

3. Ergebnisse

3.1 Fluoreszenzmikroskopie und morphologische Beschreibungen

3.1.1 Untersuchtes Material und Markierung

Für diese Versuchsreihe wurden insgesamt 9 Marmosets verwendet. Die Tiere wurden in 3 Gruppen zu je 3 Tieren eingeteilt. Die erste Gruppe (Gruppe A) wurde nur mit dem Vehikel behandelt. Die zweite Gruppe (Gruppe B) wurde mit einer einmaligen Dosis von 100 ng TCDD/kg KG behandelt, die Probennahme (Tötung der Tiere, Präparation des Thymus) erfolgte 2 Wochen nach der Behandlung. Die dritte Gruppe (Gruppe C) erhielt auch eine einmalige Dosis von 100 ng TCDD/kg, die Probennahme erfolgte jedoch nach 4 Wochen. Die Proben der Gruppe A wurden 4 Wochen nach Injektion des Vehikels gewonnen. Während dieser Zeit waren keine statistisch signifikanten Änderungen der Körper- bzw. Thymusgewichte im Vergleich zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppe auffällig.

Untersucht wurden 5 µm dicke Gefrierschnitte aus Teilstücken der Marmoset-Thymi. Zur Färbung wurden nur Schnitte ausgewählt, die lichtmikroskopisch unverletzt erschienen und ohne Faltenbildung dem Objektträger anlagen. Jeder Thymus wurde 4-mal pro Antikörper mit primärem und sekundärem Antikörper gefärbt, zum Ausschluss unspezifischer Fluoreszenzen, als sogenannte „Negativkontrolle“, wurde je 2-mal nur mit dem sekundären Antikörper markiert.

3.1.2 Artefakte und Auswahl eines repräsentativen Teilstücks

Artefakte kamen vor allem dadurch zustande, dass sich das Gewebe beim Spülen während des Färbvorgangs vom Objektträger ablöste, sich Falten bildeten und in diesen Falten sich Antikörper sammelte, der nicht mehr abgespült werden konnte. Weitere Artefakte bildeten auskristallisierte Antikörper-Konglomerate und Verschmutzungen zum Beispiel durch Staub oder Haare. So verunreinigte oder beschädigte Objekte wurden verworfen und nicht zur Fotografie herangezogen.

Um möglichst vergleichbare Bedingungen für die spätere morphologische und densitometrische Auswertung zu schaffen, wurden für die Fotos nur Teilstücke ausgewählt, die repräsentativ und thymustypisch erschienen. Kriterien hierfür waren, dass wenn möglich auf jedem Ausschnitt die thymustypische Struktur bestehend aus Kapsel, Kortex und Medulla erkennbar war. Die

Aufnahme wurde dann so angefertigt, dass die Kapsel am Rande des Ausschnitts zu liegen kam, um so die Verfälschung der Densitometrie durch Aufnahme des schwarzen Hintergrundes zu minimieren. Für die gezeigten Übersichtsaufnahmen (25fache Vergrößerung) wurden Fotos verwendet auf denen alle antikörpertypischen Strukturen besonders gut zu erkennen waren und für den verwendeten Antikörper repräsentativ erschienen. Hierfür wurden unter anderem Bilder von behandelten Tieren ausgewählt, die nach densitometrischer Auswertung keine signifikanten Abweichungen mit den Kontrolltieren aufwiesen.

3.1.3 Verwendete Antikörper

Verwendet wurden Antikörper gegen Bestandteile der extrazellulären Matrix, die ausreichend im Thymus nachweisbar sind und dort wichtige funktionelle Aufgaben erfüllen. Es wurden 4 Antikörper ausgesucht. Diese waren gerichtet gegen: Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin. Alle Antikörper zeigten eine charakteristische Fluoreszenz, unspezifische Fluoreszenzen (Markierung nur mit sekundärem Antikörper als „Negativkontrolle“) fielen sehr gering aus und beschränkten sich zum größten Teil auf die Kapsel des Thymus.

3.1.4 Fluoreszenzmikroskopie (**Kollagen Typ I** markierte Thymi)

3.1.4.1 Übersicht

In Abbildung 14 ist ein Ausschnitt eines Marmoset-Thymus abgebildet. Dieser Ausschnitt ist typisch für eine immunhistochemische Markierung mit einem Kollagen Typ I-Antikörper. Die Vergrößerung beträgt 25fach. Die Zahl 1 bezeichnet die stark angefärbte Kapsel. Darunter schließt sich der nicht angefärbte Kortex (2) an. Der Kortex wird nur von einzelnen Trabekeln (3) durchzogen, die von der Kapsel bis an die Medulla heranreichen. An der Grenze zwischen Kortex und Medulla finden sich ringförmig, retikulär angeordnete stark gefärbte Bereiche (4). Zentral in der Medulla (5) finden sich nur noch einzelne schwächer angefärbte Konglomerate.

3.1.4.2 Vergleich Kontrolle und Behandlung

Beim Vergleich einer Kontrolltieres (Abb. 15, Tier-Nr. 1454.2) mit einem Tier aus einer Behandlungsgruppe (Abb. 16, Tier-Nr. 1452.2) in 50facher Vergrößerung, ist bei letzterem eine stärkere Fluoreszenz des Kollagen Typ I-Antikörpers besonders an der Grenze zwischen Medulla und Kortex auffällig (4). Beim Kontrolltier sind nur wenige Trabekel sichtbar, die Medulla ist schwach gefärbt (Abb. 15, Nr. 3). Das behandelte Tier zeigt eine deutlichere Fluoreszenz der Medulla, die typischen Ringformen an der Kortex-Medulla-Grenze sind stark ausgeprägt (Abb. 16, Nr. 4), während sie beim Kontrolltier nur dezent angedeutet sind.

3.1.5 Fluoreszenzmikroskopie (**Kollagen Typ IV** markierte Thymi)

3.1.5.1 Übersicht

In Abbildung 17 ist ein Ausschnitt eines Marmoset-Thymus abgebildet. Dieser Ausschnitt ist typisch für eine immunhistochemische Färbung mit einem Kollagen Typ IV-Antikörper. Die Vergrößerung beträgt 25fach. Es lassen sich deutlich Kapsel (1), schwach angefärbter Kortex (2) und Medulla (3) abgrenzen. Auffällig sind die in der Medulla anzutreffenden dichtgepackten, zellartig imponierenden Konglomerate (4). Ähnlich wie bei der Färbung mit Kollagen Typ I, ist auch hier eine starke Markierung der Medulla zu beobachten, welche einen ringförmigen Charakter mit zentraler Aussparung aufweist.

3.1.5.2 Vergleich Kontrolle und Behandlung

Verglichen mit der Kontrolle (Abb. 18, Tier-Nr. 1454.2) zeigte sich bei dem behandelten Tier (Abb. 19, Nr. 1440.2) in 50facher Vergrößerung eine allgemein stärkere Fluoreszenz. Diese war besonders in der Grenzzone zwischen Kortex und Medulla auffällig. Die bei beiden Tieren sichtbare ringförmig angefärbte Zone erschien bei der Behandlung deutlich breiter als bei der Kontrolle. (siehe Abb. 19, Nr. 3 und Abb. 18, Nr. 3). Eine schwache Färbung der Medulla war auf beiden Abbildungen zu finden, zudem einige Hassall-Körperchen auf der Abb. 18 (Kontrolltier, Nr. 5).

3.1.6 Fluoreszenzmikroskopie (**Fibronektin** markierte Thymi)

3.1.6.1 Übersicht

In Abbildung 20 ist ein Ausschnitt eines Marmoset-Thymus abgebildet. Dieser Ausschnitt ist typisch für eine immunhistochemische Färbung mit einem Fibronektin-Antikörper. Die Vergrößerung beträgt 25fach. Es lassen sich wieder gut Kapsel (1), Kortex (2) und Medulla (3) unterscheiden, wobei die Kapsel bei allen Fibronektin-gefärbten Präparaten recht schwach fluoresziert. Durch den Kortex ziehen sich auffallend viele radiär angeordnete, trabekelartige Strukturen, die an der Kortex-Medulla-Grenze in die typische zirkuläre Struktur übergehen (4). Direkt in der Medulla finden sich einige bizarr gefärbte Formen, die teilweise zirkulär angeordnet sind.

3.1.6.2 Vergleich Kontrolle und Behandlung

Bei der Markierung in 50facher Vergrößerung mit Fibronektin weichen Kontrolle (hier als Beispiel Tier Nr. 1524.2, Abb. 21) und Behandlung (Abb. 22, Tier-Nr. 1440.2) nicht auffällig voneinander ab. Bei beiden sieht man ein schwach gefärbtes Kortex (1). Wieder gut erkennbar ist die zirkuläre Anordnung von Fibronektinfasern an der Grenze zwischen Kortex und Medulla (3), in Abbildung Nr. 22 sind drei ringförmige Strukturen nebeneinander zu finden. Die Medulla (2) ist insgesamt schwach markiert, es fallen lediglich einzelne strangförmige Fluoreszenzen auf.

3.1.7 Fluoreszenzmikroskopie mit **Laminin** markierten Thymi

3.1.7.1 Übersicht

In Abbildung 23 ist ein Ausschnitt eines Marmoset-Thymus abgebildet. Dieser Ausschnitt ist typisch für eine immunhistochemische Färbung mit einem Laminin-Antikörper. Die Vergrößerung beträgt 25fach. Die mit 1 bezeichnete Kapsel ist deutlich sichtbar, der sich anschließende Kortex wird nur von wenigen fluoreszierenden Streifen durchzogen. In den stark gefärbten Trabekeln finden sich zwei Blutgefäße (4). Die schwächer markierte Medulla wird von einem stärker gefärbten, auch mit den anderen verwendeten Antikörpern erkennbaren, zirkulären Saum an der Grenze zum Kortex umgeben. (3)

3.1.7.2 Vergleich Kontrolle und Behandlung

Bei beiden Tieren (Abb. 24 und 25) fluoresziert die Kapsel (1) intensiv. Verglichen mit dem behandelten Tier (Abb. 24, Nr. 1449.2) erscheint der allgemein schwach gefärbte Kortex (2) jedoch beim Kontrolltier (Abb. 25, Nr.1454.2) breiter und in der Medulla (3) zeigen sich weniger bälkchenartig markierte Strukturen. An einigen Stellen scheint die Medulla zudem eher netzartig diffus gefärbt zu sein, was besonders beim behandelten Tier auffällt (5). Insgesamt zeigt das behandelte Tier mehr positive Strukturen für Laminin.

3.1.8 Zusammenfassung

Mit allen 4 verwendeten Antikörpern ließen sich immer deutlich Kapsel, Kortex und Medulla abgrenzen. Teilweise waren einzelne Gefäße oder auch Hassall'sche Körperchen auffällig. Weiterhin typisch für alle Antikörper war die starke zirkuläre Anfärbbarkeit an der Grenze zwischen Kortex und Medulla. Diese erschien besonders bei den behandelten Marmosets intensiv ausgeprägt, wobei sich keine einheitlichen Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen B und C zeigten. Insgesamt erschienen die immunhistochemischen Färbungen der TCDD-behandelten Marmosets in ihrer Fluoreszenz heller als die der Kontrolltiere. Weitere morphologische Auffälligkeiten im Vergleich Kontrolle zu Behandlung ließen sich nicht feststellen.

