

4. Diskussion

Die akute wie auch die chronische Toxizität von TCDD und verwandten Substanzen war in den letzten Jahrzehnten Gegenstand vieler Studien. Bedeutende Ergebnisse, die sich bei diesen Untersuchungen ergaben, waren unter anderem verschiedenartige Effekte auf Organe des Immunsystems. Hier konnten Wirkungen auf primäre und sekundäre Immunorgane gezeigt werden (Nohara et al., 2000). Die eindrucklichsten und am Besten untersuchten Effekte ergaben sich aber am Thymus, dem wichtigsten primären Immunorgan des Organismus. Da dieses Organ besonders empfindlich auf störende Einflüsse beim sich in der Entwicklung befindenden Organismus reagiert, wurden die meisten Studien auch in dieser Phase durchgeführt. Die Untersuchungen konnten verschiedene Angriffspunkte von TCDD an der Thymusstruktur selbst bzw. an den sich entwickelnden Immunzellen des Thymus, den Thymozyten, aufzeigen. So konnten zum einen Wirkungen von TCDD auf Thymozyten, bevor sie den Thymus erreichen (sogenannte Präthymozyten; Fine et al., 1990) beschrieben werden, zum anderen Wirkungen auf Thymozyten die sich im Thymus befanden (Kremer et al., 1995; Laiosa et al., 2003), wie auch Wirkungen auf reife T-Lymphozyten im peripheren Blut (Neubert et al., 1991, 1993). Effekte auf die Struktur (die Epithelzellen) des Thymus zeigten Greenlee und Mitarbeiter (1985) und Cook und Mitarbeiter (1987).

Die Mechanismen über die TCDD diese Effekte induziert, sind noch weitgehend unklar. Ein wichtiger Ansatz scheint eine TCDD-induzierte Apoptose der Thymozyten zu sein (Camacho et al., 2004), die aber bei weitem nicht alle Effekte im Thymus erklären kann. In neueren Studien stellt sich immer mehr die Bedeutung der EZM des Thymus für die geordnete Reifung und Vermehrung der Thymozyten im Thymus heraus (Villa-Verde et al., 1999; Savino et al., 2000). Daraus resultierte ein neuer Ansatz um einen möglichen Mechanismus der Thymustoxizität von TCDD zu beschreiben. So konnten Riecke und Mitarbeiter (2003) TCDD-induzierte Veränderungen von Rezeptoren der EZM (Integrine) sowie von korrespondierenden Zytokinen beschreiben (Riecke et al., 2003). Diese Wirkungen können wiederum mögliche Effekte auf die normale Thymozytenreifung haben (Salomon et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden Thymi von juvenilen Marmosets auf TCDD-induzierte Veränderungen von Bestandteilen der EZM sowie von Integrinen und TGF-beta (einem Zytokin) untersucht, um weitere Anhaltspunkte für den oben beschriebenen möglichen Wirkmechanismus von TCDD zu erhalten.

4.1 Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit

In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Effekte von TCDD auf die EZM sowie Integrine und TGF-beta von Thymi juveniler Marmosets mittels Immunfluoreszenz und Immunoblotting untersucht.

Bei allen untersuchten Marmosets zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Körper- und Organgewichte verglichen mit der Kontrollgruppe, so dass allgemein toxische Wirkungen von TCDD ausgeschlossen werden können.

In den immunhistochemischen Untersuchungen der Thymi (1. Teil der Versuche) zeigte sich nach einer Behandlung mit 100 ng/kg KG TCDD (Beobachtungszeitraum 2 oder 4 Wochen) eine Zunahme der Fluoreszenz bei fast allen untersuchten Antikörpern. Diese war besonders nach Färbung mit den Antikörpern gegen Kollagen Typ I und Typ IV an der Übergangszone zwischen Kortex und Medulla auffällig. Mit Hilfe der densitometrischen Auswertung konnten diese Beobachtungen semiquantitativ ausgewertet werden. So lagen die errechneten Werte der behandelten Tiere, welche die Stärke der Fluoreszenz und somit den Proteingehalt wiedergeben, fast ausschließlich oberhalb der Werte der Kontrolltiere. Eine Dosisabhängigkeit der Effekte konnte aber nicht festgestellt werden. Nach Färbung mit einem Antikörper gegen Laminin zeigten sich nach Behandlung auch mehr positive Strukturen für Laminin verglichen mit den Kontrolltieren. Dies konnte in der densitometrischen Auswertung teilweise bestätigt werden. So lag je ein Wert aus jeder Behandlungsgruppe deutlich über denen der Kontrolltiere. Nach der Färbung mit einem Antikörper gegen Fibronectin lag in der densitometrischen Auswertung der größte Teil der Werte der behandelten Tiere oberhalb der Werte der Kontrolltiere, so dass auch hier von einer Zunahme des Gehaltes an Fibronectin nach TCDD-Behandlung ausgegangen werden kann.

Im 2. Versuchsteil wurden Thymi von Marmosets, die mit 1 oder 10 ng/kg KG TCDD (Beobachtungszeitraum über 4 Wochen) behandelt worden waren, untersucht. Mittels Immunoblot wurden die Konzentrationen der Proteine von CD49a, CD49e, CD49f, CD29, Kollagen Typ I, Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin, TGF-beta1, TGF-beta Rezeptor Typ II und beta-Actin der behandelten Tiere mit den Kontrolltieren verglichen. Bei allen untersuchten Proteinen ergab sich eine Zunahme des Proteingehalts der behandelten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren. Diese Zunahme war mit Ausnahme von Laminin schon ab einer Dosis von 1 ng/kg KG TCDD auffällig. Eine über 100%ige durchschnittliche Zunahme der Proteingehalte zeigte sich bei den Marmosets, die mit der höheren Dosis behandelt worden waren und betraf im

Einzelnen die Proteine: TGF-beta1 (+102%), TGF-beta-Rezeptor TypII (+102%), Kollagen Typ I (+105%), CD49a (+148%) und Kollagen Typ IV (+363%).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit niedrigen Dosen von TCDD zu einer Vermehrung von EZM-Bestandteilen sowie korrespondierenden Integrinen im Thymus von juvenilen Marmosets führt.

