

III ERGEBNISSE

1 5-HT als Vermittler verschiedener Darmfunktionen

1.1 Untersuchung des Gastrointestinaltraktes der TPH^{-/-} Tiere auf 5-HT

Für die Arbeiten in diesem Abschnitt wurden ausschließlich die neu gezüchteten TPH¹^{-/-} Tiere auf C57BL/6-Hintergrund verwendet. Zuerst wurde der 5-HT-Gehalt im Duodenum dieser Tiere bestimmt. Die TPH¹^{-/-} Tiere zeigen um 98% erniedrigte 5-HT-Konzentrationen im Duodenum (Abbildung III.1). Damit haben die Knockout-Tiere etwas weniger 5-HT im Duodenum als die TPH¹^{-/-} Mäusen auf gemischten Hintergrund (Mischung aus C57BL/6 und 129SvJ; Walther *et al.*, 2003a).

Die verbleibenden 2% 5-HT scheinen in den enterochromaffinen Zellen des Darmes gespeichert zu sein, da immunhistochemische Färbungen gegen 5-HT zu keiner Markierung dieser Zellen führte (Abbildung III.2 A und B). In weiteren immunhistochemischen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Neuronen des enterischen Nervensystems und wahrscheinlich auch Zellen des Immunsystems in den TPH¹^{-/-} Mäusen TPH- und 5-HT-immunoreaktiv sind (Abbildung III.2 D und F). Die in den TPH¹^{-/-} Tieren detektierten 2 % 5-HT scheinen demnach aus diesen Zellen zu stammen. Die Neuronen des enterischen Nervensystems stellen das 5-HT wahrscheinlich, wie auch die Neuronen des Zentralen Nervensystems, durch die TPH²-Form her.

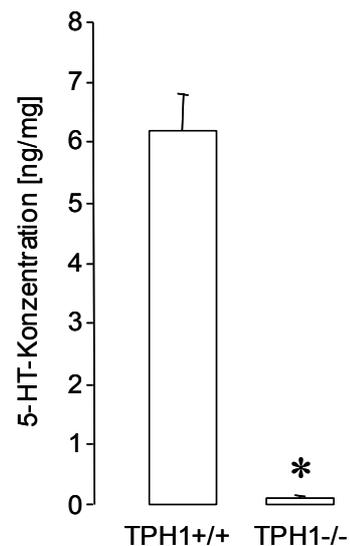


Abbildung III.1: 5-HT-Konzentration im Duodenum.

Der 5-HT-Gehalt im Duodenum der TPH¹^{-/-} Tiere zeigt sich um 98% signifikant gegenüber dem der TPH¹^{+/+} Tieren reduziert (**P* < 0.05).

Legende zu Abbildung III.2 auf Seite 56:

(A) und (B): Mit Anti-5-HT-Antikörper/Peroxidase gefärbte Duodenumsschnitte von (A) TPH¹^{+/+} und (B) TPH¹^{-/-} Tieren. In den TPH¹^{+/+} Mäusen sind deutlich die 5-HT-gefüllten enterochromaffinen Zellen zu sehen. In TPH¹^{-/-} Mäusen ist das Anfärben dieser Zellen mit Hilfe des Anti-5-HT-Antikörpers nicht möglich. Die enterochromaffinen Zellen der TPH¹^{-/-} Tiere sind also 5-HT-frei. (C) und (E): whole-mount-Präparationen von TPH¹^{-/-} Duodenum, gefärbt mit Anti-TPH-Antikörper/FITC. Das Cytoplasma der Nervenzellen des enterischen Nervensystems ist deutlich angefärbt. Die Zellkerne und Neuriten dieser Neuronen sind nicht TPH-immunoreaktiv, da dort TPH nicht vorliegt. (D) und (F): whole-mount-Präparationen von TPH¹^{-/-} Duodenum, gefärbt mit Anti-5-HT-Antikörper/FITC. (D) zeigt eine Zelle, deren Zellkörper 5-HT-gefüllte Vesikel aufweist. Im Bild (E) ist ein 5-HT-positiver Neurit zu sehen.

III ERGEBNISSE

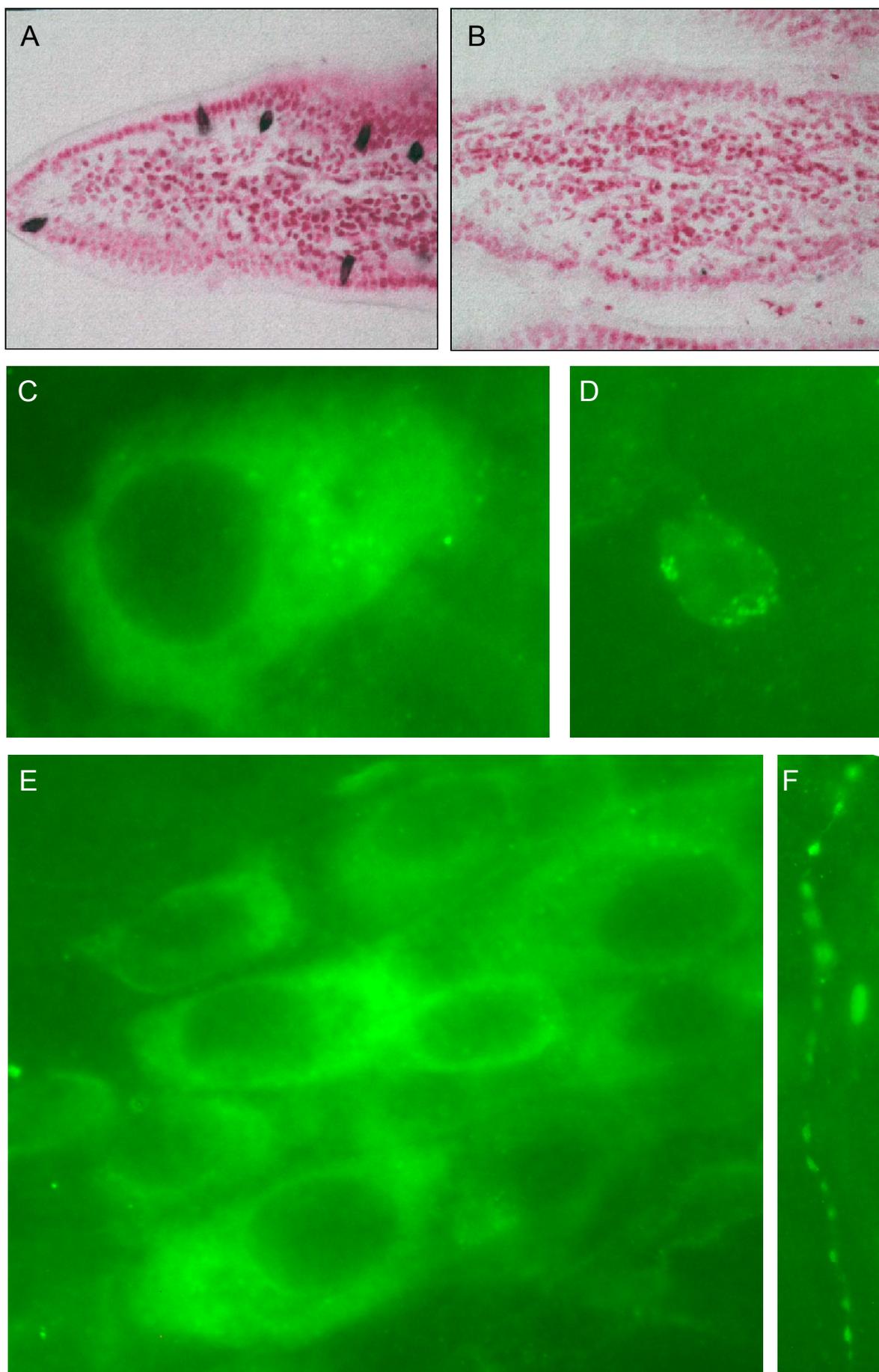


Abbildung III.2: 5-HT- und TPH-Verteilung im Duodenum der TPH1^{-/-} Tiere.
Legende siehe Seite 55.

1.2 Untersuchung des Darmtransportes *in vivo*

Das 5-HT der enterochromaffinen Zellen gilt als „Signalgeber“ der Peristaltik: durch Stimulation der Mucosa wird 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen freigesetzt, welches dann wiederum die IPANs des ENS stimuliert, die schließlich die glatte Muskulatur zur gerichteten Kontraktion beziehungsweise Relaxation veranlassen (siehe auch Abschnitt I.3.4.3). Da die enterochromaffinen Zellen der TPH1^{-/-} Mäuse kein 5-HT enthalten, sollten sie eine keine, oder zumindest eine stark reduzierte peristaltische Aktivität zeigen, die auch zu einem verzögerten Wachstum der Mäuse hätte führen müssen. Die TPH1^{-/-} Tiere entwickeln sich, im Vergleich zu den TPH1^{+/+} Tieren normal, und zeigen keine Gewichtsunterschiede. Die völlige Abwesenheit peristaltischer Aktivität konnte somit schon ausgeschlossen werden.

Zur näheren Untersuchung der Peristaltik wurde der Transportes durch den Darm gemessen. Dafür wurden den TPH1^{-/-} und entsprechenden Kontrolltieren Karminlösung oral appliziert und die Zeiten gemessen, die zur Darmpassage nötig waren (Abbildung III.3).

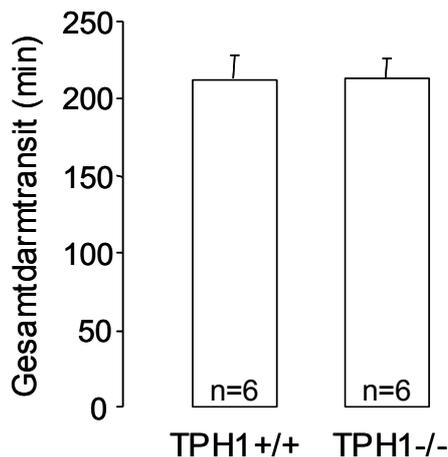


Abbildung III.3: Transit durch den gesamten Darm.

Es wurde die Zeit aufgezeichnet, die verging, bis die oral applizierte Karminlösung wieder ausgeschieden wurde. Zwischen den Werten gibt es keinen signifikanten Unterschied ($P > 0.05$).

Die Passage des farbigen Markers durch den gesamten Darm dauert in den TPH1^{-/-} Mäusen genauso lange wie in den Wildtyp-tieren. Die Werte sind mit in der Literatur gefundenen Werten vergleichbar (Nagakura *et al.*, 1996). Die Peristaltik scheint demnach nicht durch die 5-HT-Depletion gestört zu sein.

Jedoch ist bekannt, dass die einzelnen Darmabschnitte recht unterschiedliche Reaktionen in der Peristaltik als Reaktion auf verschiedene Stimuli zeigen. So zeigt speziell der Dickdarm eine erhöhte peristaltische Aktivität, wenn die Versuchstiere Stresssituationen ausgesetzt worden sind (Enck *et al.*, 1989; Barone *et al.*, 1990; Haga *et al.*, 1995). Da Stress bei diesem Versuch, speziell bei der oralen Applikation, natürlich nicht ausgeschlossen werden konnte, könnte somit eine Verlangsamung der Peristaltik im Dünndarm, der ja als am 5-HT-reichsten beschrieben worden ist und in dem daher die größten Effekte durch die 5-HT-Depletion erwartet werden können, durch eine verstärkte Dickdarmperistaltik aufgehoben worden sein. Um dies auszuschließen, wurde die peristaltische Aktivität im Dünndarm bestimmt, indem die Distanz gemessen wurde, die oral appliziertes Methylenblau innerhalb einer Stunde zurücklegt.

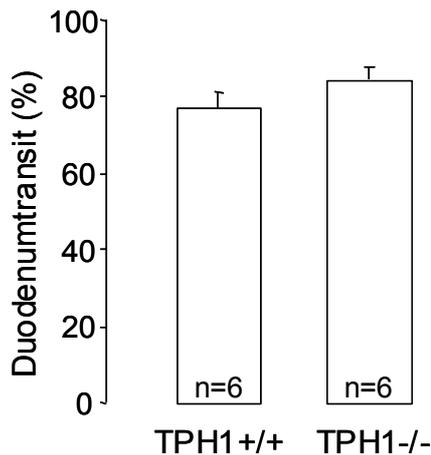


Abbildung III.4: Transit durch den Dünndarm. Es wurde die Distanz Magen-Methylenblaufront eine Stunde nach oraler Applikation des Markers gemessen und auf die Gesamtlänge des Dünndarms (=100%) bezogen. Zwischen den Werten gibt es keinen signifikanten Unterschied ($P > 0.05$).

Wie Abbildung III.4 zeigt, befand sich in allen Tieren die Farbstofffront eine Stunde nach Applikation im hinteren Drittel des Dünndarms, jedoch nicht darüber hinaus. Dieser Versuch kann daher als Messung der Dünndarmperistaltik gelten. Ebenso wie im vorhergehenden Versuch kann kein Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen im Transit festgestellt werden.

Diese beiden dargestellten Methoden der Darmtransportmessung finden in der Forschung regelmäßige Anwendung. Mit ihnen konnte zum Beispiel die Inhibition der Peristaltik durch 5-HT-Rezeptor-Antagonisten dargestellt werden (Nagakura *et al.*, 1996). Da die mit dieser Methode erarbeiteten Ergebnisse völlig der in der Literatur beschriebenen Hypothese vom 5-HT in den enterochromaffinen Zellen als Initiator des peristaltischen Reflexes widersprechen, kamen Zweifel auf, ob die angewendeten Methoden geeignet sind. Denkbar wäre ja auch, dass spontane Kontraktionen die flüssigen Marker weiterbeförderten. Daher wurde die Konsistenz der zu applizierenden Lösung zur Paste hin verändert. Das erhöht zum einen den luminalen Druck, bietet also einen stärkeren Stimulus, der Peristaltik auslösen muss. Andererseits erschwert es aber auch den Transport, was mögliche Differenzen in der Transportleistung besser erkennen lässt.

Wie jedoch in Abbildung III.5 ersichtlich ist, zeigt sich auch im Transport der applizierten Pasten, sowohl über den ganzen Darm, als auch bei der Untersuchung speziell des Dünndarmes kein Unterschied zwischen den TPH1-/- und den TPH1+/+ Mäusen. Die Verwendung von Paste statt einer flüssigen Lösung erhöht nur die Standardabweichungen in den einzelnen Gruppen.

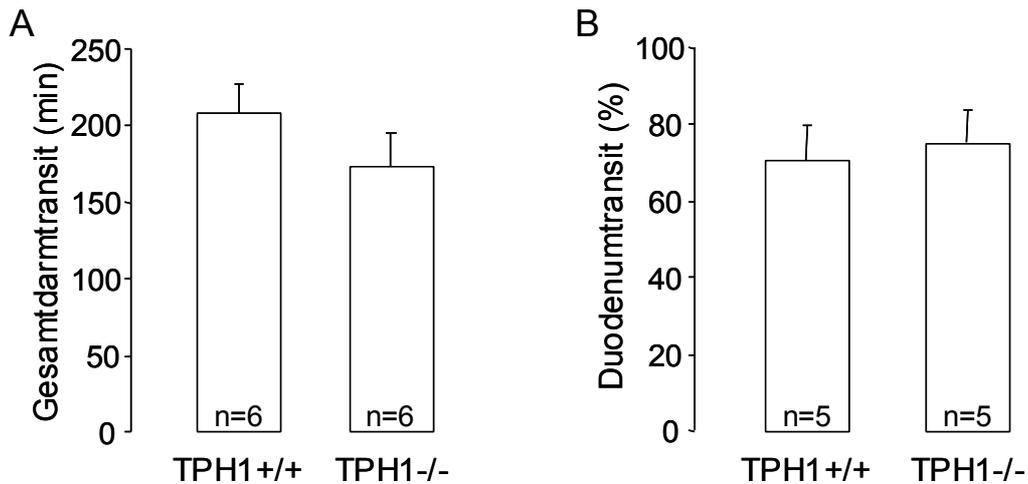


Abbildung III.5: Transit von pastösen Markern durch den gesamten Darm und den Dünndarm.

