurden. Beeindruckend ist, dass eine Schädigung des Darmepithels bereits nach einer einzelnen Stresssitzung messbar ist. Dabei zeigt sich, dass es bereits nach diesem akuten Stress zu einer Darmbarrierestörung mit einem Übertritt von Bakterien in unterschiedliche Organe wie Leber und mesenteriale Lymphknoten kommt⁸⁶. Begleitet wird dieser Stresseffekt von einem erhöhten Tryptophankatabolismus im Plasma gestresster BALB/c-Mäuse⁸⁶. Ein wichtiges tryptophanabbauendes Enzym, welches antiinflammatorische, aber auch antibakterielle Eigenschaften hat, ist die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO). IDO ist durch proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharid (LPS) oder CpG-Motive induzierbar^{87, 88}. Das bedeutet, entweder im akuten Stress übergetretene bakterielle Produkte selbst oder die darauffolgende Induktion einer proinflammatorischen Antwort können potenziell eine IDO-Aktivität induzieren.

IDO wirkt als tryptophanabbauendes Enzym antibakteriell, aber auch antiinflammatorisch bzw. immunsuppressiv und kann die Entstehung einer depressiven Stimmungslage begünstigen^{45, 87-96}.

IDO katalysiert den ersten Schritt des Tryptophanabbaus (Abb. 2.1). In der Leber ist die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) für den Tryptophankatabolismus über den Kynureninstoffwechselweg zuständig⁹⁷⁻⁹⁹. Im Gegensatz zur ausschließlich induzierbaren IDO wird sie konstitutiv exprimiert und ihre Aktivität durch Glukokortikoide und Tryptophan verstärkt^{100, 1}.

IDO-Induzierbarkeit findet man in verschiedenen Zelltypen: Makrophagen, Fibroblasten, dendritischen Zellen^{87, 102}, Mikroglia, Astrozyten und Neuronen¹⁰³.

Die IDO-Induktion erfolgt über unterschiedliche Mechanismen: IFN γ aktiviert eine Signalkaskade, die durch die Transkription des IDO-Gens zu einer Translation des IDO-Enzyms führt¹⁰⁴. TNF und LPS wirken synergistisch auf die IDO-Induktion^{87, 91, 99, 105-112}.

Des Weiteren beschreiben Puccini und Grohmann die Induktion von IDO über einen alternativen nukleären Faktor-kappaB (NF- κ B)-Aktivierungsweg in DC, bei dem eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- κ B die Transkription des IDO-Gens unterstützt^{113, 114}.

Durch Beobachtungen einiger Arbeitsgruppen wird deutlich, dass Glukokortikoide die IDO-Induktion verstärken, aber nicht selber auslösen können: GC haben vermutlich sowohl einen synergistischen Effekt auf die IFN γ -vermittelte als auch die NF- κ B-vermittelte IDO-Aktivierung^{113, 115}. Türck et al. beobachteten *in vitro* eine Steigerung der IDO-Aktivität im Überstand einer Zellkultur, welcher zusätzlich zum IFN γ Dexamethason zugesetzt wurde¹¹⁵. Grohmann et al. berichten über einen reversen Signalweg, bei dem der lösliche Glukokortikoid-induzierte Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor (GITR) *in vitro* an den auf DC exprimierten GITR-Liganden (GITRL) bindet und über den alternativen NF- κ B-Aktivierungsweg die IDO-Expression startet¹¹³. Wie sein Name schon sagt, wird der GITR durch Glukokortikoide, in diesem Fall Dexamethason, induziert.

Beim Tryptophanabbau durch IDO oder TDO entsteht zunächst Kynurenin, was durch unterschiedliche Enzyme zu Kynureninsäure, Anthranilsäure oder 3-Hydroxy-Kynurenin und Quinolinsäure verstoffwechselt wird. Am Ende der Umbauschritte mit dem Zwischenprodukt Quinolinsäure entsteht Nikotinamidadenindinukleotid

(NAD⁺)^{87 (Review), 90 (Review), 116}. Dieses Molekül wird vor allem zur Energiegewinnung mittels Adenosintriphosphat (ATP) benötigt.

Einige der Tryptophan-Abbauprodukte sind neurotoxisch⁹²⁻⁹⁴, andere neuroprotektiv. Quinolinsäure zum Beispiel zerstört über eine agonistische Bindung an N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und eine damit verbunden exzitotoxische Aktivität Nervenzellen^{90 (Review), 117-120}, Kynureninsäure schützt diese Zellen durch seine antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor^{121 (Review)}.

Nicht nur für neuronales Gewebe, sondern auch für Zellen des Immunsystems sind verschiedene Tryptophankataboliten toxisch. Die zelltodvermittelnde Dosis ist hier sogar geringer als bei der Neurotoxizität⁹²: *In vitro* zeigt sich, dass Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilinsäure die Proliferation von T-Lymphozyten inhibieren. Terness et al. vermuten die Förderung einer Apoptose als zugrundeliegenden Mechanismus⁹⁶. Aktivierte T-Zellen sind weitaus anfälliger für diese zytotoxischen Effekte als nicht aktivierte Lymphozyten, die nur durch hohe Konzentrationen und lange Einwirkzeiten der Metaboliten geschädigt werden. Sogar B- und NK-Zellen können durch Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilinsäure in Apoptose getrieben werden. Grohmann et al. beobachteten *in vitro* proapoptotische Effekte von Tryptophan-Metaboliten auf T-Zellen¹²². Fallarino et al. berichten von einer durch 3-Hydroxy-Anthranilinsäure und Quinolinsäure induzierten Caspase 8-vermittelte Apoptose von Thymozyten und TH1-Zellen *in vitro*⁹². Dagegen sind TH2-Zellen nicht von den zytotoxischen Effekten betroffen⁹². Verschiedene Arbeitsgruppen hypothetisieren, dass diese proapoptotischen Effekte von Kynureninen ebenfalls *in vivo* auftreten können^{92, 96, 122}.

Grundlegender als die proapoptotischen Metaboliten trägt die Tryptophandepletion zurIDO-vermittelten Immunsuppression bei. Tryptophan ist die wichtigste der essentiellen Aminosäuren und wird zur Proteinsynthese benötigt. Fehlt Tryptophan, wird eine Zellteilung, zum Beispiel von T-Lymphozyten, unmöglich^{96, 123-127}.

In mehreren *in vivo*-Studien werden die immunsupprimierenden Eigenschaften von IDO im Zusammenhang mit Transplantatabstoßung und Tumorwachstum bestätigt: Tryptophandepletion und Produktion zytotoxischer Substanzen führen zu verlängertem Transplantatüberleben und vermindertem Tumorwachstum¹²⁸⁻¹³².

Wie oben bereits beschrieben hat der IDO-vermittelte Tryptophan-Katabolismus nicht nur immunregulatorische Funktionen, sondern beeinflusst ebenso neuronale Prozesse. Wichtig ist, dass erhöhte IDO-Aktivität zu Depressionen führen kann:

Tryptophan wird nicht nur durch IDO zu Kynurenin abgebaut, sondern auch durch die Tryptophan-Hydroxylase zu Serotonin. Serotonin ist ein wichtiger Neurotransmitter, welcher an 5-Hydroxytryptamin (5-HT_{1A})-Rezeptoren bindet und dadurch unter anderem Wohlbefinden hervorruft¹³². Fehlt Tryptophan und damit auch die Quelle für Serotonin¹³³, kann der sinkende Serotoninspiegel zu einer depressiven Stimmungslage führen^{134, 135}. Innerhalb der letzten Jahre wurde eine weitere Theorie zur Entstehung stressbedingter Depressionen aufgestellt: Die während des Tryptophankatabolismus entstehenden Kynurenine haben, wie bereits beschrieben, neurotoxische Eigenschaften, welche zu Neurodegeneration und damit Depressionen führen können. Der neuroprotektiven Kynureninsäure hingegen werden antidepressive Eigenschaften zugeschrieben^{45, 136, 137}.

IDO vermittelt also durch Entzug des überlebenswichtigen Tryptophans und durch zytotoxische Metaboliten die Unterdrückung einer proinflammatorischen Immunantwort und kann eine stressbedingte Depression fördern.

Daneben ist die IDO-Funktion unter physiologischen Bedingungen sehr wichtig für den Organismus. Beschrieben wurde das Enzym in der Plazenta, wo es zur Induktion einer lokalen Immunsuppression und damit zur Aufrechterhaltung der Schwangerschaft beiträgt. Weiterhin hilft eine lokale Tryptophandepletion bei der Bekämpfung von Pathogenen, aber auch von Tumorzellen, die auf Tryptophan für die Zellteilung angewiesen sind^{87, 88, 90 (Reviews)}. Daten unserer eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass der Tryptophankatabolismus via IDO während psychischem Stress von Bedeutung ist (unveröffentlichte Daten).

IDO ist somit ein Enzym, welches üblicherweise während einer Infektion durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wird und durch seine antiinflammatorischen und immunsupprimierenden Eigenschaften eine übermäßige Inflammation verhindert. Viele der Kynurenine sind jedoch neuro- und zytotoxisch und können bei pathologisch verstärkter IDO-Aktivierung (z. B. durch chronischen psychischen Stress) zu Depressionen und einem immunsupprimierten Status des Individuums führen.

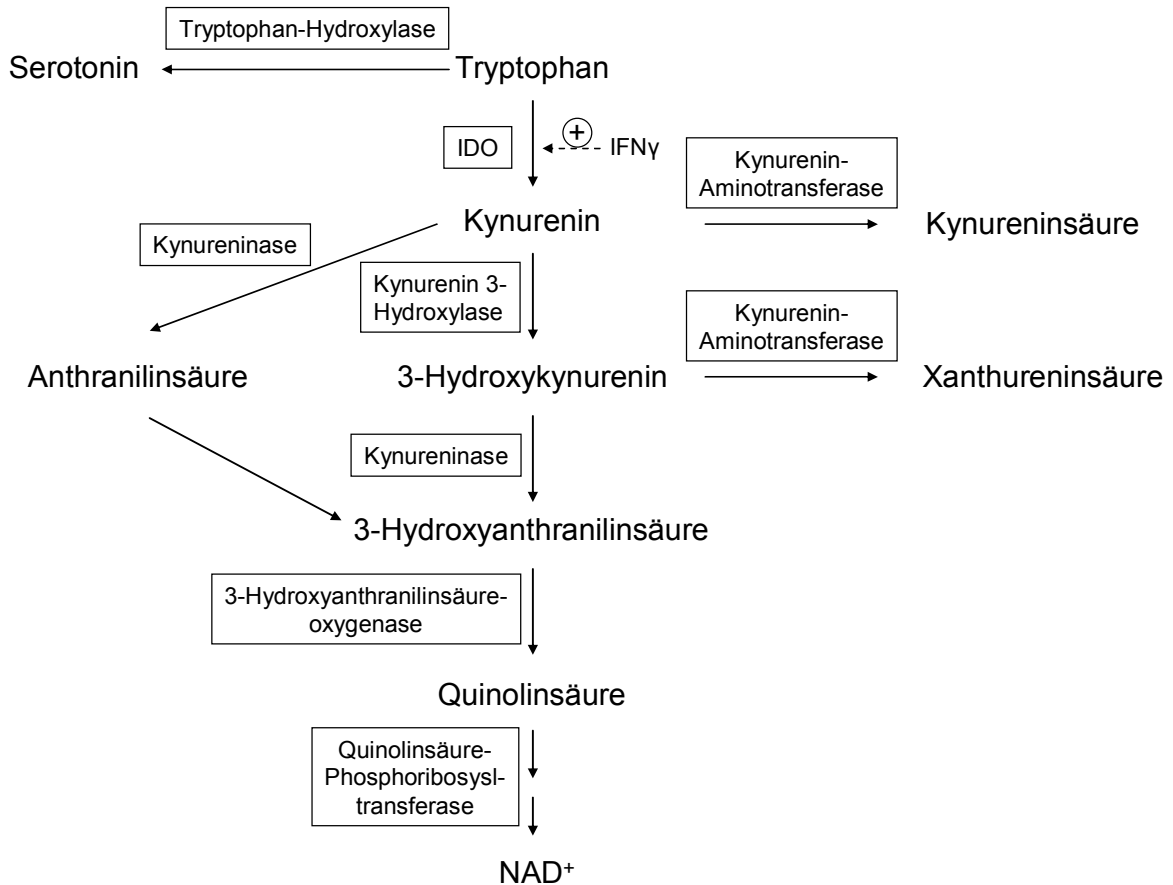


Abb. 2.1 Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan (vereinfachte Darstellung). Durch die Tryptophan-Hydroxylase wird Tryptophan zu Serotonin umgebaut. Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Kynurenin-Abbauweges und wird durch Interferon γ (IFN γ) aktiviert. Aus Kynurenin entstehen zum einen Kynureninsäure (zytoprotektiv) und zum anderen 3-Hydroxyanthranilinsäure und Quinolinsäure (zytotoxisch) ⁹⁶. NAD⁺ wird zur Bereitstellung von Energie benötigt.

2.2.2 Konsequenzen der Behandlung chronisch gestresster Mäuse mit 1-MT

Eine Substanz zur kompetitiven IDO-Inhibition ist 1-Methyl-Tryptophan (1-MT) ¹³⁸, das in unseren Experimenten im Trinkwasser verabreicht wird. Unsere Arbeitsgruppe nutzt 1-MT zur IDO-Hemmung, um dessen Effekte auf Konsequenzen des chronischen kombinierten akustischen und Immobilisationsstressmodells zu untersuchen.

Während der IDO-Inhibition durch 1-MT kommt es überraschenderweise zur Aufhebung vieler Symptome der stressvermittelten Immunsuppression. So ist die erhöhte stressvermittelte Induzierbarkeit des antiinflammatorischen Zytokins IL10

durchIDO-Blockade während chronischem Stress nicht mehr messbar. Die 1-MT-Behandlung verhindert in diesem Fall also einen stressinduzierten antiinflammatorischen Zytokinstatus⁸⁶. In der Folge zeigen 1-MT behandelte Mäuse eine verbesserte antibakterielle Antwort nach chronischem Stress: Infiziert man Mäuse mit *E. coli*, zeigen zuvor chronisch gestresste Tiere eine deutlich erhöhte bakterielle Last gegenüber ungestressten Kontrollen²¹. Nehmen gestresste Mäuse allerdings über das Trinkwasser 1-MT zu sich, können sie die experimentell zugeführten Pathogene signifikant besser bekämpfen als die nicht behandelten gestressten Mäuse⁸⁶.

Weiterhin kann unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Behandlung mit 1-MT die Entwicklung depressionsähnlichen Verhaltens im chronischen psychischen Stress reduziert. Behandelte, gestresste Mäuse bewegen sich sichtbar lebhafter und neugieriger durch ihren Käfig als gestresste Kontrolltiere⁸⁶. Dieser Behandlungseffekt kann auf eine erhöhte Serotoninverfügbarkeit zurückgeführt werden, die auf eine Blockade des tryptophandepletierenden EnzymsIDO folgt. 1-MT hat allerdings nicht nur Auswirkungen auf das Immunsystem und die Psyche, sondern auch auf den Metabolismus der Maus, so wird die im chronischen Stress auftretende Gewichtsabnahme der Mäuse durch 1-MT-Behandlung reduziert⁸⁶.

Diese Ergebnisse sind unerwartet, da die beschriebenen Stresseffekte zumeist auf Glukokortikoide oder Aktivierung des SNS zurückgeführt werden.

Welche Mechanismen den Beobachtungen zugrunde liegen, ist noch nicht geklärt. Eine wichtige und überraschende Beobachtung ist jedoch, dass der stressbedingte Kortikosteronanstieg unter 1-MT-Behandlung ausbleibt, was auf eine verminderte ACTH-Sensitivität zurückgeführt werden kann (unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtung könnte ein erster Hinweis darauf sein, dassIDO-Aktivität die HPA-Achse beeinflusst und darüber einige Stresseffekte vermittelt.

Durch diese auf eine während derIDO-Inhibition zurückgeführte Hemmung der ACTH-vermittelten Kortikosteronausschüttung aus der Nebenniere stellt sich nun die Frage, welche Stresseffekte GC-bedingt und welche direktIDO-bedingt sind. Durch eine Blockade der Glukokortikoidrezeptoren mittelsRU486 und einen Vergleich der resultierenden Effekte mit bekannten 1-MT-Wirkungen soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob die 1-MT-Effekte nur auf eine Inhibition der Glukokortikoide zurückgeführt werden können.

2.3 Inhibition der HPA-Achsenfunktion durch Glukokortikoidrezeptorblockade in Stressmodellen

Da die IDO-Blockade durch 1-MT überraschenderweise zur Inhibition vieler Stresseffekte führt, 1-MT aber gleichzeitig den stressbedingten Glukokortikoidanstieg verhindert, soll eine Glukokortikoidrezeptorblockade während chronischem Stress durchgeführt werden, um direkte GC- von IDO-vermittelten Effekten im Stress zu unterscheiden.

2.3.1 Der Glukokortikoidrezeptor

Glukokortikoidrezeptoren (GR) werden ubiquitär im Körper exprimiert³² (Review). Ungebundene Rezeptoren befinden sich an Hitzeschockproteine (HSP) assoziiert im Zytosol der Zellen und sind damit inaktiviert^{39, 51}. GC sind lipophil und können die Zellmembran ungehindert passieren. Bindet ein Glukokortikoid an seinen Rezeptor, dissoziiert dieser von den HSP und transloziert in den Nukleus^{39, 51, 139-141}. Zwei GC-GR-Komplexe können dort homodimerisieren und an ein Glukokortikoid-responsives Element (GRE) an der DNA binden^{51, 142-144}. Über Verhinderung oder Ermöglichung der Transkription nachfolgender Genabschnitte regulieren Glukokortikoide die Produktion bestimmter Enzyme und Proteine. So wird unter anderem die Gentranskription für die Schlüsselenzyme der Glukoneogenese, der Lipolyse und der Proteolyse verstärkt. Liegt der GC-GR-Komplex dagegen nicht als Dimer vor, kann er die Gentranskription durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NF- κ B oder Aktivierungsprotein-1 (AP-1) indirekt beeinflussen^{145, 146}. Über diesen Weg wird wahrscheinlich die Produktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine reguliert³².

Glukokortikoide binden nur dann an GR, wenn sie in hohen Konzentrationen im Plasma vorliegen. In basalen Plasmakonzentrationen binden sie an Mineralokortikoidrezeptoren (MR), welche genau wie GR als Transkriptionsfaktoren wirken und eine höhere Affinität zu Glukokortikoiden haben als Glukokortikoidrezeptoren^{32, 41, 42}. Mineralokortikoidrezeptoren werden gewebe-spezifisch exprimiert, z. B. vom Hippocampus und von Epithelzellen der Niere¹⁴⁷. In Nierenepithelzellen wird das Enzym 11 β -Hydroxysteroiddehydrogenase Typ II (11 β -HSD2) produziert. Die 11 β -HSD2 baut Kortikosteron zu 11-Dehydrokortikosteron,

einem inaktiven Metaboliten des Kortikosterons, ab. Kommt es zur Bindung eines Glukokortikoids an den MR, inhibiert das Enzym auf diesem Wege die Signalübertragung des Rezeptors und verhindert somit eine Beeinflussung des Wasserhaushalts durch GC¹⁴⁸. In Neuronen jedoch fehlt die 11 β -HSD2, so können GC einige ihrer zentralen Wirkungen über Bindung an den MR vermitteln¹⁴⁹. Unter physiologischen Umständen wird die GC-gesteuerte Feedback-Inhibition der HPA-Achsenaktivität über den MR vermittelt, während Stressexposition jedoch über den GR¹⁴⁹⁻¹⁵¹. GR und MR vermitteln teilweise gegensätzliche Effekte: Während die Aktivierung der GR zum Beispiel die Apoptose von Neuronen zur Folge hat, schützt die Bindung von GC an den MR die Neuronen vor dem Zelltod^{41 (Review)}.

2.3.2 Konsequenzen der Glukokortikoidrezeptorblockade in Stressmodellen

Zur experimentellen Glukokortikoidrezeptorblockade wird häufig RU486 (Mifepriston, 11 β - [p-(Dimethylamino)phenyl] - 17 β - hydroxy -17- (1-propynyl) estra - 4,9 - dien - 3-on) eingesetzt. Dieser Inhibitor wurde von dem französischen Forschungszentrum Roussel-Uclaf 1981 zunächst als Progesteronrezeptorblocker produziert^{56, 152}, hat aber auch eine starke Affinität zum Glukokortikoidrezeptor. Seine Bindungsfähigkeit an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) ist als gering anzusehen¹⁵². Mifepriston wird, in Kombination mit einem Prostaglandin-Analogen, seit den 80er Jahren als Abtreibungspille im ersten Schwangerschaftsdrittel eingesetzt^{153 (Review)}. Das lipophile RU486 hat bei oraler Applikation im Menschen eine Halbwertszeit von 20-30 Stunden^{56, 152, 153}. Zur Halbwertszeit des Medikaments nach subkutaner Injektion in der Maus wurden noch keine Daten veröffentlicht. Für die vorliegende Arbeit wird nach Rücksprache mit Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie der Universität Greifswald ebenfalls von einer ca. 24-stündigen Halbwertszeit ausgegangen. Die subkutane Applikationsart des Medikaments führt vermutlich zu einer Depotwirkung. Das Medikament kann die Blut-Hirnschranke überwinden und so auch an GR im Gehirn binden¹⁵⁴.

Mifepriston verhindert sowohl die Dissoziation der Hitzeschockproteine vom GR¹⁵⁵ als auch die Translokation des GR in den Zellkern¹⁵⁶ und blockiert so den Signalübertragungsweg des Glukokortikoidrezeptors.

RU486 greift auf unterschiedliche Art und Weise in die Regulation der HPA-Achsenaktivität ein. So kommen einige Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass

RU486 die HPA-Achsenaktivität über Beeinträchtigung der GC-vermittelten Feedbackinhibition verändert^{157, 158}. Nicht nur die Aktivität der HPA-Achse, sondern auch die Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen werden durch Mifepriston beeinflusst: RU486-behandelte Nager zeigen sowohl nach akuter als auch nach wiederholter Stressexposition im Vergleich mit unbehandelten Kontrollgruppen erhöhte Plasma-Kortikosteronwerte^{159, 160}. Auch bei Menschen ist der Kortisolgehalt im Plasma 2-3 Tage nach Einnahme einer RU486-Pille erhöht. Die durch einen Transaktivierungsassay¹⁶¹ ermittelte Bioaktivität des Kortisols ist allerdings erniedrigt¹⁶².

Daneben wird eine antidepressive Wirkung dieses GR-Blockers beschrieben: Bei Menschen kann eine tägliche Applikation einer RU486-Pille die Symptome einer psychotischen Depression abmildern. Dieses Ergebnis wird durch Anwendung der so genannten „Hamilton rating scale for depression“ während der 4-tägigen Medikamentengabe deutlich und kann unter ebenfalls 4-tägiger Plazebo-Behandlung nicht beobachtet werden¹⁶³.

Da GC hohe immunsuppressive Potenz besitzen (s. o.), ist es nicht verwunderlich, dass eine GR-Blockade die Entstehung immundefizienter Zustände reduziert. In unterschiedlichen Stressmodellen wird eine Verminderung der stressinduzierten Immunsuppression durch RU486 beobachtet. So vermindert Stress bei Nagern die Anzahl der an einen Entzündungsort einwandernden Zellen. Dieser Effekt wird durch RU486-Gabe verhindert^{85, 164}. Auch die herabgesetzte Proliferation und die Apoptose immunkompetenter Zellen, wie sie unter chronischem psychischem Stress bei Nagern unter anderem im Thymus beobachtet wird, kann durch RU486-Behandlung reduziert werden⁷⁴. Ebenso werden stressvermittelte Veränderungen der Zytokinproduktion immunkompetenter Zellen durch die Glukokortikoidrezeptorblockade verhindert: Chronischer Stress geht mit einer reduzierten Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IFN γ , IL12 und TNF einher. Werden gestresste Nager mit RU486 behandelt, ist eine proinflammatorische Antwort ihres Immunsystems hingegen möglich, zumal zusätzlich die stressinduzierte Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine (IL4 und IL6) verhindert wurde⁴⁷. Andere Arbeitsgruppen können allerdings beobachten, dass der stressbedingte Anstieg der antiinflammatorischen bzw. immunregulatorischen Zytokine IL6, IL9 und IL13 durch RU486-Behandlung nicht beeinflusst wird¹⁶⁵. Letztendlich ist bekannt, dass erhöhte GC-Level mit einer verminderten antibakteriellen Antwort verbunden sind. Wie

bereits beschrieben, weisen gestresste Mäuse eine verringerte Fähigkeit auf, eine experimentelle bakterielle Infektion abzuwehren. Viele Autoren zeigen, dass eine RU486-Applikation die antibakterielle Antwort zum Teil wieder herstellen kann. Zum Beispiel weisen Mäuse nach chronischem Immobilisationsstress und anschließender Infektion einer Hautwunde mit *Streptococcus* der Gruppe G ein größeres Wachstum opportunistischer Bakterien in dieser Wunde auf, was durch RU486-Behandlung während des Stresses vermindert werden konnte⁸⁵.

Durch die Glukokortikoidrezeptorblockade mittels RU486 wird folglich die HPA-Achsenaktivität im Stress verändert, Depressionen können, zumindest beim Menschen, vermindert werden und die stressbedingte Immunsuppression wird zum großen Teil verhindert.

Sowohl erhöhte Glukokortikoide als auchIDO-Aktivität scheinen also Einfluss auf die bei Mäusen unter chronischem psychischem Stress beobachteten Veränderungen neuroendokriner Funktionen, des Metabolismus, Verhaltensänderungen und die Immunsuppression nehmen zu können. Bisher ist allerdings bei einigen dieser Veränderungen nicht geklärt, welchem der genannten Mediatoren sie zuzuordnen sind.

3. Zielstellung

Zur Klärung der Frage, welche Stresseffekte auf erhöhte Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen und welche auf eine IDO-Aktivierung zurückzuführen sind, soll weiblichen BALB/c-Mäusen während chronischer Stressexposition der Glukokortikoidrezeptorblocker RU486 injiziert werden und die Wirkungen von RU486 den bereits vorhandenen Resultaten der Behandlung mit dem IDO-Inhibitor 1-MT in ausgewählten Read-out-Systemen gegenübergestellt werden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

- Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
- ACTH ₁₋₂₄	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- d ₄ -Kynureninsäure	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- d ₅ -Phenylalanin	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- d ₆ -Kynurenin	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- Eosin G	Certistain®, Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ethanol, 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Fötales Kälberserum (FCS)	BIOCHROM KG, Berlin, Deutschland
- Hämatoxylin-Lösung nach Mayer	Fluka AG, Buchs, Deutschland
- LPS von <i>S. abortus equi</i>	SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Methanol, 99,8%	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
- PBS-DULBECCO	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Physiologische Kochsalzlösung (NaCl)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- TissueTek® Einbettungsmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
- Trichloressigsäure	Fluka BioChemika, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterial

- Cryomold®-Einbettungschalen	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
- Deckgläschen	Superior Marienfeld, Marienfeld, Deutschland
- EDTA-Vacutainer K2E	BD™-Vacutainer, Plymoth, UK
- Einmalspitzen (10µl, 200µl, 100µl, 2,5ml)	Greiner Bio-one, Deutschland oder Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Einmalspritzen 0,5 ml	BD™, Franklin Lakes, USA
- Einmalspritzen 2 ml	BD™-Discardit, Plymoth, UK
- Mikro-Hämatokritröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm	MILLEX®, MILLIPORE, Irland
- SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
- Tierfutter, ssniff R-Z ssniff	Spezialitäten GmbH, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)	SARSTEDT, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Falcon®, Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, France

4.1.3 Geräte

- Brutschank	Heraeus, Hanau, Deutschland
- ELISA-Reader (Tecan)	SLT- Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
- Hämocounter Sysmex K-4500	SYSMEX GmbH, Deutschland
- Kamera, SPOT RT Power Supply	Visitron Systems GmbH, Hamburg, Deutschland
- Kryotom MICROM HM 560	MICROM Int. GmbH, Deutschland

- Mikroskop: Olympus BX60	Olympus, Hamburg, Deutschland
- Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Orbitalschüttler, Shaker: S-3.08M Skyline	Bartels Instruments, Heidelberg, Deutschland
- Tandem Massenspektrometer Refurb Wallac MS2	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
- Ultraschallsender	SiXiS, Pat.No.109977, Taiwan
- Ultraschallwasserbad	Heraeus, Hanau, Deutschland
- Vortex	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
- Zentrifuge: EBA 12 R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Zentrifuge: Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland

4.1.4 Kits

- Corticosteron-ELISA	IDS, Boldon, UK
- ACTH-ELISA	MD Bioscience Inc., St. Paul, USA

4.1.5 Bakterien und deren Anzucht

- <i>E.coli</i> ATCC 25922	isoliert aus Diarrhoe eines Säuglings, bereitgestellt vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Greifswald
- Kulturmedium: Lysogeny broth (LB)	Gibco, Eggenstein, Deutschland

- Agar:
Columbia Agar mit 5 % Schafsblut BD BBL™, Heidelberg,
Deutschland

4.1.6 Versuchstiere und deren Behandlung

- BALB/c-Mäuse, weiblich u. männlich eigene Zucht, Universität
Greifswald oder Charles River
Laboratories, Sulzfeld,
Deutschland
- in-vivo-Glukokortikoidrezeptorblockade:
RU486/Mifepristone, minimum 98% SIGMA-ALDRICH Chemie
GmbH, Steinheim, Deutschland
- α-Cyclodextrin SIGMA-ALDRICH Chemie
GmbH, Steinheim, Deutschland
- Sesamöl: Sesamum Indicum, dunkel (aus gerösteter Saat)
- Narkose:
Ketamin 500mg DeltaSelect, Dreieich,
Deutschland
- Rompun®, Xylazinhydrochlorid Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
Deutschland
- Physiologische Kochsalzlösung Braun Melsungen AG,
Melsungen, Deutschland

4.1.7 Computerprogramme

- Exel 2000 Microsoft Co.,
Unterschleißheim, Deutschland
- GraphPad Prism 3.02 GraphPad Software Inc., San
Diego, USA

- easyWin basic V 6.0a	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
- SPOT Advanced	Visitron Systems GmbH, Hamburg, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 Rahmenbedingungen der Tierversuche

6-10 Wochen alte Mäuse, die dem chronischen psychischen Stress unterzogen werden sollten, wurden zur Adaption an die Versuchsumgebung mindestens 28 Tage vor Versuchsbeginn in Gruppen zu je 4-6 Tieren eingeteilt. Die Adaptionszeit der Mäuse, die für Experimente mit akutem psychischem Stress eingesetzt werden sollten, betrug mindestens 14 Tage. Bis zum Versuchsbeginn verblieben die Mäuse unter minimalen Stressbedingungen in einem gut belüfteten Isolator mit konstanter Temperatur (21-24°C) und Luftfeuchtigkeit, einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus (6:00 – 18:00 Uhr), gleich bleibendem Reinigungsrhythmus (2 mal wöchentlich von derselben Person) und Futter sowie Trinkwasser *ad libitum* in ihren Käfigen. Im Labor und im Isolator war mehrfach ein konstanter Schallpegel von 50-52 dB gemessen worden (Prof. Dr. rer. nat. Ch. Wilke, Institut für Physik, Greifswald). Zusätzliche Schallquellen wurden vermieden.

