

### 3. Diskussion

#### 3.1 Körper- und Gehirngewichte

Beim Vergleich der Körpergewichte zeigte sich im U-Test nach Mann-Whitney, nach Anpassung des Signifikanzniveaus entsprechend der Bonferroni-Korrektur auf  $p < 0,007$ , kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweils gleich behandelten transgenen Tieren und den Kontrolltieren. Dies zeigt, dass das Wachstum und die Gesamtentwicklung der transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren bei gleicher Behandlung nicht grob beeinträchtigt waren.

Die Behandlung mit L-Name führte bei den transgenen Tieren zu einem signifikant niedrigeren Körpergewicht im Vergleich zu den unbehandelten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass bei einer Hemmung der Gegenregulation das Überwiegen des Endothelinsystems zu einer Entwicklungsstörung der Mäuse führt. Allerdings kann diese Störung nicht sehr groß sein, da die L-Name behandelten, transgenen Tiere sich nicht von den L-Name behandelten Kontrolltieren unterscheiden, und diese sich wiederum nicht signifikant von den unbehandelten Kontrolltieren unterscheiden. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich, wenn man berücksichtigt, dass ohne Durchführung einer Bonferroni-Korrektur bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  die unbehandelten, transgenen Tiere signifikant schwerer waren als die unbehandelten Kontrolltiere. Das könnte bedeuten, dass das Wachstum und die Gesamtentwicklung der transgenen Tiere eher verstärkt war, oder dass die bei den transgenen Tieren gefundenen Organveränderungen, wahrscheinlich vor allem die der Nieren, zu einer Ödementwicklung und Wasserretention geführt haben. Die Behandlung mit L-Name "verhinderte" sozusagen diese Gewichtszunahme bei den transgenen Tieren. Das könnte ein Zeichen dafür sein, dass die Zunahme des Körpergewichts eher durch die gesteigerte NO-Synthese als durch die ET-Überexpression verursacht wurde. Gegen diese Möglichkeit spricht allerdings, dass bei zusätzlicher Gabe von LU224 das Körpergewicht der Tiere wieder höher ist. Die doppelt behandelten, transgenen Tiere sind signifikant schwerer im Vergleich zu den nur mit L-Name behandelten. Daher ist es wahrscheinlicher, dass das Überwiegen der ET-1-Expression zu dem Gewichtsverlust geführt hat und aus diesem Grund bei einer gleichzeitigen Hemmung der ET-Wirkung dieser Gewichtsunterschied nicht mehr nachzuweisen ist. Auch bei den Kontrolltieren zeigt sich ohne die Bonferroni-Korrektur bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ein signifikant geringeres Körpergewicht bei den L-Name behandelten Tieren im Vergleich zu den L-Name und LU224 behandelten Tieren. Dies zeigt, dass selbst bei physiologischer ET-1-Expression eine Aufhebung des durch L-Name verursachten leichten ET-Übergewichts zu einem höheren Körpergewicht führt. Die Auswirkungen der Behandlung mit L-Name auf die Nieren und Lungen sind noch nicht publiziert worden.

Vergleicht man die absoluten Gehirngewichte, so lässt sich dabei nach der Bonferroni-Korrektur kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen feststellen. Ohne die Korrektur haben die unbehandelten, transgenen Tiere ein signifikant geringeres absolutes Gehirngewicht im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren. Dieser Unterschied lässt sich auch nachweisen, wenn man das Gehirngewicht in Relation zum Körpergewicht betrachtet. In diesem Fall ist der Unterschied auch nach der Bonferroni-Korrektur noch signifikant. Dies könnte auf eine Störung der Gehirnentwicklung aufgrund des Transgens zurückzuführen sein, könnte jedoch auch an den Folgen der späteren Transgenexpression wie z.B. einer Hypoxie, einer Entzündungsreaktion, einer Störung der Homöostase oder

ähnlichem mit nachfolgendem Nerven- oder Gliazelluntergang liegen. Zum Nachweis einer solchen Schädigung wurden verschiedene Färbungen und immunhistochemische Methoden zur Darstellung der unterschiedlichen Zellarten im Gehirn durchgeführt.

Die Behandlung mit L-Name führte beim absoluten Gehirngewicht nicht zu einem signifikanten Unterschied im Vergleich zu den nicht behandelten, transgenen Tieren. Die Hemmung der Gegenregulation durch das NO-System scheint also im Gehirn keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung und Funktion zu haben. Auch im Vergleich zu den L-Name behandelten Kontrolltieren war kein Unterschied festzustellen. Dieses Ergebnis passt zu dem Ergebnis der Studie von van den Buuse et al. Webber, die keinen Einfluss eines NO-Synthase-Inhibitors auf die ET-1-induzierte Dopaminausschüttung im Striatum nachweisen konnten (Van den Buuse et al. Webber 2000). In anderen Studien wurde jedoch ein Einfluss des NO-Systems auf die ET-Expression und -Wirkung nachgewiesen. Eine Hemmung des NO-Systems führte zu einer vermehrten ET-1-Expression im Bereich des Hippocampus und Kortex nach einem Neurotrauma (Steiner et al. 2004) und zu einer verstärkten Verhaltensänderung nach ET-Injektion (D'Amico et al. 1995). In einer Studie von di Nunzio et al. konnte allerdings auch eine Verminderung der ET-Wirkung auf die Hemmung der Norepinephrin-Sekretion durch NO-Synthase-Inhibitoren gezeigt werden (di Nunzio et al. 2002). NO wirkt also offenbar nicht in allen Gehirnregionen gleich auf das ET-System. Die meisten Studien zur Interaktion von ET und NO im Gehirn wurden nur in kleinen Gebieten und bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen gemacht. Der Einfluss des NO-Systems auf die Endothelinexpression unter physiologischen Bedingungen wurde noch nicht untersucht.

