

II MATERIAL UND METHODEN

1 Bezugsquellen von Feinchemikalien und Reagenzien

5-HT	Sigma
1-Methyltryptophan (1-MT)	Aldrich
1-Methyltryptophan (1-MT)-Pellets	Innovative Research of America
Aceton	Roth
Acrylamidlösung	Serva
Agarose	Sigma, Gibco
Ampicillin	USB
anorganische Salze, verschiedene	Sigma, Merck
Ammoniumpersulphat (APS)	Sigma
Bactoagar	Difco
Bactotrypton	Difco
Bayol F Mineralöl	Serva
β -Mercaptoethanol	Gibco
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Choleratoxin	Alexis
Cisplatin	Sigma
Concanavalin A	Sigma
Crotonöl	Sigma
Cyanol	Biozym
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
D-MEM	Gibco
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DNase I	Roche
dNTPs	Amersham
Desoxycorticosteronacetat (DOCA)-Pellets	Innovative Research of America
Etylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
ESGRO mLIF	Chemicon
Essigsäure	Roth
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	Sigma
Genitacin G418	Gibco
Glucose	Sigma
Glutamin	Gibco
Glycerin	Sigma
Gummi Arabicum	Sigma
Harnstoff	Stratagene
HBSS	Gibco
Hefeextrakt	Difco
Heparin	Roth
(Isopropyl-beta-D-Thiogalaktopyranosid) IPTG	bts
Isopropanol	Roth
Kanamycin	Serva
Kaolin	Sigma
Karmin	Sigma
MEM	Gibco
Methanol	Roth
Methylenblau	Riedel-DeHaen
Methylzellulose	Aldrich
Mineralöl	Sigma
Mitomycin C	Sigma
Molekulargewichtsmarker	Biolabs
Mowiol 4.88	Calbiochem

II MATERIAL & METHODEN

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Oxazolone (Ox)	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Perchlorsäure (PCA)	Fluka
PCR-Wachs	Biozym
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Primer	BIOTEZ
Random-Hexamere	Boehringer
RPMI 1640	Gibco
Saccharose	Merck
SerEx!	PAA
Serotonin	Sigma
TEMED	Sigma
³ Thymidin	NEN
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura
Tris	Sigma
TRIZOL	Gibco
Trypanblaulösung	Flow Laboratories
Tryptophan	Sigma
Tween 20	Sigma
X-Gal	Sigma, Biomol

2 Bezugsquellen von Enzymen und Kits

Antikörper	
Anit-Goat-Antikörper (FITC-gelabelt)	Sigma
Anti-MHC-II-Antikörper (FITC-gelabelt)	Santa Cruz
Anti-Rabbit-IgG (FITC-gelabelt)	Sigma
Anti-Rabbit-IgG (Peroxydase-gelabelt)	Sigma
Anti-Serotonin-Antikörper (Rabbit)	Sigma
Anti-TPH-Antikörper (Goat)	Santa Cruz
DNase I	Boehringer
Expand Long Template-PCR Kit	Boehringer
Jetstar Maxi Kit	Genomed
MuLV Reverse Transkriptase, inklusive DDT und RT-Puffer	Gibco
Proteinase K	Boehringer
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme, diverse	Gibco, NEB
RNase A	Boehringer Mannheim
RNasin	Promega
Sequagel XR Kit	national diagnostics
T4-DNA-Ligase, inklusive Ligations-Puffer	Promega
Taq-Polymerase, inklusive PCR-Puffer	Promega, Gibco
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham
TOPO-XL-Kit	Invitrogen

3 Bezugsquellen von Geräten

Agarosegelelektrophorese, verschiedene Kammern	Biometra
C18-Reversed Phase-Säule, 218TP104	Vydac
DNA-Sequenzgelelektrophorese, LI-COR 2000	MWG
Dosierpipetten, diverse Modelle	Eppendorf, Gilson
Drucksensor, TRN 050	Kent Scientific Co.

II MATERIAL & METHODEN

FACS-Gerät, Coulter Epics XL	Beckman Coulter
Hamilton 8-Kanalpipette	MWG
HPLC-Anlage (Komponenten: siehe Abschnitt II.8.2)	Shimadzu
Inkubatoren für Zellkultur, HeraCell	Heraeus
Kühlzentrifugen	Sorvall, Beckman
Mikrodialysemembran	Millipore
Multikanalpolygraph, CP640G	Nihon Kohden
OP-Besteck, Diverses	Fine Science Tools
Schüttel-Inkubator, G25	New Brunswick
Spektrophotometer, diverse	Kontron, Pharmacia
Stromquellen, EPS 500/400	Pharmacia
Telemetrieanlage und Telemetriesender, TA11PA-C20	Data Sciences International
Thermocycler, diverse	Biozym
Thermomixer, 5436	Eppendorf
Tischzentrifugen, diverse	Eppendorf, Heraeus
Transilluminator, TI 1	Biometra
Ultraschallgerät	Bandelin
Ultra-Turrax	IKA-Labortechnik
Vortex-Rüttler, K-550-GE	Scientific Industries
Zentrifugen, diverse	Eppendorf, Heraeus

<i>Lysispuffer</i>	<i>100 mM NaOH</i> <i>0.5 % SDS</i>
<i>TE-Puffer</i>	<i>10 mM Tris-HCl pH 8.0</i> <i>1 mM EDTA</i>

4.1.3 DNA aus Agarosegelen

Die durch Agarosegelelektrophorese nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (300 nm) visualisiert, die gewünschten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Ein Aliquot der isolierten DNA wurde erneut einer Agarosegelelektrophorese unterzogen und Ausbeute und Fragmentgröße durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsmarker abgeschätzt.

4.1.4 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von Total-RNA aus Zellen und Geweben wurde TRIZOL-Reagenz genutzt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. Gewebe wurden mit dem Ultra-Turrax homogenisiert (mindestens 2 x 30 sec), Zellen durch indirekten Ultraschall aufgeschlossen (ebenfalls mindestens 2 x 30 sec). Die durch Isopropanolfällung gereinigte RNA wurde anschließend in DEPC-Wasser aufgenommen.

Die RNA-Isolierung mit TRIZOL hat den Vorteil der geringen DNA-Kontamination. Trotzdem wurden die RNA-Präparationen vor ihrer Verwendung in der cDNA-Herstellung mit DNase I behandelt (Abschnitt II.4.5.3).

<i>DEPC-Wasser</i>	<i>0.1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)</i> <i>über Nacht bei 37 °C gerührt, dann autoklaviert</i>
--------------------	---

4.2 Konzentrationsbestimmungen

Die OD₂₆₀- und OD₂₈₀-Werte der Nukleinsäurelösungen wurden am Spektrophotometer bestimmt. Bei Verhältnissen von OD₂₆₀/OD₂₈₀ > 1.7 wurden die Proteinkonzentrationen vernachlässigt und die Nukleinsäurekonzentrationen folgendermaßen bestimmt:

DNA:	OD ₂₆₀ = 1 = 50 µg/ml doppelsträngige DNA
RNA:	OD ₂₆₀ = 1 = 40 µg/ml RNA

Verhältnisse von OD₂₆₀/OD₂₈₀ < 1.7 wiesen auf einen hohen Proteingehalt der Lösungen hin. Die Nukleinsäuren wurden in solchen Fällen durch Phenolextraktion gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989) und erneut vermessen.

