

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wirkungen der Phthalate DEHP [Di-(2-ethylhexyl)-phthalat] und
MEHP [Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat] und des Schwermetalls
Cadmium auf die Zellen der Sertoli-Zelllinie SerW₃**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

Martin Zurek

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann
 2. Prof. Dr. P. Steinberg
 3. Priv- Doz. Dr. rer. Nat. Th. Schulz

Datum der Promotion: 18.11.2011

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Phthalate	1
1.1.1 Di-(2-ethylhexyl)-phthalat	2
1.1.2 Exposition und Toxikokinetik	3
1.1.3 Toxizität	5
1.2 Cadmium	7
1.2.1 Exposition und Toxikokinetik	7
1.2.2 Toxizität	8
1.3 Testes	9
1.3.1 Sertoli-Zellen	10
1.3.2 SerW ₃ - eine Zelllinie aus Sertolizellen der Ratte	11
1.3.3 Zellkontakte	12
1.3.3.1 Tight Junctions	13
1.3.3.1.1 Occludin	13
1.3.3.2 Adhäsionsverbindungen	14
1.3.3.2.1 N-Cadherin	16
1.3.3.2.2 β 1-Integrine	16
1.3.3.3 Gap Junctions	17
1.3.3.3.1 Connexin 43	17
1.3.3.4 Blut-Hoden-Schranke	18
1.3.4 Intermediärfilamente und Vimentin	19
1.4 Fragestellung und Zielsetzung	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Materialien	21
2.1.1 Geräte	21

Inhaltsverzeichnis	IV
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Antikörper für Western Blot und Immunhistologie	23
2.2 Medien	24
2.2.1 Zellkulturmedium	24
2.2.2 Einfriermedium	24
2.2.3 Lösungen und Puffer	24
2.2.3.1 Lösungen und Puffer für die Western Blot-Untersuchungen	24
2.2.3.2 Lösungen und Puffer für die Elektronenmikroskopie	26
2.3 Methoden	27
2.3.1 Zellpassage	27
2.3.2 Einfrieren von SerW ₃ -Zellen	28
2.3.3 Auftauen von SerW ₃ -Zellen	28
2.3.4 Bestimmung der Zellzahl	28
2.3.5 Inkubation mit den Testsubstanzen	29
2.3.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zur Proteindetektion	30
2.3.7 Schritte für Western Blot	31
2.3.7.1 Lysieren	31
2.3.7.2 Gesamtproteinbestimmung	31
2.3.7.3 Reduktion	32
2.3.7.4 SDS-Gelelektrophorese	32
2.3.7.5 Western Blot	32
2.3.7.6 Densitometrische Auswertung	33
2.3.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	33
2.3.9 Immunhistochemische Untersuchungen	33
2.3.9.1 Cytospin	34
2.3.9.2 Immunhistochemie	34
2.3.9.3 Fotografie und semiquantitative Auswertung	35
3 ERGEBNISSE	36
3.1 Lichtmikroskopie	36
3.2 Elektronenmikroskopie	37

3.3 Ergebnisse der Immunhistologie	39
3.3.1 DEHP	40
3.3.2 MEHP	47
3.3.3 CdCl ₂	54
3.4 Auswertung der Western Blot Analyse	61
3.4.1 DEHP	62
3.4.2 MEHP	68
3.4.3 CdCl ₂	74
4 DISKUSSION	80
4.1 Effekte der Phthalate auf die Reproduktionsorgane	80
4.2 Effekte von Cadmiumchlorid auf die Reproduktionsorgane	86
4.3 Schlußfolgerung	90
4.4 Ausblick	92
5 ZUSAMMENFASSUNG	93
6 LITERATURVERZEICHNIS	95
7 DANKSAGUNG	104
8 LEBENSLAUF	105
9 ERKLÄRUNG	106
10 VERÖFFENTLICHUNGEN	107

Abkürzungsverzeichnis

ABP	Androgen-bindendes Protein
AIDA	Advanced Image Data Analyser
AJ	adherens junction
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CAM	cell adhesion molecule
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
d	Tag
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)-phthalat
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DIDP	Diisodecyl-phthalat
DINP	Diisononyl-phthalat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECMO	extrakorporale Membranoxygenation
EM	Transmissionselektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	ectoplasmic specializations
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	fokale Adhäsionskinase
FCS	fetales Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GIJC	gap junction intercellular communication
GJ	gap junctions
h	Stunde
JAM	junctional adhesion molecules
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
l	Liter
LH	luteinisierendes Hormon
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEHP	Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MMP-2	Matrix Metalloproteinase-2
MP	Metalloproteinase
nm	Nanometer
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SCSGF	Sertoli cell secreted growth factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
sTNF-α	lösliche Form des Tumornekrosefaktor-alpha
SV	Simian Virus
TBC	Tubulobulbarer Komplex
TGF-β3	transforming growth faktor-beta3
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
TJ	tight junction
V	Volt
ZO	Zonula occludens

1 Einleitung

Etwa 10 bis 20 % aller Paare im reproduktionsfähigen Alter in den westlichen Industrienationen sind ungewollt kinderlos, die Hälfte aller Embryonen sterben nach der Befruchtung, 15 % aller Schwangerschaften enden mit einem klinisch manifesten Abort und etwa 2-3 % aller Neugeborenen kommen mit grobstrukturellen Anomalien auf die Welt, die in einigen Fällen erst während ihres ersten Lebensjahres erkannt werden (Nieschlag, 2009; Riecke und Stahlmann, 2000). Die Prävalenz der Infertilität des Mannes liegt mit 7 % deutlich über der für Diabetes mellitus Typ I und II (Nieschlag, 2009). Epidemiologische Studien mit regionalen Schwerpunkten in Europa zeigten bei Männern Spermienzahlabnahmen bis zu 50 % in einem Zeitraum von 1940 bis 1990 (Carlsen et al., 1992; Jørgensen et al., 2001; Merzenich et al., 2010).

Viele Institutionen beschäftigen sich mit der Problematik der Reproduktionstoxizität umweltrelevanter Verbindungen. Sie richten ihre Aufmerksamkeit auf Stoffe wie Weichmacher und schätzen sie in Bezug auf ihre Risikogruppen als problematisch ein. Risikogruppen sind männliche, ungeborene Föten und Neugeborene, insbesondere Frühchen und Neugeborene in intensivmedizinischer Behandlung (ATSDR, 2002; CDRH-FDA, 2001; ECB, 2008; Heudorf et al., 2007; Kavlock et al., 2002; NTP-CERHR, 2006).

1.1 Phthalate

Kunststoffprodukte, die flexibel, dehnbar und leichter verarbeitbar sein sollen, werden mit Weichmachern versehen. Heute gehören sie rein synthetischen Stoffgruppen ohne natürliches Vorkommen an. Trotz der Produktion vieler unterschiedlicher Weichmacher werden weniger als 100 kommerziell genutzt. Davon sind Phthalate die häufigsten und seit über 50 Jahren in Gebrauch. Phthalate sind Dialkyl- bzw. Alkylarylester der 1,2-Benzol-di-carbonsäure (Phthalsäure) in ortho-Stellung mit Alkoholrest-Kettenlängen von C1 bis C13. Flüchtigkeit, Wasserlöslichkeit, Wirkungsgrad an Plastifizierung und Einfachheit der Verarbeitung nehmen mit wachsender Kettenlänge ab, die Fettlöslichkeit dagegen zu. Die industriell meist genutzten haben Restlängen von C8 bis C10. Vorteile der Phthalate sind niedrige Herstellungskosten und eine hohe Produktionseffizienz (ECPI, 2010). Eine Marktdatenanalyse der Arbeitsgemeinschaft „PVC und Umwelt“ zeigt, dass in Westeuropa 2004 etwa eine Million Tonnen Weichmacher von 30 Unternehmen produziert wurden, wovon 80 - 90 % zur Herstellung von

Weich-PVC (PVC-Polymere, PVC-P) dienen. Dabei wurden 90 % Phthalate und 10 % andere Weichmacher wie Adipate, Citrate, Sebacate, Phosphate, etc. verwendet (AGPU, 2006). Reines PVC ist hart und spröde. Durch Auflockerung der molekularen Struktur von polymeren Verbindungen vermögen Phthalate bei Zusatz in entsprechenden Konzentrationen PVC weich und elastisch zu machen. Der durchschnittliche Weichmacher-Gehalt beträgt in Weich-PVC 30 - 35 % (AGPU, 2006). Am Beispiel von DEHP kann gezeigt werden, wie omnipräsent Phthalate im Alltag und in der Umwelt sind (ATSDR, 2002; CDRH-FDA, 2001; ECB, 2008; Halden, 2010; Heudorf et al., 2007; NTP-CERHR, 2006).

1.1.1 Di-(2-ethylhexyl)-phthalat

Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (DEHP; $C_{24}H_{38}O_4$; MW 390,6; CAS Nr. 117-81-7) ist ein Diester der Phthalsäure und ist als Reinsubstanz bei Raumtemperatur eine farblose ölige Flüssigkeit mit hohem Siedepunkt (230°C bei 5 mmHg), niedrigem Schmelzpunkt (-55°C), niedrigem Dampfdruck und extrem geringer Wasserlöslichkeit. Durch Veresterung von Phthalsäureanhydrid mit 2-Ethylhexanol wird DEHP gewonnen. Über zwei Reaktionsschritte entsteht zuerst ein Monoester, dann unter Wasserentzug der Diester DEHP (ECB, 2008). Er wird in polymeren (PVC) und in nicht-polymeren Kunststoffen verwendet, wobei 95 % auf die Polymere entfallen. Als klassischer Weichmacher für Weich-PVC und andere Kunststoffe ist DEHP bis zu 40 % in diesen Produkten enthalten (ECB, 2008; DFG, 2002). 2004 wurden weltweit knapp zwei Millionen Tonnen DEHP hergestellt, wobei das Marktvolumen in Europa bei 200000 Tonnen lag. Der Anteil von DEHP an den Weichmachern hat sich allerdings zwischen 1999 und 2004 von 42 % auf 22 % absolut reduziert. Gleichzeitig stieg der Anteil anderer Phthalate wie Diisononyl-phthalat (DINP) und Diisodecyl-phthalat (DIDP) von 35 % auf 58 % (AGPU, 2006). Laut dem Herstellerinteressensverband „European Council for Plasticisers and Intermediates“ produzieren mittlerweile nur noch drei Firmen DEHP bzw. dessen Intermediate (ECPI, 2010). Trotzdem wird DEHP immer noch als Allzweckweichmacher in Baumaterialien wie Kabel und Bodenbelägen sowie in Produkten des täglichen Bedarfs wie Verpackungsmaterial, Behälter, Folien, Einmalhandschuhe und Schuhsohlen eingesetzt. Auch als Formulierungsmittel in Pestizidanwendungen, als industrielles Lösungsmittel, als Schmierstoff und als Additiv in der Textilindustrie wird es verwendet (ECPI, 2010; Heudorf et al., 2007; Koch et al., 2006). Mit 20 bis 40 % Anteil in PVC-haltigen Medizinprodukten ist DEHP nach wie vor noch zulässig und befindet sich in Schlauch-, Katheter- und Aufbewahrungsmaterialien, in Spritzen, in PVC-Handschuhen, in Kontaktlinsen, etc. Da DEHP-haltiges

PVC sehr flexibel und gleichzeitig sehr stabil, extrem temperaturbeständig, biokompatibel und lagerungsfähig ist, erfüllt es die hohen Anforderungen der eingesetzten Materialien bei Sterilisierungen, durch gutes Rückstellungsvermögen und hohe Kälteelastizität bei Blutprodukten (ATSDR, 2002; CDRH-FDA, 2001; ECB, 2008; Halden, 2010; Heudorf et al., 2007; Hildenbrand et al., 2005; Kahl et al., 2003; Kavlock et al., 2002; NTP-CERHR, 2006). Außerdem wird DEHP eine protektive und stabilisierende Wirkung auf Erythrozytenmembranen in Blutkonserven zugeschrieben (Hildenbrand et al., 2005; Labow et al., 1987).

1.1.2 Exposition und Toxikokinetik

DEHP wie auch andere Phthalate sind äußere Weichmacher, d. h. sie sind nicht kovalent, sondern physikalisch gebunden. Sie können aus den Produkten langsam ausdünsten, sich durch Kontakt mit Flüssigkeiten oder Fetten auswaschen oder sich durch Abrieb von Kunststoffpartikeln verteilen und so überall in die Umwelt gelangen (Martino-Andrade und Chahoud, 2010). Unter anaeroben Bedingungen kann der biologische Abbau über Jahre dauern, aerob nur wenige Wochen (ATSDR, 2002; ECB, 2008; Kavlock et al., 2002). Aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und des niedrigen Dampfdruckes treten in Trinkwasser und Atemluft nur geringe Konzentrationen an DEHP auf, allerdings verbindet es sich stark mit Staub- und Sedimentpartikeln und reichert sich in Fisch, Fleisch, Milch, Ölen und Babynahrung an (Kavlock et al., 2002).

Die Phthalat-Exposition erfolgt überwiegend durch Aufnahme der Diester (Boekelheide et al., 2005), die entweder inhalativ, oral, dermal oder intravenös bei medizinischer Versorgung direkt in den systemischen Kreislauf gelangen können, sich schnell im Körper verteilen, verschiedene Organe erreichen und wegen ihrer Lipophilie Zellmembranen leicht passieren. Normalerweise wird DEHP über die Nahrung, das aus dem Verpackungsmaterial ausgewaschen wird, aufgenommen (Schmid und Schlatter, 1985). Es wurden in Lebensmitteln Werte zwischen 0,11 und 0,18 mg DEHP/kg und bei sehr fetthaltigen Produkten Werte zwischen 31 und 150 mg/kg ermittelt (Petersen und Breindahl, 2000; Lyche et al., 2009).

Die Exposition in der Allgemeinbevölkerung liegt schätzungsweise bei 3-30 µg/kg KG/d (NTP-CERHR, 2006). Kinder erfahren eine zusätzliche Belastung durch Kauen und Saugen DEHP-haltiger Produkte (Lyche et al., 2009). Auch bei medizinischen Eingriffen wird DEHP über alle vier Pfade in besonders hohem Umfang aufgenommen. Patienten in langem Kontakt mit medizinischem PVC-Zubehör und Geräten können relativ hohen Phthalat-Konzentrationen ausgesetzt sein. Sie werden abhängig von der mechanischen Inanspruch-

nahme der Materialien, der Kontaktzeit und der Lipophilie der Lösungen und Medikamente (z.B. Ciprofloxacin, Cimetidin, Fentanyl, Metronidazol) aus der Polymermatrix herausgelöst (CDRH-FDA, 2001; Kahl et al., 2003). Schon durch das tägliche mehrstündige Tragen von Vinyl-Handschuhen können DEHP-Werte zwischen 3 und 119 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ erreicht werden (BfR, 2003).

Besonders hoch sind die Belastungen neben Transfusions- und Hämodialyse-Patienten für Früh- und Neugeborene, die viele medizinische Eingriffe benötigen und Aufnahmehöhen von 3,3 $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{d}$ und mehr erzielen. Schlauchmaterialien für Infusionen, Beatmung, Ernährung und extrakorporale Membranoxygenation (ECMO) führen bei ihnen zu relativ hohen Belastungen (CDRH-FDA, 2001; Kahl et al., 2003; Loff et al., 2000, Lyche et al., 2009). Bei oraler, inhalativer und parenteraler Exposition wird bei Kindern eine systemische DEHP-Bioverfügbarkeit von 100 % angegeben, während Erwachsene oral etwa 50 % und inhalativ 75 % erreichen. Die dermale Verfügbarkeit liegt bei 5 % sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen (BfR, 2003; CSTE, 2004; DFG, 2002; ECB, 2008; Kahl et al., 2003; Koch et al., 2006; NTP-CERHR, 2006).

Im Dünndarm und in der Leber erfolgt eine schnelle Hydrolyse des Diesters DEHP über Lipasen zum korrespondierenden Mono-Ester Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat (MEHP, MW 278,3) und ein weiterer Abbau zu Sekundärmetaboliten (Boekelheide et al., 2005). Der Metabolismus von DEHP zu MEHP und zu Phthalsäure wird in Abbildung 1 dargestellt. Im Plasma wurde MEHP als Hauptmetabolit identifiziert, in geringeren Konzentrationen liegen die sekundären oxidativen Metabolite vor (Peck und Albro, 1982). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass der Metabolismus von DEHP zu MEHP altersabhängig ist, auch außerhalb des Körpers stattfindet und MEHP z.B. aus Blutbeutelmaterial direkt aufgenommen werden kann (Hildenbrand et al., 2005; Labow et al., 1987; Loff et al., 2000).

Bei Menschen und allen untersuchten Spezies bis auf Ratten konnte eine vollständige Hydrolyse und Glukuronidierung der ausscheidbaren Abbauprodukte festgestellt werden (Albro und Lavenhar, 1989; BfR, 2003; Koch et al., 2006; Schmid und Schlatter, 1985).

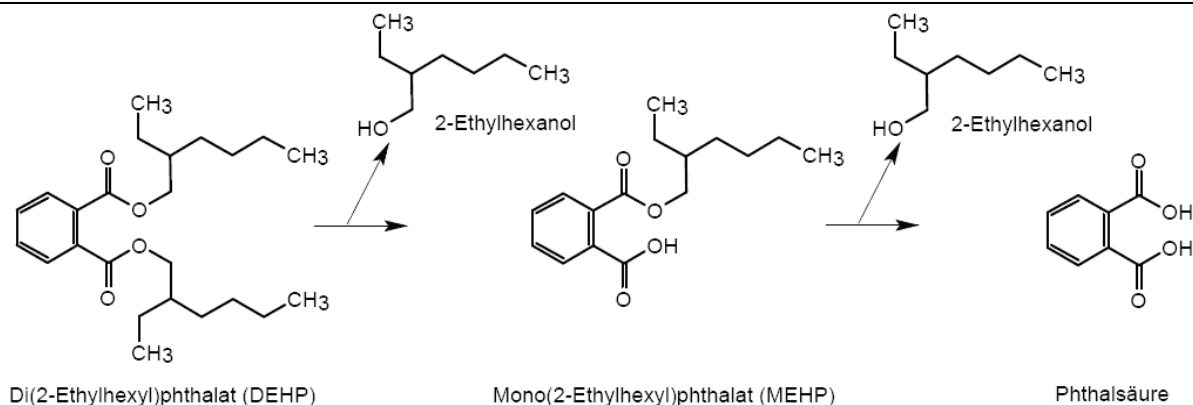


Abbildung 1: Metabolismus von DEHP zu MEHP und zu Phthalsäure

Im Intestinum und in der Leber erfolgt ein schneller Abbau von DEHP zu MEHP und 2-Ethylhexanol unter enzymatischer Hydrolyse. In einem weiteren Schritt wird MEHP unter Abspaltung von 2-Ethylhexanol zu Phthalsäure verstoffwechselt.

1.1.3 Toxizität

Seit den 40er Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgten Studien zum Nachweis von DEHP in Geweben und Organen von Mensch und Tier (Rhodes et al., 1986; Poon et al., 1997; Shaffer et al., 1945; Wolfe und Layton, 2003), um das gesundheitliche Risiko und die Toxizität zu beurteilen. Im Gegensatz zu seinem aktiven Metaboliten MEHP konnten in Tierversuchen bislang nur sehr geringe akute toxische Wirkungen von DEHP nachgewiesen werden (BfR, 2003; ECB, 2006; NTP-CEHRHR, 2006). Allerdings zeigten langfristige Aufnahmen vor allem Beeinträchtigungen der Reproduktionsfähigkeit und der Entwicklung männlicher Tiere. DEHP gehört zusammen mit anderen Phthalaten zu einer Gruppe chemischer Stoffe mit potentiell schädlicher Wirkung auf die Testes und den darin befindlichen Sertoli-Zellen (ATSDR, 2002; BfR, 2003; Boekelheide et al., 2005; CSTE, 2004; NTP-CERHR, 2006). Morphologische und funktionelle Störungen des testikulären Gewebes in Form von tubulärer Atrophie und Degeneration, Vakuolisierung der Sertoli-Zellen bis hin zur Infertilität wurden nach DEHP-Applikation über Trinkwasser, Nahrung oder Muttermilch bei männlichen Tieren beobachtet (Arcadi et al., 1998; Poon et al., 1997; Shaffer et al., 1945; Wolfe und Layton, 2003). Auch bei weiblichen Tieren wurden Effekte wie Verlängerung der Zyklusdauer, Ovulationsstörungen, strukturelle Veränderungen der Geschlechtsorgane, Funktionsverlust der östrogenproduzierenden Zellen, Entwicklungsstörungen bei Foeten und Nachkommen, gezeigt (Koch et al., 2006; Lyche et al., 2009; Martino-Andrade und Chahoud, 2010). DEHP und seine Metabolite sind plazentagängig und führen zu embryo-fetotoxischen Schäden (Halden, 2010; Lyche et al., 2009; Sharpe, 2001).

Das endokrine System reagiert ebenfalls empfindlich auf die Phthalat-Exposition (Sharpe, 2006). DEHP kann antiöstrogen, antiandrogen, aber auch indirekt östrogen wirken. Vielfach werden in diesem Zusammenhang Begriffe wie „endokrine Disruptoren“, „endokrin wirksame Substanzen“, „Xenohormone“ oder „Umwelthormone“ angewendet. Veränderte Testosteronspiegel, erhöhte Aktivität der Leydig-Zellen sowie eine erhöhte Östradiol-Produktion wurden in Tierversuchen festgestellt (Chauvigné et al., 2009; Koch et al., 2006).

DEHP ist bei Tieren kanzerogen. In Versuchen erschienen histopathologische Veränderungen an Nieren und Leber, reversible Lebervergrößerungen, Nekrosen, Peroxisomenproliferationen durch PPAR α -Induktion und Stoffwechseleränderungen in Leberzellen sowie Hepatokarzinome (ATSDR, 2002; BfR, 2003; CSTE, 2004; Doull et al., 1999; IARC, 2000).

Genotoxische Wirkungen konnten durch diverse Testsysteme nicht belegt werden (BfR, 2003; CSTE, 2004; Doull et al., 1999).

Um eine Dosis angeben zu können, die vom Menschen lebenslang täglich aufgenommen werden kann, ohne dass eine gesundheitliche Beeinträchtigung zu erwarten wäre, gibt die europäische Kommission einen TDI-Wert (*tolerable daily intake*) von 48 $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{d}$ für Erwachsene an. Grundlage für diesen Wert liefert die Studie von Wolfe und Layton mit einem NOAEL (*no observed adverse effect level*, höchste Dosis ohne unerwünschte Effekte) von 4,8 $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{d}$ (CSTE, 2004; Kommission Human-Biomonitoring, 2007; Wolfe und Layton, 2003).

Nach der EU-Richtlinie „67/548 für die menschliche Gesundheit“ wird DEHP mit der Kategorie 2 eingestuft, d. h. es kann die Fortpflanzung gefährden und das Kind im Mutterleib schädigen. Sie stützt sich auf tierexperimentelle Nachweise, die hinreichende Anhaltspunkte ergeben, dass DEHP beim Menschen zu einer Beeinträchtigung der Fortpflanzungsfähigkeit und bei schwangeren Frauen zu schädlichen Auswirkungen auf die Entwicklung der Nachkommenschaft führen kann. Zusätzlich bestehen verschiedene Gefahren aufgrund schädlicher Wirkungen für Nieren, Hoden, Fortpflanzungsfähigkeit und Entwicklung, insbesondere bei Kindern (ECB, 2008). Deshalb hat seit 2005 die Kommission der europäischen Union DEHP und diverse andere Weichmacher in Spielzeug- und Babyartikeln für Kinder verboten (European Commission, 2005; Martino-Andrade und Chahoud, 2010).

1.2 Cadmium

Cadmium (Cd) ist bereits seit dem frühen 20. Jahrhundert als potentiell schädigende Substanz mit Effekten an Lunge, Leber, Niere und Hoden bekannt (Alsberg und Schwartz, 1919). Das in geringen Konzentrationen ubiquitär vorkommende Schwermetall ist als zweiwertige Verbindung häufig mit Phosphaten, Blei oder Zink vergesellschaftet. Elementares Cadmium ist wasserunlöslich. Einige Verbindungen wie das untersuchte Cadmiumchlorid (CdCl_2 ; MW 183,3; CAS Nr. 10108-64-2) sind dagegen wasserlöslich. Cadmium und seine Verbindungen werden z. B. in der Batterie- und Akku-Herstellung (Nickel-Cadmium-Batterien), als Farbpigmente für Lacke und Kunststoffe, als Stabilisatoren in Kunststoffen, in der Galvanotechnik als Korrosionsschutz für Eisen und Stahl, als Legierungen, in der Halbleitertechnik, in der Solartechnik und als Regelstäbe in der Nukleartechnik eingesetzt (Elmadfa und Burger, 1999; Schäfer et al., 2004).

1.2.1 Exposition und Toxikokinetik

Jährlich werden weltweit 20000 Tonnen Cadmium produziert, wovon 8000 Tonnen emittieren. Es findet sich in Flusssedimenten und Böden als auch über die Nahrungskette in Pflanzen, Tieren und Menschen wieder. Durch Verbrennung von Müll und fossilen Brennstoffen und durch die Metallindustrie gelangen Partikel von Cadmiumverbindungen in die Außenluft (Elmadfa und Burger, 1999).

Die Aufnahme von Cadmium oder seinen Verbindungen erfolgt überwiegend enteral über die Nahrung oder inhalativ als Aerosol bei beruflicher Belastung und durch Zigarettenrauch. Seine biologische Halbwertszeit beträgt zehn bis 30 Jahre. Mit Gehalten von $1\text{-}5\text{ ng/m}^3$ in der Außenluft ist die Gesamtbelastung sehr gering. In den Alveolen werden Cadmium-haltige Partikel zurückgehalten und bis zu 50 % resorbiert. Wasserlöslichkeit und Partikelgröße bestimmen den Übertritt in den systemischen Kreislauf. Über den Gastrointestinaltrakt werden 2-8 % Cadmium durch belastete Nahrung resorbiert. Laut WHO kann von 0,1 bis 10 $\mu\text{g/kg}$ Cadmium über die Nahrung aufgenommen werden. Verschiedene Interaktionen können die Absorptionsrate beeinflussen. Eisen-, Calcium- und Proteinmangel in der Nahrung fördern die Cadmium-Aufnahme (Schäfer et al., 2004). Folgende Nahrungsmittel können erhöhte Cadmium-Werte aufweisen: Pilze, Blattgemüse, Vollkornprodukte, Ölsaaten, Kakao, Fleischprodukte, vor allem Innereien wie Niere und Leber, Krebstiere und Muscheln (Elmadfa und Burger, 1999).

Mit dem Alter nimmt der Gehalt an Cadmium kontinuierlich zu und hat sein Maximum etwa im 50. Lebensjahr. Etwa 0,4 mg/kg KG findet man im menschlichen Körper, davon entfallen circa 30 % auf die Niere und 20 % auf die Leber. Im Blut liegen die Konzentrationen zwischen 0,2 bis 1,1 µg/l. Gebunden an Albumin oder andere Transportproteine gelangt Cadmium in die Leber und induziert die Synthese von Metallothionin, das als Speicher- und Transportprotein für Zink fungiert. In das Plasma abgegeben gelangt Cadmium-Metallothionin durch glomeruläre Filtration in den Nierentubulus. Nur ein geringer Teil wird über den Urin ausgeschieden, der größere Teil wird von der Tubuluszelle aufgenommen und von Lysosomen metabolisiert. Cadmium wird freigesetzt, induziert dort die Metallothionin-Synthese, akkumuliert in der Tubuluszelle und verursacht Nierenschäden (Elmadfa und Burger, 1999; Schäfer et al., 2004).

1.2.2 Toxizität

Cadmium-Ionen besitzen die Eigenschaft, Proteine zu denaturieren und epitheliale Strukturen von Grenzflächen wie Kapillaren, Alveolen oder Mucosa zu schädigen. Akute Intoxikationen können oral oder inhalativ erfolgen, sind jedoch sehr selten. 15 mg Cadmium in 1 Liter Wasser gelöst bedingen Erbrechen. Inhalative Dosen von etwa 1 mg/m³ werden als gefährlich und 5-6 mg/m³ über acht Stunden als tödlich angegeben. Cadmium-Dämpfe oder -Rauch können zu schweren letal verlaufenden Lungenödemem oder interstitiellen Lungenentzündungen führen. Durch chronische Intoxikationen können Anämien, Osteomalazien und Nierenschäden hervorgerufen werden. Tierexperimentelle Studien zeigen seit Jahrzehnten schädliche Effekte am Hoden und dem vaskulären System, Ausbleiben der Spermiation, Keimzellverlust im Keimepithel, Gewebsnekrosen und -apoptosen, die zum Teil durch Zink verhindert werden können (Elmadfa und Burger, 1999; Schäfer et al., 2004, Thompson und Bannigan, 2008).

1.3 Testes

Der Hoden als Ort der Synthese diverser Hormone und der Spermatogenese wird von der Tunica albuginea, einer Bindegewebskapsel, umgeben, die mit ausstrahlenden Bindegewebssepten den Hoden in 250 Läppchen mit je ein bis vier Samenkanälchen einteilt. Die funktionelle Einheit des Hodens ist das Samenkanälchen, der Tubulus seminiferi. Das Keimepithel ist ein sehr empfindliches und das meist proliferierende Gewebe des Körpers. Es kleidet die Samenkanälchen zum einen mit Keimzellen verschiedener Entwicklungsstufen und zum anderen mit den dazwischen auf der Basallamina sitzenden Sertoli-Zellen aus. Physikalisch geschützt wird das Keimepithel durch die Basallamina, einer Kollagenfaserschicht und den Peritubulärzellen bzw. Myofibroblasten (Bart et al., 2002; Dym und Fawcett, 1970). Myofibroblasten sind wenig differenzierte Myozyten mit der Fähigkeit zu spontanen Kontraktionen und umhüllen den Tubulus mit mehreren Lagen. Diese Strukturen zusammen mit der Basallamina und dem Keimepithel bilden das tubuläre Kompartiment. Das interstitielle Kompartiment beinhaltet lockeres Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäße, Nervenfasern, Leukozyten und die Leydig-Zellen als Ort der Testosteronproduktion (Weinbauer et al., 2009).

Die Keimzellen müssen in ihrer Entwicklung, der Spermatogenese, das Keimepithel von der Basalmembran bis zum Tubuluslumen durchwandern. Die Spermatogenese wird in drei Phasen unterteilt: Spermatozytogenese, Meiose und Spermio-genese. Die Spermatozytogenese beginnt mit der mitotischen Teilung undifferenzierter Keimzellen, den sogenannten Spermato-gonien, die sich erst nach Erreichen der sexuellen Reife aus Stammzellen entwickeln und sich teilen. Im erwachsenen Hoden existieren Typ A Spermato-gonien als Reservezellen und Typ B Spermato-gonien als Vorläuferzellen. Typ A Spermato-gonien bleiben auf der Basalla-mina, stellen zeitlebens den Bestand an Zellausgangspopulationen durch mitotische Teilung sicher, während sich Typ B Spermato-gonien aus Typ A entwickeln und sich zu primären Spermatozyten differenzieren. Nach Überwindung der Blut-Hodenschranke und zwei meioti-schen Teilungen entwickeln sich frühmeiotische Spermatozyten zu Spermatischen mit halbem Chromosomensatz. In der Spermio-genese schließlich findet ein Zelldifferenzierungsprozess statt, in dem aus runden Spermatischen reife Samenzellen, die Spermatozoen, entstehen und in das Tubuluslumen des Hodens freigesetzt werden. Die Regulation der Hodenfunktion und der Spermatogenese unterliegt endokrinen, parakrinen und autokrinen Mechanismen. Sie können durch Vorgänge wie Inhibition der Gonadotropinsekretion, Enzym-inhibition der Androgen-biosynthese, direkte Effekte auf das Keimepithel oder die Sertoli-Zellfunktion, kompetitive

Hormoninhibition oder Beschädigung der Blut-Hoden-Schranke und andere Vorgänge gestört werden (Griswold, 1998; Hermo et al., 2010a; Junqueira und Carneiro, 2005).

1.3.1 Sertoli-Zellen

Die Sertoli-Zellen, benannt nach ihrem Erstbeschreiber Enrico Sertoli, sitzen im Keimepithel als prismatischer Zellverband somatischer Zellen breitbasig auf der Basalmembran und reichen mit ihrem Zellkörper, ihren zytoplasmatischen Fortsätzen (Ramifikation) und Taschen bis in das Lumen der Tubuli seminiferi. Sie dienen als Stütz- und Schutzgerüst für die sich differenzierenden und reifenden Keimzellen, die sich entlang des gesamten Keimepithels in konzentrischen Schichten von basal nach luminal aufhalten (Junqueira und Carneiro, 2005; Weinbauer et al., 2009). Im basalen Bereich sind die Sertoli-Zellen dicht miteinander verbunden, bilden mit der Blut-Hoden-Schranke eine Barriere vor dem systemischen Kreislauf und werden in ein basales und ein adluminales Kompartiment unterteilt. Sie heißen auch Ammenzellen, da die Keimzellen im adluminalen Kompartiment auf ihre ernährende, metabolische und endokrine Unterstützung über Diffusion oder *gap junctions* angewiesen sind (Junqueira und Carneiro, 2005).

Durch die Blut-Hoden-Schranke und hodenspezifisch angeordnete Zellkontakte erfolgt die Versorgung der Keimzellen ausschließlich transzellulär. Spezielle Zellmembranstrukturen wie *ectoplasmic specialisations* dienen den Keimzellen zur Orientierung und Ausrichtung während der Entwicklung (Parreira et al., 2002; Weinbauer et al., 2009). Die Sertoli-Zellen sind 70 - 80 µm groß, beherrschen etwa 35 bis 40 % des Keimepithelvolumens und ihre Anzahl begrenzt die Größe der Hoden (Sharpe et al., 2003). Sie haben meist auf der basalen Seite einen großen gelappten euchromatinreichen Kern mit auffälligem Nukleolus (Junqueira und Carneiro, 2005). Jede einzelne Sertoli-Zelle hat mit einer bestimmten Anzahl von Keimzellen funktionellen und morphologischen Kontakt. Diese Zahl ist speziesspezifisch und ein limitierender Faktor für die Spermienproduktion. Die Sertoli-Zellen beenden ihre Teilungsfähigkeit mit dem ersten Erscheinen meiotischer Keimzellen und werden bei Schädigung oder Absterben nicht mehr ersetzt (Cheng und Mruk, 2002; Monsees et al., 2000; Hess und Franca, 2005).

Bis zur Pubertät stimulieren Gonadotropine und das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) die Proliferationsrate der Sertoli-Zellen, wohingegen Thyroidhormon sie reduziert (Sharpe et al., 2003). Ferner kontrolliert FSH mit Testosteron die Sekretion des Androgen-bindenden Proteins (ABP), das zur Konzentration des zur Spermatogenese notwendigen Testosteronmilieus

im Tubuluslumen wichtig ist. Dort befindet sich ebenfalls ein Sekret der Sertoli-Zellen, das die Keimzellablösung in das Lumen erleichtert (Junqueira und Carneiro, 2005). Durch die Blut-Hoden-Schranke wird ein Rückfluß dieser Flüssigkeit verhindert, und die Keimzellen befinden sich im Tubulus in einem einzigartigen Flüssigkeitsmilieu (Weinbauer et al., 2009). Während der Spermatogenese wird überschüssiges Zytoplasma der Keimzellen in Form von Residualkörperchen und fehlgebildeten Keimzellen phagozytiert. Auch Keimzellen wirken ihrerseits auf das Zytoskelett, die Funktion, den Stoffwechsel und Sekrete der Sertoli-Zellen (Herms et al., 2010b). Im Zytoplasma der Sertoli-Zellen findet sich viel glattes Endoplasmatisches Retikulum für die Steroidsynthese, raues Endoplasmatisches Retikulum für die Proteinsynthese, viele Mitochondrien als Zeichen hoher Stoffwechselaktivität, ein prominenter Golgi-Apparat für die Verpackung und den Transport sekretorischer Produkte, lysosomale Granula zur Phagozytose sowie Mikrotubuli und intermediäre Filamente zur Anpassung der Zellform während der verschiedenen Phasen der Keimzellentwicklung (Hess und Franca, 2005; Weinbauer et al., 2009). Pyruvat und Laktat werden den Samenzellen während der Entwicklung als essentielle Energielieferanten bereitgestellt. Außerdem synthetisieren und sezernieren Sertoli-Zellen Transportproteine wie die Metalltransportproteine Transferrin und Coeruloplasmin (Griswold, 1998). Für Gewebeumbau und Keimzellpassage werden Proteasen und Proteaseinhibitoren produziert sowie Strukturproteine für Basalmembran und Peritubulärzellen (Griswold, 1995). Ferner erzeugen sie auch das Peptidhormon Inhibin, das über negative Rückkopplung die FSH-Sekretion in der Adenohypophyse unterbindet und das Anti-Müller-Hormon, das die Rückbildung der Müllergänge beim männlichen Fötus bewirkt (Junqueira und Carneiro, 2005).

1.3.2 SerW₃ - eine Zelllinie aus Sertolizellen der Ratte

Die Sertoli-Zelllinie SerW₃ wurde aus Sertoli-Zellen 17 Tage alter Wistar Ratten durch Transfektion eines Plasmids, das das SV40 *large and small T antigen* (Simian Virus) exprimiert, angelegt und immortalisiert. In einem Kulturmedium mit 5 % FCS bei 35°C im Brutschrank lassen sie sich unter sterilen Bedingungen kultivieren. Die Zellen verdoppeln sich nach 22 Stunden. Typisch für SerW₃-Zellen sind funktionelle und morphologische Charakteristika der Sertoli-Zellen wie Phagozytose, Sekretion von Transferrin und Sensitivität auf Cisplatin. Die Zellkörper sehen länglich aus und bilden viele Ausläufer. Der Nukleus zeigt ebenfalls strukturelle Eigenschaften der Sertoli-Zellen. Die SerW₃-Zellen haben eine hohe Stoffwechselaktivität. Androgen-bindendes Protein (ABP) und *sertoli cell secreted growth factor* (SCSGF) wer-

den stark sezerniert, allerdings fehlen ihnen Rezeptoren für FSH und LH (luteinisierendes Hormon), wodurch sie nicht unter der Kontrolle von Hypophysenhormonen stehen. Auch SerW₃-Zellen suchen den Kontakt zu Nachbarzellen wie die Sertoli-Zellen im Hoden und bilden *tight junctions* aus, die ein wesentlicher Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke sind und zeigen eine basale-apikale Orientierung ihres Zytoplasmas. Aufgrund dieser Charakteristika eignen sich SerW₃-Zellen für *in vitro* Studien, um Störungen an spezifischen Strukturproteinen wie z. B. Proteine der Blut-Hoden-Schranke und Eigenschaften diverser Stoffe zu demonstrieren (Pognan et al., 1997; Hess und Franca, 2005).

1.3.3 Zellkontakte

Für die Regulation der Spermatogenese und die Schaffung einer hochspezifischen Mikroumgebung für die Entwicklung und Differenzierung der Keimzellen spielen Zellverbindungen zwischen Sertoli- und Keimzellen und zwischen benachbarten Sertoli-Zellen eine herausragende Rolle. Struktur und Morphologie entsprechen überwiegend denen übriger Epithelgewebe, jedoch zeigen sich auch hodenspezifische Unterschiede, auf die weiter unten näher eingegangen wird. Die Zellkontakte werden von integralen Transmembranproteinen, so genannten Zelladhäsionsmolekülen, gebildet, die durch ihre Struktur mit dem extra- und intrazellulären Raum in Kontakt stehen. Sie halten das Gewebe zusammen und ermöglichen die Zellkommunikation von Zelle zu Zelle und von Zelle zur extrazellulären Matrix (EZM). Man findet drei Gruppen von Zellverbindungen, die sich in ihrer Funktion voneinander unterscheiden. Verschließende Verbindungen wie *tight junctions* (TJs) führen Sertoli-Zellen so eng aneinander, dass nur wenige Ionen und Moleküle den parazellulären Zwischenraum passieren können. Haftende Verbindungen dienen dem mechanischen, interzellulären Zusammenhalt. Funktional werden sie wiederum in Zell-Zell-Kontakte, Adhärenzverbindungen (*adherens junctions*, AJs) und Desmosomen, und Zell-Matrix-Kontakte, fokale Adhäsionen und Hemidesmosomen, unterteilt. Kommunizierende Verbindungen in Form von *gap junctions* (GJs) erlauben den freien Durchfluss von chemischen oder elektrischen Signalen und stellen den Kontakt zwischen benachbarten Zytoplasmen her (Alberts et al., 2008). *Tight junctions* (TJs) belegen überwiegend den apikalen Bereich von Epithelzellen, gefolgt von *adherens junctions* (AJs) und dann einer parallelen Reihe von Desmosomen. Im Hoden allerdings liegt dieser Verbindungskomplex näher an der Basalmembran. Desweiteren sind *gap junctions* (GJs) und zusätzliche Desmosomen über das ganze Epithel zur Stütze und Verankerung mit den benachbarten Zellen und der extrazellulären Matrix (EZM) verteilt. TJs und GJs sind die einzigen ver-

schließenden und kommunizierenden Verbindungen. *Tight junctions*, *adherens junctions* und *gap junctions* unterliegen einem permanenten dynamischen Auf- und Abbau-Prozess, der durch Medikamente und andere Fremdstoffe gestört werden kann (Fiorini et al., 2004).

