

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München

AG Neurobiochemie

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Teupser

**Entwicklung, Validierung und Anwendung einer
HPLC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von
Tryptophan und seinen Metaboliten**

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.) an der
Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**

vorgelegt von

Gregor Alexander Schütze

aus

Wolfratshausen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Schwarz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. Manfred Fichter

Prof. Dr. med. Michael Meyer

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 20.10.2014

Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit wurden auf folgenden Veranstaltungen vorgestellt bzw. veröffentlicht:

1. G.A. Schütze, A.M. Myint, M.J. Schwarz (29.07.2011) Analyse von Tryptophan, Serotonin und deren Metabolite mittels HPLC-UV/FLD aus verschiedenen Matrices nach "Dual-Load-SPE". Poster bei dem Research Festival der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, München.
2. Y. Pujol-Lopez, O. Arisoy, H. Noll-Puchta, G.A. Schütze, N. Müller, M.J. Schwarz, A.M. Myint (29.07.2011) Effect of different antipsychotic compounds on tryptophan metabolites after different immune challenges in astrocytes culture. Poster bei dem Research Festival der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, München.
3. E. Weidinger, R. Barth, H. Noll-Puchta, W. Stettinger, G.A. Schütze, M.J. Schwarz, N. Müller, A.M. Myint (27.07.2012) Role of Vitamin B6 in Immune-Kynurenine Pathway Interaction in Depression. Poster bei dem Research Festival der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, München.
4. G.A. Schütze, T. Gschwendtner, M.J. Schwarz (27.07.2012) Erweiterung und Optimierung der Analyse beider Arme des Tryptophan-Metabolismus. Poster bei dem Research Festival der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, München.
5. Y. Pujol-Lopez, A. Weiss, H. Noll-Puchta, W. Stettinger, G.A. Schütze, N. Müller, M.J. Schwarz, A.M. Myint (27.07.2012) Effect of different antipsychotic compounds on cytokines and tryptophan metabolites after different immune challenges in astrocytes culture. Poster bei dem Research Festival der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der LMU München, München.
6. G.A. Schütze, T. Gschwendtner, A.M. Myint, M.J. Schwarz (04.10.2012) Determination of almost all Trp metabolism intermediates – from UV to MS. Poster bei dem 4th Annual Meeting MOODINFLAME, Mailand - Italien
7. G.A. Schütze, T. Gschwendtner, M.J. Schwarz (07.11.2012) Determination of almost all Trp metabolism intermediates - from UV to MS. Vortrag bei dem 13th Meeting of the International Society for Tryptophan Research, Sydney - Australien
8. G.A. Schütze (23.03.2013) Quantitative analysis of the kynurenine pathway. Vortrag bei dem 10th Congress of the GEBIN, Regensburg.
9. G.A. Schütze, D. Teupser, M.J. Schwarz (25.10.2013) Kynurenine Pathway: Analytical and pre-analytical aspects. Poster bei der zehnten DGKL Jahrestagung, Dresden.
10. G.A. Schütze (25.11.2013) Kynurenine Pathway: Analytical and preanalytical aspects. Vortrag beim 11. Anwendertreffen der DGKL-AG LC-MS/MS in der Labormedizin, Kloster Banz.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden am 21.03.2013 mit dem auf 1000 € dotierten Hephaistos-Preis der Stiftung "Immunität und Seele" für grundlegende methodische Fortschritte im Bereich Psycho-neuroimmunologie ausgezeichnet.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Psychoneuroimmunologie	3
2.2	Psychoneuroimmunologie in der Depressionsforschung	5
2.3	Übersicht über den Tryptophanmetabolismus	8
2.3.1	Serotonin	10
2.3.2	IDO	11
2.3.3	TDO	12
2.3.4	Kynurein	12
2.3.5	Kynureinsäure	13
2.3.6	3-Hydroxykynurein, 3-Hydroxykynureinsäure und Cinnabarinsäure	14
2.3.7	Xanthurinsäure	15
2.3.8	Chinolinsäure	16
2.4	Neurochemische Effekte des Kynurein Pathways	16
2.5	Immunmodulierende Effekte des Kynurein Pathways	18
2.6	Der Tryptophanstoffwechsel in der Depressionsforschung	19
2.7	HPLC-MS/MS-Analytik	23
2.7.1	Allgemeines zur HPLC-MS/MS-Analytik	23
2.7.2	Analytik des Kynurein Pathway	28
3	Zielsetzung	31
4	Material und Methoden	32
4.1	Grundausstattung	32
4.1.1	Geräte	32
4.1.2	Verwendete Software	33
4.1.3	Verbrauchsmaterialien	34
4.1.4	Chemikalien	35
4.1.5	Sonstige Hilfsmittel	36
4.2	Reagenzien für die HPLC-Analytik	36
4.2.1	Mobile Phasen und Nadelspülösungen	36
4.2.2	Interne Standardlösung (ISTD)	37
4.2.3	Ammoniumacetatlösung zur Probenvorbereitung	37

4.2.4	Phosphorsäurelösung zur Probenvorbereitung	37
4.2.5	Waschlösung	37
4.2.6	Elutionslösung	37
4.2.7	Wiederaufnahmelösung	37
4.2.8	Kalibratoren und Kontrollen für die HPLC-Analytik	37
4.3	Bestimmung der Kynurenine mittels HPLC	38
4.3.1	HPLC-Methode zur Quantifizierung von Trp	38
4.3.2	HPLC-Methode zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA	38
4.4	Reagenzien für die HPLC-MS/MS-Analytik	39
4.4.1	Mobile Phasen und Waschlösungen	39
4.4.2	Interne Standardlösung (ISTD)	40
4.4.3	Additionslösung	40
4.4.4	Harnstofflösung	40
4.4.5	Fällungsmittel	40
4.4.6	Wiederaufnahmelösung underivatisiert	40
4.4.7	Wiederaufnahmelösung derivatisiert	40
4.4.8	Kalibratoren und Kontrollen für die HPLC-MS/MS-Analytik	41
4.5	Blutentnahme und Gewinnung von Serum	41
4.6	Quantitative Bestimmung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid	42
4.7	Reagenzien für die Zellkultur	42
4.7.1	Serum	42
4.7.2	Medium I	42
4.7.3	Medium II	42
4.7.4	Medium II + Carbamazepin	43
4.7.5	Medium II + Carbamazepinepoxid	43
4.7.6	Medium II + Kontrolle	43
4.7.7	Medium II Circadian	43
4.7.8	Medium II LPS	43
4.8	Statistik	43
5	Ergebnisse	44
5.1	Probenvorbereitung für die HPLC-Analytik mittels Dual-Load-SPE	44
5.2	HPLC-MS/MS-Methoden	45
5.2.1	Probenvorbereitung für die HPLC-MS/MS-Analytik	45
5.2.2	MS Tunepage Parameter	47
5.2.3	UPLC-Methode underivatisiert	48
5.2.4	MS/MS-Methode underivatisiert	49
5.2.5	UPLC-Methode derivatisiert	50
5.2.6	MS/MS-Methode derivatisiert	51
5.2.7	Auswertung	52

5.3	Validierung der HPLC-MS/MS-Methoden	53
5.3.1	Reproduzierbarkeit des HPLC-MS/MS-Systems	53
5.3.2	Optimale Derivatisierungsdauer und Derivatisierbarkeit des internen Standards Trp-d5	54
5.3.3	Reproduzierbarkeit	56
5.3.4	Stabilität der Serumproben	59
5.3.5	Stabilität aufgearbeiteter Serumproben	59
5.3.6	Stabilität der internen Standards	60
5.3.7	Linearität, Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze	61
5.3.8	Methodenvergleich zwischen HPLC und HPLC-MS/MS	63
5.3.9	Aufarbeitungsbedingte Verluste	64
5.4	Untersuchung präanalytischer Einflüsse	66
5.4.1	Freie und proteingebundene Kynurenine	66
5.4.2	Der Effekt des Einfrierens	67
5.4.3	Einfluss von Nahrungsaufnahme	67
5.4.4	Einfluss der Blutentnahmesysteme	70
5.5	Praktische Anwendung der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode	72
5.5.1	Untersuchung des Einflusses von Carbamazepin auf PBMC-Kulturen	72
5.5.2	Untersuchung des circadianen Rhythmus in vivo	76
5.5.3	Untersuchung des circadianen Rhythmus in PBMC-Kulturen	79
6	Diskussion	84
6.1	Bestimmung der Kynurenine mittels HPLC	84
6.2	HPLC-MS/MS-Methoden	85
6.3	Validierung der HPLC-MS/MS-Methoden	88
6.4	Präanalytische Einflüsse	98
6.5	Praktische Anwendung der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode	103
6.6	Ausblick	108
7	Anhang	112
7.1	Abkürzungsverzeichnis	112
7.2	Danksagung	117
Literaturverzeichnis		118

Abbildungsverzeichnis

2.1	Psychoneuroimmunologie - Interaktion von Psyche, Nerven- und Immunsystem	3
2.2	Der serotonerge Arm des Tryptophanstoffwechsels	8
2.3	Der Kynurenin Pathway	9
2.4	Die beiden Arme des Tryptophanstoffwechsels	10
2.5	Entstehung von Cinnabarinsäure aus 3-Hydroxyanthranilsäure	15
2.6	Neurochemische Efekte des Kynurenin Pathways	17
2.7	Aktivierung und Inhibierung der Enzyme des Kynurenin Pathways durch Zytokine	21
2.8	Prinzip der Trennung zweier Substanzen in einer HPLC-Säule	23
2.9	Komponenten einer HPLC-Anlage	24
2.10	Lambert-Beer'sches Gesetz	26
2.11	Schema eines Tandem-Massenspektrometers mit ESI und Quadrupolen	27
2.12	Prinzip einer MRM-Messung	28
5.1	Probenvorbereitung für die HPLC: Dual-Load-SPE	44
5.2	Derivatisierung am Beispiel der Picolinsäure und der Chinolinsäure	47
5.3	Reproduzierbarkeit des LC-MS/MS-Systems - Regelkarten	54
5.4	Einfluss der Derivatisierungsdauer auf die Signalintensität von Trp	55
5.5	Einfluss der Derivatisierungsdauer auf die Signalintensität des internen Standards Trp-d5.	55
5.6	Intra-Assay Reproduzierbarkeit - Boxplots	58
5.7	Inter-Assay Reproduzierbarkeit - Boxplots	58
5.8	Formeln zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	62
5.9	Postprandiale Änderung der Chinolin-2-Carboxylsäure	68
5.10	Postprandiale Änderung der KynA, der AA und des 3-HK bezogen auf Kyn	69
5.11	Vergleich unterschiedlicher Blutentnahmesysteme	72
5.12	Konzentrationen von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid nach 72 Stunden Zellkultur	75
5.13	Konzentration der Chinolinsäure nach 72 Stunden Zellkultur	76
5.14	Circadianer Rhythmus von Trp, Kyn, QuinaldA und Quin im Serum	77
5.15	Circadianer Rhythmus im Serum bezogen auf die Vorläufer	79
5.16	Circadiane Rhythmik nach 48 Stunden Zellkultur - 1	82
5.17	Circadiane Rhythmik nach 48 Stunden Zellkultur - 2	83
5.18	Circadiane Rhythmik nach 48 Stunden Zellkultur - 3	83
6.1	Beispielchromatogramm Picolinsäure	87
6.2	Zusammenhang zwischen Konzentration und Ersatzgröße	91

Abbildungsverzeichnis

6.3	Formeln zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen	92
6.4	Methodenvergleich nach Passing-Bablok	94
6.5	Methodenvergleich nach Passing-Bablok	95
6.6	Formel zur Berechnung der aufarbeitungsbedingten Verluste bzw. der Wiederfindung	96

Tabellenverzeichnis

2.1 Kriterien zur Diagnose und Klassifizierung der depressiven Episode nach ICD-10	6
4.1 Geräte	32
4.2 HPLC- und HPLC-MS/MS-Komponenten für die Bestimmung von Trp und Metaboliten .	33
4.3 HPLC-Komponenten für die Bestimmung von Carbamazepin	33
4.4 Software	33
4.5 Verbrauchsmaterialien	34
4.6 Chemikalien	35
4.7 Analytische Reinsubstanzen	36
4.8 Zugesetzte Konzentrationen für HPLC-Kalibratoren und HPLC-Kontrollen	38
4.9 HPLC-Methode zur Quantifizierung von Trp	38
4.10 HPLC-Methode zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA .	39
4.11 Gradient zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA	39
4.12 Zugesetzte Konzentrationen für HPLC-MS/MS-Kalibratoren	41
4.13 Kalibrator und Kontrollen für die Bestimmung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid	42
5.1 Steigerung der Signalintensitäten durch Dual-Load-SPE	45
5.2 Probenvorbereitung für die HPLC-MS/MS-Analytik	46
5.3 Substanzunabhängige Parameter der Ionenquelle	47
5.4 Gradient der UPLC-Pumpe zur Analyse der underivatisierten Substanzen	48
5.5 Parameter des Probengebers zur Analyse der underivatisierten Substanzen	48
5.6 Parameter der UPLC-Pumpe zur Analyse der underivatisierten Substanzen	49
5.7 MRM-Übergänge und MS/MS-Parameter für die underivatisierte Analytik	49
5.8 Parameter des Probengebers zur Analyse der derivatisierten Substanzen	50
5.9 Parameter der UPLC-Pumpe zur Analyse der derivatisierten Substanzen	50
5.10 Gradient der UPLC-Pumpe zur Analyse der derivatisierten Substanzen	51
5.11 MRM-Übergänge und MS/MS-Parameter für die derivatisierte Analytik	52
5.12 Reproduzierbarkeit des LC-MS/MS-Systems - Variationskoeffizienten	53
5.13 Ergebnisse Intra-Assay Reproduzierbarkeit	56
5.14 Ergebnisse Inter-Assay Reproduzierbarkeit	57
5.15 Stabilität der Analyte im Serum	59
5.16 Stabilität der aufgearbeiteten Proben	60
5.17 Stabilität der internen Standards	61
5.18 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen	62

Tabellenverzeichnis

5.19 Methodenvergleich HPLC und HPLC-MS/MS mittels Korrelation nach Pearson	63
5.20 Methodenvergleich nach Passing-Bablok	63
5.21 Aufarbeitungsbedingte Verluste	65
5.22 Korrelation der freien und gesamten Analytmenge	66
5.23 Vergleich unterschiedlicher Blutentnahmesysteme	71
5.24 Übersicht über die Kultur der PBMCs +/- Carbamazepin bzw. +/- Carbamazepinepoxid	74
5.25 HPLC-Methode zur Quantifizierung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid	74
5.26 Ergebnisse der Untersuchung zum Circadianen Rhythmus in Serum	78
5.27 Anzahl der gewonnenen PBMCs	80
5.28 Einfluss der LPS-Stimulation unabhängig von der Uhrzeit	81
5.29 Einfluss der LPS-Stimulation zu den jeweiligen Zeitpunkten	81

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung, Validierung und Anwendung einer HPLC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan und seinen Metaboliten. Der Stoffwechsel der proteinogenen, essentiellen Aminosäure Tryptophan umfasst nicht nur den Neurotransmitter Serotonin und das in der Epiphyse gebildete Hormon Melatonin, sondern er schließt auch den Kynurenin Pathway mit ein. Die neurobiochemische Bedeutung dieses Stoffwechselweges wird bereits durch die Tatsache offensichtlich, dass im zentralen Nervensystem mehr als 95% des Tryptophans über diesen Weg metabolisiert werden. Die Intermediate des Kynurenin Pathways spielen eine bedeutende Rolle als Mediatoren zwischen Immun- und Nervensystem. Dabei nehmen sie potenziell Einfluss auf höhere zentralnervöse Funktionen, wie Kognition, Verhalten und Affekt, weshalb sie von herausragender Bedeutung für das Forschungsgebiet der Psychoneuroimmunologie sind.

Auf molekularer Ebene wird Tryptophan im ersten Schritt durch die beiden Schlüsselenzyme Tryptophan-2,3-dioxygenase und Indoleamin-2,3-dioxygenase zu N-Formylkynurenin oxidiert. Durch Kynureninomidase erfolgt eine Metabolisierung von N-Formylkynurenin zu Kynurenin - der Ausgangssubstanz des gleichnamigen Stoffwechselweges. Während die Tryptophan-2,3-dioxygenase ausschließlich Tryptophan oxidiert, ist die Indolamin-2,3-dioxygenase nicht nur für den Abbau von Tryptophan spezifisch, sondern für alle Indolamine, inklusive Serotonin und Melatonin. Die Aktivität der Tryptophan-2,3-dioxygenase wird dabei durch Glucocorticoide, die der Indolamine-2,3-dioxygenase durch bestimmte Zytokine reguliert. Die Indolamin-2,3-dioxygenase spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Modulation der T-Zell-Toleranz. Des Weiteren werden die Aktivitätszustände diverser Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems durch Metabolite des Kynurenins gesteuert. Einige Bestandteile des Kynurenin Pathways besitzen neuroprotektive oder neurotoxische Eigenschaften. So ist beispielsweise die neuroprotektive Kynurensäure der bisher einzige bekannte endogene Antagonist des NMDA-Rezeptors und zusätzlich ein nicht-kompetitiver Antagonist des α 7-nikotinischen Acetylcholinrezeptors. Dieser Substanz steht der alternative Kynurenin-Metabolit, das exzitotoxische Neurotoxin Chinolinsäure gegenüber, welcher ein Agonist des NMDA-Rezeptors ist.

Bei Untersuchungen zum Tryptophanstoffwechsel ist es daher von entscheidender Bedeutung nicht nur einzelne Substanzen sondern die Gesamtheit der Metabolite zu quantifizieren. Nur so kann die Balance zwischen neuroprotektiven und neurodegenerativen Substanzen, aber auch die Balance zwischen inhibierenden und aktivierenden Mediatoren des Immun- und Nervensystems dargestellt werden. In klinischen Studien können so Dysbalancen mit der Pathogenese einzelner Erkrankungen assoziiert werden, wodurch die Möglichkeit besteht, dass Biomarker zur frühzeitigen Diagnose identifiziert und neue Therapieansätze postuliert werden können.

In dieser Arbeit wird eine neue HPLC-MS/MS-Methode vorgestellt, mit der eine bisher unerreichte Vielfalt an Tryptophan-Metaboliten quantifiziert werden kann. Die Probenvorbereitung ist eine einfache

1 Zusammenfassung

und kosteneffiziente Proteinfällung in zwei Stufen, wobei unterschiedliche Matrices, wie beispielsweise Serum oder Liquor cerebrospinalis, als Probenmaterial verwendet werden können. Um Analyte mit sehr niedrigen physiologischen Konzentrationen zu detektieren, wurde für diese eine Derivatisierung entwickelt. Die Methode benötigt ein sehr geringes Probenvolumen, ist durch die Verwendung der HPLC-MS/MS-Technologie äußerst sensitiv und spezifisch und umfasst alle bedeutenden Metabolite des Tryptophan-Stoffwechsels mit nur einer Probenvorbereitung. Die Robustheit wurde in einer ausführlichen Validierung bestätigt. Dabei wurden auch die analytischen Grenzwerte und Kennzahlen ermittelt, sowie die Stabilität der Proben untersucht. In Versuchen zu präanalytischen Einflüssen wurde festgestellt, dass unterschiedliche Zeitpunkte der Blutentnahme, unterschiedliche Blutentnahmesysteme und die Nahrungsaufnahme zu gravierenden Änderungen der Konzentrationen der Analyte führen. So führt die Verwendung unterschiedlicher Blutentnahmesysteme beispielsweise bei der Quantifizierung des Metaboliten Picolinsäure zu Ergebnissen, die sich um bis zu 60% unterscheiden. Es wurde nachgewiesen, dass es postprandial zu starken interindividuell unterschiedlichen Änderungen der Konzentrationen einzelner Intermediate kommt. Dabei verhalten sich die freien und proteingebundenen Metabolite ebenfalls unterschiedlich. Deshalb muss für Studien eine normierte Probengewinnung mit möglichst exakten Bedingungen eingeführt werden. Auch konnte gezeigt werden, dass die Metabolisierung des Tryptophans *in vivo* einer circadianen Rhythmik unterliegt. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden in einem *in vitro* Experiment tageszeitabhängige Schwankungen nachgewiesen und der Einfluss einer LPS-Stimulation auf den Kynurenin Pathway untersucht.

Durch den Einsatz dieser neuen HPLC-MS/MS-Methode besteht die Möglichkeit, die funktionellen Zusammenhänge zwischen Intermediate des Kynurenin Pathways und diversen immunologischen, neurochemischen und anderen pathophysiologischen Vorgängen zu untersuchen. In der Literatur gibt es eine Vielzahl an Hinweisen darauf, dass der Tryptophan-Stoffwechsel an der Pathogenese unterschiedlichster Erkrankungen beteiligt ist. Jedoch bedarf es der genauen Klärung der Zusammenhänge und der Möglichkeit, die Gesamtheit einer potentiellen Störung des Tryptophan-Stoffwechsels zu erfassen. So sind im Bereich psychiatrischer und neurologischer Erkrankungen beispielsweise Schizophrenie, Alzheimer-Krankheit, Chorea Huntington und Epilepsie zu nennen. Hier wurden in publizierten Studien häufig nur einzelne Metabolite quantifiziert und isoliert betrachtet. Darüber hinaus konnten unterschiedliche Arbeitsgruppen zeigen, dass eine Aktivierung des Kynurenin Pathways auch bei der Pathogenese von Tumoren beteiligt ist, weshalb auch hier die von uns entwickelte Methode für weitere Studien von großem Nutzen ist.

2 Einleitung

2.1 Psychoneuroimmunologie

Die Psychoneuroimmunologie (PNI) ist ein Forschungsgebiet, welches die Interaktion von Psyche, Nerven- und Immunsystem untersucht. Der Begriff wurde erstmals 1975 durch den Psychologen Robert Ader und den Immunologen Nicholas Cohen geprägt [1]. Durch die gleichzeitige Gabe des neutralen Stimulus Saccharin und des immunsuppressiven Wirkstoffs Cyclophosphamid konnten Ader und Cohen an Ratten die pavlowsche Konditionierung der immunsuppressiven Wirkung des Medikaments nachweisen: Das Immunsystem der Tiere zeigte nach der Konditionierung auch auf die alleinige Gabe von Saccharin eine suppressive Reaktion. Somit konnte nachgewiesen werden, dass nicht nur das Verhalten, sondern auch das Immunsystem von Säugetieren konditioniert werden kann. Ebenfalls in den 1970er Jahren begann Besedovsky mit der systematischen Untersuchung der Verschaltung von Neuroendokrinologie und Immunsystem [2]. Wurde früher davon ausgegangen, dass das endokrine System, das Immunsystem und Nervensystem voneinander getrennt agieren, so kann man heutzutage gegenseitige Interaktionen belegen. Immunzellen können nicht nur Zytokine, sondern auch Hormone und Neurotransmitter produzieren. Häufig geht die Produktion von Botenstoffen eines anderen Systems mit einer pathologischen Veränderung einher. Dies wird am Beispiel der rheumatoiden Arthritis deutlich. Während unter physiologischen Bedingungen Noradrenalin im Synovialgewebe nur von sympathischen Nerven freigesetzt wird, wird der Neurotransmitter im Krankheitsfall auch von lokalen synovialen Zellen produziert [3].

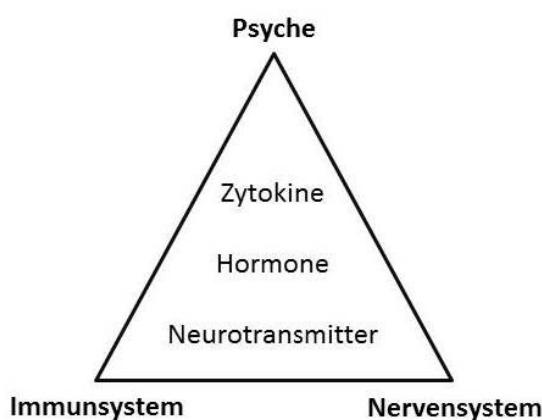


Abbildung 2.1: Psychoneuroimmunologie - Interaktion von Psyche, Nerven- und Immunsystem. Mediatoren sind Zytokine, Hormone und Neurotransmitter.

Von Williams et al. wurde 1981 der direkte Kontakt von noradrenergen sympathischen Nervenfasern mit zellulären Bestandteilen des Immunsystems beschrieben [4]. Diese Nervenfasern sind in speziellen Kom-

partimenten lymphatischer Organe angesiedelt, in welchen sie enge Verbindungen zu T-Lymphozyten und Makrophagen bilden, ähnlich wie die Synapsen zwischen den einzelnen Neuronen. Somit wurden diese Verschaltungen zwischen Gehirn und Immunsystem als wichtige Kommunikationsschnittstelle identifiziert, worüber sowohl das Verhalten, als auch zentrale Zytokine, Einfluss auf immunologische Funktionen nehmen können. Jedoch handelt es sich nicht nur um eine einseitige, sondern vielmehr um eine bidirektionale Interaktion von Gehirn und Immunsystem, wodurch das Paradigma, dass das Gehirn ein immunologisch privilegiertes Organ sei, aufgehoben wurde. Auch bei gesunden Menschen können Immunzellen in das Gehirn einwandern und dort mittels Zytokinen alle Zellarten des Gehirns, d.h. Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten, beeinflussen [5]. Der Nachweis, dass neuronale Aktivitäten durch Zytokine gesteuert werden können, wurde erbracht, indem unterschiedliche Zytokine entweder systemisch oder intracerebroventrikulär injiziert wurden. Durch die verabreichten Zytokine wurde beispielsweise die Hypothalamus-Hypophyse-Nebennierenrinden-Achse (HPA - Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis) aktiviert [6, 7, 8], Fieber induziert [9] und bei Ratten die Aufnahme von Essen und Wasser [10, 11] bzw. deren Motilität reduziert [12].

Obwohl das Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke (BBB - Blood-brain-barrier) umschlossen ist, existieren mehrere Wege, wie Zytokine das Gehirn erreichen und dort interagieren können. Einige spezielle Zytokine können offenbar aktiv durch die BBB transportiert werden. Dies konnte beispielsweise durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Interleukin-1 (IL-1), IL-2 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nachgewiesen werden [13, 14, 15]. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, dass Zytokine mit dem Zentralen Nervensystem (ZNS) über die Zirkumventrikulären Organe kommunizieren. Dies sind spezialisierte Organe in den Ventrikelwänden des Gehirns, die, im Gegensatz zu den übrigen Hirnstrukturen, ein fenestriertes Endothel aufweisen, wodurch die BBB an diesen Stellen undicht ist. Somit existiert eine bedeutende Möglichkeit zum Zytokinaustausch zwischen peripherem Blut und der Zerebrospinalflüssigkeit. Zu den Zirkumventrikulären Organen gehören die Zirbeldrüse (Epiphyse), die Eminentia mediana, das Organum subfornicale, das Organum subcommissurale, die Area postrema, das Organum vasculosum laminae terminalis (OVLT) und der Plexus choroideus. Die Bedeutung der Balance zwischen den einzelnen Zytokinen und deren gerichtete Kommunikationsfähigkeit mit dem ZNS wird offensichtlich, wenn man sieht, dass Verletzungen des OVLT in Experimenten zu unterdrücktem Fieber nach intraperitonealen Lipopolysaccharid (LPS) Injektionen führten [16, 17]. Weitere Versuche mit peripher injiziertem LPS oder IL-1 zeigten, dass auch durch die Höhe der Dosis die Art der Kommunikation mit dem ZNS beeinflusst wird. Es scheint, dass eine niedrige Dosis an LPS oder IL-1 spezifisch die Zirkumventrikulären Organe beeinflusst, wohingegen hohe Dosen über andere Wege auf das ZNS einwirken [18]. Eine dritte Möglichkeit, wie periphere Zytokine das ZNS beeinflussen können, besteht in der Stimulation des Nervus Vagus. So konnte eine übermäßige Schmerzempfindlichkeit nach LPS Injektion durch eine Vagotomie unterbunden werden. Dies deutet darauf hin, dass Substanzen, die klassisch dem Immunsystem zugeordnet und durch LPS freigesetzt werden, das Schmerzempfinden steigern können, wenn sie entweder zentral, oder eben auch peripher, interagieren können [19]. Periphere Zytokine können die Epithelzellen der BBB zur Zytokinproduktion stimulieren. Dadurch wird das Signal auf der Innenseite der BBB weitergeleitet und kann nun an Rezeptoren des ZNS binden. Durch eine periphere Stimulation konnte die Neubildung von IL-1, IL-6 und TNF- α nachgewiesen werden [20, 21, 22]. Eine weitere Möglichkeit zur Kommunikation mit dem ZNS besteht darin, dass Zytokine von Leukozyten durch die BBB transportiert

werden können. Diese weißen Blutkörperchen können sowohl unter normalen als auch pathologischen Bedingungen in das Gehirn einwandern, um ihre immunologischen Aufgaben zu erfüllen [23, 24]. Wie bereits beschrieben, ist der Kommunikationsweg nach LPS- oder IL-1-Stimulation mit dem ZNS konzentrationsabhängig. Ein weiteres Beispiel für eine konzentrationsabhängige Signalübermittlung ist IL-6. In geringen Konzentrationen kann dieser Mediator nach lokaler Produktion nicht in die Blutbahn überreten oder Nerven stimulieren. In höheren Konzentrationen kann er jedoch in der Blutbahn zirkulieren oder afferente Nervenbahnen stimulieren, wodurch im Laufe einer Erkrankung auch vom Ausgangspunkt entfernte Bereiche und auch das ZNS beteiligt werden [3].

Zytokine werden im Gehirn also unter physiologischen Bedingungen gebildet und agieren im ZNS als Botenstoffe zwischen den einzelnen Zellen. Auch periphere Zytokine können als Mediatoren Informationen an das ZNS weiterleiten. Durch gesteigerte neuronale Aktivitäten oder im Krankheitsfall kann die Zytokinproduktion und die Zytokinbalance im Gehirn verändert werden, wenn bestimmte Schwellenwerte überschritten wurden. Dass durch eine Änderung der Zytokinkonzentration auch kognitive Fähigkeiten vermindert werden können, kann durch ein einfaches Tiermodell gezeigt werden. In einem Y-förmigen Labyrinth konnten die Tiere in einem Arm Futter finden und dessen Position erlernen. Nach Inhibierung von IL-6 durch einen spezifischen Antikörper wurde die Fehlerrate signifikant erniedrigt, die Gedächtnisleistung der Tiere war also gesteigert. Im Umkehrschluss kann durch eine gesteigerte IL-6 Konzentration infolge einer chronischen Entzündungsreaktion die Gedächtnisleistung reduziert werden [25].

Ebenfalls von Interesse für die Psychoneuroimmunologie ist die gesteigerte Ausschüttung des Hormons Cortisol unter dem Einfluss von chronischem Stress und die daraus resultierende verminderte Immunabwehr, wodurch es zu Schwankungen der Zytokinkonzentrationen kommt [26]. Diese Zusammenhänge wurden in Tierstudien nachgewiesen, welche z.B. das "unpredictable chronic mild stress" Mausmodell (UCMS) verwendeten [27]. Im UCMS wurde den Tieren unter anderem regellos das Streu getauscht, der Tageslichtrhythmus geändert oder kurzzeitig Raubtiergeräusche vorgespielt. Die Tiere zeigten daraufhin nicht nur erhöhte Cortisolspiegel, sondern auch eine gesteigerte Ängstlichkeit und ein depressives Verhalten.

Die Psyche hat also einen direkten Einfluss auf unser Immunsystem, welches wiederum auf die Psyche einwirkt, wie die nächsten Kapitel zeigen.

2.2 Psychoneuroimmunologie in der Depressionsforschung

Eine der am häufigsten auftretenden psychiatrischen Erkrankungen ist die majore Depression. Es wird durch die WHO geschätzt, dass bis zum Jahr 2020 weltweit 340 Millionen Menschen unter Depressionen leiden werden. Damit wird dieses Krankheitsbild nach der Herzinsuffizienz das zweithäufigste sein. Die majore Depression ist durch einzelne oder wiederauftretende Episoden gekennzeichnet, die mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergehen. Die von ihr betroffenen Personen gehören allen Altersgruppen und Kulturreihen an, wobei Frauen einem höheren Krankheitsrisiko unterliegen als Männer. Die Lebenszeitprävalenz wird mit 12-17%, die Einjahresprävalenz mit 5-10% angegeben [28]. Obwohl die Krankheit in jedem Alter auftreten kann, wird berichtet, dass sie vermehrt im Alter zwischen 20 und 40 Jahren ausbricht [29]. Dabei ist die Einschränkung der Lebensqualität der Patienten durchaus vergleichbar mit der von Patienten, die an einer chronischen, somatischen Erkrankung leiden. Auch entstehen

durch dieses Krankheitsbild für die Gesellschaft hohe Kosten, da sie häufig nicht richtig diagnostiziert und therapiert wird, wodurch es in Folge zu einer sozialen Isolation, einem Verlust des Arbeitsplatzes und deutlich höherem Therapieaufwand kommt [30].

In Tabelle 2.1 sind die Kriterien zur Diagnose und Klassifizierung der depressiven Episode nach ICD-10 dargestellt. Es muss wohl davon ausgegangen werden, dass unterschiedliche pathophysiologische Prozesse zur Entstehung einer Depression führen. Dazu gehören unter anderem biologische, genetische, psychologische und soziale Faktoren, die einzeln oder in Kombination zu einer Krankheit führen, deren Symptomatik als Depression bezeichnet wird. Auch können an der Entstehung der Krankheit Pharmaka (z.B. Opiate, β -Blocker, Antibiotika, Cannabis) oder somatische Erkrankungen beteiligt sein. Zu den somatischen Erkrankungen zählen dabei unter anderem Morbus Cushing, Meningitis, Enzephalitis, Schädel-Hirn-Trauma, Schlaganfall, Vitamin B₁₂-Mangel, Morbus Wilson und Metastasen im ZNS [31].

Weder kann die Depression bisher durch neurobiologische, noch durch neurochemische Befunde eindeutig erklärt werden. Obwohl Therapiemöglichkeiten mit unterschiedlichen Antidepressiva, wie z.B. trizyklischen Antidepressiva, selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern, selektiven Serotonin- und Noradrenalaufnahmehemmern, selektiven Noradrenalin- und Dopaminaufnahmehemmern, existieren, bleiben ca. 30% der Patienten auch nach einem wiederholten Therapieversuch depressiv und erweisen sich als therapieresistent [32].

Kriterien	Schweregrad
<p>Typische Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> - depressive Verstimmung - Verlust von Interesse und Freude - erhöhte Ermüdbarkeit infolge Verminderung des Antriebs 	<p>Leichtgradig</p> <ul style="list-style-type: none"> - mindestens 2 typische und 2 der übrigen Symptome
<p>Andere häufige Symptome</p> <ul style="list-style-type: none"> - verminderte Konzentration und Aufmerksamkeit - vermindertes Selbstwertgefühl und Selbstvertrauen - Schuldgefühle und Gefühle von Wertlosigkeit - negative und pessimistische Zukunftsperspektiven - Suizidgedanken, Selbstverletzungen oder Suizidhandlungen - Schlaflosigkeit - verminderter Appetit 	<p>Mittelgradig</p> <ul style="list-style-type: none"> - mindestens 2 typische und 3 der übrigen Symptome
	<p>Schwer</p> <ul style="list-style-type: none"> - 3 typische und mindestens 4 der übrigen Symptome

Tabelle 2.1: Kriterien zur Diagnose und Klassifizierung der depressiven Episode nach ICD-10.

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der Depression wohl um eine multifaktorielle Krankheit, die aufgrund ihrer Symptomatik zusammengefasst wurde. Daher gelang es bis heute nicht, sie in einem einzelnen

Modell zu erklären, obwohl dies durch mehrere neurochemische Hypothesen versucht wurde. Zu den bekanntesten Hypothesen gehören die in den 1960er Jahren entwickelten Katecholamin-Mangelhypothesen, insbesondere die Serotonin-Mangelhypothese [33]. Diese Theorie wird durch die Wirksamkeit noradrenerger und serotonerger Antidepressiva und durch replizierte Befunde für eine gestörte noradrenerge bzw. serotonerge Neurotransmission untermauert: Erniedrigung oder Erhöhung von 3-Methoxy-4-Hydroxyphenylglykol, Erniedrigung von 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) im Liquor, Hochregulation postsynaptischer 5-HT₂-Rezeptoren, Erniedrigung von Tryptophanplasmakonzentrationen, Hochregulation von β-adrenergen Rezeptoren und deren Normalisierung nach antidepressiver Behandlung [28, 34]. Auf einzelne Punkte dieser Auflistung wird später noch ausführlicher eingegangen.

Die Symptome der Depression können kurzfristig und in deutlich abgeschwächter Form auch durch andere Erkrankungen hervorgerufen werden. Nach beispielsweise einer viralen oder bakteriellen Infektion stellt sich bei fast jedem Patienten das "Gefühl des Krankseins" (Sickness behavior) ein [35]. Dies beinhaltet unter anderem Apathie, Lethargie, Schwäche, Unwohlsein, kognitive Beeinträchtigungen, Appetitlosigkeit und Schlafstörungen. Zusätzlich verspüren sie eine depressive Verstimmung [36]. Normalerweise werden diese Symptome lediglich als unbequem und banal eingestuft und daher ignoriert [37]. Am Ort der Infektion werden proinflammatorische Zytokine produziert, wie zum Beispiel IL-1α, IL-1β, IL-6 oder TNF-α, die als Mediatoren fungieren und die Symptome des "Sickness behavior" auslösen [35]. Das für diese "depressive Symptomatik" nicht die Infektion oder Entzündung, sondern die Zytokine verantwortlich sind, konnte durch die Tatsache bewiesen werden, dass Hepatitis B oder Hepatitis C positive Patienten, die mit rekombinanten Zytokinen behandelt wurden, Symptome ähnlich einer majoren Depression zeigten [38]. In Übereinstimmung mit dieser Erkenntnis treten depressive Erkrankungen häufiger bei Patienten mit chronischen Entzündungen (z.B. Diabetes mellitus Typ 2, rheumatoide Arthritis) auf, als in der Gesamtpopulation [35]. Maes et al. zeigten, dass die Konzentration proinflammatorischer Zytokine bei depressiven Patienten erhöht ist und folgerten den Zusammenhang zwischen der Krankheit und der Akute-Phase-Reaktion der unspezifischen Immunantwort [39]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte einige Jahre später nachweisen, dass durch Stress ebenfalls vermehrt proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet werden, wodurch es zu einem biochemischen Zusammenschluss von Stress und depressiven Symptomen kam [40].

Um in Tierversuchen ein depressives Verhalten nachzuahmen, können die Tiere ebenfalls mit LPS behandelt werden. Diese Endotoxine gramnegativer Bakterien führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie sie bereits zuvor erwähnt wurden. Im sogenannten "Tail-suspension test" oder dem "Forced-swim test" zeigen die Tiere dann bis zu 24 Stunden nach der LPS Injektion ein depressives Verhalten. Bei beiden Tests wird eine reduzierte Motilität (verringertes Fluchtverhalten) als depressives Verhalten gedeutet. Dies ist von besonderem Interesse, da die motorischen Einschränkungen, die als ein Indikator für das "Sickness behavior" angesehen werden können, ihre maximale Ausprägung nach ca. zwei bis sechs Stunden aufweisen und nach 24 Stunden vollständig verschwunden sind [41]. Somit führt eine Infektion zu einer Immunantwort, wodurch es innerhalb weniger Stunden zu einer erhöhten Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen kommt, die mit dem "Sickness behavior" einhergehen.

Ein Schwerpunkt der PNI Forschung ist der Tryptophanstoffwechsel (siehe Abschnitt 2.3), der unter anderem zur Bildung von Serotonin und Melatonin führt, aber auch den Kynurenin Pathway (KP) beinhaltet, dessen Schlüsselenzyme durch pro- und antiinflammatorische Zytokine gesteuert werden können.

Die Katabolite des KP besitzen zum Teil neurochemische (siehe Abschnitt 2.4) oder immunmodulierende Effekte (siehe Abschnitt 2.5) und sind daher von besonderem Interesse für die Depressionsforschung (siehe Abschnitt 2.6).

2.3 Übersicht über den Tryptophanmetabolismus

Im Jahr 1901 entdeckte Hopkins die essenzielle, proteinogene, aromatische Aminosäure Tryptophan (Trp). Der durchschnittliche Anteil an Trp beträgt im menschlichen Körper ca. 1,2 g pro 100 g Protein und ist damit deutlich niedriger als der Anteil von Lysin (7,6%), Leucine (7,1%) oder Threonin (4,0%) [42]. Trp ist die Ausgangssubstanz für zwei Stoffwechselwege.

Zum einen wird Trp durch das Enzym Tryptophan-Hydroxylase (TPH) in die nicht proteinogene Aminosäure 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) und durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) weiter in den Neurotransmitter Serotonin (5-HT) verstoffwechselt. Eine Inaktivierung des Neurotransmitters erfolgt durch die Metabolisierung zu 5-Hydroxy-Indol-Essigsäure durch die Monoaminoxidase (MAO). Ein weiteres Produkt des serotonergen Arms des Tryptophanstoffwechsels ist das Hormon Melatonin, welches in der Epiphyse gebildet wird und den circadianen Rhythmus steuert [43]. Der serotonerge Arm des Tryptophanstoffwechsels ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

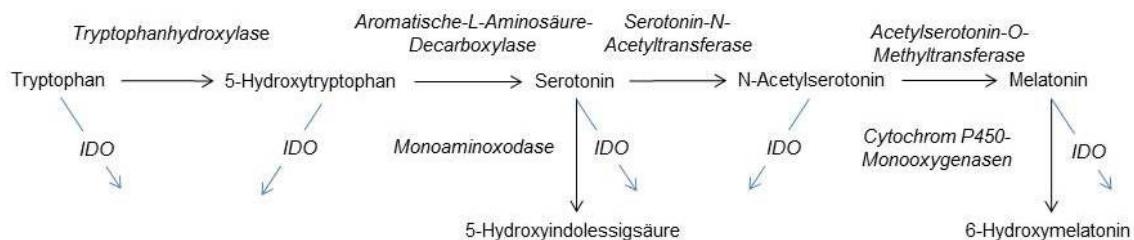


Abbildung 2.2: Der serotonerge Arm des Tryptophanstoffwechsels. Kursiv sind die beteiligten Enzyme dargestellt. Das Enzym Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) metabolisiert unspezifisch alle Indole, wie z.B. Tryptophan, 5-Hydroxytryptophan, Serotonin, N-Acetylserotonin und Melatonin.

Zum anderen werden jedoch über 95% des Tryptophans im zentralen Nervensystem des menschlichen Körpers über den KP verstoffwechselt, dessen Metabolite teilweise einen neuroprotektiven oder neurodegenerativen Einfluss besitzen oder zur Ausbildung von Immuntoleranz führen [44, 45, 46, 47]. Der KP wurde vollständig in Makrophagen, Mikroglia [48] und Neuronen [45] sowie teilweise in Astrozyten nachgewiesen [49]. Der KP und die daran beteiligten Enzyme sind in Abbildung 2.3 dargestellt. Im ersten Schritt des KP katalysieren die beiden Schlüsselenzyme Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) und Indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) die Oxidation von Trp zu N-Formylkynurenin (NFK) [50]. Durch Kynureninformidase (auch als Arylformamidase bezeichnet) wird NFK zu Kynurenin (Kyn) abgebaut. Dabei sind die beiden Enzyme IDO und TDO die geschwindigkeitsbestimmenden Faktoren.

Das zweite Schlüsselenzym IDO ist nicht nur für den Abbau von Trp zu Kyn spezifisch, sondern für alle Indolamine, inklusive 5-HT und Melatonin (siehe Abbildung 2.2). Seine Aktivität wird durch mehrere proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α und IFN- γ) induziert und durch antiinflammatorische

Zytokine (z.B. IL-4 and IL-10) inhibiert [51, 52, 53, 54].

Kynurenin wird durch drei Enzyme metabolisiert. Durch Kynureninaminotransferase (KAT) entsteht Kynureninsäure (KynA), das Enzym Kynurenin-3-Hydroxylase (Kynurenin-3-Monoxygenase, KMO) führt zur Bildung von 3-Hydroxykynurenin (3-HK) [44] und das dritte Produkt der Metabolisierung von Kynurenin ist Anthranilsäure (AA), welche unter dem Einfluss der Kynureninase (KYNU) entsteht. 3-HK und AA können beide zu 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA) degradiert werden, was wiederum unter Beteiligung des Enzyms 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase (HAAO) zur Bildung von Picolinsäure (Pic), einem Isomer der Nicotinsäure, oder Chinolinsäure (Quin) führt [46, 55].

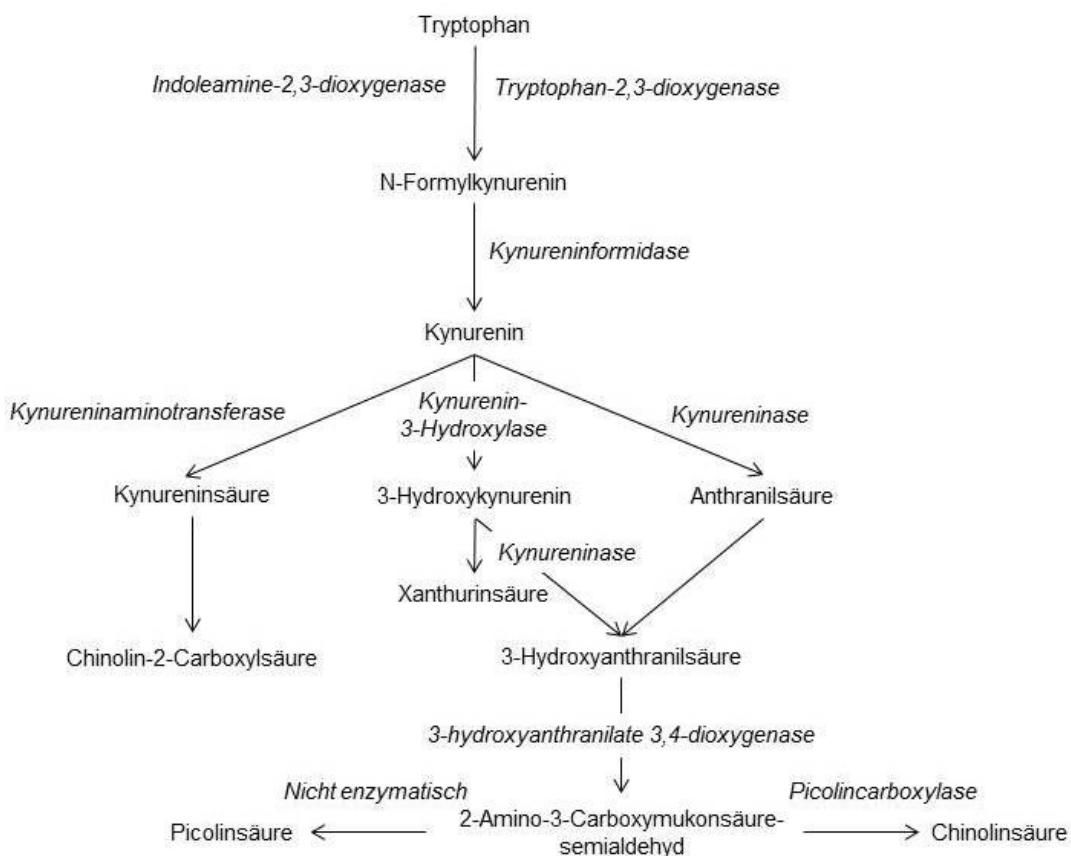


Abbildung 2.3: Der am Tryptophanstoffwechsel beteiligte Kynurenin Pathway. Kursiv sind die beteiligten Enzyme dargestellt. Nicht dargestellt ist die Bildung von Nicotinamidadenindinukleotid mittels Chinolinsäurephosphoribosyltransferase aus Chinolinsäure.

Aus Quin wird mittels Chinolinat-Phosphoribosyltransferase das Vitamin Nicotinamid und letztlich der Kofaktor Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) gebildet und für den Citratzyklus zur Verfügung gestellt [56, 57]. Dabei werden ca. 2% des gesamten Tryptophans in Nicotinamid metabolisiert [58]. Weitere Analyte des KP sind Xanthurinsäure (Xan), gebildet aus 3-HK und Chinolin-2-Carboxylsäure (Quinaldic acid, QuinaldA), gebildet aus KynA. Die Strukturformeln der einzelnen Metabolite des KP sind in der Abbildung 2.4 graphisch dargestellt.

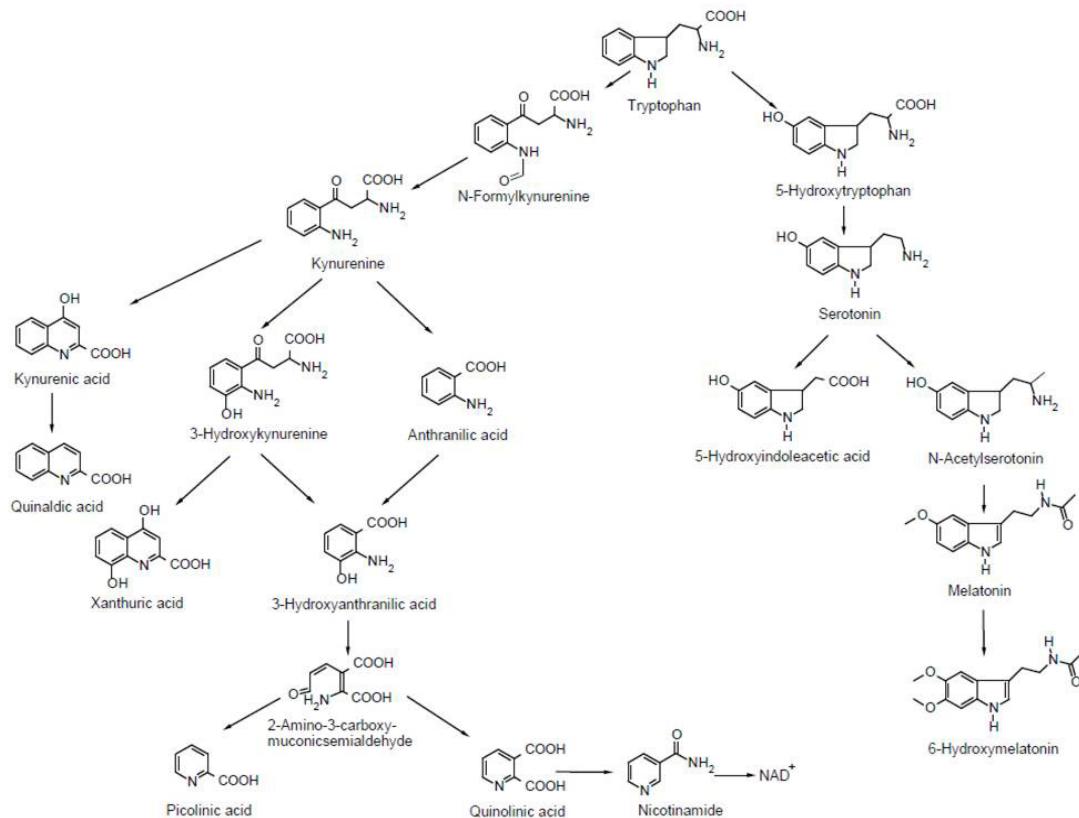


Abbildung 2.4: Die beiden Arme des Tryptophanstoffwechsels. Rechts der serotonerge Arm und auf der linken Seite der Kynurenin Pathway.

In den folgenden Kapiteln wird auf einzelne Metabolite des Tryptophanstoffwechsels und auch auf die neurochemischen und immunmodulierenden Effekte des Kynurenin Pathways eingegangen.

2.3.1 Serotonin

Serotonin (auch 5-Hydroxytryptamin, 5-HT oder Enteramin [59]) entsteht aus Trp durch Hydroxylierung am 5C Atom und Decarboxylierung [60] durch die beiden Enzyme TPH und AADC. Dabei wird als Zwischenprodukt die nicht proteinogene Aminosäure 5-HTP gebildet. 5-HT fungiert als Neurotransmitter und Gewebshormon. Seine älteste bekannte Funktion ist die als Blutgefäße kontrahierende Substanz, woher sich auch der Name ableitet - Serotonin, eine Substanz aus dem Serum, die den Tonus der Blutgefäße kontrahiert [61]. Peripher wird es vor allem in den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut durch TPH1 gebildet. Es wird durch Thrombozyten transportiert und erfüllt außerhalb des ZNS vielfältige Aufgaben, vor allem im Bereich des Herz-Kreislauf-Systems und der Blutgerinnung.

5-HT kann jedoch nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden, weswegen es im ZNS durch TPH2 vor allem in den Raphe-Kernen [62] gebildet werden muss.

Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass 5-HT durch die MAO zu 5-Hydroxyindolacetaldehyd und anschließend durch eine Aldehydreduktase zu 5-HIAA metabolisiert wird. Dies ist bei Säugetieren, nicht aber bei Arthropoden und Mollusken, der bevorzugte Abbaumechanismus. Ein weiterer

sekundärer Abbauweg des Serotonin führt bei Säugetieren zur Bildung von N-Acetylserotonin unter Beteiligung des Enzyms N-Acetyltransferase. Mittels Hydroxyindol-O-Methyltransferase entsteht daraus in der Epiphyse das Hormon Melatonin, welches den circadianen Rhythmus steuert [63].

2.3.2 IDO

Indoleamine-2,3-dioxygenase katalysiert in dem ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des KP die sauerstoffabhängige Oxidation von Tryptophan zu NFK durch Spalten der C2-C3 Bindung [64]. Das Verhältnis von Kyn zu Trp (Kyn/Trp) gibt Auskunft über die Aktivität der Dioxygenase. Im Gegensatz zur TDO katalysiert die IDO nicht nur Tryptophan, sondern alle Indolamine, zu denen unter anderem auch 5-HTP, 5-HT und Melatonin gehören (siehe Abbildung 2.2). Somit führt eine gesteigerte IDO-Aktivität auf der einen Seite zur vermehrten Bildung von Kyn und dessen Metaboliten, auf der anderen Seite zu einem gesteigerten Abbau von 5-HTP und 5-HT. Aufgrund dieser Veränderungen im Stoffwechsel wird vermutet, dass es im ZNS zu niedrigeren Spiegeln von 5-HT kommt. Im Detail verstoffwechselt IDO nicht nur Trp zu NFK, sondern auch 5-HTP zu Formyl-5-Hydroxytryptophan, 5-HT zu Formyl-5-Hydroxytryptamin und Melatonin zu N-Acetyl-5-Methoxykynuramin [65].

IDO wird in allen Gewebetypen des menschlichen Körpers, vor allem aber in der Plazenta und den Tonsillen, sowie in einer Vielzahl von Zellen des Blutes exprimiert. Dazu gehören unter anderem Fibroblasten, Dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Mikroglia. Die Aktivität der IDO kann durch die Zytokine IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2 und TGF- β induziert und durch die Zytokine IL-4 und IL-13 inhibiert werden [49, 46, 66]. Den stärksten Effekt besitzt dabei das proinflammatorische IFN- γ , welches auch die Enzyme KMO und KYNU induziert.

Wenn bei Experimenten eine generelle Immunreaktion ausgelöst, jedoch aufgrund der Fragestellung nicht einzelne Zytokine verwendet werden sollen, muss ein alternatives reproduzierbares Stimulans verwendet werden. Für die Simulation einer bakteriellen Infektion hat sich der Einsatz von LPS bewährt. LPS ist in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten und wird beim Zerfall von Bakterien freigesetzt. Wenn sie durch eine Infektion in das Blut gelangen, bilden sie mit dem Lipopolysaccharid-bindenden Protein (LBP) einen Komplex, der wiederum an den Membranrezeptor CD14 bindet. Dadurch wird über NF- κ B die Freisetzung von TNF- α und IL-1 β induziert. Es kommt zu einer positiven Selbstverstärkung, da durch TNF vermehrt CD14 exprimiert wird. Bei *in vitro* und *in vivo* Experimenten wird LPS verwendet, um eine Immunantwort auf eine bakterielle Infektion zu forcieren. Für den KP ist LPS von Interesse, da IDO durch die LPS-induzierten Zytokine TNF- α und IL-1 β , unabhängig von einem IFN- γ -abhängigen Mechanismus, aktiviert werden kann [67, 68, 69]. In einem Tiermodell mit deutschen Hausschweinen konnten Wirthgen et al. zeigen, dass eine Stunde nach einer LPS-Injektion die Konzentrationen an TNF- α und IL-10 signifikant angestiegen und nach drei Stunden wieder auf ihre Ausgangswerte zurückgegangen sind. Die Trp-Konzentrationen wurden auch nach 24 Stunden signifikant erniedrigt gemessen. Dass die IDO-Aktivität verstärkt wurde, zeigten auch erhöhte Werte von Kyn, KynA und Quin sechs Stunden nach der LPS-Injektion. Durch eine Western Blot-Analyse wurde die erhöhte IDO-Exprimierung im Blutplasma bestätigt [70]. Moon et al. konnten in ihren Zellkulturexperimenten einen signifikanten Anstieg von Kynurenin 72 Stunden nach einer LPS-Stimulation nachweisen [71]. Jedoch wird durch LPS auch vermehrt KMO exprimiert [69, 72].

2.3.3 TDO

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurde das Enzym IDO in vielen Geweben nachgewiesen. Das zytosolische Enzym Tryptophan-2,3-dioxygenase verstoffwechselt hochspezifisch Tryptophan und verwandte Derivate, wie 6-Fluortryptophan [73]. Tryptophan wird dabei zu NFK, dem Vorläufer von Kyn, oxidiert. TDO wird, im Gegensatz zur IDO, hauptsächlich in der Leber produziert [50]. Es wird auch im Zytosplasma von Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen, nicht jedoch in Mikroglia exprimiert [45]. Nach einer Stimulation, beispielsweise mit Steroidhormonen, kann es jedoch auch in der Placenta [74], dem Uterus schwangerer Frauen [75], in Hoden und Nebenhoden [76] nachgewiesen werden. Das Enzym besteht aus einem Homotetramer und bindet zwei Moleküle Häm. Seine Aktivität wird durch Glucocorticoide, wie z.B. Cortisol, induziert [27].

Eine Überaktivierung der TDO, z.B. durch chronisch erhöhte Cortisolspiegel, kann zur Entstehung von Krebs beitragen. Dies wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in 41% der Blasenkarzinome, 50% der Melanome und 100% der heptozellulären Karzinome das Gen für TDO expressioniert wird [77]. Interessanterweise kann eine verringerte TDO-Expression beobachtet werden, wenn IDO durch IFN- γ aktiviert wird. Umgekehrt ist die TDO-Aktivität gesteigert, wenn kein IDO exprimiert wird. Dies deutet auf einen noch unbekannten Regulationsmechanismus zwischen der Aktivität der IDO und der TDO hin [45].