4.2.2 Die psychischen Stressmodelle

Bewegungseinschränkung kombiniert mit akustischer Belastung wird als psychisches Stressmodell für Mäuse verwendet ²¹. Die Bewegungseinschränkung in diesem Stressmodell wurde durch gewaltfreies Einsetzen der Versuchstiere in gut belüftete konische 50 ml-Zentrifugenröhrchen realisiert. Die Mäuse konnten sich darin zwar vor- und zurückbewegen, aber nicht umdrehen. Ein Einklemmen des Schwanzes wurde durch ein Loch im Deckel des Röhrchens vermieden. Akustischer Stress wurde mittels eines Ultraschallsenders erzeugt. Der Sender emittierte zufallsverteilte irreguläre Schwingung mit einer Amplitudenmodulation zwischen 15 und 25 kHz und einem randomisierten Schalldruckpegel zwischen 50 und 85 dB, so dass 0 bis 35 dB über dem Hintergrundschallpegel im Raum (ca. 50 dB) erreicht wurden. Die

Röhrchen mit den Mäusen wurden horizontal in eine Styropor®-Halterung gesteckt und in einem Abstand von 30 cm vor der Schallquelle platziert.

Chronischer Stress wurde durch 9 Stresssituationen erzeugt. An vier aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Mäuse 2 Stressepisoden á 2 Stunden unterzogen (8:00-10:00 Uhr und 16:00-18:00 Uhr), am fünften Tag nur einer zweistündigen Stressexposition. Akuter Stress wurde durch eine zweistündige Stresssituation von 8:00 bis 10:00 Uhr morgens erzeugt.

Zwischen und nach den Stressepisoden verblieben die gestressten Mäuse ungestört in ihren Käfigen im Versuchslabor. Die oben beschriebenen Rahmenbedingungen blieben konstant. Die ungestressten Kontrolltiere wurden durch die Platzierung ihrer Käfige im Isolator von olfaktorischen und akustischen Stressoren durch gestresste Tiere abgeschirmt.

4.2.3 Die Behandlung mit RU486

Der Glukokortikoidrezeptorblocker RU486 (RU38486, Mifepriston, 11β -[p-(Dimethylamino)phenyl]- 17β -hydroxy- 17 -(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-on) wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml für einige Experimente in reinem Sesamöl, für andere in 46,25 mg/ml PBS α -Cyclodextrin gelöst und den Mäusen nach steriler Filtration mittels einer subkutanen Injektion in die Nackenfalte appliziert. Jede Maus (Gewicht ca. 20g) erhielt pro Injektion 100 μ l Lösung, so dass die Endkonzentration von RU486 ca. 50 μ g pro Gramm Körpergewicht betrug^{158, 160}. Einer gestressten und einer ungestressten Gruppe wurde RU486 injiziert, den Kontrolltieren nur das Lösungsmittel Sesamöl oder Cyclodextrin. Chronisch gestresste Mäuse erhielten 5 Applikationen, wobei, begonnen am Tag vor der ersten Stresssituation, täglich eine Injektion verabreicht wurde. Akut gestresste Tiere wurden nur am Tag vor der Stressepisode behandelt. Die Injektion wurde um 18 Uhr, zu Beginn der Aktivitätsphase der Mäuse, appliziert, um den Injektionsstress für nicht gestresste Mäuse möglichst gering zu halten. Aus demselben Grund wurde nur eine tägliche Injektion verabreicht. RU486 hat eine Halbwertszeit von 18-24 Stunden^{35, 56} und eine subkutane Injektion führt zu einer Depotbildung, so dass 14 bzw. 22 Stunden vor Stressbeginn noch von einer ausreichenden Wirkstärke des Medikaments ausgegangen werden konnte.

4.2.4 Bestimmung der Plasma-Kortikosteronkonzentration

Die Mäuse wurden mittels Ketamin/Xylazin (Ketamin: 150 µg/g Körpergewicht, Xylazin: 20 µg/g Körpergewicht) narkotisiert und durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus mit einem Mikro-Hämatokritröhrchen geblutet. Das Blut wurde in einem mit EDTA beschichteten Vacutainer aufgefangen. Nachdem das Plasma durch Zentrifugation (3345g, 10 min) von allen zellulären Blutbestandteilen getrennt worden war, wurde es bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Die enthaltene Kortikosteron-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt, wobei die im Kit enthaltenen Herstellerangaben befolgt wurden.

4.2.5 Bestimmung der Plasma-ACTH-Konzentration

Nach der wie unter Punkt 4.2.4 beschriebenen Plasma-Gewinnung wurde die enthaltene ACTH-Konzentration mit Hilfe eines ELISAs bestimmt, wobei die im Kit enthaltenen Herstellerangaben befolgt wurden.

4.2.6 ACTH-Test

Direkt nach der letzten Stresssitzung wurde den Mäusen entweder 100 µl einer 10 µg/ml-Lösung ACTH₁₋₂₄, gelöst in PBS mit 0,5 % BSA, oder nur PBS mit BSA subkutan in die Nackenfalte injiziert, so dass jedem Tier 1 µg ACTH verabreicht wurde. Nach 45-minütiger Inkubationszeit wurden die Mäuse narkotisiert und retroorbital geblutet. Der Kortikosterongehalt im Plasma wurde wie oben beschrieben (s. 4.2.4) ermittelt. Der relative Kortikosteronanstieg im Plasma als Maß für die Sensitivität der Nebennieren auf den externen Stimulus wurde durch den Quotienten zwischen dem Kortikosterongehalt der ACTH-behandelten und der PBS/BSA-behandelten Tiere bestimmt.

4.2.7 Bestimmung der Leuko- und Lymphozytenzahl im peripheren Blut

Die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten in dem unter Narkose durch retroorbitale Punktion gewonnenen EDTA-Blut der Mäuse wurde mit Hilfe eines Hämocounters bestimmt.

4.2.8 Histologische Färbung

Zur Untersuchung der Organe wurde das Gewebe mittels Hämalaun und Eosin gefärbt. Zunächst wurden die Gefrierschnitte der Präparate aufgetaut und 10 Minuten in PBS gewässert. Im Anschluss wurden alle basophilen Bestandteile der Organschnitte 5 Minuten in Hämalaun nach Mayer gefärbt. Die Schnitte wurden daraufhin kurz gespült und 10 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die eosinophilen Bestandteile wurden 3 Minuten mit 1% Eosin G angefärbt. Danach wurden die Präparate 30 Sekunden mit destilliertem Wasser gespült und in TissueTek® eingebettet.

4.2.9 Morphologische Untersuchung des Thymuskortex

Der Thymus wurde nach der Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation vorsichtig präpariert. Er wurde in TissueTek® eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C. Mittels eines Kryotoms wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, welche auf Objektträger verbracht, 10 Minuten in eiskaltem Azeton fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden.

Die Untersuchung der Breite des Thymuskortex erfolgte im Durchlichtmodus des Mikroskops. Pro Tier wurden 3 Schnitte analysiert. Bei jedem Schnitt wurde der Durchmesser der Thymusrinde an 10 unterschiedlichen Stellen gemessen, so dass pro Tier 30 Werte bestimmt wurden. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert pro Maus gebildet, der in die statistische Analyse einging.

4.2.10 Morphologische Untersuchung der Nebennierenrinde

Die Nebennieren wurden nach der Tötung des Tieres durch zervikale Dislokation vorsichtig präpariert. Sie wurden in TissueTek® eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Die weitere Lagerung erfolgte bei -80°C. Mittels eines Kryotoms wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt, welche auf Objektträger verbracht, 10 Minuten in eiskaltem Azeton fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt wurden.

Die Untersuchung der Breite der Zona fasciculata der Nebennierenrinde erfolgte im Durchlichtmodus des Mikroskops. Pro Tier wurden 5 Schnitte analysiert. Bei jedem Schnitt wurde der Durchmesser der Zona fasciculata an 10 unterschiedlichen Stellen gemessen, so dass pro Tier 50 Werte bestimmt wurden. Aus diesen Werten wurde ein Mittelwert pro Maus gebildet, der in die statistische Analyse einging.

4.2.11 Experimentelle *E. coli*-Infektion

Der *E. coli*-Stamm ATCC 25922 wurde zunächst in LB-Broth Medium angezüchtet. Direkt nach der letzten Stresssitzung wurden chronisch gestressten Mäusen 3×10^5 koloniebildende Einheiten von *E. coli* ATCC 25922 pro Tier intraperitoneal injiziert. Diese Dosis war subletal. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden und Narkotisierung wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen (EDTA-Vacutainer) und dieses in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Columbia-Agar-Platten ausplattiert. Nach einer Inkubationszeit im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) von 16 Stunden wurde die Anzahl der auf dem Agar gewachsenen koloniebildenden Einheiten bestimmt und die *E. coli*-Kolonien pro ml Blut quantifiziert.

4.2.12 Bestimmung des Körpergewichts

Chronisch gestresste Mäuse wurden am Abend vor der ersten Stressepisode sowie direkt nach der letzten Stresssitzung am 5. Tag gewogen. Die Differenz zwischen Anfangs- und Endgewicht wurde berechnet.

Zusätzlich wurde die Futter- und Wassermenge vor und nach der viereinhalbtägigen Dauer des chronischen Stresses bestimmt, um die Nahrungs- und Wasseraufnahme der einzelnen Gruppen kalkulieren zu können. Futter und Wasser war für alle Mäuse während der gesamten Dauer des Experiments frei erreichbar.

4.2.13 Messung stressinduzierter Verhaltensänderungen (Stress Severity Score)

In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Punktesystem, der Stress Severity Score (SSS), entwickelt, um stressbedingte individuelle Verhaltensänderungen bei psychisch gestressten Mäusen standardisiert evaluieren zu können ²¹. Nach jeder

Stressepisode wurden die Mäuse nacheinander einzeln in ihren Käfig zurückgebracht, wobei ihr Verhalten, gemessen an 5 Parametern, genau beobachtet wurde (Tab. 3.1): Die im Röhrchen während der Stressepisode abgesetzte Kot- und Urinmenge wurde quantifiziert und mit einem Punktwert von 0 bis 6 versehen. Litten Tiere an Diarrhoe, wurde der Kotabgabewert verdoppelt. Der Fellzustand (Piloerektion und Grad der Verschmutzung) und das Explorationsverhalten wurden mit 0 bis 6 Punkten bewertet sowie der Muskeltonus mit 0 bis 3 Punkten (Tab. 3.1). Vom explorativen Verhalten, welches die Bereitschaft der Mäuse beschreibt, den Käfig zu erkunden, wurde auf die Ausprägung eines depressionsähnlichen Zustandes (reduziertes Erkundungsverhalten, verminderter Antrieb, Kauern in der Käfigecke, wenig soziale Interaktion) geschlossen. Der Muskeltonus wurde anhand der Schwanzhaltung der Tiere ermittelt.

Tab. 3.1 Stress Severity Score ^a

Parameter (SSS)	0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte	5 Punkte	6 Punkte
Urinabgabe	kein Urin	feucht um Urethra	½ Bauch feucht	Bauch feucht	Bauch + ½ Rücken feucht	Bauch+ Rückseite feucht	gesamtes Fell mit Urin durchtränkt
Kotabgabe	keine Köttel	1-5 Köttel	6-10 Köttel	11-15 Köttel	15-20 Köttel	20-25 Köttel	> 25 Köttel
	bei gleichem Kotvolumen mit Diarrhö verdoppelter Punktwert für Kotabgabe						
Fellzustand	normales Fell	struppig im Nacken	Kopf und Nacken struppig oder leicht schmutzig	gesamter Rücken struppig oder schmutzig	Kopf, Rücken und Bauch struppig, schmutzig	Kopf, Rücken ½ und Bauch struppig, schmutzig	gesamtes Tier extrem struppig + sehr schmutzig
depressives Verhalten	normale Aktivität	leicht reduziertes Erkunden	reduziertes Erkunden mit kurzen Intervallen ohne Aktivität	längere Intervalle ohne Aktivität	stark reduziertes Erkunden, Kauern in Käfigecke	Kauern in Käfigecke, aber Reakt. auf Umweltreize	keine Reakt. auf Umwel-reize
Muskeltonus	normal	leicht reduziert, (vereinzelt Absetzen des Schwanzes)	reduziert, (häufiges + längeres Absetzen des Schwanzes)	stark reduziert, (Nachziehen des Schwanzes)	-	-	-

^a Instrument zur Ermittlung stressbedingter individueller Verhaltensänderungen nach chronischem psychischem Stress durch standardisierte Vergabe von Punktwerten.

4.2.14 Messung der Indolamine im Plasma

Die Konzentrationen von Tryptophan und seinen Kataboliten Serotonin, Kynurenin, Kynureninsäure und Quinolinsäure wurden im Plasma der Mäuse bestimmt, welches nach Zentrifugation des EDTA-Vollblutes aus dem retroorbitalen Venenplexus gewonnen worden war. Zu 100 µl Plasmaprobe wurden 10 µl 50%ige Trichloressigsäure (gelöst in Aqua dest.), 10 µl d₅-Phenylalanin, 10 µl d₄-Kynureninsäure, 10 µl d₆-Kynurenin, 100 µl Methanol und 60 µl Aqua dest.

gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20.000 g, 15 min). Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und für die Messungen der Kataboliten-Konzentrationen im Tandem-Massenspektrometer verwendet. Der Quotient von Kynurenin und Tryptophan diente, mit 100 multipliziert, als Parameter für die IDO-Aktivität.

Die Präparation der Proben wurde von Grazyna Domanska, Abteilung für Immunologie, die Messungen im Tandem-Massenspektrometer durch Dr. G. Fusch, Institut für Pädiatrie und pädiatrische Intensivmedizin, Universitätsklinikum Greifswald, durchgeführt.

4.2.15 Statistik

Alle Daten dieser Arbeit wurden anhand GraphPad Prism 3.02 analysiert. Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test, Unterschiede zwischen vier Gruppen mittels Dunns-Test bestimmt. Beide Signifikanzteste setzen keine Normalverteilung voraus. Alle Daten sind als Boxplots dargestellt. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung der Interventionsstrategie mit RU486 im psychischen Stressmodell

5.1.1 Nachweis der Wirksamkeit der Behandlung

Zur Untersuchung von Glukokortikoideffekten im chronischen psychischen Stress wurde weiblichen BALB/c-Mäusen der Glukokortikoidrezeptorblocker RU486 subkutan (s.c.) injiziert.

Bei Recherchen vor Beginn der Experimente wurde gefunden, dass RU486 häufig in einer Konzentration von 20-25 µg/g Körpergewicht (KG) eingesetzt wird, wobei das Medikament meist mehrmals täglich und/oder kurz vor der Stressexposition verabreicht wird ^{47, 48, 74, 85}.

Da jede Injektion für Versuchstiere ein Stressor ist, sollte die Anzahl der Injektionen in unseren eigenen Experimenten für die Kontrolltiere so gering wie möglich gehalten werden. Deshalb wurde RU486 nicht zweimal täglich vor jeder Stresssitzung, sondern nur einmal pro Tag, zu Beginn der Aktivitätsphase der Mäuse um 18 Uhr, mit einer Konzentration von 50 µg/g KG s.c. appliziert. Die subkutane Injektion versprach nach Auskunft von Mitarbeitern des pharmakologischen Instituts der Universität Greifswald eine retardierte Wirkweise des Medikaments. Die Halbwertszeit (HWZ) dieser Applikationsart wurde von Mitarbeitern der Pharmakologie als vergleichbar mit der in der Literatur angegebenen RU486-HWZ von 18-24 Stunden bei oraler Applikation ^{56, 152, 153} beschrieben.

In den durchgeführten Experimenten konnte ein therapeutischer Effekt der Behandlung nachgewiesen werden, denn RU486-behandelte Tiere zeigten nach der letzten der 9 Stresssitzungen nicht die typische Leuko- und Lymphozytopenie wie gestresste Kontrollmäuse ohne GR Blockade (Abb. 5.1a, b). Hier sind Ergebnisse Cyclodextrin-behandelter Mäuse dargestellt, wurde Sesamöl als Lösungsmittel für RU486 eingesetzt, zeigten die Mäuse vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

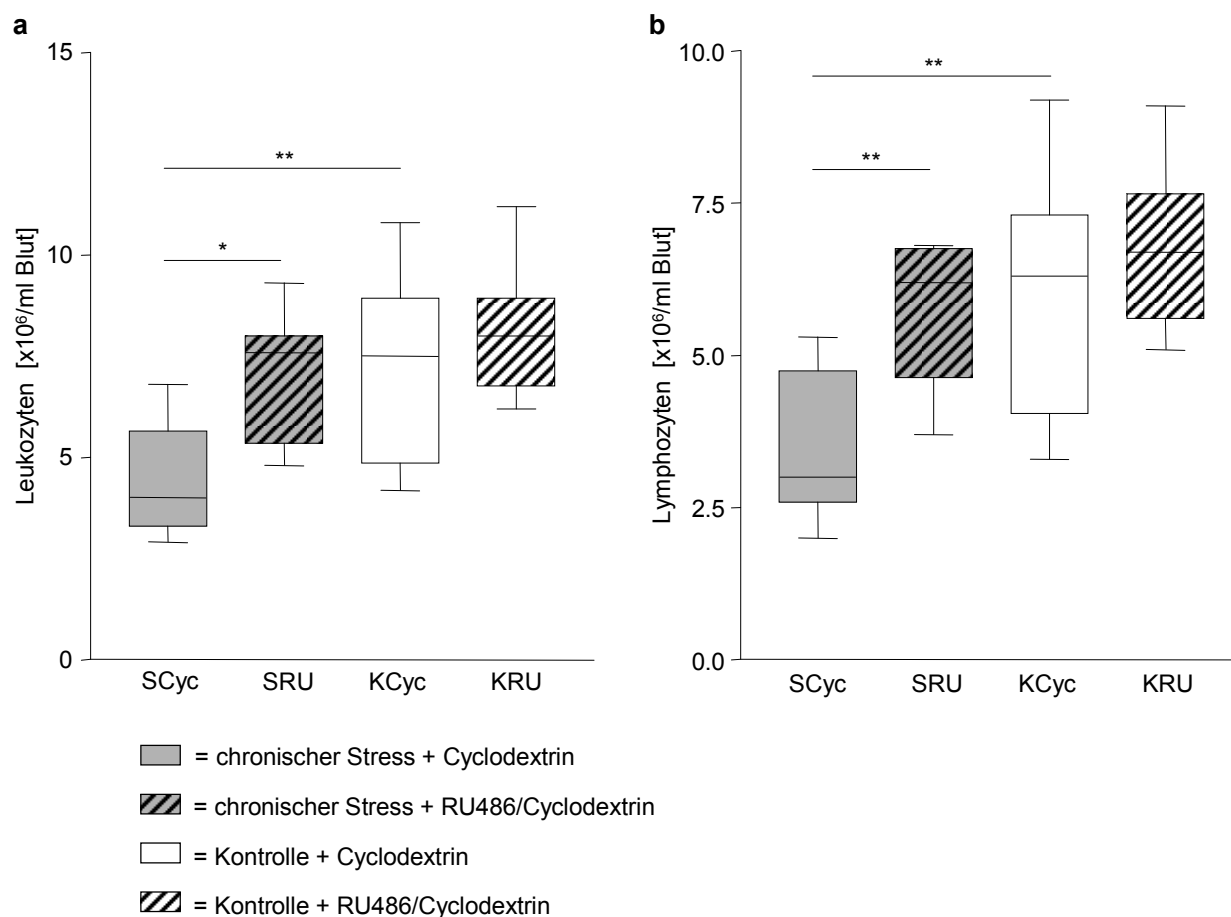


Abb. 5.1 Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im Blut chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche subkutane Injektion mit 50 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (KG) RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der letzten Stressepisode am 5. Tag wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und die Anzahl der (a) Leukozyten und der (b) Lymphozyten mittels Hämocounter bestimmt ($n = 10-11$ Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Dunns-Test).

5.1.2 Wahl des Lösungsmittels ist wichtig für Analyse von Stresseffekten

Das als Pulver erhältliche RU486 lässt sich nur in lipophilen Flüssigkeiten lösen. Da es Hinweise auf toxische Eigenschaften des häufig verwendeten Lösungsmittels Polyethylenglykol 400 gibt¹⁶⁶, sollte eine Alternative gefunden werden. Wie in einigen anderen Arbeitsgruppen¹⁶⁷⁻¹⁶⁹ und nach der Empfehlung von Dr. Harald Engler (ETH Zürich, Schweiz), der ebenfalls mit RU486 gearbeitet hat⁷⁴, wurde steril filtriertes Sesamöl als Lösungsmittel für das Medikament ausgewählt. Nach

Auswertung der ersten chronischen Stressexperimente wurde jedoch deutlich, dass Sesamöl eine für diese Arbeit einschränkende Nebenwirkung hat: In früher durchgeführten Untersuchungen wurde gezeigt, dass chronisch gestresste Mäuse Körpergewicht verloren, was auf die hyperkatabolen Wirkungen von Glukokortikoiden zurückgeführt wurde⁵³. Mit Sesamöl behandelte, chronisch gestresste Mäuse jedoch zeigten nach der viereinhalbtägigen Stressdauer keinen Gewichtsverlust gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 5.2). Effekte von RU486 auf die Änderung des Körpergewichts waren aus den Daten daher nicht abzulesen.

Dieses Ergebnis war reproduzierbar, somit kann von einem nutritiven Effekt dieses Öls ausgegangen werden.

Allerdings finden sich in dieser Arbeit unter Punkt 5.3.1 beschriebene Experimente mit Verwendung von Sesamöl als Lösungsmittel, da sich die Problematik des nutritiven Effekts erst nach Beendigung dieser Versuche zeigte.

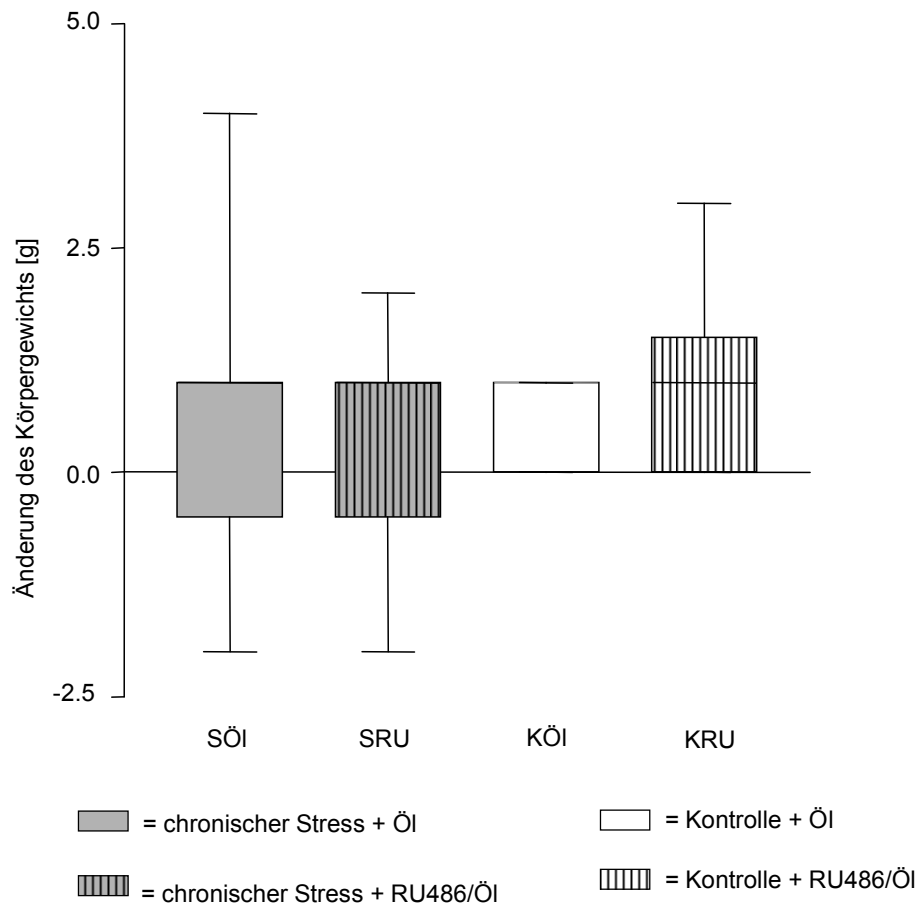


Abb. 5.2 Änderung des Körpergewichts chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Sesamöl-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche subkutane Injektion mit 50 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (KG) RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Sesamöl (Öl). Am Abend vor der ersten und unmittelbar nach der letzten Stressepisode wurde das Gewicht aller Mäuse bestimmt und die Differenz dieser beiden Werte berechnet (n = 12 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten).

Aufgrund der oben beschriebenen Nebenwirkungen des Sesamöls wurde entschieden, ein alternatives Lösungsmittel zu suchen. Die Wahl fiel auf Cyclodextrin, ein Lösungsmittel für lipophile Substanzen^{170, 171}. In Anlehnung an Denda et al. stellte sich in Vorversuchen eine Konzentration von 46,25 mg Cyclodextrin pro ml steriler Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) als geeignet heraus, um eine ausreichend große Menge an RU486 zu lösen¹⁷². Cyclodextrin hatte keinen Einfluss auf den stressbedingten Gewichtsverlust der Mäuse: Chronisch

gestresste, nur mit Lösungsmittel behandelte Mäuse verloren, verglichen mit Kontrolltieren, signifikant an Körpergewicht (Abb. 5.3). Außer bei den Experimenten mit der *E. coli*-Infektion nach chronischem Stress (siehe Punkt 5.3.1) wurden alle Versuche unter Verwendung von Cyclodextrin als Lösungsmittel mit einer RU486-Dosis von 50 µg/g KG durchgeführt.

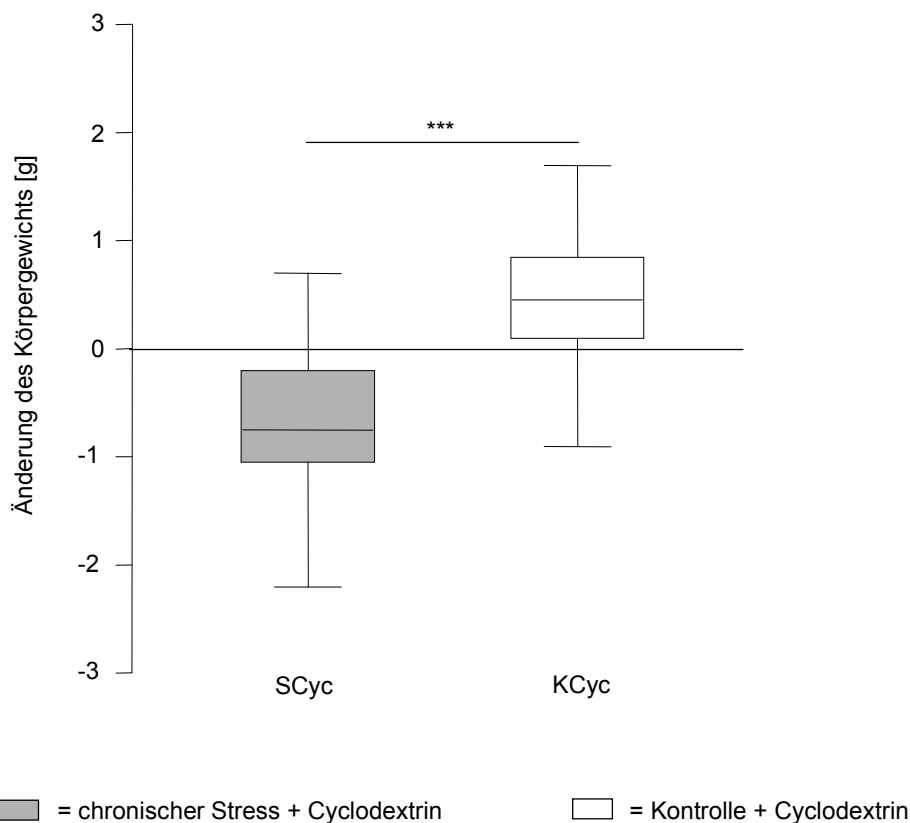


Abb. 5.3 Änderung des Körpergewichts chronisch gestresster und nicht gestresster Cyclodextrin-behandelter, weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments wurden den gestressten (S) und den nicht gestressten (K) Tieren jeden Abend 100 µl Cyclodextrinlösung (Cyc) subkutan injiziert. Am Abend vor der ersten und unmittelbar nach der letzten Stressepisode wurde das Gewicht aller Mäuse bestimmt und die Differenz dieser beiden Werte berechnet (n = 20 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 4 Experimenten, *** p > 0,001, Mann-Whitney-Test).