Abb. 14

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I. Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1440.2)**. Vergrößerung: 25fach, Länge des Messbalkens: 100 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Trabekel, 4=zirkulär gefärbte Bereiche an der Kortex-Medulla-Grenze, 5=Medulla

Abb. 15

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I. Kontrolltier (Tier-Nr. 1454.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla (umgeben von angedeuteter Ringstruktur)

Abb. 16

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I. Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1452.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla, 4=zirkuläre Strukturen an der Kortex-Medulla-Grenze

Abb.14

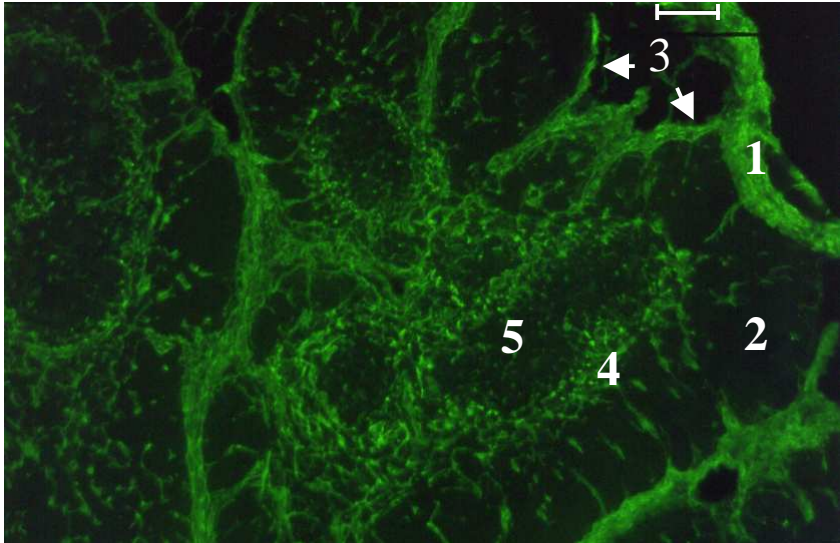


Abb. 15

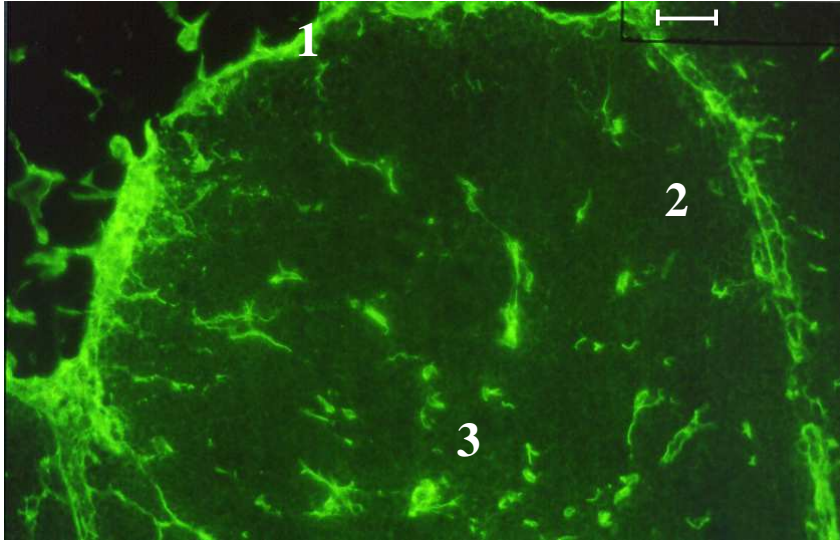


Abb. 16

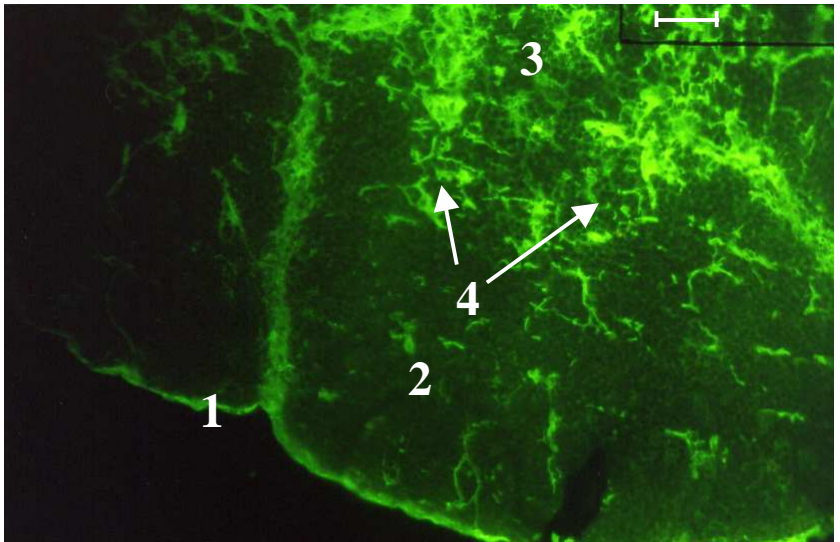


Abb. 17

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1440.2)**. Vergrößerung: 25fach, Länge des Messbalkens: 100 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla, 4=rundlich geformte Konglomerate in der Medulla

Abb. 18

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**. **Kontrolltier (Tier-Nr. 1454.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla, 4=Ringstruktur am Kortex-Medulla-Übergang, 5=Hassall-Körperchen

Abb. 19

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1440.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kortex, 2=Medulla, 3=zirkuläre Strukturen am Kortex-Medulla-Übergang

Abb. 17

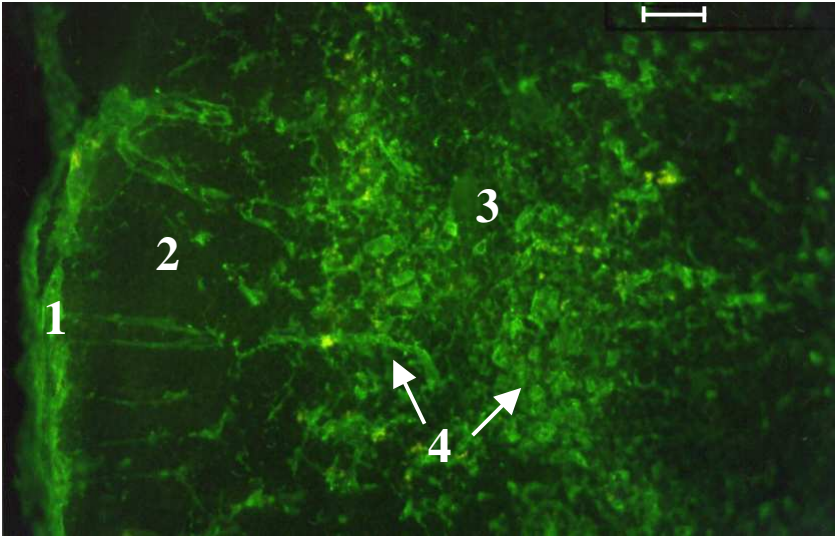


Abb. 18

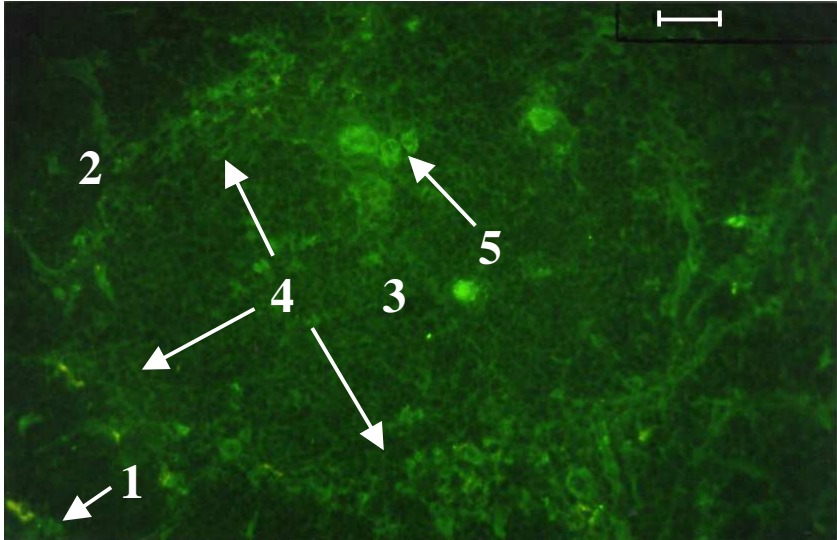


Abb. 19

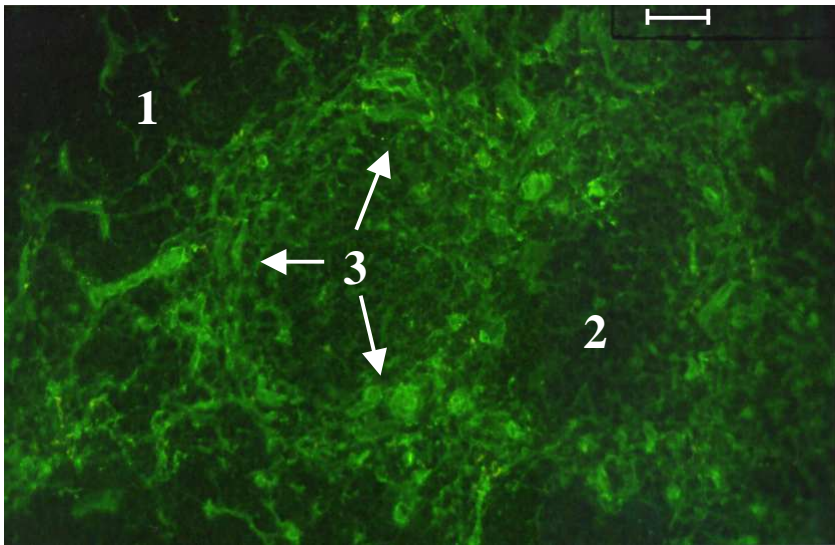


Abb. 20

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1449.2)**. Vergrößerung: 25fach, Länge des Messbalkens: 100 μm . Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla, 4=stark gefärbte Zone an der Kortex-Medulla-Grenze

Abb. 21

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**. **Kontrolltier (Tier-Nr. 1454.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 μm . Legende der Beschriftung: 1=Kortex, 2=Medulla, 3=zikulär angeordnete Strukturen an der Kortex-Medulla-Grenze

Abb. 22

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1440.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 μm . Legende der Beschriftung: 1=Kortex, 2=Medulla, 3=kreisförmige Strukturen an der Kortex-Medulla-Grenze