4.2 Wirkungen von TCDD auf den Thymus

Das morphologisch auffälligste Zeichen der TCDD-induzierten Toxizität auf den Thymus ist die Atrophie, wobei der Kortex am Stärksten betroffen ist. Mit 50 µg/kg KG TCDD behandelte Wistar-Ratten zeigten neben Zeichen der allgemeinen Toxizität eine Thymusatrophie mit Reduktion der Kortex/Medulla-Ration und einer Veränderung der Epithelarchitektur (De Waal et al., 1992).

Weitere auffällige Effekte sind die Induktion der terminalen Differenzierung von Thymozyten, aber auch eine Blockade der Proliferation von unreifen Zellen. Kremer et al. (1995) konnten zeigen, dass eine Behandlung von fetalen Thymozytenzellkulturen von Mäusen mit TCDD zu einer Zunahme von reifen Thymozyten, besonders (CD8⁺)-Zellen, führt. Dagegen war die Proliferation von unreifen Thymozyten inhibiert und somit auch die Gesamtzellzahl vermindert. Weiterhin fanden sich Anzeichen einer vermehrten positiven Thymozytenselektion im Sinne einer vermehrten Expression des Zelloberflächenmarkers CD69. Oughton et al. (1995) zeigten, dass TCDD zu einer Abnahme der (CD4⁺CD8⁻)-Thymozyten sowie einer Abnahme der T-Helfer-Gedächtniszellen begleitet von einer Zunahme der naiven T-Zellen in C57bl-Mäusen führt wobei aber die Lymphozyten der Milz und des peripheren Blutes unbeeinflusst blieben. Ferner zeigte sich in Thymuszellkulturen von C57bl-Mäusen ab einer Konzentration von 1 nM eine Suppression der Thymusepithelzell-abhängigen Reifung der Thymozyten, bei einer Konzentration von 10 nM auf 40% der Kontrollgruppe (Greenlee et al., 1985). Laiosa et al. (2003) fanden, dass TCDD einen direkten Effekt auf die Thymozyten des Thymus haben kann. So hindert TCDD frühe Stufen (CD8⁻CD4⁻CD3⁻) am Eintritt in den Zellzyklus.

In einer Arbeit von Dencker und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede in der Sensivität der TCDD-Toxizität auf die Thymozytenpopulationen bei unterschiedlichen Mäusestämmen gibt. In der Studie wurden fetale Thymozytenkulturen von C57bl-Mäusen und DBA-Mäusen mit TCDD behandelt. Bei den Mäusen zeigte sich nach 2 Tagen und einer minimalen Konzentration von 10⁻¹⁰ mol/l TCDD eine 50%ige Inhibition der Thymozyten-Entwicklung. Bei den DBA-Mäusen war nach 2 Tagen auch mit einer Konzentration von

10^{-8} mol/l TCDD kein Effekt nachweisbar, wohl aber nach 6 Tagen bei einer minimalen Konzentration von 10^{-9} mol/l TCDD. Dies deutet darauf hin, dass die anfänglich auffällige geringere Sensitivität der DBA-Mäuse, möglicherweise aufgrund eines unterschiedlichen AhR, mit zunehmender Dauer der Exposition abschwächt (Dencker et al., 1985).

Zusammenfassend führt TCDD zu einer Inhibition der Proliferation von unreifen Thymozyten ($CD4^+CD8^-$) und somit zu einer Abnahme der Gesamthymozytenpopulation. Die Reifung der Thymozyten ist beschleunigt, es findet mehr positive Selektion statt und der $CD8^+$ (zytotoxischen)-T-Zellanteil ist erhöht. Auf der anderen Seite zeigten aber mit einer niedrigen TCDD-Dosis exponierte C57bl-Mäuse (max. 100 ng/kg KG plus wöchentliche Erhaltungsdosis) keine Veränderungen der Thymozytenpopulation, wohl aber eine dosisabhängige Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 (Vogel et al., 1997).

4.2.1 Wirkungen auf Präthymozyten

Neben den Effekten von TCDD auf die Thymozyten beschrieben Fine et al. (1989) eine Wirkung von TCDD bei perinatal exponierten Mäusen auf Präthymozyten des Knochenmarks und erklärten so die verminderte Zellzahl an Thymozyten im Thymus und die damit verbundene Thymusinvolution. In den Untersuchungen fand sich außerdem eine Korrelation zwischen der Thymusatrophie und der dosisabhängigen Abnahme der terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT), einem Enzym, welches spezifisch in lymphozytären Stammzellen, also auch in den Präthymozyten, vorkommt (Fine et al., 1990).

4.2.2 Wirkungen auf sekundäre Immunorgane

In einer Studie von Nohara und Mitarbeitern wurden Ratten pränatal exponiert (max. Dosis 800 ng/kg KG) und postnatal auf Veränderungen des Thymus und der Milz untersucht. Im Thymus waren eine dosisabhängige Induktion des CYP1A1 aber keine Veränderungen der Thymozytenpopulationen auffällig. In der Milz, als sekundäres Immunorgan, dagegen war die CYP1A1-Induktion nur gering ausgeprägt, die Splenozytenpopulation dafür aber dosisabhängig reduziert (Nohara et al., 2000). Diese Resultate zeigen, dass eine niedrige pränatale Exposition gegenüber TCDD zu Veränderungen von sekundären Immunorganen führen kann, der Thymus als primäres Immunorgan aber weitgehend intakt bleibt.

4.2.3 Wirkungen auf die zelluläre und humorale Immunantwort

Neben den Veränderungen des Organgewichts, der Zellzahl und anderer morphologischer Effekte, wurden nach Verabreichung niedriger Dosen von TCDD auch funktionelle Veränderungen in diversen Testsystemen beschrieben.

