

IV DISKUSSION

1 5-HT in den TPH1^{-/-} Mäusen

Trotz des Knockouts der TPH1 gibt es in den TPH1^{-/-} Mäusen noch 5-HT. Die unveränderten 5-HT-Konzentrationen im Gehirn erklären sich aus der dort exprimierten zweiten Tryptophanhydroxylaseform, der TPH2 (Walther *et al.*, 2003a). Da 5-HT unter normalen Umständen nicht die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann (Ausnahmen werden diskutiert: Winkler *et al.*, 1995), ist das 5-HT aus dem Gehirn wahrscheinlich nicht für die 5-HT-Spuren in den peripheren Regionen verantwortlich. Die neuronale TPH2 konnte mit Ausnahme der Epiphyse (Sugden, 2004) und der Retina (Liang *et al.*, 2004), wo sie aber jeweils weit schwächer exprimiert wird als die TPH1, bislang noch nicht außerhalb der Blut-Hirn-Schranke detektiert werden. Aber nur die TPH2-Expression kann das restliche 5-HT in der Peripherie der TPH1^{-/-} Tiere erklären. Eine Vermutung ist daher, dass Neuronen in der Peripherie, also zum Beispiel im enterischen Nervensystem (ENS), ebenfalls TPH2 zur 5-HT-Synthese benutzen, und dass sich das so hergestellte 5-HT im Körper verteilt.

Die Hauptquelle des peripher vorliegenden 5-HT sind normalerweise die enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltraktes. Die 5-HT-Konzentration im Duodenum ist infolge des Knockouts auf 2 % gesunken (Abschnitt III.1.1). Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten, dass die enterochromaffinen Zellen der TPH1^{-/-} Mäuse kein 5-HT mehr enthalten, die Neuronen des ENS weisen dagegen immer noch TPH- und 5-HT-Immunreaktivität auf (Abschnitt III.1.2). Es liegt daher nahe, dass die restlichen 2 % in den Neuronen des ENS vorliegen. Eine andere Möglichkeit sind im Darm vorliegende Immunzellen, von denen einige in der Lage sind, 5-HT aufzunehmen und zu speichern (Abschnitt I.3.6.1).

Die enterochromaffinen Zellen geben in Wildtyptieren das von ihnen synthetisierte und gespeicherte 5-HT kontinuierlich oder nach Stimulation in das Lumen oder in das darunterliegende Gewebe und in den Blutkreislauf ab, wo es von den Thrombozyten aufgenommen wird. Sie sind somit die Quelle des 5-HT der Thrombozyten. Die Thrombozyten der TPH1^{-/-} Tiere enthalten weniger als 1 % des 5-HT (Abschnitt III.2.1), das die entsprechenden Kontrollen haben. Wahrscheinlich haben sie das 5-HT aufgenommen, welches vom ENS im Darm oder anderen peripheren Nervenzellen synthetisiert wurde.

Der Plasma-5-HT-Spiegel wurden im Gegensatz dazu nicht vom TPH1-Knockout beeinflusst (Abschnitt III.2.1). Das im Plasma enthaltene 5-HT stellt aber nur einen Bruchteil des 5-HT im Blut dar. Nimmt man ein Thrombozytenvolumen von 5 – 10 fl an (Yilmaz *et al.*, 2004), so zeigt sich, dass in den TPH1^{+/+} Tieren das 5-HT in den Thrombozyten im Vergleich zum Plasma 50 000 – 100 000 fach konzentriert vorliegt. In den TPH1^{-/-} Tieren ist die 5-HT-Konzentration in den Thrombozyten immer noch 500 – 1000 fach höher als im Plasma. Die 5-HT-Konzentration im Plasma ist also sehr niedrig und liegt wahrscheinlich unter der Grenze, die für die Funktion des SERT nötig ist. Daher kann dieses 5-HT nicht von den Thrombozyten aufgenommen werden.

Bei den im Abschnitt III.3.1 untersuchten lymphatischen Organen, Milz, Thymus und

Lymphknoten, sowie der Haut, war eine weit geringere Reduktion der 5-HT-Spiegel durch den TPH1-Knockout festzustellen. Anzumerken ist dazu zunächst, dass in allen Organen 5-HT messbar ist, da alle Organe durchblutet werden, und damit durch Thrombozyten 5-HT in das entsprechende Organ eingebracht wird. Ist ein Organ nicht in der Lage, 5-HT selbst zu synthetisieren, oder exogenes 5-HT zu speichern, dann müsste dieses Organ in den TPH1-/- Tieren 1 % oder weniger 5-HT enthalten. In Milz, Thymus, Lymphknoten und Haut der TPH1-/- Tiere finden sich jedoch deutlich höhere 5-HT-Konzentrationen als 1 %, verglichen mit den TPH1+/+ Tieren. Eine 5-HT-Synthese durch TPH2 kann in allen untersuchten Organen ausgeschlossen werden (Abschnitt III.3.1). Die 32.8 % 5-HT in Thymus, 11.4 % in der Milz, 66.0% in den Lymphknoten und 49.6 % in der Haut lassen sich demnach nur durch die Speicherung von außerhalb dieser Organe synthetisiertem 5-HT, zum Beispiel in den Mastzellen, Monozyten/Makrophagen und B-Zellen (siehe auch Abschnitt I.3.6.1) oder durch serotonerge Innervierungen erklären. Das 5-HT in der Milz kann aber auch daher kommen, dass in der Milz alte Blutzellen, und damit auch Thrombozyten, abgebaut werden, und sich deren 5-HT in der Milz aufstaut. Die RT-PCR zeigte, dass in Thymus und Lymphknoten TPH1 exprimiert wird. Das weist zum einen darauf hin, dass das Immunsystem die periphere TPH1 zur 5-HT-Synthese benutzt. Andererseits lässt sich damit auch ein Teil der 5-HT-Reduktion in den (TPH1-/-)-Organen auf eine fehlende 5-HT-Synthese zurückführen. Die Expression im Thymus weist auf eine Rolle des 5-HT in der T-Zellreifung oder eine „5-HT-Vorbeladung“ der T-Zellen für ihren weiteren Weg hin.

Erstaunlich ist, dass in der Milz, im Gegensatz zu den Lymphknoten, keine TPH1-mRNA detektierbar war, obwohl sich dort ebenfalls Monocyten/Makrophagen und T-Zellen aufhalten sollten, also jene immunologischen Zellen, die neben den Mastzellen als 5-HT-synthetisierend bekannt sind (siehe auch Abschnitt I.3.6.1). Denkbar ist, dass die TPH1 nicht ständig, sondern nur in bestimmten Stadien, zum Beispiel während oder nach bestimmten Zell-Zell-Interaktionen, zum Beispiel der Antigenpräsentierung, von den immunologischen Zellen exprimiert wird. Da die Haut die größte Kontaktfläche des Körpers zur Außenwelt darstellt, werden die meisten Fremdstoffe und Krankheitserreger über sie aufgenommen, und gelangen von dort als erstes in die Lymphknoten. Die Milz ist dagegen der Ort der Präsentation von im Blut vorliegenden Antigenen. Die verwendeten Tiere waren zum Zeitpunkt der Untersuchung augenscheinlich unverletzt, sie sollten also keine, erst vor kurzem aufgenommenen Antigene im Blut vorweisen. Eine Antigenaufnahme über die Haut konnte dagegen nicht ausgeschlossen werden. Vielleicht erklärt das die unterschiedliche TPH1-Expression in Milz und Lymphknoten.

In der Haut konnte in dieser Arbeit keine TPH1- oder TPH2-mRNA nachgewiesen werden, obwohl Mastzellen als 5-HT-produzierend bekannt sind. Eine mögliche Ursache könnte in einer für einen RT-PCR-Nachweis zu niedrigen Expressionsrate in der Haut liegen. Tatsächlich wurden fast alle Arbeiten über die TPH-Expression durch Mastzellen entweder mit isolierten peritonealen Mastzellen (Gripenberg, 1976) oder mit immunhistochemischen Methoden (Mathiau *et al.*, 1993) durchgeführt. Es kann jedoch vermutet werden, dass Mastzellen, wie die anderen aus den hämatopoetischen Stammzellen hervorgegangenen Immunzellen, TPH1, und nicht die TPH2 exprimieren.

2 Darmfunktionen in den TPH1^{-/-} Mäusen

2.1 Die Initiation des peristaltischen Reflexes nach gängiger Lehrmeinung

Nach der gängigen, in der Literatur beschriebenen Hypothese wird der peristaltische, ebenso wie der sekretorische Reflex durch das 5-HT der in der Mucosa gelegenen enterochromaffinen Zellen initiiert. Diese Hypothese stützt sich dabei auf vier Beobachtungen (siehe auch Abschnitte I.3.4.2 und I.3.4.3)

1. Durch Stimulation der Mucosa, zum Beispiel durch intraluminalen Druck, wird der peristaltische Reflex ausgelöst (siehe Abschnitt III.1.3).
2. Die gleiche mucosale Stimulation stimuliert die enterochromaffinen Zellen zum Ausschütten des in den Granula gespeicherten 5-HT (Fujimiya *et al.*, 1997).
3. Der peristaltische Reflex lässt sich durch verschiedene 5-HT-Antagonisten hemmen (Grider *et al.*, 1998).
4. Die Applikation von 5-HT löst *in vitro* Kontraktionen, ähnlich des peristaltischen Reflexes, aus (Craig & Clarke, 1991).

Gegen diese Hypothese sprechen zwei Arbeiten, in denen der 5-HT-Gehalt des Darmes durch eine Trp-freie Diät (Boullin, 1964) oder durch Verabreichung eines 5-HT-Wiederaufnahmehemmers (SSRI, Bülbring & Crema, 1959b) bis auf unter 1 % gesenkt wurde. Trotz dieser 5-HT-Depletion zeigten die verwendeten Versuchstiere keine Beeinträchtigung des peristaltischen Reflexes. Ein Manko dieser Arbeiten war jedoch, dass nicht nachgewiesen werden konnte, dass die enterochromaffinen Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen 5-HT-frei waren.