Abb. 20

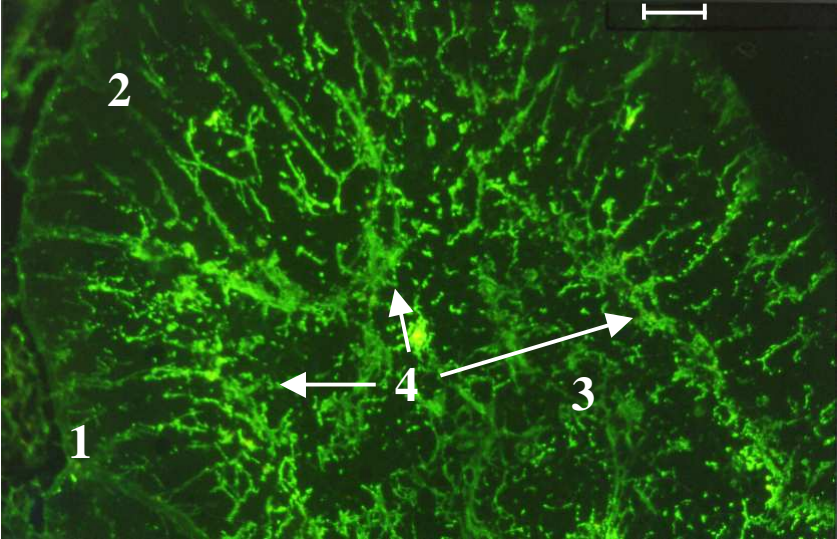


Abb. 21

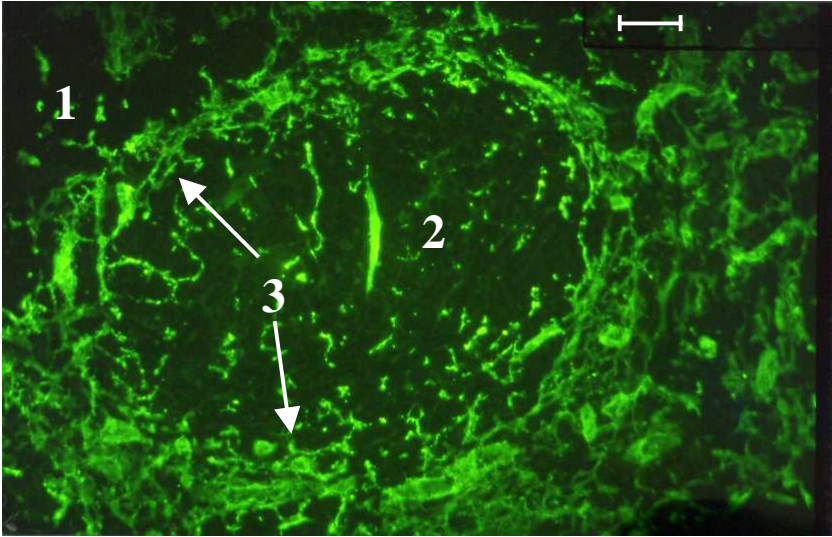


Abb. 22

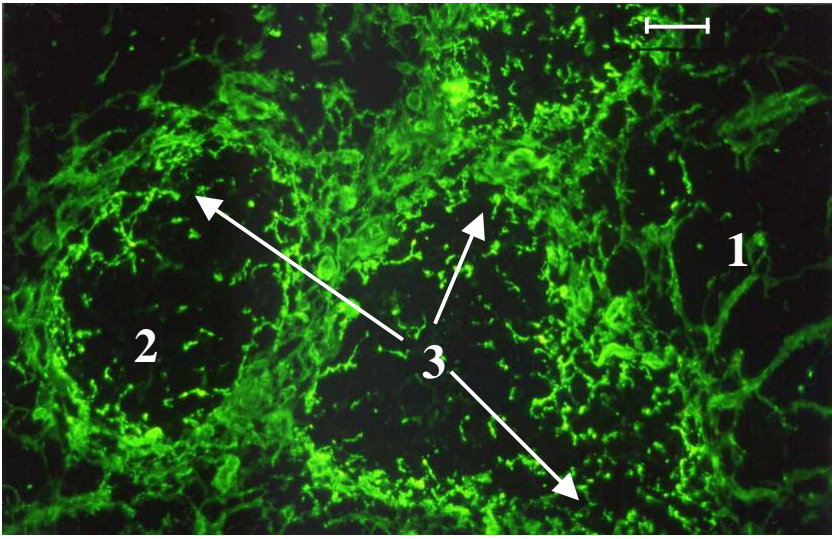


Abb. 23

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1479.2)**. Vergrößerung: 25fach, Länge des Messbalkens: 100 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla (umgeben von einem stärker gefärbten Bereich), 4=Blutgefäße

Abb. 24

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**. **Kontrolltier (Tier-Nr. 1454.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Medulla

Abb. 25

Immunhistochemische Darstellung eines Thymusausschnitts vom Marmoset, markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**. **Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung (Tier-Nr. 1449.2)**. Vergrößerung: 50fach, Länge des Messbalkens: 50 µm. Legende der Beschriftung: 1=Kapsel, 2=Kortex, 3=Trabekel, 4=Medulla, 5=diffuse, streifige Färbung

Abb. 23

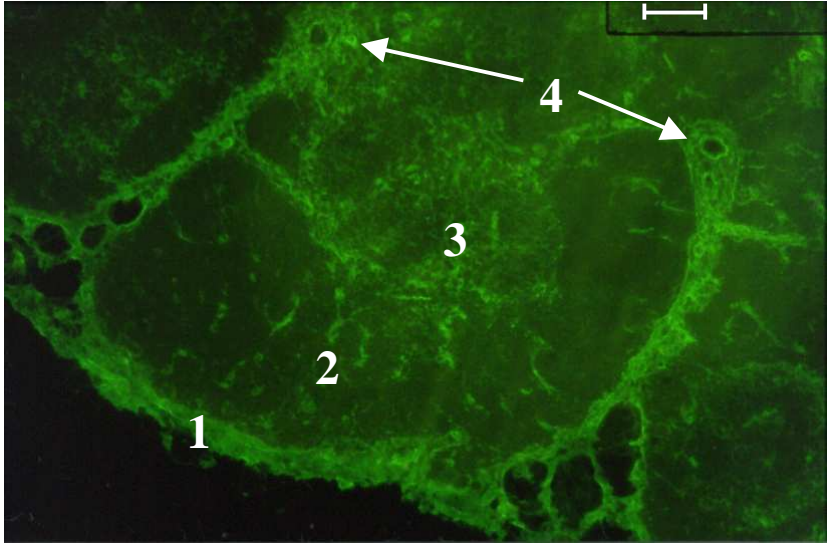


Abb. 24

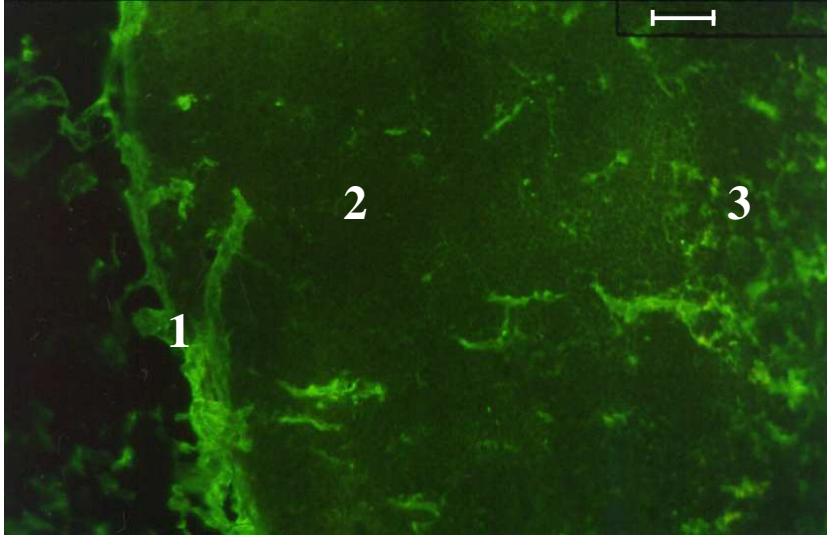
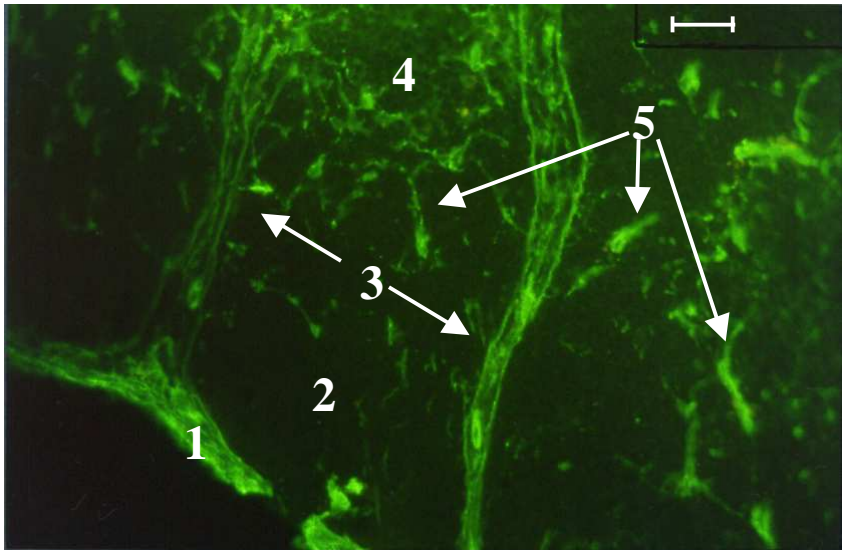


Abb. 25



3.2 Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz

3.2.1 Einführung

Für die densitometrische Auswertung wurden pro Marmoset und Antikörper mindestens 3 gescannte Bilder der Immunfluoreszenz mit dem Ziel einer orientierenden semiquantitativen Auswertung herangezogen. Aus den Messergebnissen dieser Bilder wurde ein Mittelwert gebildet. Bei den verwendeten Fotos wurde sorgfältig darauf geachtet, dass alle Strukturen des Thymus zu erkennen waren. Um Verfälschungen zu vermeiden wurde weiterhin darauf geachtet, dass die Aufnahme so wenig wie möglich schwarzen Hintergrund enthielt. Um dies zu gewährleisten wurde der zu fotografierende Bildausschnitt so gewählt, dass die Kapsel (Ende des Gewebstückes) am Rand des Bildes zu liegen kam. Ausschnitte mit Artefakten, wie auskristallisierten Antikörpern, oder Ausschnitte mit beschädigtem Thymusgewebe wurden nicht zur Auswertung herangezogen

3.2.2 Densitometrische Auswertung des **Kollagen Typ I**-Antikörpers

Innerhalb des Streubereiches der Kontrollen (Gruppe A, im Verlauf als Kontrollbereich bezeichnet) von 7978 dE (densitometrische Einheiten) bis 10464 dE lag nur ein Wert der Gruppe C (Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 10307 dE). Alle anderen Werte lagen oberhalb dieses Bereichs, besonders deutlich die Werte der Gruppe B (Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme nach 2 Wochen) mit 13847 dE (Tier-Nr. 1479.2), 13873 dE (Tier-Nr. 1452.2) und 13108 dE (Tier-Nr. 1439.2). (siehe Abb. 26)

3.2.3 Densitometrische Auswertung des **Kollagen Typ IV**-Antikörpers

Hier zeigte sich ein relativ geringer Kontrollbereich (von 22721 dE bis 25004 dE, Standardabweichung 1186 dE) im Vergleich mit der Gruppe B und der Gruppe C. Aus der Gruppe B lag nur ein Wert (Tier-Nr. 1452.2) innerhalb dieses Bereichs, ein weiterer unterhalb (Tier-Nr. 1479.2) und der letzte deutlich oberhalb (Tier-Nr. 1439.2). Die Werte der Gruppe C lagen komplett oberhalb des Streubereichs, hier besonders deutlich das Tier mit der Nummer 1449.2. (siehe Abb. 27)