TCDD-behandelte Mäuse, die vorher mit Schaferythrozyten sensibilisiert worden waren, zeigten eine dosisabhängige Suppression der Immunantwort (ED₅₀ 0,7 µg/kg KG). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei gleichbehandelten Ratten auch bei einer Dosis von 30 µg/kg KG TCDD keine Suppression der Immunantwort, eher schien die Immunantwort sogar gesteigert (Smialowicz et al., 1994). Darüber hinaus konnten Burleson et al. (1996) nach einer einmaligen Applikation von 10 ng/kg KG TCDD eine erhöhte Letalität bei Mäusen am Hong-Kong-Influenza-Virus nachweisen. Eine pränatale Exposition mit 1,5 µg/kg KG TCDD zeigte bei Mäusen eine Thymusatrophie begleitet von einer Abnahme der (CD4⁺CD8⁺)-Thymozyten sowie einer Zunahme der (CD4⁻CD8⁻)- und (CD4⁻CD8⁺)-Thymozyten, so dass die zytotoxische T-Zell-Immunantwort herabgesetzt war (Holladay et al., 1991). Ferner gibt es Hinweise, dass die Suppression der humoralen Immunität durch TCDD nach akuter oder chronischer Exposition auf unterschiedlichen Wegen stattfindet. DBA-Mäuse die einmalig akut oder chronisch mit der selben kumulativen Dosis TCDD behandelt wurden, zeigten nach chronischer Exposition eine ca. 10fach stärkere Suppression der humoralen Immunantwort verglichen mit der akuten (Morris et al., 1992). Ein Vergleich von DBA- und C57bl-Mäusen nach TCDD-Exposition zeigte in C57bl-Mäusen ab 1,2 µg/kg KG TCDD eine deutlich eingeschränkte Antikörperproduktion, in DBA-Mäusen war eine partielle Einschränkung erst ab einer Dosis von 6 µg/kg KG auffällig. Auch nach längerer Exposition kam es bei DBA-Mäusen zu keiner Verstärkung des Effekts. Eine gute Korrelation zwischen TCDD-induzierter Immunsuppression und der Aktivität der Ah-Hydroxylase (AhH) fand sich bei B6D2F1-Mäusen, so dass die AhH als einfach zu messender Marker für die Immuntoxizität von TCDD verwendet werden kann (Vecchi et al., 1983).

4.2.4 Die Rolle des Ah-Rezeptors

TCDD ist ein spezifischer Ligand des Ah-Rezeptors und weist neben allen anderen bekannten Liganden die stärkste Bindungsaffinität auf. Aus diesem Grund wurden viele Studien angestrengt um die Rolle des AhR bei der TCDD-induzierten Immuntoxizität genauer zu charakterisieren.

Dazu untersuchten Kerkvliet et al. (1990) Mäuse mit unterschiedlichen AhR-Genotypen. Diese verschiedenen Genotypen führten zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für TCDD. Bei den

Mäusen mit dem AhR, der eine schlechtere Affinität aufwies, zeigte sich nach TCDD-Exposition ein biphasischer Verlauf eines immuntoxischen Effekts. Dies ließ die Autoren zu der Annahme kommen, dass es einen akuten AhR-abhängigen und einen später folgenden AhR-unabhängigen Mechanismus der Immuntoxizität von TCDD gibt. ARNT-knockout Mäuse zeigen keine TCDD-induzierte Thymusinvolution, was darauf hindeutet, dass eine intakte AhR-Kaskade für die durch TCDD verursachte Thymusinvolution notwendig ist. Benz(a)pyren, ein weiterer AhR-Ligand, führt aber trotz des fehlenden ARNT zu einer Involution des Thymus, was unterschiedliche Mechanismen der Toxizität nahe legt (Tomita et al., 2003). Bei kultivierten Mäuse-T-Lymphozyten fand nach Zugabe von TCDD zwar eine Bindung an den AhR und eine Translokation des Ligand-Rezeptor-Komplexes in den Nukleus statt, aber keine Bindung an DREs. Diese Resultate legen einen AhR unabhängigen Mechanismus der TCDD-induzierten Beeinflussung der T-Zell-Funktion nahe (Lawrence et al., 1996).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der AhR wesentlich für die Thymus- bzw. Immuntoxizität durch TCDD ist, aber auch andere, bisher unklare Mechanismen eine Rolle spielen.

4.2.5 TCDD-induzierte Apoptose von Thymozyten und peripheren Lymphozyten

Als ein weiterer Mechanismus der TCDD-induzierten Immuntoxizität wird eine durch TCDD verursachte Apoptose der Thymozyten und auch der peripheren Lymphozyten diskutiert.

Eine erhöhte Apoptoserate der Thymozyten (besonders $CD4^+CD8^+$ -Population), begleitet von erhöhten Apoptosemarkern auf der Zelloberfläche (Tas, TRAIL, DR5) bei TCDD-exponierten C57bl-Mäusen konnte von Camacho et al. (2004) beschrieben werden. Darüber hinaus induzierte eine TCDD-Exposition ab einer Dosis von 100 ng/kg KG bei Mäusen phänotypische Veränderungen von Zelloberflächenmarkern auf Thymozyten, die denen von Thymozyten gleichen, die Apoptose unterlaufen (Kamath et al., 1998). Ferner zeigte sich bei mit 10 nM TCDD behandelten Ratten-Thymozyten eine gesteigerte RNA- und Protein-Synthese sowie eine erhöhte Poly(A)polymerase-Aktivität. Diese Prozesse korrelieren gut mit dem programmierten Tod von Zellen (Kurl et al., 1993). Weiter zeigten Fas(CD95)-negative Mäuse geringere toxische Auswirkungen auf die Thymozyten verglichen mit Fas-positiven (Rhile et al., 1996). Auch periphere Lymphozyten können Ziel der TCDD-induzierten Apoptose sein. So fanden Prell et al. (1995), dass ein mögliches Ziel aktivierte T-Helferzellen sind, die über ihre Aktivierung zur Apoptose gebracht werden.