4.3 Lagerung von Nukleinsäuren

DNA wurde in TE-Puffer (II.2.1.2) gelöst bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, RNA und cDNA dagegen in DEPC-Wasser (II.2.1.4) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Primerstocks wurden in TE-Puffer, die niedriger konzentrierten Arbeitslösungen dagegen in reinem Wasser bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Alle Nukleinsäuren wurden immer auf Eis aufgetaut.

4.4 Polymerasekettenreaction (PCR)

4.4.1 PCR zur Genotypbestimmung

Die PCR zur Bestimmung des Genotyps der Mäuse der TPH1-KO-Linie wurde folgendermaßen durchgeführt:

PCR-Ansatz:	Volumen	Endkonzentration
DNA-Lösung (Abschnitt III.4.1.1)	4 μl	
Primer Neo1L (7 μM)	0.75 μl	0.1 μM
Primer GTPHuni (7 μM)	0.75 μl	0.1 μM
Primer TPHEx2c (7 μM)	0.75 μl	0.1 μM
dNTPS (5 mM)	2 μl	200 μM
MgCl ₂ (50 mM)	2 μl	2 mM
DMSO	1 μl	2 %
PCR-Puffer (10 x)	5 μl	1 x
Taq-Polymerase (5 u/ μl)	0.2 μl	0.02 u/ μl
H ₂ O	ad 50 μl	

Die Ansätze wurden auf Eis in dünnwandigen PCR-Gefäßen zusammengestellt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und in die schon auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgeheizte PCR-Maschine überführt.

PCR-Programm:	Temperatur	Zeit	
Denaturierung	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	$95\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Annealing	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	30 sec	
Elongation	$72\text{ }^{\circ}\text{C}$	45 sec	

Anschließend erfolgte die Untersuchung der PCR-Produkte durch elektrophoretische Auftrennung auf einem 2 %igen Agarosegel.

Die Primer pTPHuni und Neo1I amplifizieren beim Vorliegen des *knock-out*-Allels eine 800 bp-Bande, die Primer pTPHuni und TPHEx2c eine circa 500 bp-Bande, wenn ein *wildtyp*-Allel vorhanden ist. Mit dieser „3-Primer-PCR“ können die Tiere mit einem PCR-Ansatz auf vorliegende *wildtyp*-Allele, *knock-out*-Allele oder beides zusammen untersucht werden. Neben der Zeit- und Materialersparnis liegt ein weiterer Vorteil darin, daß diese

Art der PCR gleichzeitig eine DNA-Kontrolle ist, da mindestens eine der beiden DNA-Fragmente amplifiziert werden muss.

Für die Untersuchung der gepickten ES-Zell-Klone zur Erstellung des IDO-Knockouts, also die IDO-Genotypisierung, wurde ein ähnliches Ansatzschema, jedoch mit anderen Primern und ohne Zugabe von DMSO pipettiert. Das verwendete PCR-Programm war ähnlich dem der TPH1-Genotypisierung, jedoch wurde die Annealingtemperatur auf 59 °C erhöht und die Elongationszeit auf 2 min verlängert. Die verwendeten Primer GIDOuni, GIDO2 und Neo1L ergaben folgende Banden: *wildtyp*-Allel 1000 bp (GIDOuni und GIDO2), beziehungsweise *knockout*-Allel 1300 bp (GIDOuni und Neo1L).

Die genauen Angaben zu den verwendeten Primer finden sich in Tabelle II.1.

Name	Orientierung	Position	Sequenz 5' --> 3'
GTPHuni	forward	<i>tp1</i> Intron 1	GGCTTTACAGCGTCTTAGGG
TPHex2c	reverse	<i>tp1</i> Exon 2	CAGCACTTTTATGAGTCCTCC
GIDOuni	forward	<i>ido</i> Intron 1	CCTCTGGCCTACACACAGGTGTACATGC
GIDO2	reverse	<i>ido</i> Exon 2	CTTTTCAACTTCTTCTCGAAGCTGCCC
Neo1L	reverse	Neo ^r -Gen	GTTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCC

Tabelle II.1: Genotypisierungsprimer.

4.4.2 PCR zur Klonierung kleiner Fragmente

Kurze DNA-Stücke, zum Beispiel der kurze Arm des IDO-Knockout-Targeting-Vektors, wurden mit einer PCR ähnlich der in Abschnitt II.4.4.1 beschriebenen amplifiziert. Die Elongationszeit betrug circa 1 min für 1 kb. Die verwendeten Primer werden in Tabelle II.2 aufgelistet.

Name	Orientierung	Position	Sequenz 5' --> 3'
IDOINT1Cla	forward	<i>ido</i> Intron 1	TTAAATCGATACACATTCACATGCATGT <u>ATAC</u>
IDOEX2Xho	reverse	<i>ido</i> Exon 2	ATTA <u>CTCGAG</u> TTCTCAATCAGCACAGG <u>CAG</u>

Tabelle II.2: Primer zur Klonierung des kurzen Armes des IDO-Targeting-Konstrukt. Unterstrichene Sequenzen = IDO-Sequenzen, fette Sequenzen = Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen.

4.4.3 PCR zur Klonierung großer Fragmente (Long Range PCR)

Zur Amplifikation langer DNA-Stücke, zum Beispiel des langen Arms des IDO-Knockout-Targeting-Vektors, wurde der Expand Long Template-Kit verwendet, welcher DNA-Polymerasen mit *proof reading*-Aktivität enthält. Es wurde hierbei nach beigefügter Vorschrift gearbeitet. Die Elongationszeit wurde etwas länger gewählt: 10 sec für 100 bp. Tabelle II.3 listet die verwendeten Primer auf.

II MATERIAL & METHODEN

Name	Orientierung	Position	Sequenz 5' --> 3'
IDOEX4Pme	forward	<i>ido</i> Exon 4	AATT GTTTAAACT GGAAGAAAAAGGAC CCC
IDOEX9Sal	reverse	<i>ido</i> Exon 9	AATT GTCGACCTTCTGGCAGCTTGGAG C

Tabelle II.3: Primer zur Klonierung des langen Armes des IDO-Targeting-Konstrukt. Unterstrichene Sequenzen = IDO-Sequenzen, fette Sequenzen = Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen.

4.4.4 PCR zum Nachweis der Genexpression

Zum Nachweis einer TPH1- oder TPH2-Genexpression wurde eine PCR analog zu der in Abschnitt III.4.4.1 beschriebenen PCR durchgeführt. Statt der DNA-Lösung wurden jedoch 4 µl der bei der Reversen Transkription erhaltenen cDNA-Lösung (Abschnitt II.4.5.3) als Template eingesetzt, sowie nur jeweils zwei Primer und kein DMSO verwendet. Das Schema des PCR-Programms entsprach ebenfalls der Genotypisierungs-PCR, die Elongationszeit betrug jedoch 40 sec, die Annealing Temperatur ist, wie andere Parameter, in Tabelle II.4 verzeichnet.

Gen	Primerkombination	Bandenlänge [bp]	Annealing Temperatur [°C]	Positivkontrolle (cDNA aus ...)
<i>tph1</i>	hmTPH1fw/hmTPH1rev	circa 280	55	Duodenum
<i>tph2</i>	mTPH2Utr5fw/mrTPH2Ex3rv	circa 280	52	Gehirn

Tabelle II.4: PCR zum Nachweis der TPH1- und TPH2-Genexpression.

In Tabelle II.5 sind die Daten zu den verwendeten Primer aufgelistet.