3.2.4 Densitometrische Auswertung des **Fibronectin**-Antikörpers

Bei diesem Antikörper ergab sich eine relativ große Variabilität in der Kontrollgruppe. Aus den beiden Behandlungsgruppen lagen insgesamt vier Werte oberhalb und zwei innerhalb des Kontrollbereichs. (siehe Abb. 28)

3.2.5 Densitometrische Auswertung des **Laminin**-Antikörpers

Zwei Werte der Gruppen B und C lagen hier im Bereich der Kontrollen (Gruppe A, 39299 bis 47685 dE), je ein Wert pro Gruppe lag aber deutlich oberhalb dieses Bereichs (Tier-Nr. 1439.2 mit 69060 dE und Tier-Nr. 1449.2 mit 68870 dE), so dass sich für diese beiden Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe eine hohe Standardabweichung ergab. Aus der Gruppe B fand sich ein Wert unterhalb des Kontrollbereichs (Tier-Nr. 1479.2). (siehe Abb. 29)

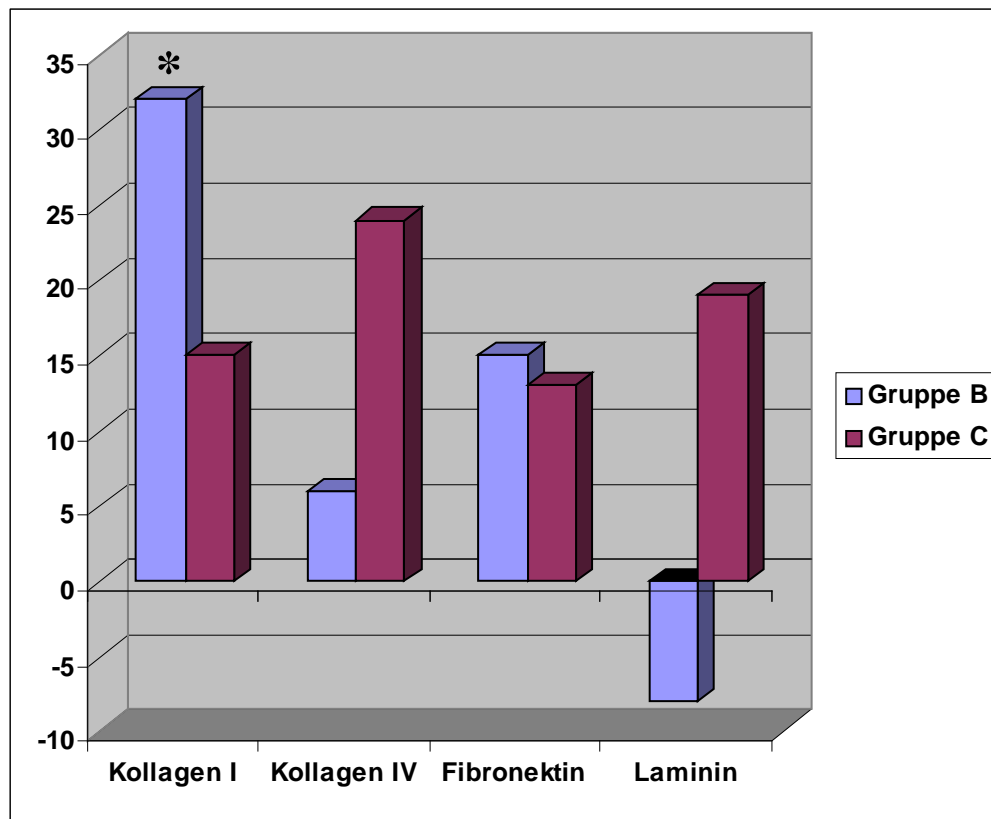
3.2.6 Zusammenfassung

Insgesamt war auffällig, dass die Werte aus den Behandlungsgruppen B und C meist oberhalb des Bereichs der Kontrollen (Gruppe A) lagen (siehe Abb. 30). Von den insgesamt 24 Einzelwerten dieser beiden Gruppen (6 Tiere, 4 verschiedene Antikörper) lagen 16 der gemessenen Werte über dem Kontrollbereich, 6 innerhalb und nur 2 darunter.

Zwei der behandelten Tiere, Nr. 1439.2 (aus Gruppe B) und Nr. 1449.2 (aus Gruppe C), zeigten bei der Auswertung der Fluoreszenz der Antikörper Kollagen IV und Laminin verglichen mit den Kontrollen eine besonders starke Zunahme der Intensität. Im Gegensatz dazu zeigte das Tier-Nr. 1479.2 (Gruppe B) bei diesen Antikörpern eine Abnahme und war damit das einzige Tier welches unterhalb des Kontrollbereichs lag. Das Tier mit der Nummer 1439.2 lag als einziges bei allen Auswertungen oberhalb der Kontrollen.

Eine signifikante Zunahme der im Thymus nach TCDD-Behandlung untersuchten Proteine zeigte ausschließlich Kollagen Typ I in der Gruppe B verglichen mit der Kontrollgruppe (Gruppe A).

Abb. 30:

**Abb. 30**

Immunfluoreszenz der Marmoset Thymi. Veränderungen der densitometrischen Ergebnisse der einzelnen Antikörper nach Behandlung mit TCDD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Angaben in %); Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme nach 2 Wochen; Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg, Probennahme nach 4 Wochen. * = Signifikanz im Student-t-Test: $p < 0,05$ (im Vergleich mit Gruppe A)

Abb. 26

Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I**. Gruppe A: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A) ist grau unterlegt.

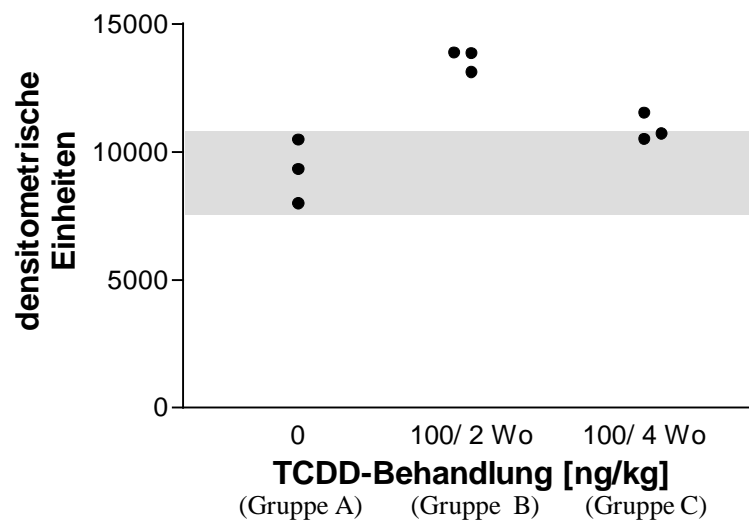
Abb. 26

Abb. 27

Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**. Gruppe A: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A) ist grau unterlegt.

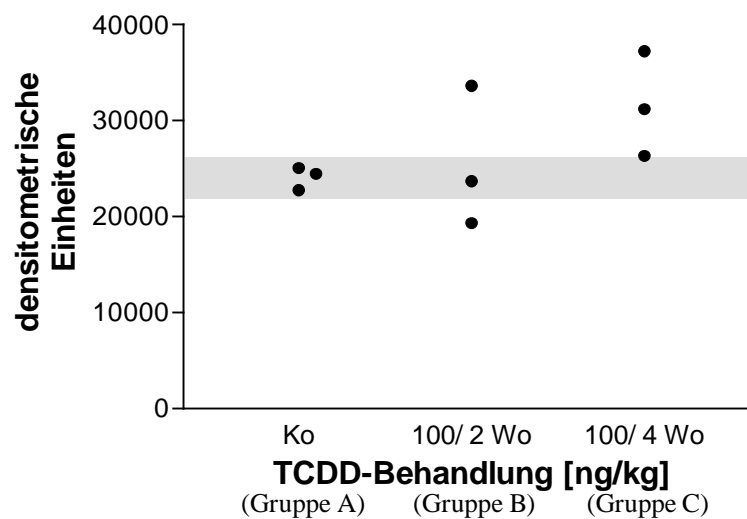
Abb. 27

Abb. 28

Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**. Gruppe A: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A) ist grau unterlegt.

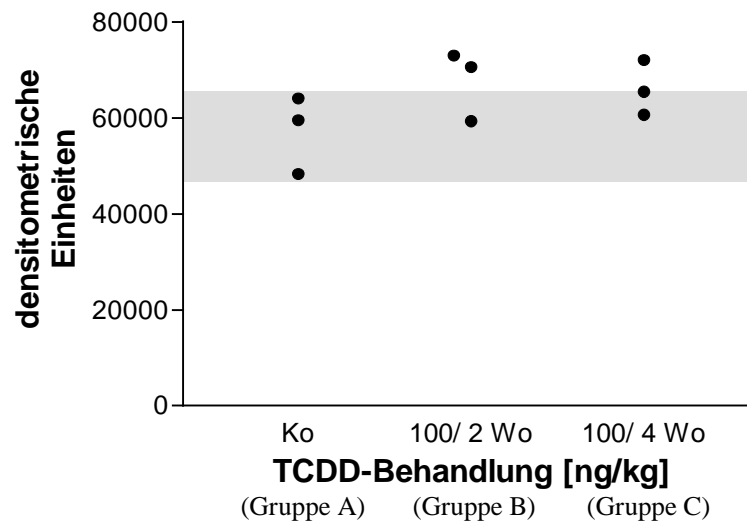
Abb. 28

Abb. 29

Densitometrische Auswertung der Immunfluoreszenz der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**. Gruppe A: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 2 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A) ist grau unterlegt.