2.3.4 Kynurenin

Im ersten Schritt des KP katalysieren die beiden Schlüsselenzyme TDO und IDO die Oxidation von Trp zu NFK [50]. Durch Kynureninformidase (auch als Arylformamidase bezeichnet) wird NFK zu Kynurenin abgebaut. Lange Zeit wurde angenommen, dass Kyn nahezu biologisch inaktiv ist. Kürzlich konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Kyn ein endogener Ligand des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) ist [78]. Der AhR ist als Transkriptionsfaktor im Zytosol und Zellkern an der Kontrolle des Zellwachstums und der Differenzierung beteiligt und wird durch die Bindung aromatischer Kohlenwasserstoffe, wie Dioxinen oder polychlorierten Biphenylen, aktiviert. Dadurch wird die Bildung von Enzymen aus der Cytochrom P450 Familie eingeleitet, die für den Abbau von Xenobiotika in der Leber zuständig sind. Kyn könnte somit als endogener Ligand am AhR den Organismus vor Schäden durch Chemikalien schützen. Die Expression des AhR wurde in fast allen Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems nachgewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass Makrophagen mit intaktem AhR nach einer Stimulation mit LPS weniger proinflammatorische Zytokine ausschütten als Makrophagen, denen der AhR fehlt [79]. Dendritische Zellen (DC) stellen eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar. Sie präsentieren den naiven T-Lymphozyten (T-Zellen) Antigene. Ob DCs primär einen immunstimulierenden oder immunsuppressiven Phänotyp zeigen, bestimmt die Reaktion der T-Zellen. LPS vermittelt ebenfalls die Expression des AhR in DC, wodurch IDO induziert wird [47]. Bei der gleichzeitigen Kultur von AhR $^{-/-}$ DCs und naiven T-Zellen konnte nach Zugabe von Kynurenin eine verstärkte Differenzierung in antiinflammatorische regulatorische T-Zellen beobachtet werden [80]. Somit führt Kynurenin durch Bindung an den AhR der DCs zu einer antiinflammatorischen Reaktion. Dies reduziert auch die Erkennung von Tumoren, wodurch die Aktivierung des AhR durch Kyn zu erhöhtem Wachstum, Migration und zur Bildung von Metastasen führt [81]. Da verstärkt Kyn durch die IFN- γ und TNF- α aktivierte IDO

produziert wird, könnte durch diesen Mechanismus erklärt werden, weshalb eine chronische Entzündung zur Entstehung von Krebs führt.

Obwohl der Tryptophankatabolismus in Astrozyten und Mikroglia erfolgt, werden 60% des cerebralen Kynurenins aus dem peripheren Blut bezogen [82].

2.3.5 Kynureninsäure

Durch Deaminierung entsteht Kynureninsäure aus Kyn. Diese Reaktion wird im Gehirn von Säugetieren durch vier Enzyme aus der Familie der Kynureninaminotransferasen katalysiert [83]. Da in menschlichen Astrozyten das Enzym KMO nicht vorhanden ist, kann in ihnen nicht die Metabolisierung von Kyn zu 3-HK und weiter zu Quin stattfinden [84]. Somit kommt es in Astrozyten zu einer Ansammlung von KynA.

KynA wird im KP weiter zu Chinolin-2-Carboxylsäure (Quinaldic acid) verstoffwechselt. Bis vor kurzem gab es keine Beweise dafür, dass dieser metabolische Schritt auch im Menschen stattfindet. Jedoch wurde kürzlich Chinolin-2-Carboxylsäure als ein potentieller Biomarker für die Diagnostik von Leberkarzinomen entdeckt und diskutiert [85]. Nach wie vor gibt es jedoch keinen Nachweis für die Entstehung von Chinolin-2-Carboxylsäure im ZNS.

KynA ist der bisher einzige bekannte endogene NMDA-Rezeptor-Antagonist und bindet dabei sowohl an glutamaterge, als auch an Glycinbindungsstellen des Rezeptors. Zusätzliche ist KynA ein nichtkompetitiver Inhibitor des $\alpha 7$ -nikotinischen Acetylcholinrezeptors ($\alpha 7\text{nAChR}$) [66, 47, 86]. Wahrscheinlich ist der $\alpha 7\text{nAChR}$ der primäre Rezeptor für endogene KynA im Gehirn, wodurch eine Inhibierung der KynA-Synthese zu einem Anstieg der Neurotransmitter Acetylcholin, Glutamat (Glutaminsäure) und Dopamin führt [87].

Es wurde gezeigt, dass KynA im Gehirn von Ratten hauptsächlich durch Astrozyten synthetisiert wird und in unmittelbarer Nähe von glutamatergen Synapsen freigesetzt wird, vermutlich um die neurotoxischen Effekte von exzitatorischen Aminosäuren zu reduzieren [88]. KynA ist ein Ligand des G-Protein-gekoppelten Rezeptors 35 (GPR35). GPR35 wird stark von CD14+ Monozyten, T-Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Dendritischen Zellen exprimiert. In geringerem Ausmaß wird GPR35 auch von B-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten expressioniert. Durch die Bindung an GPR35 inhibiert KynA die LPS-induzierte TNF- α -Sekretion in mononukleäre Zellen des peripheren Blutes [89]. Im Gehirn kann TNF- α durch Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und Neurone synthetisiert werden und ist ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese neurotoxischer und neurodegenerativer Erkrankungen. Die Inhibierung der TNF- α -Sekretion ist daher ein wichtiger Faktor der Neuroprotektion durch KynA. Wenn der Tryptophanmetabolismus durch proinflammatorische Zytokine aktiviert wird, so stellt der antiinflammatorische Effekt der KynA eine Rückkopplung dar, die den proinflammatorischen Effekten entgegenwirkt [46, 45]. Auch ist KynA durch seine neuroprotektiven Eigenschaften der Gegenspieler zu dem potentiellen Neurotoxin Chinolinsäure, da es die cholinerge Toxizität der Chinolinsäure im Tiermodell (gleichzeitige Injektion von Quin und Inhibitoren in den Nucleus basalis von Ratten) aufheben kann [55]. Ähnliches konnte in dem Experiment neben KynA auch für PIC gezeigt werden; der neuroprotektive Mechanismus der PIC ist noch nicht geklärt, sie konkurriert jedoch nicht mit Quin am NMDA-Rezeptor.

In einer Tierstudie konnte nachgewiesen werden, dass durch Stress die Konzentration an KynA in der

Amygdala reduziert wird [27]. Neben Kyn ist auch KynA ein Agonist des AhR [90] und induziert somit die Expression des Zytokins IL-6.

Da die Konzentrationen von KynA bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Huntington (HD) oder Alzheimer-Erkrankung (AD), erniedrigt sind, könnte KynA der Ansatz für eine neuroprotektive Behandlung sein [83]. Die therapeutischen Eigenschaften der KynA als neuroprotektiver Wirkstoff sind jedoch stark limitiert, da KynA kaum die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann [91]. In deutlich größerer Menge kann Kyn die Blut-Hirn-Schranke überwinden, wodurch es wahrscheinlich erscheint, dass ein Anstieg von KynA im Gehirn nur durch Steigerung der KAT-Aktivität erzielt werden kann, oder das Gleichgewicht zwischen Neuroprotektion und Neurodegeneration durch eine Reduktion der degenerativen Komponenten des KP erzielt werden muss (siehe Abschnitt 2.3.6).

2.3.6 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxykynureninsäure und Cinnabarinsäure

Unter Beteiligung des Enzyms KMO wird 3-Hydroxykynurenin aus Kyn gebildet [44]. 3-HK wird entweder durch das Enzym KYNU zu 3-Hydroxyanthranilsäure, oder aber zu Xanthurinsäure abgebaut.

3-HK ist ein endogenes Neurotoxin, dessen Konzentration in einigen neurodegenerativen Erkrankungen als erhöht beschrieben wird. In Zellkulturversuchen zeigten 3-HK und in geringerem Ausmaß auch 3-HAA ihre Toxizität gegenüber primären Neuronenkulturen aus dem Corpus striatum. Dabei konnte die Toxizität durch den Einsatz verschiedener Antioxidanzien inhibiert werden. Daraus kann gefolgert werden, dass 3-HK und 3-HAA zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Der 3-HK-induzierte Zelltod zeigt mehrere Funktionen der Apoptose. Die Toxizität von 3-HK ist abhängig von seiner Aufnahme in die Zelle durch neutrale Aminosäuretransporter, da die Blockade der Transporter die Toxizität unterbindet [92, 93]. Eine andere Forschergruppe konnte zeigen, dass Astrozyten aufgrund des Fehlens von KMO kein 3-HK produzieren können [49].

Interessanterweise haben Krause et al. beschrieben, dass 3-HAA die Expression von Zytokinen und Chemokinen in Mikroglia reduziert und den zytokininduzierten neuronalen Zelltod minimiert [94]. Leipnitz et al. schreiben, dass 3-HK und 3-HAA eine antioxidative Funktion besitzen. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass im cerebralen Cortex von Ratten durch diese beiden Metabolite die Bildung von Peroxidradikalen herabgesetzt wird [95]. Offenbar ist die Rolle dieser beiden Substanzen bisher durch die Literatur nicht eindeutig geklärt.

Die Inhibierung des Enzyms KMO ist von besonderem Interesse, da dadurch das Gleichgewicht zwischen Neuroprotektion und Neurodegeneration zugunsten der neuroprotektiven KynA verschoben werden kann. Ein in Tierexperimenten verwendeter Inhibitor der KMO ist die Substanz UPF 648, die zum Anstieg von KynA und Kyn im Plasma und Gehirn führt [96]. Des Weiteren führt eine KMO-Inhibierung durch UPF 648 zu einer Verminderung der neurodegenerativen Metabolite 3-HK und Quin.

An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass 3-HAA nicht nur durch das Enzym 3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase zu 2-Amino-3-Carboxymukonsäuresemialdehyd verstoffwechselt wird, sondern auch durch oxidative Dimerisierung Cinnabarinsäure (CinA) entstehen kann (siehe Abbildung 2.5). Obwohl CinA als Pigment in Pilzen und Insekten gut charakterisiert wurde [97], ist bisher kaum etwas über die humanbiologische Funktion dieses Nebenprodukts des KP bekannt. In Experimenten mit mononukleären Zellen des peripheren Blutes nach einer IFN- γ -Stimulation konnten um das Fünffache erhöhte 3-HAA Spiegel

detektiert werden. Jedoch wurde kein Anstieg von CinA festgestellt. Auch nach Zugabe von 3-HAA wurden nur sehr geringe Mengen zu CinA umgesetzt [98]. Kürzlich konnte CinA bei Ratten in der Lunge, der Leber, der Milz und den Nieren, jedoch nicht im Gehirn nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe konnte aber zeigen, dass CinA nach einer Stimulation mit LPS im Gehirn nachgewiesen werden kann. Des Weiteren konnte CinA als ein partieller Agonist des Typ 4 metabotropen Glutamatrezeptors (metabotroper Glutamatrezeptor Gruppe III) identifiziert werden [99]. Die Oxidation von 3-HAA zu CinA kann durch das Enzym Laccase, welches in vielen Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen vorkommt, katalysiert werden [100]. Wie auch die Laccase gehört die Oxidas Caeroloplasmin zu der Gruppe der blauen Kupferoxidinasen und kann bei Säugetieren ebenfalls 3-HAA zu CinA umwandeln.

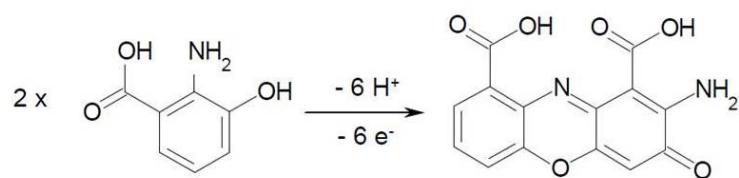


Abbildung 2.5: Entstehung von Cinnabarinsäure aus 3-Hydroxyanthranilsäure.

2.3.7 Xanthurinsäure

Die oxidative Ringöffnung von Trp führt zur Bildung von Kyn, dem Ausgangspunkt des KP. Durch Hydroxylierung entsteht aus Kyn 3-HK. Beide Trp Metabolite, Kyn und 3-HK, können nun durch Transaminierung mittels unspezifischer Kynureninaminotransferasen weiter verstoffwechselt werden. Aus Kyn entsteht so die KynA, aus 3-HK wird Xanthurinsäure gebildet [65]. Beide Substanzen besitzen eine relativ ähnliche Struktur (siehe Abbildung 2.4), sodass Xan auch als 3-Hydroxykynureninsäure bezeichnet werden kann. Obwohl die neurochemischen Effekte der KynA bisher gut erforscht wurden, konnte lange kein Beweis für die neuroaktive Funktion von Xan erbracht werden. Hingegen wurde vermutet, dass die Bildung von Xan einer erhöhten Konzentration des endogenen Neurotoxins 3-HK entgegenwirken soll [101].

Gobaille et al. konnten nachweisen, dass Xan unter physiologischen Bedingungen im Gehirn von Säugetieren gebildet wird und je nach Gehirnregion auch in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt. Dabei ist zu beachten, dass eine periphere Gabe von Xan zu einem cerebralen Konzentrationsanstieg führt, was den Schluss zulässt, dass Xan über die Blut-Hirn-Schranke in das Hirnparenchym übertragen kann. Dabei scheint der Präfrontale Cortex von besonderem Interesse zu sein, da sich hier besonders viel exogenes Xan ansammelt. Auch konnte die Substanz in synaptischen Vesikeln nachgewiesen werden, wenn auch der exakte Mechanismus zur Aufnahme und Freisetzung nicht erklärt werden konnte [86]. Copeland et al. identifizierten *in vivo* Xan als vermeintlichen Liganden des Gruppe II metabotropen Glutamatrezeptors [102] und konnten somit *in vitro* Versuche bestätigen. Dies bedeutet, dass Metabolite des KP sowohl an metabotrope (Xan), als auch an ionotrope (KynA als Antagonist und Quin als Agonist des NMDA-Rezeptors) Glutamatrezeptoren binden können. Eine weitere Forschungsgruppe vermutet hingegen die Existenz eines Xan-spezifischen neuronalen G-Protein-gekoppelten Rezeptors, da in ihren Versuchen Glutamat nur einen geringen Einfluss auf die Bindung von Xan besaß [103]. Auf jeden Fall ist

Xan ein potentiell neurochemisch interessanter Metabolit des KP, dessen genaue Bedeutung noch nicht ergründet ist.

2.3.8 Chinolinsäure

Das exzitotoxische Neurotoxin Chinolinsäure ist ein Agonist des NMDA-Rezeptors und wohl der bedeutendste Metabolit des KP. Sein Vorläufer ist die 3-HAA, die durch das Enzym KYNU zu 2-Amino-3-carboxymuconat-semialdehyd und ohne enzymatischen Einfluss weiter zu Quin verstoffwechselt wird. Abgebaut wird Quin durch das Enzym Quinolinat-phosphoribosyltransferase zu Nicotinamidadenindinukleotid. Quinolinat-phosphoribosyltransferase kann durch das proinflammatorische Zytokin IFN- γ induziert werden [49].

Die Gruppe um Guillemin zeigte, dass der Großteil an Quin durch Monozyten produziert wird. Die Konzentration von Quin ist im Plasma wesentlich größer als im Gehirn, jedoch steigt die Konzentration im Gehirn mit der peripheren Quin-Konzentration an, da vermutlich die Diffusion durch die BBB zunimmt [104]. Das Gehirn ist jedoch durch die BBB gut gegen periphere Quin geschützt, wie Untersuchungen nach intraarteriellen Injektionen zeigten, da nur ein verhältnismäßig kleiner Anteil in das Gehirn einwandert [105]. Die im Gewebe lokalisierten Makrophagen besitzen die Möglichkeit, die 20- bis 30-fache Menge an Quin zu produzieren, als die mit ihnen verwandten und im Gehirn lokalisierten Mikrogliazellen [48]. Dahingegen fehlt Astrozyten das Enzym KMO, wodurch große Mengen an Kyn und dem Chinolinsäureantagonisten KynA gebildet werden [49]. Durch diese Reduktion der Quin-Konzentration und gleichzeitiger Kumulierung von Kyn und neuroprotektiver KynA wirken Astrozyten alleine neuroprotektiv. Jedoch ist es möglich, dass sie indirekt neurotoxisch wirken, da die erhöhten Konzentrationen an Kyn zu einer erhöhten Produktion an Quin in den benachbarten Mikroglia führen. Quin greift in das Immunsystem ein, indem es gemeinsam mit dem Vorläufer 3-HAA die Initiator-Caspase-8 aktiviert, wodurch Cytochrome C aus Mitochondrien freigesetzt und die Apoptose von TH1-Zellen induziert wird [106].

In exzitotoxischen Konzentrationen fördert Quin die Freisetzung einiger Chemokine und proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 β und Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1). Dies spricht dafür, dass Quin Entzündungen im zentralen Nervensystem einleiten oder verstärken kann, wenn sie, wie z.B. bei der Alzheimer-Erkrankung, bereits ausgelöst wurden [47]. So wurden in den Amyloid-Plaques von an Alzheimer-Demenz erkrankten Patienten hohe Konzentrationen an Quin nachgewiesen [107] und gezeigt, dass Quin die Dephosphorylierung der Tau-Proteine unterbindet [108].

2.4 Neurochemische Effekte des Kynurein Pathways

Wie zuvor beschrieben, entsteht durch die oxidative Ringöffnung von Trp Kyn, welches zu 3-HK hydroxyliert werden kann. Durch Transaminierung mittels unspezifischer KAT entstehen nun die beiden Metabolite KynA (aus Kyn) und Xan (aus 3-HK) [65]. KynA ist der bisher einzige bekannte endogene Antagonist des NMDA-Rezeptors und zusätzlicher nichtkompetitiver Inhibitor des α 7-nikotinischen Acetylcholinrezeptors (α 7nAChR) [47, 66]. Das Enzym KMO hingegen führt zur Bildung des neurotoxischen Metaboliten 3-HK [44]. Das dritte Produkt der Metabolisierung von Kyn ist AA, welche unter dem Einfluss der KYNU

entsteht. 3-HK und AA können beide zu 3-HAA degradiert werden.

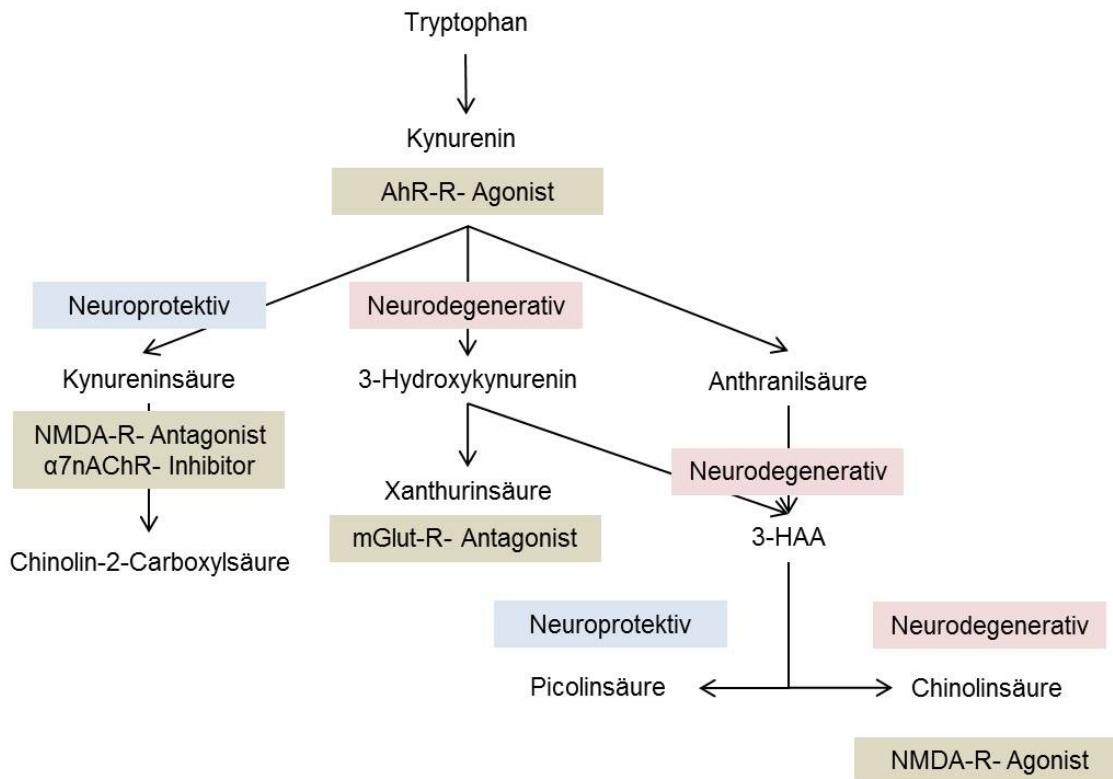


Abbildung 2.6: Neurochemische Effekte des Kynurenin Pathways.

Somit sind im Zusammenhang mit dem Kynurenin Pathway die glutamatergen Rezeptoren von besonderer Bedeutung. KynA fungiert als Antagonist am ionotropen NMDA-Rezeptor. Xan wird hingegen als Ligand des Gruppe II metabotropen Glutamatrezeptors [102] mit antagonisierender Wirkung diskutiert. Da es durch Abbau des Neurotoxins 3-HK entsteht, besitzt es eine entgiftende und damit eine indirekt-neuroprotektive Wirkung. Jedoch entstehen im KP nicht nur Antagonisten des Glutamatrezeptors, sondern durch die Verstoffwechslung von 3-HAA kann auch der potente neurodegenerative NMDA-Rezeptor-Agonist Quin gebildet werden. 3-HAA muss jedoch nicht zwangsläufig zu Quin verstoffwechselt werden, es kann auch die neuroprotektive Pic daraus gebildet werden [55]. Lapin zeigte bereits 1978, dass Quin nach intracerebroventrikulären Injektionen zu Krampfanfällen bei Mäusen führt [109]. Stone und Perkins konnten 1981 nachweisen, dass Quin ein Agonist des NMDA-Rezeptors ist, und in seiner Aktivität an diesem Rezeptor in etwa Glutamat und Aspartat entspricht [110]. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, dass Quin nur langsam aus dem synaptischen Spalt entfernt werden kann, da die Chinolinsäurephosphoribosyltransferase sehr schnell gesättigt ist. Dadurch kommt es zu einer beträchtlichen Schädigung. Schwarcz et al. zeigten wiederum, dass Quin zu selektiven neuronalen Läsionen führt [111]. Zusätzlich generiert Quin reaktive Sauerstoffspezies, wodurch in Gegenwart von Eisenionen zelluläre Lipide oxidiert werden [112]. Zwar ist das Gehirn relativ gut gegen periphere Quin geschützt [105], aber die Vorläufersubstanzen Kyn und 3-HK können durchaus die Blut-Hirn-Schranke durchwandern und stehen dort einer intracerebralen Chinolinsäuresynthese als Substrate zur Verfügung [54].

Es stehen sich im KP also neuroprotektive und neurodegenerative Substanzen auf der einen Seite, auf

der anderen Seite Antagonisten und Agonisten am Glutamatrezeptor gegenüber.

Ein Anstieg der Konzentrationen von KynA und Quin wurde bei einigen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen beobachtet, wie z.B. bei der Alzheimer-Erkrankung, Schizophrenie, Depression, Autismus und bei der Huntington-Erkrankung [66, 113, 114, 115, 116, 117].

2.5 Immunmodulierende Effekte des Kynurein Pathways

Nicht nur die Metabolite des Kynurein Pathways, sondern auch das Schlüsselenzym IDO besitzt eine immunregulierende Wirkung. Einen allgemeinen Effekt auf das Immunsystem besitzt IDO durch die lokale Tryptophan-Depletion. So kann durch Zugabe von IFN- γ zu *Toxoplasma gondii* in Zellkulturen IDO induziert werden, wodurch vermehrt die essenzielle Aminosäure Trp abgebaut wird und der Mangel an Trp das Wachstum von *Toxoplasma gondii* inhibiert [118].

Lange war unklar, weshalb ein Fötus nicht abgestoßen wird, obwohl er zur Hälfte aus körperfremden Proteinen besteht. Die Frage konnte beantwortet werden, als beobachtet wurde, dass es nach Gabe der Substanz 1-Methyltryptophan zur Abstoßung der Föten bei trächtigen Ratten kam. Bei der Substanz handelt es sich um einen spezifischen IDO-Inhibitor, sodass ein direkter Zusammenhang von IDO-Aktivität und Abstoßungsreaktion nachgewiesen wurde. Die Erklärung dafür ist, dass die Plazenta normalerweise die IDO-Aktivität hochreguliert, um im Gewebe niedrige Trp-Konzentrationen zu erlangen. Durch die niedrige Trp-Konzentration wird die Aktivität und Proliferation mütterlicher T-Lymphozyten inhibiert, die ansonsten den allogenetischen Fötus töten würden. Während der Schwangerschaft wird die IDO-Aktivität durch Hormone induziert und somit der Fötus geschützt [119, 120]. Feng et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass in Serumproben schwangerer Frauen signifikante Änderungen des KP festzustellen sind. Diese Änderungen sind durch die gesteigerte IDO Aktivität zu erklären [121].

Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass Frauen, deren KynA-Konzentrationen im Serum erhöht sind, wahrscheinlicher an Präeklampsie (eine hypertensive Erkrankung während der Schwangerschaft, die mit einer Proteinurie einhergeht) erkranken, als diejenigen mit durchschnittlichen Konzentrationen. Dies konnte jedoch für keinen anderen Metaboliten aus dem Tryptophanstoffwechsel gezeigt werden [122]. In einer anderen Studie wurde nachgewiesen, dass bei dieser Schwangerschaftskomplikation das Verhältnis von Kyn zu Trp verringert ist [123] und auch vermehrt Xan nach Tests mit gesteigerter Tryptophanaufnahme im Urin ausgeschieden wird [124]. Dies deutet darauf hin, dass die gesteigerte Aktivität der IDO während der Schwangerschaft nicht nur zu lokalen, sondern auch zu systemischen Veränderungen im Tryptophanstoffwechsel führt [125].

Der immunsuppressive Effekt der IDO scheint jedoch hauptsächlich das Produkt der erhöhten Konzentrationen einzelner Produkte des KP zu sein. Quin und 3-HAA aktivieren die Initiator-Caspase-8, wodurch Cytochrom C aus Mitochondrien freigesetzt und spezifisch die Apoptose von TH1-Zellen induziert wird [106]. Dies konnte im Mausmodell für TH1-Zellen, jedoch nicht für TH2-Zellen nachgewiesen werden. Die Immunsuppression wurde auch in humanen T-Zellen beobachtet. Durch die Substanzen 3-HK und 3-HAA können ebenfalls B-Lymphozyten (B-Zellen), T-Lymphozyten (T-Zellen) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen) beeinflusst werden. Terness et al. zeigten, dass die Proliferation der T-Zellen durch diese Substanzen unterdrückt wird und nicht wieder aktiviert werden kann. Die Arbeitsgruppe vermutet, dass diese Effekte darauf zurückgeführt werden können, dass die aufgeführten Katabolite des

Trp-Stoffwechsels in höheren Konzentrationen zytotoxisch für CD3(+) -Zellen sind. Neben den T-Zellen, werden auch noch B-Zellen und NK-Zellen durch die zytotoxischen Substanzen getötet. Dendritische Zellen werden hingegen nicht beeinflusst [126]. Auch durch die Reifung von DC können Enzyme des KP aktiviert werden, wodurch es zu einem Anstieg der neurochemisch aktiven Substanzen Kyn, 3-HK und 3-HAA kommt [127].

Ein weiterer Metabolit der 3-HAA ist die Pic. Sie gilt als neuroprotektiv und führt zu einer von IFN- γ abhängigen, gesteigerten Genexpression in Makrophagen [128]. Auch führt sie zu einer selektiv induzierten Expression von macrophage inflammatory protein 1 α und 1 β [129]. In Zellkulturversuchen konnte gezeigt werden, dass hohe Pic-Konzentrationen das Wachstum einer Reihe von Viren inhibieren können. Dazu gehört unter anderem HIV, Herpes Simplex und Simian Virus [130, 131]. Es wurden sowohl ein antibakterieller Effekt von Pic gegenüber Mycobakterium Avium, als auch eine potenzierende Wirkung in Kombination mit Antibiotika in der Literatur erwähnt [132, 133]. In vivo Experimente konnten zeigen, dass Ratten, denen Tumorzellen injiziert wurden, bei einer Behandlung mittels Pic Injektionen eine signifikant erhöhte Lebensdauer zeigen, da die Aktivität ihrer Makrophagen erhöht wurde [134]. Auch konnte gezeigt werden, dass Pic das Wachstum von humanen Neuroblastom-Zelllinien inhibiert [45].

Die IDO-vermittelte Inhibierung von TH1-Zellen führt zu einem selektiven Überleben der TH2-Zellen und beschreibt eine negative Kontrollfunktion der Immunsuppression: Eine erhöhte Zahl an TH1-Zellen nach Antigen Stimulation der DC führt zu einer gesteigerten Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IFN- γ , wodurch IDO aktiviert und die Aktivität der TH1-Zellen supprimiert und deren Apoptose eingeleitet wird. Ein weiterer Weg der Kontrollfunktion ist der, dass die IDO-Expression zu einer gesteigerten Bildung von regulatorischen T-Zellen führt, wodurch die T-Zell Aktivität inhibiert wird [120].

Die Proliferation und Funktion der NK-Zellen des angeborenen Immunsystems können durch die beiden IDO-induzierten Metabolite des KP Kyn und Pic inhibiert werden [135]. Kyn kann auch, vermittelt durch reaktive Sauerstoffspezies, zur Apoptose von NK-Zellen führen. Abhängig von der Kyn-Konzentration kommt es in der Zellkultur zu reduziertem Zellwachstum oder zur Apoptose. Dieser Effekt des Kyn kann durch die gleichzeitige Inkubation mit dem Antioxidans N-Acetylcystein vollständig unterbunden werden [136]. Der Effekt scheint sich jedoch auf die NKp46- und NKG2D-aktivierenden Rezeptoren zu beschränken [137].

2.6 Der Tryptophanstoffwechsel in der Depressionsforschung

Am Beispiel der Depression kann gezeigt werden, wie Zytokine, das Immunsystem und neurochemisch aktive Substanzen des Kynureninstoffwechsels interagieren.

Es wurde der Zusammenhang einer Dysregulation der Serotonin-Transmission mit einer Vielzahl an psychiatrischen Erkrankungen, wie Depression, gesteigerte Aggressivität, Psychosen und Angststörungen berichtet [63, 138, 139]. Eine entscheidende Rolle spielt der Mangel an 5-HT bei depressiven Erkrankungen. So konnte an Patienten, die sowohl an Tuberkulose, als auch an Depression litten, gezeigt werden, dass das gegen Tuberkulose entwickelte und verabreichte Medikament Iproniazid eine antidepressive Wirkung besitzt. Diese Wirkung wurde durch die Inhibition des Enzyms Monoaminooxidase erzielt, wodurch 5-HT nicht zu 5-HIAA verstoffwechselt wurde und es zu einem Anstieg der 5-HT-Konzentrationen kam [140]. Heute sind MAO-Hemmer als Antidepressiva weit verbreitet. In Tierstudien konnten bei Mäusen

mit fehlendem MAO-Gen gesteigerte Spiegel von 5-HT und Noradrenalin im Gehirn gemessen werden. Die Jungtiere zeigten dabei ein ängstliches Verhalten und die ausgewachsenen Tiere ein gesteigertes Aggressionsverhalten. Diese Wirkung konnte durch den Serotonin syntheseinhibitor Parachlorophenylalanin aufgehoben werden [141]. Beide Beispiele zeigen, dass der ausgeglichenen 5-HT Spiegel für eine gesunde Psyche wichtig ist und Synthese und Abbau in einem Gleichgewicht stehen müssen.

Neben der erörterten Serotonin-Mangelhypothese [33] entstanden in den letzten Jahren mehrere Modelle, die zeigen, dass nicht nur der reine Mangel an 5-HT, sondern auch eine Dysbalance im KP, bzw. eine Dysbalance im Zytokinhaushalt, mit depressiven Erkrankungen korrelieren. So konnte in klinischen Studien gezeigt werden, dass Patienten, die an einer schweren Depression leiden, erhöhte proinflammatorische Zytokinkonzentrationen und eine Hypercortisolämie aufweisen [27, 142]. Das Glucocorticoid Cortisol aktiviert das Enzym TDO, welches den Abbau von Trp zu N-Formylkynurenin katalysiert. Cortisol ist ein Hormon, welches durch das endokrine System freigesetzt wird und beispielsweise bei Menschen mit chronischem Stress erhöht ist. Durch Stress wird nicht nur vermehrt Cortisol ausgeschüttet, sondern auch in gesteigertem Maße proinflammatorische Mediatoren und reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die ebenfalls zu einem gesteigerten Trp-Abbau führen [143]. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass es durch unvorhersagbaren, chronischen, milden Stress (unpredictable chronic mild stress - UCMS) zu einer vermehrten Bildung von Kyn und dessen Metaboliten kommt [144, 27]. Dabei wurden die peripheren Trp- und KynA-Konzentrationen nicht verändert, jedoch stieg der Anteil an Kyn und 3-HK signifikant an. Im Gegensatz dazu wurden im Hippocampus und Striatum erniedrigte Trp-Konzentrationen gegenüber Kontrolltieren gemessen. Somit sind die Konzentrationen der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels sowohl auf Seite des KP, als auch auf der serotonergen Seite, abhängig von psychischen Faktoren. Nicht nur Stress, sondern auch chronische Schmerzen können einen gesteigerten Abbau von Trp hervorrufen. Durch chronische Schmerzen wird die IDO aktiviert und im Tierversuch ein angestiegenes Verhältnis von Kyn zu Trp, sowie ein reduziertes Verhältnis von 5-HT zu Trp im Hippocampus festgestellt [145].

Weiters wurde nachgewiesen, dass psychisch unauffällige Patienten, die mit IFN- α und IL-2 behandelt wurden, neuropsychiatrische Nebenwirkungen entwickelten. Eine mögliche Erklärung für dieses Zytokin-induzierte Krankheitsverhalten ist, dass durch die Zytokine IDO aktiviert wird und ein gesteigerter Tryptophanabbau in Richtung KP stattfindet, wodurch es zu einem Mangel an 5-HT und einem Überschuss an Metaboliten des KP kommt [35, 53, 146]. Es muss auch beachtet werden, dass durch eine gesteigerte IDO-Aktivität nicht nur Trp, sondern alle Indolamine abgebaut werden, zu denen auch 5-HTP und 5-HT selbst zählen. Somit wird durch eine gesteigerte IDO Aktivität sowohl 5-HT vermehrt abgebaut, als auch weniger Substrat für eine 5-HT-Neusynthese bereitgestellt. IDO kann durch die Zytokine IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 und Transforming Growth Factor- β (TGF- β) induziert und durch die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 inhibiert werden [35, 46, 49, 66, 52, 147, 116].

O'Connor et al. konnten in ihren Tierexperimenten nachweisen, dass durch eine spezifische IDO-Inhibierung mittels Methyltryptophan die depressive Symptomatik nach einer LPS-Stimulation verringert wird. Ebenfalls konnte die Forschergruppe zeigen, dass sich in den gleichen Experimenten das Verhältnis von Kyn zu Trp durch die Inhibierung wieder normalisiert, nachdem die Tiere zuvor mit LPS stimuliert wurden. In einem dritten Experiment konnte gezeigt werden, dass durch i.p. Gabe von Kyn eine von der IDO-Aktivität unabhängige depressive Symptomatik entsteht [148].

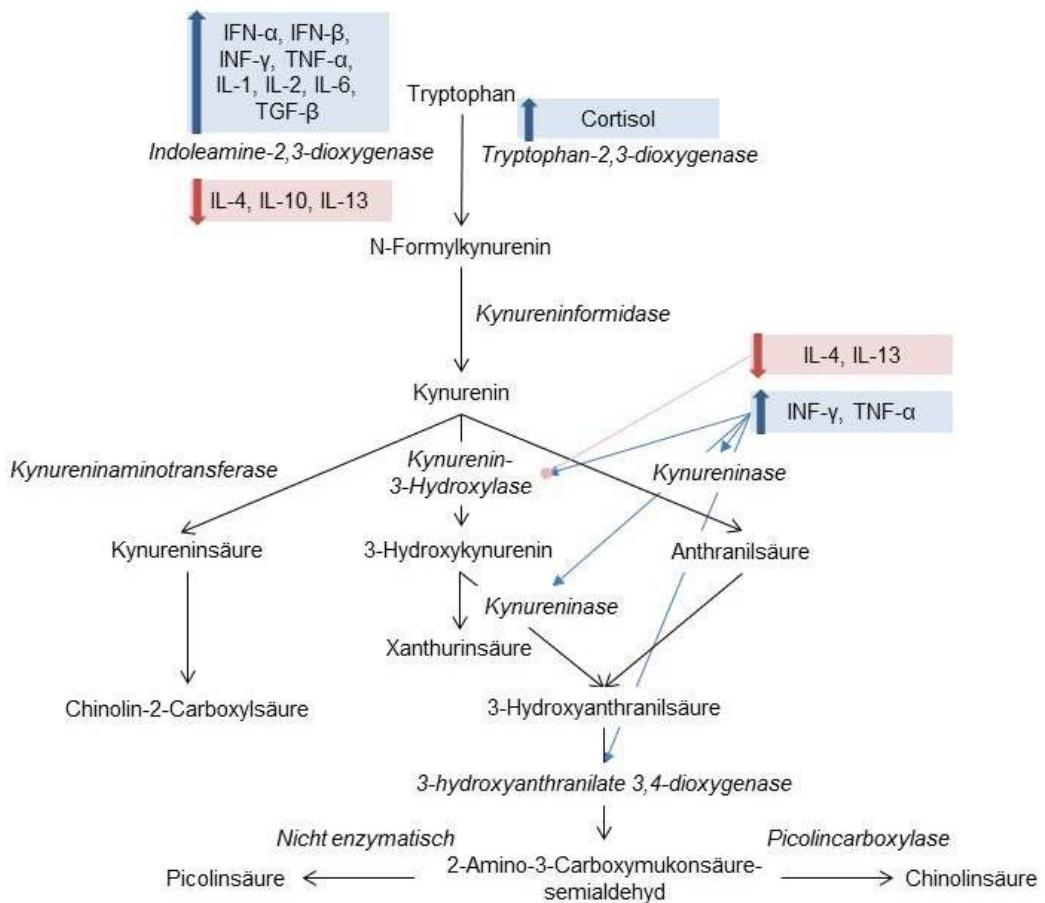


Abbildung 2.7: Aktivierung und Inhibierung der Enzyme des Kynurein Pathways durch Zytokine. Rot hinterlegte Zytokine wirken inhibierend, blau hinterlegte Zytokine wirken aktivierend.

Die beiden Zytokine IL-2 und IFN- γ werden vor allem durch T-Helfer-1-Zellen (TH-1) ausgeschüttet, welche Bestandteil des adaptiven Immunsystems sind. Daher werden diese Zytokine auch Typ-1-Zytokine genannt, obwohl sie auch von Makrophagen, Monozyten und anderen Zellen produziert werden. Dieser Typ-1-Immunantwort steht die Typ-2-Immunantwort gegenüber, welche Bestandteil der humoralen Immunantwort ist. Dabei werden vor allem durch die T-Helfer-2-Zellen (TH-2), aber auch durch Monozyten und Makrophagen vom Typ-2 (M2), IL-4, IL-10 und IL-13 produziert. Die beiden Typen der Immunantwort stimulieren jeweils den eigenen Typ, antagonisieren sich jedoch gegenseitig [84]. Betrachtet man nun mit diesem Hintergrund den KP und besonders die Möglichkeit der IDO-Aktivierung bzw. Inhibition, so stellt man fest, dass durch die Typ-1-Immunantwort eine Aktivierung erfolgt, durch die Typ-2-Immunantwort jedoch eine Inhibition. Auch hier antagonisieren sich beide Antwortarten gegenseitig. Bei Patienten mit einer depressiven Erkrankung konnte nachgewiesen werden, dass eine Typ-1-Immunantwort vorliegt und die damit einhergehenden proinflammatorischen Zytokine gegenüber Kontrollgruppen erhöht sind [5, 46, 84].

Durch die proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IFN- γ) der Typ-1-Immunantwort wird nicht nur IDO, sondern auch das Enzym KMO aktiviert. Durch IFN- γ und TNF- α werden ebenfalls die Enzyme

KYNU und HAAO induziert, was zu einem gesteigerten Abbau von Kyn hin zum neurotoxischen 3-HK und weiter zur Quin katalysiert. Durch IL-4 und IL-13 kann KMO inhibiert werden [46, 52, 84]. Gestärkt wird die These der proinflammatorischen-zytokinvermittelten-Depression durch klinische Studien, die zum einen zeigten, dass sich durch die Therapie mit antiinflammatorischen Medikamenten, wie dem COX-2-Hemmer Celecoxib, bei depressiven Patienten ein Therapieerfolg einstellte [149]. Zum anderen konnten Antidepressiva aber auch den inflammatorischen Status von Patienten verbessern [143].

Es ist bekannt, dass das CA-Wiederholungsallel 2 mit einer hohen *in vitro* Produktion von IFN- γ assoziiert ist. Es wurde in einer klinischen Studie gezeigt, dass die Homozygotie des Allels einen Einfluss auf die Serumspiegel von Trp, Kyn und 5-HIAA bei depressiven Patienten besitzt [150]. Somit ist nicht nur die biochemische Induzierbarkeit von Zytokinen, sondern auch der Genotyp für eine Gleichgewichtsverschiebung innerhalb des Tryptophanstoffwechsels ausschlaggebend.

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Konzentrationen der Metabolite des KP mit depressiven Erkrankungen gekoppelt sind. Dazu gehören die bipolare Störung [151], die majore Depression [152], prä- und postpartale Depression [153, 154] sowie Depressionen, die mit cardiovaskulären Erkrankungen einhergehen [155]. Auch konnte gezeigt werden, dass bei depressiven Patienten nicht nur die Konzentration von Trp sondern auch die von 5-HIAA erniedrigt sind und das Verhältnis von Kyn zu Trp mit dem Therapiefortschritt assoziiert ist [150]. Interessanterweise wurde nachgewiesen, dass ein gesteigertes Verhältnis von Kyn zu Trp positiv korreliert mit der Schwere der Erkrankung [156]. In Gehirnproben von Patienten mit unipolarer Symptomatik wurde eine erhöhte Dichte von Mikrogliazellen mit erhöhten Chinolinsäure-Konzentrationen im cingulären Areal immunhistochemisch nachgewiesen [116]. Es existieren jedoch auch widersprüchliche Befunde. So zeigten Hughes et al., dass in Patienten mit majorer Depression ein signifikant niedrigerer Plasma Trp-Spiegel, jedoch keinerlei erhöhte KP-Metabolite, trotz gesteigerter proinflammatorischer Zytokinspiegel (TNF- α , IFN- γ , IL-6), gemessen wurden. Die Forschergruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe auch keine gesteigerte Enzymexpression nachweisen. Gleichwohl korrelierte die Schwere der Erkrankung mit der Plasmakonzentration an IL-6 [51].

Die Neurodegenerations-Hypothese der Depression besagt, dass durch chronischen Stress oder eine physische Erkrankung proinflammatorische Zytokine ansteigen und die Enzyme aktivieren, welche für einen vermehrten Trp-Abbau und vermehrte Bildung von neurodegenerativen Metaboliten verantwortlich sind. Dass jedoch nur ein bestimmter Anteil der Menschen an einer Depression erkrankt, erklärt das Modell dadurch, dass genau bei diesen Menschen die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen gestört ist, wodurch keine antagonierenden Effekte zum Tragen kommen [52]. Untermauert wird die Hypothese durch epidemiologische Daten, die besagen, dass Depressionen häufig bei Patienten mit inflammatorischen Erkrankungen (Reizdarmsyndrom, Diabetes Typ 2, Arthritis und Autoimmunerkrankungen) auftreten [53]. Mehrere Forscher zeigten, dass erhöhte Konzentrationen an C-reaktivem Protein (CRP) mit dem Risiko, an einer Depression zu erkranken, korrelieren [157, 158] und diskutieren CRP als Risikomarker für die majore Depression bei Frauen [159]. Jedoch ist CRP ein Akute-Phase-Protein, das z.B. nach bakteriellen Infektionen ausgeschüttet wird und nicht im Ansatz spezifisch für eine Depression ist. Daher ist die Suche nach einem spezifischen Biomarker nach wie vor ein offenes Forschungsgebiet und Bedarf einer spezifischen Analysenmethode, die beispielsweise den KP als Gesamtbild darstellen kann.

2.7 HPLC-MS/MS-Analytik

2.7.1 Allgemeines zur HPLC-MS/MS-Analytik

Die Chromatographie ist eine Methode zur Trennung von Substanzen aus komplexen Gemischen. Dabei sind die Substanzen in einer mobilen Phase gelöst, die sich durch eine mit ihr nicht mischbaren stationären Phase bewegt. Bei der High performance liquid chromatography (HPLC, zu Deutsch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie - früher auch als High pressure liquid chromatography, zu Deutsch Hochdruckflüssigkeitschromatographie, bezeichnet) besteht die mobile Phase aus einer Flüssigkeit. Im Gegensatz dazu besteht die mobile Phase bei der Gaschromatographie aus einem Trägergas. Bei der HPLC-Technik handelt es sich um eine Säulenchromatographie, bei der sich die stationäre Phase in einem schmalen Rohr befindet. Die stationäre Phase, in der Säulenchromatographie auch Packung genannt, liegt in Form kleiner Partikel vor, die einen Durchmesser zwischen 3 und 10 µm besitzen. Diese Partikel bestehen zumeist aus modifiziertem Silika. Für präparative Arbeiten werden oftmals Partikel mit größerem Durchmesser verwendet. Durch die Verwendung kleinerer Partikel wird die Oberfläche der stationären Phase und damit die Trennleistung vergrößert. Ein Nachteil der kleineren Partikel sind die höheren Druckbelastungen der HPLC-Anlagen. Moderne HPLC-Anlagen können jedoch mit Drücken bis zu 1000 bar arbeiten, wodurch die Verwendung von Partikeln kleiner als 2 µm gängig geworden ist. Eine mögliche Bezeichnung solcher Anlagen lautet "Ultra High Performance Liquid Chromatography", eine Namensgebung durch die Firma Waters [160].

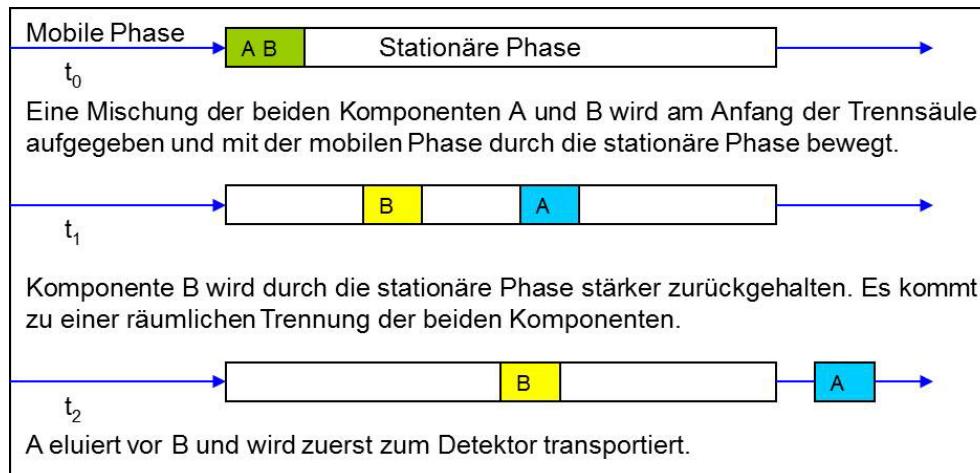


Abbildung 2.8: Prinzip der Trennung zweier Substanzen in einer HPLC-Säule.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine sogenannte Umkehrphasenchromatographie (reversed phase, RP) verwendet. In der RP-HPLC ist die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase. Die am häufigsten verwendete stationäre Phase ist chemisch an Silikapartikel gebundenes Octadecylsilan (ODS), ein n-Alkan mit 18 C-Atomen. Die mobile Phase, auch als Eluent oder Laufmittel bezeichnet, ist ein Gemisch aus Wasser oder wässrigen Pufferlösungen mit organischen Lösungsmitteln [161].

Zwischen der mobilen und der stationären Phase stellen sich Verteilungsgleichgewichte ein. Komponenten, die von der stationären Phase, z.B. aufgrund ihrer Ladung, Polarität oder Größe, stärker

zurückgehalten werden, bewegen sich langsamer mit der mobilen Phase weiter. Aufgrund dieser Mobilitätsunterschiede entsteht eine räumliche Trennung der einzelnen Komponenten (siehe Abbildung 2.8). Die unterschiedlich starke Adsorption der Substanzen an die stationäre Phase bewirkt eine Auf trennung der einzelnen Komponenten [162].

Die Leistungsfähigkeit einer chromatographischen Säule wird in theoretischen Trennstufen angegeben. Je höher die Zahl, desto bessere chromatographische Trennergebnisse werden erzielt. Trennstufen sind fiktive Einheiten, in denen sich jeweils ein Verteilungsgleichgewicht einstellt. Je kleiner eine Trennstufe ist, desto öfter kann die Gleichgewichtseinstellung in der Säule mit einer gegebenen Länge erfolgen und desto anspruchsvollere Trennprobleme können gelöst werden. Die theoretische Trennstufenhöhe hängt von der Packungsqualität, den Stoffaustauscheigenschaften der beteiligten Phasen und dem Korndurchmesser der stationären Phase ab. Je kleiner die Partikelgröße, umso höher ist die Trennstufenanzahl. Die Trennung wird auch durch die Auswahl von mobiler und stationärer Phase, die Temperatur, das Volumen der Probe (Injektionsvolumen), die Fließgeschwindigkeit und die Qualität des HPLC-Systems beeinflusst [162].

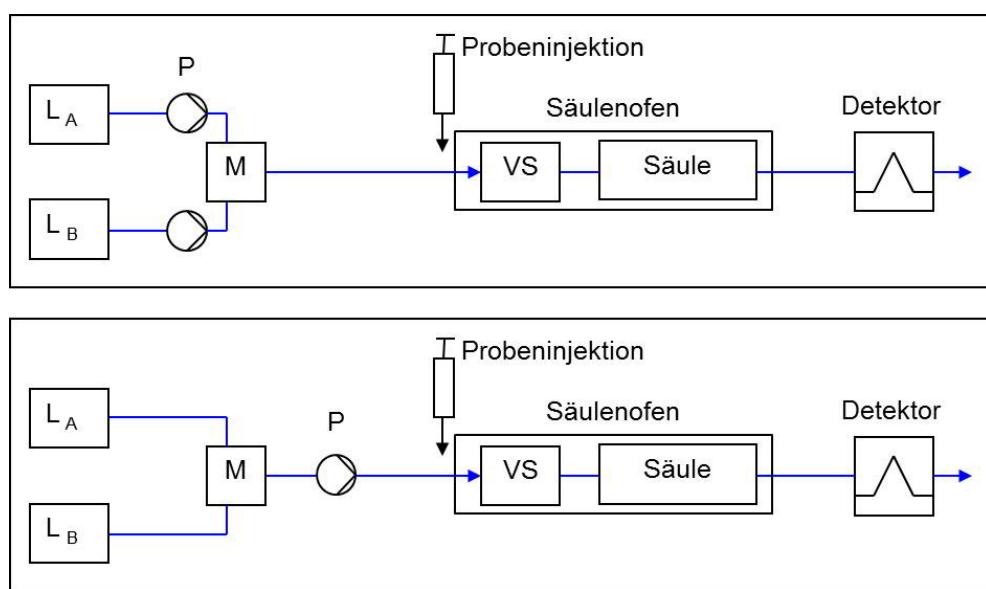


Abbildung 2.9: Komponenten einer HPLC-Anlage. Das obere Schema zeigt das Prinzip einer HPLC mit Hochdruckmischung, das untere eine HPLC mit Niederdruckmischung.

L: Laufmittel, P: Pumpe, M: Mischer, VS: Vorsäule

Wird die Zusammensetzung des Laufmittels während der Elution nicht verändert, so spricht man von einer isokratischen Trennung. In der RP-Chromatographie eluieren Substanzen umso später, je unpolarer sie sind. Um nun die Elution zu beschleunigen, kann die mobile Phase so verändert werden, dass der organische Anteil während der Analyse zunimmt. Diese Art der Elution wird Gradientenelution genannt. Dafür ist ein System notwendig, welches in der Lage ist, mindestens zwei Elutionsmittel zu fördern und zeitabhängig in vorgegebenen Verhältnissen zu mischen. Somit ist es möglich, dass ein Gemisch aus polaren und unpolaren Komponenten in einem annehmbaren Zeitrahmen getrennt werden kann. Prinzipiell kann die Mischung eines Gradienten auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt werden (siehe Abbildung 2.9). Bei dem Prinzip der Hochdruckmischung werden die unterschiedlichen Laufmittel durch jeweils eine

Pumpe angesaugt und auf der Hochdruckseite der Anlage gemischt. Im Gegensatz dazu wird bei der Niederdruckmischung lediglich eine Pumpe verwendet, der ein Mischer vorgeschaltet ist. Dieser Mischer öffnet je nach Bedarf seine unterschiedlichen Ansaugventile so, dass das vorgegebene Mischungsverhältnis aus den unterschiedlichen mobilen Phasen erreicht wird. Mit beiden Methoden können gleichwertige Ergebnisse erzielt werden [163].

In der Abbildung 2.9 ist zwischen Probeninjektion und Trennsäule eine Vorsäule eingezeichnet. Bei der Vorsäule handelt es sich um eine sehr kurze, austauschbare HPLC-Säule, die optional eingebaut werden kann, um die teure Trennsäule vor Verunreinigungen zu schützen.

Nach einer Trennung der Probenkomponenten werden sie am Detektor als diskrete Banden detektiert. Diese Banden erzeugen ein vom Detektortyp abhängiges Signal, welches im Idealfall die Form einer Gaußschen Normalverteilung besitzt. Dieses Signal wird als „Peak“ bezeichnet. Die Aufzeichnung der Signalintensität über der Zeit wird Chromatogramm genannt.

Nachdem die Analyten chromatographisch getrennt wurden, erfolgt eine quantitative Auswertung. Dazu muss das Signal eines jeden Analyten (der sogenannte Peak) einwandfrei identifiziert und von benachbarten Signalen abgetrennt sein. Vor der quantitativen Analyse wird ein Standard injiziert, d.h. eine Probe mit bekanntem Gehalt der zu analysierenden Substanz. Die Fläche des Peaks wird mittels Integration durch die Software berechnet. Mit dem bekannten Substanzgehalt des Standards und der gemessenen Peakfläche kann nun der Responsefaktor (Verhältnis von Substanzkonzentration zur Peakfläche) berechnet werden, wodurch dann auf den Gehalt der Probe geschlossen werden kann [164].

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = \text{Konzentration}_{\text{Standard}} * \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Probe}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Standard}}}$$

Um Schwankungen durch die Injektion oder die Probenvorbereitung rechnerisch zu kompensieren, wird der Probe meist ein interner Standard (ISTD) zugesetzt. Dieser ISTD wird dabei jeder Probe und auch dem Standard mit der bekannten Konzentration in identischer Menge zugesetzt. Da der ISTD nun den gleichen Einflüssen unterliegt wie die zu bestimmende Substanz, können Schwankungen mit der nachfolgenden Formel ausgeglichen werden [163, 165].

$$\text{Konzentration}_{\text{Probe}} = \text{Konzentration}_{\text{Standard}} * \frac{\text{Peakfläche}_{\text{Probe}}/\text{Peakfläche}_{\text{ISTD in Probe}}}{\text{Peakfläche}_{\text{Standard}}/\text{Peakfläche}_{\text{ISTD in Standard}}}$$

Es sind eine Vielzahl an Detektoren erhältlich. Zu den am meisten verwendeten gehören die UV Detektoren und die Fluoreszenzdetektoren.

Beim UV-Detektor wird die Extinktion von monochromatischem Licht durch die Analyten gemessen. Im ultravioletten Messbereich absorbieren viele organische Substanzen mit Doppelbindungen die Strahlung. Beim UV-Detektor wird bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen, bei welcher (im Idealfall) die zu bestimmende Substanz ihr Absorptionsmaximum aufweist. Als Quelle für das monochromatische Licht wird normalerweise eine Deuteriumlampe mit einem Prismen- oder Gittermonochromator verwendet. Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz gilt im UV-Detektor ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration des Analyten [160].

$$E_\lambda = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_\lambda * c * d$$

Abbildung 2.10: Das Lambert-Beer'sche Gesetz. Die Schichtdicke ist durch die Flusszelle gegeben und der Extinktionskoeffizient abhängig von der zu analysierenden Substanz bei der vorgegebenen Wellenlänge. Somit ist die Extinktion direkt proportional zur Konzentration der zu quantifizierenden Substanz.

E_λ : Extinktion bei der Wellenlänge λ , I_0 : Intensität des einfallenden Lichtes (W/m^2), I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes (W/m^2), c : Konzentration (mol/L), ϵ_λ : dekadischer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ (m^2/mol), d : Schichtdicke (m)

Wesentlich empfindlicher und spezifischer ist die Detektion mit einem Fluoreszenzdetektor, der jedoch nur für fluoreszierende Substanzen verwendet werden kann. Dabei wird Licht bei einer substanzspezifischen Wellenlänge absorbiert und anschließend energieärmer emittiert [161].

Massenspektrometer

Neben den beiden aufgeführten Detektoren finden auch Massenspektrometer (MS) eine immer weitere Verbreitung in der instrumentellen Analytik, vor allem bei der Quantifizierung aus komplexen Matrices. Hier erfolgt die Identifizierung des Analyten durch die Bestimmung der Molekülmasse. Dazu muss das Molekül in die Gasphase überführt werden. Eine weitere Voraussetzung für eine massenspektrometrische Untersuchung ist, dass das Molekül ionisierbar ist. Kann es ein oder mehrere Protonen aufnehmen, wodurch es als Kation vorliegt, so kann es im positiven Modus analysiert werden. Umgekehrt kann ein Anion im negativen Modus detektiert werden. Beide Vorgänge finden in der sogenannten Ionenquelle statt. Dazu stehen mehrere Techniken zur Verfügung, wie z.B. chemische Ionisation (CI), Photoionisation (PI), Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation (MALDI), chemische Ionisation unter Atmosphärendruck (APCI) und Elektrosprayionisation (ESI) [161].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ionisation eine ESI-Quelle verwendet. In dieser werden die gelösten Analyte und Ladungsträger (z.B. Protonen) in einer Kapillare erhitzt, versprüht und das Lösungsmittel durch heiße Inertgase verdampft. Dabei schrumpfen die Tröpfchen, bis die Abstoßungskräfte der Ladungen an der Oberfläche zu einer Explosion führen und der Vorgang mit den kleineren Tröpfchen erneut beginnt. Letztendlich bleibt im Idealfall nur das ionisierte Molekül übrig [166].

Das Ergebnis einer massenspektrometrischen Untersuchung ist das einheitenlose Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) eines ionisierten Probenmoleküls. Daraus kann auf die Molmasse geschlossen werden, indem die aufgegebene Ladung herausgerechnet wird. Dazu muss zuerst ermittelt werden, wieviele Ladungen auf das Molekül übertragen wurden. Aufschluss darüber gibt der Abstand zwischen den einzelnen Isotopen, wobei die Ladung der Kehrwert des Abstandes ist [167]. Die Masse des Moleküls kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Masse}_{\text{Substanz}} = (m/z_{\text{Substanz}} - \text{Anzahl Ladungen}_{\text{Substanz}}) * \text{Anzahl Ladungen}_{\text{Substanz}}$$

Beispiel: Eine Substanz erzeugt im positiven Modus ein Signal bei $m/z = 96$. Der Abstand im Spektrum zwischen dem ersten Peak und dem nachfolgendem Isotop beträgt $m/z = 0,5$. Daraus kann gefolgt

werden, dass die Ladung des Moleküls zwei Protonen beträgt. Nun kann die resultierende Masse der Substanz mit 188 g/mol berechnet werden.