2.2 Der peristaltische Reflex in den TPH1^{-/-} Mäusen

TPH1^{-/-} Tiere enthalten, verglichen mit entsprechenden Wildtyptieren, eine um 98 % reduzierte 5-HT-Konzentration im Duodenum. Damit ist die TPH1 die Haupt-TPH-Form im Gastrointestinaltrakt. Mit Hilfe von immunhistochemischen Methoden konnte nachgewiesen werden, dass in den TPH1^{-/-} Mäusen die enterochromaffinen Zellen, in denen unter normalen Bedingungen der größte Teil des 5-HT des Gastrointestinaltraktes synthetisiert und gespeichert wird, praktisch 5-HT-frei sind. Die restlichen, noch im Darm befindlichen 2 % 5-HT befinden sich wahrscheinlich in den Neuronen des ENS (Abschnitt III.1.1).

Nach der oben erwähnten Hypothese sollte im Darm dieser Tiere kein peristaltischer Reflex induzierbar sein. Weiterhin wäre zu erwarten gewesen, dass diese Mäuse aufgrund der Darmfehlfunktion massive Wachstumsstörungen aufweisen.

Die TPH1^{-/-} Tiere unterscheiden sich aber auf den ersten Blick nicht von entsprechenden Wildtyptieren. Sie entwickeln sich und nehmen ähnlich wie die TPH1^{+/+} Tiere im Laufe ihrer Entwicklung an Gewicht zu. Der Darm der TPH1^{-/-} Mäuse arbeitet also immer noch gut genug, um die Maus am Leben zu halten, und deren Wachstum und Fortpflanzung zu sichern. Ein vollständiger Verlust des peristaltischen Reflexes konnte schon aufgrund

dieser Beobachtung ausgeschlossen werden, womit die oben genannte Hypothese schon widerlegt ist.

Trotzdem wurden verschiedene Untersuchungen der Peristaltik *in vivo* und *in vitro* unternommen, um auch einen weniger drastischen Phänotyp ausschließen zu können. Jedoch gab es auch in diesen Untersuchungen keinen oder nur einen sehr geringen Unterschied zwischen den TPH1^{+/+} und den TPH1^{-/-} Tieren.

In der *in vitro* Studie zeigten die Därme der TPH1^{-/-} Mäuse deutliche Kontraktionen als Antwort auf die intraluminale Druckstimulation (Abschnitt III.1.3). Zum Vergleich und zur Einschätzung dieses Befundes ist in Abbildung IV.1 eine vollständige pharmakologische Unterdrückung des peristaltischen Reflexes abgebildet, bei dem keine Kontraktionen mehr sichtbar sind.

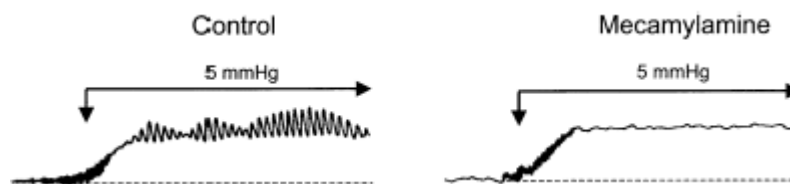


Abbildung IV.1: Vollständige Unterdrückung des peristaltischen Reflexes.

Mecamylamid als Antagonist des nicotinischen Rezeptors vermag den peristaltischen Reflex vollständig zu unterdrücken (aus Bian *et al.*, 2003). Nach der Hypothese über 5-HT als Initiator der Peristaltik wäre ein ähnliches Bild für die TPH1^{-/-} Tiere zu erwarten gewesen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Kontraktionen als Antwort auf verschiedene intraluminale Stimuli. Die Kontraktionsamplituden der TPH1^{-/-} Mäuse waren allenfalls tendenziell niedriger als die der TPH1^{+/+} Tiere. Die Kontraktionsfrequenz, also die Häufigkeit, mit der die Kontraktionen nach Stimulation auftreten, war ebenfalls tendenziell in den TPH1^{-/-} Tieren erniedrigt. Nur bei einem intraluminalen Druck von 3.75 mmHg war die Reduktion auf circa 60 % der Wildtypkontraktionsfrequenz signifikant.

Diese Verringerung der Kontraktionsfrequenz hatte jedoch keine Beeinträchtigung der TPH1^{-/-} Mäuse zur Folge. Die Untersuchungen der gastrointestinalen Transportleistungen *in vivo* zeigten, dass die Därme der TPH1^{-/-} Tiere Flüssigkeiten und Feststoffe genauso gut, in einigen Experimenten auch tendenziell besser befördern konnten als die Därme der TPH1^{+/+} Tiere (Abschnitt III.1.2). Ein Grund für diese Diskrepanz zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen könnte darin liegen, dass die Drücke, bei denen die Kontraktionsfrequenz der TPH1^{-/-} Tiere niedriger als die der Wildtyptiere war, *in vivo* selten erreicht werden, und somit nicht ins Gewicht fallen.

Womit lässt sich die geringe Erniedrigung der Kontraktionsfrequenz bei den TPH1^{-/-} Mäusen erklären? Im Jahr 2001 haben Chen *et al.* gezeigt, dass eine Beeinflussung des serotonergen Systems durchaus eine Auswirkung auf die Funktion des Gastrointestinaltraktes haben kann. Ein Teil der von ihnen verwendeten SERT^{-/-} Mäuse zeigte, verglichen mit den SERT^{+/+} Tieren, eine Verlängerung der Transportzeit, ein anderer

dagegen eine Verkürzung. Die Daten sind also sehr inhomogen. Die Veränderungen in der Peristaltik können jedoch bei diesen Tieren nicht durch eine Erniedrigung des 5-HT-Gehaltes in den enterochromaffinen Zellen bedingt sein. Die Därme der SERT^{-/-} Mäuse enthalten ein Drittel weniger 5-HT als die Wildtypiere. Bedenkt man, dass circa 90 % des 5-HT in den enterochromaffinen Zellen gespeichert sind, dann müssen die SERT^{-/-} enterochromaffinen Zellen noch mindestens zwei Drittel ihres 5-HT enthalten. Bedenkt man weiterhin, dass die Tiere in Boullins Arbeit (1964) mit weniger als 1 % des 5-HT eine normale Peristaltik aufwiesen, dann können die Veränderungen in der Peristaltik der SERT^{-/-} Tiere ihren Ursprung nur auf neuronaler Ebene haben. Immerhin gibt es serotonerge Neuronen im ENS, die, wie alle serotonergen Neuronen, ihren 5-HT-Gehalt durch Wiederaufnahme stabil halten müssen.

In den TPH1^{-/-} Tieren sind die Neuronen des ENS weder in der 5-HT-Synthese noch in der Wiederaufnahme gestört (der Antikörper, mit dem TPH in den Neuronen nachgewiesen wurde, ist zwar nicht spezifisch für eine der beiden TPH-Formen, die Aminosäuresequenz, die er erkennt, wurde aber in der TPH1 deletiert, also wurde TPH2 detektiert). Jedoch ist trotzdem denkbar, dass die TPH1^{-/-} Neuronen weniger 5-HT enthalten als die Neuronen von Wildtypieren, da Neuronen einen Teil ihres 5-HT unter normalen Umständen von den enterochromaffinen Zellen, die ja viel davon an unterliegendes Gewebe abgeben, aufnehmen könnten. Eine mögliche Reduktion der 5-HT-Gehalte in den Neuronen könnte zu der leicht erniedrigten Kontraktionsfrequenz in den TPH1^{-/-} Mäusen geführt haben. Die 5-HT-Defizienz in den enterochromaffinen Zellen jedoch beeinträchtigt die Peristaltik offensichtlich nicht.

2.3 Wie wirkt 5-HT in der Peristaltik?

Nach den Arbeiten von Bülbring & Crema in Meerschweinchen (1959b) und von Boullin (1964) in Ratten ist dies die dritte Arbeit in einer dritten Spezies, die zeigt, dass das 5-HT in den enterochromaffinen Zellen nicht an der Initiierung des peristaltischen Reflexes beteiligt ist. Darüber hinaus ist es die erste Arbeit, bei der eine vollständigen 5-HT-Depletion der enterochromaffinen Zellen gezeigt werden konnte.

Wenn also eine 5-HT-Defizienz in den enterochromaffinen Zellen keine Auswirkungen auf die Peristaltikinitiation hat, und damit die oben aufgeführte Hypothese also falsch ist, wie lassen sich dann die Beobachtungen, die zu dieser Hypothese geführt haben, speziell die Punkte 3 und 4 (Abschnitt IV.2.1), erklären?

Das ENS enthält serotonerge Neuronen (Gershon *et al.*, 1977, Kurian *et al.*, 1983), die über eine Vielzahl von 5-HT-Rezeptoren miteinander, sowie mit den glatten Muskel- und Epithelzellen des Darmes kommunizieren (Gershon, 1999). Im Darm nachgewiesen wurden bislang: der 5-HT_{1A}- (Galligan & North, 1991), der 5-HT_{1P}- (Mawe *et al.*, 1986), der 5-HT_{2A}- (Fiorica-Howells *et al.*, 2002), der 5-HT_{2B}- (Fiorica-Howells *et al.*, 2000), der 5-HT₃- (Derkach *et al.*, 1989) und der 5-HT₄-Rezeptor (Grider *et al.*, 1998). Die genaue Verteilung dieser Rezeptoren ist aber eher unklar. Von dem 5-HT_{1P}-Rezeptor wird zum Beispiel angenommen, dass er von den IPANs (intrinsic primary afferent neurons) exprimiert wird. Basis dieser Annahme sind jedoch nur pharmakologische Daten (Grider

et al., 1996; Wang *et al.*, 1996; Cooke *et al.*, 1997; Michel *et al.*, 1997), wobei man beachten muss, dass sich entsprechende Substanzen kaum gezielt einsetzen lassen. Die Gensequenz dieses Rezeptor ist bislang nicht bekannt, der genaue Ort der Expression kann also nicht durch histologische Nachweise erfasst werden. Daher lassen sich viele serotonerge Effekte kaum genau lokalisieren.