4.2.6 Vergleich der Wirkung von TCDD und anderen Substanzen

Ferner ist erwähnenswert, dass es Substanzen (Fremdstoffe wie auch körpereigene Stoffe) gibt, die ähnliche Wirkungen wie TCDD verursachen können und somit klar von der TCDD-induzierten Toxizität abgegrenzt werden müssen. Exemplarisch werden hier einige solcher Substanzen mit eventuellen Unterscheidungsmöglichkeiten gegenüber der TCDD-Toxizität vorgestellt.

So konnte gezeigt werden, dass für Östrogene, die auch eine Atrophie des Thymus verursachen können, verglichen mit TCDD ein anderer Wirkmechanismus angenommen werden muss. Diethylstilbestrol (DES), ein synthetisches Östrogen, entfaltete seine Effekte auf andere Reifungsstufen der Thymozyten als TCDD (Lai et al., 1998). Auch Kortison verursacht eine Thymusatrophie. Mit Dexamethason behandelte Mäuse zeigten eine Abnahme der Thymozytenzahl, wobei alle Subpopulationen betroffen waren. Da nach TCDD-Exposition aber fast ausschließlich (CD4⁺CD8⁺)- und (CD4⁻CD8⁻)-Thymozyten betroffen waren wird ein unterschiedlicher Wirkmechanismus vermutet (Lundberg, 1991). De Waal et al. (1997) verglichen die Wirkungen von TCDD, Bis(tri-n-butyltin)oxid (TBTO) und Ciclosporin A auf die Histologie des Thymus. Dort zeigte TCDD den stärksten Effekt auf kortikale Epithelzellen, TBTO führte hauptsächlich zu einem Untergang kortikaler Thymozyten und Ciclosporin A entfaltete seine Hauptwirkung in der Medulla.

4.2.7 Wirkungen von Stresseffekten und Mangelernährung

Auch Stress (vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen und Kortikosteroiden) sowie eine Mangelernährung können Effekte auf den Thymus ausüben.

Um Stresseffekte nach TCDD-Behandlung auf den Thymus auszuschließen wurden Ratten vor TCDD-Exposition adrenaletomiert. Dies hatte weder einen Effekt auf die Hepatotoxizität noch auf die Thymusinvolution, so dass Stress aufgrund der TCDD-Exposition als Einflussfaktor weitgehend ausgeschlossen werden kann (van Logten et al., 1980). Eine Mangelernährung aufgrund der TCDD-Intoxikation führte allerdings zu einer verstärkten Involution des Thymus (van Logten et al., 1981).

4.2.8 Studien an nicht-menschlichen Primaten

In mehreren Studien wurden von Neubert und Mitarbeitern Effekte von TCDD auf periphere Lymphozyten (in vivo und in vitro) bei nicht menschlichen Primaten untersucht.

Marmosets die mit geringen Dosen von TCDD (10 ng/kg KG) behandelt wurden, zeigten eine Abnahme von maximal 20% der (CD4⁺)-T-Zellen im peripheren Blut. Der stärkste Effekt zeigte sich bei den (CD4⁺CD29w⁺)-T-Zellen („helper-inducer-cells“, Abnahme um bis zu 50%). Die Anzahl der (CD4⁺CD45R⁺)-T-Zellen („suppressor-inducer-cells“) blieb unverändert, so dass der Quotient aus beiden Populationen eine gute Methode ist die Stärke der TCDD-Wirkung auf den Thymus zu beschreiben. Das Maximum dieses Effektes stellte sich nach 15 Wochen ein, wobei das TCDD-Absorptionsmaximum bei ca. 2 Wochen liegt. Dieses deutet auf einen indirekten (über den Thymus vermittelten) Effekt der TCDD-Toxizität hin. Darüber hinaus war die Gesamtzahl der (CD8⁺)-Thymozyten erhöht (Neubert et al., 1990). Eine kumulative Exposition von ca. 2,6 ng/kg KG über 24 Wochen (bei wöchentlicher Applikation) führte zu den gleichen Veränderungen der (CD4⁺CD29w⁺)- und (CD4⁺CD45R⁺)-T-Zellen, die Gesamt-T-Zellzahl blieb aber konstant (Neubert et al., 1992). Ähnliche Versuche wurden mit Lymphozyten aus dem peripheren Blut vom Mensch und Marmoset in vitro durchgeführt. Auch hier zeigte sich bei einer minimalen Konzentration von 10⁻¹³ mol/l eine Abnahme der (CD4⁺)-T-Zellen, bei einer Zunahme der (CD8⁺)-T-Zellen. Besonders ausgeprägte Effekte der TCDD-Toxizität fanden sich wiederum bei den (CD4⁺CDw29⁺)-T-Zellen. Weiter konnte gezeigt werden, dass TCDD auch Effekte auf die B-Lymphozyten haben kann. Eine einmalige Dosis von 10-30 ng/kg KG führte im Marmoset zu einer Abnahme von (CD20⁺)-B-Lymphozyten. So zeigen sich bei sehr niedrigen Dosen von TCDD eindeutig toxische Effekte auf Lymphozytenpopulationen (Neubert et al., 1991, 1993).

4.2.9 Studien an humanem Gewebe

Auch an humanem Gewebe ließen sich ähnliche TCDD-induzierte Effekte verglichen mit tierexperimentellen Studien nachweisen. So führte z. B. eine Dosis von 25 µg/kg KG TCDD bei einem in eine SCID-Maus (severe combined immunodeficient) transplantierten fetalen humanen Thymus zu einer Involution im Sinne einer Abnahme der relativen Kortextbreite (de Heer et al., 1995).