Name	Orientierung	Position	Sequenz 5' --> 3'
hmTPH1fw	forward	<i>tph1</i> Exon 7	CACTCAATATGTGAGACACAG
hmTPH1rev	reverse	<i>tph1</i> Exon 10	GGCTTTACTTTGGCATGTCC
mTPH2Utr5fw	forward	<i>tph2</i> vor Exon 1	AAAGAAAATTACATCGGGAGCC
mrTPH2Ex3rv	reverse	<i>tph2</i> Exon 3	TTCAGAACTTCTTCGCCGGG

Tabelle II.5: Primer zum Nachweis der TPH1- und TPH2-Genexpression.

4.4.5 Sequenzierung

DNA wurde mit der Kettenabbruchmethode sequenziert. Dazu wurde der „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ nach den Angaben des Herstellers benutzt, jedoch wurden 850 ng je 1 kb für jede Einzelreaktion (ddATP-, ddCTP-, ddGTP- und ddTTP-Reaktion) eingesetzt. Jede Einzelreaktion wurde als 4 µl-Ansatz inklusive der IRD-800 markierten Standard-Primer (M13universal und

M13reverse) in eine dünnwandigen PCR-96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit PCR-Wachs überschichtet. Nach Durchlaufen des PCR-Programmes (Schritt 1: 95 °C für 5 min; Schritt 2: 94 °C für 30 sec; Schritt 3: 55 °C für 30 sec; Schritt 4: 72 °C für 30 sec; Schritte 2 bis 4 wurden 34 mal wiederholt) wurden 8 µl Probenpuffer je Ansatz zugesetzt, die Proben 5 min bei 94 °C denaturiert und dann 1 µl jedes Ansatzes mit einer Hamilton-8-Kanalpipette auf ein denaturierendes Sequenzgel (Abschnitt II.4.6.2) aufgetragen. Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch kontinuierliche Fluoreszenz-Messung im LI-COR 2000-System. Die Sequenzen wurden anschließend mit der LI-COR-Software ausgewertet.

Bei wiederholt unklaren Sequenzierungsergebnissen oder wenn ein Sequenzierung über weite Bereiche erforderlich war, wurden die Proben durch die Firma INVITEK sequenziert.

4.5 Enzymatische Manipulationen der DNA

4.5.1 Ligation

Für die Ligation doppelsträngiger DNA in Vektor-DNA wurden folgende Ansätze genutzt: ca. 25 ng Vector-DNA, zu klonierendes Fragment im 2–5fachen molaren Überschuß, 1 µl des 10fach Ligasepuffers, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 u/µl) und H₂O ad 10 µl. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und dann vollständig für die Transformation in *Escherichia coli* (Abschnitt II.5.1) verwendet.

Für Klonierungen von PCR-Fragmenten in den TOPO-XL-Vektor wurden die Enzyme und Reagenzien des TOPO-XL-Kits nach den Angaben des Herstellers benutzt.

4.5.2 DNA-Hydrolyse durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme wurden mit den vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Reaktionspuffern verwendet.

Ein analytischer Restriktionsansatz enthielt ca. 0.2-1 µg DNA, 1 µl des entsprechenden 10fach-Puffers, 1 µl (circa 10 u) des Restriktionsenzym und H₂O ad 10 µl. Die Ansätze wurden 1-2 h bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Sollte DNA im präparativen Maßstab geschnitten werden, wurden bis zu 50 µg DNA in einem entsprechend vergrößerten Volumen mit circa 50 U Restriktionsenzym über Nacht angesetzt. Bei Doppelverdauungen wurde ein Puffer gewählt, in dem beide Restriktionsenzyme über ausreichende Aktivität verfügen.

4.5.3 Reverse Transkription

Die Erstellung von cDNA wurde folgendermaßen durchgeführt: pro Ansatz wurden zuerst 2 µg RNA mit DNase I (1 u) verdaut und das Enzym anschließend durch Hitze inaktiviert. Dann wurde die RNA mit 6.5 µM Random Hexamer-Primer in DEPC (Endvolumen

15.25 µl) für 3 min bei 80°C denaturiert und sofort auf 0°C abgekühlt. Danach wurde pro Ansatz folgender Mastermix hinzupipettiert :

Mastermix:	Volumen	Endkonzentration
1 st strand buffer (5x)	6 µl	1.2x
dNTPS (5 mM)	3 µl	600 µM
RNasin (40 u/µl)	0.75 µl	1.2 u/µl
DDT (100 mM)	3 µl	12 mM
M-MLV (200 u/µl)	2 µl	16 u/µl

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 42 °C gehalten, danach erfolgte wiederum für 10 min eine Denaturierung bei 80 °C, die mit der schnellen Abkühlung auf Eis endete. Die erhaltene cDNA-Lösung wurde dann für den Nachweis einer Genexpression verwendet (Abschnitt II.4.4.4).

4.6 Gelelektrophorese

4.6.1 Agarosegele

DNA-Moleküle wurden je nach erwarteter Länge in 1 bis 2 %igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden die DNA-Gemische mit circa 0.2 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt, auf die Agarosegele aufgetragen und in TAE-Puffer bei 1-8 V/cm gelelektrophoretisch behandelt. Zur Visualisierung der DNA wurden die Gele mit ca. 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und mit UV-Licht (300nm) bestrahlt. Die Größen und Konzentrationen der einzelnen aufgetrennten DNA-Banden konnten durch Vergleich mit Molekulargewichtsmarkern abgeschätzt werden.

TAE-Puffer 4.84 g Tris-HCL
 1.36 g Natriumacetat
 0.37 g EDTA
 ad 1000 ml H₂O
 mit Essigsäure auf pH 7.8 eingestellt

DNA-Proben- 4 g Saccharose
Puffer 2,5 mg Bromphenolblau
 ad 10 ml TE (Abschnitt II.4.1.2)

4.6.2 Polyacrylamidgele

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente aus den Sequenzierungsreaktionen wurden denaturierende Polyacrylamidgele und TBE als Laufpuffer benutzt. Sie wurden mit der Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung Sequagel XR und dem dazugehörigen Puffer nach

Anleitung mit TEMED und APS angesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 35 V/cm Gel und 50 °C im LI-COR 2000-System durchgeführt.

<i>TBE-Puffer</i>	16.2 g <i>Tris-Base</i> 2.75 g <i>Borsäure</i> 0.93 g <i>EDTA</i> ad 1000 ml <i>H₂O</i>
<i>Probenpuffer</i> <i>für Sequenzierung</i>	9.5 ml <i>Formamid (95 %)</i> 200 µl 0.5 M <i>EDTA</i> pH 7.6 300 µl <i>H₂O</i> 10 mg <i>Bromphenolblau</i> 10 mg <i>Cyanol</i>

5 Bakterien und Zellen

5.1 Bakterien und Transformation

Plasmidamplifikationen wurden in *Escherichia coli* K12DH5 α vorgenommen. Für die Transformation wurden kompetente Zellen nach der CaCl₂-Methode (Hanahan *et al.*, 1991) erstellt und bis zum Bedarf bei –80 °C gelagert. Die kompetenten Zellen wurden für ½ h mit dem Ligationsansatz (Abschnitt II.4.5.1) auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 37 °C für 45 sec und ein Kälteschock auf Eis für 3 min. Anschließend wurden die Zellen mit 750 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C im Thermomixer geschüttelt. Die Transformanten wurden auf Agar-LB-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin, X-Gal und IPTG ausgestrichen und bei 37 °C in einem Brutschrank über Nacht inkubiert. Ausgesuchte Kolonien wurden zur weiteren Plasmidamplifikation in LB-Medium bei 37 °C und 200 upm in einem Schüttelinkubator kultiviert. Die Transformanten wurden dabei immer unter Antibiotikaselektion gehalten (100µg/ml Ampicillin).