Der 5-HT_{2A}-Rezeptor wird im Darm von Neuronen, glatten Muskelzellen und Enterocyten exprimiert. Bislang wurde ihm keine Rolle bei der Initiierung des peristaltischen Reflexes zugeschrieben (siehe auch Abschnitt I.3.4.3). Die 5-HT_{2A}^{-/-} Tiere zeigen trotz dünnerer Muskel- und Enterocytenschichten keine Veränderungen des gastrointestinalen Transportes. Interessant ist, dass die Därme dieser 5-HT_{2A}^{-/-}-Tiere, im Gegensatz zu denen der 5-HT_{2A}^{+/+}-Tiere, *in vitro* nicht mit Kontraktionen auf endogenes 5-HT reagieren (Fiorica-Howells *et al.*, 2002). Das zeigt, dass dieser, durch appliziertes 5-HT ausgelöste Reflex von dem 5-HT_{2A}-Rezeptor vermittelt wird. Die Beobachtung, dass exogenes 5-HT Kontraktionen im Darm auslöst, kann demnach nicht als Argument für die Hypothese von 5-HT der enterochromaffinen Zellen als Auslöser des peristaltischen Reflexes gelten, da dies ja über 5-HT_{1P}-/5-HT₃-/5-HT₄-Rezeptoren auf den IPANs laufen sollte. Die äußere Applikation von 5-HT ist also nicht, wie häufig angenommen, ein Modell für die Initiierung des peristaltischen Reflexes. Ebenso ist es möglich, dass auch die Applikation von 5-HT-Antagonisten Neuronen des ENS inhibiert, und durch diese Unterbrechung der Signalweiterleitung der peristaltische Reflex gehemmt wird. In Zusammenhang mit anderen physiologischen Reaktionen haben zum Beispiel *Monro et al.* (2002) die Möglichkeit der Inhibition neuronaler Signalwege im ENS durch 5-HT-Antagonisten nachgewiesen.

Die Ausschüttung des 5-HT aus den enterochromaffinen Zellen scheint demnach eine „Nebenreaktion“ des peristaltischen Reflexes zu sein. Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei den Kontraktionen, die in regelmäßigen zeitlichen Abständen den Darm in Fastenzeiten durchziehen (interdigestive migrating contractions, IMC). Auch hier korreliert die luminale 5-HT-Ausschüttung aus den enterochromaffinen Zellen mit den Kontraktionen, luminales 5-HT hat aber keinen Effekt auf diese Kontraktionen (*Tanaka et al.*, 2004), und die Unterdrückung der IMC durch PCPA beruht auf einer 5-HT-Reduktion auf neuronaler Ebene (*Haga et al.*, 1996).

Wenn nun nicht das 5-HT der enterochromaffinen Zellen den peristaltischen Reflex initiiert, wie werden dann intraluminale Stimuli in für das ENS verständliche Signale umgewandelt? Die Granula der enterochromaffinen Zellen enthalten neben 5-HT auch andere Substanzen, die signalgebend wirken können, zum Beispiel Guanyline (*Cetin et al.*, 1994; *Perkins et al.*, 1997) und das Neurokinin Substanz P (*Spangueus et al.*, 2001). Bislang wurde jedoch nicht untersucht, ob Antagonisten dieser Substanzen inhibitorisch auf den peristaltischen Reflex wirken. Darüber hinaus sollte man aber auch im Auge behalten, dass die enterochromaffine Zelle nur eine von 16 verschiedenen endokrinen Zellen in der Darmmucosa ist (*Hakanson et al.*, 1978; *Anlauf et al.*, 2003). Die anderen 15 endokrinen Zelltypen könnten ebenfalls an der Initiierung des peristaltischen Reflexes beteiligt sein. Es gibt also noch weitere Zellen und Substanzen, die die Signaltransduktion durch die Mucosa vermitteln könnten.

2.4 5-HT in der Cholera-toxin-induzierten Sekretion

Für die Wirkungsweise des Cholera-toxins werden verschiedene Mechanismen diskutiert: Zum einen wird angenommen, dass Cholera-toxin, ähnlich wie ein intraluminaler Reflex, die enterochromaffinen Zellen zur 5-HT-Ausschüttung bringt, welches dann entweder direkt oder über das ENS die Epithelzellen zur Sekretion anregt (Ning *et al.*, 2004; Turvill *et al.*, 1998). Als weiteren möglichen Wirkmechanismus nimmt man die direkte Beeinflussung der Epithelzellen durch das Cholera-toxin, also 5-HT-unabhängig, an (Sears & Kaper, 1996; siehe Abbildung IV.2).

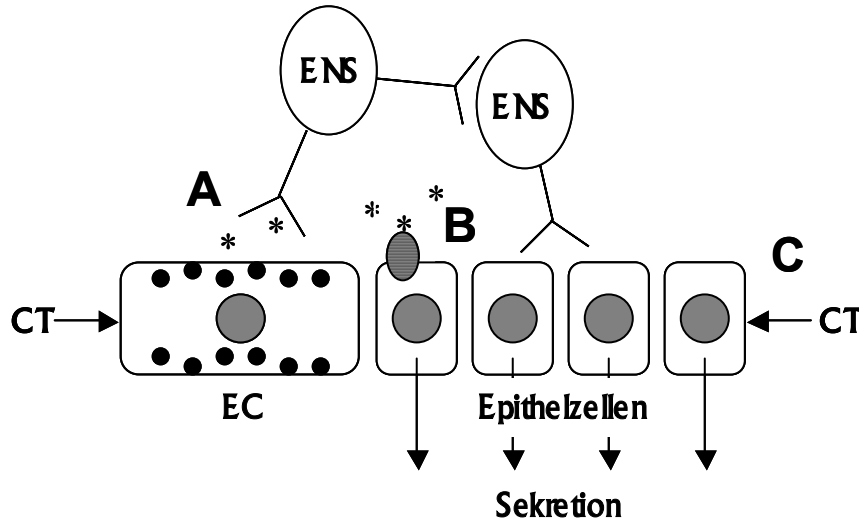


Abbildung IV.2: Mögliche Wirkungsmechanismen des Cholera-toxins.

Den Mechanismen **A** und **B** liegt die Cholera-toxin-induzierte 5-HT-Ausschüttung der enterochromaffinen Zellen (EC) zugrunde. Bei Mechanismus **A** führt das zur Aktivierung des ENS, welches dann die Epithelzellen zur Sekretion veranlasst. In Mechanismus **B** diffundiert das ausgeschüttete 5-HT zu den Epithelzellen und bringt sie direkt zur Sekretion. Mechanismus **A** ist also ENS-abhängig, Mechanismus **B** dagegen ENS-unabhängig, beide jedoch EC- und 5-HT-abhängig. Bei Mechanismus **C** wird angenommen, dass das Cholera-toxin direkt auf die Epithelzellen einwirkt. Es handelt sich also um einen EC-, ENS- und 5-HT-unabhängigen Mechanismus. (CT = Cholera-toxin; * = 5-HT)

Wenn einer der beiden ersten Mechanismen stimmen sollte, dann dürften die TPH1^{-/-} Tiere, deren enterochromaffinen Zellen ja kein 5-HT mehr enthalten, keine gesteigerte Flüssigkeitssekretion in Folge einer Cholera-toxinapplikation zeigen. Tun sie es doch, dann sollte der dritte, EC- und 5-HT-unabhängige Mechanismus stimmen.

Bei der Messung der Cholera-toxin-induzierten Sekretion (Abschnitt III.1.4) zeigten die TPH1^{-/-} Mäuse eine deutlich Antwort auf die Toxinapplikation. Zwischen den TPH1^{+/+} und TPH1^{-/-} Tieren konnte kein signifikanter Unterschied in der Stärke der Sekretion festgestellt werden. TPH1^{-/-} Mäuse sind also in ihrer Reaktion auf Cholera-toxin in keiner Weise eingeschränkt. Im Gegenteil, sie zeigen in diesem Fall eher eine tendenziell stärkere Sekretion (Abbildung III.9).

Auf den ersten Blick scheint es also, als ob das Cholera-toxin die Epithelzellen direkt, also 5-HT unabhängig, zur vermehrten Sekretion stimuliert. Andererseits spricht die gezeigte

Hemmung der Cholera-toxin-induzierten Sekretion durch 5-HT-Antagonisten (Buchheit, 1989; Beubler & Horina, 1990; Bearcroft *et al.*, 1997; Turvill *et al.*, 2000) deutlich für eine 5-HT-Beteiligung. Wie passt das zusammen?

Das Cholera-toxin-Experiment in dieser Arbeit (Abschnitt III.1.4) hat gezeigt, dass das 5-HT der enterochromaffinen Zellen nicht für die Cholera-toxin-induzierte Sekretion nötig ist. 5-HT-Antagonisten können ihre inhibierende Wirkung also nicht an diesem Punkt entfaltet haben. Einen weiteren möglichen Angriffspunkt für die 5-HT-Antagonisten bietet, ähnlich wie bei der Peristaltik, das ENS, welches serotonerge Neuronen und eine Vielzahl an 5-HT-Rezeptoren beinhaltet. Voraussetzung ist allerdings, dass das ENS an der Cholera-toxin-induzierten Sekretion beteiligt ist, also dass der Sekretion durch die Epithelzellen eine Signalweiterleitung durch das ENS vorausging. Es ist daher zu vermuten, dass Cholera-toxin 5-HT- und ENS-abhängig wirkt, jedoch nicht auf das 5-HT der enterochromaffinen Zellen angewiesen ist (Abbildung IV.3).

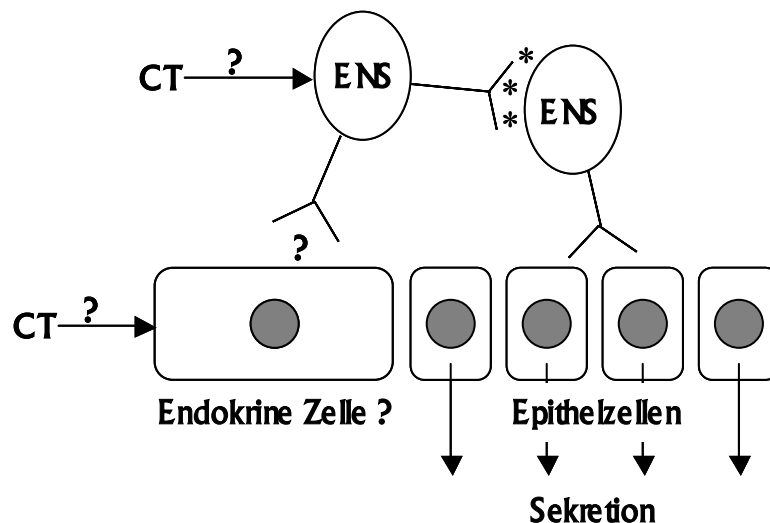


Abbildung IV.3: Wirkungsmechanismus des Cholera-toxins.