Beim relativen Gehirngewicht zeigt sich nur vor der Bonferroni-Korrektur ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten, transgenen Tieren und den L-Name behandelten, transgenen Tieren. Das liegt vor allem daran, dass sich, bei etwa gleich bleibendem absoluten Gehirngewicht, die Körpergewichte signifikant von einander unterscheiden. Außerdem ist das relative Gehirngewicht der L-Name behandelten Tiere schwerer und nicht leichter, die Hemmung der Gegenregulation führt also nicht zu einer verstärkten Entwicklungs- oder Funktionsstörung. Nach der Bonferroni-Korrektur ist der Unterschied im relativen Gehirngewicht nicht mehr als signifikant zu bezeichnen.

Bei der zusätzlichen Gabe vom LU224 zeigt sich im Gehirn bei keiner der verglichenen Gruppen ein signifikanter Unterschied, so dass eine zusätzliche Blockade des Endothelinsystems offenbar keine größeren Auswirkungen auf das Gehirngewicht hat.

### **3.2 Endothelinexpression im Gehirn**

Um die Orte der Transgenexpression nachzuweisen, wurden die LacZ-Tiere untersucht. Durch das LacZ-Gen hinter der Promotorregion des ET-1-Transgens lässt sich nachweisen, in welchen Zellen das Transgen exprimiert wird, ohne zu einer tatsächlichen Erhöhung des ET-Spiegels zu führen (Slowinski et al. 2002). Die auf diese Weise gefundene ET-1-Expression im Hirnstamm, im piriformen Kortex, in den Kerngebieten des Hypothalamus und Thalamus, im frontalen Kortex, in den Kerngebieten des Kleinhirns, sowie in geringerem Ausmaß auch im parietalen Kortex, in den Basalganglien, im Bereich der Commissura anterior und im Corpus amygdaloideum liegt im Einklang mit Ergebnissen anderer Studien, die in diesen Bereichen ebenfalls eine ET-1-Expression nachweisen konnten (Giaid et al. 1991, Naidoo et al. 2001, Naidoo et al. 2004). Naidoo et al. fanden mittels in situ RT-PCR noch weitere

Gehirnareale, welche ET-1 mRNA exprimieren, wie Neurone des primären Motorkortex, des frontalen, temporalen und occipitalen Kortex, des Thalamus, der Insel, in allen Bereichen des Hirnstamms und Cerebellums, im Rückenmark, sowie in Zellen des Hypophysenvorderlappens und epithelialen Zellen des Plexus choroideus. Insgesamt ließ sich in 22 der 24 untersuchten Regionen ET-1 mRNA nachweisen. Im Gyrus postcentralis und in der Epiphyse zeigte sich keine ET-1 Expression (Naidoo et al. 2001). Aufgrund der sehr sensiblen Methode der *in situ* RT-PCR könnte allerdings ein Teil der nachgewiesenen ET-1 mRNA ohne konsekutive Proteinbildung existieren, was den geringeren ET-Nachweis mit immunhistochemischen Methoden erklären könnte. In einer nachfolgenden Studie gelang es Naidoo et al. (2004) jedoch mit einem spezifischen, polyklonalen Anti-ET-1-Antiserum sogar, in allen 24 untersuchten Gehirnregionen ET-1 nachzuweisen; also auch im primärsensorischen Kortex und in der Epiphyse.

In einigen Gehirnbereichen, die bei den meisten Studien auch ET-1 positiv waren, wie z.B. das Striatum oder die Purkinjezellen des Kleinhirns (Takahashi et al. 1991, Webber et al. 1998a), zeigten die LacZ-Tiere jedoch keine Blaufärbung. Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass in diesen Bereichen keine Expression des Transgens stattfindet, zum anderen könnte es jedoch auch bedeuten, dass die 24 Stunden Einwirkzeit für die Bluo-Gal-Markierung nicht ausreichend waren. Da die Gehirne nur entlang des Hemisphärenspalts in zwei Hälften geschnitten wurden, bevor sie in die Färbelösung gegeben wurden, ist es durchaus möglich, dass die weiter innen gelegenen Hirnareale von dem Farbstoff nicht erreicht wurden. Für diese Möglichkeit spricht auch, dass im Bereich des Hirnstamms peripher gelegene Nervenzellen häufig intensiv blau markiert waren, während in den zentralen Anteilen keine Blaufärbung nachzuweisen war.

Bei der gleichzeitigen Markierung der LacZ-Präparate mit GFAP oder Tomato Lektin konnte nachgewiesen werden, dass das ET-1-Transgen nicht in Gliazellen, sondern in Neuronen exprimiert wurde. Dies wurde auch in anderen Studien festgestellt, wo unter physiologischen Bedingungen die Endothelinexpression an Neurone gebunden ist (Giaid et al. 1991, Schmitt-Ott et al. 1998, Nakagomi et al. 2000). Eine Expression in Astrozyten findet sich erst bei pathologischen ZNS-Veränderungen wie cerebraler Ischämie oder Verletzungen (Gajkowska 1997, Hama et al. 1997). Das bedeutet, dass bei den LacZ-Tieren keine größere pathologische ZNS-Veränderung vorgelegen haben kann.