(A) Transport einer Karminpaste durch den gesamten Darm (analog zu Abbildung III.3), (B) Transport einer Methylenblaupaste durch den Dünndarm (analog zu Abbildung III.4). Zwischen den Werten gibt es keinen signifikanten Unterschied ($P > 0.05$).

1.3 Untersuchung der Peristaltik *in vitro*

Da die Daten zum Darmtransport (III.1.2) völlig der in der Literatur beschriebenen Hypothese der enterochromaffinen Zellen als Vermittler zwischen luminalen Stimulus und ENS, welches dann den peristaltischen Reflex auslöst, widerspricht, wurden *in vitro*-Versuche zur peristaltischen Aktivität mit Hilfe eines Organbades unternommen. Diese *in vitro*-Versuche sind wesentlich genauer, da sie die Kontraktionen direkt abbilden.

Mit einem mit Puffer gefülltem Reservoir wurde der intraluminale Druck in den Ileumpräparaten auf 1.25 – 5 mmHg erhöht. Die Darmstücke sowohl der TPH1+/+, als auch der TPH1-/- Tiere reagieren darauf mit phasischen Kontraktionen, welche sich von den oralen zu den aboralen Enden fortpflanzen. Diese Reaktion ist typisch und deckt sich mit ähnlichen *in vitro*-Studien mit Maudarmsegmenten (Huizinga *et al.*, 1998; Abdu *et al.*, 2002; Bian *et al.*, 2003). In Abbildung III.6 ist eine repräsentative Aufzeichnung der phasischen Kontraktionen in TPH1+/+ und TPH1-/- Tieren dargestellt.

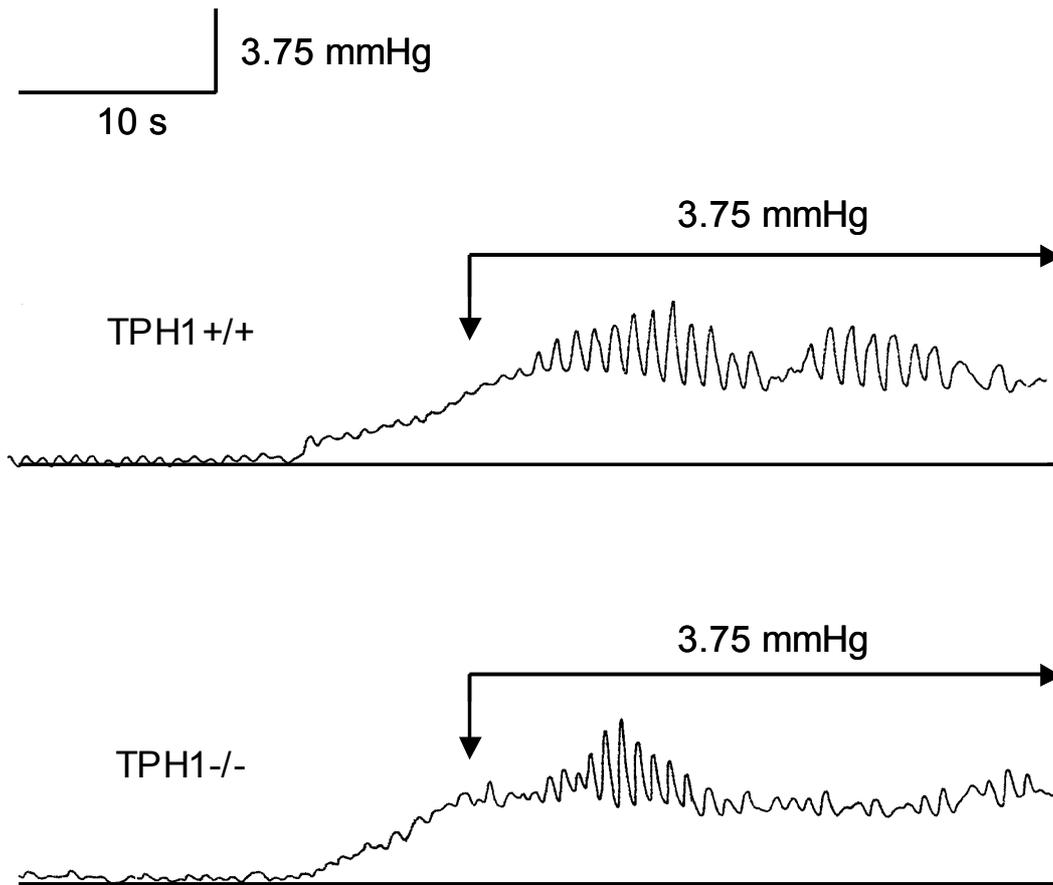


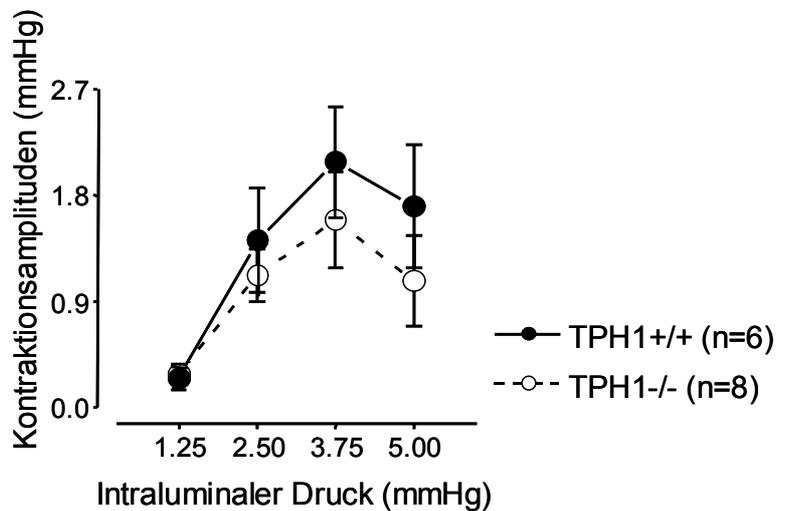
Abbildung III.6: Repräsentative Aufzeichnungen phasischer Kontraktionen in Ileumpräparaten *in vitro*.

Ileumstücke von TPH1+/+ (A) und TPH1-/- (B) –Mäusen reagieren mit phasischen Kontraktionen auf einen intraluminalen Druck von 3.75 mmHg. Ersichtlich ist, dass die Kontraktionsamplituden ähnlich sind, die Häufigkeit der Kontraktionen in TPH1-/- Tieren gegenüber den Wildtyp-tieren jedoch leicht erniedrigt ist.

Zum besseren Vergleich wurden die Kontraktionsamplituden und die Kontraktionsfrequenz genauer ausgewertet und grafisch dargestellt (Abbildung III.7 und III.8).

Abbildung III.7: Kontraktionsamplituden in Abhängigkeit vom intraluminalen Druck.

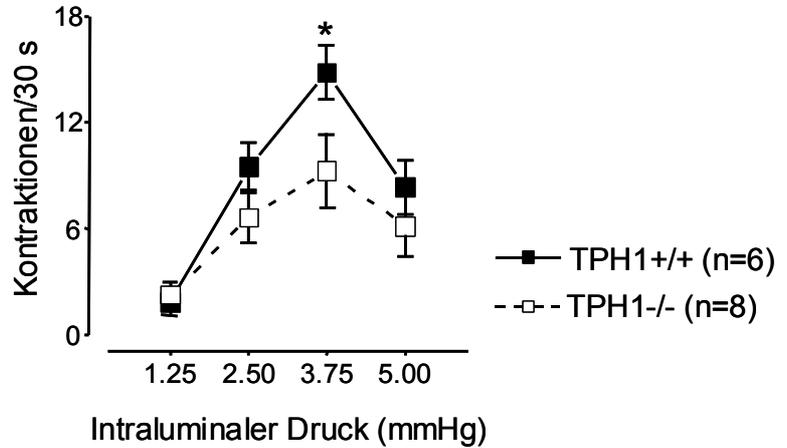
Die Kontraktionsamplituden der TPH1-/- Mäuse unterscheiden sich nicht signifikant ($P > 0.05$) von den Kontraktionsamplituden der entsprechenden Wildtyp-tiere.



Bei den Kontraktionsamplituden, also der Stärke der Kontraktionen, war kein signifikanter Unterschied zwischen TPH1+/+ und TPH1-/- Tieren ersichtlich.

Abbildung III.8: Kontraktionsfrequenz in Abhängigkeit vom intraluminalen Druck.

Bei einem intraluminalen Druck von 3.75 mmHg zeigen die TPH1-/- Mäuse eine signifikant reduzierte Kontraktionsfrequenz gegenüber den TPH1+/+ Tieren (* $P < 0.05$). Bei der Anwendung niedrigerer oder höherer Drücke zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($P > 0.05$).



Die Kontraktionsfrequenz der TPH1-/- Mäuse ist bei einem intraluminalen Druck von 3.75 mmHg gegenüber den TPH1+/+ Tieren signifikant erniedrigt. Bei allen anderen gemessenen Drücken kann kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

1.4 Messung der cholera-toxin-induzierten Sekretion

Auch für die durch Cholera-toxin ausgelöste Flüssigkeitssekretion wird eine Abhängigkeit vom 5-HT der enterochromaffinen Zellen angenommen. Der Mechanismus, der dieser Hypothese zugrunde liegt, wird in der Einleitung näher besprochen (1.3.4.4). Nach dieser Hypothese sollten die TPH1-/- Tiere im Gegensatz zu den TPH1+/+ Tieren keine gesteigerte Flüssigkeitssekretion im Gastrointestinaltrakt als Reaktion auf Cholera-toxin zeigen. Wie in Abbildung III.9 jedoch dargestellt ist, zeigen die TPH1-/- Mäuse nach Cholera-toxinapplikation eine Flüssigkeitsansammlung im Darm, welche in ihrer Intensität mit der der Wildtyp-tiere vergleichbar ist. Das Fehlen des 5-HT in den enterochromaffinen Zellen der TPH1-/- Mäuse hat keinen Einfluss auf die cholera-toxin-induzierte Flüssigkeitsansammlung im Darm.

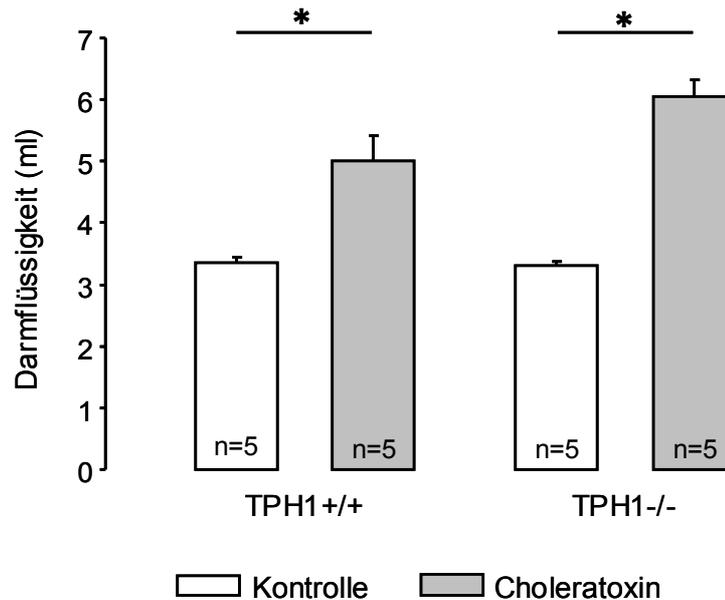


Abbildung III.9: Choleratoxininduzierte Flüssigkeitssekretion.

Gezeigt wird die auf die Darmtrockenmasse bezogene Darmflüssigkeit (genaue Berechnung siehe Methodenteil). Die Werte der Kontrolltiere (PBS-Applikation) zeigen die Flüssigkeit in den Darmzellen und die Flüssigkeit, die unter normalen Bedingungen im Darmlumen vorhanden ist. Die Flüssigkeitsmenge, die sich im Vergleich dazu zusätzlich in den choleratoxinbehandelten Tieren angesammelt hat, ist Folge der Wirkung des Toxins. Choleratoxin erhöht die Menge der Darmflüssigkeit in beiden Genotypgruppen signifikant gegenüber den PBS-behandelten Gruppen ($*P < 0.05$). Zwischen den TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($P > 0.05$).

1.5 Messung des Pica-Verhaltens nach Verabreichung des Chemotherapeutikums Cisplatin

Wie in Abschnitt 1.3.4.6 dargelegt, gilt das 5-HT in den enterochromaffinen Zellen auch als Auslöser des emetischen Reflexes nach Verabreichung von Chemotherapeutika, zum Beispiel Cisplatin. Da die TPH1-/- Tiere wie alle Mäuse nicht emetisch reagieren können, wurde stattdessen das Pica-Verhalten, also die Aufnahme von unverdaulichen Substanzen, untersucht.

Die verwendeten Mäuse, TPH1+/+ und TPH1-/- auf C57BL/6-Hintergrund zeigen keinerlei Pica-Verhalten, weder unbehandelt, noch als Reaktion auf die Cisplatin- oder Kochsalzlösungapplikation. Auch mit der Erhöhung der Karminkonzentration in den Kaolinpellets von 0.5 auf 5 %, welche die Nachweisgrenze des Karmin/Kaolingemisches im Kot deutlich erniedrigen sollte, konnte kein Karmin, und damit auch kein Kaolin, in den Fäzes der Tiere nachgewiesen werden.

C57BL/6 Mäuse zeigen also generell kein Pica-Verhalten. Daher konnte keine Aussage bezüglich der Auswirkungen des 5-HT-Defizits in den enterochromaffinen Zellen der TPH1-/- Mäuse auf das Pica-Verhaltens der Tiere gemacht werden.

2 5-HT im kardiovaskulären System

2.1 5-HT im Blutkreislauf

Die Thrombozyten der in allen kardiovaskulären Experimenten verwendeten TPH1-/- Tiere auf C57BL/6-Hintergrund enthalten mit etwa 40 pg/10⁶ Zellen nur 0.8 % der 5-HT-Menge, welche die Thrombozyten der entsprechenden Wildtypiere beinhalten (4.9 ng/10⁶ Zellen). Die 5-HT-Konzentration im Blutplasma zeigt sich dagegen nicht durch den TPH1-Knockout beeinflusst (Abbildung III.10). Das Plasma-5-HT stellt allerdings nur einen Bruchteil des gesamten 5-HT im Blut dar.

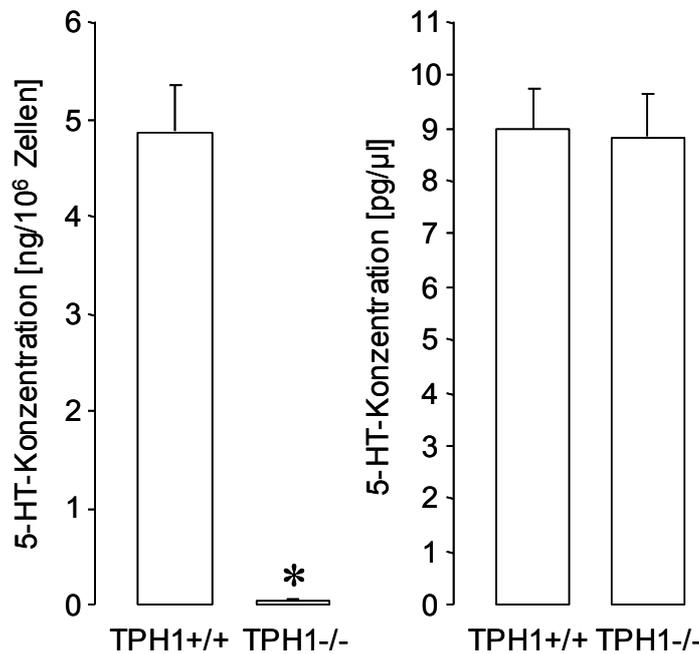


Abbildung III.10: 5-HT-Konzentrationen in Thrombozyten und Blutplasma.

Die Thrombozyten der TPH1-/- Tiere zeigen ein um 99% signifikant reduzierten 5-HT-Gehalt (**P*<0.05; n=3 je Gruppe). Im Plasma ist dagegen keine Veränderung der 5-HT-Konzentration festzustellen (*P* > 0.05; n=3 je Gruppe).