Das Cholera-toxin-Experiment bewies, dass Cholera-toxin unabhängig vom 5-HT der enterochromaffinen Zellen wirken kann. Da die Cholera-toxin-induzierte Sekretion aber als sensitiv gegenüber 5-HT-Antagonisten beschrieben worden ist, muss ein serotonerges Element am Mechanismus beteiligt sein. Es ist daher wahrscheinlich, dass das ENS mit seinen serotonergen Komponenten involviert ist. Wo genau das Cholera-toxin wirkt, ist unklar. Möglich ist zum Beispiel eine direkte Beeinflussung des ENS. Wie schon in Abschnitt IV.2.3 beschrieben, ist aber auch denkbar, dass andere endokrine Zellen beteiligt sind. (CT = Cholera-toxin; * = 5-HT)

2.5 Pica in Mäusen

Auch bei der durch das Chemotherapeutikum Cisplatin ausgelösten Emesis wurde eine entscheidende Beteiligung des 5-HT der enterochromaffinen Zellen vermutet. Grundlage dieser Vermutung war zum einen die Beobachtung, dass das 5-HT nach Cisplatingabe aus den enterochromaffinen Zellen ausgeschüttet wird, zum anderen die Möglichkeit, die Cisplatin-induzierte Emesis mit 5-HT-Antagonisten zu unterdrücken (siehe Abschnitt

I.3.4.6). Mit diesen Vorkenntnissen konnte vermutet werden, dass ohne 5-HT in den enterochromaffinen Zellen kein emetischer Reflex durch Cisplatin ausgelöst werden kann. Bei Tierversuchen zur Cisplatin-induzierten Emesis wird häufig das Pica-Verhalten bestimmt, da Mäuse ebenso wie Ratten nicht emetisch reagieren können. Statt dessen essen sie in Situationen, die beim Menschen Emesis auslösen, instinktiv unverdauliche Substanzen (Pica). Dieses Verhalten stellt somit ein Modell zur Untersuchung des emetischen Reflexes in Nagetieren dar (Abschnitt I.3.4.7).

Mit der in dieser Arbeit benutzten Kaolin/Karmin-Methode (Yamamoto *et al.*, 2002a) kann recht genau die Kaolinaufnahme bestimmt werden. Dabei wird den Tieren das Kaolin mit einer definierten Menge an Karmin versetzt angeboten. Das Karmin kann dann photometrisch in den Fäzes der Tiere bestimmt werden, und mit Hilfe des erhaltenen Wertes auf die aufgenommene Kaolinmenge geschlossen werden. Da wir aufgrund des geringen Gewichtes unserer Mäuse auch eine geringe Aufnahmemenge erwarteten, haben wir diese Methode verfeinert, indem wir den Karminanteil erhöht haben (Abschnitt II.6.2.6).

Trotz der Anwendung dieser genauen und sensitiven Kaolin/Karmin-Methode konnten wir in den TPH1^{+/+} Mäusen unter keiner der experimentellen Bedingungen (ohne Behandlung, nach Cisplatingabe, Placebogabe; Abschnitt III.1.5) eine Kaolinaufnahme feststellen. Die C57BL/6-Mäuse zeigen also kein Pica-Verhalten. Unter diesen Bedingungen konnte dann natürlich keine Aussage getroffen werden, ob die 5-HT-Defizienz in den enterochromaffinen Zellen der TPH1^{-/-} Tieren zu einem Verlust des Pica-Verhaltens führt, und ob das 5-HT der enterochromaffinen Zellen eine Rolle bei der Auslösung des emetischen Reflexes spielt.

Warum reagieren C57BL/6-Mäuse nicht mit Pica-Verhalten auf die Cisplatingabe? Eine Antwort auf diese Frage gibt die Arbeit von Yamamoto *et al.* (2002b). Yamamoto *et al.* hatten, um Strahlen-induziertes Pica-Verhalten in Ratten nachzuweisen, eine Vorauswahl zwischen den Versuchstieren getroffen, da nicht alle Individuen gleichermaßen mit Pica auf die Strahlung reagierten. Es ist anzunehmen, dass sich diese individuelle Neigung oder Abneigung zum Pica-Verhalten durch die Inzucht als stammspezifisch manifestiert hat.

Um untersuchen zu können, ob das 5-HT der enterochromaffinen Zellen an der Auslösung des emetischen Reflexes durch Cisplatin beteiligt ist, müsste man den TPH1^{-/-} Genotyp auf einen Pica-aufweisenden genetischen Hintergrund, zum Beispiel den von Yamamoto *et al.* (2002a) benutzten ICR-Stamm, etablieren. Diese „Rückkreuzung“ nimmt jedoch circa eineinhalb Jahre in Anspruch und konnte deshalb nicht im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen werden.

3 Kardiovaskuläre Untersuchungen in den TPH1^{-/-} Mäusen

3.1 5-HT in der Herzentwicklung

Die Erstellung der 5-HT_{2B}-Rezeptor-Knockout-Maus zeigte, dass 5-HT entscheidend an der Morphogenese des Herzens beteiligt ist. 5-HT_{2B}^{-/-} Tiere sterben in frühen Entwicklungsstadien, und die wenigen überlebenden adulten Mäuse weisen meist schwere Herzschäden auf (Nebigil *et al.*, 2000). 5-HT scheint, mit Hilfe des 5-HT_{2B}-Rezeptors, die Herzentwicklung positiv zu beeinflussen.

Da das Herz selbst keine TPH-Expression aufweist, 5-HT also nicht selbst herstellen kann, werden die entwicklungsfördernden Effekte des 5-HT entweder über serotonerge Innervierungen, oder aber über peripheres Thrombozyten-5-HT vermittelt. Erstere Variante wäre TPH2-, letztere TPH1-abhängig.

Die Herzen der TPH1^{-/-} Mäuse weisen ein normales Gewicht und einen normalen Aufbau auf (Abschnitt III.2.2). Sie unterscheiden sich auch nicht in verschiedenen funktionalen Parametern, wie zum Beispiel der Herzrate (Abschnitt III.2.3). Damit können eventuelle Entwicklungsstörungen der Herzen dieser Mäuse ausgeschlossen werden. 5-HT beeinflusst die Herzentwicklung also eher auf neuronaler Ebene.

Coté *et al.* (2003), welche ebenfalls einen TPH1-Knockout erstellten, zeigten, dass einzelne ihrer TPH1^{-/-} Tiere vergrößerte und dysfunktionale Herzen aufwiesen. Diese Veränderungen waren jedoch bis auf die Herzrate nicht signifikant. Nur die Herzrate war bei den TPH1^{-/-} Tieren von Coté *et al.* signifikant erhöht, jedoch wurden die Herzraten in narkotisierten Tieren gemessen, und spiegeln somit nicht die basalen Herzraten wider. Diese, von Coté *et al.* beschriebenen Veränderungen konnten wir in unseren TPH1^{-/-} Tieren nicht auffinden. Die Tatsache, dass diese Veränderungen bei den Tieren von Coté *et al.* auch nur in einzelnen Tieren auftraten, spricht dafür, dass diese nicht durch den TPH1-Knockout verursacht wurden. Wahrscheinlicher ist, dass diese Veränderungen auf anderen genetischen Defekten basieren, die in diesen Stamm durch Inzucht entstanden sein könnten.

Für eine Beeinflussung der Herzentwicklung über serotonerge Innervierungen spricht auch folgende Arbeit: Jaffré *et al.* (2004) zeigten, dass die durch Isoproterenol induzierte sympathische Stimulation 5-HT_{2B}-Rezeptor-abhängig ist. Die dadurch entstehenden kardialen Schäden traten nicht in den 5-HT_{2B}^{-/-} Tieren auf, und konnten in Wildtyp-Tieren durch Gabe von 5-HT_{2B} Antagonisten verhindert werden. Es ist also anzunehmen, dass der 5-HT_{2B}-Rezeptor-Knockout in die neuronale Signalweiterleitung involviert ist. Jaffré *et al.* vermuten zwar, dass diese 5-HT_{2B}-Rezeptor-vermittelten Effekte 5-HT-unabhängig sind. Diese Annahme beruht jedoch auf *in vitro* Studien mit kardialen Fibroblasten, die in serum- und damit 5-HT-freiem Medium kultiviert wurden. Sie wurden allerdings erst einen Tag vor der Isoproterenol-Gabe in dieses serumfreie Medium umgesetzt. Es ist also nicht auszuschließen, dass 5-HT immer noch vorhanden war, oder von den Zellen gespeichert wurde. Weiterhin ist fraglich, ob das *in vitro*-System ein genaues Abbild der *in vivo*-Situation darstellt. So wurde in den *in vitro*-Versuchen die Isoproterenol-induzierte Produktion von drei Cytokinen untersucht. Unklar ist jedoch, ob diese drei Cytokine allein

für die sich nach Isoproterenolgabe entwickelnden *in vivo*-Veränderungen verantwortlich sind.

3.2 Beeinflussung des Blutdruckes durch 5-HT

Die Frage, ob peripheres endogenes 5-HT den basalen Blutdruck beeinflussen kann, wird schon lange kontrovers diskutiert (siehe Abschnitt I.3.5.2). 5-HT-Rezeptoren zur Vermittlung blutdruckbeeinflussender Signale sind im Herz-Kreislauf-System durchaus vorhanden, wie die Blutdruckveränderung nach Applikation von exogenem 5-HT zeigen (Abschnitt I.3.5.1). Von endogenem 5-HT werden sie anscheinend aber nur unter bestimmten Bedingungen genutzt: So führen die durch aggregierende Thrombozyten nach einer Verletzung ausgeschütteten großen Mengen 5-HT zur Vasokonstriktion, um den Blutverlust durch die Wunde zu stoppen (Houston & Vanhoutte, 1986). In der Mikrovaskulatur kann 5-HT aber auch vasodilatatorisch wirken (Ralevic *et al.*, 1995), ein Effekt, der wahrscheinlich bei Entzündungsprozessen den Einstrom immunologischer Zellen in das Gewebe begünstigt. Ob diese Rezeptoren auch unter normalen Bedingungen für die Blutdruckregulation benutzt werden, ist bislang unklar.