1.3.3.1 Tight Junctions

Die einzigen in Säugetieren bekannten verschließenden Zellkontakte in Epithelien sind die *tight junctions* (TJs), auch *Zonulae occludentes* genannt. Durch schmale Bänder von Membranproteinen umgürtet TJs die Epithelzellen. Die Nachbarzellen stehen eng in Verbindung, so dass der Zellzwischenraum verschlossen wird. *Tight junctions* verhindern bzw. kontrollieren als Diffusionsbarriere den parazellulären Transport wasserlöslicher Stoffe. Durch TJs werden die Zellen in basale und apikale Domänen kompartimentiert, was die freie Bewegung von Membranproteinen verhindert und die Zellpolarität aufrechterhält. Man bezeichnet das als Zaunfunktion bzw. *fence function*. TJs sind wichtige Strukturkomponenten der Blut-Hoden-Schranke. Im Hoden unterscheiden sich TJs von TJs anderer Epithelien. Testikuläre TJs werden erst mit der Pubertät gebildet, um heranreifende Samenzellen vor dem Körperkreislauf und dem körpereigenen Immunsystem zu schützen und belegen Bereiche nahe der Basalmembran im Gegensatz zu apikal gelegenen TJs anderer Epithelien.

Auf molekularer Ebene setzen sich TJs aus drei Hauptproteinen zusammen: integralen Membranproteinen, peripheren Adaptern mit ihren assoziierenden Signalmolekülen und zytoskeletalen Proteinen. Die extrazellulären Domänen der integralen Membranproteine, die in der basolateralen Region des Epithels liegen, versiegeln den Interzellularspalt über identische sich gegenüber liegende Proteine und bilden homophile Zellkontakte aus. Zytoplasmatische Domänen der Transmembranproteine sind über Adapterproteine und Signalmoleküle, die über Lipasen oder Phosphatasen reguliert werden, mit dem zytoskelettalen Netzwerk verbunden. Bis jetzt sind die drei *tight junctions* assoziierten Transmembranproteine Occludin, Claudin und *junctional adhesion molecules*, die über die *Zonulae occludentes* Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 mit dem Mikrofilament Aktin verbunden sind, bekannt (Cheng und Mruk, 2002; Mitic et al., 2000).

1.3.3.1.1 Occludin

Occludin ist ein 60 bis 65 kDa großes Polypeptid und ein Ca^{2+} -unabhängiges interzelluläres Adhäsionsmolekül. Es organisiert zusammen mit Claudin in *tight junctions* und in der Blut-

Hoden-Schranke die Barriere- bzw. Zaunfunktion und kontrolliert die Spermatogenese. Occludin besitzt vier transmembrane Domänen, zwei extrazelluläre Schleifen für die Zellkontakte und eine zytosolische für die Verbindung über die Adapterproteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 an die Aktinfilamente. Zwei Aktivitätszustände von Occludin werden durch die Proteinkinase C und Proteasen reguliert. Im aktiven phosphorylierten Zustand sind die *tight junctions* dicht und im dephosphorylierten oder bei Zunahme von Proteasen offen, wobei Occludin in basolaterale Regionen der Zelle wandert (Balda und Matter, 1998; Fanning et al., 1999; Mitic et al., 2000).

1.3.3.2 Adhäsionsverbindungen

Haftende Verbindungen, auch Adhäsionsverbindungen (engl. *adhering junctions*) oder Ankerverbindungen (engl. *anchoring junctions*) genannt, sind in vielen Geweben reichlich vorhanden, vor allem in solchen, die mechanischem Stress ausgesetzt sind. Adhäsionsverbindungen verbinden zytoskelettale Elemente einer Zelle mit einer benachbarten oder der extrazellulären Matrix (EZM). Es gibt vier Typen von Adhäsionsverbindungen: 1) Adhärenzverbindungen, *adherens junctions* (AJs) bzw. Zonula adherens, 2) Desmosomen, 3) fokale Adhäsionen bzw. fokale Kontakte und 4) Hemidesmosomen. *Adherens junctions* (AJs) und Desmosomen sind Ankerverbindungen, die zwei Zellen miteinander in Kontakt bringen. Fokale Kontakte und Hemidesmosomen verbinden Zellen mit der EZM. *Adherens junctions* (AJs) und fokale Adhäsionen sind mit dem Aktin-Zytoskelett, Desmosomen und Hemidesmosomen mit Intermediärfilamenten verbunden. AJs belegen im Keimepithel die Domäne direkt unter den TJs, bilden bei Zell-Zell-Verbindungen einen 30 nm breiten Spalt, verbinden die externe Umgebung mit dem Aktin-Zytoskelett, dienen als Signalüberträger extrazellulärer Stimuli und können Transkriptionsfaktoren induzieren. Ausserdem kontrollieren AJs die zeitgerechte Passage sich entwickelnder Samenzellen durch das Keimepithel vom basalen zum adluminalen Kompartiment während der Spermatogenese (Alberts et al., 2008; Cheng und Mruk, 2002).

Ectoplasmic specializations (ES) und tubulobulbare Komplexe (TBC) sind hodenspezifische Strukturen der AJs (Cheng und Mruk, 2002; Hess und Franca, 2005; Russel et al., 1977). Die *ectoplasmic specializations* sind Verbindungskomplexe, die zwischen benachbarten Sertoli-Zellen und zwischen Sertoli- und Keimzellen gebildet werden. Sie bestehen aus der Plasmamembran von zwei benachbarten Zellen, hexagonalen übereinander gelagerten Aktinfilamentbündeln, die zwischen der Zellmembran der Sertoli-Zellen und den dünnen Zisternen des

glatten Endoplasmatischen Retikulum gelagert sind. Es gibt apikale und basale ES. Die apikalen ES erleichtern die Epitheldurchwanderung der Keimzellen und dienen als Halterung für elongierte Spermatiden, der Translokation von Keimzellen in tiefe Nischen und der Vorbereitung zur Spermiation in das Tubuluslumen. Die basalen ES haben Kontakt zu frühen Entwicklungsstufen der Keimzellen, den Spermatogonien und sind am Aufbau der Blut-Hoden-Schranke mitbeteiligt (Hess und Franca, 2005; Mruk et al., 2008; Parreira et al., 2002; Russel, 1977; Salanova et al., 1998; Vogl et al., 2000; Wong et al., 2005).

Tubulobulbare Komplexe sind spezielle Plasmamembranformen zwischen Sertoli-Zellen und Sertoli- und Keimzellen, die durch dünne röhrenförmige Einbuchtungen in das Zytoplasma der Sertoli-Zellen hineinragen und bei benachbarten Sertoli-Zellen Vorsprünge bilden. Ihre Aufgaben sind Keimzellen an den Sertoli-Zellen zu verankern, überschüssiges Zytoplasma der Spermatiden zu eliminieren und ES zu regenerieren, um die Sertoli-Zell-Barriere wieder aufzubauen und die Spermiation zu ermöglichen. Schädigungen haben eine Fehlentwicklung der Keimzellen zur Folge (Hess und Franca, 2005).

Transmembranproteine in den Adhärenzverbindungen sind überwiegend die Ca^{2+} -abhängigen Cadherine und Nectin-2. Catenine verbinden wiederum als Adapterproteine und Ankerproteine Cadherine mit dem Mikrofilament Aktin und Afadine mit Nectin-2 (Alberts et al., 2008; Cheng und Mruk, 2002).

Desmosomen sind scheibenförmige Strukturen von etwa 1 μm Durchmesser, die benachbarte Zellen durch Cadherine wie Desmoglein und Desmocollin als Zelladhäsionsmoleküle verbinden. Auf der zytoplasmatischen Seite bilden Proteinkomplexe (Plaques) eine Brücke zu den schleifenförmigen intermediären Filamenten. Diese sind die stabilsten Komponenten des Zytoskeletts, wodurch die Desmosomen den mechanischen Zusammenhalt der Sertoli-Zellen verbessern können (Alberts et al., 2008; Junqueira und Carneiro, 2005).

Anders als bei AJs und Desmosomen, bei denen die Zelladhäsionen über homophile Zellkontakte bestehen, liegen bei fokalen Kontakten und Hemidesmosomen heterophile Kontakte vor. Fokale Adhäsionen sind klar abgegrenzte Bereiche, die das Aktin-Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix koppeln, einem bedarfsmäßigen dynamischen Auf- und Abbau unterliegen und ihre Aufgabe als Mechanorezeptoren und Signalvermittler über Tyrosinkinasen wie der fokalen Adhäsionskinase (FAK) erfüllen. Je nach Bedarf und Signal können fokale Adhäsionen dynamisch auf- und abgebaut werden. Hemidesmosomen bilden Verbindungen zwischen den Zellen und dem Laminin der Basallamina. Sie erscheinen wie halbe Desmosomen, dienen der Stabilisierung und werden intrazellulär mit Intermediärfilamenten verknüpft. Trans-

membranproteine bei fokalen Adhäsionen und Hemidesmosomen sind Integrine (Alberts et al., 2008).

1.3.3.2.1 N-Cadherin

In *adherens junctions* und Desmosomen finden sich als mechanische Stabilisatoren der Zell-Zell-Kontakte und als Signalüberträger Ca^{2+} -abhängiger transmembraner Adhäsionsmoleküle, die Cadherine. Sie gehören zur Gruppe der CAMs (*cell adhesion molecules*) und werden nach Struktur, Vorkommen oder Entdeckungszeitpunkt in mehrere Untergruppen eingeteilt. Strukturprotein der AJs im Keimepithel und der basalen ES ist N-Cadherin (Li et al., 2009). Es ist ein 130 kDa großes Transmembranprotein aus der Familie der klassischen Cadherine und aus fünf extrazellulären Domänen mit repetitiven Aminosäuresequenzen aufgebaut. Zwischen den Domänen liegen Bindungsstellen für Ca^{2+} , die für die adhäsiven Interaktionen der sich gegenüberliegenden Cadherinmoleküle von immenser Bedeutung sind. Auch hier liegen proteinspezifische homophile Bindungen vor. Das bedeutet, dass ein Cadherinmolekül nur mit einem gleichen Cadherinmolekül der Nachbarzelle kommunizieren kann. Catenin und Vinculin als Ankerproteine verbinden Ca^{2+} -abhängig Cadherin mit intrazellulären Aktinfilamenten des Cytoskeletts und vernetzen das Gewebe. Fehlt Ca^{2+} , wird Cadherin inaktiv und proteolytisch abgebaut. In Desmosomen sind Desmogleine und Desmocolline die Strukturproteine, die über Ankerproteine Plakoglobin und Desmoplakin mit intrazellulären Intermediärfilamenten verbunden sind und neben der mechanischen Haltearbeit auch zur transmembranen Signalübermittlung über die Intermediärfilamente dienen können (Alberts et al., 2002; Cheng und Mruk, 2002; Hess und Franca, 2005).

1.3.3.2.2 β 1-Integrine

Im Keimepithel sind fokale Kontakte, Hemidesmosomen und apikale ES mit den β 1-Integrinen als integrale Transmembranproteine ausgestattet. Integrine gehören zu einer Gruppe von Heterodimeren mit vielen Isoformen, die aus transmembranären α - und β -Ketten bestehen. β 1-Integrine binden an Substrate der extrazellulären Matrix wie z. B. Kollagen, Fibronectin und Laminin. Integrine besitzen zwei Konformationszustände, die ständig wechseln. Während die extra- und intrazellulären Domänen gleichzeitig umstrukturiert werden, nehmen die α - und β -Ketten alternative Stellungen ein. So können neben der mechanischen Funktion der Rezeptoren auch Signale bidirektional weitergegeben werden. In fokalen Kontakten bin-

den β 1-Integrine über das Ankerprotein Talin an das intrazelluläre Aktinfilament, Hemidesmosomen über Plektin an das intrazelluläre Intermediärfilament Keratin (Alberts et al., 2008; Cheng und Mruk, 2002).

1.3.3.3 Gap Junctions

Gap junctions (GJs) sind kanalbildende Proteinkomplexe, die zytoplasmatische Kompartimente benachbarter Zellen miteinander verbinden. Im Hoden finden sich GJs zwischen benachbarten Leydig-, Sertoli- und zwischen Sertoli- und Keimzellen. Zu den Aufgaben der GJs gehören die direkte elektrische Kommunikation, die direkte chemische Kommunikation über *second messenger* wie Inositol-(1,4,5)-triphosphat und cAMP, Austausch von Molekülen bis 1 kDa und das Verhindern von Molekül- bzw. Ladungsverlusten in den extrazellulären Raum. Der Austauschprozeß molekularer Signale wird als *gap-junctional intercellular communication* (GJIC) bezeichnet. Er ist an der Homöostase, der metabolischen und elektrischen Kopplung, der erweiterten Gewebeantwort, der Embryogenese sowie der Kontrolle von Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Zwei sich gegenüberliegende Halbkanäle (Connexone) verbinden sich zu einer durchgehenden Pore und führen benachbarte Zellen bis zu 3 nm aneinander. Der Spalt wird durch feine Stränge überbrückt. Außerdem versorgen sie schwach durchblutetes Gewebe durch Diffusion von metabolischen Vorstufen, Aminosäuren, Glucose und Wasser bis in das unterversorgte Gewebezentrum. Sie sind an Drüsensekretionen und an der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung beteiligt. Auch *gap junctions* weisen ein steuerbares Öffnungs- und Schließverhalten auf. Durch hohe zytosolische Calciumkonzentrationen oder niedrige pH-Werte als Zeichen von irreversibler Zellschädigung schließen sich die im Ruhezustand geöffneten *gap junctions*. So können geschädigte Zellen von gesunden Nachbarzellen abgekoppelt werden (Lablack et al., 1998; Pointis et al., 2010).

1.3.3.3.1 Connexin 43

Grundbaustein eines Connexons ist das Transmembranprotein Connexin. Je nach Zusammensetzung lagern sich hexagonal sechs gleiche, also homomere, oder sechs unterschiedliche heteromere Connexine zusammen und verbinden sich mit einem gleich (homotypisch) oder unterschiedlich (heterotypisch) aufgebauten Connexon. So kann der Molekültransport in den GJs gerichtet oder auch ungerichtet sein. Connexine sind Transmembranproteine mit vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen. Connexin 43 (Cx 43) ist das vorherrschende Protein im Hoden und an der Regulation der Spermatogenese beteiligt (Lablack

et al., 1998). Die Halbwertszeit von Connexin beträgt nur wenige Stunden, so dass Zellen ihr Vorkommen nach Bedarf dynamisch mit Unterstützung von FSH und Thyroidhormonen regulieren können (Hermo et al., 2010b). Man findet Cx 43 zwischen Leydig-Zellen, im basalen Bereich zwischen Sertoli-Zellen, also in unmittelbarer Nähe zur Blut-Hoden-Schranke (Dym und Fawcett, 1970) und zwischen Sertoli- und frühen Keimzellen (Li et al., 2009; Pointis et al., 2010).

1.3.3.4 Blut-Hoden-Schranke

Die Blut-Hoden-Schranke teilt das Keimepithel in ein basales und in ein apikales bzw. adluminales Kompartiment. Im basalen befinden sich die Spermatogonien und frühen primären Spermatozyten, im apikalen die sich weiter entwickelnden und differenzierenden Keimzellen isoliert vom systemischen Kreislauf (Dym und Fawcett, 1970). Sie schützt die sich entwickelnden Samenzellen vor Einflüssen vom systemischen Kreislauf, bildet eine einzigartige Mikroumgebung für die Keimzellentwicklung, reguliert die Passage von Molekülen in und aus dem Keimepithel, hält die Zellpolarität aufrecht und isoliert in der Funktion als immunologische Barriere postmeiotische Keimzell-Antigene von zirkulierenden Antikörpern (Mruk et al., 2008; Wong et al., 2005). Bei Dysfunktion der Blut-Hoden-Schranke und bei nicht zyklus- und zeitgerechter Passage bleibt die Differenzierung und Entwicklung der Samenzellen aus (Cheng und Mruk, 2002).

Die Blut-Hoden-Schranke setzt sich aus *tight junctions* (TJ), basalen *ectoplasmic specializations* (basal ES), basalen tubulobulbaren Komplexen (basal TBC) und desmosomenartigen Verbindungen zusammen (Wong und Cheng, 2005; Wong et al., 2005). *Desmosom-like junctions* kombinieren ultrastrukturelle Bestandteile von Desmosomen und Gap junctions. Sie zeigen Verdichtungen des Zytoplasmas an korrespondierenden Stellen zwischen benachbarten Sertoli-Zellen oder zwischen Sertoli- und Keimzelle. Ihre Funktion und Regulation sind bis jetzt noch nicht geklärt (Russell, 1977; Li et al., 2009). Die Koexistenz dieser Strukturen findet man ausschließlich in der Blut-Hoden-Schranke. Sie ist eine dynamische Struktur mit Öffnungs- und Schließzyklen, um die Keimzellmigration zu erleichtern, ohne dabei die Intaktheit und Homöostase der dahinter liegenden Mikroumgebung zu beeinträchtigen. Sertoli- und Keimzellen sezernieren Zytokine wie TNF- α und TGF- β 3, die die Blut-Hoden-Schranken-Dynamik regulieren, indem sie über korrespondierende Rezeptoren ihre Effekte auf TJ- und AJ-Membranproteine, Proteasen, Proteaseinhibitoren und Proteine der extrazellulären Matrix ausüben. Während reifende Spermatozyten die Blut-Hoden-Schranke durchwandern, senden

sie über die beiden Zytokine Signale zu den Sertoli-Zellen, auf denen sich korrespondierende Rezeptoren befinden und nachgeschaltete Signalkaskaden über Mitogen-aktivierende Protein-Kinasen (MAPK) aktivieren. Dies reduziert den Gehalt der TJ- und AJ-assozierten Proteine wie z. B. von Occludin oder Cadherin, während die Proteaseproduktion wie z. B. von Cathepsin L im Keimepithel gefördert wird. Somit wird die Disassemblierung, also die Öffnung der Blut-Hoden-Schranke ermöglicht und die Keimzellwanderung erleichtert. α_2 -Makroglobulin, ein Protease-Inhibitor, limitiert die extensive Öffnung der Blut-Hoden-Schranke durch schnelle Inaktivierung der Zytokine und Hemmung der Proteolyse von TJ- und AJ-Proteinen. Dies führt wiederum zu einem schnellen Wiederschluß der Blut-Hoden-Schranke (Wong und Cheng, 2005).

1.3.4 Intermediärfilamente und Vimentin

Mikrotubuli, Aktin und Intermediärfilamente sind Proteinstrukturen des Zytoskeletts. Intermediärfilamente reihen sich mit einem Durchmesser von 10 nm zwischen Aktinfilamenten mit 7 nm und Mikrotubuli mit 25 nm ein. Sie verleihen den Zellen und mechanisch strapaziertem Gewebe über Zellverbindungen Stabilität. Intermediärfilamente werden in weitere Subtypen unterteilt. Vimentin gehört mit Desmin, GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Peripherin zu den Typ III Intermediärfilamenten. Vimentin findet sich im Zytoplasma aller Zellen mesenchymalen Ursprungs und dient als ihr Marker z. B. bei der Diagnostik von Sarkomen. Das Vimentin-Monomer hat ein Molekulargewicht von 57 kDa und besitzt eine zentrale α -Helix, das sich mit einem zweiten Monomer zu einem Dimer und weiter zu einem Tetramer verdrillt. Vimentin verankert die Zellorganellen wie den Nukleus, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum im Zytoplasma und verbindet sich über Ankyrin mit der Zellmembran. In den Sertoli-Zellen erscheint Vimentin entlang der Zellachse, aber überwiegend als ein Band um den Nukleus und im basalen Zytoplasma. Es bildet unter anderem auch mit heranreifenden elongierten Spermatozoen eine Verbindung, die durch toxische Stoffe gestört werden kann (Fuchs und Weber, 1994; Richburg und Boekelheide, 1995; Hess und Franca, 2005).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Der am besten untersuchte Weichmacher ist der Phthalsäure-Ester Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (DEHP). Sertoli-Zellen der Testes wurden als erstes zelluläres Ziel für postnatale, DEHP-

induzierte Schädigungen identifiziert. Die histopathologischen Veränderungen in diesem Zelltyp wurden in histologischen Untersuchungen ebenso wie an Zellen *in vitro* beobachtet. Ebenfalls konnten frühe charakteristische Veränderungen der Funktion und Biochemie und die schnelle Unterbrechung physikalischer Interaktionen zwischen Sertoli- und Keimzellen beschrieben werden (Boekelheide et al., 2005). Bei 300 Veröffentlichungen in PubMed zu den Schlagworten „Phthalate“ und „Testis“ erhält man derzeit weniger als 11 % Treffer zu *in vitro* Studien. Dabei sind die Vorteile dieser Testsysteme offensichtlich. Es ist möglich, Effekte mit kontrollierten Konzentrationen zu erzielen und direkt die Kinetik und die betroffene Struktur zu untersuchen (Chauvigné et al., 2009). Tendenzen können dann zum Beispiel mit anderen präklinischen Untersuchungen verglichen und ergänzend genutzt werden. Zellen der Sertoli-Zelllinie SerW₃ zeigen charakteristische morphologische und funktionelle Merkmale der nativen Sertoli-Zellen. An ihnen soll im Rahmen dieser Doktorarbeit der Einfluß von DEHP, von seinem aktiven Metaboliten MEHP und dem Schwermetall Cadmiumchlorid geprüft werden. Mit der Etablierung dieser *in vitro* Methode könnten weitere umweltrelevante Stoffe und Metabolite getestet und Hinweise auf mögliche reproduktionstoxische Effekte erarbeitet werden. Da die Zellen der Zelllinie auch die charakteristischen Zell-Zellkontakte und Strukturproteine der Nativ-Zellen ausbilden, sollten Hinweise auf Schädigungen wichtiger Strukturen untersucht werden. Die SerW₃-Zellen wurden mit DEHP- und MEHP-Konzentrationen behandelt, die sich an möglich erreichbaren Plasmakonzentrationen von den Risikogruppen orientierten. Die möglichen Veränderungen der Proteine wurden durch verschiedene Methoden untersucht. Die morphologischen Veränderungen wurden licht- und elektronenmikroskopisch analysiert. Die mögliche Abnahme der Strukturproteine sollte durch Western Blot und Immunhistologie nachgewiesen werden.

In dieser Doktorarbeit soll der Einfluß von DEHP, MEHP und CdCl₂ auf die Sertoli-Zelllinie SerW₃, die Unterschiede in ihrer toxischen Potenz, die Auswirkungen auf die Strukturproteine der Zell-Kontakte und eine mögliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden sollen hier aufgelistet und erläutert werden.

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage Navigator TM	Sartorius Göttingen
Aqua-Bidestanlage	Millipore, Billerica, USA
Autoklav, Tuttnauer 3870 ELV PV	Biomedis, Gießen
Axiophot Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Blotting-Einheiten	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Calibrated Densitometer GS-800	Bio-Rad, München
Cellspin I (1205-14)	Thermac, Waldsolms
Cryo Freezing Container (Einfrierbox)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Dewargefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe
Elektrophorese-Einheiten	Bio-Rad, München
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke und Kunkel, Staufen
Magnetrührer MR 2002	Brand, Wertheim
Neubauer-Zählkammer	Schott, Jena
pH-Meter Lab 850	Schott, Jena
Photometer, Ultrospec III	Pharmacia, Wien, Österreich
Pipetboy IBS	Integra, Schweiz
Power PAC 200 (Stromgeber)	Bio-Rad, München
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	MGW Lauda CS20, Königshofen, AUT
Schüttler 3005	Heidolph, Th. Karow, Berlin
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Staufen
Thermostat 3401	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt

2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

30 % Acrylamid / Bis Solution 37,5:1 (2,6 % C)	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
BC Assay Kit	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
BCIP / NBT Solution	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich

Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Cadmiumchlorid (Cadmium chloride anhydrous)	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
Cellclip	Thermac, Waldsolms
Cellfunnel	Thermac, Waldsolms
Cellspin Filtercards	Thermac, Waldsolms
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
DEHP (Bis-(2-ethylhexyl)-phthalat)	Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz
DermaClean	Ansell, Bangkok, Thailand
Dimethylsulfoxid, getrocknet max. 0,05 % H ₂ O	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Eppendorf epT.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (96 %) reinst	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 5 und 10 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaleidoskope prestained standards (Kaleidoskopstandard)	Bio-Rad, München
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) min 99,0 %	Merck, Darmstadt
MEHP (Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat)	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nunc EasyFlask™, 25 und 75 cm ³ (Kulturflaschen)	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 cm ²	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co, Wertheim
PBS Dulbecco (1x) mit Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München
Reagenzgläser	Hecht-Assistent, Sondheim
Reaktionsgefäße	Brand GmbH & Co, Wertheim
Salzsäure 1 M (HCl)	Merck, Darmstadt
Skim Milk Powder (Magermilchpulver)	Fluka, Buchs, Schweiz
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Bio-Rad, München
Softa-Man®	Braun, Melsungen
Sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
TEAA (Triethylammonium Acetat)	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-Rad, München
Trispuffer Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, München

Triton X 100	Sigma-Aldrich, München
Trizma Base [®]	Sigma-Aldrich, München
Trypsin / EDTA Soltion in PBS 0,05 % / 0,02 % (w/v) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Tween [®] 20	Bio-Rad, München
Zellschaber, steril	Nunc, Wiesbaden
Zentrifugengläser	Hecht-Assistent, Sondheim

2.1.3 Antikörper für Western Blot und Immunhistologie

In der folgenden Tabelle 1 sind die verwendeten Antikörper sowohl von der Western Blot Analyse als auch von der Immunhistologie aufgeführt.

Tabelle 1: primäre und sekundäre Antikörper, die in Western Blot Analysen und immunhistologischen Untersuchungen verwendet wurden

Method	Antikörper	Ausrichtung	Katalognummer	Hersteller
Western Blot Immunhistologie	anti- β_1 -Integrin	monoklonal	610467	Transduction, Lexington, Kentucky, USA
Western Blot Immunhistologie	anti-Connexin 43	monoklonal	10061	BD Transduction Laboratories TM
Western Blot Immunhistologie	anti-N-Cadherin	monoklonal	33-3900	Zymed [®] Labora- tories Inc., San Francisco, USA
Western Blot Immunhistologie	anti-Occludin	monoklonal	33-1500	Zymed [®] Labora- tories Inc., San Francisco, USA
Immunhistologie	anti-Vimentin	monoklonal	V6630	Sigma [®] , Saint Louis, Missouri, USA
Western Blot	Sheep anti-mouse IgG	gegen monoklonale Primäranti- körper	AP326A	Chemicon, Te- mecula, USA
Immunhistologie	GAM-FITC	gegen monoklonale Primäranti- körper	AP 160F	Chemicon, Te- mecula, USA

2.2 Medien

2.2.1 Zellkulturmedium

Die Kultivierung der SerW₃-Zellen wurde in einem Medium aus Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), fetalem Kälberserum (FCS) und Glutamin in folgender Zusammensetzung vorgenommen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des Nährmediums zur Zellkultivierung

Bestandteile	Anteile in Prozent
DMEM	94 %
FCS	5 %
Glutamin	1 %

2.2.2 Einfriermedium

Zur Konservierung konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Vor dem Einfrieren wurden sie deshalb in folgendem Medium vorbereitet (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des Einfriermediums

Bestandteile	Anteile
DMEM	79 %
FCS	10 %
DMSO	10 %
Glutamin	1 %

2.2.3 Lösungen und Puffer

2.2.3.1 Lösungen und Puffer für die Western Blot-Untersuchungen

Lysepuffer

Für die Western Blot-Untersuchungen mussten die Proteine aus den Zellen herausgelöst werden. Dies geschah mit dem Lysepuffer, der aus einer Stammlösung und Aqua bidest. bestand und den Proteaseinhibitoren Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und Pepstatin, die erst kurz vor der Verwendung des Lysepuffers zugegeben wurden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung des Lysepuffers

Bestandteile	Anteile
Triton X 100	1 %
SDS-Lösung (20 %)	0,1 %
NaCl	150 mM
Tris-HCl (1 M, pH 7,2)	50 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin	5 µg/ml

Gele für die Elektrophorese

Die Gele für die Elektrophorese setzten sich aus zwei Komponenten zusammen. Zuerst wurde das Trenngel gegossen, das eine Trennung der Proteine nach ihrer Größe bewirkt. Dies wurde mit dem Sammelgel überschichtet, in dem die Proteine konzentriert und verdichtet wurden. Die Gele wurden mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen angesetzt. Um ein vorzeitiges Polymerisieren des Gels zu verhindern, wurden die Beschleuniger APS und TEMED direkt vor Verwendung des noch flüssigen Gels hinzugemischt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung des Sammelgels und der Trenngele

Gel	Bestandteile	Anteile
Sammelgel 4 %	Acrylamid 30 %	0,67 ml
	Tris Puffer pH 6,8	1,25 ml
	SDS (20 %)	25 µl
	Aqua dest.	3 ml
	APS (5%)	50 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel 7,5 %	Acrylamid (30 %)	2,5 ml
	Tris Puffer pH 8,8	2,5 ml
	SDS (20%)	50 µl
	Aqua dest.	4,85 ml
	APS (5%)	100 µl
	TEMED	10 µl
Trenngel 10 %	Acrylamid (30 %)	3,3 ml
	Tris Puffer pH 8,8	2,5 ml
	SDS (20%)	50 µl
	Aqua dest.	4,05 ml
	APS (5%)	100 µl
	TEMED	10 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Bestandteile	Anteile
Tris Puffer pH 6,8 für Sammelgel	Tris-HCl in Aqua dest.	1 M
Tris Puffer pH 8,8 für Trenngel	Trizma [®] Base in Aqua dest.	1 M
Laufpuffer 10x für Elektrophorese	Trizma [®] Base	3 %
	Glycin	14,42 %
	SDS in Aqua dest.	1 %
Transferpuffer 2x für Western Blot	Trizma [®] Base	0,25 %
	Glycin	1,13 %
	Methanol in Aqua dest.	5 %
Blockpuffer für Western Blot	Magermilchpulver	5 %
	Tween 20 in PBS	0,1 %
Tris Puffer pH 9,5 für Western Blot	Trizma [®] Base	0,1 M
	MgCl ₂	0,05 M
	NaCl in Aqua dest.	0,1 M
Probenpuffer 5x pH 6,8 für Reduktion	SDS	10 %
	Glycerol (87 %)	35 %
	Ethanol (96 %)	25 %
	Bromphenolblau	0,025 %
	Tris Puffer HCl in Aqua dest.	1,5 M

Der Probenpuffer dient in der SDS-Gelelektrophorese zur Markierung der Proteine mit dunkelblauer Farbe, die durch die pH-Einstellung auf 6,8 mit NaOH entsteht. Zur Vorbereitung wird in Ethanol und Aqua dest. SDS gelöst und nach Zugabe von Natriumhydroxid auf einer Heizplatte erhitzt. Glycerol und Bromphenolblau färben die Lösung grün-rot, die Zugabe von NaOH ändert sie in dunkelblau (Tabelle 6).

2.2.3.2 Lösungen und Puffer für die Elektronenmikroskopie

Um die Zellen für die elektronenmikroskopische Untersuchung vorzubereiten und bei 4°C lagern zu können, wurden sie in Karnowsky's Lösung fixiert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Karnowsky's Lösung für Elektronenmikroskopie

Bestandteile	Anteile
Glutaraldehyd (25 %)	15 ml
Phosphatpuffer (0,2 M)	45 ml
Paraformaldehyd (3 %)	40 ml

Tabelle 8: Phosphatpuffer für Elektronenmikroskopie

Bestandteile	Anteile
KH ₂ PO ₄	0,1 M
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O in Aqua dest.	0,1 M

Tabelle 9: Lösungen für die Kontrastierung nach Reynolds für Elektronenmikroskopie

Lösungen	Bestandteile	Anteile
Lösung 1	Uranylacetat in Aqua dest.	1 %
Lösung 2	Bleinitrat	1,33 g
	Natriumacetat	1,76 g
	Aqua bidest.	30 ml

Danach erfolgte die Zugabe von 8 ml NaOH (1M) und die Auffüllung auf eine Gesamtmenge von 50 ml mit Aqua bidest, nachdem die Zellen zuerst 15-20 min in Lösung 1 vorbereitet, mit Aqua bidest. gespült, anschließend 3-5 min in Lösung 2 getaucht und zuletzt noch einmal mit Aqua bidest. gespült wurden (Tabelle 8 und 9).

2.3 Methoden

2.3.1 Zellpassage

In mehreren Vorversuchen wurde die optimale Einsaatdichte der Zellen ermittelt, um eine Konfluenz nach der gewünschten Anzahl der Inkubationstage zu erreichen. Daraus leitete sich das Verhältnis ab, in welchem die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt wurden. Das Kriterium für den richtigen Zeitpunkt einer Zellpassage, war das Erreichen einer konfluenten Monolayerschicht. Das heißt, dass der Flaschenboden zu 80-90 % mit einer Zellschicht bewachsen war. Dies wurde lichtmikroskopisch überprüft. Unter keimarmen Bedingungen unter einem Laminar Air Flow wurde das alte Nährmedium aus den Flaschen abgegossen und mit PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gespült. Zum Lösen der Zellen wurden sie mit 2 ml Trypsin behandelt. Der Flaschenboden wurde dazu benetzt, die überschüssige Flüssigkeit verworfen und die Zellen 2-3 min im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Zeit hatten die Zellen ihre längliche Form verloren und sich abgekugelt, was unter dem Mikroskop überprüft wurde. Mit 8 ml Nährmedium wurde der enzymatische Ablöseprozess gestoppt und die Zellsuspension nach Überführen in ein Zentrifugenröhrchen 10 min bei 500 U zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 5 ml Medium wieder gelöst und mechanisch durch wiederholtes Aufsaugen und

Ablassen vereinzelt. Nach Zählung in einer Neubauerkammer konnten die Zellen in 10 ml Kulturmedium erneut inkubiert werden.

2.3.2 Einfrieren von SerW₃-Zellen

Überschüssige Zellen wurden für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff bei -196°C konserviert. Dazu wurde das alte Nährmedium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺, Mg²⁺) gespült und mit 2 ml Trypsin enzymatisch vom Flaschenboden gelöst. Mit 8 ml Nährmedium wurde dieser Vorgang nach 3 min Inkubation im Brutschrank gestoppt und die Suspension 10 min bei 500 U zentrifugiert. Um die Dichte der Zellen zu ermitteln, wurden sie nach Resuspension in 5 ml Medium in einer Neubauerkammer gezählt, erneut zentrifugiert und mit einem Medium mit DMSO zum Einfrieren versetzt. Die Aufteilung der Suspension erfolgte zu je 1,5 ml in Cryoröhrchen, die die ersten 24 h bei -85°C in einer mit Isopropanol gefüllten Box eingefroren und danach in den flüssigen Stickstoff gegeben wurden.

2.3.3 Auftauen von SerW₃-Zellen

Zur weiteren Kultivierung der Zellen mussten diese wieder unter warmem Wasser aufgetaut, mit 8 ml Medium versetzt und anschließend 10 min bei 500 U zentrifugiert werden. Um die Zellen möglichst wenig durch DMSO zu schädigen, wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 10 ml Medium gelöst. Die Zellzahl wurde in einer Neubauerkammer überprüft und die Zellen anschließend inkubiert. Das Absetzen und Anwachsen auf dem Flaschenboden wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Bei Erreichen einer konfluenten Monolayerschicht konnten die Zellen erneut auf mehrere Flaschen gesplittet werden.

2.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Um die Versuchsintervalle planen zu können, musste die Zelldichte vor erneuter Einsaat ermittelt werden. Dazu wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop mit einer Neubauerkammer gezählt. Die Neubauerkammer wurde mit einem fussselfreien Papier vorbereitet und auf die Stege ein Tropfen Wasser geben. Danach wurde das Deckglas aufgelegt, wobei sich bei korrekter Lage Newtonsche Ringe bilden sollten. In den entstandenen Kapillarspalt wurden später 10 µl Zellsuspension gegeben. Auf der Oberfläche der Neubauerkammer sind vier

Quadrate mit 16 Unterquadraten eingeritzt, die das Zählen unter dem Mikroskop erleichtern. Die ermittelte Zellzahl ergibt sich aus der Summe der einzelnen Felder in 10^5 / ml. Da sich die Bildung von Zellklumpen kaum vermeiden ließ, wurde zur Minimierung des Fehlers mit einem Dreifachansatz gearbeitet. Von jeder unbehandelten Kontrolle und jeder Testsubstanzkonzentration wurden drei Flaschen inkubiert und jede Flasche dreimal ausgezählt. Die Zellen wurden wie bei der Zellpassage mit 2 ml Trypsin inkubiert, zentrifugiert und pelletiert. Anschließend wurden sie in 4 ml Medium resuspendiert und durch Aufsaugen in der Pipette mechanisch getrennt, bevor 50 μ l entnommen und in ein mit 150 μ l Medium gefülltes Eppendorf-Cup gegeben wurden. Zur Zählung wurden nach kurzem Aufschütteln und guter Durchmischung auf dem Vortex 10 μ l der Suspension in die Neubauerkammer gefüllt.

2.3.5 Inkubation mit den Testsubstanzen

Als Prüfsubstanzen dienten in dieser Arbeit das Phthalat DEHP und sein aktiver Metabolit MEHP, ausserdem das Schwermetall CdCl_2 . Als Intervalle wurden bei allen Substanzen die Tage eins, drei und sechs gewählt. Für den Western Blot wurden Proben zu allen drei Zeitpunkten gewonnen, für die Elektronenmikroskopie und Immunhistologie zum Endzeitpunkt nach sechs Tagen. Bei den Phthalaten wurden die SerW₃-Zellen mit den Konzentrationen 100, 10, 1, 0,1 und 0,01 μ M inkubiert. Dazu war DMSO in einer Konzentration von 0,1 % als Vehikel zum Lösen der Phthalate in dem wässrigen Kulturmedium nötig. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass DMSO in dieser Konzentration keinen Einfluss auf das Zellwachstum hat. Zum Herstellen einer 1 M MEHP-Stammlösung wurden 0,278 g, für eine 1 M DEHP-Stammlösung 0,3906 g in 1 ml DMSO gelöst. Danach wurde diese Stammlösung in einer Verdünnungsreihe bis auf die in den Versuchen verwendeten Konzentrationen herunter verdünnt und auf einem Magnetrührer in dem Nährmedium gelöst. Dabei wurde die DMSO-Konzentration von 0,1 % trotz Verdünnung durch Zugabe von DMSO konstant gehalten wurde. Das wasserlösliche CdCl_2 (MW 183,3) wurde in den Konzentrationen 1, 0,1 und 0,01 μ M getestet und ebenfalls mittels einer Verdünnungsreihe verdünnt. Von jeder Konzentration wurden drei Kulturflaschen angesetzt, ebenfalls drei Kontrollen nur mit Nährmedium und bei den Phthalaten zusätzlich drei Vehikel-Kontrollen mit 0,1 % DMSO. Vor jeder erneuten Einsaat und um eine Wachstumseinschränkung festzustellen, wurde zu jedem Zeitpunkt die Zellzahl mit der Neubauer-Kammer ermittelt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Verdünnungsreihe für MEHP, DEHP und CdCl₂

Stoff	Konzentration	Verdünnungsfaktor
MEHP	1 M	Stammlösung
	1000 µM	1:1000
	100 µM	1:10
	10 µM	1:10
	1 µM	1:10
	0,1 µM	1:10
	0,01 µM	1:10
DEHP	1 M	Stammlösung
	1000 µM	1:1000
	100 µM	1:10
	10 µM	1:10
	1 µM	1:10
	0,1 µM	1:10
	0,01 µM	1:10
CdCl ₂	100 mM	Stammlösung
	1 µM	1:100000
	0,1 µM	1:10
	0,01 µM	1:10

2.3.6 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot zur Proteindetektion

Das Ziel der Western Blot Analyse ist es, Proteine aus einer Lösung zu vereinzeln, nachzuweisen und zu quantifizieren. Dazu müssen zuerst die Proteine in der SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Grösse und ihrem molekularen Gewicht aufgespalten werden, indem sie auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen werden und im elektrischen Feld durch das Gel wandern. Das Polyacrylamidgel besteht aus zwei Komponenten, dem Sammelgel, in dem eine Verdichtung der Proteine zur schärferen Bandentrennung stattfindet und dem Trenngel, durch das die Proteine wandern. Danach wird der Strom senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt und die Proteine im Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran, an der sie durch hydrophobe Wechselwirkungen haften, übertragen. Dabei bleibt das Auftrennungsmuster der Elektrophorese erhalten. Bevor die Membran mit dem spezifischen primären Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert wird, müssen freie Bindungen geblockt werden. Anschließend werden ungebundene Antikörper durch mehrmaliges Spülen im Puffer wieder entfernt.

