

Aus dem Institut für
Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Abt. Toxikologie
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

**Wirkungen von 2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzo-*p*-dioxin auf die
extrazelluläre Matrix des Thymus von juvenilen Marmosets
(*Callithrix jacchus*)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Christian Nottebrock
aus Stadthagen

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ralf Stahlmann
2. PD Dr. T. Schulz-Schalge

Datum der Promotion: 25.10.2005

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines	1
1.2. Dioxine und dioxinverwandte Verbindungen	2
1.2.1. Chemische Struktur	2
1.2.2. Entstehung	4
1.2.3. Halbwertszeit und Abbau	4
1.2.3.1. Halbwertszeit in der Umwelt	4
1.2.3.2. Halbwertszeit im Organismus.....	5
1.2.4. Risikoerfassung und I-TEQ	6
1.2.5. Vorkommen, Transport und Konzentration in der Umwelt.....	7
1.2.5.1. Belastung der Umwelt	9
1.2.5.2. Belastung von Nahrungsmitteln	10
1.2.6. Menschliche Exposition und Aufnahme.....	11
1.2.7. Ah-Rezeptor.....	16
1.3. Toxizität	18
1.3.1. Akute Toxizität.....	19
1.3.2. Cytochrom P450-Induktion	19
1.3.3. Reproduktionstoxizität und Effekte auf Sexualhormone.....	19
1.3.4. Tumor-Promotion.....	20
1.3.5. Neurotoxizität.....	21
1.3.6. Immuntoxizität	21
1.4. Thymus	22
1.4.1. Aufbau und Entwicklung	22
1.4.2. Aufgaben.....	24
1.4.3. Proteine der extrazellulären Matrix, Integrine und TGF-beta	25
1.4.3.1. Proteine der extrazellulären Matrix	25

1.4.3.2. Integrine	26
1.4.3.3. TGF-beta und TGF-beta-Rezeptor	28
1.4.4. Mögliche Wirkmechanismen der toxischen Effekte auf den Thymus	29
1.5. Zielsetzung	30
2. Material und Methoden	31
2.1. Tierhaltung, Behandlung, Probengewinnung.....	31
2.1.1. Tierhaltung.....	31
2.1.2. Behandlung	31
2.1.3. Probengewinnung.....	31
2.2. Gefrierschnitte, Immunfluoreszenz, Fotos, Auswertung.....	33
2.2.1. Anfertigung von Kryostatschnitten	33
2.2.2. Antikörper.....	33
2.2.3. Immunfluoreszenz	34
2.2.3.1. Allgemeines.....	34
2.2.3.2. Verfahren	34
2.2.4. Fluoreszenzmikroskopie und –fotografie	35
2.2.5. Bildbearbeitung und densitometrische Auswertung	35
2.3. Probenaufbereitung, Gel-Elektrophorese, Western-Blot.....	36
2.3.1. Allgemeines	36
2.3.2. Verwendete Chemikalien.....	36
2.3.3. Probenaufbereitung	39
2.3.4. Gesamtproteinbestimmung, Konzentrationsangleichung.....	39
2.3.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	40
2.3.6. Western-Blot.....	41
2.3.7. Immunmarkierung.....	41
2.3.7.1. Verwendete Antikörper.....	41
2.3.7.2. Verfahren	42
2.3.8. Densitometrische Auswertung	43