Vergleicht man die unbehandelten LacZ-Tiere mit den mit L-Name behandelten, so lässt sich kein deutlicher Unterschied sehen. Die L-Name-Behandlung scheint also keinen stärkeren Einfluss auf die Endothelinexpression im Gehirn der LacZ-Tiere zu haben, wobei anzumerken ist, dass die LacZ-Tiere keine ET-1-Überexpression haben. Andere Studien zeigen jedoch, wie oben schon erwähnt, einen Einfluss des NO-Systems auf die ET-1-Expression im Gehirn (D'Amico et al. 1995, di Nunzio et al. 2002, Steiner et al. 2004), jedoch sind die Ergebnisse der Studien nicht alle einheitlich. Bei D'Amico et al. und Steiner et al. wird die ET-1-Wirkung verstärkt, bei di Nunzio et al. vermindert. Unter physiologischen Bedingungen wurde der Einfluss des NO-Systems auf die ET-Expression im Gehirn nicht untersucht. Die fehlenden Auswirkungen der Behandlung mit L-Name auf das Gehirngewicht legen ebenfalls die Vermutung nahe, dass auch bei einer ET-1-Überexpression die Gegenregulation durch das NO-System im Gehirn keine ausreichend große Rolle spielt, um zu einer signifikanten Gewichtsveränderung zu führen. Kleinere Veränderungen, die sich nicht auf das Gehirngewicht auswirken, sind aber dadurch natürlich nicht ausgeschlossen. Die Untersuchungen von Hoher et al. an den Nieren, Lungen und dem Herzkreislaufsystem der

ET-1 transgenen Mäuse zeigten eine Aktivierung des NO-Systems (Hochoer et al. 2004). Die Folgen einer Dauertherapie mit L-Name wurden noch nicht publiziert.

Überraschenderweise waren die angeschnittenen Gefäße in den Präparaten nicht blau markiert. Dies könnte bedeuten, dass in den Endothelzellen das Transgen nicht in ausreichenden Mengen exprimiert wurde.

### **3.3 Folgen der Endothelin-1-Überexpression**

Die in dieser Studie verwendeten ET-1-transgenen Mäuse waren ursprünglich zur Untersuchung der Auswirkungen einer dauerhaft erhöhten ET-1-Expression auf den Blutdruck gedacht. Dabei stellte sich jedoch heraus, dass die Tiere nicht wie erwartet hyperten waren, sondern normotone Blutdruckwerte hatten. Bei der Organentnahme fand man bei ihnen aber deutliche Nierenveränderungen, die sich bei der näheren Untersuchung als Glomerulosklerose mit interstitieller Fibrose und einer Vermehrung von Nierenzysten herausstellten (Hochoer et al. 1997b). In der Lunge wurde ebenfalls eine Fibrose und eine chronisch-inflammatorische Reaktion gefunden (Hochoer et al. 2000a). Beim Wiegen der entnommenen Organe fand man den oben beschriebenen signifikanten Unterschied im relativen Gehirngewicht. Ziel dieser Studie war die genauere Untersuchung der Auslöser dieses Gewichtsunterschieds.

Die in Paraffin eingebetteten Mäusegehirne, die wir von der Arbeitsgruppe AG PD Dr. Berthold Hochoer/ Klinik für Nephrologie/ Medizinische Klinik V/ Universitätsklinikum Charite erhalten hatten, wurden dazu zunächst mit einem Mikrotom geschnitten und mit verschiedenen Methoden gefärbt bzw. markiert. Im einzelnen wurde eine HE-Färbung zur Beurteilung der Neurone, eine Luxol-Färbung zur Beurteilung der Myelinscheiden, die GFAP-Immunhistochemie zur Beurteilung der Astrozyten und die Tomato Lektin-Histochemie zur Beurteilung der Mikroglia gemacht. Beim Untersuchen der ersten Schnitte ließen sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Kontrollen feststellen. Vor allem bei den Neuronen und Myelinscheiden fielen keine Unterschiede auf, so dass wir uns entschlossen, die Messungen mit dem Quantimet auf die GFAP- und Tomato Lektin-markierten Schnitte zu konzentrieren. Ein weiterer Grund für diesen Entschluss lag darin, dass Astrozyten sehr sensibel auf schädigende Einflüsse reagieren und ZNS-Veränderungen häufig zuerst an der reaktiven Gliose der Astrozyten zu sehen sind (O'Callaghan 1988 und 1991). Die in den Nieren und Lungen beobachtete Fibrose würde im Gehirn auch am ehesten einer Astroglieose entsprechen. Außerdem wurde eine Aktivierung von Astrozyten durch Endothelin über den ET<sub>B</sub>R nachgewiesen (Ishikawa et al. 1997, Baba 1998, Rogers et al. 2003). Da bei der Untersuchung der Nieren und Lungen vermehrt Entzündungszellen gefunden wurden (Hochoer et al. 2000a, Hochoer et al. 2004), beschlossen wir, auch die Mikroglia näher zu untersuchen, da diese, entsprechend ihrer Abstammung von Blutmonozyten (Ling 1979), die Vertreter des Immunsystems im ZNS darstellen (Rezaie et Male 2001).

Da in der Literatur ET-1-Expression vor allem im Hypothalamus gefunden wurde (Webber et al. 1998a, Naidoo et al. 2001 und 2004) und bei den LacZ-Tieren ebenfalls der Hypothalamus häufig markiert war, wurde dieses Gebiet als neuron-reiches Gebiet für die genauere Untersuchung ausgewählt. Ein weiterer Grund ist das Vorkommen von ET<sub>B</sub>Rezeptoren im Hypothalamus (Yamamoto et al. 1997), da sich die Auswirkungen der ET-1-Überexpression am ehesten in Bereichen zeigen müssten, in denen es auch ausreichend ET-Rezeptoren gibt.