Auch einen direkten Effekt von TCDD auf die Reifung von humanen Thymusepithelzellkulturen, bei einer TCDD-Konzentration von 10 nM konnten Cook et al.

(1987) nachweisen. Darüber hinaus schien in dieser Studie die CYP450-Induktion nicht mit der Toxizität zu korrelieren.

Ferner zeigten mit 0,1 nM TCDD behandelte humane Thymusepithelzellen eine vermehrte terminale Differenzierung sowie eine Zunahme der Integrin-Ketten CD49b und CD49e und eine Abnahme von CD49f. Da diese Rezeptorbestandteile eine wichtige Rolle in der Thymozytenreifung spielen, ist eine Veränderung dieser Proteine möglicherweise mit in die TCDD-induzierte Immuntoxizität involviert (Riecke et al., 2003).

Kikuchi et al. (2001) zeigten außerdem eine gesteigerte Apoptoserate durch eine TCDD-induzierte Caspase-3-Aktivität in einer humanen T-lymphoblastischen-Zelllinie.

Da schon nach äußerst geringen TCDD-Dosen eine Veränderung der peripheren Lymphozytenpopulationen beim Marmoset auffällig war (Neubert et al., 1991) wurden Untersuchungen angestellt, um zu erfassen, ob sich periphere Blutlymphozyten des Menschen als einfacher Biomarker für dioxinverursachte Immunalterationen im Menschen eignen. Dazu wurden kultivierte humane Lymphozyten mit bis zu 10^{-7} mol TCDD behandelt. Da aber auch bei dieser hohen Konzentration keine spezifischen Effekte, außer einer CYP1A1-Induktion, auffällig waren sind periphere Blutlymphozyten nicht als Biomarker geeignet (Lang et al., 1994, 1996).

Darüber hinaus können Veränderungen des Thymus zahlreiche Ursachen haben, die immer neben den durch Fremdstoffe verursachten Effekten berücksichtigt werden müssen. So war z. B. eine Thymusinvolution bei Kindern nach akuter Krankheit auffällig. Hier zeigte sich auch ein Verlust vor allem von unreifen proliferierenden Thymozyten des Kortex bei aber intakter Epithelstruktur. (van Baarlen et al., 1989).

4.2.10 Epidemiologische Studien

Bei Arbeitern mit moderat erhöhter TCDD-Belastung konnten keine signifikanten Veränderungen des Phänotyps der Lymphozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie festgestellt werden (Neubert et al., 1994). Auch in groß angelegten Studien bei Bodentruppen der US-Army, die im Vietnam-Krieg dem mit Dioxinen verunreinigten Pestizid „Agent Orange“ ausgesetzt waren, konnten keine signifikanten Effekte auf das Immunsystem festgestellt werden (Houk, 1991). Mocarelli et al. (1991) konnten bei einigen Kindern, die nach dem Unfall in Seveso mit TCDD kontaminiert wurden, einen leichten Anstieg der Blutlymphozyten feststellen. Diese Kinder entstammten aber fast alle aus einer hoch kontaminierten Zone und wiesen zudem alle eine Chlorakne auf. Nach einigen Jahren waren diese Effekte nicht mehr auffällig. In einer Region in Missouri (USA), die mit TCDD-verunreinigten Abfällen verseucht worden war,

zeigten sich in einigen exponierten Personen einen prozentualen Anstieg der (CD8⁺)-T-Lymphozyten im peripheren Blut, chronische Erkrankungen waren aber nicht auffällig (Needham et al., 1991).

Insgesamt sind die Daten aus epidemiologischen Studien nur wenig aussagekräftig und die Effekte im Menschen nur gering ausgeprägt sowie schwer auf eine Dioxin-Exposition zurückzuführen.

4.3 Die extrazelluläre Matrix (EZM) des Thymus

4.3.1 Bedeutung und Aufgaben der EZM im Thymus

Momentan sind über 50 Proteine der EZM bekannt. Die meisten haben unterschiedliche Domänen und können so mit verschiedenen Molekül-Partnern interagieren. Die strukturelle Vielfalt wird von einer großen Zahl von Mechanismen reguliert, so dass die EZM ständig dynamischen Veränderungen unterliegt (Zamir und Geiger 2001). Bestandteile der EZM finden sich im Thymus hauptsächlich in der Kapsel sowie in den den Thymus durchziehenden Septen. Im juvenilen Thymus finden sich im Kortex nur dünne EZM-Fäden, überwiegend bestehend aus Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin, dickere Stränge finden sich an der kortikomedullären Übergangszone sowie in der Medulla selbst (Savino et al., 2000). Im Alter nehmen die Bestandteile der EZM in allen Regionen des Thymus kontinuierlich zu und im Gegensatz dazu findet eine starke Abnahme der kortikalen Thymozyten statt (Contreiras et al., 2004). Im Kortex und der Medulla werden von den Thymusepithelzellen die EZM-Bestandteile Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ IV produziert. Diese bilden ein makromolekulares Arrangement, was den Thymozyten über Adhäsion und Deadhäsion erlaubt zu wandern und zu differenzieren, somit spielt die EZM eine wesentliche Rolle in der Reifung von Thymozyten (Villa-Verde et al., 1999; Savino et al., 2000).

Darüber hinaus wurde von Savino et al. (1993, 2000) sowie Watt et al. (1992) die Expression von unterschiedlichen Integrinen, den Rezeptoren der EZM, auf Thymozyten und Thymusepithelzellen zusammengestellt. So exprimieren Thymozyten unter anderem alpha4beta1-, alpha6beta4- sowie alpha6beta1-Integrin. Auf Thymusepithelzellen wurden alpha2beta1, alpha3beta1, alpha5beta1- und alpha6beta1-Integrine gefunden. Die festgestellte unterschiedliche Verteilung und Konzentration der Integrine im Thymus könnte einen Einfluss auf die Entwicklung der Thymozyten haben.