2.2 Untersuchung der Herzgewichte

Um den Einfluss des TPH1-Knockouts auf die Herzentwicklung zu untersuchen, wurden die relativen Gewichte der (Gesamt-)Herzen und der linken und rechten Ventrikel von circa 16 Wochen alten männlichen Tieren bestimmt. Wie aus Abbildung III.11 ersichtlich, zeigen sich in den relativen Herz- und Ventrikelgewichten keine signifikanten Unterschiede zwischen TPH1-/- und TPH1+/+ Mäusen. Es sind auch keine Veränderungen an den Herzen sichtbar. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Untersuchung der mit 21 Wochen deutlich älteren Kontrolltiere des DOCA/NaCl/Nx-Versuches (Abbildung III.15 in Abschnitt III.2.6). Die Herzen haben sich demnach ähnlich wie die der Wildtypkontrollen entwickelt. Die Gewichtsmessungen können zwar die erfolgreiche Entwicklung, nicht jedoch die korrekte Funktion der Herzen anzeigen. Daher wurden weitere Untersuchungen der Herzfunktion unternommen.

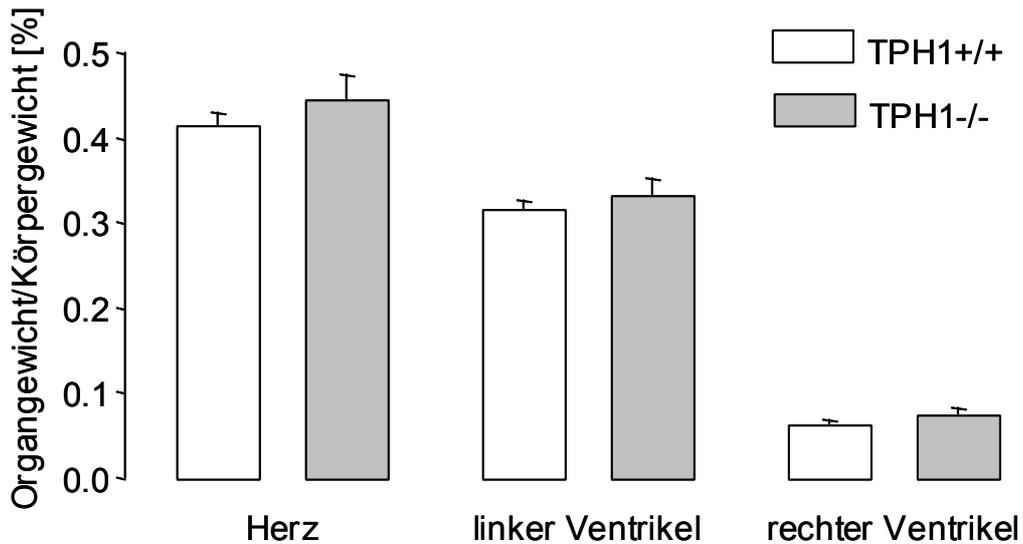


Abbildung III.11: Herzgewichte bezogen auf das Körpergewicht.

Herzgewichte und Gewichte des linken und rechten Ventrikels, normiert auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres, zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen TPH1^{-/-}-Tieren und entsprechenden Wildtyptieren als Kontrolle ($P > 0.05$; $n=5$ je Gruppe).

2.3 Funktionale Untersuchung der Herzen

Ein wichtiger Parameter der Herzfunktion ist die Herzrate (heart rate, HR), also die Anzahl der Schläge pro Minute (beats per minute, bpm). Mit Hilfe der Telemetrie (siehe auch Abschnitt III.2.4) wurde die Herzrate der TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tiere ermittelt (Abbildung III.12). Dabei können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($P > 0.05$).

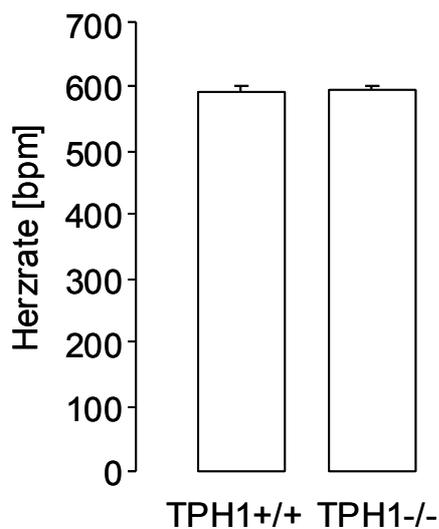


Abbildung III.12: Herzrate.

Die Herzraten der TPH1^{+/+} und der TPH1^{-/-} Tiere zeigen keinen signifikanten Unterschied zueinander ($P > 0.05$; $n=5$ für TPH1^{+/+}; $n=6$ für TPH1^{-/-}).

Zur weiteren Charakterisierung der Herzfunktion der TPH1^{-/-} Mäuse wurden verschiedene haemodynamischen Parameter mit Hilfe eines Herzkatheters gemessen. Die erhal-

III ERGEBNISSE

tenen Daten sind in Tabelle III.1 zusammengefaßt. Es zeigt sich, dass die Herzfunktion der TPH1^{-/-} Tiere verglichen mit der der TPH1^{+/+} in keiner Weise verändert ist.

	TPH1 ^{+/+}	TPH1 ^{-/-}
EDP [mmHg] (Enddiastolischer Druck)	5.22 ± 1.88	2.47 ± 2.44
ESP [mmHg] (Endsystolischer Druck)	72.48 ± 2.81	71.71 ± 2.82
EDV [µl] (Enddiastolisches Volumen)	33.55 ± 0.25	42.10 ± 4.71
ESV [µl] (Enddiastolisches Volumen)	24.69 ± 1.58	34.06 ± 4.48
Schlagvolumen [µl]	16.57 ± 3.24	21.65 ± 4.82
EDPVR (Enddiastolische Druck-Volumenrelation)	0.31 ± 0.13	0.28 ± 0.17
ESPVR (Endsystolische Druck-Volumenrelation)	3.00 ± 0.25	3.49 ± 0.73

Tabelle III.1: Haemodynamische Parameter.

Haemodynamische Parameter der linken Ventrikel der TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tiere (n = 3 je Gruppe). Keiner der ermittelten Parameter der TPH1^{-/-} Tiere zeigt einen signifikanten Unterschied verglichen mit den entsprechenden Werten der TPH1^{+/+} Tiere ($P > 0.05$).

2.4 Untersuchung des basalen Blutdruckes

Die basalen Blutdrücke wurden zuerst mit Hilfe der Kathetermethode bestimmt. Dabei wurden circa 16 Wochen alte Tiere zweimal für circa eine Minute vermessen, und die erhaltenen Werte zusammengefasst ausgewertet. In den TPH1^{-/-} Tieren kann ein höherer mittlerer arterieller Druck (mean arterial pressure, MAP) festgestellt werden als in den TPH1^{+/+} Mäusen (MAP in TPH1^{+/+}: 109.1 ± 3.5 mmHg; MAP in TPH1^{-/-}: 112.7 ± 2.8 mmHg; $P < 0.05$). Der Unterschied von 3.6 mmHg ist zwar gering, aber signifikant.

Da bei der Kathetermessung jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Mäuse gestresst und die Daten daher störungsanfällig sind, wurde anschließend eine Blutdruckmessung mittels Telemetrie durchgeführt. Die circa 16 Wochen alten Tiere wurden eine Woche nach der Operation, in der die Sender eingesetzt wurden, drei Tage lang kontinuierlich vermessen. Pro Tag ausgewertet zeigt sich in den TPH1^{-/-} Mäusen ein

höherer MAP als in den TPH1+/+ Tieren, es werden jedoch an keinem der drei Tage signifikante Unterschiede erreicht. Fasst man jedoch die Werte der drei Tage zusammen, zeigt sich eine signifikante Blutdruckerhöhung um 4.4 mmHg in den Knockout-Mäusen (MAP in TPH1+/+: 107.1 ± 1.7 mmHg; MAP in TPH1-/-: 111.5 ± 1.6 mmHg; $P < 0.05$).

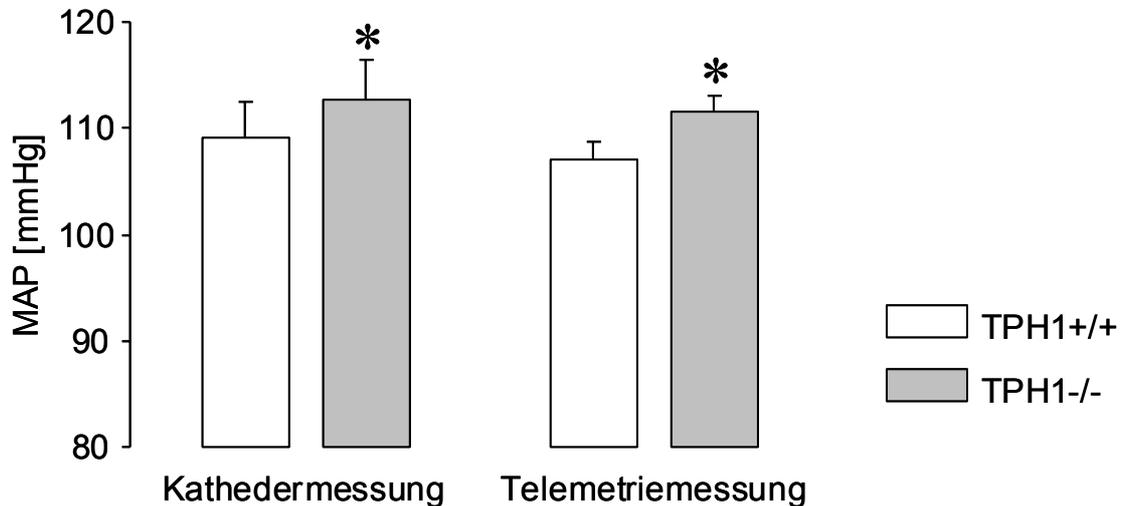


Abbildung III.13: Katheter- und Telemetriebestimmte Blutdrücke.

Sowohl bei der Messung mittels Katheter, als auch in der Telemetrie zeigen die TPH1-/- Tiere einen signifikant höheren MAP als die TPH1+/+ Tiere ($*P < 0.05$; Kathetermessung: n=8 für TPH1+/+; n=7 für TPH1-/-; Telemetrie: n=5 für TPH1+/+; n=6 für TPH1-/-).

Die mittels Telemetrie erhaltenen Daten fallen etwas niedriger aus und zeigen eine geringere Variabilität als die Daten, die mit Hilfe der Kathetermessung gewonnen worden sind (Abbildung III.13). Mit beiden Methoden lässt sich jedoch eine leichte Erhöhung des MAP in den TPH1-/- Mäusen belegen.

Eine ähnliche Erhöhung in den TPH1-/- Tieren zeigt sich auch im systolischen und im diastolischen Druck (Tabelle III.2).

	Basale Distole	Basaler MAP	Basale Systole
TPH1+/+	89.8 ± 1.5 mmHg	107.1 ± 1.7 mmHg	123.6 ± 2.1 mmHg
TPH1-/-	93.2 ± 1.6 mmHg *	111.5 ± 1.6 mmHg *	129.6 ± 2.0 mmHg *

Tabelle III.2: Basale Blutdruckwerte.

Basaler diastolischer und systolischer Blutdruck und der basale MAP der TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere ($*P < 0.05$ versus TPH1+/+; n=5 für TPH1+/+; n=6 für TPH1-/-).

2.5 Bluthochdruckinduktion mittels DOCA/NaCl/Nx

Nach Messung des basalen Blutdruckes (Abschnitt I.2.4) wurde an den Mäusen eine Uninephrektomie (Nx) durchgeführt, sowie jeweils ein DOCA-(Desoxycorticosteronacetat)-Pellet subkutan appliziert. Zusätzlich erhielten die Tiere 1 %ige NaCl-Lösung als Trinkwasser.

Wie in Abbildung III.14 und Tabelle III.3 zu sehen ist, führt diese Behandlung sowohl in den TPH1+/+, als auch in den TPH1-/- Tieren zu einer Steigerung des Blutdruckes ($P < 0.05$).

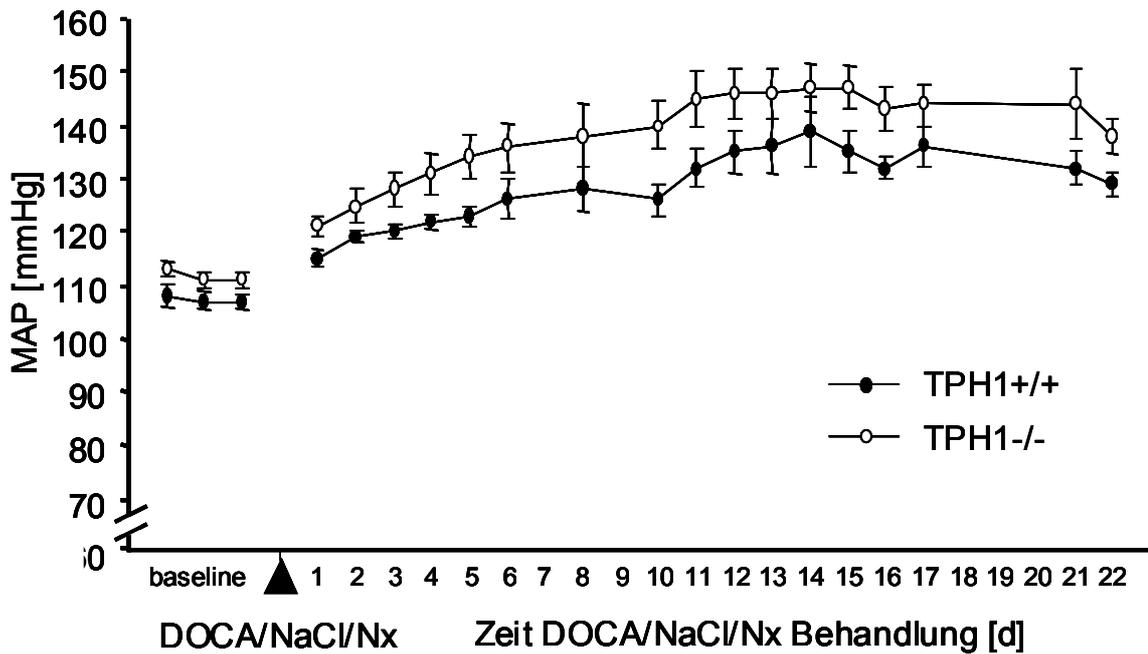


Abbildung III.14: Bluthochdruckinduktion mittels DOCA/NaCl/Nx-Behandlung. Die Behandlung mit DOCA/NaCl und Uninephrektomie (Nx) führen in TPH1+/+ als auch in TPH1-/- Tieren zu einem Anstieg des MAP (n=6 je Gruppe).

	Basaler MAP	MAP nach 15 Tagen DOCA/NaCl/Nx-Behandlung §	Veränderung um
TPH1+/+	107.1 ± 1.7 mmHg	133.4 ± 2.8 mmHg §	+23.6 ± 3.9 mmHg
TPH1-/-	111.5 ± 1.6 mmHg *	143.1 ± 4.7 mmHg * §	+30.8 ± 3.4 mmHg

Tabelle III.3: Blutdruckveränderungen durch DOCA/NaCl/Nx-Behandlung. Blutdrücke der TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere vor und am Ende der DOCA/NaCl/Nx-Behandlung (§ Werte der Tage 16, 17 und 21 zusammengefasst; * $P > 0.05$ versus TPH1+/+; § $P > 0.05$ versus basalem Blutdruck; n=6 je Gruppe).

Wie bei den basalen Werten zeigen die TPH1^{-/-} Mäuse auch am Ende der DOCA/NaCl/Nx-Behandlung einen signifikant höheren MAP als die TPH1^{+/+} Tiere ($P < 0.05$). Bei der Veränderung des MAP kann jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($P > 0.05$; siehe Tabelle III.3).

2.6 Organschäden durch Bluthochdruck

Nach dreiwöchiger DOCA/NaCl/Nx-Behandlung und dem darauf folgendem Blutdruckanstieg (Abschnitt III.2.5) zeigen die Mäuse typische bluthochdruckbedingte Organschäden, also eine Hypertrophie des Herzens und Nierenschädigungen.