Deshalb wählten wir als neuronen-ärmeres, faserreiches Gebiet das Striatum, da sich auch hier eine hohe Anzahl von ET-Rezeptoren findet (Tayag et al. 1996, Webber et al. 1998b). Allerdings ist bei den ET-1-transgenen Mäusen die ET<sub>B</sub>R-Dichte im Vergleich zu den Kontrolltieren erniedrigt (Hochoer et al. 2004). In anderen Studien wurde ebenfalls eine ET-Expression im Striatum nachgewiesen (Webber et al. 1998a, Naidoo et al. 2001 und 2004). Bei den LacZ-Tieren fand sich allerdings keine Blaufärbung in diesem Bereich, was jedoch (wie oben erwähnt) wahrscheinlich auf die nicht ausreichende Einwirkzeit zurückzuführen ist.

### 3.3.1 Diskussion der Ergebnisse der GFAP-Immunhistochemie

Bei den GFAP-Markierungen zeigt sich weder im Hypothalamus noch im Striatum ein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Tieren (Gruppe 3) und den Kontrolltieren (Gruppe 6). Vergleicht man diese Gruppen jedoch mit den LacZ-Tieren, so haben sie im Bereich des Striatums einen signifikant höheren GFAP-Gehalt. Im Bereich des Hypothalamus ist der GFAP-Gehalt ebenfalls bei den transgenen Tieren signifikant höher, bei den Kontrolltieren zeigt sich diese Tendenz auch, eine Signifikanz wird jedoch nicht erreicht ( $p=0,154$ ). Das könnte auf einen schädigenden Einfluss während der Aufzucht der Mäuse aus den Gruppen 1 bis 6 hindeuten. Das wird vor allem deutlich, wenn man berücksichtigt, dass die LacZ-Tiere älter waren als die anderen Versuchstiere (10 Monate im Vergleich zu 3 Monaten), da die GFAP-Expression mit dem Alter zunimmt (Nichols et al. 1993). Die Schnitte der LacZ-Tiere hätten also eher einen höheren GFAP-Gehalt haben müssen, zumindest im Vergleich zu den Kontrolltieren. Für diese Theorie spricht auch die im Vergleich zu anderen gesunden Mäusen relativ ausgeprägte GFAP-Reaktion bei den Tieren. Es liegt also tatsächlich eine Astroglieose vor, allerdings auch bei den Kontrolltieren. Die verstärkte GFAP-Markierung lässt sich somit nicht auf die Überexpression des ET-1-Gens zurückführen, sondern muss an einem Faktor liegen, der sowohl die transgenen, als auch die Kontrolltiere beeinflusst hat. Ein solcher Faktor könnte beispielsweise eine Infektion, eine kurzzeitige Hypoxie (welche noch nicht zu einem neuronalen Zelluntergang geführt hat), vermehrter Stress im Vergleich zu den LacZ-Tieren durch häufiges Wiegen, Stoffwechselbestimmung oder ähnliches sein. Der Auslöser der Astroglieose ist im Nachhinein leider nicht mehr ermittelbar. Die zur Zeit der Tieraufzucht gewonnenen Daten geben keinen Hinweis auf eine genaue Ursache.

Im Bereich des Striatums wurde ein signifikant niedrigerer GFAP-Gehalt bei den unbehandelten, transgenen Tieren im Vergleich zu den L-Name behandelten, transgenen Tieren nachgewiesen. Das könnte ein Hinweis auf das Zutreffen der Annahmen bezüglich der Gegenregulation durch das NO-System sein. Wie bereits bei der Beschreibung der Tieraufzucht erwähnt, lässt sich diese Gegenregulation auch in Bezug auf den Blutdruck bei den transgenen Tieren nachweisen. Auch die Ausscheidung von NO-Metaboliten im Urin ist bei den transgenen Tieren erhöht im Vergleich zu den Kontrolltieren (Hochoer et al. 2004), was für eine erhöhte NO-Synthese spricht. Wird die NO-Synthese mit L-Name gehemmt, so müssten die Auswirkungen der ET-Überexpression deutlicher werden. Die Hemmung der Gegenregulation durch L-Name scheint zumindest im Bereich des Striatums tatsächlich zu einer stärkeren Astroglieose zu führen. Allerdings zeigt sich dieser Unterschied beim Vergleich mit den jeweils gleich behandelten Kontrolltieren nicht. Das könnte daraufhin deuten, dass eine Hemmung des NO-Systems auch bei normalem ET-System die Bildung einer Astroglieose begünstigt. Dagegen spricht wiederum, dass sich kein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrolltieren und den L-Name behandelten Kontrolltieren findet. Außerdem ist der gefundene Unterschied nach Änderung des Signifikanzniveaus auf

$p < 0,007$  entsprechend der Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant. Dieses Ergebnis lässt sich im Bereich des Hypothalamus auch nicht reproduzieren, obwohl der GFAP-Gehalt in diesem Bereich eher höher war als im Striatum.

### 3.3.2 Diskussion der Ergebnisse der Mikroglialektin histochemie

Bei den Tomato Lektin markierten Präparaten konnten beim Vergleich der Quantimetergebnisse der transgenen Tiere mit den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Entweder war bei den transgenen Tieren also die vermehrte Entzündungsreaktion im Gehirn nicht so stark, dass sie zu einer mit dem Quantimeter messbaren, stärkeren Markierung der Mikrogliazellen geführt hat oder die Kontrolltiere hatten ebenfalls inflammatorisch-bedingte Gehirnveränderungen. Ein Vergleich mit den LacZ-Tieren zeigte wieder signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Kontrolltieren und zu den unbehandelten, transgenen Tieren. Erstaunlicherweise wiesen die LacZ-Tiere dabei die höheren Werte auf.