4.3.2 Effekte nach Eingriff in die Integrität der EZM

Eine Blockade von Fibronectin mit einem Antikörper führt zu einer Modulation der Thymozytenreifung im Sinne einer Blockierung der Differenzierung von $(CD4^-CD8^-)$ -Thymozyten zu $(CD4^+CD8^+)$ -Thymozyten sowie einer Reduktion der Gesamtzahl der $(CD4^+)$ -Thymozyten gegenüber den $(CD8^+)$ -Thymozyten (Schmeissner et al., 2001; Utsumi et al., 1991). Laminin und Merosin haben eine costimulierende Funktion auf die anti-CD3-induzierte Thymozytenproliferation. Antikörper gegen die alpha6- und alpha3-Integrinketten blockieren diese Proliferation, was darauf hindeutet, dass die Laminin- und Merosinrezeptoren alpha6beta1 und alpha3beta1 eine wichtige Rolle in der Laminin bzw. Merosin induzierten Thymozytenproliferation haben (Chang et al., 1995).

Im Thymus vorhandenes Laminin-5 (alpha3beta3gamma2) ist in die über alpha6beta4-Integrin vermittelte Proliferation der Thymozyten involviert (Vivinus-Nebot et al., 1999). Kim et al. (2001) zeigten, dass die Blockade der alpha3-Kette von Laminin-5 (keine Adhäsion mehr möglich) zu einer Unterbrechung der T-Zell-Entwicklung mit einer Abnahme der Gesamthymozyten von 40% führt. Besonders stark betroffen waren zwei Untergruppen ($CD25^+CD44^+$ und $CD25^+CD44^-$) der $(CD4^-CD8^-)$ -Fraktion (Abnahme um 75-90%), so dass die intakte Funktion von vorwiegend subkapsulär exprimierten Laminin-5 für das Überleben und die Differenzierung unreifer Thymozyten wesentlich ist.

Darüber hinaus konnten Geberhiwot et al. (2001) zeigen, dass Thymozyten Laminin-8 (alpha4beta1gamma1) produzieren und über das alpha6beta1-Integrin die Zellproliferation stimulieren. Eine antikörpervermittelte Blockade von Fibronectin und Laminin stört den Eintritt und die Entlassung von Thymozyten aus den „thymic-nurse-cells“ sowie die Konstituierung der Thymozyten-„thymic-nurse-cell“-Komplexe (Villa-Verde et al., 1994).

4.3.3 Effekte von Zytokinen

Weiterhin können Zytokine, die von Thymozyten und Thymusepithelzellen hergestellt werden, die Produktion von EZM-Proteinen und Integrinen modulieren. So führen niedrige Dosen von Interferon-gamma zu einer vermehrten Produktion von alpha5beta1- und alpha6beta1-Integrinen sowie Kollagen Typ IV, hohe Dosen von Interferon-gamma haben den umgekehrten Effekt (Lagrotta-Candido et al., 1996). Ferner beschrieben Salomon et al. (1997), dass VCAM-1 (vascular cellular adhesion molecule) selektiv an der kortiko-medullären Grenze des Thymus exprimiert wird, Fibronectin dagegen ist hauptsächlich in der Medulla zu finden. Beide

Moleküle sind Liganden für VLA-4. VLA-4 wird von heranreifenden Thymozyten exprimiert und spielt eine Rolle bei deren positiver Selektion. Salomon et al. vermuten, dass VCAM-1 somit eher für die Entwicklung unreifer Thymozyten zuständig ist, Fibronectin in der Medulla für die reiferen Stufen.

SDF-1alpha (stromal cell derived factor) ist ein Chemokin des Thymus, welches eine Rolle bei der Wanderung (Chemotaxis) von Thymozyten spielt. Fibronectin und Laminin verstärken in Mäusen diese chemotaktische Aktivität (ca. 10-fach) selektiv im Kortex (Yanagawa et al., 2001). Außerdem können genetische Veränderungen des Phänotyps von Mäuse-Thymozyten (z. B. CD4-knockout-Mäuse) zu einer Änderung des Zytokinprofils führen, was wiederum zu Veränderungen des EZM-Netzwerks innerhalb des Thymus führt (Savino et al., 1998).

4.3.4 Effekte von TCDD auf Zytokine und die EZM

TCDD verursacht in fetalen Thymozytenkulturen Veränderungen von unterschiedlichen Zytokinen. So konnten Veränderungen von verschiedenen Interleukinen (IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-6) sowie TNF-alpha, TGF-beta1 und dem Plasminogenaktivatorinhibitor-2 festgestellt werden (Lai et al., 1997). Mit einer niedrigen TCDD-Dosis exponierte C57bl-Mäuse (max. 100 ng/kg KG plus wöchentliche Erhaltungsdosis), zeigten keine Veränderungen der Zytokine TGF-beta, TGF-alpha und TNF-alpha. Auffällig waren aber eine vermehrte Expression von IL-1beta sowie eine dosisabhängige Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 (Vogel et al., 1997). Außerdem zeigten mit TCDD behandelte humane Keratinozyten Änderungen der Konzentrationen von TGF-alpha, TGF-beta2 sowie eine Beschleunigung ihrer Differenzierung (Gaido und Maness, 1994). Gaido et al. (1992) beschrieben in mit TCDD behandelten humanen Keratinozyten einen Anstieg von TGF-alpha sowie eine Reduktion von TGF-beta2 bei unverändertem Gehalt an TGF-beta1. Wobei die Erhöhung von TGF-alpha primär auf mRNA-Stabilisierung, bei unverändertem mRNA-Gehalt, die Abnahme von TGF-beta2 aber auf einer verminderten Gentranskription beruhte. Diese verschiedenen Effekte legen einen unterschiedlichen Ansatz der Wirkung von TCDD nahe.