Die TPH1-/- Mäuse weisen einen um circa 4 mmHg erhöhten Blutdruck auf (Abschnitt III.2.4). Da die Herzfunktionen in diesen Tieren nicht verändert sind (Abschnitt III.2.3), kann man davon ausgehen, dass diese Blutdruckerhöhung auf vaskulären Effekten beruht. Es sind zwei vaskuläre 5-HT-Rezeptoren bekannt: der 5-HT_{2A}-Rezeptor vermag eine Vasokonstriktion, der 5-HT₇-Rezeptor dagegen eine Vasodilatation zu vermitteln (Abschnitt I.3.5.1). Eine mangelnde Stimulation des 5-HT₇-Rezeptors könnte demnach zu der Blutdruckerhöhung in den TPH1-/- Tieren geführt haben.

In Abschnitt III.2.1 wurde gezeigt, dass der TPH1-Knockout zu einer starken Reduktion des 5-HT-Gehaltes in den Thrombozyten geführt hat. Die 5-HT-Konzentration im Plasma war dagegen unverändert. Das Plasma-5-HT kann demnach nicht für die Blutdruckerhöhung verantwortlich sein. Wie kann nun aber das 5-HT in den Thrombozyten auf den vaskulären 5-HT₇-Rezeptor einwirken, beziehungsweise wie kann die 5-HT-Defizienz der Thrombozyten zu einer mangelnden Stimulation dieses Rezeptors führen?

Es ist bekannt, dass Scherkräfte *in vitro* Thrombozyten aktivieren können (Oda *et al.*, 1996), und dass Thrombozyten bei der Aktivierung 5-HT freisetzen. Scherkräfte entwickeln sich umgekehrt proportional zum Durchmesser der Blutgefäße, sind in der Mikrovaskulatur also am größten. Damit wäre folgender hypothetischer Mechanismus denkbar:

1. Die Thrombozyten werden durch die Scherkräfte in der Mikrovaskulatur aktiviert und setzen etwas 5-HT frei.
2. Das freigesetzte 5-HT bindet an die vaskulären 5-HT₇-Rezeptoren, wodurch sich die Gefäße leicht erweitern.
3. Durch die Gefäßerweiterung werden die Scherkräfte reduziert.

4. Nimmt man an, dass der Aktivierungsreiz durch die Scherkräfte nicht so groß waren, dass die Thrombozyten irreversibel miteinander aggregieren, können die Thrombozyten nach Abklingen des Reizes das ausgeschüttete 5-HT wieder aufnehmen und speichern.

Es könnte sich also um einen Mechanismus zur lokalen Regulation des Blutflusses in der Mikrovaskulatur handeln. Da die Thrombozyten der TPH1^{-/-} Tiere kaum noch 5-HT enthalten, könnte das Fehlen der durch diesen Mechanismus ausgelösten Gefäßerweiterung zu der leichten Blutdruckerhöhung geführt haben.

Für diesen hypothetischen Mechanismus gibt es allerdings bis auf den erhöhten Blutdruck in den TPH1^{-/-} Mäusen keine Beweise. Die Erarbeitung weiterer Beweise stößt auf folgende experimentelle Probleme:

> Die erhöhte 5-HT-Plasma-Konzentration in der Mikrovaskulatur lässt sich schlecht nachweisen, da man kaum Blut aus der Mikrovaskulatur erhalten kann, ohne das Endothel zu beschädigen. Eine Endothelschädigung würde aber unweigerlich die irreversible Thrombozytenaggregation induzieren. Selbst wenn dies gelänge, wären die Thrombozyten in der Spritze beziehungsweise im Reaktionsgefäß nicht mehr den Scherkräften ausgesetzt, und würden dann das freigesetzte 5-HT wieder aufnehmen. Man würde also nur das stressfreie Gleichgewicht messen können.

Eine weitere Messmethode ist die Mikrodialysetechnik. Mit ihr kann man Plasma ohne zelluläre Bestandteile, also auch ohne Thrombozyten aus dem fließenden Blut gewinnen. Derart gewonnenes Plasma würde also die 5-HT-Konzentration unter dem Einfluss der Scherkräften widerspiegeln. Jedoch haben die kleinsten Mikrodialysesonden immer noch einen Durchmesser von circa 0.2 mm (zum Vergleich: Der Durchmesser eines Thrombozyten beträgt etwa ein hundertstel dessen). Mit dieser Technik kann man also kaum bis in die Mikrovaskulatur vordringen.

> Ein weiterer Beweis dieser Hypothese wäre ein durch einen 5-HT₇-Rezeptor-Antagonisten ausgelöster langanhaltender Blutdruckanstieg. Allerdings gibt es bislang keinen 5-HT₇-Rezeptor-Antagonisten, der nicht auch auf andere 5-HT-Rezeptoren einwirkt. Eine selektive Blockade ist also nicht möglich. Ein weiteres Kriterium für solch ein Experiment wäre die Durchlässigkeit des Antagonisten durch die Blut-Hirn-Schranke. Um Beeinflussungen des zentralen Nervensystems ausschließen zu können, müsste die Verteilung des benutzten Antagonisten auf den Blutkreislauf beschränkt sein.

> Stimmt die oben beschriebene Hypothese, dann sollten auch 5-HT₇-Rezeptor-Knockout-Mäuse einen erhöhten Blutdruck aufweisen, wenn der Knockout nicht im Gehirn gegensätzliche Effekte erzeugt. 5-HT₇-Rezeptor-Knockout-Mäuse wurden jedoch bislang nur auf ihre thermische Regulation und auf ihr Lernverhalten, nicht jedoch auf ihren Blutdruck hin untersucht (Hedlund *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2004).

Um die Hypothese von Thrombozyten-5-HT als lokale tonusregulierende Substanz zu untermauern, sind also noch weitere Experimente nötig, die im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erstellt werden konnten.

3.3 Verstärkte bluthochdruckinduzierte Organschäden in TPH1^{-/-} Mäusen

Thrombozyten haben einen entscheidenden Anteil an der Entstehung von Entzündungen, indem Sie nach Aktivierung eine ganze Reihe chemotaktischer Botenstoffe freisetzen, und indem sie den dadurch angelockten immunologischen Zellen das Eindringen in das beschädigte Gewebe ermöglichen (Abschnitt I.3.6.2). Dieser Mechanismus könnte auch bei der Entstehung bluthochdruckinduzierter Nierenschäden beteiligt sein (Abschnitt I.3.5.4), da auch diese durch die Einwanderung immunologischer Zellen gekennzeichnet sind. Thrombozyten werden jedenfalls generell als krankheitsfördernd beschrieben (eine Übersicht bieten zum Beispiel Cameron, 1984 und Doggrell, 2003).

Thrombozyten dienen als transportable 5-HT-Speicher im Blutkreislauf. Sie setzen es nach Kontakt mit subendothelialen Collagen frei und fördern damit unter anderem auf parakrine und autokrine Weise die Ausschüttung ihrer eigenen α -Granula, und damit die Freisetzung verschiedener in den α -Granula gespeicherter Substanzen. Die Thrombozyten der TPH1^{-/-} Mäuse enthalten weniger als 1 % des 5-HT, das in Wildtypthrombozyten gespeichert ist (Abschnitt III.2.1). Im Rahmen einer früheren Untersuchung konnte in unserer Arbeitsgruppe am Beispiel des von Willebrand-Faktors gezeigt werden, dass durch diese 5-HT-Defizienz die Ausschüttung der α -Granula gestört ist (Walther *et al*, 2003c). Da die α -Granula der Thrombozyten vor allem entzündungsfördernde Substanzen, zum Beispiel TGF- β und P-Selektin enthalten, ist die Entstehung von Entzündungen in den TPH1^{-/-} Mäusen gestört (siehe auch Abschnitt IV.4.1 und IV.4.2), und es wurde erwartet, dass auch die Entstehung bluthochdruckinduzierter Organschäden in diesen Mäusen inhibiert ist.

In den TPH1^{-/-} Mäusen und entsprechenden Wildtyptieren wurde mittels der DOCA/NaCl/Nx-Methode (Abschnitt II.6.3.2) Bluthochdruck induziert. Dabei wird durch das Entfernen einer Niere (Uninephrektomie, Nx) die Natriumausscheidung gesenkt, durch die Verabreichung des Aldosteronvorläufers DOCA (Desoxycorticosteronacetat) die Natriumresorption in den distalen Nierentubuli erhöht, und durch die Verabreichung von NaCl im Trinkwasser dem Organismus vermehrt Natrium zugeführt. Zusammen führt dies zum Anstieg des Blutvolumens und damit des Blutdruckes (Abbildung III.14 in Abschnitt III.2.5).

Die DOCA/NaCl/Nx-Behandlung führt sowohl in den TPH1^{-/-}, als auch in den TPH1^{+/+} Tieren zu einem signifikanten Anstieg des Blutdruckes. In beiden Gruppen konnte eine ähnliche Blutdruckveränderung verzeichnet werden, jedoch behielten die TPH1^{-/-} Tiere den schon im unbehandelten Zustand gezeigten um circa 5 mmHg erhöhten Blutdruck während der Behandlung bei (Abschnitt III.2.5).

In den durch den Bluthochdruck verursachten Organschäden konnte jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den TPH1^{-/-} und den TPH1^{+/+} Tieren festgestellt werden. TPH1^{-/-} Mäuse zeigen nach drei Wochen DOCA/NaCl/Nx-Behandlung eine stärkere Herzhypertrophie (Abbildung III.15) und höhere Albuminausscheidung über den Urin auf (Abbildungen III.16 und III.17). Während diese quantitativen Unterschiede durchaus mit dem über den drei Behandlungswochen konsequent leicht höheren Blutdruck in den TPH1^{-/-} Tieren erklärt werden könnten, lassen sich die in den Nierenschnitten aufgefundenen qualitativen Unterschiede kaum auf Blutdruckunterschiede zurückführen. Die Bowman-

schen Kapseln der DOCA/NaCl/Nx-behandelten TPH1^{-/-} Glomeruli waren häufig mit proliferierten und vakuolenenthaltenden Zellen verschlossen. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Epithelzellen, die in Mäusen typischerweise bis in die Bowmansche Kapsel hineinreichen (Abbildung III.18). In DOCA/NaCl/Nx-behandelten TPH1^{+/+} Mäusen waren solche Zellproliferationen nicht zu sehen. Diese Schädigungen sind untypisch für DOCA/NaCl/Nx-behandelte Mäuse und sind vermutlich Ursache der in den TPH1^{-/-} Tieren gefundenen erhöhten Albuminausscheidung.