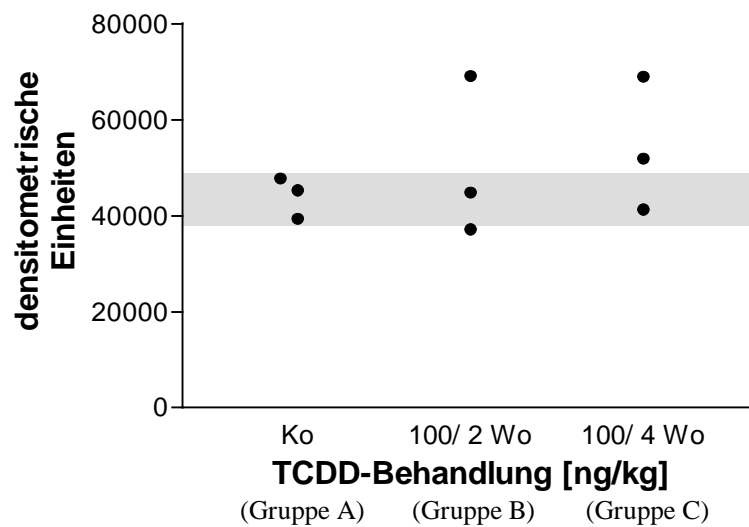
Abb. 29

Tabelle 6

	Gruppe A		Gruppe B		Gruppe C	
	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE
Kollagen I	1442.2	10464	1439.2	13108	1429.2	10705
	1454.2	7978	1452.2	13873	1440.2	10496
	1457.2	9318	1479.2	13847	1449.2	11520
MW		9253		13609		10907
STAB		+/- 1244		+/- 434		+/- 541
SIGN				p = 0,02		p = 0,13
Kollagen IV	1442.2	24415	1439.2	33570	1429.2	26298
	1454.2	22721	1452.2	23666	1440.2	31151
	1457.2	25004	1479.2	19298	1449.2	37182
MW		24046		25511		31543
STAB		+/- 1185		+/- 7312		+/- 5453
SIGN				p = 0,76		p = 0,13
Fibronectin	1442.2	48233	1439.2	70492	1429.2	71964
	1454.2	59416	1452.2	72901	1440.2	65397
	1457.2	63977	1479.2	59246	1449.2	60557
MW		57208		67546		65973
STAB		+/- 8101		+/- 7289		+/- 5725
SIGN				p = 0,18		p = 0,21
Laminin	1442.2	45219	1439.2	69060	1429.2	51854
	1454.2	39299	1452.2	44761	1440.2	41208
	1457.2	47685	1479.2	37093	1449.2	68870
MW		44068		40927		53977
STAB		+/- 4310		+/- 16689		+/- 13953
SIGN				p = 0,59		p = 0,34

Tabelle 6

Immunfluoreszenz der Marmoset-Thymi. Daten der densitometrischen Auswertung. Aufschlüsselung nach Antikörper und Tiernummer. Die Messergebnisse wurden aus mindestens 3 Einzelmessungen gemittelt. Gruppe A: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme nach 2 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C: Behandlung mit 100 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. dE=densitometrische Einheiten, MW=Mittelwert, STAB=Standardabweichung, SIGN=Signifikanz im Student-t-Test (Vergleich mit Gruppe A)

3.3 Auswertung der Immunoblots

3.3.1 Untersuchtes Material

Für diese Versuchsreihe wurden die Thymi von insgesamt 9 Marmosets verwendet. Die Tiere wurden in 3 Gruppen zu je 3 Tieren eingeteilt. Die erste Gruppe (Gruppe A2) wurde nur mit dem Vehikel behandelt. Die zweite Gruppe (Gruppe B2) wurde mit 1 ng/kg einer einmaligen Dosis TCDD behandelt, die dritte Gruppe (Gruppe C2) erhielt eine Dosis von 10 ng/kg TCDD. Die Probennahme (Tötung der Tiere, Präparation des Thymus) erfolgte bei allen 3 Gruppen 4 Wochen nach der Behandlung. Während dieser Zeit waren keine statistisch signifikanten Änderungen der Körper- bzw. Thymusgewichte im Vergleich Kontrolle zu Behandlung auffällig. Untersucht wurde für den Immunoblot aufbereitetes Gewebe aus Thymusteilstücken der Marmosets. Da bei den geringen Gewebegewichten nicht ausgeschlossen werden konnte, dass nicht exakt gleiche Mengen verwendet wurden, wurde nach dem Aufbereitungsschritt die Proteinkonzentration der einzelnen Proben bestimmt. Die leicht variierenden Konzentrationen (siehe Tabelle 11) wurden dann durch Verdünnen mit einer Pufferlösung auf die Konzentration von 1mg/ml angeglichen. Für den Immunoblot wurden dann 20 µl der Probe, mit einer Proteinmenge von jeweils 20 µg, aufgetragen

3.3.2 Verfahren der densitometrischen Auswertung

Die densitometrische Auswertung der Immunoblots erfolgte mit der Software LabImage (Kapelan, Halle). Dieses Programm erkennt automatisch die jeweilige Spur bzw. die einzelnen Banden des verwendeten Antikörpers. Eine manuelle Nachbearbeitung wurde nur notwendig, wenn vom Programm eine Verunreinigung der Membran als Bande erfasst wurde. Weiterhin errechnete die Software automatisch die Menge des gefärbten Anteils der jeweiligen Bande. Markierte ein Antikörper mehrere Fraktionen des Proteins und war somit mehr als eine Bande sichtbar, wurden die Densitometrie-Ergebnisse der einzelnen Banden summiert, und so zu einem Gesamtergebnis zusammengefasst.

3.3.3 verwendete Antikörper

Verwendet wurden insgesamt 11 verschiedene Antikörper, die sich grob in 4 Gruppen einteilen ließen. Die erste Gruppe waren Antikörper gegen Integrine. Im einzelnen wurden markiert: **alpha1-Integrin**, als Bestandteil eines Kollagen-Rezeptors; **alpha5-Integrin**, als Bestandteil eines Fibronectin-Rezeptors; **alpha6-Integrin**, als Bestandteil eines Laminin-Rezeptors und **beta1-Integrin** als Bestandteil sowohl des Kollagen- als auch des Fibronectin-Rezeptors. Die nächste Gruppe waren Antikörper gegen Proteine der extrazellulären Matrix. Ausgewählt wurden 4 verschiedene Proteine, die sich im Thymus nachweisen ließen und denen unter anderem bei der Reifung der Thymozyten eine wichtige Aufgabe zukommt (siehe ab Seite 24). Dies waren: **Kollagen Typ I**, **Kollagen Typ IV**, **Fibronectin** und **Laminin**. Die dritte Gruppe waren Antikörper gegen **TGF-beta** bzw. gegen den **TGF-beta-Rezeptor**. Als letztes wurde noch **beta-Actin** verwendet. Dieser Antikörper sollte eigentlich als interne Kontrolle der Immunoblots dienen, die Problematik die sich bei der Markierung mit diesem Antikörper aber ergab, wird später erläutert.

3.3.4 Antikörper gegen Integrine

3.2.4.1 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **alpha1-Integrin (CD49a)**

Innerhalb des Streubereichs der Kontrollen von 81409 dE bis 133119 dE (Gruppe A2, im Verlauf als Kontrollbereich bezeichnet), lag nur ein Wert der Behandlungsgruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) mit 135641 dE. Die Werte aller anderen behandelten Tiere lagen über dem Kontrollbereich, besonders deutlich war dies bei den Werten der Tiere aus der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen). Diese Wert lagen zwischen 249101 dE und 264492 dE. (siehe Abb. 31 und Abb. 32)

3.3.4.2 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **alpha5-Integrin (CD49e)**

Hier zeigte sich ein sehr geringer Kontrollbereich (von 116231 dE bis 128209 dE, Standardabweichung +/- 5993 dE). Die Werte der Behandlungsgruppen B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) und C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen alle über dem Kontrollbereich. Der niedrigste Wert lag bei

139671 dE (aus der Gruppe B2), der höchste bei 172826 (aus der Gruppe C2). (siehe Abb. 33 und Abb. 34)

3.3.4.3 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **alpha6-Integrin (CD49f)**

Bei dieser Auswertung zeigte sich auch ein relativ geringer Kontrollbereich (von 21253 dE bis 28656 dE, Standardabweichung +/- 4274 dE). Die Werte der beiden Behandlungsgruppen streuten im Gegensatz zu den Kontrollen stark. Mittelwert und Standardabweichung Standardabweichung der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) wurden mit 37046 +/- 17757 dE berechnet, die Standardabweichung der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) 45694 dE. Aus der Gruppe B2 lag ein Wert (19786 dE) unterhalb des Kontrollbereichs, alle übrigen Werte der Behandlungsgruppen lagen oberhalb des Kontrollbereichs. (siehe Abb. 35 und Abb. 36)

3.3.4.4 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **beta1-Integrin (CD29)**

Der Kontrollbereich bei dieser Auswertung lag zwischen 80542dE und 113445 dE. Nur ein Wert der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lag innerhalb des Kontrollbereichs. Zwei Werte der Gruppe B2 und zwei Werte der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen nur knapp über den Werten der Kontrollen (zwischen 119585 dE und 128076 dE). Ein Wert der Gruppe C2 lag mit 158972 dE deutlich oberhalb des Kontrollbereichs. (siehe Abb. 37 und Abb. 38)

3.3.5 Antikörper gegen Bestandteile der extrazellulären Matrix

3.3.5.1 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I**

Bei dieser Auswertung lagen alle Werte der behandelten Tiere über denen der nicht behandelten (Kontrollbereich von 167626 dE bis 282339 dE). Die Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen mit einer sehr geringen Standardabweichung (5423 dE) knapp oberhalb der Kontrollen. Zwei der Werte aus der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) kamen mit 508388 dE und 511449 dE deutlich oberhalb des Kontrollbereichs zu liegen. (siehe Abb. 39 und Abb. 40)

3.3.5.2 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**

Hier erstreckte sich der Kontrollbereich von 11030 dE bis 19228 dE. Die Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen mit Werten von 19641 dE bis 31976 alle oberhalb der Kontrollwerte. Die Werte der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen sehr deutlich über dem Kontrollbereich (zwischen 62892 dE und 78840 dE). (siehe Abb. 41 und Abb. 42)

3.3.5.2 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**

Hier zeigte sich ein Kontrollbereich von 144649 dE bis 219249 dE. Alle Werte der Behandlungsgruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen), wie auch der Behandlungsgruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen oberhalb des Kontrollbereichs, wobei die Werte der Gruppe C2 im Mittel etwa 20% höher lagen als die Werte der Gruppe B2. (siehe Abb. 43 und Abb. 44)

3.3.5.3 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **Laminin**

Bei dieser Auswertung lagen zwei Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) und ein Wert der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) innerhalb des Kontrollbereichs (12171 dE bis 16504 dE). Ein Wert der Gruppe C2 lag mit 16995 dE nur knapp oberhalb der Werte der Kontrollen, je ein Wert der Gruppe B2 und C2 lag deutlich darüber. (siehe Abb. 45 und Abb. 46)

3.3.6 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **TGF-beta1**

Hier fiel ein sehr breiter Kontrollbereich auf (von 14200 dE bis 35102 dE). Nur ein Wert der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) kam innerhalb des Kontrollbereichs zu liegen, die anderen beiden lagen knapp oberhalb. Aus der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lag ein Wert nahe über den Kontrollen, die beiden übrigen mit 54796 dE und 74833 dE deutlich darüber. (siehe Abb. 47 und Abb. 48)

3.3.7 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **TGF-beta-Rezeptor Typ II**

Hier erstreckte sich der Kontrollbereich von 47297 dE bis 64352 dE. Zwei Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen innerhalb des Streubereichs der Kontrollen, ein Wert dieser Gruppe lag mit 104251 dE deutlich darüber. Die Werte der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen alle deutlich über dem Kontrollbereich. (siehe Abb. 49 und Abb. 50)

3.3.8 Auswertung der Markierung mit einem Antikörper gegen **beta-Actin**

Bei dieser Auswertung wurden die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung aus 3 unter gleichen Bedingungen angefertigten Immunoblots errechnet. Der niedrigste aller Mittelwerte wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte auf diesen bezogen. Der Bereich der Werte der Kontrolltiere lag zwischen 1 und 1,28. Die Kontrollen wichen untereinander somit um ca. 28% voneinander ab. Die Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) und der Gruppe C2 (Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) lagen alle oberhalb des Kontrollbereichs. Bei der Gruppe B2 zwischen 1,51 und 1,88 und bei der Gruppe C2 zwischen 1,85 und 2,13. (siehe Abb. 51 und Abb. 52)