5.1.3 Nebenwirkungen durch Injektionsstress bei der Interventionstherapie

Unter physiologischen Bedingungen wird die HPA-Achse während chronischem psychischen Stress aktiviert. Dies zeigt sich in einem Anstieg der Kortikosteronkonzentration im Plasma gestresster Mäuse^{16, 19, 20, 21, 22, 25, 29, 30, 32, 41, 48, 52, 53}.

Trotz des Lösungsmittelwechsels und dem Nachweis der Wirksamkeit von RU486 im chronischen Stressmodell gab es ein überraschendes weiteres Problem: Chronisch gestresste Mäuse, denen täglich Cyclodextrin injiziert wurde (Kontrollbehandlung), zeigten direkt nach der letzten Stresssitzung keine Erhöhung des Kortikosterongehalts im Plasma (Abb. 5.4a). Eine durch das chronische psychische Stressmodell bedingte Erhöhung der GC hatten zuvor verschiedene Experimentatoren unserer Arbeitsgruppe an nicht behandelten Mäusen reproduziert. Wir haben daher die Hypothese aufgestellt, dass der zusätzliche Stress der täglichen Applikation von Cyclodextrin (Injektionsstress) zu einer Modifikation der HPA-Achsenantwort führt und die Glukokortikoidausschüttung in den chronischen Stressexperimenten beeinflusst. Zur Klärung dieser Frage wurde die stressbedingte Änderung der Plasma-Kortikosteronspiegel Cyclodextrin-behandelter mit der unbehandelten Mäuse verglichen: Im Gegensatz zu Cyclodextrin-behandelten Mäusen zeigten Tiere ohne zusätzliche Injektion unmittelbar nach viereinhalbtägiger chronischer Stressexposition auch in meinen Experimenten den erwarteten signifikanten Anstieg der Plasma-Glukokortikoidkonzentration (Abb. 5.4b). Der Vergleich der Kortikosteronspiegel Cyclodextrin-behandelter und nicht behandelte ungestresster Tiere verschiedener Experimente unter sonst identischen Bedingungen zeigte, dass allein die tägliche Cyclodextrininjektion über einen Zeitraum von fünf Tagen zu erhöhten Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen führte und die Cyclodextrin-behandelten Kontrolltiere somit nicht mehr als vollkommen ungestresste gelten konnten (Abb. 5.4a, b). Der Spritzstress beeinflusste also die Aktivität der HPA-Achse, weshalb bei der Analyse dieser Ergebnisse Vorsicht geboten ist.

Folglich war eine Interpretation der RU486-Wirkung auf die Glukokortikoidausschüttung nach chronischem Stress durch die offensichtliche Spritzstress-Problematik in diesem Versuchsaufbau nicht möglich.

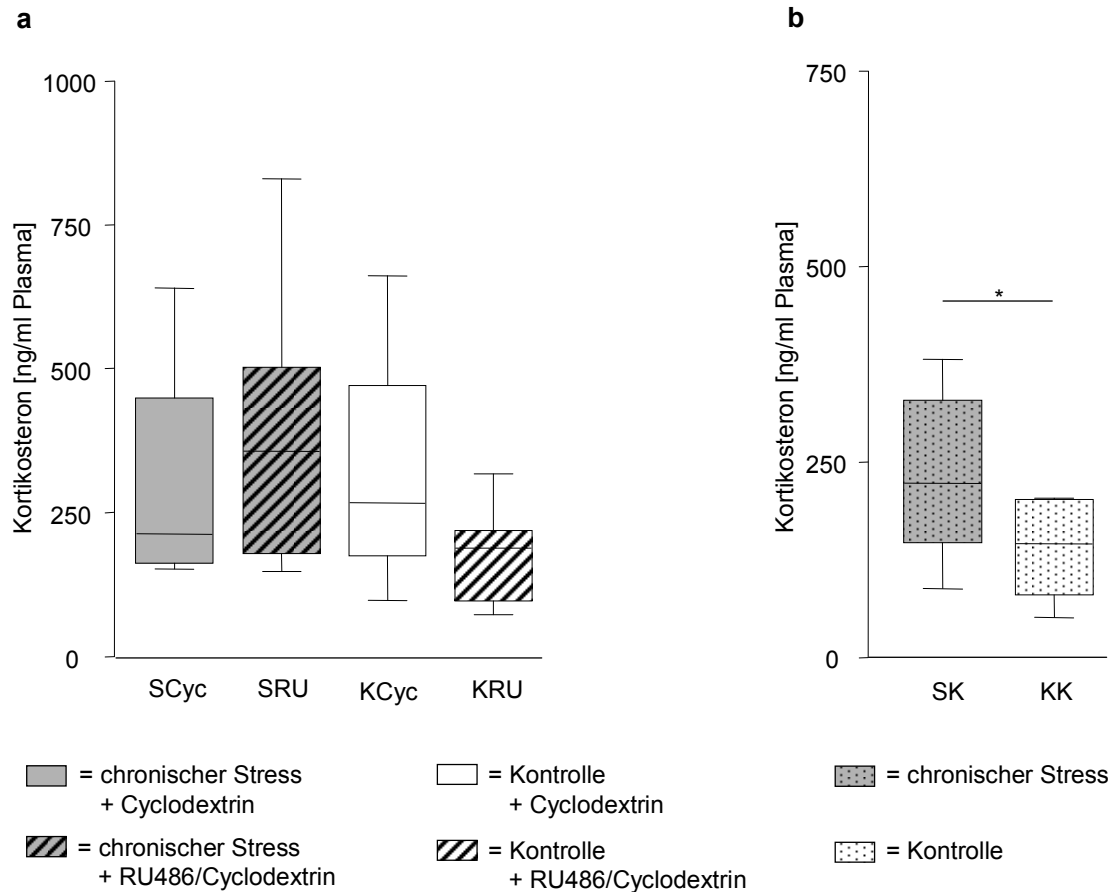


Abb. 5.4 Plasma-Kortikosteronwerte chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486-, Cyclodextrin- und unbehandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. (a) Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). (b) Eine gestresste (SK) und eine ungestresste (KK) Gruppe wurden nicht behandelt. Unmittelbar nach der letzten Stressepisode am 5. Tag wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und der Plasma-Kortikosterongehalt mittels ELISA bestimmt ((a) n = 9 Tiere pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, (b) n = 6 Tiere pro Gruppe, * p < 0,05, Mann-Whitney-Test).

Interessant war jedoch, dass Cyclodextrin-behandelte weibliche BALB/c-Mäuse im Gegensatz zu den chronischen Stressexperimenten unmittelbar nach akutem Stress einen stressinduzierten Anstieg der Glukokortikoidkonzentration im Plasma zeigten (Abb. 5.5), der auch schon in früheren Experimenten mit unbehandelten, akut gestressten Tieren beobachtet werden konnte.

Um zu untersuchen, ob bereits eine einmalige Injektion (Handling, Schmerz des Einstichs) die HPA-Achsen-Aktivität modifiziert und ob der Spritzeffekt substanzabhängig war, wurde ein weiteres Experiment mit intraperitonealen NaCl-

Injektionen durchgeführt. Dabei wiesen Mäuse, die im Abstand von 24 Stunden zwei NaCl-Injektionen erhielten, 30 Minuten nach der zweiten Injektion gegenüber unbehandelten Tieren erhöhte Plasma-Kortikosteronwerte auf. Dagegen war die Kortikosteronkonzentration im Plasma von Mäusen 24 Stunden bzw. 30 Minuten nach nur einer NaCl-Injektion nicht erhöht (Abb. 5.6).

Um die HPA-Achse auf einen Stressor, wie er durch Handling und Spritzen erzeugt wird, zu sensitivieren oder in einen schneller aktivierbaren Status zu versetzen, reichte folglich eine Injektion aus.

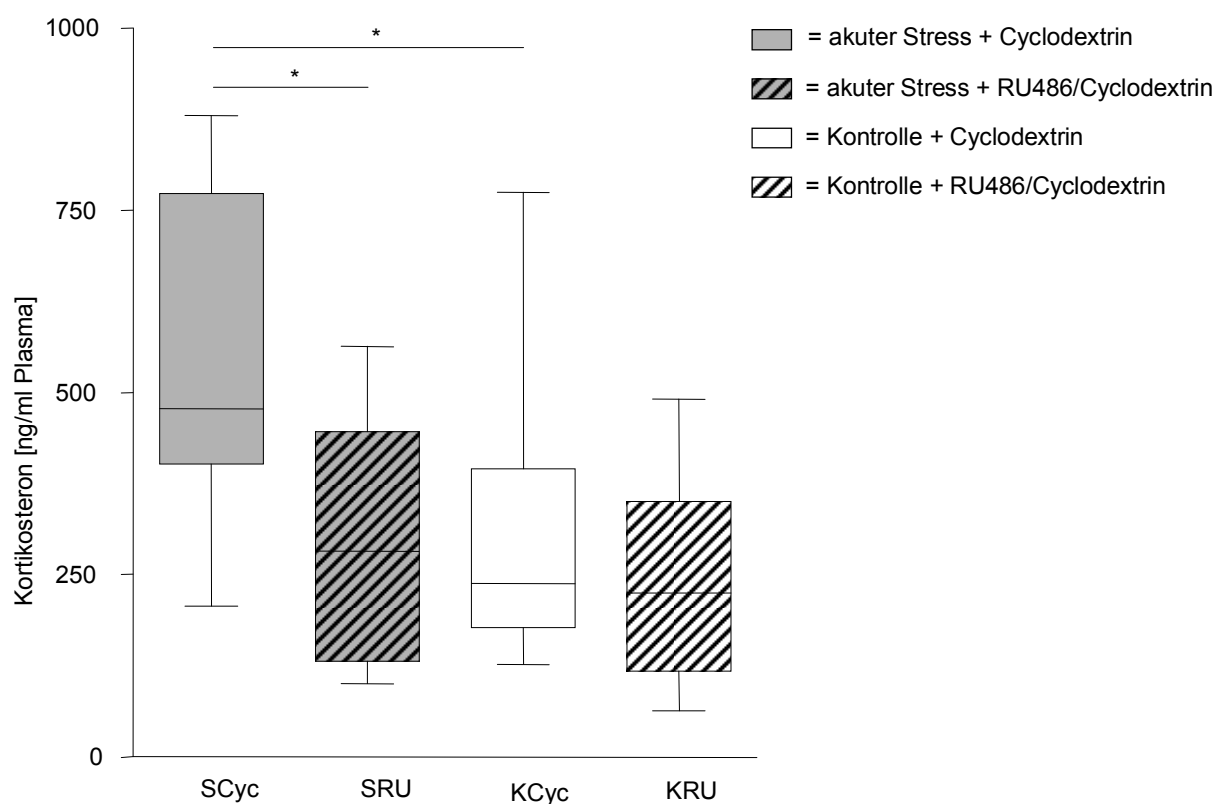


Abb. 5.5 Plasma-Kortikosteronwerte akut gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. 14 h vor der zweistündigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der Stressepisode wurde allen Mäusen retroorbital Blut entnommen und der Plasma-Kortikosteronspiegel mittels ELISA bestimmt (n = 9 Tiere pro Gruppe, Summe von 2 Experimenten, * p < 0,05, Dunns-Test).

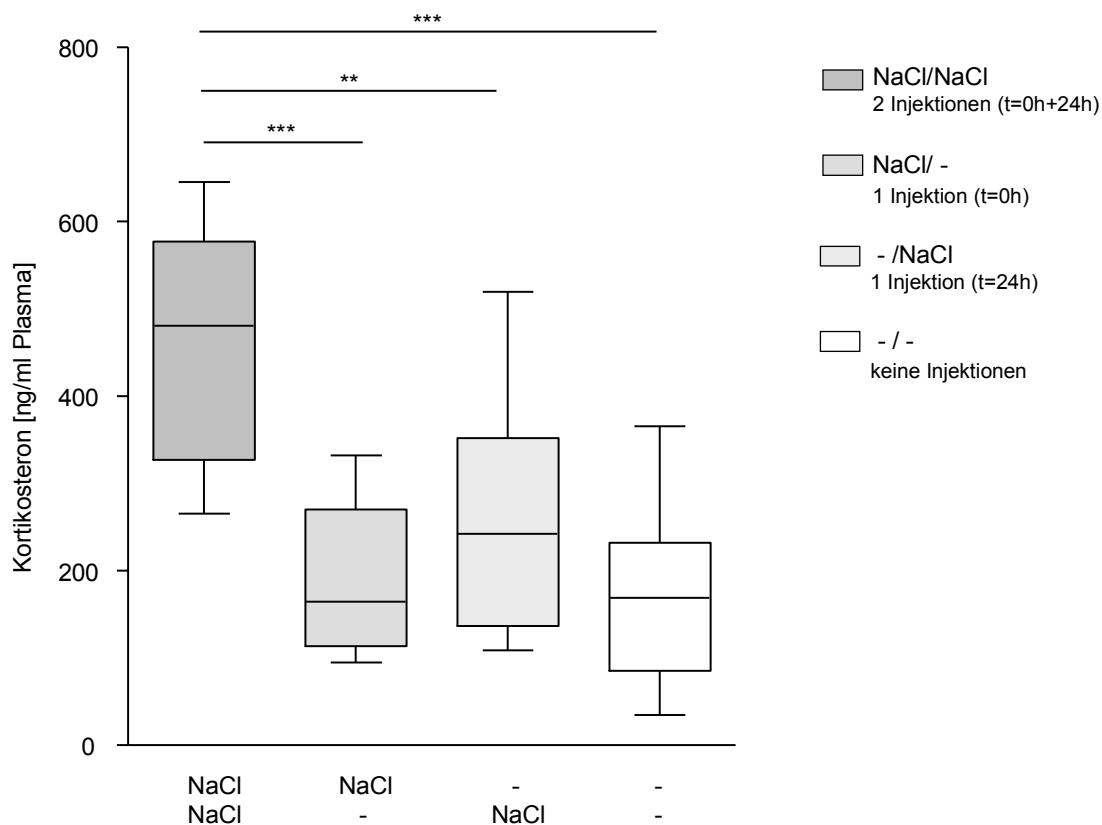


Abb. 5.6 Plasma-Kortikosteronwerte männlicher BALB/c-Mäuse nach einfacher oder zweifacher NaCl-Injektion. Zwei Gruppen männlicher BALB/c-Mäuse wurden mit einer intraperitonealen NaCl-Injektion vorbehandelt, zwei Gruppen wurden ungestört im Käfig belassen. Nach 24 h erhielt eine vorbehandelte und eine unbehandelte Gruppe eine weitere NaCl-Injektion. Nach 30 min wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Plasma-Kortikosteron Gehalt mittels ELISA bestimmt (n = 10 Tiere pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Dunns-Test).

5.2 RU486-sensitive Effekte im chronischen Stressmodell

Obwohl direkt nach chronischem Stress kein Unterschied in der Plasma-Kortikosteronkonzentration zwischen gestressten und ungestressten, Cyclodextrin-behandelten Mäusen zu messen war, konnten bekannte Auswirkungen stressbedingt erhöhter Glukokortikoide (z.B. Leukozytopenie, Gewichtsverlust, Verminderung der Thymuskortexdicke) gezeigt werden. Diese Ergebnisse der Stressexperimente konnten demnach trotz Spritzstress-Interferenz für die Analyse der RU486-Wirkungen genutzt werden und werden im Folgenden dargestellt.

5.2.1 RU486 vermindert die Gewichtsabnahme gestresster Mäuse

Aufgrund von chronischem psychischen Stress entwickelt sich bei weiblichen BALB/c-Mäusen, die neben wiederholtem kombinierten und akustischen Stress keinem weiteren Stressor ausgesetzt waren, eine hyperkatabole Stoffwechsellage^{21, 56}. Zurückgeführt werden kann dies auf eine erhöhte Genexpression der Enzyme der Glukoneogenese, der Proteolyse und der Lipolyse⁵⁶. Durch die stressbedingt erhöhte Stoffwechselaktivität verlieren Mäuse während der 4,5-tägigen Stressexposition 0,5 bis maximal 5 g an Körpergewicht, während ungestresste innerhalb des beobachteten Zeitrahmens eher an Gewicht zunehmen^{20, 21, 53}.

Jetzt sollte geprüft werden, ob Glukokortikoide als Ursache für den stressbedingten Gewichtsverlust in Frage kommen. Wie unter Punkt 5.1.2 schon beschrieben, zeigten chronisch gestresste Mäuse unter Cyclodextrin-Injektionen einen deutlichen Körpergewichtsverlust (Abb. 5.7a), obwohl sie tendenziell mehr Wasser und signifikant mehr Futter aufnahmen als ungestresste Kontrollmäuse (Abb. 5.7b, c). Auffällig ist, dass gestresste Mäuse ohne zusätzliche Injektionen in früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe keine erhöhte Futter- und Wasseraufnahme gegenüber ungestressten Kontrolltieren zeigen²¹. Möglicherweise ist dies, neben der Veränderung der HPA-Achsenaktivität, ein weiterer Hinweis auf einen zusätzlichen Effekt des Spritzstress bei Cyclodextrin-behandelten Mäusen.

Durch RU486 wurde der stressinduzierte Gewichtsverlust vermindert (Abb. 5.7a). RU486-behandelte, gestresste Mäuse zeigten in diesen Experimenten genau wie gestresste Kontrolltiere eine erhöhte Wasser- und Futteraufnahme gegenüber nicht gestressten behandelten Tieren (Abb. 5.7b, c). Die hyperkatabole Stoffwechsellage chronisch gestresster BALB/c-Mäuse wurde durch RU486 zwar nicht vollständig aufgehoben, aber deutlich reduziert.

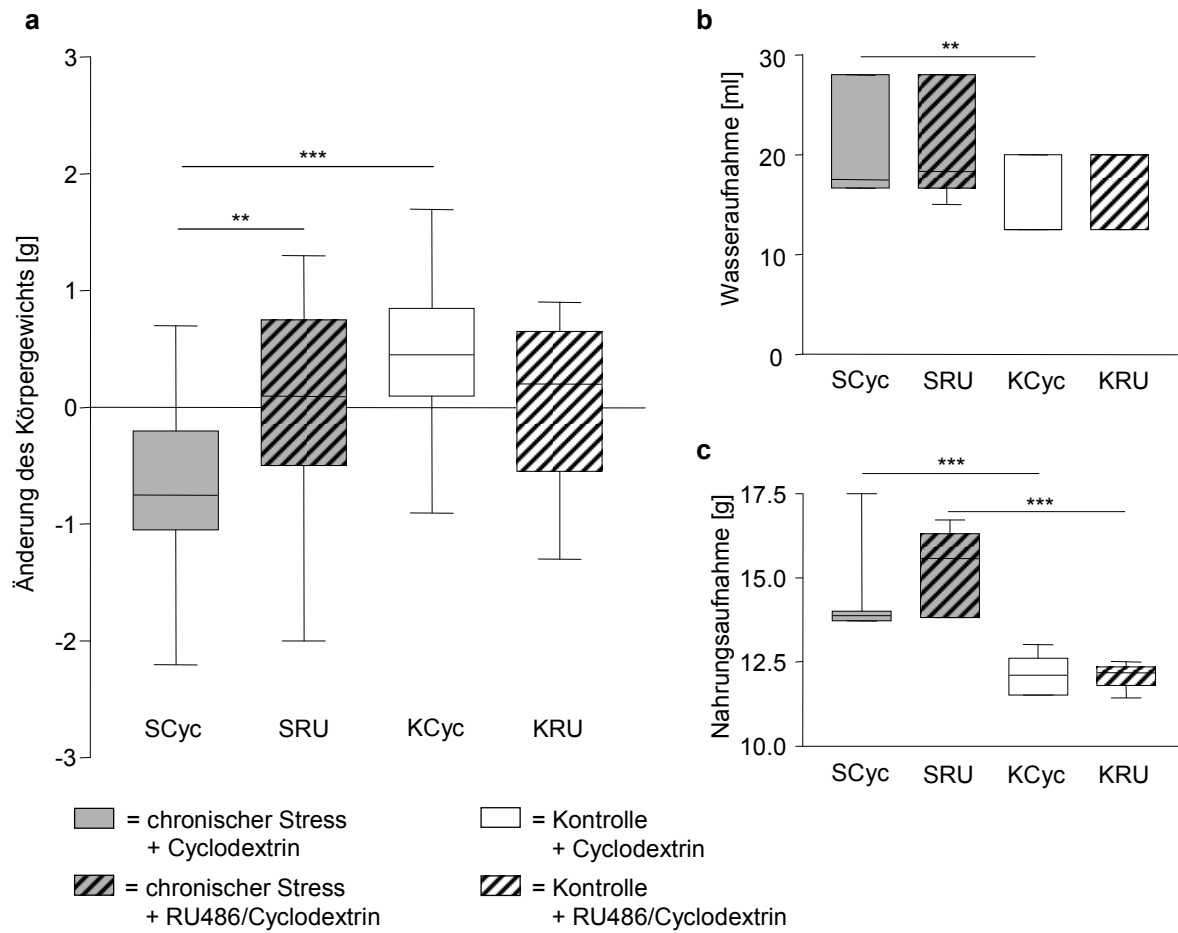


Abb. 5.7 Änderung des Körpergewichts sowie Wasser- und Nahrungsaufnahme chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). **(a)** Änderung des Körpergewichts: Am Abend vor der ersten und unmittelbar nach der letzten Stressperiode wurde das Gewicht aller Mäuse bestimmt und die Differenz dieser beiden Werte berechnet ($n = 19-20$ Mäuse pro Gruppe, Summe von 4 Experimenten, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Dunns-Test). **(b, c)** Der Wasser- und Futterverbrauch der Mäuse während der 4,5-tägigen Stressdauer wurden ebenfalls berechnet ($n_{\text{Futter}} = 19-20$ bzw. $n_{\text{Wasser}} = 14-15$ Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 4 bzw. 3 Experimenten, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Dunns-Test).

5.2.2 RU486 vermindert stressinduzierte Verhaltensänderungen

Chronischer psychischer Stress beeinflusst nicht nur das Körpergewicht der Mäuse, sondern auch deren Kot- und Urinabgabe sowie das Verhalten nach jeder einzelnen Stresssituation. In unserer Arbeitsgruppe wurde ein Punktesystem entwickelt, mit

dessen Hilfe das Ausmaß dieser Veränderungen klassifiziert werden kann, der Stress Severity Score (SSS). Je stärker eine solche stressbedingte Veränderung ist, umso höher ist der zugeteilte Punktwert. Noch im Röhrchen, in welchem die Maus immobilisiert ist, werden Urinabgabe und Defäkation anhand der durchtränkten Fellfläche bzw. der Anzahl der „Köttel“ bestimmt. Fellzustand, Muskeltonus und depressionsähnliches Verhalten werden unmittelbar nach Befreiung der Mäuse aus dem Röhrchen im Käfig bewertet. Der Fellzustand beschreibt den Grad der Struppigkeit und Verschmutzung des Fells, der Muskeltonus wird anhand der Schwanzhaltung bewertet^{21, 86}.

Besonders wichtig für unsere Arbeitsgruppe ist die Beobachtung, dass es während chronischem Stress zur Entwicklung eines depressionsähnlichen Verhaltens kommt, welches durch reduzierte Aktivität, Verminderung der sozialen Interaktion, Isolation und Erschöpfung der Maus definiert wird²¹.

Nun sollte überprüft werden, ob Glukokortikoide mit der stressbedingten Veränderung der Kot- und Urinabgabe und des Verhaltens in Zusammenhang zu bringen sind. Gestresste Mäuse wiesen unter Cyclodextrin-Injektionen in diesem Experiment, vergleichbar mit unbehandelten Mäusen aus früheren Experimenten, deutliche Veränderungen vegetativer Parameter und des Verhaltens auf: Im Immobilisationsröhrchen zeigten die Tiere verstärkte Urin- und Kotabgabe (Daten nicht gezeigt). Im Käfig verhielten sich die Tiere depressiv (reduziertes Erkundungsverhalten, verminderter Antrieb, Kauern in der Käfigecke, wenig soziale Interaktion) (Abb. 5.8b), putzten sich weniger (Abb. 5.8c) und hatten einen erniedrigten Muskeltonus (Daten nicht gezeigt). Diese stressbedingte Beeinflussung zeigte sich in einem Gesamt-SSS von durchschnittlich 12 Punkten (Abb. 5.8a), was vorherigen Beobachtungen ähnlich ist. Urinabgabe, Defäkation und Muskeltonus wurden durch die Glukokortikoidrezeptorblockade nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Die RU486-Behandlung bewirkte jedoch eine signifikante Reduktion des depressionsähnlichen Verhaltens. Diese Mäuse zeigten außerdem eine weniger starke Reduktion des Putzverhaltens als Cyclodextrin-behandelte Tiere, wodurch das Fell weniger struppig und der Punktwert somit niedriger war als bei gestressten Kontrollmäusen (Abb. 5.8b, c). Dieser Behandlungseffekt zeigte sich in einem erniedrigten Gesamt-SSS-Punktwert (Abb. 5.8a).

Unabhängig von der RU486- oder Kontrollbehandlung wies der Gesamt-SSS beider gestresster Gruppen wie auch in früheren Experimenten tageszeitliche Schwankun-

gen auf. Die morgendliche Stressexposition erhöhte den Punkte-Score der Mäuse stärker als die abendliche (Abb. 5.8d). Beim depressionsähnlichen Verhalten waren diese Schwankungen nicht so deutlich (Abb. 5.8e).

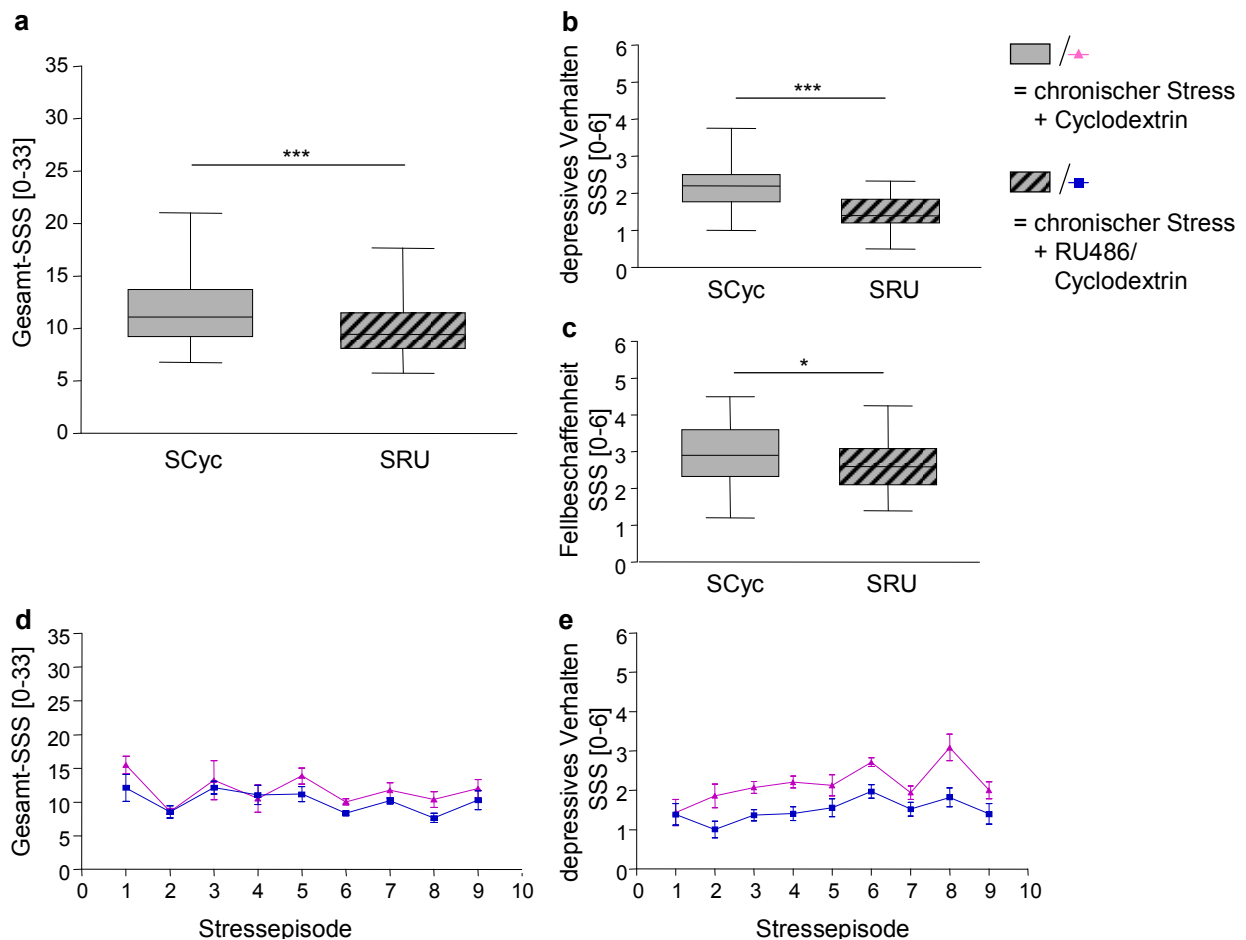


Abb. 5.8 Analyse von Verhaltensänderungen chronisch gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Direkt nach jeder der neun Sressepisoden wurden vegetative Parameter und das Verhalten der Mäuse mittels Stress Severity Score bewertet. (a) Änderung vegetativer Parameter und des Verhaltens durch chronischen psychischen Stress. Dargestellt ist die Aufsummierung aller fünf beurteilter Parameter des SSS (Urinabgabe, Defäkation, Fellbeschaffenheit, depressionsähnliches Verhalten, Muskeltonus). (b) Depressionsähnliches Verhalten, (c) Fellbeschaffenheit, (d, e) Verlauf des Gesamt-SSS bzw. des depressiven Verhaltens. n = 19-20 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 4 Experimenten, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, Mann-Whitney-Test.