Obwohl Entzündungsreaktionen aufgrund der 5-HT-Defizienz in den Thrombozyten in den TPH1^{-/-} Mäuse inhibiert sind, bilden diese Tiere stärkere und vor allem untypische bluthochdruckinduzierte Nierenschädigungen aus. Die inhibierte Ausschüttung der α -Granula der TPH1^{-/-} Thrombozyten und damit das Fehlen der verschiedenen entzündungsfördernden Substanzen aus den Thrombozyten hatte demnach nicht den erwarteten schützenden Effekt auf die Organe gegenüber der Schädigung durch den erhöhten Bluthochdruck.

Wie lässt sich das erklären? Die Ursache dieses Effekts muss in den Thrombozyten liegen, da Nieren selbst kein 5-HT synthetisieren. Mögliche serotonerge Komponenten in der Niere könnten Innervierungen sein. Diese sollten in dem TPH1-Knockout aber nicht verändert sein, da Neuronen bekanntlich die TPH2 zur 5-HT-Biosynthese nutzen. Um aber den genauen Mechanismus verstehen zu können, der zu der Zellproliferation in den Glomeruli der TPH1^{-/-} Mäusen, und damit wahrscheinlich auch zu der durch die Albuminausscheidung gekennzeichneten Nierenschädigung führte, sind weitere Untersuchungen nötig. Zentrale Fragen für die Erklärung des Phänotyps sind zum Beispiel:

> Führt die 5-HT-Defizienz direkt zu der Entwicklung des Phänotyps, oder wird dieser Effekt von Substanzen aus den α -Granula der Thrombozyten, die in den TPH1^{-/-} Tieren bekanntermaßen nicht ausgeschüttet werden können, vermittelt? Welche Substanz könnte das sein?

> Werden die tubulären Epithelzellen direkt oder indirekt über andere Zellen, zum Beispiel den Mesangialzellen beeinflusst?

> Könnte die mangelnde Gefäßerweiterung (siehe Abschnitt IV.3.2), und damit auch indirekt die leichte Blutdruckerhöhung in den TPH1^{-/-} Mäusen zu diesen Phänotyp geführt haben?

Eindeutig ist aber, dass Thrombozyten nicht, wie bisher angenommen, die Entwicklung hypertensiver Nierenschädigungen nur fördern. Die Ergebnisse der Bluthochdruckinduktion in den TPH1^{-/-} Mäusen lässt darauf schließen, das sie sich auch günstig auf den Krankheitsverlauf auswirken können. Daher muss die Rolle der Thrombozyten in der Entstehung von Nierenschädigungen als Folge des Bluthochdrucks neu überdacht werden.

4 Immunologische Untersuchungen in den TPH1^{-/-} Mäusen

4.1 Verminderte Kontakthypersensibilität in den TPH1^{-/-} Mäusen

Dass 5-HT auch entscheidend an verschiedenen, unterschiedlichen Prozessen der Immunabwehr beteiligt ist, wurde schon in verschiedenen Studien gezeigt (siehe auch Abschnitt I.3.6).

In dieser Arbeit wurde die Kontakthypersensibilität (CHS) als *in vivo*-Modell einer T-Zell-vermittelten Immunantwort benutzt, da es recht einfach durchzuführen und gut quantifizierbar ist. Als Grad der Immunreaktion wird in diesem Modell die Ohrenschwellung nach Haptenauftrag in sensibilisierten Organismen gemessen. Es gibt zwei Schwellungen: eine leichte 2 h und eine stärkere 24 h nach Haptenauftrag. Nach Ptak *et al.* (1991) bringen bei der 2 h-Schwellung antigenspezifische T-Zellen Mastzellen und/oder Thrombozyten zur 5-HT-Freisetzung, welches dann die Rekrutierung weiterer antigenspezifischer Lymphozyten zum Entzündungsort, und damit die 24 h-Schwellung ermöglichen soll.

Wie aus Abbildung III.21 ersichtlich, bilden die TPH1^{-/-} Tiere eine deutlich geringere 24h-Schwellung als CHS-Antwort nach Kontakt mit dem Hapten Oxazolon aus. Dieses Ergebnis zeigt klar, dass die 5-HT-Defizienz in den TPH1^{-/-} Tieren das Immunsystem beeinträchtigt. Die zwei Stunden nach Haptenauftrag entstehende Schwellung konnte dagegen nicht registriert werden (keine Abbildung). Da diese 2 h-Schwellung jedoch auch nicht in den TPH1^{+/+} Mäusen aufgefunden wurde, scheint dies ein Charakteristikum der verwendeten C57BL/6-Mauslinie zu sein. Ein Grund könnte zum Beispiel die geringe Größe der Tiere sein. Die TPH1^{-/-} Mäuse stellen somit ein eher unbefriedigendes Tiermodell für Untersuchungen mit dem CHS-Modell dar. Eine Rückkreuzung auf einen anderen genetischen Hintergrund, bei dem die 2 h-Schwellung klar detektiert werden kann, zum Beispiel die von Ptak *et al.* (1991) verwendeten CBA oder BALB/c-Mäuse, hätte allerdings zu viel Zeit in Anspruch genommen.

Da bis zur Ausbildung der CHS-Antwort verschiedene immunologische Prozesse stattfinden (Antigenerkennung, Antigenpräsentierung, T-Zellaktivierung, Rekrutierung der Effektorzellen an den Entzündungsherd...), und in der Literatur verschiedene dieser Prozesse als 5-HT-abhängig beschrieben wurden (vor allem die T-Zellaktivierung: Kut *et al.*, 1992; Young & Matthews, 1995; Sibella-Arguelles, 2001; und die Entzündungsreaktion: Ameisen *et al.*, 1989), sollte trotz des nicht gerade idealen Tiermodells untersucht werden, an welcher Stelle des CHS-Modells die 5-HT-Defizienz zu der gezeigten Beeinträchtigung führte. Als mögliche beeinträchtigte 5-HT-abhängige Prozesse galten:

> Die efferente Phase: Nach erneutem Kontakt mit dem Hapten bildet sich in einem sensibilisierten Organismus nur dann eine vollständige Entzündungsreaktion heraus, wenn am Entzündungsort 5-HT als Signalmolekül von Thrombozyten oder Mastzellen bereitgestellt werden kann. Diese Ausbildung dieser Entzündungsreaktion konnte mit 5-HT-Antagonisten inhibiert werden (Abschnitt I.3.6.4). Die efferente CHS-Antwort kann man unterteilen in die frühe (2 h-) Schwellung und die weitaus stärkere späte (24 h-) Schwellung (siehe auch Abschnitt IV.3.2 weiter hinten).

> Die T-Zellaktivierung in der afferenten Phase: In *in vitro*-Versuchen zeigte sich, dass die Lymphozytenaktivierung durch verschiedene 5-HT-Antagonisten hemmbar ist (Abschnitt I.3.6.3). Zwar wurden in diesen Experimenten Milzzellen benutzt, so dass die Antigen-

präsentierung hauptsächlich durch Makrophagen stattfand, während diese Aufgabe im CHS-Modell von den Langerhansschen/Dendritischen Zellen übernommen wird. Wenn 5-HT jedoch ein generelles Signalmolekül in der Lymphozytenaktivierung darstellt, dann sollte es auch in der afferenten Phase des CHS-Modell eine Rolle spielen. Bislang wurde solch eine 5-HT-Abhängigkeit jedoch nicht *in vivo* nachgewiesen

> Verschiedene Migrationsschritte: Nachgewiesen wurde bislang die entscheidende Rolle der Thrombozyten in der Entstehung der Atherosklerose (Abschnitt I.3.6.2). Ein weiteres Beispiel geben Diacovo *et al.* (1998). In ihrer Publikation zeigten sie, dass T-Zellen von L-Selektin-Knockout-Mäusen nicht in die peripheren Lymphknoten einwandern können. Gibt man diesen Mäusen jedoch aktivierte Thrombozyten, so funktioniert dieser „homing“ genannte Prozess wieder. Eine Frage ist allerdings, ob Thrombozyten 5-HT brauchen, um diese Effekte vermitteln zu können.

> Die Hämatopoese: Da 5-HT in die Ontogenese involviert ist (Abschnitt I.3.2), und viele immunologische Zellen 5-HT synthetisieren, beziehungsweise 5-HT-Rezeptoren exprimieren (Abschnitt I.3.6.1), wäre auch eine gestörte Hämatopoese in den TPH1^{-/-} Tieren denkbar.

4.2 Beeinträchtigung der efferenten CHS-Phase in den TPH1^{-/-} Tieren

Die Frage, an welcher Stelle des komplexen CHS-Ablaufs die 5-HT-Defizienz der TPH1^{-/-} Mäuse störend wirkte, konnte zum Teil mit dem adoptiven Transfer von Lymphknoten-zellen (LKZ) beantwortet werden. Dabei wurden Zellsuspensionen von den Lymphknoten sensibilisierter Tiere hergestellt und unsensibilisierten Tieren verabreicht. Die nachfolgende Applikation des Haptens löste dann auch in den unsensibilisierten Tieren die CHS-Antwort aus (siehe auch Abschnitt III.3.5).

In diesen Versuchen zeigte sich, dass LKZ aus TPH1^{-/-} Tieren durchaus in der Lage waren, eine starke CHS-Reaktion auszulösen, wenn sie in TPH1^{+/+} Tiere gegeben wurden. Die gleichen Zellen in TPH1^{-/-} Tiere gespritzt ergaben dagegen eine deutlich schwächere Reaktion (Abschnitt III.3.5). Der Grad der Inhibition in den TPH1^{-/-} Mäusen glich jener, die in dem CHS-Experiment ohne Transfer gesehen wurde (Abschnitt III.3.2). Dieses Ergebnis zeigt, dass die afferente CHS-Phase in den TPH1^{-/-} Mäusen nicht beeinträchtigt ist. Diese Aussage betrifft die Hämatopoese der beteiligten Zellen, also der Langerhansschen/Dendritischen Zellen und der T-Zellen, die Antigenaufnahme, die Migration der Dendritischen Zellen in die Lymphknoten, die Antigenpräsentation und die T-Zellaktivierung und -proliferation. Unwahrscheinlich ist außerdem, dass die Migration der aktivierten und proliferierten T-Zellen aus den Lymphknoten hinaus in das Blut beeinträchtigt ist, da die TPH1^{-/-} LKZ den Tieren i.v. appliziert, und somit dieser Schritt übersprungen wurde, es aber trotzdem zu der Reduktion der CHS-Antwort in den TPH1^{-/-} Tieren kam.