3.3.9 Zusammenfassung

Insgesamt erschien eindrücklich, dass fast alle Werte der behandelten Tiere oberhalb der Werte der Kontrolltiere zu liegen kamen. Nur bei der Markierung mit dem Antikörper gegen Laminin lagen die Werte der Gruppe B2 (Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen) im Mittel 2% unter denen der Kontrollgruppe. Teilweise deutete sich ein dosisabhängiger Anstieg der gemessenen Werte an (siehe Abb. 53). Bei den Markierungen mit folgenden Antikörpern zeigte sich ein Anstieg der Werte der behandelten Tiere (Gruppe C2) verglichen mit den Kontrollen von über 100%:

- **CD49a** (+148%)
- **Kollagen Typ I** (+105%)
- **Kollagen Typ IV** (+363%)
- **TGF-beta** (+102%)
- **TGF-beta Rezeptor** (+102%)

Signifikante Zunahmen der untersuchten Proteinmengen im Marmoset-Thymus nach TCDD-Behandlung zeigten sich bei CD49a (nur Gruppe C2), bei CD49e, bei Kollagen Typ I (nur Gruppe C2), bei Kollagen Typ IV (nur Gruppe C2), bei Fibronektin, beim TGF-beta Rezeptor Typ II (nur Gruppe C2) und bei beta-Actin. (siehe Abb. 53)

Abb. 53

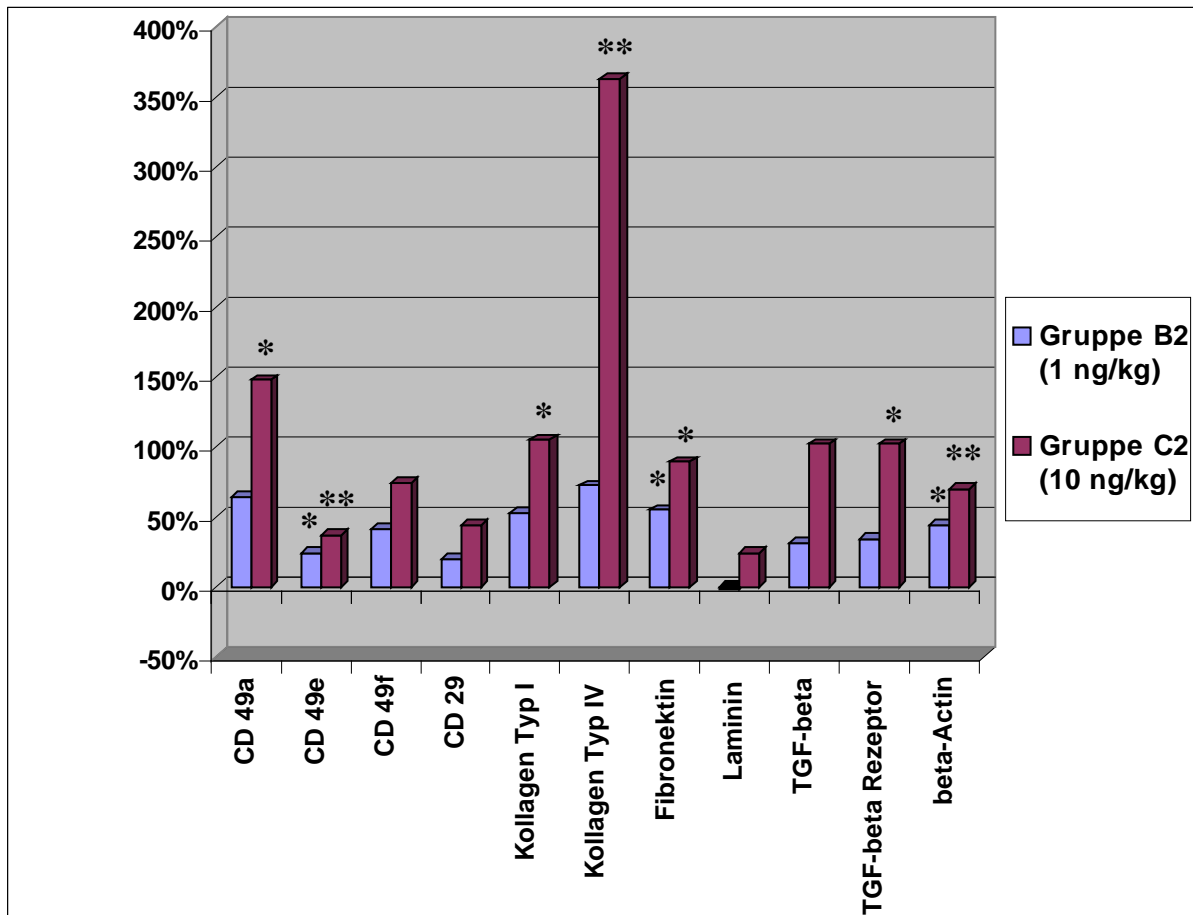


Abb. 53

Immunoblots der Marmoset Thymi. Veränderungen der densitometrischen Ergebnisse der einzelnen Antikörper nach Behandlung mit TCDD im Vergleich zur Kontrollgruppe (Angaben in %); Gruppe B2: Behandlung mit 1ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen; Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg, Probennahme nach 4 Wochen. * = Signifikanz im Student-t-Test: $p < 0,05$ (im Vergleich mit Gruppe A2), ** = Signifikanz im Student-t-Test: $p < 0,01$ (im Vergleich mit Gruppe A2)

Abb. 31

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **alpha1-Integrin (CD 49a)**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 32

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **alpha1-Integrin (CD 49a)**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung;

Abb. 33

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **alpha5-Integrin (CD 49e)**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 34

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **alpha5-Integrin (CD 49e)**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung;

Abb. 31

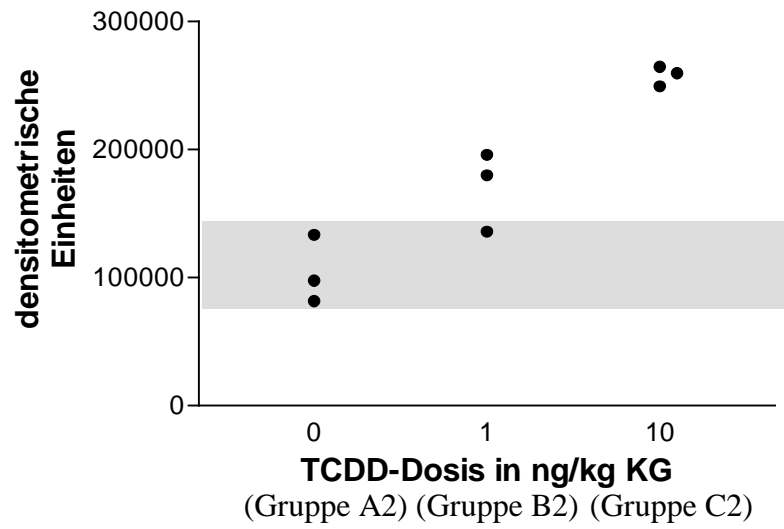


Abb. 32

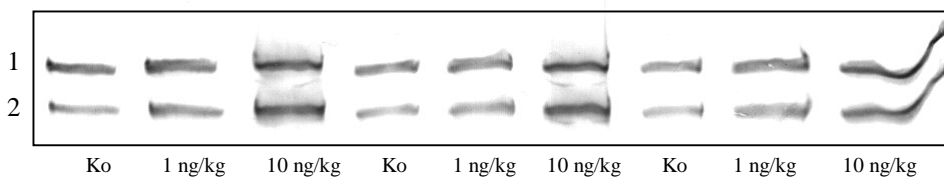


Abb. 33

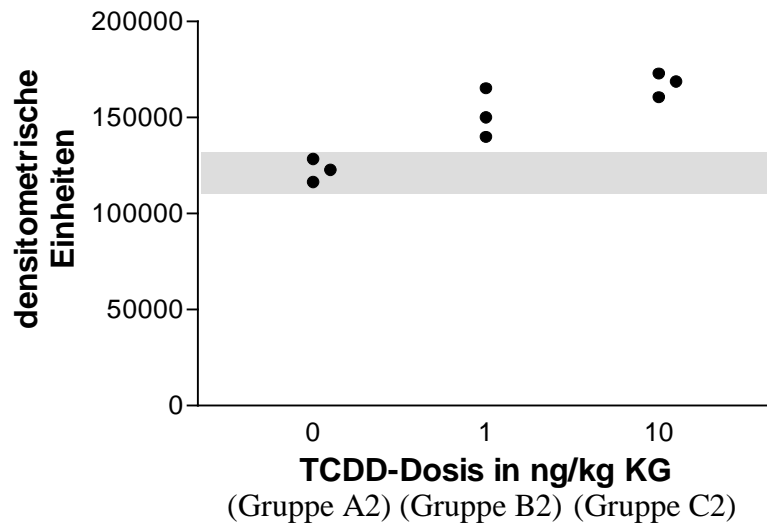


Abb. 34

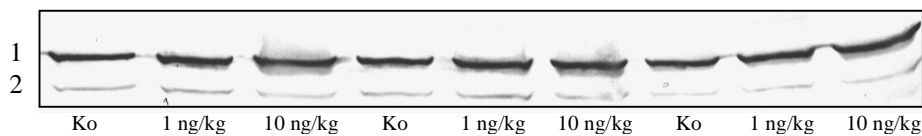


Abb. 35

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **alpha6-Integrin (CD 49f)**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 36

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **alpha6-Integrin (CD 49f)**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 37

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **beta1-Integrin (CD 29)**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 38

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **beta1-Integrin (CD 29)**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 35