5.2.3 RU486 verhindert die stressinduzierte Leuko- und Lymphozytopenie

Nach chronischem psychischem Stress wird bei BALB/c-Mäusen die Entstehung einer Immunsuppression beobachtet, die unter anderem durch die Induktion von Apoptosen immunkompetenter Zellen in Milz, Thymus und Peyer'schen Plaques charakterisiert ist und sehr wahrscheinlich die chronische Stress-assoziierte Leuko- und Lymphozytopenie verursacht ²¹.

Auch akuter psychischer Stress führt zu einer Leuko- und Lymphozytopenie, allerdings vermutlich über einen anderen Mechanismus als bei chronischem Stress: Dhabhar et al. beobachteten als Ursache der Lymphozytopenie in der Zirkulation akut gestresster Ratten eine Umverteilung immunkompetenter Zellen aus dem Blutkreislauf in peripheres Gewebe ^{12, 16, 17, 73}.

Der Einfluss einer RU486-Behandlung auf die Leuko- und Lymphozytopenie nach psychischem Stress erbrachten folgende Ergebnisse: Obwohl die Mäuse täglich eine Cyclodextrin-Injektion erhielten, zeigten gestresste Tiere sowohl nach chronischem als auch nach akutem Stress eine verminderte Anzahl von Leuko- und Lymphozyten im Blutkreislauf (Abb. 5.1, 5.9). Im chronischen Stress wurde dieser Verlust durch eine RU486-Behandlung vollständig verhindert, wahrscheinlich über die Verhinderung glukokortikoidinduzierter Apoptosen (Abb. 5.1a, b).

Nach einer einzelnen Stresssitzung jedoch waren beide gestresste Gruppen (Cyclodextrin- bzw. RU486-behandelt) unabhängig von der Vorbehandlung leuko- und lymphozytopenisch (Abb. 5.9a, b). Dies zeigt, dass der Lymphozytopenie im akuten Stress ein anderer, nicht hauptsächlich durch GC vermittelter, Mechanismus zugrunde liegt als im chronischen Stress.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass RU486 den Leuko- und Lymphozytenverlust nach chronischem Stress, vermutlich durch Blockade GC-induzierter Apoptosen, reduzieren kann, die durch akuten Stress induzierte Leukozytopenie aber nicht verhindert.

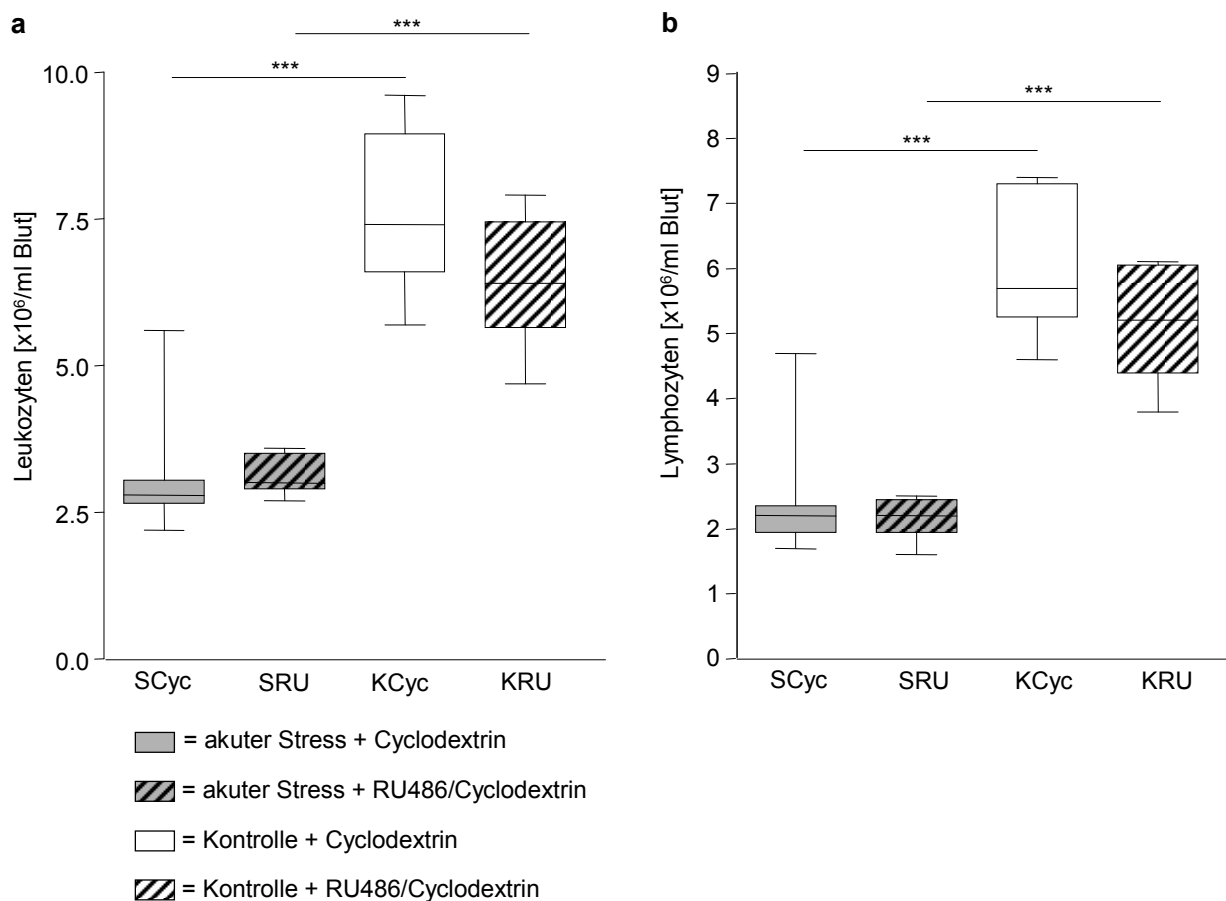


Abb. 5.9 Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im peripheren Blut akut gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. 14 h vor der zweistündigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine s.c. Injektion mit 50 $\mu\text{g/g}$ KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Direkt nach der Stressepisode wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und die Anzahl der Leukozyten (a) und der Lymphozyten (b) mittels Hämocounter bestimmt ($n = 6-9$ Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, *** $p < 0,001$, Dunns-Test).

5.2.4 RU486 reduziert die stressinduzierte Thymuskortexinvolution

Wie oben bereits erwähnt, können nach chronischem Stress neben Apoptosen in der Milz und Peyer'schen Plaques auch gehäuft Thymozytenapoptosen beobachtet werden^{21, 74}, die im histologischen Präparat mit einer Verminderung der Thymuskortexdicke korrelieren. T-Lymphozyten reifen assoziiert mit einem Selektionsprozess im Thymus heran. Reife T-Zellen werden danach als naive T-Zellen in der Blutbahn gefunden. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass vermehrte Apoptosen von

Thymuszellen mit der oben beschriebenen stressbedingten Lymphozytopenie in Zusammenhang stehen.

Da bekannt ist, dass Glukokortikoide hochpotent sind, Apoptosen zu induzieren, wurde der Einfluss von Kortikosteron auf die Thymozytenapoptose im chronischen psychischen Stress mittels RU486-Behandlung untersucht:

BALB/c-Mäuse mit Cyclodextrin-Injektion zeigten nach einer 4,5-tägigen Stressexposition, genau wie unbehandelte, gestresste Mäuse in früheren Experimenten, eine deutlich schmalere Thymusrinde als ungestresste Cyclodextrin-behandelte Mäuse (Abb. 5.10a, b, d). Auch der Thymuskortex RU486-behandelter, gestresster Mäuse war gegenüber dem ungestresster Mäuse mit Glukokortikoidrezeptorblockade verkleinert. Jedoch bewirkte die RU486-Behandlung gegenüber Kontrollbehandlung eine Verminderung der stressbedingten Thymuskortexinvolution (Abb. 5.10a, c, e). Durch Glukokortikoidrezeptorblockade konnte somit eine stressinduzierte Verminderung der Thymuskortexdicke, wahrscheinlich bedingt durch Apoptosen der Thymozyten, vermindert werden.

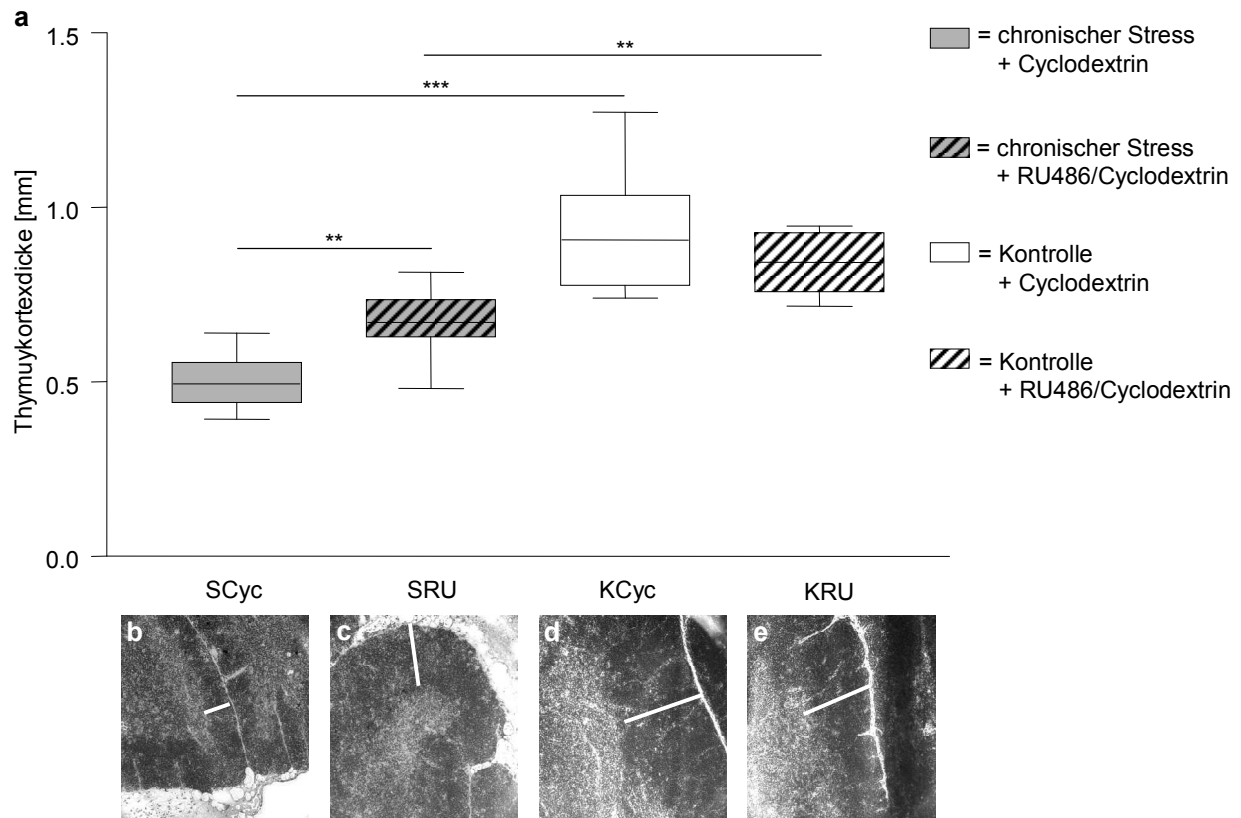


Abb. 5.10 Thymuskortextbreite chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter, weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der letzten Stressepisode am 5. Tag wurde den Mäusen der Thymus entnommen und die 5 µm dicken Organ-Gefrierschnitte mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop beurteilt. (a) Bestimmung der Kortextdicke des Thymus: Pro Maus wurden 3 Bilder des Thymus aufgenommen, pro Bild wurde die Thymuskortextbreite an 10 Stellen bestimmt und ein Mittelwert der Messdaten gebildet (n = 9 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, ** p < 0,01; *** p < 0,001, Dunns-Test. (b, c, d, e) Beispiel für histologische Bilder, die zur Bestimmung des Kortextdurchmessers verwendet wurden (b: SCyc, c: SRU, d: KCyc, e: KRU).

5.2.5 RU486 vermindert den Glukokortikoidanstieg im ACTH-Test gestresster Mäuse

Da die Aktivität der HPA-Achse unter anderem von der Sensitivität der Nebenniere auf ACTH abhängt, wurde ACTH bzw. als Kontrolllösung ein steriles PBS/Bovines Serum-Albumin (PBS/BSA)-Gemisch subkutan injiziert und der Glukokortikoidanstieg im Plasma der Mäuse 45 Minuten später bestimmt.

In dem hier durchgeführten chronischen Stressexperiment sollte durch diesen ACTH-Test überprüft werden, ob eine Blockade der Glukokortikoidrezeptoren einen Einfluss auf die ACTH-Sensitivität der Nebenniere hatte.

Zusätzlich sollte ermittelt werden, ob der durch die tägliche Cyclodextrin-Injektion hervorgerufene Spritzstress die Aktivität der Nebenniere beeinflusst. Chronisch gestresste, Cyclodextrin-behandelte Mäuse wiesen, wie auch nicht behandelte Mäuse in früheren Experimenten, gemessen am Glukokortikoidanstieg im Plasma eine erhöhte Reaktion der Nebenniere auf den externen ACTH-Reiz auf (Abb. 5.11a): Cyclodextrin-behandelte Mäuse zeigten nach viereinhalbtägiger Stressexposition einen 8-fachen Kortikosteronanstieg im Plasma als Reaktion auf die ACTH-Behandlung (Abb. 5.11b). Unter RU486-Behandlung wurde die stressinduzierte Erhöhung der ACTH-Sensitivität vermindert: Nach der ACTH-Injektion war nur ein 4-facher Kortikosteronanstieg sichtbar (Abb. 5.11b). Im Vergleich dazu war bei ungestressten Mäusen mit Cyclodextrin-Injektionen nach ACTH-Applikation kein Glukokortikoidanstieg messbar, in einem der beiden durchgeführten Experimente reagierten die Mäuse paradoxerweise sogar etwas stärker auf die PBS-Injektion als auf das ACTH. Dies war unerwartet, weil unbehandelte, ungestresste Tiere in früheren Experimenten eine deutliche ACTH-induzierte GC-Ausschüttung zeigen und weist wiederum auf einen möglichen desensibilisierenden Effekt von wiederholtem Spritzstress auf die HPA-Achse hin, die sich in der Resistenz der Nebennierenrinde auf das extern zugeführte ACTH zeigte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Sensitivität der Nebennierenrindenzellen sowohl Cyclodextrin- als auch RU486-behandelter gestresster Mäuse auf ACTH höher war als die der ungestressten Tiere. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Glukokortikoidrezeptoren durch RU486 im Stress tendenziell zu einer verringerten Reaktivität auf ACTH führt.

Vor diesem Hintergrund sollte die Frage geklärt werden, ob in den gestressten Versuchsgruppen direkt nach der letzten Stresssitzung eine veränderte Rückkopplungshemmung der HPA-Achse messbar war. Dazu wurde die Konzentration von ACTH im Plasma der Mäuse mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Es zeigte sich, dass Stress in Cyclodextrin- und auch in RU486-behandelten Mäusen zu einem gegenüber ungestressten Gruppen geringfügig reduzierten Plasma-ACTH-Spiegel führte (Abb. 5.11c). Die Werte zeigen jedoch eine hohe Varianz und sind daher schwer interpretierbar. Das Ergebnis könnte allerdings ein Hinweis auf eine stressbedingte Feedbackinhibition der ACTH-Ausschüttung und damit auf eine Desensitivierung der HPA-Achsenfunktion dieser Tiere auf einer zentralen Ebene sein.

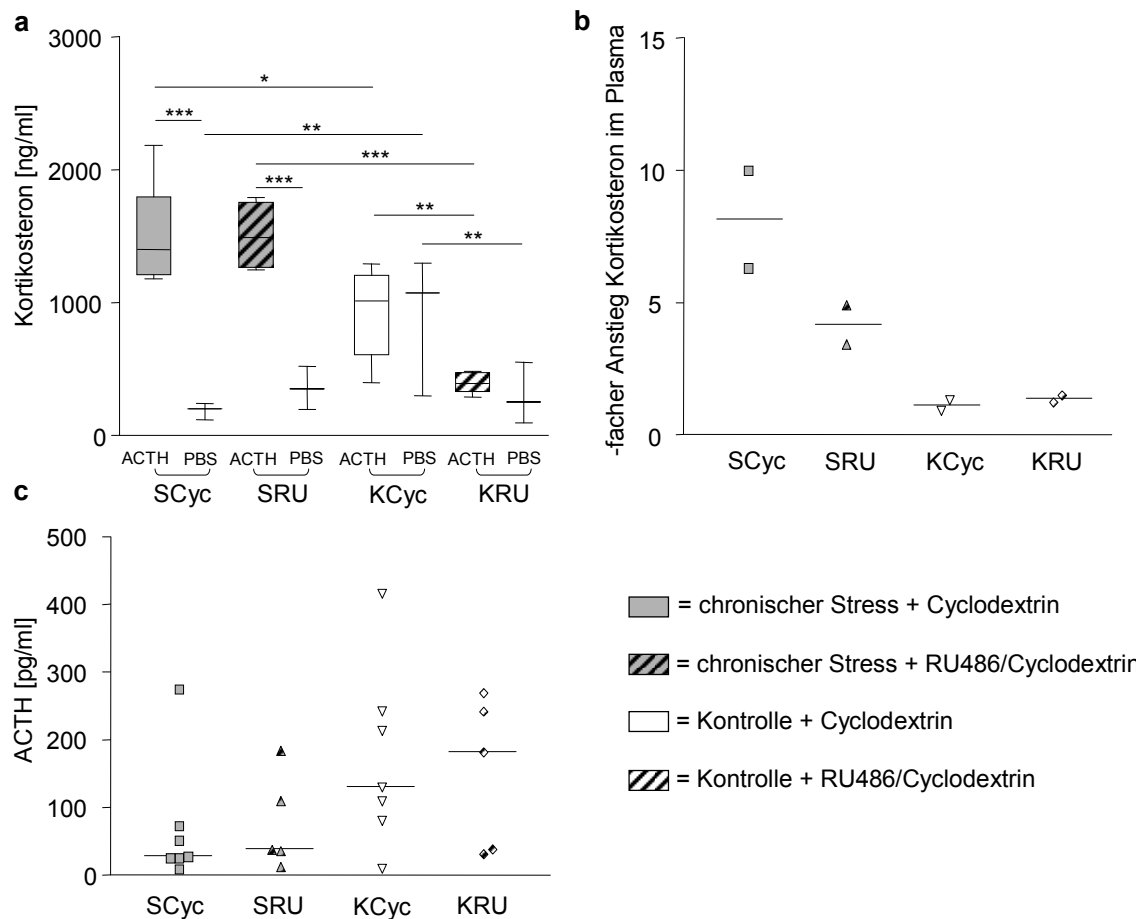


Abb. 5.11 Kortikosteronanstieg im Plasma nach ACTH-Test und Plasma-ACTH-Konzentration chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter, weiblicher BALB/c-Mäuse. (a, b) Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der letzten Stressepisode wurden die Mäuse entweder mit 1 µg ACTH(1-24) pro Maus in PBS/BSA-Lösung oder nur mit der PBS/BSA-Lösung behandelt. Nach 45 min wurde durch retroorbitale Punktion Blut gewonnen und die Plasma-Kortikosteronkonzentration mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Der Anstieg der Kortikosteronspiegel im Plasma zwischen ACTH- und PBS/BSA-behandelten Mäusen einer Behandlungs-Gruppe wurde berechnet (n = 11 Mäuse pro Gruppe (6 erhielten ACTH, 5 erhielten PBS/BSA), gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001, Dunns-Test). (c) Plasma-ACTH-Konzentrationen chronisch gestresster und ungestresster Mäuse direkt nach der letzten Stresssitzung und nach RU486- bzw. Cyclodextrin-Behandlung (n = 5-7 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten).

5.3 RU486-insensitive Effekte im chronischen Stressmodell

5.3.1 Stressinduziert erhöhte bakterielle Dissemination nach experimenteller Infektion

Die Schwächung des Immunsystems äußert sich neben der oben beschriebenen Lymphozytopenie und Thymuskortexinvolution funktionell vor allem in der Verminderung der Fähigkeit, bestimmte bakterielle Infektionen, für die eine TH1-Antwort des Immunsystems erforderlich ist, adäquat zu bekämpfen. Durch chronischen psychischen Stress wird die Entstehung einer TH2-dominierten Immunantwort mit verstärkter *ex vivo* IL10-, aber verminderter TNF-, IFN γ - und IL6-Induzierbarkeit gefördert^{20, 21, 47, 48}. So konnte in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass chronisch gestresste BALB/c-Mäuse deutlich schlechter mit einer experimentellen *E. coli*-Infektion umgehen können als ungestresste Kontrolltiere. In unterschiedlichen Organen wie Leber, Milz und Blut wurde bei gestressten Tieren 24 Stunden nach Injektion des *E. coli*-Stammes ATCC 25922 eine signifikant erhöhte Anzahl von Keimen gezählt²¹.

Eine mögliche Beteiligung von Glukokortikoiden bei der Hemmung der antibakteriellen Antwort sollte durch GR-Blockade aufgedeckt werden.

Wichtig an dieser Stelle ist, dass die Infektionsexperimente mit *E. coli* mit Sesamöl als RU486-Trägersubstanz durchgeführt wurden und eventuell in Experimenten mit Cyclodextrin als Lösungsmittel verifiziert werden müssen.

Sesamöl-behandelte, chronisch gestresste Mäuse zeigten 24 Stunden nach *E. coli*-Infektion im Blut signifikant mehr Keime als ungestresste Kontrolltiere (Abb. 5.12). Das bedeutet, dass chronisch gestresste Tiere trotz nutritivem Effekt der Vehikel-Applikation eine experimentelle bakterielle Infektion nicht so gut bekämpfen können wie ungestresste Kontrolltiere. Somit ist eine stressbedingte Immunsuppression reproduzierbar. Die Behandlung mit RU486 hatte aber keinen Einfluss auf die bakterielle Dissemination: Gestresste, RU486-behandelte Mäuse zeigten gegenüber gestressten, kontrollbehandelten Mäusen sogar eine leicht erhöhte bakterielle Last im Blut (Abb. 5.12). Glukokortikoide sind daher vermutlich nicht allein für die Hemmung der antibakteriellen Antwort verantwortlich. Vielmehr könnte dieses Ergebnis ein Hinweis auf eine unterstützende Funktion der Glukokortikoide bei der Bekämpfung einer bakteriellen Infektion sein.

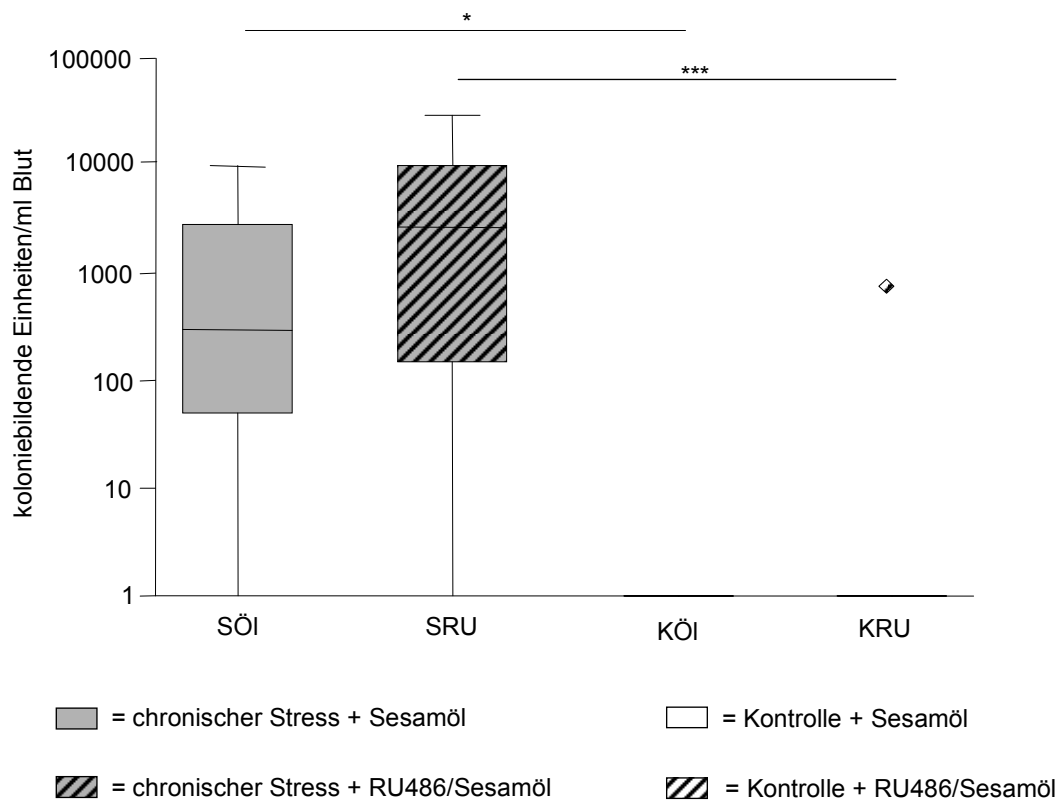


Abb. 5.11 Bakterielle Dissemination im Blut nach experimenteller *E. coli*-Infektion chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit dem Lösungsmittel Sesamöl (Öl). Unmittelbar nach der letzten Stressepisode am 5.Tag wurden die Mäuse intraperitoneal mit 3×10^5 Keimen des *E. coli*-Stammes ATCC 25922 infiziert. Nach 24 h wurde den Tieren durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und auf Columbia-Agar ausplattiert. Nach 24stündiger Inkubation wurde die Anzahl der gewachsenen *E.coli*-Kolonien pro g Organmasse bestimmt (n = 12 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$, Dunns-Test).

5.3.2 Stressinduzierte Hyperplasie der Nebennieren

Die Zona fasciculata der Nebennierenrinde ist der Ort der Glukokortikoidproduktion. Durch eine im Stress verstärkte HPA-Achsenaktivität müssen mehr Glukokortikoide produziert werden, wodurch es zu einer Verbreiterung der Nebennierenrinde

kommen kann. In unserer und anderen Arbeitsgruppen konnte durch histologische Untersuchung eine Hyperplasie der Nebennierenrinde, speziell der Zona fasciculata, nach chronischem psychischem Stress bestimmt werden^{21, 54, 55}. Die Anzahl der Parenchymzellen in diesem Bereich des Nebennierenkortex nahm deutlich zu⁵⁵.

Trotz veränderter HPA-Achsen-Aktivität Cyclodextrin-behandelter Mäuse konnten die Ergebnisse aus früheren Experimenten reproduziert werden: Gestresste BALB/c-Mäuse wiesen gegenüber ungestressten Kontrolltieren eine verbreiterte Zona fasciculata auf (Abb. 5.13a, b, d). Auch unter RU486-Behandlung war dieser Stresseffekt sichtbar (Abb. 5.13a, c, e). Die Glukokortikoidrezeptorblockade während des gesamten Stressexperiments hatte also keinen Einfluss auf die Vergrößerung der Nebennierenrinde.