Die Verwendung von TPH1^{+/+} LKZ für den adoptiven Transfer bestätigte, dass die efferente Phase der CHS in den TPH1^{-/-} Mäusen inhibiert ist. Die in ihrer Funktion unbeeinträchtigten TPH1^{+/+} LKZ vermochten nicht eine ähnlich starke CHS-Reaktion in den TPH1^{-/-} Mäusen wie in den TPH1^{+/+} Mäusen hervorzurufen. Die Reduktion der CHS-Antwort in den TPH1^{-/-} Tieren gegenüber den Wildtyp-tieren entsprach wieder der

Reduktion im CHS-Experiment ohne Transfer. Dass die TPH1+/+ LKZ eine gleichermaßen reduzierte CHS-Antwort in den Knockouttieren auslösen wie die TPH1-/- LKZ, bestätigt zum einen die Beobachtung aus dem adoptiven Transfers mit TPH1-/- LKZ, dass TPH1-/- LKZ nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Zum anderen spricht es auch dafür, dass die Umgebung in den TPH1-/- Mäusen, also Gewebe, Endothel oder andere zelluläre Komponenten im Gewebe oder Blut, für die Reduktion verantwortlich ist.

Damit kommen noch zwei Schritte in der efferenten Phase in Betracht, die in den TPH1-/- Mäusen inhibiert sein könnten:

> Die 2 h-Schwellung: In dieser Phase wirken frühe (*engl: early acting*) T-Zellen im Gewebe, welches mit dem Hapten in Kontakt kam. Es wird angenommen, dass diese Lymphozyten die Mastzellen und/oder die Thrombozyten zur 5-HT-Freisetzung stimulieren, und dass dieses 5-HT entscheidend als Signalmolekül an der Initiierung der 24 h-Schwellung beteiligt ist (Ptak *et al.*, 1991; Geba *et al.* 1996).

> Die 24 h-Schwellung: In dieser späteren Phase sollen weitere T-Zellen (*engl: late acting*), angelockt durch das in der ersten Phase ausgeschüttete 5-HT, in das Gewebe eintreten. Diese spätere Phase sollte natürlich inhibiert sein, wenn die 2h-Schwellung nicht korrekt stattgefunden hat. Weiterhin ist jedoch denkbar, dass die Einwanderung dieser Zellen, ähnlich wie bei der Atherosklerose, thrombozytenabhängig ist. Da den Thrombozyten der TPH1-/- Mäuse 5-HT fehlt, und daher die Ausschüttung der α -Granula, welche wichtige Adhensionsmoleküle enthalten (Abschnitte I.2.3 und I.3.3), gestört ist, könnte diese Leukozyteneinwanderung in den TPH1-/- Mäusen gestört sein.

Die Beantwortung dieser Frage war leider nicht möglich, da in den verwendeten C57BL/6-Mäusen die 2 h-Schwellung nicht detektierbar ist. Die Prozesse, die während der 2 h-Schwellung stattfinden, wird es höchstwahrscheinlich auch in diesen Tieren geben, da sich ohne sie die 24 h-Schwellung nicht ausbilden kann (Ptak *et al.*, 1991). Jedoch ist die Schwellung als Zeichen, dass diese Prozesse ablaufen, wahrscheinlich aufgrund anatomischer Besonderheiten in den C57BL/6-Mäusen nicht sehr stark ausgeprägt.

Fest steht jedoch, dass in beiden Phasen Thrombozyten beteiligt sind. Daher bestätigen diese Versuche die Rolle dieser Zellen in der Entstehung von Entzündungen. Die Applikation von exogenem 5-HT in den Blutkreislauf, und damit das „Aufladen“ der Thrombozyten, kann die Ausbildung der CHS-Antwort in den TPH1-/- Tieren verstärken, während diese Behandlung in den TPH1+/+ Tieren zu einer Abschwächung der Immunantwort führt, so dass sich die Unterschiede zwischen TPH1-/- und TPH1+/+ Tieren aufheben (Abschnitt III.3.7). Ein Grund für diesen inhibierenden Effekt in den TPH1+/+ Tieren könnte darin liegen, dass die schon beladenen TPH1+/+ Thrombozyten das zugefügte 5-HT nicht aufnehmen können, und die dadurch entstehende lokale 5-HT-Erhöhung im Plasma die Thrombozyten aktiviert. Es ist denkbar, dass sie daraufhin Substanzen ausschütten, die ihnen dann später zur Erfüllung ihrer Funktion fehlen.

4.3 T-Zellaktivierung und -proliferation

Wie schon in Abschnitt IV.3.2 erläutert, ist die T-Zellaktivierung und –proliferation in den TPH1-/- Mäusen nicht beeinträchtigt. Diese Erkenntnis wurde durch den durchgeführten *in vitro*-Versuch zur T-Zellproliferation untermauert (Abschnitt III.3.6).

Dieser Test wurde in dreifacher Weise durchgeführt: Dem ersten Ansatz wurde fötales Kälberserum (FCS) zugegeben. Serum wird normalerweise allen Zellkulturmedien zugegeben, da es mit den enthaltenen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren das Zellwachstum optimal unterstützt. Ein Nachteil des Serums für die 5-HT-Forschung ist jedoch die hohe und schwankende 5-HT-Konzentration im Serum. In serumsupplementiertem Zellkulturmedium ist immer 5-HT enthalten. Um die Effekte des 5-HT auf die T-Zellaktivierung und –proliferation zu studieren wurde deshalb auch ein Ansatz ohne Serumzugabe durchgeführt. Damit die Zellen trotzdem optimal wachsen können, wurde ein Serumersatzmedium (SerEx!) verwendet. Weiterhin wurde ein Ansatz mit Serumersatz und mit 5-HT in einer Konzentration wie im Medium mit Serum durchgeführt, um den Einfluss der 5-HT-Defizienz und der Serumdefizienz unterscheiden zu können.

Wie in Abschnitt III.3.6 beschrieben wurde, war in den Ansatz ohne Serum kaum eine T-Zellproliferation detektierbar. Da aber auch in dem Ansatz mit Serumersatz und 5-HT keine Proliferation stattfand, konnte ausgeschlossen werden, dass diese Proliferationshemmung durch die 5-HT-Defizienz verursacht wurde. Wahrscheinlicher ist, dass die Zellen durch das Anheften an die Zellkulturschale nicht miteinander kommunizieren konnten. Dieser „Klebeffekt“ war nur in den Ansätzen mit Serumersatz zu sehen. In den Ansätzen mit Medium dagegen schwammen die Zellen frei herum und sammelten sich auf dem Boden der Rundbodenplatte. Es scheint, dass im Serum, nicht jedoch im Serumersatz, Stoffe enthalten sind, die das Ankleben der Zellen an die Plastikware verhindern.

In den Ansätzen mit Serum wurde kein Unterschied in der T-Zellaktivierung und –proliferation zwischen TPH1-/- Tieren und den entsprechenden Wildtypen festgestellt. Angesichts der Tatsache, dass immer noch 5-HT in Milz und Lymphknoten der TPH1-/- Tiere zu finden ist (Abschnitt III.3.1), man also nicht von einer völligen 5-HT-Defizienz an diesen Orten der Antigenpräsentation ausgehen kann, spiegelt dieser *in vitro*-Test mit Serum durchaus *in vivo*-Verhältnisse in den TPH1-/- Mäusen wider. Dieser *in vitro*-Test bekräftigt damit die aus den *in vivo*-Experimenten gewonnene Erkenntnis, dass die T-Zellaktivierung und –proliferation in den TPH1-/- Mäusen normal verläuft. Die TPH1-/- Mäuse stellen also aufgrund der immer noch vorhandenen 5-HT-Spuren, die anscheinend von den immunologischen Zellen aufgenommen werden, kein geeignetes *in vivo*-Modell zur Erforschung der 5-HT-Abhängigkeit der T-Zellaktivierung und -proliferation dar.

5 Versuche zur IDO-induzierten Toleranz in der Schwangerschaft

5.1 IDO und Schwangerschaft

In der Einleitung dieser Arbeit wurde im Abschnitt I.3.7 das Konzept der IDO-vermittelten Toleranz vorgestellt. Dabei soll das Enzym IDO Trp abbauen, wodurch eine Trp-Defizienz entsteht, die wiederum T-Zellen an der Proliferation hindert. Aber ohne T-Zellen können allogene Gewebe, zum Beispiel Transplantate, nicht abgestoßen werden. Stattdessen werden sie toleriert.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der IDO-induzierte Toleranzmechanismus tatsächlich durch die Trp-Defizienz, oder aber durch eine Defizienz des Trp-Abkömmlings 5-HT vermittelt wird. Als Arbeitsmodell wurde die Schwangerschaft gewählt, da auch die maternale Toleranz gegenüber dem allogenen Fötus IDO-vermittelt sein sollte (Munn *et al.*, 1998; Mellor *et al.*; 2001). In den im Abschnitt III.4 beschriebenen Experimenten wurden die Trp- und 5-HT-Spiegel (TPH1+/+), beziehungsweise nur der Trp-Spiegel (TPH1-/-) in schwangeren Mäusen durch Trp-Verfütterung oder durch Gabe eines IDO-Inhibitors erhöht, und die Auswirkungen auf die syn- und allogenen Föten studiert.