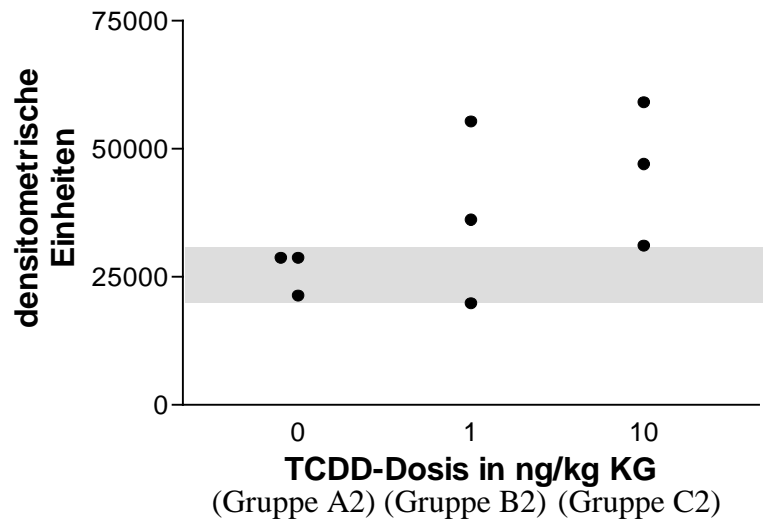


Abb. 36

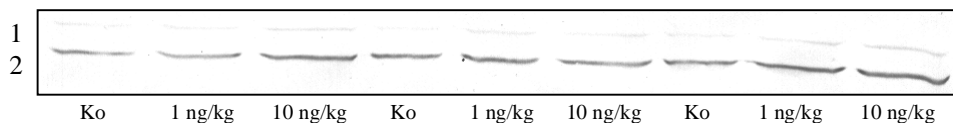


Abb. 37

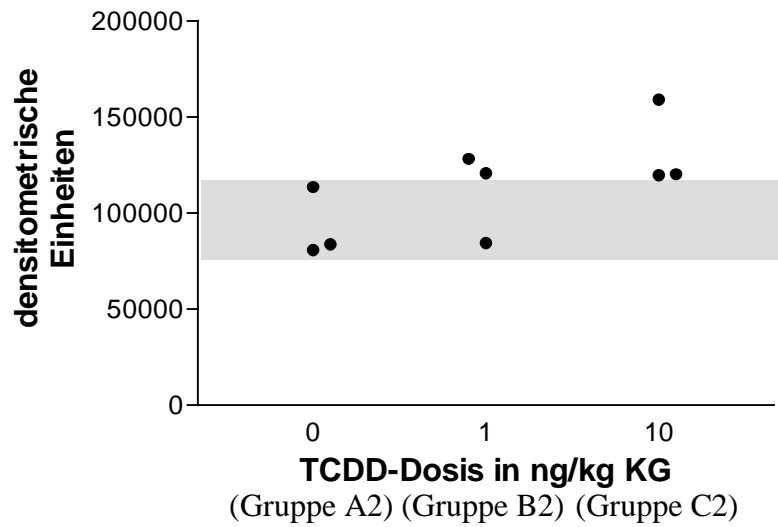


Abb. 38

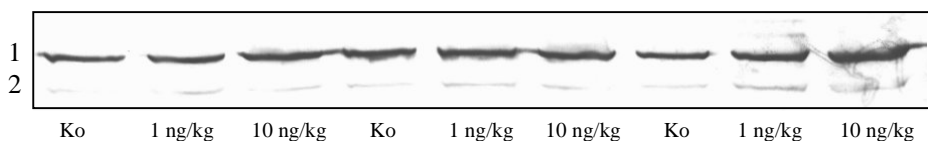


Abb. 39

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 40

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ I**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 41

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 42

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **Kollagen Typ IV**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 39

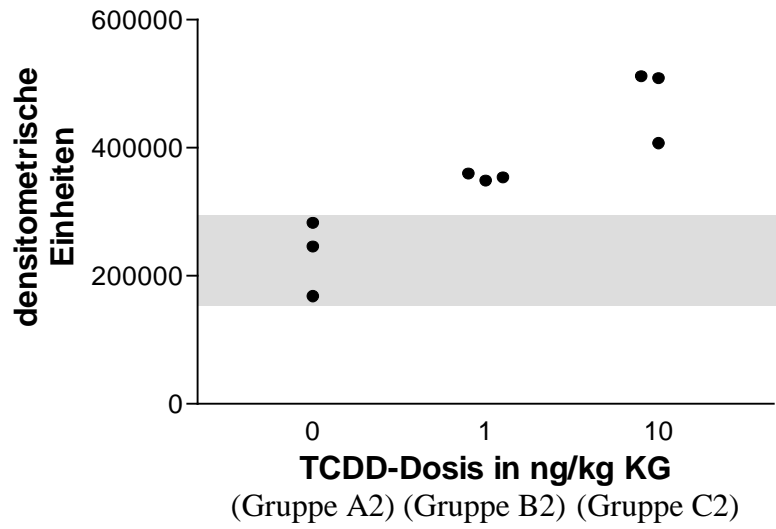


Abb. 40

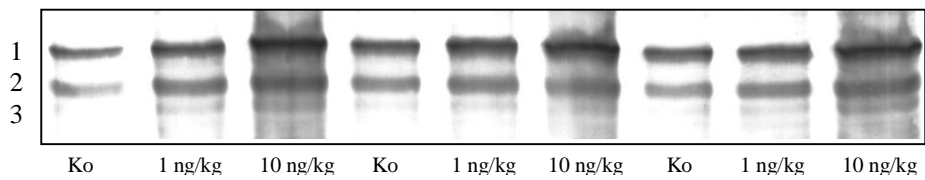


Abb. 41

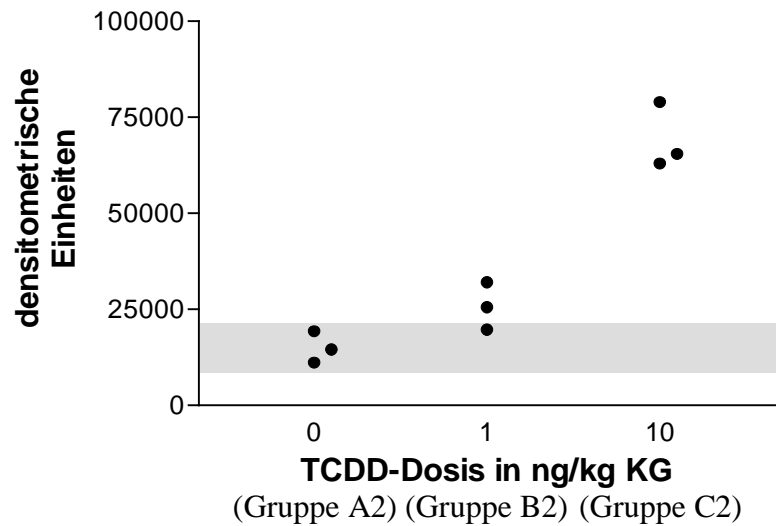


Abb. 42

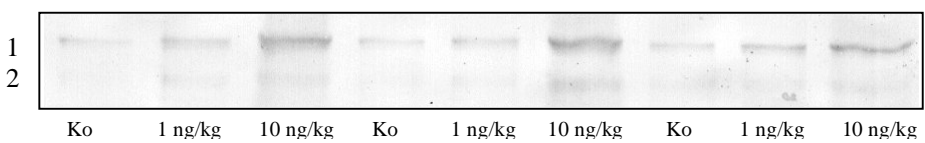


Abb. 43

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 44

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **Fibronectin**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 45

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 46

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **Laminin**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 43

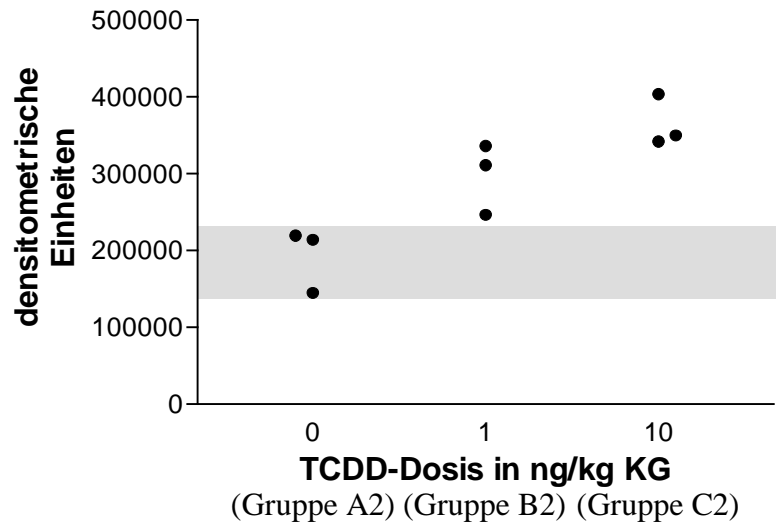


Abb. 44

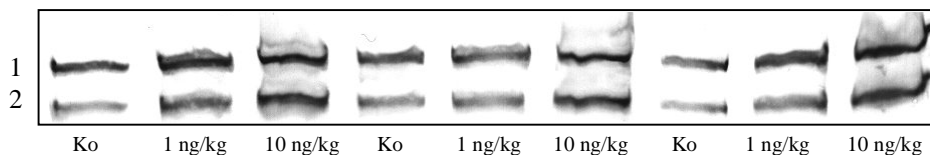


Abb. 45

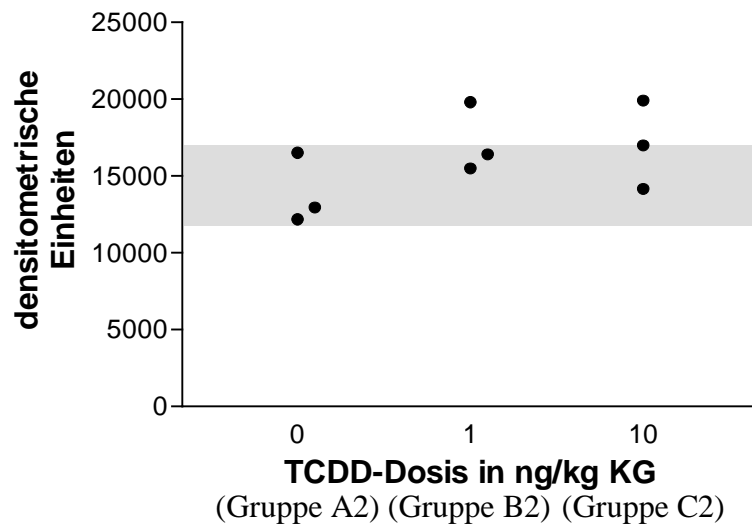


Abb. 46

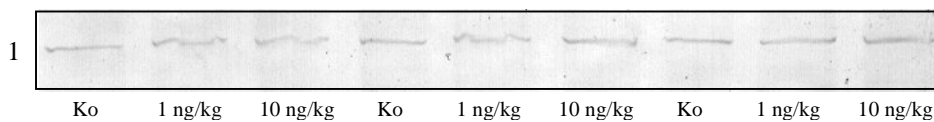


Abb. 47

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **TGF-beta1**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 48

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **TGF-beta1**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 49

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **TGF-beta Rezeptor Typ II**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 50

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **TGF-beta Rezeptor Typ II**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