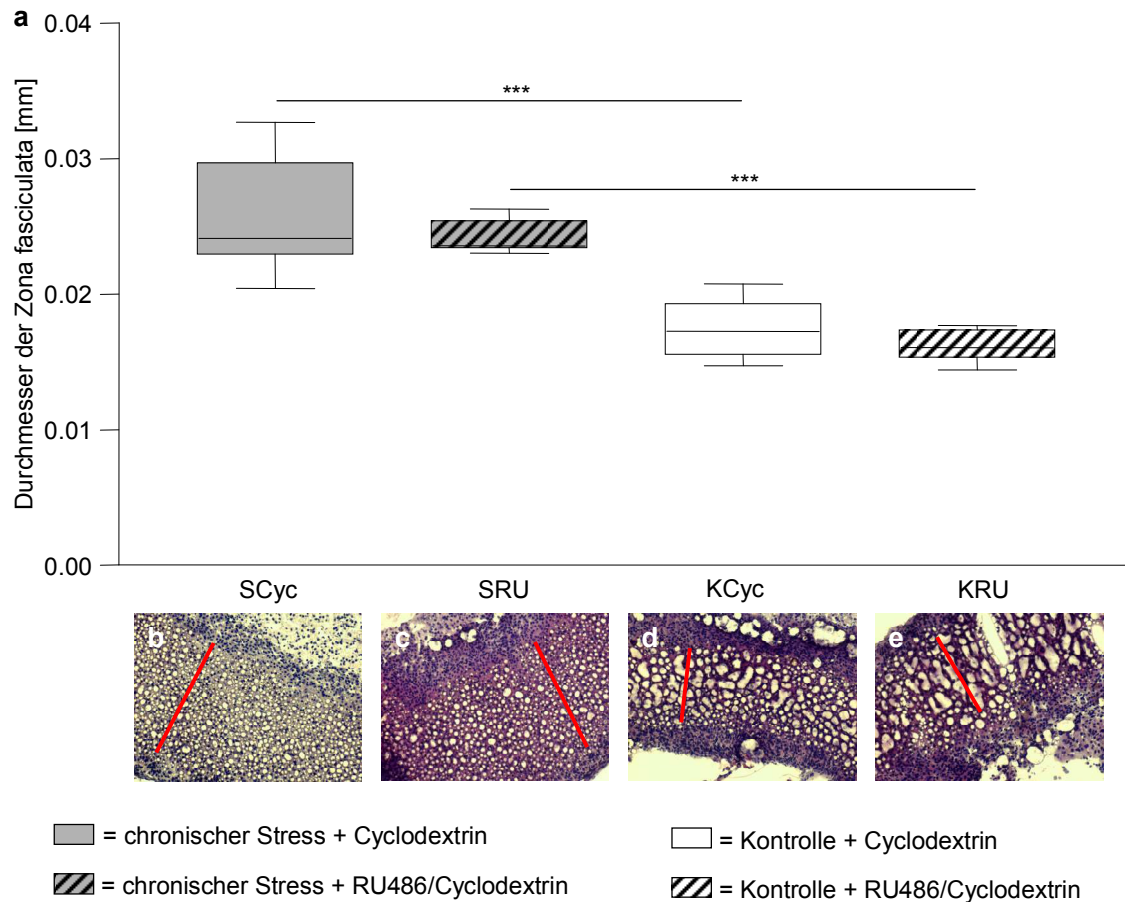


Abb. 5.13 Breite der Zona fasciculata chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 µg/g KG RU486 (RU) bzw. nur mit Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der letzten Stressepisode am 5. Tag wurde den Mäusen die Nebenniere entnommen und die 5 µm dicken Organ-Gefrierschnitte mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop beurteilt. (a) Durchmesser der Zona fasciculata: Pro Maus wurden 5 Bilder der Nebenniere aufgenommen, pro Bild wurde die Breite der Zona fasciculata an 10 Stellen bestimmt und ein Mittelwert der Messdaten gebildet (n = 9 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, *** p < 0,001, Dunns-Test). (b, c, d, e) Beispiel für histologische Bilder, die zur Bestimmung des Rindendurchmessers verwendet wurden, der Durchmesser der Zona fasciculata ist markiert (b: SCyc, c: SRU, d: KCyc, e: KRU).

5.4 Beeinflussung stressinduzierter Veränderungen des Indolaminstoffwechsels im Plasma durch RU486

In früheren Experimenten fand unsere Arbeitsgruppe heraus, dass nach einer akuten Stressexposition in einigen Organen weiblicher BALB/c-Mäuse IDO-mRNA signifikant hochreguliert wird⁸⁶: direkt nach akutem Stress in der Lunge, 6 Stunden danach im Gehirn, 12 Stunden nach Stress in der Milz. Im Plasma dieser Mäuse ändern sich die Konzentrationen wichtiger Tryptophan-Kataboliten. So zeigen akut gestresste Tiere unmittelbar nach der Stresssitzung (wenn kein weiterer Stress folgt) eine transiente Erniedrigung des Plasma-Tryptophanspiegels. Kynureninsäure fällt 6 Stunden nach akutem Stress zunächst ab, erreicht nach 12 Stunden aber wieder die Ausgangskonzentration, Kynurenin hingegen steigt 12 Stunden nach der Stressexposition signifikant an und erreicht 24 Stunden nach Stress wieder Kontrollspiegel⁸⁶.

Auch im Plasma chronisch gestresster Tiere ist der Indolaminstoffwechsel gegenüber ungestressten Mäusen verändert: Es werden erniedrigte Tryptophan- und Serotoninkonzentrationen gemessen, während die Plasma-Quinolinsäurekonzentrationen und das Kynurenin-Tryptophan-Verhältnis ansteigen⁸⁶.

Die IDO-mRNA-Expression in Gehirn, Milz und Peyerschen Plaques ist nach chronischem psychischem Stress signifikant gegenüber ungestressten Kontrollmäusen herunterreguliert⁸⁶. Diese Herunterregulation könnte im Rahmen einer Gegenregulation nach stressbedingter übermäßiger Expression der IDO-mRNA stattgefunden haben.

Unsere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die klassische, durch chronischen psychischen Stress induzierte HPA-Achsen-Aktivierung durch die Blockade von IDO verhindert wird⁸⁶. Dieser Effekt konnte auf eine reduzierte ACTH-Reaktivität der Nebenniere zurückgeführt werden. Im Umkehrschluss lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die IDO-Aktivität einen Beitrag zur Erhöhung der ACTH-vermittelten GC-Ausschüttung liefert. Glukokortikoide wiederum spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der im chronischen Stress beobachteten Immunsuppression. Alle unter IDO-Blockade gefundenen Effekte auf Stresskonsequenzen könnten somit lediglich auf eine Hemmung der GC-Ausschüttung zurückzuführen sein. Analog dazu hemmt RU486 die GC-Effekte in der Zelle. In der Literatur gibt es Hinweise, dass GC in die Aktivierung von IDO eingebunden sind: Glukokortikoide können *in vitro* die

Aktivierung von IDO durch IFN γ synergistisch verstärken^{113, 115}, was bedeutet, dass ein erhöhter Tryptophan-Katabolismus beobachtet werden kann.

Die Rolle von GC bei der Modifikation des Tryptophan-Katabolismus in chronisch gestressten Mäusen sollte hier charakterisiert werden.

Bereits Cyclodextrin-behandelte Mäuse (Kontrollgruppe) zeigten jedoch in Abhängigkeit von der Jahreszeit unterschiedliche Veränderungen des Indolaminstoffwechsels nach chronischem psychischem Stress: In Experimenten, die im Winter/Frühling durchgeführt wurden, wurden keine Anzeichen eines erhöhten Tryptophanabbaus im Plasma deutlich (Abb. 5.14), in einem im Sommer durchgeführten Experiment jedoch waren, vergleichbar mit unbehandelten gestressten Tieren (Abb. 5.15b, c), die Kynureninkonzentration und das Kynurenin-Tryptophan-Verhältnis gestresster Tiere erhöht, die Serotonin-Konzentration dagegen erniedrigt (Abb. 5.15b, c, f). Tryptophan-, Kynureninsäure- und Quinolinsäurewerte waren jeweils unverändert (Abb. 5.15a, d, e). Die im Sommer erhobenen Daten waren vergleichbar mit Ergebnissen früherer Experimente unserer Arbeitsgruppe ohne zusätzliche Behandlung chronisch gestresster Mäuse. Bei beiden hier durchgeführten Experimenten fielen allerdings unter dem Durchschnittswert gesunder, unbehandelter weiblicher BALB/c-Mäuse liegende Tryptophan- und Serotoninkonzentrationen auf. Da die Tryptophan-Depletion in bisherigen Experimenten immer Stress-assoziiert war, spiegeln sich in den hier gezeigten Ergebnissen wahrscheinlich Effekte des wiederholten Spritzstresses wider. Zeichen einer stressbedingt erhöhten IDO-Aktivität konnten demnach bei Cyclodextrin-behandelten Mäusen nach chronischem psychischem Stress schwer interpretiert werden.

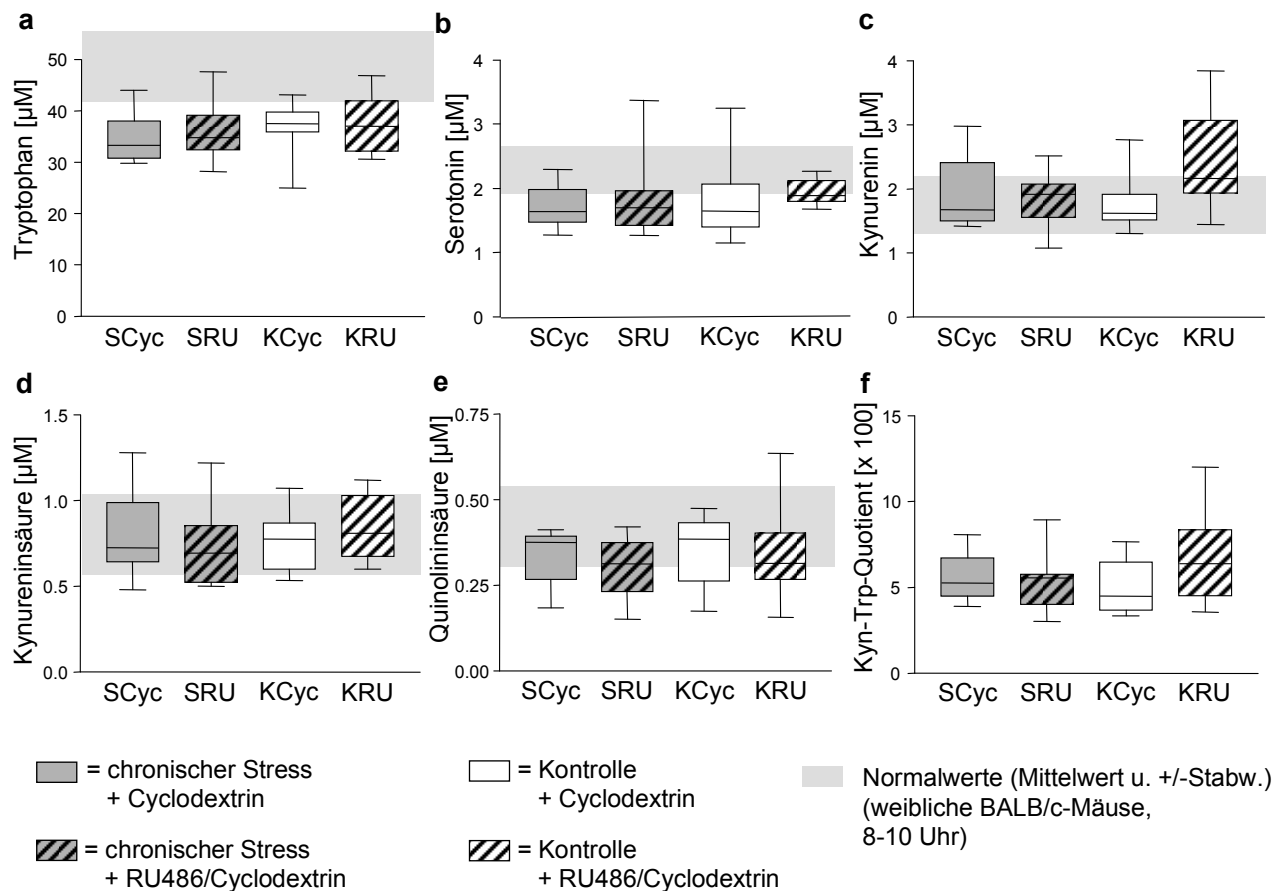


Abb. 5.14 Plasma-Indolaminkonzentrationen chronisch gestresster und nicht gestresster, RU486- bzw. Cyclodextrin-behandelter, weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit 50 $\mu\text{g/g}$ KG RU486 (RU) bzw. nur mit Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der letzten Stresssitzung am 5. Tag wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und darin mittels Tandem-Massen-Spektrometrie die Konzentrationen von (a) Tryptophan, (b) Serotonin, (c) Kynurenin, (d) Kynureninsäure, und (e) Quinolinsäure bestimmt. (f) der Kynurenin-Tryptophan-Quotient wurde berechnet ($n = 9$ Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 im Winter/Frühling durchgeführten Experimenten).

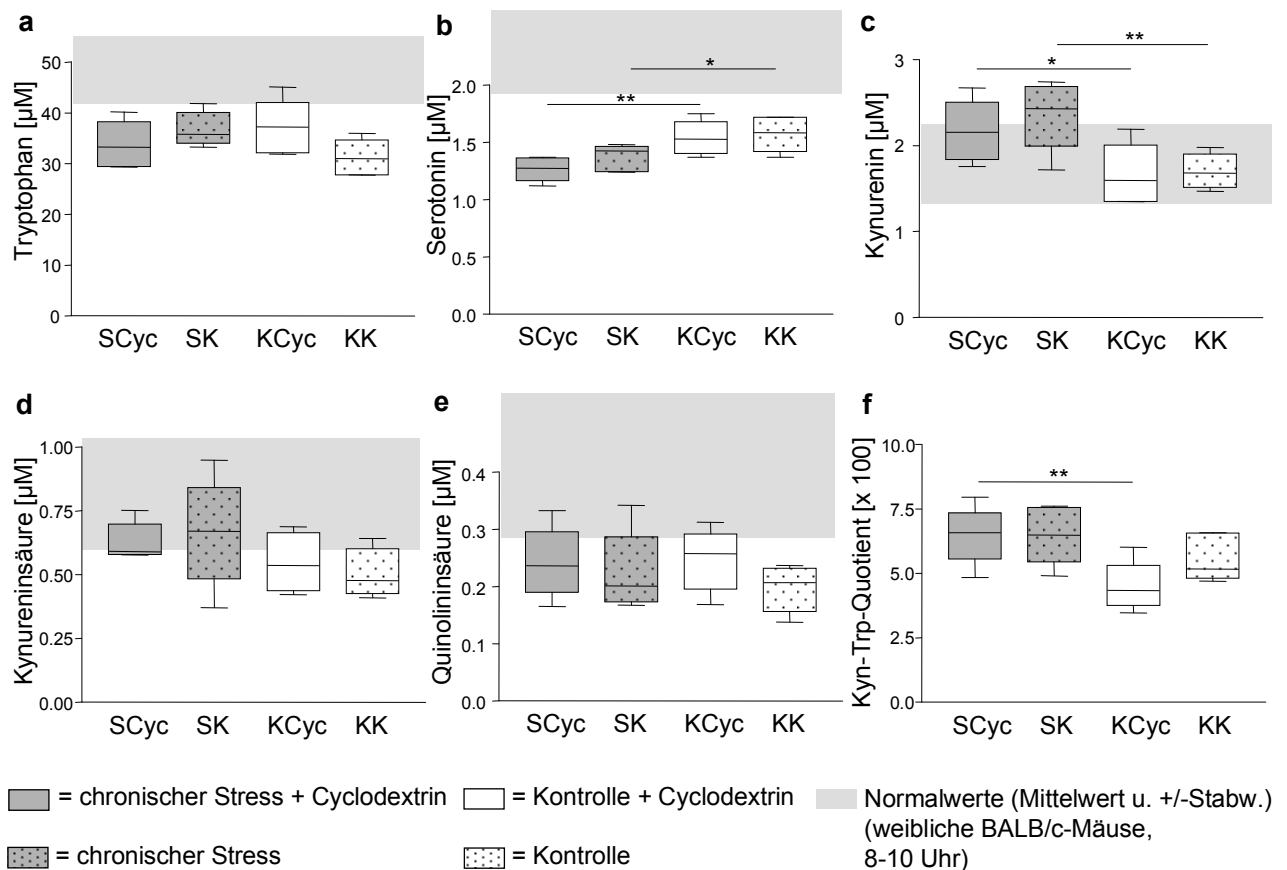


Abb. 5.15 Plasma-Indolaminkonzentrationen chronisch gestresster und nicht gestresster, cyclodextrin- und nicht behandelter, weiblicher BALB/c-Mäuse. Während der 4,5-tägigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine tägliche s.c. Injektion mit Cyclodextrin (Cyc). Gestresste (SK) und ungestresste (KK) Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Unmittelbar nach der letzten Stresssitzung am 5. Tag wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und im Plasma mittels Tandem-Massen-Spektrometrie die Konzentrationen von (a) Tryptophan, (b) Serotonin, (c) Kynurenin, (d) Kynureninsäure, und (e) Quinolinsäure bestimmt. (f) der Kynurenin-Tryptophan-Quotient wurde berechnet (n = 6 Mäuse pro Gruppe, * p < 0,05, ** p < 0,01, Dunns-Test, Experiment wurde im Sommer durchgeführt).

Direkt nach akutem Stress waren Tryptophan-, Serotonin- und Quinolinsäurewerte im Plasma Cyclodextrin- und RU486-behandelter Gruppen nicht verändert (Abb. 5.16a, b, e). Nur im Plasma RU486-behandelter Mäuse war ein stressbedingter Anstieg der Kynureninwerte zu beobachten (Abb. 5.16c). Cyclodextrin-behandelte Tiere wiesen lediglich geringfügige Merkmale einer stressinduzierten Aktivierung des Tryptophanstoffwechsels auf: Die Kynureninkonzentration und der Kyn-Trp-Quotient waren in der gestressten Gruppe tendenziell erhöht (Abb. 5.16c, f). Gegenüber den

gestressten, Cyclodextrin-behandelten Mäusen war bei gestressten, RU486-behandelten Mäusen die Kynureninsäurekonzentration erhöht (Abb. 5.16d). Dieses Ergebnis lässt auf eine verstärkte IDO-Aktivität oder auf einen verlangsamten Umbau der Tryptophankataboliten im Plasma der RU486-behandelten Mäuse direkt nach akutem Stress schließen. Auch die Überlegung, ob RU486 die Auswirkungen des Spritzstresses reduziert, wodurch eigentlich zu erwartende akute Stresseffekte wieder sichtbar werden, ist zulässig.

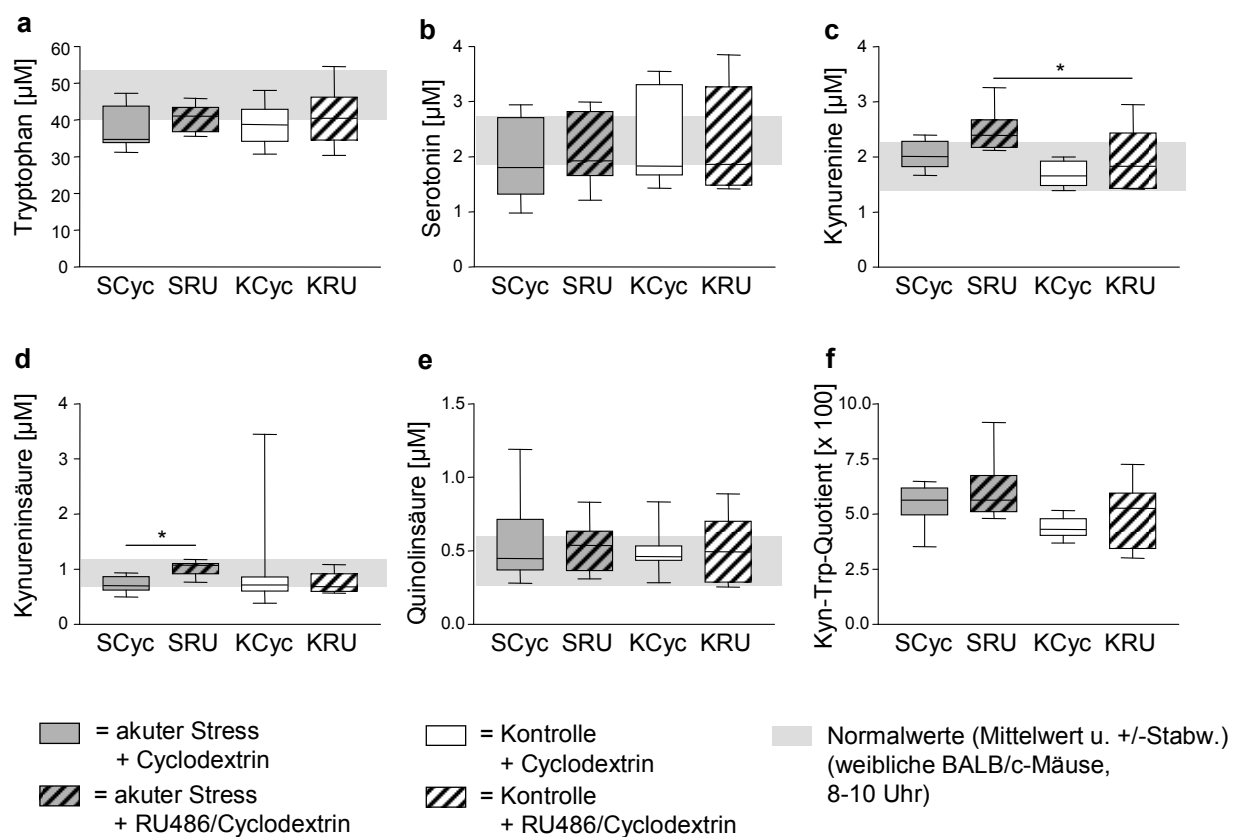


Abb. 5.16 Plasma-Indolaminkonzentrationen im Plasma unmittelbar nach akutem Stress und RU486-Behandlung. 14 h vor der zweistündigen Dauer des Experiments erhielten gestresste (S) und nicht gestresste (K) Tiere eine s.c. Injektion mit 50 $\mu\text{g/g}$ KG RU486 (RU) bzw. nur mit Cyclodextrin (Cyc). Unmittelbar nach der Stressepisode wurde den Mäusen retroorbital Blut entnommen und darin per Massentandemspektrometrie die Plasmakonzentrationen von (a) Tryptophan, (b) Serotonin, (c) Quinolinsäure, (d) Kynurenin, (e) Kynureninsäure und daraus (f) der Kynurenin-Tryptophan-Quotient bestimmt (n = 6-9 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, * p < 0,05, Dunns-Test).

Eine Erhöhung der IDO-Aktivität konnte weder nach akutem noch nach chronischem Stress konsistent nachgewiesen werden. Wie bereits erwähnt, könnte die Veränderung des Tryptophan-Katabolismus im Plasma dieser Mäuse auf Spritzstress-Effekte zurückzuführen oder durch diese beeinflusst worden sein. Ob Glukokortikoide *in vivo* einen Einfluss auf die IDO-Aktivität haben, konnte durch Analyse der Ergebnisse nicht geklärt werden.

6. Diskussion

6.1 Modifikation der HPA-Achsenaktivität durch unterschiedliche Stressoren

6.1.1 Nebeneffekte der Interventionstherapie im Stressmodell

Während der Etablierung der RU486-Behandlung zur Glukokortikoidrezeptorblockade im chronischen Stressmodell weiblicher BALB/c-Mäuse wurde nach Durchführung einiger Experimente deutlich, dass die tägliche Injektion der nicht-toxischen Substanz Cyclodextrin, das als Lösungsmittel verwendet wurde, Einfluss auf die Ergebnisse des etablierten Stressmodells hat. Besonders auffällig war die Veränderung der HPA-Achsenfunktion. Die Bereitstellung von Glukokortikoiden wird durch die Aktivität der HPA-Achse reguliert. Als Stresshormone haben sie zahlreiche Effektorfunktionen, die auch während der Durchführung der Stressexperimente und in den behandelten Kontrolltieren offensichtlich wurden.

Verschiedene Studien mit unterschiedlichen Labor-Nagetieren zeigen, dass neben der Injektion von Substanzen schon so grundlegende Vorgänge wie Handhabung (Handling) oder Wiegen der Mäuse, Blutabnahmen, orogavale Applikation von Substanzen und sogar die Säuberung oder das Bewegen der Tierkäfige eine messbare Aktivierung der Stressachsen hervorrufen¹⁷³⁻¹⁸⁰. Bereits nicht invasive, harmlose Routine-Tätigkeiten wie Berühren und Hochheben der Labortiere oder das Säubern der Käfig erwiesen sich als Ursache für Veränderungen physiologischer Parameter wie Puls, Blutdruck, Blutzuckerkonzentration und die Ausschüttung von Stresshormonen, die mindestens 30 Minuten lang anhielten^{173, 174, 177, 181, 182}.

Bei unbehandelten Mäusen war die Glukokortikoidkonzentration in unserem chronischen Stressmodell nach 9 Stressepisoden gegenüber Kontrolltieren erhöht. Wurden Mäuse mit täglicher Cyclodextrin-Injektion chronischem psychischem Stress unterzogen, gab es in den hier durchgeführten Experimenten dagegen keinen Unterschied der Plasma-Glukokortikoidkonzentrationen zwischen gestressten und nicht gestressten Tieren. Nicht ein „fehlender“ Anstieg von GCs bei gestressten Mäusen, sondern leicht erhöhte Plasma-Kortikosteronkonzentrationen der ungestressten, Cyclodextrin-behandelten Tiere verhinderten, dass chronische Stresseffekte auf die HPA-Achse messbar wurden. Doch nicht nur die Kortikosteronausschüttung, auch die Regulation der gesamten HPA-Achse wurde

durch den chronischen Spritzstress beeinflusst. Die Funktion der einzelnen Bestandteile der HPA-Achse (Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere) wird durch Zytokine, Glukokortikoide und andere Mediatoren gesteuert^{5, 7, 9-11, 44, 45}. Durch Stress wird die HPA-Achse aktiviert, woraufhin es zu einer starken Ausschüttung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde kommt^{44, 45}. Glukokortikoide greifen inhibierend in ihre eigene Produktionsschleife ein, indem sie an spezielle GR in Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere binden. Eine Signalkaskade führt in diesen Zellen zu einer Reduktion der CRH-, ACTH- und Glukokortikoidproduktion^{30, 32, 40-42}. Die Aktivität der HPA-Achse wird also nach dem Erleben eines kurz andauernden oder eines eher milden Stressors von einem erhöhten Stress innerhalb von Stunden wieder auf Normalniveau herunterreguliert. Je länger chronischer Stress bestehen bleibt und je stärker der Stressor ist, umso stärker wird eine Dysregulation dieses Mechanismus. Der Körper verliert nach und nach seine Fähigkeit, die HPA-Achse abzuschalten und die Hypersekretion der GC kann nicht mehr supprimiert werden^{41, 142 (Reviews)}. Diese gestörte Feedbackhemmung durch GC kann auf den Verlust von GR-tragenden Neuronen im Hippocampus zurückzuführen sein, der durch chronisch erhöhte GC-Konzentrationen hervorgerufen wurde^{41 (Review)}. Bei Mäusen im chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe war eine solche Dysregulation, wie im Folgenden deutlich wird, jedoch noch nicht ausgeprägt. Nach chronischem Stress wiesen unbehandelte Mäuse eine erhöhte Sensitivität der Nebenniere auf ACTH auf, es kam zu einem gegenüber ungestressten Tieren signifikant stärkeren GC-Anstieg als Reaktion auf diesen Sekretionsreiz (unveröffentlichte Daten). Dass die Plasma-Kortikosteronkonzentration nach chronischem Stress allerdings niedriger war als nach akutem Stress, ist vermutlich auf die noch bestehende zentrale Feedbackhemmung der ACTH-Ausschüttung durch GC zurückzuführen. Zu diesen Ergebnissen passt die Beobachtung vieler Arbeitsgruppen, dass wiederholtes Handling von Mäusen, genau wie auch multiple Kortikosteron-Injektionen, die GC-Antwort auf einen bekannten Stressor erniedrigen kann. Gleichzeitig wird eine herunterregulierte CRH-Expression und ACTH-Ausschüttung beobachtet¹⁸³⁻¹⁸⁵.

Genau wie unbehandelte Tiere wiesen Cyclodextrin-behandelte, chronisch gestresste Mäuse eine stark erhöhte ACTH-Sensitivität der Nebenniere, doch im Gegensatz zu akut gestressten Tieren niedrigere GC-Spiegel auf. Diese Mäuse zeigten gegenüber ungestressten Mäusen zudem einen tendenziell erniedrigten

Plasma-ACTH-Gehalt, was die Theorie der zentralen Feedback-Hemmung der ACTH-Sekretion unterstützt. Im Gegensatz zu dieser zentralen Verminderung der HPA-Achsen-Aktivierung wurde die Kortikosteronsekretion bei nicht gestressten, aber mehrfach mit Cyclodextrin-Injektionen behandelten Mäusen in der Nebenniere geblockt: Die Ergebnisse des ACTH-Tests bieten Hinweise auf eine Resistenzentwicklung der HPA-Achse nicht gestresster, aber täglich mit Cyclodextrin behandelter Mäuse auf Ebene der Nebenniere. Diese Tiere waren nicht in der Lage, auf die externe ACTH-Zuführung mit einem Kortikosteronanstieg zu reagieren. Vermutlich führte der chronische Spritzstress zu dieser HPA-Achsen-Desensitivierung.