Für die Transformation des TOPO-XL-Vektors wurden die kompetenten *Escherichia coli* des TOPO-XL-Kits nach den Angaben des Herstellers benutzt und auf Kanamycin als Antibiotikum gehalten (50µg/ml Kanamycin).

<i>LB-Medium</i>	5 g <i>Hefeextrakt</i> 10 g <i>Baktotrypton</i> 10 g <i>NaCl</i> ad 1000 ml <i>H₂O</i>
<i>Nährböden</i>	<i>LB-Medium</i> 10-15% <i>Baktoagar</i> 100 µg/ml <i>X-Gal</i> 80 µg/ml <i>IPTG</i>

5.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturen wurden in einem Inkubator mit wassergesättigter Atmosphäre und 5 % CO₂ bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Überschüssige Zellen wurden im jeweiligen Einfriermedium eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3 Fibroblastenisolierung und -kultivierung

Zur Erstellung der Fibroblastenkultur wurden Knockout-Mäuse (zum Beispiel TPH1 Tiere), welche mit Hilfe einer Neomycinkassette erstellt wurden, verpaart, so dass alle Nachkommen homo- oder heterozygot für das Neomycinresistenzgen waren. Der Tag des Auffindens des Vaginalplugs wurde mit 1 dpc bezeichnet. 12-16 dpc wurde das Weibchen durch cervikale Dislokation getötet, das Bauchfell mit 70% Ethanol besprüht, die Bauchhöhle geöffnet und die Uteri mitsamt der Föten entnommen und in steriles PBS überführt. Von den Föten wurden Kopf, Extremitäten inklusive Schwanz und die Eingeweide entfernt. Das restliche Gewebe wurde fein zerschnitten, mit eiskalter 0.05 % Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C, bei der die Zellen voneinander getrennt wurden. Die Reaktion wurde mit Feeder-Medium gestoppt und die Zellen auf Zellkulturschalen ausgesät. Nach mehreren Passagen wurden konfluente Fibroblasten mit 20 µg/ml Mitomycin C für 1 h inaktiviert und das Mitomycin gründlich mit Medium gewaschen. Die inaktivierten Fibroblasten wurden dann als Unterlage für die ES-Zellen verwendet.

<i>PBS</i>	<i>8 g NaCl</i> <i>0.2 g KCl</i> <i>1.15 g Na₂HPO₄*2H₂O</i> <i>0.2 g KH₂PO₄</i> <i>ad 1000 ml H₂O</i>
<i>Fibroblasten- medium</i>	<i>D-MEM</i> <i>10 % FCS</i> <i>500 nM β-Mercaptoethanol</i> <i>2 mM Glutamin</i> <i>100 u/ml Penicillin/Streptomycin</i>
<i>Fibroblasten- einfriermedium</i>	<i>6 ml Fibroblastenmedium</i> <i>1 ml FCS</i> <i>1 ml DMSO</i>

5.4 Kultur embryonaler Stammzellen und deren Manipulation

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Mauslinie 129SvJ (von AG Willnow, MDC Berlin) wurden in ES-Zell-Medium auf inaktivierten Fibroblasten gehalten.

Für die Manipulationen wurde zuerst der Targeting-Vektor mit der Restriktionsendonuklease ClaI direkt vor dem kurzen Arm geöffnet und die Linearisierung durch Auftrennung eines Aliquots auf einem Agarosegel überprüft. Danach wurde die Restriktionsendonuklease durch Erhitzen inaktiviert und das erhaltene lineare Konstrukt mit Hilfe einer Mikrodialysemembran gereinigt.

Die ES-Zellen wurden durch Elektroporation (240 V, 500 μ F) mit 25 μ g des Konstruktes in Capecchi-Puffer transfiziert. Es folgte eine Selektion mit dem Neomycinanalogon Genitacin G-418 (100-200 μ g/ml) und mit Ganciclovir (2 nM) über mehrere Tage, bis untransfizierte Zellen abgestorben und die überlebenden Klone groß genug zum Isolieren (Picken) waren.

<i>ES-Zell- medium</i>	<i>D-MEM</i> <i>1 % MEM</i> <i>15 % FCS</i> <i>500 nM β-Mercaptoethanol</i> <i>2 mM Glutamin</i> <i>100 u/ml Penicillin/Streptomycin</i> <i>2 x 10⁵ u/ml ESGRO mLIF</i>
<i>ES-Zell- einfriermedium</i>	<i>6 ml ES-Zellmedium</i> <i>1 ml FCS</i> <i>1 ml DMSO</i>
<i>Capecchi- Puffer</i>	<i>20 mM HEPES</i> <i>pH7.0</i> <i>137 mM NaCl</i> <i>5 mM KCl</i> <i>0.7 mM Na₂HPO₄</i> <i>6 mM Glucose</i> <i>0.1 mM β-Mercaptoethanol</i>

5.5 Kultur Dendritischer Zellen

Die verwendeten dendritischen Zellen wurden von der AG Zenke, MDC Berlin-Buch, bezogen. Dabei handelte es sich um murine Knochenmarkstammzellen, die in RPMI 1640 Medium sieben Tage lang mit SCF (100 ng/ml) amplifiziert und danach sechs Tage lang mit GM-CSF (50 ng/ml) zu dendritischen Zellen differenziert wurden (Kurz *et al.*, 2002).

5.6 Milzzellenisolierung und ³Thymidin-Inkorporationsassay

Für die Milzentnahme wurden die Versuchstiere durch cervikale Dislokation getötet und zur Desinfektion mit 70 % Ethanol besprüht. Die Milzen wurden kurz mit PBS (II.5.3) gespült und dann in HBSS überführt. Mit Hilfe des Stempels einer sterilen 2 ml Plastikspritze wurden die Milzen im Medium zerdrückt und die Zellen durch kräftiges auf- und abpipettieren weiter vereinzelt. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch eine Gaze (80 µm) gegeben, um nicht vereinzelt Zellen und Membranen zu entfernen. Zur Erythrozytenlyse wurden die Milzzellen in PBS überführt, mit dem zehnfachen Volumen ACK-Puffer versetzt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit HBSS und abschließender Aufnahme in RPMI-Medium ohne FCS wurde die Zelldichte mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

Für den ³Thymidin-Inkorporationsassay wurden 2 x 10⁵ Zellen pro Ansatz in einer 96er Rundbodenplatte in 200 µl Medium ausgesät. Als Medien wurden benutzt:

RPMI 1640 mit 10 % FCS
RPMI 1640 mit 10 % SerEx! Serumersatz
RPMI 1640 mit 10 % SerEX! Serumersatz und 125 pg/µl 5-HT

125 pg/µl entsprechen ungefähr der 5-HT-Konzentration in RPMI 1640 mit 10 % FCS.

Zur Stimulation wurden die Zellen mit 10 µg/ml Concanavalin A versetzt, die Kontrollen blieben unstimuliert. Nach 72 h wurden pro Ansatz 1 µCi ³Thymidin in 50 µl RPMI-Medium ohne FCS hinzupipettiert, und nach weiteren 24 h die ³Thymidin-Aufnahme in die Zellen vermessen. Dazu wurden die Ansätze auf Membranen gesaugt, welche die Zellen, nicht aber das Medium aufnehmen. Die Membranen wurden mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Szintillationszähler die Radioaktivität vermessen.