Abbildung III.15 zeigt die Gewichte der Gesamtherzen und der linken Ventrikel der DOCA/NaCl/Nx-behandelten Mäuse. In beiden hypertonen Gruppen, TPH1^{+/+} als auch TPH1^{-/-}, ist eine signifikante Gewichtszunahme, verglichen mit unbehandelten Tieren, festzustellen. Die TPH1^{-/-} zeigten jedoch gegenüber den TPH1^{+/+} Mäusen eine weit stärker ausgeprägte Hypertrophie, waren also stärker geschädigt.

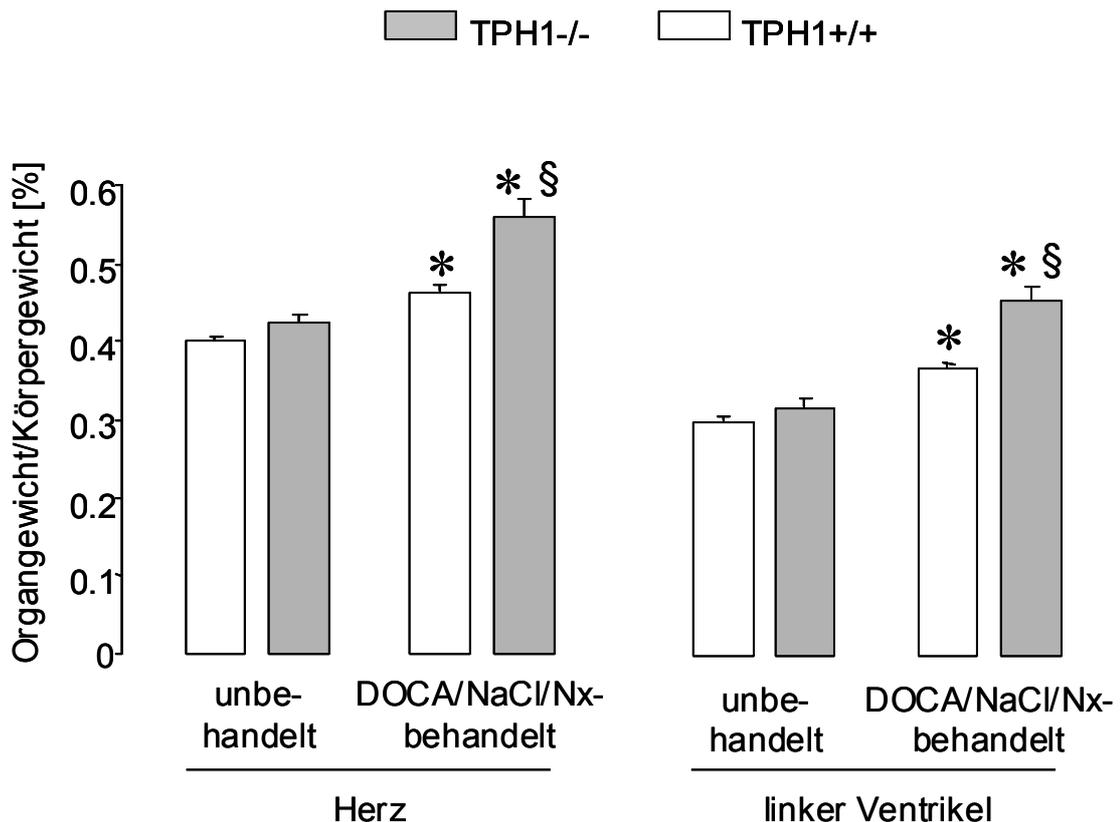


Abbildung III.15: Herzgewichte nach DOCA/NaCl/Nx-Behandlung bezogen auf das Körpergewicht.

Nach DOCA/NaCl/Nx-Behandlung zeigen TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tiere signifikant größere Herzgewichte und Gewichte des linken Ventrikels (normiert auf das Körpergewicht des jeweiligen Tieres; * $P < 0.05$ versus unbehandelt). Bei den TPH1^{-/-} Tieren ist diese Gewichtszunahme jedoch deutlich stärker ausgeprägt als in den TPH1^{+/+} Mäusen (§ $P < 0.05$ versus TPH1^{+/+} DOCA/NaCl/Nx-behandelt; n=5 für TPH1^{+/+}; n=6 für TPH1^{-/-}).

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei den Nierenschäden. Auch hier reagieren die Knockout-Tiere sensibler als die entsprechenden Wildtypiere mit Schädigungen auf den Bluthochdruck. Nach drei Wochen DOCA/NaCl/Nx-Behandlung scheiden die TPH1^{-/-} Tiere circa siebenmal mehr Albumin mit dem Urin aus als die TPH1^{+/+} Mäuse. Dieser Unterschied erreicht in den weiblichen Tiergruppen aufgrund der starken Schwankung keine Signifikanz ($P > 0.05$; Abbildung III.16). Bei den männlichen Tieren war der Unterschied eindeutiger ($P < 0.05$; Abbildung III.17).

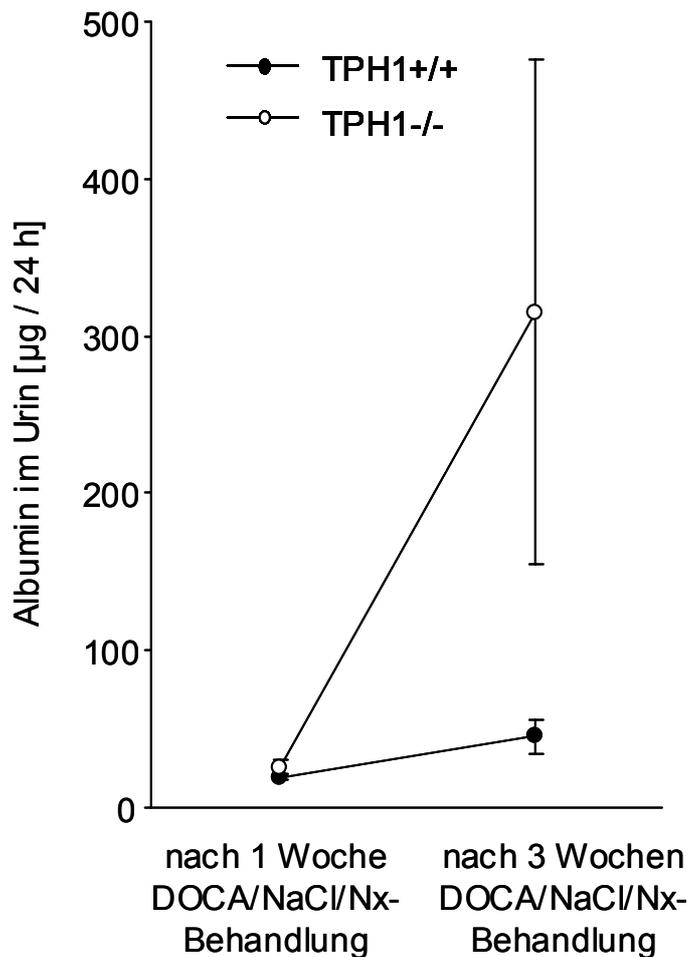


Abbildung III.16: Albumin-gehalte im Urin während der DOCA/NaCl/Nx - Behandlung von weiblichen Tieren.

Eine und drei Wochen nach Beginn der bluthochdruckinduzierenden Behandlung wurden die Albumingehalte im Urin ermittelt. Nach dreiwöchiger Behandlung zeigen die TPH1^{-/-} Weibchen eine deutlich stärkere Albuminausscheidung als die TPH1^{+/+} Kontrollen. Aufgrund der großen Variabilität der Werte kann jedoch keine Signifikanz festgestellt werden. ($P > 0.05$; $n=5$ für TPH1^{+/+}; $n=6$ für TPH1^{-/-}).

Auffallend ist, dass bei der Albuminausscheidung sowohl bei den TPH1^{+/+}, als auch bei den TPH1^{-/-} Mäusen ein deutlicher Geschlechterunterschied festzustellen war. Die Weibchen scheiden nach drei Wochen DOCA/NaCl/Nx-Behandlung jeweils nur circa 40 % der Albuminmenge aus, die die männlichen Tiere abgeben. Bei den TPH^{+/+} Tieren ist dieser Unterschied signifikant ($P < 0.05$), bei den TPH1^{-/-} Tieren dagegen nicht ($P > 0.05$). Der Grund liegt wohl auch hier in der großen Varianz der Daten.

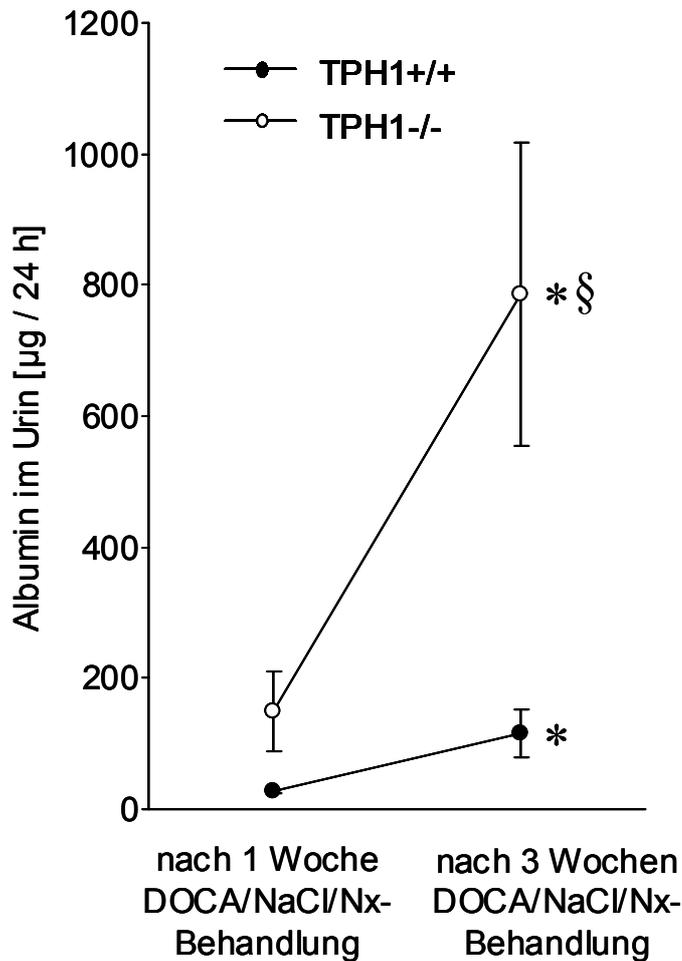


Abbildung III.17: Albumingehalte im Urin während der DOCA/NaCl/Nx - Behandlung von männlichen Tieren.

Die Albumingehalte im Urin der männlichen TPH1-/- Tiere sind wie die der weiblichen TPH1-/- Tiere (Abbildung III.16) gegenüber den Wildtyp-Kontrollgruppen stark erhöht. Hier zeigen die Werte auch Signifikanz (* $P < 0.05$ versus 1 Woche Behandlung; § $P < 0.05$ versus TPH1+/+; 1 Woche nach Behandlung; $n=6$ für beide Gruppen; 3 Woche nach Behandlung: $n=9$ für TPH1+/+ und $n=7$ für TPH1-/-).

Die histologische Untersuchung der geschädigten Nieren zeigt sowohl in TPH1+/+, als auch in TPH1-/- Tieren die erwarteten Proteinansammlungen in den Tubuli (Abbildung III.18 A). Die TPH1-/- Mäuse weisen daneben aber auch auffällige Veränderungen an den Nierenkörperchen auf. Die Bowmansche Kapsel vieler Nierenkörperchen zeigt deutliche Zeichen einer Zellproliferation, in deren Folge der Raum zwischen innerer und äußerer Wand der Bowmanschen Kapsel, in besonders schweren Fällen auch der proximale Tubulus, verschlossen wird (Abbildung III.18 C-E). Die Anzahl der durch proliferierte Zellen „verstopften“ Nierenkörperchen scheint nicht mit der ausgeschiedenen Albuminmenge zu korrelieren. Für eine genaue Analyse war die Datenmenge jedoch zu klein. In den TPH1+/+ Tieren sind keine derartigen Zellproliferationen sichtbar. Dieser Effekt beschränkt sich auf die DOCA/NaCl/Nx-behandelten TPH1-/- Mäuse.

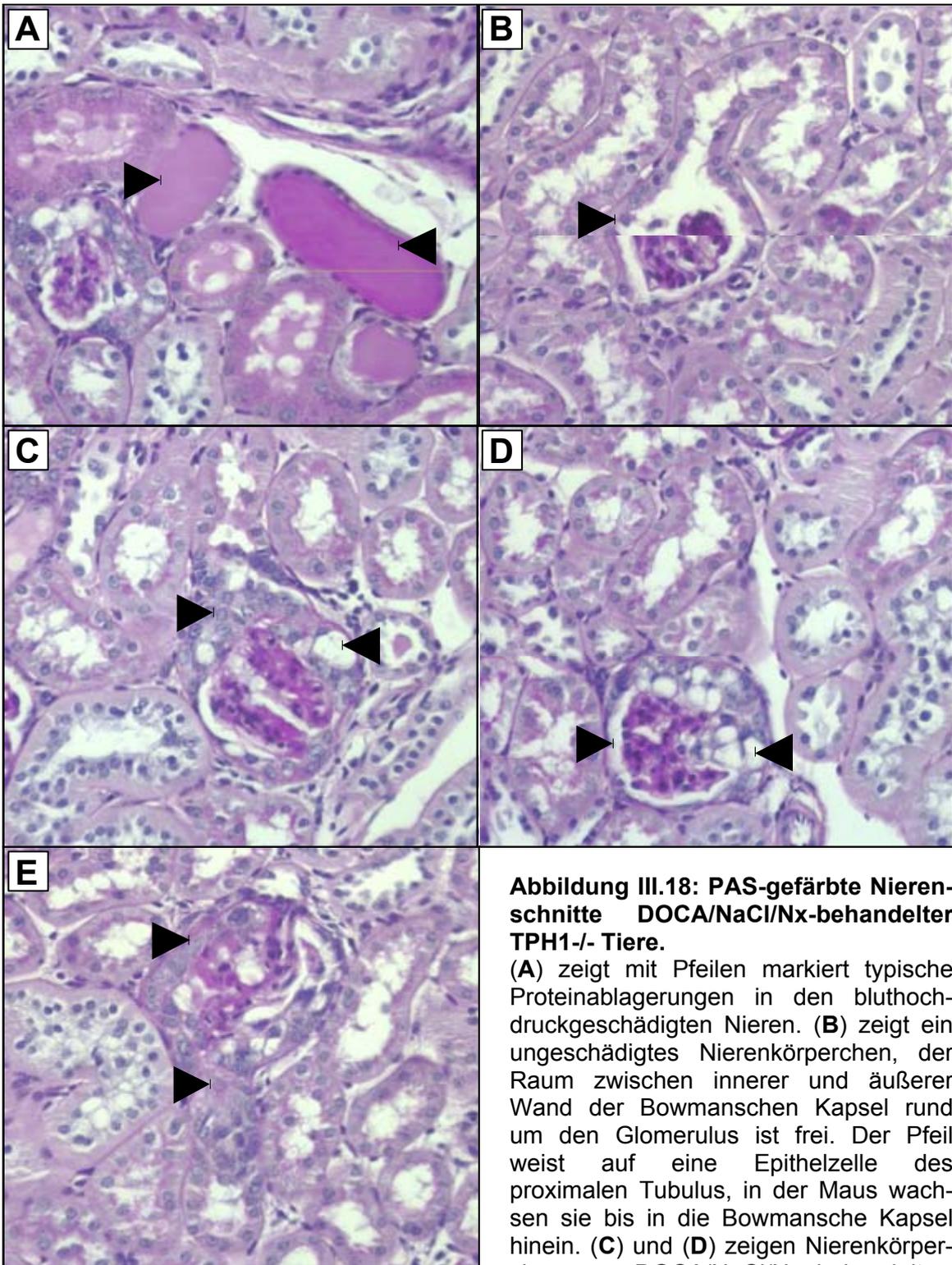


Abbildung III.18: PAS-gefärbte Nierenschnitte DOCA/NaCl/Nx-behandelter TPH1^{-/-} Tiere.