Der sekundäre Antikörper mit alkalischer Phosphatase ist gegen Strukturen des primären Antikörpers gerichtet und dient dem Sichtbarmachen der Proteine. Während der anschließenden Inkubation in dem Entwicklergemisch BCIP/NBT-Solution bildet die alkalische Phosphatase einen blauviolettten Farbstoff, der die gesuchte Proteinbande markiert.

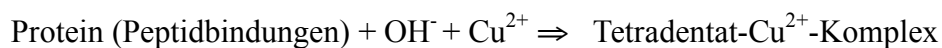
2.3.7 Schritte für Western Blot

2.3.7.1 Lysieren

Um das Ausgangsmaterial für den Western Blot zu gewinnen, mussten die Zellen nach Ablauf des Testintervalls lysiert werden. Das alte Kulturmedium wurde verworfen, die Zellen zweimal mit PBS (mit Ca^{2+} , Mg^{2+}) gespült und auf Eis gelagert, um einen zu schnellen Proteinabbau und Denaturierung zu verhindern. In jede Flasche wurde 400 μl Lysepuffer gegeben, der erst unmittelbar mit den Proteaseinhibitoren PMSF und Pepstatin versetzt wurde. Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers wurden die Zellen nach Ablauf von 15 min und 30 min Inkubationszeit mechanisch vom Flaschenboden gelöst. Durch Aufziehen und Ablassen mit einer Pipette wurde dieser Vorgang noch unterstützt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lysat in Eppendorf-Cups überführt und in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 4°C 30 min bei 9000 U zentrifugiert. Das Pellet mit den Zelltrümmern wurde verworfen und der Überstand mit den gelösten Proteinen in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C bis zur Proteinbestimmung eingefroren.

2.3.7.2 Gesamtproteinbestimmung

Chemische Grundlage der Proteinbestimmung sind folgende Reaktionen:



Im Alkalischen reduzieren Proteine in der Biuret-Reaktion Cu^{2+} zu Cu^+ . Dadurch entsteht ein eingefärbter Chelatkomplex mit Bicinchoninsäure, der fotometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen wurde. Die Bildung dieses Chelatkomplexes ist abhängig von der Proteinkonzentration im Lysat. Die Reagenzien stammten aus dem BC-Assay-Kit der Firma Up-tima. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) verwendet und pro Konzentration drei Felder mit 10 μl in einer 96-Well-Lochplatte damit befüllt. Außerdem wurden drei Blank-Felder und jeweils drei Wells pro Lysatprobe mit ebenfalls 10 μl versehen. Bevor die 96-Well-Lochplatte 30 min bei 60°C im Brutschrank inkubiert wurde, wurde noch 1 ml des frisch gemischten Reagenzgemesches dazugegeben. Die Proben wurden nach fotometrischer Messung auf einen Proteinwert von 150 $\mu\text{g/ml}$ durch Zugabe von Lysepuffer eingestellt.

2.3.7.3 Reduktion

Nach der Verdünnung mussten die Proben noch stabilisiert werden. Dazu wurde pro 1000 µl Probe 250 µl Probenpuffer und 62,5 µl Mercaptoethanol dazugegeben und unter dem Abzug 10 min bei 90°C im Thermoblock erhitzt. Danach war ein weiteres Denaturieren der Proben verhindert und sie konnten bei -20°C eingefroren werden.

2.3.7.4 SDS-Gelelektrophorese

Die gesuchten Proteine verlangten je nach ihrem Molekulargewicht die Herstellung von Gelen mit 7,5 oder 10 % Polyacrylamid. Nach Abschluss der Polymerisation konnten in die Gel-taschen 20 µl der jeweiligen Probe und ein Marker pipettiert werden. Die Gelelektrophorese gliedert sich in zwei Phasen, die Sammelgelphase, in der über 15 min bei 80 V die Proteine verdichtet werden, und der Trenngelphase, in der die Proteine 60 min bei 120 V je nach Größe und Gewicht schneller oder langsamer durch das Gel wandern. Zum Auffüllen des Behältnisses wurde Laufpuffer verwendet.

2.3.7.5 Western Blot

Die Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte nach der Sandwichmethode. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt und mit einer Nitrozellulose-Membran überdeckt. Der angelegte Strom von 120 V über 60 min lief dabei senkrecht zur vorherigen Richtung aus der Gelelektrophorese. Um der Wärmeentwicklung vorzubeugen wurde der mit Aqua dest. verdünnte Transferpuffer mit Eis gekühlt. Das anschließende Spülen über 30 min im Blockpuffer diente dem Abschirmen unspezifischer Bindungsstellen. Danach wurden die Membranen über 48 h mit in Blockpuffer gelöstem primären Antikörper inkubiert. Das geschah rollend bei 4-8°C im Dunkeln. Überschüssiger Antikörper wurde über 10 min durch dreimaliges Spülen in Blockpuffer entfernt und die Membranen wurden erneut über 120 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser wurde zuvor in einem Verhältnis von 1:4000 in Blockpuffer gelöst. Im sekundären Antikörper ist alkalische Phosphatase enthalten, die mit einem Substrat der Entwicklerlösung BCIP/NCP Solution eine Farbreaktion, die die Proteinbanden dunkelviolett anfärbt, eingeht. Nach Ablauf der Zeit wurde wieder überschüssiger Antikörper mit verdünntem Tris-Puffer über 30 min durch mehrmaliges Wechseln der Flüssigkeit abgespült. Zum Anfärben der Proteinbanden wurden die Membranen über 120 min in BCIP/NCP Solution im Dunkeln inkubiert. Diese wurde zuvor in einem Verhältnis von

1:5 mit Tris-Puffer verdünnt. Der Entwicklerschritt wurde durch mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. gestoppt. Danach mussten die Membranen im Dunkeln auf Filterpapier trocknen.

2.3.7.6 Densitometrische Auswertung

Um die Banden zu scannen und den Western Blot damit semiquantitativ auszuwerten stand das Programm Presto Mr. Photo (Version 1.5, New Soft Technology Corporation, Taipei Taiwan) zur Verfügung. Es wurde eine Auflösung von 2400 dpi gewählt. Die optometrischen Dichte der Banden wurde mit Hilfe des Programms AIDA (Advanced Image Data Analyser, Version 3.44.035, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Stuttgart) ermittelt, das einen Leerwert mit den markierten Banden verrechnet.

2.3.8 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Bilder der Elektronenmikroskopie konnten in Kooperation mit Professor Dr. Mehdi Shalibaei vom Institut für Anatomie der LMU München ermöglicht werden.

Als Inkubationsintervall wurden sechs Tage gewählt. Zur Vorbereitung wurde das Medium abgegossen und die Zellen wurden zweimal mit PBS gespült. Zur Fixierung wurde Karnovsky's Lösung in die Kulturflaschen gegeben, und die Zellen wurden mechanisch mit Zellschabern vom Flaschenboden gelöst. Nach Zentrifugation wurden die Zellen unter dem Abzug mit 2 % OsO₄ nachfixiert und überschüssiges Material durch Spülen mit Phosphat-Puffer (0,1 M) entfernt. Anschließend wurden die Zellen entwässert, wozu eine aufsteigende Alkoholreihe (10 % bis 96 %) vorbereitet wurde. Die Präparate wurden zweimal 15 min in Styrol gegeben und über die Nacht in einem Gemisch aus Styrol und Epon (1:1) konserviert. Die endgültige Einbettung in Flacheinbettungsformen erfolgte in Epon. Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Reichert-Jung Ultracut E präpariert und in einem Gemisch nach Reynolds aus 2 % Uranylacetat und Bleicitrat konserviert. Anschließend konnten die Präparate mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 10, Zeiss) fotografiert werden.

2.3.9 Immunhistochemische Untersuchungen

Der Vorteil der Immunhistochemie ist, dass die Lokalisation von intrazellulären und extrazellulären Proteinen unterschieden werden kann, weil die Zellen nicht durch das Lysieren wie beim Western Blot zerstört werden. Das Prinzip des Anfärbens beruht auf der Kopplung zweier Antikörper. Der primäre bindet spezifisch an das gesuchte Protein, der sekundäre mit

einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelte Antikörper bindet an den primären und macht damit indirekt das Protein im Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

2.3.9.1 Cytospin

Der Cytospin ist ein Verfahren, mit dem man die Zellen gleichmäßig auf ein bestimmtes Areal auf dem Objektträger aufbringen kann. Dazu wurden die Zellen nach Ablauf des Inkubationsintervalls durch Trypsin enzymatisch vom Flaschenboden gelöst und anschließend bei 1000 U 10 min zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert und anschließend in den Cytospin eingefüllt. Die Objektträger wurden nach einer Trocknungszeit von 120 min bei Raumluft noch 10 min in Aceton fixiert. Beim Cytospin war darauf zu achten, dass die Zellen möglichst keine Klumpen bildeten und sie sich nicht überlagerten.

2.3.9.2 Immunhistochemie

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf der Kopplung des primären Antikörpers mit einem sekundären, dem ein fluoreszierender Farbstoff angehängt ist. Eine Kontrolle des sekundären Antikörpers wurde ebenfalls mitgeführt. Um die Proteine anzufärben, mussten zuerst die unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper entfernt und blockiert werden. Dazu wurden die Objektträger 15 min in PBS mit 0,5 % BSA getaucht und anschließend zweimal mit PBS gespült, um überschüssiges BSA zu entfernen. Der primäre Antikörper wurde 1:10 bis 1:40 verdünnt, 10 μl auf den Objektträger gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zweimal mit PBS gespült, der sekundäre Antikörper aufgebracht und erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch einen 10 minütigen Waschschrift mit PBS entfernt. Zum Schutz vor Austrocknung und Auskristallisierung wurde 0,1 % p-Phenylendiamin in Glycerin und PBS gelöst und ein Tropfen der Lösung auf die Zellen aufgebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Da der Farbstoff schnell verblasst, wurden die Objektträger sofort fotografiert.

2.3.9.3 Fotografie und semiquantitative Auswertung

Von jedem Objektträger wurden fünf Bilder von unterschiedlichen Regionen angefertigt und als Bilddatei gespeichert. Die Objektträger wurden verblindet beurteilt, d. h. sie wurden von einer zweiten Person angereicht, um subjektive Einflüsse durch Kenntnis der Konzentration und des Testintervalls auszuschließen. So wurde auch bei der Auswertung verfahren und erst später wurde die Zuordnung zur Substanz, Konzentration und Tag vorgenommen.

Die Fluoreszenz wurde bei allen Objektträgern in einem vorher definierten Kreis gemessen, der eine möglichst konstante Anzahl an Zellen enthielt. Ausgeschlossen wurden Bereiche mit Zellklumpen, Artefakten, starkem Hintergrundleuchten oder Areale mit mehr oder weniger als 20 Zellen. Das Programm Scion Image (Scion Image Corporation, Frederick, Maryland, USA) zur semiquantitativen Auswertung erzeugt von jedem Foto ein Graustufen- und ein Farbbild. Aus dem monochromen Bild wurde ein Schwarz-Weiß-Bild hergestellt. Das Farbbild wird mit dem Schwellenwert-Verfahren zum Binär-Bild in Beziehung gesetzt. Dabei entspricht ein schwarzer Punkt im invertierten Schwarz-Weiß-Bild einem fluoreszierenden Protein im originalen Farbbild. Mit der Formel $\text{Fluoreszenz (\%)} = (\text{Messwert} \times 100) / \text{Gesamtfläche}$ wurde der gemessene Wert zum Schwarzwert in Beziehung gesetzt und in Prozent ausgedrückt.

3 Ergebnisse

Damit die Phthalate DEHP und MEHP im wässrigen Kulturmedium gelöst werden konnten, brauchten sie DMSO als Vehikel. Um Effekte von DMSO selbst an den SerW₃-Zellen auszuschließen, wurde in Vorversuchen die DMSO-Konzentration von 0,1 % als unbedenklich ermittelt. Zu allen drei Messzeitpunkten (Tag eins, drei und sechs) der Versuche zeigte DMSO keine Veränderungen an den behandelten Zellen der SerW₃-Zelllinie bei Zellzählungen, Western Blot Analysen und immunhistologischen Untersuchungen, so dass die Vehikel-Kontrolle als Referenz genommen werden konnte.

3.1 Lichtmikroskopie

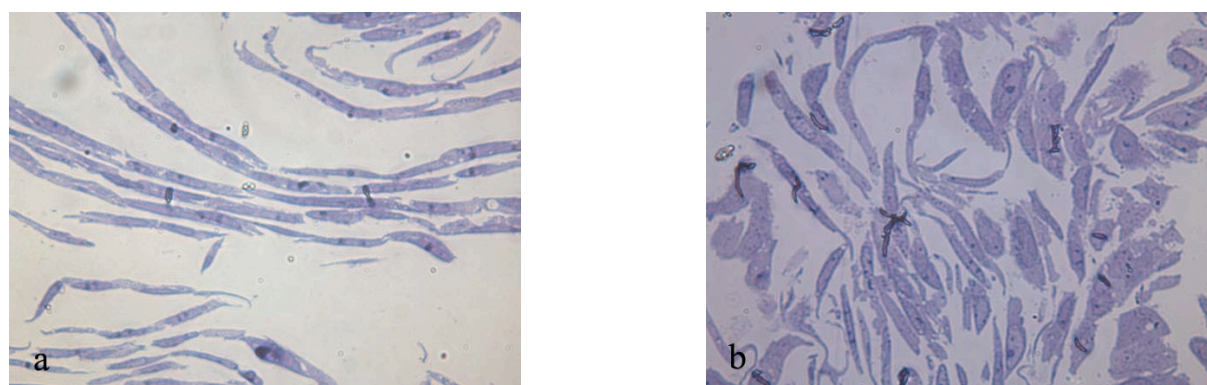


Abbildung 2: SerW₃-Zellen in der Lichtmikroskopie nach Inkubation mit MEHP über sechs Tage, Vehikel-Kontrolle mit DMSO (a), 100 μ M MEHP (b), Vergrößerung x 100

Auf den lichtmikroskopischen Bildern werden die morphologischen Veränderungen während der Inkubation mit MEHP über sechs Tage deutlich (Abb. 2). Auf dem Bild der Vehikel-Kontrolle mit DMSO (a) liegen die Zellen in einem dichten Zellverband, die Zellkerne sind oval und langgestreckt, und die Zellkörper haben eine schlanke Form. Die Zell-Zell-Kontakte sind eng und die Interzellularspalten schmal. Nach sechs Tagen Inkubation mit 100 μ M MEHP (b) ist der Zellverband aufgelöst, und die engen Zell-Zell-Kontakte sind verloren gegangen. Die Zellen haben sich abgerundet. Die Zellkerne sind stark vergrößert, angeschwollen und haben ihre längliche Form verloren.

3.2 Elektronenmikroskopie

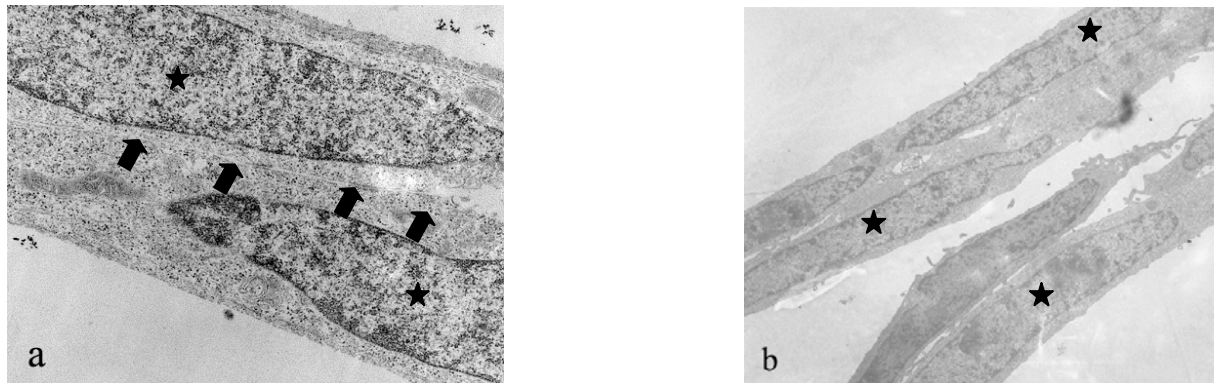


Abbildung 3: SerW₃-Zellen in der Elektronenmikroskopie nach sechs Tagen Inkubation mit DMSO als Vehikel-Kontrolle, Bild a: die Zellkerne sind schmal und langgestreckt (★), das Kernchromatin ist im ganzen Kern verteilt, die Interzellularspalten mit Desmosomen sind schmal (➡), Bild b: dichter Zellverband mit langgestreckten Zellen und Zellkernen (★), Vergrößerung x 15000 (Bild a), x 5000 (Bild b)

Auf den elektronenmikroskopischen Bildern konnten die Veränderungen, die auf den lichtmikroskopischen Bildern beobachtet wurden, bestätigt werden (Abb. 3). Es zeigte sich nach sechs Tagen Inkubation mit der Vehikel-Kontrolle DMSO ein dichter Zellverband mit schmalen Zellkernen, in denen das Kernchromatin homogen verteilt ist (★). Die Zellen sind lang und schmal, die Interzellularspalten sind eng. Es ließen sich Desmosomen als wichtiger Bestandteil der Blut-Hoden-Schranke darstellen, über die die Zellen miteinander verbunden sind (➡). Als Zeichen vitaler Zellen mit hoher Syntheseleistung und Aktivität sind reichliche Mitochondrien, Endoplasmatische Retikula (ER) und Golgi-Apparate vorhanden.

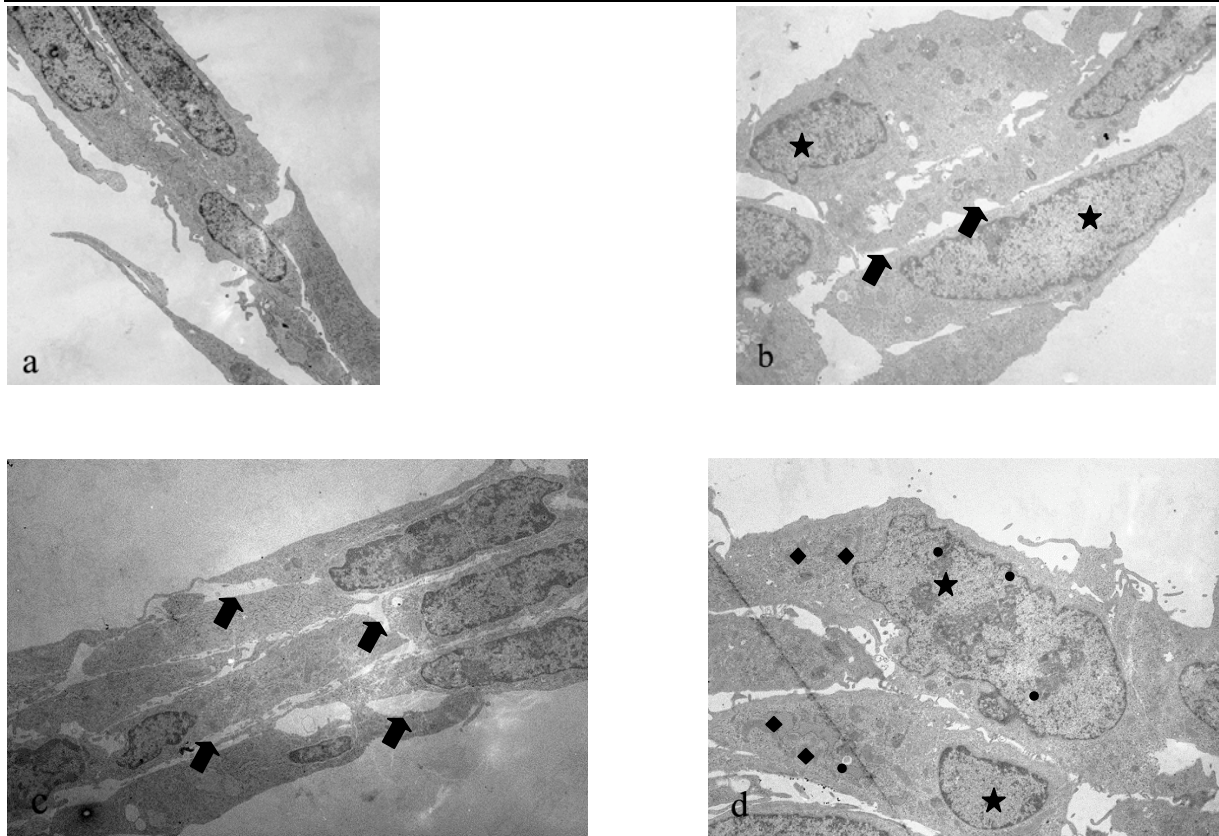


Abbildung 4: SerW₃-Zellen in der Elektronenmikroskopie nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP, exemplarisch wurden die Konzentrationen 0,1 μM (a), 1 μM (b) und 100 μM (c, d) dargestellt, der Zellverband hat sich zunehmend aufgelöst (\blacktriangleright), die Zellorganellen sind vergrößert, die Zellkerne haben ihre langgestreckte Form verloren (\star), es haben sich Vakuolen im Zell- und Kernchromatin gebildet (\bullet), die Zellorganellen sind vergrößert (\blacklozenge), Vergrößerung x 5000 (a, c), x 10000 (b, d)

Die morphologischen Veränderungen auf den elektronenmikroskopischen Bildern nach sechstägiger Inkubation mit MEHP sind deutlich zu erkennen. Exemplarisch wurden die Konzentrationen 0,1 (a), 1 (b) und 100 μM (c, d) ausgewählt (Abb. 4). Der Zellverband ist deutlich aufgelockert, die Zellen haben keinen Kontakt mehr untereinander (\blacktriangleright). Es sind weite Interzellularspalten zu sehen und die Zellen scheinen geschrumpft. Die langgestreckten Zellausläufer sind nicht mehr vorhanden. Besonders deutlich sind die Veränderungen in der höchsten Konzentration von 100 μM (c) zu erkennen. Die Zellkerne haben ihre regelmäßige längliche Form verloren. Sie haben sich abgerundet (\star). Das Kernchromatin ist an den Zellkernrand gedrängt und nicht mehr homogen verteilt. Die Kernmembran beginnt sich aufzulösen und ist mit Vakuolen durchsetzt (\bullet). Die Zellorganellen sind stark vergrößert (\blacklozenge). Die Mitochondrien haben ihre Christae verloren oder sind stark vergrößert und erweitert. Das ER und der Golgi-Apparat sind stark aufgebläht. Die Syntheseleistung und Aktivität der Zellen sind stark eingeschränkt durch die Veränderungen der Zellorganellen.

3.3 Ergebnisse der Immunhistologie

Die Effekte von DEHP, MEHP und CdCl₂ sollten mit der Methode der immunhistologischen Analyse semiquantitativ untersucht werden. Dafür wurden die SerW₃-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen über sechs Tage inkubiert. Um Veränderungen durch DEHP, MEHP und CdCl₂ miteinander vergleichen zu können, wurden bei allen die gleichen Konzentrationen im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle bzw. zu einer unbehandelten Kontrolle eingesetzt. Allerdings konnten aufgrund des hohen zelltoxischen Potentials von CdCl₂ die Konzentrationen von 10 µM und 100 µM nicht getestet werden, da es schon nach wenigen Stunden zu einem vollständigen Absterben der SerW₃-Zellen kam.

Es wurde mit einem Fünffachansatz gearbeitet und eine Kontrolle des sekundären Antikörpers mitgeführt, um eine eigene Fluoreszenz von ihm auszuschließen. Zur Darstellung möglicher Effekte auf die SerW₃-Zellen und ihrer Zell-Zell-Kontakte wurden verschiedene Antikörper gegen Connexin 43, N-Cadherin, Occludin, β₁-Integrine und Vimentin eingesetzt. Es fällt sofort die für die SerW₃-Zellen untypische runde Form auf (Abb. 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20, 22, 24, 26, 30, 32, 34, 36 und 38). Diese entsteht durch das vereinzelt Schleudern der Zellen auf einen Objektträger während der vorbereitenden Arbeitsschritte.

3.3.1 DEHP

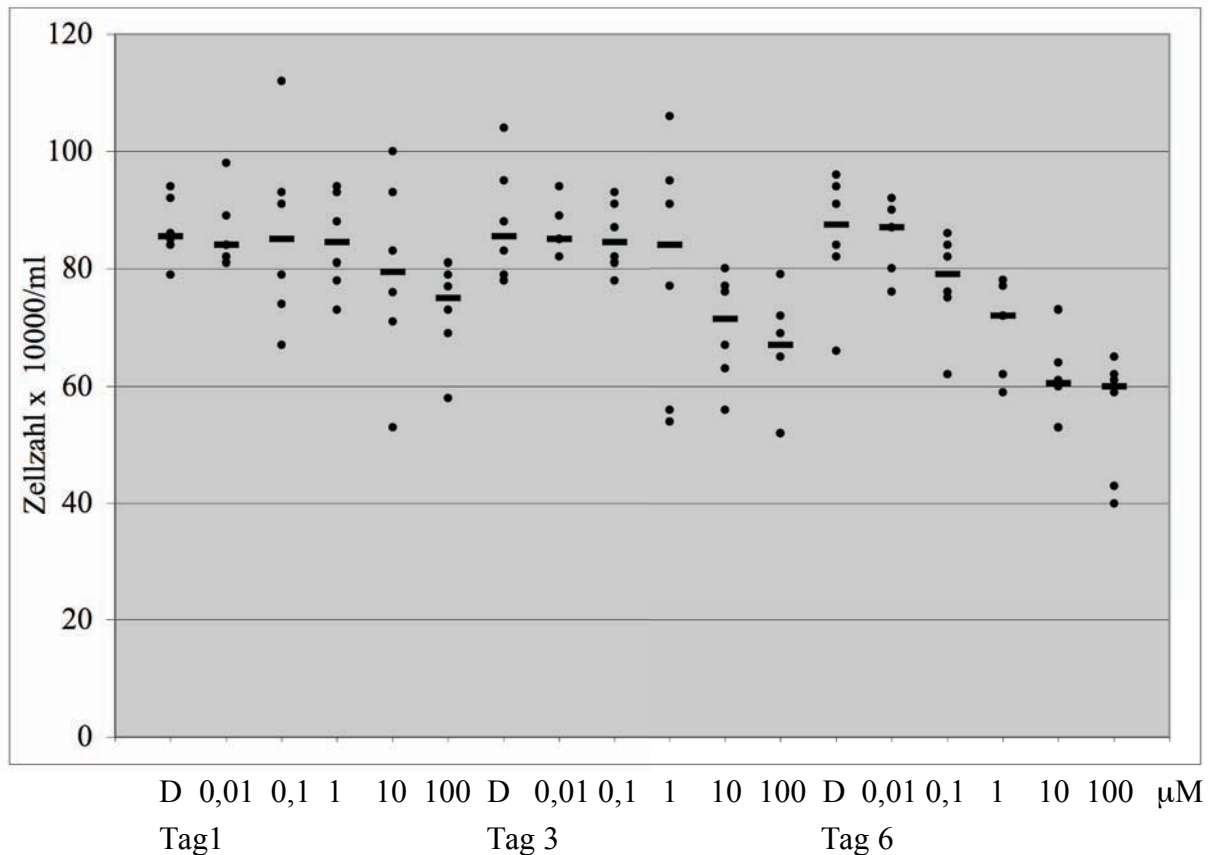


Abbildung 5: Darstellung der absoluten Zellzahlen pro ml in einer Grafik nach Inkubation über einen, drei und sechs Tage mit DEHP, dargestellt sind sechs Zählungen pro Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D), die Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (●) und der Medianwert (–)

Die Darstellung der Medianwerte der absoluten Zellzahlen nach den Inkubationsintervallen von einem, drei und sechs Tagen mit DEHP zeigt im Vergleich zur Kontrolle eine Abnahme der Zellzahlen in den höchsten Konzentrationen von 10 μM und 100 μM nach einem Tag um 8 % und 16 % und nach drei Tagen um 16 % und 22 %. Ebenfalls kann man der Abbildung 5 nach sechs Tagen bei den Konzentrationen 0,1 und 1 μM Zellzahlreduktionen von 10 % und 18 % sowie bei 10 und 100 μM jeweils 31 % entnehmen. Insgesamt wurden die geringsten Effekte bei Konzentrationen <1 μM nach einem und drei Tagen festgestellt, es besteht also eine eindeutige Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit.

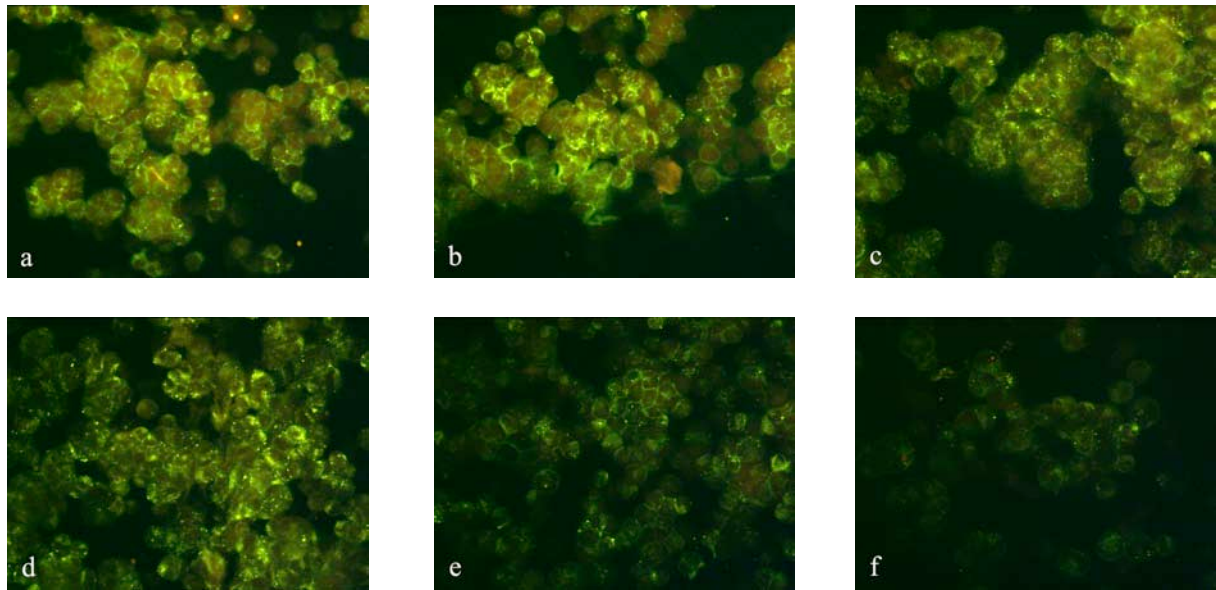
Connexin 43

Abbildung 6: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d), 10 µM (e), 100 µM (f)

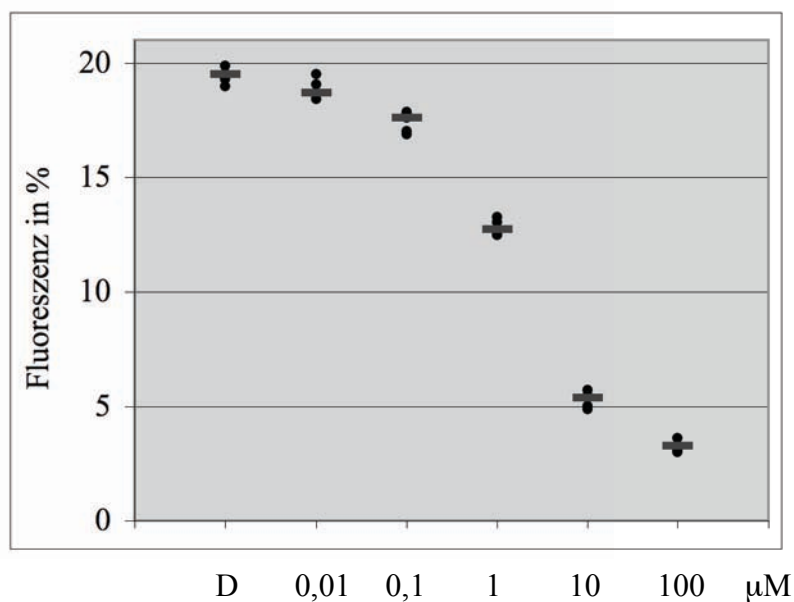


Abbildung 7: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM DEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

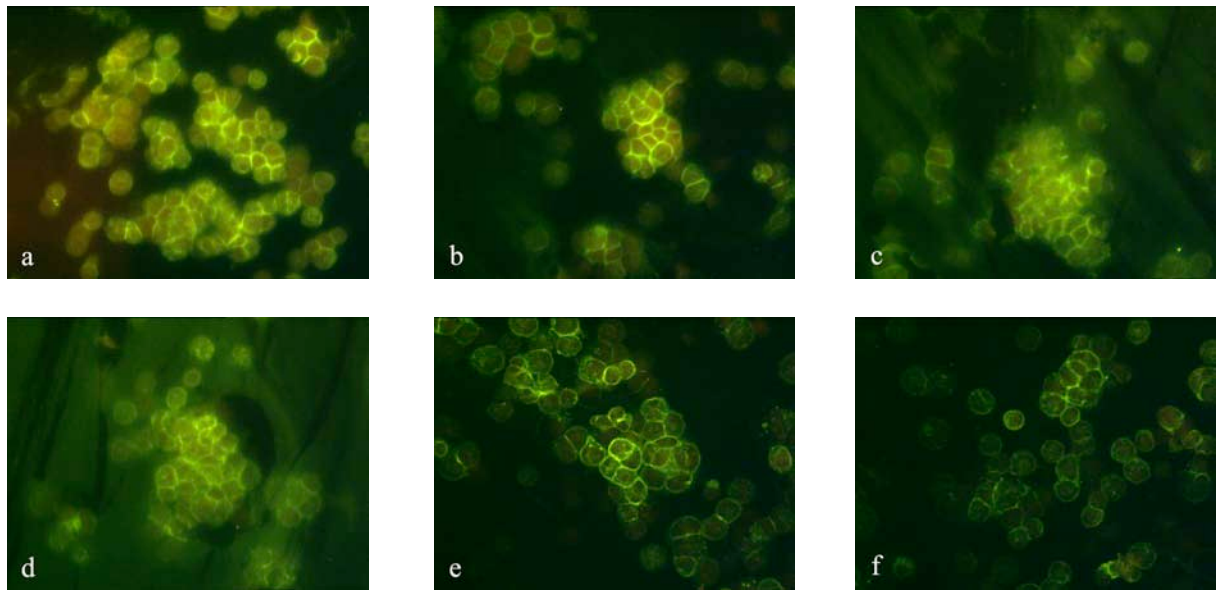
N-Cadherin

Abbildung 8: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μM (b), 0,1 μM (c), 1 μM (d), 10 μM (e), 100 μM (f)

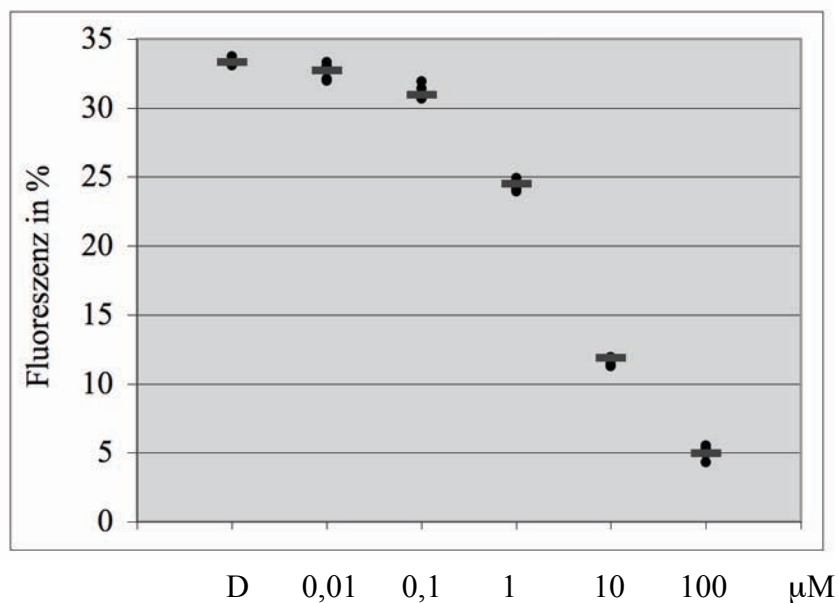


Abbildung 9: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM DEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

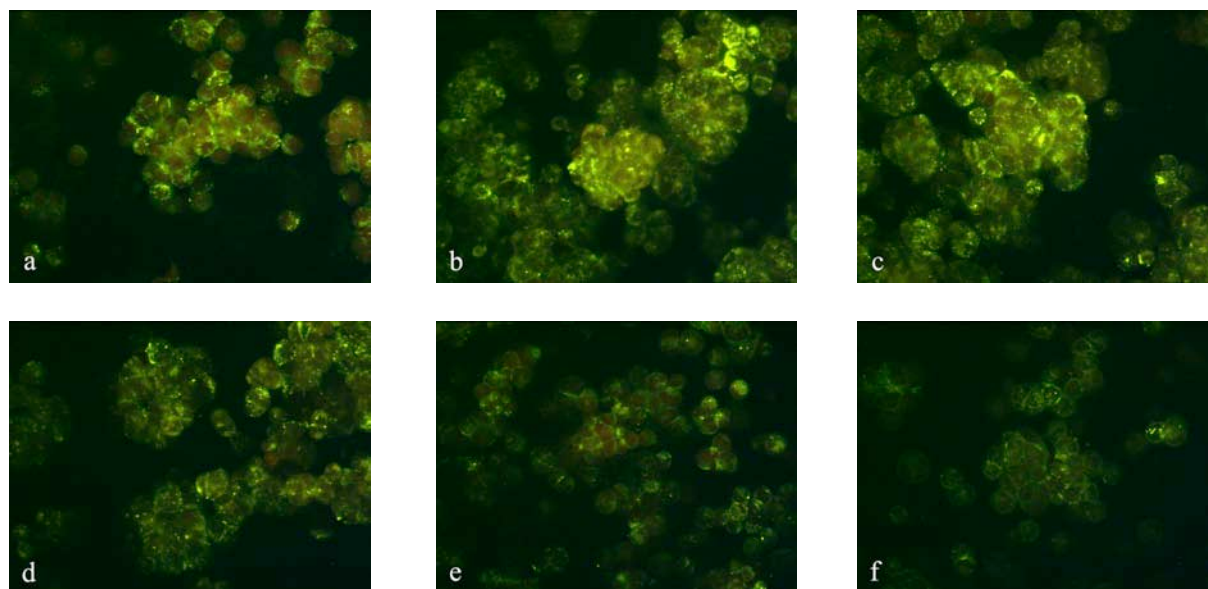
Occludin

Abbildung 10: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d), 10 µM (e), 100 µM (f)

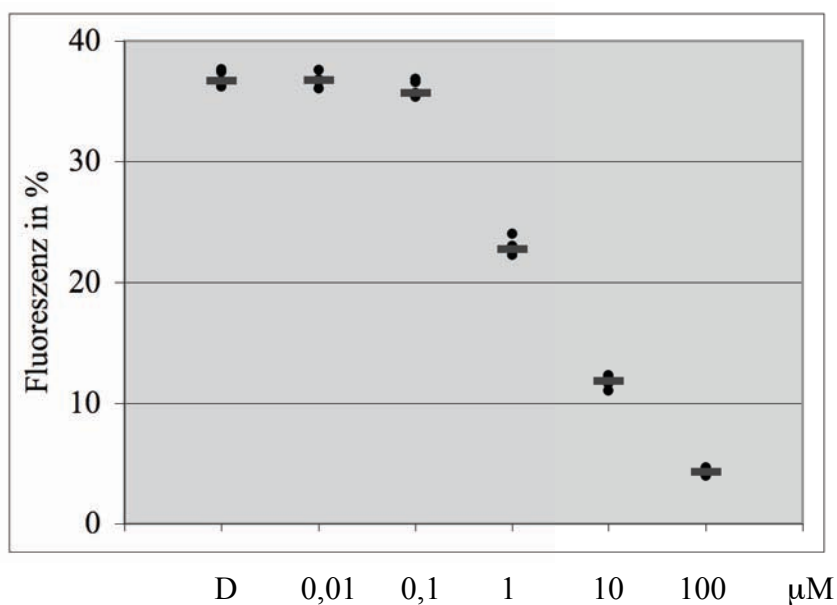


Abbildung 11: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM DEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