Das könnte allerdings aufgrund der zusätzlichen Markierung von Blutgefäßen zustande kommen. Tomato Lektin bindet nämlich nicht nur an Mikrogliazellen, sondern auch an Endothelzellen (Acarin et al. 1994) und an granuläre Strukturen im Zytoplasma einiger Neurone. Bei den LacZ-Tieren waren deutlich mehr Gefäße angeschnitten als bei den transgenen Tieren und den Kontrolltieren. Diese erhöhte Gefäßdichte könnte aufgrund des höheren Alters der LacZ-Tiere entstanden sein. Sollte der erhöhte Tomato Lektin-Gehalt nicht an den Gefäßanschnitten, sondern an einer vermehrten Markierung der Mikrogliazellen liegen, dann würde das auf stärkere Aktivierung der Mikroglia bei den LacZ-Tieren hindeuten, da amoeboiden Mikrogliazellen Tomato Lektin stärker binden (Acarin et al. 1994).

Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, verglichen wir die Mikrogliamorphologie in verschiedenen Bereichen des Gehirns bei stärkeren Vergrößerungen. Diese Vergleiche erfolgten allerdings ohne Ausmessung mit dem Quantimeter, da sich Unterschiede in der Morphologie damit nicht gut erfassen lassen. Entsprechend der Ergebnisse anderer Studien wurden Mikrogliazellen mit feinen, verzweigten Fortsätzen als ramifizierte, ruhende Mikroglia gewertet, während Zellen mit kurzen, dicken Fortsätzen und eher rundem Zellkern und plumpen Erscheinungsbild als aktivierte Mikroglia gewertet wurden (Rezaie et Male 2001, Banati 2003).

Bei den Kontrolltieren hatten die Mikrogliazellen in allen Bereichen des Gehirns feine, verzweigte Fortsätze, sie waren also im ramifizierten Zustand. Nur ganz vereinzelt fanden sich bei einigen Tieren auch etwas plumpere Mikrogliazellen. Die Behandlung mit L-Name führte bei den Kontrolltieren zu einer leichten Zunahme der Zellen mit kürzeren, dickeren Fortsätzen, vor allem im Bereich des Hirnstamms. Allerdings waren auch hier die Mehrheit der Mikrogliazellen im ramifizierten Zustand. Die leichte Zunahme vereinzelter aktivierter Zellen könnte an einem relativen ET-Überschuss bei Hemmung des NO-Systems liegen. Bei der zusätzlichen Behandlung mit LU224 waren ausschließlich ramifizierte Mikrogliazellen zu sehen. Eine Hemmung des ET-Systems in Kombination mit einer Hemmung des NO-Systems scheint also keine Veränderungen im Gehirn zu bewirken, welche sich in einer Aktivierung der Mikroglia zeigen müssten.

Die transgenen Tiere zeigten zu einem geringeren Teil fast ausschließlich ramifizierte Mikroglia, bei einer höheren Anzahl an Tieren konnten jedoch auch aktivierte Mikrogliazellen mit kurzen, dicken Fortsätzen nachgewiesen werden. Die aktivierte Mikroglia war nicht gleichmäßig über das Gehirn verteilt, sondern kam vor allem im Bereich des Hirnstamms und des Kleinhirnmarklagers, weniger häufig im Hypothalamus und

Thalamus, selten auch im Striatum und Kortex vor. Diese Verteilung der aktivierten Zellen entspricht in etwa auch der Verteilung der Bluo-Gal-markierten Neuronen bei den LacZ-Tieren. Das spricht für eine Mikroglia-Aktivierung aufgrund der ET-1-Überexpression. Eine kleine Ausnahme bildet das Striatum, das keine Bluo-Gal-Markierung zeigte, was aber, wie oben beschrieben, an der zentralen Lage des Striatums und der kurzen Einwirkzeit liegen kann. Allerdings waren im Striatum auch nur wenige Mikrogliazellen aktiviert, so dass die ET-1-Überexpression in diesem Bereich evtl. tatsächlich nicht so ausgeprägt war. Die Behandlung mit L-Name führte auch bei den transgenen Tieren zu einer Zunahme der aktivierten Mikrogliazellen. Zum einen wurden die Fortsätze noch kürzer und dicker, zum anderen nahm auch die Anzahl der aktivierten Zellen zu. Gelegentlich fanden sich auch Mikroglia-Knötchen aus zusammengelagerten Mikrogliazellen, die ein deutliches Zeichen für eine Aktivierung darstellen. Die Häufigkeitsverteilung entsprach der der unbehandelten, transgenen Tiere, also auch hier in etwa der Verteilung der Bluo-Gal-Markierung der LacZ-Tiere. Die Zunahme der Mikroglia-Aktivierung durch die Hemmung der Gegenregulation mittels L-Name ist ein weiteres Anzeichen für eine durch die ET-1-Überexpression hervorgerufenen Aktivierung der Mikrogliazellen. Bei einem deutlicheren Überwiegen des ET-Systems wird auch die Reaktion der Mikroglia stärker. Es gab allerdings auch Gehirnbereiche wie den Hippocampus, in denen fast nie aktivierte Zellen zu finden waren. In diesen Bereichen scheint also die ET-1-Expression sehr gering zu sein. Da der Hippocampus als wichtige Struktur für Lernvorgänge (Wu et al. 2002) zumindest in diesem Versuch nicht stärker von der ET-1-Überexpression betroffen ist, dürften die kognitiven Leistungen der Tiere auch nicht wesentlich beeinträchtigt sein. Leider wurden bei der Aufzucht der Tiere keine Untersuchungen zur Erfassung der kognitiven Leistungen durchgeführt. Die transgenen Tiere, die mit der Kombination aus L-Name und LU224 behandelt wurden, zeigten eine eher geringe Gesamtzahl an Mikrogliazellen, welche sich alle in ramifiziertem Zustand mit feinen, verzweigten Fortsätzen befanden. Auch bei den transgenen Tiere verhindert also die kombinierte Hemmung des ET- und NO-Systems eine Aktivierung. Dies deutet auch darauf hin, dass die Aktivierung der Mikroglia tatsächlich durch die ET-1-Überexpression verursacht wird, da die bei den L-Name behandelten Tiere beobachteten Veränderungen durch die zusätzliche Gabe von LU224 verhindert werden konnten.