ACK-Puffer 8.29 g NH₄Cl
 1 g KHCO₃
 37.2 mg Na₂EDTA
 ad 1000 ml H₂O
 mit Salzsäure auf pH 7.3 eingestellt

6 Tierversuche

6.1 Allgemeine Handhabung der Tiere

6.1.1 Tierstämme und Tierhaltung

Als Versuchstiere wurden verschiedene Linien der Spezies *Mus musculus* verwendet, welche in Gruppen von bis zu acht Tieren in klimatisierten Räumen mit einem 12h-12h-Hell-Dunkel-Zyklus und freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten wurden.

Die TPH1^{-/-} Tiere, welche durch die Knockout-Erstellung einen gemischten genetischen Hintergrund aufwiesen (C57BL/6 x 129SvJ), wurden vor Beginn der Experimente über acht Generationen auf C57BL/6 rückgekreuzt. Die dazugehörigen TPH1^{+/+}(C57BL6) Mäuse stammten entweder aus eigener Zucht oder wurden, wie auch alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Tiere von anderen Stämmen, von Charles River bezogen. Für Versuche wurden Tiere im Alter von 6-16 Wochen, für Verpaarungen 8-14 Wochen verwendet.

6.1.2 Narkosen und Tötungen

Für größere operative Eingriffe wie zum Beispiel die Uninephrektomie, die Blutabnahme aus der Vena cava oder das Einsetzen der interarteriellen Katheder wurden die Tiere mit den gebrauchsfertigen Lösungen Ketavet (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid) und Rompun (Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid) aus der Apotheke narkotisiert. Einer 20-25 g schweren Maus wurden dabei circa 3 mg Ketaminhydrochlorid und circa 40 µg Xylazinhydrochlorid in PBS (Abschnitt II.5.3) verabreicht. Beim Einsetzen der Telemetriesender wurden die Tiere mit Isofluran narkotisiert. Für kleinere Eingriffe wie zum Beispiel die Applikation von Pellets, Rasur oder Ohrendickemessungen wurde eine leichte Diethylethernarkose vorgenommen.

Die Tiere wurden im Allgemeinen durch cervikale Dislokation getötet. Im Falle der Messungen der Dünndarmperistaltik (II.6.2.2) und des Cholera-toxinexperimentes (II.6.2.4) wurde die Mäuse leicht mit Diethylether narkotisiert, damit eine Beeinflussung der Ergebnisse durch mögliche Stressreaktionen ausgeschlossen werden konnte. Die Tiere, denen Blut abgenommen wurde, wurden gewöhnlich durch eine Überdosis des Narkosemittels getötet.

6.1.3 Blutabnahme

Blut wurde den Tieren mit Hilfe einer Spritze aus der Vena cava abgenommen. Diese Methode hat gegenüber der Blutabnahme mit einer Pasteurpipette aus dem retroorbitalen Plexus den Vorteil, dass die Thrombozyten nicht aktiviert werden.

In der Spritze wurde circa 1/10 des erwarteten Blutvolumens Heparinlösung (300 u/ml in PBS, Abschnitt II.5.3) vorgelegt. Die Endkonzentration des Heparins war also circa 30 u/ml.

Für die Isolierung von Plasma und Thrombozyten wurden die Blutproben zunächst bei 200 g zentrifugiert und das thrombozytenreiche Plasma als Überstand abgenommen. Mit einer weiteren Zentrifugation bei 1000 g wurden dann die Thrombozyten vom Plasma getrennt.

<i>Tyrode-HEPES-Puffer</i>	<i>134 mM NaCl</i>	<i>pH 7,3</i>
	<i>0,34 mM Na₂HPO₄</i>	
	<i>2,9 mM KCl</i>	
	<i>12 mM NaHCO₃</i>	
	<i>20 mM HEPES</i>	
	<i>5 mM Glucose</i>	
	<i>1 mM MgCl₂</i>	

6.1.4 Anpaarung

Je ein bis zwei Weibchen wurden mit einem Männchen verpaart und am nächsten Morgen auf Vaginalpfropfen untersucht. Der Tag des Auffindens eines Vaginalpfropfes wurde mit 1 dpc bezeichnet.

6.2 Untersuchungen der Darmfunktionen

6.2.1 *in vivo*-Messungen der Peristaltik im gesamten Darm

Zur Bestimmung der peristaltischen Aktivität des gesamten Darms wurde die Zeit, die für den Transport eines farbigen Markers durch den gesamten Darm nötig ist, ermittelt. Dafür wurden die Versuchstiere zuerst 12-18 h ohne Futter, aber mit Trinkwasser gehalten, um den Darm zu entleeren. Vor dem Versuch wurden die Tiere einzeln in Käfige gesetzt, die keine Streu enthielten, dafür jedoch mit einem Blatt weißem Papier ausgelegt waren. Den nüchternen Tieren wurde dann eine farbige Lösung, beziehungsweise zur Erhöhung des luminalen Druckes eine farbige Paste mit Hilfe einer Schlundsonde in den Magen appliziert (Zeit = 0 min). Als Farbstoff wurde hierfür Karmin gewählt, da diese rote Substanz gut in den dunklen Fäzes zu erkennen ist. Zwei Stunden nach Applikation erhielten die Tiere wieder Zugang zum Futter. Als Darmdurchgangszeit galt die Zeit, bei der die ersten roten Fäzes ausgeschieden wurden.

Farbige Lösung *0.6 g Karmin*
in 10 ml 0,5 % Methylzelluloselösung in Leitungswasser

Farbige Paste *3 g Futterpulver, wie es am Boden der Futtertüten zu finden ist*
0.5 g Karmin
in 12 ml 1 % Methylzelluloselösung in Leitungswasser

von der Lösung wurden 50 µl, von der Paste 200 µl je Maus appliziert

6.2.2 *in vivo*-Messungen der Peristaltik des Dünndarms

Die peristaltische Aktivität des Dünndarms wurde bestimmt, indem der Weg gemessen wurde, den der farbige Marker innerhalb einer Stunde zurückgelegt hat.

Die Behandlung der Versuchstiere erfolgte wie in Abschnitt II.6.2.1 beschrieben, jedoch wurden die Lösung und die Paste statt mit Karmin mit Methyleneblau als Farbstoff angesetzt, da Blau sich besser vom Darm abhebt. Die Tiere wurden eine Stunde nach Applikation unter leichter Diethylethernarkose durch cervikale Dislokation getötet und der Gastrointestinaltrakt freipräpariert. Es wurde die Distanz von Magenausgang bis zur vordersten Markerfront bestimmt und auf die gesamte Dünndarmlänge vom Magenausgang bis zum Appendix (entsprechen 100 %) bezogen.