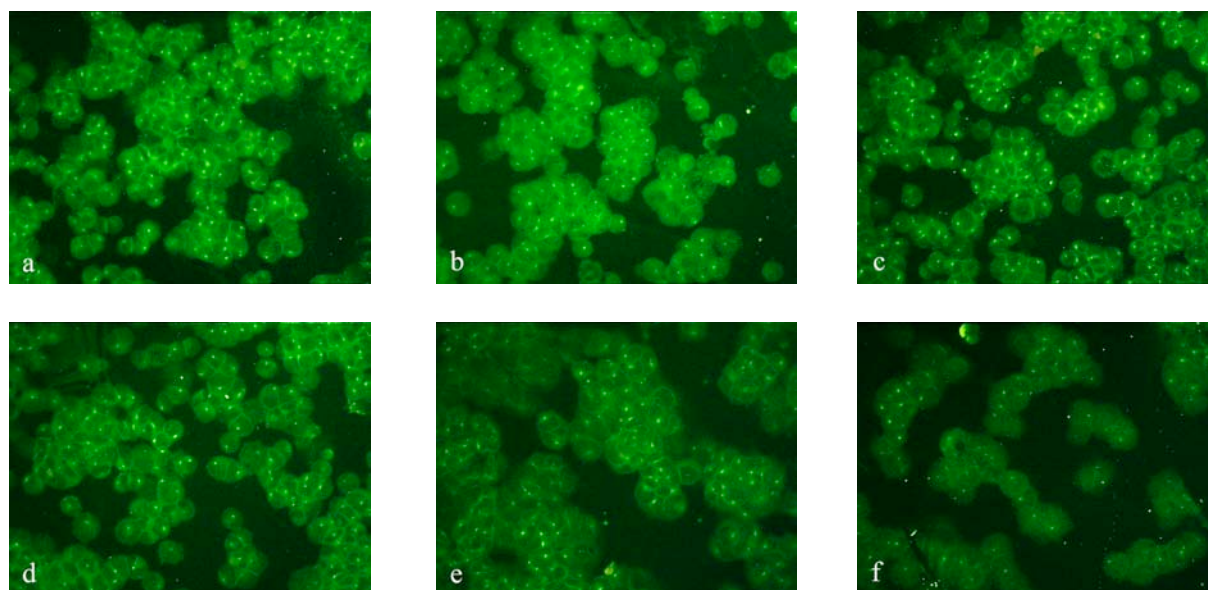
β_1 -Integrine

Abbildung 12: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μ M (b), 0,1 μ M (c), 1 μ M (d), 10 μ M (e), 100 μ M (f)

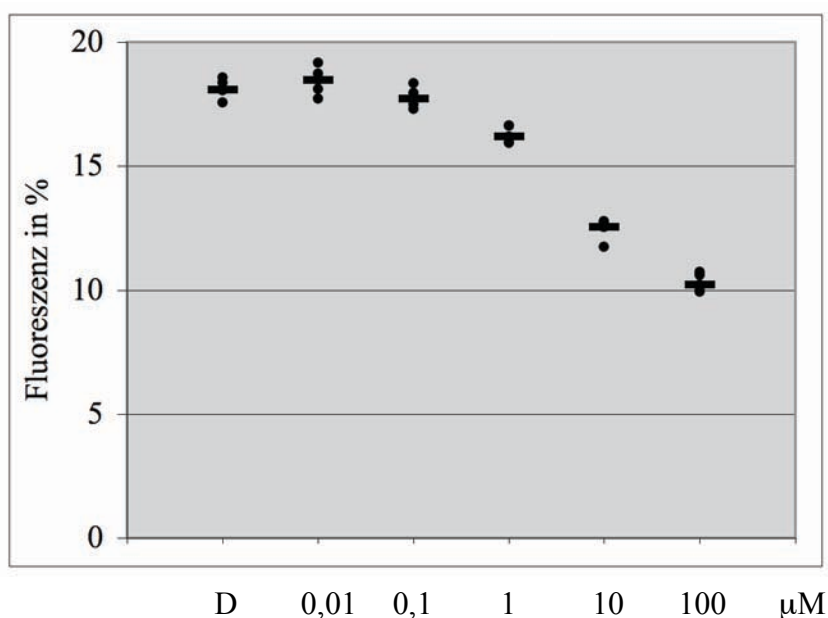


Abbildung 13: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M DEHP und einer Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

Vimentin

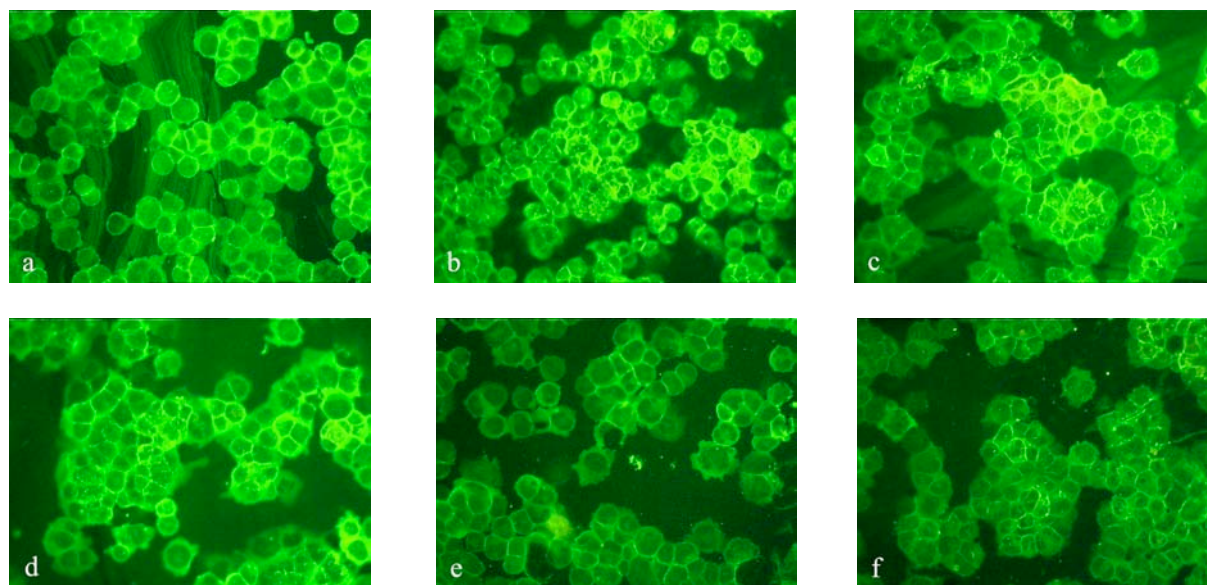


Abbildung 14: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d), 10 µM (e), 100 µM (f)

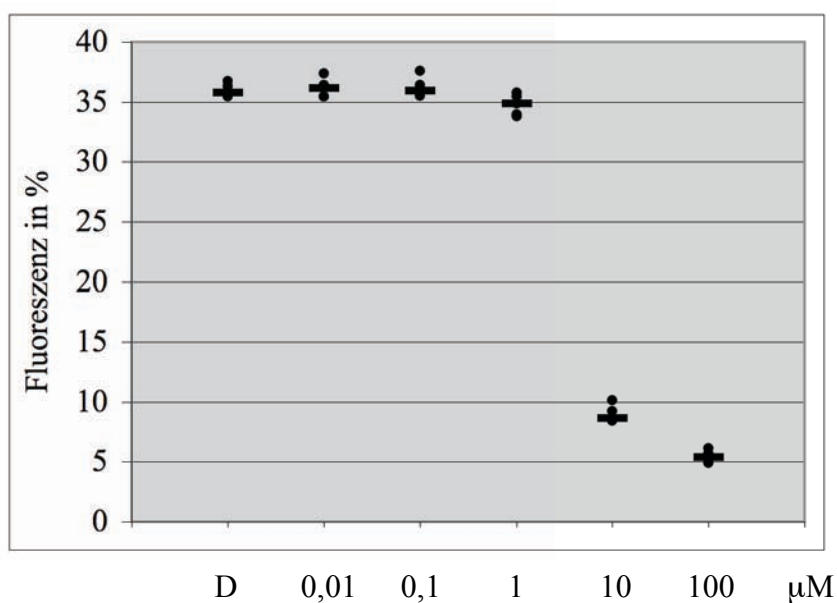


Abbildung 15: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM DEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

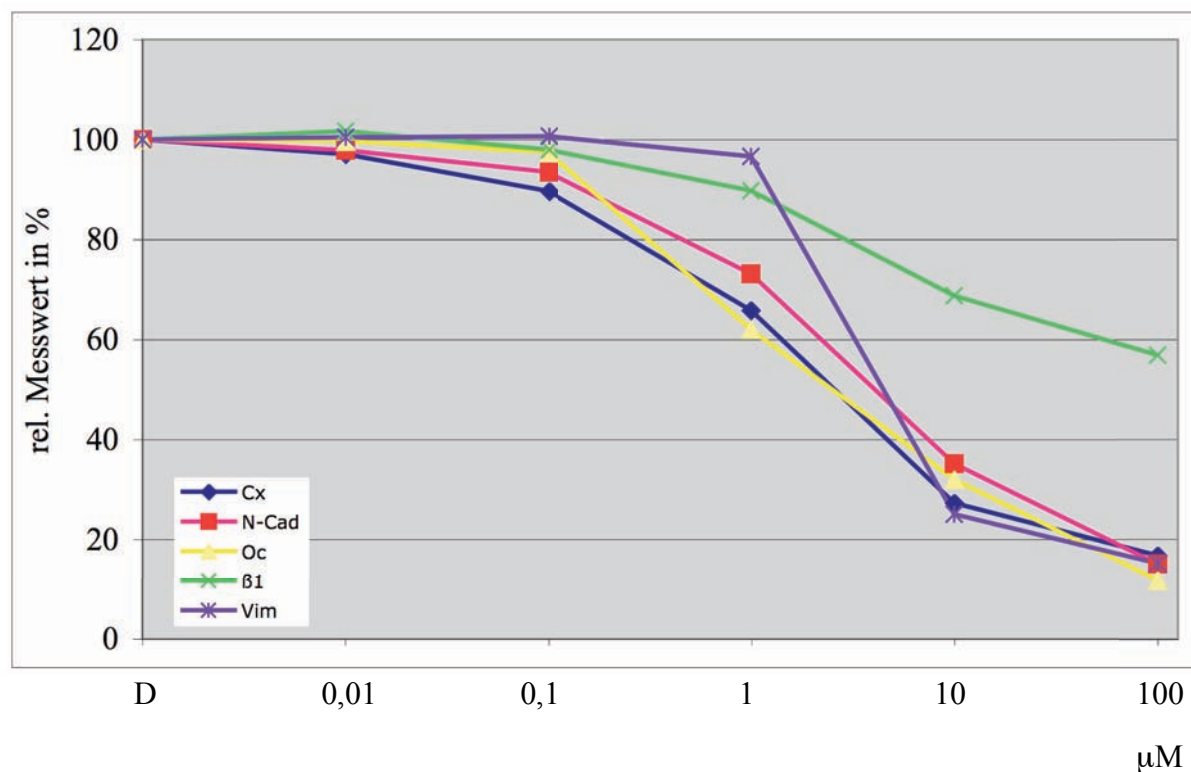


Abbildung 16: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse nach DEHP-Exposition der Sertoli-Zellen, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲), β_1 -Integrine (β_1 ×) und Vimentin (Vim*) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (jeweils Medianwerte)

Auf den Abbildungen 6, 8, 10, 12 und 14 zeigen die Zellen der Vehikel-Kontrolle (a) und die Zellen mit den geringsten DEHP-Konzentrationen von 0,01 μM (b) und 0,1 μM (c) nach sechs Tagen eine starke Fluoreszenz. Dagegen kann man gut bei den höchsten Konzentrationen von 10 μM (e) und 100 μM (f) eine Fluoreszenzabnahme erkennen. Zur Verdeutlichung wurden die Mediane der absoluten Fluoreszenzwerte (Abb. 7, 9, 11, 13 und 15) in Relation zum Median der Vehikel-Kontrolle mit DMSO gesetzt und grafisch dargestellt (Abb. 16). Dabei fällt auf, dass bei Vimentin der Median des Fluoreszenz-Wertes bis 1 μM DEHP konstant bleibt und bei 10 μM auf 24 % und bei 100 μM auf 15 % fällt. Die geringste Fluoreszenz-Abnahme zeigt sich insgesamt bei den β_1 -Integrinen. Auch hier finden sich kaum Veränderungen bis 1 μM und dann Abnahmen von 30 % erst ab 10 μM . Bei den Antikörpern Connexin 43, N-Cadherin und Occludin bleibt bis 0,1 μM ein hoher Fluoreszenzwert erhalten, während die Werte der Mediane bei 100 μM bis auf 10-15 % absinken. Die größte Veränderung ist bei allen drei Antikörpern zwischen 1 μM und 10 μM zu sehen.

3.3.2 MEHP

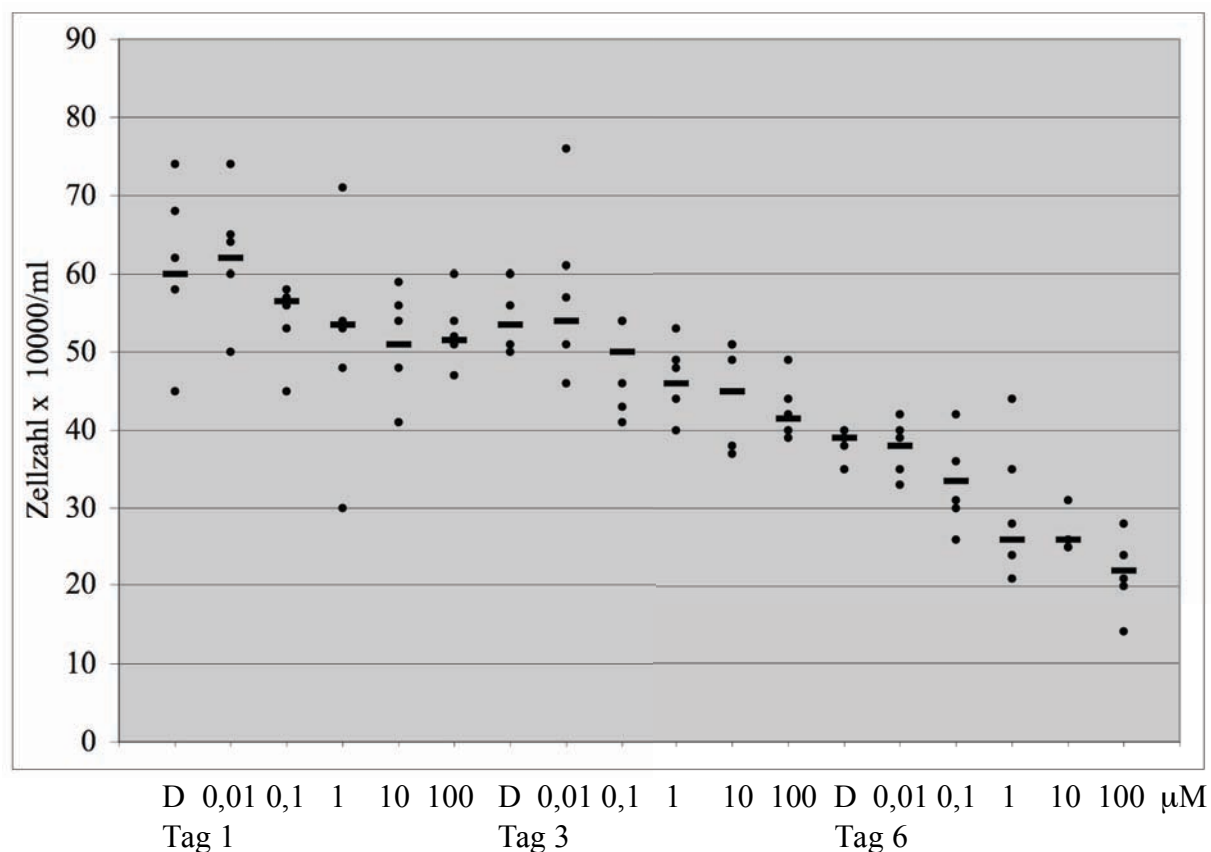


Abbildung 17: Darstellung der absoluten Zellzahlen pro ml in einer Grafik nach Inkubation über einen, drei und sechs Tage mit MEHP, dargestellt sind sechs Zählungen pro Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D), die Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (●) und der Medianwert (—)

Im Vergleich zu DEHP werden deutlichere Effekte bei mit MEHP behandelten SerW₃-Zellen bereits nach einem Tag mit einer Abnahme der Medianwerte der absoluten Zellzahlen von 5 bis 15 % ab den Konzentrationen 0,1 bis 100 μM erkennbar (Abb. 17). Nach Tag drei und sechs sieht man Abnahmen im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle bei 0,1 μM von 7 % und 14 %, bei 1 μM von 14 % und 33 %, bei 10 μM von 16 % und 33 % und bei 100 μM von 22 % und 44 % (Abb. 17).

Connexin 43

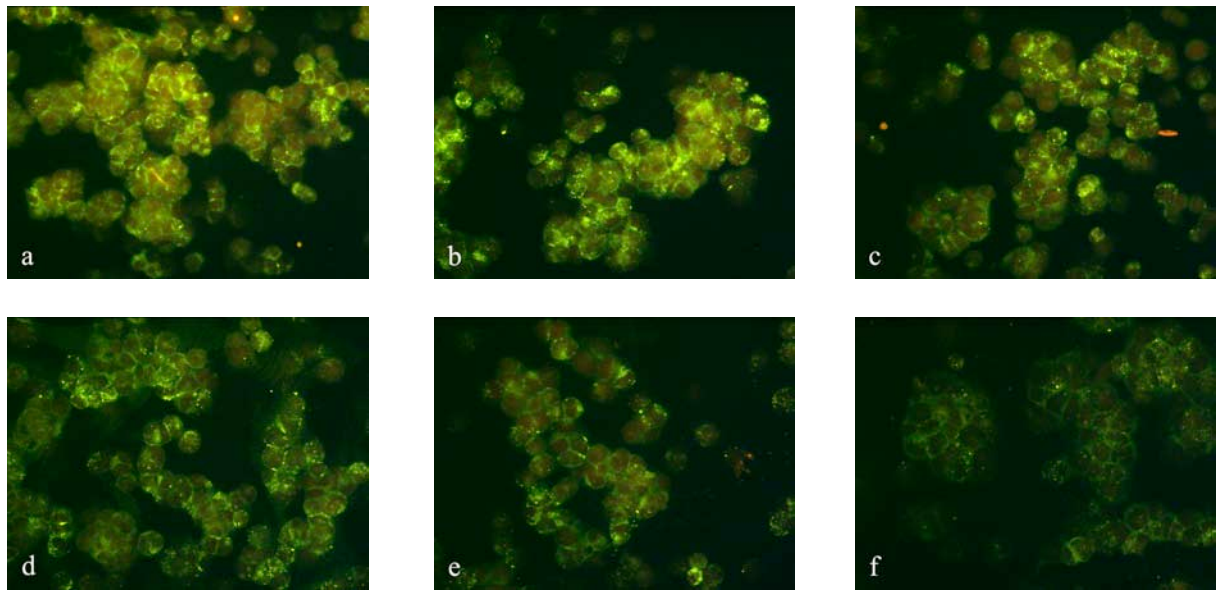


Abbildung 18: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μM (b), 0,1 μM (c), 1 μM (d), 10 μM (e), 100 μM (f)

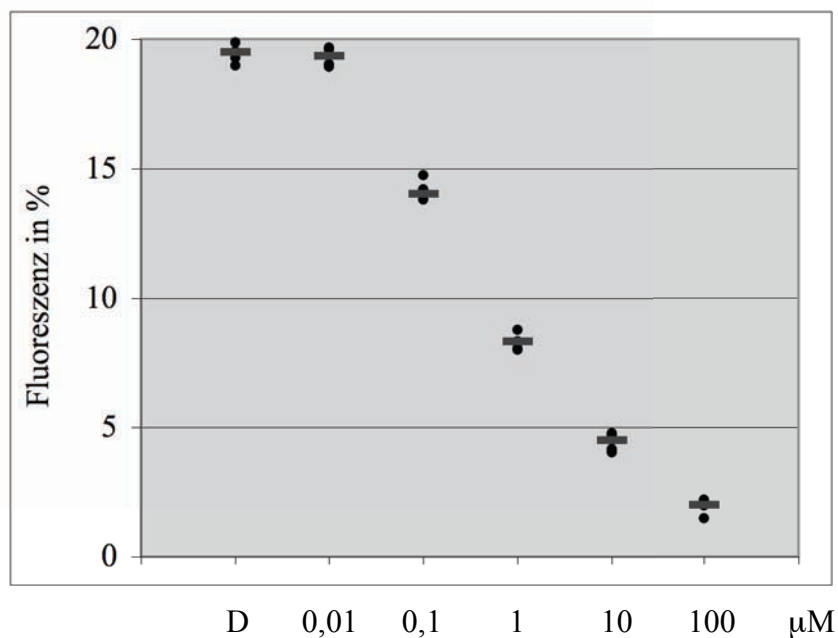


Abbildung 19: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM MEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

N-Cadherin

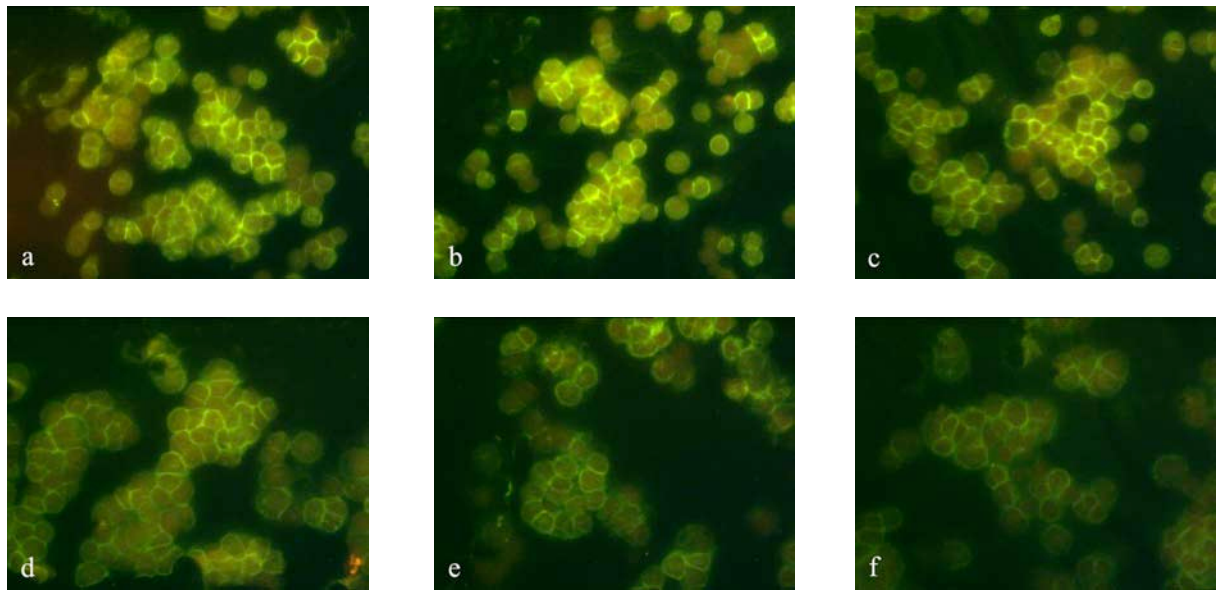


Abbildung 20: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μ M (b), 0,1 μ M (c), 1 μ M (d), 10 μ M (e), 100 μ M (f)

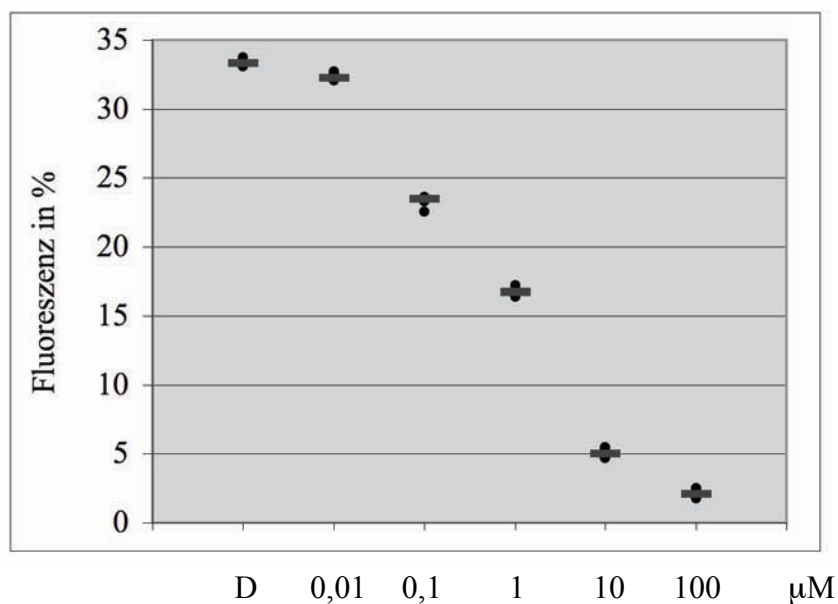


Abbildung 21: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M MEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (•)

Occludin

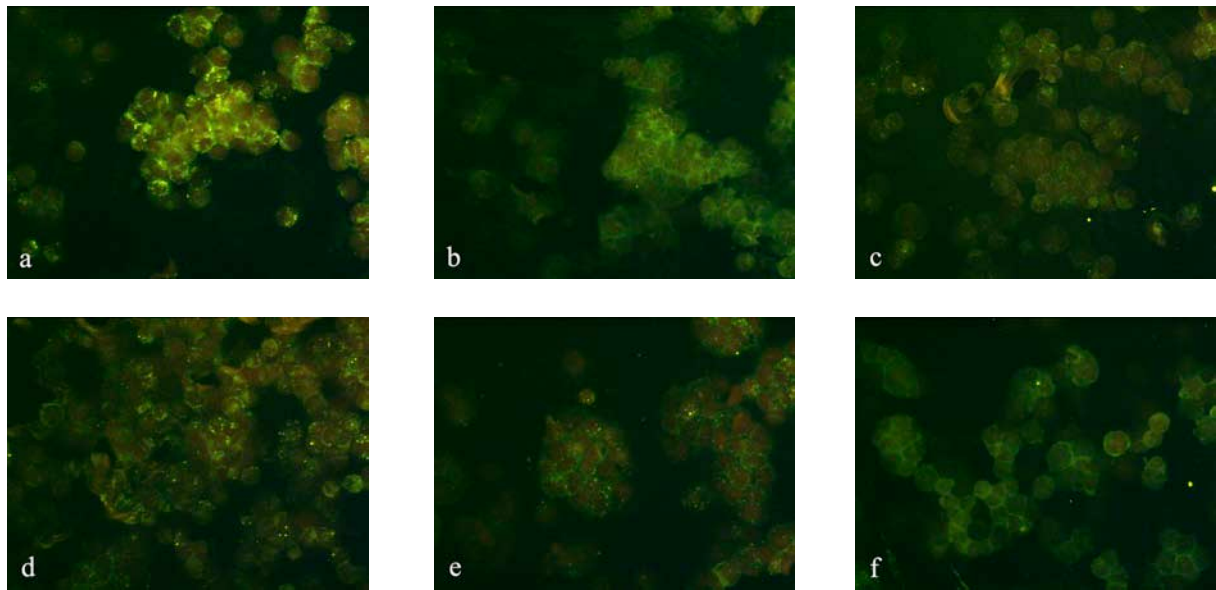


Abbildung 22: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d), 10 µM (e), 100 µM (f)

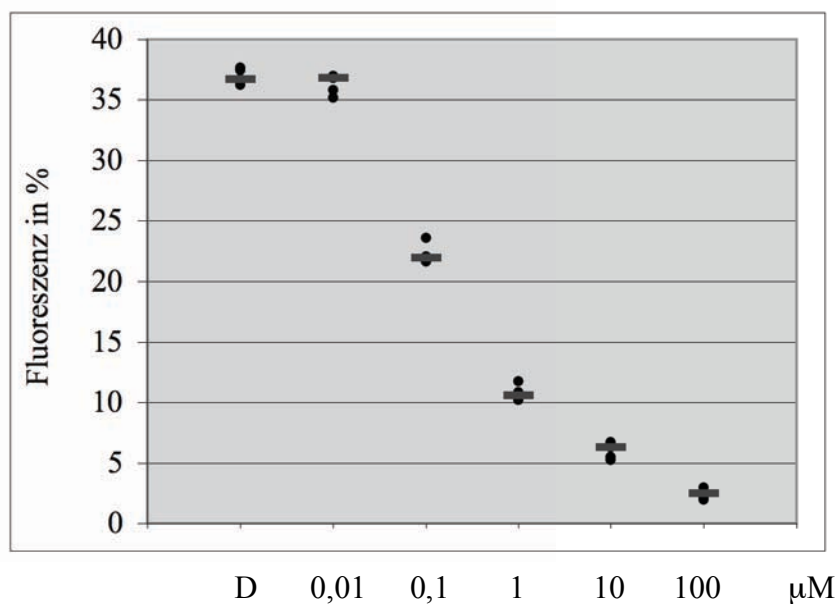


Abbildung 23: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM MEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

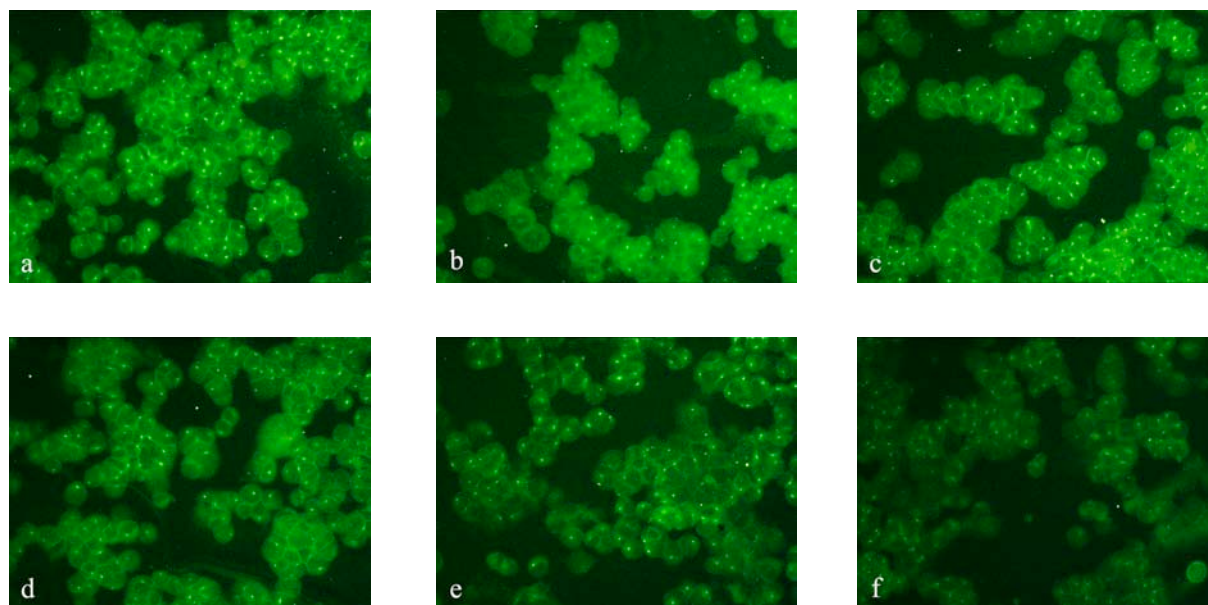
β_1 -Integrine

Abbildung 24: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μ M (b), 0,1 μ M (c), 1 μ M (d), 10 μ M (e), 100 μ M (f)

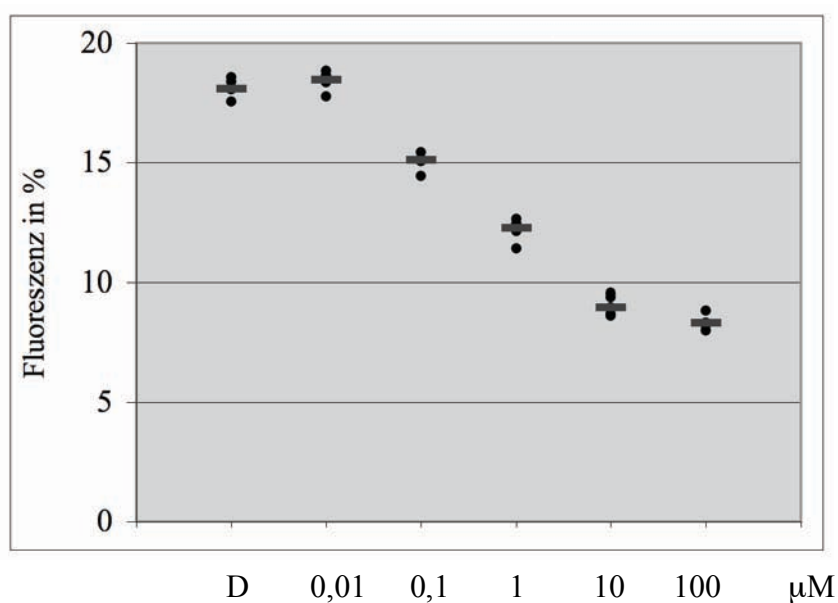


Abbildung 25: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M MEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

Vimentin

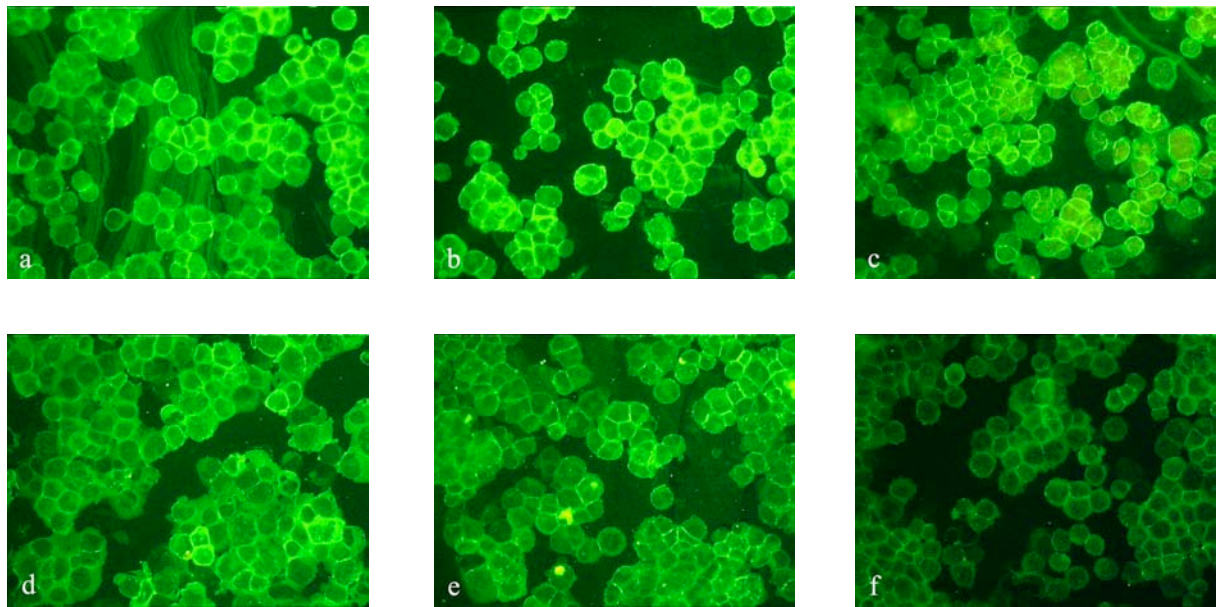


Abbildung 26: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP und Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin: Vehikelkontrolle mit DMSO (a), 0,01 μM (b), 0,1 μM (c), 1 μM (d), 10 μM (e), 100 μM (f)

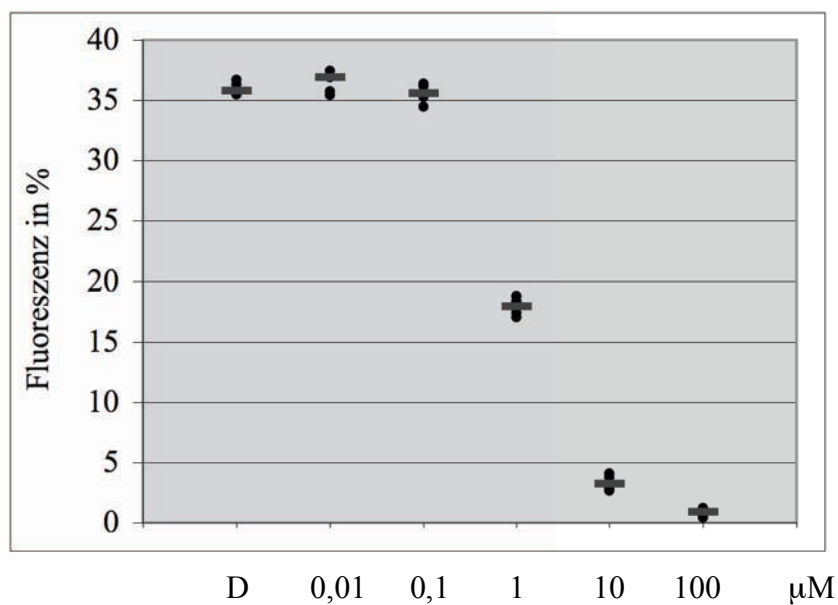


Abbildung 27: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM MEHP und einer Vehikelkontrolle mit DMSO (D), Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (•)

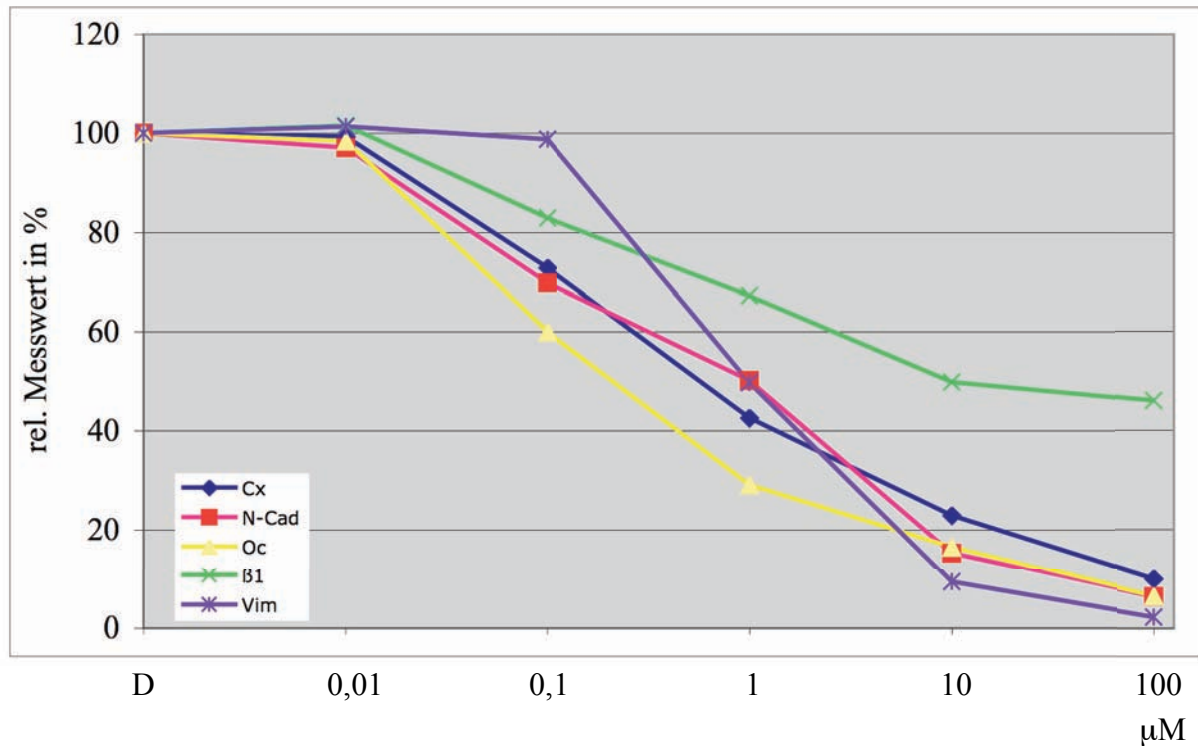


Abbildung 28: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse nach MEHP-Exposition der Sertoli-Zellen, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲), β_1 -Integrine (β_1 ×) und Vimentin (Vim*) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (jeweils Medianwerte)

Nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP zeigen die gemessenen Intensitäten der Immunfluoreszenz von Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und β_1 -Integrin ein deutliches Verblasen bereits ab 0,1 μM und bei Vimentin ab 1 μM MEHP (Abb. 18, 20, 22, 24 und 26). Im Vergleich zur Kontrolle finden sich kaum Veränderungen bei allen Antikörpern nach Behandlung mit 0,01 μM MEHP (Abb. 19, 21, 23, 25 und 27). Verglichen mit den anderen Antikörpern erkennt man in der Grafik (Abb. 28) bei den β_1 -Integrinen mäßige Abnahmen der Medianwerte um 16 %, 32 %, 50 % und 54 % bei 0,1 μM bis 100 μM MEHP. Die stärksten Intensitätsverminderungen in Relation zur Kontrolle sind bei Occludin mit Medianwerten von 60 % bei 0,1 μM , 29 % bei 1 μM , 16 % bei 10 μM und 7 % bei 100 μM zu erkennen. Ebenfalls auffällig sind bei Vimentin die sprunghaften Intensitätsverluste bei 1 μM um 50 % und bei 10 μM um 91 %. Bei Färbungen mit dem Antikörper N-Cadherin erkennt man einen sprunghaften Abfall der Fluoreszenz zwischen 1 μM und 10 μM mit Medianwerten von 50 und 15 % in Bezug zum Median der Kontrolle. Connexin 43 weist Medianwerte ab 0,1 μM MEHP von 72

%, 43 %, 23 % und 10 % auf. Bei Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und Vimentin geht die Fluoreszenz bei 100 μM fast vollständig zurück.