Als Erste beschrieben Abbott et al. (1987) Wirkungen von TCDD auf Bestandteile der EZM. So fanden sie bei exponierten fetalen Mäusen eine Abnahme von Laminin und Kollagen Typ IV in der Basalmembran der Nieren. Eine Behandlung einer humanen Brustkrebszelllinie mit TCDD führte zu einem reduzierten Zellwachstum auf 60% verglichen mit der Kontrolle, begleitet von einem zweifachen Anstieg der Konzentration von TGF-beta3 sowie Erhöhungen von TGF-alpha, TNF-alpha, IL-1beta, so dass die Wachstumsinhibition mit dem Anstieg der Wachstumsfaktoren

und Zytokinen zu erklären ist (Vogel und Abel, 1995). Weitere TCDD-induzierte Effekte auf die EZM konnten Riecke et al. (2002) aufzeigen. So führte eine einmalige Dosis von 1 ng/kg KG TCDD im Myokard von Marmosets zu einem Anstieg von Kollagen, Fibronectin, Laminin sowie TGF-beta1 und TGF-beta-Rezeptor Typ I und rief damit eine Myokardfibrose hervor. Ferner konnte gezeigt werden, dass TCDD in Thymusepithelzellkulturen einen Anstieg der Integrinketten CD49b und CD49e sowie ICAM-1 (CD54) verursacht. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikante Abnahme von CD49f und VCAM-1 (CD106)(Riecke et al., 2003).

4.3.5 Hypothesen zum Wirkmechanismus von TCDD

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben ist die EZM des Thymus wesentlich für die normale Reifung und Differenzierung der Thymozyten. Veränderungen der EZM-Bestandteile führen zu einer gestörten Thymozytenreifung.

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit und aus vorangegangenen Studien zu diesem Thema zusammen, lässt sich ein möglicher Wirkmechanismus der TCDD-induzierten Immuntoxizität postulieren. So kann TCDD durch eine vermehrte Expression von Zytokinen (wie z. B. TGF-beta) zu einer Induktion der EZM führen was wiederum eine gestörte Thymozytenreifung und somit Alterationen des Immunsystems hervorruft.

Weiterhin wird vermutet, dass TCDD die anti-entzündliche Immunantwort, durch eine gesteigerte Produktion von Entzündungsmediatoren, verstärkt (Kervliet und Oughton, 1993). Eine Entzündungsreaktion ist auch immer mit einer Aktivierung von Fibroblasten und einer vermehrten Bildung von EZM-Bestandteilen verbunden, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die spezifischen Zielzellen und die zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen der TCDD-induzierten Immuntoxizität bleiben aber weiterhin unklar. Aufgrund der sehr unterschiedlichen bisher beschriebenen Wirkungen von TCDD auf das Immunsystem, ist es wahrscheinlich, dass nicht nur ein bestimmter Mechanismus verantwortlich ist, sondern verschiedene Angriffspunkte eine Rolle spielen. Weiterhin scheint auch die Dauer der Exposition, ob akut oder chronisch, sowie die Dosis und die Zusammensetzung der verschiedenen Dioxine wesentlich zu sein.

4.3.6 Effekte von TCDD auf beta-Actin

Beta-Actin wird als sogenanntes „housekeeping gene“ bezeichnet. Das heißt, es kommt in allen Körperzellen vor und unterliegt allgemein nur geringen regulativen Effekten, so dass es in allen Zellen etwa gleich stark exprimiert wird. Beta-Actin polymerisiert zu Actinfilamenten, welche der Zelle Stabilität und Flexibilität verleihen.

Für Immunoblots kann es als interne Kontrolle der verwendeten Gesamtproteinmenge benutzt werden. So muss bei den vorher berechneten gleichen Gesamtproteinmengen unterschiedlicher Proben die Expression von beta-Actin gleich sein, was wiederum im Immunoblot zu gleich stark ausgeprägten Banden führt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtproteinmengen der aufbereiteten Thymusproben zuvor je Probe dreimal photometrisch bestimmt, um so die Menge berechnen zu können, die gleichen Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben entspricht.

In den nachträglich durchgeführten Immunoblots mit beta-Actin zur Verifizierung der berechneten gleichen Konzentrationen, zeigte sich ein TCDD-dosisabhängiger Anstieg der beta-Actin-Konzentration in allen untersuchten Proben.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass beta-Actin unter bestimmten Umständen sehr wohl starken regulativen Effekten unterliegt. So zeigten Chang et al. (1998), dass beta-Actin in einer Leberkrebszelllinie vermehrt exprimiert wurde. Ferner können Wachstumsfaktoren (z. B. EGF (epidermal growth factor)) eine vermehrte Expression von beta-Actin in verschiedenen Zelltypen induzieren (Elder et al. 1984, 1988; Greenberg et al. 1986; Ng et al., 1989). Außerdem fanden Gagelin et al. (1995) und Leof et al. (1986) eine TGF-beta induzierte beta-Actin-Synthese in Astrozyten und Fibroblasten. Einen TCDD-induzierten Effekt auf ein beta-Actin-bindendes Protein in Thymozyten konnten Svensson und Lundberg (2001) zeigen. So führte eine Behandlung mit TCDD im Thymus zu einer gesteigerten Expression von Adseverin. Adseverin bindet an beta-Actin und hat viele Funktionen in der Organisation der Actin-Filamente und spielt eine wichtige Rolle in der normalen Zellfunktion. Diese Ergebnisse zeigen, dass beta-Actin einer Regulation besonders durch Wachstumsfaktoren unterliegen kann und dass TCDD Effekte auf beta-Actin-bindende Proteine im Thymus haben kann.

In den untersuchten Thymi aus der vorliegenden Arbeit kam es zu einer deutlichen TCDD-verursachten Induktion von TGF-beta. Da TGF-beta zu einer vermehrten Expression von beta-Actin führen kann (Gagelin et al., 1995) und auch TCDD direkt induzierende Effekte auf beta-Actin-regulierende Proteine hat (Svensson und Lundberg, 2001), kann beta-Actin als interne Kontrolle für die hier durchgeführten Versuche nicht verwendet werden.