Der ionisierte und in die Gasphase überführte Analyt wird nun durch elektrische Felder in den Analysator überführt, der das Verhältnis aus Masse zu Ladung bestimmt. Dazu stehen wieder mehrere Techniken zur Verfügung, wie z.B. Flugzeitmassenspektrometer (Time of flight, TOF), Quadrupol-Massenspektrometer, Ionenfallen-Massenspektrometer oder Sektorfeld-Massenspektrometer. Werden zwei Massenspektrometer gekoppelt, so spricht man von Tandemmassenspektometern (MS/MS). Dabei sind mehrere Kombinationen möglich, wie z.B. aus zwei TOF-Massenspektometern, aus zwei Quadrupol-Massenspektometern (siehe Abbildung 2.11) oder aus einem Quadrupol und einem TOF Massenspektrometer (QTOF). Um Aufschluss über die Struktur eines Moleküls zu erhalten, kann nun eine Substanz ionisiert und ihr m/z -Verhältnis im ersten Massenspektrometer bestimmt werden. Anschließend kann sie in der sogenannten Kollisionszelle fragmentiert und die Verhältnisse aus Masse zu Ladung der entstandenen Bruchstücke im zweiten Massenspektrometer bestimmt werden [166].

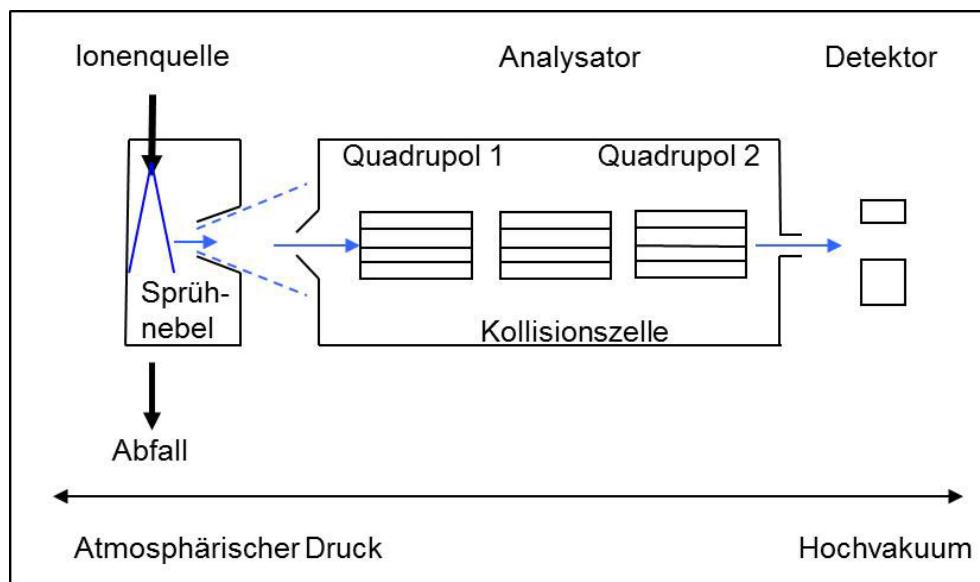


Abbildung 2.11: Schema eines Tandem-Massenspektrometer mit ESI und Quadrupolen.

Ein Quadrupol besteht aus vier parallelen Elektroden, wobei die sich gegenüberliegenden Elektroden identische, benachbarte Elektroden unterschiedliche Polarisationen aufweisen. Die Ionen werden in den Raum zwischen den Elektroden gelenkt. An den Elektroden liegen variable Hochfrequenz-Wechselspannungen an. Für jedes individuelle m/z -Verhältnis existiert bei konstanter Stromstärke eine Frequenz, bei welcher die entsprechenden Ionen im Quadrupol fokussiert und hindurchgeleitet werden. Ionen mit einem anderen m/z -Verhältnis werden abgelenkt, bis sie gegen eine Elektrode prallen und dort ihre Ladung verlieren. Limitiert werden Quadrupole jedoch durch ihren begrenzten Massenbereich. Sie können lediglich bis $m/z = 4000$ arbeiten [161, 166].

Eine Substanz kann jedoch auch nach vorgegebenen Kriterien automatisch fragmentiert werden, wodurch im ersten MS eine Substanz (Mutterion) isoliert und im zweiten ein oder mehrere spezifische Frag-

mente (Tochterionen) detektiert wird. Dadurch ist eine sehr substanzspezifische Messung möglich, die störendes Hintergrundrauschen minimiert. Diese Technik wird als Multiple Reaction Monitoring (MRM) bezeichnet (siehe Abbildung 2.12). Dabei ist zu beachten, dass nur die Kombination aus Mutter- und Tochterion detektiert wird und keinerlei Aussage über weitere Substanzen getroffen werden kann. Diese Kombination aus Mutter- und Tochterion wird als MRM-Übergang bezeichnet. Andere Substanzen, wie beispielsweise Komedikationen in einer Blutprobe, können nicht bestimmt werden [167]. Es gibt noch eine Reihe weiterer Techniken, wie z.B. Neutral Loss Scan oder Selected Ion Monitoring, auf die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht eingegangen wird. Für die entwickelte und in dieser Arbeit beschriebene HPLC-MS/MS-Methode wurde ein MS/MS-System mit positiver ESI-Quelle und Quadrupolen im MRM-Modus verwendet.

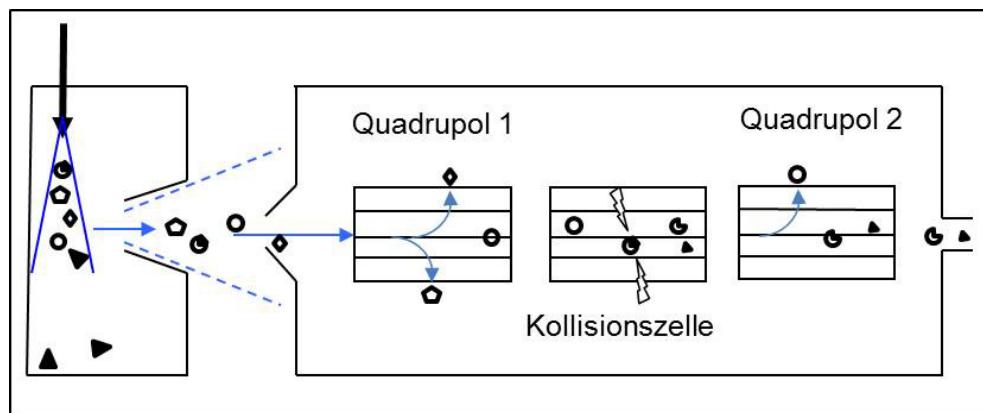


Abbildung 2.12: Prinzip einer Multiple Reaction Monitoring (MRM) Messung. In der Ionenquelle wird der zu messende Analyt und drei weitere Substanzen ionisiert. Eine Substanz kann aufgrund der fehlenden Ladung nicht in den Analysator abgelenkt werden. Im ersten Quadrupol werden zwei Ionen aufgrund des falschen m/z Verhältnisses aussortiert. In der Kollisionszelle wird nur ein Molekül korrekt fragmentiert. Das nicht fragmentierte Ion wird durch den zweiten Quadrupol aussortiert. Nur die beiden Tochterionen des Analyten gelangen durch beide Quadrupole zum Detektor.

2.7.2 Analytik des Kynurein Pathway

Es sind verschiedene Methoden zur Analyse von Tryptophan und seinen Metaboliten publiziert worden. So wurde mit einer HPLC-Methode und einem elektrochemischen Detektor AA aus Serum und Liquor cerebrospinalis bestimmt [168]. Die beiden Substanzen AA und 3-HAA wurden gemeinsam aus Dialysaten von Rattenhirnen mittels HPLC gekoppelt an einen Fluoreszenzdetektor (HPLC-FLD) quantifiziert [169].

Durch Guillemin et al. wurde der Kynurein Pathway in Astrozyten untersucht [49]. Dazu wurden parallel mehrere chromatographische Methoden verwendet. Ein Massenspektrometer gekoppelt an einen Gaschromatographen (GC-MS) wurde zur Messung von Quin und PIC benutzt. Kyn wurde mittels HPLC-UV bestimmt. Die Analyse von KynA führte die Arbeitsgruppe mit einer HPLC-FLD nach der Methode von Kapoor et al. [170] und die Analytik von 3-HK mit einem elektrochemischen Detektor gekoppelt an eine HPLC nach der Methode von Heyes et al. durch [171]. Somit wurden zur Quantifizierung von Quin, PIC, Kyn, KynA und 3-HK vier unterschiedliche Methoden mit jeweils unterschiedlicher Proben vorbereitung benutzt. Eine solche Aufteilung ist nicht nur zeitaufwändig und kostenintensiv, die benötigten

Probenvolumina können auch bei vielen klinischen Studien nicht bereitgestellt werden.

Auch Mackay et al. stellten zur Untersuchung des Tryptophanstoffwechsels die Kombination mehrerer Methoden vor. Sie verwendeten eine dreifache Proteinfällung mittels Perchlorsäure und analysierten die Substanzen Trp und Kyn mittels UV- und KynA mittels Fluoreszenzdetektion nach einer isokratischen Trennung. Zur Analyse von 3-HK, 3-HAA und Xan wurde die identische Probe in ein zweites, unterschiedliches HPLC-System injiziert und durch einen elektrochemischen Detektor, nach isokratischer Auftrennung der Analyten, bestimmt. Quin wurde durch eine Festphasenextraktion (SPE) aufgereinigt, mit tert-Butyldimethylsilyl derivatisiert und mittels GC-MS quantifiziert [172].

Zwei getrennte HPLC-Methoden wurden von Kim et al. [173] zur Bestimmung von Trp und Kyn verwendet. Trp wurde dabei mittels HPLC-FLD nach einer Derivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd und online Mikrodialyse detektiert. Zur Bestimmung von Kyn wurden die Plasmaproteine durch Perchlorsäurefällung entfernt und der Überstand mittels HPLC-UV quantifiziert. Trp, Kyn, KynA und 3-HK wurden von Munipally et al. mit einer HPLC-Methode analysiert und die IDO-Expression mittels semi-quantitativer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) bestimmt [174]. Änderungen der Enzymaktivität können auch durch Änderungen des Verhältnisses aus Produkt zu Substrat dargestellt werden, wozu jedoch eine verlässliche Quantifizierungsmethode Voraussetzung ist. Eine weitere HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion wurde von O'Connor et al. [148] beschrieben. Diese Gruppe analysierte Trp, Kyn und 5-HIAA aus Plasmaproben und Gehirnhomogenisaten.

In der HPLC und auch in der GC-MS- und HPLC-MS-Analytik wird eine Derivatisierung, also eine chemische Veränderung der Probenkomponenten, meist dazu verwendet, um die Empfindlichkeit des Nachweises zu erhöhen. Teilweise dient die Derivatisierung jedoch auch dazu, eine Substanz überhaupt erst chromatographierbar zu machen [160]. Zur Diagnose der Ahornsirupkrankheit bei neugeborenen Kindern wurden mehrere Aminosäuren mittels GC-MS bestimmt. Dazu wurde die Carboxygruppe mittels Butanol in Gegenwart von Salzsäure verestert [175]. Diese Methode zur Derivatisierung ist prinzipiell für alle Carbonsäuren möglich und wurde in der vorliegenden Arbeit für Carbonsäuren des Tryptophanstoffwechsels optimiert.

Beretta et al. beschrieben eine Probenvorbereitung mittels SPE von KynA und anderen Chinolin Alkaloiden aus Honig. Die Quantifizierung erfolgte durch eine HPLC gekoppelt an einen Diodenarraydetektor und einem Ionenfallen-Massenspektrometer. Der Gradient besaß dabei eine Laufzeit von 60 Minuten [176].

Eine HPLC-MS-Methode zur Analyse von C¹³-Isotopen von Trp und Kyn nach einer Derivatisierung mit Pentafluorobenzylbromid und chemische Ionisation (CI) wurde von Boni et al. beschrieben. Zur chromatographischen Trennung der Substanzen wurde eine Normalphase verwendet [177]. Kürzlich wurde eine aus Kernspinresonanz (NMR) und UPLC mit Flugzeitmassenspektrometer (UPLC-QTOF) kombinierte Messung vorgestellt. Damit wurden eine Vielzahl an Aminosäuren und deren Metabolite, unter anderem auch Trp, Kyn, KynA, in Urin detektiert. Semiquantitativ konnten hiermit bei Ratten Unterschiede zwischen einer Kontrollgruppe und mittels "unpredictable chronic mild stress" (UCMS) gestressten Tieren detektiert werden [144].

Im Jahr 2012 wurde eine HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Trp, Kyn, KynA, AA, 3-HAA, Quin und PIC aus Rattenplasma vorgestellt [178]. Bei dieser Methode erfolgte die Probenvorbereitung aus 800 µL Plasma durch eine SPE Aufreinigung. Der Gradient hatte eine Laufzeit von zwölf

Minuten. Die Ionisation mittels ESI erfolgte für Quin und PIC im negativen, für die übrigen Substanzen im positiven Modus.

Eine weitere HPLC-ESI-MS/MS-Methode zur Bestimmung von Trp, Kyn, KynA und Quin aus Plasma von Schweinen wurde von Wirthgen et al. beschrieben. Zur Probenvorbereitung wurden die Plasmaproteine durch Zugabe von Trichloressigsäure gefällt und der Überstand ohne weitere Schritte zur Reinigung oder Probenkonzentration analysiert. Die Fällung und die Inkubation mit den internen Standards benötigte zwölf Stunden [70].

Am Klinikum der Universität München wurde im Labor der Psychiatrischen Klinik eine isokratische HPLC-UV/FLD-Methode zur Bestimmung von Trp, 5-HIAA und Kyn nach einer Probenvorbereitung mittels SPE verwendet [179]. Diese Methode kann als Ausgangspunkt der in dieser Arbeit beschriebenen Analysenmethoden gesehen werden. In der Literatur wurde vor dieser Arbeit keine Methode beschrieben, die in der Lage ist, den gesamten Kynureninstoffwechsel und den serotonergen Arm des Tryptophanstoffwechsels zu quantifizieren.

3 Zielsetzung

Der vorliegenden Arbeit lagen mehrere Ziele zugrunde. Als erstes sollte für die HPLC-Analytik der Substanzen Trp, 5-HT, 5-HIAA, Kyn, 3-HK, 3-HAA und KynA die Probenvorbereitung optimiert werden, um eine gesteigerte Sensitivität zu erhalten (siehe Abschnitt 5.1).

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer HPLC-MS/MS-Methode, die im Vergleich zur etablierten HPLC-Methode folgende Punkte erfüllen sollte: Ein geringeres Probenvolumen bei gleichzeitig gesteigerter Spezifität und Sensitivität. Eine gesteigerte Anzahl an detektierbaren Analyten pro Analyse, insbesondere die Bestimmung von Chinolinsäure, war ein wichtiger Schlüssepunkt bei der Methodenentwicklung. Die Laufzeiten sollten verkürzt und die Kosten für Verbrauchsmaterialien durch den Einsatz einer einfachen Probenvorbereitung, wie beispielsweise durch Fällung der Serumproteine oder eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, reduziert werden. Der Einsatz dieser HPLC-MS/MS-Methode war für die Analyse von teilweise multizentrischen klinischen Studien geplant. Bei diesen Studien findet die Akquise geeigneter Probanden teilweise über einen sehr langen Zeitraum statt, so dass eine erneute Probengewinnung nicht möglich ist. Die Vielzahl an Proben pro Studie bedingt eine Probenvorbereitung und Analyse an verschiedenen Messtagen und durch mehrere Personen, wodurch diverse Fehlerquellen generiert werden. Daher wurde die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode einer umfangreichen Validierung unterzogen. Speziell wurde dabei die Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung und der Messung, die Vergleichbarkeit mit der zuvor etablierten HPLC-Methode und die Stabilität der Proben bei unterschiedlichen Lagerbedingungen untersucht. Neben diesen Punkten wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenze, die Linearität und die aufarbeitungsbedingten Verluste ermittelt.

Das dritte Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung präanalytischer Einflüsse auf die Analytik des Tryptophan Metabolismus. Dazu wurde die Möglichkeit zur Bestimmung freier und proteingebundener Kynurenine, der Einfluss von Nahrungsaufnahme und der Einfluss unterschiedlicher Blutentnahmesysteme untersucht.

Im Anschluss an diese Versuche wurde die entwickelte HPLC-MS/MS-Methode in praktischen Versuchen eingesetzt. Es wurde der Einfluss von Carbamazepin auf den Tryptophan Metabolismus von PBMC-Kulturen untersucht, um festzustellen, ob durch Carbamazepin verstärkt Chinolinsäure gebildet wird, wie eine Publikation von Ghosh et al. vermuten ließ [180]. Ebenfalls wurde untersucht, ob der Tryptophanstoffwechsel einem circadianen Rhythmus unterliegt. Dieser Versuch teilte sich in einen *in vivo* und einen *in vitro* Abschnitt auf.

4 Material und Methoden

4.1 Grundausstattung

4.1.1 Geräte

Gerätetyp	Name	Hersteller
Zentrifugen	Omnifuge 2.0RS	Heraeus
	Allegra™ 6R Centrifuge	Beckmann
	Rotaxia 120R	Hettich
	miniSpin	Eppendorf
	Mikro 22R	Hettich
Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Ultraschallbad	8200	Branson
pH-Meter	pH Level 1	WTW Inolab
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA
Waagen	PL200	Mettler
	M2P	Sartorius
Vakuumkonzentrator	RVC 2-18	Christ
Kühlfalle	CT02-50SR	Christ
Vakuumpumpe	2c	Vacuumbrand
Absaugstation	Laborport	KNF Neuberger
Metallblockthermostat	13142	Liebisch Labortechnik
Brutschrank	cytoperm 2	Heraeus
Sicherheitswerkbank	Hera safe	Heraeus
Wasserbad	Typ 3043	Köttermann

Tabelle 4.1: Verwendete Geräte.

Des Weiteren wurden Glaswaren und Kleingeräte namhafter Hersteller verwendet, welche dem aktuellen Laborstandard entsprachen.

Komponente	Name	Hersteller
HPLC Säule	XBridge C18, 3,5 µm, 4,6 * 150 mm	Waters
Vorsäule	SecurityGuard C18, 4 * 2 mm	Phenomenex
HPLC	2695 Alliance	Waters
Säulenofen	Jetstream plus	Waters
UV Detektor	2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters
Fluoreszenz Detektor	2475 Fluorescence Detector	Waters
HPLC-MS/MS-Säule	Kinetex XB-C18, 2,6 µm, 2,1 * 150 mm	Phenomenex
UPLC-Pumpe	Acquity Binary Solvent Manager UPB	Waters
UPLC-Probengeber	Sample Manager UPA	Waters
UPLC-Säulenthalermostat	Acquity Column Heater UPH	Waters
Massenspektrometer	Xevo TQ MS mit ZSpray ESI Ionenquelle	Waters

Tabelle 4.2: Verwendete HPLC- und HPLC-MS/MS-Komponenten für die Bestimmung von Trp und Metaboliten.

Komponente	Name	Hersteller
HPLC-Pumpe	515 HPLC Pump	Waters
HPLC-Probengeber	717plus Autosampler	Waters
Säulenofen	Jetstream plus	Waters
UV Detektor	2487 Dual λ Absorbance Detector	Waters

Tabelle 4.3: Verwendete HPLC-Komponenten für die Bestimmung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid.

4.1.2 Verwendete Software

Name	Hersteller
MassLynx 4.1	Waters
Empower 2	Waters
SPSS 21	IBM
Dintest Version 2004 DE	Arvecon GmbH
Excel-Tool Passing-Bablok-Regression	ACOMED

Tabelle 4.4: Verwendete Software.

4.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Bestellnummer
6-Well Platten Nunclon™ Surface	Nunc	140675
Amicon 10,000 NMWL Filter Unit	Millipore	UFC3LGC00
BD Vacutainer Safety-Lok	Becton Dickinson	367284
BD Vacutainer, SST II Advance*	Becton Dickinson	366444
BD Vacutainer, K2E (EDTA)*	Becton Dickinson	367864
BD Vacutainer, NH (Sodium Heparin)*	Becton Dickinson	367876
Deckel	Chromacol	11-PEC1
Glaseinsatz 31 * 6 mm	VWR	548-0006
Neubauer Zählkammer, C-Chip	Digital Bio	DHC-N01
Pipettenspitzen Mastertips	Eppendorf	0030 001.320
Pipettenspitzen 2-200 µL	Eppendorf	0030 073.800
Pipettenspitzen 50-1000 µL	Eppendorf	0030 073.460
Probengläser	Chromacol	2-RV(A)
Probengläser Total Recovery	Waters	186000385c
Reagiergefäße 1,5 mL	Sarstedt	72.690
Reagiergefäße 2,0 mL	Eppendorf	0030 120.094
S-Monovette ® EDTA/KE, 7,5 mL	Sarstedt	01.1605
S-Monovette ® Serum, 7,5 mL	Sarstedt	01.1601
S-Monovette ® Serum-Gel, 4,7 mL*	Sarstedt	03.1524
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt	85.1638.205
SPE- Säulen Oasis MCX 3 cc (60 mg)	Waters	186000254
Spritzenfilter 0,2 µm, Ø 25 mm	Nalgene	190-2520
Zellkulturflasche 25cm ² PE vented cap	Sarstedt	83.1810.002
Zentrifugenrörchen 50 mL	Sarstedt	62.547.254

Tabelle 4.5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

* Die gekennzeichneten Blutentnahmesysteme wurden lediglich für Vergleiche unterschiedlicher Systeme verwendet und nicht zur quantitativen Bestimmung des KP aus Serum.

4.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Bestellnummer
3-Nitro-Tyrosin	Sigma	N7389
Acetonitril ULC/MS	Biosolve	01204102
Acetonitril LiChrosolv	Merck	1.00029.
Ameisensäure ULC/MS	Biosolve	06914131
Ammoniaklösung 32%	Merck	1.05426.
Ammoniumacetat \geq 99.99%	Sigma Aldrich	431311-250G
Biocoll Separationslösung	Biochrom	L6715
Carbamazepine	Sigma Aldrich	C4024-1G
Carbamazepine-10,11-epoxide	Sigma Aldrich	C4206-5MG
Dithiothreitol	Merck	1.11474.
Ethanol gradient grade	Merck	1.11727.
FKS	Biochrom	S0615
Harnstoff	Roth	2317.3
Methanol ULC/MS	Biosolve	13684102
Methyltryptophan	Aldrich	452483
Natriumdihydrogenophosphat-Monohydrat	Merck	1.06346.
Natriumpyruvat 100 mM	Biochrom	L0473
Natronlauge 0,1 N	Merck	1.09141.
PBS Dulbecco w/o Ca^{2+} , w/o Mg^{2+}	Biochrom	L182-50
Perfluorbuttersäure 98%	Aldrich	16,419-4
Phosphorsäure 85%	Merck	1.00552.
Salzsäure 0,1 N	Merck	1.09060.
Salzsäure endotoxinarm 6 M	Merck	1.10164.
Salzsäure 3 N in Butanol	Fluka	87472-50ML-F
Trypanblau	Fluka	93595

Tabelle 4.6: Verwendete Chemikalien.

Analyte	Hersteller	Bestellnummer	Lot
3-Hydroxyanthranilic acid	Sigma	1448776	087K5010
3-Hydroxy-DL-kynurenone	Sigma	H1771	027K4034
5-Hydroxyindole-3-acetic acid	Sigma	H8876	146K1520
5-Hydroxytryptophan	Aldrich	107751	1404641
Antranilic acid	Sigma	10680	1367436
Kynurenic acid	Sigma	K3375	029K1297
L-Kynurenone	Sigma	K8625	027K1100
Picolinic acid	Fluka	39245	1283509
Quinaldic acid	Fluka	22560	BCBB8834
Quinolinic acid	Fluka	22690	1293219
Serotonin hydrochloride	Sigma	H9523	046K7038
Tryptophan	Sigma	T-0254	011K0893
Xanthuric acid	Aldrich	D12,080-4	S73853-259
Deuterierte Analyte	Hersteller	Bestellnummer	Lot
2-Picolinic-d4 acid	CDN Isotopes	D-5289	X103P1
Kynurenic-d5 acid	CDN Isotopes	D-4391	B421P23
L-Tryptophan-d5	CDN Isotopes	D-1522	G368BP24

Tabelle 4.7: Verwendete analytische Reinsubstanzen.

Wasser wurde einem Millipore Milli-Q System mit LC-PAK™ und 0,22 µm Filter täglich frisch entnommen.

Die Namen der verwendeten Analyte sind in Tabelle 4.7 dem Hersteller entsprechend in englischer Sprache angegeben. Die deutsche Übersetzung ist dem Abkürzungsverzeichnis zu entnehmen.

4.1.5 Sonstige Hilfsmittel

Für den Versuch zur Bestimmung des Einflusses tryptophanreicher Nahrung wurden Fresubin protein energy Drinks der Firma Fresenius Kabi (704850S) und 500 mg Tryptophan Filmtablette der Firma Ratiopharm (L-Tryptophan-ratiopharm 500mg) verwendet.

Für den Methodenvergleich zwischen HPLC und HPLC-MS/MS wurde die unter 4.3.1 beschriebene Probenvorbereitung von Frau Doris Grillitsch durchgeführt.

4.2 Reagenzien für die HPLC-Analytik

4.2.1 Mobile Phasen und Nadelspülösungen

Mobile Phase A: 50 mM Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (6,90 g/L) in Wasser, pH 2,5 mit Phosphorsäure eingestellt.

Mobile Phase B: 93 Vol.-% mobile Phase A gemischt mit 7 Vol.-% Ethanol.

Mobile Phase C: 70 Vol.-% mobile Phase A gemischt mit 27 Vol.-% Acetonitril (LiChrosolv) und 3 Vol.-% Ethanol.

Nadelspülösung: 10 Vol.-% Acetonitril (LiChrosolv) in Wasser.

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.2.2 Interne Standardlösung (ISTD)

Als interne Standardlösung für die HPLC-Analytik wurden je 7,5 µg/mL Methyltryptophan und 3-Nitro-Tyrosin in Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bis zur Probenvorbereitung bei -20°C in Aliquoten zu je 2,0 mL.

4.2.3 Ammoniumacetatlösung zur Probenvorbereitung

Zur Herstellung einer 0,1 M Ammoniumacetatlösung wurden 771 mg Ammoniumacetat in 100 mL Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.2.4 Phosphorsäurelösung zur Probenvorbereitung

Die 1 M Ortho-Phosphorsäure wurde hergestellt, indem 3,378 mL Ortho-Phosphorsäure im Messzyylinder mit Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 50 mL verdünnt wurden. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.2.5 Waschlösung

Als Waschlösung für die SPE-Säulen wurden 0,1 M Salzsäure (1,67 mL der 6 M HCl pro 100 mL) und 50 µg/mL Dithiothreitol in Wasser verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.2.6 Elutionslösung

Die Elutionslösung für die Probenvorbereitung bestand aus 32 Vol.-% Ethanol, 63 Vol.-% Acetonitril (LiChrosolv) und 5 Vol.-% Ammoniaklösung 21%. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur für maximal eine Woche.

4.2.7 Wiederaufnahmelösung

Zur Herstellung der Wiederaufnahmelösung wurden 25 µg/mL Dithiothreitol in Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 5-8°C.

4.2.8 Kalibratoren und Kontrollen für die HPLC-Analytik

Zur leichteren Herstellung von Kalibratoren und Kontrollen wurden sechs Spikelösungen hergestellt. Zusätzlich wurde ebenfalls eine Lösung ohne jeglichen Analyt verwendet (Blank). Serum wurde über das Routinelabor der Psychiatrischen Klinik, bzw. das Institut für Laboratoriumsmedizin bezogen. Es wurde 1+1 mit Wasser verdünnt, mittels Rundfilter filtriert und mit 5 Vol.-% der entsprechenden Spikelösungen versetzt. Die Lagerung erfolgt in Aliquoten zu je 2,2 mL bei -20°C.

Die absolute Konzentration eines jeden Analyten musste experimentell ermittelt werden, indem in MassLynx mit den in Tabelle 4.8 angegebenen Konzentrationen eine Regressionsgerade berechnet wurde (Wichtung 1/x, Ursprung nicht berücksichtigt). Der Quotient aus Ordinate und Steigung ergab jeweils den Blindwert der Leermatrix und musste zu jeder zugesetzten Konzentration hinzuaddiert werden. Es ist

Analytname	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-HAA	3	7	12,5	25	50	100
3-HK	3	7	12,5	25	50	100
5-HIAA	3	7	12,5	25	50	100
5-HT	10	25	50	100	250	500
KynA	3	7	12,5	25	50	100
Kyn	10	25	50	100	250	500
Trp	1000	2000	3000	5000	10000	15000

Tabelle 4.8: Zugesetzte Konzentrationen für HPLC-Kalibratoren und HPLC-Kontrollen.

zu beachten, dass dieser Blindwert bei jedem neuen Kalibratorenset und jeder neuen Kontrolle berechnet werden musste. Die jeweiligen absoluten Konzentrationen sind den Rohdaten zu entnehmen.

4.3 Bestimmung der Kynurenine mittels HPLC

4.3.1 HPLC-Methode zur Quantifizierung von Trp

Die in der Tabelle 4.9 beschriebene HPLC-Methode wurde zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan verwendet. Für die Analyte 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA wurde die unter dem Punkt 4.3.2 beschriebene HPLC-Methode verwendet.

Laufzeit	6,00 min
Flussrate	1,0 mL/min
Gradient	isokratisch (50% A, 50% C)
Injectivolumen	0,5 μ L
Säulentemperatur	40°C
Temperatur Probengeber	6°C
UV-Detektion	Aus
Fluoreszenzdetektion	$\lambda_{\text{Ex}} 280 \text{ nm } \lambda_{\text{EM}} 340 \text{ nm}$

Tabelle 4.9: HPLC-Methode zur Quantifizierung von Trp.

Auswertung

Eine lineare, 1/x gewichtete Auswertung erfolgte in Empower 2. Als ISTD wurde Methyltryptophan für die Auswertung verwendet.

4.3.2 HPLC-Methode zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA

Die in den Tabellen 4.10 und 4.11 beschriebene HPLC-Methode wurde zur quantitativen Bestimmung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA verwendet. Für Trp wurde die unter dem Punkt 4.3.1 beschriebene isokratische Methode verwendet.

Laufzeit	26,00 min
Injektionsvolumen	60 μ L
Säulentemperatur	40°C
Temperatur Probengeber	6°C
UV-Detektion	330 nm (KynA, 3-HAA) 365 nm (3-HK, Kyn)
Fluoreszenzdetektion	$\lambda_{\text{Ex}} 300 \text{ nm } \lambda_{\text{EM}} 340 \text{ nm (5-HIAA, 5-HT)}$

Tabelle 4.10: HPLC-Methode zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA.

	Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	% A	% B	% C	% D	Kurve
1	INITIAL	1,20	100	0	0	0	
2	4,00	1,20	50	50	0	0	6
3	7,00	1,20	50	50	0	0	6
4	15,00	1,20	0	100	0	0	6
5	18,00	1,20	0	100	0	0	6
6	18,10	1,20	0	0	100	0	6
7	22,00	1,20	0	0	100	0	6
8	22,10	1,20	100	0	0	0	6
9	26,0	1,20	100	0	0	0	6

Tabelle 4.11: Gradient der HPLC-Methode zur Quantifizierung von 3-HAA, 3-HK, 5-HIAA, 5-HT, Kyn und KynA.

Auswertung

Eine lineare, $1/x$ gewichtete Auswertung erfolgte in Empower 2. Der ISTD Methyltryptophan wurde für die Auswertung von Serotonin und 5-HIAA verwendet. Für die übrigen Analyte wurde 3-Nitro-Tyrosin als ISTD verwendet.

4.4 Reagenzien für die HPLC-MS/MS-Analytik

4.4.1 Mobile Phasen und Waschlösungen

Mobile Phase A: 0,1% Ameisensäure, 0,01% HFBA

Mobile Phase B: Methanol

WWS: 10% ACN

SWS: 50% ACN 50% MeOH

Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.4.2 Interne Standardlösung (ISTD)

KynA-d5: 500 ng/mL

Trp-d5: 20 µg/mL

Pic-d4: 100 ng/mL

Als interne Standardlösung für die HPLC-MS/MS-Analytik wurden die deuterierten Analyte in der oben aufgeführten Konzentration in Wasser gelöst. Vor der Probenvorbereitung wurde diese Lösung erneut 1:10 mit Wasser verdünnt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

4.4.3 Additionslösung

3-HAA: 120 ng/mL

5-HIAA: 120 ng/mL

5-HTP: 120 ng/mL

Als Additionslösung wurden die oben aufgeführten Analyte in der jeweiligen Konzentration in Wasser gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 5-8°C.

4.4.4 Harnstofflösung

Als chaotropes Reagenz zum Lösen von Proteinbindungen wurde 2,0 M Harnstoff in Wasser verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.4.5 Fällungsmittel

Fällungsmittel 1: Methanol/Ethanol 2/1 v/v

Fällungsmittel 2: ACN

Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur.

4.4.6 Wiederaufnahmelösung underivatisiert

Als Wiederaufnahmelösung für die Probenvorbereitung ohne Derivatisierung wurden 10 Vol.-% mobile Phase B mit 90 Vol.-% mobile Phase A gemischt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.4.7 Wiederaufnahmelösung derivatisiert

Als Wiederaufnahmelösung für die Probenvorbereitung mit Derivatisierung wurden 30 Vol.-% mobile Phase B mit 70 Vol.-% mobile Phase A gemischt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

4.4.8 Kalibratoren und Kontrollen für die HPLC-MS/MS-Analytik

Zur leichteren Herstellung von Kalibratoren und Kontrollen wurden sechs Spikelösungen hergestellt. Zusätzlich wurde ebenfalls eine Lösung ohne jeglichen Analyt verwendet (Blank). Serum wurde über das Routinelabor der Psychiatrischen Klinik, bzw. das Institut für Laboratoriumsmedizin bezogen. Es wurde 1+1 mit Wasser verdünnt, filtriert und mit 5% der entsprechenden Spikelösungen versetzt. Die Lagerung erfolgt in Aliquoten zu je 1,5 mL für die Kalibratoren bzw. 2,2 mL für die Kontrollen (Level 3 und 5) bei -80°C.

Um Konzentrationen an Trp und den Metaboliten aus den Zellkulturversuchen zu bestimmen, wurde ein Set an Kalibratoren und Kontrollen in RPMI 1640 der Firma Biochrom (1215) verwendet. Die weitere Vorgehensweise entsprach dem oben aufgeführten Prozedere.

Analytname	Level 1	Level 2	Level 3	Level 4	Level 5	Level 6
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL
3-HAA	20	50	75	100	150	200
3-HK	3	7	12,5	25	50	75
5-HIAA	3	7	12,5	25	50	75
5-HTP	5	10	25	50	75	100
AA	20	50	75	100	150	200
KynA	5	10	25	50	75	100
Kyn	50	100	200	300	400	500
Pic	3	7	12,5	25	50	75
QuinaldA	3	7	12,5	25	50	75
Quin	3	7	12,5	25	50	75
5-HT	50	100	200	300	400	500
Trp	1000	2000	3000	5000	10000	15000
Xan	5	10	25	50	75	100

Tabelle 4.12: Zugesetzte Konzentrationen für HPLC-MS/MS-Kalibratoren und HPLC-MS/MS-Kontrollen.

Die absolute Konzentration eines jeden Analyten musste experimentell ermittelt werden, indem in MassLynx mit den in Tabelle 4.12 angegebenen Konzentrationen eine Regressionsgerade berechnet wurde (Wichtung $1/x$, Ursprung nicht berücksichtigt). Der Quotient aus Ordinate und Steigung ergab jeweils den Blindwert der Leermatrix und musste zu jeder zugesetzten Konzentration hinzuaddiert werden. Es ist zu beachten, dass dieser Blindwert bei jedem neuen Kalibratorenset und jeder neuen Kontrolle berechnet werden musste. Die jeweiligen absoluten Konzentrationen sind den Rohdaten zu entnehmen.

4.5 Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Die Blutentnahmen erfolgten durch medizinisches Personal an der Psychiatrischen Klinik der LMU München. Blut wurde nur freiwilligen, gesunden Probanden ohne jegliche Medikamentierung entnommen. Dazu wurde mit einem BD Vacutainer Safety-Lok Blutentnahmesystem eine periphere Vene punktiert und mittels Monovette® Serum, 7,5 mL Blut abgenommen. Dies wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend für sieben Minuten bei 3850 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert

(Rotaxia 120R), mit einer serologischen Pipette in 2,0 mL Reagiergefäße überführt. Entsprechend des Versuchsplans wurde das Serum entweder unmittelbar weiterverarbeitet oder bei -20°C bis zur Analyse gelagert.

4.6 Quantitative Bestimmung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid

Für die quantitative Bestimmung der Wirkstoffe Carbamazepin und Carbamazepinepoxid aus den Zellkulturüberständen wurde der zertifizierte Kit 22000/HR der Firma Chromsystems verwendet. In diesem Kit waren alle Reagenzien, Verbrauchsmaterialien und die entsprechende HPLC-Säule enthalten. Der Kit ist im TDM Labor der Psychiatrischen Klinik über Jahre im Einsatz gewesen und ist dort dokumentiert. Die Probenvorbereitung und die Analytik erfolgten entsprechend der mitgelieferten Arbeitsanweisung.

	Hersteller	Bestellnummer	Lot
Kalibrator	Chromsystems	22005/HR	0411
Kontrolle	Chromsystems	0160	0411
Kontrolle	Chromsystems	0170	0411
Kontrolle	Chromsystems	0080	1411
Kontrolle	Chromsystems	0064/1	1911
Kontrolle	Chromsystems	0064/2	1911

Tabelle 4.13: Kalibrator und Kontrollen für die Bestimmung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid.

4.7 Reagenzien für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien basieren auf RPMI 1640 w/o Phenolrot der Firma Biochrom (FG1275). Die Medien wurden unter der Sicherheitswerkbank steril hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei 5-8°C gelagert. Vor der Verwendung in der Zellkultur wurde jedes Medium im Wasserbad auf 37°C angewärmt.

4.7.1 Serum

Am 5.02.2013 wurde drei Spendern jeweils vierfach 7,5 mL Blut abgenommen (Monovette® Serum) und nach zehn Minuten für sieben Minuten bei 3850 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotaxia 120R). Das gewonnene Serum wurde bei 56°C für 30 Minuten im Wasserbad inaktiviert.

4.7.2 Medium I

500 mL RPMI Medium wurden mit fünf mL der Natriumpyruvatlösung versetzt. Dies entsprach einer Konzentration von 1 mM Natriumpyruvat.

4.7.3 Medium II

Je Spender wurden 10 mL Serum mit 90 mL Medium I gemischt. Dies entspricht 10 Vol.-% Humanserum im Medium II.

4.7.4 Medium II + Carbamazepin

Es wurde eine Carbamazepinlösung hergestellt, indem 5,0 mg Carbamazepin eingewogen und in 2,5 mL 40 Vol-% EtOH und 60 Vol.-% Wasser gelöst wurden. Dies entsprach einer Konzentration von 2,0 mg/mL. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 5-8°C gelagert und unmittelbar vor der Verwendung mittels Spritzenfilter steril filtriert. 25,0 mL Medium II wurden mit 125 µL der Carbamazepinlösung versetzt. Dies entsprach einer Konzentration von 10 µg/mL Carbamazepin in dem fertigen Medium.

4.7.5 Medium II + Carbamazepinepoxid

Es wurde eine Carbamazepinepoxidlösung hergestellt, indem 1,0 mg Carbamazepinepoxid eingewogen und in 0,5 mL 40 Vol-% EtOH und 60 Vol.-% Wasser gelöst wurden. Dies entsprach einer Konzentration von 2,0 mg/mL. Die Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 5-8°C gelagert und unmittelbar vor der Verwendung mittels Spritzenfilter steril filtriert. 25,0 mL Medium II wurden mit 62,5 µL der Carbamazepinepoxidlösung versetzt. Dies entsprach einer Konzentration von 5 µg/mL Carbamazepinepoxid in dem fertigen Medium.

4.7.6 Medium II + Kontrolle

Als Kontrolllösung wurde eine Mischung aus 40 Vol-% EtOH und 60 Vol.-% Wasser verwendet. Wie die wirkstoffhaltigen Lösungen wurde die Kontrolllösung bis zur weiteren Verwendung bei 5-8°C gelagert und unmittelbar vor der Verwendung mittels Spritzenfilter steril filtriert. 25,0 mL Medium II wurden mit 125 µL Kontrolllösung versetzt. Die drei Medien mit den beiden Wirkstoffen und der Kontrolle wurden für jedes der drei unterschiedlichen Medien II hergestellt. Somit wurden insgesamt neun unterschiedliche Medien II für die Zellkultur verwendet. Die Herstellung erfolgte unmittelbar vor dem Beginn der Zellkultur.

4.7.7 Medium II Circadian

Es wurden 180 mL Medium I mit 20 mL FKS gemischt. Dies entsprach 10 Vol.-% Serum im Medium II.

4.7.8 Medium II LPS

1,0 mg LPS wurden in 1,0 mL Wasser gelöst und mittel Spritzenfilter steril filtriert. 50 mL Medium II Circadian wurden mit 25 µL LPS-Lösung versetzt. Dies entsprach einer Konzentration von 0,5 µg/mL LPS in dem fertigen Medium.

4.8 Statistik

Die massenspektrometrischen Daten wurden in MassLynx 4.1 und die HPLC-Daten in Empower 2 erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SPSS und ACOMED. In SPSS wurden die Korrelation nach Pearson bestimmt. Je nach Anwendung wurde ebenfalls mittels SPSS ein t-Test oder eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc-Test durchgeführt. Passing-Bablok Regressionsgeraden [181] wurden in dem Programm ACOMED erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Probenvorbereitung für die HPLC-Analytik mittels Dual-Load-SPE

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Probenvorbereitung zur quantitativen Bestimmung von Tryptophan, Serotonin, 5-Hydroxyindolessigsäure, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Kynureninsäure mittels HPLC-UV und HPLC-FLD. Dazu wurde die von uns als Dual-Load-SPE bezeichnete Methode zur Probenvorbereitung entwickelt (siehe Abbildung 5.1). Nachfolgend wird das Verfahren beschrieben, die benötigten Reagenzien sind dem Abschnitt 4.2 zu entnehmen.

Die benötigte Anzahl an Säulen zur Festphasenextraktion wird auf die Absaugstation gesteckt und beschriftet. Zur Vorbereitung (Äquilibrierung) werden jeweils 1,0 mL Acetonitril, 1,0 mL Ethanol und 1,0 mL Wasser aufgetragen und gewartet, bis das jeweilige Lösemittel vollständig durch die Säule gelaufen ist.

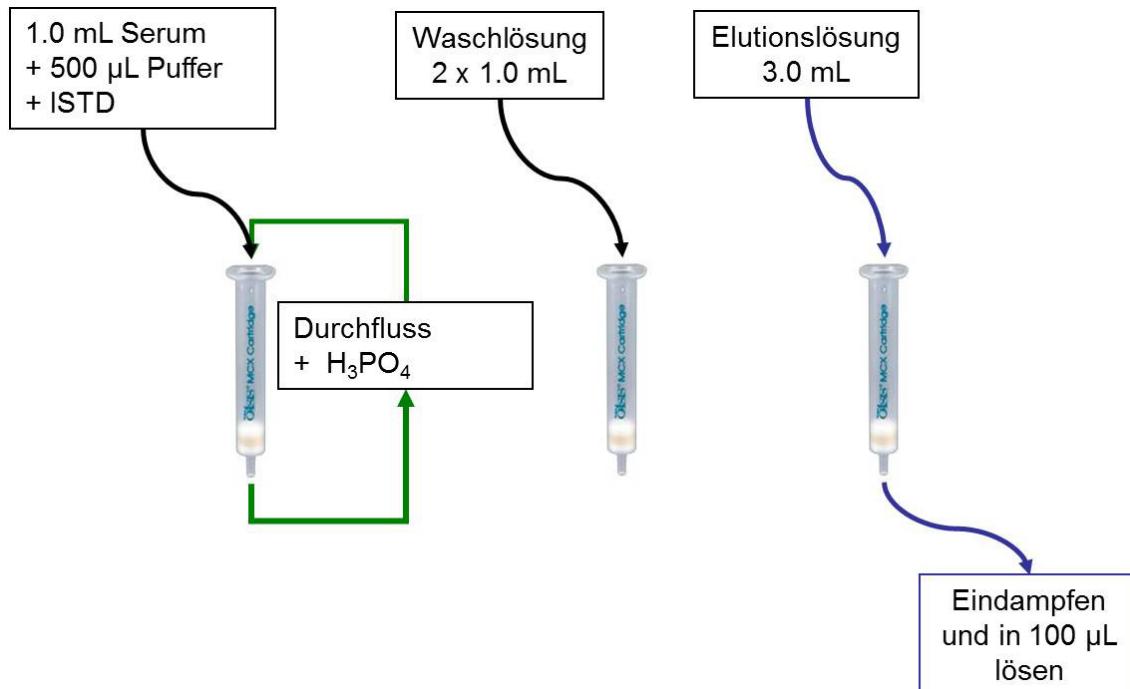


Abbildung 5.1: Probenvorbereitung für die HPLC: Dual-Load-SPE.

Parallel werden zur Probenvorbereitung jeweils 1,0 mL Kalibrator, Kontrolle oder Probe mit 0,5 mL Ammoniumacetatlösung und 150 µL ISTD gemischt (siehe Abschnitt 4.2) und für fünf Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Die vorbereiteten Proben werden anschließend auf die äquilibrierten SPE-Säulen aufgegeben (siehe Abschnitt 4.1.3), der Durchfluss mit beschrifteten Glasrörchen aufgefangen und mit 150 µL Phosphorsäurelösung gemischt (Vortex) und erneut aufgetragen. Der Durchfluss wird diesmal verworfen. Nach dem zweiten Auftragen werden die Säulen trocken gesaugt, zweifach mit 1,0 mL Waschlösung gespült und erneut trocken gesaugt. Um sicherzugehen, dass keine restliche Waschlösung in den SPE-Säulen enthalten ist, wird diese in 15 mL Polipropylenvials umgesteckt und mit 1000 RPM für ca. zwei Minuten zentrifugiert (Allegra™ 6R Centrifuge). Die SPE-Säulen werden wieder auf die Absaugstation gesteckt und die entsprechende Anzahl an Glasrörchen in das Auffanggestell gestellt. Mit 3,0 mL Elutionslösung werden die Analyte von den SPE-Säulen eluiert und bei 70°C im Metallblockthermostat, unter einem konstanten Stickstoffstrom, bis zur Trockne eingedampft, in 100 µL Wiederaufnahmelösung gelöst, in Probengläser (Total Recovery) überführt und analysiert. Jede Probe wird doppelt injiziert und mit zwei unterschiedlichen Methoden analysiert, um zum einen Trp (siehe Abschnitt 4.3.1) und zum anderen die Kynurenine zu detektieren (siehe Abschnitt 4.3.2).

Im Vergleich mit der bisherigen Methode [179] konnte eine Steigerung der Signalintensitäten um bis zu 237% beobachtet werden (siehe Tabelle 5.1). Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu ermitteln, wurde eine Probe sechsfach aufgearbeitet und analysiert. Dabei wurde ein maximaler Variationskoeffizient von 10% berechnet.

Analyt	Steigerung (%)	VK (%)
5-HIAA	21	6
KynA	27	3
3-HK	99	7
Kyn	172	2
Trp	221	2
3-HAA	237	3
5-HT	0	10

Tabelle 5.1: Steigerung der Signalintensität durch die Probenvorbereitung mittels Dual-Load-SPE und Variationskoeffizienten ($n = 6$).

5.2 HPLC-MS/MS-Methoden

Nachfolgend wird die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HPLC-MS/MS-Methode zur quantitativen Bestimmung von Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure, Chinolin-2-Carboxylsäure, Serotonin, Kynureninsäure, 5-Hydroxyindolessigsäure, Tryptophan, Xanthurinsäure, Kynurenin, 5-Hydroxytryptophan, Picolinsäure, Chinolinsäure und 3-Hydroxykynurenin beschrieben. Die genaue Zusammensetzung und Herstellung der verwendeten Reagenzien ist im Abschnitt 5.2 beschrieben.

5.2.1 Probenvorbereitung für die HPLC-MS/MS-Analytik

Zur Probenvorbereitung werden jeweils 300 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe mit 50 µL 2 M Harnstofflösung, 50 µL ISTD und 50 µL Additionslösung gemischt (siehe Abschnitt 4.4) und für fünf Minuten mit 1400 RPM bei 23°C geschüttelt (Thermomixer comfort). Anschließend werden 150 µL Fällungsmittel 1

hinzugestellt und fünf Minuten mit 1400 RPM bei 23°C geschüttelt. Nachdem 800 µL Fällungsmittel 2 zugesetzt wurden, wird erneut mit 1400 RPM bei 23°C geschüttelt und für zehn Minuten mit 14000 RPM bei 4°C abzentrifugiert (Mikro 22R). Je Probe werden zweimal 600 µL Fällungsüberstand in zwei 1,5 mL Reagiergefäße überführt und bei 60°C für 3,5 Stunden im Vakuumkonzentrator (Christ) evaporiert.

Ein Aliquot wird mit 50 µL "Wiederaufnahmelösung underivatisiert" rekonstituiert, in Probengläser mit Glaseinsatz überführt und analysiert. Das zweite Aliquot wird in 200 µL HCl/Butanol gelöst und für 60 Minuten bei 90°C im Schüttler derivatisiert (1400 RPM) und anschließend bei 60°C für eine Stunde im Vakuumkonzentrator evaporiert. Anschließend wird die Probe in 50 µL "Wiederaufnahmelösung derivatisiert" gelöst, in Probengläser mit Glaseinsatz überführt und analysiert. Die Probenvorbereitung ist in der Tabelle 5.2 zusammengefasst.

300 µL Probe	
+ 50 µL 2 M Harnstofflösung	
+ 50 µL ISTD	
+ 50 µL Additionslösung	→ 5 Minuten schütteln bei RT
+ 150 µL Fällungsmittel 1	→ 5 Minuten schütteln bei RT
+ 800 µL Fällungsmittel 2	→ 5 Minuten schütteln bei RT 10 Minuten bei 4°C zentrifugieren
2 * 600 µL Fällungsüberstand abnehmen in 2 1,5 mL Reagiergefäße überführen	→ 3,5 h bei 60°C evaporieren
1. Aliquot + 50 µL Wiederaufnahmelösung underivatisiert	→ underivatisierte Analyse
2. Aliquot + 200 µL HCl/Butanol	→ 60 Minuten schütteln bei 90°C 1 h bei 60°C evaporieren
+ 50 µL Wiederaufnahmelösung derivatisiert	→ derivatisierte Analyse

Tabelle 5.2: Probenvorbereitung für die HPLC-MS/MS-Analytik.

Abbildung 5.2 A zeigt exemplarisch die Derivatisierung von Picolinsäure. In Gegenwart von Salzsäure wird unter Abspaltung von Wasser aus Picolinsäure und Butanol ein Butylester gebildet. Dadurch wird zum einen die Molekülmasse erhöht, zum anderen verändern sich aber auch die chromatographischen Eigenschaften. Durch die Seitenkette wird das Molekül deutlich unpolarer und dadurch stärker auf der verwendeten Umkehrphasensäule (Kinetex XB-C18, 2,6 µm, 2,1 * 150 mm, Phenomenex) retardiert. Chinolinsäure ist eine Dicarbonsäure und kann daher auch zweifach verestert werden (siehe Abbildung 5.2 B). Um eine vollständige Reaktion zu erzielen, wurden die Reaktionstemperatur und Reaktionszeit optimiert und eine optimale Dauer von 60 Minuten bei einer optimalen Temperatur von 90°C ermittelt. Nicht bei allen Substanzen ist eine Derivatisierung zur Quantifizierung möglich. So kann 5-HT aufgrund der fehlenden Carbonsäure nicht verestert werden. Die Substanzen 5-HTP und 5-HIAA können zwar aufgrund ihrer chemischen Struktur derivatisiert werden, jedoch kann der Ester nicht reproduzierbar nachgewiesen werden.

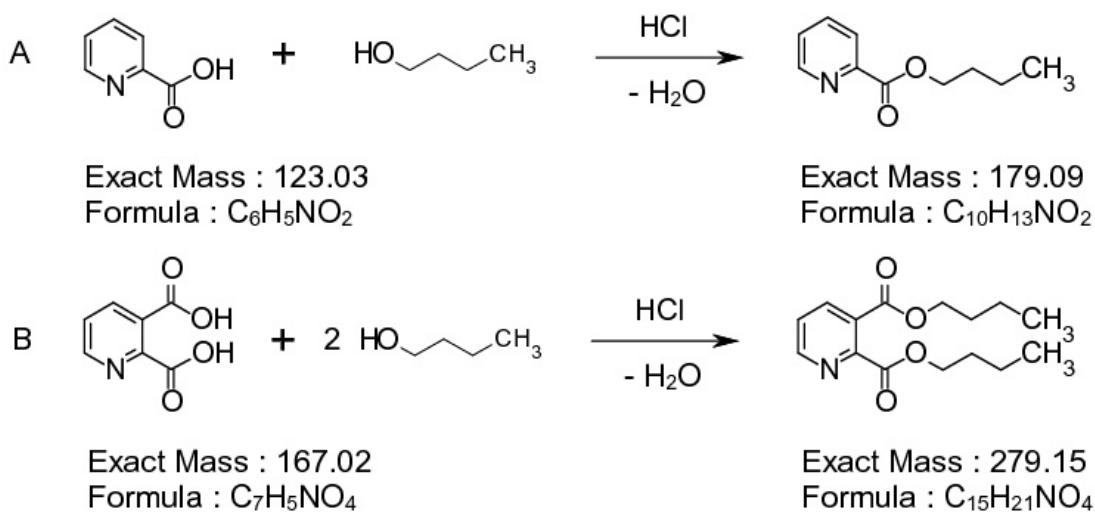


Abbildung 5.2: A: Derivatisierung am Beispiel der Picolinsäure. Unter Abspaltung von Wasser wird in Gegenwart von Salzsäure aus Picolinsäure und Butanol bei 90°C ein Butylster gebildet. B: Chinolinsäure ist eine Dicarbonsäure und kann daher auch einen Dibutylester bilden.

5.2.2 MS Tunepage Parameter

Die Parameter für die Tunepage, d.h. die substanzunabhängigen Parameter der Ionenquelle, wurden manuell ermittelt. Dabei haben insbesondere die Parameter "Capillary Voltage", "Desolvation Temperature" und "Desolvation Gas Flow" einen erheblichen Einfluss auf die Signalintensität. Letztendlich stellen alle Parameter einen Kompromiss dar, da sie allgemeingültig für alle Analyte ermittelt werden mussten.

Polarity	ES+	Gas On MSMS Mode Entrance	0.50
Calibration	Static 2	Gas On MSMS Mode Exit	0.50
Capillary (kV)	1.00	Gas Off MSMS Mode Entrance	30.00
Extractor (V)	3.00	Gas Off MSMS Mode Exit	30.00
Source Temperature (°C)	150	ScanWave MSMS Mode Entrance	0.50
Desolvation Temperature (°C)	650	ScanWave MSMS Mode Exit	0.50
Cone Gas Flow (L/Hr)	OFF	LM 2 Resolution	2.9
Desolvation Gas Flow (L/Hr)	1200	HM 2 Resolution	14.6
Collision Gas Flow (mL/Min)	0.15	Ion Energy 2	0.8
LM 1 Resolution	2.9	Gain	1.00
HM 1 Resolution	14.5	Multiplier	514.53

Tabelle 5.3: Substanzunabhängige Parameter der Ionenquelle.

5.2.3 UPLC-Methode underivatisiert

Für die underivatisierte Analyse wird eine Kinetex XB-C18 Umkehrphasensäule mit 2,6 µm Partikeln, 2,1 mm Innendurchmesser und 150 mm Länge der Firma Phenomenex verwendet. Für die Analyse der underivatisierten Substanzen sind die Parameter der UPLC-Pumpe in Tabelle 5.6, der Gradient in Tabelle 5.4 und die Einstellungen des automatischen Probengebers in der Tabelle 5.5 aufgeführt.

	Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	% A	%B	Kurve
1	INITIAL	0,25	90	10	
2	1,00	0,25	90	10	6
3	4,00	0,25	60	40	6
4	4,50	0,25	60	40	6
5	4,51	0,25	5	95	6
6	6,00	0,50	5	95	6
7	6,25	0,50	5	95	6
8	6,26	0,50	90	10	6
9	7,50	0,50	90	10	6
10	7,51	0,25	90	10	6

Tabelle 5.4: Gradient der UPLC-Pumpe zur Analyse der underivatisierten Substanzen.

Run Time	1,00 min
Load Ahead	Enabled
Loop Option	Partial Loop With Needle Overfill
Loop Offline	Disable
Weak Wash Solvent Name	10% ACN
Weak Wash Volume	600 µL
Strong Wash Solvent Name	50% ACN 50% MeOH
Strong Wash Volume	200 µL
Target Column Temperature	30,0°C
Column Temperature Alarm Band	5,0°C
Target Sample Temperature	6,0°C
Sample Temperature Alarm Band	5,0°C
Full Loop Overfill Factor	Automatic
Syringe Draw Rate	Automatic
Needle Placement	3.0
Pre-Aspirate Air Gap	1,0
Post-Aspirate Air Gap	1,0
Needle Overfill Flush	3,0
Sample Loop Size	10,0
Injection Volume (µl)	7,50

Tabelle 5.5: Parameter des Probengebers zur Analyse der underivatisierten Substanzen.

Run Time	8,00 min
Low Pressure Limit	0 bar
High Pressure Limit	1034,2 bar
Seal Wash	5,0 min

Tabelle 5.6: Parameter der UPLC-Pumpe zur Analyse der underivatisierten Substanzen.

5.2.4 MS/MS-Methode underivatisiert

Für alle Analyte wurde die Scanzeit mittels der Option "Auto Dwell" festgelegt und für die Bestimmung der einzelnen Substanzen ein Zeitfenster definiert, um eine möglichst lange "Dwell Time" zu erhalten.