3.3.3 CdCl_2

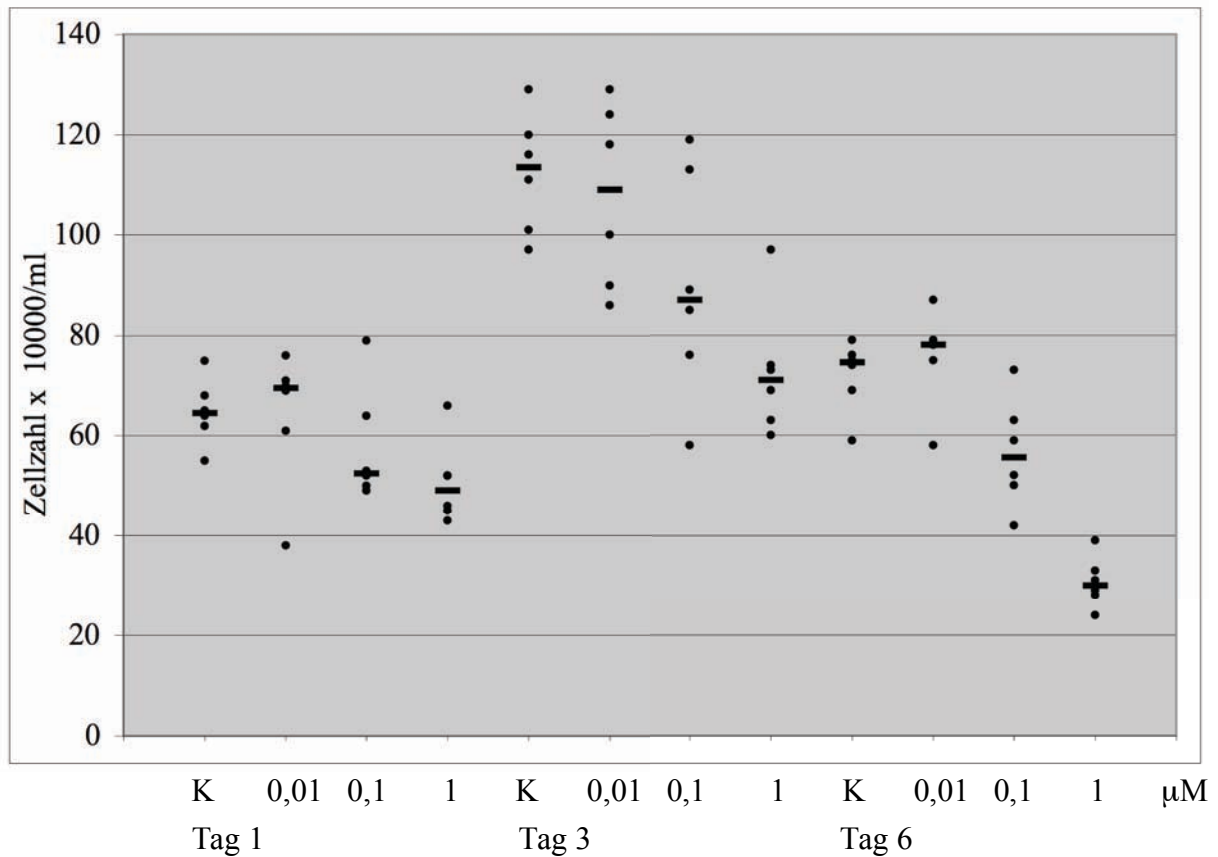


Abbildung 29: Darstellung der absoluten Zellzahlen pro ml in einer Grafik nach Inkubation über einen, drei und sechs Tage mit CdCl_2 , dargestellt sind sechs Zählungen pro unbehandelter Kontrolle (K) und den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 μM (●) und der Medianwert (—)

Am Ende der Behandlungen der SerW₃-Zellen mit CdCl_2 zeigen die Mediane der absoluten Zellzahlen nach einem, drei und sechs Tagen bereits deutliche Abnahmen bei den Konzentrationen mit 0,1 und 1 μM . Die Medianwerte der unbehandelten Kontrolle (K) und der niedrigsten Konzentration mit 0,01 μM zeigten in allen untersuchten Intervallen kaum Unterschiede. Bei 0,1 μM werden nach einem Tag Abnahmen von etwa 19 %, nach drei Tagen von 23 % und nach sechs Tagen von 26 % sichtbar. Stärkere Abnahmen finden sich bei 1 μM mit 24 %, 37 % und 59 %.

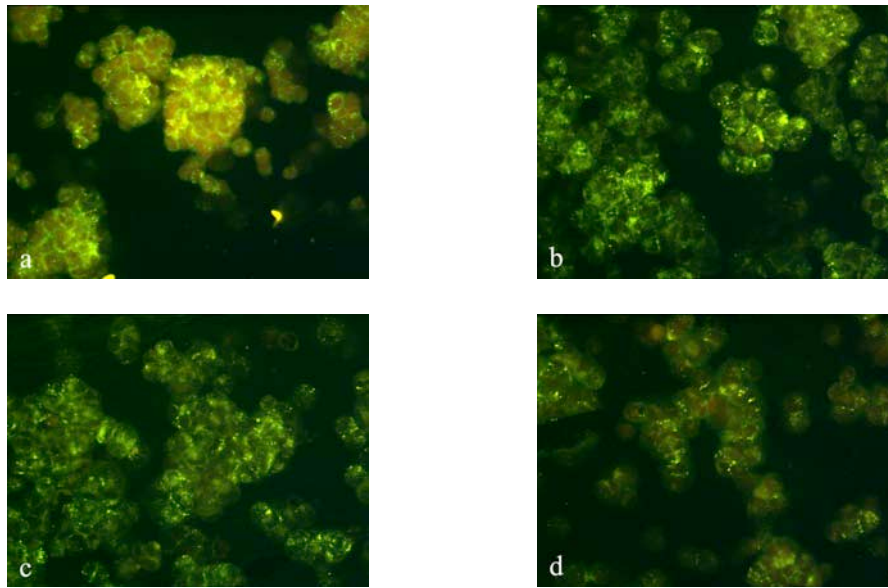
Connexin 43

Abbildung 30: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ und Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43: unbehandelte Kontrolle (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d)

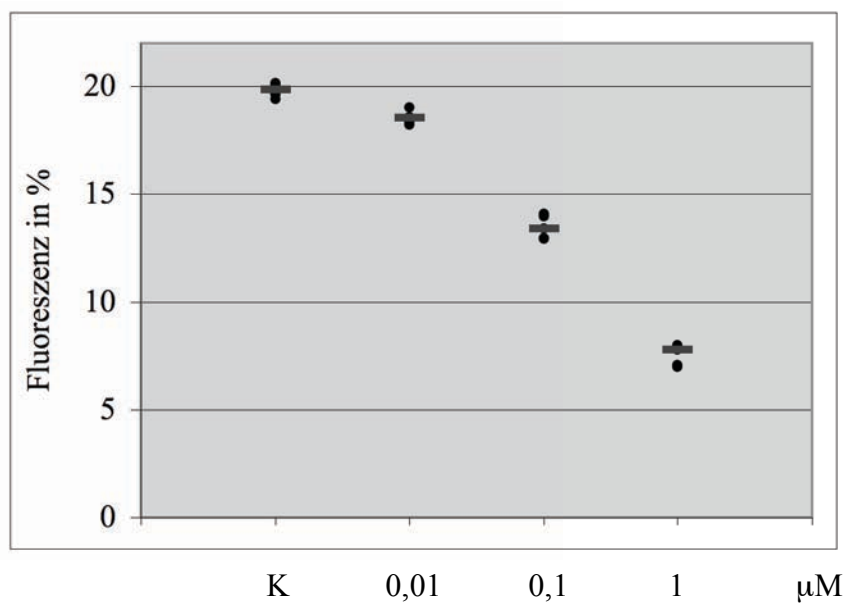


Abbildung 31: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1 µM CdCl₂ und einer unbehandelten Kontrolle, Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

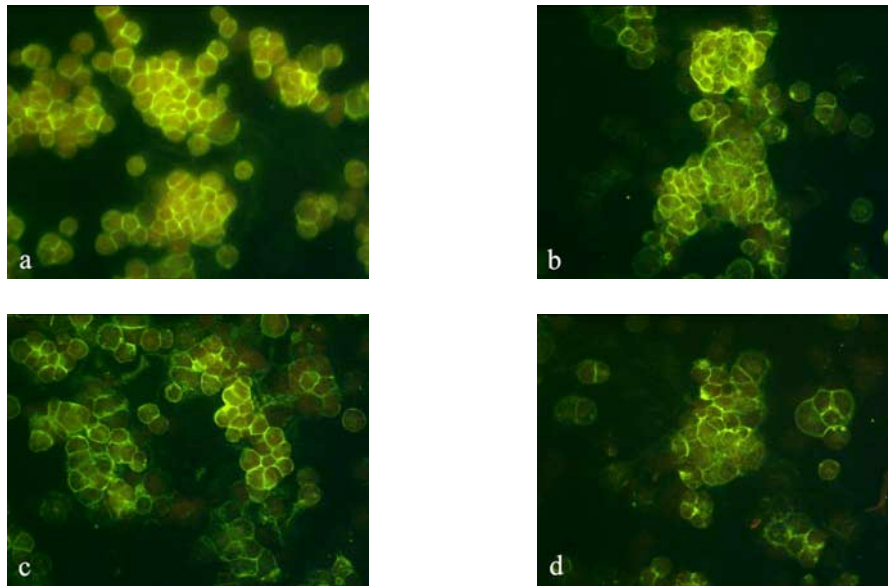
N-Cadherin

Abbildung 32: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ und Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin: unbehandelte Kontrolle (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d)

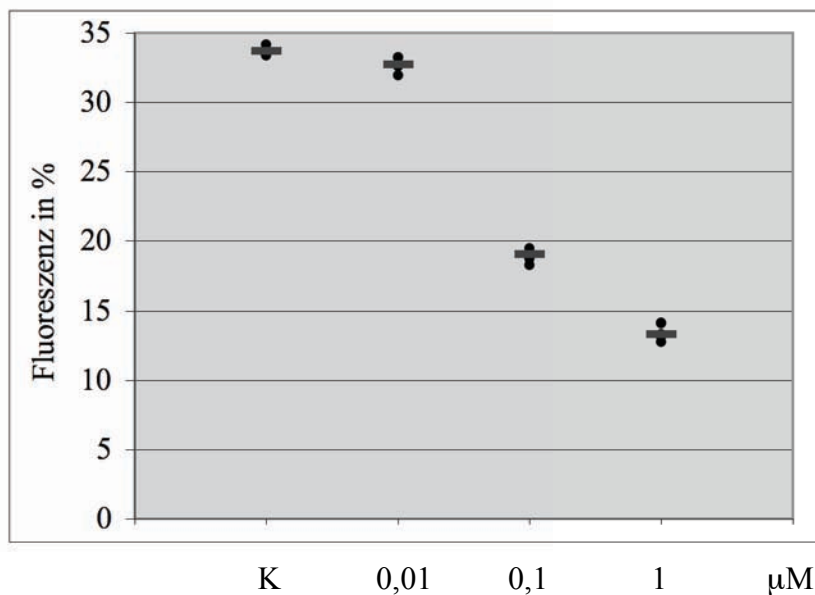


Abbildung 33: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1 µM CdCl₂ und einer unbehandelten Kontrolle, Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

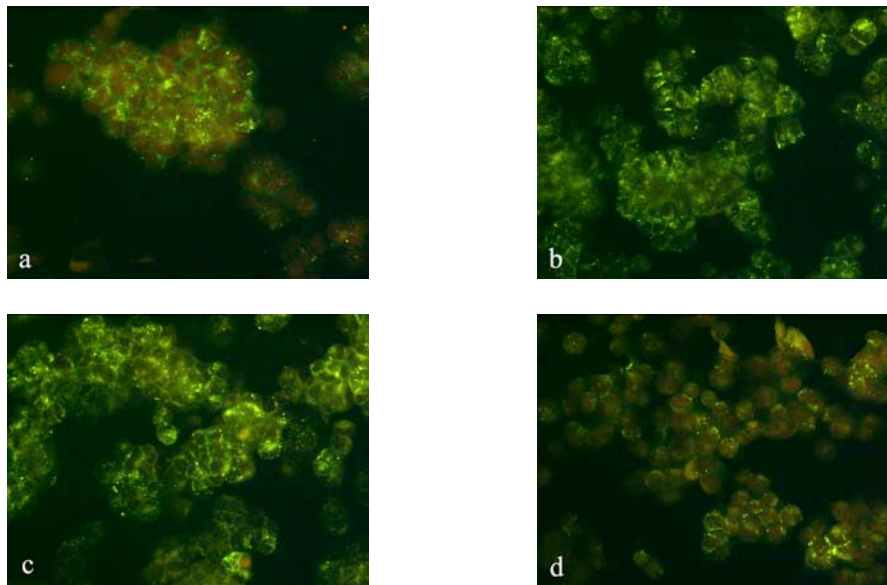
Occludin

Abbildung 34: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ und Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin: unbehandelte Kontrolle (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d)

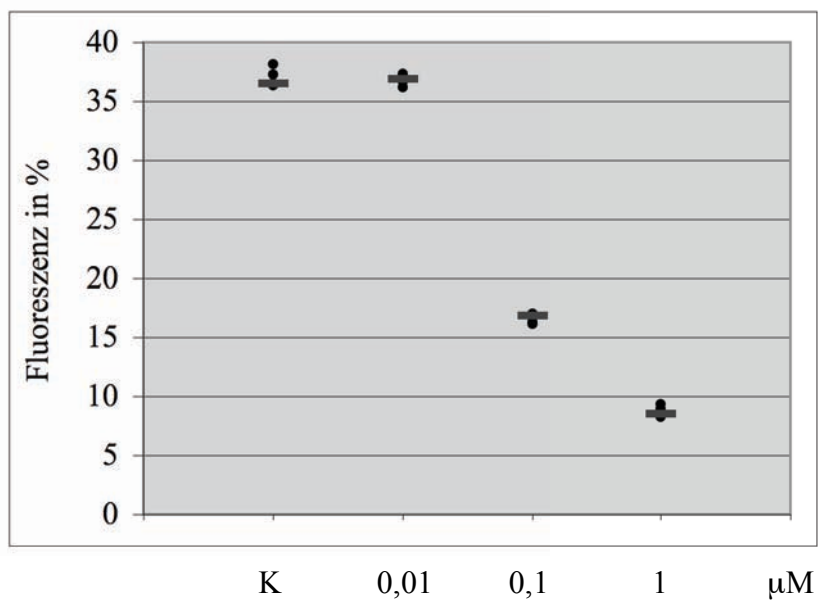


Abbildung 35: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1 µM CdCl₂ und einer unbehandelten Kontrolle, Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

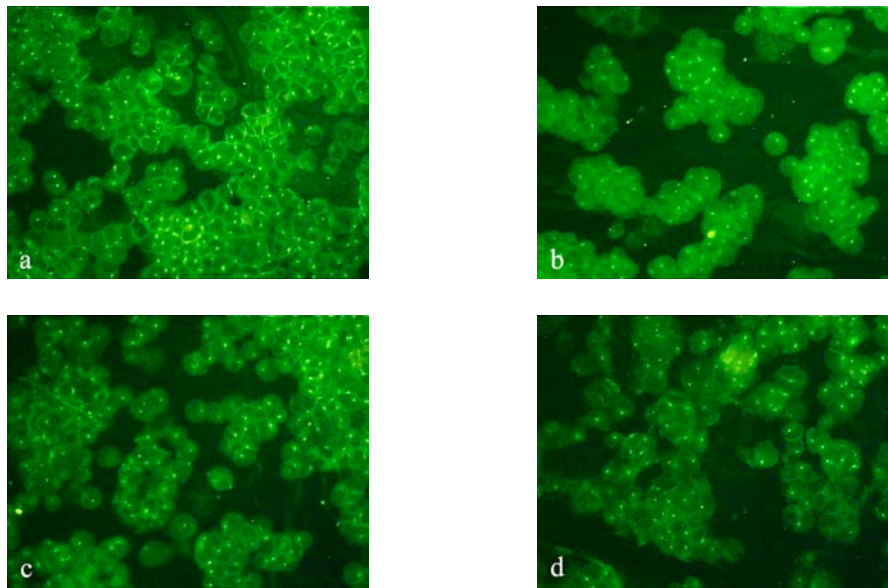
β_1 -Integrine

Abbildung 36: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ und Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine: unbehandelte Kontrolle (a), 0,01 μ M (b), 0,1 μ M (c), 1 μ M (d)

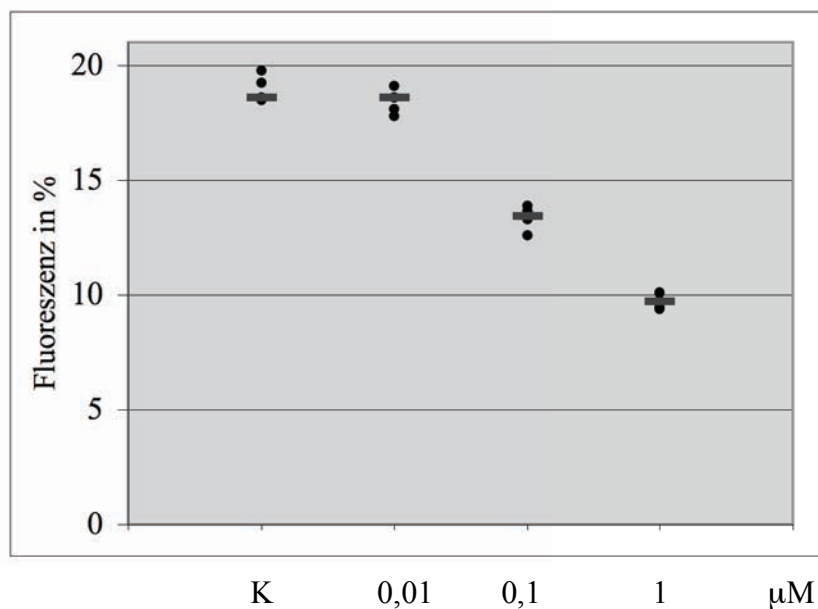


Abbildung 37: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1 μ M CdCl₂ und einer unbehandelten Kontrolle, Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (●)

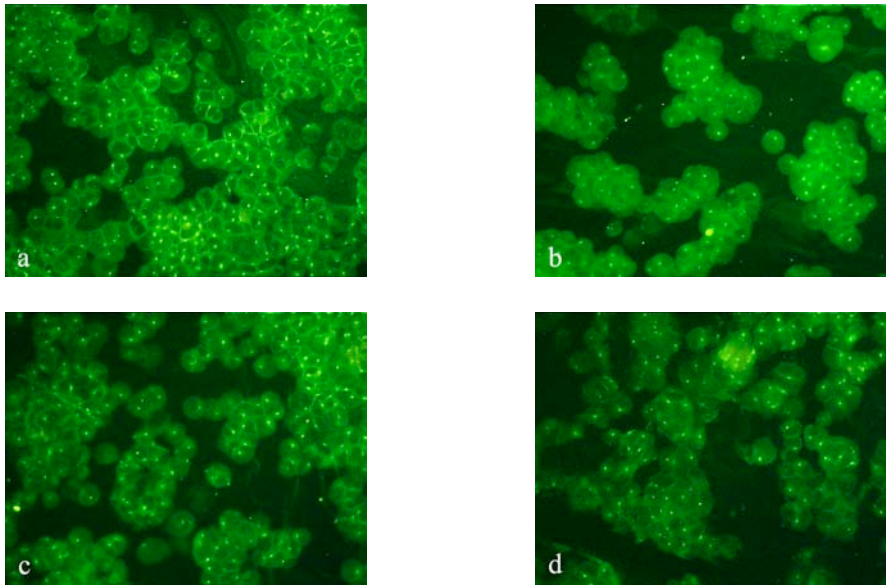
Vimentin

Abbildung 38: Bilder der immunhistologischen Analyse der SerW₃-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ und Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin: unbehandelte Kontrolle (a), 0,01 µM (b), 0,1 µM (c), 1 µM (d)

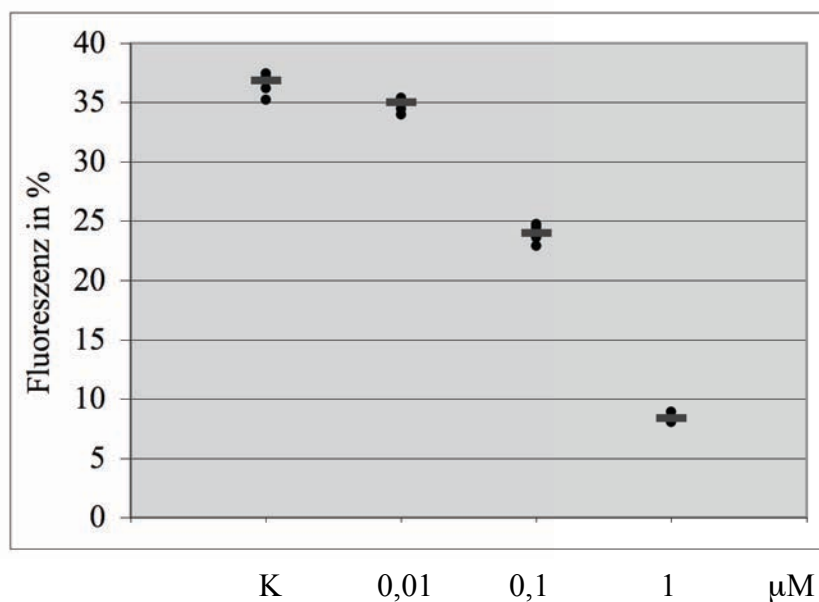


Abbildung 39: Ergebnisse der immunhistologischen Analyse in einer grafischen Darstellung nach sechs Tagen Inkubation der SerW₃-Zellen mit 0,01, 0,1, 1 µM CdCl₂ und einer unbehandelten Kontrolle, Färbung mit einem Antikörper gegen Vimentin, Abbildung des Medianwertes (—) und fünf Messwerten pro Konzentration (•)

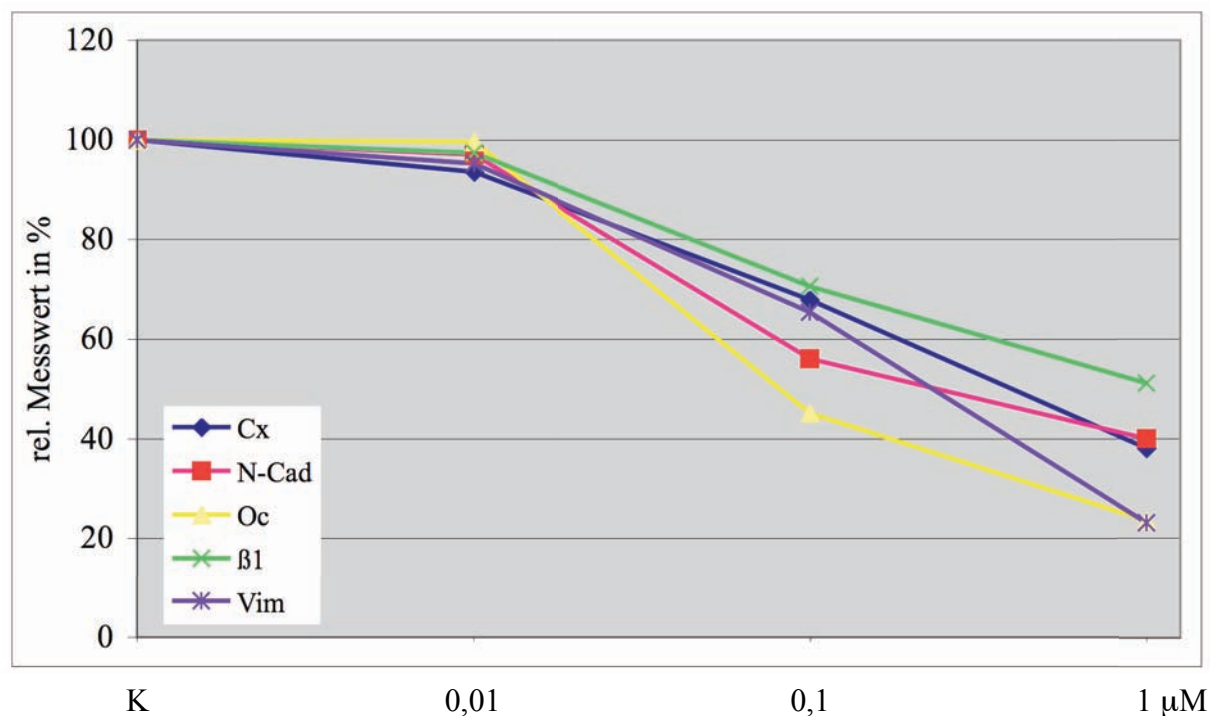


Abbildung 40: Grafische Darstellung der immunhistologischen Ergebnisse nach CdCl_2 -Exposition der Sertoli-Zellen, abgebildet wurde die relative prozentuale Fluoreszenzabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲), β_1 -Integrine (β_1 ×) und Vimentin (Vim*) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 μM (jeweils Medianwerte)

Die Bilder (Abb. 30, 32, 34, 36 und 38) und die grafische Darstellung (Abb. 40) der Fluoreszenz der Immunhistologie nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl_2 zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz nach Markierung mit allen Antikörpern ab der Konzentration von 0,1 μM . Wie bei DEHP und MEHP zeigen sich kaum Veränderungen zwischen dem Median von 0,01 μM und dem Median der Kontrolle (Abb. 31, 33, 35, 37, 39 und 40). Auch lassen sich wie bei MEHP die schwächste Fluoreszenzreduktion bei den β_1 -Integrinen und die stärkste bei Occludin erkennen. Bei der Konzentration von 0,1 μM zeigen sich sprunghafte Fluoreszenzabfälle bei Occludin und N-Cadherin um 54 % und 44 %. Vimentin fällt zusammen mit Occludin bei 1 μM auf 23 %.

3.4 Auswertung der Western Blot Analyse

Mit Hilfe der Western Blot Analyse sollten die Veränderungen, die in den immunhistologischen Untersuchungen nach Behandlung mit DEHP, MEHP und CdCl₂ an den SerW₃-Zellen gesehen wurden, bestätigt werden. Unter Beibehaltung der Versuchsdurchführung wurden dieselben Konzentrationen bei den Phthalaten von 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM mit der Vehikel-Kontrolle mit 0,1 % DMSO und bei CdCl₂ von 0,01, 0,1 und 1 µM mit einer unbehandelten Kontrolle verglichen. Um eine mögliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit nachweisen zu können, wurden Proben nach einem, drei und sechs Tagen gewonnen. Es wurden vier Antikörper zur Markierung gegen Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und β₁-Integrine eingesetzt. Dreimal wurde jede Western Blot Analyse für jede Konzentration, jeden Stoff und Antikörper wiederholt. Dargestellt werden die absoluten Messwerte (◆) und der Median (—). Exemplarisch ist eine Membran für die drei Wiederholungen abgebildet.

3.4.1 DEHP

Connexin 43

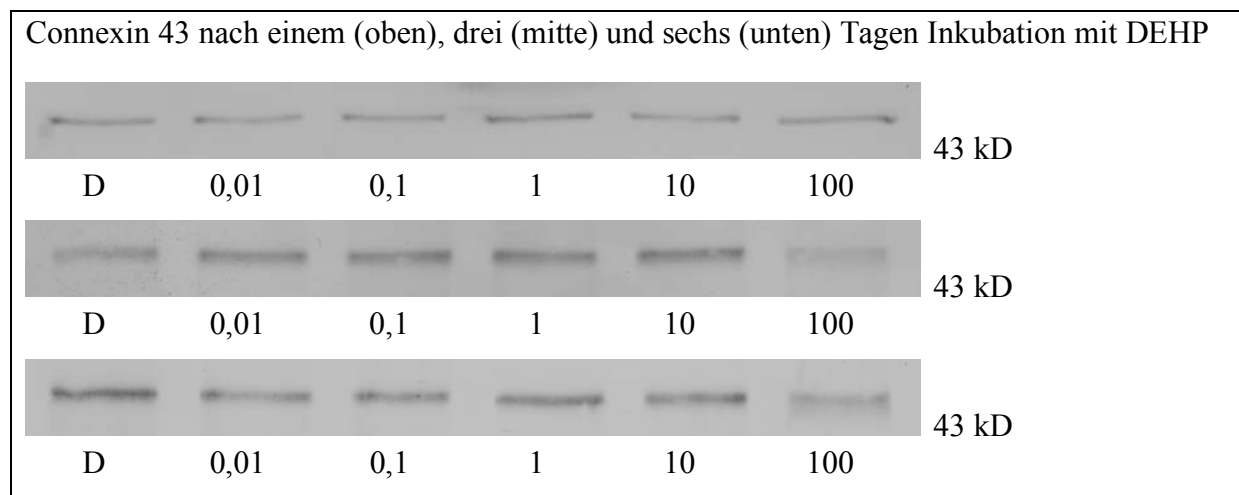


Abbildung 41: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit DEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43

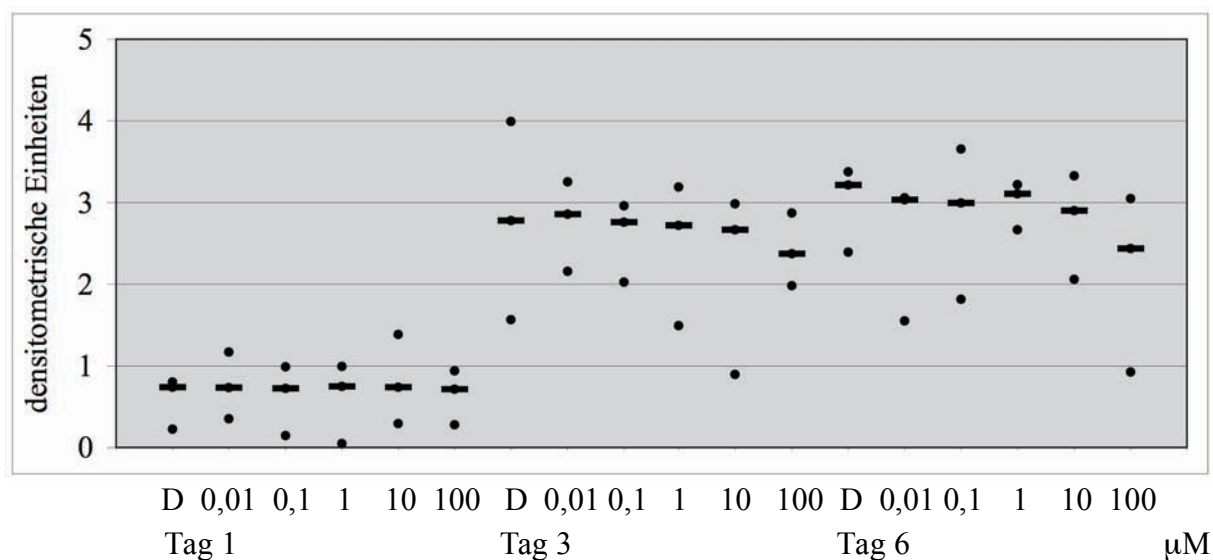


Abbildung 42: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit DEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

N-Cadherin

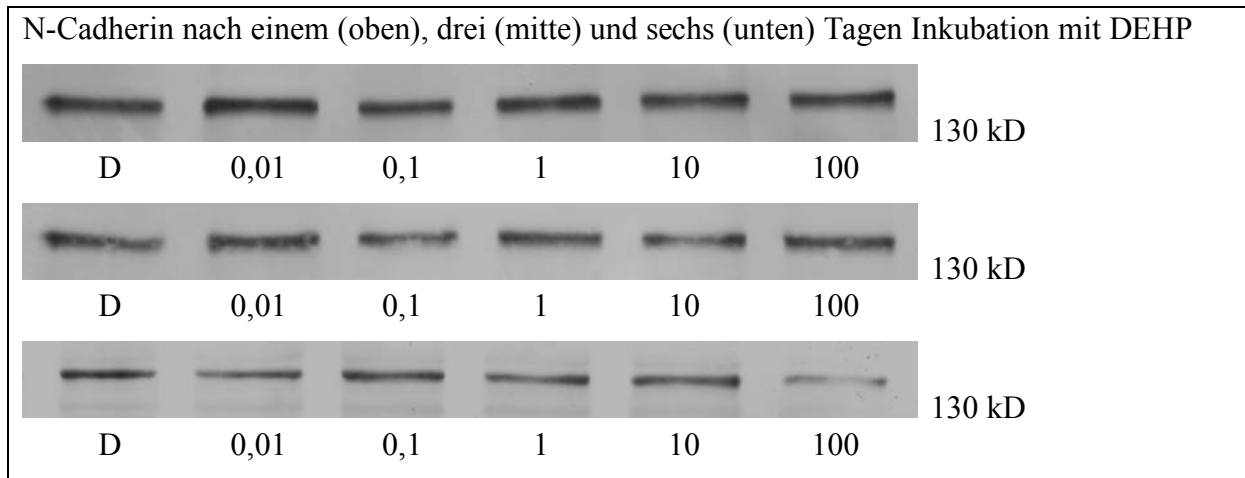


Abbildung 43: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit DEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin

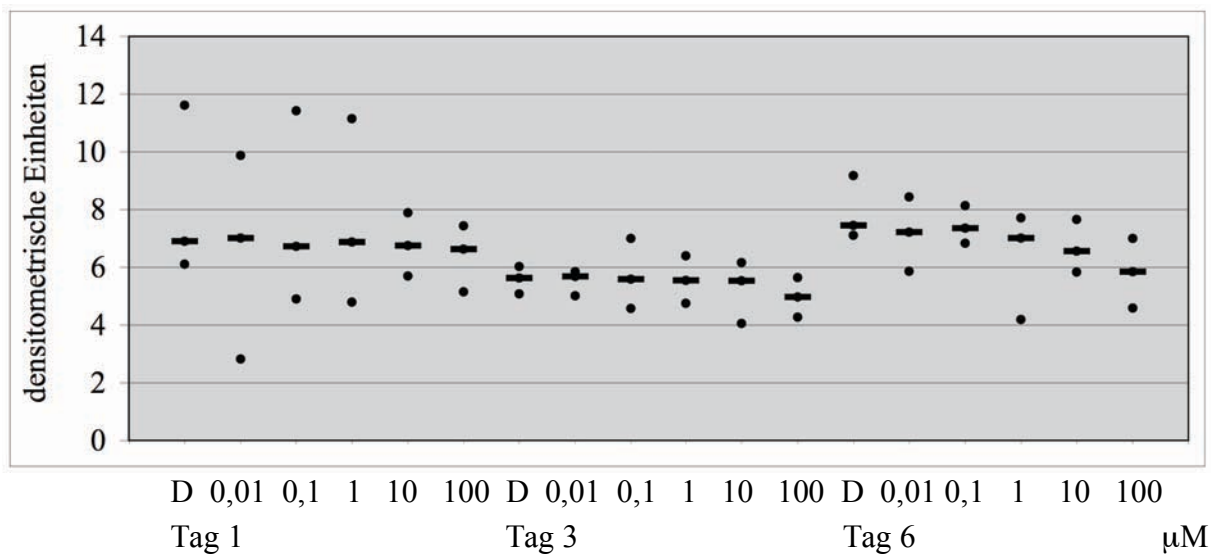


Abbildung 44: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit DEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

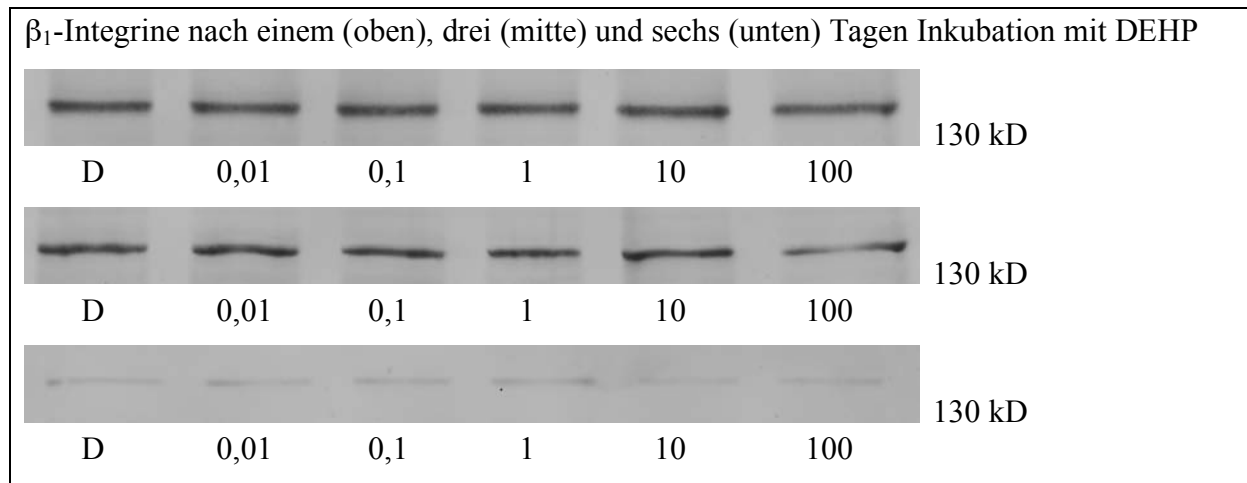
β_1 -Integrine

Abbildung 45: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit DEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine

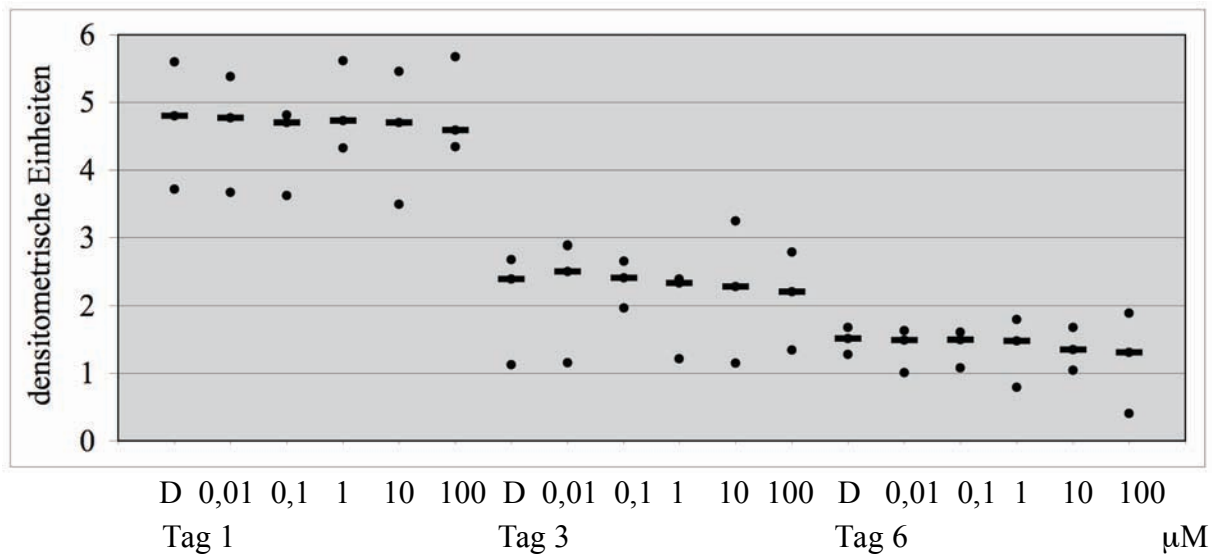


Abbildung 46: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit DEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (\bullet) nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