5.2 Trp-Fütterungsversuch

Wie schon in in Abschnitt III.4.1 angedeutet, war das Ergebniss des Trp-Fütterungsversuches uneindeutig. Bei einer Verfütterung von 5 % zusätzlichem Trp zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wurfgrößen der syngen und allogenen verpaarten TPH1+/+ Tiere. Wahrscheinlich wurden bei der Verfütterung von zusätzlichem Trp auch folgende Effekte ausgelöst, die berücksichtigt werden müssen:

1. Ein Übermaß an Trp ist an sich schädlich (LD₅₀ für Ratte: 16 g/kg KG, *safety data sheet*). Bei der Fütterung mit 7.5 % Trp im Futter wurden in allen Gruppen kaum noch lebende Jungtiere geboren (Abschnitt III.4.1). Die Ursache für diese Toxizität könnte darin liegen, dass ein Überschuss an Trp den Transport anderer neutraler Aminosäuren mit verzweigten oder aromatischen Seitenketten durch die gemeinsamen Transporter inhibiert (Kanai *et al.*, 1998; Segawa *et al.*, 1999).
2. Der TPH1-Knockout blockiert einen der Trp-Abbauwege. Dadurch wird Trp in den TPH1-/- Tieren aufgestaut (Wilhelm, 2001). Der unter 1. beschriebene Effekt sollte damit in den TPH1-/- Tieren ausgeprägter gewesen sein als in den TPH1+/+ Tieren, und in den syngen verpaarten TPH1-/- Tieren stärker als in den allogenen verpaarten TPH1-/- Tieren, da in diesem Versuch in ersteren die Föten homozygot, in letzteren dagegen heterozygot für das Knockout-Allel waren.

Da sich in den nachfolgenden Versuchen zu diesem Thema (Abschnitte III.4.2 und III.4.3) herausgestellt hat, dass der Trp- oder 5-HT-Abbau durch IDO nicht für die Toleranz gegenüber dem allogenen Fötus verantwortlich ist (siehe auch nachfolgende Abschnitte), müssen diese beiden Effekte Ursache für die erhaltenen Ergebnisse sein.

Wie kommt dann aber der Unterschied in den Wurfzahlen syn- und allogenen verpaarter TPH1+/- Tiere zustande? Trp könnte sich schädlich auf den immunologischen Schutzmechanismus, oder die Zellen, die diesen Schutzmechanismus stellen, also Plazentazellen, ausgewirkt und diesen zerstört haben. Damit könnten allogene Föten von der maternalen Immunabwehr erkannt und abgestoßen worden sein, während die syngenen Föten nicht abgestoßen wurden, da das maternale Immunsystem sie nicht erkannt hat.

5.3 Versuche mit 1-MT

Die von Munn *et al.* (1998) und Mellor *et al.* (2001) publizierte Beeinträchtigung allogener Schwangerschaften durch die Applikation desIDO-Inhibitors 1-MT konnte von uns nicht bestätigt werden. Sogar die doppelte Dosis (zwei Pellets pro Maus) zeigte keinerlei Auswirkungen (Abschnitt III.4.2).

Eine erste Vermutung über den Grund dieser Diskrepanz lag in der Tatsache, dass hier C57BL/6-Weibchen (TPH1+/- und TPH1-/-) mit CBA/J-Böckchen verpaart wurden, während bei Mellor und Munn die Verpaarungskombination genau andersherum war. Diese Annahme konnte allerdings widerlegt werden, nachdem auch ein allogenes verpaartes CBA/J-Weibchen, welches mit einem 1-MT-Pellet behandelt wurde, eine unbeeinträchtigte Schwangerschaft aufwies (Tabelle III.5). Eine zweite Vermutung war, dass die applizierten 1-MT-Pellets vom Bindegewebe eingekapselt wurden und dadurch den Wirkstoff nicht mehr an die Mäuse abgeben konnten. Eine Untersuchung des Plasmas einer der Mäuse zeigte jedoch eindeutig, dass 1-MT im Organismus vorlag (Abbildung III.31).

Einen Hinweis, warum in unseren Experimenten keine Abstoßung allogener Föten zu sehen war, gibt die Publikation von Baban *et al.* (2004). Dort wird im Abschnitt Material und Methoden erwähnt, dass von jeder Charge der Pellets erst einige auf Effizienz, das heißt auf das Vermögen, eine Abstoßung allogener Föten hervorzurufen, hin untersucht wurden. Nicht alle Pellets sind also auch wirksam. In den in Abschnitt III.4.2 gezeigten Experimenten wurden wohl die unwirksamen Pellets verwendet. Trotzdem konnte 1-MT im Plasma eines der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass 1-MT nicht für den negativen Effekt auf allogene Schwangerschaften verantwortlich sein kann. Was war dann dafür verantwortlich?

Denkbar ist, dass bei den Versuchen von Mellor und Munn das 1-MT verunreinigt war. Die Firma Aldrich garantiert bei 1-MT eine Reinheit von mindestens 95 %. Das heißt, 5 % sind Nebenprodukte, die bei der Synthese anfallen. Eine dieser Substanzen könnte sich schädlich auf den immunologischen Schutzmechanismus ausgewirkt und diesen zerstört haben. Dann könnten allogene Föten von der maternalen Immunabwehr erkannt und abgestoßen worden sein. Syngene Föten wären nicht betroffen gewesen, da sie ja für das maternale Immunsystem „unsichtbar“ waren.

5.4 IDO-Knockout

Es scheint also, dass eine Hemmung der IDO durch 1-MT keinen Einfluss auf den Schwangerschaftserfolg hat. Es war auch schwer erklärbar, warum Mellor und Munn extrem hohe Dosen verabreichen mussten, um die Schädigung allogener Föten zu erreichen (1-MT: 1 mg/ g KG/ d gegenüber Trp: circa 3.5 µg/ g KG/ d, abgeschätzt aus der Trp-Einnahmeempfehlung für Menschen, Mayes 1996). Um zu beweisen, dass eine Trp-Abbau durch IDO nicht für eine erfolgreiche allogene Schwangerschaft nötig ist, sollte ein IDO-Knockout erstellt werden. Wie schon in Abschnitt III.4.3.1 erwähnt, wurde dieses Vorhaben nicht zu Ende geführt, da Mellor *et al.* (2003) die Erstellung der IDO-/- Tiere publizierten.

Die IDO-/- Tiere sind lebensfähig und in allen erdenklichen allogenen Kombinationen (Mutter IDO-/- Kind +/+; Mutter IDO+/+ Kind -/-; Mutter IDO-/- Kind -/-) waren die Wurfzahlen normal und die Jungtiere gesund (Baban *et al.*, 2004). Damit bestätigt sich der Verdacht, dass die IDO-Expression und der durch IDO katalysierte Trp-Abbau für eine allogene Schwangerschaft entbehrlich sind und nicht den Schwangerschaftstoleranzmechanismus darstellen.

Interessant war, dass die Applikation der (wirksamen) 1-MT-Pellets allogene Schwangerschaften nicht beeinträchtete, wenn beide Eltern IDO-/- waren. Das heißt, dass IDO das Nebenprodukt in den 1-MT-Pellets wahrscheinlich erst zu einer schädlichen Substanz umsetzt.

Mit den IDO-/- Tieren konnte dagegen die von Grohmann *et al.* (2002; siehe auch Abschnitt I.3.7.4) gezeigte Toleranzinduktion gegenüber Transplantaten durch IDO-expimierende DC bestätigt werden (Mellor *et al.*, 2003). Aber auch hier stellt sich natürlich die Frage, ob der Trp-Abbau oder der 5-HT-Abbau für die Toleranzvermittlung wichtig ist.

5.5 5-HT oder Trp?

Im folgenden werden noch einmal einige Überlegungen dargelegt, die dafür sprechen, dass 5-HT und nicht Trp die entscheidende Substanz ist, deren Abbau bei der IDO-induzierten Toleranz gegenüber Transplantaten entscheidend sein könnte:

1. Die Trp-Konzentration ist im Allgemeinen höher als die 5-HT-Konzentration (zum Beispiel im Plasma circa 200 mal höher; Yamamoto *et al.*, 1997: Trp circa 10 µM; Abschnitt III.2.1: 5-HT circa 50 nM). Eine 5-HT-Defizienz lässt sich unter diesen Voraussetzungen sicher eher erreichen, als eine Trp-Defizienz.
2. IDO baut nicht nur 5-HT, sondern auch die 5-HT-Vorläufer Tryptophan und 5-Hydroxytryptophan ab (*in vitro*-Studie: Shimizu *et al.*, 1978; *in vivo*-Studie: Fujiwara *et al.*, 1979). Damit kann die 5-HT-Konzentration auf zwei Wegen verringert werden: durch den Abbau von 5-HT selbst und durch den Abbau der Vorläufer-substanzen.
3. Eine Trp-Defizienz würde alle Zellen in näherer Umgebung treffen, da alle Zellen diese essentielle Aminosäure für die Proteinbiosynthese benötigen. Das hätte besonders den sich entwickelnden Fötus betroffen, hätte sich bewahrheitet, dass

der IDO-Abbau wichtig für die Schwangerschaftstoleranz ist. Eine 5-HT-Depletion beträfe dagegen nur Zellen, die auch 5-HT-Rezeptoren exprimieren. Die Signaltransduktion wäre in diesem Fall viel spezifischer.

4. Ein weiterer Abkömmling des Trp ist das Tryptamin. Es entsteht durch Deaminierung des Trp ohne vorhergehende Hydroxylierung (Abschnitt I.3.7.2). Dieses ebenfalls durch IDO abgebaute Tryptamin weist agonistische Eigenschaften zu mindestens einem 5-HT-Rezeptor auf (Cohen & Wittenauer, 1985; van Hooft & Vijverberg, 1996; Dukat *et al.*, 2004).
5. 5-HT wird durch IDO zu Formyl-5-Hydroxykynurenamin abgebaut, welches dann von der Formidase (EC 3.5.1.9) zu 5-Hydroxykynurenamin umgesetzt wird. 5-Hydroxykynurenamin zeigte in biologischen Assays antagonistische Eigenschaften zu 5-HT (Toda *et al.*, 1974; Okuma *et al.*, 1976).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der IDO-induzierte Toleranzmechanismus nicht für den Erfolg allogener Schwangerschaften verantwortlich ist, und demnach die Frage, ob Trp oder 5-HT abgebaut werden muss, in diesem Fall nicht relevant ist. In allen weiteren in Abschnitt I.3.7.3 und I.3.7.4 dargestellten Fällen, also der Pathogenabwehr, der Transplantation und der Tumortoleranz, ist diese Frage weiterhin offen und bedarf weiterer Untersuchungen.