Abb. 47

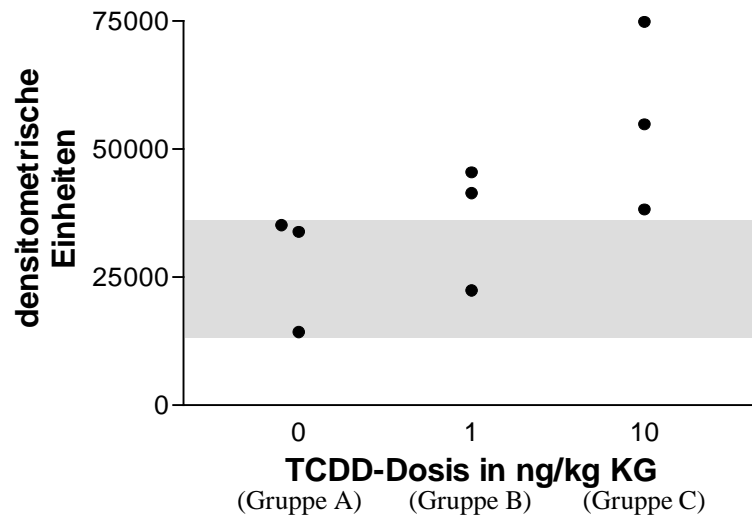


Abb. 48

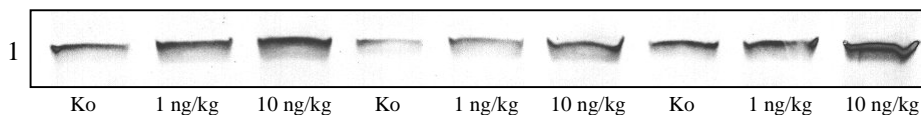


Abb. 49

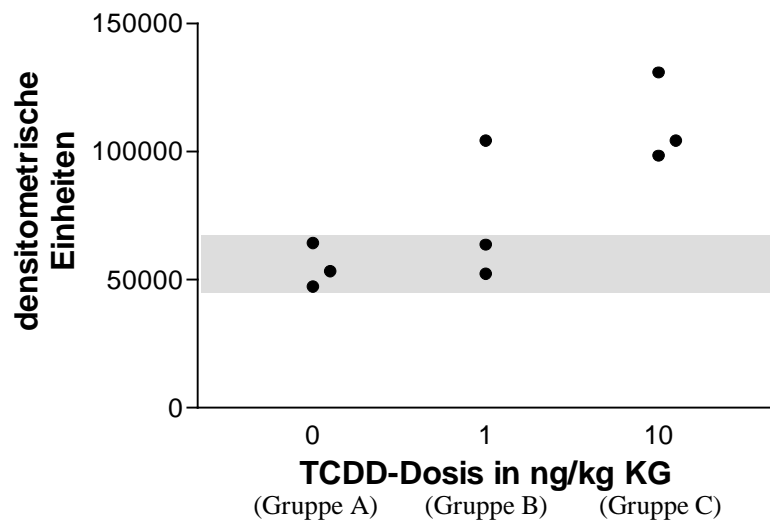


Abb. 50

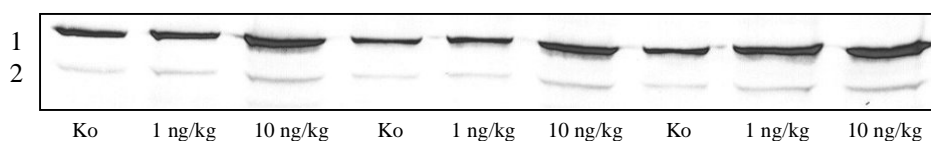


Abb. 51

Densitometrische Auswertung der Immunoblots der Marmoset-Thymi; markiert mit einem Antikörper gegen **beta-Actin**. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 3 Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Immunoblots; der jeweils niedrigste Wert wurde gleich 1 gesetzt. Der Bereich in dem die Werte der Kontrolltiere liegen (Gruppe A2) ist grau unterlegt.

Abb. 52

Immunoblot von Marmoset-Thymi markiert mit einem Antikörper gegen **beta-Actin**; Darstellung mit der alkalischen Phosphatase-Reaktion; Ko: Kontrolltier, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 1 ng/kg: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung, 10 ng/kg: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme 4 Wochen nach Behandlung

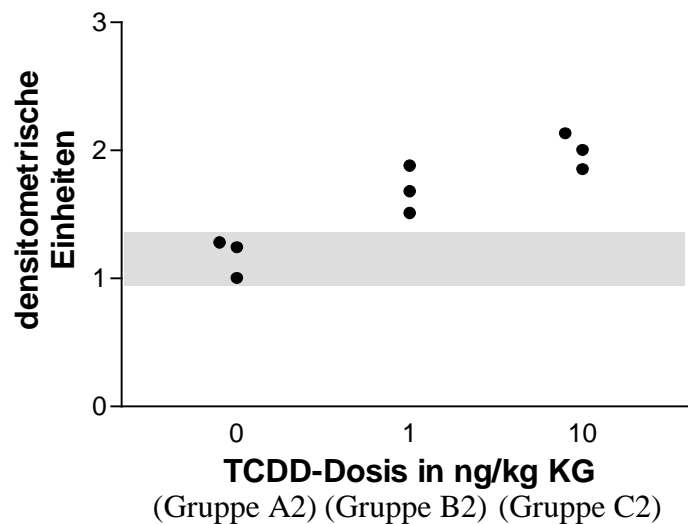
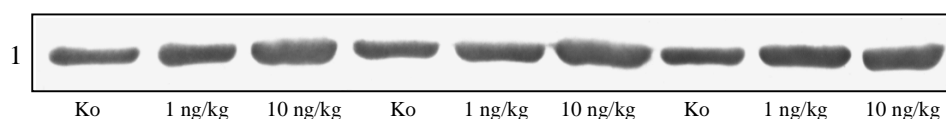
Abb. 51**Abb. 52**

Tabelle 7

	Gruppe A2		Gruppe B2		Gruppe C2	
	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE
CD 49a	1499.2	133119	1539.2	195633	1500.2	259270
	1518.2	97286	1501.2	135641	1518.2	249101
	1504.2	81409	1510.2	179509	1504.2	264492
MW		103938		170261		257621
STAB		+/- 26489		+/- 31047		+/- 7827
SIGN				p = 0,05		p = 0,01
CD 49e	1499.2	128209	1539.2	149864	1500.2	168571
	1518.2	122603	1501.2	165044	1518.2	160407
	1504.2	116231	1510.2	139671	1504.2	172826
MW		122348		151526		167268
STAB		+/- 5993		+/- 12768		+/- 6311
SIGN				p = 0,04		p = 0,001
CD 49f	1499.2	21253	1539.2	19786	1500.2	46982
	1518.2	28655	1501.2	36092	1518.2	31051
	1504.2	28656	1510.2	55261	1504.2	59048
MW		26188		37046		45694
STAB		+/- 4274		+/- 17757		+/- 14043
SIGN				p = 0,40		p = 0,13
CD 29	1499.2	83600	1539.2	84317	1500.2	120009
	1518.2	113445	1501.2	128076	1518.2	119585
	1504.2	80542	1510.2	120657	1504.2	158972
MW		92529		111017		132855
STAB		+/- 18178		+/- 23418		+/- 22619
SIGN				p = 0,34		p = 0,08

Tabelle 7

Immunoblots der **Integrine** der Marmoset-Thymi. Daten der densitometrischen Auswertung. Aufschlüsselung nach Antikörper und Tiernummer. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. dE=densitometrische Einheiten, MW=Mittelwert, STAB=Standardabweichung, SIGN=Signifikanz im Student-t-Test (Vergleich mit Gruppe A2)

Tabelle 8

	Gruppe A2		Gruppe B2		Gruppe C2	
	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE
Kollagen I	1499.2	167626	1539.2	359127	1500.2	508388
	1518.2	282339	1501.2	348288	1518.2	406955
	1504.2	245199	1510.2	353351	1504.2	511449
	MW	231721		353589		475597
STAB	+/- 58532		+/- 5423		+/- 59466	
SIGN			p = 0,07		p = 0,01	
Kollagen IV	1499.2	19228	1539.2	31976	1500.2	78840
	1518.2	11030	1501.2	19641	1518.2	65342
	1504.2	14447	1510.2	25466	1504.2	62892
	MW	14902		25694		69025
STAB	+/- 4118		+/- 6171		+/- 8588	
SIGN			p = 0,07		p = 0,003	
Fibronectin	1499.2	214134	1539.2	336023	1500.2	349775
	1518.2	219249	1501.2	246481	1518.2	342079
	1504.2	144649	1510.2	311127	1504.2	403374
	MW	192677		297877		365076
STAB	+/- 41672		+/- 46218		+/- 33390	
SIGN			p = 0,04		p = 0,01	
Laminin	1499.2	16504	1539.2	19795	1500.2	16995
	1518.2	12943	1501.2	16404	1518.2	14158
	1504.2	12171	1510.2	15486	1504.2	19902
	MW	13873		17228		17018
STAB	+/- 2311		+/- 2270		+/- 2872	
SIGN			p = 0,15		p = 0,22	

Tabelle 8

Immunoblots der **Proteine der extrazellulären Matrix** der Marmoset-Thymi. Daten der densitometrischen Auswertung. Aufschlüsselung nach Antikörper und Tiernummer. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. dE=densitometrische Einheiten, MW=Mittelwert, STAB=Standardabweichung, SIGN=Signifikanz im Student-t-Test (Vergleich mit Gruppe A2)

Tabelle 9

	Gruppe A2		Gruppe B2		Gruppe C2	
	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE	Tier-Nr.	dE
TGF beta	1499.2	35102	1539.2	41342	1500.2	54796
	1518.2	14200	1501.2	22342	1518.2	38183
	1504.2	33759	1510.2	45384	1504.2	74833
MW	27687		36356		55937	
STAB	+/- 11699		+/- 12304		+/- 18352	
SIGN			p = 0,43		p = 0,1	
TGF Rez.	1499.2	64352	1539.2	63688	1500.2	104304
	1518.2	47297	1501.2	52295	1518.2	98480
	1504.2	53296	1510.2	104251	1504.2	130929
MW	54982		73411		111238	
STAB	+/- 8652		+/- 27309		+/- 17300	
SIGN			p = 0,36		p = 0,02	

Tabelle 9

Immunoblots von **TGF-beta1** und **TGF-beta Rezeptor Typ II** der Marmoset-Thymi. Daten der densitometrischen Auswertung. Aufschlüsselung nach Antikörper und Tiernummer. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. dE=densitometrische Einheiten, MW=Mittelwert, STAB=Standardabweichung, SIGN= Signifikanz im Student-t-Test (Vergleich mit Gruppe A2)

Tabelle 10

	Gruppe A2		Gruppe B2		Gruppe C2	
	Tier-Nr.	MTL	Tier-Nr.	MTL	Tier-Nr.	MTL
beta-Actin	1499.2	1,00	1539.2	1,51	1500.2	2,13
	1518.2	1,24	1501.2	1,68	1518.2	2,00
	1504.2	1,28	1510.2	1,88	1504.2	1,85
MW	1,17		1,69		1,99	
STAB	+/- 0,15		+/- 0,19		+/- 0,14	
SIGN			p = 0,02		p = 0,002	

Tabelle 10

Immunoblots von **beta-Actin** der Marmoset-Thymi. Daten der densitometrischen Auswertung. Aufschlüsselung nach Antikörper und Tiernummer. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. MTL=Mittelwert aus 3 Blots, niedrigster Wert wurde gleich 1 gesetzt, die anderen auf diesen bezogen, MW=Mittelwert, STAB=Standardabweichung, SIGN=Signifikanz im Student-t-Test (Vergleich mit Gruppe A2)

Tabelle 11

Gruppe A2		Gruppe B2		Gruppe C2	
Tier-Nr.	Prot.-Konz.	Tier-Nr.	Prot.-Konz.	Tier-Nr.	Prot.-Konz.
1499.2	2,2	1539.2	3,1	1500.2	2,8
1518.2	2,9	1501.2	3,1	1518.2	2,6
1504.2	2,0	1510.2	2,2	1504.2	2,9

Tabelle 11

Marmoset-Thymi, Bestimmung der **Proteinkonzentrationen** der aufbereiteten Gewebstücke. Gruppe A2: Kontrollgruppe, Behandlung mit dem Vehikel, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe B2: Behandlung mit 1 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Gruppe C2: Behandlung mit 10 ng/kg TCDD, Probennahme nach 4 Wochen, 3 Tiere. Mittelwerte aus 2 Messungen. Prot.-Konz.=Proteinkonzentration in mg/ml.