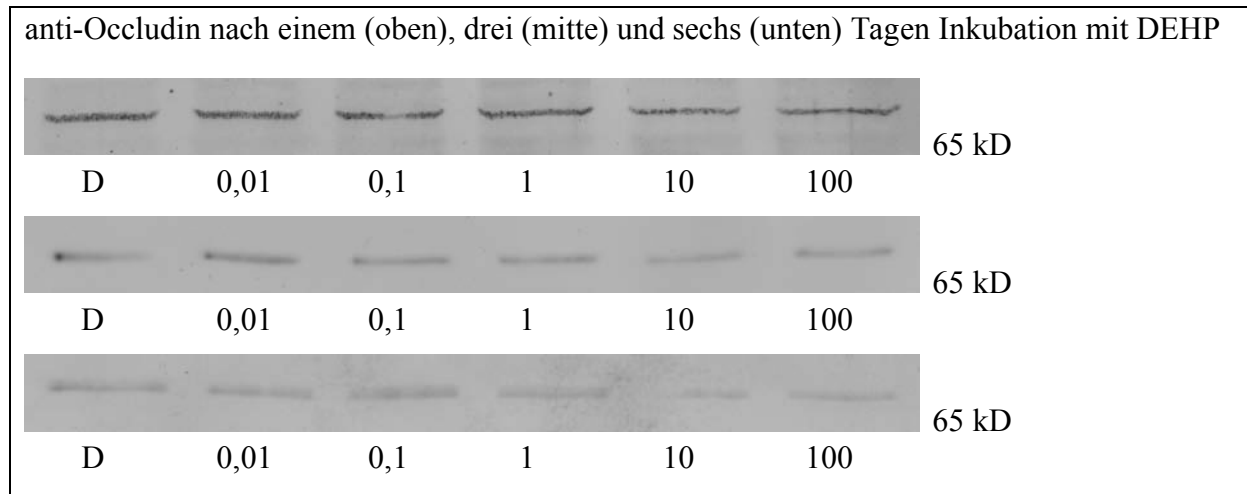
Occludin

Abbildung 47: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit DEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin

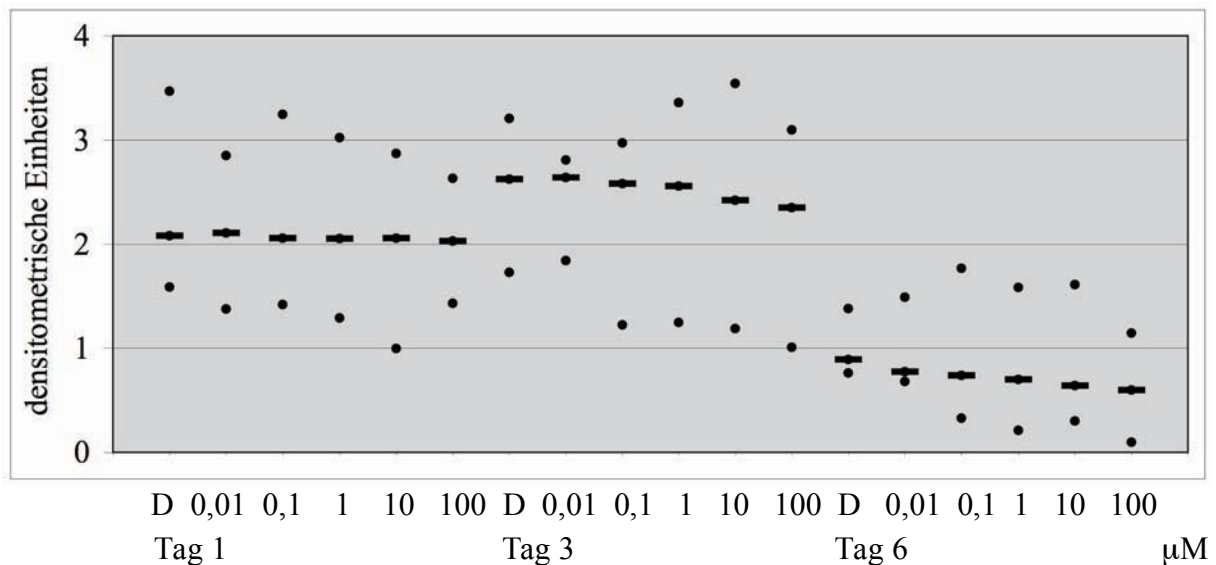


Abbildung 48: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit DEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

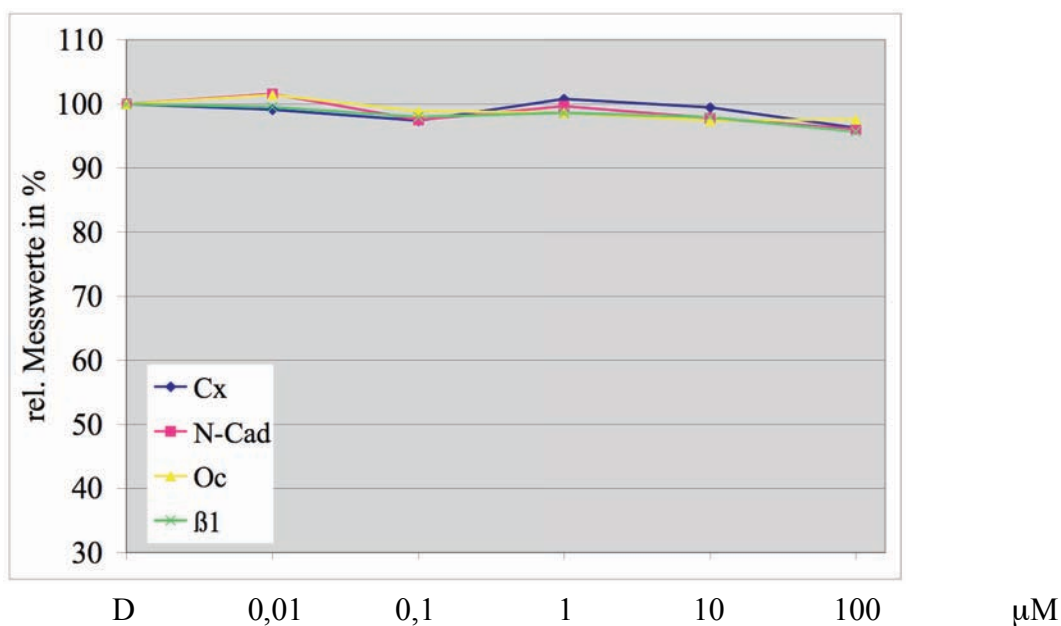


Abbildung 49: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach einem Tag Inkubation mit DEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M (jeweils Medianwerte)

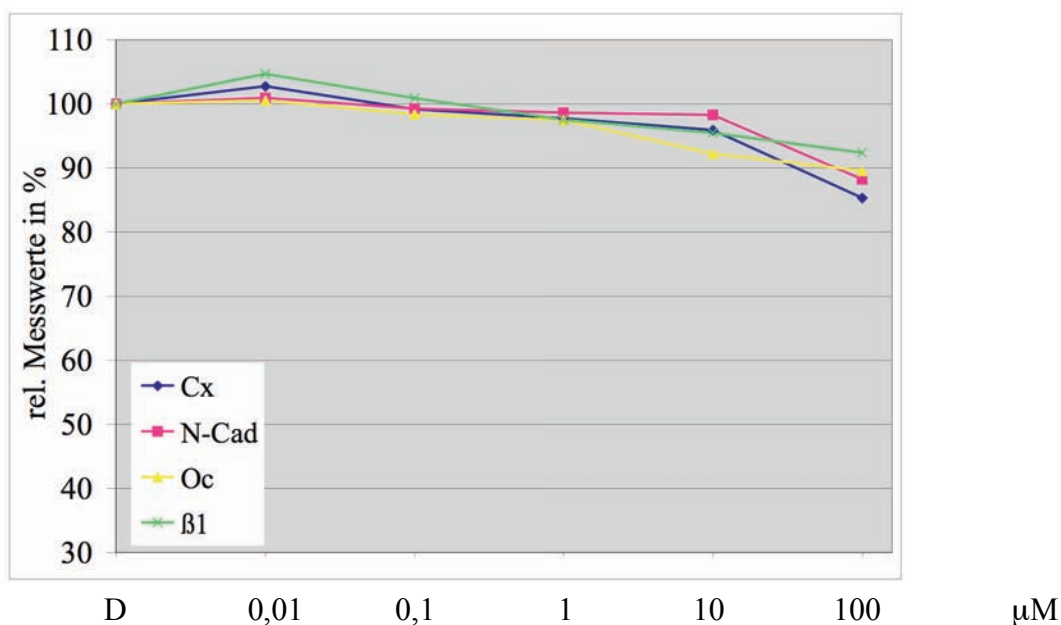


Abbildung 50: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach drei Tagen Inkubation mit DEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M (jeweils Medianwerte)

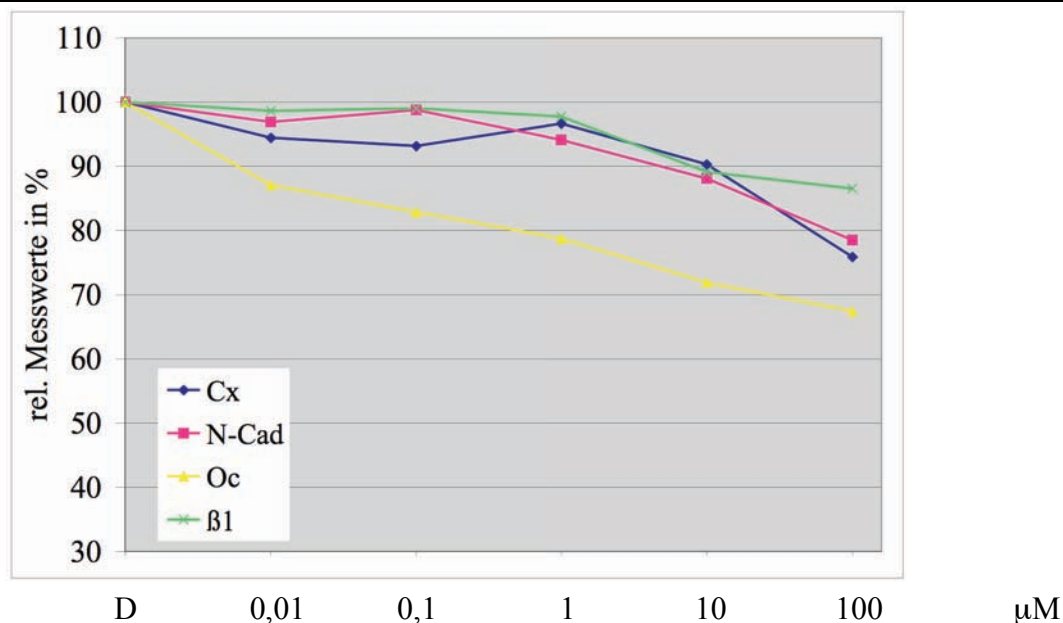


Abbildung 51: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit DEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (jeweils Medianwerte)

Die Wirkungen von DEHP auf die Proteine Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und β_1 -Integrine wurden nach ein-, drei- und sechstägiger Inkubation auf die SerW₃-Zellen untersucht (Abb. 41, 43, 45 und 47). Auch hier wurden die Mediane der absoluten Messwerte (Abb. 42, 44, 46 und 48) in Relation zum Median der Vehikel-Kontrolle mit DMSO gesetzt und grafisch dargestellt (Abb. 49-51). Bei allen vier Proteinen sieht man, dass nach einem Tag kaum Veränderungen stattgefunden haben. Auch nach Tag drei sind lediglich leichte Proteinabnahmen um 10 bis 15 % bei 100 μM DEHP zu erkennen. Nach sechs Tagen nehmen die Proteinreduktionen bis zu 15 % bei 10 μM und bis zu 30 % bei 100 μM DEHP deutlich zu. Auffallend sind stärkere Effekte bei Occludin und geringere bei den β_1 -Integrinen.

3.4.2 MEHP

Connexin 43

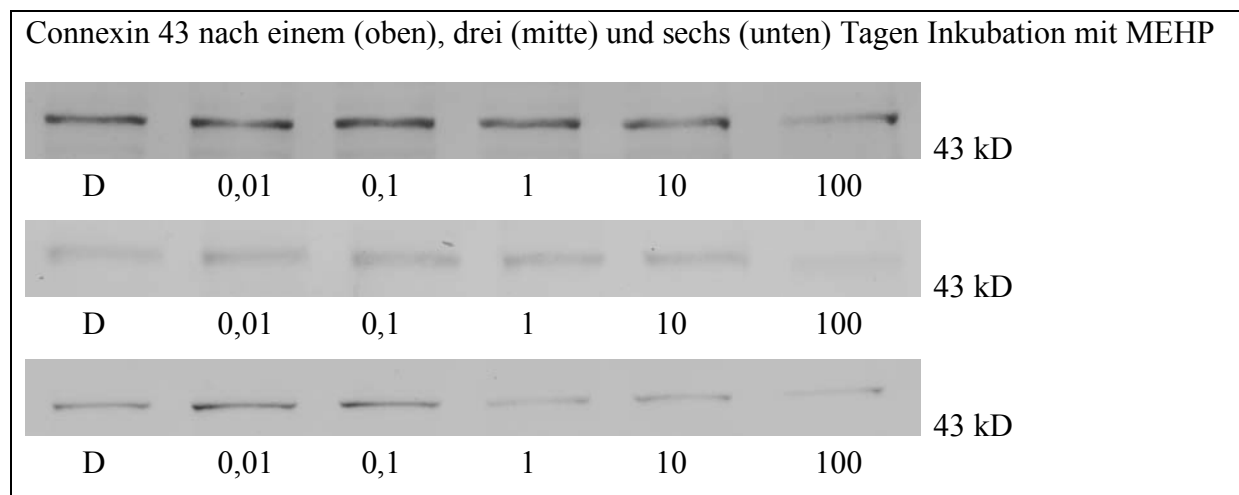


Abbildung 52: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit MEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43

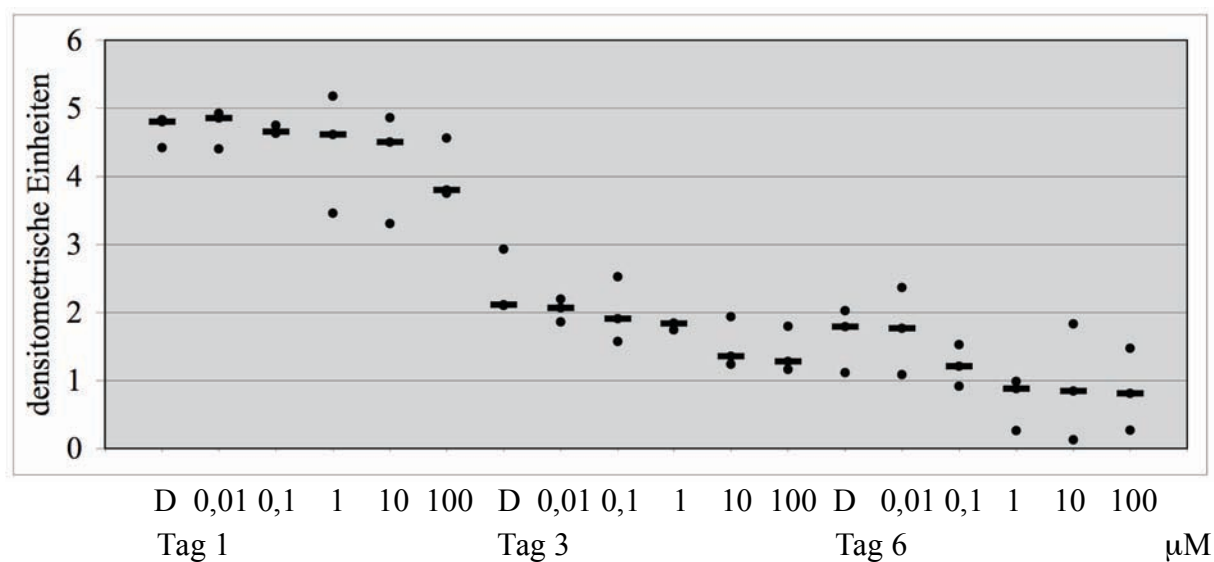


Abbildung 53: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit MEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

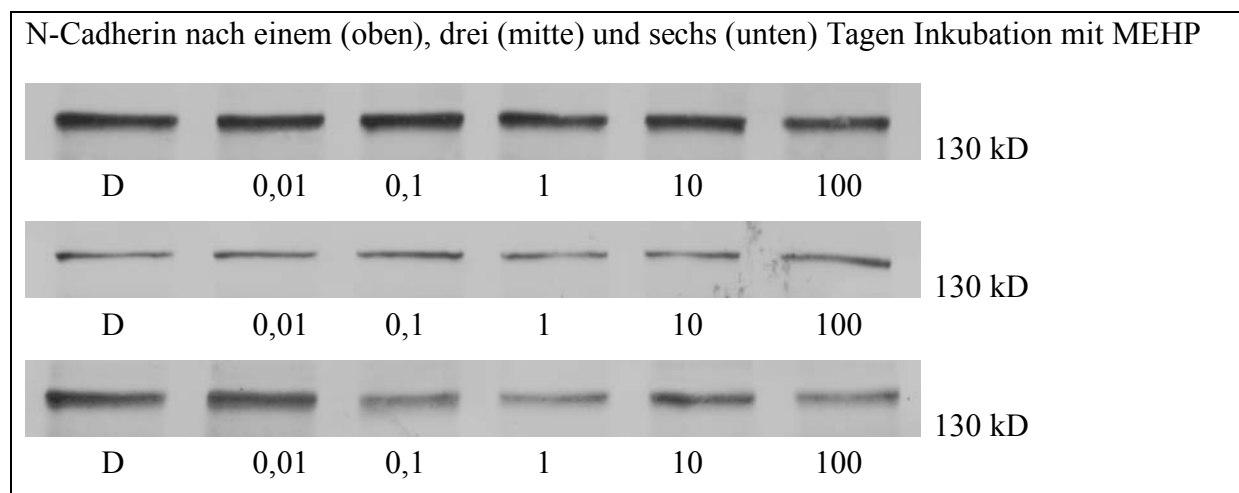
N-Cadherin

Abbildung 54: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit MEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin

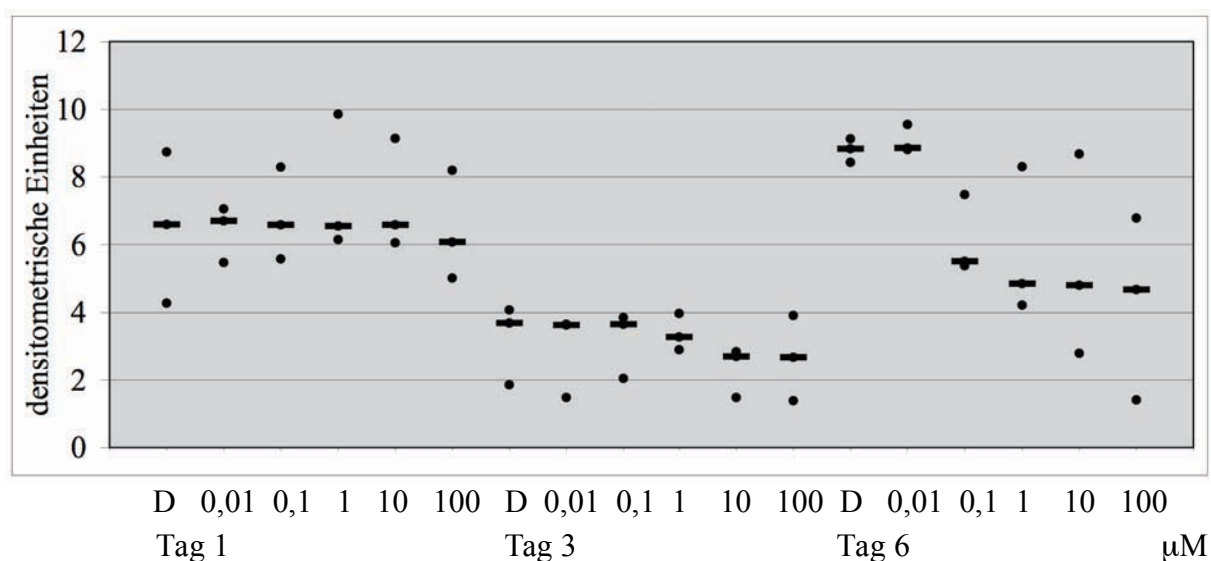


Abbildung 55: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit MEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

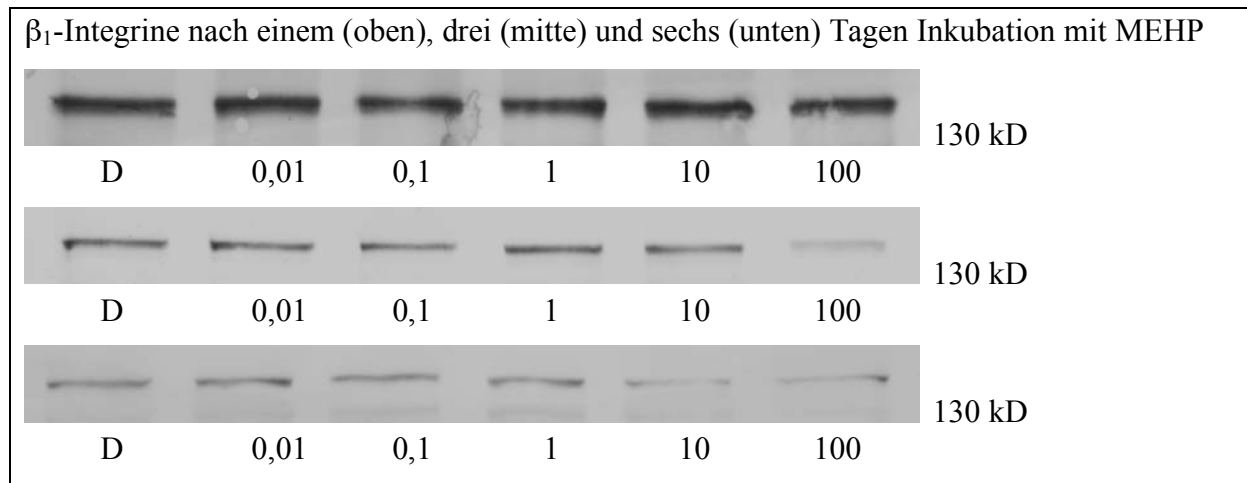
β_1 -Integrine

Abbildung 56: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit MEHP über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine

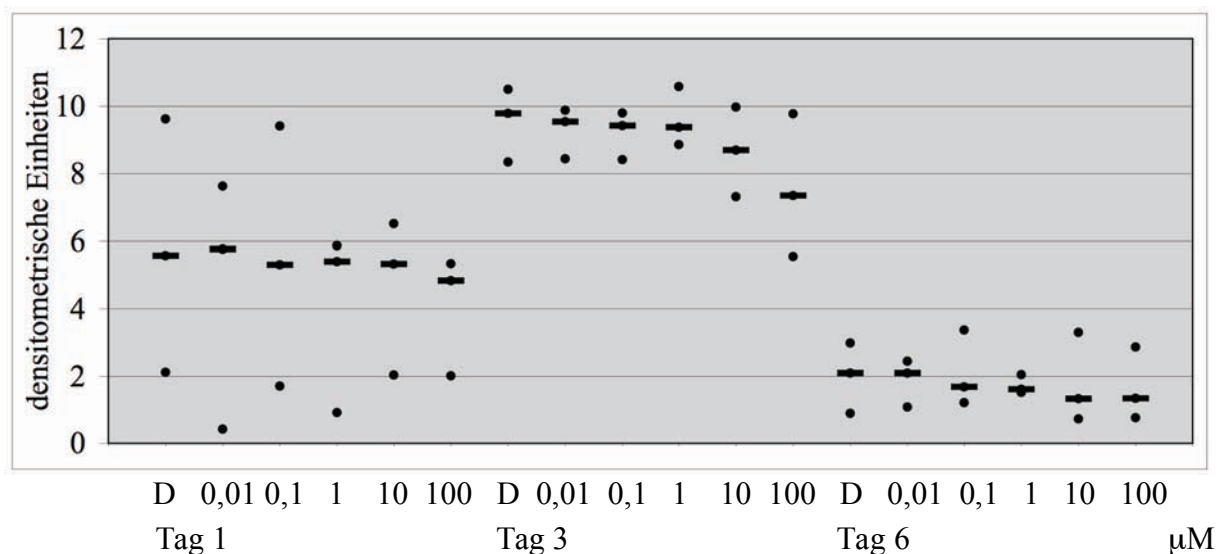


Abbildung 57: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit MEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (\bullet) nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: ($-$)

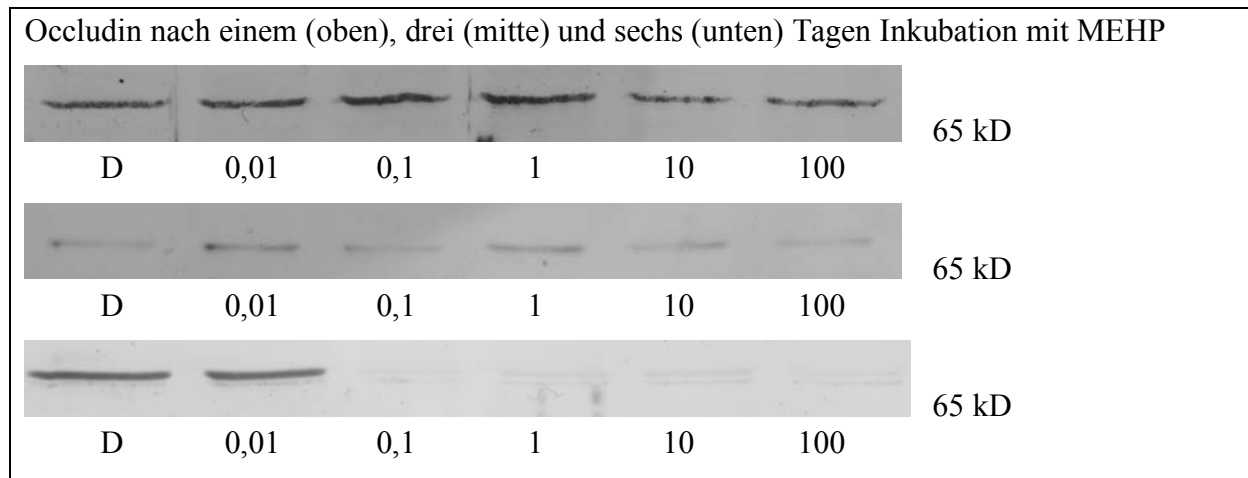
Occludin

Abbildung 58: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit MEHP über einem (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle mit DMSO (D) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin

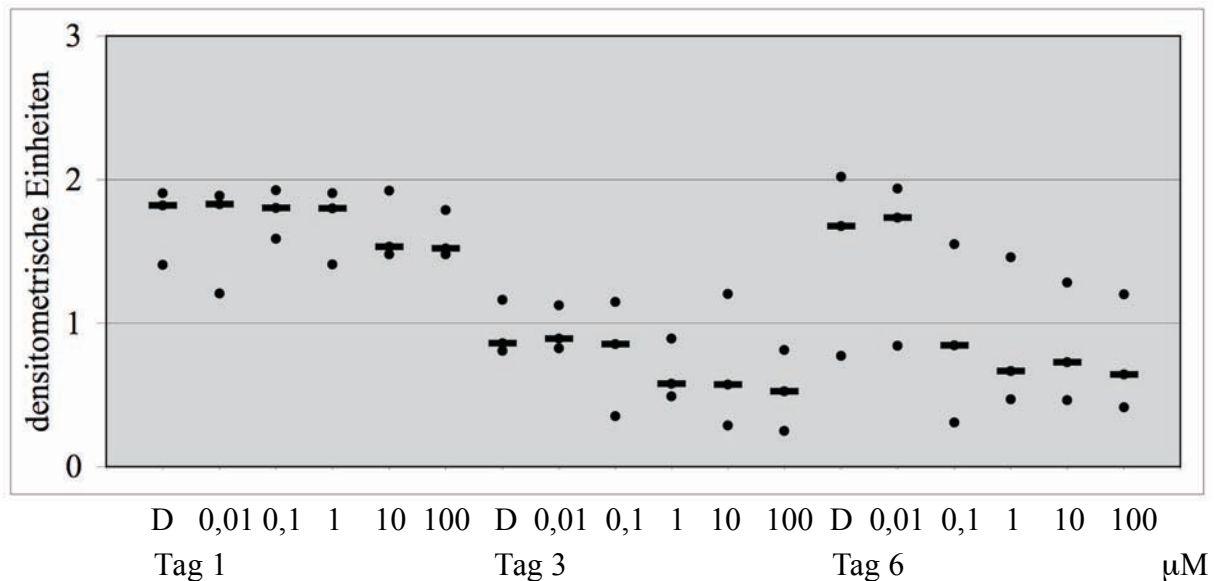


Abbildung 59: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit MEHP in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 µM im Vergleich zur Vehikelkontrolle mit DMSO (D), abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

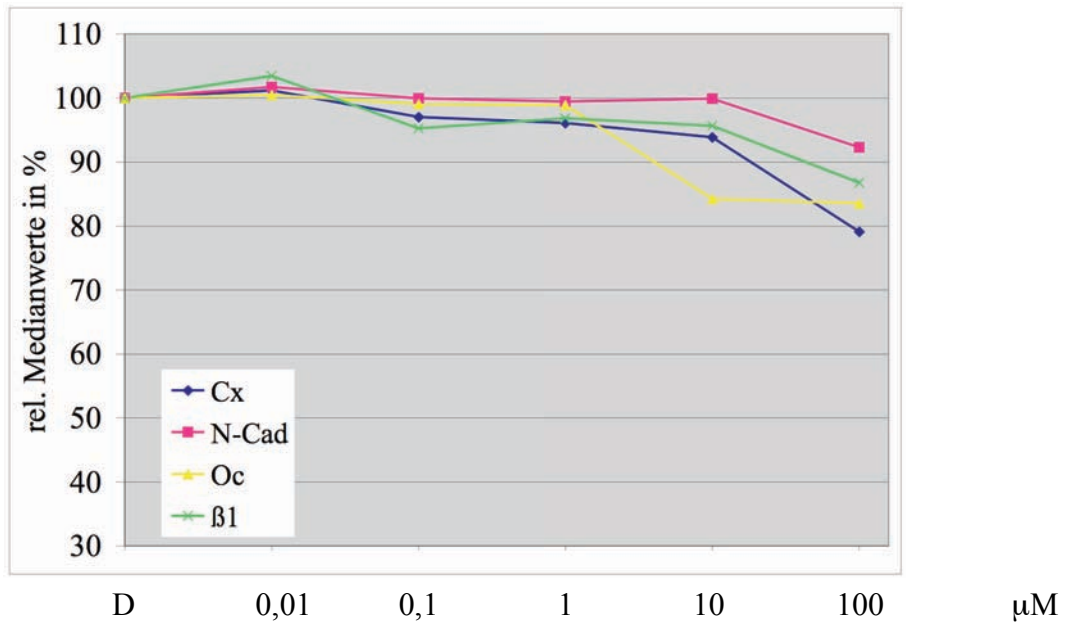


Abbildung 60: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach einem Tag Inkubation mit MEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M (jeweils Medianwerte)

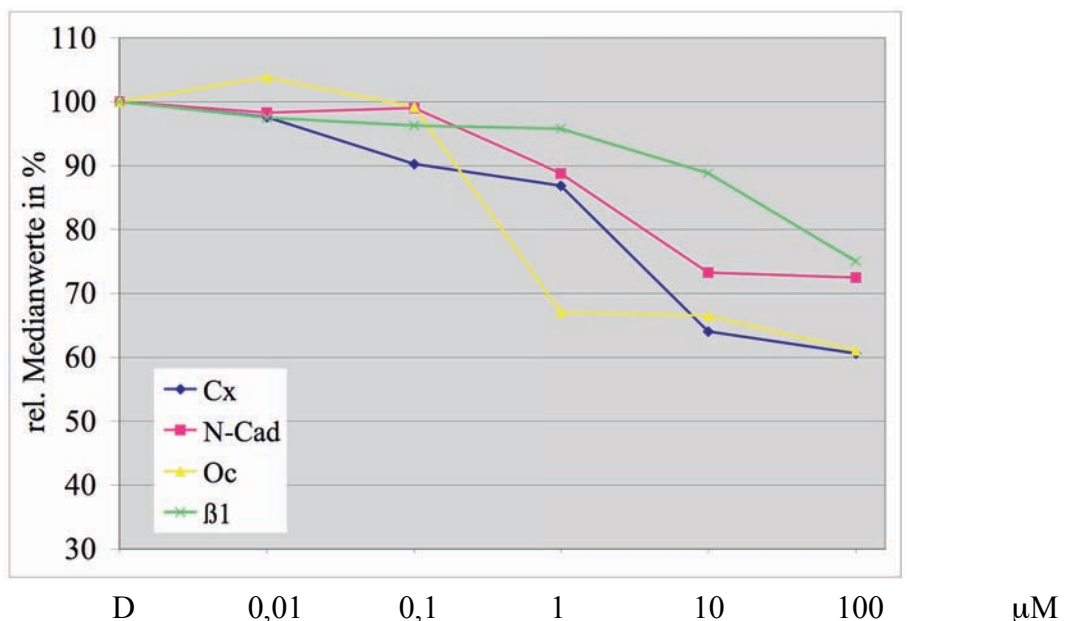


Abbildung 61: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach drei Tagen Inkubation mit MEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μ M (jeweils Medianwerte)

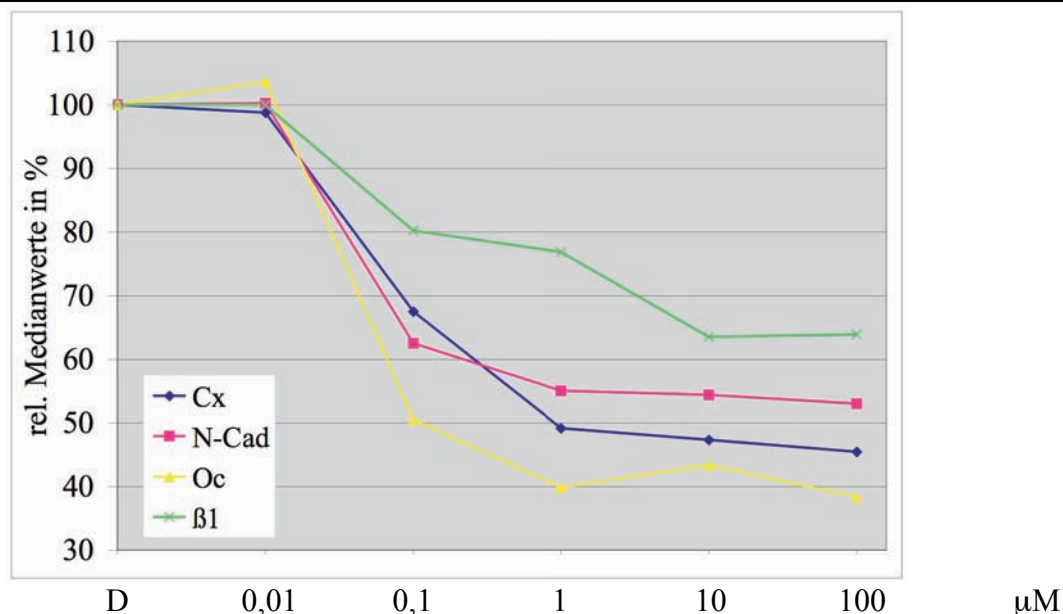


Abbildung 62: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit MEHP, abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur DMSO-Kontrolle (D, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1, 10 und 100 μM (jeweils Medianwerte)

Bei den Untersuchungen der Effekte von MEHP auf die Proteine Connexin 43, N-Cadherin, Occludin und β_1 -Integrine bestehen zu allen Messzeitpunkten im Median kaum Unterschiede zwischen der Vehikel-Kontrolle und der niedrigsten Konzentration. Im Vergleich mit DEHP zeigen sich deutliche Veränderungen im Verlauf ab drei Tagen (Abb. 53, 55, 57, 59). Nach einem Tag lassen sich zwischen den Banden der Vehikel-Kontrolle und den MEHP-Konzentrationen von 0,01 μM bis 10 μM bei Connexin 43, N-Cadherin und β_1 -Integrinen kaum Unterschiede erkennen (Abb. 52, 54, 56). Bei Connexin 43 fällt der Median an Tag drei bei 0,1 μM um 10 %, dann bei 10 μM um 36 %. Nach sechs Tagen erfolgt eine Proteinreduktion um 33 % bereits bei 0,1 μM und bei 1 μM um 50 % im Vergleich zur Kontrolle. Mit etwas geringer ausfallenden Veränderungen kann man bei N-Cadherin einen ähnlichen Verlauf wie bei Connexin 43 sehen (Abb. 60-62). Wie bereits in der Immunhistologie beobachtet, fallen weniger Effekte bei den β_1 -Integrinen im Vergleich mit den anderen Strukturproteinen nach drei und sechs Tagen auf, allerdings sind auch hier sprunghafte Abnahmen von 20 % bei 0,1 μM und 37 % bei 10 μM nach sechs Tagen zu sehen. Die stärksten Effekte wurden bei Occludin beobachtet (Abb. 58 und 59). Hier erfolgt eine sprunghafte Abnahme des Medians der Bandenintensität um 16 % bei 10 μM an Tag eins. Nach drei Tagen zeigt sich ein Sprung von 33 % bei 1 μM und nach sechs von 50 % bei 0,1 μM und 60 % bei 1 μM (Abb. 60-62).