#	Compound	Parent m/z	Daughter m/z	Cone (V)	Collision (V)	Rt (min)
1	AA	138,11	92,10	12	20	5,45
1	AA	138,11	120,06	12	10	5,45
2	3-HAA	154,11	80,10	12	24	4,26
2	3-HAA	154,11	136,03	12	16	4,26
3	QuinaldA	174,14	128,10	16	22	4,98
3	QuinaldA	174,14	156,20	16	12	4,98
4	5-HT	177,11	132,17	12	20	4,40
4	5-HT	177,11	160,06	12	12	4,40
5	KynA	190,07	116,12	24	30	4,95
5	KynA	190,07	144,06	24	18	4,95
6	5-HIAA	192,08	91,09	16	30	4,69
6	5-HIAA	192,08	118,26	16	26	4,69
7	KynA-d5	195,14	121,20	18	30	4,93
7	KynA-d5	195,14	149,21	18	18	4,93
7	KynA-d5	195,14	177,21	18	12	4,93
8	Trp	205,07	118,03	12	26	5,33
8	Trp	205,07	146,04	12	18	5,33
9	Xan	206,07	132,08	18	26	4,87
9	Xan	206,17	160,09	18	20	4,87
10	Kyn	209,12	94,09	12	14	4,43
10	Kyn	209,12	192,05	12	8	4,43
11	Trp-d5	210,21	122,23	12	26	5,31
11	Trp-d5	210,21	150,24	12	18	5,31
11	Trp-d5	210,21	210,21	12	10	5,31
12	5-HTrp	221,20	162,15	12	20	4,18
12	5-HTrp	221,20	204,40	12	11	4,18
13	3-HK	225,11	162,10	14	18	3,16
13	3-HK	225,11	208,07	14	10	3,16

Tabelle 5.7: MRM-Übergänge und MS/MS-Parameter für die underivatisierte Analytik.

In der Software wurde festgelegt, dass je Peak zwölf Datenpunkte aufgenommen werden sollen. Je Analyt wurde der signalstärkere MRM-Übergang zur Quantifizierung und der zweite MRM-Übergang zur Qualifizierung verwendet. Die Optimierung der Übergänge erfolgte zunächst automatisch, wurde

später jedoch manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die substanzspezifischen Parameter der MS/MS-Methode sind in Tabelle 5.7 aufgelistet.

5.2.5 UPLC-Methode derivatisiert

Wie bereits für die Analyse der underivatisierten Analyte wurde auch für die Analyse der derivatisierten Substanzen eine Kinetex XB-C18 Umkehrphasensäule mit 2,6 µm Partikeln, 2,1 mm Innendurchmesser und 150 mm Länge der Firma Phenomenex verwendet. Für die Analyse der derivatisierten Substanzen sind die Einstellungen des automatischen Probengebers in der Tabelle 5.8, die Parameter der UPLC-Pumpe in Tabelle 5.9 und der Gradient in Tabelle 5.10 aufgeführt.

Run Time	1,00 min
Load Ahead	Enabled
Loop Option	Partial Loop With Needle Overfill
Loop Offline	Disable
Weak Wash Solvent Name	10% ACN
Weak Wash Volume	600 µL
Strong Wash Solvent Name	50% ACN 50% MeOH
Strong Wash Volume	200 µL
Target Column Temperature	30,0°C
Column Temperature Alarm Band	5,0°C
Target Sample Temperature	6,0°C
Sample Temperature Alarm Band	5,0°C
Full Loop Overfill Factor	Automatic
Syringe Draw Rate	Automatic
Needle Placement	3,0
Pre-Aspirate Air Gap	1,0
Post-Aspirate Air Gap	1,0
Needle Overfill Flush	3,0
Sample Loop Size	10,0
Injection Volume (µl)	7,50

Tabelle 5.8: Parameter des Probengebers zur Analyse der derivatisierten Substanzen.

Run Time	8,50 min
Low Pressure Limit	0 bar
High Pressure Limit	1034,2 bar
Seal Wash	5,0 min

Tabelle 5.9: Parameter der UPLC-Pumpe zur Analyse der derivatisierten Substanzen.

	Zeit (min)	Flussrate (mL/min)	% A	%B	Kurve
1	INITIAL	0,25	70	30	
2	1,00	0,25	70	30	6
3	5,00	0,25	25	75	6
4	5,10	0,25	5	95	6
5	7,00	0,25	5	95	6
6	7,01	0,50	5	95	6
7	7,50	0,50	5	95	6
8	7,51	0,50	70	30	6
9	8,00	0,50	70	30	6
10	8,01	0,25	70	30	6

Tabelle 5.10: Gradient der UPLC-Pumpe zur Analyse der derivatisierten Substanzen.

5.2.6 MS/MS-Methode derivatisiert

Für alle Analyte wurde die Scanzeit mittels der Option "Auto Dwell" festgelegt und für die Bestimmung der einzelnen Substanzen ein Zeitfenster definiert, um eine möglichst lange "Dwell Time" zu erhalten. In der Software wurde festgelegt, dass je Peak zwölf Datenpunkte aufgenommen werden sollen. Je Analyt wurde der signalstärkere MRM-Übergang zur Quantifizierung und der zweite MRM-Übergang zur Qualifizierung verwendet. Die Optimierung der Übergänge erfolgte zunächst automatisch, wurde später jedoch manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert. Die substanzspezifischen Parameter der MS/MS-Methode sind in Tabelle 5.11 aufgelistet.

#	Compound Name	Parent m/z	Daughter m/z	Cone (V)	Collision (V)	Rt (min)
1	Pic-butylester	180,13	106,09	14	18	5,99
1	Pic-butylester	180,13	124,07	14	10	5,99
2	Pic-d4-butylester	184,13	110,10	14	18	5,96
2	Pic-d4-butylester	184,13	28,07	14	10	5,96
3	AA-butylester	194,10	92,07	12	28	6,79
3	AA-butylester	194,10	120,09	12	10	6,79
4	3-HAA-butylester	210,14	108,05	12	26	6,65
4	3-HAA-butylester	210,14	136,07	12	14	6,65
5	QuinaldA-butylester	230,12	128,04	20	22	6,78
5	QuinaldA-butylester	230,12	156,04	20	16	6,78
6	KynA-butylester	246,14	144,07	20	26	6,39
6	KynA-butylester	246,14	190,05	20	14	6,39
7	KynA-d5-butylester	251,23	149,26	22	24	6,38
7	KynA-d5-butylester	251,23	177,26	22	18	6,38
7	KynA-d5-butylester	251,23	195,29	22	14	6,38
8	Trp-butylester	261,20	132,14	14	28	5,45
8	Trp-butylester	261,20	244,19	14	12	5,45
9	Xan-butylester	262,12	132,08	22	36	6,51
9	Xan-butylester	262,12	160,02	22	26	6,51
10	Kyn-butylester	265,18	118,08	14	26	4,45
10	Kyn-butylester	265,18	136,12	14	18	4,45
11	Quin-2-butylester	280,18	78,06	16	32	6,78
11	Quin-2-butylester	280,18	149,99	16	14	6,78
12	3-HK-butylester	281,18	152,08	16	16	4,67
12	3-HK-butylester	281,18	264,12	16	10	4,67

Tabelle 5.11: MRM-Übergänge und MS/MS-Parameter für die derivatisierte Analytik.

5.2.7 Auswertung

Für alle Versuche wurde, soweit nicht anders erwähnt, eine lineare, $1/x$ gewichtete Auswertung, bei welcher die Regressionsgerade nicht durch den Ursprung gezwungen wurde (Exclude), in dem Mass-Lynx Unterprogramm TargetLynx verwendet. Es wurden jeweils die Peakflächen beider MRM-Übergänge addiert.

5.3 Validierung der HPLC-MS/MS-Methoden

5.3.1 Reproduzierbarkeit des HPLC-MS/MS-Systems

Beliebige derivatisierte und underivatisierte Proben aus vorherigen Versuchen wurden gemischt und jeweils 25-fach analysiert (siehe Abschnitt 5.2). Jede Probe wurde dabei als Standard definiert und jedem Analyten die fiktive Konzentration 1 zugeordnet. Unter Berücksichtigung des jeweiligen internen Standards wurden die Daten ausgewertet, eine Regelkarte erstellt und der entsprechende Variationskoeffizient berechnet.

In nachfolgender Tabelle 5.12 sind die Variationskoeffizienten der einzelnen Analyte aufgeführt.

Analyt	VK (%)	Analyt	VK (%)
AA	4,3	AA-but	4,6
3-HAA	5,6	3-HAA-but	1,5
QuinaldA	3,6	QuinaldA-but	2,0
5-HT	7,0		
KynA	3,1	KynA-but	1,5
5-HIAA	8,0		
Trp	3,8	Trp-but	1,2
Xan	4,8	Xan-but	1,4
Kyn	4,1	Kyn-but	1,3
5-HTP	5,3		
3-HK	4,4	3-HK-but	1,9
		Pic-but	1,9
		Quin-but	2,7

Tabelle 5.12: Reproduzierbarkeit des LC-MS/MS-Systems. Auf der linken Seite sind die Variationskoeffizienten (VK) für 25 identische underivatisierte, auf der rechten Seite für 25 identische derivatisierte Analysen aufgelistet.

Bei den in SPSS erstellten Regelkarten werden Punkte hervorgehoben, welche um mehr als +/- 3 Sigma vom Mittelwert abweichen, wenn sechs Punkte in einer Reihe einen Aufwärts- oder Abwärtsrend darstellen, oder acht Punkte über oder unter dem Mittelwert liegen. Die so hervorgehobenen Messwerte wurden überprüft. In Abbildung 5.3 werden exemplarisch die Regelkarten für AA, 3-HAA und Quin-butylester dargestellt.

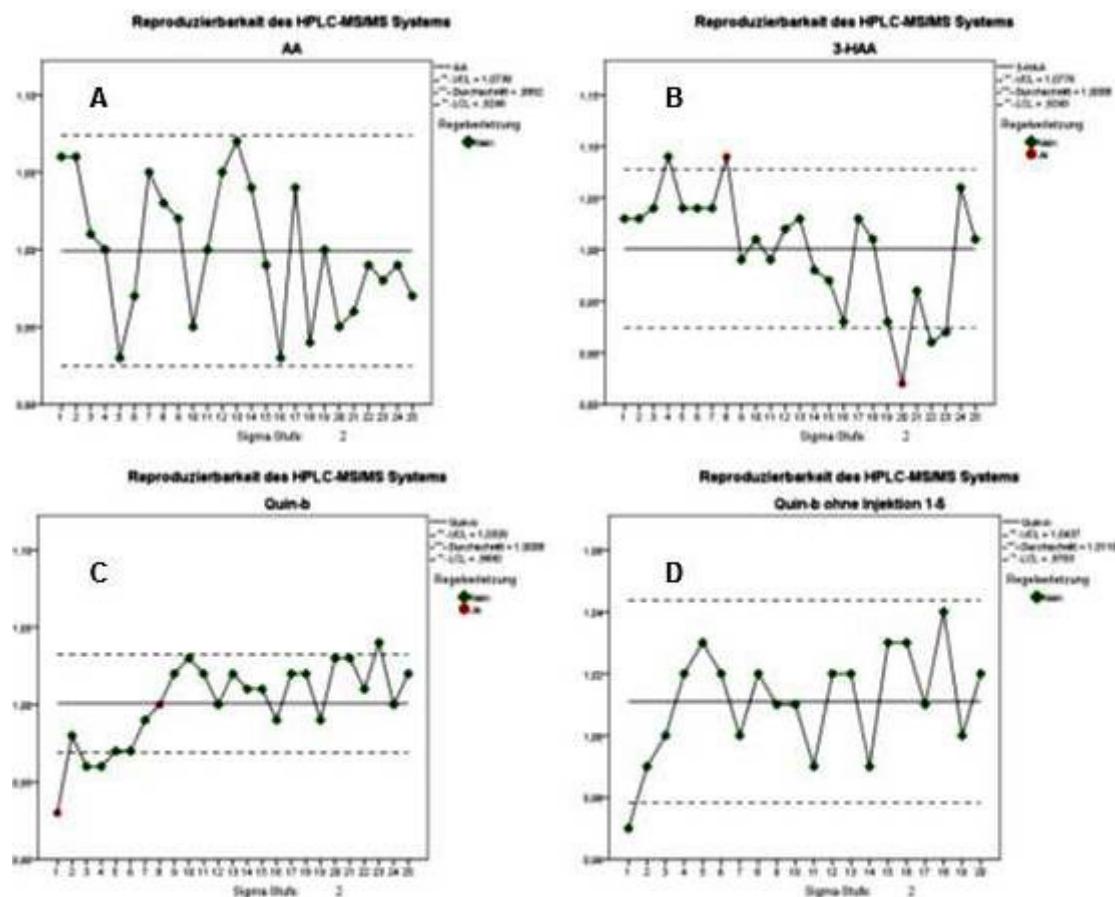


Abbildung 5.3: Reproduzierbarkeit des LC-MS/MS-Systems. A: Keine Regelverletzung bei AA. B: Regelverletzung bei 3-HAA. Mehr als acht aufeinander folgende Punkte befinden sich über dem Mittelwert, bzw. mehr als drei Sigma kleiner als der Mittelwert. C: Regelverletzung bei Quin-butylester. Der erste Punkt ist um mehr als drei Sigma kleiner als der Mittelwert und acht aufeinander folgende Punkte befinden sich über oder unter dem Mittelwert. D: Keine Regelverletzung bei Quin-butylester, wenn die ersten fünf Injektionen zum Äquilibrieren verwendet und daher aus der Darstellung entfernt werden.

Regelverletzungen wurden für folgende Substanzen festgestellt: 3-HAA (acht aufeinander folgende Punkte liegen über der Mittellinie; ein Punkt ist um mehr als drei Sigma kleiner als der Mittelwert), 3-HAA-butylester (ein Punkt ist um mehr als drei Sigma kleiner als der Mittelwert), Xan-butylester (mehr als drei Sigma größer als der Mittelwert) und Quin-butylester (ein Punkt um mehr als drei Sigma kleiner als der Mittelwert). Wenn die ersten fünf Injektionen zum Äquilibrieren verwendet und daher aus der Darstellung entfernt werden, sind keine Regelverletzungen mehr vorhanden.

5.3.2 Optimale Derivatisierungsdauer und Derivatisierbarkeit des internen Standards Trp-d5

Im Zuge der Methodenentwicklung wurde festgestellt, dass der interne Standard Trp-d5 nach der Derivatisierung lediglich zu einem sehr schwachen Signal führte oder teilweise gar nicht detektierbar war. Um den Einfluss der Derivatisierung zu überprüfen, wurde eine Serumprobe aus dem TDM Labor der

Psychiatrischen Klinik mehrfach aufgearbeitet und dabei die Derivatisierungsdauer in Schritten von je zehn Minuten bis maximal 60 Minuten variiert. Anschließend wurden alle Proben gleichzeitig evapiert, rekonstituiert und analysiert, wie in Tabelle 5.2 beschrieben wurde. Die Auswertung erfolgte in MassLynx und die exportierten Daten wurden in Excel graphisch aufgearbeitet. Beispielhaft ist in Abbildung 5.4 der Einfluss der Derivatisierungsdauer auf Tryptophan dargestellt.

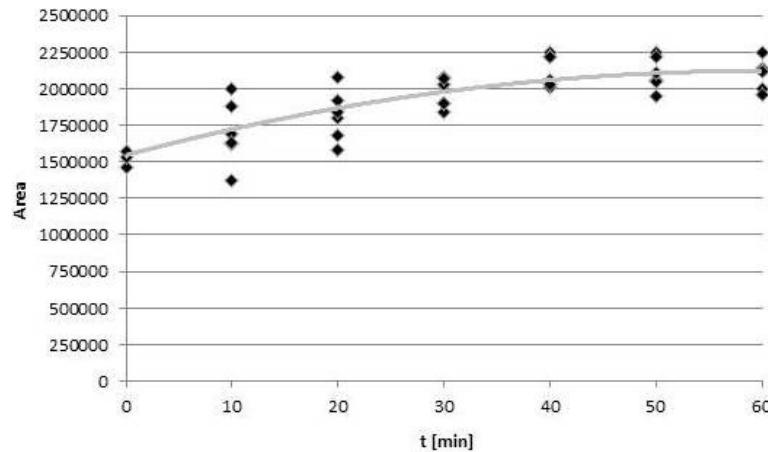


Abbildung 5.4: Einfluss der Derivatisierungsdauer auf die Signalintensität von Trp. Nach 40 Minuten wird ein Plateau erreicht und die Signale steigen nicht weiter an.

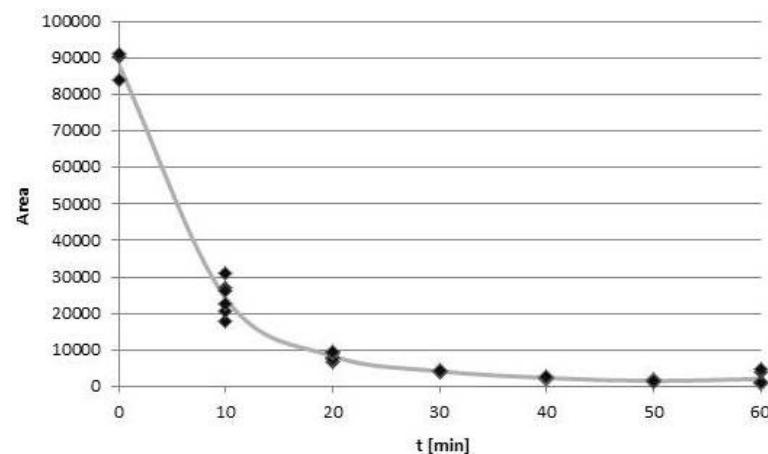


Abbildung 5.5: Einfluss der Derivatisierungsdauer auf die Signalintensität des internen Standards Trp-d5.

Die Resultate zeigen eindeutig, dass eine Derivatisierungsdauer für alle Analyte, mit Ausnahme des internen Standards Trp-d5, von mindestens 40 Minuten bei einer Derivatisierungstemperatur von 90°C Pflicht ist. Danach erreichen die gemessenen Peakflächen ein Plateau. Die optimale Reaktionszeit wird auf 60 Minuten festgelegt (vergleiche Abschnitt 5.2). Nach dieser Zeit sind die Schwankungen deutlich kleiner und eventuelle Fehlerquellen, wie z.B. ein nicht optimal vorgewärmter Heizblock, werden ausgeglichen. Eine optimale Reaktion ist vor allem für Chinolinsäure wichtig (vergleiche Abbildung 5.2), da diese Substanz eine Dicarbonsäure ist und zweifach verestert werden muss. Bei einer zu geringen Temperatur,

5 Ergebnisse

oder zu kurzer Reaktionszeit, wird Chinolinsäure nicht optimal umgesetzt und liegt teilweise als einfacher Butylester vor.

Anders sieht dies jedoch für die Substanz Trp-d5 aus (siehe Abbildung 5.5). Sie zeigt einen deutlichen Signalabfall mit längerer Derivatisierungsdauer. Dass bei 0 Minuten ein Signal zu erkennen ist, liegt daran, dass die Derivatisierungsreaktion während des Evaporierens bei 60°C stattfand. Der interne Standard Trp-d5 kann somit nicht für die Auswertung herangezogen werden.

5.3.3 Reproduzierbarkeit

Zur Reproduzierbarkeitsüberprüfung der Methode und zur Ermittlung der Schwankungen zwischen einzelnen Messtagen wurden die Kalibratoren 0 bis 6 je einfach, die Kontrollen 3 und 5 je fünffach an fünf unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und analysiert (Inter-Assay Reproduzierbarkeit - siehe Abschnitt 5.2).

Level 3	AA	3-HAA	QuinaldA	5-HT	KynA	5-HIAA	Trp	Xan	Kyn	5-HTP	3-HK
Mittelwert	81,3	247	13,0	254	31,3	39,6	12644	63,0	292	50,8	15,1
Standardabweichung	6,3	11	0,3	14	1,0	3,4	446	0,6	9	2,6	1,8
VK	7,7%	4,6%	2,6%	5,6%	3,1%	8,7%	3,5%	1,0%	3,2%	5,2%	11,9%
Sollwert	84,1	256	13,5	244	31,6	40,1	13000	66,0	307	49,7	15,5
Abweichung	3,4%	3,4%	3,7%	4,1%	1,1%	1,3%	2,7%	4,6%	4,9%	2,3%	2,6%

Level 4	AA	3-HAA	QuinaldA	5-HT	KynA	5-HIAA	Trp	Xan	Kyn	5-HTP	3-HK
Mittelwert	114	296	25,7	356	57,6	53,4	15183	92,3	404	77,4	29,7
Standardabweichung	4	15	1,0	28	1,9	4,8	449	2,3	18	3,8	1,3
VK	3,6%	5,1%	4,0%	8,0%	3,3%	9,0%	3,0%	2,5%	4,4%	4,9%	4,4%
Sollwert	109	281	26,0	344	56,6	52,6	15000	91,0	407	74,7	28,0
Abweichung	4,1%	5,5%	1,0%	3,6%	1,8%	1,5%	1,2%	1,5%	0,6%	3,6%	6,0%

Level 5	AA	3-HAA	QuinaldA	5-HT	KynA	5-HIAA	Trp	Xan	Kyn	5-HTP	3-HK
Mittelwert	150	321	51,0	437	82,2	78,6	19975	116	515	99,7	54,7
Standardabweichung	6	12	1,4	24	1,6	4,5	543	2	20	4,0	2,4
VK	4,0%	3,8%	2,7%	5,5%	1,9%	5,7%	2,7%	1,6%	3,9%	4,0%	4,4%
Sollwert	159	331	51,0	444	81,6	77,6	20000	116	507	99,7	53,0
Abweichung	5,8%	2,9%	0,1%	1,6%	0,7%	1,3%	0,1%	0,4%	1,6%	0,0%	3,3%

Level 3	Pic-b	AA-b	3-HAA-b	QuinaldA-b	KynA-b	Trp-b	Xan-b	Kyn-b	Quin-b	3-HK-b
Mittelwert	19,2	84,8	94,1	12,9	31,7	13152	24,1	376	47,6	16,1
Standardabweichung	0,6	4,1	6,4	1,0	2,0	485	0,6	10	1,6	1,2
VK	3,0%	4,8%	6,9%	8,1%	6,3%	3,7%	2,4%	2,6%	3,3%	7,3%
Sollwert	19,6	84,1	99,3	13,5	32,5	13000	26,3	394	47,3	15,5
Abweichung	2,3%	0,9%	5,2%	4,5%	2,4%	1,2%	8,4%	4,6%	0,6%	3,6%

Level 4	Pic-b	AA-b	3-HAA-b	QuinaldA-b	KynA-b	Trp-b	Xan-b	Kyn-b	Quin-b	3-HK-b
Mittelwert	34,8	111	127	26,5	58,6	15804	51,6	513	63,9	29,1
Standardabweichung	1,4	6	5	0,6	1,4	588	1,5	18	2,0	0,9
VK	4,0%	5,6%	4,0%	2,3%	2,4%	3,7%	3,0%	3,5%	3,1%	3,2%
Sollwert	32,1	109	124	26,0	57,5	15000	51,3	494	59,8	28,0
Abweichung	8,3%	1,5%	1,9%	1,7%	1,9%	5,4%	0,5%	3,9%	6,8%	4,0%

Level 5	Pic-b	AA-b	3-HAA-b	QuinaldA-b	KynA-b	Trp-b	Xan-b	Kyn-b	Quin-b	3-HK-b
Mittelwert	58,0	164	177	52,3	82,5	20323	77,4	584	86,2	52,7
Standardabweichung	1,8	6	8	0,8	1,7	423	1,1	25	1,3	3,2
VK	3,1%	3,4%	4,5%	1,6%	2,1%	2,1%	1,5%	4,3%	1,5%	6,0%
Sollwert	57,1	159	174	51,0	82,5	20000	76,3	594	84,8	53,0
Abweichung	1,5%	3,3%	1,7%	2,5%	0,0%	1,6%	1,5%	1,7%	1,6%	0,6%

Tabelle 5.13: Ergebnisse der Untersuchung zur Intra-Assay Reproduzierbarkeit. Das underivatisierte 3-HK besitzt beim Level 3 den größten VK mit 11,9%. Die übrigen VKs sind alle kleiner als 10%. Die Abweichungen vom Sollwert betragen maximal 8,5% (Xan-b; Level 3).

Am ersten Tag wurde ebenfalls noch die Kontrolle 4 fünffach aufgearbeitet und der Blindwert bestimmt. Mit den Blindwerten des Leerserums und den zugesetzten Konzentrationen der einzelnen Kalibratoren und Kontrollen konnten deren tatsächliche Werte festgelegt werden. Am zweiten Tag wurde die Kontrolle 5 insgesamt zehnfach als Intra-Assay aufgearbeitet und analysiert. Genauso wurde mit der Kontrolle 3 am

5 Ergebnisse

dritten Tag und mit der Kontrolle 4 am vierten Tag verfahren. Die Daten wurden mittels MassLynx ausgewertet, exportiert und in Excel die Variationskoeffizienten der Intra-Assay Reproduzierbarkeit ($n = 10$) und der Inter-Assay Reproduzierbarkeit ($n = 5 * 5$) berechnet. Die Ergebnisse befinden sich in den beiden nachfolgenden Tabellen 5.13 und 5.14.

Level 3	AA	3-HAA	QuinaldA	5-HT	KynA	5-HIAA	Trp	Xan	Kyn	5-HTP	3-HK
Mittelwert	80,8	255	13,2	242	30,8	40,6	12981	63,4	295	48,5	16,0
Standardabweichung	5,2	20	0,6	20	1,4	4,7	653	1,2	18	3,0	1,8
VK	6,4%	7,9%	4,8%	8,3%	4,7%	11,5%	5,0%	1,8%	6,2%	6,2%	11,3%
Sollwert	84,1	256	13,5	244	31,6	40,1	13000	66,0	307	49,7	15,5
Abweichung	3,9%	0,5%	2,0%	0,9%	2,6%	1,3%	0,1%	4,0%	3,7%	2,4%	3,0%

Level 5	AA	3-HAA	QuinaldA	5-HT	KynA	5-HIAA	Trp	Xan	Kyn	5-HTP	3-HK
Mittelwert	163	336	51,9	449	83,3	80,5	20408	119	511	103,3	54,5
Standardabweichung	12	14	2,1	34	3,7	5,0	807	3	30	5,0	5,0
VK	7,6%	4,3%	4,0%	7,5%	4,4%	6,2%	4,0%	2,6%	5,9%	4,9%	9,2%
Sollwert	159	331	51,0	444	81,6	77,6	20000	116	507	99,7	53,0
Abweichung	2,7%	1,5%	1,8%	1,2%	2,0%	3,8%	2,0%	2,7%	0,9%	3,6%	2,8%

Level 3	Pic-b	AA-b	3-HAA-b	QuinaldA-b	KynA-b	Trp-b	Xan-b	Kyn-b	Quin-b	3-HK-b
Mittelwert	19,9	86,4	98,8	13,4	32,6	13359	24,1	382	47,5	15,8
Standardabweichung	1,1	3,4	6,0	0,8	1,7	757	1,0	27	2,3	1,1
VK	5,6%	4,0%	6,1%	6,1%	5,2%	5,7%	4,1%	7,2%	4,8%	6,9%
Sollwert	19,6	84,1	99,3	13,5	32,5	13000	26,3	394	47,3	15,5
Abweichung	1,3%	2,8%	0,5%	0,9%	0,3%	2,8%	8,3%	3,1%	0,4%	2,2%

Level 5	Pic-b	AA-b	3-HAA-b	QuinaldA-b	KynA-b	Trp-b	Xan-b	Kyn-b	Quin-b	3-HK-b
Mittelwert	56,8	159	183	51,3	85,1	20186	75,0	599	84,4	54,7
Standardabweichung	3,1	11	10	1,9	2,3	930	5,5	38	5,5	5,1
VK	5,5%	7,2%	5,2%	3,6%	2,7%	4,6%	7,4%	6,3%	6,5%	9,3%
Sollwert	57,1	159	174	51,0	82,5	20000	76,3	594	84,8	53,0
Abweichung	0,6%	0,3%	5,0%	0,5%	3,1%	0,9%	1,7%	0,9%	0,5%	3,2%

Tabelle 5.14: Ergebnisse der Untersuchung zur Inter-Assay Reproduzierbarkeit. Die underivatisierten Analyte 3-HK und 5-HIAA besitzen beim Level 3 die größten VKs mit 11,3% und 11,5%. Die übrigen VKs sind alle kleiner als 10%. Die Abweichungen vom Sollwert betragen maximal 8,3% (Xan-b; Level 3).

Die Ergebnisse wurden als Boxplot-Diagramm dargestellt (siehe Abbildung 5.6 und 5.7) und nach Aufälligkeiten, wie z.B. eine vermehrte Anzahl an harten oder weichen Ausreißern, überprüft. In Abbildung 5.6 ist zu erkennen, dass innerhalb der Untersuchungen zur Intra-Assay Reproduzierbarkeit für QuinaldA keine Ausreißer beobachtet wurden. Für Xan sind zwei weiche Ausreißer hervorgehoben. 3-HK zeigt nach der Veresterung (3-HK-b) eine deutlich geringere Streuung. Daher sollte 3-HK als Butylester analysiert werden.

Die Abbildung 5.7 zeigt die exemplarischen Ergebnisse der Inter-Assay Reproduzierbarkeitsuntersuchung als Boxplots. 5-HIAA besitzt zwar den größten VK (11,5%), jedoch sind nur zwei weiche Ausreißer festgestellt worden. Underivatisiertes 3-HK zeigt, wie auch bei der Intra-Assay Reproduzierbarkeit, eine starke Streuung, welche durch einzelne Ausreißer erklärt werden kann. Dass die Derivatisierung generell reproduzierbar ist, kann der Darstellung des derivatisierten Kynurenins (Kyn-b) entnommen werden. Hingegen besitzt die derivatisierte 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA-b) einige starke Ausreißer, weshalb sich eine Analyse im derivatisierten Zustand nicht empfiehlt.

5 Ergebnisse

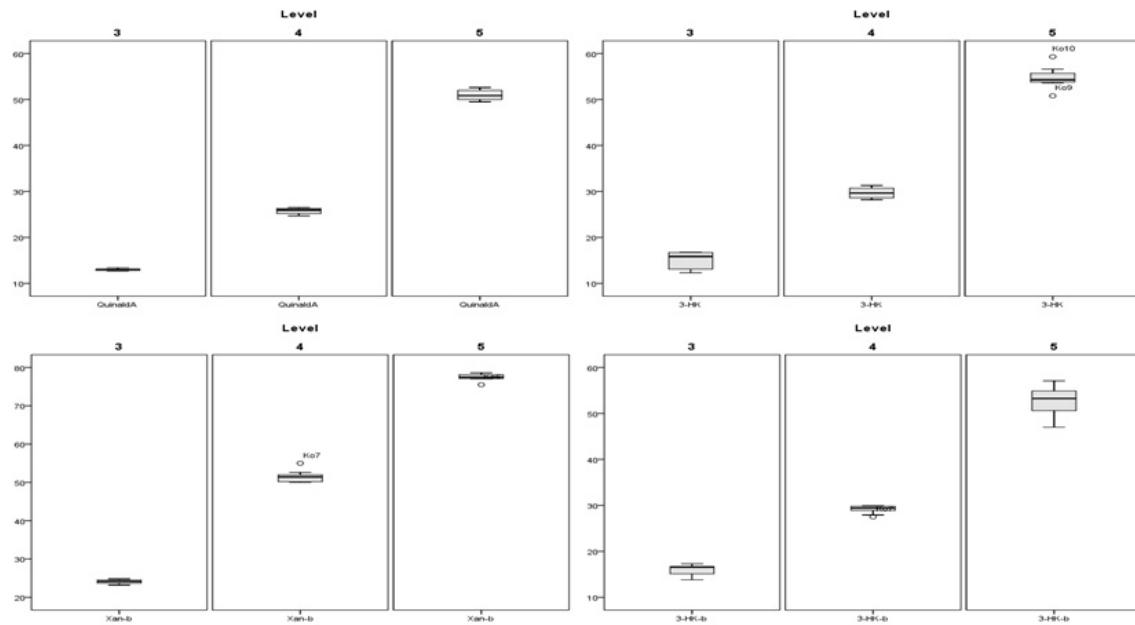


Abbildung 5.6: Intra-Assay Reproduzierbarkeit. Exemplarisch sind die Ergebnisse für underivatisierte QuinaldA und 3-HK, sowie derivatisierte Xan und 3-HK als Boxplot abgebildet. Weiche Ausreißer sind dabei als Kringel und harte als Sterne dargestellt.

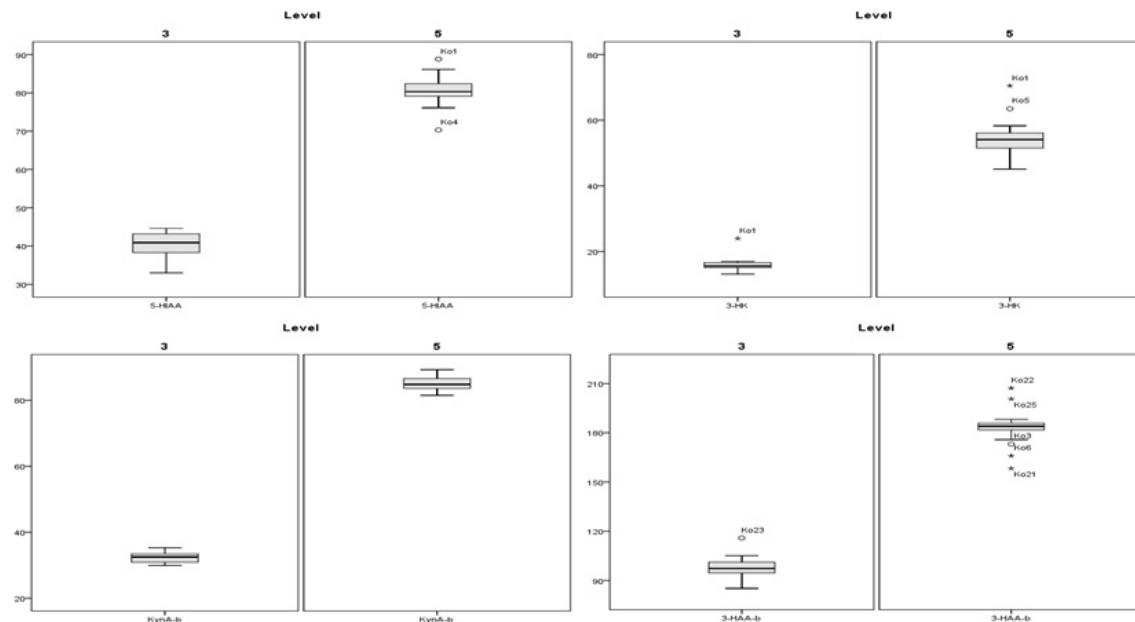


Abbildung 5.7: Inter-Assay Reproduzierbarkeit. Exemplarisch sind die Ergebnisse für underivatisierte 5-HIAA und 3-HK, sowie derivatisierte KynA und 3-HAA als Boxplot abgebildet. Weiche Ausreißer sind dabei als Kringel und harte als Sterne dargestellt.

5.3.4 Stabilität der Serumproben

Die Stabilität der Serumproben wurde durch Lagerung der Kontrolle 4 bei unterschiedlichen Temperaturen überprüft. Es wurden Kontrollen bei -20°C im Tiefkühler, bei 5-8°C im Kühlschrank und bei Raumtemperatur für unterschiedliche Zeiträume eingelagert. Bis zum Zeitpunkt der Einlagerung bei der jeweiligen Temperatur und anschließend bis zum Zeitpunkt der Probenmessung, wurden die gestressten Serumproben und die Referenzproben bei -80°C gelagert. Jede Lagerbedingung wurde als Duplikat untersucht, die Probenvorbereitung und Analyse erfolgte wie unter 5.2 beschrieben.

Bei jeder Lagertemperatur wurde die Kontrolle 4 für einen, zwei, drei, vier und sieben Tage eingelagert. Des Weiteren wurden bei -20°C Kontrollen für zwei, drei und vier Wochen eingelagert. Auch wurde ein Paar der Kontrolle einem fünffachen Gefrierzyklus unterzogen. Die Probe wurde dazu bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut bis zum nächsten Tag bei -20°C eingefroren.

Es wurde vorab festgelegt, dass die Proben nur bis zu dem Tag als stabil gelten, an dem letztmalig alle Analyte um weniger als 10% auf- oder abgebaut wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.15 aufgelistet.

Analyst	-20°C	5-8°C	Raumtemp.	Analyst	-20°C	5-8°C	Raumtemp.
AA	4 Wochen	7 Tage	3 Tage	AA-b	4 Wochen	7 Tage	3 Tage
3-HAA	4 Wochen	4 Tage	2 Tage	3-Haa-b	4 Wochen	7 Tage	3 Tage
QuinaldA	4 Wochen	7 Tage	7 Tage	QuinaldA-b	4 Wochen	7 Tage	7 Tage
5-HT	4 Wochen	7 Tage	7 Tage				
KynA	4 Wochen	7 Tage	4 Tage	KynA-b	4 Wochen	7 Tage	4 Tage
5-HIAA	4 Wochen	7 Tage	7 Tage				
Trp	4 Wochen	7 Tage	4 Tage	Trp-b	4 Wochen	7 Tage	3 Tage
Xan	4 Wochen	7 Tage	7 Tage	Xan-b	4 Wochen	7 Tage	3 Tage
Kyn	4 Wochen	7 Tage	4 Tage	Kyn-b	4 Wochen	7 Tage	4 Tage
5-HTP	4 Wochen	7 Tage	7 Tage				
3-HK	4 Wochen	7 Tage	3 Tage	3-HK-b	4 Wochen	7 Tage	3 Tage
				Pic-b	4 Wochen	7 Tage	4 Tage
				Quin-b	4 Wochen	7 Tage	7 Tage

Tabelle 5.15: Stabilität der Analyte im Serum.

Bei -20°C sind alle Analyte mindestens vier Wochen stabil. Aufgrund der Instabilität von 3-HAA können Serumproben im Kühlschrank maximal vier Tage und bei Raumtemperatur maximal zwei Tage gelagert werden. Alle Analyte sind für mindestens fünf Gefrierzyklen stabil.

5.3.5 Stabilität aufgearbeiteter Serumproben

Durch diesen Versuch wurde die maximale Lagerdauer der aufgearbeiteten Serumproben festgelegt. Dazu wurde die Kontrolle 4 32-fach aufgearbeitet (siehe Abschnitt 5.2), gemischt und bei -20°C im Tiefkühler, bei 5-8°C im Kühlschrank und bei Raumtemperatur eingelagert. Bis zum Zeitpunkt der Einlagerung bei der jeweiligen Temperatur und anschließend bis zum Zeitpunkt der Probenmessung wurden die aufgearbeiteten Serumproben und die Referenzproben bei -80°C gelagert. Jede Lagerbedingung wurde als Duplikat untersucht.

Bei -20°C wurden aufgearbeitete Proben für einen, zwei, drei, vier und sieben Tage, sowie zwei und drei Wochen gelagert. Im Kühlschrank wurden die aufgearbeiteten Proben für einen, zwei, drei und vier Tage eingelagert. Bei Raumtemperatur wurden die aufgearbeiteten Proben lediglich für maximal drei Tage eingelagert.

Auch wurde ein Paar der aufgearbeiteten Probe einem fünffachen Gefrierzyklus unterzogen. Die aufgearbeitete Probe wurde dazu bei Raumtemperatur aufgetaut und erneut bis zum nächsten Tag bei -20°C eingefroren.

Es wurde vorab festgelegt, dass die aufgearbeiteten Proben nur bis zu dem Tag als stabil gelten, an dem letztmalig alle Analyte um weniger als 10% auf- oder abgebaut wurden. Die Ergebnisse sind der Tabelle 5.16 zu entnehmen.

Analyst	-20°C	5-8°C	Raumtemp.	Analyst	-20°C	5-8°C	Raumtemp.
AA	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	AA-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
3-HAA	3 Wochen	1 Tag	instabil	3-Haa-b	3 Wochen	4 Tage	1 Tag
QuinaldA	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	QuinaldA-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
5-HT	3 Wochen	4 Tage	3 Tage				
KynA	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	KynA-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
5-HIAA	3 Wochen	1 Tag	instabil				
Trp	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	Trp-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
Xan	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	Xan-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
Kyn	3 Wochen	4 Tage	3 Tage	Kyn-b	3 Wochen	4 Tage	1 Tag
5-HTP	3 Wochen	4 Tage	3 Tage				
3-HK	3 Wochen	1 Tag	instabil	3-HK-b	3 Wochen	1 Tag	instabil
				Pic-b	3 Wochen	4 Tage	3 Tage
				Quin-b	3 Wochen	4 Tage	2 Tage

Tabelle 5.16: Stabilität der Analyte in aufgearbeiteten Proben.

Werden die aufgearbeiteten Serumproben bei -20°C gelagert, so sind alle Analyte mindestens drei Wochen stabil. Im Kühlschrank und im gekühlten Probengeber können die aufgearbeiteten Proben maximal einen Tag gelagert werden, danach ist der Abbau von 3-HAA, 5-HIAA und 3-HK zu groß. Bei Raumtemperatur muss eine Lagerung ausgeschlossen werden, da mehrere Analyte nur für wenige Stunden stabil sind. Alle Analyte können jedoch mindestens fünffach eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne dass es zu einem Verlust kommt.

5.3.6 Stabilität der internen Standards

Die Stabilität der internen Standards wurde untersucht, indem Aliquote der internen Standardlösung (siehe Abschnitt 4.4.2) zu je 50 µL bei -20°C im Tiefkühler, bei 5-8°C im Kühlschrank und bei Raumtemperatur eingelagert wurden. Bis zum Zeitpunkt der Einlagerung bei der jeweiligen Temperatur und anschließend bis zum Zeitpunkt der Probenmessung wurden die ISTDs und die Referenzlösung bei -80°C gelagert. Jede Lagerbedingung wurde als Duplikat untersucht.

Bei jeder Lagertemperatur wurden die ISTDs für einen, zwei, drei, vier und sieben Tage eingelagert. Des Weiteren wurde bei -20°C ISTD für zwei, drei und vier Wochen eingelagert. Auch wurden die ISTDs einem fünffachen Gefrierzyklus unterzogen. Die jeweiligen Aliquote wurden dazu bei Raumtemperatur

aufgetaut und erneut bis zum nächsten Tag bei -20°C eingefroren.

Zur Messung der unterschiedlich gelagerten ISTDs wurde jedem Aliquot 50 µL einer wässrigen Lösung bestehend aus Tryptophan (2 µg/mL), Kynureninsäure (50 ng/mL) und Picolinsäure (10 ng/mL) zugesetzt. Anschließend wurde jede Probe doppelt analysiert (siehe Abschnitt 5.2).

Zur Auswertung wurden dabei lediglich die MRM-Übergänge für Pic, Pic-d4, KynA, KynA-d5, Trp und Trp-d5 in MassLynx näher betrachtet. Es wurde jeweils der Quotient aus deuteriertem zu undeuteriertem Analyt gebildet und anschließend die belasteten internen Standardlösungen mit den Referenzproben verglichen. Für diesen Versuch wurde also die Funktion der deuterierten ISTDs und undeuterierten Analyte getauscht; die undeuterierten Analyte dienten diesmal als "interne Standards" zum Ausgleich gerätespezifischer Messschwankungen. Vorab wurde festgelegt, dass die internen Standards nur bis zu dem Tag als stabil gelten, an dem letztmalig alle Analyte um weniger als 10% auf- oder abgebaut wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.17 aufgelistet.

ISTD	-20°C	5-8°C	Raumtemp.
Pic-d4	3 Wochen	7 Tage	7 Tage
KynA-d5	3 Wochen	7 Tage	7 Tage
Trp-d5	3 Wochen	7 Tage	4 Tage

Tabelle 5.17: Stabilität der internen Standardlösung.

Bei -20°C sind alle deuterierten internen Standards mindestens drei Wochen und im Kühlschrank mindestens eine Woche stabil. Bei Raumtemperatur wird Trp-d5 nach vier Tagen deutlich abgebaut. Dies deckt sich mit den Erkenntnissen aus dem Abschnitt 5.3.2, in welchem festgestellt wurde, dass Trp-d5 im Zuge der Derivatisierung innerhalb weniger Minuten nahezu gänzlich abgebaut wird. Alle deuterierten internen Standards sind für mindestens fünf Gefrierzyklen stabil.

5.3.7 Linearität, Bestimmungsgrenze, Nachweisgrenze

Zur Bestimmung der analytischen Grenzwerte wurden die Kalibratoren 0 bis 5 je vierfach aufgearbeitet und doppelt analysiert (siehe Abschnitt 5.2). Diese begrenzte Anzahl ergibt sich aus der Möglichkeit, maximal 24 Proben gleichzeitig im Heizblock derivatisieren zu können.

Die in MassLynx ausgewerteten Daten wurden exportiert, mit dem Programm Dintest Version 2004 DE (siehe Abschnitt 4.1.2) gemäß der DIN 320645 die Linearität überprüft, sowie die Bestimmungsgrenze, die Erfassungsgrenze und die Nachweisgrenze berechnet. Als Parameter wurden dabei eine Ergebnisunsicherheit von 50% und eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 3% festgelegt.

An dieser Stelle ist die Nachweisgrenze als der kleinste Messwert definiert, welcher vom Blindwert mit einer vorgegebenen Sicherheit unterschieden werden kann. Wenn eine Probe exakt diesen Gehalt des Analyten enthält, ist der konkrete Messwert in 50% der Fälle kleiner als die Nachweisgrenze (β -Fehler = 50%). Wenn die Messwerte einer Analyse im Bereich der Nachweisgrenze liegen, ist der Analyt mit einer vorgegebenen Sicherheit von beispielsweise 99% und einer damit verbundenen Unsicherheit von 1% (α - Fehler) vorhanden. Die Erfassungsgrenze entspricht dem zweifachen der Nachweisgrenze. Es wird die Anwesenheit des Analyten im Konzentrationsbereich der Bestimmungsgrenze (BG) vorausgesetzt. Die

Kalibrationsgerade wird von einem Vertrauensband (VB) umschlossen, wodurch der Bestimmungsfehler berechnet werden kann. Es gilt nun $BG = k * VB$ (wobei k die relative Ergebnisunsicherheit ist). Die Bestimmungsgrenze ist nun als die Konzentration definiert, bei der der relative Fehler erstmals die vorgegebene Schranke der Ergebnisunsicherheit unterschreitet [182, 183]. In Abbildung 5.8 sind die beiden Formeln zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen dargestellt.

$$X_{NG} = s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{X_M^2}{Q_X}}$$

$$X_{BG} = k * s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - X_M)^2}{Q_X}}$$

Abbildung 5.8: Formeln zur Bestimmung der Nachweigrenze (NG) und der Bestimmungsgrenze (BG) nach DIN 320645.

k : relative Ergebnisunsicherheit, s_{x_0} : Verfahrensstandardabweichung. $t_{f,\alpha}$: Quantil der t -Verteilung, m : Anzahl der Messungen, n : Anzahl der Kalibrationspunkte, X : Konzentration X , X_M : Mittelwert der Kalibratorkonzentration, Q_X : Summe der Abweichungsquadrate

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Tabelle 5.18 aufgelistet.

Mit dem Programm Dintest Version 2004 DE wird ebenfalls ein statistischer Test auf Linearität nach Mandel durchgeführt. Dieser Test bestimmt, ob das lineare oder das quadratische Regressionsmodell für den vorliegenden Untersuchungsfall anzunehmen ist. Bei der Linearitätsüberprüfung wurde festgestellt, dass Tryptophan nur bis 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ linear ist. Für Xanthurinsäure ist das lineare Regressionsmodell nicht geeignet, sondern ein quadratisches.

under.	3-HAA	3-HK	AA	Kyn	KynA	QuinaldA	Trp	Xan	5-HIAA	5-HT	5-HTP
NG	3,3	0,9	10,0	35,9	2,3	2,0	1.834	1,8	3,2	30,0	3,8
EG	6,6	1,8	20,0	71,8	4,7	4,0	3.669	3,7	6,3	59,9	7,5
BG	8,3	2,3	22,5	77,7	5,6	4,8	3.388	4,5	7,2	66,8	8,7
Linear	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	bis 15.000	Nein	Ja	Ja	Ja
der.	3-HAA-b	3-HK-b	AA-b	Kyn-b	KynA-b	QuinaldA-b	Trp-b	Xan-b	Pic-b	Quin-b	
NG	20,6	0,8	15,9	9,6	4,4	0,5	793	4,4	3,8	6,7	
EG	41,2	1,6	31,7	19,2	8,8	0,9	1.585	8,8	7,6	13,4	
BG	41,3	2,0	36,5	23,9	10,1	1,2	1.780	10,3	8,4	13,6	
Linear	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	

Tabelle 5.18: Nachweigrenzen (NG), Erfassungsgrenzen (EG) und Bestimmungsgrenzen (BG). Alle Angaben in ng/mL .

5.3.8 Methodenvergleich zwischen HPLC und HPLC-MS/MS

In diesem Experiment wurden Daten ermittelt, um die neu entwickelte HPLC-MS/MS-Analysemethoden (siehe Abschnitt 5.2) mit der in Anwendung befindlichen HPLC-Methode (siehe Abschnitte 5.1) zu vergleichen. Dies war methodenbedingt jedoch nur für die Analyte Trp, 5-HIAA, 5-HT, KynA, Kyn und 3-HK möglich.

Als Ausgangsmaterial wurden mehrere Serumproben (Restmaterial) aus dem TDM Labor der Psychiatrischen Klinik verwendet. Diese Seren wurden teilweise mit unterschiedlichen Spikelösungen versetzt, wodurch 30 individuelle Proben entstanden. Alle Seren wurden verblindet randomisiert, nummeriert und anschließend jeweils für die HPLC und die HPLC-MS/MS aufgearbeitet und analysiert. Zur Auswertung wurde die parametrische Korrelation nach Pearson bestimmt. Des Weiteren wurde für jede Substanz eine Passing-Bablok Regressionsgerade erstellt.

Korrelation nach Pearson			
	HPLC / und.	HPLC / der.	der. / und.
Trp	0,891**	0,867**	0,867**
5-HIAA	0,952**	- - - -	- - - -
5-HT	0,875**	- - - -	- - - -
KynA	0,971**	0,961**	0,989**
3-HK	0,966**	0,887**	0,847**
Kyn	0,973**	0,962**	0,958**

Tabelle 5.19: Korrelation nach Pearson. Test für die Analysen mittels HPLC, HPLC-MS/MS underivatiiert (und.) und HPLC-MS/MS derivatiiert (der.). N jeweils 30.

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Im Vergleich zwischen HPLC und HPLC-MS/MS underivatiiert, HPLC und HPLC-MS/MS derivatiiert, bzw. HPLC-MS/MS underivatiiert und HPLC-MS/MS derivatiiert korrelieren alle Analyte hochsignifikant.

	HPLC / und.		HPLC / der.	
	Steigung	Ordinate	Steigung	Ordinate
Trp	1,12	4159	0,95	4813
5-HIAA	0,86	24,4	- - - -	- - - -
5-HT	1,15	44,2	- - - -	- - - -
KynA	2,76	0,31*	2,78	0,38*
3-HK	0,64	0,44*	0,94	3,39*
Kyn	0,97	-0,64*	1,22	12,5*

Tabelle 5.20: Methodenvergleich nach Passing-Bablok für die Analysen mittels HPLC, HPLC-MS/MS underivatiiert (und.) und HPLC-MS/MS derivatiiert (der.). N jeweils 30.

*Nullpunkt liegt im 95%-Vertrauensintervall.

Beim Vergleich von Trp wird mit der HPLC-MS/MS-Methode 4,2 µg/mL zu hoch gemessen (siehe auch Tabelle 5.20). Dies liegt entweder daran, dass bei einem der beiden Kalibratorsets der Blindwert

ungenau bestimmt wurde, oder bei der HPLC-Analyse das Signal durch eine konstante Störgröße überlagert ist. Das gleiche Problem wird für 5-HIAA und 5-HT festgestellt. 3-HK muss derivatisiert gemessen werden, da die Steigung beim Vergleich von HPLC und HPLC-MS/MS underivatisiert mit 0,64 deutlich abweicht vom geforderten optimalen Wert. Eine optimale Übereinstimmung ist bei 1,00 gegeben. Es werden Abweichungen von 0,15 akzeptiert. Im Gegensatz dazu sollte Kyn underivatisiert gemessen werden. Bei den beiden Korrelationsgeraden von KynA wird der Ursprung jeweils vom 95%-Vertrauensintervall umschlossen. Jedoch ist die Steigung mit 2,76 bzw. 2,78 deutlich zu hoch. Dies deutet auf einen systematischen Fehler bei der Herstellung der Kalibratorsets hin. Entweder wurde bei der Einwaage der Kalibratoren für die HPLC-MS/MS-Analyse zu wenig, oder bei der Einwaage der Kalibratoren für die HPLC zu viel eingewogen. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die HPLC-Signale durch eine Überlagerung gestört sind. Diese Überlagerung kann jedoch nicht konstant sein, da sonst die Steigungen gleich eins und die Ordinaten deutlich größer wären.

5.3.9 Aufarbeitungsbedingte Verluste

Um die aufarbeitungsbedingten Verluste zu ermitteln, wurden zehn Seren (Set A) mit 5% einer Spikelösung Level 3 versetzt und aufgearbeitet (siehe 5.2). Als Referenz wurde parallel Serum aufgearbeitet und anschließend so mit Spikelösung Level 3 versetzt, dass theoretisch die gleiche Konzentration vorliegt (Set B). Die Unterschiede sind ein Maß für die aufarbeitungsbedingten Verluste.

Mittels t-Test wurde geprüft, ob ein Unterschied zwischen den beiden Probensets vorliegt und dieser in Prozent berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.21 aufgelistet.

$$\text{Aufarbeitungsbedingte Verluste (\%)} = \frac{\text{Mittelwert Set A} - \text{Mittelwert Set B}}{\text{Mittelwert Set B}} * 100$$

Die berechneten Werte sind negativ, wenn die Signale im Set A niedriger sind als im Set B. Durch die Aufarbeitung kommt es also zu einem Substanzverlust. Sind die Werte jedoch positiv, so ist das mittlere Signal aus Set B kleiner als jenes aus Set A. Dies erscheint auf den ersten Blick unlogisch, kann jedoch durch drei Möglichkeiten begründet werden:

1. Der interne Standard unterliegt einem Verlust, wodurch der Quotient aus Analyt und internem Standard für Set A größer ist als der für Set B.
2. Die Messungen und Probenvorbereitungen unterliegen gewissen Schwankungen, wodurch die berechneten Werte nicht signifikant, bzw. kleiner als 10% und damit vernachlässigbar sind.
3. Es besteht ein Löslichkeitsproblem, wodurch die Signale im Set B kleiner sind (Bsp.: Proteine dienten als Lösungsvermittler und fehlen nun nach der Fällung).

Wie aus Tabelle 5.21 ersichtlich, unterliegen die Substanzen AA, 3-HK, KynA und Trp weder undeutert noch deutert aufarbeitungsbedingten Verlusten. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Set A und Set B berechnet werden. Auch sind die aufarbeitungsbedingten Verluste deutlich kleiner als 10%. Im Zuge der Aufarbeitung erfahren diese Analyte keine nennenswerte Verluste. Xanthurinsäure zeigt underivatisiert keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Sets. Derivatisiert ist der

Verlust (-3,6%) zwar signifikant, jedoch vernachlässigbar gering. QuinaldA und Kyn zeigen derivatisiert keinen signifikanten Unterschied. Underivatisiert sind die Unterschiede (3,5% und 8,1%) hingegen signifikant. Gleches gilt für die beiden Analyte 5-HIAA und 5-HTP, welche nur underivatisiert gemessen werden können. Quin und Pic können nur derivatisiert gemessen werden. Die beiden Substanzen zeigen hoch- und höchstsignifikante Verluste von -6,9 und -7,4%. Diese Verluste sind jedoch immer noch vertretbar.

	T	df	Sig. (2-seitig)	Aufarbeitungsbedingte Verluste
3-HAA	4,263	19	0,000	*** 25,5%
(alternativ)	(-0,969)		(0,345)	(-2,7%)
3-HK	0,755	19	0,460	2,6%
5-HIAA	3,268	19	0,004	** 7,1
5-HT	3,728	19	0,001	** 11,1
(alternativ)	(1,310)		(0,206)	(5,5%)
5-HTP	0,592	19	0,000	*** 1,4%
AA	0,273	19	0,788	0,7%
Kyn	6,561	19	0,000	*** 8,1%
KynA	1,199	19	0,245	1,1%
QuinaldA	4,740	19	0,000	*** 3,5%
Trp	0,751	19	0,462	1,0%
Xan	-1,580	19	0,131	-1,5%
	T	df	Sig. (2-seitig)	Aufarbeitungsbedingte Verluste
3-HAA-butyl	-2,629	19	0,017	* -5,0%
3-HK-butyl	-0,866	19	0,397	-2,1%
AA-butyl	-0,889	19	0,385	-2,7%
Kyn-butyl	1,383	19	0,183	1,7%
KynA-butyl	0,354	19	0,727	0,3%
Pic-butyl	-4,197	19	0,000	*** -7,4%
QuinaldA-butyl	1,186	19	0,250	0,9%
Quin-butyl	-4,085	19	0,01	** -6,9%
Trp-butyl	1,558	19	0,136	1,3%
Xan-butyl	-2,349	19	0,030	* -3,6%

Tabelle 5.21: Aufarbeitungsbedingte Verluste. Signifikanz berechnet mittels t-Test. Verluste bis maximal 10% werden akzeptiert. Für 5-HT und 3-HAA wurden die aufarbeitungsbedingten Verluste alternativ mit dem internen Standard Trp-d5 berechnet.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$), *** höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$)

5-HT zeigt einen hochsignifikanten Anstieg von 11,1%, wenn der interne Standard KynA-d5 verwendet wird. Werden die Daten jedoch mit dem internen Standard Trp-d5 ausgewertet, verkleinert sich der Anstieg auf 5,5% und ist nicht signifikant. 3-HAA unterliegt derivatisiert einem signifikanten Verlust von -5,0%. Underivatisiert beträgt der Unterschied jedoch 25,5% und ist dabei hochsignifikant. Wird bei underivatisiertem 3-HAA lediglich die Peakfläche untersucht, so stellt man einen nicht signifikanten Verlust von 2,7% fest.

5.4 Untersuchung präanalytischer Einflüsse

5.4.1 Freie und proteingebundene Kynurenine

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob generell eine Unterscheidung zwischen gesamter und freier, nicht proteingebundener Konzentration der einzelnen Analyte möglich ist. Auch wurde der Einfluss der Nahrungsaufnahme auf diese beiden Konzentrationsangaben überprüft. Dazu wurde von sechs Probanden nüchtern (präprandial) und ca. 150 Minuten nach Nahrungsaufnahme (postprandial) Blut abgenommen (siehe Abschnitt 4.5) und das gewonnene Serum unmittelbar für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet. Zur Bestimmung der Gesamtkonzentration wurden die Proben wie unter 5.2 beschrieben aufgearbeitet. Zur Quantifizierung der freien Analyte wurden vorab 1000 µL Serum in 10 kDa Zentrifugenfilter überführt und für 45 Minuten °C mit 14000 RPM zentrifugiert (Micro 22R). 300 µL des Permeats wurden nun der Probenvorbereitung unterzogen.

	präprandial	postprandial
5-HIAA	0,780 n.s.	-0,119 n.s.
AA	0,773 n.s.	0,598 n.s.
KynA	0,851 n.s.	0,637 n.s.
Pic	0,847 n.s.	n.s.
QuinaldA	0,675 n.s.	0,714 n.s.
Quin	0,880 n.s.	n.s.
3-HAA	0,955*	0,964**
3-HK	0,926*	0,907*
5-HT	0,985**	0,994**
Kyn	0,887*	0,980**
Trp	0,750 n.s.	0,887*
Xan	0,947 *	0,050 n.s.
5-HTP	0,863 n.s.	0,984**

Tabelle 5.22: Korrelationskoeffizienten der freien und gesamten Analytmenge nach Pearson.

n.s. nicht signifikant, * signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$)

Es zeigte sich, dass nach der präprandialen Blutabnahme für alle Analyte ein signifikanter Unterschied zwischen freien und proteingebundenen Analyten besteht ($p < 0,05$). Durch die Nahrungsaufnahme kam es zu einer Änderung der Werte, es konnte nun für QuinaldA und 5-HTP kein signifikanter Unterschied zwischen freier Menge und Gesamtmenge festgestellt werden.