6.2.3 *in vitro*-Messung der Peristaltik

Diese Untersuchung wurde von der Gruppe um James J. Galligan an der Michigan State University durchgeführt. Zum besseren Verständnis wird die Methode kurz beschrieben:

Circa 6 cm lange Segmente des Ileums wurden in ein Organbad aus Plexiglass eingesetzt (Huizinga *et al.*, 1998). Vor Beginn der Versuche wurde das Gewebe für 10 min mit Krebs-Lösung bei 37 °C equilibriert. Der intraluminale Druck zur Auslösung der peristaltischen Aktivität wurde durch Anheben eines Pufferreservoirs erzeugt, welches mittels Plastikschläuchen und einem T-Stück mit dem Darmsegment und mit einem Drucksensor verbunden war. Der Druck wurde jeweils für 30 s auf 1.25/2.50/3.75 beziehungsweise 5.00 mmHg erhöht, danach wurde wieder der basale Druck eingestellt. Die Darmaktivitäten während der 30 s Druckerhöhung wurden aufgezeichnet.

Als Antwort auf einen intraluminalen Druck zeigt der Darm eine Serie phasischer Kontraktionen. Zur quantitativen Auswertung wurden die maximale Kontraktion und die Häufigkeit der Kontraktionen ermittelt.

<i>Krebs-Lösung</i>	120.3 mM NaCl
	5.9 mM KCl
	25 mM NaHCO ₃
	2.5 mM CaCl ₂
	1.2 mM MgCl ₂
	20 mM NaHCO ₃
	1.2 mM NaH ₂ PO ₄
	11.5 mM Glucose

6.2.4 Messung der Cholera-toxin-induzierten Sekretion

Die Versuchstiere wurden zum Entleeren des Darmes für ca. 24 h vor, aber auch während des Versuches ohne Futter, jedoch immer mit Trinkwasser gehalten. Pro Maus wurden 20 µg Cholera-toxin in 0.5 ml Leitungswasser, beziehungsweise in den Kontrollgruppen

nur Leitungswasser oral mit Hilfe einer Schlundsonde appliziert. Nach vier Stunden wurden die Tiere unter leichter Diethylethernarkose durch cervikale Dislokation getötet und der gesamte Darm vom Magenausgang bis zum Anus freipräpariert, wobei darauf zu achten war, dass aus dem Darmlumen keine Flüssigkeit austrat. Nach Bestimmung des Feuchtgewichts (Darm und Inhalt) wurden die Därme für zwei Tage im Heizschrank bei 80°C getrocknet und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

Die Darmflüssigkeit wurde mit folgender Gleichung errechnet:

$$\text{Darmflüssigkeit (normiert) [ml]} = \frac{(\text{Feuchtgewicht [g]} - \text{Trockengewicht [g]})}{\text{Trockengewicht [g]}}$$

Dabei galt die Annahme, dass:

$$\rho (\text{Darmflüssigkeit}) = \rho (\text{Wasser}) = 1 \text{ g}\cdot\text{cm}^3$$

Die Subtraktion des Trockengewichtes vom Feuchtgewicht ergibt die Darmflüssigkeit, welche sich aus der Flüssigkeit im Darmlumen und den Zellflüssigkeiten zusammensetzt. Zur Normierung auf die Darmlänge wird die errechnete Darmflüssigkeit durch das Trockengewicht dividiert.

6.2.6 Messung des Cisplatin-induzierten Pica-Verhalten

Pica wurde mit der von Yamamoto *et al.* (2002) erstellten Kaolin/Karmin-Methode gemessen.

Für die Kaolin/Karmin-Pellets wurde Kaolin gründlich mit 1 % Gummi Arabicum, 5 % Karmin und destilliertem Wasser vermischt. Der Karmingehalt der Pellets wurde erhöht (von 0,5 % bei Yamamoto *et al.*), da die hier verwendeten Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund ein wesentlich kleineres Körpergewicht als die von Yamamoto *et al.* verwendeten ICR-Mäuse haben (20 g gegenüber 36 g), und damit auch eine geringere Kaolin- und Karminaufnahme erwartet wurde. Aus der Masse wurden dann Pellets geformt, die in Form und Größe normalen Futterpellets glichen. Diese wurden dann für mehrere Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Tiere wurden einzeln in Käfige gesetzt, wobei sie zur Adaption erst einmal für drei Tage freien Zugang zu Wasser, Futter und den Kaolin/Karmin-Pellets hatten. Am Tag vor dem Versuch wurden Futter und Kaolin/Karmin-Pellets entfernt. Kurz vor Versuchsbeginn wurden die Käfige gesäubert und die Einstreu erneuert. Pro Kilogramm Körpergewicht wurden dann 5 mg Cisplatin in physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht, Kontrolltieren wurde nur Saline verabreicht. Gleich nach der Applikation erhielten die Tiere wieder Zugang zu Futter und den Kaolin/Karmin-Pellets, letztere wurden jedoch 24 h später wieder entfernt.

Die Fäzes, die in den 48 h nach der Cisplatinapplikation ausgeschieden wurden, wurden gesammelt und bei 60 °C im Heizschrank über Nacht vollständig getrocknet. Nach Ermittlung der Gewichte wurden die Fäzes für eine Stunde in destilliertem Wasser (19 ml/g) eingeweicht. Nach Homogenisieren mit Ultraschall wurde 3 N NaOH-Lösung (1 ml/g) zugegeben und vermischt, und die Homogenate bei 35 000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Absorption der Überstände bei 550 und bei 700 nm bestimmt.

Bei 550 nm absorbieren das Karmin und das Fäzeshomogenat, bei 700 nm nur das Fäzeshomogenat. Um die Karminabsorption genau bestimmen zu können, musste die störende Absorption durch das Fäzeshomogenat subtrahiert werden. Dafür wurde mit Hilfe der Fäzes unbehandelter Tiere die Beziehung zwischen der Absorption bei 550 und bei 700 nm durch das Fäzeshomogenat bestimmt:

$$A_{500} = 1.1998 A_{700} + 0.0147$$

Die korrekte Karminabsorption bei 550 nm konnte dann folgendermaßen errechnet werden:

$$A_{550\text{Karmin}} = A_{500} - 1.1998 A_{700} - 0.0147$$

6.3 Untersuchungen des Herz-Kreislauf-Systems

6.3.1 Blutdruckmessungen

Zur Bestimmung von Blutdruck und Herzrate wurden zwei Methoden angewendet:

> Messung mittels Katheter: Den Ketavet/Rompun-narkotisierten Mäusen (Abschnitt II.6.1.2) wurde ein Polyethylenkatheter so in die linke Arteria femoralis eingeführt, dass die Katheterspitze in der Aorta abdominalis zu liegen kam. Der Katheter wurde mit Nahtmaterial an der Arteria femoralis fixiert. Das andere Katheterende wurde subkutan zum Nacken geführt, wo es die Haut durchstoßend mit Nahtmaterial fixiert wurde. Nach der Katheterlegung wurden die Tiere für einen Tag zur Erholung in Ruhe gelassen. Danach wurde der interarterielle Katheter mit einem Transducer verbunden, und Herzrate und mittlerer arterieller Blutdruck der freibeweglichen, nicht narkotisierten Mäuse mit Hilfe eines Multikanalpolygraphen aufgezeichnet.

>Telemetrische Messung: Den Isofluran-narkotisierten Mäusen wurde ein Telemetriesender so in die rechte Arteria carotis eingeführt, dass die Katheterspitze des Senders unterhalb der Gabelung des Aortenbogens zu liegen kam. Der Senderkatheter wurde mit Nahtmaterial fixiert und der Senderkörper in subkutaner Lage am Bauch der Tiere positioniert. Die Käfige der Tiere standen über den Empfangsgeräten, die die Herzraten, die mittleren arteriellen Blutdrücke, sowie die systolischen und die diastolischen Blutdrücke der freibeweglichen, nicht narkotisierten Mäuse aufzeichneten.