(A) zeigt mit Pfeilen markiert typische Proteinablagerungen in den bluthochdruckgeschädigten Nieren. (B) zeigt ein ungeschädigtes Nierenkörperchen, der Raum zwischen innerer und äußerer Wand der Bowmanschen Kapsel rund um den Glomerulus ist frei. Der Pfeil weist auf eine Epithelzelle des proximalen Tubulus, in der Maus wachsen sie bis in die Bowmansche Kapsel hinein. (C) und (D) zeigen Nierenkörperchen aus DOCA/NaCl/Nx-behandelten

TPH1^{-/-} Tieren. Deutlich zu sehen (jeweils linker Pfeil) sind die proliferierten Zellen, wahrscheinlich Epithelzellen des proximalen Tubulus, die die Bowmansche Kapsel zur Hälfte (D) beziehungsweise zu $\frac{3}{4}$ (C) ausfüllen. Viele der proliferierten Zellen zeigen zudem zur Vakuolenbildung (jeweils rechter Pfeil). (E) zeigt einen besonders ausgeprägten Fall. Die Bowmansche Kapsel (oberer Pfeil) und der proximale Tubulus (unterer Pfeil) sind vollständig mit proliferierten Zellen ausgefüllt.

3 5-HT in der T-zellvermittelten Immunantwort

3.1 5-HT und TPH in lymphatischen Organen

Milz, Thymus, inguinale Lymphknoten und Haut (Ohren) der für die in den immunologischen Untersuchungen verwendeten TPH1^{-/-} Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund wurden mit Hilfe der HPLC auf ihre 5-HT-Gehalte getestet. Die erhaltenen Ergebnisse werden in Abbildung III.19 dargestellt.

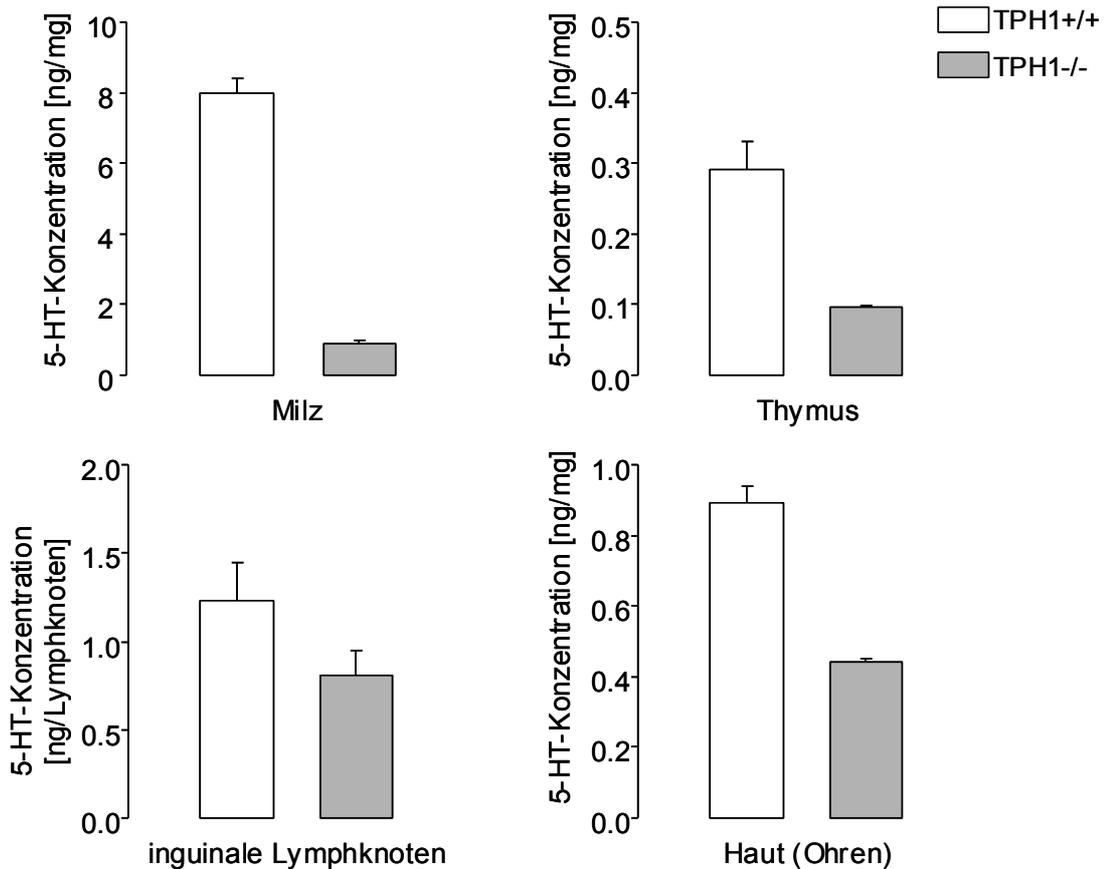


Abbildung III.19: 5-HT-Konzentrationen lymphatischen Organen und der Haut.

5-HT in Milz (A), Thymus (B), inguinalen Lymphknoten (C) und Haut (Ohren) (D) von TPH1^{-/-}-Tieren und entsprechenden Wildtypkontrollen (* $P > 0.05$; $n = 3$ je Gruppe).

Im Gegensatz zu den Thrombozyten und dem Duodenum (Abschnitte III.2.1 und III.1.1) zeigen Milz, Thymus und Lymphknoten verglichen mit den Organen aus TPH1^{+/+} Tieren recht hohe 5-HT-Konzentrationen (11.4 %, 32.8 %, 66.0 % beziehungsweise 49.6%). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre eine 5-HT-Synthese durch die TPH2 oder eine Akkumulation des 5-HT durch Speicherung zum Beispiel aus dem Plasma. Daher wurde die Expression der TPH1, aber auch der TPH2 mittels RT-PCR untersucht (Abbildung III.20). Hierbei zeigt sich, dass Thymus und Lymphknoten die TPH1, nicht jedoch die TPH2 exprimieren. Bei dem in den TPH1^{-/-} Organen enthaltenen 5-HT scheint es sich um aufgenommenes 5-HT zu handeln. Milz und Haut exprimieren dagegen keine der beiden TPH-Formen.

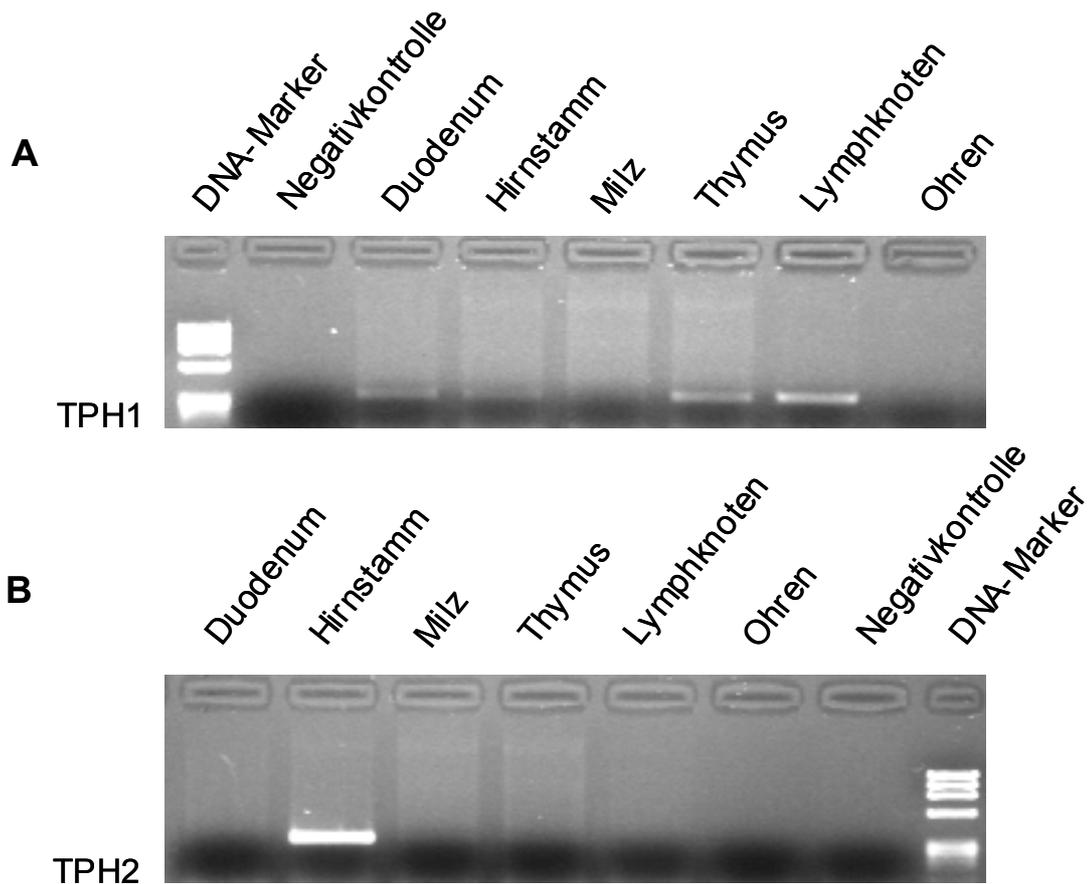


Abbildung III.20: Genexpression der TPH1 und TPH2 in ausgewählten Organen.

(A) TPH1 wird in Thymus und Lymphknoten, nicht jedoch in Milz und Haut (Ohren) exprimiert. Als Positivkontrolle diente Duodenum. (B) TPH2 wird in keinem der untersuchten Gewebe exprimiert. Als Positivkontrolle diente hier Hirnstamm.

3.2 Abgeschwächte Immunantwort in TPH1^{-/-}-Mäusen

Da es in der Literatur viele Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des 5-HT-Systems sowohl in der afferenten Sensibilisierungs-, als auch in der efferenten Auslösungsphase der Kontakthypersensibilität (CHS) gibt (siehe Abschnitt I.3.6.4), sollte in den 5-HT-defizienten TPH1-KO-Mäusen die CHS-Reaktion reduziert, wenn nicht sogar gänzlich abwesend sein.

Für die Untersuchungen der CHS-Reaktion wurde Oxazalon (Ox) benutzt.

Wie aus Abbildung III.21 ersichtlich, zeigen TPH1^{-/-}-Mäuse gegenüber entsprechenden Wildtypmäusen als Immunantwort eine auf circa 40% reduzierte 24h-Ohrenschwellung. Die Stärke der Antwort schwankt von Experiment zu Experiment, die Immunantwort in den TPH1^{-/-} Tieren ist gegenüber den entsprechenden Wildtypkontrollen jedoch immer auf circa 30-50 % reduziert. Die verschiedenen Versuche zeigen miteinander verglichen eine gewisse Variabilität. Die Ohren der TPH1^{+/+} Tiere schwollen im Mittel um 100 bis 300 µm. Die Schwankungen gehen vermutlich auf eine unterschiedliche Qualität des

verwendeten Ox zurück (die Farbe der Substanz ist, je nach Charge, sehr unterschiedlich). Eine andere mögliche Fehlerquelle stellt sicher auch das Verhalten der Tiere dar. So ist es möglich, dass sich die Ohrenschwellung verstärkt, wenn sich ein Tier während des Versuches am Ohr kratzt, oder dass die Ohrenschwellung nicht sehr stark ausgeprägt ist, wenn die Haut am Ohr durch früheres Kratzen vernarbt ist.

Eine 2 h-Schwellung konnte weder in Wildtyp-, noch in Knockouttieren registriert werden. Die Ursachen dieses Phänomens werden in Abschnitt IV.3.1 diskutiert.

Da die Sensibilisierung und die Auslösung der CHS sehr komplexe Reaktionsmechanismen sind, dienten die folgenden Experimente der genaueren Lokalisierung des Punktes, an dem 5-HT involviert ist und an dem dessen Fehlen den gezeigten Phänotyp der TPH1^{-/-}-Tiere hervorruft.

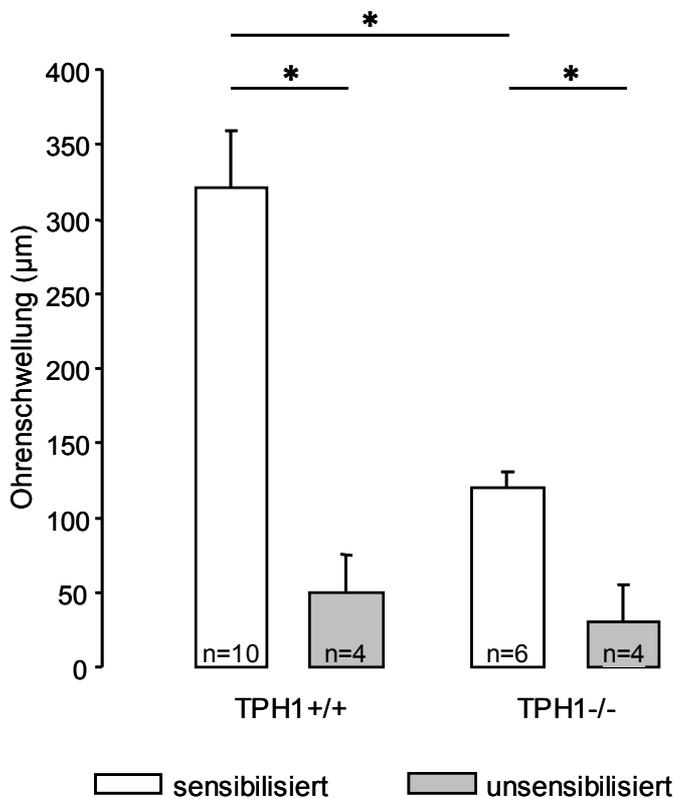


Abbildung III.21: CHS-Reaktion: Ox-induzierte Ohrenschwellung. 24h-Ohrenschwellung nach Ox-Applikation auf die Ohren von Ox-sensibilisierten und unsensibilisierten Mäusen (Kontrollgruppe). Die Sensibilisierung erfolgte vier Tage vor dem Auftrag auf die Ohren. Der Ox-Auftrag führt in sensibilisierten Tieren zu einer signifikanten Ohrenschwellung. Die Reduktion der Immunantwort in den TPH1^{-/-}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-tieren ist ebenfalls signifikant (* $P < 0.05$). Abgebildet ist eins von drei Experimenten, die jedoch alle eine signifikante Reduzierung der Immunantwort auf circa 30-50 % in TPH1^{-/-} Tieren gegenüber den TPH1^{+/+} Tieren zeigten.

3.3 Nicht-T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion

Das für diesen Versuch benutzte Crotonöl wird in Indien aus den Samen des Crotonbaumes gewonnen. Samen als auch das Öl des Samens sind dafür bekannt, bei Hautkontakt schwere Schädigungen auszulösen. Als Ursache gelten die im Öl gelösten Phenole, die als lipophile Substanzen schnell die Epidermis durchdringen und dann in der Dermis Zellschäden verursachen. Die dadurch einsetzende Rötung und Schwellung folgt ohne Verzögerung wird durch einen nicht-T-Zell-abhängigen Reaktionsmechanismus ausgelöst.

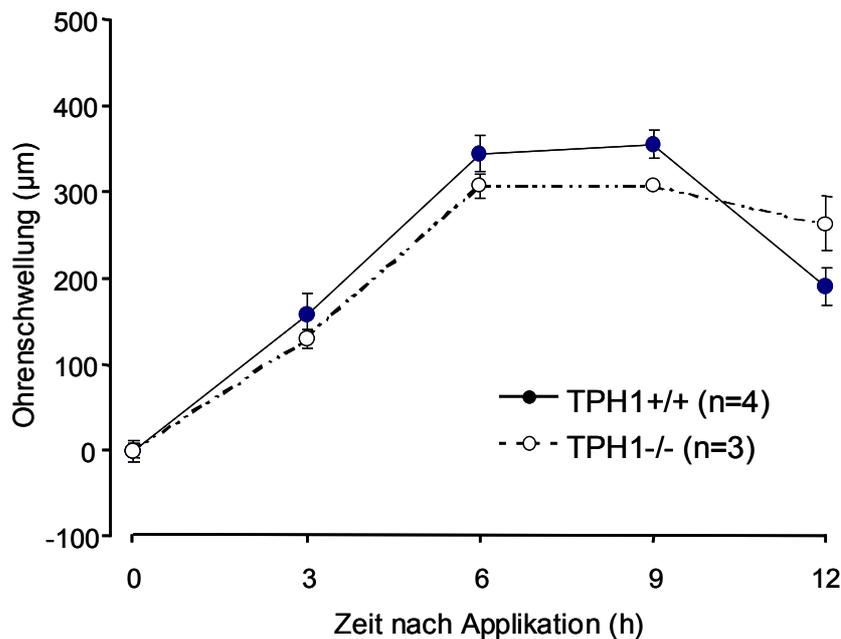


Abbildung III.22: Crotonölinduzierte Entzündungsreaktion.