Anschließend wurde mit der Korrelation nach Pearson bestimmt, ob die freie und die gesamte Konzentration korrelieren. Die Korrelation wurde sowohl präprandial, als auch postprandial berechnet (siehe Tabelle 5.22).

Die Konzentrationen an freier und gesamter Substanz korrelieren nicht für die Analyte 5-HIAA, AA, KynA, Pic, QuinaldA, Quin weder vor, noch nach der Nahrungsaufnahme. Für die Substanzen 3-HAA, 3-HK, 5-HT und Kyn existiert eine Korrelation zwischen freier und gesamter Analytkonzentration sowohl

präprandial, als auch postprandial. Nur bei diesen Analyten kann also durch die Bestimmung der Änderung der freien Analytkonzentration auf die Änderung der Gesamtkonzentration geschlossen werden. Die Analyte Trp, Xan und 5-HTP zeigen teilweise vor und teilweise nach der Nahrungsaufnahme eine Korrelation.

5.4.2 Der Effekt des Einfrierens

Unter Abschnitt "5.4.1 Freie und proteingebundene Kynurenine" wurde beschrieben, dass zwischen gesamter und freier, das heißt nicht proteingebundener, Konzentration an Bestandteilen des Tryptophanstoffwechsels unterschieden werden kann. Dazu wurden native Serumproben aufgearbeitet, analysiert und mit Serumproben verglichen, die zuerst mit einem 10 kDa Zentrifugenfilter vorbehandelt wurden. Als Folge dieses Experiments wurde nun getestet, ob sich bei eingefrorenen Serumproben noch die freien und gesamten Konzentrationen unterscheiden, wie es bei nicht eingefrorenen der Fall ist. Wie im vorherigen Abschnitt 5.4.1 beschrieben, wurde dazu sechs Probanden nüchtern Blut abgenommen (siehe Abschnitt 4.5). 2,0 mL des daraus gewonnenen Serums wurden für drei Stunden bei -20°C eingefroren. Der restliche Anteil wurde bis zur Probenvorbereitung im Kühlschrank (5-8°C) gelagert. Zur Analyse wurde jeweils ein Aliquot Serum (Bestimmung der gesamten Analytmenge) und ein mittels 10 kDa Zentrifugenfilter deproteinisiertes Aliquot (Bestimmung der freien Analyte) für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet (siehe Abschnitt 5.2).

Bei den nicht eingefrorenen Serumproben konnte für alle Analyte ein signifikanter Unterschied zwischen freien und proteingebundenen Analyten ($p < 0,05$) bestimmt werden. Nach dem Einfrieren konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Um sicherzustellen, dass sich nur der freie Anteil, nicht aber die gesamte Menge ändert, wurden 18 unterschiedliche Serumproben aus dem TDM Labor der Psychiatrischen Klinik untersucht. Von jeder Probe wurden zweimal 300 μ L in 1,5 mL Reagiergefäße überführt und diese beschriftet. Eine Serie wurde als Referenz im Kühlschrank (5-8°C) gelagert. Die zweite Serie wurde für eine Stunde bei -20°C eingefroren und anschließend wieder bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach identischer, paralleler Probenvorbereitung erfolgte die Analyse mittels HPLC-MS/MS (siehe Abschnitt 5.2). Ein gepaarter t-Test zeigte keinerlei signifikante Änderung der gesamten Analytmenge durch das Einfrieren.

5.4.3 Einfluss von Nahrungsaufnahme

Dieser Versuch war eine der direkten Konsequenzen aus dem Versuch "Freie und proteingebundene Kynurenine" (siehe Abschnitt 5.4.1). Nun wurde genauer untersucht, wie sich die Metabolite des Tryptophanstoffwechsels nach einer tryptophanreichen Nahrungsaufnahme ändern. Dabei wurden nicht nur die Gesamtmengen aus dem Serum bestimmt, sondern auch der freie Anteil untersucht. In der Psychiatrischen Klinik wurde dazu zwei freiwilligen, gesunden Probanden ohne jegliche Medikamentierung (männlich, 34 und 37 Jahre, Nichtraucher) ein Venenverweilkatheter gelegt. Es erfolgte um 9:15 Uhr eine Blutabnahme bei den nüchternen Probanden (Monovette® Serum, 7,5 mL siehe 4.5). Danach nahmen beide Probanden eine tryptophanreiche Nahrung (je 2 x 200 mL Fresubin protein energy) und 500 mg L-Tryptophan (Filmtablette L-Tryptophan-ratiopharm 500mg) zu sich. Weitere Blutentnahmen erfolgten 30, 60 und 135 Minuten nach Nahrungsaufnahme.

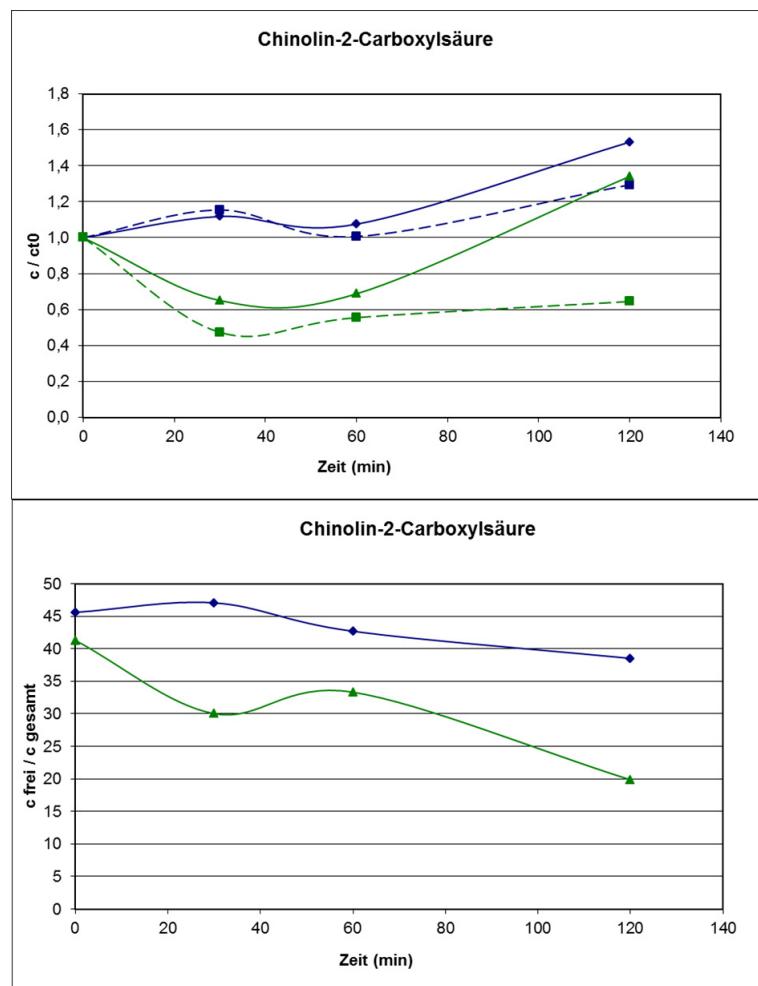


Abbildung 5.9: Postprandiale Änderung der Chinolin-2-Carboxylsäure. Die obere Grafik zeigt die zeitliche Änderung der Konzentration bezogen auf die präprandiale Konzentration. Die beiden unterschiedlichen Farben stehen für unterschiedliche Probanden. Gestrichelte Linien stellen die freien, durchgezogene Linien die gesamte Konzentration dar. In der unteren Grafik sind die Quotienten aus freier Konzentration und Gesamtmenge über der Zeit dargestellt.

Die Blutproben wurden jeweils zehn Minuten nach Abnahme für sieben Minuten bei 3850 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotaxia 120R) und das gewonnene Serum mit einer serologischen Pipette in 2,0 mL Reagiergefäße überführt. Zur Bestimmung der freien und der Gesamtmenge an Kynureninen wurde die Probenvorbereitung wie unter 5.4.1 beschrieben durchgeführt und die Proben mittels HPLC-MS/MS analysiert (siehe Abschnitt 5.2).

Die Daten wurden in MassLynx ausgewertet, exportiert und mittels Excel graphisch dargestellt. Dabei wurde die jeweilige präprandiale Konzentration als eins definiert und die anderen Werte darauf bezogen. Auch wurde der Quotient aus freien Analyten bezogen auf die Gesamtmenge berechnet. Die Ergebnisse für Chinolin-2-Carboxylsäure sind beispielhaft in der Abbildung 5.9 dargestellt.

Die Auswertungen lieferten keine einheitlichen Ergebnisse. Bei allen Analyten ist eine postprandiale Änderung der Konzentrationen zu beobachten. Dabei findet eine maximale Änderung erst nach zwei Stunden

statt. Weder ist die Gesamtmenge, noch die freie Menge konstant. Dabei sind zum einen starke inter-individuelle Unterschiede festzustellen, zum anderen sind auch die Unterschiede zwischen den Analyten sehr ausgeprägt. Es ist zu beachten, dass sich nach zwei Stunden die gesamte QuinaldA-Konzentration des einen Probanden um ca. 50% erhöht, während die Kurve der Gesamtkonzentration des anderen Probanden nach ca. 40 Minuten einen Tiefpunkt erreicht und nur noch 60% des Ausgangswerts gemessen werden. Aus der Änderung der freien Analyte kann nicht auf die Änderung der Gesamtmenge geschlossen werden, da beide Kurven ein unterschiedliches Verhalten zeigen.

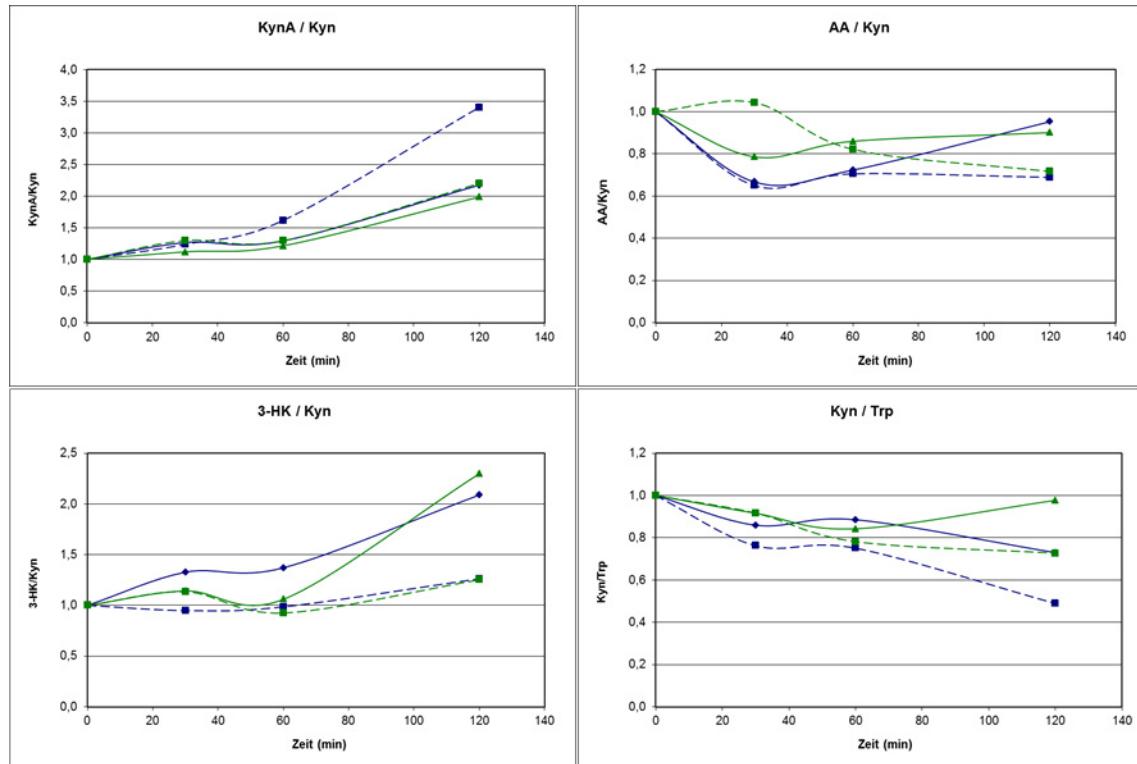


Abbildung 5.10: Postprandiale Änderung der KynA, der AA und des 3-HK bezogen auf Kyn. Die unterschiedlichen Verhaltensweisen der drei Metabolite deuten darauf hin, dass primär nicht die Substratkonzentration den Metabolismus beeinflusst. Vermutlich ändern sich die einzelnen Enzymaktivitäten des Kynurenin Pathways im Laufe der Zeit. Die beiden unterschiedlichen Farben stehen für unterschiedliche Probanden. Gestrichelte Linien stellen die freien, durchgezogene Linien die gesamte Konzentration dar.

Auch der Quotient aus freien Analyten bezogen auf die Gesamtmenge ändert sich mit der Zeit. Bei einem Probanden ändert sich der freie Anteil innerhalb von zwei Stunden von 46% auf 39%, bei dem anderen Probanden ist die Änderung jedoch wesentlich ausgeprägter. Bei ihm wurde präprandial ein Anteil von 46% bestimmt, der innerhalb von zwei Stunden jedoch auf 21% absank. Die Proteinbindung scheint sich also entweder zeitlich, oder in Abhängigkeit von der Konzentration des Metaboliten zu ändern und unterliegt offensichtlich individuellen Schwankungen.

Wie aus Abbildung 2.3 ersichtlich ist, wird Kynurenin zu Kynureninsäure, Anthranilsäure oder 3-Hydroxykynurenin verstoffwechselt. In einem weiteren Schritt der Auswertung wurden die Konzenta-

tionen dieser drei Metabolite auf die Konzentration der gemeinsamen Vorläufersubstanz Kyn bezogen. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5.10 illustriert.

Es ist zu beobachten, dass sich die Kurven der drei Kynureninmetabolite unterschiedlich ändern. KynA und 3-HK zeigen einen Anstieg, während AA einen moderaten Abfall zeigt. Die freien Anteile zeigen auch in diesen Grafiken ein deutlich anderes Verhalten als die Gesamtmengen. Postprandial zeigt Kyn, bezogen auf Trp, im Mittel einen Abbau. Dieser Abbau stimmt mit dem Anstieg der Metabolite 3-HK und KynA überein. Nach der Nahrungsaufnahme erfolgt also sehr schnell eine Verstoffwechslung des Tryptophans und dessen Stoffwechselprodukte.

5.4.4 Einfluss der Blutentnahmesysteme

In diesem Versuch wurde der Einfluss unterschiedlicher Blutentnahmesysteme auf die Analytik des Kynurenin Pathways untersucht. Dazu wurde einem freiwilligen, gesunden Probanden (männlich, 34 Jahre, Nichtraucher, nicht nüchtern) ohne jegliche Medikamentierung mit einem BD Vacutainer Safety-Lok Blutentnahmesystem eine periphere Vene punktiert und mit unterschiedlichen Blutentnahmeröhrchen (siehe nachfolgende Auflistung) Blut abgenommen. Dies wurde nach zehn Minuten für sieben Minuten bei 3850 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotaxia 120R), mit einer serologischen Pipette in 2,0 mL Reagiergefäße überführt und unmittelbar für die HPLC-MS/MS-Analyse vorbereitet (siehe Abschnitt 5.2). Die Proben wurden dabei jeweils vierfach aufgearbeitet und analysiert.

1. Monovette® Serum, 7,5 mL
2. Monovette® Serum-Gel, 4,7 mL
3. BD Vacutainer SST II Advance
4. BD Vacutainer SST II Advance (1/2)
5. BD Vacutainer K2E (EDTA)
6. BD Vacutainer NH (Sodium Heparin)

Häufig sind Blutentnahmeröhrchen von Patienten nicht vollständig gefüllt. Um zu testen, ob dies einen Einfluss auf die Analyse hat, wurde ein Blutentnahmeröhrchen des Typs BD Vacutainer SST II Advance nur zur Hälfte gefüllt (Nr. 4). Es wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc-Test durchgeführt. Die statistische Auswertung zeigt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Blutentnahmesystemen in Bezug auf die Analyte AA, 3-HAA, 5-HT, Quin, Pic, QuinaldA und KynA. Die Ergebnisse des Posthoc Tests sind in Tabelle 5.23 aufgelistet. Exemplarisch sind die Ergebnisse für AA, Trp und Pic in der Grafik 5.11 dargestellt. Dabei wurde die gemessene Konzentration aus der Monovette® Serum (Nr. 1) als Referenz festgelegt und die Ergebnisse der anderen Blutentnahmesysteme darauf bezogen.

5 Ergebnisse

I System	J System	Analyt	Signifikanz		Analyt	Signifikanz
1	2	AA	0,009	**	3-HAA	0,821
	3		0,000	***		0,108
	4		0,000	***		0,005
	5		0,001	**		0,000
	6		1,000			0,854
1	2	QuinaldA	0,261		5-HT	1,000
	3		0,074			0,532
	4		0,853			1,000
	5		1,000			1,000
	6		1,000			0,000
1	2	KynA	1,000		Quin	0,056
	3		0,754			0,142
	4		0,014	*		0,160
	5		1,000			0,000
	6		1,000			1,000
1	2	Pic	0,004	**		
	3		0,000	**		
	4		0,000	***		
	5		0,005	**		
	6		0,002	**		

Tabelle 5.23: Vergleich unterschiedlicher Blutentnahmesysteme.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$), *** höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$). 1: Monovette® Serum, 7,5 mL 2: Monovette® Serum-Gel, 4,7 mL 3: BD Vacutainer SST II Advance 4: BD Vacutainer SST II Advance (1/2) 5: BD Vacutainer K2E (EDTA) 6: BD Vacutainer NH (Sodium Heparin)

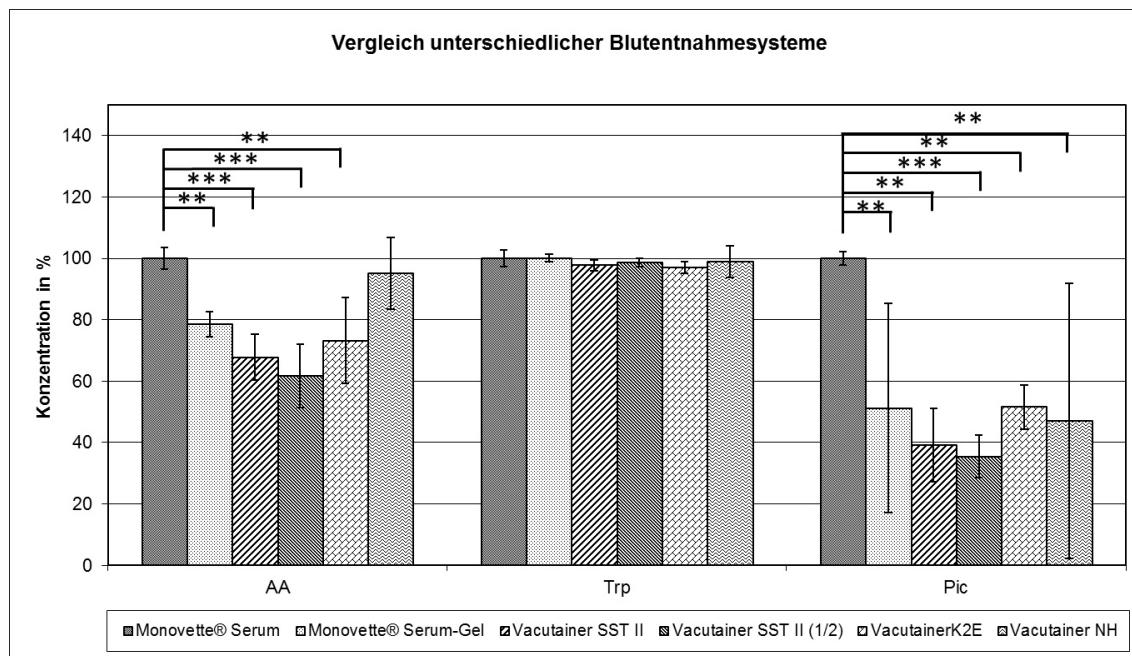


Abbildung 5.11: Vergleich unterschiedlicher Blutentnahmesysteme. Exemplarisch sind die Ergebnisse für AA, Trp und Pic dargestellt.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$), *** höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$)

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem vollständig und dem nur zur Hälfte befüllten Blutentnahmeröhrchen BD Vacutainer SST II Advance festgestellt.

5.5 Praktische Anwendung der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode

5.5.1 Untersuchung des Einflusses von Carbamazepin auf PBMC-Kulturen

Es wurde untersucht, ob nach Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes mit 10 µg/mL Carbamazepin vermehrt Chinolinsäure, oder andere Metabolite aus dem Kynurenin Pathway gebildet werden. Des Weiteren wurde mit dem Carbamazepin-Metabolit Carbamazepinepoxid stimuliert. Der Versuch wurde mit den PBMCs dreier gesunder, freiwilliger Spender ohne bekannte Medikamenteneinnahme durchgeführt. Um die individuellen Kulturbedingungen der Zellen möglichst physiologisch zu gestalten, wurde statt dem üblichen fötalen Kälberserum das Serum des jeweiligen Spenders den Zellkulturmedien (siehe 4.7.1) zugesetzt.

Nach Beendigung der Zellkultur wurden die Konzentrationen von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid in jeder Probe bestimmt, um eine eventuelle Metabolisierung zu erkennen und zu quantifizieren.

Ebenfalls wurden mittels HPLC-MS/MS Tryptophan und seine Metabolite bestimmt. Insbesondere wurde dabei auf Veränderungen der Konzentration der Chinolinsäure und deren Vorläufer im Kynurenin Pathway geachtet.

Gewinnung von PBMCs

Eine Woche vor dem Versuch wurde von den drei Spendern Serum gewonnen (siehe Abschnitt 4.7.1), um die PBMCs später mit individuellen Wachstumsfaktoren zu kultivieren. Im Wasserbad wurden die Seren inaktiviert und bis zum Tag der Zellkultur im Kühlschrank (5-8°C) gelagert. Zur Gewinnung der PBMCs wurden den drei Probanden je vier Röhrchen Blut abgenommen (Monovette® EDTA/KE). Unverzüglich wurde unter der Sicherheitswerkbank das Blut je zweier Röhrchen eines Probanden gemischt und in ein 50 mL Zentrifugenrörchen überführt. Dort wurde es auf 30 mL mit Medium I aufgefüllt. In sechs 50 mL Zentrifugenrörchen wurden jeweils 15 mL Biocoll Separationslösung vorgelegt und vorsichtig mit je 30 mL Blut/Medium I Mischung überschichtet und für 40 Minuten bei 1600 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS). Nach dem Zentrifugieren wurden die Zentrifugenrörchen in der Sicherheitswerkbank vorsichtig geöffnet und der Zellring der PBMCs, welcher sich zwischen der Biocoll Separationslösung und dem Medium gebildet hatte, mit einer serologischen Pipette abgenommen. Die Zellen wurden in einem 50 mL Zentrifugenrörchen mit jeweils 10 mL Medium II gewaschen, indem sie für 20 Minuten bei 1400 RPM zentrifugiert wurden (Omnifuge 2.0RS). Die Überstände wurden verworfen, die Zellen der einzelnen Spender zusammengeführt und in 10 mL Medium II aufgenommen.

Zur Zellzählung (siehe Abschnitt 5.5.1) wurden 2,5 µL abgenommen, der Rest erneut für 20 Minuten bei 1400 RPM zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS). Anschließend wurden die Zellen in 1,0 mL Medium II Ko aufgenommen und ihrer Konzentration entsprechend mit den unterschiedlichen Medien II (Kontrolle, +Carbamazepin, +Carbamazepinepoxid) zu einer finalen Konzentration von $1 * 10^6$ Zellen/mL verdünnt.

Zellzählung

Zur Zellzählung wurden 2,5 µL der Zellen mit 97,5 µL Trypanblau gemischt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Durch das Trypanblau wurden dabei vitale Zellen nicht, tote Zellen hingegen deutlich blau angefärbt. Die Zellzahl aus allen vier Feldern gab die Menge in 10^5 Zellen/mL an. Diese Zahl wurde mit dem Volumen (10 mL) multipliziert. Es ergaben sich Zellzahlen von $5,9 * 10^7$, $6,3 * 10^7$ und $6,9 * 10^7$ vitalen Zellen.

Kultur der PBMCs +/- Carbamazepin

Die neun unterschiedlichen Zellsuspensionen der einzelnen Spender, kombiniert mit den beiden Wirkstoffen und einer medikamentenfreien Kontrolllösung, wurden in 6-Well Platten jeweils dreifach zu je 2,0 mL ausgesät. Als Referenz wurden je Spender 2,0 mL Medium II Ko, je 2,0 mL Medium II Carba und je 2,0 mL Medium II Epoxid in 6-Well Platten überführt und ohne Zellen inkubiert (siehe Tabelle 5.24). Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für 72 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH. Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen und Blindlösungen in Zentrifugenrörchen überführt und für 15 Minuten bei 1400 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Allegra™ 6R Centrifuge). Die Überstände wurden in 2,0 mL Reagiergefäße überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Das zellhaltige Pellet wurde verworfen.

Zellen Spender 1	Zellen Spender 2	Zellen Spender 3	Blindwert (ohne Zellen)
+ Kontrolle	+ Kontrolle	+ Kontrolle	+ Kontrolle
+ Carbamazepin	+ Carbamazepin	+ Carbamazepin	+ Carbamazepin
+Carbamazepin-epoxid	+Carbamazepin-epoxid	+Carbamazepin-epoxid	+Carbamazepin-epoxid
je dreifach	je dreifach	je dreifach	je einfache

Tabelle 5.24: Übersicht über die Kultur der PBMCs +/- Carbamazepin bzw. +/- Carbamazepinepoxid.

Bestimmung der Konzentrationen von Carbamazepin & Carbamazepinepoxid

Die Probenvorbereitung erfolgte nach Angaben der Firma Chromsystems. Es wurden 100 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe mit je 150 µL Internal Standard mittels Vortex-Genie 2 Schüttler in 1,5 mL Reagiergefäßen gemischt. Anschließend wurden 50 µL Precipitation Reagent zugegeben und für eine Minute geschüttelt. Die gefällten Proteine wurden durch Zentrifugation (Hettich) für 14 Minuten bei 14000 RPM abgetrennt. 100 µL Überstand wurden mit 100 µL Stabilisation Buffer gemischt und analysiert. Eine lineare Auswertung erfolgte in Empower 2, wobei die Regressionsgerade durch den Ursprung gezwungen wurde. Die Ergebnisse sind in Grafik 5.12 illustriert. Es sind dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Referenzen ohne Zellen und den drei Zellkulturen zu erkennen.

Laufzeit	25,00 min
Injektionsvolumen	20 µL
Säulentemperatur	25°C
Temperatur Probengeber	6°C
UV-Detektion	204 nm
Flussrate	1,2 mL/min
Gradient	isokratisch

Tabelle 5.25: HPLC-Methode zur Quantifizierung von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid.

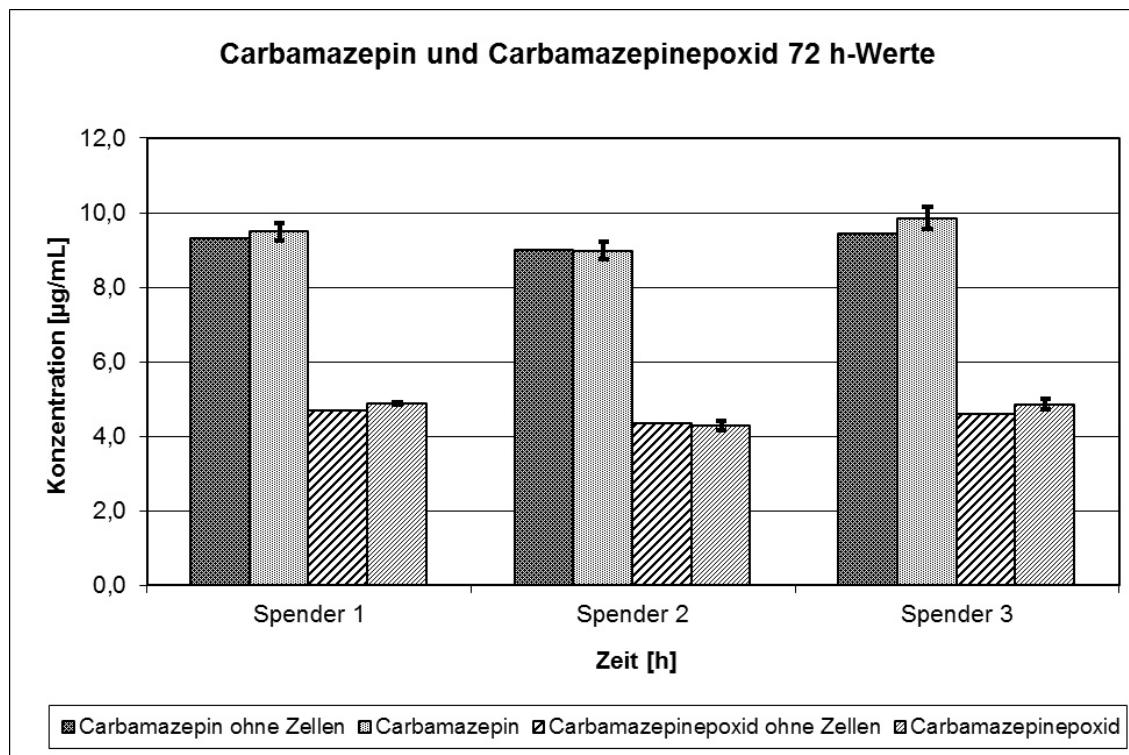


Abbildung 5.12: Konzentrationen von Carbamazepin und Carbamazepinepoxid nach 72 Stunden Zellkultur. Es existieren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der zellfreien Inkubation und der Zellkultur.

Bestimmung der Konzentration von Chinolinsäure

Es wurden die Konzentrationen der Quin mittels HPLC-MS/MS bestimmt (siehe Abschnitt 5.2). Dazu wurde zuerst ein Kalibratorset in Zellkulturmedium (siehe 4.7) hergestellt. Es wurden je Kalibrator 1,9 mL Medium mit 100 µL der entsprechenden Spikelösung versetzt (siehe 4.4.8). Die Daten wurden zunächst in MassLynx ausgewertet, exportiert und mittels Excel in Abbildung 5.13 graphisch dargestellt. Es wurden die Konzentrationsunterschiede statistisch analysiert (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc Test). Dabei wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Kontrollen und den stimulierten Zellkulturen der einzelnen Spender festgestellt.

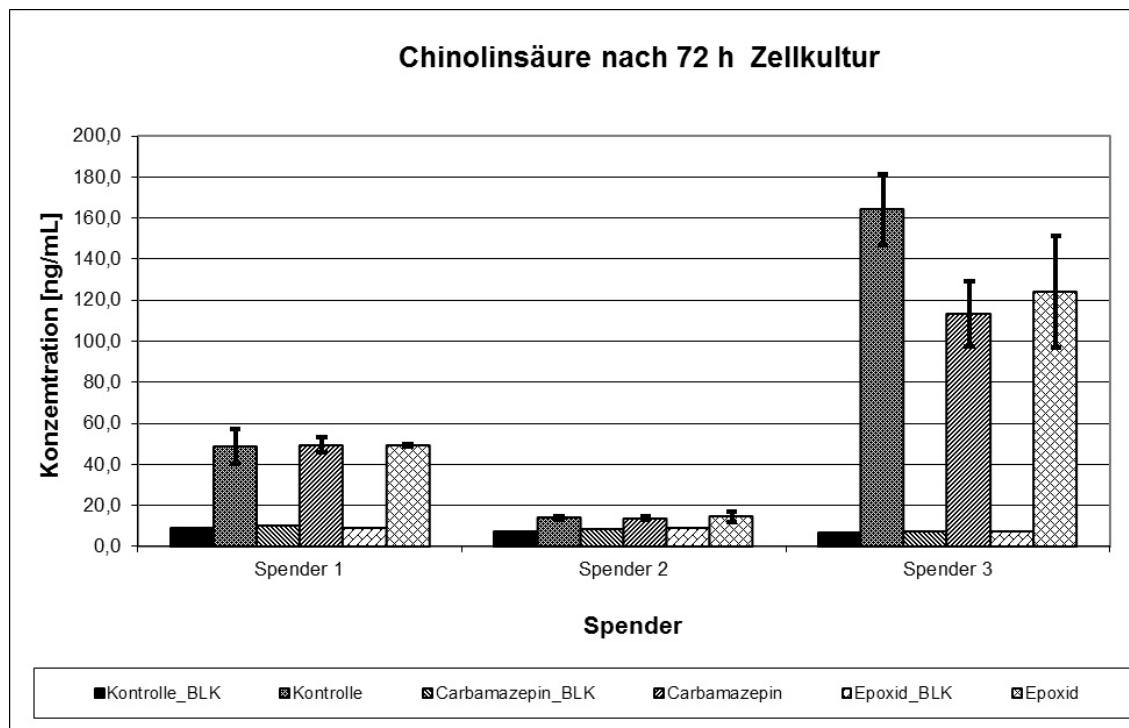


Abbildung 5.13: Konzentration der Chinolinsäure nach 72 Stunden Zellkultur in Kontrollmedium und Medium mit Carbamazepin oder Carbamazepinepoxid. Es wurden keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen den Kontrollen und den stimulierten Zellkulturen der einzelnen Spender festgestellt.

5.5.2 Untersuchung des circadianen Rhythmus in vivo

In diesem Versuch wurde die circadiane Rhythmisik des Kynurenin Pathways in vivo untersucht. Dazu wurde einem Probanden zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten Serum abgenommen und zu einem späteren Zeitpunkt mittels LC-MS/MS untersucht.

Wie im Abschnitt 4.5 beschrieben, wurde einem freiwilligen, gesunden Probanden (männlich, 34 Jahre, Nichtraucher) an einem Tag um 6:00 Uhr, 10:00 Uhr, 14:00 Uhr, 18:00 Uhr und 22:00 Uhr Blut abgenommen (zweimal Monovette® EDTA/KE und einmal Monovette® Serum) und daraus das Serum gewonnen. Das Vollblut wurde für den im Abschnitt 5.5.3 beschriebenen Versuch verwendet. Um den Einfluss der Nahrungsaufnahme möglichst gering zu halten, aß der Proband jeweils zwei Stunden vor der Blutabnahme eine identisch große Portion eines handelsüblichen Müslis. Das Serum wurde bis zur Analyse bei -20°C gelagert und wie unter Abschnitt 5.2 beschrieben je dreifach aufgearbeitet und analysiert.

Die Daten wurden zunächst in MassLynx ausgewertet, exportiert und mittels Excel graphisch dargestellt. In Abbildung 5.14 sind exemplarisch die Ergebnisse für Tryptophan, Kynurenin, Chinolin-2-Carboxylsäure und Chinolinsäure dargestellt. Es wurde anschließend eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc-Test durchgeführt. Dabei wurden im ersten Schritt signifikante Änderungen der Serumspiegel für Trp ($p = 0,003$), Kyn ($p = 0,004$), QuinaldA ($p = 0,041$), Quin ($p = 0,000$), 3-HAA ($p = 0,011$), 5-HT ($p = 0,047$), KynA ($p = 0,007$), 5-HIAA ($p = 0,01$), 5-HTP ($p = 0,000$), 3-HK ($p = 0,000$), Pic ($p = 0,001$) und AA ($p = 0,011$) festgestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.26 auf-

gelistet. Für QuinaldA und 5-HT konnten im Posthoc-Test keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Für KynA und 5-HIAA konnten keine Unterschiede zum ersten Wert festgestellt werden. Jedoch bestehen für KynA signifikante Unterschiede zwischen 14:00 Uhr und 18:00 Uhr ($p = 0,030$) und zwischen 18:00 Uhr und 22:00 Uhr ($p = 0,028$). 5-HIAA zeigt einen signifikanten Anstieg der Konzentration zwischen 18:00 Uhr und 22:00 Uhr.

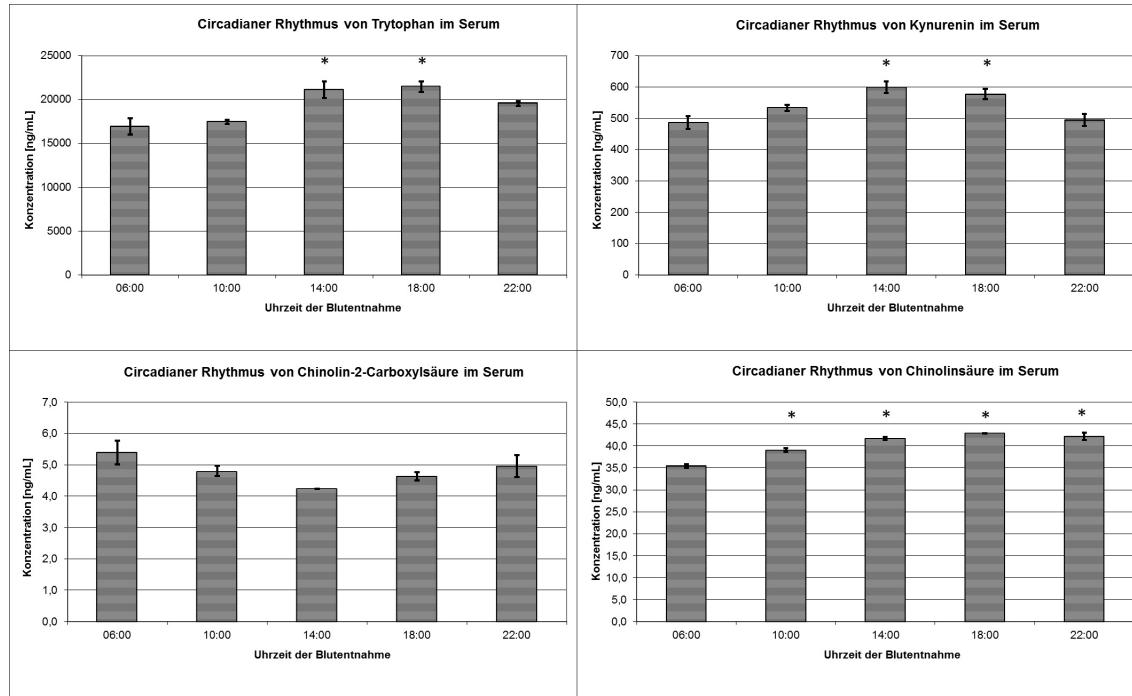


Abbildung 5.14: Circadianer Rhythmus von Trp, Kyn, QuinaldA und Quin im Serum. Signifikante Unterschiede zwischen dem jeweils ersten Wert um 6:00 Uhr und Folgewerten sind durch * hervorgehoben ($p < 0,05$).

5 Ergebnisse

I System	J System	Analyt	Signifikanz		Analyt	Signifikanz	
6:00	10:00	Trp	1,000		Kyn	0,426	
			0,014	*		0,013	*
			0,010	*		0,033	*
			0,104			1,000	
6:00	10:00	QuinaldA	0,688		Quin	0,004	**
			0,055			0,000	***
			0,330			0,000	***
			1,000			0,000	***
6:00	10:00	3-HAA	0,017	*	5-HT	1,000	
			0,081			1,000	
			1,000			1,000	
			0,317			1,000	
6:00	10:00	KynA	1,000		5-HIAA	1,000	
			0,063			0,334	
			0,058			1,000	
			1,000			0,145	
6:00	10:00	5-HTP	0,065		3-HK	0,398	
			0,002	**		0,001	**
			0,000	***		0,000	***
			0,014	*		0,182	
6:00	10:00	AA	0,393		Pic	0,330	
			0,037	*		0,003	**
			0,080			0,052	
			1,000			0,004	**

Tabelle 5.26: Ergebnisse der Untersuchung zum circadianen Rhythmus in Serum. Es sind die Ergebnisse bezogen auf den 6:00 Wert dargestellt.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$), *** höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$)

Als letzter Schritt der Auswertung dieses Versuchs wurden die Konzentrationen der Metabolite auf die Konzentrationen ihrer Vorläufer bezogen, wie es auch im Abschnitt 5.4.3 über den Einfluss der Nahrungsaufnahme durchgeführt wurde. Es sind exemplarisch die Ergebnisse von KynA, 3-HK, 3-HAA und Xan in Abbildung 5.15 dargestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Analyte wurden durch die Konzentrationen von Trp und Kyn geteilt. Die Quotienten wurden mit dem Faktor 1000 bzw. 100 multipliziert, um eine bessere Darstellung zu ermöglichen. Signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc-Test) wurden für KynA/Trp zwischen 6:00 Uhr und 22:00 Uhr, zwischen 10:00 Uhr und 22:00 Uhr und zwischen 14:00 Uhr und 22:00 Uhr ermittelt. Für 3-HAA/Trp wurden signifikante Unterschiede zwischen 6:00 Uhr und 10:00 Uhr und zwischen 10:00 Uhr und 18:00 Uhr festgestellt.

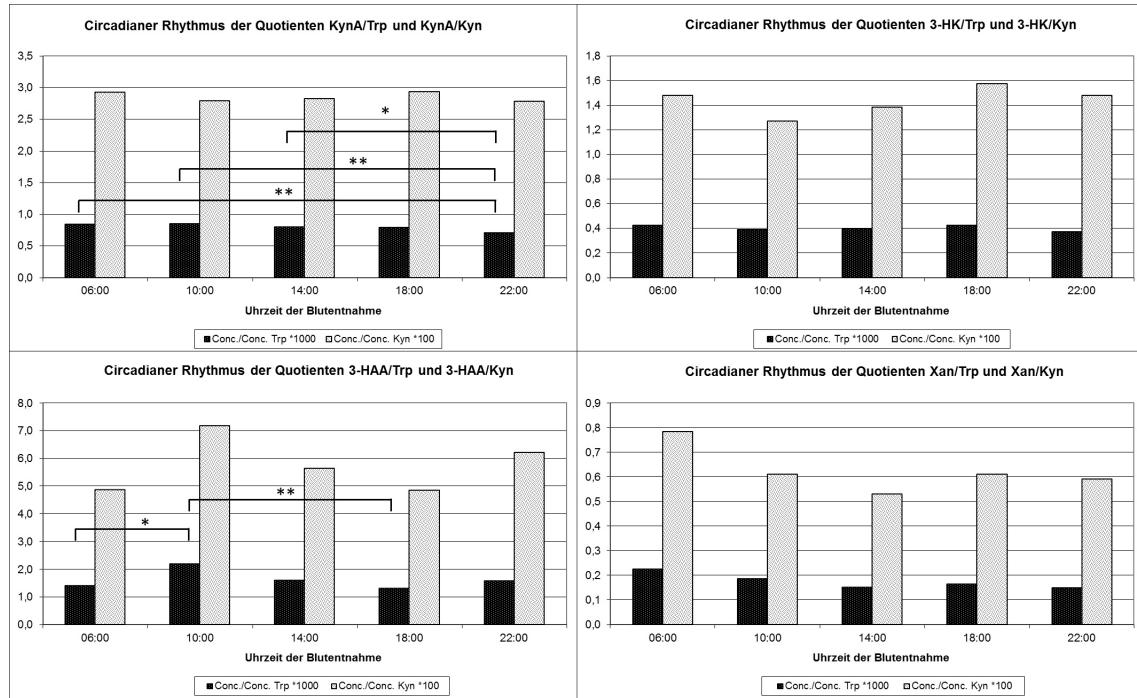


Abbildung 5.15: Circadianer Rhythmus von KynA, 3-HK, 3-HAA und Xan bezogen auf Kyn und Trp im Serum.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$)

5.5.3 Untersuchung des circadianen Rhythmus in PBMC-Kulturen

Parallel zu der zuvor in Abschnitt 5.5.2 erörterten Untersuchung des circadianen Rhythmus *in vivo*, wurde auch der circadiane Einfluss auf eine Zellkultur getestet. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurde einem freiwilligen, gesunden Probanden (männlich, 34 Jahre, Nichtraucher) an einem Tag um 6:00 Uhr, 10:00 Uhr, 14:00 Uhr, 18:00 Uhr und 22:00 Uhr peripheres Blut abgenommen (zweimal Monovette® EDTA/KE) und umgehend für die Isolierung der mononukleären Zellen (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell) verwendet. Um den Einfluss der Nahrungsaufnahme möglichst gering zu halten, aß der Proband jeweils zwei Stunden vor der Blutabnahme eine identisch große Portion eines handelsüblichen Müslis.

Unmittelbar nach der Blutabnahme wurde unter der Sicherheitswerkbank das Blut der zwei EDTA-Röhrchen in einem 50 mL Zentrifugenrörchen gemischt und auf 30 mL mit PBS aufgefüllt. In einem zweiten 50 mL Zentrifugenrörchen wurden 15 mL Biocoll Separationslösung vorgelegt und vorsichtig mit der Blut/PBS-Mischung überschichtet. Zur Separation erfolgte eine Zentrifugation für 40 Minuten bei 1600 RPM und Raumtemperatur (Omnifuge 2.0RS). Anschließend wurden die Zentrifugenrörchen in der Sicherheitswerkbank vorsichtig geöffnet und der Zellring der PBMCs, welcher sich zwischen der Biocoll Separationslösung und dem PBS gebildet hatte, mit einer serologischen Pipette abgenommen. Die isolierten Zellen wurden in einem weiteren 50 mL Zentrifugenrörchen mit 10 mL PBS gewaschen, indem sie für 20 Minuten bei 1400 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert wurden (Omnifuge 2.0RS). Die Überstände wurden verworfen und die Zellen in 10 mL Medium I aufgenommen. Zur Zellzählung (siehe Abschnitt 5.5.1) wurden 2,5 μ L verwendet, der Rest erneut für 20 Minuten bei 1400 RPM und

Raumtemperatur zentrifugiert (Omnifuge 2.0RS). Vor der Inkubation wurden die Zellen in 1,0 mL Medium II Circadian aufgenommen und mit Medium II Circadian (- LPS), bzw. Medium II LPS (+ LPS), zu der angestrebten Konzentration von $1 * 10^6$ Zellen/mL verdünnt (Reagenzien für die Zellkultur siehe Abschnitt 4.7, Ergebnisse der Zellzählung siehe Tabelle 5.27).

Uhrzeit	Zellzahl
6:00	$28 * 10^5$ /mL
10:00	$37 * 10^5$ /mL
14:00	$31 * 10^5$ /mL
18:00	$25 * 10^5$ /mL
22:00	$30 * 10^5$ /mL

Tabelle 5.27: Anzahl der gewonnenen PBMCs zum jeweiligen Zeitpunkt der Blutabnahme.

Je Zeitpunkt wurde eine 6-Well Platte inkubiert. Drei Vertiefungen wurden dabei mit je 2,0 mL LPS stimulierter Zellsuspension (+ LPS) und drei Vertiefungen mit je 2,0 mL Zellsuspension ohne Stimulation (- LPS) gefüllt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank für jeweils 48 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% rH. Nach der Inkubation wurden die Zellsuspensionen in Zentrifugenrörchen überführt und für 15 Minuten bei 1400 RPM und Raumtemperatur zentrifugiert (Allegra™ 6R Centrifuge). Die Überstände wurden in 2,0 mL Reagiergefäße überführt und bis zur Analyse bei -20°C gelagert. Das zellhaltige Pellet wurde verworfen.

Zur Quantifizierung der Metabolite des Kynurein Pathways wurde ein Kalibratorset in Zellkulturmedium (siehe 4.7) hergestellt. Dazu wurden je Kalibrator 1,9 mL Medium mit 100 µL der entsprechenden Spikelösung versetzt (siehe 4.4.8). Die Daten wurden zunächst in MassLynx ausgewertet, exportiert und in Excel illustriert. Mit einem gepaarten t-Test wurde untersucht, ob die LPS-Stimulation zu signifikanten Änderungen führt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 5.28 aufgeführt. Pic konnte nicht ausgewertet werden, da die niedrigen Signalintensitäten keine Integration zuließen. Die Substanzen QuinaldA, Xan und 5-HTP sind zwar integrierbar, aber die berechneten Konzentrationen zu klein, um eine sinnvolle Differenzierung zu ermöglichen. Nach einer LPS-Stimulation zeigt Kyn einen signifikanten Anstieg, wohingegen 3-HAA und 5-HT signifikant niedrigere Werte aufweisen.

Analyt	Konzentration (ng/mL)		T	Signifikanz
	- LPS	+ LPS		
Trp	3318	3068	1,0	0,313
Kyn	253	438	-2,6	0,021 *
QuinaldA	0,8	0,9	-0,9	0,375
Quin	68,3	61,2	1,3	0,213
3-HAA	1322	595	5,1	0,000 ***
5-HT	114	77,0	5,0	0,000 ***
KynA	17,0	20,7	-1,3	0,214
5-HIAA	67,7	60,7	1,4	0,181
Xan	0,4	0,3	0,6	0,546
5-HTP	0,0	0,1	-1,3	0,230
3-HK	22,1	26,7	-1,2	0,239
AA	36,6	28,0	1,5	0,144

Tabelle 5.28: Gepaarter t-Test: Einfluss der LPS-Stimulation unabhängig von der Uhrzeit.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$), *** höchstsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$). a) Konzentrationen sind so klein, dass eine Unterscheidung nicht möglich ist.

Anschließend wurde durch einen gepaarten t-Test zu den jeweiligen Zeitpunkten geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den stimulierten und den unstimulierten Kulturen bestanden (siehe Tabelle 5.29). Die Zellkultur, die mit dem um 6:00 Uhr gewonnen Blut begonnen wurde, zeigt dabei keinerlei signifikante Unterschiede. Zu den späteren Zeitpunkten sind teilweise signifikante Unterschiede für 3-HAA, 5-HT, Kyn, 3-HK und AA zu beobachten.

Uhrzeit	Analyt	Konzentration (ng/mL)		T	Signifikanz
		- LPS	+ LPS		
10:00	3-HAA	2031	854	6,1	0,026 *
	5-HT	27,0	17,3	5,2	0,035 *
14:00	Kyn	210	383	-6,1	0,026 *
	3-HAA	1745	552	10,1	0,010 *
18:00	5-HT	168	108	5,5	0,031 *
	AA	38,7	24,7	12,1	0,007 **
22:00	3-HAA	409	136	8,5	0,014 *
	AA	15,0	7,0	4,6	0,044 *
	Kyn	190	833	-8,1	0,015 *
	5-HT	132	70	6,1	0,026 *
	KynA	13,7	32,7	-7,6	0,017 *
	3-HK	17,0	40,7	-8,0	0,015 *

Tabelle 5.29: Einfluss der LPS-Stimulation zu den jeweiligen Zeitpunkten.

* signifikanter Unterschied ($p < 0,05$), ** hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

Des Weiteren wurde eine einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni als Posthoc-Test durchgeführt, um für die stimulierten und die unstimulierten Kulturen Unterschiede zwischen den einzelnen Zeitpunkten zu ermitteln. Dabei wurden signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Zeitpunkten für Trp, Kyn, 3-HAA,

5 Ergebnisse

5-HIAA, 3-HK und AA sowohl ohne, als auch mit LPS-Stimulation festgestellt. Nach einer Stimulation, jedoch nicht ohne die Verwendung von LPS, wurden Unterschiede für 5-HT und KynA festgestellt. Die Konzentrationen aller Intermediate sind in den Abbildungen 5.16, 5.17, 5.18 dargestellt. Signifikante Änderungen zum vorherigen Zeitpunkt wurden für Trp im Posthoc-Test weder mit noch ohne Stimulation gefunden. 3-HAA zeigt signifikante Änderungen zum Vorwert um 10:00 Uhr, 14:00 Uhr, 18:00 Uhr und um 22:00 Uhr nach einer Stimulation und um 18:00 Uhr ohne Stimulation. Für Kyn bestehen signifikante Änderungen zum Vorwert nur nach LPS-Stimulation um 18:00 Uhr und um 22:00 Uhr. 5-HT zeigt unabhängig von der Stimulation Änderungen um 14:00 Uhr, 18:00 Uhr und um 22:00 Uhr.

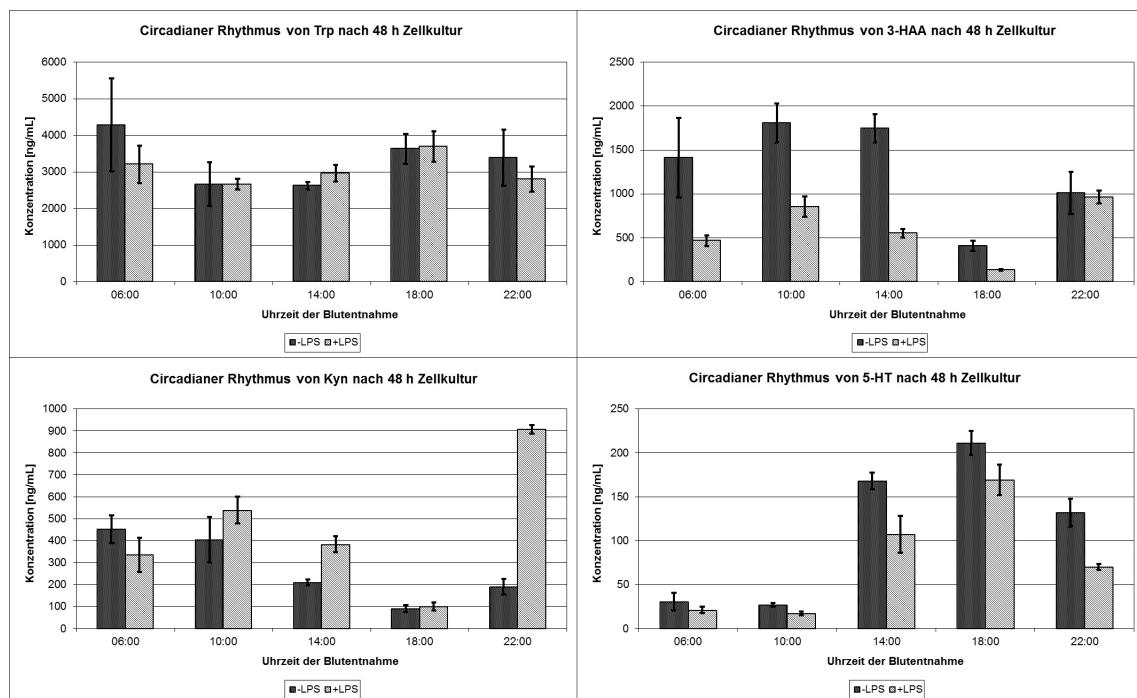


Abbildung 5.16: Circadiane Rhythmik für Trp, 3-HAA, Kyn und 5-HT nach 48 Stunden Zellkultur, mit und ohne LPS-Stimulation.

5 Ergebnisse

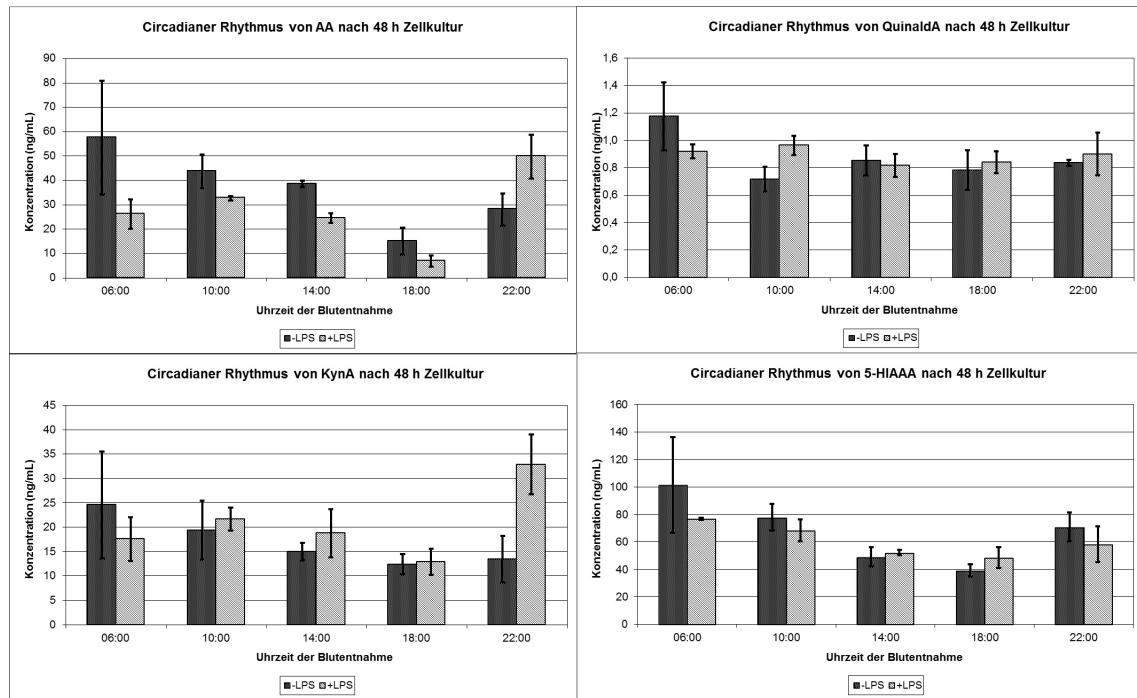


Abbildung 5.17: Circadiane Rhythmis für AA, QuinaldA, KynA und 5-HIAA nach 48 Stunden Zellkultur, mit und ohne LPS-Stimulation.