Die Feedbackhemmung der HPA-Achsenaktivität fand also zusammengefasst bei Cyclodextrin-behandelten Kontrollmäusen auf Ebene der Nebenniere statt, bei chronisch psychisch gestressten Cyclodextrin-behandelten Tieren auf einer übergeordneten, zentralen Ebene. Odio et al. beschreiben ein ähnliches Phänomen: Chronisch gestresste Ratten wiesen neben einer erniedrigten ACTH-Ausschüttung nach CRH-Injektion eine erhöhte Sensitivität der Nebenniere auf ACTH auf. Diese Autoren haben die Hypothese aufgestellt, dass die Adaptation der ACTH-Antwort im chronischen Stress auf ein vermindertes Ansprechen der Hypophyse auf CRH zurückzuführen ist ¹⁸⁶ (Abstrakt).

Die unterschiedliche Qualität und Stärke der Stressoren bestimmen in unserem Stressmodell folglich, wie und wo die HPA-Achse reguliert wird und wo die Feedback-Schleife am stärksten eingreift. Leichte Stressoren wie die tägliche Injektion einer harmlosen Substanz scheinen eine Nebennieren-Desensibilisierung gegenüber ACTH zu erzeugen. Dagegen rufen schwere, kombinierte Stressoren (Injektion, Immobilisation und akustischer Stimulus) anscheinend eine CRH-Resistenz auf Ebene der Hypophyse hervor. Bowers et al. unterscheiden ebenfalls zwischen den Effekten verschiedener chronischer Stressoren unterschiedlicher Qualität: Immobilisationsstress, Kälte und forcierter Schwimmstress hatten signifikant stärkere stimulierende Einflüsse auf die HPA-Achsenaktivität als Isolation oder Handling. Die parallel beobachtete stressbedingte Umverteilung von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in peripheres Gewebe war bei immobilisierten oder isolierten Mäusen und bei Mäusen, die Kälte ausgesetzt waren, signifikant stärker ausgeprägt als bei Tieren, die Handling und forcierem Schwimmstress exponiert waren ¹⁸⁷.

Um zu untersuchen, ob in unseren Experimenten das Lösungsmittel Cyclodextrin zu der veränderten HPA-Achsenaktivierung beiträgt, oder der tägliche Injektionsstress eine Rolle spielt, wurden zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, in deren Rahmen physiologische NaCl-Lösung verabreicht wurde. Auch dabei wurde gezeigt, dass der Spritzstress die HPA-Achsenantwort sensitiviert: Nur die durch eine NaCl-Injektion präkonditionierten Mäuse reagierten auf eine weitere intraperitoneale NaCl-Injektion mit einem transienten Anstieg des Kortikosteronspiegels im Plasma. Die Mäuse wiesen 24 Stunden nach einer NaCl-Injektion keine erhöhten GC-Spiegel im Plasma auf. Dagegen war 16 Stunden nach einer subkutanen Injektion von Cyclodextrin noch ein Spritzeffekt zu beobachten: Die Plasma-Kortikosteronkonzentration ungestresster, Cyclodextrin-behandelter Mäuse war gegenüber physiologischen Konzentrationen von vollkommen unbehandelten Tieren aus einem anderen Experiment signifikant erhöht. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen eines vorübergehenden Kortikosteronanstieges durch Spritzstress konnten Gärtner et al. zeigen, dass allein die Bewegung des Käfigs innerhalb von 5 Minuten zur Induktion eines Kortikosteronanstieges im Plasma erwachsener männlicher Han:Sprague-Ratten führte, der nach 15 Minuten seinen Höhepunkt erreichte. Nach 60 Minuten war der Plasma-Glukokortikoidspiegel wieder normalisiert¹⁷⁷.

Da Spritzstress messbare Effekte auf die HPA-Achse zeigt, schlagen Dalm et al. als Alternative vor, Tieren Substanzen, wie zum Beispiel Kortikosteron, GR-Blocker oder die entsprechenden Lösungsmittel, über spezielle Nahrungszubereitungen, in diesem Falle mittels einer getränkten Haferflocke, zu applizieren. Nach Aufnahme einer in Lösungsmittel getränkten oder einer reinen Haferflocke wurden im Gegensatz zur orogavalen Gavage oder einer intraperitonealen Injektion des Lösungsmittels nur ein sehr geringer, kurz andauernder Anstieg der Plasma-Kortikosteronkonzentration und keine Veränderung anderer physiologischer Parameter gemessen¹⁷⁶. Aufgrund nicht abschätzbarer Konsequenzen einer invasiven Behandlung und durch die Beobachtungen, dass schon harmlose Interventionen wie das Verschieben der Tierkäfige zu einer Veränderung physiologischer Parameter führen, sollte eine solche stress- und (beinahe) interventionsfreie Applikationsweise von Medikamenten in einem Versuchsaufbau zur Stressforschung als ernstzunehmende Alternative in Erwägung gezogen werden. Allerdings gäbe es auch hier einige Nachteile: Erstens müsste zunächst getestet werden, ob und in welchem Maße die zu verabreichende

Substanz von der Haferflocke aufgesaugt wird oder ob das Medikament dadurch vielleicht sogar strukturell und in seiner Wirksamkeit verändert wird. Zweitens ist eine Manipulation am Käfig trotz nicht-invasiver Darreichungsform notwendig. Drittens, und das wäre mit großer Wahrscheinlichkeit das Hauptproblem, kann nicht davon ausgegangen werden, dass alle Tiere die gleiche Menge des Medikaments zu sich nehmen. Auch diese Möglichkeit der therapeutischen Applikation von Substanzen kann also mit Schwierigkeiten assoziiert sein.

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten wurde ein weiteres Problem deutlich: Wurde Sesamöl als Lösungsmittel für RU486 verwendet, verloren chronisch gestresste Mäuse kein Körpergewicht. Wir vermuten, dass diese Behandlung einen zusätzlichen nutritiven Effekt hat. Dieser ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Jeng et al. beschreiben in ihrem Review über die Sesamöl-Bestandteile Sesamin und Sesamolin jedoch antiinflammatorische Eigenschaften dieser ω -3-Fettsäuren. Sie konkurrieren mit ω -6-Fettsäuren, den Vorläufern proinflammatorischer Prostaglandine und Leukotriene, um das für diesen Umbau verantwortliche Enzym Cyclooxygenase, wodurch weniger inflammatorische Mediatoren hergestellt werden. Einhergehend mit dieser Beobachtung vermindern Sesamin und Sesamolin bei Mäusen die Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL6 und IL1 β , aber erhöhen die IL10-Konzentration nach LPS-Exposition¹⁸⁸. Ob diese Effekte auch in unserem Stressmodell eintraten, wurde nicht überprüft. Starke Einflüsse des Öls auf das Immunsystem waren allerdings eher unwahrscheinlich, da mit Sesamöl behandelte Mäuse bei der Abwehr einer experimentellen Infektion mit *E. coli* vergleichbar mit unbehandelten Mäusen reagierten.

Um den offensichtlich nutritiven Effekt und mögliche andere Einflüsse des Sesamöls zu umgehen wurde ein Wechsel des Lösungsmittels zu Cyclodextrin vorgenommen, woraufhin durch die Ergebnisse der folgenden Experimente von einem Ausbleiben substanzabhängiger Interferenzen ausgegangen werden konnte.

Obwohl für dieses Problem eine Lösung gefunden worden war, stellte sich nun die grundlegende Frage, ob mit dem chronischen Stressmodell trotz der Störung durch die Interventionsbehandlung wie zuvor geplant weitergearbeitet werden konnte, da die HPA-Achsenaktivität der Kontrollmäuse, die Lösungsmittelinjektionen erhielten, verändert war. Infolgedessen war im Bezug auf die Kortikosteron-Plasmaspiegel, die als wichtiges diagnostisches Werkzeug gelten, kein Unterschied zwischen chronisch gestressten und „ungestressten“ Mäusen mit Cyclodextrin-Injektionen messbar.

Allerdings waren viele der bekannten Stresseffekte (Leukozytopenie, erhöhte bakterielle Dissemination, erhöhte ACTH-Sensitivität) bei Cyclodextrin-behandelten Mäusen trotz der Behandlung zu beobachten. Zudem wurde die Wirksamkeit von RU486 indirekt nachgewiesen: Die durch chronischen Stress hervorgerufene Leuko- und Lymphozytopenie wurde durch die Glukokortikoidrezeptorblockade verhindert. Aus diesen Gründen wurde die Entscheidung getroffen, die Experimente fortzusetzen.

Diese Beobachtungen zeigen, dass sowohl jegliche Handhabung der Mäuse, besonders die wiederholte Injektion von (harmlosen) Substanzen, als auch die Wahl des Lösungsmittels ernstzunehmende potenzielle Störfaktoren in Tiermodellen sind und ihr Einsatz während der Planung einer Versuchsreihe gründlich überdacht werden sollte, vor allem wenn keine absolut sensiblen Read-Out-Systeme, welche die Qualität des Störfaktors aufdecken können, genutzt werden. Von einem Einfluss der HPA-Achse und somit von einer „Interventions-Stress“-Übertragung auf viele experimentelle Ansätze ist jedoch auszugehen.

6.1.2 RU486 vermindert den durch akuten Stress vermittelten Kortikosteronanstieg

Trotz eines Spritzeffekts bei Kontrollmäusen nach akutem Stress war ein Effekt der Glukokortikoidrezeptorblockade auf die HPA-Achsenaktivität sichtbar: Die RU486-Behandlung verhinderte unter Anderem, wie bereits gesagt, den Kortikosteronanstieg im Plasma akut gestresster Mäuse. Obwohl dieses Ergebnis mehrfach reproduzierbar war, gibt es in der Literatur nur wenige ähnliche Beobachtungen: Zwar fanden Moldow et al. heraus, dass eine Behandlung von Sprague-Dawley-Ratten mit 50 µg/g KG RU486 die 24 Stunden nach akutem Stress gemessene Erhöhung der Plasma-Kortikosteronkonzentration verhindert, jedoch hatte der Inhibitor unmittelbar nach der Stresssituation keinen Effekt auf die Kortikosteronausschüttung¹⁵⁸. Viele Arbeitsgruppen entdeckten zudem, dass Nager unter GR-Blockade erhöhte GC-Konzentrationen im Plasma aufweisen: Ratka et al. beobachteten, dass die Plasma-Glukokortikoidkonzentration nach akuter Stressexposition bei Mäusen mit subkutaner Injektion von 10 µg/g KG RU486 länger erhöht blieb als bei gestressten Kontrolltieren¹⁵⁷. Anscheinend hatte das Medikament die inhibitorischen GR entlang der HPA-Achse geblockt, wodurch eine

physiologische Feedback-Inhibition der Glukokortikoid-Produktion durch Kortikosteron nicht möglich war und die Plasmaspiegel länger erhöht blieben.

Dal-Zotto et al. behandelten Ratten 45 Minuten vor akutem Stress subkutan mit 100 µg/g KG RU486, gelöst in 40% Propylenglykol. Sieben Tage später wurden die Tiere einer weiteren Stresssitzung exponiert. Dabei wurde beobachtet, dass RU486-behandelte Ratten, die zwei Stresssitzungen unterzogen wurden, signifikant höhere Kortikosteronkonzentrationen zeigten als Lösungsmittelbehandelte, wiederholt gestresste Ratten ¹⁵⁹. Auch diese Beobachtung kann auf die verhinderte Feedbackinhibition der GC-Produktion durch RU486 zurückgeführt werden.

Nicht nur bei Nagern, auch bei Menschen war der Kortisolspiegel im Plasma 2-3 Tage nach Einnahme einer RU486-Pille (4 µg/g KG) erhöht. Die Bioaktivität des Kortisols war allerdings erniedrigt ¹⁶². Durch dieses Ergebnis eines Transaktivierungsassays ^{161, 162} könnte erklärt werden, weshalb viele Arbeitsgruppen unter RU486-Behandlung eine Blockade von Glukokortikoideffekten sahen, obwohl die Plasma-Kortikosteronkonzentration offensichtlich nach der Stresssitzung zunächst erhöht war.

Die Beobachtung in den in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten, dass RU486 den akuten stressbedingten GC-Anstieg verhindert, kann möglicherweise auf Unterschiede zwischen dem Versuchsaufbau meiner Experimente und der Experimente der anderen Arbeitsgruppen zurückgeführt werden: Zwischen Injektion des RU486 und der Stressexposition lagen 14 Stunden, die anderen Arbeitsgruppen applizierten das Medikament jedoch höchstens eine Stunde vor Stressbeginn ^{158, 159}. Der GR-Inhibitor bewirkte also vermutlich während seiner mehrstündigen Einwirkzeit auf eine bisher nicht geklärte Weise eine Änderung der HPA-Achsenfunktion, welche eine Resistenz gegenüber dem akuten Stressor bewirkte.

6.2 Glukokortikoidvermittelte Stresskonsequenzen

6.2.1 RU486- und 1-MT-sensitive Stresseffekte

Da 1-MT-Behandlung in Experimenten zur IDO-Inhibition zu einer verminderten ACTH-induzierten GC-Antwort führte und chronisch psychisch gestresste Mäuse unter der Therapie keine erhöhten Kortikosteron-Plasmaspiegel zeigten, werden hier

die Ergebnisse der RU486-Behandlung den Resultaten der zuvor in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten 1-MT-Behandlung gegenübergestellt: Es sollte geklärt werden, welche Effekte des chronischen psychischen Stresses direkt GC-vermittelt und welche aufIDO-Aktivität zurückzuführen sind.

Stresseffekte, die sowohl durch Glukokortikoidrezeptor- als auch durchIDO-Inhibition verhindert werden konnten, müssen durch Glukokortikoidwirkungen erklärt werden können. Zu diesen Effekten zählen die Gewichtsabnahme, depressionsähnliches Verhalten und die verstärkte ACTH-induzierte GC-Ausschüttung aus der Nebenniere nach chronischem psychischem Stress.

Ein Verlust an Körpergewicht nach chronischem psychischem Stress trotz unverändertem Futter- und Wasserangebot konnte in unserer und anderen Arbeitsgruppen bei verschiedenen Nagern schon vielfach nachgewiesen werden^{15, 20, 21, 53, 60-66}. Jahng et al. haben gezeigt, dass unter mehrmaliger intraperitonealer Dexamethason-Injektion (1 mg/kg KG) ähnliche Effekte sichtbar waren: Ratten nahmen Gewicht ab, obwohl sie sogar mehr fraßen als Kochsalzbehandelte Kontrolltiere²⁹.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten verloren gestresste, Cyclodextrin-behandelte Mäuse Körpergewicht. Im Gegensatz zu unbehandelten, gestressten Mäusen aus früheren Experimenten fraßen sie mehr als ungestresste Kontrolltiere. Diese Beobachtung verdeutlicht zum einen die Entwicklung einer hyperkatabolen Stoffwechsellage^{53, 189-191}, zum anderen jedoch auch, dass der Spritzstress an dieser Stelle das Futteraufnahmeverhalten Cyclodextrin-behandelter Mäuse änderte. Die stressbedingte Gewichtsabnahme und somit möglicherweise der Hyperkatabolismus konnte durch Blockade der GR mittels RU486 nahezu aufgehoben werden. Die Erklärung liegt nahe: Glukokortikoide sind bekannte Induktoren der Genexpression der Schlüsselenzyme von Glukoneogenese, Lipolyse und Proteolyse^{53, 189-191}. In der Folge kommt es zu einem Abbau der Fettreserven und auch der Muskelmasse zugunsten einer schnellen Energiebereitstellung in Form von Kohlenhydraten. Kohlenhydrate werden intrazellulär zu Kohlenstoffdioxid, Wasser und energiereichem ATP umgebaut.

Auch durch 1-MT-Behandlung wurde der durch chronischen Stress bedingte Verlust an Körpergewicht verhindert⁸⁶. Da bei diesen 1-MT-behandelten, gestressten Mäusen gleichzeitig die Glukokortikoide auf einem niedrigen, basalen Niveau blieben, kann bei dem unterIDO-Blockade entstandenen Ergebnis von einem

indirekten Einfluss auf das Körpergewicht über Blockade der Glukokortikoidwirkung ausgegangen werden.

Neben diesem metabolischen Stresseffekt (Gewichtsabnahme) beeinflusst chronischer psychischer Stress auch das Verhalten von BALB/c-Mäusen^{20, 21, 67-69, 178}. Der Stress Severity Score (SSS) ist ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Instrument zur Bewertung stressbedingter Veränderungen der Kot- und Urinabgabe und des Verhaltens unmittelbar nach jeder einzelnen Stresssitzung^{20, 21, 178}. Gestresste Mäuse setzen im Immobilisations-Röhrchen Kot und Urin ab. Häufig zeigen sie eine Diarrhö. Neben einem schmutzigen und zerzausten Fell weisen die Tiere nach Absetzen in den Heimatkäfig einen verringerten Muskeltonus auf. Besonders eine Veränderung des Verhaltens der ansonsten lebhaften, sozialen Tiere fiel ins Auge: Gestresste BALB/c-Mäuse weisen Anzeichen eines depressionsähnlichen Verhaltens auf, gekennzeichnet durch Verminderung der lokomotorischen Aktivität, Verringerung sozialer Kontakte und Antriebsarmut bis hin zur Apathie^{20, 21, 86}.

Auch Cyclodextrin-behandelte, gestresste Mäuse zeigten einen erhöhten SSS. Durch die RU486-Behandlung konnte insbesondere das depressive Verhalten reduziert werden. Depressionsähnliches Verhalten kann als Folge einer verminderten Serotoninwirkung im zentralen Nervensystem entstehen^{132, 134, 135}. Ist die verfügbare Serotoninmenge oder die Signalübertragung am Serotoninrezeptor, dem 5-HT_{1A}-Rezeptor, verringert oder gestört, kann es zu Depressionen kommen. In dieser Hinsicht ist es wichtig zu betonen, dass chronisch erhöhte Glukokortikoidkonzentrationen zur Aktivierung der TDO in der Leber führen, wodurch weniger Tryptophan für den Umbau zu Serotonin zur Verfügung steht und dass GC die Tryptophan-Hydroxylase hemmen, welche Tryptophan zu Serotonin abbaut^{45, 136}. Durch diese Effekte bewirken GC eine Herabsetzung der verfügbaren Serotoninmenge. Außerdem inhibieren GC die Transkription des 5-HT_{1A}-Rezeptorgens⁷⁰⁻⁷². Dies führt zu einer Reduktion der Rezeptorexpression an der Zelloberfläche, z. B. im Hippocampus¹⁹². Auf diesem Wege können erhöhte GC-Konzentrationen die Entwicklung einer Depression fördern, was in dem chronischen Stressmodell unserer Arbeitsgruppe sehr wahrscheinlich ist, aber in weiteren Untersuchungen noch genauer charakterisiert werden muss. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die stressinduzierte Verhaltensänderung durch RU486 vermindert werden konnte. Wurde die Signalübertragung des GR

unterbrochen, entstand im Stress kein depressives Verhalten. Das verbesserte Fellpflegeverhalten trat wahrscheinlich als Folge verminderter depressiver Störungen auf: RU486-behandelte Mäuse waren aktiver und widmeten sich deshalb auch stärker der Fellpflege.

Auch durch 1-MT-Behandlung konnte der SSS gestresster Mäuse vermindert werden, was ebenfalls auf eine Verringerung des depressionsähnlichen Verhaltens zurückzuführen war ⁸⁶. Für dieses Phänomen gibt es drei mögliche Ursachen: Da IDO blockiert war, konnte Tryptophan zu Serotonin statt über den Kynureninweg verstoffwechselt werden, so dass eine Depression durch ein höheres Angebot an Serotonin verhindert wurde. Zudem ist zu vermuten, dass depressionsinduzierende neurotoxische Eigenschaften der Kynurenine ausblieben. Möglicherweise hatte zusätzlich die niedrigere Kortikosteronkonzentration im Plasma 1-MT-behandelter, gestresster Mäuse einen Einfluss auf die Serotoninsignaltransduktion (s. o.).

Weiterhin wurde die erhöhte ACTH-induzierte GC-Ausschüttung gestresster Mäuse im ACTH-Test sowohl durch RU486- als auch durch 1-MT-Therapie reduziert. Neuere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass IDO-knockout-Mäuse ebenfalls nicht adäquat auf den ACTH-Reiz reagieren (unveröffentlichte Daten), was die oben genannte Hypothese stützt. Als Reaktion auf die externe ACTH-Zuführung wiesen RU486-behandelte, gestresste Mäuse einen weniger starken Kortikosteronanstieg im Plasma auf als gestresste Kontrolltiere. Anscheinend haben Glukokortikoide also eine positive Wirkung auf die Erhöhung der ACTH-Sensitivität der Zona fasciculata. Zurückgeführt werden könnte diese Beobachtung auf die durch GC vermittelte Feedback-Inhibition der CRH- und ACTH-Produktion in Hypothalamus und Hypophyse ^{30, 32, 40-42, 186 (Abstrakt)}. An dieser Stelle lässt sich die Hypothese aufstellen, dass durch diese Feedbackinhibition weniger ACTH im Kreislaufsystem gestresster Tiere zirkuliert, woraufhin spezifische G-Protein-gekoppelte ACTH-Rezeptoren, die Melanocortin₂-Rezeptoren, auf Zellen der Nebennierenrinde möglicherweise verstärkt exprimiert werden, um die wenigen verfügbaren ACTH-Peptide optimal abfangen zu können. Vermutlich wurden auch mehr Komponenten der Signaltransduktion des ACTH-Rezeptors in diesen Zellen produziert, wodurch diese schneller ablaufen kann. Zur Klärung der Ursachen müssten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Bei Mäusen unter 1-MT-Behandlung ist eine Hemmung der HPA-Achsenaktivität über das negative GC-Feedback allerdings unwahrscheinlich, da sie normale basale Plasma-Kortikosteronkonzentrationen und

unter Stress keine erniedrigten ACTH-Spiegel im Plasma zeigen (unveröffentlichte Daten).

Herausragend an der Verminderung der ACTH-Sensitivität durch 1-MT-Behandlung während chronischen psychischen Stresses war, dass sie eine mögliche Erklärung für die Verhinderung des stressbedingten Glukokortikoidanstiegs bei diesen Mäusen sein könnte (unveröffentlichte Daten). Ist die Reaktionsfähigkeit der Zellen der Zona fasciculata auf ACTH herabgesetzt, werden auch weniger Glukokortikoide produziert und ausgeschüttet, da der adäquate Reiz fehlt oder vermindert ist. Bisher ist noch nicht geklärt, wie die IDO-Aktivität mit der ACTH-Sensitivität der Nebenniere zusammenhängt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die stressbedingte Gewichtsabnahme und das depressionsähnliche Verhalten chronisch gestresster Mäuse sicher auf Glukokortikoidwirkungen zurückzuführen sind. Wie RU486- und 1-MT-Behandlung die ACTH-Sensitivität regulieren, wurde bisher noch nicht nachgewiesen und bedarf weiterer detaillierter Untersuchungen.

6.2.2 RU486-sensitive Stresseffekte

Neben der Beeinflussung metabolischer Funktionen und dem Verhalten bewirken GC auch eine starke Modulation der Immunantwort. Chronisch gestresste Mäuse zeigten in vielen Untersuchungen eine systemische Immunsuppression^{20, 21, 39, 47, 85}, die partiell durch RU486-Behandlung inhibiert werden konnte. Wir konnten zeigen, dass diese chronischen Stresskonsequenzen, die Verminderung der Thymuskortexbreite und die Leukozytopenie, ausschließlich GC-vermittelt sind: Unter IDO-Blockade im chronischen Stress wurde weder die Leuko- und Lymphozytopenie noch die Thymuskortexinvolution aufgehoben oder reduziert.

In unserer Arbeitsgruppe werden durch chronischen psychischen Stress ausgelöste Lymphozyten-Apoptosen im Thymus und in der Milz beobachtet, außerdem fällt im Blutkreislauf eine Lymphozytopenie, aus welcher eine Leukozytopenie resultiert, auf^{21, 86}. Die Thymuskortexbreite gestresster Mäuse ist verringert²¹. Ebenso zeigten Engler et al. in Ratten, die sozialem Stress unterzogen wurden, indem diese zur Unterwürfigkeit gegenüber dominanten Tieren gezwungen wurden, eine verminderte Thymusmasse, eine Thymusatrophie und eine verminderte Zellzahl im Thymus, einhergehend mit einer erhöhten Apoptoserate im Thymus gestresster Tiere⁷⁴.

Millán et al. beschreiben ein reduziertes Gewicht von Milz und Thymus sowie eine verminderte Zellzahl in diesen beiden Organen in chronisch gestressten Ratten. Auch die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im peripheren Blut war verringert¹⁶. Als Ursache für die Leuko- und Lymphozytopenie nach chronischem psychischem Stress kommt zum Einen die Umverteilung der Immunzellen in periphere Gewebe, zum Anderen eine Apoptose dieser Zellen in Frage. Die Verminderung der Thymuskortexbreite gestresster, Cyclodextrin-behandelter Mäuse resultierte sehr wahrscheinlich aus den stressvermittelten Apoptosen der Thymozyten. Durch chronischen psychischen Stress wird die Zellzahl des Organs drastisch erniedrigt, wodurch eine Beteiligung dieses Zellverlusts an der Entwicklung einer Immunsuppression sehr gut möglich ist^{20, 21, 74, 86}. Durch die lange Dauer der chronischen Stressexposition von 4,5 Tagen in unseren Experimenten mit systemisch erhöhten GC und die zuvor in anderen Experimenten parallel beobachteten Apoptosen von Lymphozyten in Milz und Thymus ist die Hypothese zulässig, dass die im chronischen Stress auftretende Lymphozytopenie im peripheren Blut eine Folge des programmierten Zelltods in lymphozytären Organen ist.

Die im Stress vermehrt ausgeschütteten GC haben ein hohes proapoptotisches Potenzial. Sie bewirken den programmierten Zelltod über verstärkte Expression proapoptotischer Mitglieder (z. B. Bax) der Bcl-2(B cell leukemia/lymphoma 2-like proteins)-Proteinfamilie. Bax führt dazu, dass Cytochrom c aus Mitochondrien abgegeben wird und Caspasen aktiviert, welche dann den Zelltod einleiten¹⁹³⁻¹⁹⁵. Die Produktion antiapoptotischer Mitglieder der Bcl-2-Familie dagegen wird durch GC geblockt¹⁹⁶. Sowohl die Verminderung der Thymuskortexbreite als auch die Lymphozytopenie konnten durch die Blockade der GR bei chronisch gestressten Mäusen reduziert bzw. verhindert werden, was die Schlussfolgerung erlaubt, dass diese Effekte auf GC-Wirkungen zurückzuführen sind. DurchIDO-Blockade konnte, wie bereits erwähnt, weder die Lymphozytopenie noch die Thymuskortexinvolution beeinflusst werden (unveröffentlichte Daten). Bei der Vermittlung der Apoptose immunkompetenter Zellen müssen also ausschließlich GC beteiligt sein, IDO oder eine Regulation der HPA-Achse durch Tryptophan-Kataboliten scheinen in diesem Fall keine Rolle zu spielen.

Im Gegensatz zur Lymphozytopenie durch GC-vermittelte Apoptose nach chronischem Stress scheint der Verlust von Leukozyten im peripheren Blut akut

gestresster Mäuse durch andere Mechanismen vermittelt zu sein. Die auf akuten Stress folgende Leuko- und Lymphozytopenie war innerhalb von 12 Stunden aufgehoben und ist daher vermutlich durch eine Umverteilung immunkompetenter Zellen aus dem Blutkreislauf in peripheres Gewebe zu erklären. Dhabhar et al. beschreiben eine stressbedingte Zellmigration⁷³ an einen Ort der Immunaktivierung¹⁷, insbesondere in die Haut und lokale Lymphknoten, um ein eindringendes Pathogen dort unmittelbar immunologisch bekämpfen zu können^{12, 16}. Dieser Stresseffekt wurde durch die GR-Blockade durch RU486 nicht verhindert. Auch waren die Glukokortikoidspiegel gestresster, RU486-behandelter Mäuse auf Normalniveau. Für die Vermittlung müssen daher andere Mediatoren maßgeblicher als Glukokortikoide verantwortlich sein. Katecholamine wie Adrenalin und Noradrenalin, die nach akutem Stress erhöht sind, spielen möglicherweise eine Rolle bei der stressbedingten Zellmigration. So konnten Engler et al. die nach einer 24-stündigen Stresssitzung bei Ratten auftretende Lymphozytopenie durch die Blockade alpha-adrenerger Rezeptoren reduzieren¹⁹⁷.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die nach chronischem psychischem Stress beobachtete Leuko- und Lymphozytopenie und die Verminderung der Thymuskortexbreite glukokortikoidinduziert sind, an der Vermittlung der im akuten Stress beobachteten Leuko- und Lymphozytopenie jedoch andere Faktoren beteiligt sein müssen.

6.3 Die stressbedingte Verstärkung der bakteriellen Dissemination ist IDO-vermittelt

Chronischer psychischer Stress führt, wie bereits erwähnt, zu einem immunsupprimierten Status des Organismus²⁰⁻²⁶. Dies bewirkt, dass Pathogene, für deren Bekämpfung eine TH1-Antwort des Immunsystems vonnöten ist, schlechter abgewehrt werden können. Nach einer experimentellen *E. coli*-Infektion wiesen gestresste weibliche BALB/c-Mäuse in früheren Experimenten eine erhöhte Dissemination der Keime in unterschiedliche Organe, z. B. die Peritonealhöhle, die Leber und das Blut, auf²¹.