Bei den LacZ-Tieren war die Beurteilung der Mikroglia durch die hohe Anzahl an Gefäßanschnitten und die ausgeprägte Hintergrundfärbung erschwert. Die identifizierbaren Mikrogliazellen hatten allerdings alle feine Fortsätze und waren im ramifizierten Zustand. Das passt zu der Tatsache, dass bei den LacZ-Tieren das eigentliche ET-1-Transgen aufgrund des hinter der Promotorregion eingefügten LacZ-Gens nicht exprimiert wird und daher auch kein erhöhter ET-1-Spiegel vorliegt.

### 3.3.3 Kritik der Methode

Zu den Ergebnissen dieser Studie muss bemerkt werden, dass es keine objektive Erfassung quantitativer Unterschiede in der Immunhistochemie gibt und dass die Messungen mit dem Quantimet nur semiquantitativ sind. Zunächst fallen die unterschiedlichen Färbungen nicht alle gleich aus, was zum einen an leichten Unterschieden bei der Einwirkzeit der Entwicklerlösung liegen kann (da immer mehrere Schnitte gleichzeitig gefärbt werden, aber nicht alle gleichzeitig bearbeitet werden können), zum anderen ist das Blockieren der endogenen Peroxidase und der unspezifischen Bindungsstellen nicht immer gleich effektiv. Daher wurde vor jeder Messung der zu messende Farbton neu eingestellt, damit möglichst alle positiv markierten Zellen gemessen wurden und gleichzeitig möglichst wenig falsch

positive Strukturen in die Messung mit einbezogen wurden. Das hat allerdings den Nachteil, dass die Ergebnisse zwar genauer, aber dafür subjektiver und nicht so gut reproduzierbar sind. Ein weiteres Problem sind die unterschiedlichen Schnittebenen. Nicht von jedem Tier sind die Schnitte in der gleichen Ebene, so dass es nicht möglich ist, bei allen Tieren genau die gleiche Struktur zu messen. Die für die durchgeführten Messungen ausgesuchten Hirnbereiche (das Striatum und der Hypothalamus) haben neben den oben beschriebenen Gründen den Vorteil, dass sie auf mehreren unterschiedlichen Schnittebenen vorhanden sind. Dadurch konnten fast alle Tiere vermessen werden. Natürlich konnte im Striatum und im Hypothalamus nicht immer genau der gleiche Bereich gemessen werden, also beispielsweise nicht immer das gleiche hypothalamische Kerngebiet. Zu einer so genauen Unterscheidung hätte auch eine stärkere Vergrößerung als 1:200 verwendet werden müssen. Da also wie gesagt nicht immer exakt das gleiche Gebiet gemessen werden konnte, ist es möglich, dass die gefundenen Unterschiede zumindest zum Teil dadurch begründet sind. Ebenso ist es möglich, dass im gleichen Kerngebiet vorhandene Unterschiede deshalb nicht entdeckt wurden. Bei der Ausmessung der mit Tomato Lektin markierten Präparate ergab sich eine weitere Schwierigkeit. Da Tomato Lektin nicht ausschließlich Mikrogliazellen, sondern auch Endothelzellen und granuläre Lektine in bestimmten Neuronen markiert, sind Unterschiede in den Ergebnissen der Quantimetausmessung nicht ohne weiteres auf eine vermehrte Markierung und damit wahrscheinliche Aktivierung von Mikroglia zurückzuführen. Dies zeigte sich zum Beispiel in den signifikant höheren Werten der LacZ-Tiere, die nicht durch vermehrte Mikroglia-markierung, sondern durch eine erhöhte Anzahl an Gefäßanschnitten zustande kam. Auch reicht eine leichte Aktivierung offensichtlich nicht aus, um einen statistisch messbaren Unterschied hervorzurufen. Die morphologischen Veränderungen sprechen für eine Aktivierung bei den unbehandelten, transgenen Tieren und vor allem bei den L-Name behandelten, transgenen Tieren, aber die Ergebnisse der Quantimetmessung zeigen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anderen Gruppen. Das Quantimet ist also für den Nachweis einer Mikroglia-Aktivierung bei Tomato Lektin-Markierung nicht geeignet.

Trotz dieser Nachteile ist die Ausmessung mit dem Quantimet eine Methode, um histologische Präparate möglichst objektiv und reproduzierbar zu bewerten. Sie erlaubt, die gewonnenen Messergebnisse zu vergleichen und statistisch auszuwerten, auch wenn bei der Interpretation der Ergebnisse die beschriebenen Mängel der Methode berücksichtigt werden müssen. Alternative Wege zur Beurteilung der Folgen der ET-1-Überexpression wären mit molekulargenetischen Methoden möglich. Man könnte z.B. mittels Western Blots den Gehalt an GFAP oder mit Northern Blots den Gehalt an GFAP-mRNA messen und damit auf das Ausmaß der reaktiven Astrogliose Rückschlüsse ziehen. Diese Methoden haben wiederum den Nachteil, dass man keine Zuordnung zu bestimmten Gehirnarealen treffen kann. Man hätte auch die Menge bestimmter Zytokine und Chemokine messen können, um eine Aktivierung der Mikroglia nachzuweisen. Diese Methoden wäre objektiver und besser zur statistischen Auswertung geeignet, waren aber bei unserer Studie nicht möglich, da wir die Gehirne bereits fixiert und in Paraffin eingebettet bekommen haben.