4.4 Aktuelle Bedeutung von Dioxinen und Schwierigkeiten der Risikoerfassung

Tierexperimentelle Studien können wertvolle Hinweise auf die die Toxizität von Dioxinen und anderen Fremdstoffen beim Menschen machen. Eine genaue, quantitative Extrapolation der Ergebnisse im Hinblick auf mögliche Effekte beim Menschen ist aber nicht möglich. Gerade die (zum Teil sehr deutlichen) Unterschiede in der Toxizität der Dioxine (qualitativ und quantitativ), die zwischen den verschiedenen Spezies bestehen (Variation der Effekte teilweise 10000fach), legen unterschiedliche Mechanismen der Wirkungsweise, die über den Ah-Rezeptor vermittelten Weg hinausgehen, nahe (Neubert et al., 1994b). Weitere Probleme bereiten Tierstudien, in denen mit deutlich zu hohen TCDD-Dosen gearbeitet worden ist, so sind zum Beispiel Versuche mit C57bl-Mäusen nahe der LD50 wenig aussagekräftig. Allgemein sind Studien zur Risikoerfassung im Menschen mit z. B. Mäusen, die Dosen über 3 µg/kg KG TCDD erhalten und somit allgemein-toxische Effekte zeigen, irrelevant (Neubert et al., 1993). Weitere zu beachtende Faktoren sind die deutlich unterschiedlichen Kinetiken und Gewebeverteilung in den verschiedenen Spezies. So haben zum Beispiel fettgewebsreiche Organismen wie der Mensch einen höheren Anteil an Zielgewebe für Dioxine und können somit auch höhere Konzentrationen erreichen.

Erhebliche Probleme können auch bei epidemiologischen Studien zur Erfassung von gesundheitlichen Risiken durch Dioxine erwartet werden, da oftmals eine große Heterogenität der exponierten Population besteht. So können zum Beispiel genetische wie auch Umweltfaktoren die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Dioxinen stark beeinflussen. Weitere wichtige limitierende Punkte sind, 1. dass häufig eine Polyexposition stattgefunden hat und sich die Kongenere unterschiedlich in den Geweben verteilen und sich die Kongenere teilweise antagonisieren, 2. dass sich die Exposition schlecht quantifizieren lässt, 3. dass bei den oft nur äußerst gering ausgeprägten Effekten Einflussfaktoren wie Ernährungsgewohnheiten, Arbeitsbedingungen oder die Wohnlage eine wichtige Rolle spielen, 4. dass die Probandengruppe zu klein gewählt ist und eine echte Kontrollgruppe fehlt und 5. dass die Latenzperiode nach Exposition zu kurz gewählt ist um Langzeiteffekte wie beispielsweise die Entwicklung maligner Tumoren zu beobachten.

Weiterhin lässt sich nur äußerst schwierig feststellen, ob die gemessene Belastung eines Individuums aus einer akuten und hohen Exposition resultiert oder ob es sich um eine kumulative Belastung aus niedrigen Konzentrationen über Jahre handelt. Im Blut von Menschen, die ungewöhnlich hohen Dosen Dioxin ausgesetzt waren, wie zum Beispiel nach Unfällen in Chemieanlagen, lassen sich noch 32 Jahre später erhöhte Konzentrationen, sowie Isomer-

spezifische Auffälligkeiten, nachweisen (Schechter und Ryan 1988). Außerdem sind messbare und eindeutige klinische Effekte, die sich auf eine Dioxinexposition zurückführen lassen, nur sehr schwierig auszumachen. Das einzige Symptom, was im Menschen nach einer exzessiven Exposition von Dioxinen auftritt, ist die Chlorakne, welche aber auch in verschiedenen Individuen mit gleicher Belastung sehr unterschiedlich ausgeprägt ist. So hatte ein Kind nach dem Seveso-Unfall mit der höchsten Dioxinkonzentration (56000 ppt) nur eine leichte und vorübergehende Chlorakne, andere Kinder mit deutlich niedrigeren Dosen litten an einer schweren Variante (Mocarelli et al., 1991).

Um eine Gewebkonzentration von TCDD von ca. 50000 ppt zu erreichen, wäre in einer Ratte eine Dosis von $>100 \mu\text{g/kg KG}$ notwendig, was in der Ratte ein schweres wasting-syndrom auslösen würde. In anderen Spezies (wie z. B. C57bl-Mäuse) wäre diese Dosis wahrscheinlich tödlich (Neubert, 1997/98). Eine einmalige Dosis von ca. $2 \mu\text{g/kg KG}$, die einer Ratte appliziert wird, führt schon zu signifikanten Effekten auf den Thymus (Vogel et al., 1997). Die Gewebkonzentrationen, die nach dieser Applikation erreicht werden, können mit den oberen Bereichen der Körperbelastung des Menschen verglichen werden. Ferner variiert zum Beispiel die LD50 zwischen Meerschweinchen und Hamstern um den Faktor 5000, wobei aber die Induktion der AHH (aryl hydrocarbon hydroxylase) und der EROD (ethoxyresorufin-O-deethylase) vergleichbar sind. (Silbergeld und Gasiewicz 1989, Olson et al. 1990). Dies macht die eindrucklichen Unterschiede der Toxizität der Dioxine in unterschiedlichen Spezies deutlich. Ein Grund für die geringere Toxizität von TCDD im Menschen verglichen mit Nagetieren ist möglicherweise die geringere Affinität des AhR des Menschen (Okey et al., 1994). Auch unterschiedliche AhR-Genotypen haben eine Auswirkung auf die Toxizität von TCDD. So unterscheidet sich die LD50 in C57bl-Mäusen mit unterschiedlichen AhR um den Faktor 20 (Birnbaum et al., 1990).