Hier ist gezeigt, dass die Blockade von Glukokortikoidrezeptoren durch RU486 die stressbedingte verstärkte Ausbreitung der Pathogene nach experimenteller *E. coli*-Infektion im Blut nicht verhinderte. Dieses Ergebnis ist überraschend, da GC meist

als Ursache der im chronischen Stress beobachteten Immunparalyse gesehen werden^{20, 21, 39, 47, 85}. Rojas et al. beschreiben eine durch RU486 verbesserte antibakterielle Abwehr: Nach chronischem Immobilisationsstress und der Infektion einer Hautwunde mit *Streptococcus* der Gruppe G wiesen gestresste, unbehandelte Mäuse ein größeres Wachstum opportunistischer Bakterien auf als gestresste, RU486-behandelte Tiere⁸⁵. Anscheinend sind die Wirkungen der GC auch im chronischen Stress nicht nur immunsuppressiv, sondern unterstützen das Immunsystem bei der Bekämpfung von Bakterien, eventuell durch Bereitstellung von Glukose zur Energieproduktion oder durch Erhöhung der Synthese und Ausschüttung von Chemokinen, welche die Migration immunkompetenter Zellen an den Ort der Infektion ermöglichen. Dhabhar et al. konnten im Gegensatz zu meinen Ergebnissen nur bei akut, nicht bei chronisch gestressten Ratten nachweisen, dass erhöhte GC eine Immunantwort in der Haut (delayed type hypersensitivity-Modell) verstärken können¹². Allerdings betrug die Dauer des dort durchgeführten chronischen Stressmodells mindestens drei Wochen, in unserer Arbeitsgruppe werden Mäuse nur viereinhalb Tage lang gestresst. Diese Zeitdifferenz könnte ein Grund für unterschiedliche Ergebnisse sein.

Im Gegensatz zu den chronischen Stressexperimenten unter RU486-Therapie konnte eine 1-MT-Behandlung die *E. coli*-Ausbreitung im Körper gestresster Mäuse stoppen: Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass eine 1-MT-Behandlung gestresster Mäuse zu Keimzahlen in Blut, Leber und Milz führte, die denen ungestresster Mäuse vergleichbar waren⁸⁶. Diese Beobachtung wurde durch ein weiteres Ergebnis unterstützt: AuchIDO-knockout-Mäuse zeigten eine verringerte stressinduzierte bakterielle Dissemination im Blut (unveröffentlichte Daten). Ein verstärkter Tryptophan-Katabolismus nach chronischem psychischem Stress ist folglich eine wichtige Komponente für eine erhöhte Ausbreitung der Erreger. Auch dieses Ergebnis ist kontrovers zu diskutieren, da gezeigt wurde, dassIDO-Aktivität über antibakterielle Kompetenzen verfügt^{87, 88 (Reviews), 198 (Abstrakt)}.

In unserem Versuchsaufbau jedoch waren die immunsupprimierenden Eigenschaften vonIDO¹²⁸⁻¹³¹ nach chronischem Stress anscheinend stärker als die antibakteriellen Mechanismen mittels Tryptophan-Depletion. Genau wie die Bakterien benötigen Zellen des eukaryoten Organismus Tryptophan zum Überleben. Zellen des Immunsystems haben eine hohe Stoffwechselrate und sind daher äußerst anfällig für einen Tryptophanmangel, wie er durchIDO-Aktivität entsteht^{96, 123-127}. Wie in der

Einleitung beschrieben, haben Kynurenine, die bei erhöhter IDO-Aktivität entstehen, toxische Eigenschaften auf aktivierte T-Lymphozyten^{92, 96, 122}. Ohne T-Lymphozyten und eine durch sie eingeleitete TH1-Antwort des Immunsystems gestresster Mäuse kann keine Bekämpfung der Pathogene erfolgen. Zudem liefern Versuche unserer Arbeitsgruppe Hinweise darauf, dass 1-MT-Behandlung die stressbedingte Erhöhung der *ex vivo*-Induzierbarkeit des antiinflammatorischen Zytokins IL10 verhindert, wodurch die antibakterielle Abwehr dieser Mäuse im Gegensatz zu unbehandelten Mäusen nicht gehemmt war. Die Ergebnisse der RU486- und der 1-MT-Behandlung zeigen, dass verstärkter Tryptophan-Katabolismus nach chronischem psychischem Stress die Bekämpfung von *E. coli*-Bakterien reduziert und IDO-Funktionen somit im Gegensatz zu Glukokortikoid-induzierten immunsuppressiven Effekten für die antibakterielle Abwehr von größter Bedeutung sind.

6.4 Die stressbedingte Hyperplasie der Nebennierenrinde ist weder Glukokortikoid- noch IDO-beeinflusst

Einhergehend mit erhöhter HPA-Achsenaktivierung kann im chronischen Stress häufig eine Hyperplasie und Hypertrophie der Zellen der Zona fasciculata in der Nebennierenrinde festgestellt werden^{21, 55, 86}. Dabei findet man in der äußeren Schicht der Zona fasciculata eher hyperplastische, in der inneren Schicht eher hypertrophe Veränderungen⁵⁵. Gestresste Mäuse wiesen in den früher und in den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten unabhängig von der Behandlung (1-MT oder RU486) eine signifikante Verbreiterung der Nebennierenrinde bzw. der Zona fasciculata auf. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass weder Glukokortikoide noch IDO-Aktivität maßgeblich an dieser Verbreiterung der Nebennierenrinde beteiligt sind. Der Reiz zur Hyperplasie und Hypertrophie kommt vermutlich vielmehr von anderen Mediatoren, deren Sekretion stressbedingt verstärkt wurde. So wird ACTH, N-terminalen Proopiomelanocortin-Peptiden und der nervalen Innervation der Nebenniere eine wachstumsfördernde Wirkung auf die Zona fasciculata zugeschrieben^{55, 192, 199, 200}.

Die Hyperplasie der Zona fasciculata kann auch ein Grund für die erhöhte Kortikosteronausschüttung chronisch gestresster Mäuse im ACTH-Test sein²⁰¹.

6.5 Glukokortikoide haben keinen Einfluss auf erhöhte IDO-Aktivität nach chronischem psychischem Stress

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde entdeckt, dass die durch akuten und chronischen psychischen Stress erhöhte IDO-Aktivität zu einem verstärkten Indolaminstoffwechsel im Plasma der Mäuse führt. Dabei wurden direkt nach akutem Stress ein Absinken der Tryptophan- und nach 12 Stunden ein Anstieg der Kynureninkonzentration beobachtet. Direkt nach chronischem Stress zeigten weibliche BALB/c-Mäuse neben dem Abfall der Tryptophan- auch erniedrigte Serotoninkonzentrationen sowie einen Anstieg der Quinolinsäurekonzentrationen und des Kyn-Trp-Quotienten ⁸⁶.

Durch IDO-Blockade mittels 1-MT wurde die stressbedingte Verstärkung des Tryptophanumbaus, wie zu erwarten war, vermindert ⁸⁶: Tryptophan- und Serotoninkonzentrationen im Plasma blieben auf dem Niveau unbehauelter, ungestresster Mäuse. Paradoxiweise blieb der Kynureninsäurespiegel trotz IDO-Blockade hoch, was möglicherweise auf die ausgleichende TDO-Funktion zurückzuführen ist. Wie bereits mehrfach erwähnt, hemmt IDO-Blockade die stressbedingte Erhöhung der GC-Ausschüttung. Glukokortikoide wiederum tragen, wie bereits veröffentlicht wurde, zu einer Erhöhung der IDO-Aktivität bei: Einige Arbeitsgruppen fanden heraus, dass Glukokortikoide (Dexamethason) *in vitro* an einer IDO-Aktivierung beteiligt sind ^{113, 115}. Türck et al. zeigten, dass Dexamethason die IDO-induzierende Wirkung von IFN γ synergistisch steigert ¹¹⁵. Laut Grohmann et al. sind GC in der Lage, den Glukokortikoid-induzierten TNF-Rezeptor (GITR) auf dendritischen Zellen hochzuregulieren, wodurch IDO über einen alternativen NF- κ B-Weg induziert wird ¹¹³.

Durch RU486-Behandlung sollte herausgefunden werden, ob Glukokortikoide auch *in vivo* einen Einfluss auf die IDO-Aktivierung entwickeln können. Bei unbehauelten, gestressten Mäusen war in früheren Experimenten im Plasma eine Induktion des Tryptophankatabolismus zu beobachten. Nach chronischem psychischem Stress zeigten Mäuse mit Cyclodextrin-Injektionen jedoch keine Hinweise auf erhöhte IDO-Aktivität. Als hypothetische Ursache kam auch hier ein überlagernder Effekt durch den Stress der Injektion in Frage, da die Konzentrationen der Indolamine im Plasma Cyclodextrin-behandelter über dem Spiegel unbehauelter Tiere liegen. Im Gegensatz zu diesen im Winter durchgeführten Experimenten zeigten chronisch

gestresste Cyclodextrin-behandelte Mäuse jedoch in einem weiteren Versuch im Sommer, genau wie gestresste unbehandelte Tiere, überraschenderweise Anzeichen einer erhöhten IDO-Aktivität. Möglicherweise reagieren die Mäuse im Winter stärker auf den Spritzstress, so dass dieser den Effekt des chronischen Stressmodells überlagerte. Bei der Suche nach Ursachen für diese inkongruenten Ergebnisse fiel letztlich auf, dass die Experimente in unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt wurden. Die ersten Versuche fanden im Winter/Frühling statt, dagegen wurde das Experiment, bei dem stressbedingte Veränderungen gesehen wurden, im Sommer durchgeführt. Jahreszeitliche Unterschiede bei der Reaktion des Organismus auf Stress wurden bereits von unserer Arbeitsgruppe beschrieben²². Dabei wurde jedoch eine Intensitätsabnahme der Stresseffekte im Sommer gezeigt, was gegensätzlich zu den hier beobachteten Unterschieden ist. Sieht man allerdings die mehrfachen Injektionen auch als Stress an, liegt die Annahme nahe, dass nicht chronisch gestresste Mäuse im Winter stärker auf den Spritzstress reagierten und dadurch ein möglicher durch das chronische Stressmodell hervorgerufener Unterschied im Indolamin-Stoffwechsel maskiert wurde. Der Grund für die inkonsistenten Daten des Indolaminstoffwechsels Cyclodextrin-behandelter Mäuse ist also bisher unklar und verlangt weitere Untersuchungen.

Die als Kontrollen fungierenden Cyclodextrin-behandelten Tiere lieferten bei verschiedenen Experimenten (Winter bzw. Sommer) mit gleicher Versuchsanordnung unterschiedliche Ergebnisse, somit konnten die Resultate dieser Experimente aufgrund uneinheitlicher Reaktionen der Kontrollgruppen nicht zur Analyse etwaiger RU486-Effekte auf den Indolaminstoffwechsel im chronischen Stress herangezogen werden.

Ein erhöhter Tryptophan-Abbau wurde in früheren Experimenten auch im Plasma akut gestresster Mäuse beobachtet: Über einen kurzen Zeitraum sank die Tryptophankonzentration im Plasma gestresster Mäuse ab, Kynurenine jedoch stiegen an⁸⁶. Cyclodextrin-behandelte Mäuse wiesen direkt nach akutem Stress tendenzielle, RU486-behandelte Tiere signifikante Anzeichen eines verstärkten Indolaminstoffwechsels auf. Als Grund für die unter GR-Blockade gegenüber Kontroll-behandelten Mäusen leicht erhöhte IDO-Aktivität kommen folgende Überlegungen in Frage: Wie bereits beschrieben, haben GC hyperkatabole Effekte, die im weiteren Verlauf des Stressmodells sogar zur Gewichtsabnahme führen. Dieser glukokortikoidinduzierte Hyperkatabolismus benötigt viel Energie, welche aus

NAD⁺ bzw. ATP gewonnen werden kann. Tiere mit GR-Blockade zeigten erniedrigte GC-Spiegel nach akutem Stress und (nach chronischem Stress) keine Symptome eines Hyperkatabolismus. Dadurch setzten diese Mäuse möglicherweise auch weniger Energie in Form von NAD⁺ um als die Cyclodextrin-behandelten Tiere, so dass es zu einem Rückstau der Kynurenine kam, da das Endprodukt (NAD⁺) nicht verbraucht wurde.

Möglicherweise führte aber auch der fehlende stressbedingte GC-Anstieg RU486-behandelter Tiere zu der leicht erhöhten IDO-Aktivität: Wenn IDO bzw. IDO-Produkte wirklich an der GC-Produktion in der Nebenniere beteiligt sind, wie es die Ergebnisse der 1-MT-Ergebnisse (erniedrigte Kortikosteronspiegel nach 1-MT-Gabe im Stress) vermuten lassen, könnte die IDO-Aktivität kompensatorisch erhöht worden sein, um einen physiologischen GC-Anstieg im akuten Stress in RU486-behandelten Mäusen zu ermöglichen.

Auch in diesem Fall könnte der bereits mehrfach erwähnte Spritzstress die Ergebnisse der Kontrollgruppen durch die signifikante Erhöhung der Glukokortikoidspiegel nicht gestresster, Cyclodextrin-behandelter Mäuse verfälscht haben. Des Weiteren könnte die RU486-Behandlung die Auswirkungen des Spritzeffekts reduziert haben, so dass diese Mäuse, vorausgesetzt, RU486 verändert den Indolaminstoffwechsel nicht, physiologische Stresseffekte zeigten. Die Ursache der unterschiedlich starken IDO-Aktivität RU486- und Kontroll-behandelter Mäuse direkt nach akutem Stress ist noch nicht geklärt.

Abschließend lässt sich durch die Spritzstress- und die saisonale Problematik keine klare Aussage über eine GC-Beteiligung bei der stressinduzierten IDO-Aktivierung treffen.

6.6 (Tabellarische) Zusammenfassung der Behandlungseffekte

Tabelle 6.1 Vergleich der Beeinflussung chronischer Stresskonsequenzen durch RU486- und 1-MT-Behandlung.

Analyten im chronischen psychischen Stressmodell	Stresseffekt	Wirkung von RU486	Wirkung von 1-MT
Körpergewicht	↓	+	(+)
Depressionsähnliches Verhalten	↑	(+)	(+)
Anzahl der Leuko- und Lymphozyten	↓	+	0
Dicke des Thymuskortex	↓	(+)	0
Dicke der Nebennierenrinde	↑	0	0
ACTH-Sensitivität	↑	(+)	+
antibakterielle Abwehr (<i>E. coli</i> Infektion)	↓	0	(+)

0 = keine Wirkung (+) = Abschwächung des Stresseffektes + = Verhinderung des Stresseffektes

Nach Abschluss der Experimente ist deutlich geworden, dass Glukokortikoide bei der Vermittlung einiger Stresseffekte maßgeblich, bei anderen höchstens am Rande beteiligt sind. Gewichtsabnahme, depressives Verhalten, Leuko- und Lymphozytopenie, Thymuskortexinvolution und ACTH-Sensitivitätserhöhung, wie sie nach chronischem Stress in weiblichen BALB/c-Mäusen zu beobachten waren, werden durch GC-induzierte Mechanismen hervorgerufen. Bei der im chronischen Stress erhöhten Ausbreitung von *E. coli* nach einer experimentellen Infektion und der Nebennierenrinden-Hyperplasie müssen andere Faktoren eine größere Rolle spielen. Die Bekämpfung einer experimentellen Infektion konnte durchIDO-Blockade im chronischen Stress verbessert werden, so dass vermutlich immunsupprimierende Eigenschaften derIDO bei der Vermittlung dieses Stresseffektes im Vordergrund stehen. Die nach akutem Stress beobachtete Leuko- und Lymphozytopenie scheint eher auf Katecholamin- als auf GC-Effekte zurückzuführen zu sein.

Eine sehr wichtige Schlussfolgerung dieser Arbeit ist allerdings auch, dass jegliche Interventions-Behandlungen vor Planung eines Experiments gründlich überdacht werden müssen.

7. Zusammenfassung

1. Chronischer psychischer Stress, der in einem Modell aus kombiniertem Immobilisations- und akustischem Stress realisiert wurde, führt bei weiblichen BALB/c-Mäusen zu einem Anstieg der Plasma-Kortikosteronkonzentration, Immunsuppression und depressionsähnlichem Verhalten.
Eine durch chronischen psychischen Stress verursachte Darmbarrierestörung ruft über die Translokation bakterieller Produkte eine systemischeIDO-Aktivierung hervor. Frühere Experimente zeigen, dass IDO-Hemmung durch 1-MT die stressinduzierte Immunsuppression und das depressive Verhalten, aber auch den Glukokortikoidanstieg im Plasma der Mäuse verhindert.
2. Zur Klärung der Frage, welche Stresseffekte auf Glukokortikoide und welche auf eine IDO-Aktivierung zurückzuführen sind, wurde weiblichen BALB/c-Mäusen während chronischer Stressexposition der Glukokortikoidrezeptorblocker RU486 injiziert und die Wirkungen von RU486 denen von 1-MT in ausgewählten Read-out-Systemen gegenübergestellt.
3. Bei der Etablierung der Interventionsbehandlung mit RU486 tauchten schwerwiegende Probleme auf: Die tägliche Injektion des Medikaments führte zu einer Modifizierung der HPA-Achsenaktivität nicht gestresster Mäuse im Vergleich zu nicht behandelten, ungestressten Tieren. Außerdem wurde deutlich, dass die Wahl des Lösungsmittels einen Einfluss auf die Ergebnisse hatte. Jede Manipulation an Versuchstieren ist folglich ein ernstzunehmender Störfaktor in Tiermodellen.
4. Die Ergebnisse dieses Mausmodells wurden nach der Wirksamkeit der Inhibitoren 1-MT und RU486 in drei Blöcke eingeteilt:
Stresseffekte, die sowohl durch 1-MT als auch durch RU486 in ähnlicher Weise beeinflusst wurden, sind durch einen HPA-Achsen-vermittelten Glukokortikoidanstieg vermittelt. Dazu zählen die Gewichtsabnahme und depressionsähnliches Verhalten.
5. Ein Stresseffekt, der nur durch RU486, aber nicht durch 1-MT vermindert wurde, ist die durch chronischen Stress vermittelte Apoptose der Leukozyten im Blutkreislauf und der Thymozyten. Dieser Zellverlust ist unabhängig von IDO-Aktivität ausschließlich Glukokortikoid-vermittelt.

6. Überraschenderweise konnte die stressbedingt verminderte Fähigkeit zur Bekämpfung einer experimentellen Infektion ausschließlich durch 1-MT-Behandlung wieder hergestellt werden. Tryptophanmangel und Kynurenine beeinträchtigen die bakterielle Abwehr folglich stärker als Glukokortikoide.
7. Ob Glukokortikoide ihrerseits einen Einfluss auf die IDO-Aktivität haben, konnte nicht abschließend geklärt werden.

8. Literaturverzeichnis

- 1) Johnson, E. O., Kamilaris, T. C., Chrousos, G. P., Gold, P. W.
Mechanisms of Stress: A Dynamic Overview of Hormonal and Behavioral Homeostasis
Neuroscience and Biobehavioral Reviews, Vol. 16, pp. 115-130, 1992
- 2) Ader, R., Cohen, N.
Psychoneuroimmunology: conditioning and stress
Annu. Rev. Psychol. 1993, 44:53-85
- 3) Selye, H.
A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936.
J Neuropsychiatry Clin Neurosci. 1998 Spring;10(2):230-1.
- 4) Selye, H.
The general adaptation syndrome and the disease of adaptation.
Practitioner (1949) 163: 393-405.
- 5) Wrona, D.
Neuronal-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between
the brain and immune systems.
J Neuroimmunol 2005; online.
- 6) McEwen, B. S.
Protection and Damage from Acute and Chronic Stress. Allostasis and Allostatic
Overload and Relevance to the Pathophysiology of Psychiatric Disorders.
Ann N Y Acad Sci (2004) 1032: 1-7
- 7) de Kloet, E. R.
Hormones, brain and stress.
Endoc Reg 2003; **37**: 51-68.
- 8) McEwen, B. S.
The end of stress as we know it.
Washington, D.C., Nat Acad Press 2002.
- 9) Tsigos, C., Chrousos, G.P.
Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress
Journal of Psychosomatic Research 53 (2002) 865- 871
- 10) Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D.C.,
Cullinan W. E.
Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-
pituitary-adrenocortical responsiveness.
Front Neuroendocrinol. (2003) 24(3):151-80
- 11) Wilder, R. L.
Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity
Annu. Rev. Immunol (1995) 13:307-38
- 12) Dhabhar, F. S., McEwen, B. S.
Acute Stress Enhances while Chronic Stress Suppresses Cell-Mediated Immunity in Vivo: A
Potential Role for Leukocyte Trafficking
Brain, Behavior, and Immunity 11, 286-306 (1997)
- 13) Teague, C. R., Dhabhar, F. S., Barton, R. H., Beckwith-Hall, B., Powell, J., Cobain, M., Singer,
B., McEwen, B. S., Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E.
Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in
Sprague-Dawley Rats
Journal of proteome research 6 (2007) 2080-2093

- 14) McEwen, B. S.
Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders.
Ann N Y Acad Sci. 2004 Dec;1032:1-7.
- 15) Millán, S., Gonzalez-Quijano, M.I., Giordano, M., Soto, L., Martín, A.I., Lopez-Calderon, A.
Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions
Life Sci. 59 (1996), 1431–1442
- 16) Dhabhar, F.S., McEwen, B.J.
Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999), 1059– 1064
- 17) Viswanathan, K., Dhabhar, F. S.
Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Apr 19;102(16):5808-13.
- 18) Bohus, B., de Kloet, E. R., Veldhuis, H.D.
Adrenal steroid and behavioral adaptation: relationship to brain corticoid receptors.
In: Ganten, D., Pfaff, D. (Hrsg.), *Adrenal Action on Brain*, Springer, Berlin (1982), pp. 107–148.
- 19) Silberman, D. M., Wald, M. R., Genaro, A. M.
Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity
Journal of Neuroimmunology 144, 53-60, 2003
- 20) Kiank, C., Entleutner, M., Füll, B., Westerholt, A., Heidecke, C.-D., Schütt, C.
Stress-induced immune conditioning affects the course of experimental peritonitis
Shock 27, 3, 305-311, 2007
- 21) Kiank, C., Holtfreter, B., Starke, A., Mundt, A., Wilke, C., Schütt, C.
Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice
Brain, Behavior, and Immunity 20 (2006) 359–368
- 22) Kiank, C., Koerner, P., Keßler, W., Traeger, T., Maier, S., Heidecke, C.-D., Schuett, C.
Seasonal variations in inflammatory responses to sepsis and stress in mice
Crit Care Med 2007; 35 (10):1-7
- 23) Freeman, M. L., Sheridan, B. S., Bonneau, R. H., Hendricks, R. L.
Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent *Herpes Simplex* type 1 infections.
J. Immunol. (2007) 179:322–328.
- 24) Goubout, J., Glaser, R.
Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer.
J. Neuroimmune. Pharmacol. (2006) 1:421–427.
- 25) Kiank, C., Daeschlein, G., Schuett, C.
Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in BALB/c mice
Brain, Behavior, and Immunity (2008) 22:1173–1177
- 26) Wilmore, D.W.
From cuthbertson to fast-track surgery: 70 years of progress in reducing stress in surgical patients.
Ann. Surg. (2002) 736:643–648.
- 27) Lundberg, U.
Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender.
Psychoneuroendocrinol (2005) 30:1017-1021

- 28) Mota, M., Pănuș, C., Mota, E., Lichiardopol, C., Vladu, D., Toma, E.
The metabolic syndrome--a multifaced disease.
Rom J Intern Med. 2004;42(2):247-55.
- 29) Jahng, J. W., Kim, N. Y., Ryu, V., Yoo, S. B., Kim, B.-T., Kang, D.-W., Lee, J.-H.
Dexamethasone reduces food intake, weight gain and the hypothalamic 5-HT concentration and increases plasma leptin in rats
European Journal of Pharmacology 581 (2008) 64–70
- 30) Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Iyengar, S., Ball, S. G., Russell, J.
Neurobiology of depression: an integrated view of key findings
Int J Clin Pract, December 2007, 61, 12, 2030–2040
- 31) Van Craenenbroeck, K., De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., Vanhoenacker, P., Haegeman, G.
Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders
Molecular and Cellular Endocrinology 245 (2005) 10-22
- 32) De Bosscher, K., Van Craenenbroeck, K., Meijer, O. C., Haegeman, G.
Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems
European Journal of Pharmacology 583 (2008) 290-302
- 33) Bernstein, D.
Cardiovascular and metabolic alterations in mice lacking beta1- and beta2-adrenergic receptors
Trends Cardiovasc Med. 2002 Oct;12(7):287-94
- 34) Straub, R. H., Grum, F., Strauch, U., Capellino, S., Bataille, F., Bleich, A., Falk, W., Schölmerich, J., Obermeier, F.
Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation
Gut. 2008 Jul;57(7):911-21
- 35) Yoshida, T., Sakane, N., Umekawa, T., Kondo, M.
Effect of Nicotine on Sympathetic Nervous System Activity of Mice Subjected to Immobilization Stress
Physiology & Behavior, Vol. 55, pp. 53-57, 1994
- 36) Abrass, C.K., O'Connor, S.W., Scarpace, P.J., Abrass, I.B.
Characterization of the β -adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage
J. Immunol. 135 2 (1985), pp. 1338–1341
- 37) Bishopric, N.H., Cohen, H.J., Lefkowitz, R.J.
 β -Adrenergic receptors in lymphocyte subpopulations
J. Allergy Clin. Immunol. 65 (1980), pp. 29–33
- 38) Rosati, C., Hannaert, P., Dausse, J., Braquet, P., Garay, R.
Stimulation of β -adrenoceptors inhibits calcium-dependent potassium-channels in mouse macrophages
J. Cell. Physiol. 129 (1986), pp. 310–314
- 39) Hans J. Hatz: Glucocorticoide: Immunologische Grundlagen, Pharmakologie und Therapierichtlinien, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1998
- 40) Gupta, S., Aslakson, E., Gurbaxani, B. M, Vernon, S. D.
Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability
Theoretical Biology and Medical Modelling 4, 8, 2007
- 41) Yu, S., Holsboer, F., Almeida, O. F.X.
Neuronal actions of glucocorticoids: Focus on depression
Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology 108, 300–309, 2008

- 42) Pace, T. W. W., Spencer, R. L.
Disruption of mineralocorticoid receptor function increases corticosterone responding to a mild, but not moderate, psychological stressor
Am J Physiol Endocrinol Metab 288: E1082–E1088, 2005
- 43) MacLulich, A. M., Seckl, J. R.
Diabetes and Cognitive Decline: Are Steroids the Missing Link?
Cell Metab. 2008 Apr;7(4):286-7
- 44) Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Cullinan, W. E.
Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness
Front Neuroendocrinol. 2003 Jul;24(3):151-80
- 45) Leonard, B. E.
HPA and Immune Axes in Stress: Involvement of the Serotonergic System
Neuroimmunomodulation 2006;13:268–276
- 46) Chrousos, G. P., Kino, T.
Glucocorticoid action networks and complex psychiatric and/or somatic disorders.
Stress 10 (2007), 213–219.
- 47) Zhang, D., Kishihara, K., Wang, B., Mizobe, K., Kubo, C., Nomoto, K.
Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of *Listeria monocytogenes*
Journal of Neuroimmunology 92, 139-151, 1998
- 48) Jarillo-Luna, A., Rivera-Aguilar, V., Reyna Garfias, H., Lara-Padilla, E., Kormanovsky, A., Campos-Rodríguez, R.
Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal IgA in mice
Psychoneuroendocrinology 32, 681-692, 2007
- 49) Caulfield, J., Fernandez, M., Snetkov, V., Lee, T., Hawrylowicz, C.
CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by Dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells
Immunology 105 (2002) 155-162
- 50) Almawi, W. Y., Beyhum, H. N., Rahme, A. A., Rieder, M. J .
Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids.
J Leukoc Biol. 1996;60(5):563-72.
- 51) Baumann, S., Dostert, A., Novac, N., Bauer, A., Schmid, W., Fas, S. C., Krueger, A., Heinzel, T., Kirchhoff, S., Schütz, G., Krammer, P. H.
Glucocorticoids inhibit activation-induced cell death (AICD) via direct DNA-dependent repression of the CD95 ligand gene by a glucocorticoid receptor dimer
Blood (American Society of Hematology) 2005 106: 617-625
- 52) Dhabhar, F. S.
Stress-induced augmentation of immune function – The role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines
Brain, Behavior, and Immunity 16 (2002) 785–798
- 53) Depke, M., Fusch, G., Domanska, G., Geffers, R., Völker, U., Schuett, C., Kiank, C.
Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice
Endocrinology 2008 Jun 149(6)
- 54) Gamallo, A., Villanua, A., Trancho, G., Fraile, A.
Stress adaptation and adrenal activity in isolated and crowded rats.
Physiol Behav 36: 217–221, 1986

- 55) Ulrich-Lai, Y. M., Figueiredo, H. F., Ostrander, M. M., Choi, D. C., Engeland, W. C., Herman, J. P.
Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner.
Am J Physiol Endocrinol Metab. 2006 Nov;291(5):E965-73.
- 56) Agarwal, M. K.
The antigluco-corticoid action of Mifepristone
Pharmacol. Ther. Vol. 70, No. 3, pp 183-213, 1996
- 57) Selye, H. (1947) *Textbook of Endocrinology.* University of Montreal, Montreal.
- 58) Selye, H. (1971) *Hormones and Resistance.* Springer Verlag, New York.
- 59) Selye, H.A.
The general adaptation syndrome and the adaptation diseases
Wien. Klin. Wochenschr. 64 (1952), pp. 781–783
- 60) Lin, Y.H., Liu, A. H., Xu, Y., Tie, L., Yu, H. M., Li, X. J..
Effect of chronic unpredictable mild stress on brain-pancreas relative protein in rat brain and pancreas.
Behav. Brain Res. 165 (2005) , 63–71.
- 61) Harris, R. B., Palmondon, J., Leshin, S., Flatt, W. P., Richard, D.
Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress.
Horm. Behav. 49 (2006), 615–625.
- 62) Makino, S., Asaba, K., Nishiyama, M., Hashimoto, K.,
Decreased type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mRNA expression in ventromedial hypothalamus during repeated immobilization stress.
Neuroendocrinology 70 (1999), 160–167.
- 63) Vanhorebeek, I., van den Berghe, G.
Hormonal and metabolic strategies to attenuate catabolism in critically ill patients.
Curr Opin Pharmacol 4 (2004):621-628
- 64) Morley, J. E., Thomas, D. R., Wilson, M. M.
Cachexia: pathophysiology and clinical relevance.
Am J Clin Nutr 83 (2006):735-743
- 65) Wray, C., Mammen, J., Hasselgren, P.
Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support.
Nutrition 18 (2002):971-977
- 66) McGuinness, O. P., Snowden, R. T., Moran, C., Neal, D. W., Fujiwara, T., Cherrington, A.D.
Impact of Acute Epinephrine Removal on Hepatic Glucose Metabolism During Stress Hormone Infusion.
Metabolism 48 (1999):910-914
- 67) Erhardt, A., Müller, M. B., Rödel, A., Welt, T., Ohl, F., Holsboer, F., Keck, M. E.
Consequences of chronic social stress on behaviour and vasopressin gene expression in the PVN of DBA/2OlaHsd mice--influence of treatment with the CRHR1-antagonist R121919/NBI 30775.
Journal of Psychopharmacology OnlineFirst 00(00) (2008) 1–9
- 68) Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E., Chrousos, G.P.
Pediatric stress: hormonal mediators and human development
Horm. Res. 59 (2003), pp. 161–179.