Ein weiterer Kritikpunkt liegt in der Verwendung des humanen ET-1-Gens zur Herstellung der transgenen Tiere. Zwar sind sich die Endotheline in verschiedenen Spezies, unter anderem auch zwischen Menschen und Mäusen, sehr ähnlich (Itoh et al 1988), aber man kann nicht uneingeschränkt davon ausgehen, dass das humane ET-1-Gen genau die gleiche Affinität zu den Mäuse Enzymen und Rezeptoren hat. Insofern wäre ein transgenes Tiermodell mit



Verwendung des Mäuse-ET-1-Gens evtl. aussagekräftiger um die Auswirkungen einer ET-1-Überexpression zu untersuchen. Auch lässt sich nicht ausschließen, dass das humane ET-1 in den transgenen Mäusen nicht noch andere, zusätzliche Wirkungen hat, die nicht direkt mit der physiologischen Wirkung des Mäuse-ET-1 korrelieren. Dennoch ist die Untersuchung von fremd-transgenen Tieren eine anerkannte Methode, um die Auswirkungen einer Überexpression bestimmter Gene zu erforschen (Theuring et al. 1998, Racay 2002). Der Vorteil der Verwendung von humanen Genen liegt in der besseren Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf Erkrankungen des Menschen, sowie der Entwicklung neuer Medikamente und Therapien gegen diese Krankheiten.

#### 3.3.4 Beurteilung

Eine Astrogliareaktion auf die Überexpression des ET-1-Gens kann man aufgrund dieser Studie nicht nachweisen. Es ließ sich, insbesondere wenn man die Anzahl der durchgeführten Berechnungen mit der Durchführung der Bonferroni-Korrektur berücksichtigt, kein signifikanter Unterschied zwischen den transgenen Tieren und den Kontrolltieren feststellen. Auch die Behandlung mit L-Name und der Kombination aus L-Name und LU224 änderte an dieser Tatsache nichts. Ein Einfluss der ET-1-Überexpression auf die Astrozyten lässt sich aber aufgrund der bei den Kontrolltieren ebenfalls vorhandenen Astroglieose dennoch nicht ausschließen. Eine, wie bereits in den Nieren und Lungen der ET-1 transgenen Mäuse nachgewiesene, Fibrose ist im Gehirn wegen der sehr geringen Dichte an bindegewebsbildenden Zellen nicht möglich.

Bei der Beurteilung der Mikroglia war die Auswertung der Quantimetergebnisse aufgrund der oben beschriebenen Einschränkungen wenig aussagekräftig. Die deskriptive morphologische Beurteilung zeigt eine vermehrte Aktivierung der Mikrogliazellen bei den transgenen Tieren und eine noch ausgeprägtere Aktivierung bei den mit L-Name behandelten, transgenen Tieren. Der Faktor, der die Astroglieose verursacht hat, hatte also offensichtlich keinen Einfluss auf die Mikrogliareaktion. Da die Mikroglia-Aktivierung bei der zusätzlichen Gabe von LU224 nicht mehr nachzuweisen ist, muss die ET-1-Überexpression die Ursache sein. Ein deutlicherer Nachweis der Aktivierung der Mikrogliazellen wäre durch spezielle Marker, die nur aktivierte Mikrogliazellen markieren, möglich.

### **3.4 Aussichten für die Zukunft der Endothelforschung im Gehirn**

Über die Bedeutung und Funktion des Endothelinsystems im zentralen Nervensystem ist noch vieles unbekannt. Es wirkt nicht nur auf Gefäße und spielt dadurch eine Rolle bei Ischämien und Blutungen (Gajkowska 1997, Wang et al. 1995), sondern es lassen sich auch alle Komponenten des ET-Systems in unterschiedlichen Bereichen des Hirngewebes nachweisen (van den Buuse et Webber 2000). Endothelin hat Einfluss auf die Hormonausschüttung der Hypophyse (Samson et al. 1991, Webber et al. 1998a), erhöht die Dopamin-Freisetzung im Striatum (van den Buuse et Webber 2000) und hemmt die Norepinephrin-Sekretion im anterioren Hypothalamus und führt dadurch zu einem Blutdruckanstieg (di Nunzio et al. 2002). Höhere ET-Konzentrationen führen zu Verhaltensänderungen (D'Amico et al. 1995) und reversiblen Hypermetabolismus (Gross et al. 1992a), sehr hohe Konzentrationen haben einen permanenten neuronalen Schaden zur Folge (Hughes et al. 2003). Endothelin hat also offensichtlich einen Einfluss auf viele Gehirnfunktionen sowohl unter physiologischen, als

auch unter pathologischen Bedingungen. Da es unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von Neuronen exprimiert wird und ET-Rezeptoren auch auf bzw. in Neuronen zu finden sind, übernimmt es im Gehirn die Funktion eines Neurotransmitters.

Die meisten Studien zur ET-Verteilung und -Wirkung im Gehirn wurden *in vitro* durchgeführt. Die intrazelluläre Signalverarbeitung ist dadurch relativ gut bekannt, und entspricht weitgehend der ET-Wirkung in nicht neuronalem Gewebe. ET führt auch im Gehirn zu einem Anstieg des intrazellulären Calcium-Spiegels und zu einer Aktivierung des Inositol-Phosphat-Stoffwechsels, wobei allerdings die Angaben über den Typ des aktivierten ET-Rezeptors unterschiedlich sind (van den Buuse et Webber 2000).

Bei der Mehrzahl der Studien im Gehirn wurde der Einfluss von unterschiedlichen Dosen Endothelins auf die Sekretion von Hormonen, Transmittern, den Metabolismus und die Neurotoxizität untersucht. Dazu wurde Endothelin meist injiziert oder infundiert. Die gezielte Injektion ist eine gute Möglichkeit, um lokale Wirkungen von ET zu untersuchen. Ein Problem ist allerdings die richtige Dosierung, um Rückschlüsse auf die physiologische ET-Wirkung ziehen zu können.