3. Ergebnisse	44
3.1. Fluoreszenzmikroskopie und morphologische Beschreibungen	44
3.1.1. Untersuchtes Material und Markierung	44
3.1.2. Artefakte und Auswahl eines repräsentativen Teilstücks	44
3.1.3. Verwendete Antikörper	45
3.1.4. Fluoreszenzmikroskopie mit Kollagen Typ I	46
3.1.4.1. Übersicht	46
3.1.4.2. Vergleich Kontrolle und Behandlung	46
3.1.5. Fluoreszenzmikroskopie mit Kollagen Typ IV	46
3.1.5.1. Übersicht	46
3.1.5.2. Vergleich Kontrolle und Behandlung	47
3.1.6. Fluoreszenzmikroskopie mit Fibronectin	47
3.1.6.1. Übersicht	47
3.1.6.2. Vergleich Kontrolle und Behandlung	47
3.1.7. Fluoreszenzmikroskopie mit Laminin	48
3.1.7.1. Übersicht	48
3.1.7.2. Vergleich Kontrolle und Behandlung	48
3.1.8. Zusammenfassung	49
3.1.9. Abbildungen	50
3.2. Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz	58
3.2.1. Einführung	58
3.2.2. Auswertung des Kollagen Typ I-Antikörpers	58
3.2.3. Auswertung des Kollagen Typ IV-Antikörpers	58
3.2.4. Auswertung des Fibronectin-Antikörpers	59
3.2.5. Auswertung des Laminin-Antikörpers	59
3.2.6. Zusammenfassung	59
3.2.7. Abbildungen	60
3.3. Auswertung der Immunoblots	66
3.3.1. Untersuchtes Material	66
3.3.2. Verfahren der densitometrischen Auswertung	66

3.3.3. Verwendete Antikörper	67
3.3.4. Antikörper gegen Integrine	67
3.3.4.1. Auswertung des CD49a-Antikörpers.....	67
3.3.4.2. Auswertung des CD49e-Antikörpers.....	67
3.3.4.3. Auswertung des CD49f-Antikörpers	68
3.3.4.4. Auswertung des CD29-Antikörpers	68
3.3.5. Antikörper gegen Bestandteile der EZM.....	68
3.3.5.1. Auswertung des Kollagen Typ I-Antikörpers	68
3.3.5.2. Auswertung des Kollagen Typ IV-Antikörpers	69
3.3.5.3. Auswertung des Fibronectin-Antikörpers.....	69
3.3.5.4. Auswertung des Laminin-Antikörpers.....	69
3.3.6. Auswertung des TGF-beta1-Antikörpers	69
3.3.7. Auswertung des TGF-beta-Rezeptor-Typ-II-Antikörpers.....	70
3.3.8. Auswertung des beta-Actin-Antikörpers	70
3.3.9. Zusammenfassung	70
3.3.10. Abbildungen.....	72
4. Diskussion.....	87
4.1. Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit	88
4.2. Wirkungen von TCDD auf den Thymus.....	89
4.2.1. Wirkungen auf Präthymozyten	90
4.2.2. Wirkungen auf sekundäre Immunorgane	90
4.2.3. Wirkungen auf die zelluläre und humorale Immunantwort.....	91
4.2.4. Die Rolle des Ah-Rezeptors.....	91
4.2.5. Apoptose von Thymozyten und peripheren Lymphozyten	92
4.2.6. Vergleich der Wirkung von TCDD und anderen Substanzen.....	93
4.2.7. Wirkungen von Stresseffekten und Mangelernährung	93
4.2.8. Studien an nicht-menschlichen Primaten.....	94
4.2.9. Studien an humanem Gewebe.....	94
4.2.10. Epidemiologische Studien	95

4.3 Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Thymus.....	96
4.3.1 Bedeutung und Aufgaben der EZM im Thymus.....	96
4.3.2 Effekte nach Eingriff in die Integrität der EZM	97
4.3.3 Effekte von Zytokinen	97
4.3.4 Effekte von TCDD auf Zytokine und die EZM	98
4.3.5 Hypothesen zum Wirkmechanismus von TCDD	99
4.3.6 Effekte von TCDD auf beta-Actin	100
4.4 Aktuelle Bedeutung von Dioxinen und Schwierigkeiten der Risikoerfassung...	101
5. Zusammenfassung.....	103
6. Literaturverzeichnis.....	105
7. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	127
8. Danksagung	129
9. Lebenslauf.....	130