Ohrenschwellung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Crotonölapplikation auf die Ohren naiver Mäuse. Zu allen gemessenen Zeitpunkten nach Crotonölapplikation sind die Ohrendicken gegenüber den ursprünglichen Ohrendicken signifikant erhöht ($P < 0.05$). Zu keinem Zeitpunkt gibt es jedoch einen signifikanten Unterschied zwischen TPH1^{-/-} und TPH1^{+/+} Tieren ($P > 0.05$; $n=4$ für TPH1^{+/+}; $n=3$ für TPH1^{-/-}).

Dieses Experiment (Abbildung III.22) zeigt, dass eine Ohrenschwellung, also die Erweiterung der Gefäße und ein Flüssigkeitseinstrom in das Gewebe in TPH1^{-/-} Tieren prinzipiell möglich ist.

3.4 Dendritische Zellen

Der erste Schritt der Sensibilisierungsphase der CHS ist die Aufnahme und Präsentation des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen. Bei Antigenen, die durch die Haut in den Körper eindringen, geschieht dies gewöhnlich durch die in der Epidermis gelegenen Langerhansschen Zellen/dendritischen Zellen.

Zuerst wurde untersucht, ob Langerhanssche Zellen in der Epidermis der TPH1^{-/-} Mäuse vorhanden sind, oder ob der Knockout die Hämatopoese, und damit auch die Reifung der Langerhanssche Zellen beeinflusst. Wie Abbildung III.23 zeigt, enthält die TPH1^{-/-} Epidermis Langerhanssche Zellen.

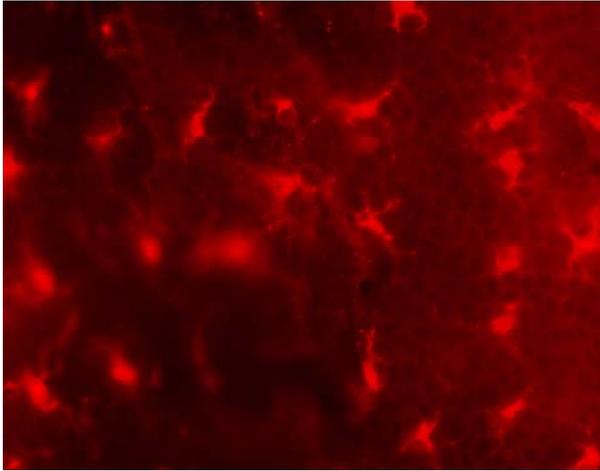


Abbildung III.23: Langerhansche Zellen in der Epidermis der TPH1^{-/-} Tiere.

Immunhistologische Färbung von TPH1^{-/-} Epidermis mit Anti-MHCII-Antikörper.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die in der Haut vorhandenen Langerhansschen Zellen Antigene aufnehmen und mit ihnen in den nächstgelegenen Lymphknoten wandern können, um sie dort als dendritische Zellen den naiven T-Zellen präsentieren zu können. Dazu wurde auf die Haut der Versuchstiere im Bereich der inguinalen Lymphknoten die fluoreszierende Substanz Fluoreszeinthiocyanat (FITC) als Antigen aufgetragen. Nach 18 h wurde in den Lymphknoten der Anteil der dendritischen Zellen mit FITC auf der Oberfläche (FITC⁺) bestimmt (siehe Abbildung III.24 A und B).

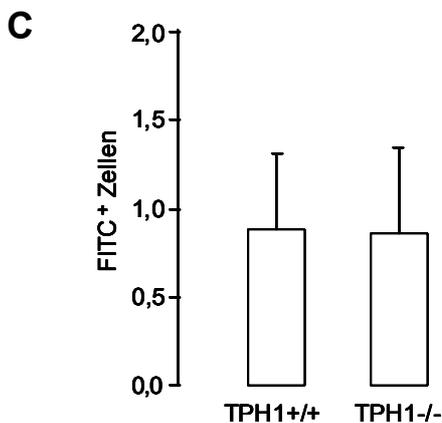
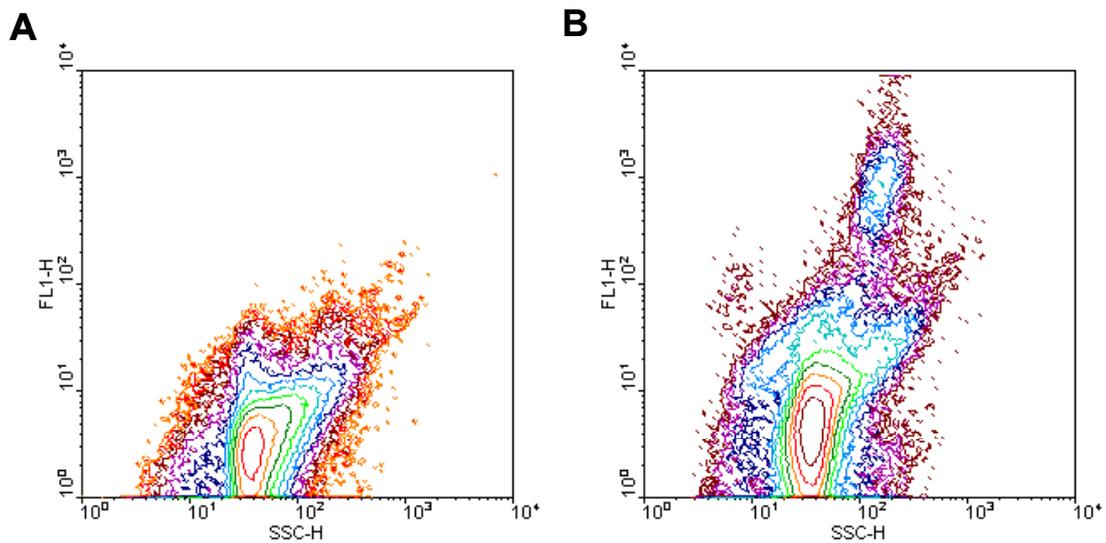


Abbildung III.24: Migrationsassay für dendritische Zellen.

(A) und (B): Im FACS-Gerät nach Granularität und Fluoreszenz aufgetrennte Lymphknotenzellen (LKZ): (A) LKZ eines unbehandelten Tieres, (B) LKZ eines FITC-behandelten Tieres. In (B) ist deutlich die fluoreszierende Population zu sehen, die in (A) fehlt. (C) Anteil fluoreszierender LKZ in den Lymphknoten von FITC-behandelten TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Mäusen. Es kann kein Unterschied in der Migration und der Antigenaufnahme der dendritischen Zellen festgestellt werden (n=4 je Gruppe).

Abbildung III.24 C zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung: zwischen den dendritischen Zellen der TPH1^{-/-} Tiere und der TPH1^{+/+} Tiere bestehen keine Unterschiede bezüglich der Antigenaufnahme und der Migration in die Lymphknoten. Diese Schritte können also nicht für die Reduzierung der CHS-Reaktion in den TPH1^{-/-} Tieren verantwortlich sein. Weiterhin wurde untersucht, ob dendritische Zellen 5-HT produzieren können. Bisher gibt es hierzu keine Daten. Deshalb wurden dendritische Zellen über mehrere Tage in Kultur gehalten, und Zellen und Überstand mittels HPLC auf zusätzliches 5-HT überprüft. Weiterhin wurden dendritische Zellen auf eine mögliche Expression von TPH1 und TPH2 getestet. Beide Versuchsansätze lieferten negative Resultate. Dendritische Zellen können also kein 5-HT synthetisieren (Daten nicht gezeigt).

3.5 Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen sensibilisierter Tiere

Beim adoptiven Transfer werden Lymphknotenzellen (LKZ) von Ox-sensibilisierten Mäusen isoliert und unsensibilisierten Mäusen verabreicht. Dort können sie eine Immunantwort initiieren, wenn der Rezipient mit dem Antigen, also Ox, in Kontakt kommt (Abbildung III.25).

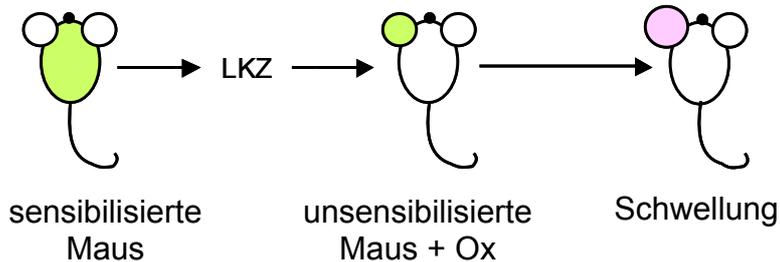


Abbildung III.25: Schema des Adoptiven Transfers.

Die aus den Lymphknoten einer mit Ox-sensibilisierten Maus isolierten proliferierten T-Zellen (LKZ) können in einem unsensibilisierten Tier eine immunologische Reaktion auf Ox auslösen, wozu das unsensibilisierte Tier alleine nicht fähig wäre.

Mit Hilfe des adoptiven Transfers sollte untersucht werden, ob die reduzierte Immunantwort (Abschnitt III.3.2) durch:

- a) eine inhibierte T-Zell-Aktivität (durch mangelnde Stimulation, Proliferation oder Reaktion auf das auslösende Agens), oder
- b) eine Inhibierung der T-Zell-Reaktion durch T-Zell-umgebende Komponenten (Gefäßsystem, Veränderungen im Gewebe, andere Blutzellen)

verursacht wird.

Der erste adoptive Transfer wurde mit LKZ aus Ox-sensibilisierten TPH1^{-/-} Tieren unternommen.

Wie in Abbildung III.26 zu sehen ist, lösen die TPH1^{-/-} LKZ in den TPH1^{+/+} Tieren eine stärkere Reaktion aus als in den TPH1^{-/-} Mäusen, denen zur Kontrolle ebenfalls die TPH1^{-/-} LKZ verabreicht wurden. Die Ohrenschwellung in den TPH1^{-/-} Mäusen beträgt circa 30 % verglichen mit der in den TPH1^{+/+} Tieren.

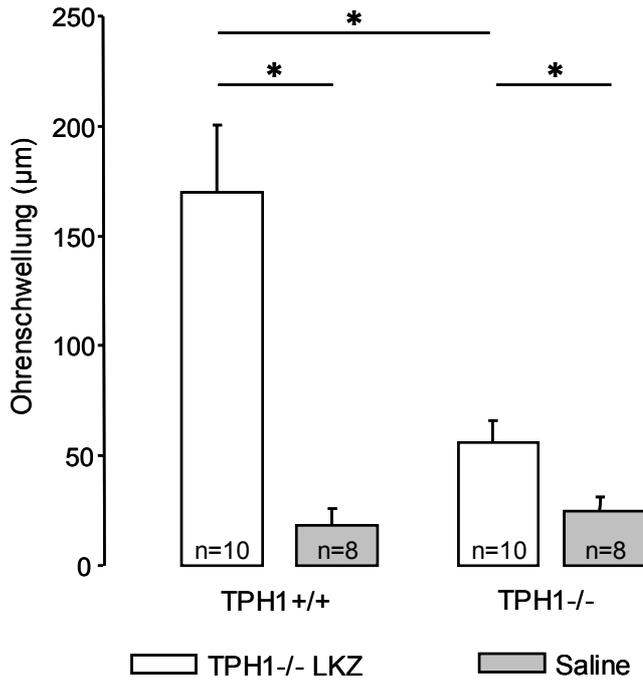


Abbildung III.26: Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen aus TPH1-/- Tieren.

LKZ aus sensibilisierten TPH1-/- Mäusen wurden intravenös in unsensibilisierte TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere gespritzt und die 24h-Ohrschwellung nach Ox-Gabe auf die Ohren vermessen. Kontrolltiere wurden mit Kochsalzlösung (Saline) behandelt. TPH1-/- LKZ lösen in TPH1+/+ Tieren eine stärkere Immunantwort aus als in TPH1-/- Tieren. (* $P < 0.05$).

Dieser Versuch zeigt, dass TPH1-/-T-Zellen durchaus eine stärkere Immunantwort auslösen können, wenn sie in „TPH1+/+ Umgebung“ agieren, beziehungsweise dass eine „TPH1-/- Umgebung“ inhibitorisch auf die T-Zell-Reaktion wirkt. Um zu untersuchen, ob die „TPH1-/- Umgebung“ alleine diese Reduktion in der Immunantwort auslöst, oder ob zusätzlich dazu auch ein TPH1-Knockout in den T-Zellen vorliegen muss, wurde der Versuch mit LKZ aus Ox-sensibilisierten TPH1+/+ Tieren wiederholt.

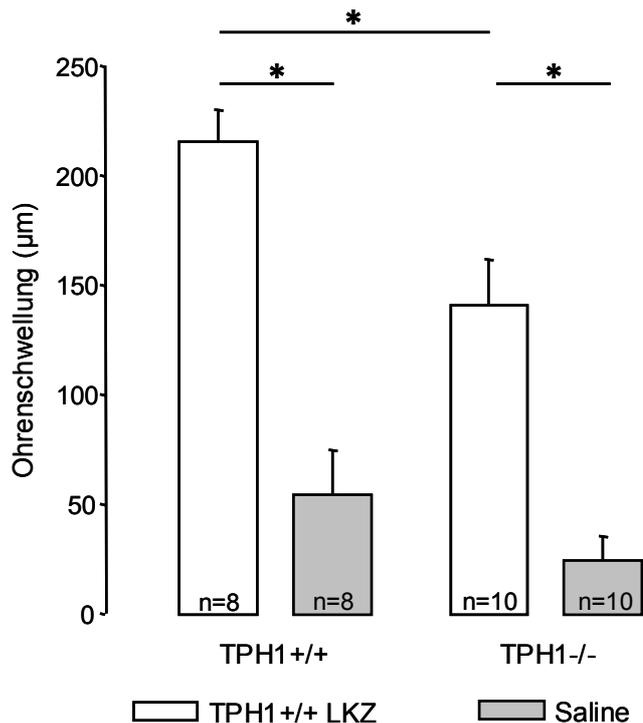


Abbildung III.27: Adoptiver Transfer mit Lymphknotenzellen aus TPH1+/+ Tieren.

Dieser Versuch wurde analog zu dem in Abbildung III.26 gezeigten Versuch durchgeführt, jedoch wurden hier LKZ aus sensibilisierten TPH1+/+ Mäusen transferiert. (* $P < 0.05$).

Auch bei diesem Versuch (Abbildung III.27) zeigt sich eine stärkere Immunantwort in den TPH1+/+ Tieren. In den TPH1-/- Mäusen ist die Ohrschwellung auf circa 60 % verglichen mit den TPH1+/+ Tieren reduziert. Damit bestätigt sich die Vermutung, dass hauptsächlich die „TPH1-/- Umgebung“ für die reduzierte Immunantwort in den TPH1-/- Mäusen verantwortlich ist.

Es gab jedoch folgende Unterschiede zwischen den beiden Versuchen:

- a) TPH1-/- LKZ in TPH1+/+ Tieren erzeugen eine schwächere Reaktion (Schwellung um 170 µm) als die TPH1+/+ LKZ (Schwellung um 220 µm)
- b) die Reaktion der TPH1+/+ LKZ in TPH1-/- Tieren ist weniger stark inhibiert (auf 60 %) als die der TPH1-/- LKZ (auf 30 %)

Beide Phänomene können durchaus durch die Variabilität des CHS-Tests selbst verursacht worden sein (siehe auch Abschnitt III.3.2). Da jedoch für einen adoptiven Transfer sehr viele Versuchstiere benötigt werden, wurden die Tests nicht wiederholt.