Transgene Tiermodelle haben den Vorteil, dass man die Funktionen von Endothelin nicht nur lokal, sondern im gesamten Gehirn untersuchen kann. So zeigen ET-1 ebenso wie ET<sub>A</sub>R *knockout* Mäuse kraniofaziale Missbildungen, was darauf hindeutet, dass ET-1 eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Kopfes und damit auch des Gehirns spielt (Kurihara et al. 1994, Clouthier et al. 1998). In anderen *knockout* Tieren wurde gezeigt, dass die Interaktion von ET-3 und dem ET<sub>B</sub>R für die Entwicklung des enterischen Nervensystems von großer Bedeutung ist (Kruger et al. 2003). Eine Defizienz des ET<sub>B</sub>R führt außerdem zu einer erhöhten Apoptoserate im Gyrus dentatus während der postnatalen Entwicklung bei Ratten (Ehrenreich et al. 2000). Das Endothelinsystem scheint also nicht nur für die Entwicklung des Nervensystems, sondern auch als Überlebensfaktor für Neurone von Bedeutung zu sein. Die meisten transgenen Tiermodelle des ET-Systems haben sich bisher jedoch auf die Untersuchung anderer Organe wie die Nieren, Lungen, das Herz-Kreislauf-System oder den Darm konzentriert. Die Auswirkungen im ZNS wurden in der Regel (noch) nicht genauer untersucht, da die Veränderungen an anderen Organen deutlicher waren. Die Untersuchung dieser transgenen *knockout* und *knockin* Tiere könnte in Zukunft zu weiteren wichtigen Erkenntnissen über die Funktion und Bedeutung des Endothelinsystems im Gehirn führen. Die Untersuchung der Astroglia der ET-1 transgenen Mäuse in dieser Studie hat leider bei der Auswertung ergeben, dass sich die Daten aufgrund eines vorher nicht bemerkten Störfaktors nicht eindeutig auswerten lassen. Es wäre daher sinnvoll, den Versuch zum Nachweis einer Astroglieose zu wiederholen. Dabei sollten zusätzlich Untersuchungen erfolgen, die Verhaltensunterschiede und Unterschiede in den kognitiven Leistungen der Tiere erfassen. Neben den lichtmikroskopischen Untersuchungen könnte eine elektronenmikroskopische Auswertung erfolgen. Die Ergebnisse der morphologischen Mikroglia-Beurteilung zeigten eine Aktivierung der Mikrogliazellen aufgrund der ET-1-Überexpression. Diese Ergebnisse sollten durch die Verwendung spezieller Marker, die besonders aktivierte Mikrogliazellen markieren, noch bestätigt werden. Als Marker kämen z.B. CR3/43, ED1 monoklonale Antikörper, OX-6 Antikörper oder Antikörper gegen MHC Klasse I und Klasse II-Moleküle in Frage (Graeber et al. 1994, Egensperger et al. 1998, Graeber et al. 1998). Nach neueren Methoden wäre sogar ein *in vivo* Nachweis von aktivierter Mikroglia mittels PK11195 oder dem noch spezifischeren R-Enantiomer von PK11195 als Ligand bei einer Positronen-Emissions-Tomographie möglich (Banati 2003). Dies ist jedoch aus Kostengründen und aufgrund der geringen Auflösung nicht sinnvoll.

Um die Rolle des ET-Systems bei neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen beurteilen zu können, ist die genauere Aufklärung der ET-Wirkungen von großer Bedeutung. Es gibt mehrere Studien, die einen Einfluss des ET-Systems bei solchen Erkrankungen nahe legen. Am häufigsten untersucht wurde der cerebrovaskuläre Einfluss von Endothelin im Gehirn, vor allem bei Ischämien, Subarachnoidalblutungen und Verletzungen des Hirngewebes (van den Buuse et Webber 2000). Eine größere Anzahl an Studien haben sich auch mit der Rolle des ET-Systems bei der Pathogenese des Morbus Alzheimer beschäftigt (Yoshizawa et al. 1992, Jiang et al. 1993, Minami et al. 1995, Kohzuki et al. 1995, Crawford et al. 1998). Der Zusammenhang der einzelnen Ergebnisse und die genaue ET-Funktion dabei sind jedoch noch unklar. Es gibt auch Hinweise, dass ET bei der endogenen Depression (Hoffman et al. 1989) und beim Morbus Parkinson (Webber et al. 1998b, van den Buuse et Webber 2000) von Bedeutung ist. Durch seinen mitogenen Effekt hat Endothelin auch Einfluss auf das Wachstum von Tumoren. So ließ sich in verschiedenen Tumorzelllinien des ZNS die Expression von ET und von ET-Rezeptoren nachweisen (Takahashi et al. 1998, Sone et al. 2000). Die Bedeutung von Endothelin für die zentrale kardiovaskuläre Regulation ist auch noch nicht ausreichend untersucht. In einigen Regionen führt es zu einem Blutdruckanstieg, wie z.B. durch eine Hemmung der Noradrenalinfreisetzung im Bereich des anterioren Hypothalamus (di Nunzio et al. 2002) oder bei intracisternaler ET-1-Injektion (Mosqueda-Garcia et al. 1992), in anderen zu einem Blutdruckabfall, wie z.B. bei Mikroinjektion von ET-1 in die rostrale oder kaudale, ventrolaterale Medulla oblongata (Mosqueda-Garcia et al. 1995).

Das ET-System ist also im ZNS bei physiologischen und pathologischen Vorgängen von großer Bedeutung. Die Erforschung seiner genauen Aufgaben könnte in Zukunft die Diagnose, Therapie und Prognose vieler Erkrankungen entscheidend beeinflussen.