- 69) Weinstock, M.
The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring
Brain. Behav. Immun. 19 (2005), pp. 296–308.
- 70) Meijer, O.C., de Kloet, E.R.,
A role for the mineralocorticoid receptor in a rapid and transient suppression of hippocampal 5-HT_{1A} receptor mRNA by corticosterone.
J. Neuroendocrinol. 7 (1995), 653–657.
- 71) Chaouloff, F.
Serotonin, stress and corticoids.
J. Psychopharmacol. 14 (2000), 139–151.
- 72) Dinan, T.G.
Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function.
Life Sci. 58 (1996) 20, 1683–1694(12).
- 73) Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S., Spencer, R. I.
Stress-Induced Changes in Blood leukocyte Distribution
Role of Adrenal Steroid Hormones
The Journal of Immunology, 1996, 157: 1638-1644.
- 74) Engler, H., Stefanski, V.
Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function.
Psychoneuroendocrinology. 2003 Nov;28(8):951-69.
- 75) Wickens, T.
Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction.
Trends Pharmacol. Sci. 16 (1995): 193-197.
- 76) Arzt, E., Sauer, J., Pollmacher, T., Labeur, M., Holsboer, F., Reul, J. M. and Stalla, G. K.
Glucocorticoids suppress interleukin-1 receptor antagonist synthesis following induction by endotoxin.
Endocrinology 134 (1994): 672-677.
- 77) Breuninger, L. M., Dempsey, W. L., Uhl, J. and Murasko, D. M.
Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein produced by a purified population of human peripheral blood monocytes.
Clin. Immunol. Immunopathol. 69 (1993): 205-214.
- 78) Brouckaert, I., Liebert, C., Everaerd, B., Takahashi, N., Cauwels, A. and Fiers, W.
Tumor necrosis factor, its receptors and the connection with interleukin-1 and interleukin-6.
Immunobiology 187 (1993): 317-329.
- 79) Dobbs, C.M., Feng, N., Michael Beck, F. Sheridan, J.F.
Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection
J. Immunology 157 (1996): 1870-1877
- 80) Webster, J.I., Tonelli, L., Sternberg, E.M.
Neuroendocrine regulation of immunity.
Annu. Rev. Immunol. 20 (2002):, 125–163.
- 81) Elenkov, I.J.
Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance.
Ann. NY Acad. Sci. 1024 (2004): 138–146.
- 82) Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kaltschmidt, J. R., Gickonaitis, I.
Immunosuppressive effects of apoptotic cells.
Nature 390:350Y351, 1997.

- 83) Hotchkiss, R. S., Chang, K. C., Grayson, M. H., Tinsley, K. W., Dunne, B. S., Davis, C. G., Osborne, D. F., Karl, I. E.
Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis.
Proc Natl Acad Sci U S A 100:6724Y6729, 2003.
- 84) Le Tulzo, Y., Pangault, C., Gacouin, A., Guilloux, V., Tribut, O., Amiot, L., Tattevin, P., Thomas, R., Fauchet, R., Drenou, B.
Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome.
Shock 18:487Y494, 2002.
- 85) Rojas, I.-G., Padgett, D. A., Sheridan, J. F., Marucha, P. T.
Stress-Induced Susceptibility to Bacterial Infection During Cutaneous Wound Healing
Brain, Behaviour, and Immunity 16, 74-84, 2002
- 86) Kiank, C.
Immun- und verhaltensmodulatorische Effekte von psychischem Stress
Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Greifswald, 2006
- 87) Schröcksnadel, K., Wirleitner, B., Winkler, C., Fuchs, D.
Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation.
Clin Chim Acta. 2006 Feb;364(1-2):82-90. Review
- 88) Takikawa, O.
Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism.
Biochem Biophys Res Commun. 2005 Dec 9;338(1):12-9. Epub 2005 Sep 15. Review
- 89) Grant, R. S., Passey, R., Matanovic, G., Smythe, G., Kapoor, V.
Evidence for increased de novo synthesis of NAD in immune-activated RAW264.7 macrophages: a self-protective mechanism?
Archives of Biochemistry and Biophysics, Volume 372, Number 1, December 1999 , pp. 1-7(7)
- 90) Grohmann, U., Fallarino F., Puccetti P.
Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO
TRENDS in Immun., 2003
- 91) Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., Young, H. A.
Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation
J Immunol 2000;164: 3596–699
- 92) Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, C., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C., Puccetti, P.
T cell apoptosis by tryptophan catabolism.
Cell Death Differ. 2002;9(10):1069-77.
- 93) Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., 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. 2002; 196(4):459-68.
- 94) Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H., Mellor, A.L.
Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division.
Immunology 2002; 107(4):452-60
- 95) Schrotten, H., Spors, B., Hucke, C., Stins, M., Kim, K. S., Adam, R., Daubener, W.
Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of Staphylococcus aureus by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase.
Neuropediatrics. 2001; 32(4):206-10.

- 96) Terness, P., Bauer, T. M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., Opelz, G.
Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites.
J Exp Med. 2002; 196(4):447-57.
- 97) Saito, K., Nagamura, Y., Ohta, Y., Sasaki, E., Ishiguro, I.
Characterization of the L-tryptophan transport system in the liver of growing rats.
Life Sci. 1991; 49(7):527-34.
- 98) Schimke, R. T., Sweeney, E. W., Berlin, C. M.
The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrrolase.
J Biol Chem 240 (1965): 322–331
- 99) Knox, W. E.
The regulation of tryptophan pyrrolase activity by tryptophan.
Adv Enzyme Regul 4 (1966): 287–297
- 100) Ren, S., Correia, M. A.
Heme: a regulator of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase?
Arch Biochem Biophys 377 (2000): 195–203
- 101) Li, J. S., Han, Q., Fang, J., Rizzi, M., James, A. A., Li, J.
Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation.
Arch Insect Biochem Physiol. 2007 Feb;64(2):74-87.
- 102) Yoshida R, Imanishi J, Oku T, Kishida T, Hayaishi O.
Induction of pulmonary indoleamine (2,3)-dioxygenase by interferon.
Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78:129– 32.
- 103) G.J. Guillemin, B.J. Brew, C.E. Noonan, O. Takikawa, K.M. Cullen,
Indoleamine 2,3-dioxygenase and quinolinic acid immunoreactivity in Alzheimer's disease hippocampus
Neuropathol. Appl. Neurobiol. 31(2005) 395–404.
- 104) Du, M. X., Sotero-Esteva, W. D., Taylor, M. W.
Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma.
J Interferon Cytokine Res. 2000;20(2):133-42.
- 105) Yoshida, R., Imanishi, J., Oku, T., Kishida, T., Hayaishi, O.
Induction of pulmonary indoleamine (2,3)-dioxygenase by interferon
Proc Natl Acad Sci U S A 1981;78:129– 32.
- 106) Taylor, M. W., Feng, G. S.
Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism.
FASEB J 1991;5:2516– 22
- 107) Werner, E. R., Bitterlich, G., Fuchs, D., et al.
Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon gamma.
Life Sci 1987; 41: 273–80
- 108) Carlin, J. M., Borden, E. C., Sondel, P. M., Byrne, G. I.
Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes.
J. Leukoc Biol. 1989;45(1):29-34.
- 109) Currier, A. R., Ziegler, M. H., Riley, M. M., Babcock, T. A., Telbis, V. P., Carlin, J. M.
Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhances interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently.
J Interferon Cytokine Res. 2000; 20(4):369-76.

- 110) Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D. B., Mellor, A. L., Fioretti, M. C., Grohmann, U., Puccetti, P.
Functional expression of indolamine 2,3- dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells.
Int. Immunol. 2002;14(1):65-8.
- 111) Robinson, C. M., Shire, K. A., Carlin, J. M.
Synergistic transcriptional activation of indolamine dioxygenase by IFNgamma and tumor necrosis factor-alpha.
J. Interferon Cytokine Res. 2003; 23(8):413-21.
- 112) Miura H, Ozaki N, Shirokawa T, Isobe K
Changes in brain tryptophan metabolism elicited by ageing, social environment, and psychological stress in mice.
Stress. 2008 Jun;11(2):160-9.
- 113) 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., Puccetti, P.
Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy.
Nat Med. 2007; 13(5):579-86.
- 114) 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(10):817-23.
- 115) Türck, J., Oberdörfer, C., Vogel, T., Mackenzie, C. R., Däubener, W.
Enhancement of antimicrobial effects by glucocorticoids.
Med Microbiol Immunol. 2005 Jan;194(1-2):47-53.
- 116) Moffett, J. R., Namboodiri, M. A.
Tryptophan and the immune response.
Immunol Cell Biol. 2003; 81(4):247-65.
- 117) Heyes, M. P., Saito, K., J. Crowley, S., Davis, L. E., Demitrack, M. A., Der, M., Dilling, L. A., Elia, J., Kruesil, M. J. P., Lackner, A., Larsen, S. A., Lee, K., Leonard, H. L., Markey, S. P., Martin, A., Milstein, S., Mouradian, M. M., Pranzatelli, M. R., Quearry, B. J., Salazar, A., Smith, M., Strauss, S. E., Sunderland, T., Swedo, S. W., Tourtellotte, W. W.
Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease
Brain 115 (1992), pp. 1249–1273
- 118) Schwarcz, R., Whetsell Jr., W.O., Mangano, R.M.
Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axion-sparing lesions in rat brain
Science 219 (1983), pp. 316–318.
- 119) Kim, J.P., Choi, D.W.
Quinolinic acid neurotoxicity in cortical cell culture
Neuroscience 23 (1987), pp. 423–432.
- 120) Stone, T.W., Perkins, M.N.
Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS
Eur. J. Pharmacol. 72 (1981), pp. 411–412.
- 121) Miura, H., Ozaki, N., Sawada, M., Isobe, K., Ohta, T., Nagatsu, T.
A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression
Stress. 2008;11(3):198-209.

- 122) Grohmann, U., Puccetti, P.
The immunosuppressive activity of proinflammatory cytokines in experimental models: potential for therapeutic intervention in autoimmunity.
Curr. Drug Targets (Inflammation&Allergy) (2002) 1: 77-87
- 123) Pfefferkorn, E. R.
Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan.
Proc. Natl. Acad. Sci. 1984; 81:908-12.
- 124) De la Maza, L.M., Peterson, E.M.
Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media
Cancer Res 48 (1988), pp. 346–350.
- 125) Ozaki, Y., Edelstein, M.P., Duch, D.S.
Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma
Proc Natl Acad Sci U S A 85 (1988), pp. 1242–1246.
- 126) Mellor, A. L., Munn, D. H.
Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation?
Immunol. Today. (1999) 20:469–473.
- 127) Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., Mellor, A. L..
Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism.
J. Exp. Med. (1999) 189:1363–1372.
- 128) Alexander, A. M., Crawford, M., Bertera, S., Rudert, W. A., Takikawa, O., Robbins, P. D., Trucco, M.
Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes.
Diabetes. 2002; 51(2):356-65.
- 129) Kai, S., Goto, S., Tahara, K., Sasaki, A., Kawano, K., Kitano, S.
Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth.
J Exp Ther Oncol. 2003; 3(6):336-45.
- 130) Miki, T., Sun, H., Lee, Y., Tandin, A., Kovscek, A. M., Subbotin, V., Fung, J. J., Valdivia, L. A.
Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts.
Transplant Proc. 2001; 33(1-2):129-30.
- 131) Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., Van den Eynde, B. J.
Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.
Nat Med. 2003; 9(10):1269-74.
- 132) Blier, P., Ward, N. M.
Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression?
Biol. Psychiatry 53 (2003), pp. 193–203.
- 133) Branchey, L., Weinberg, U., Branchey, M., Linkowski, P., Mendlewicz, J.
Simultaneous study of 24-hour patterns of melatonin and cortisol secretion in depressed patients.
Neuropsychobiology. 1982;8(5):225-32.
- 134) Coppen, A.
The biochemistry of affective disorders.
Br J Psychiatry. 1967;113(504):1237-64.

- 135) Heninger, G. R., Charney, D. S., Sternberg, D. E.
Serotonergic function in depression. Prolactin response to intravenous tryptophan in depressed patients and healthy subjects.
Arch Gen Psychiatry. 1984;41(4):398-402.
- 136) Myint A-M, Kim Y-K, Verkerk R, Scharpe S, Steinbusch H, Leonard BE:
Kynurenine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection.
J Affect Disord 2007; 98: 143–151.
- 137) Wichers MC, Koek GH, Robaey R, 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.
- 138) Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., Mellor, A. L.
Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism.
Science 1998;281(5380):1122-4.
- 139) Agarwal, M. K.
Receptors for mammalian steroid hormones in microbes and plants.
FEBS Lett. 322 (1993): 207-210.
- 140) Agarwal, M. K
Perspectives in receptor mediated mineralocorticoid hormone action.
Pharmacol. Rev. 46. (1994): 67-87.
- 141) Jensen, E. V., Greene, G. L., Gloss, L. E., DeSombre, E. R. and Nadji, M
Receptors reconsidered: a 20-year perspective.
Recent Prog. Horm. Res. 38. (1982): 1-40.
- 142) Heijnen, C. J.
Receptor regulation in neuroendocrine-immune communication: Current knowledge and future perspectives
Brain, Behavior, and Immunity 21, 1–8, 2007
- 143) Diamond, M. I., Miner, J. N., Yoshinaga, S. K., Yamamoto, K. R.
Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element.
Science. 1990;249:1266-1272.
- 144) Hoepfner, M. A., Mordacq, J. C., Linzer, D. I.
Role of the composite glucocorticoid response element in proliferin gene expression.
Gene Expr. 5 (1995): 133-141.
- 145) Pagano, M., Mirshahi, M., Mirshahi, E, Monnot, M., Lazar, G., Chassaing, C. G., Femandjian, S. and Agarwal, M. K.
Properties of the mineralocorticoid receptor immunopurified from bovine kidney.
Biochem. Pharmacol. 48 (1994): 1163-1169.
- 146) Rhen, T., Cidlowski, J. A.
Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs
N. Engl. J. Med. 353 (2005), 1711–1723
- 147) Funder, J. W.
Mineralocorticoid receptors: distribution and activation.
Heart Fail Rev 2005; 10:15–22.
- 148) Holmes, M. C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J. J., Seckl, J. R.
Phenotypic analysis of mice bearing targeted deletions of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases 1 and 2 genes.
Mol Cell Endocrinol 2001;171:15–20.

- 149) Lim, H. Y., Müller, N., Herold, M. J., van den Brandt, J., Reichardt, H. M.
Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration.
Immunology. (2007) 122(1):47-53.
- 150) De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., Joels, M.
Brain corticosteroid receptor balance in health and disease
Endocrin. Rev. (1998) 19:269-301
- 151) Joels, M., deKloet, E. R.
Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems.
Prog Neurobiol 1994; 43:1–36.
- 152) Sitruk-Ware, R., Spitz, I. M.
Pharmacological properties of mifepristone: toxicology and safety in animal and human studies
Contraception 68 (2003) 409–420
- 153) Fiala, C., Gemzell-Danielsson, K.
Review of medical abortion using mifepristone in combination with a prostaglandin analogue
Contraception 74 (2006) 66– 86
- 154) Heikinheimo, O., Kekkonen, R.
Dose-response relationships of RU 486.
Ann Med. 1993 Feb;25(1):71-6.
- 155) Distelhorst, C. W., Howard, K. J.
Evidence from pulse-chase labeling studies that the antiglucocorticoid hormone RU486 stabilizes the nonactivated form of the glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells.
J Steroid Biochem. 1990 Jun;36(1-2):25-31.
- 156) Lefebvre, P., Formstecher, P., Richard, C., Dautrevaux, M.
RU 486 stabilizes a high molecular weight form of the glucocorticoid receptor containing the 90K non-steroid binding protein in intact thymus cells
Biochem Biophys Res Commun, Volume 150, Issue 3, 15 February 1988, Pages 1221-1229
- 157) Ratka, A., Sutanto, W., Bloemers, M., de Kloet, E. R.
On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation.
Neuroendocrinology. 1989 Aug;50(2):117-23.
- 158) Moldow, R. L., Beck, K. D., Weaver, S., Servatius, R. J.
Blockage of glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptors prevents the persistent increase in circulating basal corticosterone concentrations following stress in the rat.
Neurosci Lett. 2005 Feb 1;374(1):25-8.
- 159) Dal-Zotto, S., Martí, O., Armario, A.
Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis.
Psychoneuroendocrinology. 2003 Nov;28(8):992-1009
- 160) Weidenfeld, J., Feldman, S.
Glucocorticoid feedback regulation of adrenocortical responses to neural stimuli: role of CRF-41 and corticosteroid type I and type II receptors.
Neuroendocrinology. 1993 Jul;58(1):49-56.
- 161) Raivio, T., Palvimo, J. J., Kannisto, S., Voutilainen, R., Jänne, O. A.
Transactivation assay for determination of glucocorticoid bioactivity in human serum.
J Clin Endocrinol Metab 87 (2002):3740–3744

- 162) Heikinheimo, O., Raivio, T., Honkanen, H., Ranta, S., Jänne, O. A.
Termination of pregnancy with mifepristone and prostaglandin suppresses transiently circulating glucocorticoid bioactivity.
J Clin Endocrinol Metab. 2003 Jan;88(1):323-6.
- 163) Belanoff, J. K., Flores, B. H., Kalezhan, M., Sund, B., Schatzberg, A. F.
Rapid reversal of psychotic depression using mifepristone.
J Clin Psychopharmacol. 2001 Oct;21(5):516-21
- 164) Pastva, A., Estell, K., Schoeb, T. R., Schwiebert, L. M.
RU486 blocks the anti-inflammatory effects of exercise in a murine model of allergen-induced pulmonary inflammation.
Brain Behav Immun. 2005 Sep;19(5):413-22
- 165) Forsythe, P., Ebeling, C., Gordon, J. R., Befus, A. D., Vliagoftis, H.
Opposing effects of short- and long-term stress on airway inflammation.
Am J Respir Crit Care Med. 2004 Jan 15;169(2):220-6.
- 166) Pollak, N.
Die Rolle von MIF (macrophage migration inhibitory factor) in der Sepsis-induzierten Immunparalyse.
Dissertation an der naturwissenschaftlichen Fakultät IV Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg, 2005.
- 167) Nakamura, Y., Tamura, H., Ono, M., Shimamura, K., Sugino, N., Numa, F., Ueda, K., Kato, H.
A study of the luteolytic mechanism of the antiprogestone RU486 during the late-luteal phase in pseudopregnant rats.
J Endocrinol. 1996 Jul;150(1):93-8.
- 168) Weinstein, M. A., Pleim, E. T., Barfield, R. J.
Effects of neonatal exposure to the antiprogestin mifepristone, RU 486, on the sexual development of the rat.
Pharmacol Biochem Behav. 1992 Jan;41(1):69-74.
- 169) Jimenez-Moreno, V., Billeter, M., Liu, C. Q., Gordon, K., Mahony, M.
Local effects of mifepristone on the nonhuman primate endometrium.
Fertil Steril. 2000 Jul;74(1):134-40.
- 170) Kent, W. D., Cross-Mellor, S. K., Kavaliers, M., Ossenkopp, K. P.
Acute effects of corticosterone on LiCl-induced rapid gustatory conditioning in rats: a microstructural analysis of licking patterns.
Behav Brain Res. 2002;136(1):143-50
- 171) Yuan, J. M., Jameson, C. W., Goehl, T. J., Collins, B. J., Purdie, W., Judd, L.
Application of molecular encapsulation for toxicology studies: toxicokinetics of p-chloro-alpha,alpha,alpha-trifluorotoluene in alpha-cyclodextrin or corn oil vehicles in male F344 rats.
Toxicol Appl Pharmacol. 1991;111(1):107-15.
- 172) Denda, M., Tsuchiya, T., Elias, P. M., Feingold, K. R.
Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis
Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol. (2000) 278: R367–R372
- 173) Balcombe, J., N.D. Barnard, N. D., C. Sandusky, C.
Laboratory routines causes animal stress,
Contemp Top Lab Anim Sci 2004; 43 (6), 42-51
- 174) Besch, E.L., Chou, B.J., Cornelius, C. E.
Physiological responses to blood collection in rats
Proc Soc Exp Biol Med 1971; 138(3):1019-21.

- 175) Brown, A.P., Dinger, N., Levine, B.S.
Stress produced by gavage administration in the rat
Contemp Top Lab Anim Sci 2000; 39(1):17-21
- 176) Dalm, S., Brinks, V., van der Mark, M., de Kloet R., Oitzl, M.S.
Non-invasive stress-free application of glucocorticoid ligands in mice
J Neurosci Methods 2008; 170, 77-84
- 177) Gärtner, K., Buttner, D., Dohler, K., Friedel, R., Lindena, J., Trautschold, I.
Stress response of rats to handling and experimental procedures
Laboratory Animals (1980) 14, 267-274
- 178) Labruto, F., Vaage, J., Li, G., Valen, G.
Intraperitoneal injection induces a delayed preconditioning-like effect in mice,
Lab Anim 2005; 39(3):298-307
- 179) Meijer, M.K., Sommer, R., Spurijt, B.M., van Zutphen, L.F., Baumans, V.
Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in
individually housed mice
Lab Anim 2007; 41(2):161-73
- 180) Tabata, H., Kitamura, T., Nagamatsu, N.
Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on
plasma glucose levels between mice and rats
Lab Anim 1998; 32(2):143-8
- 181) Moynihan, J.A., Brenner, G.J., Ader, R., Cohen, N.,
The effects of handling adult mice on immunological relevant processes,
Ann N Y Acad Sci 1992; 650:262-7
- 182) Swaim, L.D., Taylor, H.W., Jersey, G.C.,
The effect of handling techniques on serum ALT activity in mice
J Appl Toxicol 1985; 5(3):160-2
- 183) Bugajski, J., Gadek-Michalska, A., Bugajski, A.
A single corticosterone pretreatment inhibits the hypothalamic-pituitary-adrenal responses to
adrenergic and cholinergic stimulation
J Physiol Pharmacol 2001; 52(2):313-24
- 184) Gadek-Michalska, A., Bugajski, J.
Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-
adrenocortical response to acute restraint stress,
J Physiol Pharmacol 2003; 54(3):449-59
- 185) García, A., Martí, O., Vallès, A., Dal-Zotto, S., Armario, A.
Recovery of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Response to Stress,
Neuroendocrinology 2000; 72(2):114-25
- 186) Odio, M. R., Brodish, A.
Effects of chronic stress on in vivo pituitary-adrenocortical responses to corticotropin releasing
hormone. (Abstrakt)
Neuropeptides. 1990;15(3):143-52.
- 187) Bowers, S. L., Bilbo, S. D., Dhabhar, F. S., Nelson, R. J.
Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice
Brain, Behavior, and Immunity 22 (2008) 105–113
- 188) Jeng, K. C. G., Hou, R. C. W.
Sesamin and Sesamol: Nature's Therapeutic Lignans
Current Enzyme Inhibition, 2005, 1, 11-20 11

- 189) Vanhorebeek, I., van den Berghe, G.
Hormonal and metabolic strategies to attenuate catabolism in critically ill patients.
Curr Opin Pharmacol (2004) 4:621-628
- 190) Morley, J. E., Thomas, D. R., Wilson, M. M.
Cachexia: pathophysiology and clinical relevance.
Am J Clin Nutr (2006) 83:735-743
- 191) Wray, C., Mammen, J., Hasselgren, P.
Catabolic response to stress and potential benefits of nutrition support.
Nutrition (2002) 18:971-977
- 192) Deakin, J. F.
Does selectivity matter?
Int Clin Psychopharmacol 1996; 11(suppl 1):13-17.
- 193) R.A. Schwartzman, J.A. Cidlowski
Glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells
Int. Arch. Allergy Immunol. 105 (1994) 347-354.
- 194) Tomea, M. E., Lutz, N. W., Briehl, M. M.
Overexpression of catalase or Bcl-2 alters glucose and energy metabolism concomitant with dexamethasone resistance
Biochim Biophys Acta. 2004 Jul 23;1693(1):57-72
- 195) Almawi, W. Y., Melemedjian, O. K., Jaoude, M. M.
On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis
J Leukoc Biol. 2004 Jul;76(1):7-14
- 196) Rogatsky, I., Hittelman, A. B., Pearce, D., Garabedian, M. J.
Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids.
Mol Cell Biol. 1999;19(7):5036-49
- 197) Engler, H., Dawils, L., Hoves, S., Kurth, S., Stevenson, J. R., Schauenstein, K., Stefanski, V.
Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms.
J Neuroimmunol. 2004 Nov;156(1-2):153-62.
- 198) Heseler, K., Spekker, K., Schmidt, S. K., MacKenzie, C. R., Däubener, W.
Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation.
FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Mar;52(2):273-81.
- 199) Weinreich, M. A., Hogquist, K. A.
Thymic emigration: when and how T cells leave home.
Immunol. 2008 Aug 15;181(4):2265-70.
- 200) Rezzani, R., Bonomini, F., Rodella, L. F.
Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development.
Prog Histochem Cytochem. 2008;43(2):73-120
- 201) Bornstein, S. R., Engeland, W. C., Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Herman
Dissociation of ACTH and glucocorticoids
Trends in Endocrinology and Metabolism (2008); 19 (5):175-180

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei den Personen und Einrichtungen bedanken, die mir die Verfassung dieser Dissertationsschrift ermöglicht haben.

Vor Allem danke ich Frau Prof. Dr. med. Christine Schütt für die Bereitstellung dieses hochinteressanten Themas, die unkomplizierte, freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die engmaschigen Konsultationsmöglichkeiten, anregende Diskussionen und für die konstruktive Kritik an meinem Manuskript.

Großer Dank gebührt auch meiner Betreuerin Frau Dr. Cornelia Kiank, ohne die ich diese Arbeit wahrscheinlich nie begonnen hätte. Für die Anleitung beim experimentellen Arbeiten, die Diskussionsmöglichkeiten und die zahlreichen hilfreichen Kommentare beim Verfassen des Manuskripts bin ich ihr äußerst dankbar.

Frau Prof. Dr. med. Barbara Bröker danke ich für die Aufnahme ins Graduiertenkolleg und für die Unterstützung bei diesbezüglichen Aktivitäten.

Dem Graduiertenkolleg 840 („Host-pathogen interactions in generalized bacterial infections“) gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung sowie die zahlreichen interessanten und lehrreichen Seminare, Vorträge und Workshops.

Bei Frau Dr. Cornelia Kiank und Herrn Felix Schwenteit bedanke ich mich für die Bereitstellung der Daten der 1-MT-Behandlung.

Frau Dipl.-Biochemikerin Grazyna Domanska und Herrn Dr. Gerhard Fusch danke ich für die Durchführung der Messungen der Plasma-Indolaminkonzentrationen.

Annett Geißler, Dominique Muschter, Sylvia Voß, Jakob Olfe, Anne Baumgart und Felix Schwenteit danke ich herzlich für viele anregende Diskussionen und die unkomplizierte Unterstützung bei der Laborarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir das Studium und diese Promotion ermöglichen, meinem Freund, meinen Geschwistern und meinen Freunden dafür bedanken, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich mental und emotional unterstützt haben.