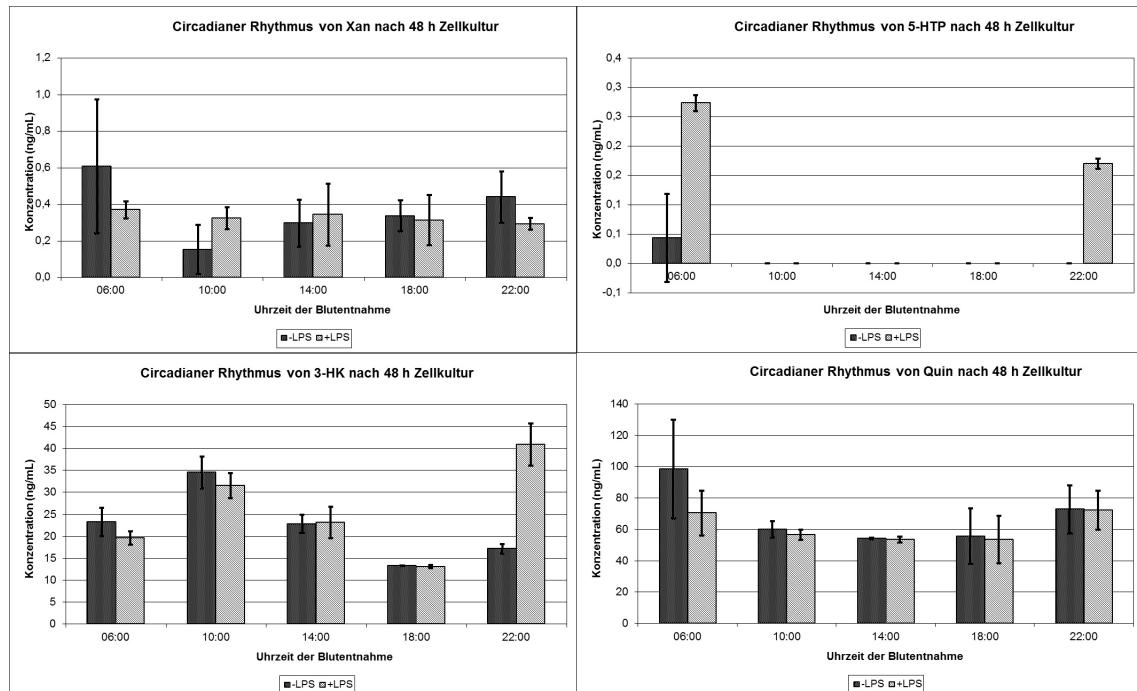


Abbildung 5.18: Circadiane Rhythmis für Xan, 5-HTP, 3-HK und Quin nach 48 Stunden Zellkultur, mit und ohne LPS-Stimulation. Zu den Zeitpunkten 10:00 Uhr, 14:00 Uhr und 18:00 Uhr konnte kein 5-HTP nachgewiesen werden.

6 Diskussion

6.1 Bestimmung der Kynurenine mittels HPLC

Der vorliegenden Arbeit lagen mehrere Ziele zugrunde. Das erste Ziel war die Optimierung der Probenvorbereitung für die im Labor etablierte Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), um eine gesteigerte Sensitivität zu erhalten (siehe Abschnitt 5.1). Das Ergebniss ist eine Festphasenextraktion (SPE) zur selektiven Aufreinigung der Substanzen Tryptophan (Trp), Serotonin (5-HT), 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA), Kynurenin (Kyn), 3-Hydroxykynurenin (3-HK), 3-Hydroxyanthranilsäure (3-HAA) und Kynureninsäure (KynA) aus unterschiedlichen biologischen Matrices, wie beispielsweise Serum, Zellkulturmedium, Liquor Cerebrospinalis und Saliva. Diese Methode wurde Dual-Load-SPE benannt, da im Zuge der Probenvorbereitung die Analyte zweifach auf die SPE Säule aufgetragen werden.

Durch den Einsatz dieser neuartigen Probenvorbereitung wurde, im Vergleich mit der zuvor verwendeten Probenvorbereitung [179], eine deutliche Signalsteigerung auf bis zu 237% erzielt. In Versuchen zeigten sich unterschiedliche, vom pH-Wert abhängige Bindungseigenschaften der zu untersuchenden Analyte an die Partikel der SPE Kartusche. Die ursprüngliche Methode sah eine stark acide Probenaufgabe vor. Mittels Dual-Load-SPE werden die Analyte sowohl mit einem neutralen pH-Wert als auch in einem sauren Milieu aufgetragen, wodurch die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der Analyte optimal ausgenutzt werden können.

Im Vergleich zu anderen Methoden ist die Anzahl der gemessenen Analyte höher. Mit der von uns entwickelten Methode können sieben Analyte durch eine Probenvorbereitung aus unterschiedlichen biologischen Matrices extrahiert werden und durch eine HPLC-Anlage mit UV-Detektor und Fluoreszenzdetektor (FLD) quantifiziert werden. Guillemin et al. beschrieben eine Methode, durch welche lediglich Kyn mittels HPLC-UV bestimmt werden kann [49]. Auch mit den Methoden von Kapoor [170] und Heyes [171] können lediglich KynA bzw. 3-HK analysiert werden. In einer im Jahr 2010 veröffentlichten Arbeit stellte die Münchner Arbeitsgruppe eine HPLC-UV/FLD-Methode nach einer Probenvorbereitung mittels SPE vor, auf deren Basis die hier beschriebene Methode entwickelt wurde. Im Vergleich zur Dual-Load-SPE wird in dieser Arbeit jedoch nicht die Analyse von 3-HAA und 5-HT beschrieben [184]. Durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebene HPLC-UV/FLD-Methode kann die Substanz Chinolinsäure (Quin) nicht nachgewiesen werden. Ghosh et al. stellten 2012 eine HPLC-UV-Methode vor, die Quin, jedoch keine weiteren Substanzen des Kynurenin Pathways (KP) detektieren kann [180]. Jedoch wurden damit keine physiologischen Blutspiegel bestimmt. Durch die gleichzeitige Analyse mehrerer Analyte des KP lässt sich nun ein umfangreicheres Bild der Aktivitäten des KP zeichnen. Dabei können Probenmaterial, Arbeitszeit und Analysengeräte eingespart werden. Ein weiterer Vorteil einer multiparameter Analyse ist, dass zwischen den einzelnen Quantifizierungen kein Zeitverzug stattfindet, oder Proben gar in ein anderes

Labor versandt werden müssen. Durch derartige äußere Einflüsse kann es zu einem unterschiedlich stark ausgeprägtem Substanzabbau kommen, was zu einem verfälschtem Bild des KP führen kann.

Die von uns verwendete Methode ermöglicht die Analyse der aufgeführten Substanzen mittels HPLC-UV/FLD. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur häufig die Verwendung eines elektrochemischen Detektors für die Quantifizierung einzelner Substanzen des Tryptophanstoffwechsels beschrieben [98, 168, 172, 148, 185]. Diese Art der Detektion gilt jedoch in der Praxis als sehr störanfällig und ist deutlich wartungsintensiver als ein UV-Detektor oder FLD.

Die neu entwickelte Dual-Load-SPE wurde bis zur Einführung einer HPLC-MS/MS-Methode im Labor der Arbeitsgruppe Neurobiochemie des Instituts für Laboratoriumsmedizin des Klinikums der Universität München als Standard zur Messung von Studien aus unterschiedlichen Matrices verwendet.

Trotz der deutlichen Verbesserungen gegenüber herkömmlichen Methoden zeigten sich sehr schnell die Grenzen dieser Technik bei der Analyse endogener Substanzen aus Zellkulturmedien oder Patientenserien. So waren beispielsweise die benötigten Probenvolumina mit jeweils 1,0 mL sehr groß und nicht immer realisierbar. Die laufenden Kosten für die einzelnen Probenvorbereitungen waren durch die aufwendige SPE-Probenvorbereitung und spezielle Probengläser sehr hoch. Da sich die Konzentrationen der einzelnen Analyte in einer Serumprobe drastisch unterscheiden, muss mit dieser Technik das relativ hoch konzentrierte Trp in einer unabhängigen Analysemethode gemessen werden (siehe Abschnitt 4.3.1), um den Detektor nicht zu überladen und eine auswertbare, lineare Kalibriergerade zu ermöglichen. Die weiteren Analyte müssen in einer zusätzlichen Analyse mit einem sehr großen Injektionsvolumen quantifiziert werden (siehe Abschnitt 4.3.2), um Substanzen wie 3-HK und 5-HIAA im physiologischen Bereich noch detektieren zu können. Das große Injektionsvolumen schließt jedoch eine erneute Injektion aus, wodurch eine Verifizierung von Messungen oder Wiederholung bei etwaigen Fehlern unmöglich ist. Die Analysedauer ist mit insgesamt mehr als 35 Minuten (6 Minuten Trp, 26 Minuten übrige Analyte und jeweils ca. 2 Minuten für die Injektion) sehr lang und limitiert die Anzahl der Proben, welche pro Tag gemessen werden konnten. Aber die Laufzeit ist für eine HPLC-Methode durchaus konkurrenzfähig [43]. Da speziell die UV Analytik sehr unspezifisch detektiert und die Probenmatrices Serum und Zellkulturmedium sehr komplex sind, wurden bei der HPLC-Analytik des öfteren einzelne Analysen durch Proteine, Peptide, zugesetzte Indikatoren wie Phenolrot, Medikamente und deren Metabolite überlagert, wodurch die Ergebnisse nicht verwertbar, jedoch aufgrund der zuvor aufgeführten Gründe auch nicht wiederholbar waren.

6.2 HPLC-MS/MS-Methoden

Das nächste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer HPLC-MS/MS-Methode, die im Vergleich zur zuvor entwickelten HPLC-Methode folgende Punkte erfüllen sollte: Ein geringeres Probenvolumen bei gleichzeitig gesteigerter Spezifität und Sensitivität. Eine gesteigerte Anzahl an detektierbaren Analyten pro Analyse, insbesondere die Bestimmung von Chinolinsäure, war ein wichtiger Schlüsselpunkt bei der Methodenentwicklung. Die Laufzeiten sollten verkürzt und die Kosten für Verbrauchsmaterialien durch den Einsatz einer einfachen Probenvorbereitung, wie beispielsweise durch Fällung der Serumproteine oder eine Flüssig-Flüssig-Extraktion, reduziert werden.

Alle Punkte konnten erfüllt werden. Durch den Einsatz der MS/MS-Technik wurde eine deutlich spezi-

fischere Nachweismethode etabliert. Zusätzlich zu den Analyten Tryptophan, Serotonin, 5-Hydroxyindol-essigsäure, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Kynureninsäure können nun die Tryptophanmetabolite Anthranilsäure (AA), Chinolin-2-Carboxylsäure (Quinaldic acid, QuinaldA), Xanthurinsäure (Xan), 5-Hydroxytryptophan (5-HTP), Picolinsäure (Pic) und Chinolinsäure quantifiziert werden. Keine der bisher publizierten Methoden konnte so viele Metabolite des Tryptophanstoffwechsels durch eine Probenvorbereitung erfassen. Teilweise konnten durch einzelne HPLC-Analysen lediglich einzelne Substanzen wie Trp und Kyn [173], KynA [170] oder 3-HK [171] bestimmt werden. Auch Quin und Pic wurden nur in speziellen GC-MS-Methoden, getrennt von den anderen Analyten, untersucht [49, 172, 185]. Feng et al. publizierten 2013 eine HPLC-Methode mit "on-column" Derivatisierung und UV-, bzw. Fluoreszenzdetektion. Der Einsatz dieser technisch aufwendigen Analyse ermöglicht jedoch auch nur die Quantifizierung von Trp, Kyn, 5-HIAA und KynA [121]. 2012 wurde eine HPLC-Methode publiziert, die insgesamt acht unterschiedliche Probenvorbereitungen und Analysen für die Bestimmung von neun Metaboliten des Kynurenin Pathways benötigt [186]. Aktuell wurde im Jahr 2013 eine HPLC-Methode mit kombinierter UV- und Fluoreszenzdetektion publiziert [187]. Sie ermöglicht die Analyse von Trp, 5-HT, 5-HIAA, Kyn und KynA. Jedoch wird die aufgearbeitete Probe dreifach injiziert, wobei eine Analyse ca. 30 Minuten benötigt. Eine weitere HPLC-UV-FLD-Methode aus dem Jahr 2012 benötigt eine Laufzeit von 65 Minuten [43].

Auch im Vergleich zu aktuellen HPLC-MS/MS-Methoden ist die Anzahl der detektierbaren Metabolite deutlich größer. Huang et al. publizierten 2013 eine HPLC-MS/MS-Methode, mit welcher lediglich Trp und Kyn aus humanem Plasma quantifiziert werden können [188]. Und Wirthgen et al. konnten mit ihrer HPLC-MS/MS-Methode lediglich Trp, Kyn, KynA und Quin bestimmen [70].

Die Probenvorbereitung, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert wurde, ist eine zweistufige Fällung mit anschließender, teilweiser Derivatisierung. Diese zweistufige Fällung ist deutlich einfacher als die von Mackay beschriebene dreifache Fällung mit Perchlorsäure zur Bestimmung von Trp, Kyn, 3-HK, 3-HAA und Xan. Quin wurde bei dieser Methode separat durch eine Festphasenextraktion aufgereinigt, mit tert-Butyldimethylsilyl derivatisiert und mittels GC-MS analysiert [172]. Auch ist die Probenvorbereitung einfacher als eine wässrige Extraktion, Reinigung von Lipiden etc. mittels Chloroform, anschließende Fällung und letztlich Aufkonzentrierung durch Lyophilisation, wie sie von Lesniak et al. beschrieben wurde [187].

Durch die Derivatisierung kann die Sensitivität, vor allem für Quin und Pic, gesteigert werden. Für Pic sind in der Abbildung 6.1 zwei Chromatogramme dargestellt. In dem linken Chromatogramm ist das Signal der underivatisierten Pic zu sehen. Das rechte Chromatogramm zeigt den Peak der derivatisierten Pic aus der identischen Probe. Die Signalintensität hat sich um mehr als Faktor 100 vergrößert. Durch die Derivatisierung wird die Substanz deutlich stärker von den Partikeln der HPLC-Säule retardiert, wodurch sich die Retentionszeiten deutlich verlängern. Dieser Effekt wirkt sich besonders stark auf 3-HK aus, welches underivatisiert mit den polaren Verunreinigungen der Probe eluiert. Nach der Derivatisierung ist der Analyt deutlich von diesen störenden Matrixeinflüssen getrennt. Dass der entstandene Butylester nun nicht mit anderen Molekülen um die Ionisation konkurrieren muss, führt ebenfalls zu einem größeren Signal. Da die Matrix zwischen den einzelnen Proben variiert, kommt es bei der underivatisierten Analyse zu einer unterschiedlich starken Ionensuppression. Dieser sich negativ auswirkende Effekt entfällt nach der Derivatisierung, wodurch deutlich reproduzierbarere Ergebnisse generiert werden können. Bei der

Derivatisierung handelt es sich um eine Veresterung der Carbonsäuren mittels Butanol (siehe Abschnitt 5.2.1). Daher ist die Derivatisierung theoretisch für alle Substanzen des Kynureninstoffwechsels möglich, mit Ausnahme von 5-HT, da diese Substanz keine Carbonsäure besitzt. Praktisch können 5-HTP und 5-HIAA nicht verestert werden. Da die Derivatisierungsreaktion bei einer Temperatur von 90°C abläuft, wird vermutet, dass die beiden Substanzen thermolabil sind und es zu einem Substanzabbau kommt.

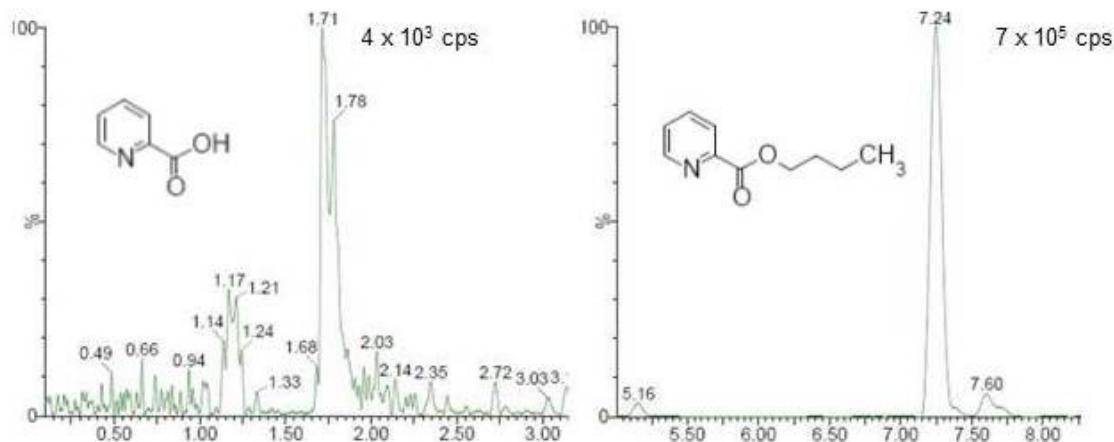


Abbildung 6.1: Am Beispiel der Picolinsäure kann man erkennen, dass nach der Derivatisierung ein deutlich größeres Signal mit einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis detektiert werden kann. Auch ist die Retentionszeit deutlich verlängert, wodurch die Substanz besser von störenden Matrixeinflüssen gereinigt werden kann.

Durch die gesteigerte Sensitivität konnte das benötigte Probenvolumen auf 300 µL gesenkt werden. Die 2012 von Möller et al. vorgestellte HPLC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von Trp, Kyn, KynA, AA, 3-HAA, Quin und PIC aus Rattenplasma benötigt beispielsweise ein Volumen von 800 µL [178]. Auch kann die aufgearbeitete Probe mehrfach injiziert werden, wodurch Analysen nach eventuellen Fehlern am HPLC-MS/MS-System wiederholt werden können.

Die Probenvorbereitung verzichtet auf kostenintensive Verbrauchsmaterialien wie SPE-Säulen, Filter oder spezielle Probengläschen. Zur Analyse werden je Probe zwei Injektionen durchgeführt. Dabei benötigt die Trennung der underivatisierten Metabolite 8,0 Minuten, und die der derivatisierten Metabolite 8,5 Minuten und ist in der Summe schneller als die zuvor beschriebene HPLC-Methode. Die Dauer der chromatographischen Trennung ist mit anderen HPLC- oder HPLC-MS/MS-Methoden vergleichbar. So stellten Möller et al. 2012 eine HPLC-MS/MS-Methode vor, die für die Bestimmung von sechs Metaboliten 12 Minuten benötigt. [178]. Die von Lesniak publizierte Methode ist mit einer Laufzeit von 30 Minuten deutlich länger, obwohl nur fünf Substanzen des KP quantifiziert werden können [187]. Mit insgesamt 60 Minuten Laufzeit ist die Methode von Beretta aus dem Jahr 2009 [176] für einen Analyten (KynA) unverhältnismäßig langsam und für die Messung von Studien mit hoher Probenanzahl nicht geeignet.

Ein sehr zeitintensiver Schritt bei der Probenvorbereitung ist das Eindampfen der Probe im Rotationsverdampfer (3,5 Stunden nach der Fällung). Vergleicht man diese Methode jedoch mit anderen aktuellen Methoden, so stellt man fest, dass teilweise Fällungen über Nacht [70] oder langdauernde Lyophili-

sationen [187] zur Probenkonzentrierung durchgeführt werden. In der Praxis hat es sich bewährt, diese lange Probenvorbereitung über zwei Tage zu verteilen und die Proben über Nacht einzudampfen. Die getrockneten Proben sind bei Raumtemperatur stabil und können am nächsten Tag weiterverarbeitet werden.

6.3 Validierung der HPLC-MS/MS-Methoden

Derivatisierungsdauer

Es wurde die optimale Derivatisierungsdauer ermittelt und die Derivatisierbarkeit des internen Standards Tryptophan-d5 (Trp-d5) überprüft (siehe Abschnitt 5.3.2). Dabei wurde festgestellt, dass optimales Ergebnis bei einer Derivatisierungstemperatur von 90°C und einer Dauer von 60 Minuten erzielt wird. Nach 40 Minuten steigen die Signalintensitäten der Analyte nicht weiter an, jedoch kann durch eine 60 minütige Derivatisierung ein stabileres Ergebnis erzielt und eventuelle Fehler können ausgeglichen werden. Solch ein Fehler könnte beispielsweise ein nicht vollständig vorgeheizter Heizschüttler sein. Der interne Standard Trp-d5 wird hierbei jedoch nicht derivatisiert. Die Substanz ist offenbar thermolabil und es kommt bei der hohen Temperatur teilweise zu einem Deuteriumaustausch. Dass nicht alle fünf Deuteriumatome betroffen sind, erkennt man daran, dass es zu keinem Anstieg der Signale des undeuterierten Tryptophans kommt. Trp-d5 kann daher nicht als interner Standard für die Analyse derivatisierter Substanzen verwendet werden. In der Literatur konnten keine vergleichbaren Daten zur Derivatisierung von fünfach deuteriertem Tryptophan bei 90°C gefunden werden.

Reproduzierbarkeit

Im Zuge der Validierung wurde zuerst die Reproduzierbarkeit des HPLC-MS/MS-Systems überprüft (siehe Abschnitt 5.3.1). Dabei wurde für jede Substanz der Variationskoeffizient (VK) aus 25 Injektionen unter Berücksichtigung des jeweiligen internen Standards berechnet. Der größte VK wurde für Serotonin mit 7,0% ermittelt. Es wurden zu jeder Substanz Regelkarten erstellt. Deutlich ist am Beispiel der Chinolinsäure zu erkennen, dass das System offensichtlich fünf Injektionen vor dem Beginn der eigentlichen Analysensequenz zum Äquilibrieren benötigt. Werden die ersten Injektionen aus den Regelkarten entfernt, so werden keine Regelverletzungen für 20 Injektionen festgestellt. Das HPLC-MS/MS-System arbeitet also reproduzierbar, benötigt jedoch eine gewisse Aufwärmphase. Diese kann durch den Bediener genutzt werden, die Tagesleistung des Gerätes mit der des Vortages zu vergleichen und somit eventuelle Fehler frühzeitig zu erkennen. Dazu empfiehlt sich die mehrfache Injektion einer identischen Lösung, deren Aliquote unter stabilen Lagerbedingungen aufbewahrt werden und somit auch nach Monaten einen Vergleich zulassen. Dieses Vorgehen wurde neben den Anwendungen in der Forschung auch bei dem ebenfalls durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten Medikamentenspiegelbestimmungen eingeführt, wo es sich als gutes Werkzeug zur Überwachung der Systemleistung bewährt hat. An dieser Stelle sollte für die Praxis folgendes bedacht werden: Wenn festgestellt wird, dass bei einer mehrfachen, direkt aufeinander folgenden Analyse einer identischen Probe die erste Injektion zu größeren Signalen führt, so ist häufig die Äquilibrierungsdauer am Ende des Gradienten zu kurz gewählt. Bei der ersten Injektion wurde zumeist das System deutlich länger mit den Startbedingungen äquilibriert, was dann zu den beobachte-

ten Unterschieden in der Chromatographie führt. Eine Verlängerung der Analysendauer ist unter diesen Umständen angebracht.

Im Zuge der Reproduzierbarkeitsüberprüfung (siehe Abschnitt 5.3.3) innerhalb eines Tages (Intra-Assay, $n = 10$) und an mehreren Tagen (Inter-Assay, $n = 5 * 5$) wurden die Variationskoeffizienten aller Analyte bei unterschiedlichen Konzentrationen berechnet. Das underivatisierte 3-Hydroxykynurenin besitzt innerhalb eines Analysetages bei der niedrigsten Konzentration den größten VK mit 11,9% ($n = 10$). 3-HK zeigt nach der Veresterung (3-HK-b) eine deutlich geringere Streuung. Die übrigen VKs sind alle kleiner als 10%. Die Abweichungen vom Sollwert betragen maximal 8,5%. Betrachtet man die Ergebnisse in einem Boxplot Diagramm (siehe Abbildung 5.6), so ist exemplarisch zu erkennen, dass für QuinaldA keine Ausreißer vorliegen. Innerhalb einer Aufarbeitung ist die Methode also reproduzierbar.

Die Auswertung mehrerer unabhängiger Probenvorbereitungen (Inter-Assay) zeigt, dass die underivatisierten Analyte 3-HK und 5-HIAA bei der niedrigsten Kontrolle die größten VKs mit 11,3% und 11,5% besitzen. Die übrigen VKs sind alle kleiner als 10%. Die Abweichungen vom Sollwert betragen maximal 8,3%. Werden die Messdaten als Boxplot dargestellt (siehe Abbildung 5.7), so sind für 5-HIAA zwei weiche Ausreißer zu erkennen. Mit der Methode von Perry und Keevil zur Analyse von 5-HIAA in Urin mittels LC-MS/MS wurden vergleichbare VKs von < 12% erzielt [189]. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass nur ein Analyt aus einer deutlich weniger komplexen Matrix als Serum bestimmt wurde. Underivatisiertes 3-HK zeigt, wie auch bei der Intra-Assay Reproduzierbarkeit, eine starke Streuung, welche sich durch die Derivatisierung verringert. Dass die Derivatisierung generell reproduzierbar ist, kann man an der Darstellung des derivatisierten Kynurenins (Kyn-b) erkennen. Hingegen besitzt 3-Hydroxyanthranilsäurebutylester (3-HAA-b) einige deutliche Ausreißer, weshalb die Analyse im derivatisierten Zustand nicht möglich ist. Ohashi et al. verwendeten für die Probenvorbereitung zur Bestimmung von Trp und Kyn aus Serum mittels LC-MS, ebenfalls eine Fällung mit anschließender Derivatisierung [190]. Sie verwendeten jedoch nicht Butanol, sondern R(-)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol, ein Reagenz, das ursprünglich zur Trennung chiraler Substanzen mit Fluoreszenzdetektion verwendet wurde [191, 192]. Es wurden nach der Derivatisierung VKs ($n = 4$) von 0,24% für L-Trp und 4,44% für L-Kyn erzielt. Für Kyn, bzw. L-Kyn, sind die Schwankungen mit der von uns entwickelten Methode vergleichbar.

Für die Auswertung von Studien und die Dateninterpretation müssen die ermittelten Schwankungen berücksichtigt werden. Um die Effekte möglichst gering zu halten, darf beispielsweise nicht an einem Tag die Patientengruppe und an einem anderen Tag die Kontrollgruppe analysiert werden. Es empfiehlt sich, dass Proben, deren Anzahl über ein Tagespensum hinausgehen, wie es z.B. bei klinischen Studien der Fall ist, vor der Probenaufarbeitung randomisiert werden. Somit unterliegen alle Gruppen den gleichen Schwankungen und das Ergebnis wird nicht verfälscht. Guillén-Casla et al. geben in ihrer Publikation aus dem Jahr 2012 VKs < 5,3% bei der Inter-Assay Untersuchung ($n = 3 * 5$) der Analyte 5-HT, 5-HTP und Trp an [193]. Jedoch ist zu beachten, dass diese Werte durch die Analyse identischer Standardlösungen ermittelt wurden. Sie beinhalten also keine aufarbeitungsbedingten Schwankungen, sondern geben nur Auskunft über die Schwankung der Systemleistung. Badawy und Morgan ermittelten über einen Zeitraum von vier Wochen die Schwankungen aus einer wässrigen Lösung [194]. Sie berechneten für die Substanzen Kyn, 3-HK, 3-HAA, KynA, Xan und AA VKs von maximal 7,7%. Auch diese Ergebnisse spiegeln nicht

die tatsächlichen Schwankungen durch individuelle Probenvorbereitungen wieder. Die in der Literatur angegebenen VKs müssen also kritisch hinterfragt werden und können nicht immer direkt verglichen werden.

Stabilität der Proben

Die Analysenmethode wurde im Hinblick auf klinische, teils multizentrische Studien entwickelt. In der Praxis ist hierbei nicht immer eine unverzügliche Verarbeitung und adäquate Lagerung der Proben möglich. Als Beispiel sei hier der unterschiedlich lang dauernde Transport zum jeweiligen analytischen Labor zu nennen. Daher muss festgestellt werden, über welchen Zeitraum die zu untersuchenden Substanzen unter bestimmten Bedingungen stabil sind. Hierzu wurde eine Stabilitätsuntersuchung (siehe Abschnitt 5.3.4) bei -20°C im Tiefkühler, bei 5-8°C im Kühlschrank und bei Raumtemperatur durchgeführt. Es zeigte sich, dass Serumproben bei -20°C mindestens vier Wochen gelagert werden können. Es wird vermutet, dass Proben unter diesen Lagerbedingungen noch deutlich länger stabil sind, jedoch wurde keine längere andauernde Studie durchgeführt. 3-HAA ist offensichtlich der limitierende Analyt bezüglich der Stabilität der Proben bei 5-8°C und bei Raumtemperatur. Im Kühlschrank können Serumproben maximal vier Tage und bei Raumtemperatur maximal zwei Tage ohne nennenswerten Abbau der Analyte gelagert werden. Die Serumproben können mindestens fünfmal eingefroren und aufgetaut werden. Wenn man die maximalen Lagerzeiten bei Raumtemperatur genauer betrachtet, so stellt man teilweise Unterschiede zwischen der derivatisierten und underivatisierten Analyse fest (3-HAA, Trp, Xan). Da es sich jedoch um identische Proben handelt, wird vermutet, dass es durch die Lagerung bei Raumtemperatur zu einer Veränderung der Matrix kommt, wodurch die Derivatisierung beeinflusst wird. Die Messergebnisse nach einer Veresterung zeigen, dass 3-HAA einen Tag länger bei Raumtemperatur gelagert werden kann. Die Analyse von 3-HAA-butylester kann jedoch aufgrund der starken Schwankungen nicht verlässlich durchgeführt werden (siehe Abschnitt 5.3.3). Da die Proben aus klinischen Studien oder anderen Experimenten normalerweise bei -80°C gelagert werden und erst am Tage der Probenvorbereitung aufgetaut und sofort aufgearbeitet werden, kann man davon ausgehen, dass ein Substanzabbau im Serum ausgeschlossen werden kann.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung der aufgearbeiteten Serumproben (siehe Abschnitt 5.3.5), so wird beobachtet, dass bei -20°C alle Analyte für mindestens drei Wochen stabil sind. Auch können die aufgearbeiteten Proben mindestens fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut werden, ohne dass es zu einem Analytverlust kommt. Jedoch können im Kühlschrank und im gekühlten Probengeber die aufgearbeiteten Proben maximal einen Tag gelagert werden, da zu einem späteren Zeitpunkt der Abbau von 3-HAA, 5-HIAA und 3-HK zu groß ist. In einer vergleichbaren Untersuchung wurde gezeigt, dass Pic innerhalb von 24 Stunden um ca. 25% abgebaut wird [178]. Dieses Ergebnis konnte durch unsere Untersuchung nicht bestätigt werden. Die aufgearbeiteten Proben können nicht bei Raumtemperatur gelagert werden, da mehrere Analyte nur für wenige Stunden stabil sind. Sollte es also zu einem technischen Problem im Zuge der Analyse kommen, welches zu einem vorzeitigen Abbruch der Sequenz führt, so kann innerhalb von 24 Stunden die Analyse wiederholt werden. Auch muss aus Gründen der Stabilität zwingend darauf geachtet werden, dass der automatische Probengeber ausreichend gekühlt wird.

Die internen Standards Picolinsäure-d4 (Pic-d4) und Kynureninsäure-d5 (KynA-d5) sind bei -20°C für

mindestens drei Wochen, im Kühlschrank und bei Raumtemperatur für mindestens eine Woche stabil. Trp-d5 ist ebenfalls bei -20°C für mindestens drei Wochen und im Kühlschrank für mindestens eine Woche stabil, wird jedoch bei Raumtemperatur nach vier Tagen deutlich abgebaut. Es sollte also die interne Standardlösung vorbereitet, aliquotiert und bei -20°C gelagert werden. Ein Aliquot kann anschließend für eine Woche im Kühlschrank gelagert werden.

Bei den in der Literatur beschriebenen Methoden fällt häufig eine Stabilitätsuntersuchung sehr einfach aus. So wurde in der Arbeit von Monaghan et al. lediglich die Stabilität der aufgearbeiteten Proben untersucht [195]. Dabei wurde durch die Arbeitsgruppe festgestellt, dass 5-HT in aufgearbeiteten Serumproben für mindestens 48 Stunden bei Raumtemperatur stabil ist. Auch Perry und Keevil untersuchten bei ihrer Methodenvalidierung die Stabilität von 5-HIAA nur in aufgearbeiteten Proben [189]. Sie stellten eine Stabilität von mindestens 24 Stunden fest, geben jedoch nicht die Temperatur an. Für Kyn, 3-HK, 3-HAA, KynA, Xan und AA wurde eine Stabilität von vier Wochen nach einer Perchlorsäurefällung bei -24°C ermittelt [194]. Diese in der Literatur aufgeführten Ergebnisse entsprechen nicht den Ansprüchen einer soliden Validierung. Gerade die Untersuchung der Stabilität ist bei biologischen Substanzen von entscheidender Bedeutung und geben Auskunft über die Verlässlichkeit analytischer Ergebnisse. Durch eine unzureichende Stabilitätsuntersuchung besteht für jede analytische Methode die Gefahr, dass falsche Werte generiert werden und die Interpretation der Ergebnisse zu einer falschen Schlussfolgerungen führt.

Analytische Grenzwerte

Bei einer linearen analytischen Messmethode wird die Konzentration c indirekt über eine Ersatzgröße Y bestimmt [196]. Diese Ersatzgröße kann beispielsweise eine Spannung sein. Y und c stehen gemäß der Formel in Abbildung 6.2 in einem Zusammenhang. Y kann durch den jeweiligen Detektor gemessen und c , nach einer Kalibrierung, berechnet werden.

$$Y = f(c, w) * \epsilon$$

Abbildung 6.2: Zusammenhang zwischen Konzentration und Ersatzgröße.

Y : Ersatzgröße, c : Konzentration, w : weitere Größe, ϵ : Störgröße

Dies bedeutet, dass Y als Funktion von c , eventuell einer weiteren Größe w und einer Störgröße ϵ betrachtet wird. Während c als exakter Wert vorliegt, muss Y jedoch, bedingt durch stochastisch wirkende Nebenfaktoren, als Zufallsgröße aufgefasst werden. Aufgrund dieser teils technisch bedingten Unsicherheiten, müssen im Zuge einer Validierung eindeutige Grenzen festgelegt werden, innerhalb derer ein statistisch aussagekräftiger Rückschluss auf die Konzentration zugelassen werden kann. Dazu versteht man unter der Nachweisgrenze (NG) die kleinste Substanzkonzentration, die mit einer definierten statistischen Aussagewahrscheinlichkeit durch eine einmalige Messung qualitativ nachgewiesen werden kann und sich signifikant von der Konzentration Null unterscheidet [197]. Die Bestimmungsgrenze (BG) ist hingegen die kleinste Konzentration, bei welcher die zu analysierende Substanz mit einer definierten statistischen Aussagewahrscheinlichkeit durch eine einmalige Messung quantifiziert werden kann. Die NG kann über das Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) oder gemäß DIN 32645 [182, 183, 198] nach dem Leerwert- oder

dem Kalibrierkurvenverfahren erfolgen. Teilweise wird in der Literatur die Erfassungsgrenze (EG) gleich der BG gesetzt [197]. Jedoch ist die EG in etwa doppelt so hoch wie die NG, da hier die Substanz mit einer höheren statistischen Wahrscheinlichkeit berechnet wird. Gemäß der DIN 32645 darf nur die Erfassungsgrenze als Qualitätsgarantie für den Höchstgehalt eines Bestandteils im untersuchten Stoff herangezogen werden.

Im Abschnitt 5.3.7 wurde beschrieben, wie die NG, die EG und die BG gemäß DIN 320645 gemäß der Formel in Abbildung 6.3 ermittelt wurden [182, 183]:

$$X_{NG} = s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{X_M^2}{Q_X}}$$

$$X_{BG} = k * s_{x_0} * t_{f,\alpha} * \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(X_{BG} - X_M)^2}{Q_X}}$$

Abbildung 6.3: Formeln zur Bestimmung der Nachweigrenze (NG) und der Bestimmungsgrenze (BG) nach DIN 320645. k: relative Ergebnisunsicherheit, s_{x_0} : Verfahrensstandardabweichung, $t_{f,\alpha}$: Quantil der t-Verteilung, m: Anzahl der Messungen, n: Anzahl der Kalibrationspunkte, X: Konzentration X, X_M : Mittelwert der Kalibratorkonzentration, Q_X : Summe der Abweichungsquadrate.

Betrachtet man die in Abbildung 6.3 dargestellten Formeln, so stellt man fest, dass die ermittelten Werte umso kleiner werden, je größer die Anzahl der Messungen (m) und die Anzahl der Kalibrationspunkte (N) sind. Ebenso hat der Mittelwert der Kalibratorkonzentration (X_M) einen Einfluss auf NG und BG. Je niedriger X_M ist, desto niedriger ist also auch NG. Ebel und Kamm [197] zeigen sehr deutlich, dass eine Erhöhung der Kalibrationspunkte zu einer deutlich niedrigeren BG führt, jedoch ab einer Anzahl von $n > 10$ kaum mehr ein positiver Effekt zu beobachten ist. Da es sich bei den Kynureninen jedoch um endogene Substanzen handelt, können die Kalibrationspunkte nicht beliebig klein gewählt werden, sondern sind durch das Versetzen der Seren mit zusätzlichen Mengen an Analyt immer größer als die nativen Konzentrationen. Somit können auf diese Weise keine wirklich aussagekräftigen Daten gewonnen werden, es sei denn, man würde auf die native Matrix verzichten, was jedoch dem Grundgedanken einer analytischen Validierung widerspräche. Eine alternative Methode zur Bestimmung der NG und BG bezieht sich auf das Verhältnis von Signal zu Rauschen (S/N), wie es z.B. in den Methodenvalidierungen von Möller et. al [178], oder Zagajewski et. al. [43] praktiziert wurde. Bei diesem Verfahren wird häufig definiert, dass die NG oder BG nicht unterschritten wurden, solange S/N größer 3 bzw. 10 ist. Die Berechnung von S/N hängt jedoch von der verwendeten Software bzw. dem auswertenden Analytiker ab. Dabei muss festgelegt werden, was als Rauschen definiert wird und mit welchem Algorithmus S/N berechnet wird. Beispielsweise kann der maximale Wert des Rauschens, oder ein Durchschnittswert zur Berechnung herangezogen werden. Auch können in modernen MS-Methoden Retentionszeitfenster definiert werden. Dadurch kann nur ein sehr kleiner Zeitraum vor und nach dem Peak ausgewertet werden, was ebenfalls kein repräsentatives Ergebnis für das Rauschen zulässt. Es handelt sich also bei einer Auswertung nach

dieser Methode immer um subjektive und nicht um objektive Werte. Zuvor wurde erwähnt, dass die NG und die BG gemäß DIN 32645 [182, 183, 198] auch nach dem Leerwertverfahren erfolgen kann. Dies ist jedoch bei endogenen Substanzen nicht möglich, da es keine analytfreie Matrix gibt. Die S/N-Methode ist sehr gut für die Auswertung von UV-Chromatogrammen geeignet, da hier sowohl das Signal (Peakhöhe), als auch das Rauschen (beispielsweise mittlere Peakhöhen + deren Standardabweichung), definiert werden können. Die Auswertung nach DIN 320645 ist sehr gut für exogene Substanzen geeignet, da hier eine beliebige Anzahl von Kalibrationspunkten mit relevanten Konzentrationen verwendet werden können. Für eine MS/MS-Methode endogener Substanzen kann wiederum das Rauschen nicht eindeutig definiert werden, da im Idealfall nur der Analyt detektiert wird, bzw. zeitliche Messfenster so eng gesetzt wurden, dass ein Rauschen zwar vorhanden ist, aber nicht aufgezeichnet wird. Aufgrund dieser Überlegungen werden die BGs und NGs somit niedriger als die in Tabelle 5.18 angegebenen Konzentrationen vermutet.

Die auf diese Weise berechneten NGs und BGs sind sehr hoch und erfüllen die Anforderungen an eine sensitive Nachweismethode nicht. Die BG für Kyn liegt beispielsweise bei 77,7 ng/mL. In der Literatur ist für Kyn z.B. eine BG von 11,6 ng/mL mittels HPLC-UV angegeben [121]. Jedoch ist die in dieser Literaturstelle angegebene BG für KynA mit 243 ng/mL deutlich höher als die in im Zuge der Validierung ermittelte BG von 5,6 ng/mL. Winkler et al. geben in der Literatur die NG von 3-HK mit 11 ng/mL an [199]. Mit der von uns entwickelten und validierten Methode kann sowohl derivatisiert, als auch underivatisiert um den Faktor zehn sensitiver gemessen werden. Aus der Arbeitsgruppe von Robert Schwarcz stammt eine Publikation, die für Kyn eine Bestimmungsgrenze (ohne Angabe der Matrix) von 300 picomol angibt. Dies entspricht einer Konzentration von weniger als 0,1 ng/mL [200]. Die Bestimmungsgrenze wurde in diesem Fall durch den untersten Punkt definiert, bis zu welchem die Methode linear misst.

Die von uns ermittelte NG von 5-HT lag bei 30 ng/mL. Da Serotonin im nativen Serum relativ hoch konzentriert ist, verwundert diese hohe NG, aus oben genannten Gründen nicht. Monaghan et al. erzielten mit ihrer LC-MS/MS-Methode für 5-HT in Plasma eine NG von 0,9 ng/mL [195]. Sie definierten die NG als die kleinste Konzentration, bei welcher der VK ($n = 10$) $< 20\%$ ist. Perry und Keevil ermittelten mit der S/N-Methode die NG ($S/N > 3$) von 5-HIAA in Urin mittels LC-MS/MS mit 535 ng/mL und damit um den Faktor 167 höher als in der von uns beschriebenen Methode [189]. Für die Analyte Kyn, 3-HK, 3-HAA, KynA, Xan und AA ermittelten Badawy und Morgan NGs zwischen 1,0 und 10,0 ng/mL aus wässrigen Standardlösungen mittels HPLC-UV/FLD [194]. Es wurde als Kriterium $S/N > 5$ definiert. Möller et al. geben für ihre LC-MS/MS-Methode nach Probenvorbereitung mittels SPE die NGs zwischen 3,2 ng/mL für AA und 124 ng/mL für Pic an [178]. Auch diese Arbeitsgruppe definierte die NG mit $S/N > 3$. Die Ergebnisse liegen in einer vergleichbaren Größenordnung wie die von uns ermittelten NGs. Ebenfalls mit der S/N-Methode bestimmten Guillén-Casla et al. die NG von 5-HTP und Trp in Schokolade mit 0,01 µg/g und 0,12 µg/g [193]. Zwar ist diese Matrix gänzlich anders und der Einsatzbereich nicht vergleichbar, aber die Probe ist ähnlich komplex. Zu beachten ist dabei, dass in der erwähnten Publikation für unterschiedliche Schokoladesorten unterschiedliche NGs bestimmt wurden. Überträgt man dieses Ergebnis auf die Analyse von Serumproben, so sollte immer die für die Methoden relevanten Matrices untersucht werden. Ganz ohne Angabe der Methode wurden in der Publikation von Ohashi die NGs von Trp und Kyn mit 30 ng/mL und 104 ng/mL aufgeführt [190]. Diese Werte sind deshalb von Interesse, da die Quantifizierung der Analyte mittels LC-MS nach einer Derivatierung mit R(-)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazol erfolgte. Für Kyn lag

die von uns ermittelte NG mit 9,6 ng/mL nach der Derivatisierung deutlich niedriger. Für Trp jedoch mit 793 ng/mL deutlich höher. Diese hohe NG ist jedoch für die Praxis irrelevant, da die physiologischen Konzentrationen der Aminosäure Trp deutlich höher liegen.

Diese Beispiele zeigen deutlich, wie gewissenhaft analytische Grenzwerte ermittelt, interpretiert und verglichen werden müssen. Da die verwendeten Methoden zur Bestimmung der BG und NG in der Literatur nicht konsistent sind, muss eine reine Zahlenangabe immer unter Vorbehalt betrachtet werden.

Methodenvergleich

Der Methodenvergleich (siehe Abschnitt 5.3.8) mit 30 unterschiedlichen Proben wurde für die Analyte 5-HIAA, 5-HT, Kyn, KynA, Trp und 3-HK zwischen HPLC und HPLC-MS/MS durchgeführt. Es wurde die parametrische Korrelation nach Pearson ermittelt, da es sich bei den Messwerten um verhältnisskalierte, normalverteilte Daten handelt [201]. Es zeigt sich, dass für alle Substanzen die Korrelation auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant ist.

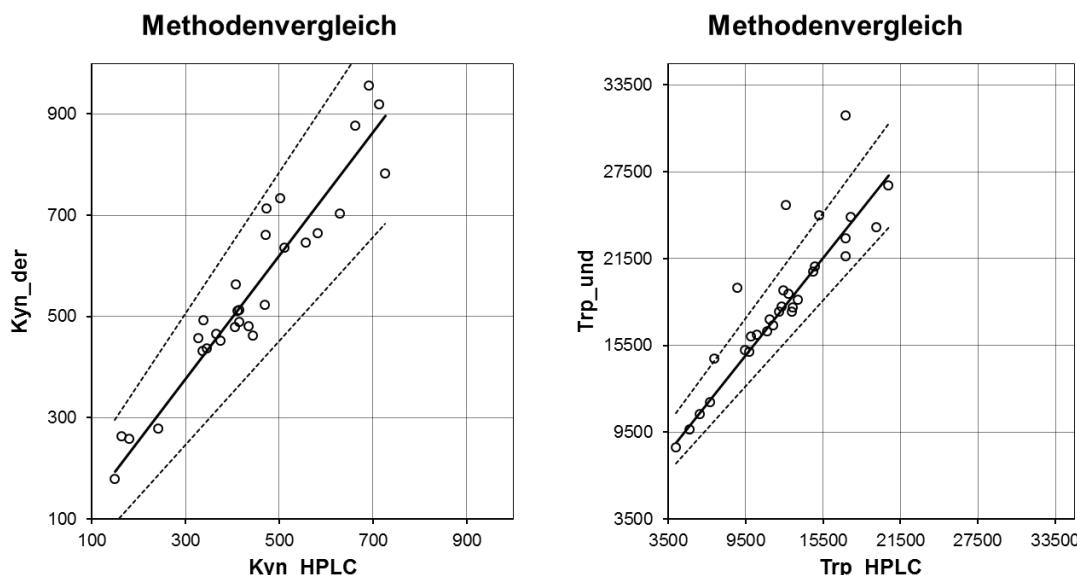


Abbildung 6.4: Methodenvergleich nach Passing-Bablok. Auf den X- und Y-Achsen sind jeweils die gemessenen Konzentrationen in ng/mL dargestellt. Bei Kynurenin (linke Grafik) wird der Ursprung durch das 95% Vertrauensintervall umschlossen, die Steigung liegt nahe bei eins. Beim Vergleich von Trp (rechte Grafik) wird der Ursprung nicht durch das 95% Vertrauensintervall umschlossen, die Steigung liegt nahe bei eins.
 Suffix *_der*: derivatisierte MS/MS Messung, Suffix *_und*: underivatisierte MS/MS Messung, Suffix *_HPLC*: Messung mittels HPLC.

Nachdem für die entsprechenden Wertepaare eine Passing-Bablok Regressionsgerade erstellt wurde, konnte man folgendes feststellen: Die Messergebnisse von Kynurenin sind sowohl underivatisiert, als auch derivatisiert mit denen der HPLC-Methode vergleichbar (siehe Abbildung 6.4). Die Messung von 3-HK ist derivatisiert mit der HPLC-Methode vergleichbar, wohingegen underivatisiert ein deutlicher Unterschied

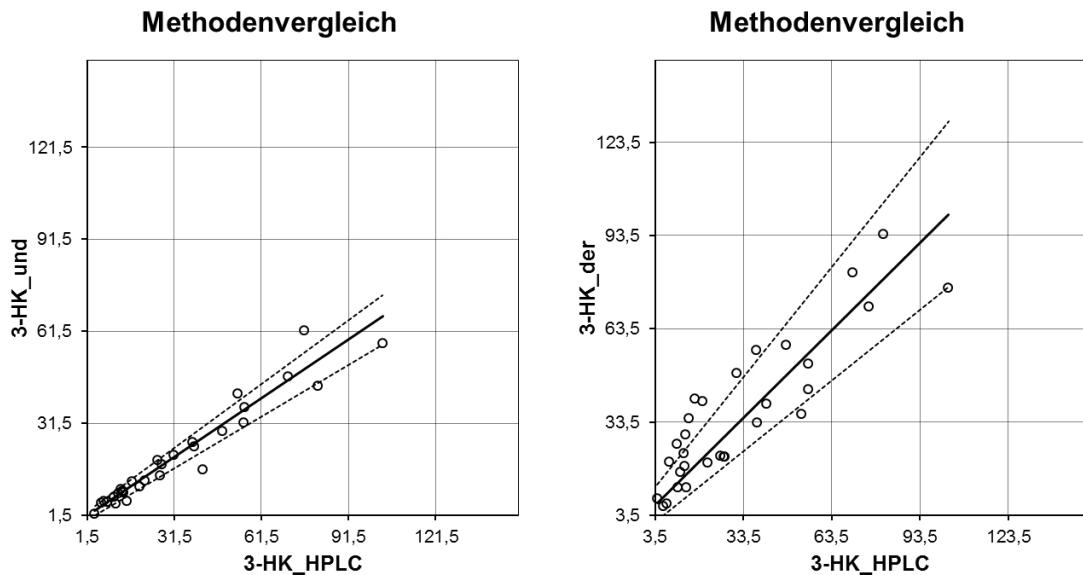


Abbildung 6.5: Methodenvergleich nach Passing-Bablok. Auf den X- und Y-Achsen sind jeweils die gemessenen Konzentrationen in ng/mL dargestellt. 3-HK kann underivatisiert (linke Grafik) nicht mit der HPLC-Methode verglichen werden, da die Steigung deutlich kleiner als eins ist. Nach der Derivatisierung (rechte Grafik) beträgt die Steigung annähernd eins; die Ergebnisse sind vergleichbar.

Suffix *_der*: derivatisierte MS/MS Messung, Suffix *_und*: underivatisierte MS/MS Messung, Suffix *_HPLC*: Messung mittels HPLC.

besteht (siehe Abbildung 6.5). Für die Substanzen Trp (siehe Abbildung 6.4), 5-HIAA und 5-HT hingegen zeigen die Passing-Bablok Regressionsgeraden einen deutlichen Achsenabschnitt, der vermuten lässt, dass in einer von beiden Methoden der Blindwert nicht korrekt ermittelt wurde, oder bei der HPLC-Analyse das Signal durch eine konstante Störgröße überlagert ist. Letzteres ist vor allem bei der Analyse von 5-HIAA und 5-HT häufig beobachtet worden. KynA zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden MS-Methoden und der HPLC-Methode. Die Steigungen sind jeweils größer 2,7, was bedeutet, dass entweder die Kalibratoren für die HPLC zu hoch oder die Kalibratoren für die HPLC-MS/MS zu niedrig sind. Eine dritte Möglichkeit ist, dass die HPLC-Signale durch eine Überlagerung gestört sind. Diese Überlagerung kann jedoch nicht konstant sein, da sonst die Steigungen gleich eins und die Ordinaten deutlich größer wären. Infrage käme also nur eine koelzierende Substanz, welche als Kontamination in einer der verwendeten Stammlösungen für die Herstellung der HPLC-Spikelösungen vorliegt. Bei der Überprüfung der Einwaagen und Herstellungsprotokolle für die HPLC-MS/MS-Kalibratoren konnte kein Fehler festgestellt werden. Die Richtigkeit der HPLC-MS/MS-Kalibratoren wurde durch Kontrollen, welche an einem anderen Tag hergestellt wurden, betätigt, weshalb vermutet wird, dass die HPLC-Kalibratoren zu hoch sind.

Wiederfindung und aufarbeitungsbedingte Verluste

Zur Bestimmung der aufarbeitungsbedingten Verluste wurden zwei Probensets verglichen (siehe Abschnitt 5.3.9). Set A bestand aus Seren, welche mit Analyten versetzt und aufgearbeitet wurden. Set B bestand

hingegen aus Seren, die aufgearbeitet und anschließend mit Analyten versetzt wurden. Mittels SPSS wurde für jeden Analyt ein Students t-Test durchgeführt und überprüft, ob der Unterschied zwischen den beiden Probensets signifikant ist. Die Unterschiede der beiden Sets sind ein Maß für die aufarbeitungsbedingten Verluste, ähnlich der von Matuszewski [202] oder Buhrman [203] vorgestellten Methoden. Im Unterschied zu Matuszewskis wird jedoch nicht die Wiederfindung, sondern der Verlust angegeben (So entspricht z.B. eine Wiederfindung von 95% einem Verlust von -5%, siehe Abbildung 6.6).

$$\text{Aufarbeitungsbedingte Verluste (\%)} = \frac{\text{Mittelwert Set A} - \text{Mittelwert Set B}}{\text{Mittelwert Set B}} * 100$$

$$\text{Wiederfindung (\%)} = \frac{\text{Mittelwert Set A}}{\text{Mittelwert Set B}} * 100$$

Abbildung 6.6: Die obere Formel zeigt die Berechnung der aufarbeitungsbedingten Verluste. Hierbei können negative und positive Werte entstehen. Die untere Formel zeigt die Berechnung der Wiederfindung nach Matuszewski. Set A: gespiktes und aufgearbeitetes Serum. Set B: aufgearbeitetes Serum, anschließend gespiked.

Dabei kann es auch zu einem scheinbaren Anstieg kommen, wenn der interne Standard einem Verlust unterliegt und der Quotient aus Analyt und internem Standard für Set A größer ist als der für Set B. Auch unterliegen Messungen und Probenvorbereitungen gewissen Schwankungen, die zu vernachlässigbar kleinen Unterschieden zwischen den beiden Sets führen können. Eine weitere Ursache kann in einem Löslichkeitsproblem bei der Herstellung von Set B liegen. Dies könnte beispielsweise der Fall sein, wenn etwaige Proteine, die als Lösungsvermittler dienten, nach der Fällung fehlen.

Die Auswertung der aufarbeitungsbedingten Verluste gestaltet sich als schwierig. Werden in Excel aus den Mittelwerten die Verluste berechnet, so erhält man Werte zwischen -7,5% für Picolinsäurebutylester (Pic-b) und +25,5% für 3-HAA. Für AA, 3-HK, KynA, Trp, Xan, QuinaldA, Kyn, 5-HIAA und 5-HTP, Quin und Pic wurde festgestellt, dass die Verluste vernachlässigbar klein sind. Für die Analyte 5-HT, 5-HTP und Trp geben Guillén-Casla et al. Wiederfindungen zwischen 76% und 98% an [193]. Dabei verwendet die Arbeitsgruppe eine HPLC-Methode mit UV- und Fluoreszenzdetektion. Die von uns erzielten Wiederfindungen sind für Trp und 5-HTP vergleichbar gut oder besser.

Jedoch zeigt 5-HT einen hochsignifikanten Anstieg von 11,1%. Betrachtet man nun die Rohdaten erneut, so wird festgestellt, dass Serotonin einem Signalverlust unterliegt, wenn die mittleren Signalintensitäten der beiden Sets verglichen werden. Der zur Auswertung herangezogene interne Standard KynA-d4 unterliegt ebenfalls einem Signalverlust, der deutlich stärker ist, wodurch es bei der Berechnung des aufarbeitungsbedingten Verlustes zu einem scheinbaren Anstieg kommt. Bei einer erneuten Berechnung der aufarbeitungsbedingten Verluste unter Zuhilfenahme von Trp-d5 beträgt der Anstieg nur noch 5,5% und ist dabei nicht signifikant. Bei der LC-MS/MS-Analyse von 5-HT mit einem deuterierten internen Standard konnten Monaghan und Kollegen eine Wiederfindung von 98% erzielen [195]. Der interne Standard KynA-d5 sollte also durch deuteriertes Serotonin ersetzt werden, wenn ein Bedarf an der quantitativen Bestimmung besteht. Dies ist jedoch für die derzeitigen Forschungsziele der Arbeitsgruppe

nicht relevant, da peripheres 5-HT hauptsächlich von den enterochromaffinen Zellen und zusätzlich von den Thrombozyten freigesetzt wird und daher nicht repräsentativ für die Konzentration im zentralem Nervensystem ist. 3-Hydroxyanthranilsäure unterliegt derivatisiert einem signifikanten Verlust von -5,0%. Underivatisiert beträgt der Unterschied jedoch 25,5% und ist dabei hochsignifikant. Vorherige Versuche zur Reproduzierbarkeit (siehe Abschnitt 5.3.3) zeigten jedoch, dass 3-HAA nicht derivatisiert gemessen werden kann. Eine alternative Betrachtung der Rohdaten zeigt, dass 3-HAA underivatisiert ohne internen Standard, also nur über die Flächen ausgewertet, lediglich einen nicht signifikanten Verlust von 2,7% zeigt. Die Substanz Trp-d5 ist demnach nicht als interner Standard geeignet. Es sollte auch hier 3-HAA in einer deuterierten Form verwendet werden. Dass es durch den Einsatz nicht idealer interner Standards zu Wiederfindungen größer 100% kommen kann, ist auch in anderen Arbeiten zu beobachten. Feng et al. verwendeten beispielsweise in ihrer Methode 3-Nitro-Tyrosin als internen Standard und erzielten Wiederfindungen bis 114% [121]. Auch Badawy und Morgan erzielten durch eine Fällung mittels Perchlorsäure für die Substanzen Kyn, 3-HK, 3-HAA, KynA, Xan und AA Wiederfindungen zwischen 62,3% und 111% [194]. Der scheinbare Substanzgewinn kann auch hier durch einen Substanzverlust beim internen Standard erklärt werden. Möller et al. konnten mittels SPE und anschließender LC-MS/MS-Analyse für die Substanzen Trp, Kyn, KynA, AA, 3-HAA und Quin Wiederfindungen zwischen 95% und 100% erzielen [178]. Jedoch zeigte ihre Methode für Pic Wiederfindungen von 37%. Zum einen unterliegt Pic in der SPE Probenvorbereitung deutlich stärkeren Verlusten, als bei der Fällung, zum anderen ist der verwendete interne Standard Ethyl-4-hydroxy-2-chinolincarboxylat wesentlich schlechter zur Quantifizierung von Pic geeignet, als die von uns verwendete deuterierte Pic.

Matrixeffekt

Eine LC-MS/MS-Methode sollte auch immer auf eventuelle Matrixeffekte hin untersucht werden. Unter Matrixeffekten versteht man unerwünschte Effekte von nicht zu analysierenden Substanzen, die zu einer Veränderung der Signalintensität führen. Der häufigste Effekt ist die sogenannte Ionensuppression, wobei koelzierende Substanzen die Ionisation des Analyten unterdrücken und somit zu einem Signaleinbruch führen. Zur Berechnung des jeweiligen Matrixeffekts würde ein Set C benötigt werden, welches aus mobiler Phase besteht und identische Konzentrationen an Analyten und internen Standards besitzt wie Set B. Dies ist sehr einfach bei exogenen Substanzen, wie beispielsweise Medikamenten, möglich [204]. Für endogene Substanzen müsste die exakte native Konzentration im Serum bekannt sein, die Methode sehr niedrige Schwankungen in diesem Bereich aufweisen und alle Substanzen gut in einem wässrigen Milieu löslich sein. Vor allem aufgrund des letzten Punktes war es nicht möglich, diesen Versuchsteil befriedigend durchzuführen. Eine alternative Methode zur Bestimmung des Matrixeffekts ist das sogenannte "Postcolumn Infusion Experiment", wie es z.B von Perry und Keevil [189] durchgeführt wurde. Dabei wird eine analytfreie Probe aufgearbeitet und analysiert. Gleichzeitig wird durch eine Spritzenpumpe nach der Säule eine konstante Konzentration des zu untersuchenden Analyten zugeführt. Wird die Ionisation nicht gestört, so ist ein konstantes Signal zu detektieren. Kommt es jedoch durch koelzierende Stoffe, wie beispielsweise Peptide oder Lipide, zu einer Ionensuppression, so wird zu diesem Zeitpunkt ein niedrigeres Signal detektiert. Solange also zur relevanten Retentionszeit keine Veränderungen der Signalintensität zu beobachten ist, kann bei dieser Methode davon ausgegangen werden, dass kein Matrixeffekt vorliegt.