3.6 Wiederherstellung der CHS-Reaktion durch 5-HT-Applikation

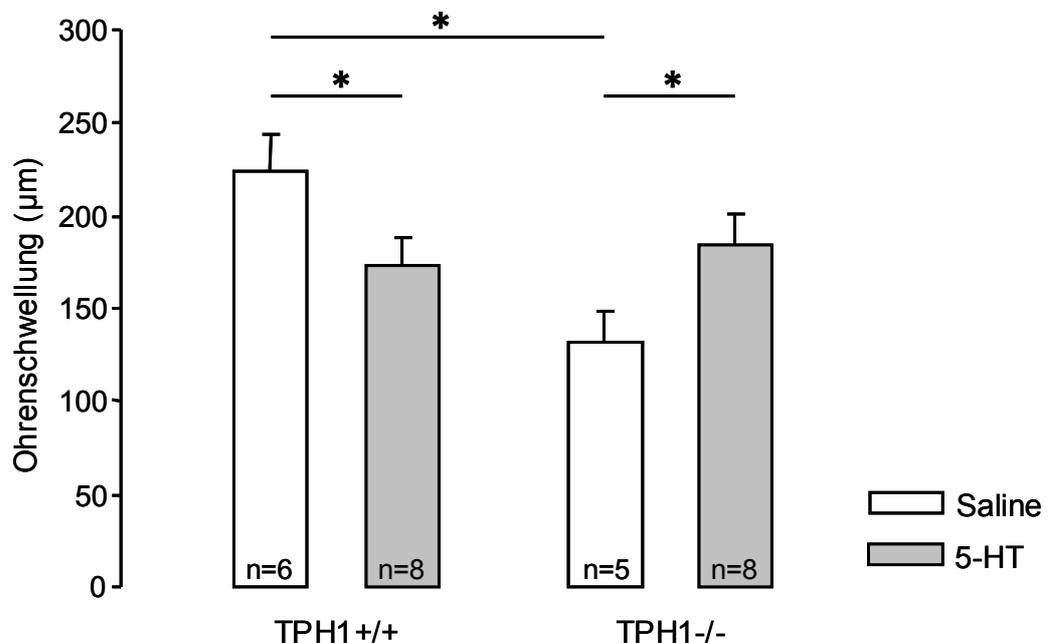


Abbildung III.28: Phentyp-Rettung durch 5-HT-Applikation.

Ox-sensibilisierten TPH1-/- und TPH1+/+ Tieren wurde vier Stunden vor der Ox-Applikation auf die Ohren intravenös 5-HT in Kochsalzlösung (3mg/kg Körpergewicht) verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten nur Kochsalzlösung (Saline). Bei den Kontrollgruppen zeigt sich wieder die Reduktion der Immunantwort in den TPH1-/- Tieren gegenüber den Wildtyptieren (ähnlich Abbildung III.21). Die 5-HT-Applikation führt in TPH1-/- Mäusen zu der erwarteten Verstärkung der Immunantwort, in den TPH1+/+ Tieren dagegen zu einer Abschwächung. Beide Veränderungen sind signifikant verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen. Der in den Kontrollgruppen signifikante Unterschied zwischen TPH1+/+ und TPH1-/- Mäusen hebt sich durch die 5-HT-Gabe auf. (* $P < 0.05$).

Die Ausbildung der CHS-Reaktion scheint in entscheidendem Maße vom 5-HT in den Thrombozyten des Blutes und den Mastzellen der Haut abzuhängen (Abschnitt I.3.6.4).

Daher wurde versucht, mit einer 5-HT-Applikation die Beeinträchtigung der CHS-Reaktion in den TPH1^{-/-} Mäusen aufzuheben.

Sensibilisierten Tieren wurde vor Auftrag der auslösenden Ox-Lösung auf die Ohren 5-HT intravenös verabreicht. Diese Behandlung führt zu einer Beladung der Thrombozyten, vielleicht auch der Mastzellen. Kontrolltieren wurde Kochsalzlösung appliziert. Die Auswirkungen der Behandlung auf die CHS-Reaktion werden in Abbildung III.28 dargestellt.

Die Ausprägung der CHS-Reaktion in den TPH1^{-/-} Mäusen kann durch die 5-HT-Applikation signifikant gesteigert werden. Dieser Befund zeigt, dass die Vorbeladung der Thrombozyten mit exogenem 5-HT den Defekt in der Entwicklung der CHS-Reaktion aufheben kann. In den TPH1^{+/+} Tieren wird dagegen die CHS-Reaktion durch die 5-HT-Applikation signifikant inhibiert. Damit heben sich die Unterschiede zwischen TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tieren, die in den Kontrollgruppen ebenso wie in der basalen CHS-Bestimmung (Abbildung III.21) sichtbar sind, auf.

3.7 *In vitro*-T-Zell-Proliferation

Die T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation wurden mit Hilfe des ³H-Thymidin-Inkorporationsassay genauer untersucht. Dazu wurden Milzzellen von TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tieren präpariert, und mit Concanavalin A stimuliert. Die Stimulation erfolgte in unterschiedlichen Medienzusammensetzungen, um eine Beeinflussung durch im Serum enthaltenes 5-HT auszuschließen:

- > RPMI 1640 mit 10% fötalem Kälberserum, enthält circa 125 pg/μl 5-HT
- > RPMI 1640 mit 10% Serumersatz
- > RPMI 1640 mit 10% Serumersatz und 125 pg/μl 5-HT

Im RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum nehmen die T-Zellen der TPH1^{+/+} Tiere durchschnittlich 8089.7 ± 1084.4 cpm, die der TPH1^{-/-} Tiere dagegen 10030.8 ± 415.0 cpm ³H-Thymidin auf. Die TPH1^{-/-} T-Zellen scheinen auf die Concanavalin A-Stimulation hin etwas besser zu proliferieren, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

In den Medien mit Serumersatz ist die ³H-Thymidin-Aufnahme kaum detektierbar. Die Ursache für dieses Phänomen könnte die veränderte Adhäsionsneigung der Zellen gewesen sein. Im Medium mit fötalem Kälberserum liegen die Zellen frei beweglich vor und können sich daher am Grund der Rundbodenplatte sammeln. Das Ergebnis ist ein enger Kontakt zwischen T-Zellen und accessorischen Zellen, was die Proliferation überhaupt erst möglich macht, da zur Stimulation mit Concanavalin A accessorische Zellen nötig sind (Ahmann *et al.*, 1978). In den Medien mit Serumersatz „kleben“ die Zellen am Boden der Platte und berührten sich kaum. Eine effiziente Stimulation ist da kaum möglich.

Da die Lymphknoten, in denen die T-Zellstimulation ja hauptsächlich *in vivo* stattfindet, in den TPH1^{-/-} nicht 5-HT defizient sind, sondern nur eine nicht signifikante Erniedrigung der 5-HT-Konzentration aufweisen (Abschnitt III.3.1), stellt die *in vitro*-Proliferation mit Zusatz von fötalem Kälberserum ähnliche Bedingungen dar, wie sie *in vivo* vorzufinden sind. Daraus lässt sich schließen, dass die T-Zellproliferation in den TPH1^{-/-} Tieren nicht beeinträchtigt ist.

4 5-HT in der IDO-vermittelten Schwangerschaftstoleranz

4.1 Effekte einer erhöhten Trp-Verfügbarkeit auf den Schwangerschaftserfolg

Wie schon in Abschnitt I.3.7.4 beschrieben, soll eine Reduktion des Trp-Spiegels durch das Enzym IDO nicht nur an der Schwangerschaftstoleranz beteiligt, sondern auch dafür notwendig sein. Ungeklärt ist jedoch bislang, ob dazu wirklich Trp, oder aber das daraus entstehende 5-HT abgebaut werden muss. Wenn Trp die entscheidende Substanz ist, deren Abbau zur Toleranz führt, müsste sich eine zusätzliche Trp-Gabe während der Schwangerschaft sowohl in TPH1+/+, als auch in den TPH1-/- Tieren negativ auf einen allogenen Schwangerschaftserfolg auswirken. Sollte jedoch 5-HT die entscheidende Substanz sein, würde sich die Trp-Gabe nur bei den allogenen Schwangerschaften der TPH1+/+ Tiere negativ auswirken. TPH1-/- blieben verschont, da das Trp in diesen Tieren nicht in 5-HT umgewandelt werden kann. Syngene Schwangerschaften müssten aber in beiden Szenarien unbeeinflusst bleiben, da ein gestörter Toleranzmechanismus in syngenen Schwangerschaften nicht zur Abstoßung führen kann, schließlich ist der syngene Fötus dem maternalen Immunsystem nicht fremd und damit nicht abstoßbar.

Um zu klären, ob Trp oder 5-HT für die Toleranz verantwortlich ist, wurden TPH1+/+ und TPH1-/- Mäuse syngen oder allogenen verpaart und Trp in verschiedenen Mengen verabreicht. Da bei Beginn dieses Versuches noch keine TPH1-Knockout-Tiere auf C57BL/6-, sondern nur solche auf gemischtem genetischen Hintergrund zur Verfügung standen, wurden die Tiere wie folgt verpaart:

TPH1+/+	verpaart mit	TPH1+/+	ergibt	syngene Schwangerschaft
TPH1+/+	verpaart mit	CBA/J	ergibt	allogene Schwangerschaft
TPH1-/-	verpaart mit	TPH1-/-	ergibt	syngene Schwangerschaft
TPH1-/-	verpaart mit	CBA/J	ergibt	allogene Schwangerschaft

Das ergab zwar keine reinen syngenen Schwangerschaften, stellte aber unter diesen Bedingungen die Anpaarung mit der bestmöglichen genetischen Übereinstimmung dar. Die TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere stießen Hauttransplantate von CBA/J-Tieren gleichermaßen ab (Walther, 2000). Daher sollten auch allogenen Föten in den TPH1+/+ und den TPH1-/- gleichermaßen abgestoßen werden, wenn die Toleranz aufgehoben wird. Die Trp-Gabe begann 3 – 5 dpc über das Futter (w/w). Als schwanger galten Tiere, die

- a) Jungtiere gebären
- b) die schwanger aussahen und deren Käfige 20 oder 21 dpc Blut enthielten (Zeichen einer Geburt, Jungtiere aber tot und aufgeessen)
- c) wenn weder a) noch b) zutreffen, deren Uteri Zeichen einer bestandenen Schwangerschaft aufwiesen (zum Beispiel Implantationsstellen)

Alle anderen Tiere galten als nicht schwanger. Der Anteil trotz Vaginalplug nicht schwanger gewordenen Mäuse war in allen Gruppen ähnlich hoch, woraus sich schließen lässt, dass die Trp-Verfütterung die Entwicklung der Föten bis zur Einnistung und die Einnistung

III ERGEBNISSE

nicht stört.

Zur Wurfgrößenbestimmung wurden alle Jungtiere, die 20 oder 21 dpc im Käfig aufgefunden wurden, egal ob tot oder lebendig gezählt. Aufgegessene Jungtiere konnten natürlich nicht gezählt werden, jedoch handelt es sich dabei um einen systematischen Fehler, der in allen Gruppen auftreten sollte.

Die Wurfgrößen der Gruppen ergab sich aus der Anzahl der aufgefundenen Jungtiere durch die Anzahl der schwangeren Muttertiere und werden in Tabelle III.4 dargestellt.

Genotyp Weibchen	Verpaarung	Genotyp Föten	Trp-Zugabe [%]		
			0	5	7.5
TPH1+/+	syngen	TPH1+/+	8.3 ± 0.6 (9)	7.9 ± 0.6 (10) [§]	1.0 ± 0.6 (6) *
TPH1+/+	allogen	TPH1+/+	8.3 ± 0.5 (16)	4.7 ± 1.0 (15) *	0.6 ± 0.4 (9) *
TPH1-/-	syngen	TPH1-/-	7.2 ± 0.8 (13)	4.9 ± 0.6 (14) *	0.9 ± 0.4 (9) *
TPH1-/-	allogen	TPH1+/-	7.6 ± 0.5 (14)	3.8 ± 0.9 (12) *	1.5 ± 0.7 (13) *

Tabelle III.4: Wurfgrößen syngen und allogen verpaarter TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere unter Trp-Gabe.

Die jeweilige Gruppengröße ist in Klammern angegeben. (* $P > 0.05$ versus den ohne zusätzlichen Trp gefütterten Gruppen; [§] $P > 0.05$ versus allen anderen mit 5 % zusätzlichen Trp gefütterten Gruppen)

Zum besseren Verständnis werden die Daten in Abbildung III.29 noch einmal graphisch dargestellt.

Bei den Schwangerschaften ohne zusätzliche Trp-Gabe zeigte sich kein Unterschied zwischen den vier Gruppen. Werden 5 % Trp verfüttern, zeigte sich bei den TPH1+/+ Tieren ein deutlicher Unterschied zwischen den syngen und den allogen verpaarten Tieren. Letztere zeigen sowohl im Vergleich zu der Gruppe ohne zusätzlichen Trp, als auch zu der syngenen Gruppe eine Verminderung der Wurfgröße. Im Gegensatz dazu zeigen beide TPH1-/- Gruppen eine Wurfgrößenminderung verglichen mit der 0 % Trp-Gruppe. Untereinander, also zwischen syngen und allogen verpaarten Tieren zeigte sich jedoch kein Unterschied. Bei der Verfütterung von 7.5 % Trp verminderte sich die Wurfgröße in allen Gruppen gleichermaßen drastisch.

Die Aussage dieses Versuches ist uneindeutig. Zwar weist der Unterschied in der Wurfgröße zwischen syngen und allogen verpaarten TPH1+/+ Tieren und die Tatsache, dass dieser Unterschied nicht zwischen den TPH1-/- Tieren auftritt, darauf hin, dass 5-HT den Toleranzeffekt vermittelt. Andererseits sollten die Wurfgrößen der TPH1-/- Tiere dann aber ähnlich der der syngen verpaarten TPH1+/+ Gruppe sein. Mögliche Ursache der verminderten Wurfgröße in den TPH1-/- Gruppen könnte eine Aufstauung des Trp durch den TPH-Knockout sein, welche auch unabhängig vom Toleranzeffekt negative Auswirkungen haben könnte. Von der Trp-Aufstauung sollten dann jedoch die syngen verpaarten TPH1-/- Tiere stärker betroffen sein als die allogen verpaarten TPH1-/- Tiere,

da in den Föten der letzteren der Trp-Abbau über die 5-HT-Synthese nicht durch den TPH-Knockout blockiert ist (Föten sind heterozygot!). Somit ist nicht auszuschließen, dass doch ein Unterschied in der Wurfgröße zwischen syngen und allogenen verpaarten TPH1-/- Tieren aufgrund der Vermittlung der Toleranz durch Trp existiert.