6.3.2 DOCA/NaCl/Nx-Behandlung

Zur Bluthochdruckinduktion wurde den Mäusen unter Ketavet/Rompun-Narkose (Abschnitt II.6.1.2) die rechte Niere entfernt (Uninephrektomie, Nx). Die entstandene Operationswunde wurde außerdem dazu benutzt, jeweils ein DOCA-Pellet subkutan zu applizieren. Die benutzten DOCA-Pellets geben pro Tag jeweils 50 mg DOCA an das Tier ab.

Nach der Operation erhielten die Mäuse ausschließlich Salzwasser zu trinken (1 % NaCl in Leitungswasser).

Bei einem Teil der Tiere wurde die DOCA/NaCl/Nx-Behandlung einige Tage nach der Implantation von Telemetriesendern (Abschnitt II.6.3.1) vorgenommen. Bei diesen Tieren konnte somit die Entwicklung des Bluthochdruckes verfolgt werden.

6.4 Immunologische Untersuchungen

6.4.1 Test auf Kontakthypersensibilität

Am Tag 0 wurden den Versuchstieren die Rücken rasiert und jeweils 150 µl einer 3 % ethanolschen Oxazolonslösung aufgetragen. Es wurde darauf geachtet, daß die Lösung einzieht, bevor die Tiere in den Käfig zurückgesetzt wurden. Die Tiere der Kontrollgruppen blieben am Tag 0 unbehandelt.

Vier Tage später wurden die sensibilisierten und die naiven Tiere im Ethertopf leicht narkotisiert, und dann noch unter Narkose mit einer Micrometerschraube die native Dicke der Ohren ermittelt. Anschließend wurde auf jede Seite der Ohren je 10 µl einer 1 %igen ethanolschen Oxazolonslösung gegeben. Nach 24 h wurden die Ohren der im Ethertopf narkotisierten Mäuse erneut vermessen.

Die Veränderung der Ohrendicke (ΔT) für jedes einzelne Tier ergab sich aus:

$$\Delta T = (\text{Ohrendicke 24 h nach Oxazolons-Auftragung}) - (\text{native Ohrendicke})$$

Die Nettoohrschwellung ergibt sich aus dem Vergleich von ΔT der sensitivierten Tiere mit ΔT der naiven Tiere.

6.4.2 Crotonöl-induzierte Ohrenschwellung

Dieser Versuch wurde nach Shimizu *et al.* (2003) durchgeführt. Jedoch wurde die Crotonölkonzentration von 0.5 auf 5 % erhöht, da eine 0.5 %ige Lösung keine Schwellung verursachte. Der Grund für diese Beobachtung könnte in einer Schwankung der schwellungsauslösenden Substanzen in diesem Naturprodukt liegen.

Den Mäusen wurde auf jede Seite beider Ohren je 10 µl Crotonölslösung verabreicht und die Ohrendicke 3, 6, 9 und 12 h nach Applikation bestimmt (siehe Abschnitt II.6.4.2). Die Ohrenschwellung ergab sich daraus nach Abzug der nativen Ohrendicke.

*Crotonöl-
Lösung* *5 % Crotonöl
in Aceton/Olivenöl (4:1)*

6.4.3 Adoptiver Transfer

Für jedes Akzeptortier wurde vier Tage vor dem eigentlichen Versuch zwei Donortiere wie im Abschnitt II.6.4.1 beschrieben sensibilisiert.

Am Versuchstag wurden die Donortiere durch cervikale Dislokation getötet, die inguinalen Lymphknoten entnommen und in kaltes PBS überführt. Unter einem Binokular wurde mit Hilfe von zwei Pinzetten anhaftendes Fettgewebe von jedem Lymphknoten entfernt. Die Lymphknoten wurden anschließend in eine Zellkulturschale, welche HBSS enthielt, überführt und mit dem sterilen Stempel einer 2 ml Plastikspritze zerdrückt. Die erhaltenen Lymphknotenzellen (LKZ) wurden durch 80 µm Gaze gefiltert, um eventuell vorhandene größere Zellaggregate zu entfernen. Ein Aliquot der Suspension wurde mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung vermischt und die Dichte der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Kurz vor der Applikation in die unsensibilisierten Akzeptortiere wurde die Zellsuspension zentrifugiert, das überstehende HBSS abgenommen und das Zellpellet in PBS resuspendiert.

Dabei wurde die Zelldichte so eingestellt, dass jeder Maus mit 100 µl Suspension die gewünschte Zellmenge intravenös verabreicht werden konnte. Von den TPH1+/+ LKZ wurden 1.5×10^8 , von den TPH1-/- LKZ 5×10^7 Zellen, also weniger, je Akzeptortier verabreicht. Jedoch wurden im letzteren Fall die Lymphozyten aus der Lymphknotenzellsuspension durch sogenanntes panning angereichert. Dafür wurden die LKZ in reichhaltigerem RPMI 1640-Medium mit Penicillin/Streptomycin in nicht zu hoher Dichte auf Zellkulturschalen aufgeteilt und für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator gehalten. Die hauptsächlich aus Monozyten und Macrophagen bestehende adherente Fraktion wurde verworfen, die noch schwimmenden Zellen als angereicherte Lymphozytensuspension wie weiter oben beschrieben den Mäusen appliziert.

Den Tieren der Kontrollgruppen wurden jeweils 100 µl PBS intravenös verabreicht. Gleich nach der Zell- beziehungsweise PBS-Applikation wurde auf jede Seite der Ohren je 10 µl einer 1 %igen ethanolischen Oxazololösung gegeben. Nach 24 h wurden die Ohren der im Ethertopf narkotisierten Mäuse vermessen und mit der vor der Applikation bestimmten nativen Ohrendicke die Veränderung der Ohrendicke (ΔT) für jedes einzelne Tier errechnet (siehe auch 4.4.1).

6.4.4 Ermittlung der Migrationsfähigkeit Dendritischer Zellen

Den Versuchstieren wurden unter Ethernarkose das Fell über den inguinalen Lymphknoten großflächig rasiert. Danach wurde auf jede Seite 25 µl FITC-Lösung pipettiert, und darauf geachtet, daß die Lösung einzieht, bevor die Tiere in den Käfig zurückgesetzt wurden.

Nach 18 h wurden die Tiere geopfert. Die inguinalen Lymphknoten wurden entnommen und in Schalen mit PBS gelegt. Unter einem Binokular wurde sorgfältig anhaftendes Fettgewebe entfernt und die so gesäuberten Lymphknoten in je 1 ml PBS (Abschnitt II.5.2) mit 0.01 % Paraformaldehyd überführt. Mit Stempeln von 2 ml Einwegspritzen wurden die Lymphknoten gründlich zerdrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch 80 µm Gaze gefiltert, um eventuell vorhandene größere Zellaggregate zu entfernen. Bis zur Analyse mit dem FACS-System wurden die Zellen bei 4 °C aufbewahrt.

Mit der Analyse im FACS-System wurde der Anteil der FITC⁺ Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt. Da nach Robbiani *et al.* (2000) alle in den Lymphknoten gefundenen FITC⁺ Zellen auch CD11c⁺ und damit dendritische Zellen sind, wurde auf eine weitergehende Analyse verzichtet.