3.4.3 CdCl₂

Connexin 43

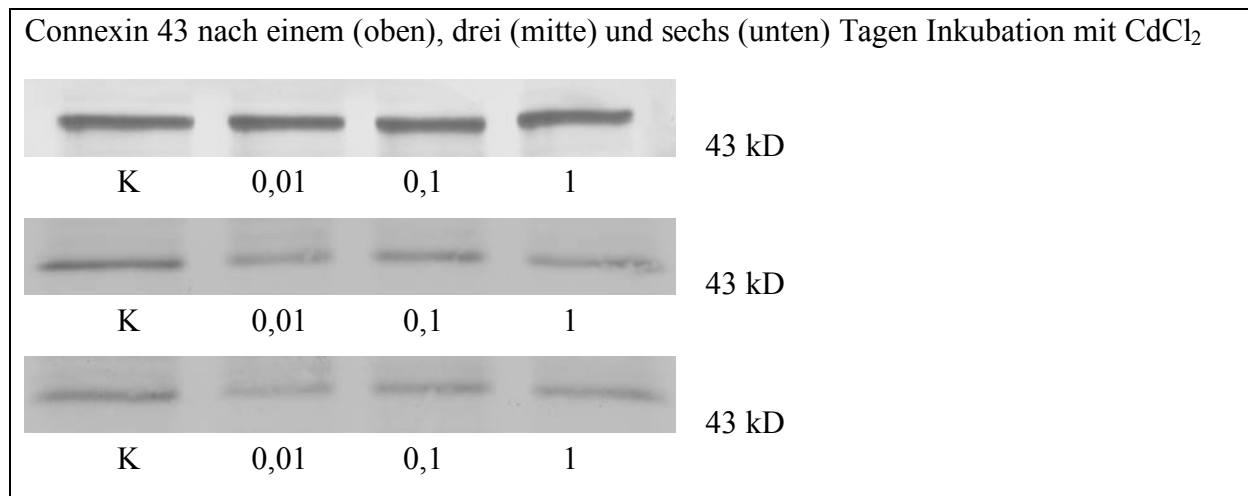


Abbildung 63: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit CdCl₂ über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43

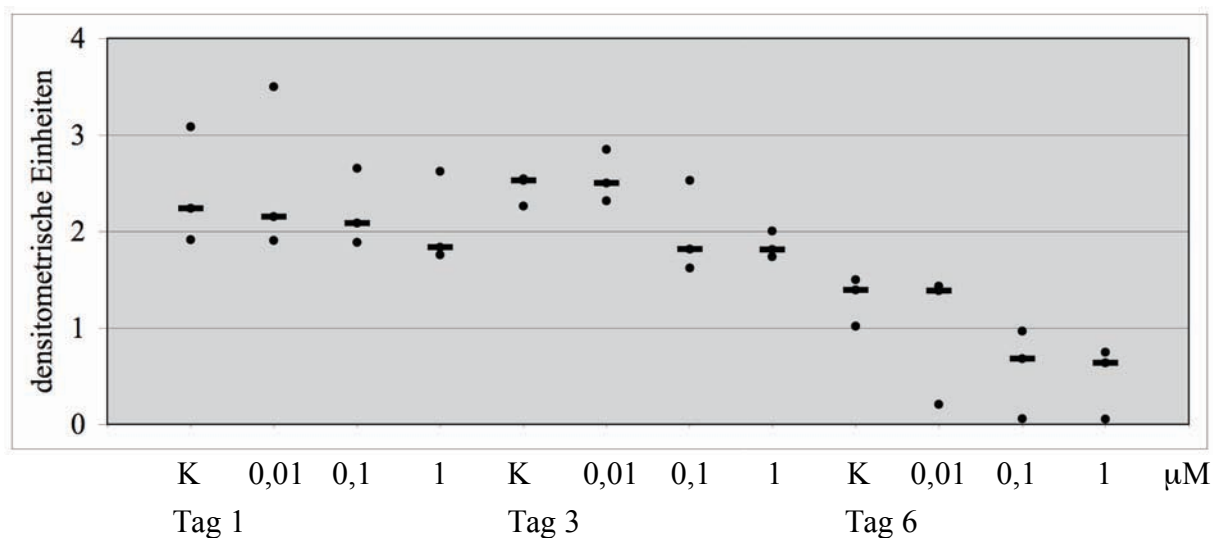


Abbildung 64: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Connexin 43, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

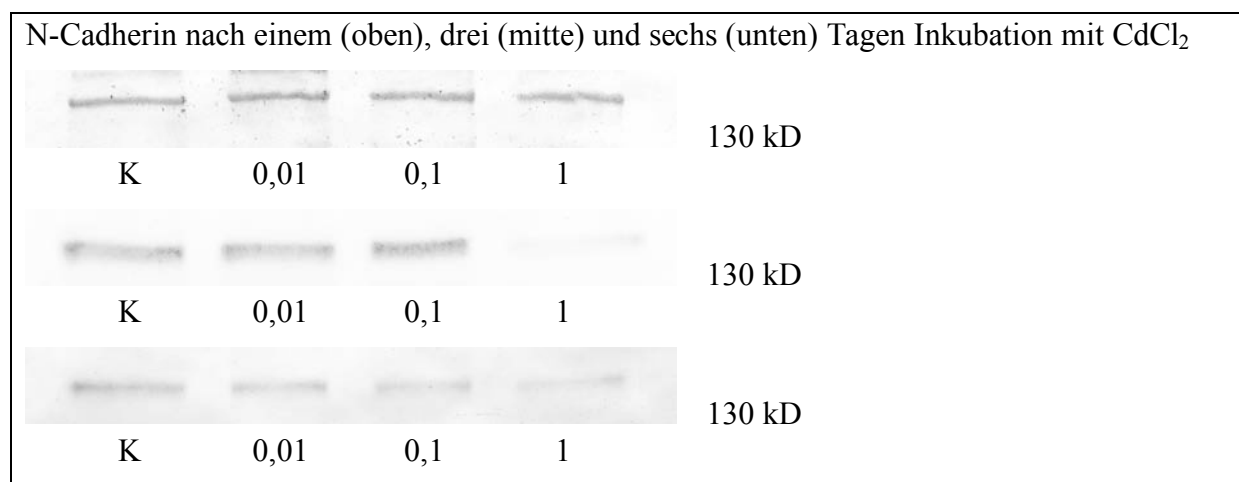
N-Cadherin

Abbildung 65: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit CdCl₂ über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin

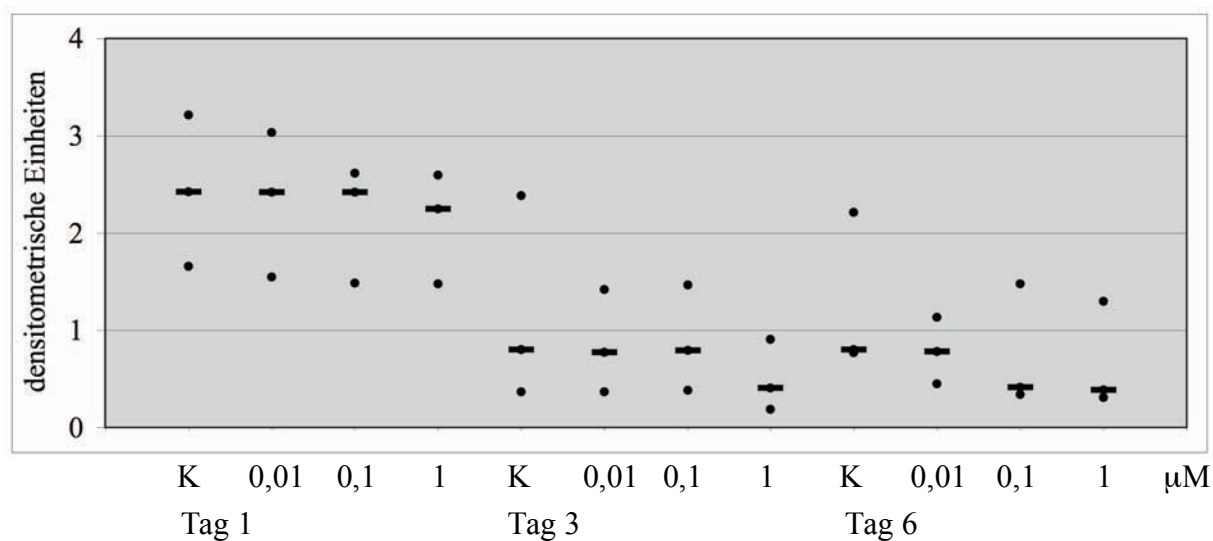


Abbildung 66: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen N-Cadherin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

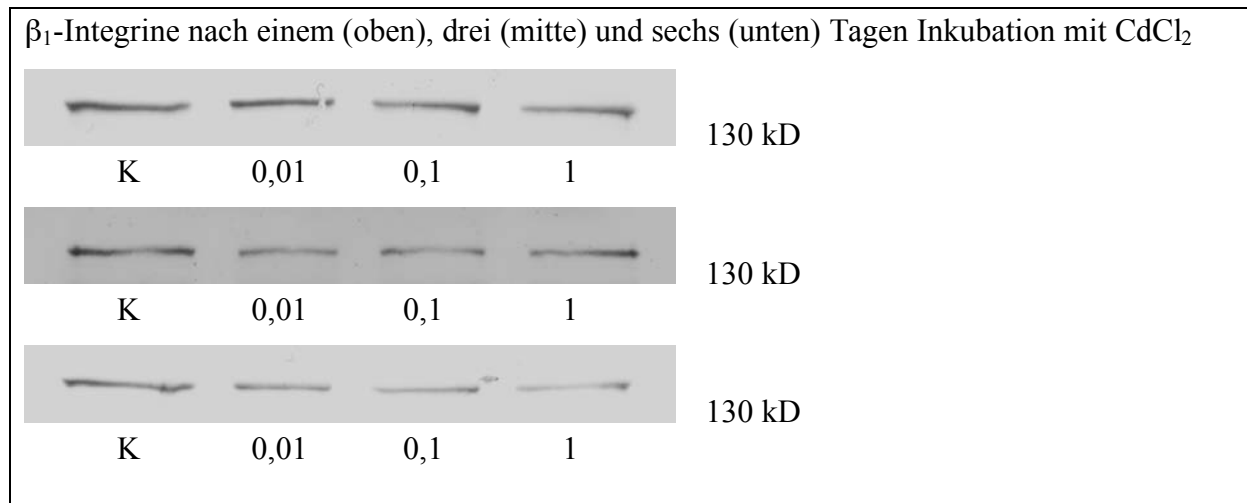
β_1 -Integrine

Abbildung 67: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit CdCl_2 über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine

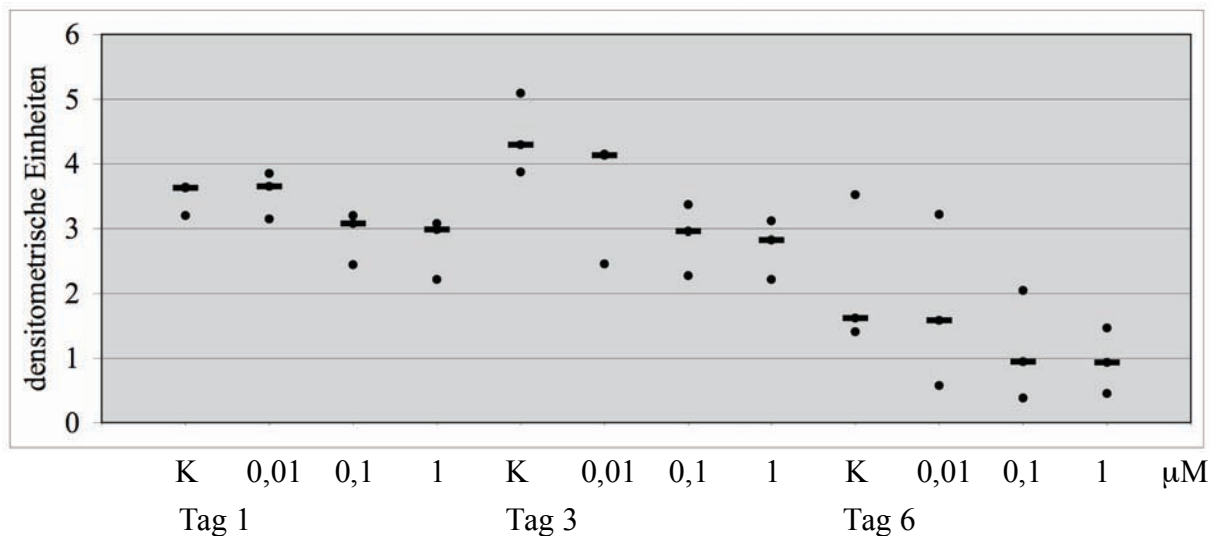


Abbildung 68: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit CdCl_2 in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen β_1 -Integrine, der Median ist mit folgendem Symbol, dargestellt: (—)

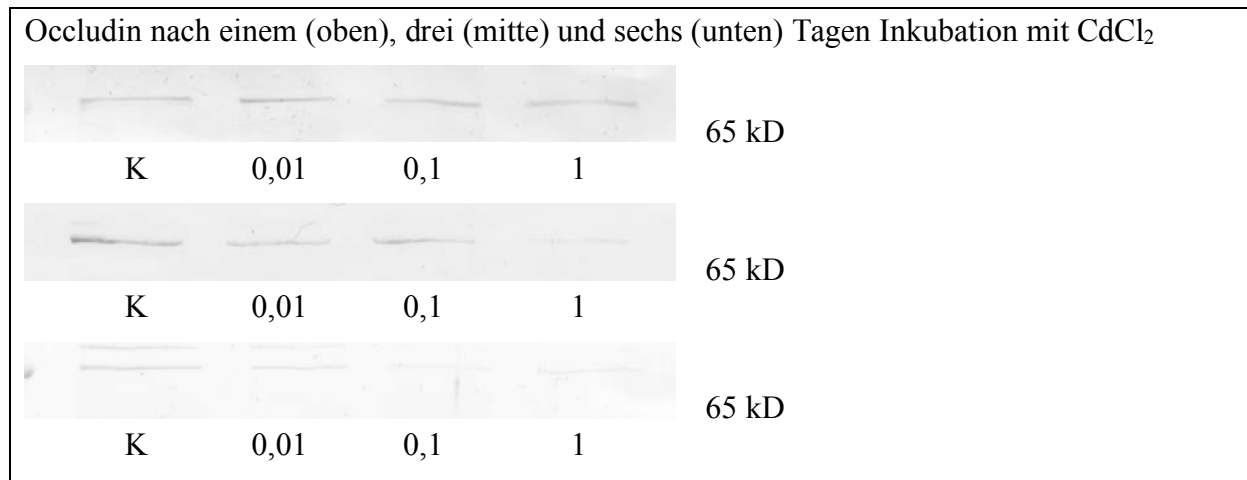
Occludin

Abbildung 69: SerW₃-Zellen in der Western Blot Analyse nach Inkubation mit CdCl₂ über einen (oben), drei (mitte) und sechs (unten) Tagen in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) und nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin

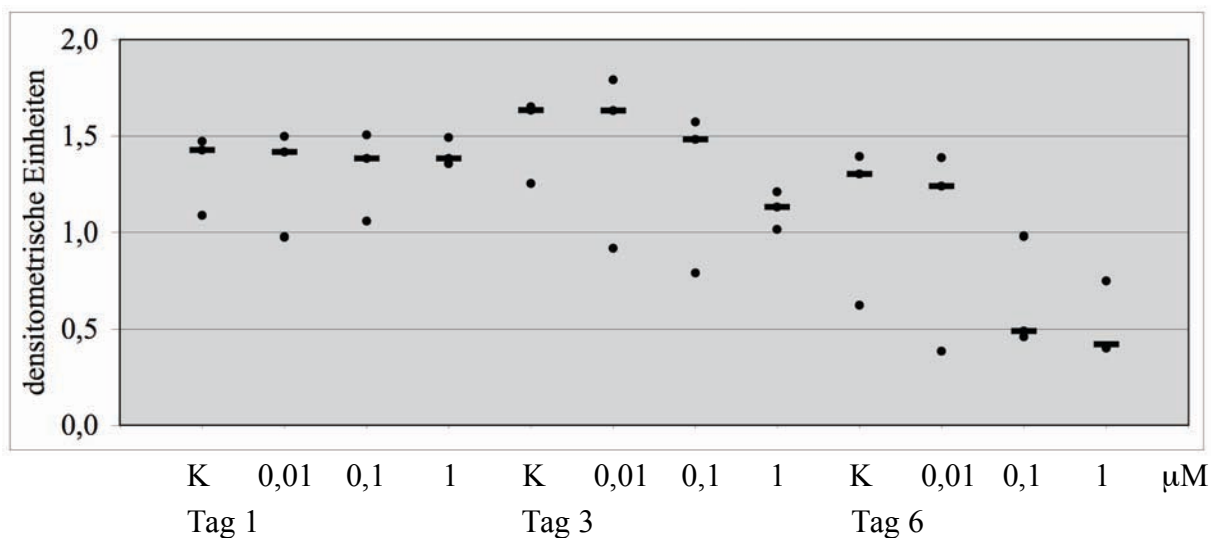


Abbildung 70: Grafische Darstellung der Ergebnisse der Western Blot Analyse nach einem, drei und sechs Tagen Inkubation mit CdCl₂ in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 μM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (K) abgebildet sind drei Messwerte pro Konzentration (●) nach Färbung mit einem Antikörper gegen Occludin, der Median ist mit folgendem Symbol dargestellt: (—)

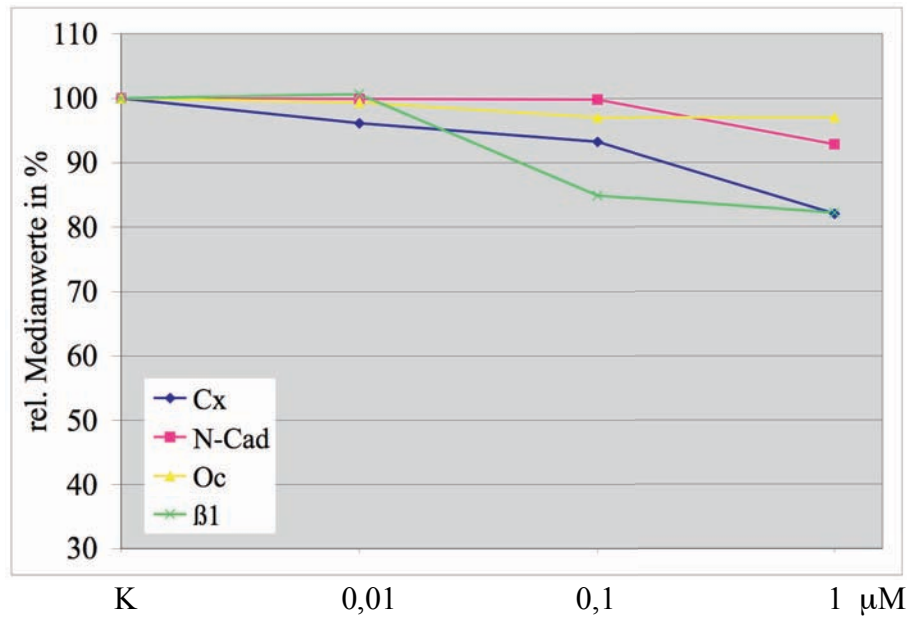


Abbildung 71: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach einem Tag Inkubation mit CdCl_2 , abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 μM (jeweils Medianwerte)

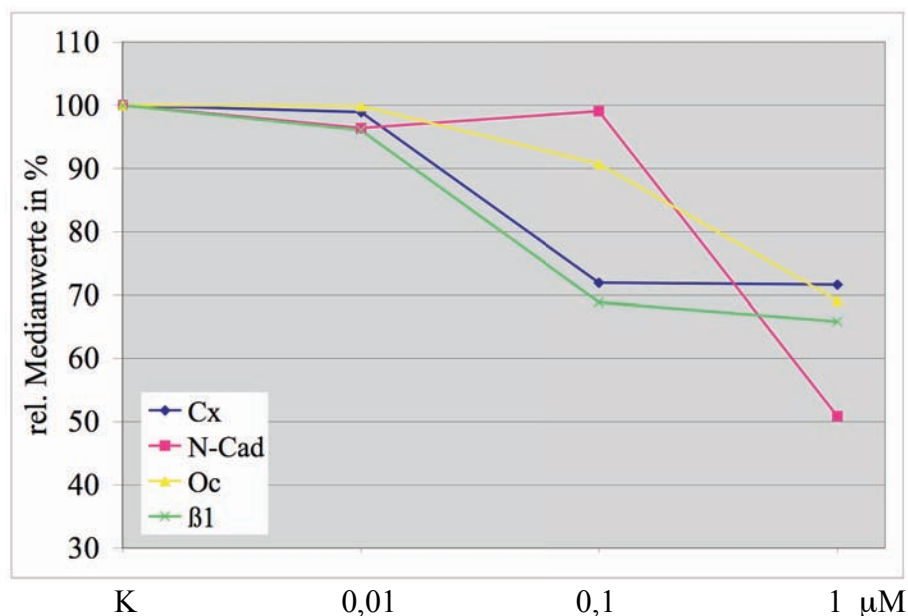


Abbildung 72: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach drei Tagen Inkubation mit CdCl_2 , abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 μM (jeweils Medianwerte)

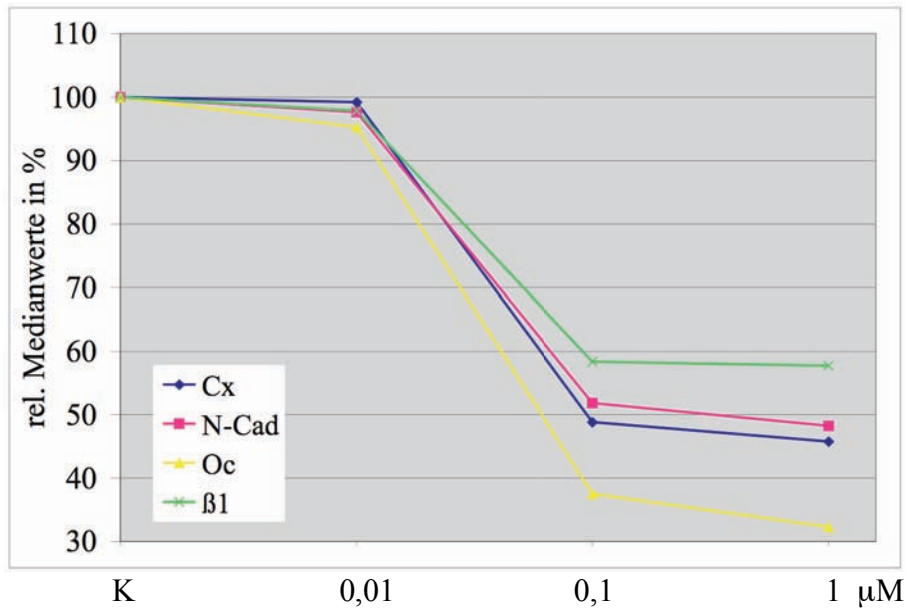


Abbildung 73: Grafische Darstellung der Western Blot Analyse von Sertoli-Zellen nach sechs Tagen Inkubation mit CdCl_2 , abgebildet wurde die relative prozentuale Messwertabnahme nach Markierung mit den Antikörpern Connexin 43 (Cx◆), N-Cadherin (N-Cad■), Occludin (Oc▲) und β_1 -Integrine (β_1 ×) in Bezug zur unbehandelten Kontrolle (K, 100 %) in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 μM (jeweils Medianwerte)

Auch bei den Sertoli-Zellen nach Behandlung mit CdCl_2 sind Veränderungen zu erkennen, während sich die Intensität der Banden der niedrigsten Konzentration kaum von der Kontrolle bei allen Proteinen zu allen Zeitpunkten unterscheidet (Abb. 63-70). Bei Occludin werden erst Proteinabnahmen nach dem dritten Tag mit 90 % und 69 % und nach dem sechsten Tag mit 38 % und 32 % bei 0,1 μM und 1 μM deutlich. Nach den ersten beiden Messzeitpunkten zeigt N-Cadherin Proteinreduktionen erst bei 1 μM , später erfolgt ein Sprung bei 0,1 μM . Bei Connexin 43 erscheint dieser Effekt schon nach dem dritten Tag und bei den β_1 -Integrinen bereits nach 24 Stunden. Wieder zeigen sich nach sechs Tagen bei den β_1 -Integrinen die geringeren Effekte im Vergleich zu den anderen Proteinen und die stärkeren bei Occludin (Abb. 71-73).

4 Diskussion

4.1 Effekte der Phthalate auf die Reproduktionsorgane

Weichmacher und andere potentiell reproduktionstoxische Stoffe sind in der Umwelt ubiquitär präsent und führen zu einer alltäglichen Exposition des Menschen. Phthalate sind synthetische Weichmacher, die mit einem sehr hohen Anteil in PVC-haltigen Alltags- und Medizinprodukten verwendet werden. Da sie an den Kunststoff nicht kovalent gebunden sind, können sie sich wegen ihrer lipophilen Eigenschaften durch fetthaltige Substanzen aus der Kunststoffmatrix von z. B. Blutbeuteln oder Kathetersystemen leicht herauslösen.

Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (DEHP) ist ein klassischer Weichmacher, der nach Aufnahme in Intestinum und Leber unter anderem zu seinem korrespondierenden aktiven Metaboliten Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat (MEHP) verstoffwechselt wird. Potentiell schädigende Wirkungen der Phthalate auf den Reproduktionstrakt sind schon seit den vierziger Jahren bekannt, trotzdem fehlen immer noch detaillierte Kenntnisse über die Mechanismen dieser toxischen Wirkungen (Shaffer et al., 1945; Richburg und Boekelheide, 1996; Poon et al., 1997; Wolfe und Layton, 2003).

In dieser Dissertation wurden die unterschiedlichen Wirkungen der Phthalate DEHP und MEHP an den Zellen der SerW₃-Zelllinie untersucht. Wegen ihrer Teilungsfähigkeit konnten im Gegensatz zu den früher veröffentlichten vergleichsweise kurzen Studien an Primärkulturen Prüfzeitpunkte über einen, drei und sechs Tage gewählt werden (Gray und Beamand, 1984; Gray und Gangolli, 1986; Li et al., 1998; Li und Kim, 2003).

Bereits vor circa 25 Jahren wurden von der Arbeitsgruppe Gray und Beamand Studien an Kokulturen von Sertoli- und Keimzellen durchgeführt. Sie zeigten nach MEHP-Behandlung konzentrationsabhängige Zunahmen der Keimzellablösungen und zeit- und konzentrationsabhängige Veränderungen der Sertoli-Zellen. Die Primärkulturen wurden 24 und 48 Stunden mit DEHP und MEHP in Dosierungen von 0,1 bis 100 µM behandelt. Nach der DEHP-Behandlung zeigten sich keine Effekte. Die Autoren folgerten daraus, dass DEHP nach oraler Gabe *in vivo* intestinal zu MEHP hydrolysiert wird und die Effekte am testikulären Gewebe auf MEHP zurückzuführen sind (Gray und Beamand, 1984). Gray und Gangolli testeten diverse Phthalate mit ihren aktiven Metaboliten *in vitro*. Dabei untersuchten sie Kokulturen über 24 Stunden mit Konzentrationen von 1 bis 10000 µM diverser Monophthalate. MEHP

stellte sich als potentester Stoff heraus. Die Zunahme der Keimzellablösung war ebenfalls konzentrationsabhängig (Gray und Gangolli, 1986).

Damit lieferten diese Experimente erste Hinweise auf Veränderungen der Kommunikation und Zellkontakte im Keimepithel und auf die höhere Wirksamkeit von MEHP im Vergleich zu DEHP. An den Zellen der SerW₃-Zelllinie konnten diese Beobachtungen mit den angewandten Methoden dieser Dissertation bestätigt werden, was für die Eignung dieser Zelllinie für weitere detaillierte Untersuchungen spricht.

In weiteren Studien wurden Effekte der Phthalate auf die Sertoli-Zell-Proliferation überprüft. Die Arbeitsgruppe Li untersuchte Kokulturen von Sertoli-Zellen und Gonozyten (Vorläuferzellen von Spermatogonien) zwei Tage alter Ratten 48 Stunden mit MEHP-Konzentrationen von 0,01 bis 1 µM, 0,5 % DMSO als Vehikel-Kontrolle und 10 µM DEHP als Negativ-Kontrolle. Dabei beobachteten sie eine zeit- und konzentrationsabhängige MEHP-induzierte Gonozyten-Ablösung von den Sertoli-Zellen. Keine Effekte wurden bei 0,01 µM, 0,5 % DMSO und 10 µM DEHP nach 48 Stunden observiert. Bei 0,1 µM erfolgten nach 24 Stunden Ablösungen der Keimzellen und bei 1 µM schon nach 12 Stunden. Ebenso untersuchten sie die Proliferation markierter Sertoli-Zellen der unreifen Ratten und stellten eine Abnahme von 33,6 % bei 0,1 µM MEHP und von 83,6 % bei 1 µM nach 48 Stunden fest, wiederum keine Veränderungen bei 0,01 µM (Li et al., 1998).

Hinsichtlich der NOEC (*no observed effect concentration*) stehen diese Ergebnisse in Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit. Auch an den SerW₃-Zellen wurden nach Phthalat-Behandlung über alle drei Messzeitpunkte keine Effekte bei 0,01 µM beobachtet.

Ebenfalls zeigte die Arbeitsgruppe Li und Kim in *in vitro* Versuchen mit MEHP und *in vivo* Versuchen mit DEHP konzentrationsabhängige Abnahmen der Sertoli-Zell-Proliferation sowie lichtmikroskopisch und immunhistochemisch typische morphologische Veränderungen an neonatalem Hodengewebe (Li und Kim, 2003). Sertoli-Zellen besitzen die Fähigkeit, eine fixe Anzahl von Keimzellen zu versorgen. Wird die Sertoli-Zellzahl schon während der neonatalen Entwicklung reduziert, folgt aufgrund der geringeren Sertoli-Zellzahl eine Verminderung der Spermienzahl im Erwachsenenalter.

Nach Behandlungen mit MEHP lassen sich deutliche Reduktionen der Zellzahlen der SerW₃-Zellen im Vergleich zu DEHP erkennen. Die Bilder der elektronenmikroskopischen Analyse an den SerW₃-Zellen zeigen zur Veranschaulichung typische morphologische Veränderungen schon bei Expositionen mit geringen MEHP-Konzentrationen.

Die Bildung von Vakuolen erfolgt als erstes Zeichen der Hodenschädigung wie aus Tierexperimenten bekannt ist. Dabei lassen sich zwei Arten der Vakuolisierung beschreiben. An geschädigten Zellen kommt es nach Anschwellung und Verschmelzung membrangebundener intrazytoplasmatischer Organellen, wie Vesikel und Endoplasmatischem Retikulum, zur Bildung von mehreren basal liegenden kleinen Vakuolen oder einer einzigen großen Vakuole (Boekelheide et al., 2005). Beide Formen wurden in den morphologischen Untersuchungen dieser Arbeit sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch ebenfalls beobachtet. Dabei erscheint der Zellkern pyknotisch, das Kernchromatin verdichtet, die Kernmembran zum Teil aufgelöst, die Mitochondrien geschwollen und vergrößert und das ER aufgeweitet. Diese typischen Zeichen an MEHP exponierten Sertoli-Zellen werden auch von den Arbeitsgruppen Boekelheide und Moffit beschrieben (Boekelheide et al., 2005; Moffit et al., 2007).

Andriana und Mitautoren zeigten aus Versuchen mit MEHP an Sertoli-Primärkultur-Zellen von Ziegen in elektronenmikroskopischen Untersuchungen nekrotische und apoptotische Zellen, die durch geschwollene Mitochondrien, Vakuolenbildung, kondensiertes Chromatin und aufgelöste Zell- und Kernmembranen charakterisiert waren (Andriana et al., 2004). Zhang und seine Mitarbeiter behandelten Sertoli-Primärkulturen über 24 Stunden mit MEHP in Konzentrationen von 0 bis 600 μM . Sie untersuchten charakteristische Proteine der *tight junctions* und stellten konzentrations- und zeitabhängige Occludin-Reduktionen fest. Sie sahen sowohl im Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop Vakuolisierungen und extrem eingefurchte und irreguläre Plasmamembranen (Zhang et al., 2008).

Die Arbeitsgruppe um Yao und Richburg untersuchte an 21 Tage alten Mäusen und an Sertoli-Primärkulturen die Veränderungen an den physikalischen Verbindungen zwischen benachbarten Sertoli- und Keimzellen nach Behandlung mit MEHP über 24 Stunden. Der Fokus wurde auf Komponenten der Blut-Hoden-Schranke und der apikalen *ectoplasmic specializations* gerichtet. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Ultrastruktur der Blut-Hoden-Schranke benachbarter Sertoli-Zellen, den *tight-junctions* und den Adhäsionsverbindungen zwischen Sertoli- und Keimzellen, konnte man erweiterte Interzellularspalten und induzierte Keimzellablösungen beobachten. Gleichzeitig wurden in Westen Blot und in immunhistologischen Analysen konzentrations- und zeitabhängige Proteinabnahmen von Occludin und den β_1 -Integrinen, den Strukturproteinen der *tight-junctions* und *adherens junctions*, ermittelt. Bei ZO-1, einem ebenfalls wichtigen *tight-junctions*-Protein, konnten keine Effekte nachgewiesen werden (Yao et al., 2010).

In früheren Studien stellte die Arbeitsgruppe eine erhöhte Aktivierung der Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) nach MEHP-Induktion in den Sertoli-Zellen fest. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Zytokine wie *transforming growth factor-β3* (TGF-β3) und *tumor necrosis factor-α* (TNF-α) eine vermittelte Down-Regulation der Verbindungsproteine und eine Erhöhung der Blut-Hoden-Schranken-Permeabilität bewirken. Als mögliches Modell stellten sie die „Öffnung der Blut-Hoden-Schranke durch Induktion von MMP-2“ vor (Yao et al., 2009). TNF-α und seine lösliche Form sTNF-α sind an der Regulation der Spermatogenese beteiligt und haben Einfluß auf die Expression der Adhäsionsmoleküle. Dabei sind Metalloproteinasen (MPs) essentiell für die Prozessierung der Präkursoren von TNF-α. Verschiedene Metalloproteinasen wurden im Hoden bereits identifiziert. Die meisten sind extrazelluläre Enzyme in inaktiver Form, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Metalloproteinase-Aktivität wird durch Transkription, durch Zymogen-Aktivierung und durch Gewebsinhibitoren (*tissue inhibitors*) reguliert. Eine erhöhte durch MEHP aktivierte Expression von MMP-2 und eine verstärkte Produktion des löslichen sTNF-α wurde festgestellt. Die Expression von Occludin in den *tight junctions* war *in vivo* und *in vitro* stark supprimiert. Sie entdeckten eine funktionelle Beteiligung von MMP-2 bei der MEHP-induzierten Unterbrechung der Verbindungskomplexe und dem daraus resultierenden Keimzellverlust und der zunehmenden Keimzellapoptose. Daraus folgerte man auf Störungen der apikalen *ectoplasmic specializations* und einer Disorganisation von Occludin und der Blut-Hoden-Schranke. Demnach dient TNF-α als Negativ-Regulator der Occludin-Expression, und eine Zunahme von MMP-2 bedeutet weniger Occludin und größere „Lücken“ in der Blut-Hoden-Schranke (Yao et al., 2009; Yao et al., 2010).

Die vorliegenden Daten der immunhistologischen und der Western Blot Analysen stehen durch die deutliche konzentrations- und zeitabhängigen Proteinabnahmen von Occludin und den β₁-Integrinen an den SerW₃-Zellen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit den Primär-Kultur-Zellen. Sowohl in der Immunhistologie als auch im Western Blot konnten bei Occludin und den β₁-Integrinen nach sechs Tagen MEHP Behandlung sprunghafte Abnahmen zwischen 0,01 und 0,1 μM und nach DEHP-Behandlung erst zwischen 1 und 10 μM gesehen werden. Insgesamt fallen die Effekte auch hier bei Occludin stärker als bei den β₁-Integrinen aus.

Intermediärfilamente wie Vimentin haben die Fähigkeit mit diversen Zellmembranprozessen zu interagieren und Einfluß auf die Lokalisation und die Aktivität von Oberflächenproteinen auszuüben. Die Arbeitsgruppe Ivaska berichtet über eine enge Zusammenarbeit in der Regula-

tion zwischen dem Intermediärfilament Vimentin und den β_1 -Integrinen. Vimentin ist mit Integrin-Matrix-Komplexen verbunden und an der Regulation der Adhäsionen von Hemidesmosomen und fokalen Kontakten beteiligt. Vimentin kann direkt oder indirekt mit den Integrinen und Strukturen der Plasmamembran assoziiert sein. Versuche an Vimentin-armen Zellen zeigten reduzierte mechanische Stabilität und reduzierte Beweglichkeit (Ivaska et al., 2007).

Die Arbeitsgruppe Richburg und Boekelheide untersuchte die Vimentin-Filament-Verteilungen in den Sertoli-Zellen 28 Tage alter Fischer-Ratten drei, sechs und zwölf Stunden nach einer MEHP-Behandlung zusammen mit dem Auftreten der testikulären Keimzellapoptose. Sie beobachteten frühe Vakuolisierungen in den Sertoli- und Keimzellen, einen Zusammenfall der Vimentin-Filamente nach dreistündiger MEHP-Exposition ohne begleitende Veränderungen der Tubulin- oder Actin-Strukturen und nach sechs bis zwölf Stunden eine progressive Zunahme perinukleärer Vimentin-Verdichtung. Um die MEHP-induzierte Keimzellapoptose einzuschätzen, wurden mittels visualisierender Methoden die Zellkerne apoptotischer Zellen dargestellt. Es fiel auf, dass nach drei Stunden eine Abnahme und erst nach sechs bis zwölf Stunden eine Zunahme der Apoptose erschien. Zusammengefasst schlossen sie daraus, dass zwischen dem frühen Vimentin-Filament-Kollaps, der anfänglichen Apoptosenabnahme durch Entkopplung und der anschließenden progressiven Zunahme starke strukturelle und biochemische Zusammenhänge zwischen Intermediärfilamenten und der Plasmamembran und eine parakrine Kontrolle der durch Membran-Protein-gekoppelte Regelmechanismen induzierten Apoptosen der Keimzellen bestehen (Richburg und Boekelheide, 1996). In weiteren Studien bestätigten sie das FAS-System zur parakrinen Regulation der Apoptose zwischen den Keim- und den Sertoli-Zellen (Lee et al., 1997; Boekelheide et al., 1998; Lee et al., 1999). Die Arbeitsgruppe Tay beobachtete auch nach drei, sechs, zwölf und 24 Stunden das zeit- und konzentrationsabhängige Verschwinden von Vimentin mittels immunhistologischer und Western Blot Analysen und das Erscheinen von Vakuolen an Sertoli-Zellen von Mäusen und konnte die Ergebnisse von Richburg und seinen Mitarbeitern somit an Zellen einer zweiten Spezies bestätigen (Tay et al., 2007).

Die eindeutigen Effekte auf das Vimentin konnten in dieser Dissertation in der Immunhistologie an den SerW₃-Zellen überzeugend dargestellt werden. Sie entsprechen den Ergebnissen der Studien an den Primärkulturen. Außerdem liefern die Ergebnisse Hinweise, dass auch bei der SerW₃-Zelllinie eine enge Kooperation zwischen den Abnahmen der β_1 -Integrine und der Abnahme von Vimentin bestehen kann.

Die Arbeitsgruppe Kang untersuchte den Einfluß von DEHP an der Maus Sertoli-Zelllinie TM5 auf die interzelluläre Kommunikation der *gap junctions* (GJIC) und auf die Apoptose. Dabei entdeckten sie eine zeit- aber in dem untersuchten Konzentrationsbereich nicht dosisabhängige Down-Regulation der GJIC nach DEHP-Behandlung. Erste Effekte wurden schon nach neun Stunden gesehen. Weitere Untersuchungen zeigten eine Korrelation zwischen der Downregulation der *gap junctions*, der Hemmung der Phosphorylierung von Connexin 43 und dem morphologisch sichtbaren Ausbleiben der Apoptose. Die charakterischen Eigenschaften der Apoptose sind Chromatin-Kondensation, Zellkernzusammenbruch, Externalisation von Phosphatidylserin, DNA-Fragmentation, Zellmembran-*blebbing* (Blasenbildung der Kernmembran) und Caspasenaktivierungen. Die Sertoli-Zellen haben direkten Einfluß auf die kommunikativen Funktionen mit den Keimzellen. *Gap junctions* zwischen benachbarten Sertoli-Zellen und Sertoli- und Keimzellen ermöglichen einen spezifischen Informationsaustausch zwischen den Zellen. In den Western Blot Analysen wurden reproduzierbare Signalabnahmen der Connexin 43 Aktivität in den behandelten Zellen entdeckt, um anzuzeigen, dass eine Abnahme der Protein-Expression nach Phthalatexposition erfolgte. Morphologische Veränderungen wie Chromatin-Kondensation und Fragmentation der Nuklei wurden beobachtet. Diese Studie unterstützt die Hypothese, dass *gap junctions* den Transfer von Todessignalkaskaden für Apoptosen ermöglichen (Kang et al., 2002).

Bei den Untersuchungen von Connexin 43 durch Western Blot und Immunhistologie zeigen die Daten in dieser Arbeit auch hier deutliche konzentrations- und zeitabhängige Proteinabnahmen und stehen mit den Beobachtungen von Kang und seinen Mitarbeitern in Übereinstimmung. Während bei DEHP nach sechs Tagen sprunghafte Veränderungen zwischen 1 μM und 10 μM stattfinden, erkennt man bei MEHP bereits zwischen 0,01 und 0,1 μM deutliche Effekte.

Die Arbeitsgruppen Gray und Beamand, Gray und Gangolli und Li haben bei der Durchführung ihrer Versuche keine Effekte von DEHP auf die Sertoli-Zellen gefunden, während die Arbeitsgruppe Kang deutliche zeitabhängige Auswirkungen von DEHP auf ihre verwendeten Zellen beobachtet hat (Gray und Beamand, 1984; Gray und Gangolli, 1986; Li et al., 1998; Kang et al., 2002). In den für diese Dissertation durchgeführten Versuchen konnten insgesamt deutlich geringere Effekte von DEHP als von MEHP auf die SerW₃-Zellen gezeigt werden. Allerdings werden auch Effekte bei DEHP nach sechs Tagen in den hohen Konzentrationen sichtbar, die mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Kang in Übereinstimmung stehen. Möglicherweise ist die Zeitdauer der Kultur für die DEHP-Effekte bedeutsam. Es könnte unter den

experimentellen Bedingungen zu einer Hydrolyse des Diesters zum MEHP kommen, so dass die Effekte auf diesen Metaboliten zurückzuführen wären. Dieser Frage sollte in weiteren Experimenten nachgegangen werden.

4.2 Effekte von Cadmiumchlorid auf die Reproduktionsorgane

Das Schwermetall Cadmium ist durch seinen vielfältigen industriellen Einsatz weit verbreitet und als potentiell schädigende Substanz an Lunge, Leber, Niere und besonders Hoden seit Jahrzehnten bekannt (Alsberg und Schwartz, 1919; Elmadfa und Burger, 1999; Schäfer et al., 2004; Thompson und Bannigan, 2008).

In dieser Dissertation wurde das wasserlösliche Salz Cadmiumchlorid (CdCl_2) unter den gleichen Bedingungen untersucht wie die Phthalate. Allerdings starben die behandelten Zellen bereits nach wenigen Stunden bei 10 und 100 μM CdCl_2 aufgrund seiner hohen toxischen Potenz.

Die toxischen Wirkungen von Cadmium auf die männlichen Reproduktionsorgane zeigt die folgende Auswahl an Studien, die beim Menschen und verschiedenen Tierarten durchgeführt wurden.

Die Arbeitsgruppe Akinloye untersuchte und bestätigte einen Zusammenhang zwischen der Infertilität und dem Cadmium-Gehalt im Serum und Samen-Plasma von Nigerianern in einer Studie an 20 azoo-, 40 oligo- und 40 normospermatischen Männern. Die Korrelationen von Serum und Samenplasma wurde mit den Samencharakteristika und Hormongehalten verglichen und ausgewertet. In allen Gruppen war der Cadmium-Gehalt im Samenplasma signifikant höher als im Serum. Der Cadmium-Gehalt in Samen und Serum war bei den azospermatischen Männern vor den Oligospermatikern und der Kontrollgruppe am höchsten (Akinloye et al., 2006).