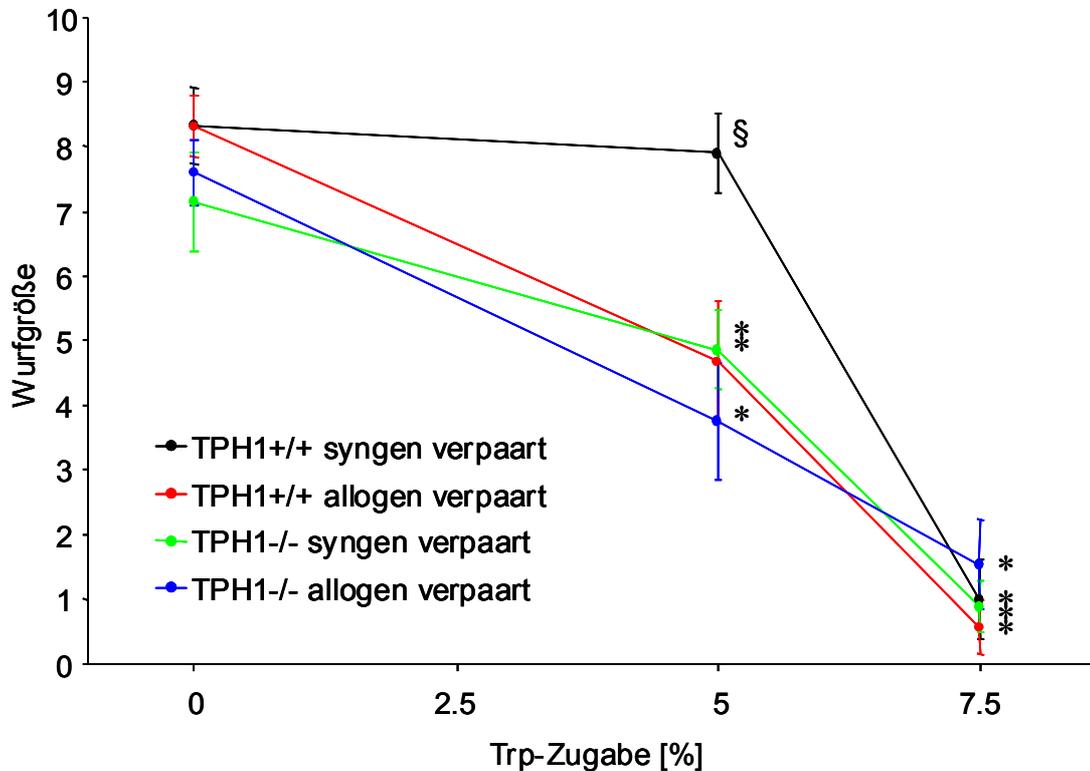


Abbildung III.29: Wurfgrößen syngen und allogene verpaarter TPH1+/+ und TPH1-/- Tiere unter Trp-Gabe.

Signifikanzangaben siehe Tabelle III.4.

Klarheit würde ein Versuch bringen, in dem sowohl die syngen, als auch die allogene verpaarten TPH1-/- Tiere für den TPH-Knockout homozygote Föten tragen. Dazu müssten aber erst TPH1-/- Tiere auf CBA/J-Hintergrund erstellt werden. Da dies jedoch, ebenso wie dieser Verpaarungsversuch, sehr aufwändig ist, wurden Versuche mit dem IDO-Inhibitor 1-Methyltryptophan (1-MT) unternommen. Wenn 5-HT statt Trp in der Entwicklung der Toleranz gegenüber einem allogenen Fötus eine Rolle spielt, dann sollten allogene verpaarte TPH1-/- Tiere vor dem negativen Effekt des 1-MT geschützt sein.

Anmerkung: Einen Teil der in diesem Abschnitt gezeigten Daten habe ich bereits während meines Studiums erstellt und in meiner Diplomarbeit präsentiert (Wilhelm, 2001). Da das Projekt aufgrund der Zeit, die für die Anpaarungen benötigt wurde, nicht in der Diplomarbeitungszeit beendet werden konnte, habe ich es in meiner Dissertationszeit weitergeführt und beendet.

4.2 Der Effekt des IDO-Inhibitors 1-MT auf allogene Schwangerschaften

Für diesen Versuch wurden die Mäuse allogenen verpaart. Die TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Weibchen, welche auf die C57BL/6-Linie zurückgekreuzt worden waren, wurden mit CBA/J-Böckchen, das CBA/J-Weibchen wurde mit einem C57BL/6-Böckchen verpaart. 4 dpc wurden den Weibchen ein oder zwei 1-MT-Pellets (enthalten 150 mg pro Pellet und geben dieses gleichmäßig über sieben Tage ab) appliziert, 13 dpc wurden die Tiere getötet und die Jungtiere gezählt und untersucht.

Da 4 dpc noch nicht zu erkennen war, ob die Anpaarung erfolgreich war, wurden auch nicht schwangeren Weibchen Pellets appliziert. Konnten 13 dpc bei einer Maus keine Zeichen für eine bestehende oder bestandene Schwangerschaft festgestellt werden, wurde sie dieser Gruppe zugeordnet. Von acht angepaarten TPH1^{+/+} Weibchen waren vier, und von sechs angepaarten TPH1^{-/-} Weibchen ebenfalls vier schwanger. Der Anpaarungserfolg lag somit bei 50 beziehungsweise 67 %, was erfahrungsgemäß normal ist. Damit konnte auch ausgeschlossen werden, dass 1-MT die Implantation der Embryonen 5 dpc inhibierte.

Überraschend war, dass sich in allen untersuchten Gruppen trotz 1-MT Föten entwickeln konnten, die keine offensichtlichen Entwicklungsschäden aufwiesen. In Abbildung III.30 wird ein solcher Fötus gezeigt.



Abbildung III.30: Auswirkung der 1-MT-Applikation auf allogene Föten.

(A) Fötus 13 dpc CBA/J x C57BL/6 unbehandelt (B) Fötus 13 dpc CBA/J x C57BL/6 mit 1-Methyltryptophan behandelt. Es sind keine Entwicklungsunterschiede zwischen diesen beiden Föten erkennbar.

III ERGEBNISSE

Die Anzahl der Jungtiere, die 13 dpc in den schwangeren Mäusen aufgefunden wurden, wird in Tabelle III.5 genauer aufgelistet.

Mit einer Ausnahme enthielten alle behandelten Weibchen gemäß dem Schwangerschaftstag entsprechend entwickelte Föten. Die geringe Anzahl retardierter Föten ist nichts Ungewöhnliches und tritt auch in unbehandelten Tieren auf. Sie entstehen zum Beispiel, wenn sich die Föten zu eng beieinander einnisten und damit der Platz für die weitere Entwicklung nicht mehr vorhanden ist. Bei einem Weibchen waren alle Föten retardiert. Auch dieses Phänomen konnte schon bei unbehandelten Tieren beobachtet werden. Zwar sind für eine statistische Auswertung die Gruppen zu klein, jedoch kann man abschätzen, dass die untersuchten Tiere ähnliche Wurfgrößen wie die unbehandelten Tiere in Abschnitt III.4.1 hervorgebracht hätten.

Genotyp/ Mausstamm der Muttertiere	Anzahl der applizierten 1-MT Pellets (4 dpc)	Anzahl der Jungtiere (13 dpc)	davon retardiert
TPH1 ^{-/-}	1	11	3
TPH1 ^{-/-}	1	8	1
TPH1 ^{-/-}	1	8	1
TPH1 ^{-/-}	2	12	2
TPH1 ^{+/+}	1	Implantationsstellen	alle
TPH1 ^{+/+}	1	11	2
TPH1 ^{+/+}	1	9	2
TPH1 ^{+/+}	2	9	1
CBA/J	1	5	0

Tabelle III.5: Anzahl und Entwicklungsstand allogener Föten nach 1-MT-Applikation während der Schwangerschaft.

Es zeigte sich somit, dass die Applikation der 1-MT-Pellets weder die allogenen Schwangerschaften der TPH1^{+/+}, noch der TPH1^{-/-} Tiere negativ beeinflussen konnte. Eine mögliche Ursache könnte die Verkapselung des Pellets gewesen sein, die dann den Übertritt des 1-MT in das Gewebe unterband. Dies konnte jedoch ausgeschlossen werden, nachdem im Plasma eines der Tiere 1-MT nachgewiesen wurde (Abbildung III.31). Weitere mögliche Ursachen, warum in diesem Experiment, im Gegensatz zur Literatur (Munn *et al.*, 1998), die Föten nicht abgestoßen wurden, werden im Diskussionsteil erörtert.

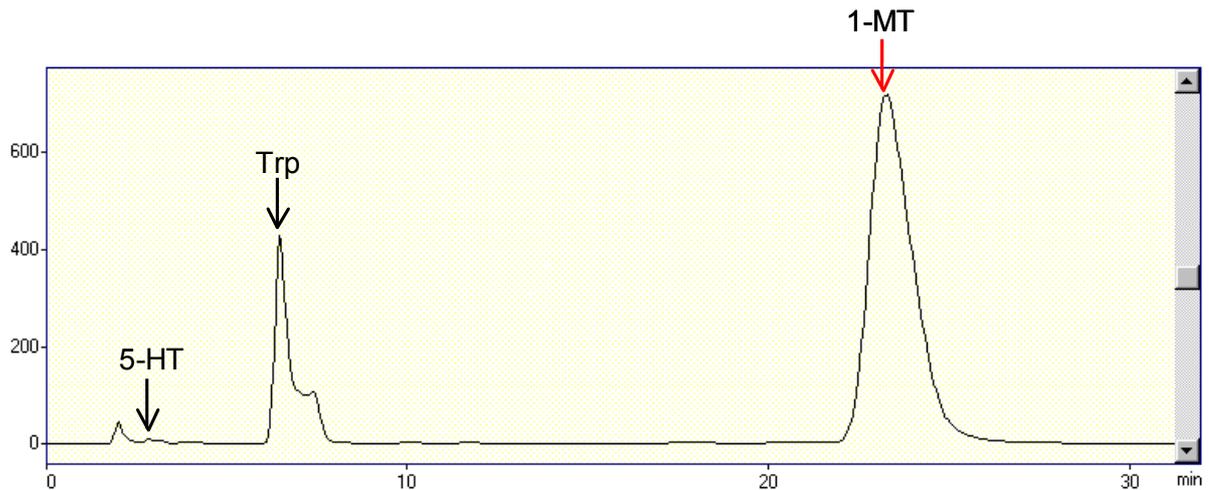


Abbildung III.31: 1-MT im Plasma nach 1-MT-Pellet-Applikation.

HPLC-Spektrum des Plasmas einer mit einem 1-MT-Pellet behandelten Maus. Der rote Pfeil weist auf den 1-MT-Peak. Um zu beweisen, dass das Enzym nicht für die Toleranz des maternalen Organismus gegenüber dem allogenen Fötus verantwortlich ist, sollte ein IDO-Knockout erstellt werden.

4.3 IDO-Knockout

4.3.1 Klonierung des IDO-Targeting-Vektors für die ES-Zellmanipulation

Der Targeting-Vektor für die ES-Zellmanipulation wurde nicht, wie häufig beschrieben, mit Konstrukten aus Genbanken kloniert, sondern mit Hilfe der PCR-Technologie erstellt. Dies geht schnell und effizient und man kann damit zuverlässig mögliche genetische, die Rekombination störende Unterschiede zwischen kloniertem Konstrukt und den verwendeten ES-Zellen vermeiden, was vorkommen kann, wenn diese aus unterschiedlichen Sublinien der Labormauslinie 129 erstellt werden.

Für die PCRs wurde aus ES-Zellen isolierte genomische DNA als Template verwendet. Mit Hilfe der Primer IDOINT1Cla und IDOEX2Xho wurde der 838 bp-lange kurze Arm, mit IDOEX4Pme und IDOEX9Sal der 6323 bp-lange lange Arm des Targeting-Vektors amplifiziert (genaue Primer-Daten in den Tabellen II.2 und II.3). Beide DNA-Fragmente wurden in den Vektor TOPO-XL kloniert. Bei diesem Vektor handelt es sich um einen T-Vektor, an dessen Enden kovalent Topoisomerasen gebunden sind, was die Ligationseffizienz deutlich erhöht. Mit den dadurch entstandenen Vektoren kIDO (enthält den kurzen Arm) und lIDO (enthält den langen Arm) konnten die Fragmente in ausreichender Menge in *Escherichia coli* amplifiziert werden. Mit Hilfe der in den Primern eingefügten Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen ClaI und XhoI wurde der kurze Arm aus kIDO herausgeschnitten und in den mit den Restriktionsendonukleasen ClaI und XhoI geöffneten pTV0-Vektor vor das Neomycinresistenzgen eingefügt. Der lange Arm wurde durch Verdau mit den Restriktionsendonukleasen PmeI und SalI, deren Erkennungssequenzen ebenfalls in den verwendeten Primern lagen, aus dem Vektor lIDO gewonnen und in den mit HpaI und SalI geöffneten pTV0-Vektor zwischen das Neomycinresistenz- und das Thymidinkinasegen kloniert.

Die korrekte Klonierung des Targeting-Vektors konnte durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und durch Sequenzanalysen bestätigt werden.

4.3.1 ES-Zellmanipulation

In Abbildung III.32 wird die Knockout-Strategie dargestellt, mit der der *ido*-Knockout erstellt werden sollte.

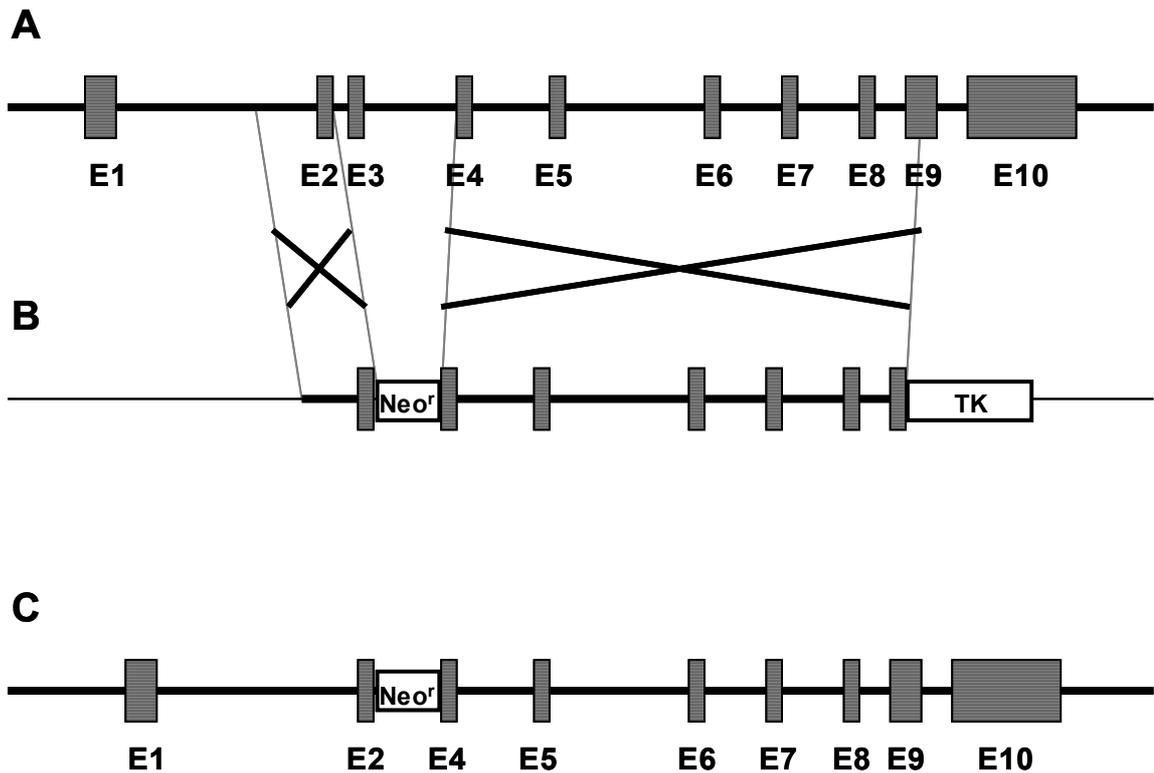


Abbildung III.32: Knockout-Strategie zur Mutierung des *ido*-Gens.

Die homologe Rekombination eines Allel des *ido*-Gens (A) mit dem Knockout-Konstrukt (B) soll zur Deletion des Exons 3 und Teile der Exons 2 und 4 führen. Dabei werden auch die Introns 2 und 3 deletiert. An ihrer Stelle wird ein Neomycin-Resistenzgen und ein Terminationssignal eingefügt (C). Eine erfolgreiche Rekombination kann mit Hilfe der *ido*-Genotypisierungs-PCR (Abschnitt II.4.4.1) nachgewiesen werden.

1 kb

Trotz mehrerer Targetingversuche, bei denen über 1000 Klone untersucht wurden, konnte keine homologe Rekombination zwischen Targetingvektor und *ido*-Gen festgestellt werden. Nachdem der *ido*-Knockout im Juni 2003 publiziert wurde (Mellor *et al.*), wurden diese Arbeiten eingestellt.

Die Bedeutung des lebens- und vermehrungsfähigen *ido*-Knockouts bezüglich der Toleranzinduktion soll im Diskussionsteil eingehender erläutert werden.