FITC-Lösung *8 mg/ml FITC (Fluorescein isothiocyanate isomer I) in Aceton/Dibutylphthalate (1:1)*

7 Histochemische Untersuchungen

7.1 whole mount-Immunhistochemie von Duodenum

Duodena von nüchternen Tieren wurden der Länge nach aufgeschnitten, mit PBS (Abschnitt II.5.3) gespült, mit der Mucosa nach oben auf Balsaholz aufgespannt und über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Mucosa und Submucosa vorsichtig mit Pinzetten abgezogen und die verbleibenden Muskelschichten nach folgendem Schema behandelt:

Zeit	Lösung	Temperatur	
5 min	PBST	RT	3 x
5 min	H ₂ O	RT	
10 min	Aceton	- 20 °C	
5 min	H ₂ O	RT	
5 min	PBDT	RT	
2 h	PBDT + 10 % BSA	RT	
üN	PBDT + 1 % BSA + 1. AK	4 °C	
1 min	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	
1 min	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	
insgesamt 1 d	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	5 x
1 h	PBDT + 1 % BSA	RT	
üN	PBDT + 1 % BSA + 2. AK	4 °C	
1 min	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	
1 min	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	
insgesamt 1 d	PBDT + 1 % BSA + 0.1 M NaCl	RT	6x
Einbettung mit Mowiol			

Antikörperkombinationen:

- | | |
|--------------|--|
| TPH-Färbung | 1. Anti-TPH aus Ziege (1:500)
2. Anti-IgG-Ziege mit FITC gekoppelt (1:100) |
| 5-HT-Färbung | 1. Anti-5-HT aus Kaninchen (1:500)
2. Anti-IgG-Kaninchen mit FITC gekoppelt (1:100) |

PBST *PBS (Abschnitt II.5.3)*
0.1 % Tween 20

PBDT *PBS (Abschnitt II.5.3)*
0.1 % Tween 20
1 % DMSO

Mowiol-Medium *6 g Glycerin*
2.4 g Mowiol 4.88
12 ml H₂O
in dieser Reihenfolge gemischt und 2 h gerührt
12 ml Tris, 0.2 M, pH 8.5
zugegeben und mehrere Stunden bei 53 °C gerührt, danach bei 5000 g
zentrifugiert, der klare Überstand wurde zum Einbetten benutzt

7.2 whole mount-Immunhistochemie von Epidermis

Für diesen Assay wurden die abgetrennten Ohren der Mäuse benutzt. Mit Hilfe zweier Pinzetten wurden die Vorderseiten von den Rückseiten getrennt. Dabei wurden auch größere Knorpelstückchen entfernt. Die Ohrenstücke wurden dann für 1 h in 0.02 % EDTA in PBS bei Raumtemperatur inkubiert. Danach ließ sich die Epidermis vorsichtig von den darunterliegenden Hautschichten trennen. Sie wurde in Aceton für mindestens 20 min bei -20 °C fixiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Mit der der Luft zugewandten, hydrophoben Seite wurde die Epidermis auf einem Objektträger plaziert und mit 1:100 in PBS verdünnten Anti-MHC-II-Antikörper (FITC-gelabelt) überzogen. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Epidermis dreimal mit PBS gewaschen und mit Mowiolmedium (II.7.1) eingebettet.

7.3 Immunhistochemie von duodenalen Kryoschnitten

Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Rüdiger Veh von der Charité durchgeführt und wurden schon in der Dissertation von Dr. D.J. Walther publiziert (Walther, 2002).

7.4 PAS-gefärbte Paraffinschnitte von Nieren

Die entnommenen Nieren wurden für drei Tage bei 4 °C in 4 % PFA in PBS eingelegt. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 30 min wurden die Organe nach folgendem Schema behandelt:

Zeit	Lösung	Temperatur
1 h	25 % Methanol in PBS	RT
1.5 h	90 % Methanol in PBS	RT
1.5 h	75 % Methanol in PBS	RT
1 h	90 % Methanol in PBS	RT
1 h	Methanol	4 °C
2 h	Methanol	4 °C
1 h	Ethanol	4 °C
1 h	Toluol	RT
1.5 h	Toluol	RT
üN	Paraffin	60 °C
1 h	Paraffin	60 °C
6 h	Paraffin	60 °C

Anschließend wurden die Organe in heißem Paraffin eingebettet.

Das Anfertigen der Schnitte und die PAS-Färbung übernahm freundlicherweise Prof. W. Schneider vom Pathologischen Institut des HELIOS Klinikum Berlin-Buch.

8 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

8.1 Probenaufarbeitung für die HPLC

Allgemein wurden die Proben zur Deproteinierung mit Perchlorsäure (PCA) versetzt, mit geeigneten Mitteln aufgeschlossen, und die denaturierten und ausgefallenen Proteine durch anschließende Zentrifugation für 30 min bei 15 000 g und 4 °C abgetrennt (Tabelle II.6 enthält die genauen Aufarbeitungsbedingungen). Die erhaltenen Überstände wurden mehrmals ohne das Pellet zu beschädigen auf- und abpipettiert, und in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Alle Schritte wurden strikt auf Eis ausgeführt. Bis zur Analyse im HPLC-System wurden die Überstände bei -80 °C gelagert.

Probenart	PCA	Aufschluss
Plasma	+ 8 % (v/v) PCA (70 %)	-
Zellen in Puffer	+ 4 % (v/v) PCA (70 %)	2 x 30 sec Ultraschall
Gewebe	in geeignetem Volumen H ₂ O mit 7 % PCA	2 x 30 sec Ultra-Turrax

Tabelle II.6: Aufarbeitung der HPLC-Proben.

8.2 5-HT-Detektion mittels HPLC

Die Detektion von 5-HT erfolgte mit Hilfe der HPLC-Technik. Die aufgearbeiteten Proben wurden direkt oder bei Bedarf mit Wasser verdünnt in das HPLC-System injiziert. Als feste Phase diente eine C18-Reversed Phase-Säule. Die Trennung erfolgte bei 20 °C und mit einer Flussrate des HPLC-Puffers von 2 ml/min. Die Säulenuate wurden kontinuierlich in den angeschlossenen Spektrometern vermessen. Serotonin und 1-Methyl-Tryptophan wurden im Fluoreszenzdetektor bei 295 nm angeregt und deren Emission bei 345 nm vermessen. In den somit erhaltenen Spektren wurden die Peakhöhen der einzelnen Substanzen ermittelt und durch Vergleich mit Standardkurven deren Konzentration in den Proben ermittelt.

HPLC- 10 mM Kaliumdihydrogenphosphat
Puffer 5 % Methanol

Alle Komponenten der HPLC-Anlage stammten von Shimadzu:

- CBM-10A Communications Bus Module
- DGU-3A Degasser
- LC-10AD Liquid Chromatograph
- SIL-10A Auto Injector & Sample Cooler
- CTO-10AC Column Oven
- SPD-10AV UV-VIS Detector
- RF-10AXL Fluorescence Detector

sowie zur Steuerung und Auswertung das Rechnerprogramm CLASS-LC10.

9 Statistik

Die erhaltenen Datenreihen wurden mit Hilfe des Programms Microsoft Excel statistisch ausgewertet. Alle in den Diagrammen oder Tabellen dargestellten Werte sind die Mittelwerte +/- SEM der Datenreihen. Das Signifikanzniveau zwischen Datenreihen wurde mit Hilfe des Student t-Tests (zweiseitig, Typ 3) ermittelt. Unterschiede mit Irrtumswahrscheinlichkeiten $p \leq 0.05$ wurden als signifikant erachtet.