Die Arbeitsgruppe De Souza Predes testete Effekte von CdCl_2 niedriger Dosierungen an Ratten über sieben und 56 Tage. Dabei entdeckten sie eine signifikante Abnahme des Durchmessers der Hodenkanälchen. Nach sieben Tagen waren die Tubuluslumina mit degenerierten Keimzellen und multinukleären Spermatidaggregaten gefüllt. Vakuolisierungen wurden im Keimepithel schon früh und nach 56 Tagen verstärkt in den Sertoli-Zellen beobachtet. Elektronenmikroskopische Bilder zeigten ein kompaktes und fibrös erscheinendes und fenestriertes interstitielles Epithel, ein stark verkleinertes Keimepithel und fehlende Spermatozoen (De Souza Predes et al., 2010).

Haffor und Mitautoren behandelten Mäuse vier Wochen lang mit 1 mg/kg KG Cadmium/d. Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben bei der behandelten Gruppe vaskulär endotheliale, interstitielle und Sertoli-Zell-Beschädigungen, frühe Schäden an den Keimzellen wie Dislokation der akrosomalen Granula, nukleäre Schäden mit Chromatin-Heterogenität, abgelöste Spermatiden von den Sertoli-Zellen, Disarrangement der Mitochondrien, abnormal orientierte Schwanzausläufer und abnormale mikrotubuläre Komplexe (Haffor et al., 2004).

Die nachfolgend beschriebenen Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen geben Hinweise auf Effekte an den Strukturproteinen der Blut-Hoden-Schranke, die in dieser Dissertation untersucht wurden.

Die Arbeitsgruppe Clough behandelte als Keimepithelzellen die Sertoli-Zellen und als interstitielle Zellen die Leydig-Zellen im direkten Vergleich drei Tage mit CdCl₂-Konzentrationen von 0 bis 9 µM und stellte fest, dass Sertoli-Zellen konzentrations- und zeitabhängig durch CdCl₂ geschädigt wurden. Sie reagieren wesentlich sensibler auf Cadmium als die Leydig-Zellen (Clough et al., 1990).

Thompson und Bannigan berichteten, dass im Hoden nach Cadmium-Exposition Veränderungen durch Unterbrechung der Blut-Hoden-Schranke sowie durch oxidative Stressreaktionen und beginnende Nekrosen beobachtet wurden (Thompson und Bannigan, 2008).

Normale Zellverbindungen spielen eine Rolle bei der Regulation der Meiosen und der Differenzierung in der Spermatogenese.

Die Beeinflussung von Cadmium auf die Zellverbindungen ist komplex und wird wahrscheinlich durch viele andere zelluläre Effekte dieses Metalls verändert. Sowohl an Wüstenrennmäusen als auch an Ratten konnten nach Behandlung mit Cadmium an den Hoden eine erhöhte vaskuläre Permeabilität mit Ödembildung und ultrastrukturelle Vakuolisierungen des Endoplasmatischen Retikulums und desmosomale Unterbrechungen zwischen den Gefäßzellen beobachtet werden (Berliner und Jones-Witters, 1975; Fende und Niewenhuis, 1977).

Adherens junctions, *tight junctions* und Desmosomen sind im testikulären Gewebe funktional stark miteinander vernetzt und die Rolle der *tight junctions* in der Blut-Hoden-Schranke ist von besonderer Bedeutung.

Wong und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Cadmium die Blut-Hoden-Schranke über die TGF-β3/p38 MAP-Kinase Signalkaskade mit funktionalem Verlust der *adherens junctions* unterbricht. Die Zerstörung der Blut-Hoden-Schranke mit anschließender Abnahme der Keimzellzahl und Infertilität ist mit der verminderten Expression von Occludin gekoppelt (Wong et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe Kusakabe untersuchte Hodengewebe von Ratten nach Behandlung mit CdCl_2 über sechs, zwölf und 24 Stunden und stellte Schädigungen der *tight junctions* mit Auflösung der Blut-Hoden-Schranke und signifikante Zunahmen von Lipid Peroxidationen, also die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, fest. Außerdem wurde die Präsenz von Metallothionin in Spermatogonien, Spermatozyten und Sertoli-Zellen, aber nicht im interstitiellen Gewebe nachgewiesen. Sie schlossen daraus, dass Metallothionin als Reaktion auf Cadmium in Spermatogonien, Spermatozyten und Sertoli-Zellen induziert und zur Abwehr des schadennehmenden Hodengewebes involviert wurde (Kusakabe et al., 2008a).

Die Metallhomöostase ist außerordentlich wichtig für die Regulation der Zelle zum Schutz vor freien Radikalen. Die Induktion von Metallothionein durch Zink und andere Metalle ist ein alternativer Schutzmechanismus (Thompson und Bannigan, 2008).

In weiteren Studien an Primär-Kultur-Zellen beobachtete die Arbeitsgruppe im Zytoplasma Zunahmen von Cadmium und Eisen und Abnahmen von Zink. Sie untersuchten CdCl_2 -Konzentrationen im Bereich von 0,0975 bis 100 μM und stellten einen signifikanten Anstieg der Metallothionein-Expression fest. Metallothionein bindet an Cadmium mit größerer Affinität als Zink, was leicht aus Metallothionein gelöst wird. Metallothionein ist Cystein-reich, ein metallbindendes Protein, das die Zellen vor Cadmium schützt und Cadmium-induzierte Apoptosen auslöst. Testikuläres Gewebe reagiert hoch sensitiv auf Cadmium. Nach kurzer Zeit erscheinen hämorrhagische Nekrosen. Diese und Apoptosen im Hoden werden nach Cadmium-Behandlung durch Abnahmen antioxidativer Enzyme, Zunahme von Lipid-Peroxidationen und die Zunahme von Eisen im Hoden bewirkt (Kusakabe et al., 2008b).

Die Arbeitsgruppe Chung und Cheng untersuchte *tight junctions* von Sertoli-Primärkultur-Zellen mit CdCl_2 -Konzentrationen von 0 bis 10 μM . Dabei stellten sie nach Behandlung mit hohen Konzentrationen fest, dass bereits nach wenigen Stunden die *tight junctions* konzentrationsabhängig gestört wurden. Nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen wie 0,1 μM konnten reversible Verschlüsse der *tight junctions* beobachtet werden. Außerdem sahen sie Abnahmen der Occludin-Expression und einen protektiven Effekt von Testosteron an den mit CdCl_2 behandelten Zellen (Chung und Cheng, 2001).

Die Arbeitsgruppe Sorenson testete Cadmium in einer Dosis von 10 μM sechs Stunden an einer Ratten Sertoli-Zelllinie ASC-D19 und untersuchte ihre Ultrastruktur. Dabei entdeckten sie Autophagosomen und autophagische Lysosomen, doppelt so viele unterbrochene *tight junctions* wie in der Kontrolle, apoptotische Zellen mit klassischer apoptotischer Morpholo-

gie, Zellabrundungen, Plasmamembran-*blebbing*, Chromatin-Kondensation, nukleäres *Blebbing* und Vakuolisierungen (Sorenson und Brabec, 2003).

Mit den Experimenten dieser Dissertation konnten auch an der Sertoli-Zelllinie SerW₃ deutliche konzentrations- und zeitabhängige Proteinreduktionen des *tight junctions* Protein Occludin in den immunhistologischen Untersuchungen und Western Blot Analysen erfasst werden. Wie bei den Phthalaten zeigten sich keine Effekte bei 0,01 µM. Wie aus den Daten der Immunhistologie und den Western Blot Analysen zu entnehmen ist, fanden zwischen 0,01 µM und 0,1 µM deutliche Proteinreduktionen statt, die im Vergleich mit MEHP wesentlich stärker ausgeprägt waren.

Neben den *tight junctions* widmete die Arbeitsgruppe Siu besondere Aufmerksamkeit den Strukturproteinen der *adherens junctions*. Sie entdeckte, dass die fokale Adhäsionskinase nicht nur ein Regulator von Cadherinen und β1-Integrinen ist, sondern auch an der Regulation des Occludin-ZO-1-Komplexes beteiligt ist. Die Blut-Hoden-Schranke besteht aus mehreren Protein-Komplexen: Occludin/ZO-1, JAM-A/ZO-1, Claudin/ZO-1 und N-Cadherin/β-Catenin. Die fokale Adhäsionskinase (FAK) ist eine rezeptorunabhängige Tyrosinkinase, wobei ihre aktive Form p-FAK-Tyr meistens in den apikalen *ectoplasmic specializations* mit den β1-Integrinen als p-FAK/β1-Integrin-Komplex interagiert. Es reguliert Zellbewegungen, virale Transfektionen, Apoptose, Zelldifferenzierung, Zelladhäsionen und Verbindungskräfte. Allerdings haben Studien an anderen Geweben gezeigt, dass FAK ein immens wichtiger Regulator an *tight junctions* und *adherens junctions* ist. In der Studie von Siu wurden Sertoli-Primärkultur-Zellen mit CdCl₂ in Konzentrationen von 1 µM und 3 µM über drei, sechs, neun und 24 Stunden behandelt. Es wurden konzentrations- und zeitabhängige Abnahmen bei Occludin und den β1-Integrinen entdeckt. Außerdem konnten sie Interaktionen zwischen der FAK und Occludin am Occludin-ZO-1-Komplex ermitteln (Siu et al., 2009).

Die Daten dieser Dissertation zeigen an den untersuchten SerW₃-Zellen ebenfalls konzentrations- und zeitabhängige Abnahmen der Proteine N-Cadherin und den β1-Integrinen als Strukturproteine der *adherens junctions*. Insgesamt wirkt auch auf diese Proteine CdCl₂ potenter als MEHP.

Die Arbeitsgruppe Fiorini untersuchte in umfangreichen Studien Veränderungen der *tight junctions*, *adherens junctions* und insbesondere der *gap junctions* der Sertoli-Zelllinie SerW₃ nach Exposition mit potentiell testikulär schädigenden Substanzen. Dabei wurden die Zellen jeweils mit Schwermetallen wie CdCl₂, umweltrelevanten Verbindungen wie Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), Chemotherapeutika und Phosphodiesterase-Hemmern 24 Stunden

lang behandelt. Die Mehrheit der getesteten Substanzen beeinflussten direkt die Zell-Zell-Kontakte der SerW₃-Zellen. Licht- und elektronenmikroskopische Auswertungen ergaben wieder als erstes morphologisches Schädigungszeichen typische frühe Vakuolisierungen an den Zellen der Zelllinie. In immunhistologischen und Western Blot Analysen konnten deutliche Abnahmen der Membranproteine Occludin, ZO-1, N-Cadherin und Connexin 43 dargestellt werden (Fiorini et al., 2004; Fiorini et al., 2008).

Auch in den eigenen immunhistologischen und Western Blot Analysen an der SerW₃-Zelllinie konnte durch Abnahmen von Connexin 43 die beobachteten Effekte an den *gap junctions* bestätigt werden. Die Daten dieser Dissertation zeigen bei Connexin 43 bis 0,01 μM keine Effekte und bei 0,1 μM eine deutliche Abnahme. Beim Vergleich der toxischen Potenz von MEHP und CdCl₂, wirkt CdCl₂ in Bezug auf Connexin 43 etwas effektiver als MEHP.

Bei Betrachtung der Effekte von CdCl₂ auf die untersuchten Strukturproteine der Blut-Hoden-Schranke konnten insgesamt wieder die stärksten Effekte an Occludin und die geringsten an den β 1-Integrinen beobachtet werden.

4.3 Schlußfolgerung

Gerade bei jungen Patienten auf Früh- und Neugeborenenstationen sind Phthalatbelastungen durch Medizinprodukte problematisch. Die Angaben aus verschiedenen Studien variieren über Expositionshöhen in Vollblut und Plasma. So werden DEHP-Mittelwerte für Vollblut bis zu 80 mg/l, für Erythrozytenkonzentrate zwischen 14 und 40 mg/l und für Plasmaprodukte zwischen 4 und 545 mg/l, in Einzelfällen sogar bis 890 mg/l angegeben (Huber et al., 1996; CDRH-FDA, 2001; Kahl et al., 2003).

Nach Blutaustauschtransfusionen bei Neugeborenen konnten unmittelbar nach Infusion DEHP Werte zwischen 3,4 und 19,6 mg/l ermittelt werden (Sjöberg et al., 1985a; Sjöberg et al., 1985b).

In dieser Dissertation konnten mit DEHP Konzentrationen von 100 μM (= 39 mg/l) nach einem Tag bzw. 10 μM (=3,9 mg/l) nach sechs Tagen eindeutige Effekte an der SerW₃-Zelllinie gezeigt werden. Die Konzentrationen, mit denen sich bereits nach einem Tag deutliche Effekte zeigen ließen, waren damit doppelt bis 11-fach so hoch wie die angegebene Exposition im Plasma. Nach sechs Tagen wurde sie bezogen auf den höchsten gemessenen Plasmawert um das Fünffache unterschritten.

Für MEHP wurden bis 22,5 mg/l in Blutprodukten und zwischen 2,4 und 15 mg/l direkt nach Austauschtransfusionen bei Neugeborenen angegeben (Sjöberg et al., 1985a; Sjöberg et al., 1985b; CDRH-FDA, 2001; Kahl et al., 2003). Auch hier sind die Effektkonzentrationen mit 1 μM (=0,278 mg/l) nach einem Tag um das Acht- bis 54-fache und mit 0,1 μM (=0,0278 mg/l) nach sechs Tagen um das 80 bis 540-fache geringer als die maximalen, gemessenen Konzentrationen bei den Patienten.

Bei Neugeborenen ist kein Cadmium nachzuweisen. Es akkumuliert im menschlichen Körper erst im Laufe des Lebens. Im Blut wurden Cadmium-Konzentrationen von 0,2-1,1 $\mu\text{g/l}$ bei Nichtrauchern und bei Rauchern zwischen 0,7-3,9 $\mu\text{g/l}$ nachgewiesen (Schäfer et al., 2004). Die an den SerW₃-Zellen wirksamen Konzentrationen von 0,1 μM (=18,33 $\mu\text{g/l}$) nach einem Tag sind somit 16,6-fach höher.

Potentiell schädigende Substanzen bewirken an Sertoli-Zellen zuerst direkte spezielle Veränderungen, die in sekundäre Manifestationen übergehen können. Direkte Veränderungen sind veränderte Keimzellbindungen, Defekte an der Blut-Hoden-Schranke, ungenügender apikaler zytoskelettaler Support und Rezeptor/*second-messenger* Veränderungen. Als Manifestationen erscheinen Vakuolisierungen von Endoplasmatischem Retikulum und Vesikeln, apikales Ablösen und Ausfallen von Keimzellen, Sertoli-Zell-Apoptose, Keimzellapoptose, Veränderungen der Verteilung, der Quantität oder der biochemischen Eigenschaften testikulärer Komponenten, interstitieller Verlust von Sertoli-Zell-Proteinen und abnehmende Sertoli-Zellzahlen (Boekelheide et al., 2005).

An den Zellen der SerW₃-Zelllinie konnten konzentrations- und zeitabhängige Wirkungen von DEHP, MEHP und CdCl₂ auf wichtige Strukturproteine der Sertoli-Zellen und auf Zellzahlen sowie morphologische Veränderungen nach MEHP-Exposition licht- und elektronenmikroskopisch gezeigt werden.

Bislang sind die derzeitigen humanen toxikologischen Daten über die pränatale und kindliche Belastung durch Phthalate noch ungenügend (Lyche et al., 2009), jedoch kann man aus den gewonnenen Daten dieser Arbeit schließen, dass es bereits bei niedrigen Konzentrationen, die unterhalb der maximal gemessenen Exposition des Menschen liegen, zu spezifischen Veränderungen kommt, welche die Dringlichkeit weiterer gezielter Studien deutlich machen.

4.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte festgestellt werden, dass die Zelllinie SerW₃ gut geeignet ist, um die möglichen Effekte in Bezug auf die Schädigung verschiedener Proteine durch verschiedene Fremdstoffe wie DEHP, MEHP und Cadmium auf die Blut-Hoden-Schranke zu simulieren. Durch ihre Omnipräsenz in der Umwelt muss die Frage einer möglichen schädigenden Wirkung auf die sich entwickelnden und auch ausgereiften Reproduktionsorgane sehr ernst genommen werden. Die Zellen der SerW₃-Zelllinie zeigen relevante Strukturmerkmale natürlicher Sertoli-Zellen, so dass Schädigungen der Proteine, die in der Blut-Hoden-Schranke vorkommen, nachgewiesen werden können. Durch die Teilungsfähigkeit der SerW₃-Zellen sind die Versuche zeitlich nicht so limitiert wie *in vitro* Versuche mit Primärkulturen der Sertoli-Zellen. Derzeit gibt es wenige Publikationen zu *in vitro* Versuchen, die diese Substanzen über einen längeren Zeitraum getestet haben. Außerdem könnte die Anzahl von Tierexperimenten durch die Testung an der Zelllinie reduziert werden. Um weitere Proteine der Blut-Hoden-Schranke durch Verfahren wie Western Blot Analyse oder Immunhistologie nachzuweisen und zu beurteilen, können weitere Antikörper verwendet werden. Identifizierungen von Apoptosesystemen, Aktivierungen von Schlüsselenzymen und Signalkaskaden könnten mit anderen Methoden, wie z.B. durch das PCR-Verfahren, untersucht werden. Besonders die Wirkungen alternativer Phthalat-Verbindungen und ihrer aktiven Metaboliten oder anderer umweltrelevanter Stoffe sollten weiterhin untersucht werden, um mögliche Schädigungen auf den Reproduktionstrakt so weit wie möglich frühzeitig zu erkennen und nach Möglichkeit zu vermeiden.

5 Zusammenfassung

Di-(2-ethylhexyl)-phthalat (DEHP) ist ein synthetischer Weichmacher, der mit einem sehr hohen Anteil in PVC-haltigen Alltags- und Medizinprodukten immer noch häufige Verwendung findet. Es ist nicht kovalent an die Kunststoffmatrix gebunden und lässt sich wegen seiner lipophilen Eigenschaften durch fetthaltige Substanzen aus Blutbeuteln oder Kathetersystemen leicht herauslösen. Im Gastrointestinaltrakt wird es enzymatisch zu seinem korrespondierenden aktiven Metaboliten Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat (MEHP) verstoffwechselt. Die potentiell schädigenden Wirkungen dieser Phthalate auf den Reproduktionstrakt sind schon seit über 60 Jahren bekannt.

Das in der Industrie weit verbreitete Schwermetall Cadmium wird überwiegend durch Nahrung oder Zigarettenrauch aufgenommen und über Jahrzehnte im Körper gespeichert. Ebenso sind die reproduktionstoxischen Wirkungen von Cadmium seit dem frühen 20. Jahrhundert bekannt. Darum wurde es als Vergleichssubstanz zu den Phthalaten für die hier beschriebenen Experimente ausgewählt.

In den Versuchen für diese Dissertation wurden als Prüfzeitpunkte ein, drei und sechs Tage und als Konzentrationen 0,01 μM bis 100 μM für die Phthalate und 0,01 μM bis 1 μM für CdCl_2 ausgewählt. Die Wirkung der Verbindungen auf den Hoden und die mögliche Schädigung der Blut-Hoden-Schranke wurde am Modell der Sertoli-Zelllinie SerW₃ untersucht, die alle wesentlichen Strukturmerkmale von natürlich vorkommenden Sertoli-Zellen aufweist. Die Effekte der charakteristischen Proteine der *tight junctions*, *adherens junctions* und *gap junctions* und somit auch der Blut-Hoden-Schranke wurden durch immunhistologische und Western Blot Untersuchungen analysiert. Dabei wurden Occludin, N-Cadherin, β_1 -Integrine, Vimentin und Connexin 43 ausgewählt, die stellvertretend für die verschiedenen Zell-Zell-Kontakte stehen. Durch licht- und elektronenmikroskopische Analysen konnten morphologische und ultrastrukturelle Veränderungen dargestellt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei DEHP außer nach sechs Tagen in den hohen Konzentrationen kaum Veränderungen an den Proteinen dargestellt haben. Bei MEHP waren Effekte bereits nach einem Tag in den hohen Konzentrationen und deutliche Veränderungen nach Tag drei in den mittleren bis niedrigen Konzentrationen zu sehen. CdCl_2 stellte sich im Vergleich zu den Phthalaten als potentester Stoff dar. Aufgrund seines hohen zelltoxischen Potentials konnten die Zellen nur in Konzentrationen bis maximal 1 μM getestet werden. Das stärkste Ausmaß an Veränderungen konnte bei dem *tight junction* Protein Occludin bei allen drei Ver-

bindungen beobachtet werden. Weiterhin wurden deutliche Veränderungen bei dem Adhäsionsprotein N-Cadherin und dem *gap junction* Protein Connexin 43 gesehen.

Im Vergleich mit den anderen Strukturproteinen wurden die β_1 -Integrine als *adherens junctions* Proteine am wenigsten beeinträchtigt. In der Immunhistologie zeigten sich bei Vimentin nach MEHP- und CdCl₂-Exposition deutliche Veränderungen. Mit Hilfe der in dieser Dissertation gewonnenen Daten konnte die Eignung der Sertoli-Zelllinie SerW₃ für *in vitro* Untersuchungen mit Fremdstoffen gezeigt werden. Insbesondere für umweltrelevante Stoffe ist es sinnvoll auch längere Expositionszeiten zu realisieren, die mit Primärkulturen von Sertoli-Zellen nicht möglich sind.

6 Literaturverzeichnis

AGPU – Arbeitsgemeinschaft PVC und Umwelt (2006): Marktdaten Weichmacher. <http://www.agpu.com/de/infoservice/downloads.html> (letzter Zugriff 24.09.2010)

Akinloye, O., Arowojolu, A. O., Shittu, O. B., Anetor, J. I. (2006). Cadmium toxicity: a possible cause of male infertility in Nigeria. *Reprod Biol*, 6: 17-30

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: *Molecular Biology of The Cell*; 5th edition; Garland Science: 1130-1204

Albro, P. W., Lavenhar, S. R. (1989). Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev*, 21: 13-34

Alsberg, C. L., Schwartz, E. W. (1919). Pharmacological action of cadmium. *J Pharmacol Exp Ther*, 13: 504-505

Andriana, B.B., Tay, T. W., Maki, I., Awal, M. A., Kanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2004). An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat in vitro. *J Vet Sci*, 5: 235-240

Arcadi, F. A., Costa, C., Imperatore, C., Marchese, A., Rapisarda, A., Salemi, M., Trimarchi G. R., Costa, G. (1998). Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem Toxicol*, 36: 963-970

ATSDR - US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2002). Toxicological Profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate. <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=684&tid=65> (letzter Zugriff 24.09.2010)

Balda, M. S., Matter, K. (1998). Tight junctions. *J Cell Sci*, 111: 541-547

Bart, J., Groen, H. J. M., van der Graaf, W. T. A., Hollema, H., Hendrikse, N. H., Vaalburg, W., Sleijfer, D. T., de Vries, E. G. E. (2002). An oncological view on the blood-testis barrier. *Lancet Oncol*, 3: 357-363

Berliner, A. F., Jones-Witters, P. (1975). Early effects of a lethal cadmium dose on gerbil testis. *Biol Reprod*, 13: 240-247

BfR - Bundesinstitut für Risikobewertung (2003). Tägliche Aufnahme von Diethylhexylphthalat (DEHP). Stellungnahme des BfR vom 23. Juli 2003. http://www.bfr.bund.de/cm/208/taegliche_aufnahme_von_diethylhexylphthalat.pdf (letzter Zugriff 24.09.2010)

Boekelheide, K., Johnson, K. J., Richburg, J. H. (2005). Sertoli Cell Toxicants. In: *Sertoli Cell Biology*, Elsevier: 345-382

Boekelheide, K., Lee, J., Shipp, E. B., Richburg, J. H., Li, G. (1998). Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure. *Toxicol Lett*, 102-103: 503-508

Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*, 305: 609-613

CDRH-FDA - Center for Devices and Radiological Health U.S, Food and Drug Administration (2001). Safety Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) Released from PVC Medical Devices. www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM080457.pdf (letzter Zugriff 24.09.2010)

Chauvigné, F., Menuet, A., Lesné, L., Chagnon, M.-C., Chevrier, C., Regnier, L.-F., Angerer, J., Jégou, B. (2009). Time- and dose-related effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its main metabolites on the function of the rat fetal testis in vitro. *Environ Health Perspect*, 117: 515-521

Cheng, C. Y., Mruk, D. D. (2002). Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiol Rev*, 82: 825-874

Chung, N. P., Cheng, C. Y. (2001). Is cadmium chloride-induced inter-sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*, 142: 1878-1888

Clough, S. R., Welsh, M. J., Payne, A. H., Brown, C. D., Brabec, M. J. (1990). Primary rat Sertoli and interstitial cells exhibit a differential response to cadmium. *Cell Biol Toxicol*, 6: 63-79

CSTEE – Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (2004). Opinion on the results of a second Risk Assessment of: Bis(2-ethylhexyl)phthalate [DEHP] Human Health Part, 41th plenary meeting of 8 January 2004. <http://ec.europa.eu/geninfo/query/resultaction.jsp?Page=2> (letzter Zugriff 05.10.2010)

De Souza Predes, F., Diamante, M. A. S., Dolder, H. (2010). Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *Int J Exp Pathol*, 91: 125-131

DFG – Deutsche Forschungsgemeinschaft (2002). Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe – Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten und Einstufungen; 35. Lieferung, Wiley-VCH

Doull, J., Cattley, R., Elcombe, C., Lake, B. G., Swenberg, J., Wilkinson, C., Williams, G., van Gemert, M. (1999). A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regul Toxicol Pharmacol*, 29: 327-357

Dym, M., Fawcett, D. W. (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod*, 3: 308-326

ECB – European Chemicals Bureau (2008). European Union Risk Assessment Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), Final Report 2008. Second Priority List, 80 <http://ecb.jrc.ec.europa.eu/> (letzter Zugriff 05.10.2010)

ECPI – European Council for Plasticisers and Intermediates (2010). www.ecpi.org (letzter Zugriff 05.10.2010)

Elmadfa, I., Burger, P. (1999). Expertengutachten zur Lebensmittelsicherheit Cadmium. Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien. <http://www.bmg.gv.at/cms/site/standard.html?channel=CH0857&doc=CMS1038849469927> (letzter Zugriff 05.10.2010)

European Commission (2005). Restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles) directive 2005/84/EC. Off. J. Eur. Union, L 344: 40–43 <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32005L0084:en:NOT> (letzter Zugriff 02.01.2011)

Fanning, A. S., Mitic, L. L., Anderson, J. M (1999). Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol*, 10: 1337-1345

Fende, P. L., Niewenhuis, R. J. (1977). An electron microscopic study of the effects of cadmium chloride on cryptorchid testes of the rat. *Biol Reprod*, 16: 298-305

Fiorini, C., Tilloy-Ellul, A., Chevalier, S., Charuel, C., Pointis, G. (2004). Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*, 18: 413-421

Fiorini, C., Gilleron, J., Carette, D., Valette, A., Tilloy, A., Chevalier, S., Segretain, D., Pointis, G. (2008). Accelerated internalization of junctional membrane proteins (connexin 43, N-cadherin and ZO-1) within endocytic vacuoles: an early event of DDT carcinogenicity. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 56-67

Fuchs, E., Weber, K. (1994). Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem*, 63: 345-382

Gray, T. J. B., Beamand, J. A. (1984). Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. *Food Chem Toxicol*, 22: 123-131

Gray, T. J. B., Gangolli, D. (1986). Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect*, 65: 229-235

Griswold, M. D. (1995). Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*, 52: 211-216

Griswold, M. D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, 9: 411-416

Haffor, A. S., Abou-Tarboush, F. M. (2004). Testicular cellular toxicity of cadmium: transmission electron microscopy examination. *J Environ Biol*, 25: 251-258

- Halden, R. (2010). Plastics and health risks. *Annu Rev Public Health*, 31: 179-194
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. (2010a). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. *Microsc Res Tech*, 73: 241-278
- Hermo, L., Pelletier, R. M., Cyr, D. G., Smith, C. E. (2010b). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 5: intercellular junctions and contacts between germs cells and Sertoli cells and their regulatory interactions, testicular cholesterol, and genes/proteins associated with more than one germ cell generation. *Microsc Res Tech*, 73: 409-494
- Hess, R., Franca, L. (2005). Structure of the Sertoli Cell. In: *Sertoli Cell Biology*, Elsevier: 19-40
- Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health*, 210: 623-34
- Hildenbrand, S. L., Lehmann, H.-D., Wodarz, R., Ziemer, G., Wendel, H. P. (2005). PVC-plasticizer DEHP in medical products: do thin coatings really reduce DEHP leaching into blood? *Perfusion*, 20: 351-357
- Huber, W. W., Grasl-Kraupp, B., Schulte-Hermann, R. (1996). Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol*, 26: 365-481
- IARC - International Agency for Research on Cancer (2000). Di(2-ethylhexyl)phthalate. *IARC Monographs*, 77: 41-148
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/index.php>
(letzter Zugriff 02.01.2011)
- Ivaska, J., Pallari, H. M., Nevo, J., Eriksson, J. E. (2007). Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*, 313: 2050-2062
- Jørgensen, N., Andersen, A. G., Eustache, F, Irvine, D. S., Suominen, J., Petersen, J. H., Andersen, A. N., Auger, J., Cawood, E. H., Horte, A., Jensen, T. K., Jouannet, P., Keiding, N., Vierula, M., Toppari, J., Skakkebaek, N. E. (2001). Regional differences in semen quality in Europe. *Hum Reprod*, 16: 1012-1019
- Junqueira L., Carneiro J. (2005). The male reproductive System. In: *Basic Histology*; eleventh edition; Mc Graw-Hill: 418-434
- Kahl, R., Degen, G., Foth, H., Kramer, P.-J., Lilienblum, W., Schrenk, D., Schulz, T., Schweinfurth, H. (2003). Stellungnahme der Beratungskommission der Sektion Toxikologie der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) zu möglichen Gesundheitsgefahren durch Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) aus Medizinprodukten in neonatologischen Intensivstationen. *Umweltmedizin in Forschung und Praxis*, 8: 25-30

Kang, K. S., Lee, Y. S., Kim, H. S., Kim, S. H. (2002). DI-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *J Toxicol Environ Health Part A*, 65: 447-459

Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol*, 16: 529-653

Koch, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2006). Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure - an update and latest results. *Int J Androl*, 29: 155-165

Kommission Human-Biomonitoring (2007). Ableitung von Human-Biomonitoring-(HBM)-Werten auf der Basis tolerabler Aufnahmemengen - Teil III: HBM-Werte für Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 50: 255-259

Kusakabe, T., Nakajima, K., Suzuki, K., Nakazato, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Kobayashi, K., Koyama, H., Arakawa, K., Nagamine, T. (2008a). The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals*, 21: 71-81

Kusakabe, T., Nakajima, K., Nakazato, K., Suzuki, K., Takada, H., Satoh, T., Oikawa, M., Arakawa, K., Nagamine, T. (2008b). Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol In Vitro*, 22: 1469-1475

Lablack, A., Bourdon, V., Defamie, N., Batias, C., Mesnil, M., Fenichel, P., Pointis, G., Segretain, D. (1998). Ultrastructural and biochemical evidence for gap junction and connexin 43 expression in a clonal Sertoli cell line: a potential model in the study of junctional complex formation. *Cell Tissue Res*, 294: 279-287

Labow, R. S., Card, R. T., Rock, G. (1987). The effect of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate on red cell deformability. *Blood*, 70: 319-323

Lee, J., Richburg, J. H., Younkin, S. C., Boekelheide, K. (1997). The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, 138: 2081-2088

Lee, J., Richburg, J. H., Shipp, E. B., Meistrich, M. L., Boekelheide K. (1999). The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology*, 140: 852-858

Li, L. H., Jester, W. F., Orth, J. M. (1998). Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 153: 258-265

Li, H., Kim, H. (2003). Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal and neonatal rat testis organ cultures. *Biol Reprod*, 69: 1964-1972

Li, M. W., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2009). Connexin 43 and plakophilin-2 as

a protein complex that regulates blood-testis barrier dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106: 10213-10218

Loff, S., Kabs, F., Witt, K., Sartoris, J., Mandl, B., Niessen, K. H., Waag, K. L. (2000). Polyvinylchloride infusion lines expose infants to large amounts of toxic plasticizers. *J Pediatr Surg*, 35: 1775-1781

Lyche, J. L., Gutleb, A. C., Bergman, A., Eriksen, G. S., Murk, A. J., Ropstad, E., Saunders, M., Skaare, J. U. (2009). Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 12: 225-249

Martino-Andrade, A. J., Chahoud, I. (2010). Reproductive toxicity of phthalate esters. *Mol Nutr Food Res*, 54: 148-157

Merzenich, H., Zeeb, H., Blettner, M. (2010). Decreasing sperm quality: a global problem? *BMC Public Health*, 10: 24-28

Mitic, L. L., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M. (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279: 250-254

Moffit, J., Bryant, B. H., Hall, S. J., Boekelheide, K. (2007). Dose-dependent effects of sertoli cell toxicants 2,5-hexanedione, carbendazim, and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in adult rat testis. *Toxicol Pathol*, 35: 719-727

Monsees, T. K., Franz, M., Gebhardt, S., Winterstein, U., Schill, W. B., Hayatpour, J. (2000). Sertoli cells as a target for reproductive hazards. *Andrologia*, 32: 239-246

Mruk, D. D., Silvestrini, B., Cheng, C. Y. (2008). Anchoring junctions as drug targets: role in contraceptive development. *Pharmacol Rev*, 60: 146-180

Nieschlag, E. (2009). Aufgaben und Ziele der Andrologie. In: *Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*; 3. Auflage; Springer Medizin Verlag: 3-12

NTP-CERHR – National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, Center for the evaluation of risks to human reproduction (2006). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP). NIH Publ No. 06-4476
<http://ntpsearch.niehs.nih.gov/query.html?col=060cerh&qt=monograph+dehp>
(letzter Zugriff 02.01.2011)

Parreira, G. G., Melo, R. C., Russel, L. D. (2002). Relationship of sertoli-sertoli tight junctions to ectoplasmic specialization in conventional and en face views. *Biol Reprod*, 67: 1232-1241

Peck, C. C., Albro, P. W. (1982). Toxic potential of the plasticizer Di(2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ Health Perspect*, 45: 11-17

Petersen, J. H., Breindahl, T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit Contam*, 17: 133-141

Pognan, F., Masson, M. T., Lagelle, F., Charuel, C. (1997). Establishment of a rat Sertoli cell line that displays the morphological and some of the functional characteristics of the native cell. *Cell Biol Toxicol*, 13: 453-463

Pointis, G., Gilleron, J., Carette, D., Segretain, D. (2010). Physiological and physiopathological aspects of connexins and communicating gap junctions in spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*, 365: 1607-1620

Poon, R., Lecavalier, P., Mueller, R., Valli, V. E., Procter, B. G., Chu, I. (1997). Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol*, 35: 225-239

Rhodes, C., Orton, T. C., Pratt, I. S., Batten, P. L., Bratt, H. Jackson, S. J. Elcombe C. R. (1986). Comparative pharmacokinetics and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in rats and marmosets: extrapolation of effects in rodents to man. *Environ Health Perspect*, 65: 299-307

Richburg, J. H., Boekelheide, K. (1996). Mono-(2-ethylhexyl)-phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 137: 42-50

Riecke, K., Stahlmann, R. (2000). Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia*, 32: 209-218

Russel, L. D. (1977). Desmosome-like junctions between Sertoli and germ cells in the rat testis. *Am J Anat*, 148: 301-312

Salanova, M., Ricci, G., Boitani, C., Stafanini, M., De Grossi, S., Palombi, F. (1998). Junctional contacts between Sertoli cells in normal and aspermatogenic rat seminiferous epithelium contain alpha6beta1 integrins, and their formation is controlled by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, 58: 371-378

Schäfer, S. G., Elsenhans, B., Forth, W., Schumann, K. (2004). Metalle. In: *Lehrbuch der Toxikologie*; 2. Auflage; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart: 763-820

Schmid, P., Schlatter, C. (1985). Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate in man. *Xenobiotica*, 15: 251-256

Shaffer, C. B., Carpenter, C. P., Smyth Jr., H. F. (1945). Acute and subacute toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate with note upon its metabolism. *J Indust Hyg Toxicol*, 27: 130-135

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*, 125: 769-784

Siu, E. R., Wong, E. W. P., Mruk, D. D., Porto, C. S., Cheng, C. Y. (2009). An occludin-focal adhesion kinase protein complex at the blood-testis barrier: a study using the cadmium model. *Endocrinology*, 150: 3336-3344

- Sjöberg, P. O., Bondesson, U. G., Sedin, E. G., Gustafsson J. P. (1985a). Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion. *Transfusion*, 25: 424-428
- Sjöberg, P., Bondesson, U., Sedin, G., Gustafsson, J. (1985b). Dispositions of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in newborn infants subjected to exchange transfusions. *Eur J Clin Invest*, 15: 430-436
- Sorenson, D. R., Brabec, M. (2003). The response of adult rat sertoli cells, immortalized by a temperature-sensitive mutant of SV40, to 1,2-dinitrobenzene, 1,3-dinitrobenzene, 2,4-dinitrotoluene, 3,4-dinitrotoluene, and cadmium. *Cell Biol Toxicol* , 19: 107-119
- Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Kurohmaru, M. (2007). Disappearance of vimentin in Sertoli cells: a mono(2-ethylhexyl) phthalate effect. *Int J Toxicol*, 26: 289-295
- Thompson, J., Bannigan, J. (2008). Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo. *Reprod Toxicol*, 25: 304-315
- Vogl, A.W., Pfeiffer, D. C., Mulholland, D., Kimel, G., Guttman, J. (2000). Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Arch Histol Cytol*, 63: 1-15
- Weinbauer, G., Gromoll, J., Simoni, M., Nieschlag, E. (2009). Physiologie der Hodenfunktion. In: *Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*; 3. Auflage; Springer Medizin Verlag: 15-61
- Wolfe, G. W., Layton, K. A. (2003). Multigeneration reproduction toxicity study in rats (un-audited draft): Diethylhexylphthalate: Multigenerational reproductive assessment by continuous breeding when administered to Sprague-Dawley rats in the diet. TherImmune Research Corporation, Gaithersburg, Maryland, TRC Study No 7244-200 (04.10.2010 online nicht verfügbar, zitiert nach: Kommission Human-Biomonitoring (2007). Ableitung von Human-Biomonitoring-(HBM)-Werten auf der Basis tolerabler Aufnahmemengen - Teil III: HBM-Werte für Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP). *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 50: 255-259)
- Wong, C. H., Xia, W., Lee, N. P. Y., Mruk, D. D., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2005). Regulation of ectoplasmic specialization dynamics in the seminiferous epithelium by focal adhesion-associated proteins in testosterone-suppressed rat testes. *Endocrinology*, 146: 1192-204
- Wong, C. H., Cheng, C. Y. (2005). The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 71: 263-296
- Yao, P. L., Lin, Y. C., Richburg, J. H. (2009). TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod*, 80: 581-589
- Yao, P. L., Lin, Y. C., Richburg, J. H. (2010). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod*, 82: 516-527

Zhang, Y. H., Lin, L., Liu, Z. W., Jiang, X. Z., Chen, B. H. (2008). Disruption effects of monophthalate exposures on inter-Sertoli tight junction in a two-compartment culture model. *Environ Toxicol*, 23: 302-308

7 Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Stahlmann für die Vergabe des Dissertationsthemas, seine intensive Förderung und Diskussionsbereitschaft als Doktorvater bedanken.

Außerdem möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe für die nette Aufnahme in die AG Stahlmann, das gute Arbeitsklima und auch für die tolle Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen Fimmel, Jankowski und Vetter danken.

Ich danke Herrn Prof. Mehdi Shakibaei für die Zusammenarbeit und die Herstellung der licht- und elektronenmikroskopischen Bilder.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, die mich während meines ganzen Studiums unterstützt und an mich geglaubt haben.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Frau Agnes Föst für die gemeinsame Arbeit, die viele gemeinsame Zeit und das gegenseitige Bestärken und Diskutieren.

8 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

9 Erklärung

„Ich, Martin Zurek, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Wirkungen der Phthalate DEHP [Di-(2-ethylhexyl)-phthalat] und MEHP [Mono-(2-ethylhexyl)-phthalat] und des Schwermetalls Cadmium auf die Zellen der Sertoli-Zelllinie SerW₃ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

10 Veröffentlichungen

Foest, A., Zurek, M., Baumann-Wilschke, I., Stahlmann, R. (2009). Sertoli cells (SerW₃) are Affected on Linezolid at Therapeutically Relevant Concentrations. In: Toxicology Letters, 189S:S57-S273 (Abstract-No. I11)

Mehdi Shakibaei, Agnes Föst, Martin Zurek, Valentyna Zolotukhina, Ralf Stahlmann (2008) Linezolid verursacht ultrastrukturelle Veränderungen bei SerW3-Zellen *in vitro*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 377 (1): 1–98 (Abstract No: 370)