Bei der Analyse von endogenen Substanzen ist dies jedoch nicht möglich, da in der aufgearbeiteten Probe immer der zu untersuchende Analyt enthalten ist. Ein Signaleinbruch ist deshalb nicht zu erkennen, sondern nur der jeweilige, erwünschte Anstieg.

6.4 Präanalytische Einflüsse

Freie und proteingebundene Kynurenine

Als Anwendung für diese Methode ist die Analyse klinischer oder biologischer Proben geplant. Daher war es von entscheidender Bedeutung die präanalytischen Einflussfaktoren zu untersuchen. Die Aminosäure Tryptophan konkurriert mit den Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Valin (Val) und Isoleucin (Ile) um den Transport über die Blut-Hirn-Schranke (BBB). Dabei ist es von entscheidender Bedeutung, dass nur die freien, nicht proteingebundenen Aminosäuren die BBB passieren können. Demzufolge sind sowohl eine geringe Konzentration konkurrierender Aminosäuren am Transporter, als auch ein hoher Anteil an freiem Trp, Voraussetzung für einen ausreichend hohen Trp Transport über die BBB. Bei depressiven Patienten wurde wiederholt ein verringertes Verhältnis von Trp gegenüber den konkurrierenden Aminosäuren festgestellt [205, 206].

Durch die akute Tryptophan Depletion (ATD) kann ein Mangel an Trp im Gehirn herbeigeführt werden, indem zum einen die Trp-Konzentration durch eine Diät möglichst gering gehalten wird, und zum anderen der Transport durch die BBB durch die Verabreichung einer hohen Dosis konkurrierender Aminosäuren unterdrückt wird. Ein weiterer Effekt ist die Induktion der Proteinsynthese durch die Zufuhr aller anderen Aminosäuren und damit die Konsumierung des verbliebenen Trp. Durch die ATD kommt es somit zu reduzierten Trp Spiegeln im Gehirn und einer reduzierten Neusynthese von 5-HT [207, 208, 209]. Im Zuge dieses Experiments wurden die Konzentrationen an freiem Trp im Blut bestimmt, um Rückschlüsse auf den Übertritt an der BBB zu erhalten. Auch in anderen Bereichen kommt eine Unterscheidung zwischen freien und gebundenen Analyten zum Einsatz. So unterschieden Johnsen et al. beispielsweise zwischen freier und gesamter Menge an 25-Hydroxyvitamin D [210]. Sie untersuchten dabei die "freie-Hormon-Hypothese", die besagt, dass nur die nicht gebundenen Hormone biologisch aktiv sind. Im Zuge unserer Experimente wurde deshalb getestet, ob generell eine Unterscheidung zwischen gesamter und freier, das heißt nicht proteingebundener Konzentration an Analyten des Kynurenin Pathways möglich ist. Diese Untersuchung für den gesamten KP ist bisher noch nicht in der Literatur beschrieben worden.

Plasmaproteine bestehen zu ca. 60% aus Albuminen und zu ca. 40% aus Globulinen [211]. Trp ist die einzige Aminosäure, die an Albumin bindet. Insgesamt sind etwa 90% des Trp an Albumin gebunden [212]. Der Einsatz von 10 kDa Filtern wird in der Literatur als gängige Methode zum Deproteinieren beschrieben. Hijikata [213] und Jagannathan [214] distinguierten mittels diesem Filter zwischen freiem und proteingebundenem Tryptophan. Zwar werden nicht alle Proteine durch diese Methode entfernt, jedoch können die ca. 67 kDa schweren Albumine und die 67 kDa bis 1,3 MDa schweren Globuline mit hoher Wahrscheinlichkeit die Filtermembran nicht passieren. Deshalb ist die Filtration ein adäquates Mittel um für die Analyse zwischen freien und proteingebundenen Analyten zu unterscheiden.

Als zweites wurde der Einfluss der Nahrungsaufnahme auf diese beiden Konzentrationsangaben hin überprüft. Da Trp eine essentielle, proteinogene Aminosäure ist, wird sie durch proteinreiche Nahrung

aufgenommen und im menschlichen Körper freigesetzt. Jedoch schwankt die Trp-Konzentration zwischen unterschiedlichen Lebensmitteln erheblich. Beispielsweise besitzt Ananas keinerlei Trp, eine Banana ca. 18 mg/100 g, ein Hühnerei 230 mg/100 g, Fleisch und Fisch ca. 250 mg/100 g. Über 400 mg/100 g Trp beinhalten Sojabohnen, Cashewnüsse und Hartkäse [215]. Aber auch die 5-HT-Konzentration schwankt deutlich zwischen den einzelnen Lebensmitteln. So besitzt eine Tomate 1,2 mg/100 g und eine Banane 7,7 mg/100 g. Neben der Aufnahme von Aminosäuren und Proteinen üben auch Kohlenhydrate einen Einfluss auf die Trp Menge im Blut aus. Nach der Aufnahme von Kohlenhydraten steigt der Blutzuckerspiegel an und stimuliert unter anderem das Pankreas Insulin freizusetzen. Durch die Insulinausschüttung wird die Blutzuckerkonzentration geregelt und als Begleiterscheinung steigt die Trp-Konzentration im Blut an, wohingegen die Konzentration der meisten anderen Aminosäuren absinkt [216]. Somit beeinflusst die Art der Ernährung stark die aufgenommene Menge der Aminosäuren und letztlich die Trp-Konzentration im Blut. Für einen ersten Versuch wurden daher die Seren von sechs Probanden nüchtern (präprandial) und nach Nahrungsaufnahme (postprandial) untersucht. Die Probanden wählten dabei ihr Essen frei. Die Gesamtkonzentrationen der Analyte wurde wie unter 5.2 beschrieben bestimmt. Zur Quantifizierung der freien Analyte wurden vor der Probenaufarbeitung die Proteine durch einen 10 kDa Zentrifugenfilter aus dem Serum entfernt.

Im Zuge der Auswertung wurde durch einen Student t-Test festgestellt, dass präprandial für alle Analyte ein signifikanter Unterschied zwischen freien und proteingebundenen Analyten besteht ($p < 0,05$). Postprandial konnte für QuinaldA und 5-HTP kein signifikanter Unterschied mehr festgestellt werden. In einer zweiten Auswertung wurde mit der Korrelation nach Pearson bestimmt, ob die freie und die gesamte Konzentration korrelieren. Dabei ergab sich ein heterogenes Bild. Nur für die Substanzen 3-HAA, 3-HK, 5-HT und Kyn existiert eine Korrelation zwischen freier und gesamter Analytkonzentration, sowohl präprandial als auch postprandial. Für die übrigen Analyte existiert diese Korrelation nicht, oder wird durch die Nahrungsaufnahme verändert.

Durch den Einsatz eines 10 kDa Zentrifugenfilters kann also zwischen freien und proteingebundenen Analyten des KP distinguiert werden und durch Nahrungsaufnahme werden die Analytkonzentrationen wie erwartet verändert. Wenn durch die Fragestellung also eine Quantifizierung der freien Analyte des KP gefordert wird, ist dies folglich möglich. Da es durch die Nahrungsaufnahme zu Änderungen der Konzentrationen einzelner Metabolite des KP kommt, wurde beschlossen, dass der Einfluss der Nahrungsaufnahme genauer untersucht werden muss.

Einfluss von Nahrungsaufnahme

In dem Experiment zur Unterscheidung von freien und proteingebundenen Substanzen des Kynurenin Pathways wurde festgestellt, dass die Nahrungsaufnahme einen deutlichen Einfluss auf die Konzentration der Analyte besitzt. Sowohl die Gesamtkonzentration, als auch der Anteil der freien Analyte ändert sich dadurch. Diese Effekte der Nahrungsaufnahme wurden deshalb näher untersucht (siehe Abschnitt 5.4.3). Dazu wurde zwei über Nacht nüchternen Probanden präprandial und 30 Minuten, 60 Minuten und 135 Minuten nach Aufnahme einer tryptophanreichen Kost Blut abgenommen und dieses untersucht. Es wurde zu jedem Zeitpunkt zwischen der Gesamtmenge und der freien Fraktion unterschieden. Zur Auswertung wurde die jeweilige präprandiale Konzentration als eins definiert und die postprandialen Werte

darauf bezogen. Des Weiteren wurde der Quotient aus freien Analyten und Gesamtmenge berechnet und graphisch dargestellt. Exemplarisch sind die Ergebnisse für QuinaldA in der Abbildung 5.9 dargestellt.

Die Ergebnisse sind sehr inhomogen, die Analyte verhalten sich unterschiedlich. Es kann bei allen Analyten eine postprandiale Änderung der Konzentrationen beobachtet werden. Weder ist die Gesamtmenge, noch die freie Menge konstant. Auch die freie Fraktion ändert sich, woraus gefolgt werden kann, dass sich die Proteinbindung der Analyte ebenfalls ändert. Da maximale Änderungen erst nach 2 Stunden beobachtet werden, handelt es sich also nicht um einen kurzfristigen Effekt. Es sind starke interindividuelle Unterschiede zu beobachten. Für diese Unterschiede gibt es eine Vielzahl möglicher Erklärungen. Da es sich um nur zwei Probanden handelt, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob einer der beiden Verläufe unphysiologisch ist, wie es z.B. bei einer Infektion der Fall wäre. Auch können die Unterschiede durch variierende Lebensgewohnheiten und dadurch bedingte Abweichungen im circadianen Rhythmus des Cortisol erklärt werden. In beiden möglichen Fllen käme es durch Zytokine oder Hormone zu unterschiedlichen Enzymaktivierungen und in Folge zu den festgestellten interindividuellen Schwankungen.

Kynurenin wird durch Kynureninaminotransferase zu Kynureninsäure, durch Kynureninase zu Anthranilsäure oder durch Kynurenin-3-Monoxygenase zu 3-HK verstoffwechselt (siehe Abbildung 2.3) [44, 46, 55]. Während KynA und 3-HK postprandial einen Anstieg zeigen, fällt AA moderat ab. Bezieht man die Konzentration eines dieser Metabolite auf die Konzentration der gemeinsamen Vorläufersubstanz Kyn, so erhält man ein Maß für die jeweilige Enzymaktivität. Betrachtet man so die Aktivität der KAT, KYNU oder KMO, so stellt man ein inhomogenes Verhalten fest (siehe Abbildung 5.10). In der Literatur wurde der Quotient aus Kyn und Trp als ein Maß für die Aktivität der Indolamin-2,3-dioxygenase beschrieben (IDO) [217, 218]. Wird nun Kyn auf dessen Vorläufer Trp bezogen, so wird auch hier im Mittel ein Abfallen des Quotienten festgestellt. Dieser Abfall stimmt mit dem Anstieg der Metabolite 3-HK und KynA überein. Nach der Nahrungsaufnahme erfolgt also sehr schnell eine Verstoffwechslung des Tryptophans und dessen Stoffwechselprodukte.

Da jedoch die drei Enzyme KAT, KMO und KYNU das selbe Substrat Kyn besitzen, kann das unterschiedliche Verhalten nicht alleine auf den Effekt der Nahrungsaufnahme zurückgeführt werden. Wenn nur die Nahrungsaufnahme und die daraus resultierenden höheren Blutspiegel an Trp und nach einer Metabolisierung die erhöhten Konzentrationen an Kyn, also ein Substratanstieg für die drei Enzyme, ausschlaggebend wäre, dann müssten sich die Konzentrationen der drei Metabolite 3-HK, KynA und AA in gleicher Weise verhalten. Daher wird das unterschiedliche Verhalten der Metabolitkonzentrationen durch drei Hypothesen erklärt:

1. Die drei Enzyme ändern ihre Aktivität mit der Zeit, so dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Mengen an Kynureninmetaboliten gebildet werden.
2. Die drei Enzyme werden im Laufe der Zeit unterschiedlich stark exprimiert.
3. Die drei Substanzen werden unterschiedlich schnell metabolisiert (in QuinaldA, Xanthurinsäure (Xan) oder 3-HAA), wodurch der Quotient stark schwankt. KynA und 3-HK werden demzufolge langsamer als AA verstoffwechselt.

Vermutlich handelt es sich jedoch um eine Kombination der Hypothesen. Die Enzyme des Tryptophanstoffwechsels unterliegen offensichtlich einer starken Aktivittschwankung, wodurch es zu einer Änderung

der Metabolitgleichgewichte kommt. Diese Schwankungen sind vermutlich abhängig von der Substratkonzentration und unterliegen offensichtlich einem circadianen Rhythmus.

Die Änderungen der Metabolitkonzentrationen nach Nahrungsaufnahme werden durch die Literatur bestätigt. So wird beispielsweise der Anstieg von KynA-Konzentrationen im Serum und im Gehirn von Nagetieren nach einer systemischen Gabe von Trp beschrieben [219, 220]. Bereits 1969 wurde berichtet, dass eine Aktivierung der Tryptophan-2,3-dioxygenase (TDO) durch eine erhöhte Trp-Konzentration erfolgt [221]. In einer weiteren Literaturstelle wurde der Anstieg von Kyn 30 Minuten nach einer intraperitonealen Injektion im Prosencephalon, Cerebellum, Plasma und in der Leber nachgewiesen [200]. Es ist bekannt und wurde bereits in dieser Arbeit erörtert, dass die Aktivität der TDO durch Glucocorticoide, wie z.B. Cortisol, induziert wird [27]. Im Jahr 2013 konnte gezeigt werden, dass postprandial auch die Konzentration des Cortisols ansteigt [222]. Damit wird durch die Aufnahme von Trp zum einen mehr Substrat zur Verfügung gestellt, zum anderen wird die Aktivität des verstoffwechselnden Enzyms gesteigert.

Jedoch können generell die Ergebnisse einer Quantifizierung des Tryptophanstoffwechsels im Zuge einer klinischen Studie durchaus verglichen werden, wie Hiratsuka und Kollegen zeigten [186]. Über einen Zeitraum von 22 Tagen konnte die Arbeitsgruppe keine signifikanten Änderungen der untersuchten Metablate in Blut und Serum gesunder Frauen feststellen.

Der Effekt des Einfrierens

Bis zu diesem Zeitpunkt wurden bei allen Untersuchungen der Arbeitsgruppe eingefrorene Probenmaterialien aufgearbeitet und analysiert. Daher musste zwangsläufig geprüft werden, in wie weit sich durch das Einfrieren das Verhältnis aus freien und proteingebundenen Analyten gegenüber der nativen Probe ändert (siehe Abschnitt 5.4.2). Es zeigte sich, dass nach dem Einfrieren keinerlei signifikante Unterscheidung zwischen freien Analyten und der Gesamtkonzentration möglich ist. Die Analyse der deproteinisierten Fraktion zeigte die identischen Konzentrationen, wobei vor der Kältebehandlung ein signifikanter Unterschied für alle Analyte bestand. Durch das Einfrieren werden also die Bindungen zwischen Proteinen und den zu untersuchenden Tryptophanmetaboliten zerstört. Auch Chang et al. haben Beobachtungen zur Proteinpräzipitation und Denaturierung bei tiefen Temperaturen gezeigt [223]. Für Studien mit eingefrorenen Probenmaterialien kann also nur die Summe aus freien und proteingebundenen Analyten bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Summe durch das Einfrieren nicht verändert wird.

Einfluss der Blutentnahmesysteme

In klinischen Studien, vor allem bei multizentrischen Studien, oder solchen über einen längeren Zeitraum, können unter Umständen unterschiedliche Blutentnahmesysteme verwendet werden. Deshalb wurde der Einfluss von Blutentnahmesystemen auf die Analytik des KP untersucht (siehe Abschnitt 5.4.4). In der Praxis wird häufig beobachtet, dass Blutentnahmeröhrchen nicht vollständig gefüllt werden. Deshalb wurde ein Blutentnahmeröhrchen des Typs BD Vacutainer SST II Advance nur zur Hälfte gefüllt, um den Einfluss dieses präanalytischer Fehlers zu untersuchen. Insbesondere bei EDTA und Heparin Plasma kommt es durch ein unvollständige Befüllung zu einem abweichenden Verhältnis zwischen Antikoagulanz

und Blut. EDTA und Heparin unterbinden beide die Gerinnung, indem EDTA das Kalzium und Heparin das Antithrombin III bindet [224].

Die statistische Auswertung zeigt signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Blutentnahmesystemen im Bezug auf die Analyte AA, 3-HAA, 5-HT, Quin, QuinaldA, Pic und KynA. Es fällt auf, dass nicht nur die mittlere Konzentration von der des Bezugsystems abweicht, sondern auch die Schwankungen drastisch zunehmen. Auch ist zu beobachten, dass bei den Substanzen, welche einem Einfluss durch das Blutentnahmesystem unterliegen, die höchsten Signalintensitäten aus Serum gemessen werden. Daraus kann einerseits gefolgert werden, dass durch die Gerinnung keine Analyte ausfallen. Andererseits können bei bestimmten Analyten die verwendeten Gerinnungshemmer zu einer Ionensuppression führen. Auch durch den Einsatz von Gelseparatoren kommt es zu einem kleineren Signal, was entweder durch Ionensuppression, oder durch eine Substanzadsorption an das Gel erklärt wird. Lykkesfeldt zeigt in seiner 2012 publizierten Arbeit den gleichen negativen Einfluss von Gelseparatoren bei der Blutspiegelbestimmung von Vitamin C [225]. Er zeigt ebenfalls anschaulich, dass der Einsatz von Fluorid als Antikoagulanz zu deutlich niedrigeren Spiegeln bei Vitamin C und Dehydroascorbat führt. Er verwendete Heparin Plasma als Referenzmaterial, welches mit Serum vergleichbar ist. Die beiden von ihm untersuchten Analyte zeigen bei der Verwendung anderer Blutentnahmesysteme, wie EDTA, Fluorid oder Gel Serum, signifikant kleinere Konzentrationen. Jedoch kommt er zu dem Ergebnis, dass durch den Einsatz von EDTA das *in vivo* Redoxgleichgewicht zwischen Ascorbat und Dehydroascorbat am besten erhalten bleibt. Im Jahr 2008 zeigten Shich et al., dass bei der Quantifizierung von Myeloperoxidase die höchsten Spiegel bei Verwendung von Lithium Heparin Röhrchen gemessen werden [226]. Dabei steigen die Konzentrationen jedoch nach der Blutabnahme noch an und sind bei Raumtemperatur deutlich stärker ausgeprägt als bei gekühlten Proben. In diesem Falle wird vermutet, dass Heparin bei der Gerinnung die Freisetzung von Myeloperoxidase aus Leukozyten ermöglicht. Bei der Analyse von Metaboliten des Tryptophanstoffwechsel ist jedoch weder ein Redoxgleichgewicht noch eine Freisetzung aus Leukozyten während der Gerinnung in der Literatur beschrieben. Dies erlaubt also die Analyse aus Serum. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es nach der Blutentnahme durch unterschiedliche Zytokinkonzentrationen zu unterschiedlichen Enzymaktivierungen kommt. Biancotto et al. führen in ihrer Publikation aus dem Jahr 2012 etliche Zytokine auf, deren Konzentrationen, in Abhängigkeit des gewählten Gerinnungshemmers, variieren [227]. So wurde beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ) aus EDTA Plasma mit 11,7 pg/mL, aus Heparin Plasma mit 33,8 pg/mL und aus Serum mit 52,6 pg/mL bestimmt. Da IFN- γ zu einer Aktivierung der IDO und damit zur Bildung von NFK [49] führt, könnte dieser Effekt einen gewissen Einfluss auf nachfolgende Experimente haben. Da diese Effekte nicht zwangsläufig für alle Analyte auftreten müssen, zeigte ein ähnliches Experiment mit 25-Hydroxyvitamin D [228]. Hierbei konnten keine Unterschiede zwischen Serum, Heparin und EDTA Plasma festgestellt werden. Auch die Dauer zwischen Blutentnahme und Zentrifugation hatte innerhalb von 72 Stunden keinen Einfluss. Auch Tahir et al. konnten nachweisen, dass das Blutentnahmesystem keinen Einfluss auf den untersuchten Progesteronspiegel besitzt [229]. Es konnte von uns nachgewiesen werden, dass ein nur zur Hälfte mit Serum befülltes Blutentnahmeröhrchen keine statistisch signifikant anderen Ergebnisse liefert als das vollständig befüllte Blutentnahmeröhrchen. Da bei der Verwendung von Serum keine Antikoagulanzien verwendet werden, war dieses Ergebnis zu erwarten. Aus diesem Grund und der Tatsache, dass Serum zu den größten Signalen führt, sollte es bevorzugt verwendet werden. Ein weiterer positiver Effekt ist, dass Plasmaproben bei einer Probenvorbereitung

mittels Festphasenextraktion häufig zu Problemen führen, da es nach dem Einfrieren zu einer Gerinnung kommen kann und dann die SPE Kartuschen verstopfen. Eine reproduzierbare Probenvorbereitung ist dann nicht mehr gegeben. Dieser Nachteil ist jedoch bei einer Fällung nicht von Belang.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann also zusammenfassend gesagt werden, dass analytisch prinzipiell zwischen freien und proteingebundenen Substanzen unterschieden werden kann. Diese Differenzierung jedoch nach dem Einfrieren nicht mehr möglich ist. Da es zu deutlichen Schwankungen der Konzentrationen nach Nahrungsaufnahme kommt, sollte eine Blutabnahme immer nüchtern erfolgen, um kompetitive Ergebnisse zu erlangen. Ebenfalls von entscheidender Bedeutung ist die Verwendung identischer Blutentnahmesysteme. Nicht nur die Art, sondern auch der Hersteller müssen gleich sein. Nur durch absolut identische Bedingungen zum Zeitpunkt der Blutentnahme kann überhaupt der Vergleich der Analyte des KP angestrebt werden. Würde Patienten Blut mittels einer Monovette® Serum und der Kontrollgruppe mittels BD Vacutainer SST II Advance abgenommen werden, so sind z.B. für den Analyten Pic bis zu 60% niedrigere Werte bei der Kontrollgruppe zu erwarten. Durch Unterschiede in der Nahrungsaufnahme könnte dieser Effekt noch drastischer ausfallen. Es wurde in der Literatur über den Tryptophanstoffwechsel kein Beispiel gefunden, welches explizit die identischen Bedingungen als zwingend hervorhebt. Es gilt zu überlegen, ob für größere Studien die Abnahmesysteme zentral beschafft und verteilt werden, damit die selbe Charge Verwendung findet.

6.5 Praktische Anwendung der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode

Untersuchung des Einflusses von Carbamazepin auf PBMC-Kulturen

In der Literatur [180] wurde beschrieben, dass *in vivo* aus dem Antiepileptikum Carbamazepin Chinolinsäure gebildet wird. Dazu untersuchten Ghosh et al. *ex vivo* Blutproben und Gewebeproben von arzneimittelresistenten Patienten, die an Epilepsie erkrankt waren. Die Gewebeproben wurden im Zuge von Lobektomien des Temporallappens nach einer Therapie mit Carbamazepin entnommen. Die Arbeitsgruppe etablierte ebenfalls ein *in vitro* Model der Blut-Hirn-Schranke mit Primärkulturen aus den Gehirnproben. Mittels LC-MS-Analysen quantifizierten sie die Carbamazepinkonzentrationen und untersuchten mittels Beschleuniger-Massenspektrometrie (AMS - Accelerator Mass Spectrometry) ¹⁴C Metabolite des ¹⁴C Carbamazepins. Die Arbeitsgruppe konnte dabei kein Carbamazepin in den Gewebeproben und nur geringe Mengen in dem *in vitro* Versuch, auf der Hirnseite des Blut-Hirn-Schranken Models, nachweisen. Sowohl *in vitro* als auch *ex vivo* konnten durch die AMS Untersuchungen die Carbamazepin Metabolite Carbamazepinepoxid und 10,11-Dihydro-10,11-dihydroxycarbamazepin nachgewiesen werden. Quin wurde ebenfalls durch diese Methode in mikromolaren Konzentrationen bestätigt. Die Arbeitsgruppe sieht ihre Entdeckung dadurch bestätigt, dass Quin mit vergleichbarer Geschwindigkeit (3% pro Stunde) gebildet wurde, wie Carbamazepinepoxid abgebaut wurde (5% pro Stunde).

Um die Richtigkeit dieser Aussage zu überprüfen, wurden in einem Zellkulturexperiment (siehe Abschnitt 5.5.1) mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell) mit Carbamazepin, bzw. dessen Hauptmetaboliten Carbamazepinepoxid, inkubiert. Normalerweise wird

in der Zellkultur fötales Kälberserum als Zusatz verwendet, da es eine Vielzahl von Proteinen enthält, die für das Kultivieren von Zellen in Kultur notwendig sind. Unter diesen Proteinen befinden sich auch viele Wachstumsfaktoren [230, 231]. Um in diesem Versuch die Zellen nicht nur mit den benötigten Wachstumsfaktoren zu versorgen, sondern auch mit denjenigen Zytokinen, die im jeweiligen Spenderblut vorkommen, wurden anstelle von fötalem Kälberserum die Seren der jeweiligen Spender verwendet.

Es wurde festgestellt, dass es innerhalb von 72 Stunden zu keinem signifikanten Abbau von Carbamazepin oder Carbamazepinepoxid kommt (siehe Abbildung 5.12). Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der von Ghosh et al. [180] beobachtete Effekt nicht auf einen Abbau von Carbamazepin zu Quin, sondern auf eine vermehrte Produktion der Quin zurückzuführen ist. Dies würde bedeuten, dass Carbamazepin, oder dessen Metabolite, die Enzyme aktivieren, welche für eine vermehrte Quin Synthese verantwortlich sind. Dies erscheint möglich, da in der Literatur beschrieben wurde, dass Antikonvulsiva, wie Carbamazepin, Phenytoin, Phenobarbital, Felbamat und Lamotrigin, zu einer gesteigerten Produktion der Kynureninsäure führen [232, 233]. Zwar wurde dabei nur eine gesteigerte Aktivität der Kynureninaminotransferase beschrieben, aber eine generelle Aktivierung des Kynurenin Pathways könnte auch zu einer vermehrten Quin Bildung führen. Deshalb wurden auch die Konzentrationen von Quin analysiert und verglichen. Es zeigte sich innerhalb von 72 Stunden kein signifikanter Anstieg von Quin nach einer Inkubation mit Carbamazepin oder Carbamazepinepoxid im Vergleich zu nativen PBMC-Kulturen (siehe Abbildung 5.13).

Betrachtet man die gemessenen Konzentrationen der Tryptophanmetabolite in unserem Zellkulturexperiment, so stellt man signifikante Unterschiede gegenüber den Kontrollen fest. Es findet also durch die Zellen durchaus eine Metabolisierung innerhalb des KP statt, was ein Beweis für vitale, aktive Zellen ist. Auffallend ist auch der Unterschied zwischen den einzelnen Spendern. Die Unterschiede können dabei nicht durch unterschiedliche Zellzahlen oder Zellkulturmedien begründet werden. Die Kulturen unterscheiden sich nur durch ihre individuellen Zellpopulationen und die verwendeten individuellen Seren. Durch den Einsatz individueller Seren und Zellen als Quelle von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, etc. wird somit ein individuelles Bild des Tryptophanstoffwechsels gezeichnet, welches zwar weniger gut vergleichbar mit anderen Experimenten ist, aber auf der Suche nach eventuellen Stoffwechseleffekten ein breiteres Spektrum an möglichen Metabolisierungen zulässt.

Letztlich wird eine Bildung von Quin aus Carbamazepin, wie sie von Ghosh et al. postuliert wurde, aus mehreren Gründen angezweifelt:

1. In den von uns durchgeführten Versuchen konnte nach einer *in vitro* Stimulation mit Carbamazepin oder Carbamazepinepoxid kein Anstieg der Quin nachgewiesen werden.
2. In der Literatur gibt es keine weiteren Hinweise auf eine Metabolisierung von Carbamazepin zu Quin.
3. Ghosh et al. konnten ^{14}C Metabolite des ^{14}C Carbamazepins, aber keine ^{14}C Quin nachweisen.
4. Es kann an dieser Stelle die enzymatische Umsetzung von Carbamazepin zu Quin nicht ausgeschlossen werden, jedoch erscheint der vermutete Mechanismus als sehr komplex und es müsste eine Vielzahl an Enzymen daran beteiligt sein.

5. Die UV-Chromatogramme von Ghosh et al. zeigen deutlich, dass das vermeintliche Quin mit anderen Substanzen koeluiert, weshalb diese Methode nicht zur eindeutigen Identifikation dienen kann.
6. Quin besitzt eine Molmasse von 167,119 g/mol. Einfach protoniertes Quin [Quin + H]⁺ besitzt demzufolge eine Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) von 168,127. Ghosh et al. ordneten das vermeintliche Quin einem Signal mit m/z 167,96 bzw. 168,0 zu. Die Vermutung liegt also nahe, dass es sich bei dem Signal um eine unbekannte Substanz mit einem ähnlichem m/z handelt.
7. Die mittels HPLC aufgereinigten und durch UV detektierten Fraktionen sind heterogene Stoffgemische. Quin wurde anschließend lediglich durch einfache MS, nicht aber durch spezifischere und dadurch beweiskräftigere MS/MS-Analysen identifiziert. Lutidinsäure, Dipicolinsäure und Dinicotinsäure besitzen die identische Molmasse wie Quin. Phthalsäure und Carbazol besitzen beispielsweise relativ ähnliche Massen von 166,027 g/mol bzw. 167,207 g/mol.
8. In den ex vivo Untersuchungen von Ghosh et al. gab es keine Kontrollgruppe ohne Carbamazepin Therapie, die beweist, dass das vermeintliche Quin auf das Antiepileptikum zurückzuführen ist.

Zwar besitzen Antikonvulsiva durchaus einen Einfluss auf den KP, jedoch konnte durch unsere Arbeit nicht bewiesen werden, dass eine Therapie mit Carbamazepin zu gesteigerten Konzentrationen an Quin führt. Die aufgeführten Überlegungen lassen den Schluss zu, dass die Folgerungen von Gosh et al. nicht korrekt sind und in den Experimenten nicht Quin identifiziert wurde, sondern eine unbekannte Substanz quantifiziert wurde.

Untersuchung des circadianen Rhythmus in vivo

Von Coggan et al. konnten 2009 für Pic und Quin zeigen, dass es einen signifikanten Unterschied in den cerebrospinalen Pic und Quin Konzentrationen in Abhängigkeit von der Uhrzeit gibt [234]. Bereits 1968 konnten Rapoport und Beisel zeigen, dass die Gabe von drei Gramm Trp um 9:00 Uhr zu einer anderen Exkretion von Metaboliten führt, als eine Gabe der gleichen Menge um 21:00 Uhr [235]. Dabei wurde festgestellt, dass im Laufe des Vormittags annähernd dreifach größere Mengen an Kyn, KynA und Xan ausgeschieden werden. Rapoport und Beisel folgerten daraus, dass die Aktivität der TDO einem circadianen Rhythmus unterliegt. Es ist bekannt, dass die TDO-Aktivität durch Glucocorticoide, wie z.B. Cortisol, induziert wird [27]. Cortisol unterliegt wiederum einem circadianen Rhythmus, welcher zu einer minimalen Konzentration gegen Mitternacht und einem Cortisol Peak in den frühen Morgenstunden führt. Die Cortisol Konzentration wird dann im Laufe des Tages abgebaut [236, 237, 238, 239]. Somit führt die tägliche Änderung des Cortisolspiegels zu einer Änderung der TDO-Aktivität und es kann vermutet werden, dass es letztlich zu zeitabhängigen Konzentrationen der Metabolite des Kynurein Pathways kommt. Jedoch können auch Effekte unabhängig von der Tageszeit die Konzentration von Cortisol beeinflussen. Beispielsweise kommt es bei einer allergischen Rhinitis zu einem niedrigeren Cortisolpeak und einem verzögerten Abbau [240]. Somit sollte bei einer klinischen Studie zum KP immer auch die Konzentration des Cortisols bestimmt und statistisch geprüft werden, ob eine Krankheit mit Änderung des KP oder der Cortisol-Konzentration korreliert.

Auch Zytokine unterliegen einem täglichen Rhythmus. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass beispielsweise IL-2, IL-6, IL-12, TNF und IFN- γ eine maximale Konzentration während des nächtlichen Schlafens besitzen [241, 242, 243]. Dies ist von Bedeutung, da die IDO durch die Zytokine IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-2 und TGF- β induziert und durch die Zytokine IL-4 und IL-13 inhibiert werden kann [49, 46, 66]. Das proinflammatorische IFN- γ kann auch die Enzyme KMO und KYNU induzieren. Einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-12, TNF und IFN- γ , wirkt das Immunsystem dabei durch eine Erhöhung der Konzentrationen an Cortisol und Katecholaminen entgegen [244]. Wenn nun dieses Gleichgewicht gestört wird, kann eine Verschiebung der Balance im KP die Folge sein. Die Arbeitsgruppe von Jan Born konnte zeigen, dass die Produktion von IL-6 in Monozyten einem circadianen Rhythmus unterliegt, dabei aber nicht abhängig vom Schlaf ist [245]. Interessanterweise unterliegt jedoch nicht nur das Zytokin einem täglichen Rhythmus, sondern auch der membrangebundene Rezeptor für IL-6. Die Konzentration des im Plasma gelösten Rezeptors unterliegt hingegen keinem circadianen Rhythmus, ist aber signifikant während der Schlafphasen erhöht.

Aufgrund dieser publizierten Daten stellt sich die Frage, inwieweit der KP tageszeitabhängigen Schwankungen unterliegt. Deshalb wurden, wie unter Abschnitt 5.5.2 beschrieben, die circadianen Änderungen des KP *in vivo* untersucht. Dazu wurde einem Probanden zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten Blut abgenommen und die Konzentrationen der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels mittels LC-MS/MS bestimmt. Zuvor wurden bereits der Einfluss der Nahrungsaufnahme und andere präanalytische Faktoren diskutiert (siehe Abschnitt 6.4). Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment besonders darauf geachtet, diese Einflüsse möglichst konstant zu lassen. Es wurden identische Blutentnahmesysteme und standardisierte Aufarbeitungsprotokolle verwendet. Um den Effekt der Nahrungsaufnahme möglichst minimal zu halten, wurde eine konstante Nahrungsaufnahme über den gesamten Tag durchgeführt.

Die Auswertung ergab Schwankungen innerhalb des KPs über den Zeitraum eines Tages. In Abbildung 5.14 sind diese Kurven für Trp, Kyn, QuinaldA und Quin dargestellt. Es wurden signifikante Änderungen der Serumspiegel für Trp, Kyn, Quin, QuinaldA, 3-HAA, 5-HT, KynA, 5-HIAA, 5-HTP, 3-HK, Pic und AA festgestellt. Ein verstärkter Substanzabbau oder eine Akkumulation wurden dabei durch veränderte Enzymaktivitäten hervorgerufen. Hinweise auf die jeweilige Enzymaktivität können aus dem Quotienten aus Produkt und Edukt abgeleitet werden. Deshalb wurden in einem weiteren Schritt der Auswertung die Konzentrationen der Metabolite auf die Konzentrationen ihrer Vorläufer bezogen. In Abbildung 5.15 sind die jeweiligen Ergebnisse von KynA, 3-HK, 3-HAA und Xan exemplarisch dargestellt. Die Metabolite wurden dabei auf die Vorläufer Kyn und Trp bezogen. Zwar sind in der Grafik Schwankungen zu erkennen, jedoch wurden signifikante Unterschiede nur für den Quotienten KynA/Trp (zwischen 6:00 Uhr und 22:00 Uhr, zwischen 10:00 Uhr und 22:00 Uhr und zwischen 14:00 Uhr und 22:00 Uhr) und für den Quotienten 3-HAA/Trp (zwischen 6:00 Uhr und 10:00 Uhr und zwischen 10:00 Uhr und 18:00 Uhr) festgestellt.

Der Versuch wird dadurch limitiert, dass nur die Blutproben eines einzelnen Probanden untersucht wurden, die körperliche Aktivität zwischen den einzelnen Blutentnahmen unterschiedlich und die Anzahl an Datenpunkten innerhalb von 24 Stunden gering war. Aus diesen Gründen sind die Ergebnisse nur als Hinweise und nicht als eindeutiger Beweis zu verstehen. Für weitere und genauere Versuche zu diesem Thema ist eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Tanja Lange und Jan Born geplant, die bereits etliche Untersuchungen zum circadianen Rhythmus des Immunsystems durchgeführt haben [245, 239, 246,

244]. Die Veränderungen des KP können in einer gemeinsamen Studie mit den Veränderungen einzelner Zytokine oder den Immunzellpopulationen verglichen werden.

Untersuchung des circadianen Rhythmus in PBMC-Kulturen

Parallel zu der Untersuchung des circadianen Rhythmus *in vivo* (siehe Abschnitt 5.5.2) wurde auch der circadiane Rhythmus *in vitro* untersucht (siehe Abschnitt 5.5.3). Da die Konzentrationen verschiedener Hormone, Zytokine und Chemokine, sowie Anzahl und Verhältnis diverser Lymphozytenpopulationen tageszeitlichen Schwankungen unterliegen [236, 237, 238, 239, 241, 242, 243, 244], lässt dies die Vermutung zu, dass auch in Zellkulturexperimenten die Konzentrationen der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels einer circadianen Rhythmisik unterliegen. Dazu wurde an einem Tag zu fünf unterschiedlichen Zeitpunkten peripheres Blut abgenommen und umgehend die mononukleären Zellen isoliert. Dabei wurden nach jeder Blutabnahme sechs Kulturen mit einer identischen Anzahl an vitalen Zellen vorbereitet. Bei jeweils drei der Kulturen wurde die Aktivität der IDO durch 500 ng/mL Lipopolysaccharid stimuliert [70, 71]. Die Vorgehensweise bei der Isolierung der PBMCs ist dabei mit anderen in der Literatur beschriebenen Verfahren vergleichbar [185, 247, 248]. Anschließend wurden alle Zellkulturen unter identischen Bedingungen für jeweils 48 Stunden inkubiert und die Überstände zu einem späteren Zeitpunkt mittels HPLC-MS/MS analysiert. Durch dieses Experiment konnten zwei unterschiedliche Fragestellungen beantwortet werden. Zum einen wurde der Effekt der LPS-Stimulation auf diverse Intermediate des Tryptophanstoffwechsels, zum anderen eventuelle tageszeitabhängige Schwankungen dieser Metabolite untersucht. Der Vergleich aller Proben zeigte für Kyn einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$), hingegen für 3-HAA und 5-HT einen Abfall ($p < 0,001$) der Konzentrationen durch die Stimulation mit LPS (siehe Tabelle 5.28). Dies kann dadurch erklärt werden, dass nach einer Stimulation mit LPS auch vermehrt KMO exprimiert wird, was zu einem gesteigerten Abbau von Kyn zu 3-HK führt [69]. In einer Publikation beschrieben Connor und Kollegen, dass LPS nicht zu einer vermehrten Expression von KAT führt [72]. Dies erklärt, warum es zu keinen erhöhten KynA-Spiegeln nach LPS-Stimulation kommt. Die verringerten Konzentrationen an 5-HT können durch eine Stimulation der IDO erklärt werden [67]. Da durch die IDO unspezifisch Indolamine abgebaut werden, führt eine gesteigerte IDO-Aktivität auf der einen Seite zur vermehrten Bildung von Kyn und dessen Metaboliten, wie Kynurensäure, auf der anderen Seite zu einem gesteigerten Abbau von 5-HTP und 5-HT [65]. Daher sollten in künftigen Untersuchungen ebenfalls Formyl-5-Hydroxytryptophan, Formyl-5-Hydroxytryptamin und N-Acetyl-5-Methoxykynuramin quantifiziert werden.

Die verringerten 3-HAA-Konzentrationen stehen jedoch im Widerspruch zu einer früheren Arbeit, in welcher gezeigt wurde, dass eine PBMC-Stimulation mittels IFN- γ zu einem signifikanten Anstieg der 3-HAA-Konzentration im Zellkulturüberstand führt [98]. Dieser Widerspruch kann derzeit nicht erklärt werden. Betrachtet man die Konzentrationen von 3-HAA, 5-HT, Kyn, 3-HK und AA, so stellt man teilweise bei Kulturen aus bestimmten Blutentnahmen signifikante Änderungen nach LPS-Stimulation fest (siehe Tabelle 5.29). Jedoch sind diese Änderungen nicht bei allen Kulturen zu beobachten. Es wird vermutet, dass diese unterschiedlichen Ergebnisse auf zwei Effekten beruhen. Zum einen ändern sich die Konzentrationen der durch LPS stimulierbaren Enzyme, zum anderen verändert sich die Zellpopulationen im Laufe des Tages, wie in der Literatur beschrieben [244].

Letztlich wurde noch untersucht, in wieweit die einzelnen Metabolite des Tryptophanstoffwechsels

auch in einem in vitro Experiment tageszeitlichen Schwankungen unterliegen. Dabei wurden signifikante Unterschiede für Trp, Kyn, 3-HAA, 5-HIAA, 3-HK und AA sowohl ohne als auch mit LPS-Stimulation festgestellt (siehe Abbildungen 5.16, 5.17, 5.18). Nach einer Stimulation, jedoch nicht ohne die Verwendung von LPS, wurden Unterschiede für 5-HT und KynA festgestellt. Der Posthoc Test zeigt nur wenige signifikante Änderungen. Da es sich um eine hypothesengenerierende Pilotstudie mit sehr geringer Fallzahl und damit sehr geringer statistischer Aussagekraft handelt, sind auch die nichtsignifikanten, jedoch deutlichen numerischen Änderungen zumindest hinweisgebend. Es wird vermutet, dass zu den unterschiedlichen Zeitpunkten unterschiedliche Verhältnisse der Lymphozytenpopulationen aus dem Blut in die Kultur überführt wurden. IDO wird in einer Vielzahl von Zellen des Blutes exprimiert. Dazu gehören unter anderem Dendritischen Zellen und Monozyten, die Bestandteile der in diesem Experiment isolierten PBMCs sind. Eine Stimulation mittels LPS führt zu einer Freisetzung von TNF- α und IL-1 β [67, 68]. Die Aktivität der IDO kann unter anderem durch diese Zytokine induziert werden [46, 66]. Da die freigesetzte Menge einzelner Zytokine abhängig vom Zelltyp ist, kommt es folglich zu einer unterschiedlichen Aktivierungen des Enzyms, wodurch die verschiedenen Konzentrationen der Indole erklärt werden.

In diesem Versuch konnte somit nachgewiesen werden, dass auch ein Zellkulturexperiment tageszeit-abhängigen Schwankungen unterliegt. Aufgrund dieser Erkenntnisse sollten in künftigen Untersuchungen nicht nur die Konzentrationen der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels, sondern auch die Hormon- und Zytokinspiegel, sowie die Zellpopulation bestimmt werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erzeugen. Änderungen der freigesetzten Intermediate des Kynurenin Pathways können dann normiert und auf die Zellzahlen einzelner Lymphozytenpopulationen bezogen werden, wie es auch von Besedovsky et al. vorgeschlagen wurde [244].

6.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode zur Analyse des Tryptophanstoffwechsels ermöglicht sowohl die gleichzeitige Quantifizierung der Metabolite des serotonergen Arms als auch der des Kynurenin Pathways. Erstmals kann durch diese Methode aus einer einzigen Probe die Gesamtheit dieses komplexen Stoffwechsels quantifiziert werden. Durch die Derivatisierung einzelner Substanzen können mit nur einem LC-MS/MS-System alle Katabolite chromatographisch von Kontaminationen abgetrennt werden. Die Methode ermöglicht die Analyse aus unterschiedlichen biologischen Matrices und ist sehr robust und sensitiv. Dabei sind die laufenden Kosten deutlich geringer als bei vergleichbaren Methoden mit teuren Festphasenextraktionen. Auch ist durch die Probenvorbereitung mittels Proteinfällung und Derivatisierung die tatsächliche Arbeitszeit sehr gering, auch wenn die Summe der einzelne Schritte mehrere Stunden beträgt. Da die Verfügbarkeit und Qualität einzelner deuterierter Substanzen in den letzten Jahren immer weiter angestiegen ist, ist für die Weiterentwicklung dieser Methode die Integration weiterer deuterierter interner Standards geplant. Dadurch sollen die Schwankungen zwischen den einzelnen Analysetagen und matrixbedingte Ionensuppressionseffekte noch kleiner werden. Von besonderem Interesse ist dabei der Einsatz von deuterierter Chinolinsäure und deuteriertem 3-Hydroxykynurenin. Da diese beiden Substanzen nur nach einer Derivatisierung gemessen werden können, werden durch individuelle interne Standards Schwankungen bei der Veresterung noch besser korrigiert.

Als Weiterführung der Zellkulturexperimente mit LPS Stimulation ist eine Untersuchung der PBMCs

+/- Poly I:C Stimulation von Interesse. Das virale Mimetikum induziert die Interleukine 1 β und 6 und den Tumornekrosefaktor α , was wiederum zu einer gesteigerten IDO-Aktivität führt. Gibney et al. konnten zeigen, dass eine Poly I:C Injektion innerhalb von 24 Stunden bei Ratten zu einer um den Faktor 70 gesteigerte IDO-Aktivität führt [249]. Auch wurden in dieser Arbeit in den Hippocampi und den präfrontalen Cortizes gesteigerte Konzentrationen an Kyn und Trp nachgewiesen. Sowohl bei einer Stimulation mit Poly I:C, als auch mit LPS sollte die Dauer der Inkubation in der Zellkultur und die jeweilige Konzentration des Stimulus optimiert werden. Denkbar wäre auch eine Stimulation einzelner Enzyme durch die entsprechenden Zytokine, wie z.B. IL-6. Es wurde nachgewiesen, dass dieses proinflammatorische Zytokin zu einem Anstieg der IDO mRNA und auch des IDO Proteins führt [250], was wiederum einen gesteigerten Abbau von Trp zu Kyn zur Folge hat [145]. Auch wäre eine Stimulation mittels Cobalt(II)-chlorid von Interesse [85]. Durch Cobalt(II)-chlorid wird selektiv die TDO aktiviert, was zu einem spezifischen Tryptophanabbau führt, dabei aber nicht den serotonergen Arm des Tryptophanstoffwechsels beeinflusst. Somit wäre eine differenzierte Analyse zwischen TDO und IDO generiertem Kynurenin möglich. Dadurch können spezifische Modelle für unterschiedliche biochemische Fragestellungen etabliert werden.

Wie unter Abschnitt 6.5 beschrieben ist eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Tanja Lange und Jan Born geplant, um den Circadianen Rhythmus des KP zu untersuchen. Neben grundsätzlichen Untersuchungen ist auch die Anwendung der entwickelten hochleistungsflüssigkeitschromatographiegekoppelten Tandem Massenspektrometrie Methode (HPLC-MS/MS) bei Untersuchungen zur Pathogenese von anderen Krankheitsbildern als der eingangs beschriebenen majoren Depression von Interesse. Auf dem Forschungsgebiet der Psychoneuroimmunologie sind hier insbesondere die Schizophrenie und die Alzheimer Erkrankung zu nennen. Bei der Alzheimer Erkrankung werden beispielsweise vermehrt die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ durch aktivierte Mikroglia Zellen ausgeschüttet [251], die wiederum zu einer Aktivierung der IDO führen. Dies führt zu einer vermehrten Bildung der Neurotoxine 3-HK und Quin, welche vermutlich an den neurodegenerativen Prozessen beteiligt sind [93, 252, 250]. In Verbindung dazu wurden im Blut [253] und im Liquor cerebrospinalis [254] geringere Spiegel der neuroprotektiven KynA beobachtet. Jedoch wurden auch erhöhte Konzentrationen der KynA im Corpus striatum und im Hippocampus beschrieben [255]. Die erhöhten KynA Werte entstehen dabei durch eine gesteigerte Aktivität der Kynureninaminotransferase. Ebenfalls erhöhte Konzentrationen des endogenen NMDA-Rezeptor Antagonisten KynA wurden mit der Entstehung der Schizophrenie in Verbindung gebracht [256, 257].

Bei der vererblichen, neurodegenerativen Huntington-Krankheit wurden auch pathologische Veränderungen des KP beobachtet. Verringerte KynA-Konzentrationen wurden im Cortex [258], im Corpus striatum [259, 260] und im Liquor cerebrospinalis [254] nachgewiesen. Die verringerten KynA-Konzentrationen können dabei durch eine reduzierte Aktivität der KAT erklärt werden, wie sie im Corpus striatum beobachtet wurden [259, 260]. Auch wurden erhöhte 3-HK [261, 262] und Quin [263] Spiegel beobachtet. Bei Patienten mit einer Huntington Erkrankung wurden sowohl in Serum [264], als auch in Plasma [265], eine erhöhte IDO-Aktivität und erhöhte Kyn- und Neopterin-Werte nachgewiesen. In Zukunft ist eine Quantifizierung aller Metabolite des Tryptophanstoffwechsels innerhalb einer Studie durch die in dieser Arbeit vorgestellte Methode möglich. Damit können nicht nur einzelne Konzentrationen, sondern auch die für die Enzymaktivität charakteristischen Quotienten aus Produkt und Substrat berechnet werden. Dabei kann vor allem untersucht werden, ob die gemessenen Konzentrationen im Serum mit denen im Liquor cerebrospinalis korrelieren, damit gegebenenfalls auf die Entnahme von Liquor cerebrospinalis verzichtet

werden kann.

Wie bei der Huntington Erkrankung wurden erhöhte Konzentrationen an 3-HK, bei gleichzeitig verringerten KynA-Spiegeln im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit Epilepsie beschrieben [266, 267]. Bei Patienten mit dieser Erkrankung wurden auch reduzierte Kyn-Werte gemessen [266]. Die zur Therapie eingesetzten Antiepileptika Carbamazepin, Phenytoin, Phenobarbital, Felbamat und Lamotrigin, führen zu einer gesteigerten KynA Produktion durch eine gesteigerte KAT-Aktivität [232, 233]. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der KP eine bedeutende Rolle bei zentral nervösen Erkrankungen spielt. Daher ist die Untersuchung von Serum und Liquor cerebrospinalis von an Epilepsie erkrankten Patienten, mit und ohne medikamentöser Therapie, von großem Interesse, um die pharmakologische Wirkung von Antikonvulsiva besser zu verstehen.

Auch bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), einer degenerativen Erkrankung des motorischen Nervensystems, wurden Veränderungen des KP beobachtet [268]. Es wurden erhöhte Spiegel der excito-toxischen Quin im Serum und Liquor cerebrospinalis gemessen [113]. Dabei wurden eine große Anzahl aktiver Mikroglia, reaktiver Astrozyten, T-Lymphozyten und eingewanderter Makrophagen im Gehirn und Rückenmark beschrieben [269, 270]. Dadurch wird IFN- γ sezerniert, was zu einer IDO-Aktivierung führt [271]. Chen et al. beobachteten im Liquor cerebrospinalis und im Serum signifikant erhöhte Konzentrationen an Trp, Kyn und Quin [272]. Die neuroprotektive Pic wurde dabei in reduzierter Konzentration nachgewiesen. Im Zuge einer Kollaboration könnte mit der in dieser Arbeit vorgestellten Methode die Gesamtheit der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels quantifiziert und weitere Erkenntnisse über die Pathogenese der ALS gewonnen werden.

Bei der multiplen Sklerose handelt es sich um eine chronische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems. Bei Patienten mit multipler Sklerose wurden erhöhte Trp-Spiegel im Plasma und im Liquor cerebrospinalis festgestellt [273]. Die Krankheit kann einen schubförmig remittierenden oder progressiven Verlauf aufweisen. Im Liquor cerebrospinalis wurden bei der erstgenannten Variante erhöhte KynA Spiegel während akuten Schüben [274] und verringerte KynA Spiegel während der Remission [275] nachgewiesen. Auch bei dieser Erkrankung kann durch die von uns entwickelten Methode die Gesamtheit der Metabolite des Tryptophanstoffwechsels quantifiziert und weitere Erkenntnisse über die Pathogenese und Therapie der multiplen Sklerose gewonnen werden. Insbesondere die Identifizierung eines Biomarkers zur frühzeitigen Diagnose der Erkrankung ist dabei von großem Interesse.

Eine pathologische Veränderung des Tryptophanstoffwechsels wurde jedoch nicht nur bei Erkrankungen des zentralen Nervensystems beobachtet. Auch bei der Pathogenese von Tumoren scheint eine Aktivierung des KP beteiligt zu sein. Stapelberg et al. konnten zeigen, dass in Tumor-inizierenden Zellen der KP der einzige hochregulierte Pathway ist, bei welchem signifikant IDO hochreguliert ist [276]. Abhängig von der untersuchten Krebsart ist die IDO dabei durch transkriptionale oder posttranskriptionale Mechanismen hochreguliert. Eine IDO-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Tryptophanmetabolisierung und ist eine Möglichkeit, wie Krebszellen der Immunantwort entgehen können [277]. Aus der IDO-Aktivierung folgt eine Trp-Depletion, was wiederum die Bildung von zytotoxischen T-Zellen unterdrückt. Dadurch werden MHC-I-tragende Zellen nicht vom Immunsystem angegriffen. Des Weiteren reifen naive T-Zellen vermehrt zu regulatorischen T-Zellen, was zu einer weiteren Immunsuppression führt. Pilotte et al. beschreiben neben der Aktivierung der IDO auch eine Aktivierung der TDO bei einigen Krebsarten [77]. Bei 41% der Blasenkarzinome, 50% der Melanome und 100% der heptozellulären Karzinome wird das Gen für

TDO exprimiert. Pantouris und Mowat stellen daher einen selektiven TDO Inhibitor mit der Bezeichnung NSC 36398 vor [278]. Diese Substanz wird neben IDO Inhibitoren [279] für zukünftige Krebstherapien untersucht.

Diese Beispiele zeigen, dass der Tryptophanstoffwechsel bei einer Vielzahl von medizinischen Fragestellungen eine entscheidende Rolle spielt. Für die Beantwortung dieser Fragen ist eine möglichst lückenlose Quantifizierung der einzelnen Metabolite notwendig. Dies kann durch die in dieser Arbeit vorgestellte LC-MS/MS-Methode aus einem geringen Probenvolumen, mit der erforderlichen Sensitivität und Präzision erfolgen.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Sollte das Akronym für einen englischen Begriff stehen, so wird die deutsche Übersetzung in Klammern aufgeführt. Gleches gilt für die chemischen Substanzen, welche in englischer Sprache beschriftet waren.

3-HAA	3-Hydroxyanthranilic acid (3-Hydroxyanthranilsäure)
3-HK	3-Hydroxy-DL-kynurenine (3-Hydroxykynurenin)
5-HIAA	5-Hydroxyindole-3-acetic acid (5-Hydroxyindolessigsäure)
5-HT	5-Hydroxytryptamine (5-Hydroxytryptamin / Serotonin)
5-HTP	5-Hydroxytryptophan (5-Hydroxytryptophan)
AA	Antranilic acid (Anthranilsäure)
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
ACN	Acetonitril
AcOH	Essigsäure
AD	Alzheimer disease (Morbus Alzheimer)
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMS	Accelerator Mass Spectrometry (Beschleuniger-Massenspektrometrie)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (chemische Ionisation unter Atmosphärendruck)
ATD	Akute Tryptophan Depletion
$\alpha 7\text{nAChR}$	$\alpha 7$ -nikotinischer Acetylcholinrezeptors
BBB	Blood-brain-barrier (Blut-Hirn-Schranke)
BG	Bestimmungsgrenze
CI	Chemische Ionisation
CinA	Cinnabarinic Acid (Cinnabarinsäure)

CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritic cells (Dendritische Zellen)
DTT	Dithiothreitol
EG	Erfassungsgrenze
ESI	Elektrosprayionisation
EtOH	Ethanol
FA	Ameisensäure
FKS	Fetales Kälberserum
FLD	Fluoreszenz Detektor
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HAAO	3-Hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
HCl/But	Salzsäure 3 N in Butanol
HD	Huntington disease (Morbus Huntington)
HFBA	Heptafluorobutyric acid (Perfluorbuttersäure)
HPA	Hypothalamus-pituitary-adrenal axis (Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse)
HPLC	High-performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
Ile	Isoleucin
i.p.	Intraperitoneal (Injektion in die Bauchhöhle)
ISTD	Internestandardlösung
IL	Interleukin
KAT	Kynureninaminotransferase
kDa	Kilodalton
KMO	Kynurenin-3-Monoxygenase (alternative Bezeichnung: Kynurenin-3-Hydroxylase)
KP	Kynurenin Pathway (Stoffwechselweg des Kynurenins)

Kyn	Kynurenine (Kynurenin)
KynA	Kynurenic acid (Kynureninsäure)
KynA-d5	Kynurenic-d5 acid (Kynureninsäure-d5)
KYNU	Kynureninase
LBS	Lipopolsaccharidbindendes Protein
LPS	Lipopolsaccharid
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption (Matrix-unterstützte Laser-Desorption Ionisation)
MAO	Monoamin-Oxidase
MCP1	Monocyte chemoattractant protein-1
MeOH	Methanol
min	Minute
mL	Milliliter
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer
MS/MS	Tandem Massenspektrometer
mP A	Mobile Phase A
mP B	Mobile Phase B
m/z	Verhältnis von Masse zu Ladung
µL	Mikroliter
NG	Nachweisgrenze
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natronlauge
NFK	N-Formylkynurenin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nm	Nanometer
OVLT	Organum vasculosum laminae terminalis
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)

PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
Phe	Phenylalanin
PI	Photoionisation
Pic	Picolinic acid (Picolinsäure)
Pic-d4	Picolinic-d4 acid (Picolinsäure-d4)
PNI	Psychoneuroimmunologie
QuinaldA	Quinaldic acid (Chinolin-2-Carboxylsäure)
Quin	Quinolinic acid (Chinolinsäure)
rH	Relative humidity (Relative Luftfeuchtigkeit)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
SWS	Strong Wash Solvent (Starke Nadelspülösung)
S/N	Signal to noise ratio (Signal/Rausch-Verhältnis)
TDO	Tryptophan-2,3-dioxygenase
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPH	Tryptophan-Hydroxylase
Trp	Tryptophan (Tryptophan)
Trp-d5	Tryptophan-d5 (Tryptophan-d5)
Tyr	Tyrosin
UCMS	Unpredictable chronic mild stress mice model
UPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography (Bezeichnung der HPLC-Anlagen der Firma Waters, welche mit Drücken bis zu 1000 bar arbeiten können)
Val	Valin
VK	Variationskoeffizient

Vol.-%	Volumenprozent
WWS	Weak Wash Solvent (Schwache Nadelpüllösung)
Xan	Xanthuric acid (Xanthurinsäure)
ZNS	Zentrales Nervensystem
+/- X	Stimulation mit/ohne Substanz X
-butyl / -b	Butyliert - Suffix, das die derivatisierte Form eines Analyten bezeichnet.

7.2 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei dem ehemaligen Direktor der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie Herrn Professor Dr. med. Hans-Jürgen Möller, für die Möglichkeit an seiner Klinik meine Doktorarbeit durchzuführen.

Ich bedanke mich auch bei dem Direktor des Instituts für Laboratoriumsmedizin Herrn Professor Dr. med. Daniel Teupser, an diesem Institut ich meine Doktorarbeit beendet habe.

Für die hervorragende Betreuung bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Markus Schwarz, der mich für die Psychoneuroimmunologie begeistert und zu einer Doktorarbeit motiviert hat. Insbesondere die langen Gespräche, die weit über den Themenbereich meiner Arbeit hinausgingen, werden mir in bester Erinnerung bleiben.

Ich bedanke mich bei den Gutachtern meiner Arbeit für ihre Mühe.

Auch möchte ich mich bei meiner ehemaligen Kollegin Frau Nadja Gabellini für die Unterstützung in der Zellkultur bedanken.

Bei Frau Doris Grillitsch und Herrn Sebastian Sterz möchte ich mich ebenfalls für die Unterstützung bei den HPLC-Analysen und Korrekturen bedanken.

Zum Schluss sage ich Danke zu meiner Familie, Frau Dr. rer. nat. Meike Fahlbusch, meinen Freunden und Frieda.

Literaturverzeichnis

- [1] Ader, R., and Cohen, N. (1975) Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom Med* 37, 333–340.
- [2] Besedovsky, H., and Sorkin, E. (1977) Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin Exp Immunol* 27, 1–12.
- [3] Straub, R., Besedovsky, H., and del Rey, A. In *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer Erkrankungen Band 1 - Kap. 1 Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie*; Straub, R., Ed.; Vandenhoeck & Ruprecht, 2006.
- [4] Williams, J. M., Peterson, R. G., Shea, P. A., Schmedtje, J. F., Bauer, D. C., and Felten, D. L. (1981) Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune systems. *Brain Res Bull* 6, 83–94.
- [5] Schwarz, M. J. (2003) Cytokines, neurophysiology, neuropsychology, and psychiatric symptoms. *Dialogues Clin Neurosci* 5, 139–153.
- [6] Berkenbosch, F., van Oers, J., del Rey, A., Tilders, F., and Besedovsky, H. (1987) Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238, 524–526.
- [7] Besedovsky, H., and del Rey, A. (1987) Neuroendocrine and metabolic responses induced by interleukin-1. *J Neurosci Res* 18, 172–178.
- [8] Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., and Vale, W. (1987) Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 238, 522–524.
- [9] Duff, G. W., and Durum, S. K. (1983) The pyrogenic and mitogenic actions of interleukin-1 are related. *Nature* 304, 449–451.
- [10] McCarthy, D. O., Kluger, M. J., and Vander, A. J. (1986) Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. *Physiol Behav* 36, 745–749.
- [11] Chance, W. T., and Fischer, J. E. (1991) Aphagic and adipsic effects of interleukin-1. *Brain Res* 568, 261–264.
- [12] Crestani, F., Seguy, F., and Dantzer, R. (1991) Behavioural effects of peripherally injected interleukin-1: role of prostaglandins. *Brain Res* 542, 330–335.
- [13] Banks, W. A., Kastin, A. J., and Durham, D. A. (1989) Bidirectional transport of interleukin-1 alpha across the blood-brain barrier. *Brain Res Bull* 23, 433–437.

- [14] Banks, W. A., Ortiz, L., Plotkin, S. R., and Kastin, A. J. (1991) Human interleukin (IL) 1 alpha, murine IL-1 alpha and murine IL-1 beta are transported from blood to brain in the mouse by a shared saturable mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 259, 988–996.
- [15] Banks, W. A., Kastin, A. J., and Broadwell, R. D. (1995) Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 2, 241–248.
- [16] Blatteis, C. M., Bealer, S. L., Hunter, W. S., Llanos-Q, J., Ahokas, R. A., and Mashburn, T., Jr (1983) Suppression of fever after lesions of the anteroventral third ventricle in guinea pigs. *Brain Res Bull* 11, 519–526.
- [17] Blatteis, C. M., Hales, J. R., McKinley, M. J., and Fawcett, A. A. (1987) Role of the anteroventral third ventricle region in fever in sheep. *Can J Physiol Pharmacol* 65, 1255–1260.
- [18] Quan, N., and Herkenham, M. (2002) Connecting cytokines and brain: a review of current issues. *Histol Histopathol* 17, 273–288.
- [19] Watkins, L. R., Wiertelak, E. P., Goehler, L. E., Smith, K. P., Martin, D., and Maier, S. F. (1994) Characterization of cytokine-induced hyperalgesia. *Brain Res* 654, 15–26.
- [20] Quan, N., Whiteside, M., and Herkenham, M. (1998) Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* 83, 281–293.
- [21] Vallières, L., and Rivest, S. (1997) Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem* 69, 1668–1683.
- [22] Nadeau, S., and Rivest, S. (1999) Regulation of the gene encoding tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in the rat brain and pituitary in response in different models of systemic immune challenge. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 61–77.
- [23] Oehmichen, M., Domasch, D., and Wiethölter, H. (1982) Origin, proliferation, and fate of cerebrospinal fluid cells. A review on cerebrospinal fluid cell kinetics. *J Neurol* 227, 145–150.
- [24] Hickey, W. F. (1991) Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1, 97–105.
- [25] Besedovsky, H., and del Rey, A. In *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer Erkrankungen Band 1 - Kap. 15 Zytokine des Gehirns sind Integrationsfaktorendes neuroendokrin-immunen Netzwerks*; Straub, R., Ed.; Vandenhoeck & Ruprecht, 2006.
- [26] Feuerecker, M., Mayer, W., Kaufmann, I., Gruber, M., Muckenthaler, F., Yi, B., Salam, A. P., Briegel, J., Schelling, G., Thiel, M., and Choukèr, A. (2013) A corticoid-sensitive cytokine release assay for monitoring stress-mediated immune modulation. *Clin Exp Immunol* 172, 290–299.

[27] Laugé, A., Launay, J.-M., Callebert, J., Surget, A., Belzung, C., and Barone, P. R. (2011) Evidence for a key role of the peripheral kynurene pathway in the modulation of anxiety- and depression-like behaviours in mice: focus on individual differences. *Pharmacol Biochem Behav* 98, 161–168.

[28] Bauer, M. *Neurobiologie und Therapie depressiver Erkrankungen*; UNI-MED Verlag AG, Bremen, 2011.

[29] Angst, J. (1995) The epidemiology of depressive disorders. *Eur Neuropsychopharmacol* 5 Suppl, 95–98.

[30] Unützer, J., Patrick, D. L., Diehr, P., Simon, G., Grembowski, D., and Katon, W. (2000) Quality adjusted life years in older adults with depressive symptoms and chronic medical disorders. *Int Psychogeriatr* 12, 15–33.

[31] Müller, N., and Möller, H.-J. In *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer Erkrankungen Band 2 - Kap. 32A Pathophysiologie der Depression*; Straub, R., Ed.; Vandenhoeck & Ruprecht, 2006.

[32] Bauer, M., Berghöfer, A., and Adli, M. *Akute und therapieresistente Depression* (2. Auflage); Springer Verlag, 2005.

[33] Coppen, A. (1967) The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry* 113, 1237–1264.

[34] Elhwuegi, A. S. (2004) Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28, 435–451.

[35] Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., and Kelley, K. W. (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9, 46–56.

[36] Dantzer, R. (2001) Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 15, 7–24.

[37] Dantzer, R., and Kelley, K. W. (2007) Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 21, 153–160.

[38] Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., Manolagas, S. C., and Chrousos, G. P. (1998) The pathophysiological roles of interleukin-6 in human disease. *Ann Intern Med* 128, 127–137.

[39] Maes, M., Smith, R., and Scharpe, S. (1995) The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology* 20, 111–116.

[40] Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., and Smith, R. S. (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine* 10, 313–318.

[41] Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K. W., Dantzer, R., and Castanon, N. (2007) Lipopolysaccharide induces delayed FosB/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516–531.

[42] Mahan, D. C., and Shields, R., Jr (1998) Essential and nonessential amino acid composition of pigs from birth to 145 kilograms of body weight, and comparison to other studies. *J Anim Sci* 76, 513–521.

[43] Zagajewski, J., Drozdowicz, D., Brzozowska, I., Hubalewska-Mazgaj, M., Stelmaszynska, T., Laidler, P. M., and Brzozowski, T. (2012) Conversion L-tryptophan to melatonin in the gastrointestinal tract: the new high performance liquid chromatography method enabling simultaneous determination of six metabolites of L-tryptophan by native fluorescence and UV-VIS detection. *J Physiol Pharmacol* 63, 613–621.

[44] Stone, T. W. (1993) Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev* 45, 309–379.

[45] Guillemin, G. J., Cullen, K. M., Lim, C. K., Smythe, G. A., Garner, B., Kapoor, V., Takikawa, O., and Brew, B. J. (2007) Characterization of the kynurenine pathway in human neurons. *J Neurosci* 27, 12884–12892.

[46] Mándi, Y., and Vécsei, L. (2012) The kynurenine system and immunoregulation. *J Neural Transm* 119, 197–209.

[47] Stone, T. W., Stoy, N., and Darlington, L. G. (2013) An expanding range of targets for kynurenine metabolites of tryptophan. *Trends Pharmacol Sci* 34, 136–143.

[48] Guillemin, G. J., Smith, D. G., Smythe, G. A., Armati, P. J., and Brew, B. J. (2003) Expression of the kynurenine pathway enzymes in human microglia and macrophages. *Adv Exp Med Biol* 527, 105–112.

[49] Guillemin, G. J., Kerr, S. J., Smythe, G. A., Smith, D. G., Kapoor, V., Armati, P. J., Croitoru, J., and Brew, B. J. (2001) Kynurenine pathway metabolism in human astrocytes: a paradox for neuronal protection. *J Neurochem* 78, 842–853.

[50] Capece, L., Lewis-Ballester, A., Yeh, S.-R., Estrin, D. A., and Marti, M. A. (2012) Complete reaction mechanism of indoleamine 2,3-dioxygenase as revealed by QM/MM simulations. *J Phys Chem B* 116, 1401–1413.

[51] Hughes, M. M., Carballido, A., McLoughlin, D. M., Amico, F., Harkin, A., Frodl, T., and Connor, T. J. (2012) Tryptophan depletion in depressed patients occurs independent of kynurenine pathway activation. *Brain Behav Immun* 26, 979–987.

[52] Myint, A. M., and Kim, Y. K. (2003) Cytokine-serotonin interaction through IDO: a neurodegeneration hypothesis of depression. *Med Hypotheses* 61, 519–525.

[53] Leonard, B. E. (2010) The concept of depression as a dysfunction of the immune system. *Curr Immunol Rev* 6, 205–212.

[54] Lugo-Huitrón, R., Ugalde Muñiz, P., Pineda, B., Pedraza-Chaverrí, J., Ríos, C., and Pérez-de la Cruz, V. (2013) Quinolinic acid: an endogenous neurotoxin with multiple targets. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 104024.

[55] Jhamandas, K., Boegman, R. J., Beninger, R. J., and Bialik, M. (1990) Quinolinate-induced cortical cholinergic damage: modulation by tryptophan metabolites. *Brain Res* 529, 185–191.

[56] HEIDELBERGER, C., and GULLBERG, M. E. (1949) Tryptophan metabolism; concerning the mechanism of the mammalian conversion of tryptophan into kynurenone, kynurenic acid, and nicotinic acid. *J Biol Chem* 179, 143–150.

[57] HEIDELBERGER, C., ABRAHAM, E. P., and LEPKOVSKY, S. (1949) Tryptophan metabolism; concerning the mechanism of the mammalian conversion of tryptophan into nicotinic acid. *J Biol Chem* 179, 151–155.

[58] Wolf, H., Price, J. M., Brown, R. R., and Madsen, P. O. (1970) Studies on tryptophan metabolism in male subjects treated with progestational agents. *Scand J Clin Lab Invest* 25, 237–249.

[59] Erspamer, V., and Asero, B. (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169, 800–801.

[60] Karlosn, P., Doenecke, D., and Koolman, J. *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Auflage; Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1994.

[61] Rapport, M. M., Green, A. A., and Page, I. H. (1948) Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J Biol Chem* 176, 1243–1251.

[62] Gershon, M. D. (2012) Serotonin is a sword and a shield of the bowel: serotonin plays offense and defense. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 123, 268–80; discussion 280.

[63] Squires, L. N., Rubakhin, S. S., Wadhams, A. A., Talbot, K. N., Nakano, H., Moroz, L. L., and Sweedler, J. V. (2010) Serotonin and its metabolism in basal deuterostomes: insights from *Strongylocentrotus purpuratus* and *Xenoturbella bocki*. *J Exp Biol* 213, 2647–2654.

[64] Efimov, I., Basran, J., Sun, X., Chauhan, N., Chapman, S. K., Mowat, C. G., and Raven, E. L. (2012) The mechanism of substrate inhibition in human indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Am Chem Soc* 134, 3034–3041.

[65] Stone, T. W., and Darlington, L. G. (2002) Endogenous kynurenes as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 1, 609–620.

[66] Müller, N., and Schwarz, M. J. (2010) Immune System and Schizophrenia. *Curr Immunol Rev* 6, 213–220.

[67] Fujigaki, H., Saito, K., Fujigaki, S., Takemura, M., Sudo, K., Ishiguro, H., and Seishima, M. (2006) The signal transducer and activator of transcription 1alpha and interferon regulatory factor 1 are not essential for the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by lipopolysaccharide: involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB pathways, and synergistic effect of several proinflammatory cytokines. *J Biochem* 139, 655–662.

[68] Rivest, S., Lacroix, S., Vallières, L., Nadeau, S., Zhang, J., and Laflamme, N. (2000) How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. *Proc Soc Exp Biol Med* 223, 22–38.

[69] Corona, A. W., Huang, Y., O'Connor, J. C., Dantzer, R., Kelley, K. W., Popovich, P. G., and Godbout, J. P. (2010) Fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency sensitizes mice to the behavioral changes induced by lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* 7, 93.

[70] Wirthgen, E., Tuchscherer, M., Otten, W., Domanska, G., Wollenhaupt, K., Tuchscherer, A., and Kanitz, E. (2013) Activation of indoleamine 2,3-dioxygenase by LPS in a porcine model. *Innate Immun*

[71] Moon, J. S., Cheong, N. R., Yang, S. Y., Kim, I. S., Chung, H. J., Jeong, Y. W., Park, J. C., Kim, M. S., Kim, S. H., and Ko, H. M. (2013) Lipopolysaccharide-induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the periodontal ligament. *J Periodontal Res* 48, 733–739.

[72] Connor, T. J., Starr, N., O'Sullivan, J. B., and Harkin, A. (2008) Induction of indolamine 2,3-dioxygenase and kynurenine 3-monooxygenase in rat brain following a systemic inflammatory challenge: a role for IFN-gamma? *Neurosci Lett* 441, 29–34.

[73] Forouhar, F. et al. (2007) Molecular insights into substrate recognition and catalysis by tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 473–478.

[74] Minatogawa, Y., Suzuki, S., Ando, Y., Tone, S., and Takikawa, O. (2003) Tryptophan pyrrole ring cleavage enzymes in placenta. *Adv Exp Med Biol* 527, 425–434.

[75] Tatsumi, K., Higuchi, T., Fujiwara, H., Nakayama, T., Egawa, H., Itoh, K., Fujii, S., and Fujita, J. (2000) Induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in the mouse endometrium during implantation. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 166–170.

[76] Britan, A., Maffre, V., Tone, S., and Drevet, J. R. (2006) Quantitative and spatial differences in the expression of tryptophan-metabolizing enzymes in mouse epididymis. *Cell Tissue Res* 324, 301–310.

[77] Pilote, L., Larrieu, P., Stroobant, V., Colau, D., Dolusic, E., Frédéric, R., De Plaen, E., Uyttenhove, C., Wouters, J., Masereel, B., and Van den Eynde, B. J. (2012) Reversal of tumoral immune resistance by inhibition of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2497–2502.

[78] Opitz, C. A. et al. (2011) An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 478, 197–203.

[79] Wu, D., Li, W., Lok, P., Matsumura, F., and Vogel, C. F. A. (2011) AhR deficiency impairs expression of LPS-induced inflammatory genes in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 410, 358–363.

[80] Nguyen, N. T., Kimura, A., Nakahama, T., Chinen, I., Masuda, K., Nohara, K., Fujii-Kuriyama, Y., and Kishimoto, T. (2010) Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenone-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19961–19966.

[81] Barhoover, M. A., Hall, J. M., Greenlee, W. F., and Thomas, R. S. (2010) Aryl hydrocarbon receptor regulates cell cycle progression in human breast cancer cells via a functional interaction with cyclin-dependent kinase 4. *Mol Pharmacol* 77, 195–201.

[82] Heyes, M. P., Chen, C. Y., Major, E. O., and Saito, K. (1997) Different kynurenone pathway enzymes limit quinolinic acid formation by various human cell types. *Biochem J* 326 (Pt 2), 351–356.

[83] Amaral, M., Outeiro, T. F., Scrutton, N. S., and Giorgini, F. (2013) The causative role and therapeutic potential of the kynurenone pathway in neurodegenerative disease. *J Mol Med (Berl)* 91, 705–713.

[84] Schwarz, M. J., and Müller, (2009) Schizophrenie und Depression - Immunsystem im therapeutischen Visier. *Neurotransmitter* 4, 51–54.

[85] Liu, S.-Y., Zhang, R.-L., Kang, H., Fan, Z.-J., and Du, Z. (2013) Human liver tissue metabolic profiling research on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 19, 3423–3432.

[86] Gobaille, S., Kemmel, V., Brumaru, D., Dugave, C., Aunis, D., and Maitre, M. (2008) Xanthurenic acid distribution, transport, accumulation and release in the rat brain. *J Neurochem* 105, 982–993.

[87] Schwarcz, R., Bruno, J. P., Muchowski, P. J., and Wu, H.-Q. (2012) Kynurenes in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci* 13, 465–477.

[88] Guidetti, P., Hoffman, G. E., Melendez-Ferro, M., Albuquerque, E. X., and Schwarcz, R. (2007) Astrocytic localization of kynurene aminotransferase II in the rat brain visualized by immunocytochemistry. *Glia* 55, 78–92.

[89] Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H., and Ling, L. (2006) Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35. *J Biol Chem* 281, 22021–22028.

[90] DiNatale, B. C., Murray, I. A., Schroeder, J. C., Flavenvy, C. A., Lahoti, T. S., Laurenzana, E. M., Omiecinski, C. J., and Perdew, G. H. (2010) Kynurenic acid is a potent endogenous aryl hydrocarbon receptor ligand that synergistically induces interleukin-6 in the presence of inflammatory signaling. *Toxicol Sci* 115, 89–97.

[91] Fukui, S., Schwarcz, R., Rapoport, S. I., Takada, Y., and Smith, Q. R. (1991) Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism. *J Neurochem* 56, 2007–2017.

[92] Okuda, S., Nishiyama, N., Saito, H., and Katsuki, H. (1998) 3-Hydroxykynurene, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J Neurochem* 70, 299–307.

[93] Bonda, D. J., Mailankot, M., Stone, J. G., Garrett, M. R., Staniszewska, M., Castellani, R. J., Siedlak, S. L., Zhu, X., Lee, H.-g., Perry, G., Nagaraj, R. H., and Smith, M. A. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase and 3-hydroxykynurene modifications are found in the neuropathology of Alzheimer's disease. *Redox Rep* 15, 161–168.

[94] Krause, D., Suh, H.-S., Tarassishin, L., Cui, Q. L., Durafourt, B. A., Choi, N., Bauman, A., Cosenza-Nashat, M., Antel, J. P., Zhao, M.-L., and Lee, S. C. (2011) The tryptophan metabolite 3-hydroxyanthranilic acid plays anti-inflammatory and neuroprotective roles during inflammation: role of hemeoxygenase-1. *Am J Pathol* 179, 1360–1372.

[95] Leipnitz, G., Schumacher, C., Dalcin, K. B., Scussiato, K., Solano, A., Funchal, C., Dutra-Filho, C. S., Wyse, A. T. S., Wannmacher, C. M. D., Latini, A., and Wajner, M. (2007) In vitro evidence for an antioxidant role of 3-hydroxykynurene and 3-hydroxyanthranilic acid in the brain. *Neurochem Int* 50, 83–94.

[96] Amaral, M., Levy, C., Heyes, D. J., Lafite, P., Outeiro, T. F., Giorgini, F., Leys, D., and Scrutton, N. S. (2013) Structural basis of kynureine 3-monooxygenase inhibition. *Nature* 496, 382–385.

[97] Ogawa, H., Nagamura, Y., and Ishiguro, I. (1983) Cinnabarinic acid formation in Malpighian tubules of the silkworm, *Bombyx mori*. Participation of catalase in cinnabarinic acid formation in the presence of manganese ion. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364, 1059–1066.

[98] Christen, S., and Stocker, R. (1992) Simultaneous determination of 3-hydroxyanthranilic and cinnabarinic acid by high-performance liquid chromatography with photometric or electrochemical detection. *Anal Biochem* 200, 273–279.

[99] Fazio, F. et al. (2012) Cinnabarinic acid, an endogenous metabolite of the kynureine pathway, activates type 4 metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol* 81, 643–656.

[100] Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., and Eriksson, K. E. (1995) Laccase-mediated formation of the phenoazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS Lett* 376, 202–206.

[101] Malina, H. Z., and Hess, O. M. (2004) Xanthurenic acid translocates proapoptotic Bcl-2 family proteins into mitochondria and impairs mitochondrial function. *BMC Cell Biol* 5, 14.

[102] Copeland, C. S., Neale, S. A., and Salt, T. E. (2013) Actions of Xanthurenic acid, a putative endogenous Group II metabotropic glutamate receptor agonist, on sensory transmission in the thalamus. *Neuropharmacology* 66, 133–142.

[103] Taleb, O., Maammar, M., Brumaru, D., Bourguignon, J.-J., Schmitt, M., Klein, C., Kemmel, V., Maitre, M., and Mensah-Nyagan, A. G. (2012) Xanthurenic acid binds to neuronal G-protein-coupled receptors that secondarily activate cationic channels in the cell line NCB-20. *PLoS One* 7, e48553.

[104] Furlanetto, S., Pinzauti, S., La Porta, E., Chiarugi, A., Mura, P., and Orlandini, S. (1998) Development and validation of a differential pulse polarographic method for quinolinic acid determination in human plasma and urine after solid-phase extraction: a chemometric approach. *J Pharm Biomed Anal* 17, 1015–1028.

[105] Foster, A. C., Miller, L. P., Oldendorf, W. H., and Schwarcz, R. (1984) Studies on the disposition of quinolinic acid after intracerebral or systemic administration in the rat. *Exp Neurol* 84, 428–440.

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

[107] Ting, K. K., Brew, B. J., and Guillemin, G. J. (2009) Effect of quinolinic acid on human astrocytes morphology and functions: implications in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 6, 36.

[108] Rahman, A., Ting, K., Cullen, K. M., Braidy, N., Brew, B. J., and Guillemin, G. J. (2009) The excitotoxin quinolinic acid induces tau phosphorylation in human neurons. *PLoS One* 4, e6344.

[109] Lapin, I. P. (1978) Stimulant and convulsive effects of kynurenes injected into brain ventricles in mice. *J Neural Transm* 42, 37–43.

[110] Stone, T. W., and Perkins, M. N. (1981) Quinolinic acid: a potent endogenous excitant at amino acid receptors in CNS. *Eur J Pharmacol* 72, 411–412.

[111] Schwarcz, R., Whetsell, W., Jr, and Mangano, R. M. (1983) Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science* 219, 316–318.

[112] Stípek, S., Stastný, F., Pláteník, J., Crkovská, J., and Zima, T. (1997) The effect of quinolinate on rat brain lipid peroxidation is dependent on iron. *Neurochem Int* 30, 233–237.

[113] Guillemin, G. J., Meininger, V., and Brew, B. J. (2005) Implications for the kynurene pathway and quinolinic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 2, 166–176.

[114] Erhardt, S., Schwieler, L., Nilsson, L., Linderholm, K., and Engberg, G. (2007) The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia. *Physiol Behav* 92, 203–209.

[115] Heyes, M. P., Swartz, K. J., Markey, S. P., and Beal, M. F. (1991) Regional brain and cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 122, 265–269.

[116] Steiner, J., Walter, M., Gos, T., Guillemin, G. J., Bernstein, H.-G., Sarnyai, Z., Mawrin, C., Brisch, R., Bielau, H., Meyer zu Schwabedissen, L., Bogerts, B., and Myint, A.-M. (2011) Severe depression is associated with increased microglial quinolinic acid in subregions of the anterior cingulate gyrus: evidence for an immune-modulated glutamatergic neurotransmission? *J Neuroinflammation* 8, 94.

[117] Zimmerman, A. W., Jyonouchi, H., Comi, A. M., Connors, S. L., Milstien, S., Varsou, A., and Heyes, M. P. (2005) Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism. *Pediatr Neurol* 33, 195–201.

[118] Pfefferkorn, E. R. (1984) Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 908–912.

[119] Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A. L. (1998) Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191–1193.

[120] Mellor, A. L., and Munn, D. H. (2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4, 762–774.

[121] Feng, C., Gao, J., Zhen, Q., Fan, Z., Zhu, M., Yang, X., and Ding, M. (2013) [Simultaneous determination of tryptophan and its metabolites in plasma by high performance liquid chromatography with on-column derivatization]. *Se Pu* 31, 577–581.

[122] Nilsen, R. M., Bjørke-Monsen, A.-L., Midttun, O., Nygård, O., Pedersen, E. R., Ulvik, A., Magnus, P., Gjessing, H. K., Vollset, S. E., and Ueland, P. M. (2012) Maternal tryptophan and kynurenine pathway metabolites and risk of preeclampsia. *Obstet Gynecol* 119, 1243–1250.

[123] Kudo, Y., Boyd, C. A. R., Sargent, I. L., and Redman, C. W. G. (2003) Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 188, 719–726.

[124] SPRINCE, H., LOWY, R. S., FOLSOME, C. E., and BEHRMAN, J. S. (1951) Studies on the urinary excretion of "xanthurenic acid" during normal and abnormal pregnancy: a survey of the excretion of "xanthurenic acid" in normal nonpregnant, normal pregnant, pre-eclamptic, and eclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 62, 84–92.

[125] Rose, D. P., and Braidman, I. P. (1971) Excretion of tryptophan metabolites as affected by pregnancy, contraceptive steroids, and steroid hormones. *Am J Clin Nutr* 24, 673–683.

[126] Terness, P., Bauer, T. M., Röse, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002) Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196, 447–457.

[127] McIlroy, D., Tanguy-Royer, S., Le Meur, N., Guisle, I., Royer, P.-J., Léger, J., Meflah, K., and Grégoire, M. (2005) Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J Leukoc Biol* 78, 794–803.

[128] Varesio, L., Clayton, M., Blasi, E., Ruffman, R., and Radzioch, D. (1990) Picolinic acid, a catabolite of tryptophan, as the second signal in the activation of IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol* 145, 4265–4271.

[129] Bosco, M. C., Rapisarda, A., Massazza, S., Melillo, G., Young, H., and Varesio, L. (2000) The tryptophan catabolite picolinic acid selectively induces the chemokines macrophage inflammatory protein-1 alpha and -1 beta in macrophages. *J Immunol* 164, 3283–3291.

[130] Fernandez-Pol, J. A., and Johnson, G. S. (1977) Selective toxicity induced by picolinic acid in simian virus 40-transformed cells in tissue culture. *Cancer Res* 37, 4276–4279.

[131] Fernandez-Pol, J. A., Klos, D. J., and Hamilton, P. D. (2001) Antiviral, cytotoxic and apoptotic activities of picolinic acid on human immunodeficiency virus-1 and human herpes simplex virus-2 infected cells. *Anticancer Res* 21, 3773–3776.

[132] Shimizu, T., and Tomioka, H. (2006) Activity of picolinic acid in combination with the antiprotozoal drug quinacrine against *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3186–3188.

[133] Cai, S., Sato, K., Shimizu, T., Yamabe, S., Hiraki, M., Sano, C., and Tomioka, H. (2006) Antimicrobial activity of picolinic acid against extracellular and intracellular *Mycobacterium avium* complex and its combined activity with clarithromycin, rifampicin and fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother* 57, 85–93.

[134] Ruffmann, R., Schlick, R., Chirigos, M. A., Budzynsky, W., and Varesio, L. (1987) Antiproliferative activity of picolinic acid due to macrophage activation. *Drugs Exp Clin Res* 13, 607–614.

[135] Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G. B. (2002) Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196, 459–468.

[136] Song, H., Park, H., Kim, Y.-S., Kim, K. D., Lee, H.-K., Cho, D.-H., Yang, J.-W., and Hur, D. Y. (2011) L-kynurenine-induced apoptosis in human NK cells is mediated by reactive oxygen species. *Int Immunopharmacol* 11, 932–938.

[137] Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A., and Vitale, M. (2006) The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 108, 4118–4125.

[138] Mosienko, V., Bert, B., Beis, D., Matthes, S., Fink, H., Bader, M., and Alenina, N. (2012) Exaggerated aggression and decreased anxiety in mice deficient in brain serotonin. *Transl Psychiatry* 2, e122.

[139] Myint, A. M., Schwarz, M. J., Steinbusch, H. W. M., and Leonard, B. E. (2009) Neuropsychiatric disorders related to interferon and interleukins treatment. *Metab Brain Dis* 24, 55–68.

[140] Jacobsen, J. P. R., Medvedev, I. O., and Caron, M. G. (2012) The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg439His knockin mouse. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367, 2444–2459.

[141] Cases, O., Seif, I., Grimsby, J., Gaspar, P., Chen, K., Pournin, S., Müller, U., Aguet, M., Babinet, C., and Shih, J. C. (1995) Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science* 268, 1763–1766.

[142] Davis, S., Heal, D. J., and Stanford, S. C. (1995) Long-lasting effects of an acute stress on the neurochemistry and function of 5-hydroxytryptaminergic neurones in the mouse brain. *Psychopharmacology (Berl)* 118, 267–272.

[143] Myint, A.-M., Schwarz, M. J., and Müller, N. (2012) The role of the kynureneine metabolism in major depression. *J Neural Transm* 119, 245–251.

[144] Jia, H.-M., Feng, Y.-F., Liu, Y.-T., Chang, X., Chen, L., Zhang, H.-W., Ding, G., and Zou, Z.-M. (2013) Integration of (1)H NMR and UPLC-Q-TOF/MS for a Comprehensive Urinary Metabonomics Study on a Rat Model of Depression Induced by Chronic Unpredictable Mild Stress. *PLoS One* 8, e63624.

[145] Kim, H., Chen, L., Lim, G., Sung, B., Wang, S., McCabe, M. F., Rusanescu, G., Yang, L., Tian, Y., and Mao, J. (2012) Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *J Clin Invest* 122, 2940–2954.

[146] Raison, C. L., Dantzer, R., Kelley, K. W., Lawson, M. A., Woolwine, B. J., Vogt, G., Spivey, J. R., Saito, K., and Miller, A. H. (2010) CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenes during immune stimulation with IFN-alpha: relationship to CNS immune responses and depression. *Mol Psychiatry* 15, 393–403.

[147] Musso, T., Gusella, G. L., Brooks, A., Longo, D. L., and Varesio, L. (1994) Interleukin-4 inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human monocytes. *Blood* 83, 1408–1411.

[148] O'Connor, J. C., Lawson, M. A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., Castanon, N., Kelley, K. W., and Dantzer, R. (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. *Mol Psychiatry* 14, 511–522.

[149] Müller, N., and Schwarz, M. J. (2008) COX-2 inhibition in schizophrenia and major depression. *Curr Pharm Des* 14, 1452–1465.

[150] Myint, A. M., Bondy, B., Baghai, T. C., Eser, D., Nothdurfter, C., Schüle, C., Zill, P., Müller, N., Rupprecht, R., and Schwarz, M. J. (2013) Tryptophan metabolism and immunogenetics in major depression: a role for interferon-? gene. *Brain Behav Immun* 31, 128–133.

[151] Miller, C. L., Llenos, I. C., Cwik, M., Walkup, J., and Weis, S. (2008) Alterations in kynureneine precursor and product levels in schizophrenia and bipolar disorder. *Neurochem Int* 52, 1297–1303.

[152] Myint, A.-M., Kim, Y. K., Verkerk, R., Scharpé, S., Steinbusch, H., and Leonard, B. (2007) Kynureneine pathway in major depression: evidence of impaired neuroprotection. *J Affect Disord* 98, 143–151.

[153] Kohl, C., Walch, T., Huber, R., Kemmler, G., Neurauter, G., Fuchs, D., Sölder, E., Schröcksna del, H., and Sperner-Unterweger, B. (2005) Measurement of tryptophan, kynurenone and neopterin in women with and without postpartum blues. *J Affect Disord* 86, 135–142.

[154] Konsman, J. P., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* 25, 154–159.

[155] Swardfager, W., Herrmann, N., Dowlati, Y., Oh, P. I., Kiss, A., Walker, S. E., and Lanctôt, K. L. (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase activation and depressive symptoms in patients with coronary artery disease. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1560–1566.

[156] Maes, M., Verkerk, R., Bonaccorso, S., Ombelet, W., Bosmans, E., and Scharpé, S. (2002) Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenone, a phenomenon which is related to immune activation. *Life Sci* 71, 1837–1848.

[157] Almeida, O. P., Norman, P., Hankey, G. J., Jamrozik, K., and Flicker, L. (2007) The association between C-reactive protein concentration and depression in later life is due to poor physical health: results from the Health in Men Study (HIMS). *Psychol Med* 37, 1775–1786.

[158] Hamer, M., Molloy, G. J., de Oliveira, C., and Demakakos, P. (2009) Leisure time physical activity, risk of depressive symptoms, and inflammatory mediators: the English Longitudinal Study of Ageing. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1050–1055.

[159] Pasco, J. A., Nicholson, G. C., Williams, L. J., Jacka, F. N., Henry, M. J., Kotowicz, M. A., Schneider, H. G., Leonard, B. E., and Berk, M. (2010) Association of high-sensitivity C-reactive protein with de novo major depression. *Br J Psychiatry* 197, 372–377.

[160] Aced, A., and Möckl, H. *Liquidchromatographie*; VCH, 1991.

[161] Skoog, D. A., and Leary, J. J. *Instrumentelle Analytik*; Springer Verlag, 1996.

[162] Meyer, V. *Praxis der Hochleistungs- Flüssigchromatographie, 8. Auflage*; Otto Salle Verlag, 1999.

[163] Kromidas, S. *HPLC-Tips Die schnelle Hilfe für Anwender, Band I*; Verlag Hoppenstedt GmbH, 1997.

[164] Schütze, G. *Charakterisierung von Nierenablagerungen in Ratten nach wiederholter Verabreichung eines neuen Antibiotikums*; Diplomarbeit am Antibiotic Research Institute der Firma SANDOZ, Wien, 2004.

[165] Kromidas, S. *HPLC-Tips Die schnelle Hilfe für Anwender, Band II*; Verlag Hoppenstedt GmbH, 2003.

[166] Schröder, E. *Massenspektrometrie: Begriffe und Definitionen*; Springer-Verlag, 1991.

[167] Budzikiewicz, H., and Schäfer, M. *Massenspektrometrie: Eine Einführung*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.

[168] Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Fujii, H., Wada, H., Noma, A., and Seishima, M. (1998) Species differences in L-tryptophan-kynurenine pathway metabolism: quantification of anthranilic acid and its related enzymes. *Arch Biochem Biophys* 358, 329–335.

[169] Cannazza, G., Baraldi, M., Braghieri, D., Tait, A., and Parenti, C. (2003) High-performance liquid chromatographic method for the quantification of anthranilic and 3-hydroxyanthranilic acid in rat brain dialysate. *J Pharm Biomed Anal* 32, 287–293.

[170] Kapoor, V., Kapoor, R., and Chalmers, J. (1994) Kynurenic acid, an endogenous glutamate antagonist, in SHR and WKY rats: possible role in central blood pressure regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21, 891–896.

[171] Heyes, M. P., Saito, K., Lackner, A., Wiley, C. A., Achim, C. L., and Markey, S. P. (1998) Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J* 12, 881–896.

[172] Mackay, G. M., Forrest, C. M., Stoy, N., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T. W., and Darlington, L. G. (2006) Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with chronic brain injury. *Eur J Neurol* 13, 30–42.

[173] Kim, Y.-K., Myint, A.-M., Verkerk, R., Scharpe, S., Steinbusch, H., and Leonard, B. (2009) Cytokine changes and tryptophan metabolites in medication-naïve and medication-free schizophrenic patients. *Neuropsychobiology* 59, 123–129.

[174] Munipally, P. K., AgraHarm, S. G., Valavala, V. K., Gundae, S., and Turlapati, N. R. (2011) Evaluation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression and kynurenine pathway metabolites levels in serum samples of diabetic retinopathy patients. *Arch Physiol Biochem* 117, 254–258.

[175] Deng, C., and Deng, Y. (2003) Diagnosis of maple syrup urine disease by determination of L-valine, L-isoleucine, L-leucine and L-phenylalanine in neonatal blood spots by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 792, 261–268.

[176] Beretta, G., Artali, R., Caneva, E., Orlandini, S., Centini, M., and Facino, R. M. (2009) Quinoline alkaloids in honey: further analytical (HPLC-DAD-ESI-MS, multidimensional diffusion-ordered NMR spectroscopy), theoretical and chemometric studies. *J Pharm Biomed Anal* 50, 432–439.

[177] Boni, R. L., Simpson, J. T., Naritsin, D. B., Saito, K., and Markey, S. P. (1994) Quantification of L-tryptophan and L-kynurenine by liquid chromatography/electron capture negative ion chemical ionization mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom* 23, 27–32.

[178] Möller, M., Du Preez, J. L., and Harvey, B. H. (2012) Development and validation of a single analytical method for the determination of tryptophan, and its kynurenine metabolites in rat plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 898, 121–129.

[179] Schwarz, M. J., Offenbaecher, M., Neumeister, A., Ewert, T., Willeit, M., Praschak-Rieder, N., Zach, J., Zacherl, M., Lossau, K., Weisser, R., Stucki, G., and Ackenheil, M. (2002) Evidence for an altered tryptophan metabolism in fibromyalgia. *Neurobiol Dis* 11, 434–442.

[180] Ghosh, C., Marchi, N., Hossain, M., Rasmussen, P., Alexopoulos, A. V., Gonzalez-Martinez, J., Yang, H., and Janigro, D. (2012) A pro-convulsive carbamazepine metabolite: quinolinic acid in drug resistant epileptic human brain. *Neurobiol Dis* 46, 692–700.

[181] Passing, H., and Bablok, (1983) A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem* 21, 709–720.

[182] DIN 32645:2004. *Deutsches Institut für Normung*

[183] Schmitt, G., and Herbold, M. (2004) Elektronisches Handbuch des Programms DINTEST.

[184] Oades, R. D., Dauvermann, M. R., Schimmelmann, B. G., Schwarz, M. J., and Myint, A.-M. (2010) Attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) and glial integrity: S100B, cytokines and kynurenone metabolism—effects of medication. *Behav Brain Funct* 6, 29.

[185] Chiarugi, A., Calvani, M., Meli, E., Traggiai, E., and Moroni, F. (2001) Synthesis and release of neurotoxic kynurenone metabolites by human monocyte-derived macrophages. *J Neuroimmunol* 120, 190–198.

[186] Hiratsuka, C., Fukuwatari, T., and Shibata, K. (2012) Fate of dietary tryptophan in young Japanese women. *Int J Tryptophan Res* 5, 33–47.

[187] Lesniak, W. G., Jyoti, A., Mishra, M. K., Louissaint, N., Romero, R., Chugani, D. C., Kannan, S., and Kannan, R. M. (2013) Concurrent quantification of tryptophan and its major metabolites. *Anal Biochem* 443, 222–231.

[188] Huang, Y., Louie, A., Yang, Q., Massenkoff, N., Xu, C., Hunt, P. W., and Gee, W. (2013) A simple LC-MS/MS method for determination of kynurenone and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients. *Bioanalysis* 5, 1397–1407.

[189] Perry, H., and Keevil, B. (2008) Online extraction of 5-hydroxyindole acetic acid from urine for analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 45, 149–152.

[190] Ohashi, H., Iizuka, H., Yoshihara, S., Otani, H., Kume, M., Sadamoto, K., Ichiba, H., and Fukushima, T. (2013) Determination of L-tryptophan and L-kynurenone in Human Serum by using LC-MS after Derivatization with (R)-DBD-PyNCS. *Int J Tryptophan Res* 6, 9–14.

[191] Toyo'oka, T., and Liu, Y. M. (1995) Determination of D- and L-amino acid residues in peptides with fluorescent chiral tagging reagents by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 40, 645–651.

[192] Toyo'oka, T., Jin, D., Tomoi, N., Oe, T., and Hiranuma, H. (2001) R(-)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole, a fluorescent chiral tagging reagent: sensitive resolution of chiral amines and amino acids by reversed-phase liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 15, 56–67.

[193] Guillén-Casla, V., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., Pérez-Arribas, L. V., and Polo-Díez, L. M. (2012) Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection. *J Chromatogr A* 1232, 158–165.

[194] Badawy, A. A.-B., and Morgan, C. J. (2010) Rapid Isocratic Liquid Chromatographic Separation and Quantification of Tryptophan and Six kynurenone Metabolites in Biological Samples with Ultraviolet and Fluorimetric Detection. *Int J Tryptophan Res* 3, 175–186.

[195] Monaghan, P. J., Brown, H. A., Houghton, L. A., and Keevil, B. G. (2009) Measurement of serotonin in platelet depleted plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877, 2163–2167.

[196] Luthardt, M., Than, E., and Heckendorf, H. (1987) Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze analytischer Verfahren. *Fresenius Z Anal Chem* 326, 331–339.

[197] Ebel, S., and Kamm, K. (1983) Statistische Definiton der Bestimmungsgrenze. *Fresenius Z Anal Chem* 316, 382–385.

[198] Neitzel, V. (2002) Lineare Kalibrationsfunktionen. *CLB Chemie in Labor und Biotechnik* 1.

[199] Winkler, D., Beconi, M., Toledo-Sherman, L. M., Prime, M., Ebneth, A., Dominguez, C., and Muñoz-Sanjuan, I. (2013) Development of LC/MS/MS, high-throughput enzymatic and cellular assays for the characterization of compounds that inhibit kynurenone monooxygenase (KMO). *J Biomol Screen* 18, 879–889.

[200] Wang, X.-D., Horning, K. J., Notarangelo, F. M., and Schwarcz, R. (2013) A method for the determination of D-kynurenone in biological tissues. *Anal Bioanal Chem* 405, 9747–9754.

[201] Bühl, A. *SPSS 16 einführung in die moderne Datenanalyse*; Pearson Studium, 2008.

[202] Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L., and Chavez-Eng, C. M. (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem* 75, 3019–3030.

[203] Buhrman, D. L., Price, P. I., and Rudewiczcor, P. J. (1996) Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *J Am Soc Mass Spectrom* 7, 1099–1105.

[204] König, K., Goethel, S. F., Rusu, V. M., and Vogeser, M. (2013) Deproteination of serum samples for LC-MS/MS analyses by applying magnetic micro-particles. *Clin Biochem* 46, 652–655.

[205] Møller, S. E. (1985) Tryptophan to competing amino acids ratio in depressive disorder: relation to efficacy of antidepressive treatments. *Acta Psychiatr Scand Suppl* 325, 3–31.

[206] Kaneko, M., Watanabe, K., and Kumashiro, H. (1992) Plasma ratios of tryptophan and tyrosine to other large neutral amino acids in manic-depressive patients. *Jpn J Psychiatry Neurol* 46, 711–720.

[207] Miller, H. L., Delgado, P. L., Salomon, R. M., Licinio, J., Barr, L. C., and Charney, D. S. (1992) Acute tryptophan depletion: a method of studying antidepressant action. *J Clin Psychiatry* 53 Suppl, 28–35.

[208] Moreno, F. A., McGavin, C., Malan, T. P., Gelenberg, A. J., Heninger, G. R., Mathé, A. A., and Delgado, P. L. (2000) Tryptophan depletion selectively reduces CSF 5-HT metabolites in healthy young men: results from single lumbar puncture sampling technique. *Int J Neuropsychopharmacol* 3, 277–283.

[209] Zepf, F. D. et al. (2014) Acute tryptophan depletion - converging evidence for decreasing central nervous serotonin synthesis in rodents and humans. *Acta Psychiatr Scand* 129, 157–159.

[210] Johnsen, M. S., Grimnes, G., Figenschau, Y., Torjesen, P. A., Almås, B., and Jorde, R. (2014) Serum free and bio-available 25-hydroxyvitamin D correlate better with bone density than serum total 25-hydroxyvitamin D. *Scand J Clin Lab Invest*

[211] Silbernagel, S., and Despopoulos, A. *Taschenatlas Physiologie* 7. Auflage; Thieme, 2007.

[212] van Donkelaar, E. L., Blokland, A., Ferrington, L., Kelly, P. A. T., Steinbusch, H. W. M., and Prickaerts, J. (2011) Mechanism of acute tryptophan depletion: is it only serotonin? *Mol Psychiatry* 16, 695–713.

[213] Hijikata, Y., Hara, K., Shiozaki, Y., Murata, K., and Sameshima, Y. (1984) Determination of free tryptophan in plasma and its clinical applications. *J Clin Chem Clin Biochem* 22, 291–299.

[214] Jagannathan, V., March, C., and Venitz, J. (1995) Determination of unbound L-tryptophan in human plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 9, 305–308.

[215] Souci, S., Fachmann, W., and Kraut, H. *Die Zusammensetzung der Lebensmittel. Nährwerttabelle* 6. Auflage; medpharm GmbH Scientific Publishers, 2000.

[216] Wurtman, R. J., and Fernstrom, J. D. (1975) Control of brain monoamine synthesis by diet and plasma amino acids. *Am J Clin Nutr* 28, 638–647.

[217] Suzuki, Y., Suda, T., Yokomura, K., Suzuki, M., Fujie, M., Furuhashi, K., Hahimoto, D., Enomoto, N., Fujisawa, T., Nakamura, Y., Inui, N., Nakano, Y., Nakamura, H., and Chida, K. (2011) Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *J Infect* 63, 215–222.

[218] Fotopoulou, C., Sehouli, J., Pschowski, R., VON Haehling, S., Domanska, G., Braicu, E.-I., Fusch, G., Reinke, P., and Schefold, J. C. (2011) Systemic changes of tryptophan catabolites via the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in primary cervical cancer. *Anticancer Res* 31, 2629–2635.

[219] Ishii, K., Ogaya, T., Song, Z., Iizuka, H., and Fukushima, T. (2010) Changes in the plasma concentrations of D-kynurenine and kynurenic acid in rats after intraperitoneal administration of tryptophan enantiomers. *Chirality* 22, 901–906.

[220] Ishii, K., Iizuka, H., Ogaya, T., Song, Z., and Fukushima, T. (2011) Comparative study on kynurenic acid production in the rat striatum by tryptophan enantiomers: an in vivo microdialysis study. *Chirality* 23 Suppl 1, E12–E15.

[221] Leklem, J. E., Woodford, J., and Brown, R. R. (1969) Comparative tryptophan metabolism in cats and rats: differences in adaptation of tryptophan oxygenase and in vivo metabolism of tryptophan, kynurenine and hydroxykynurenine. *Comp Biochem Physiol* 31, 95–109.

[222] Stimson, R. H., Mohd-Shukri, N. A., Bolton, J. L., Andrew, R., Reynolds, R. M., and Walker, B. R. (2013) The post-prandial rise in plasma cortisol in men is mediated by macronutrient-specific stimulation of adrenal and extra-adrenal cortisol production. *J Clin Endocrinol Metab*

[223] Chang, B. S., Kendrick, B. S., and Carpenter, J. F. (1996) Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci* 85, 1325–1330.

[224] Hoffmann, J. N., Hartl, W. H., Faist, E., Jochum, M., and Inthorn, D. (1997) Tumor necrosis factor measurement and use of different anticoagulants: possible interference in plasma samples and supernatants from endotoxin-stimulated monocytes. *Inflamm Res* 46, 342–347.

[225] Lykkesfeldt, J. (2012) Ascorbate and dehydroascorbic acid as biomarkers of oxidative stress: validity of clinical data depends on vacutainer system used. *Nutr Res* 32, 66–69.

[226] Shih, J., Datwyler, S. A., Hsu, S. C., Matias, M. S., Pacenti, D. P., Lueders, C., Mueller, C., Danne, O., and Möckel, M. (2008) Effect of collection tube type and preanalytical handling on myeloperoxidase concentrations. *Clin Chem* 54, 1076–1079.

[227] Biancotto, A., Feng, X., Langweiler, M., Young, N. S., and McCoy, J. P. (2012) Effect of anti-coagulants on multiplexed measurement of cytokine/chemokines in healthy subjects. *Cytokine* 60, 438–446.

[228] Yu, C.-L., Falk, R. T., Kimlin, M. G., Rajaraman, P., Sigurdson, A. J., Horst, R. L., Cosentino, L. M., Linet, M. S., and Freedman, D. M. (2010) The impact of delayed blood centrifuging, choice of collection tube, and type of assay on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Cancer Causes Control* 21, 643–648.

[229] Tahir, M. Z., Thoumire, S., Raffaelli, M., Grimard, B., Reynaud, K., and Chastant-Maillard, S. (2013) Effect of blood handling conditions on progesterone assay results obtained by chemiluminescence in the bitch. *Domest Anim Endocrinol* 45, 141–144.

[230] Rowley, S. D. (2002) Regulation of hematopoietic stem cell processing and transplantation. *Int J Hematol* 75, 237–245.

[231] Taupin, P. (2006) Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. *Med Sci Monit* 12, RA75–RA78.

[232] Kocki, T., Kocki, J., Wielosz, M., Turski, W. A., and Urbanska, E. M. (2004) Carbamazepine enhances brain production of kynurenic acid in vitro. *Eur J Pharmacol* 498, 325–326.

[233] Kocki, T., Wielosz, M., Turski, W. A., and Urbanska, E. M. (2006) Enhancement of brain kynurenic acid production by anticonvulsants—novel mechanism of antiepileptic activity? *Eur J Pharmacol* 541, 147–151.

[234] Coggan, S. E., Smythe, G. A., Bilgin, A., and Grant, R. S. (2009) Age and circadian influences on picolinic acid concentrations in human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 108, 1220–1225.

[235] Rapoport, M. I., and Beisel, W. R. (1968) Circadian periodicity of tryptophan metabolism. *J Clin Invest* 47, 934–939.

[236] Krieger, D. T., Allen, W., Rizzo, F., and Krieger, H. P. (1971) Characterization of the normal temporal pattern of plasma corticosteroid levels. *J Clin Endocrinol Metab* 32, 266–284.

[237] Debono, M., Ghobadi, C., Rostami-Hodjegan, A., Huatan, H., Campbell, M. J., Newell-Price, J., Darzy, K., Merke, D. P., Arlt, W., and Ross, R. J. (2009) Modified-release hydrocortisone to provide circadian cortisol profiles. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 1548–1554.

[238] Chan, S., and Debono, M. (2010) Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab* 1, 129–138.

[239] Rimmele, U., Meier, F., Lange, T., and Born, J. (2010) Suppressing the morning rise in cortisol impairs free recall. *Learn Mem* 17, 186–190.

[240] Fidan, V., Alp, H. H., Gozeler, M., Karaaslan, O., Binay, O., and Cingi, C. (2013) Variance of melatonin and cortisol rhythm in patients with allergic rhinitis. *Am J Otolaryngol* 34, 416–419.

[241] Haus, E., and Smolensky, M. H. (1999) Biologic rhythms in the immune system. *Chronobiol Int* 16, 581–622.

[242] Petrovsky, N. (2001) Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction. *Immunol Cell Biol* 79, 350–357.

[243] Hermann, C., von Aulock, S., Dehus, O., Keller, M., Okigami, H., Gantner, F., Wendel, A., and Hartung, T. (2006) Endogenous cortisol determines the circadian rhythm of lipopolysaccharide—but not lipoteichoic acid—inducible cytokine release. *Eur J Immunol* 36, 371–379.

[244] Besedovsky, L., Lange, T., and Born, J. (2012) Sleep and immune function. *Pflugers Arch* 463, 121–137.

[245] Dimitrov, S., Lange, T., Benedict, C., Nowell, M. A., Jones, S. A., Scheller, J., Rose-John, S., and Born, J. (2006) Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J* 20, 2174–2176.

[246] Lange, T., Dimitrov, S., and Born, J. (2010) Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Ann N Y Acad Sci* 1193, 48–59.

[247] Schroecksnadel, S., Jenny, M., and Fuchs, D. (2011) Myelomonocytic THP-1 cells for in vitro testing of immunomodulatory properties of nanoparticles. *J Biomed Nanotechnol* 7, 209–210.

[248] Krause, D. L., Riedel, M., Müller, N., Weidinger, E., Schwarz, M. J., and Myint, A.-M. (2012) Effects of antidepressants and cyclooxygenase-2 inhibitor on cytokines and kynurenes in stimulated in vitro blood culture from depressed patients. *Inflammopharmacology* 20, 169–176.

[249] Gibney, S. M., McGuinness, B., Prendergast, C., Harkin, A., and Connor, T. J. (2013) Poly I:C-induced activation of the immune response is accompanied by depression and anxiety-like behaviours, kynurene pathway activation and reduced BDNF expression. *Brain Behav Immun* 28, 170–181.

[250] Schwarz, M. J., Guillemin, G. J., Teipel, S. J., Buerger, K., and Hampel, H. (2013) Increased 3-hydroxykynurene serum concentrations differentiate Alzheimer's disease patients from controls. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 263, 345–352.

[251] Schubert, P., Ogata, T., Marchini, C., and Ferroni, S. (2001) Glia-related pathomechanisms in Alzheimer's disease: a therapeutic target? *Mech Ageing Dev* 123, 47–57.

[252] Guillemin, G. J. (2012) Quinolinic acid, the inescapable neurotoxin. *FEBS J* 279, 1356–1365.

[253] Hartai, Z., Juhász, A., Rimanóczy, A., Janáky, T., Donkó, T., Dux, L., Penke, B., Tóth, G. K., Janka, Z., and Kálmán, J. (2007) Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 50, 308–313.

[254] Heyes, M. P., Saito, K., Crowley, J. S., Davis, L. E., Demitack, M. A., Der, M., Dilling, L. A., Elia, J., Kruesi, M. J., and Lackner, A. (1992) Quinolinic acid and kynurene pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 115 (Pt 5), 1249–1273.

[255] Baran, H., Jellinger, K., and Deecke, L. (1999) Kynurene metabolism in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 106, 165–181.

[256] Müller, N., Myint, A.-M., and Schwarz, M. J. (2012) Inflammation in schizophrenia. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88, 49–68.

[257] Schwartz, T. L., Sachdeva, S., and Stahl, S. M. (2012) Glutamate neurocircuitry: theoretical underpinnings in schizophrenia. *Front Pharmacol* 3, 195.

[258] Beal, M. F., Matson, W. R., Storey, E., Milbury, P., Ryan, E. A., Ogawa, T., and Bird, E. D. (1992) Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex. *J Neurol Sci* 108, 80–87.

[259] Beal, M. F., Matson, W. R., Swartz, K. J., Gamache, P. H., and Bird, E. D. (1990) Kynurene pathway measurements in Huntington's disease striatum: evidence for reduced formation of kynurenic acid. *J Neurochem* 55, 1327–1339.

[260] Jauch, D., Urba?ska, E. M., Guidetti, P., Bird, E. D., Vonsattel, J. P., Whetsell, W., Jr, and Schwarcz, R. (1995) Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases. *J Neurol Sci* 130, 39–47.

[261] Pearson, S. J., and Reynolds, G. P. (1992) Increased brain concentrations of a neurotoxin, 3-hydroxykynurenone, in Huntington's disease. *Neurosci Lett* 144, 199–201.

[262] Guidetti, P., Reddy, P. H., Tagle, D. A., and Schwarcz, R. (2000) Early kynurenergic impairment in Huntington's disease and in a transgenic animal model. *Neurosci Lett* 283, 233–235.

[263] Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J., and Schwarcz, R. (2004) Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiol Dis* 17, 455–461.

[264] Widner, B., Leblhuber, F., Walli, J., Tilz, G. P., Demel, U., and Fuchs, D. (1999) Degradation of tryptophan in neurodegenerative disorders. *Adv Exp Med Biol* 467, 133–138.

[265] Stoy, N., Mackay, G. M., Forrest, C. M., Christofides, J., Egerton, M., Stone, T. W., and Darlington, L. G. (2005) Tryptophan metabolism and oxidative stress in patients with Huntington's disease. *J Neurochem* 93, 611–623.

[266] Yamamoto, H. (1991) Studies on CSF tryptophan metabolism in infantile spasms. *Pediatr Neurol* 7, 411–414.

[267] Yamamoto, H., Shindo, I., Egawa, B., and Horiguchi, K. (1994) Kynurenic acid is decreased in cerebrospinal fluid of patients with infantile spasms. *Pediatr Neurol* 10, 9–12.

[268] Füvesi, J., Rajda, C., Bencsik, K., Toldi, J., and Vécsei, L. (2012) The role of kynurenines in the pathomechanism of amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis: therapeutic implications. *J Neural Transm* 119, 225–234.

[269] Graves, M. C., Fiala, M., Dinglasan, L. A. V., Liu, N. Q., Sayre, J., Chiappelli, F., van Kooten, C., and Vinters, H. V. (2004) Inflammation in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord and brain is mediated by activated macrophages, mast cells and T cells. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 5, 213–219.

[270] Henkel, J. S., Engelhardt, J. I., Siklós, L., Simpson, E. P., Kim, S. H., Pan, T., Goodman, J. C., Siddique, T., Beers, D. R., and Appel, S. H. (2004) Presence of dendritic cells, MCP-1, and activated microglia/macrophages in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Ann Neurol* 55, 221–235.

[271] McGeer, P. L., and McGeer, E. G. (2002) Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 26, 459–470.

[272] Chen, Y., Stankovic, R., Cullen, K. M., Meininger, V., Garner, B., Coggan, S., Grant, R., Brew, B. J., and Guillemin, G. J. (2010) The kynurenine pathway and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurotox Res* 18, 132–142.

[273] Monaco, F., Fumero, S., Mondino, A., and Mutani, R. (1979) Plasma and cerebrospinal fluid tryptophan in multiple sclerosis and degenerative diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 42, 640–641.

[274] Rejdak, K., Petzold, A., Kocki, T., Kurzepa, J., Grieb, P., Turski, W. A., and Stelmasiak, Z. (2007) Astrocytic activation in relation to inflammatory markers during clinical exacerbation of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neural Transm* 114, 1011–1015.

[275] Rejdak, K., Bartosik-Psujek, H., Dobosz, B., Kocki, T., Grieb, P., Giovannoni, G., Turski, W. A., and Stelmasiak, Z. (2002) Decreased level of kynurenic acid in cerebrospinal fluid of relapsing-onset multiple sclerosis patients. *Neurosci Lett* 331, 63–65.

[276] Stapelberg, M. et al. (2013) Indoleamine-2,3-dioxygenase elevated in tumor-initiating cells is suppressed by mitocans. *Free Radic Biol Med* 67C, 41–50.

[277] Munn, D. H., and Mellor, A. L. (2007) Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest* 117, 1147–1154.

[278] Pantouris, G., and Mowat, C. G. (2014) Antitumour agents as inhibitors of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 443, 28–31.

[279] Löb, S., Königsrainer, A., Rammensee, H.-G., Opelz, G., and Terness, P. (2009) Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees? *Nat Rev Cancer* 9, 445–452.

Eidesstattliche Versicherung

Schütze, Gregor Alexander

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema
Entwicklung, Validierung und Anwendung einer HPLC-MS/MS-Methode zur
quantitativen Bestimmung von Tryptophan und seinen Metaboliten

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzelnen nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Geretsried, 21.10.2014

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand