

Aus dem Institut für Toxikologie und Pharmakologie für Naturwissenschaftler

(Direktor: Prof. Dr. E. Maser)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Zytoletale Wirkung von Organozinnverbindungen auf C6 Gliomazellen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

TERESA LUISE MEYER

aus Cloppenburg

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Maser, Institut für Toxikologie und Pharmakologie für
Naturwissenschaftler

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herdegen, Institut für Experimentelle u. Klinische
Pharmakologie

Tag der mündlichen Prüfung: 07.06.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 07.06.2011

gez.: Prof. Dr. Dr. Cascorbi
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Abkürzungen

Ac	Acetyl
AT	Adenin-Thymin
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
AV-Modus	Aperture value-Modus
CHP	Cumolhydroperoxid
CRP	C-reaktives Protein
DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
DCFH	Dichlorofluorescein (nicht fluoreszierend)
DCF	Difchlorofluorescein (fluoreszierend)
DEVD	Asp-Glu-Val-Asp
DMEM	Dulbecco's Modified Eage Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EU	Europäische Union
FCS	Fetales Rinderserum
GFAP	Saures Gliafaserprotein
IMO	Internationale Schifffahrtsorganisation
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LC ₅₀	halbmaximale letale Dosis
MAP	mitogen aktiviertes Protein
MDA	Malondialdehyd
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid
PBS	Phosphate buffered saline nach Dulbecco
pNA	p-Nitroanilin
PVC	Polyvinylchlorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

SDS	Dodecylsulfat Natriumsalz
TBT	Tributylzinn
TBA	2-Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TCA	Trichloressigsäure
TMT	Trimethylzinn
TPT	Triphenylzinn
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	MATERIAL UND METHODEN.....	7
2.1	Zellkultur.....	7
2.1.1	C6 Zellen.....	7
2.1.2	Materialien.....	7
2.1.3	Kulturmedien.....	8
2.1.4	Lösungen.....	9
2.1.5	Kultivierung.....	9
2.2	Testsubstanzen.....	10
2.3	Versuchsaufbau.....	11
2.3.1	96-Well-Mikrotiterplattenkulturen.....	11
2.3.1.1	Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität.....	11
2.3.1.2	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität.....	12
2.3.1.3	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies durch fluorimetrische Messung mit 2',7'- Dichlorfluoreszein-Diacetat.....	13
2.3.2	100 mm Schalen.....	15
2.3.2.1	Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität	15
2.3.2.2	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität.....	15
2.3.2.3	Aufbereitung der Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Kernmorphologie, Messung der Caspase-3 Aktivität und der Bestimmung des Zellproteingehaltes.....	16
2.3.3	35 mm Schalen.....	18
2.4	Messmethoden.....	19
2.4.1	Proteinbestimmung.....	19
2.4.1.1	96-Well-Mikrotiterplattenkulturen.....	20
2.4.1.2	100 mm Kulturschalen.....	21
2.4.1.3	35 mm Kulturschalen.....	21
2.4.2	MTT-Messung.....	22

2.4.3	Kernmorphologische Beurteilung.....	23
2.4.4	Caspase-Assay.....	27
2.4.5	Messung mit 2',7'-Dichlorfluoreszein-Diacetat.....	30
2.4.6	Messung mit Lipoxidation.....	31
2.5	Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.....	33
2.5.1	96-Well-Mikrotiterplattenkulturen.....	33
2.5.1.1	Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität.....	33
2.5.1.2	Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität.....	34
2.5.1.3	Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Messung.....	34
2.5.2	100 mm Schalen.....	34
2.5.2.1	Beurteilung der Kernmorphologie.....	34
2.5.2.2	Messung der Caspase 3-Aktivität.....	35
2.5.2.3	Betrachtung der zeitabhängigen Zytotoxizität.....	35
2.5.3	35 mm Kulturschalen.....	35
2.5.3.1	Lipidperoxidierende Wirkung der Organozinnverbindungen.....	35
2.5.4	Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	36
3	ERGEBNISSE.....	37
3.1	Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität	37
3.1.1	Messung des Zellproteingehaltes der exponierten Kulturen.....	37
3.1.2	Messung der Zellvitalität (MTT-Assay).....	39
3.2	Einfluss der Expositionszeit auf die Zytotoxizität.....	43
3.3	Induktion von Apoptose und Nekrose.....	50
3.3.1	Konzentrationsabhängigkeit der Induktion des Zelltodes.....	50
3.3.1.1	Morphologische Analysen.....	50
3.3.1.2	Messung der Caspase 3-Aktivität.....	58
3.3.2	Zeitabhängigkeit der Induktion von Apoptose und Nekrose.....	60
3.3.2.1	Morphologische Analysen.....	61
3.3.2.2	Messung der Caspase 3-Aktivität.....	66

3.4 Einfluss der Organozinnverbindungen auf die zelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.....	70
3.5 Einfluss der Organozinnverbindungen auf die Lipidperoxidation in den Zellen.....	72
4 DISKUSSION.....	74
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	90
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	92
7 DANKSAGUNG.....	99
8 LEBENSLAUF.....	100

1 Einleitung

„Der Mensch ist nicht das Produkt seiner Umwelt - die Umwelt ist das Produkt des Menschen.“ (Benjamin Disraeli (1804-81), britischer Politiker, Premierminister und Schriftsteller)

Der Mensch greift auf unterschiedliche Weise in seine Umwelt ein. Die Konsequenzen seines Handelns sind dabei nicht immer sofort ersichtlich, und einige Auswirkungen offenbaren sich erst Jahre später.

Eine zunehmende Bedrohung für Mensch, Tier und Umwelt stellen Umweltchemikalien dar. Durch den Einsatz dieser Chemikalien in den unterschiedlichsten Bereichen werden die oft langlebigen Verbindungen zu einer kaum überschaubaren Bedrohung für unsere heutiges und zukünftiges Leben.

Die Gruppe der Organozinnverbindungen bildet durch ihre weltweite Verbreitung ein erhebliches Risiko für unsere Umwelt.

Die Verbindungen sind durch den Menschen erzeugt und bestehen aus einem Zinnatom und einem organischen Rest. Je nach Alkylierungsgrad existieren unterschiedliche Organozinnverbindungen wie z.B. Tributylzinn (TBT) oder Trimethylzinn (TMT).

Jedes Jahr werden weltweit über 50.000 Tonnen Organozinnverbindungen produziert (Snoeij et al., 1987). Seit die Verbindungen in den Dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts erstmals eingesetzt wurden, haben sie eine weite Verbreitung gefunden. Die Triorganozinnverbindungen werden heute als Fungizide, Bakterizide, Herbizide, Insektizide, Rodentizide, Konservierungsmittel für Holz, Papier und Textilien, Schutzmittel für Flüssigkeiten und Mauerwerk und vor allem als Antifoulingmittel in Schiffslacken (WHO, 1980) verwendet. Aber auch als Stabilisatoren für PVC oder als Desinfektionsmittel zum Schutz von Textilien oder Leder werden Organozinnverbindungen eingesetzt (Fent, 1996).

Heute sind Organozinnverbindungen die am weitesten verbreiteten Organometallverbindungen überhaupt (Fent, 1996). Die Triorganozinnverbindungen gehören zugleich zu den giftigsten anthropogen hergestellten Stoffen (WHO, 1980).

Der Mensch nimmt die toxischen Verbindungen vor allem über Meeresfrüchte auf, die auf Grund der Exposition gegenüber Antifoulinganstrichen kontaminiert sind (Takahashi et al., 1999) oder durch das Trinken von Wasser, das die Verbindung aus PVC-Wasserrohren herauswäscht (Sadiki et Williams, 1999). In höheren Spezies wie Säugetieren können Organozinn in Organen wie Leber, Niere und Gehirn akkumulieren (Fait et al., 1994).

Die zwei in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen Tributylzinn (TBT) und Trimethylzinn (TMT) sind in ihrer Wirkung auf Organismen gut untersucht und zeigen trotz ihrer chemischen Ähnlichkeit große Unterschiede in ihrer Wirkung.

In den 1970er und 1980er Jahren begann der weit verbreitete Einsatz von Tributylzinn als effektives Biozid in Antifoulinganstrichen für Schiffe (Fent, 1996). Diese Anstriche sollen den Bewuchs des Schiffsrumpfes mit Algen, Seepocken und Muscheln verhindern und stellen somit auch einen wichtigen wirtschaftlichen Faktor dar, da der Bewuchs den Wasserwiderstand und damit die Transportkosten erhöht. Seitdem TBT derart verbreitet zum Einsatz gekommen ist, ist bekannt, dass TBT erheblichen Einfluss auf unsere Umwelt nimmt. Es kann direkt von den Anstrichen ins Wasser gelangen. So resultierte der weit verbreitete Einsatz in einer hohen Kontamination von Häfen und Küstenregionen. Diese Form der Freisetzung stellt den Hauptweg dar, über den TBT ins Aquasystem gelangt (Fent, 1996). Bedingt durch den hauptsächlichlichen Einsatz im Schiffbau schädigt die Belastung so vor allem im Wasser lebende Organismen.

Ein Anwendungsverbot für TBT in Schiffsanstrichen für Schiffe unter 25 m Länge, das seit 1989 besteht, konnte bis 1995 keine signifikante Abnahme der TBT-Konzentration an der deutschen Nord- und Ostseeküste bewirken (Schulte-Oehlmann, 2000).

In der Europäischen Union wurden im Jahr 2002 etwa 1300 Tonnen TBT in Schiffslacken verwendet (Trittin, 2002).

Heute ist der Einsatz von TBT in Schiffsanstrichen verboten. Nach dem Aufruf der Internationalen Schifffahrtsorganisation (IMO), bis zum 01. Januar 2003 das Auftragen von zinnorganischen Verbindungen als Antifoulingmittel weltweit zu verbieten, folgte die Kommission der Europäischen Union diesem Vorschlag. In Deutschland wurde die EU-Richtlinie durch das Bundeskabinett zum Januar 2003 umgesetzt (Trittin, 2002).

Nichtsdestotrotz bilden Organozinnverbindungen weiterhin eine Gefahr für unsere Umwelt. TBT und seine Abbauprodukte werden über Jahre in marinen Sedimenten verbleiben.

Trotz des Verbots ist wohl nicht auszuschließen, dass TBT weiterhin für Schiffsanstriche verwendet wird.

Nicht nur der Einsatz von TBT als Bestandteil von Antifoulinganstrichen gefährdet die Umwelt. Greenpeace konnte das Gift auch in Fußballtrikots, PVC-Bodenbelägen, Babywindeln und zahlreichen Badeartikeln nachweisen (Greenpeace Presseerklärung, 29.8.00). Im Februar 2002 entdeckte die Zeitschrift ÖKO-TEST TBT in Eurobanknoten.

Die toxischen Wirkungen von TBT machen es für den Einsatz als Biozid so interessant und betreffen vor allem Meereslebewesen.

In tierexperimentellen Kurz- und Langzeit-Untersuchungen sind verschiedene Wirkungen von TBT-Verbindungen beschrieben worden. Diese betreffen die Leber, das hämatologische und das endokrinologische System.

Es konnte beobachtet werden, dass schon geringe Konzentrationen eine immunotoxische Wirkung bei Fischen, Säugetieren und Menschen zeigen. So bewirkt die Verabreichung von 20 mg TBT pro kg Körpergewicht bei Ratten eine Atrophie des Thymus und einen Lymphozytenmangel (Vos et al., 1984). Eine länger andauernde Exposition über Jahre führte zur Suppression der unspezifischen Immunreaktion der cytotoxischen Makrophagen und natürlichen Killerzellen bei Ratten. Durch eine zwei Jahre andauernde Fütterung von 5 ppm TBT-oxid wurde eine Immunotoxizität, durch die Gabe von 50 ppm wurde das Auftreten endokriner Tumoren bewirkt (Boyer, 1989; Wester et al., 1990).

Die Auswirkungen der Exposition mit nur 2 ng/l TBT auf Muscheln bestehen in einer verminderten Eiablage, Schalendeformation und der Schädigung der Larven (Batley et al., 1992); in den 80er Jahren führte dies zu einem massiven Austernsterben in den USA.

Eine besondere Wirkung besitzt TBT auf bestimmte Meeresschnecken. Etwa die Wattschnecke und Strandschnecke werden in ihrer Populationsdichte durch subletale Konzentrationen von TBT gestört. Diese Wirkung ist bedingt durch die Induktion von sogenanntem Impossex (imposition of male sex characters onto the female) (Smith, 1981). Dieser Begriff beschreibt einen Pseudohermaphroditismus mit Ausbildung von männlichen Geschlechtsorganen in weiblichen Organismen, der bis zur Sterilität des Tieres führen kann. TBT hat durch die Induktion dieser Veränderungen erheblichen negativen Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit der Schnecken.

Trimethylzinn (TMT) entsteht als ein Nebenprodukt bei der Synthese anderer Organozinnverbindungen, die in Industrie und Landwirtschaft eingesetzt werden. Heute dient es wegen seiner Neurotoxizität als Modellsubstanz in der Erforschung neurologischer Krankheiten und deren Therapie.

TMT wirkt vor allem neurotoxisch und bewirkt eine Neurodegeneration im limbischen System; die vulnerabelste Struktur stellt der Hippocampus dar.

Die chronische oder akute Exposition mit TMT in Säugetieren führt zu Übererregbarkeit, Tremor und Aggressivität. Begleitend zu den neurotoxischen Symptomen ist die Ausbildung eines schweren Hirnödems (Fortemps et al., 1978; Dyer, 1982) sowie eine signifikante Reduktion des Hirngewichts (O'Callaghan et Miller, 1989) beschrieben worden.

Im menschlichen Organismus wirkt TMT, wie durch zahlreiche Fälle von oraler oder inhalativer Aufnahme beschrieben, toxisch und führt zu Gedächtnisstörungen, Ataxie, Aggression sowie zu komplexen partiellen aber auch tonisch-klonischen Anfällen (Besser et al., 1987).

In vitro führt TMT zu einer neuronalen Degeneration (Thompson et al., 1996; Gunasekar et al., 2001 b) und einer Aktivierung der Glia (Figiel et Fiedorowicz, 2002).

Obwohl die Toxizität der verschiedenen Organozinnverbindungen in vivo inzwischen sehr gut untersucht ist und aus diesem Wissen auch Konsequenzen gezogen wurden, liegen die genauen Wirkmechanismen auf zellulärer Ebene noch vielfach im Dunkeln. Deshalb liegt es im Interesse wissenschaftlicher Arbeiten, die genauen Angriffspunkte der verschiedenen Verbindungen aufzudecken.

Beide Verbindungen zeigen bereits in vivo klare Unterschiede in der Wirkung, für die es bislang keine Erklärung gibt. Um den Wirkungsmechanismus der Organozinnverbindung zu verstehen, wurden in der Vergangenheit zahlreiche In-vitro-Versuche durchgeführt. Unter anderem wurde die Wirkung der Verbindungen an C6 Gliomazellen getestet (Seibert et al., 2004). Ein Vergleich von TBT und TMT zeigte interessante Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit und auch der Zeitabhängigkeit der Toxizität.

Diese Arbeit schließt an diese Versuche an und möchte die Unterschiede der Zytotoxizität der Verbindungen TBT und TMT genauer charakterisieren und Ursachen für diese finden.

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, welche Unterschiede in der Toxizität zwischen TBT und TMT bestehen und welche Mechanismen für diese Unterschiede verantwortlich gemacht werden können. Nachdem Seibert et al. (2004) gezeigt hatten, dass eine TBT Exposition in C6 Gliomazellen eine konzentrationsabhängige Toxizität bewirkte, die sich von TMT deutlich unterschied, war es zunächst nötig, diese Unterschiede klarer zu klassifizieren. Zu Beginn der Versuche sollte die Frage geklärt werden:

1) Welche Unterschiede in der Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Aktivität lassen sich zwischen TBT und TMT finden?

Ebenfalls in früheren Versuchen aufgefallen waren Unterschiede in der Zeitabhängigkeit der Wirkung (Seibert et al., 2004; Karpiak et Eyer, 1999). So ist bekannt, dass TMT eine

verzögerte Toxizität erzeugt. Auch dieser Unterschied zu TBT sollte deshalb charakterisiert werden und damit in einem weiteren Schritt geklärt werden:

2) Welche Unterschiede zwischen den Verbindungen stellen sich bei Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Wirkung heraus?

Nach genauerer Darstellung der Unterschiede zwischen beiden Verbindungen sollte in einem weiteren Schritt nach den Ursachen dieser Unterschiede gesucht werden. Die Wirkmechanismen von TBT und TMT sind noch immer unklar. In ihnen sind die Ursachen für die Unterschiede in der Toxizität beider Verbindungen zu suchen.

Als zwei sich grundsätzlich unterscheidende Formen eines Zelltods gelten Apoptose und Nekrose. Die Apoptose stellt den so genannten programmierten Zelltod dar. Diese auch physiologisch vorkommende Verlaufsform unterscheidet sich durch einen geregelten und die umgebenden Zellen schonenden Ablauf von der Nekrose, die akzidentiell auftritt und das Gewebe schädigt. Auch durch die Exposition mit toxischen Verbindungen kann in Zellen ein apoptotischer Zelltod erzeugt werden. Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Induktion von Apoptose durch Organozinnverbindungen.

Nach Charakterisierung der Unterschiede in der Toxizität von TBT und TMT sollte deshalb in einem weiteren Schritt geklärt werden, ob in C6 Gliomazellen die Induktion der beiden Verlaufsformen eines Zelltods, Apoptose und Nekrose, für die Unterschiede verantwortlich gemacht werden können. Eine weitere Frage warf sich auf:

3) Welche Mechanismen auf zellulärer Ebene bilden die Ursache für die Unterschiede in der Toxizität von TBT und TMT, insbesondere im Hinblick auf die verschiedenen Möglichkeiten des Zelltods: Nekrose und Apoptose? Und genauer:

a) Erzeugt TBT eventuell eher einen nekrotischen als einen apoptotischen Zelltod?

b) Erzeugt TMT eventuell eher einen apoptotischen als einen nekrotischen Zelltod?

Ein Zelltod, sei es apoptotischer oder nekrotischer, kann unterschiedlich ausgelöst werden. Besonders die Induktion von Apoptose wurde in der Vergangenheit oft mit der vorausgehenden Bildung von oxidativem Stress in exponierten Zellen in Zusammenhang gebracht (Wang et al., 2009; Payne et al., 1995).

Nach Zuordnung der verschiedenen Verlaufsformen des Zelltods zu beiden Verbindungen bestand deshalb in einem weiteren Schritt das Bedürfnis, zu klären, welche Mechanismen dem Zelltod vorangehen und ob eine Beteiligung von oxidativem Stress in der Induktion des Zelltods vorliegt:

4) Welche biochemischen Mechanismen führen zu diesem Zelltod, insbesondere: Führen Organozinnverbindungen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies?

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 C6 Zellen

Die Wirkung der Organozinnverbindungen wurde an C6 Gliomazellen untersucht. Die Gliomzelllinie C6 wurde aus einem primären Rattenhirntumor, der durch N-nitrosomethylharnstoff induziert wurde, von Benda et al. (1968) etabliert. Die C6 Zellen wurden am 12.10.1999 in der 37. Passage von der American Type Culture Collection (ATCC: CCL 107) bezogen, dreimal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden Zellen der Passage 45 bis 61 verwendet.

2.1.2 Materialien

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit 4,5 g Glucose/l, ohne Pyruvat, mit Phenolrot	(c.c.pro: PM-13-S)
DMEM ohne Glucose, ohne Pyruvat, ohne Phenolrot	(PAN Biotech:P03-00101)
FCS (Fötales Rinderserum)	(BIOCHROM:S0115)
Hepes Puffersubstanz	(Merck)
Glutamin (200 mM)	(c.c.pro:Z-10-M)
Gentamycin (10 mg/ml)	(Gibco)
Fungizone (Amphotericin B 250 µg/ml)	(Gibco)
D(+)-Glukose	(Merck)
Trypsin-EDTA-Lösung (1)	(Gibco)
Trypsin, TrypLE™ Express, (rekombinant) (2)	(Gibco)
PBS Puffer (Zusammensetzung s. 2.1.4)	
25 cm ² Kulturflaschen	(Sarstedt)
96-Well-Mikrotiterplatten	(Falcon)
96-Well-Mikrotiterplatten, schwarz mit klarem Boden	(Corning)
100 mm Kulturschalen	(Sarstedt)
35 mm Kulturschalen	(Sarstedt)

2.1.3 Kulturmedien

Medien für die Erhaltungskulturen (Erhaltungsmedium):

Das DMEM Basismedium (mit Phenolrot) wurde in ultra pure H₂O angesetzt und mit NaHCO₃ (3,7 g/l) sowie Hepes (4,766 g/l) versehen.

Zusammensetzung des Erhaltungsmediums:	DMEM	93,5% (v/v)
	FCS	5 % (v/v)
	Gentamycin	1 % (v/v)
	Fungizone	0,5% (v/v)

Medien für die Versuche:

Wachstumsmedien: Zur Kultivierung der Zellen unter Versuchsbedingungen wurde ebenfalls das DMEM Medium mit Phenolrot, ohne Pyruvat und mit FCS verwendet (Zusammensetzung s.o.).

Lediglich für die Versuche zur fluorimetrischen Messung reaktiver Sauerstoffspezies wurde die phenolrotfreie Variante dieses Mediums verwendet. Bei der Herstellung dieses Mediums wurden neben NaHCO₃ (3,7 g/l) und Hepes (4,766 g/l) dem DMEM Basismedium noch Glutamin (20 ml/l) sowie Glukose (4,5 g/l) hinzugefügt. Die weitere Zusammensetzung entspricht der oben erwähnten.

Versuchsmedien: Für die Exposition der Zellen mit den zu untersuchenden Konzentrationen der Organozinnverbindungen wurden ebenfalls diese beiden Medien verwendet. Da jedoch ein weiteres Wachstum der Zellen während des Versuchs verhindert werden sollte, wurde auf die Zugabe von Serum verzichtet.

Zusammensetzung der Versuchsmedien:	DMEM	98,5% (v/v)
	a) mit Phenolrot	
	b) ohne Phenolrot	
	Gentamycin	1 % (v/v)
	Fungizone	0,5% (v/v)

Medium a) wurde verwendet zur Untersuchung der konzentrations- und zeitabhängigen Zytotoxizität mittels **Bestimmung der Proteinmengen bzw. des MTT-Assays**.

Medium b) wurde verwendet zur Untersuchung der konzentrations- und zeitabhängigen Zytotoxizität mittels **modifiziertem MTT-Assay**, zur **fluorimetrischen Messung** der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, zur Messung von **Lipidperoxidation** sowie in 100 mm Schalen mit nachfolgender Aufbereitung zur Beurteilung der **Kernmorphologie/ Durchführung des Caspase-Assays/ Durchführung einer Proteinbestimmung**.

2.1.4 Lösungen

PBS Puffer (Phosphate buffered saline nach Dulbecco):

NaCl	8000 mg/l
KCL	200 mg/l
Na ₂ HPO ₄	1150 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l

Der pH-Wert aller Medien und Lösungen betrug 7,4. Vor Gebrauch wurden sie im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

2.1.5 Kultivierung

Die Erhaltungskulturen wurden in 25 cm² Flaschen bei 37°C im Begasungsschrank (10% CO₂) kultiviert und einmal wöchentlich passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen zunächst mit 5 ml PBS gespült. Dann wurde für ca. 35 Sekunden Trypsin EDTA Lösung (1:10 mit PBS verdünnt) hinzugefügt. Im Verlauf der Laborarbeiten wurde diese Lösung durch eine schonendere, rekombinant hergestellte Lösung ersetzt (TrypLE™ Express). Diese wurde unverdünnt für ca. 1 Minute hinzugefügt (ebenfalls 5 ml). Nach Absaugen des Trypsins wurden die Kulturflaschen in den Brutschrank gestellt und ein Ablösen des Zellrasens vom Boden (ca. 10 min) abgewartet. Jede Kulturflasche erhielt anschließend 5 ml serumhaltiges Versuchsmedium und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren wurde eine

homogene Zellsuspension erzeugt. Diese wurde in ein auf Eis liegendes Röhrchen überführt.

Vor Aussaat in die Kulturflaschen für neue Erhaltungskulturen sowie in die 96-Well-Platten/ 100 mm /35 mm Schalen für die Versuchskulturen wurden die in serumhaltigem Versuchsmedium suspendierten Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Thoma Zählkammer ausgezählt. Die durch Trypanblaufärbung kenntlich gemachten toten Zellen gingen nicht in die Zählung ein. Durch Verdünnen der Zellsuspension mit der entsprechenden Menge an serumhaltigem Wachstumsmedium wurde die gewünschte Zellkonzentration für Erhaltungskultur bzw. Versuchskulturen hergestellt.

Jede neue Erhaltungskultur erhielt eine an die differierenden Wachstumsgeschwindigkeiten der einzelnen Passagen angepasste Menge an Zellen (50.000 bis 500.000) in 7 ml Erhaltungsmedium. Am 2. und 4. Kulturtag wurde das Medium durch 7 ml frisches Medium ersetzt.

2.2 Testsubstanzen

Die Wirkung folgender Substanzen wurde untersucht:

Tributylzinnchlorid (TBT)	(Merck)
Trimethylzinnchlorid (TMT)	(Merck)

Beide Substanzen wurden lichtgeschützt bei Zimmertemperatur gelagert. Vor Versuchsbeginn wurden die Organozinnverbindungen in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) gelöst. Es wurden Stammlösungen von 30 mM (TBT) bzw. 10.000 mM (TMT) hergestellt. Von diesen ausgehend wurden durch Verdünnung geringere Konzentrationen erzeugt. Diese wurden so gewählt, dass eine weitere Lösung im verwendeten Versuchsmedium die letztlich gewünschten zu untersuchenden Substanzkonzentrationen ergab.

Die Versuchsmedien mit den entsprechenden Substanzen wurden am Versuchstag frisch angesetzt.

TBT wurde in Konzentrationen von 0,01 – 10 µM, TMT in Konzentrationen von 0,1 – 10.000 µM untersucht.

2.3 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden mit Kulturen wachstumsgehemmter C6 Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten bzw. in 100 mm und 35 mm Kulturschalen durchgeführt. Zur Hemmung des Wachstums während der Exposition mit den Organozinnverbindungen wurden die Zellen in serumfreiem Versuchsmedium kultiviert.

2.3.1 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen

Am 1. Tag wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen ausgesät. Die inneren Wells (s. Abb. 2.1) erhielten 40 000 Zellen in 200 µl serumhaltigem Versuchsmedium.

Die äußeren Wells wurden freigelassen; zwei Randreihen einer jeden Plattenseite waren für die später bei der Proteinmengenbestimmung notwendigen Standards vorgesehen.

Auch für die Platten, deren Zellen später mit dem MTT-Test auf Vitalität untersucht werden sollten, wurde diese Belegung der Platte gewählt.

Am 2. Tag erfolgte die Exposition. Vor der Behandlung wurden die Zellen aller Platten durch das Mikroskop betrachtet, um sicher zu gehen, dass sie gleichmäßig gewachsen und nicht kontaminiert waren. Das serumhaltige Medium wurde abgesaugt und die gesamte Mikrotiterplatte zweimal mit serumfreiem Versuchsmedium gespült, um das FCS restlos zu entfernen. Jedes Well erhielt anschließend 200 µl serumfreies Versuchsmedium mit der entsprechenden Konzentration der Organozinnverbindungen. Für den modifizierten MTT-Assay wurde sowohl serum- als auch phenolrotfreies Versuchsmedium verwendet. Die Lösungen der Testsubstanzen wurden an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

Am 3. Tag, bzw. für eine Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung der verschiedenen Organozinnkonzentrationen nach Ablauf einer festgesetzten Stundenzahl wurden die Mikrotiterplatten nach Ende der Exposition aus dem Brutschrank geholt und die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Anschließend wurde der Zellproteingehalt der Wells bzw. die Vitalität der Zellen mittels MTT-Assay bestimmt.

2.3.1.1 Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität

Sowohl für Tributylzinnchlorid als auch für Trimethylzinnchlorid wurde die Konzentrationsabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung gemessen. Pro Mikrotiterplatte wurden sechs verschiedene Konzentrationen der Organozinnverbindungen untersucht (s.

Abb. 2.1). Die Zellen der Kontrollgruppe erhielten serumfreies Versuchsmedium ohne Organozinnverbindung, jedoch mit einer im Volumen der Organozinnlösung (in DMSO) in den vergifteten Wells entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO (0,2%).

Die Kulturen wurden für 24 Stunden im Begasungsbrutschrank (10% CO₂, 37°C) inkubiert. Anschließend wurden die Zellproteinmengen pro well bestimmt bzw. der MTT-Assay durchgeführt.

2.3.1.2 Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität

In den Versuchen zur zytotoxischen Wirkung der Organozinnverbindungen über die Zeit wurden die Mikrotiterplatten in gleicher Weise wie oben beschrieben mit den jeweiligen Konzentrationen der Testsubstanzen versehen. Entsprechend der verschiedenen Einwirkungszeiten, die untersucht werden sollten, wurden mehrere Mikrotiterplatten gleichzeitig behandelt.

Die Beendigung der Exposition erfolgte nach 1, 2, 4, 24, 48 und 72 Stunden.

Die Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung wurde mit dem MTT-Assay untersucht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	S03									S03	Blk	A
B	Blk	S03									S03	Blk	B
C	Blk	S04	Kontrolle	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	Kontrolle	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	S04	Blk	C
D	Blk	S04									S04	Blk	D
E	S01	S05									S05	S01	E
F	S01	S05									S05	S01	F
G	S02	S06									S06	S02	G
H	S02	S06									S06	S02	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abb. 2.1: Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte, wie sie für die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit sowie der Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität der Organozinnverbindungen mit Hilfe der Proteinmengenbestimmung bzw. des MTT-Tests eingesetzt wurde

Blk (Blank): 0,5 N NaOH; S01 – S06: Proteinstandards

2.3.1.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies durch fluorimetrische Messung mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat

Materialien und Lösungen:

96-Well-Mikrotiterplatten, schwarz mit transparentem Boden (Corning)

Hanks-Puffer:	185 mg/l	CaCl ₂ x 2 H ₂ O
	400 mg/l	KCL
	60 mg/l	KH ₂ PO ₄
	100 mg/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O
	100 mg/l	MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	8000 mg/l	NaCl
	350 mg/l	NaHCO ₃
	48 mg/l	Na ₂ HPO ₄
	1000 mg/l	Glukose

2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (Sigma)

Cumolhydroperoxid (88%, Sigma)

Lösungsmittel: DMSO (Merck)

Für die Messung von oxidativem Stress mit Hilfe des Fluorimeters „Tecan GENIOS pro“ (Firma Tecan) und dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat wurden sterile, schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit flachem durchsichtigem Boden ausgewählt (mit zellbindender Oberfläche). Schwarze Mikrotiterplatten wurden verwendet, um Störungen durch die benachbarten Wells während der Messung zu vermeiden.

Am 1. Tag wurden 40.000 Zellen/Well in phenolrotfreiem Wachstumsmedium (serumhaltig) ausgesät. Die äußeren Wells wurden frei gelassen (s. Abb. 2.2)

Am zweiten Tag wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte zunächst zweimal mit 150 µl Hanks-Puffer gespült. Eine 10 µM DCF-DA-Lösung in Hanks-Puffer wurde hergestellt, indem zunächst das pulverförmige und lichtempfindliche DCF-DA unter lichtgeschützten Bedingungen in DMSO zu einer 5 mM Lösung aufgelöst und anschließend diese Lösung in Hanks-Puffer gebracht wurde, sodass die gewünschte Konzentration von 10 µM erreicht wurde. Diese Lösung wurde auf 37°C aufgewärmt. Nach Absaugen des Hanks-Puffers konnten anschließend 150 µl der DCF-DA-Lösung auf die Zellen gegeben werden. Da die Substanz lichtempfindlich ist, musste hierfür und im weiteren Verlauf des Versuchs auf eine

weitgehende Abdunkelung des Raumes geachtet werden. Die Platte wurden dann für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Während dessen konnten die Zellen das DCF-DA aufnehmen.

Danach wurden die Wells jeweils zweimal mit 150 µl Hanks-Puffer gespült und die Zellen mit je 150 µl/Well mit den zu untersuchenden Konzentrationen der Organozinnverbindungen in Hanks-Puffer versehen.

Es wurden je 7 verschiedene Konzentrationen untersucht, wobei eine Reihe eine Konzentration enthielt. Eine weitere Reihe (Reihe 10) wurde mit 150 µl einer 500 µM Cumolhydroperoxide (CHP)-Lösung versehen. CHP diente hierbei als Positivkontrolle, da es in mehreren Vorversuchen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und somit zu einem fluorimetrischem Signal in der Messung geführt hatte. Die Reihen 2 und 11 erhielten lediglich Hanks Puffer mit dem Lösungsmittel DMSO und dienten damit als Kontrollgruppen.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk											Blk	A
B	Blk											Blk	B
C	Blk											Blk	C
D	Blk	Kontrolle	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	TBT/TMT	CHP	Kontrolle	Blk	D
E	Blk											Blk	E
F	Blk											Blk	F
G	Blk											Blk	G
H	Blk											Blk	H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abb. 2.2: Belegung der 96-Well-Mikrotiterplatte, wie sie für den Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies durch fluorimetrische Messung mit 2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat eingesetzt wurde

Blk (Blank): Hanks-Puffer

2.3.2 100 mm Kulturschalen

Am 1. Tag wurden die Zellen in 100 mm Kulturschalen ausgesät. Sie erhielten pro Schale jeweils 1×10^6 Zellen in 10 ml serumhaltigem Versuchsmedium.

Am 2. und 4. Kulturtag wurde das Medium durch 10 ml frisches Medium ersetzt.

Am 6. Tag erfolgte die Exposition. Vor der Behandlung wurden die Zellen durch das Mikroskop betrachtet, um sicher zu gehen, dass sie gleichmäßig gewachsen und nicht kontaminiert waren. Das serumhaltige Medium wurde abgesaugt und alle Kulturschalen zweimal mit serum- sowie phenolrotfreiem Versuchsmedium gespült, um das FCS gründlich zu entfernen.

Jede Schale erhielt anschließend 8 ml serum- und phenolrotfreies Versuchsmedium mit der entsprechenden Konzentration an TBT bzw. TMT. Die Lösungen der Verbindungen wurden an jedem Versuchstag frisch angesetzt.

Am 7. Tag, bzw. zur Untersuchung der zeitabhängigen Wirkung der verschiedenen Organozinnkonzentrationen nach Ablauf einer festgesetzten Stundenzahl wurden die Kulturschalen nach Ende der Exposition aus dem Brutschrank geholt und die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt. Anschließend wurden sie so aufbereitet, dass die floureszenzmikroskopische Beurteilung der Kernmorphologie, die Messung der Caspase 3-Aktivität und die Bestimmung des Zellproteingehalts in den Schalen folgen konnten.

2.3.2.1 Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität

Es wurden immer 4 Schalen gleichzeitig behandelt, wobei jeweils 1 Schale als Kontrollschale diente und die übrigen 3 mit den zu untersuchenden Organozinnverbindungen versehen wurden. Die Kontrollschale enthielt lediglich serum-/phenolrotfreies Versuchsmedium mit dem als Lösungsmittel im Versuch verwendeten DMSO. Zur Untersuchung der konzentrationsabhängigen Zytotoxizität wurde die Exposition nach 24h Inkubationszeit beendet. Es folgte die Aufbereitung der einzelnen Schalen.

2.3.2.2 Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität

Um einen Eindruck von dem zeitlichen Verlauf der Wirkungen der Organozinnverbindungen zu erlangen, wurden, wie auch bei den Versuchen in den 96-Well-Mikrotiterplatten, Messungen nach unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Hierzu wurde jeweils 1 Schale als Kontrollschale behandelt und direkt nach Behandlung aller Schalen zur Stunde 0 aufbereitet,

um einen Bezugswert für die folgenden, zu verschiedenen Zeiten aufbereiteten Schalen zu erhalten.

Es wurden für jeden untersuchten Zeitabschnitt 2 Schalen behandelt, wobei eine Schale die Zellen enthielt, die mit der zu untersuchenden Konzentration der Organozinnverbindung behandelt wurden, während die andere Schale als dazugehörige Kontrolle unbehandelte Zellen enthielt.

So wurde für jede Organozinnverbindung die Wirkung einer Konzentration über die Zeit jeweils gepaart mit einer Kontrollschale untersucht.

Für TBT erfolgte eine Beendigung der Exposition nach: **1, 2, 4, 6 und 24 Stunden**

Für TMT erfolgte eine Beendigung der Exposition nach: **6, 24 und 48 Stunden**

2.3.2.3 Aufbereitung der Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Beurteilung der Kernmorphologie, Messung der Caspase 3-Aktivität und der Bestimmung des Zellproteingehalts

Materialien und Lösungen: 50 ml Röhrchen (Sarstedt)

Trypsin (1 & 2 siehe 2.1.2)

DMEM, serumfrei, ohne Phenolrot

DMEM, serumhaltig, ohne Phenolrot

Hanks-Puffer (Zusammensetzung s. 2.3.1.3)

PBS-Puffer

Lysispuffer (s. 2.4.4, 1:5 verdünnt mit ultra pure H₂O)

NaOH (0,5 N)

Die Materialien und Lösungen, die zur Vorbereitung der Proben für den später folgenden Caspase 3-Assay dienen, d.h. PBS- und Lysispuffer, wurden stets auf Eis gelagert. Medien und Hankspuffer wurden vor der Aufbereitung aus dem 4°C temperierten Kühlschrank genommen und während des Verfahrens bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das verwendete Trypsin wurde vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C gebracht.

Nach Ablauf der festgesetzten Expositionszeit wurden die Schalen dem Kulturschrank entnommen. Handelte es sich um einen Versuchsaufbau, bei dem die zeitabhängige Wirkung der Organozinnverbindung untersucht wurde und jeweils zu einer Schale behandelte Zellen eine Kontrollschale zu untersuchen war, so wurden diese beiden Schalen gleichzeitig aufbereitet. Bei mehr als zwei Schalen zu einer Zeit, wie sie bei der Untersuchung der konzentrationsabhängigen Wirkung vorlagen, mussten die Schalen hintereinander aufbereitet werden.

Zunächst mussten die Zellen aus den Schalen abgelöst werden. Ziel hierbei war, alle Zellen, d.h. sowohl die angehefteten als auch die bereits abgelösten Zellen aus der Schale zu entfernen und in ein 50 ml Röhrchen zu überführen.

Dazu wurde der in den Schalen befindliche Überstand von 8 ml serum- und phenolrotfreiem Versuchsmedium, der neben den verwendeten Versuchssubstanzen auch etwaige vom Schalenboden abgelöste Zellen enthielt, in ein 50 ml Plastikröhrchen pipettiert.

Dann wurden auf den verbleibenden Zellrasen 6 ml Trypsinlösung pipettiert. (Analog zum Einsatz des Trypsins beim Passagieren der Zellen für die Erhaltungskulturen wurde auch in diesen Versuchen ein zunächst verwendetes Trypsin im Verlauf der Laborarbeiten durch ein schonenderes, rekombinant hergestelltes, ersetzt. Es zeigten sich in Probeversuchen nach dieser Veränderung keine Unterschiede in den Versuchsergebnissen.) Unter leicht kreisenden Bewegungen wurde 5 Minuten lang die makroskopisch meist deutlich sichtbare Ablösung des Zellrasens vom Schalenuntergrund abgewartet. Anschließend wurde die Wirkung des Trypsins durch Zugabe von 6 ml serumhaltigem phenolrotfreiem Versuchsmedium gestoppt.

Im Anschluss daran wurden die nunmehr im Überstand befindlichen Zellen in das 50 ml Röhrchen überführt. Die Schale wurde mehrfach mit serum- und phenolrotfreiem Versuchsmedium befüllt, welches die letzten verbleibenden Zellen vom Schalenboden löste und dann in die Zellsuspension überführte. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das 50 ml Röhrchen mit eben dieser Menge Flüssigkeit gefüllt war.

Anschließend wurden die Röhrchen bei 4300 x g für 10 Minuten in der auf 5°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert.

Nach dem Herausnehmen der Röhrchen aus der Zentrifuge war ein Zellpellet erkennbar, das nach Abgießen des Überstandes im Röhrchen verblieb.

Durch die Zugabe von 700 µl Hanks-Puffer und anschließendes vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen in Lösung gebracht.

Es erfolgte die Verteilung der homogenen Zellsuspension in die für die im weiteren Verlauf folgenden Messmethoden vorbereiteten Eppendorfhütchen und zwar aus der Zellsuspension einer Schale je:

- 2x 25 µl für die Proteinmengenbestimmung
- 500 µl zur Bestimmung der Caspase 3-Aktivität
- 100 µl zur Anfärbung und anschließenden morphologischen Betrachtung

Die Proben für die Proteinmengenbestimmung wurden nach Zugabe von 1175 µl NaOH für eine spätere Bestimmung bei – 18°C eingefroren.

Die 500 µl Zellsuspension für die Caspase 3-Aktivitätsbestimmung wurde bei 4°C für 5 Minuten und 2000 x g zentrifugiert (Heraeus fresco 21). Danach wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µl eiskaltem PBS Puffer gewaschen und erneut 5 Minuten zentrifugiert. Nach restloser Entfernung des Puffers wurden nun 250 µl Lysispuffer zum Pellet gegeben und alle Zellen durch kräftiges Auf- und Abpipettieren in Lösung gebracht. Das Hütchen wurde danach für 30 Minuten auf Eis gelegt und nach Ablauf dieser Zeit bei 16.000 x g und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Hierdurch wurden die Zellbruchstücke aus dem Lysat entfernt, welches darauf als klarer Überstand erschien. Von diesem wurden 220 µl entnommen und in ein Cryoröhrchen überführt. Dieses wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 70°C aufbewahrt. Zu einem späteren Zeitpunkt konnte so die Messung der Caspase 3-Aktivität erfolgen.

2.3.3 35 mm Kulturschalen

Für die Versuche, die dazu dienten festzustellen, ob Organozinnverbindungen Lipidperoxidation bewirken, wurden die Zellen in 35 mm Schalen kultiviert. Dazu wurden am ersten Tag in 14 Schalen je 1×10^6 Zellen in 2 ml serumhaltigem DMEM mit Phenolrot ausgesät.

Am zweiten Tag erfolgte die Exposition der Zellen. Zunächst wurden die Schalen gründlich mit 2 ml serumfreiem DMEM ohne Phenolrot gespült, dann wurde 1 ml dieses Versuchsmediums mit der zu untersuchenden Testsubstanz hinzugegeben. Dabei wurden je zwei Schalen mit einer Konzentration behandelt. Zwei weitere Schalen dienten als Kontrollschalen und erhielten nur das serumfreie Versuchsmedium mit dem Lösungsmittel

DMSO. Wie in den Versuchen zum fluorimetrischen Nachweis freigesetzter reaktiver Sauerstoffspezies wurde auch hier als Positivkontrolle Cumolhydroperoxid (CHP) verwendet, welches für seine lipidperoxidierende Wirkung bekannt ist.

Je zwei Schalen wurden demnach behandelt mit:

Kontrolle (mit DMSO)

100 μ M TMT

1000 μ M TMT

1 μ M TBT

3 μ M TBT

100 μ M CHP

Die verbleibenden zwei Schalen wurden für eine Bestimmung der Proteinmengen verwendet. Hierfür wurden sie 3 x mit 1 ml PBS-Puffer (mit Magnesium/Calcium, Zusammensetzung siehe 2.4.1 Proteinbestimmung) gespült, mit 1 ml 0,5 N NaOH versehen und für 45 Minuten bei 37°C auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Das entstandene Lysat wurde in Eppendorfhütchen überführt und bei -18°C eingefroren. So konnte eine Proteinbestimmung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen.

Am dritten Tag, nach 24h Exposition, konnte das Ausmaß der Lipidperoxidation mit Hilfe der TBARS-Messung bestimmt werden.

2.4 Messmethoden

2.4.1 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die für Mikrotiterplatten modifizierte Methode nach Lowry et al. (1951) angewendet, die auf zwei Reaktionen beruht. Aminosäuren, d.h. im wesentlichen Tyrosin und Tryptophan und in geringerem Ausmaß Cystin, Cystein und Histidin, reduzieren Natriumwolframat und -molybdat, die bei dieser Methode in Form von Folin-Ciocalteus Phenolreagenz vorliegen, zu verschiedenen Formen mit charakteristischer blauer Farbe. Diese Reduktion wird durch eine zweite Reaktion erleichtert: In der Biuret-Reaktion

entstehen in Anwesenheit von Kupfersulfat und Peptiden oder Proteinen im alkalischen Milieu Komplexe zwischen Cu^{2+} und Peptidbindungen (Biuret-Komplex), die ebenfalls reduzierend auf Natriumwolframat und -molybdat wirken.

Die Extinktion der blauen Farbe wurde bei 630 nm im Mikrotiterplattenphotometer gemessen. Als Proteinstandard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet.

Materialien und Lösungen:

<u>PBS Puffer mit Calcium, Magnesium:</u>	NaCl	8000 mg/l
	KCl	200 mg/l
	Na_2HPO_4	1150 mg/l
	KH_2PO_4	200 mg/l
	$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	100 mg/l
	$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	132 mg/l

Biuretlösung: 48 Teile 4% Na_2CO_3 , 1 Teil 2% K-Na-Tartrat und 1 Teil 1% $\text{CuSO}_2 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck) frisch angesetzt am Messtag

Folinlösung: 1 Teil Folin-Reagenz (Merck) und 2 Teile ultra pure H_2O

Proteinstandards: Es wurden sechs verschiedene Standards verwendet, die aus Rinderserum-Albumin (BSA, Sigma), gelöst in 0,5 N NaOH, bestanden. Die Konzentration des höchsten Standards (S1) war 0,4 mg BSA/ml, die des niedrigsten (S6) 0.025 mg BSA/ml. Nach dem Ansetzen wurden die Standards portionsweise in Eppendorfhütchen pipettiert und tiefgefroren gelagert. Am Versuchstag wurde die benötigte Menge aufgetaut.

Die Proteinbestimmung wurde stets in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt. Je nachdem, ob der Proteingehalt direkt in 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen oder aus 100 mm/35 mm Kulturschalen bestimmt werden sollte, wurden die Wells unterschiedlich vorbereitet.

2.4.1.1 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen

Alle Wells wurden zu Beginn zweimal mit 200 μl /Well PBS Puffer mit Calcium und Magnesium gespült. Die Wells der Reihen 3-10 (s. Abb. 2.1) erhielten jeweils 60 μl 0,5 N

NaOH und wurden anschließend zur Zellsolubilisierung 45 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Nun wurden in die beiden äußeren, zellfreien Reihen je 60 µl/Well 0,5 N NaOH (Blindwerte, s. Abb. 2.1) und Proteinstandards pipettiert. Im Anschluss daran wurden 150 µl Biuret-Lösung in jedes Well gegeben und die Platte erneut für 10 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Zuletzt wurden 60 µl Folinlösung/Well hinzugefügt, gut durchmischt und die Platte für 20 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt. Daraufhin wurde im Mikrotiterplattenphotometer (BIO-TEK Elx800uv) die Extinktion der entstandenen blauen Farbe bei 630 nm gemessen. Aus den blindwertbereinigten Extinktionen der Proteinstandards wurde eine Eichgerade erstellt, die es ermöglichte, der gemessenen Extinktion eines Wells die entsprechende Proteinmenge in µg/Well zuzuordnen.

2.4.1.2 100 mm Kulturschalen

Die bei -18°C eingefrorenen Eppendorfhütchen, in denen 25 µl Zellsuspension aus den 100 mm Schalen in NaOH gelöst vorlag, wurden unter Schütteln ca. 45 Minuten aufgetaut. Pro behandelte Schale waren zwei Hütchen vorbereitet.

Eine Mikrotiterplatte wurde vorbereitet, indem die äußeren beiden Reihen mit je 60 µl/Well 0,5 N NaOH (Blindwerte) und Proteinstandards wie oben beschrieben befüllt wurden.

Anschließend wurden die Proteinproben in die frei verfügbaren übrigen Wells pipettiert. Es erfolgte eine Doppelbestimmung, sodass letztlich vier Wells den Inhalt einer behandelten 100 mm Schale repräsentierten.

Die Messung erfolgte wie zuvor beschrieben, das Messprotokoll wurde derart gestaltet, dass aus der gemessenen Extinktion auf den Proteingehalt in µg/100 mm Schale geschlossen wurde.

2.4.1.3 35 mm Kulturschalen

Die Bestimmung der Proteinmengen aus den Versuchen zur Messung der Lipidperoxidation, die später als Bezugswert für das TBARS-Signal dienten, erfolgte aus den bei -18°C eingefrorenen Eppendorfhütchen und wurde analog zu der aus den 100 mm Schalen durchgeführt.

2.4.2 MTT-Messung

Beim MTT-Test (Mosmann, 1983) handelt es sich um eine Vitalfärbung mit dem Tetrazoliumsalz MTT, das von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien der Zellen zum violetten Formazan reduziert und somit nur in lebenden Zellen umgesetzt wird. Damit stellt die Farbentwicklung einen photometrisch relativ einfach zu bestimmenden Parameter für den Anteil an lebenden Zellen einer Kultur dar. Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode ist an die von Hansen et al. (1989) entwickelte Methode angelehnt.

Materialien und Lösungen:

DMEM ohne Pyruvat, ohne Phenolrot (s. 2.1.3)

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) (Sigma)

DMF (Dimethylformamid) (Merck)

Essigsäure

1N HCl

SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz) (Merck)

MTT-Lösung:

Es wurden 5 mg MTT-Pulver pro 1 ml PBS Puffer gelöst und steril filtriert. Die Lösung wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt.

Solubilisierungslösung:

Zunächst wurden 50 % DMF und 80 % Essigsäurelösung in ultra pure H₂O hergestellt.

Für 100 ml Solubilisierungslösung wurden 20 g SDS in etwa 70 ml 50 % DMF gelöst, dann 2,5 ml 80 % Essigsäurelösung und 2,5 ml 1N HCl hinzugefügt und zuletzt mit 50 % DMF auf 100 ml aufgefüllt.

Beide Lösungen sowie das Versuchsmedium wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde zuerst zweimal mit 100 µl/Well Versuchsmedium gespült. Dann erhielt jedes Well 100 µl Medium und 25 µl MTT-Lösung. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Platte herausgenommen und die Farbentwicklung durch Zugabe von 100 µl

Solubilisierungslösung/Well gestoppt. Die Platte wurde für 5 Minuten auf den Shaker-Inkubator gestellt und anschließend erneut für 2 Stunden bei 37°C und 10 % CO₂ inkubiert. Vor der endgültigen Messung im Mikrotiterplattenphotometer wurde die Platte noch einmal für 5 Minuten auf dem Shaker-Inkubator geschüttelt und die Lösungen in den einzelnen Wells mit dem Plastikspatel umgerührt. Die Extinktion wurde bei 570 nm gemessen.

Im Verlauf der Versuche wurde eine modifizierte Methode angewendet. Hierzu wurde zu Beginn des Versuches auf ein Spülen der Mikrotiterplatten verzichtet. Die in diesem Fall mit 150 µl phenolrotfreiem DMEM-Kulturmedium gefüllten Wells wurden direkt mit 25 µl MTT-Lösung versehen. Anschließend wurden sie wie oben beschrieben behandelt, allerdings mit 75 µl statt 100 µl Solubilisierung versetzt.

2.4.3 Kernmorphologische Beurteilung

Zur Beurteilung der Kernmorphologie wurden die C6 Zellen mit zwei fluoreszierenden Kernfarbstoffen, Hoechst 33342 und Propidiumiodid, angefärbt. Daraufhin wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet und mit Hilfe einer Digitalkamera (Canon Powershot) fotografiert.

Materialien und Lösungen:

Hoechst 33342 (Sigma)

Propidiumiodid (Sigma)

ultra pure H₂O

Hanks-Puffer (Zusammensetzung s. 2.3.1.3)

Beide Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Pulver bezogen und in ultra pure H₂O zu einer Stammlösung von 1 mg/ml gelöst. Diese wurde in 100 µl Portionen abgefüllt und bei -18°C gelagert. Unmittelbar vor dem Versuch wurden die Stammlösungen in Hanks-Puffer erneut verdünnt. Dabei wurde so verfahren, dass in den letztlich anzufärbenden 100 µl Zellsuspension nach Zugabe von je 10 µl Farbstofflösung eine Endkonzentration von 5 µg/ml

Hoechst 33342 und 10 µg/ml Propidiumiodid erreicht wurde. Während aller Vorbereitungs- und Verdünnungsschritte sowie bei der anschließenden Anfärbung, wurden die Lösungen vor Licht geschützt.

Prinzip der Färbung:

Hoechst 33342 durchdringt als lipophiler Farbstoff die Zellmembran intakter Zellen und bindet vornehmlich an AT-reiche DNA-Regionen im Kern. Hoechst hat ein Anregungsmaximum bei 350 nm und ein Emissionsmaximum bei 460 nm. Der Zellkern intakter Zellen erscheint dadurch in einem hellen Blau.

Propidiumiodid durchdringt als ionisch aufgebauter Farbstoff nur die Zellmembran toter Zellen und bindet mit geringer bis keiner Sequenzpräferenz in einem stöchiometrischen Verhältnis von einem Farbstoffmolekül zu 4-5 Basenpaaren an die DNA. Außerdem bindet es schwach an RNA im Zytoplasma. Tote Kerne erscheinen daher in einem hellen Rot, RNA-reiche Regionen im Zytoplasma sind schwach dunkelrot gefärbt.

Tote und lebende nichtapoptotische Zellen zeichnen sich durch meist locker verteilt erscheinende Strukturen in ihrem Zellkern aus, welche ein Abbild der Verteilung des Chromatins darstellen, die sich je nach Zelltyp und Zellzyklusphase unterscheiden kann. Nekrotische Kerne sind oft im Vergleich zu Kernen lebender Zellen vergrößert.

Die Kerne apoptotischer Zellen, die eine intakte Zellmembran besitzen und somit als noch vital gelten müssen, zeigen ein hochkondensiertes Chromatin, welches gleichmäßig blau strahlt. Das Chromatin kann dabei halbmondförmig dicht am Zellkernrand angelagert sein oder als Gruppe kleiner hell leuchtender Kugeln erscheinen. Die Kerne apoptotischer Zellen sind oft kleiner als die unbeschädigter vitaler Zellen. Sie werden im Folgenden als „apoptotisch“ oder „frühapoptotisch“ bezeichnet (vgl. Duke, 2004).

Demgegenüber stehen die Kerne der Zellen, in denen die apoptotischen Vorgänge soweit abgelaufen sind, dass ihre Zellmembran geschädigt und damit durchlässig für Propidiumiodid geworden ist. Sie gelten somit als tot und können als „spätapoptotisch“ beschrieben werden. Das Chromatin dieser Zellen leuchtet durch das Eindringen des Farbstoffes in die Zelle hellrot, ist ebenfalls hochkondensiert und oft in mehrere Fragmente zerfallen. Abbildung 2.3 zeigt die typischen Verteilungsmuster des Chromatins im Zellkern, wie sie unter dem Fluoreszenzmikroskop zu beobachten sind.

Das Prinzip der Farbstoffe zu Grunde legend konnte somit eine Einteilung der Zellen nach ihrer Morphologie erfolgen.

Die Einteilungskriterien waren folglich:

Ist der Farbstoff Propidiumiodid ins Zellinnere eingedrungen? (Einteilung: tot/vital)

Zeigen die Kerne eine apoptotetypische Morphologie? (Einteilung: apoptotisch/nicht apopt.)

		Propidiumiodid eingedrungen ?	
		ja	nein
Apoptose- Zeichen ?	ja	spätapoptotisch	apoptotisch
	nein	nekrotisch	vital

Hieraus ergaben sich vier Gruppen, in die sich die Zellen einteilen ließen:

- 1) vitale Zellen
- 2) nekrotische Zellen
- 3) apoptotische Zellen
- 4) spätapoptotische Zellen

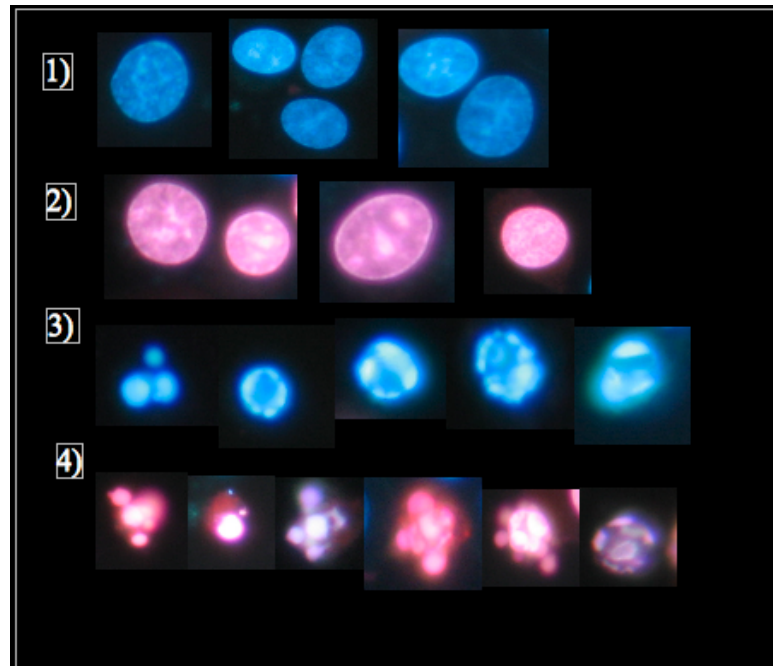


Abb. 2.3: Typische Morphologie durch Hoechst und Propidiumiodid angefärbter Zellkerne

1) Kerne vitaler Zellen; 2) Kerne nekrotischer Zellen; 3) Kerne apoptotischer Zellen; 4) Kerne sogenannter spätapoptotischer Zellen;

Die Gruppe der apoptotischen Zellen und die der spätapoptotischen Zellen stellen zusammen den Anteil der Gesamtapoptose. Eine weitere Gruppe wird durch die sogenannten „desintegrierten“ Zellen gebildet. Diese Gruppe lässt sich nach Bestimmung des Zellproteinverlustes bestimmen und beschreibt den Anteil der Populationen, der sich vom Schalenboden gelöst hat und sich damit der fotografischen Auswertung entzieht (s. 2.5.2.1).

Anfärben der Zellen und Beurteilung unter dem Mikroskop

Nach Aufbereitung der in den 100 mm Schalen behandelten Zellen und Erstellen einer Zellsuspension in Hanks-Puffer wurden 100 µl der Suspension für die Anfärbung bereitgestellt.

Diese wurden anschließend mit jeweils 10 µl Propidiumiodidlösung und Hoechstlösung gut gemischt und für mindestens zehn Minuten bei Raumtemperatur und unter Schutz vor Lichteinstrahlung inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit konnte die Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Es wurde die Filtereinstellung 1 (Filterset: G 365, FT 395; LP 420) und eine 40 fache Vergrößerung gewählt. Als Lichtquelle für die Anregungswellenlängen diente eine Quecksilberdampflampe. Fotografiert wurde im AV-Modus (aperture value), wobei die Kamera die Belichtungszeit automatisch vorgab.

Es erfolgte für jede Schale und somit für jede Konzentration die Aufnahme von 13 Fotos, deren Bildausschnitte zufällig gewählt wurden.

Anschließend wurden die auf den Fotos an Hand der angefärbten Zellkerne erkennbaren Zellen ausgezählt und nach Beurteilung ihrer Kernmorphologie in oben beschriebene Gruppen eingeteilt.

Nach Einteilung und Auszählung der Zellen wurden die prozentualen Anteile der Gruppen bezogen auf die Gesamtzellzahl errechnet.

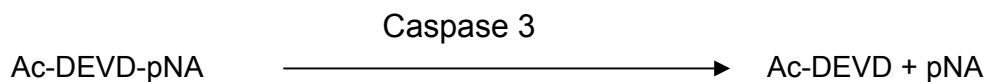
2.4.4 Caspase-Assay

Caspasen (Cysteine-requiring Aspartate proteases) sind eine Familie von Proteasen, die an der Vermittlung von Zelltod beteiligt und bedeutsam für den Prozess der Apoptose sind. Caspase 3 ist ein gut untersuchtes Mitglied dieser Familie und ein entscheidendes Enzym des apoptotischen Zelltods.

Die Aktivierung von Caspase 3 in Zellen gibt Hinweis auf einen apoptotischen Zelltod.

Für die Bestimmung wurde der colorimetrische Caspase 3-Assay (Sigma) verwendet.

Der Assay basiert auf der Hydrolyse des Substrates Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-Nitroanilin (Ac-DEVD-pNA) durch Caspase 3 und der folgenden Freisetzung von p-Nitroanilin (pNA). P-Nitroanilin hat eine hohe Absorption bei 405 nm, sodass die Freisetzung und damit die Caspase 3-Aktivierung, sowie die Aktivierung anderer Caspasen, die eine Substratspezifität für DEVD zeigen, in Zellen gut photometrisch nachzuweisen ist.



Materialien und Lösungen:

17 Megohm Wasser

Rinderserumalbumin (BSA 8022)

Caspas-3 Assay Kit (Sigma), beinhaltet:

Assaypuffer (200 mM Hepes (pH 7,4), 20 mM EDTA, 0,1 % Chaps, 50 mM DTT)

Substrat (Ac-DEVD-pNA)

Caspase 3-Positivkontrolle

Caspase 3-Inhibitor (Ac-DEVD-CHO)

Lysispuffer (250 mM Hepes (pH 7,4), 50 mM Chaps, 50 mM DTT)

p-Nitroaniline Standard

Der Assaypuffer liegt dabei zehnfach, der Lysispuffer fünffach konzentriert vor. Beide Puffer wurden portioniert und anschließend mit Stickstoff begast, da das enthaltende Dithiothreitol (DTT) an der Luft relativ instabil ist. Die Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

Der Lysispuffer wurde bereits zur Aufbereitung der Proben (s. 2.3.2.3), der Assaypuffer bei der eigentlichen Caspase 3-Bestimmung verwendet.

Unmittelbar vor der Verwendung wurden die Puffer mit Reinstwasser (17 Megohm) verdünnt.

Sowohl Substrat als auch Inhibitor wurden in DMSO gelöst und in kleinen Portionen bei -20°C gelagert. Vor der Bestimmung wurden die Stammlösungen mit Assaypuffer verdünnt: die Substrat-Stammlösung von 20 mM auf 2 mM, die Inhibitor-Stammlösung von 2 mM auf 200 μM .

Die lyophilisierte Caspase 3-Positivkontrolle wurde in ultra pure H_2O gelöst und in Portionen zu je 1,5 μl bei -70°C gelagert. Unmittelbar vor der Bestimmung wurde die Caspase 3-Positivkontrolle (100 $\mu\text{g/ml}$) mit Assaypuffer, der zusätzlich 1 mg/ml BSA enthielt, auf 5 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt.

Die Messung der Caspase 3-Aktivität erfolgte in 96-Well-Mikrotiterplatten. Das Endvolumen jedes Wells betrug 100 μl . Um zu überprüfen, ob freigesetztes und damit messbares p-NA tatsächlich durch die Spaltung des Substrats durch die Caspase 3-like-Proteasen und nicht durch andere Proteasen oder durch unspezifische Hydrolyse entstanden ist, gab es für jede Probe zusätzlich Kontrollwells, die die zu bestimmende Probe mit Inhibitor enthielten. Der in diesem Kit verwendete Inhibitor trägt zusätzlich zu der Tetrapeptidsequenz DEVD eine Aldehydgruppe, wodurch er reversibel an das aktive Zentrum der Caspase binden kann.

Das Gesamtvolumen von 100 μl in den Wells setzte sich wie folgt zusammen und wurde in folgender Reihenfolge pipettiert:

1. Assaypuffer 50 μl , bei Zusatz von Inhibitor 40 μl (Kontrollwells)
2. Zellysate 40 μl
3. Inhibitor 10 μl (Kontrollwells)
4. Substrat 10 μl

Zur Überprüfung der optimalen Assaybedingungen diente die Caspase 3-Positivkontrolle. Die Wells hierfür enthielten folgende Komponenten:

1. Assaypuffer 85 μl , bei Zusatz von Inhibitor 75 μl (Kontrollwells)

2. Caspase 3-Positivkontrolle 5 μ l
3. Inhibitor (Kontrollwells) 10 μ l
4. Substrat 10 μ l

Die Zugabe des Substrates startet die Reaktion, weshalb zunächst die verbleibenden Wells befüllt wurden. Die ersten beiden Wells der ersten Reihe wurden mit je 100 μ l Assaypuffer, als Blindwerte dienend, versehen. Die folgenden 10 Wells beinhalteten Standards. Hierzu wurde in DMSO gelöstes p-Nitroanilin (10.000 μ M) mit Hilfe einer Verdünnungsreihe so in Assaypuffer gelöst, dass Standards mit einer p-Nitroanilin-Konzentration von 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M, 20 μ M sowie 10 μ M vorlagen. Je zwei Wells erhielten 100 μ l eines Standards. Über die Messung dieser Standards kann mit Hilfe einer Eichgerade die Konzentration des p-NA bestimmt werden.

Die Reaktion wurde gestartet, indem in alle Wells, die Proben bzw. Positivkontrollen enthielten, 10 μ l der Substratlösung gegeben wurden. Die Platte wurde für 5 Minuten auf den Shaker-Inkubator gestellt.

Anschließend wurde die Platte für 3 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit konnte die Messung der Absorption des bei der Reaktion entstandenen p-NA bei 405 nm im Mikrotiterplattenphotometer erfolgen. Über die um den Blindwert bereinigte Eichgerade konnte die Caspaseaktivität bestimmt werden.

Die Menge an p-NA, die in den Positivkontrollen messbar war, lag stets in einem Bereich von 30 – 40 nmol p-NA pro well.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Blk	S04	P1	P1+I	P5	P5+I	P9	P9+I	P13	P1+I			A
B	Blk	S04	P1	P1+I	P5	P5+I	P9	P9+I	P13	P1+I			B
C	S01	S05	P2	P2+I	P6	P6+I	P10	P10+I	P14	P1+I			C
D	S01	S05	P2	P2+I	P6	P6+I	P10	P10+I	P14	P1+I			D
E	S02	C3	P3	P3+I	P7	P7+I	P11	P11+I	P15	P1+I			E
F	S02	C3	P3	P3+I	P7	P7+I	P11	P11+I	P15	P1+I			F
G	S03	C3+I	P4	P4+I	P8	P8+I	P12	P12+I	P16	P1+I			G
H	S03	C3+I	P4	P4+I	P8	P8+I	P12	P12+I	P16	P1+I			H
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

Abb. 2.4 Vorbereitung der Platte zur Messung der Caspase 3-Aktivität

Blk (Blank): 100 μ l Assaypuffer;

S01-S02: Standards; C3: Caspase 3-Positivkontrolle; P1-Px: Probe; +I: mit Zusatz von Inhibitor;

2.4.5 Messung mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat

Zum Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen wurde eine Messung mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) durchgeführt. DCF-DA kann Zellmembranen durchdringen und wird enzymatisch durch intrazelluläre Esterasen zu dem nicht fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCFH) hydrolysiert. In Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies wird das DCFH zu stark fluoreszierendem DCF oxidiert. Dies kann bei einer Anregungswellenlänge von ungefähr 525 nm fluorimetrisch gemessen werden.

Folglich dient diese Methode dazu, ein Maß für den zellulären ROS-Status der Zellen zu bekommen. Es wurde in dieser Arbeit eine Modifizierung der Methode nach Wang et al. (1999) und Invitrogen (2006) verwendet, die es ermöglicht, die ROS-Bildung in 96-Well-Mikrotiter-Platten in C6 Zellen zu messen.

Nach „Aufladung“ der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DCF-DA und Exposition der Platte mit den zu untersuchenden Organozinnverbindungen (s. 2.3.1.3) erfolgte die Messung des fluorimetrischen Signals und dessen Verlauf über die Zeit. Insgesamt wurden 8 Zyklen gemessen, wobei zwischen zwei Zyklen eine Zeit von 15 Minuten lag.

Das Fluorimeter „Tecan GENIOS pro“ (Firma Tecan) wurde hierfür auf 37°C vorgewärmt. Zur Auswertung wurde die Software XFLUOR4GeniosPro, Version 4.53 benutzt. Folgende Parameter wurden am Fluorimeter für die Messung eingestellt:

Measurement mode: Fluorescence Intensity, Kinetic
Excitation wavelength: 485 nm
Emission wavelength: 535 nm
Gain: 40
Number of flashes: 3
Lag time: 0 µs
Integration time: 40 µs
Mirror selection: Dichroic 3 (e.g.FI)
Plate definition file: GRE96fb.pdf
Part of the plate: A1 – H12
Multiple reads per well (Square): 3x3
Number of kinetic cycles: 8
Kinetic interval (Minimal): 558 s
Valid temperature range: 36 – 38 °C
Target Temperature: 37 °C

Es war von besonderer Wichtigkeit, dass die Platten bei dem gleichen „Gain-Wert“ (Verstärkung der Fluoreszenzmesswerte) gemessen wurden, um später die Möglichkeit zu haben, die Ergebnisse der Messungen von unterschiedlichen Platten miteinander zu vergleichen. Es wurde deshalb einheitlich ein „Gain-Wert“ von 40 verwendet.

2.4.6 Messung der Lipidperoxidation

Die Lipidperoxidation wurde mit dem Thiobarbiturat-Test quantifiziert. Bei der Lipidperoxidation entsteht unter anderem Malondialdehyd (MDA), welches im sauren Milieu unter Erhitzen mit Thiobarbitursäure (TBA) zu einem rosafarbenen Komplex reagiert, dessen Absorptionsmaximum bei 532-535 nm liegt (Draper et Hadley, 1990). Die Reaktion sollte bei pH 2-3 und 90-100°C durchgeführt werden. Wird, wie hier, die TBA-Reaktion mit der gesamten angesäuerten Gewebeprobe, das heißt ohne vorherige TCA-Fällung und Entfernung des Präzipitats, durchgeführt, ist sie nicht spezifisch für freies MDA. MDA und MDA-ähnliche Verbindungen können während des Tests durch säurekatalysierte bzw. thermische Dekomposition aus Vorläufern entstehen: zum Beispiel aus anderen Aldehyden, proteingebundenem MDA oder oxidierten Lipiden. In diesem Fall ist es angemessener, von der Messung TBA reaktiver Substanzen (TBARS: thiobarbituric acid reactive substances) statt von MDA-Messung zu sprechen. Unter Verwendung der molaren Extinktionskoeffizienten für den MDA/TBA-Komplex werden TBARS als MDA-Äquivalente ausgedrückt.

Materialien und Lösungen:

Trichloressigsäure (TCA) (Merck)
2-Thiobarbitursäure (TBA) (Sigma)
Glaszentrifugenröhrchen, Rundboden
Photometerküvetten, (Einweg)
Alufolie
Gummispatel (Rubberpoliceman)
Heizblock (118°C) mit passenden Einsätzen für die Zentrifugengläser
Wasserbad (Raumtemperatur)
Photometer (UVICON 810, KONTRON)
Zentrifuge (Megafuge 1.0 R, HEREAUS)

Erstellen der TBA/TCA Lösung:

Zur Herstellung von 50 ml Lösung wurden zunächst 400 mg Thiobarbitursäure (TBA) in 35 ml ultra pure H₂O gelöst, dazu dann 10 g Trichloressigsäure (TCA, Merck) gegeben und mit

ultra pure H₂O auf 50 ml aufgefüllt. So entstand eine Lösung mit einem Anteil von 0,8% TBA und 20% TCA an der Lösung.

Die 35 mm Kulturschalen wurden aus dem Brutschrank genommen und in jede Schale wurde 1 ml TBA/TCA Lösung gegeben. Der Zellrasen wurde mit dem Gummispatel abgekratzt und der Inhalt jeder Schale (Zellen, 1 ml serumfreies Versuchsmedium, 1 ml TBA/TCA Lösung) in Zentrifugengläser pipettiert. Außerdem wurde eine Blindlösung aus 2 ml serumfreiem Versuchsmedium und 2 ml TBA/TCA Lösung in einem Zentrifugenglas angesetzt. Die Gläser wurden mit Alufolie bedeckt, um ein Verdunsten des Inhalts zu verhindern, und dann für 45 Minuten bei 118°C in den Heizblock gestellt. Danach wurden die Zentrifugengläser für 5 Minuten im Wasserbad bei Zimmertemperatur abgekühlt. Anschließend konnten die Gläser in die Zentrifuge überführt werden, in der sie für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen und Zimmertemperatur zentrifugiert wurden. Aus dem Überstand wurde nun je 1 ml in Halbmikro-Plastikküvetten pipettiert, in denen die Absorptionsmessung im Photometer bei 532 nm gegen die Blindlösung erfolgen konnte. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die gemessenen Extinktionen in Malondialdehyd-Äquivalente (TBARS = thiobarbituracid reactive substances) umgerechnet. Dies erfolgte nach der Formel:

$$TBARS \text{ (mol/Schale)} = \frac{A \times \text{Reaktionsvolumen (l/Schale)}}{E}$$

Hierbei ist das Reaktionsvolumen jeder Schale 2 ml, bestehend aus den Zellen, 1 ml Versuchsmedium und 1 ml TBA/TCA Lösung. E ist der molare Extinktionskoeffizient bei 532 nm ($E = 1,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Draper et Hadley, 1990), A die gemessene Absorption.

Der Zellproteingehalt pro Schale wurde aus den zwei dafür vorgesehenen 35 mm Schalen wie oben beschrieben mit der Methode nach Lowry et. al. (1951) bestimmt.

2.5 Auswertung und Darstellung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Graph Pad Prism.

2.5.1 96-Well-Mikrotiterplattenkulturen

2.5.1.1 Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität

Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmengen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Die gemessenen Werte der zwölf Wells einer Platte, die nicht mit den Organozinnverbindungen behandelt wurden, wurden gemittelt. Dieser Mittelwert diente als Kontrollwert. Der Proteingehalt der Testgruppen ergab sich aus dem Mittelwert der gemessenen Werte der sechs Wells, die jeweils mit einer Organozinnkonzentration behandelt worden waren. Dem Kontrollwert wurden 100 % zugeordnet; die Testgruppenwerte wurden in % der Kontrolle ausgedrückt.

Der EC_{50} -Wert entspricht der Konzentration der Organozinnverbindung, die eine Reduktion des Proteingehalts um 50 % hervorruft.

MTT-Test

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem MTT-Test untersucht. Als Parameter dient die Extinktion des reduzierten Tetrazoliumsalzes MTT. Analog zur Auswertung nach der Proteinmengenbestimmung wurde auch hier der Extinktionswert für die Kontrollwells auf 100 % gesetzt und die Extinktionen der einzelnen Testgruppen in % der Kontrolle ausgedrückt. Der EC_{50} -Wert entspricht in diesem Fall der Konzentration der Organozinnverbindung, die eine Reduktion der Extinktion um 50 % hervorruft.

2.5.1.2 Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität

MTT-Test

Die Zytotoxizität der Organozinnverbindungen im Zeitverlauf wurde ebenfalls mit dem MTT-Test untersucht. Die Auswertung erfolgte in gleicher Weise wie in den Versuchen über 24 Stunden (wie oben beschrieben). Für jede Platte und damit für jeden untersuchten Zeitabschnitt wurden die Messwerte der Testgruppen auf die jeweiligen Kontrollgruppen derselben Platte bezogen.

2.5.1.3 Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies mittels DCF-Messung

Um zu untersuchen, ob Organozinnverbindungen zur Bildung von freien Radikalen in C6 Zellen führen, wurde die Messung mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat (DCF-DA) durchgeführt. Das unter der Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies entstehende oxidierte DCF konnte mit dem Fluorimeter quantifiziert werden. Es wurde eine 96-Well-Platte über 8 Zyklen von je 15 Minuten untersucht. Die Randwells der Platte waren unbehandelt. Der Mittelwert des von diesen Wells ausgesendeten Fluoreszenzsignals diente als Blindwert. Dem Mittelwert des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Testreihen (7 Organozinnkonzentrationen, 2 Kontrollreihen, 1 Reihe Positivkontrolle CRP) wurde dieser Blindwert abgezogen. Die Darstellung erfolgte als Fluoreszenzsignal der einzelnen getesteten Substanzen über den Zeitverlauf von 2 Stunden.

2.5.2 100 mm Kulturschalen

2.5.2.1 Beurteilung der Kernmorphologie

Die kernmorphologische Betrachtung lieferte prozentuale Anteile der einzelnen Untergruppen an dem Anteil der Zellen, der sich durch Zentrifugation sammeln ließ. Die dazugehörigen Proteinwerte ergaben für jede untersuchte Schale im Vergleich zur Kontrollschale einen eventuellen Proteinverlust. Dieser konnte als Anteil nicht angehefteter, sogenannter „desintegrierter Zellen“ an der Gesamtpopulation aufgefasst werden, die als Zellbruchstücke während der Zentrifugation des Schaleninhalts nicht sedimentiert und damit für die Untersuchungen des weiteren Zelllysats verloren gehen. Die sich ergebenden prozentualen Anteile am Ende der Betrachtungen bezogen sich somit stets nur auf die

sedimentierten Zellen und wurden deshalb um den Faktor korrigiert, der sich aus der dazugehörigen Proteinmengenbestimmung durch den Vergleich zur Kontrollschale ergab.

2.5.2.2 Messung der Caspase 3-Aktivität

Das im Mikrotiterplattenphotometer messbare entstandene p-NA lieferte Auskunft über etwaige Caspase 3-Aktivierung in den gemessenen Proben. Anhand des Signals der Caspase 3-Positivkontrolle und des entsprechend geringer ausfallenden Signals bei zusätzlich vorhandenem Inhibitor konnte die optimale Funktionsfähigkeit des Tests überprüft werden. Von dem Proben-Signal wurde das dazugehörige Signal der Proben mit Inhibitorzugabe abgezogen. So ließ sich das tatsächlich durch Caspase 3-Aktivität entstandene Signal ermitteln. Dieses konnte des Weiteren auf die dazugehörige Proteinmenge bezogen werden und als nmol p-NA/ mg Protein x 3 h ausgedrückt werden.

2.5.2.3 Betrachtung der zeitabhängigen Zytotoxizität

Für die Beurteilung der Toxizität im Zeitverlauf wurde stets eine Kontrollschale zum Zeitpunkt direkt nach Beginn der Exposition, d.h. zur Stunde Null, untersucht. So konnte jede behandelte Schale nach Ende ihrer Expositionszeit nicht nur im Vergleich zu der zur gleichen Zeit untersuchten Kontrollschale betrachtet werden, sondern es war auch möglich, Bezüge zum Zustand der Zellen bei Start des zeitabhängigen Versuchs herzustellen.

2.5.3 35 mm Kulturschalen

2.5.3.1 Lipidperoxidierende Wirkung

Die Lipidperoxidation wurde mit dem Thiobarbiturat-Test (Draper et Hadley, 1990) quantifiziert. Mit der unter 2.4.6 beschriebenen Formel wurden die gemessenen Extinktionen des entstandenen rosafarbenen Komplexes in TBARS = Thiobarbitursäure reaktive Substanzen umgerechnet und auf die Proteinmengenwerte bezogen. Aus den Werten der Schalen einer Testgruppe bzw. Kontrollgruppe (je 2 Schalen) wurde der Mittelwert gebildet. Die Lipidperoxidation wurde als entstandene TBARS in nmol/mg Zellprotein ausgedrückt.

2.5.4 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden in halblogarithmischer Darstellung aufgezeichnet. Die EC_{50} -Werte wurden aus den Kurvenverläufen abgelesen. Sie werden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, sofern die Zahl der durchgeführten Versuche $n \geq 3$ war.

Zur Überprüfung auf signifikante Unterschiede in den Ergebnissen wurde der Student t-Test durchgeführt. Als signifikante Unterschiede werden diejenigen angegeben, die im ungepaarten t-Test einen p-Wert $< 0,05$ ergaben.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Zytotoxizität

3.1.1 Messung des Zellproteingehaltes der exponierten Kulturen

Um einen ersten Eindruck von der Zytotoxizität der Organozinnverbindungen zu gewinnen, wurden zunächst Messungen des Zellproteingehaltes in den behandelten Kulturen durchgeführt und geprüft, ob die Ergebnisse anderer Studien reproduzierbar waren.

Die Versuche wurden an C6 Gliomazellen durchgeführt, die durch den Entzug von FCS aus ihrem Umgebungsmedium (siehe 2.3) in ihrem Wachstum gehemmt waren.

Nach 24stündiger Exposition mit TBT bzw. TMT wurde der Zellproteingehalt in den Kulturen gemessen und dem der unbehandelten Kontrolle gegenübergestellt. In den Kontrollen wurden hierbei Proteinkonzentrationen von etwa 4 - 8 mg/ 100 mm Schale gemessen, die in den behandelten Kulturen gemessenen Werte konnten als prozentualer Anteil an dem Gehalt der Kontrollen angegeben werden.

Die Messung des Zellproteingehaltes erlaubt eine Aussage über die zellschädigenden Wirkungen von toxischen Verbindungen. Der Verlust von Zellprotein in diesem Verfahren entsteht durch das Abspülen der sich vom Untergrund gelösten Zellen. Ist eine Substanz also in der Lage, die Adhärenzfähigkeit von Zellen zu stören, kommt es in diesem Assay zu einem messbaren Proteinverlust. Eine Aussage über den Zustand dieser abgelösten Zellen, beispielsweise ihre Vitalität, erlaubt dieses Messverfahren nicht.

Abbildung 3.1 zeigt die zytotoxische Wirkung von TBT, die durch einen deutlichen konzentrationsabhängigen Verlust von Zellprotein in den exponierten Platten auffiel. Die geringste verwendete Konzentration von 0,01 μM TBT führte gegenüber den Kontrollen zu keinerlei Proteinmengenverminderung, während die höchste untersuchte Konzentration (3 μM) stets zu einem nahezu kompletten Proteinverlust führte.

Der EC_{50} -Wert lag bei $0,34 \pm 0,07 \mu\text{M}$. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve fällt dabei in einem schmalen Konzentrationsbereich steil ab.

Auch TMT wirkte bei 24stündiger Exposition der Zellen zytotoxisch, jedoch waren höhere Konzentrationen als bei TBT für diesen Effekt erforderlich. Wie TBT zeigte auch TMT einen sehr steilen Verlauf der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Während bei Exposition von 1 μM noch kein Zellverlust auftrat, führten 10 μM zu einem nahezu vollständigen Verlust. Der EC_{50} -Wert lag bei diesen Versuchen bei $5,1 \pm 0,13 \mu\text{M}$.

In der Zusammenschau zeigt sich, dass sowohl TBT als auch TMT über einen Expositionszeitraum von 24 Stunden zytotoxisch wirken. Beide Substanzen weisen einen relativ engen Konzentrationsbereich auf, in dem sich die zytotoxische Wirkung vollständig ausbildet, jedoch liegt dieser Bereich bei TBT in weit niedrigeren Konzentrationen als bei TMT. Die EC_{50} -Werte der verwendeten Verbindungen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,0001$) und waren bei TMT um mehr als den Faktor 10 höher als bei TBT.

Im Hinblick auf die Aussagekraft der Zellproteinmessung lässt sich festhalten, dass nach 24stündiger Exposition weit kleinere Konzentrationen TBT als TMT erforderlich sind, um ein Ablösen der Zellen zu erzeugen. TBT besitzt demnach zu diesem Zeitpunkt eine größere Potenz als TMT, Zellen so zu schädigen, dass sie sich aus dem Zellverband lösen. Ob die gelösten Zellen tatsächlich als tot gelten können, bleibt nach Beendigung dieser Versuche noch offen.

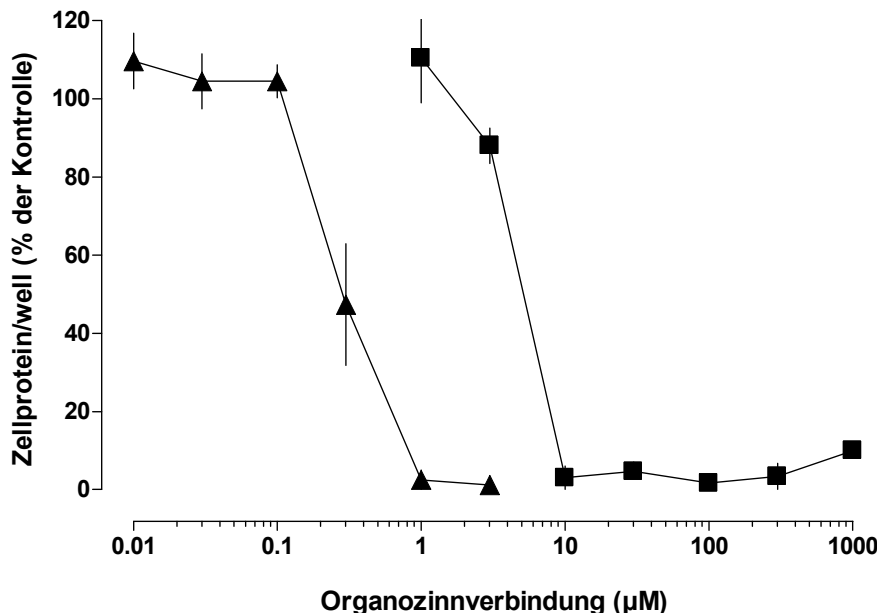


Abb. 3.1: Einfluss der Organozinnverbindungen auf den Zellproteingehalt von Kulturen wachstumsgehemmter C6 Gliomazellen nach 24stündiger Exposition

Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen von (\blacktriangle) TBT bzw. (\blacksquare) TMT inkubiert. Angegeben sind die Zellproteingehalte pro well in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM von $n=6$ (TBT) bzw. $n=3$ (TMT) unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Messung der Zellvitalität (MTT-Assay)

Die Messung der Zellproteinverluste, die durch die toxischen Verbindungen verursacht werden, erlaubt, wie oben ausgeführt, nur eine Aussage über einen Teilaspekt der Zytotoxizität. Der gemessene Zellverlust spiegelt wider, wie viele Zellen durch die Exposition mit den toxischen Substanzen vom Untergrund gelöst wurden, in welchem Zustand diese Zellen sich befinden, bleibt weiter offen. Um diese Frage zu klären, wurde ein weiterer Assay angewandt.

Der MTT-Assay gibt über die Messung der Bildung von Formazan, das von Dehydrogenasen in aktiven Mitochondrien der Zellen aus dem Tetrazoliumsalz MTT gebildet wird, einen Überblick über den Funktionszustand der Mitochondrien in den Zellen und erlaubt damit eine direkte Bewertung der Vitalität von Zellen (s. 2.4.2). Bei dem hier verwendeten Assay wurde auf ein Spülen der Kulturen verzichtet, sodass etwaige abgelöste Zellen im Versuchssystem verbleiben. Dabei handelt es sich um genau die Zellen, die im Messverfahren der Zellproteinmessung durch ein Spülen verloren gehen und als Zellproteinverlust messbar sind. Sollten diese abgelösten Zellen tatsächlich keine Vitalität aufweisen, ergäbe sich in der MTT-Messung eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die mit der Kurve aus der Zellproteinmessung identisch sein müsste. Sind die abgelösten Zellen jedoch nicht tot, ist eine Vitalität durch diesen Assay nachweisbar und die Ergebnisse, die beide Verfahren liefern, unterscheiden sich.

Bei gleichem Versuchsaufbau wurde die zytotoxische Wirkung der Organozinnverbindungen deshalb auch mit Hilfe des MTT-Assays quantifiziert. Wie auf Abbildung 3.2 zu erkennen, ergab sich für TBT eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die in ihrem Verlauf der aus den Messungen der Proteinmengen ähnelte, dabei aber leicht in Richtung höherer Konzentrationen verschoben war und nicht die beschriebene starke Steilheit aufwies.

Der EC_{50} -Wert lag bei $1,2 \pm 0,39 \mu\text{M}$.

Ganz anders stellten sich die Ergebnisse der MTT-Messung nach Behandlung der Zellen mit TMT dar. Hier war die Konzentrations-Wirkungs-Kurve deutlich gegenüber der Kurve aus den Proteinmessungen in Richtung höhere Konzentrationen verschoben und bildete im Bereich zwischen 10 und 1000 μM ein Plateau.

Der EC_{50} -Wert lag dadurch bei $440 \pm 14 \mu\text{M}$ und stand damit im starken Kontrast zu dem Wert aus der Proteinmengenbestimmung. Eine dort eingesetzte Konzentration von 10 μM bewirkte einen nahezu vollständigen Proteinverlust, im MTT-Test führte sie zu einem

Vitalitätsverlust von weniger als 20 %. Erst bei einer Konzentration von 1000 μM nähern sich die Ergebnisse beider Verfahren wieder an.

Die Unterschiede in der zytotoxischen Wirksamkeit der beiden Organozinnverbindungen TBT und TMT zeigte sich, wie in Abbildung 3.2 zu erkennen, somit in dem MTT-Assay noch stärker als in den Versuchen zum Proteinmengenverlust.

Es fiel auf, dass beide Messverfahren, MTT-Assay und Proteinmengenbestimmung unterschiedliche Ergebnisse lieferten, dieser Unterschied jedoch bei TMT sehr viel ausgeprägter war als beim TBT. Wie stark die Ergebnisse dieser beiden Messverfahren voneinander abweichen, wird bei der graphischen Gegenüberstellung der beiden Konzentrations-Wirkungs-Kurven, wie in Abbildung 3.3 gezeigt, deutlich. Die Diskrepanz zwischen den Kurven ist dabei besonders für TMT auffällig.

Stellt man die EC_{50} -Werte, die beide Messverfahren liefern wie in Tabelle 3.1 gegenüber, ergibt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$; Zellproteinmessung bzw. MTT-Assay) zwischen TBT und TMT, so wie auch zwischen den Ergebnissen der Verfahren ($p < 0,05$ für TBT bzw. $p < 0,0001$ für TMT).

Da dieser Assay im Gegensatz zur Proteinbestimmung Aussagen zur vitalitätsschädigenden Zytotoxizität erlaubt, kann festgehalten werden, dass TBT nach 24stündiger Exposition die Vitalität der Zellen in sehr viel kleineren Konzentrationen beeinflusst als TMT. Dieser Unterschied in der Konzentrationsabhängigkeit einer Zytotoxizität bestätigt die Beobachtungen aus der Zellproteinmessung.

Die Tatsache, dass für TBT ein geringer Unterschied zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die die Ergebnisse beider Verfahren liefern, besteht, erlaubt eine Aussage über das toxische Verhalten von TBT. Wie oben erläutert kann gefolgert werden, dass TBT ein Ablösen der Zellen vom Untergrund herbeiführt und dass diese abgelösten Zellen nur zu einem geringen Anteil noch vital sind. Überwiegend geht ein Ablösen der Zellen bei dieser Verbindung also mit einem Tod der Zellen einher.

Bei Exposition der Zellen mit TMT ergab sich ein sehr großer Unterschied zwischen den Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die nach Zellproteinmessung und MTT-Assay darstellbar waren. Besonders im mittleren Konzentrationsbereich sind viel niedrigere Konzentrationen TMT für einen Protein- als für einen Vitalitätsverlust verantwortlich. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass im Gegensatz zum TBT hier ein Großteil der Zellen, die sich durch die Exposition vom Untergrund gelöst haben, noch vital sind.

Anders als TBT scheint TMT demnach einen besonderen Wirkmechanismus aufzuweisen, der Zellen zunächst in ihrer Anheftung stört und erst in höheren Konzentrationen tötet.

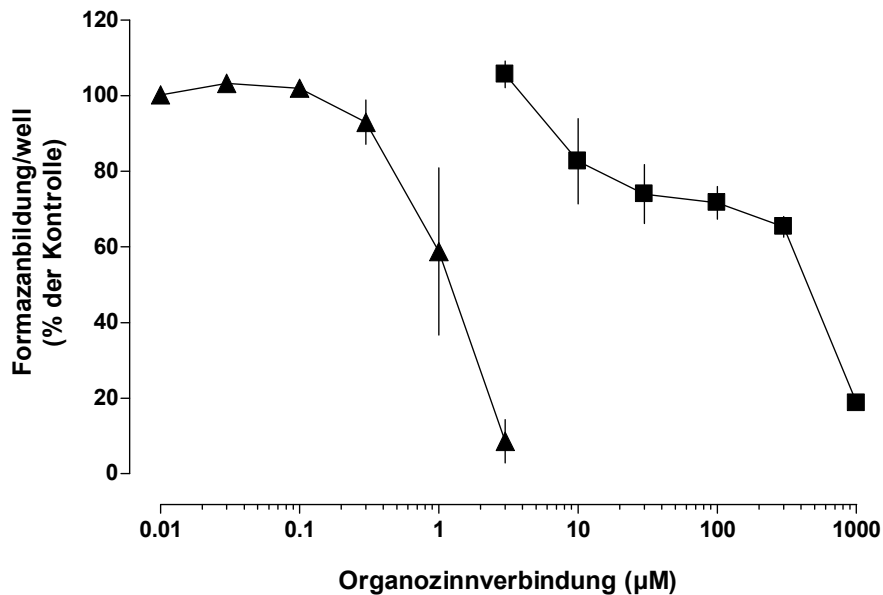
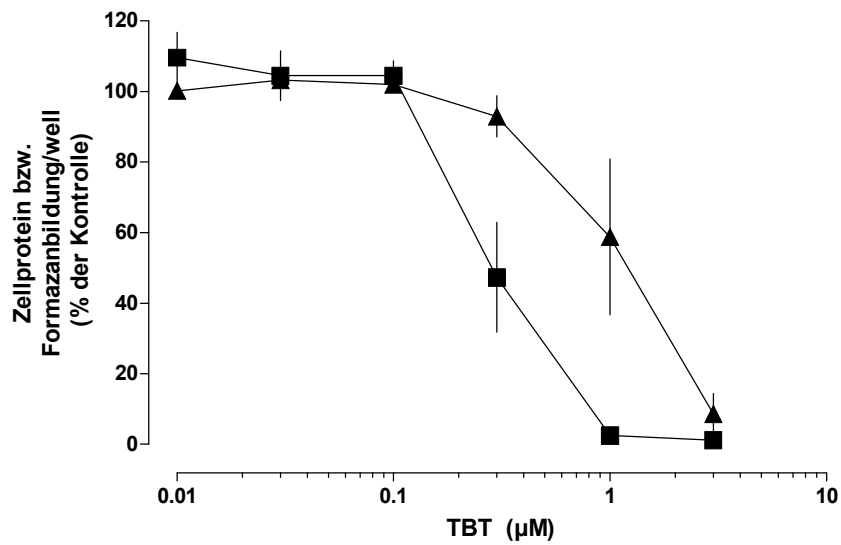


Abb. 3.2: Einfluss der Organozinnverbindungen auf die Vitalität wachstumsgehemmter C6 Gliomazellen nach 24stündiger Exposition

Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen von (▲) TBT bzw. (■) TMT inkubiert. Angegeben sind die Extinktionswerte des gebildeten Formazans pro well in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM von n=4 (TBT) bzw. n=3 (TMT) unabhängigen Experimenten.

A



B

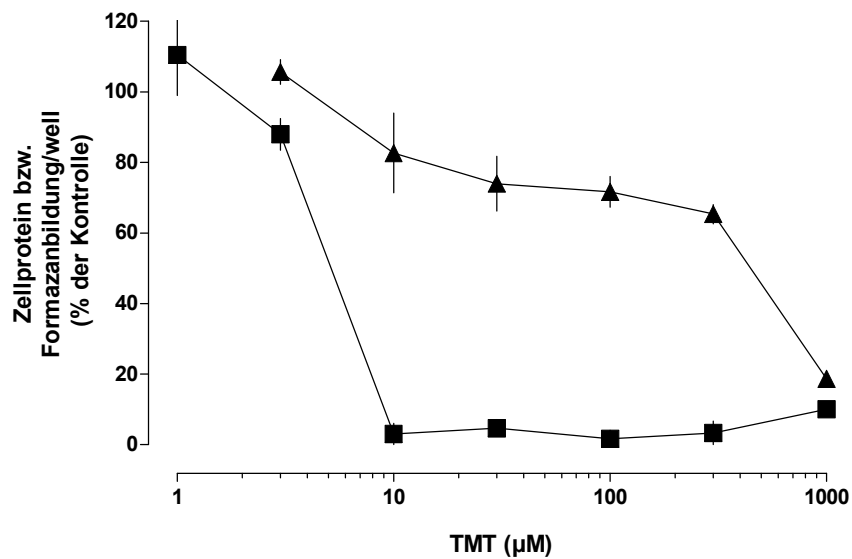


Abb. 3.3: Einfluss der Organozinnverbindungen auf den Zellproteingehalt im Vergleich zum Einfluss auf die Vitalität wachstumsgehemmter C6 Gliomazellen nach 24stündiger Exposition

Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen von TBT (A) bzw. TMT (B) inkubiert. Angegeben sind die Zellproteingehalte pro well (■) bzw. die Extinktion des gebildeten Formazans (▲) in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM aus 3-6 unabhängigen Experimenten (s. Abb. 3.1 und 3.2).

Tabelle 3.1: Zytotoxische Potenz von TBT und TMT bei Bestimmung mit unterschiedlichen Assays

Angegeben sind die Mittelwerte (\pm SEM) der EC₅₀-Werte aus 3-6 Versuchen (s. Abb. 3.1 und 3.2).

	Protein-Assay	MTT-Assay
TBT	0,34 \pm 0,069 μ M ^{a)c)}	1,2 \pm 0,39 μ M ^{a)d)}
TMT	5,1 \pm 0,13 μ M ^{b)c)}	440 \pm 14 μ M ^{b)d)}

a) (TBT: Protein Assay vs. MTT-Assay): p<0,05

b) (TMT: Protein Assay vs. MTT-Assay): p<0,05

c) (Protein Assay: TBT vs. TMT): p<0,05

d) (MTT-Assay: TBT vs. TMT): p<0,05

3.2 Einfluss der Expositionszeit auf die Zytotoxizität

Andere Studien (Seibert et al., 2004) ergaben auffällige Unterschiede zwischen der Zytotoxizität von TBT und TMT und ihrem Verlauf, wenn man eine Exposition über mehrere Stunden wählt. Diese Versuche wurden mit dem Verfahren der Zellproteinverlustmessung durchgeführt. Nachdem die hier durchgeführten Versuche mit einer 24stündigen Expositionszeit die Unterschiede zwischen den Ergebnissen, die die Proteinbestimmung und der MTT-Assay lieferten, zeigten und diese Unterschiede bei Versuchen mit TMT so viel auffälliger waren als beim TBT, lag es nahe, mit dem aussagekräftigen MTT-Assay auch Versuche mit längeren Expositionsdauer durchzuführen. So sollten Aussagen über die Unterschiede in der toxischen Wirkung auf die Vitalität der Zellen zwischen TBT und TMT und zwar in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition ermöglicht werden.

Der Entzug von Kälberserum aus dem Versuchsmedium führte zu einer Wachstumshemmung der kultivierten Zellen. Ein vollständiger Stopp des Wachstums wurde dadurch jedoch nicht erreicht. Es war zu beobachten, dass die Kulturen in den unbehandelten Kontrollen den MTT-Umsatz über den Verlauf der Versuchszeit von bis zu 72 Stunden leicht steigerten, was durch ein geringes Wachstum erklärt werden kann. Möglich

ist, dass trotz mehrmaliger Spülvorgänge stets kleine Mengen des Kälberserums in der Kultur verbleiben, oder aber auch, dass mitogene Substanzen in den Zellen für das Fortbestehen der Zellteilung verantwortlich sind.

Mit Hilfe des MTT-Tests wurde aus oben genannten Gründen die zytotoxische Wirkung der Organozinnverbindungen über den Verlauf mehrerer Stunden verfolgt. Für TBT ergab sich, wie in Abbildung 3.4 A dargestellt, sowohl bei kurzen Einwirkzeiten (1, 2, 4 Stunden) als auch bei längeren (48, 72 Stunden) ein ähnliches Wirkprofil wie in den Versuchen über 24 Stunden. Eine nach einer Stunde Einwirkzeit zu keinerlei zytotoxischem Effekt führende Konzentration von 1 μM TBT erzeugt auch nach bis zu 72 Stunden Expositionszeit keinen Vitalitätsverlust.

Die EC_{50} -Werte der einzelnen geprüften Zeitabschnitte lagen relativ dicht beieinander (s. Tab. 3.2). Bei einer Expositionszeit von einer Stunde betrug der EC_{50} -Wert 6,2 μM , bei der längsten Expositionsdauer von 72 Stunden lag der Wert mit 1,8 μM etwa um den Faktor 3,5 darunter. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven fallen stets steil ab (s. Abb. 3.4).

Während der kurzen Expositionszeiten von 1,2 und 4 Stunden ergab sich für eine Konzentration von 3 μM ein zunehmender Vitalitätsverlust, sodass sich diese Konzentration als diejenige erweist, in deren Nähe sich die zytotoxische Potenz von TBT über die Zeit stets voll ausbildet (s. Abb. 3.6 A). Die nächsthöhere Konzentration von 10 μM sowie auch die nächstniedrigere von 1 μM führten unabhängig von der Expositionszeit zu einem stabilen Ergebnis, also entweder zum nahezu vollständigen MTT-Signalverlust oder zu keinem Unterschied gegenüber der Vitalität in der Kontrolle.

Im Kontrast dazu stand der Effekt, der sich nach Behandlung der Zellen mit TMT über den Verlauf mehrerer Stunden nachweisen ließ. Hier zeigten sich große Unterschiede in der zytotoxischen Potenz je nach Expositionszeit. Abbildung 3.4 B zeigt diesen auffälligen Verlauf. So führte eine Konzentration von 1000 μM nach kurzen Expositionszeiten (1,2 und 4 Stunden) zu wenig Vitalitätsverlust (<20 %), eben diese Konzentration bedeutete in der Betrachtung nach 24 Stunden einen massiven (>70 %), nach 48 und 72 Stunden sogar einen vollständigen Vitalitätsverlust. Für die längste Expositionszeit von 72 Stunden reichte eine Konzentration von 10 μM aus, um einen starken Verlust der Vitalität auf weniger als 25 % der Kontrolle zu bewirken.

Demnach unterschieden sich die EC_{50} -Werte für die einzelnen Expositionszeiten drastisch und reichten, ermittelt aus den Kurvenverläufen in ihrer ursprünglichen Form, von 8800 μM für eine einstündige Exposition bis zu 6,5 μM für eine Einwirkzeit von 72 Stunden. Die verschiedenen Dosiswirkungskurven erstrecken sich folglich über einen breiten Konzentrationsbereich (s. Abb. 3.4 B).

In der Zusammenschau wird das unterschiedliche zeitliche Wirkprofil der Organozinnverbindungen deutlich. Nach einer Stunde Exposition ist TBT um ein vielfaches zytotoxischer als TMT. Die Unterschiede lassen sich bei Vergleich der in Tabelle 3.2 dargestellten EC_{50} -Werte erkennen. In der Betrachtung über einen längeren Zeitverlauf nähert sich jedoch TMT mit seiner zytotoxischen Wirksamkeit immer stärker der von TBT an. Nach 72 Stunden Expositionszeit liegen die EC_{50} -Werte eng beieinander (s. Tab. 3.2).

Im Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus dem MTT-Assay mit den Kurven, die in früheren Studien (Seibert et al., 2004) mit Hilfe der Zellproteinverlustmessung ermittelt worden waren, bestätigte sich das charakteristische zeitliche Wirkprofil von TBT und TMT. Jedoch kommt es, wie in den Versuchen mit 24stündiger Exposition bereits beobachtet, im MTT-Assay gegenüber der Zellproteinmessung zu einer Verschiebung der Kurvenverläufe zu höheren Konzentrationen. Dies gilt insbesondere für die Exposition mit TMT.

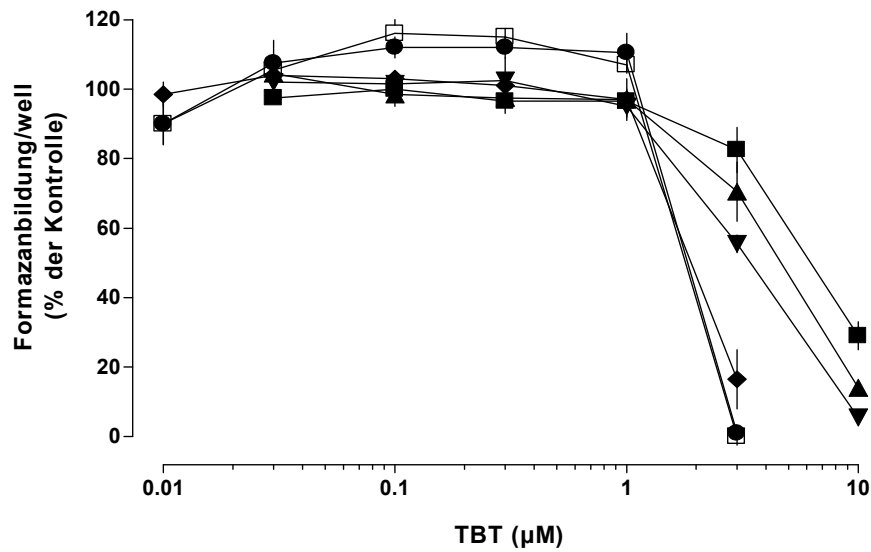
In der Betrachtung der einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die sich für TMT ergeben, fällt weiterhin auf, dass die Kurven ab 24stündiger Exposition einen auffälligen Verlauf zeigen. Bereits in den Versuchen nach 24stündiger Exposition ist erkennbar, dass die Kurven im mittleren Konzentrationsbereich ein Plateau aufweisen, welches in dieser Form in früheren Untersuchungen mit Hilfe der Zellproteinmessung nicht gezeigt werden konnte. Dieses Plateau in den Kurvenverläufen macht es unmöglich, aus diesen realistische EC_{50} Werte zu bestimmen. Welche Eigenheiten in der Wirkungsweise von TMT für diese Kurvenverläufe verantwortlich sind, bleibt unklar. Es ist anzunehmen, dass das Plateau die Synthese zweier Kurven darstellt; dabei beschreibt der erste Kurvenabschnitt in seiner Steigung die Wirkung der Verbindung in kleineren Konzentrationen (Beginn der Kurve). Nach Überschreiten des Plateaus zeigt der zweite Abschnitt den Ablauf für höhere Konzentrationen (Ende der Kurve).

Es ist denkbar, dass hinter diesem zweiphasigen Verlauf zwei unterschiedliche Mechanismen in der Wirksamkeit stehen. Um ein realistisches Bild über dieses Toxizitätsverhalten zu liefern, ist es notwendig, die Kurven, die das beschriebene Plateau

zeigen, in zwei Kurven aufzuteilen und so jeweils zwei EC_{50} -Werte zu erhalten. So beschreibt ein Wert die zytotoxische Potenz kleinerer Konzentrationen TMT, ein zweiter die der höheren Konzentrationen. Abbildung 3.5 zeigt die graphische Ermittlung dieser Werte, die in Tabelle 3.2 aufgeführt sind.

Die Darstellung der zytotoxischen Wirksamkeit in Form eines Kurvenverlaufes der einzelnen Konzentrationen über den Zeitverlauf in Abbildung 3.6 stellt einen weiteren Aspekt der unterschiedlichen zeitlichen Wirkprofile in den Vordergrund. Während beim TBT lediglich eine einzelne Konzentration von 3 μM in seiner zytotoxischen Potenz durch den Zeitverlauf beeinflusst wird und die übrigen Konzentrationen unverändert über die Zeit weitestgehend stabil entweder toxische oder keine Effekte erzeugen, stellt sich die Situation beim TMT völlig anders dar. Bis auf die niedrigsten eingesetzten Konzentrationen von bis 3 μM ist jede Konzentration TMT in der Lage, einen wesentlichen Effekt zu erzielen, sobald eine entsprechende Expositionszeit gewählt wird. Anders als beim TBT macht jede Konzentrations-Kurve eine Veränderung im Zeitverlauf durch (s. Abb. 3.6).

A



B

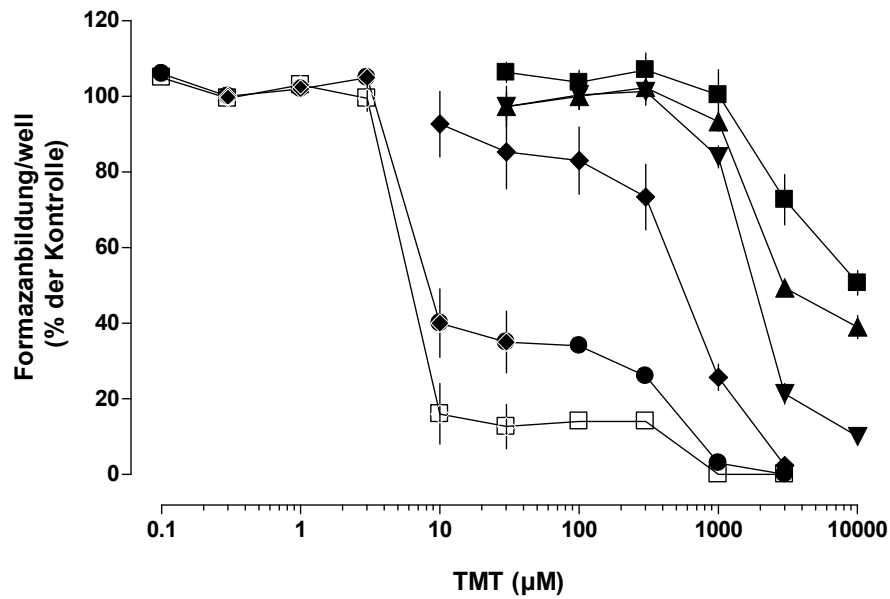


Abb. 3.4: Einfluss der Expositionszeit auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der zytotoxischen Wirkung von Organozinnverbindungen

Die Zellen wurden für (■) 1, (▲) 2, (▼) 4, (◆) 24, (●) 48 bzw. (□) 72 Stunden in DMEM mit unterschiedlichen Konzentrationen von (A) TBT bzw. (B) TMT inkubiert. Angegeben sind die Extinktionswerte des gebildeten Formazans pro well in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM/+ range von n=2 (TBT) bzw. n=3 (TMT) unabhängigen Experimenten.

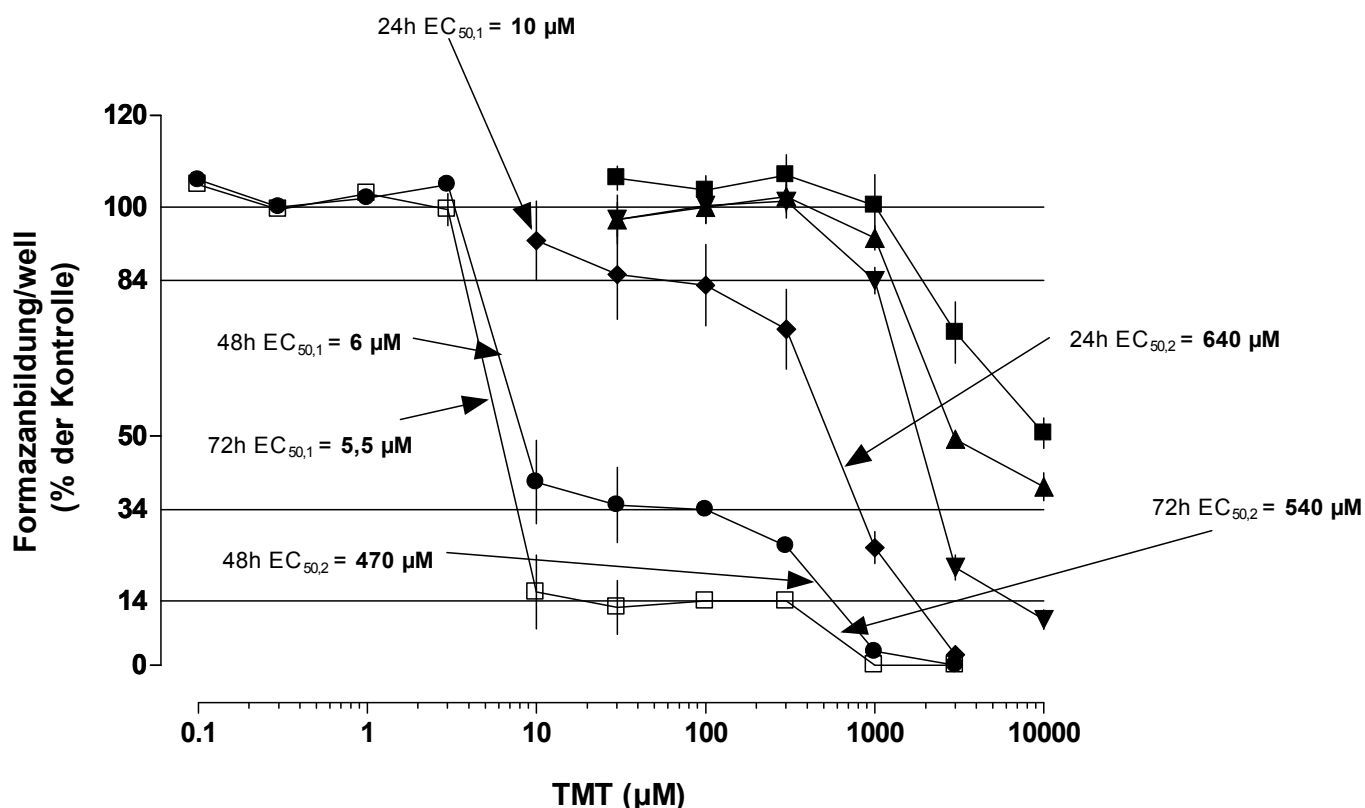


Abb. 3.5: Graphische Ermittlung der EC_{50} -Werte in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen für die Exposition mit TMT über mehrere Stunden

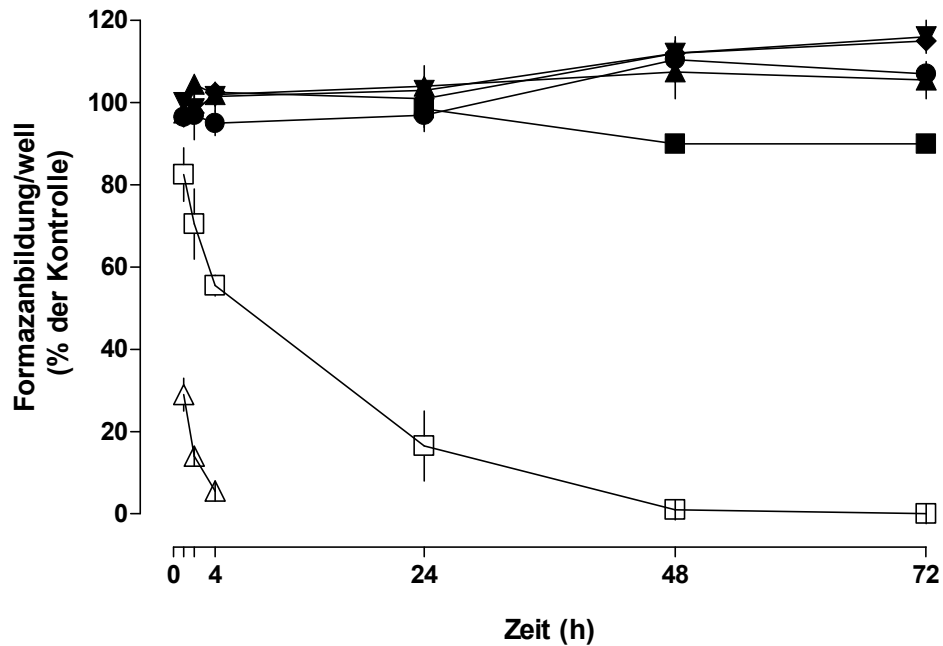
Die Zellen wurden für (■) 1, (▲) 2, (▼) 4, (◆) 24, (●) 48 bzw. (□) 72 Stunden in DMEM mit den unterschiedlichen Konzentrationen von TMT inkubiert (s. Abb. 3.4). Anhand des Plateaus wurden die Kurven für 24, 48 und 72 Stunden in jeweils zwei Abschnitte unterteilt. Für jede sich neu ergebende Kurve wurde ein EC_{50} -Wert abgelesen, der in Tabelle 3.2 dargestellt ist.

Tab. 3.2: Einfluss der Expositionsdauer auf die zytotoxische Potenz von Organozinnverbindungen in kultivierten wachstumsgehemmten C6 Gliomazellen

Angegeben sind die EC_{50} -Werte, die aus den Mittelwertkurven aus Abb. 3.3 zu Grunde liegenden Einzelversuchskurven ermittelt worden sind, in Abhängigkeit von den Expositionszeiten. Die jeweils zwei EC_{50} -Werte für die Expositionszeiten von 24, 48 und 72 Stunden ergeben sich aus der graphischen Ermittlung aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven (s. Abb. 3.5).

	TBT	TMT		
		EC_{50} 1	EC_{50}	EC_{50} 2
1 h	6,2 µM		8800 µM	
2 h	4,6 µM		2900 µM	
4 h	3,4 µM		1800 µM	
24 h	1,9 µM	10 µM		640 µM
48 h	1,8 µM	6 µM		470 µM
72h	1,8 µM	5,5 µM		540 µM

A



B

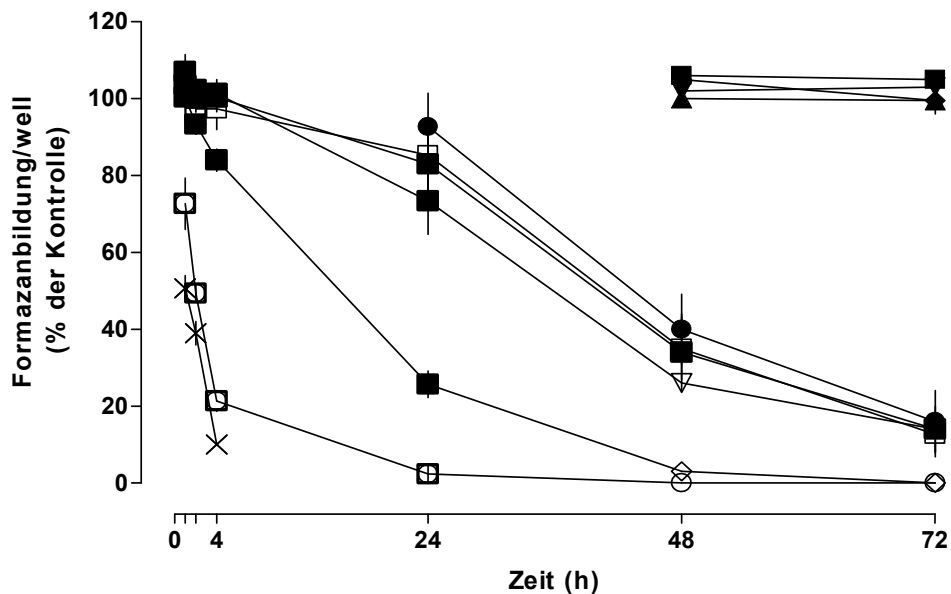


Abb. 3.6: Einfluss der Expositionszeit auf die zytotoxische Potenz der verschiedenen getesteten Konzentrationen der Organozinnverbindungen

Die Zellen wurden über 72 Stunden in DMEM mit den Konzentrationen (■) 0,01, (▲) 0,03, (▼) 0,1, (◆) 0,3, (●) 1, (□) 3 bzw. (Δ) 10 µM TBT (A) bzw. (■) 0,1, (▲) 0,3, (▼) 1, (◆) 3, (●) 10, (□) 30, (Δ) 100, (▽) 300, (◇) 1000, (○) 3000, (x) 10000 µM TMT (B) inkubiert. Angegeben sind die Extinktionswerte des gebildeten Formazans pro well in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte (\pm SEM/+ range) von n=2 (TBT) bzw. n=3 (TMT) unabhängigen Experimenten.

3.3 Induktion von Apoptose und Nekrose

Nachdem die durchgeführten Versuche die auffälligen Unterschiede zwischen der Zytotoxizität von TMT und TBT und insbesondere die unterschiedlichen zeitlichen Wirkprofile gezeigt hatten, sollte in einem weiteren Schritt geprüft werden, ob eventuell unterschiedliche Formen des Zelltods für diese Unterschiede verantwortlich sind. Dazu wurde untersucht, ob die beiden Organozinnverbindungen einen nekrotischen oder einen apoptotischen Zelltod induzieren. Diese Analyse beinhaltete zum einen die morphologische Untersuchung der Zellkerne (s. 2.4.3) und zum anderen die Messung der Caspase 3-Aktivierung (s. 2.4.4.), welche als Indikator für einen apoptotischen Zelltod begriffen werden kann.

Die Exposition der Zellen mit TBT bzw. TMT in DMEM erfolgte am 6. Kulturtag in 100 mm Kulturschalen. Die C6 Zellen waren durch Entzug von Kälberserum aus ihrem Medium in ihrer Proliferation gehemmt.

3.3.1 Konzentrationsabhängigkeit der Induktion des Zelltodes

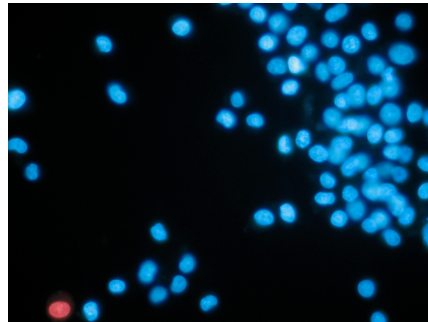
3.3.1.1 Morphologische Analysen

Morphologische Veränderungen der Zellkerne nach Exposition mit den Organozinnverbindungen konnten mit Hilfe der Färbung durch die Fluoreszenzfarbstoffe Hoechst 33342 sowie Propidiumiodid sichtbar gemacht werden. Abbildung 3.7 zeigt beispielhaft die Veränderungen in der Morphologie der Kerne der Zellen, die über mehrere Stunden mit TBT bzw. TMT behandelt worden sind. Die Kerne apoptotischer Zellen fallen durch ein hochkondensiertes, meist fragmentiertes Chromatin auf, das sich halbmondförmig an die Kernmembran anlagert. Die Farbe ist dabei heller leuchtend als die der lebendigen oder nekrotischen Zellen und erscheint oft beinahe weiß. Apoptotische Kerne fallen sowohl als lebendige, mit dem blauen Hoechst-Farbstoff angefärbte, Zellen auf und können dann als „frühapoptotische“ Zellen beschrieben werden, oder aber auch als so genannte „spätapoptotische“ Zellen, die bereits eine geschädigte Zellmembran besitzen und dadurch den roten Farbstoff Propidiumiodid hindurch lassen. (vgl. 2.4.3)

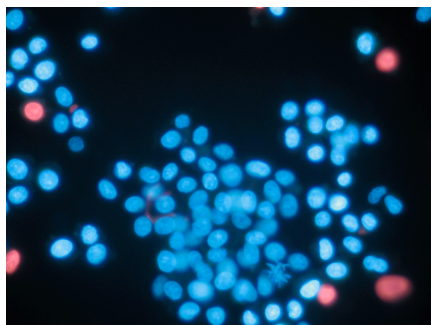
In der Abbildung 3.7 A sind beispielhaft nach Exposition mit 3 μ M TBT sowohl frühapoptotische Kerne nach kurzen Expositionszeiten (2 Stunden) als auch spätapoptotische Kerne nach längeren Zeiten (24 Stunden) zu erkennen.

A

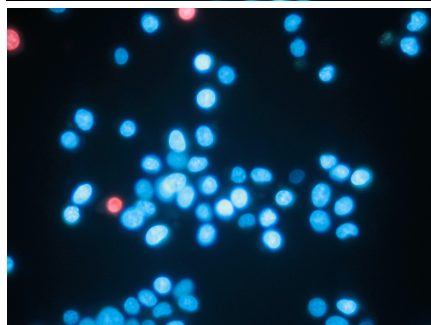
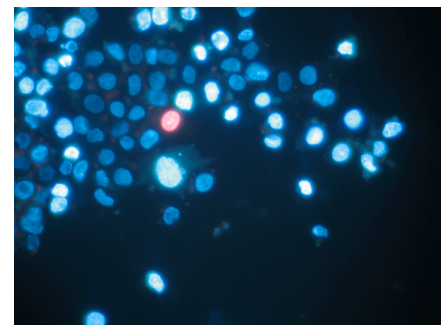
Kontrolle: 0 Stunden



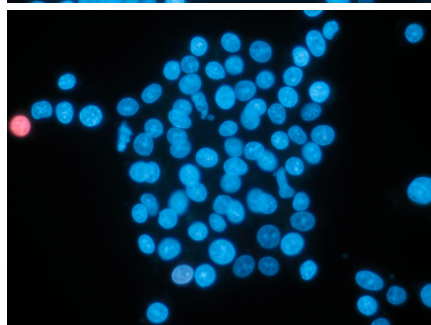
Kontrolle

3 μ M TBT

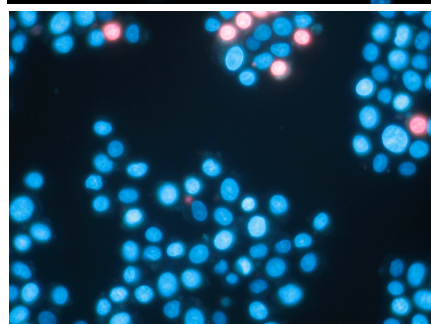
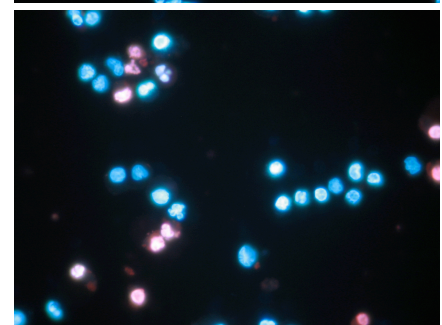
2 Stunden



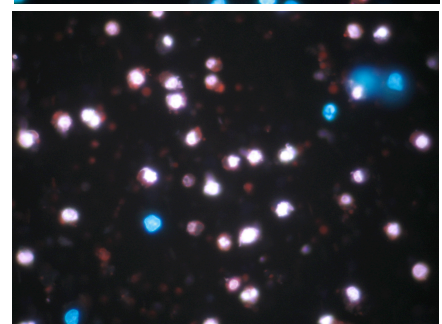
4 Stunden



6 Stunden



24 Stunden



B

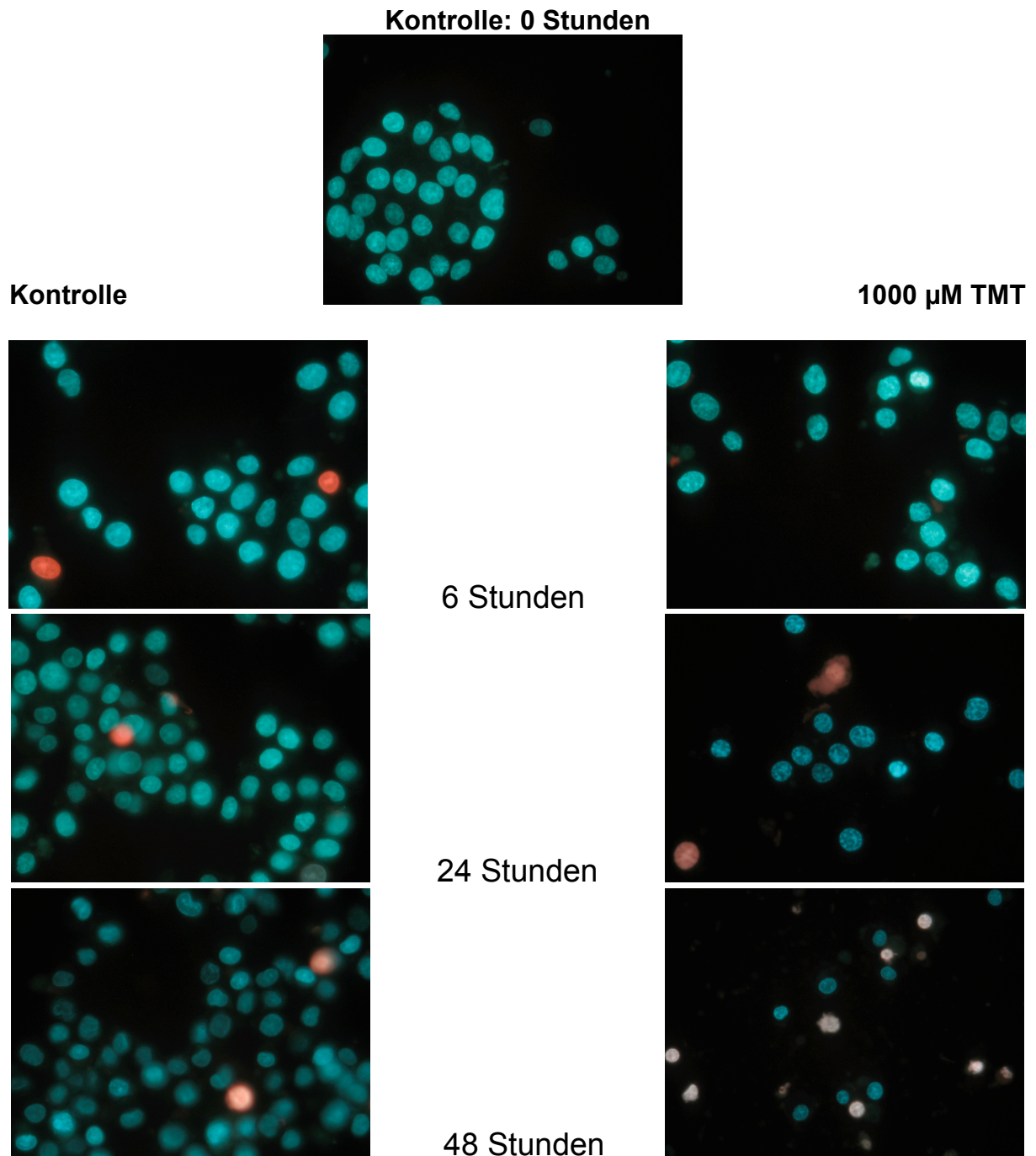


Abb. 3.7: Einfluss der Organozinnverbindungen auf die fluoreszenzmikroskopisch erkennbare Kernmorphologie von C6 Gliomazellen, die nach Exposition über verschiedene Zeiten mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid angefärbt wurden

Mittig oben ist jeweils ein Foto der unbehandelten Kontrolle zum Zeitpunkt des Expositionsbeginns dargestellt. Es folgen darunter links die Bilder der unbehandelten Kontrollen zu den unterschiedlichen Zeiten und gegenübergestellt auf der rechten Seite Beispiele der Bilder, die nach Exposition mit 3 μ M TBT (A) bzw. 1000 μ M (B) nach den unterschiedlichen Expositionszeiten aufgenommen wurden. Klar zu erkennen ist die typische Morphologie apoptotischer Zellkerne, die sich nach Behandlung mit TBT zeigen. Das Kernchromatin der mit TMT exponierten Zellen zeigt typische grobschollige Veränderungen. Die unbehandelten Kontrollen zeigen Stabilität in der Kernmorphologie über den Versuchsverlauf.

Die Einteilung in einzelne Anteile an der Population nach morphologischen Merkmalen fand nach der in Abschnitt 2.4.3 beschriebenen Methode statt. Dabei gilt es zu beachten, dass eine Auszählung der prozentualen Anteile an Hand einer Restpopulation getätigt wurde, die nach Aufbereitung der Zellen vor der Anfärbung noch vorhanden war. Wie in Abschnitt 2.3.2.3 beschrieben werden die Zellen einer Kultur mit Hilfe der Zentrifugation gesammelt und angefärbt. Eine jedem Versuch zusätzlich zugeordnete Messung des Zellproteinverlustes gegenüber der unbehandelten Kontrolle zeigte jedoch, dass nicht immer alle Zellen einer exponierten Kultur aus der Aufbereitung in die anzufärbende Population übergangen. Es muss demnach ein Verlust von Zellen bzw. den Resten ehemaliger Zellen erfolgen, der durch die Zentrifugation entsteht: Zellbruchstücke sedimentieren nicht und entziehen sich dadurch einer morphologischen Analyse. Dieser Anteil an Zellen kann als derjenige der sogenannten „desintegrierten“ Zellen bezeichnet werden und war nach Exposition mit den Organozinverbindungen zum Teil sehr hoch, was von der deutlichen Schädigung der Zellen zeugte.

Zu beachten ist nach diesen Überlegungen, dass zunächst Aussage getroffen werden konnte über diejenigen Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen an der gesichteten Population, die sich aus dem herunterzentrifugierten Pellet gewinnen ließ.

Unter dem Vorbehalt, dass diese Anteile lediglich Auskunft über die Verhältnisse in der Restpopulation und nicht in der Gesamtpopulation geben, konnten die in Abbildung 3.8 gezeigten Ergebnisse festgehalten werden.

Die Messung der Zellproteinmenge ergab für die Exposition sowohl mit TBT als auch mit TMT einen Verlust, der in den eingefügten Graphiken der Abbildung 3.8 dargestellt ist. Dieser Verlust entspricht dem Anteil der desintegrierten Zellen (vgl. 2.5.2.1). Mikroskopisch analysiert werden können demgegenüber nur die sedimentierten Zellen, sodass die Anteile nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen um den Faktor korrigiert werden müssen, der sich aus dem Anteil desintegrierter Zellen an der Gesamtpopulation ergibt. Nur so lässt sich eine Aussage über die Verhältnisse in der gesamten exponierten Kultur treffen. Die so „korrigierten“ Werte sind in Abbildung 3.9 dargestellt.

Da der sehr hohe Anteil an desintegrierten Zellen nicht näher beurteilt werden kann, ist ein sehr viel höherer Anteil apoptotischer Zellen vor allem für TBT denkbar, insbesondere wenn man bedenkt, dass nahezu alle analysierten Zellen offensichtlich durch Apoptose gestorben sind (Abb. 3.8).

Die Analyse der Kernmorphologie der über 24 Stunden mit TBT behandelten Kulturen zeigte, dass die Konzentrationen 0,3 bzw. 1 μM zu keinem Anstieg der Anteile nekrotischer bzw. apoptotischer Zellen an der ausgewerteten Population führten. Wie in Abbildung 3.8 zu

sehen, erzeugten jedoch 3 μM TBT einen sehr hohen Anteil an apoptotischen Zellen. Bei Betrachtung der aufgenommenen Fotos fiel auf, dass das Bild zu einem überwiegenden Anteil von propidiumiodid-positiven apoptotischen Kernen geprägt war. Der Anteil lag bei 46 %. Weiterhin waren auf Grund vieler vorliegender Zelltrümmer und zum Teil stark verklumpter Zellkernbestandteile die Bildausschnitte schwer beurteilbar und zeugten damit von der deutlichen Schädigung der Zellen. Im eingefügten Graphen der Abbildung 3.8 A ist zu erkennen, dass sich für diese Konzentration auch ein erheblicher Verlust an Zellprotein gegenüber den Kontrollen feststellen ließ. TBT schädigte in dieser Konzentration also die Zellen so stark, dass ein beträchtlicher Anteil an Zellen in einer Weise zerstört wurde, die zu zahlreichen nicht herunterzentrifugierbaren Trümmern führte. Die verbleibenden Zellen lieferten das in Abbildung 3.8 gezeigte Bild. Der Proteinverlust bestimmt den Anteil der sogenannten desintegrierten Zellen und korrigiert die analysierten Anteile, wie in Abbildung 3.9 zu erkennen.

Nach Korrektur der Werte zeigte sich für die Versuche an mit TBT exponierten Zellen über 24 Stunden, wie auf Abbildung 3.9 ersichtlich, folglich ein leicht abgeändertes Bild. Konzentrationen von 0,3 μM bzw. 1 μM TBT führten verglichen mit den Kontrollen zu keiner Veränderung der Kernmorphologie. Für die Kontrollschalen ergab sich eine Apoptoserate von $0,2 \pm 0,1$ % an der Gesamtzellzahl. Sowohl die mit 0,3 μM TBT behandelten Zellen mit einem Apoptoseanteil von $0,5 \pm 0,1$ % als auch die mit 1 μM TBT exponierten Zellen mit $0,5 \pm 0,05$ % Apoptoserate wichen nicht wesentlich von den Kontrollen ab.

Anders zeigte sich das kernmorphologische Bild in den Versuchen mit einer eingesetzten Konzentration von 3 μM TBT. Es ließ sich ein Gesamtapoptoseanteil an der Population von $24 \pm 5,9$ % feststellen (s. Abb. 3.9).

Die als apoptotisch gewerteten Zellen lagen fast ausschließlich (>90 %) als sogenannte spätapoptotische Zellen vor. Eine Erhöhung des Anteils nekrotischer Zellen gegenüber den Kontrollen konnte für keine Konzentration TBT festgestellt werden (s. Abb. 3.9).

Der Anteil sogenannter desintegrierter Zellen ergab sich aus der Einbeziehung des durch die Konzentration ausgelösten Proteinverlustes (siehe oben) und war für die mit 0,3 μM und 1 μM TBT vergifteten Zellen nicht erhöht. 3 μM TBT hingegen führte in den Versuchen über 24 Stunden zu einem Anteil von $37 \pm 7,2$ % desintegrierter Zellen an der Gesamtpopulation. Abbildung 3.9 B zeigt die ermittelten Anteile apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen, an der Population, die nach Exposition mit TMT der Färbung zur Verfügung stand. Es ließ sich für keine Konzentration TMT ein wesentlich erhöhter Anteil apoptotischer Zellen feststellen. Das Chromatin der angefärbten Zellkerne zeigte jedoch spezifische grobkörnige Verdichtungen (vgl. Abb. 3.7 B), die sich wiederholt für Zellen, die mit 1000 μM TMT behandelt wurden,

feststellen ließen; doch erlaubten diese morphologischen Veränderungen keine Einteilung der Zellen in die Gruppe der apoptotischen Zellen. Für die höchste verwendete Konzentration von 1000 μM TMT ließ sich so eine Apoptoserate von nur 4 % ermitteln.

Die eingefügte Graphik in Abbildung 3.8 zeigt, dass die Konzentration 1000 μM TMT wie einen beträchtlichen Proteinverlust verursachte. Es folgte die Ermittlung der Anteile desintegrierter Zellen, sowie die Korrektur der ursprünglichen Werte, wie in Abbildung 3.9 B dargestellt.

Nach dieser Korrektur kann festgehalten werden, dass die Exposition der Zellen mit TMT über 24 Stunden keine morphologisch erkennbare Erhöhung der Anteile apoptotischer Zellen an der Gesamtzellzahl gegenüber der Kontrolle ergab. 1000 μM TMT erzeugten eine Apoptoserate von $1,8 \pm 0,39$ %, dieser Wert lag nur unwesentlich über dem Anteil in der Kontrolle ($0,32 \pm 0,11$ %).

Für die Konzentrationen 10 μM und 100 μM ließ sich nach 24 Stunden ein Anstieg des Anteils der Zellen feststellen, die morphologisch als nekrotisch einzustufen sind. Mit $22 \pm 3,1$ % (10 μM) bzw. $28 \pm 2,3$ % (100 μM) Nekroserate lag ein deutlicher Unterschied zu den als Kontrollen behandelten Populationen vor ($4,2 \pm 0,9$ % Nekrose).

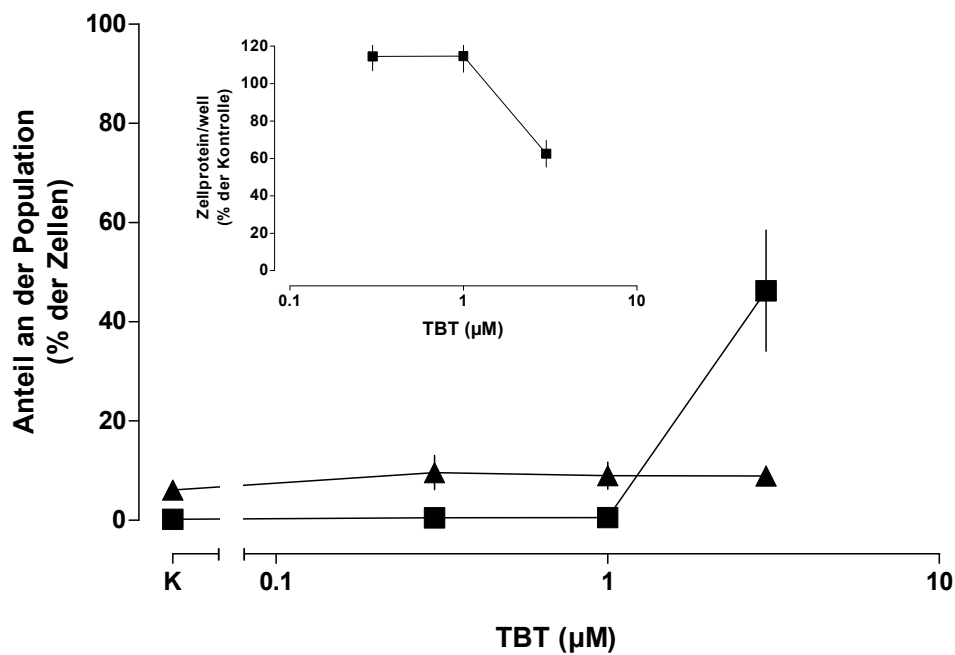
Eine Konzentration von 1000 μM führte lediglich zu einem Anteil nekrotischer Zellen von $9 \pm 1,9$ %, allerdings ergab die Proteinmengenbestimmung für diese Konzentration einen starken Proteinverlust mit einem gefolgerten Anteil desintegrierter Zellen von 53 ± 3 % an der Gesamtpopulation. 10 μM bzw. 100 μM führten zu einem Anstieg des Anteils desintegrierter Zellen von $11 \pm 4,9$ % (10 μM) bzw. 26 ± 9 % (100 μM), sodass eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve einen gleichmäßigen Anstieg des Anteils desintegrierter Zellen mit steigenden Konzentrationen erkennen lässt (s. Abb. 3.9).

In den Kontrollen zeigten sich nach 24stündiger Exposition ein Anteil nekrotischer Zellen von etwa 5 % sowie ein Anteil apoptotischer Zellen von unter 0,3 % an der Gesamtpopulation.

Unter alleiniger Einbeziehung der morphologischen Auswertung induzierte TBT somit nach einer Expositionszeit von 24 Stunden klar Apoptose, während sich ein solcher Effekt für TMT nicht nachweisen ließ. Unter Einhaltung der klar definierten Einteilungskriterien für einen apoptotischen Zellkern konnten Veränderungen, die TMT erzeugte, nicht als Apoptose gewertet werden.

Beiden Verbindungen gemeinsam war der hohe Anteil desintegrierter Zellen, der vor allem durch die höchsten eingesetzten Konzentrationen verursacht wurde.

A



B

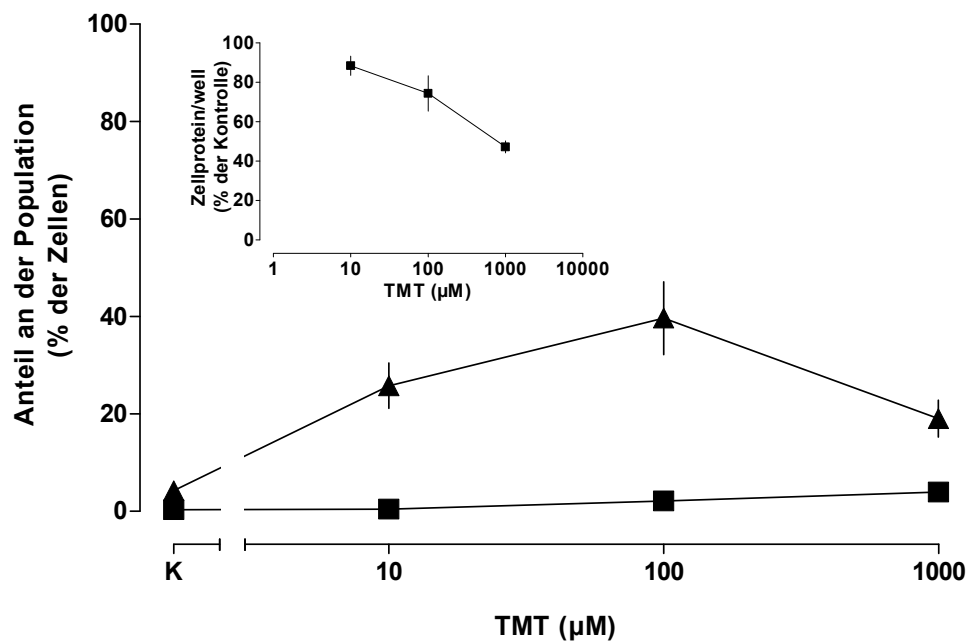


Abb. 3.8: Induktion von apoptotischem und nekrotischem Zelltod durch Organozinnverbindungen in wachstumsgehemmten C6 Gliomazellen

Die C6 Zellen wurden in 100 mm Schalen über 24 Stunden in DMEM mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Organozinnverbindungen inkubiert. Dargestellt ist der fluoreszenzmorphologisch bestimmte Anteil (■) apoptotischer Zellen sowie (▲) nekrotischer Zellen an der nach der Zentrifugation der Kulturen einer Analyse zur Verfügung stehenden Restpopulation. Die dargestellten Prozentwerte entsprechen Mittelwerten aus 8 (TBT) bzw. 6 (TMT) Versuchen (\pm SEM). Weiterhin ist dargestellt in den eingefügten Graphen der Einfluss der verschiedenen Organozinnkonzentrationen auf die Zellproteingehalte pro well in % der unbehandelten Kontrolle als Mittelwerte \pm SEM.

A: Exposition mit TBT

B: Exposition mit TMT

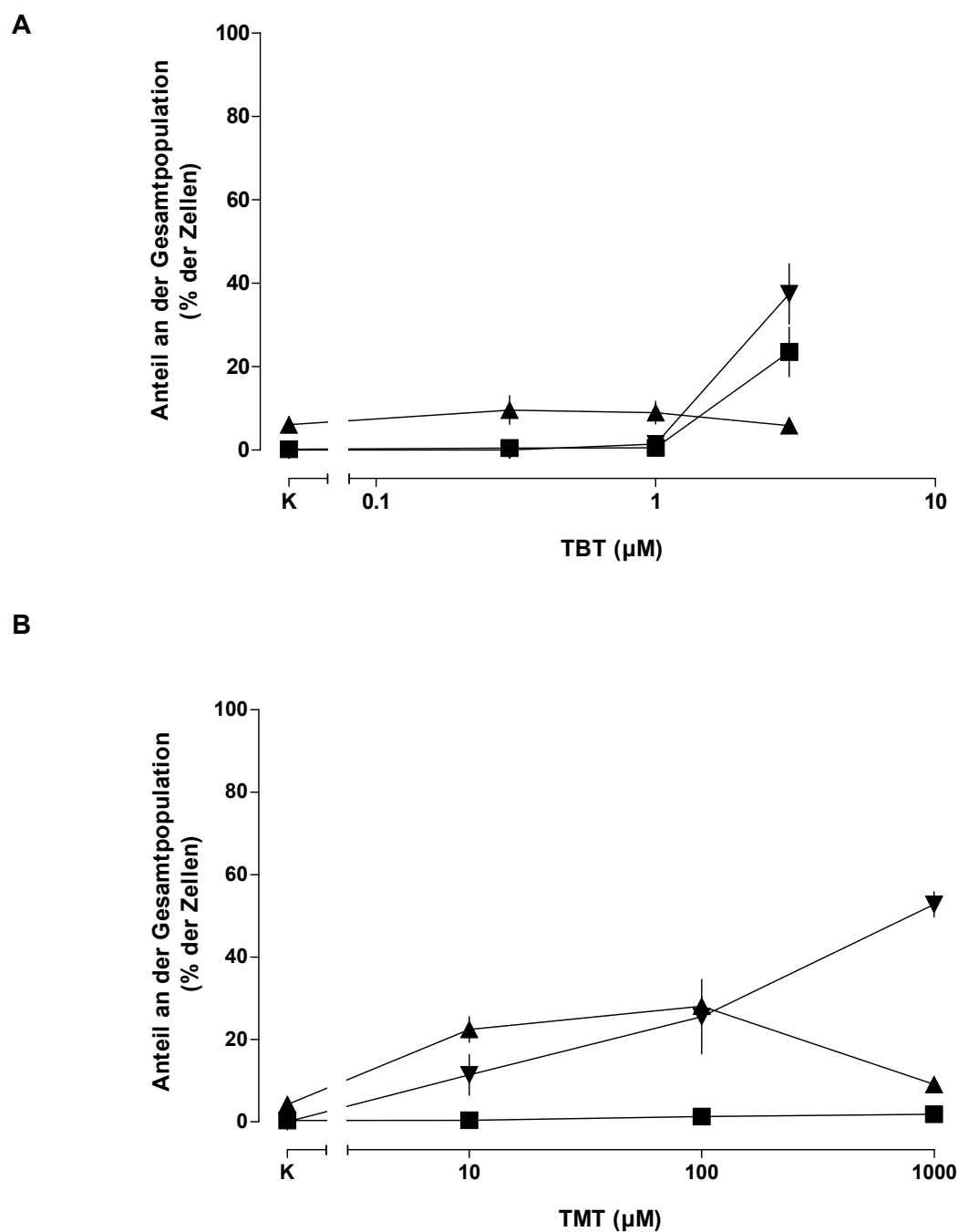


Abb. 3.9: Induktion von apoptotischem und nekrotischem Zelltod durch Organozinnverbindungen

Die C6 Zellen wurden in 100 mm Schalen über 24 Stunden in DMEM mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Organozinnverbindungen inkubiert. Dargestellt ist der fluoreszenzmorphologisch bestimmte Anteil (■) apoptotischer Zellen, (▲) nekrotischer sowie (▼) desintegrierter Zellen an der Gesamtpopulation; letzterer ergab sich aus der zugehörigen Proteinmengenbestimmung und dem Proteinverlust gegenüber der unbehandelten Kontrolle (s. eingefügte Graphen in Abb. 3.8). Die dargestellten Prozentwerte entsprechen Mittelwerten aus 8 (TBT) bzw. 6 (TMT) Versuchen (\pm SEM).

A: Exposition mit TBT

B: Exposition mit TMT

3.3.1.2 Messung der Caspase 3-Aktivität

Da die Aktivierung der Caspase 3, die als ein entscheidendes Enzym im Verlauf eines apoptotischen Zelltodes gilt, in Zellen direkt Hinweis auf einen solchen geben kann, wurde in einem weiteren Schritt der Einfluss beider Organozinnverbindungen auf die Aktivierung der Caspase 3 geprüft.

Dazu wurde die in Kapitel 2.4.4 beschriebene Methode angewandt, die mit Hilfe der kolorimetrischen Messung des Eduktes p-Nitroanilin, welches durch die Caspase von dem Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA abgespalten wird, Auskunft über die Aktivität dieses Enzyms gibt.

Abbildung 3.10 zeigt den Einfluss der verschiedenen Konzentrationen TBT bzw. TMT auf die Aktivierung der Caspase.

Nach einer Exposition über 24 Stunden ließ sich für keine Konzentration TBT ein Caspase 3-aktivierender Effekt nachweisen. Die gemessene Aktivität lag für die Kontrollschalen bei $5,1 \pm 0,4$ nmol p-NA/ mg Protein x 3 h. Zellen, die mit $0,3 \mu\text{M}$ TBT behandelt worden waren, erzeugten ein Signal von $4,4 \pm 0,18$ nmol, die mit $1 \mu\text{M}$ behandelten $4,7 \pm 0,22$ nmol. Auch die höchste verwendete Konzentration von $3 \mu\text{M}$ führte nach 24 Stunden zu einer Caspase 3-Aktivierung von lediglich $4,4 \pm 0,68$ nmol p-NA/ mg Protein x 3h, womit die Aktivität noch unter der in den Kontrollzellen lag (s. Abb. 3.10).

Ganz anders stellten sich die Ergebnisse für TMT dar. Während die Konzentrationen $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ nach 24 Stunden Exposition in den Zellen keine Erhöhung der Caspase 3-Aktivität erzeugten, konnte für $1000 \mu\text{M}$ TMT ein signifikanter ($p < 0,01$) Anstieg der Caspaseaktivität nachgewiesen werden. Mit $21 \pm 4,6$ nmol p-NA/ mg Protein x 3 h war ein deutlicher Unterschied zur Aktivität in den Kontrollen gegeben ($5,3 \pm 0,28$ nmol p-NA/mg Protein x 3 h) (s. Abb. 3.10).

Eine Aktivierung der Caspaseaktivität wurde somit nach 24stündiger Exposition durch TMT in der höchsten Konzentration erzeugt, welches in der morphologischen Betrachtung zu keiner Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen geführt hatte. Im Gegenzug induzierte TBT eine klare morphologisch nachweisbare Apoptose, führte jedoch nach 24 Stunden Expositionszeit zu keiner Caspaseaktivitätserhöhung. Diese scheinbare Diskrepanz galt es, in weiteren Versuchen zu überprüfen.

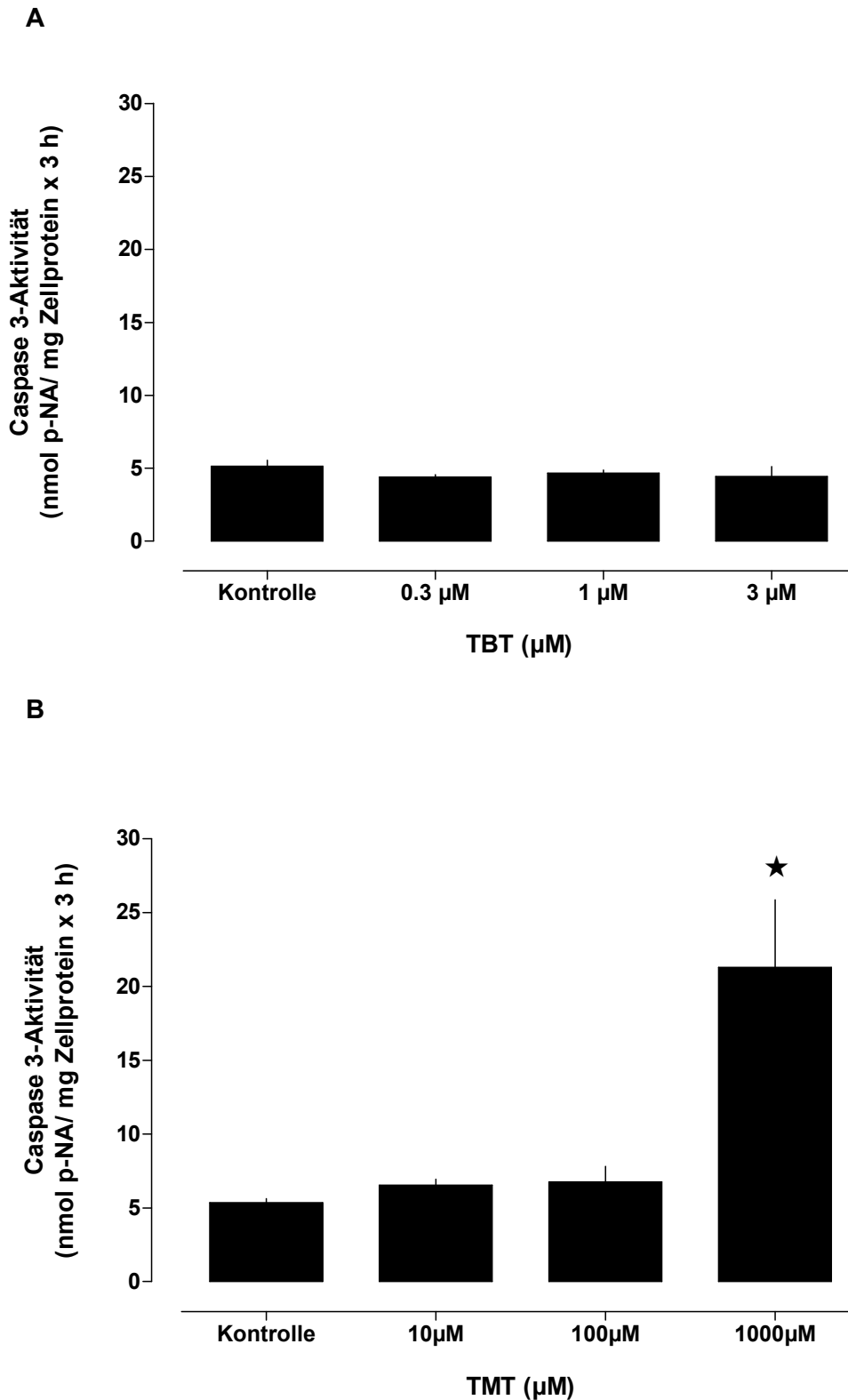


Abb. 3.10: Induktion von Apoptose durch TMT und TBT in C6 Gliomazellen - Einfluss der Organozinnverbindungen auf die Aktivierung der Caspase 3

Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM mit den verschiedenen Konzentrationen von TBT bzw. TMT inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) aus 8 (TBT) bzw. 6 (TMT) Versuchen. Nach Aufbereitung der Zellen erfolgte die Messung der Enzymaktivität in 96-Well-Platten; $\star p < 0.01$

A: Exposition mit TBT; **B:** Exposition mit TMT;

3.3.2 Zeitabhängigkeit der Induktion von Apoptose und Nekrose

Die Versuche über einen Expositionszeitraum von 24 Stunden lieferten Ergebnisse, die einen Teilaspekt der zelltodinduzierenden Wirkung von TBT und TMT charakterisieren. Aus den Messungen mit Hilfe des MTT-Assays waren die Besonderheiten der Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung beider Verbindungen bekannt.

So überraschte es kaum, dass in der morphologischen Analyse für die Exposition mit TBT der Effekt der wirksamen Konzentrationen von 3 μM nach 24 Stunden bereits ein sehr fortgeschrittenes Bild lieferte. Der Anteil apoptotischer Zellen war sehr hoch und diese lagen fast ausschließlich als sogenannte spätapoptotische Zellen vor. Außerdem war das Übersichtsbild von zahlreichen Zelltrümmern geprägt und auch der sehr hohe Anteil an desintegrierten Zellen zeugte von der deutlichen Schädigung der Zellen. Es war also, auch unter Berücksichtigung des aus den MTT-Messungen bekannten schnellen Wirkprofils, anzunehmen, dass der Zustand nach 24stündiger Exposition für TBT einen sehr späten Zustand darstellte und dass die entscheidenden Anfänge eines apoptotischen Zelltods zu früheren Zeitpunkten einsetzen. Auch die fehlende Caspaseaktivierung nach 24 Stunden fügte sich in die Annahme, dass der Prozess der Apoptose eventuell nach 24 Stunden bereits sehr weit fortgeschritten ist, nur noch wenige Zelltrümmer von diesem Ablauf zeugen und Enzymaktivitäten schon vermindert sind.

Auf Grund dieser Überlegungen lag es nahe, für TBT nach kürzeren Expositionszeiten Analysen der Morphologie und Caspaseaktivitätsmessungen durchzuführen und somit einen genaueren Eindruck über den zeitlichen Aspekt des durch diese Verbindung ausgelösten apoptotischen Zelltods zu erlangen.

Die Exposition mit 3 μM TBT wurde deshalb nach sowohl 1, 2, 4 und 6 Stunden beendet und die Ergebnisse in einen zeitlichen Zusammenhang zu den Messungen über 24 Stunden gebracht.

Aus den MTT-Messungen war weiterhin bekannt, dass die zytotoxische Wirkung von TMT einen zeitverzögerten Aspekt hat. Die fehlenden morphologischen Zeichen einer Apoptose nach Exposition mit 1000 μM TMT in den über 24 Stunden exponierten Zellen, dabei aber ein deutlicher Anstieg der Caspaseaktivierung, machte deshalb eine Einordnung dieser Abläufe in einen zeitlichen Rahmen auch für TMT wünschenswert. Sowohl sollte eine kürzere Expositionszeit gewählt werden, um den Verlauf der Caspaseaktivierung zu verfolgen, vor allem musste aber durch Analyse nach längerer Exposition geprüft werden, ob

morphologische Veränderungen der Zellkerne zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen und wie sich zu diesem Zeitpunkt die Aktivität der Caspase 3 darstellt.

Vor diesem Hintergrund wurden für 1000 μM TMT Versuche mit einer Expositionszeit von 6 und 48 Stunden angeschlossen und deren Ergebnisse in zeitliche Beziehung zu denen aus der 24stündigen Exposition gesetzt.

Durch die Einbeziehung der Ergebnisse, die die Betrachtungen über einen Verlauf mehrerer Stunden lieferten, wurde so das zeitliche Wirkprofil der einzelnen Organozinnverbindungen in Bezug auf den Einfluss auf die Art des verursachten Zelltodes deutlich.

Wie auch in den Versuchen mit 24stündiger Exposition wurde zu jeder morphologischen Analyse bzw. Caspaseaktivitätsmessung eine Zellproteinverlustmessung durchgeführt. So konnte stets der Anteil der sogenannten desintegrierten Zellen bestimmt werden (siehe oben) und die ermittelten Anteile der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen auf die Gesamtpopulation bezogen werden.

Der Verlauf der Zellproteinmengen in den unbehandelten Kontrollen zeigte, dass der Entzug von Kälberserum aus dem Medium, der zu einer Hemmung des Zellwachstums führt, nicht zu einem vollständigen Stopp im Wachstum führte. Die Kontrollen zeigten eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme der Zellproteinmengen über die Versuchszeit von ca. 4300 μg /Schale zu Beginn des Versuchs auf etwa 7000 μg nach 48 Stunden.

Dieser leichte Anstieg bestätigt die Messungen aus dem MTT-Assay, die ebenfalls eine leichte Zunahme über 72 Stunden gezeigt hatten (s. 3.2).

3.3.2.1 Morphologische Analysen

Bei den Beurteilungen über 1, 2, 4, 6 und 24 Stunden zeigte sich, dass TBT in der höchsten eingesetzten Konzentration von 3 μM einen Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation erzeugte, der schon nach wenigen Stunden einsetzte und im Verlauf immer deutlicher wurde, um schließlich den aus der 24stündigen Exposition bekannten Anteil von $24 \pm 5,9 \%$ zu erreichen. Auf Abbildung 3.11 B ist dieser Verlauf zu erkennen.

Bereits nach einer Stunde Expositionszeit deutete sich der Beginn eines apoptotischen Geschehens mit einem morphologisch erkennbaren Anteil an der Gesamtzellzahl von $0,9 \pm 0,72 \%$ an, nach nur 2 Stunden lag dieser bereits bei $13,6 \pm 5,7 \%$. 6 Stunden Exposition

führten schließlich zu einem Anteil, der sich im Verlauf nicht mehr änderte und dem aus der 24stündigen Messung entsprach, sodass nach dieser Zeit bereits von einer nahezu vollständigen Ausbildung der apoptoseinduzierenden Wirkung des TBT auszugehen war (s. Abb. 3.11 B).

Bei Differenzierung der apoptotischen Zellen in sogenannte früh- bzw. spätapoptotische fiel auf, dass zunächst der Anteil frühapoptotischer Zellen zunahm, in späteren Stunden dieser jedoch abgelöst wurde durch einen hohen Anteil spätapoptotischer Zellen (s. Abb. 3.12).

Der Anteil der Zellen, die nach morphologischer Betrachtung als nekrotisch einzustufen sind, war in keiner eingesetzten Konzentration und zu keiner untersuchten Zeit gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (s. Abb. 3.11 B)

Der nach Bestimmung der Proteinmengenkonzentration als „desintegriert“ einzustufende Anteil der Zellen, stieg wie auch der apoptotische Anteil schon nach kurzer Expositionszeit an und erreichte bereits nach 6 Stunden einen Anteil von $21 \pm 6,8 \%$.

Für die Exposition mit $1 \mu\text{M}$ TBT ergab sich keine Veränderung gegenüber den Kontrollschalen.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit TBT führte die eingesetzte Testkonzentration von $1000 \mu\text{M}$ TMT, wie Abbildung 3.11 C zeigt, auch im Zeitverlauf zu keinem wesentlichen Anstieg der morphologisch klar als apoptotisch einzustufenden Zellen an der Gesamtpopulation. Zwar erzeugte die höchste eingesetzte Konzentration wie oben beschrieben auch in den Betrachtungen über mehrere Stunden eine auffällige Veränderung des Kernchromatins, doch ließ sich diese nicht mit den Einteilungskriterien für die Kernmorphologie einer apoptotischen Zelle, wie sie im Vorfeld definiert worden waren, in Einklang bringen.

Eine Expositionszeit von 48 Stunden verursachte in 1 von 3 Versuchen ein morphologisch nicht auswertbares Bild, da zahlreiche Zelltrümmer und verklumpte Zellen eine Einteilung nicht möglich machten. In den restlichen beiden Versuchen ergab sich für die eingesetzte Testkonzentration ein erzeugter Anteil Gesamtapoptose an der Population von $7,2 \%$.

Nach 48 Stunden lag der Anteil nekrotischer Zellen in den mit $1000 \mu\text{M}$ TMT behandelten Zellen bei 16% (s. Abb. 3.11 C).

Nach 6 Stunden ergab sich sowohl in den Apoptoseraten als auch im Anteil nekrotischer Zellen an der Gesamtpopulation für die getestete Konzentration von $1000 \mu\text{M}$ kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen.

Der Anteil sogenannter desintegrierter Zellen stieg im Zeitverlauf stetig an und lag nach 6 Stunden bei 9,4 %, nach 24 Stunden bereits bei 53 ± 3 % und nach 48 Stunden bei schließlich $61 \pm 1,4$ %.

Bei Differenzierung des wohl bemerkt sehr geringen erkennbaren Apoptoseanteils in sogenannte früh- bzw. spätapoptotische Zellen zeigte sich wie auch beim TBT (s. Abb. 3.12) ein Wechsel von einem hohen Anteil frühapoptotischer Zellen nach kurzen Expositionszeiten hin zu einem Überwiegen der spätapoptotischen nach längerer Zeit.

Die stets ebenfalls untersuchte unbehandelte Kontrolle zeigte, wie in Abbildung 3.11 A dargestellt, keine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen an der Population im Verlauf der Zeit. Der Anteil lag stabil bei <1 %. Der Anteil nekrotischer Zellen hielt sich auf einem Level von <6 %.

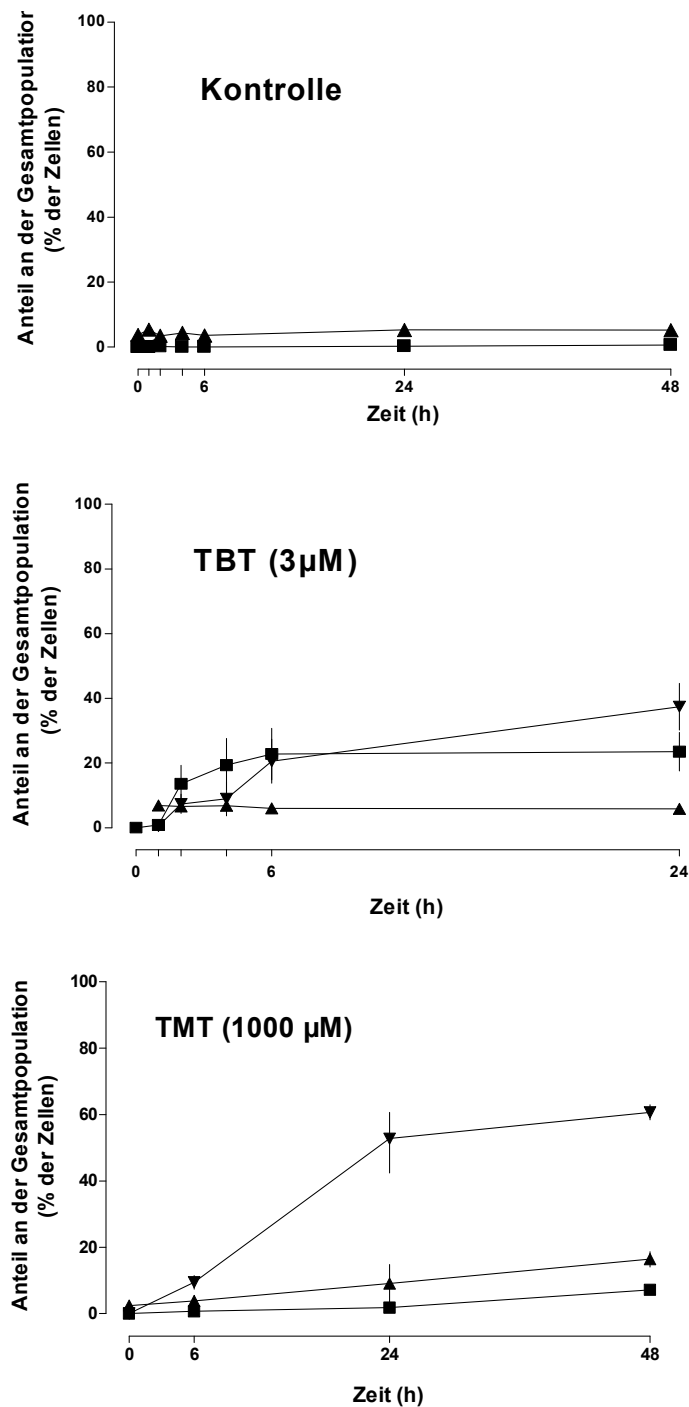


Abb. 3.11: Zeitabhängigkeit der Induktion von Apoptose und Nekrose durch Organozinnverbindungen in C6 Gliomazellen

Die Zellen wurden für 1,2,4,6 und 24 Stunden (TBT) bzw. für 6, 24 und 48 Stunden (TMT) in DMEM mit den jeweiligen Konzentrationen der Organozinnverbindungen inkubiert.

Dargestellt ist der fluoreszenzmorphologisch bestimmte Anteil (■) apoptotischer Zellen, (▲) nekrotischer sowie (▼) desintegrierter Zellen an der Gesamtpopulation; letzterer ergab sich aus der zugehörigen Proteinmengenbestimmung und dem Proteinverlust gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Die dargestellten Prozentwerte entsprechen Mittelwerten aus 5 (TBT) bzw. 2 (TMT) Versuchen (\pm SEM/ range).

Weiterhin sind dargestellt die Anteile apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen und ihr Verlauf über die Zeit in den unbehandelten Kontrollen als Mittelwert der Anteile aus allen Versuchen.

Kontrolle; Exposition mit 3 µM TBT; Exposition mit 1000 µM TMT;

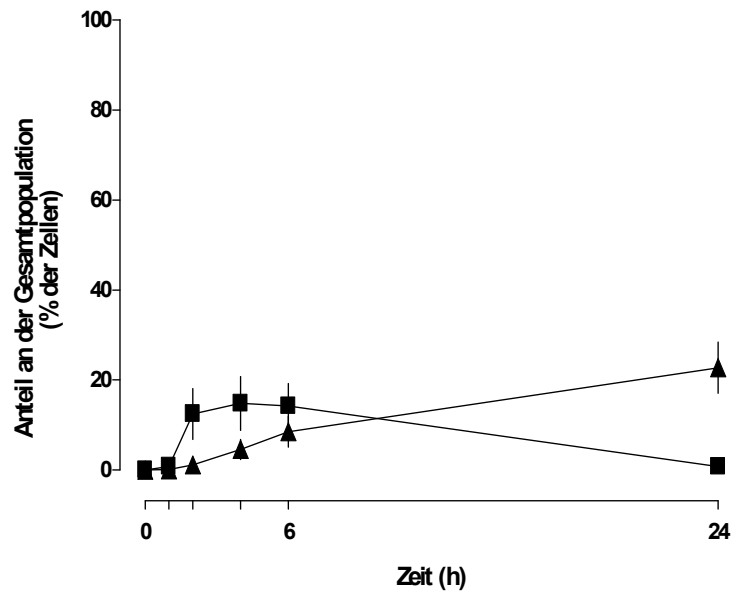


Abb. 3.12: Veränderung der morphologisch erkennbaren Erscheinungsform der Apoptoseanteile von (■) „frühaoptotischen“ Anteilen zu (▲) „spätaoptotischen“ über den Verlauf der Expositionszeit.

Exemplarisch ist der Verlauf für die Exposition mit 3 μM TBT dargestellt. Die Prozentwerte entsprechen den Mittelwerten aus 5 Versuchen ($\pm\text{SEM}$).

Die morphologischen Betrachtungen über einen Zeitverlauf von mehreren Stunden betätigten damit die deutlichen Unterschiede im zeitlichen Wirkprofil beider Organozinnverbindungen.

Stellt man, wie in Abbildung 3.13 geschehen, die Anteile an apoptotischen Zellen, die durch TBT bzw. TMT Exposition verursacht werden, gegenüber, fällt auf, dass TBT in kürzester Zeit einen apoptotischen Zelltod verursacht. Damit bestätigen sich die Beobachtungen aus den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Zytotoxizität der Substanz mit Hilfe des MTT-Assays. TBT stellt sich als eine Verbindung dar, die sehr schnell wirkt. Ist die rasche Wirkung des TBT einmal eingetreten, beeinflussen die Dauer der Exposition die Ausprägung dieser Wirkung nur noch unwesentlich.

TMT erzeugte, nach morphologischen Gesichtspunkten beurteilt, nur wenig apoptotischen Zelltod. Diese geringe Apoptose setzte dann aber erst sehr spät ein. Auch hier findet sich also das charakteristische Wirkprofil der Verbindung wieder. Es kommt nach Exposition mit 1000 μM TMT zu einer verzögerten Wirkung im Sinne einer Apoptose, wie auch aus den Versuchen zur allgemeinen Zytotoxizität mittels des MTT-Assays bekannt.

Nach alleiniger Analyse der Zellkernmorphologie ist anzunehmen, dass beide Substanzen das Potential haben, einen apoptotischen Zelltod zu induzieren. Jedoch ist dieses bei TBT um ein vielfaches größer als beim TMT.

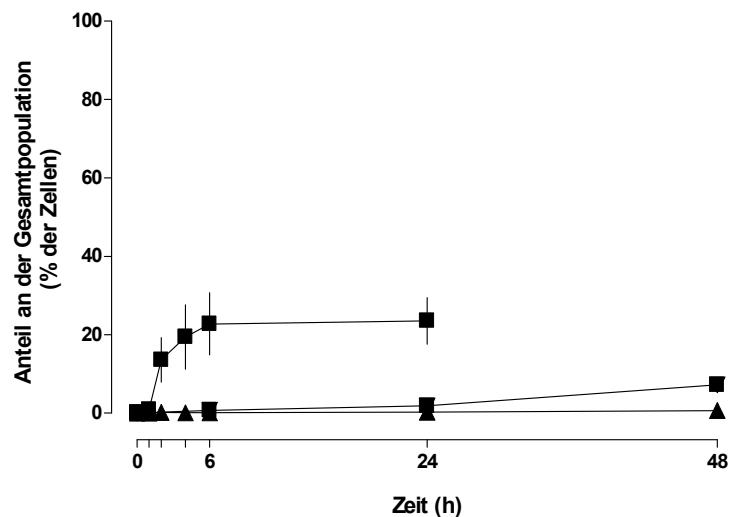


Abb. 3.13: Induktion von Apoptose durch Organozinnverbindungen im zeitlichen Verlauf

Die dargestellten Prozentwerte entsprechen den in Abbildung 3.11 dargestellten Mittelwerten. Dargestellt ist der Anteil apoptotischer Zellen erzeugt durch (■) 3 µM TBT, (▼) 1000 µM TMT bzw. der Anteil in den (▲) Kontrollschalen.

3.3.2.2 Messung der Caspase 3-Aktivität

Die morphologische Analyse der Zellkernmorphologie kann stets nur einen Baustein der Untersuchung auf die Induktion eines apoptotischen Zelltodes liefern.

Gerade bei den Versuchen mit TMT war aufgefallen, dass eine fehlende morphologische Veränderung der Kerne sehr wohl mit einer Aktivierung der Caspase 3 vergesellschaftet war. Andersherum war in den Versuchen mit 24stündiger Exposition für TBT keine Aktivierung des Enzyms nachweisbar gewesen, obwohl eine deutliche Kernmorphologie auf ein apoptotisches Geschehen hinwies.

Um diese Diskrepanzen genauer einzuordnen können, war es in den Versuchen zur Zeitabhängigkeit der Apoptoseinduktion besonders wichtig, die Caspaseaktivierung zu messen.

Es sollte geklärt werden, welche weiteren Hinweise auf ein apoptotisches Geschehen zu finden sind, aber auch, in welchem zeitlichen Verhältnis zu etwaigen morphologischen Veränderungen die Enzymaktivität steht und welche Unterschiede zwischen den getesteten Substanzen sich darstellen.

Abbildung 3.14 bringt die gemessene Caspase 3-Aktivierung direkt mit den ermittelten Anteilen aus den morphologischen Analysen in Zusammenhang. Nach Messung der Caspase 3-Aktivität zeigte sich, dass TBT in einer Konzentration von 3 μ M wiederholt keine Aktivierung nach 24 Stunden Expositionszeit erzeugte, dass jedoch dieselbe Konzentration nach nur einer Stunde Exposition und noch stärker nach 2, 4 und 6 Stunden einen massiven Anstieg der Caspase 3-Aktivität verursachte.

Die gemessene Aktivität nach einstündiger Exposition lag mit $11 \pm 3,1$ nmol p-NA/ mg Protein x 3 h bereits etwa doppelt so hoch wie in den Kontrollschalen mit $5 \pm 0,27$ nmol p-NA/ mg Protein x 3 h. Nach 2 Stunden Exposition mit 3 μ M TBT erreichte die Caspase 3-Aktivität einen Höchstwert von $29 \pm 8,4$ nmol p-NA/ mg Protein x 3h und hielt sich auch nach 4 bzw. 6 Stunden Expositionszeit etwa auf diesem Level, um dann wieder auf den niedrigen Aktivitätswert der 24-Stunden-Messung abzufallen (s. Abb. 3.14 A).

Stellt man, wie hier geschehen, den Anstieg der Caspaseaktivität über den Zeitverlauf dem Anstieg des morphologisch erkennbaren Apoptoseanteils gegenüber, zeigt sich, dass die Caspaseaktivitätserhöhung der Erhöhung der Apoptoserate leicht vorausgeht.

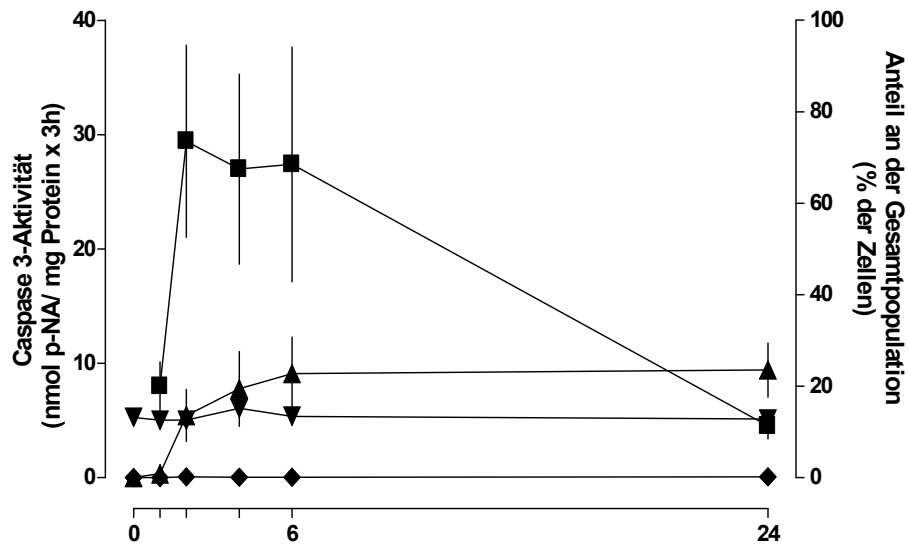
Für die Versuche mit 1 μ M TBT ließ sich in der Caspaseaktivitätsmessung keinerlei Unterschied zu den Kontrollen nachweisen.

Die Messung der Caspaseaktivität nach Behandlung der Zellen mit TMT lieferte ganz andere Ergebnisse. In Abbildung 3.14 B ist der Verlauf zu erkennen. Eine Exposition mit 1000 μ M TMT erzeugte nach 6 Stunden eine Caspaseaktivität von 5,1 nmol p-NA/ mg Protein x 3 h, womit kein Unterschied gegenüber der Kontrolle mit 5,3 nmol p-NA/ mg Protein x 3 h gegeben war. Nach 24 Stunden jedoch war für 1000 μ M der beschriebene massive Aktivitätsanstieg zu beobachten ($21 \pm 4,6$ nmol p-NA/ mg Protein x 3 h).

Der letzte untersuchte Zeitabschnitt von 48 Stunden lieferte wiederum keinen Signalanstieg in den mit 1000 μ M TMT behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen.

Abbildung 3.14 B zeigt, dass mit diesem Aktivitätsverlauf, wie auch beim TBT, der Anstieg der Caspase 3-Aktivität der morphologisch erkennbaren, beim TMT jedoch geringen Erhöhung der Apoptoserate vorausgeht.

A



B

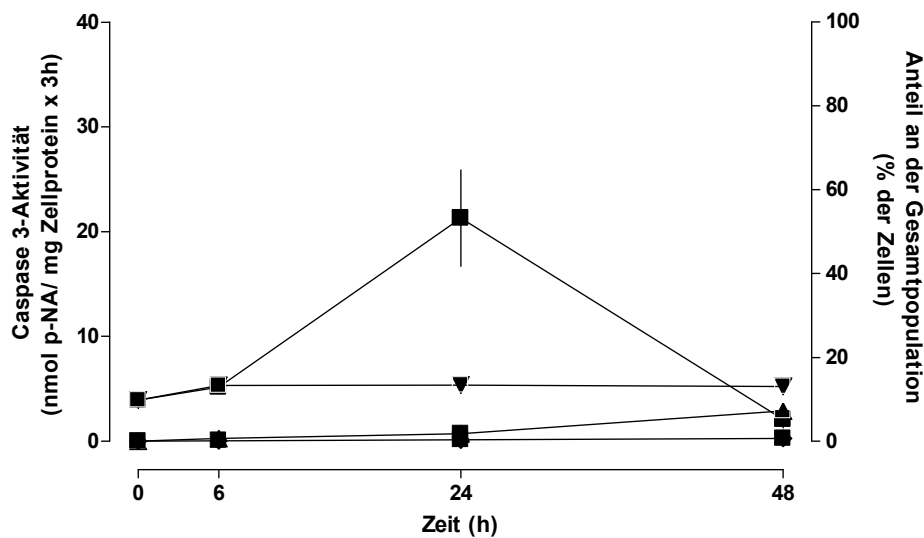


Abb. 3.14: Aktivierung der Caspase 3 und Induktion eines apoptotischen Zelltods durch Organozinnverbindungen nach Exposition über mehrere Stunden

Die dargestellten Extinktionswerte entsprechen den Mittelwerten (\pm SEM/range) aus 5 (TBT) bzw. 2 (TMT) Versuchen. Die dargestellten Prozentwerte entsprechen den in Abbildung 3.11 gezeigten.

Dargestellt ist auf der linken Achse die Caspaseaktivierung erzeugt durch (■) die Organozinnverbindung bzw. der Extinktionswert der (▼) Kontrolle, sowie auf der rechten Achse die apoptotischen Anteile an der Gesamtpopulation, induziert durch (▲) die Organozinnverbindung bzw. der Anteil in der (◆) Kontrolle.

A: Exposition mit 3 μ M TBT

B: Exposition mit 1000 μ M TMT

Damit ergibt sich in der Zusammenschau, erkennbar in Abbildung 3.15, dass beide Organozinnverbindungen eine deutliche Erhöhung der Caspase 3-Aktivität in den Zellen bedingen, dass sie sich jedoch in dem Zeitpunkt dieses Effektes nach Exposition stark unterscheiden. Wie in den übrigen Versuchen zu TBT ist das Eintreten einer Wirkung, hier die Induktion von Caspase 3-Aktivität, schon nach kurzer Zeit zu beobachten.

Der im Gegensatz dazu verzögerte Caspase 3-Aktivitätsanstieg in mit TMT behandelten Zellen erst nach 24 Stunden fügt sich in das Bild eines in sämtlichen Versuchen feststellbaren verlängerten zeitlichen Wirkprofils des TMT.

Nach Einordnung dieser Ergebnisse ist somit anzunehmen, dass sowohl TBT als auch TMT einen apoptotischen Zelltod bedingen. Eine morphologisch klare Veränderung ist zwar nur bei TBT nachweisbar, doch weist die klare Induktion von Caspase 3-Aktivierung auch auf ein apoptotisches Geschehen in mit TMT behandelten Zellen hin.

Die Unterschiede in der zeitlichen Wirkung beider Verbindungen bleiben auch in den Untersuchungen zur Apoptoseinduktion zu erkennen.

Apoptose erscheint damit als ein Geschehen, das in unterschiedlichen Geschwindigkeiten verlaufen kann. Möglicherweise sind unterschiedliche vorgeschaltete Auslösemechanismen dafür verantwortlich.

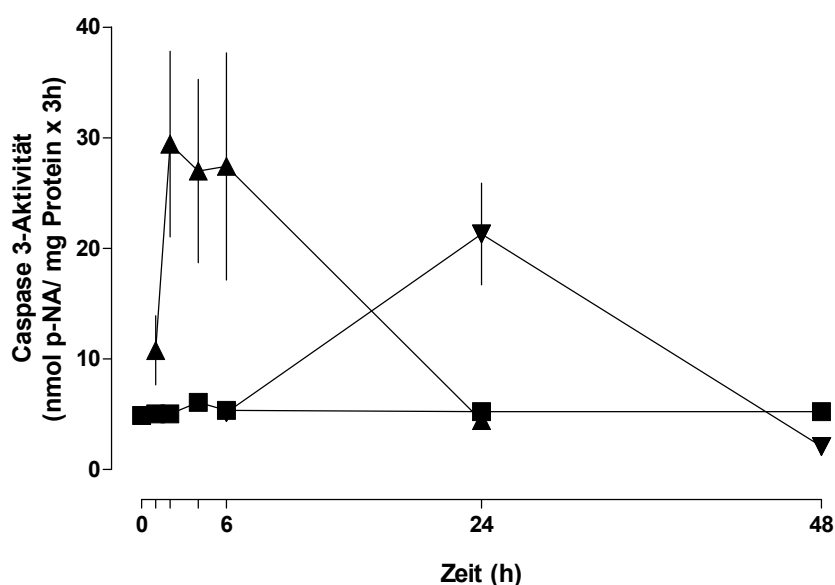


Abb. 3.15: Zeitlicher Verlauf des Einflusses der beiden Organozinnverbindungen auf die Aktivierung der Caspase 3 in C6 Gliomazellen

Die dargestellten Werte entsprechen denen aus Abb. 3.14. Dargestellt ist die Caspaseaktivierung erzeugt durch (▲) 3µM TBT, (▼) 1000 µM TMT sowie die Aktivität in den als (■) Kontrollen behandelten Zellen.

3.4 Einfluss der Organozinnverbindungen auf die zelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Nachdem sowohl für TMT als auch für TBT untersucht worden war, ob die Verbindungen einen apoptotischen oder einen nekrotischen Zelltod in C6 Gliomazellen induzieren, warf sich in einem weiteren Schritt die Frage auf, ob der durch TBT bzw. TMT induzierte Zelltod durch oxidativen Stress ausgelöst wird.

Mehrere Studien bringen die Erzeugung von oxidativem Stress mit der Induktion eines apoptotischen Zelltods in Zusammenhang (Wang et al., 2009).

Da beide Verbindungen hier Hinweise auf ein apoptotisches Geschehen lieferten, jedoch die deutlichen Unterschiede in der Zytotoxizität und vor allem im zeitlichen Verlauf weiterhin ins Auge fielen, lag es nahe, mittels der Messung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einen der Erzeugung einer Apoptose möglicherweise vorgeschalteten Prozess in den Zellen zu untersuchen und zu prüfen, ob sich hierin Unterschiede zwischen TMT und TBT finden lassen.

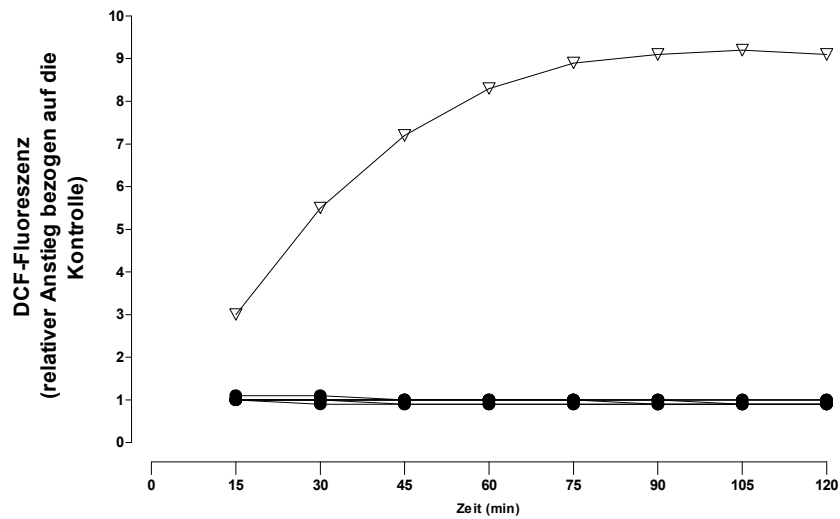
Die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies wurde mit der unter 2.4.5 beschriebenen Methode untersucht.

Die Zellen wurden mit DCFH-DA aufgeladen und im Anschluss mit den jeweiligen Konzentrationen der Organozinnverbindung behandelt. Anschließend wurde die emittierte Fluoreszenz sofort im Fluorimeter gemessen. Die Veränderung des Fluoreszenzsignals wurde über jeweils 2 Stunden in viertelstündigen Abständen gemessen und dem emittierten Signal der unbehandelten Kontrolle gegenübergestellt.

Abbildung 3.16 zeigt den Einfluss der verschiedenen Konzentrationen TBT bzw. TMT auf die fluorimetrisch messbare zelluläre Radikalbildung.

Die Messung ergab für beide Verbindungen keinen Anstieg der Fluoreszenz. Während die Fluoreszenz bei den mit der Positivkontrollsubstanz CHP (500 μM) behandelten Zellen nach 8 Zyklen Werte von 10 - 30.000 Fluoreszenzeinheiten erreichte (in den unbehandelten Kontrollen stieg die Fluoreszenz auf bis max. 3000 Fluoreszenzeinheiten), war in den behandelten Wells unabhängig von der eingesetzten Konzentration nach 8 Zyklen sowohl für TBT als auch für TMT keinerlei Erhöhung der Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle nachweisbar. Es kann also geschlussfolgert werden, dass beide Organozinnverbindungen zu keinerlei Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen.

A



B

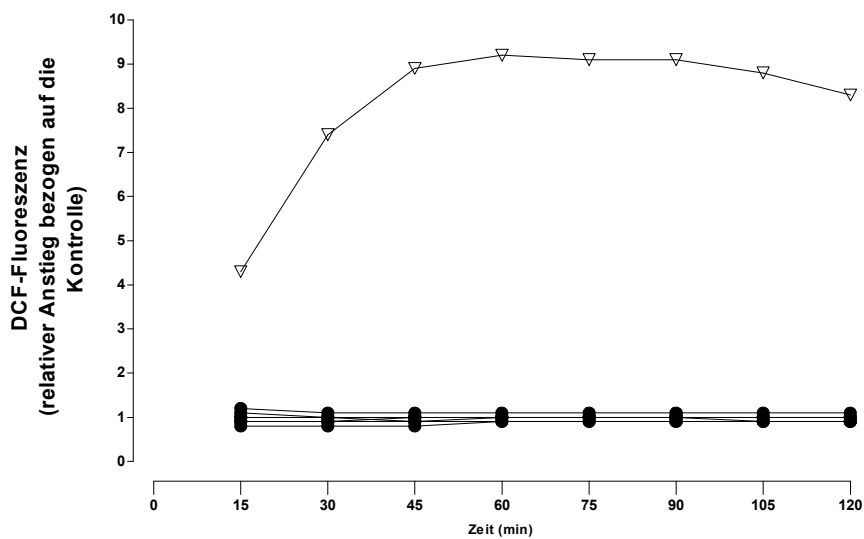


Abb. 3.16: Einfluss der Organozinnverbindungen auf die zelluläre Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DCFH-DA aufgeladen und im Anschluss mit (A) 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 bzw. 10 μM TBT bzw. (B) 1, 3, 10, 30, 100, 300 bzw. 1000 μM TMT behandelt. Die unmittelbar danach emittierte Fluoreszenz wurde in Beziehung zu der in den unbehandelten Kontrollen messbaren Fluoreszenz gesetzt. Dargestellt ist jeweils ein Versuch.

Die einzelnen Kurven liegen im Graphen nahezu deckungsgleich übereinander. Weiterhin ist dargestellt der relative Anstieg der Fluoreszenz gegenüber der der unbehandelten Kontrolle, hervorgerufen durch die Behandlung mit 500 μM des als Positivkontrolle eingesetzten CHP (▽).

3.5 Einfluss von Organozinnverbindungen auf Lipidperoxidation in den Zellen

Ein weiterer Indikator für oxidativen Stress ist die Lipidperoxidation. Um zu prüfen, ob TBT bzw. TMT zu einer Lipidperoxidation in C6 Zellen beitragen, wurde der in 2.4.6 beschriebene Thiobarbiturat-Test verwendet. Dabei wird die Bildung Thiobarbitursäure reaktiver Substanzen (TBARS) photometrisch gemessen und als Malondialdehyd (MDA)- Äquivalent ausgedrückt. MDA entsteht in Zellen, in denen Lipidperoxidation stattfindet, und kann mit Thiobarbitursäure zu einem photometrisch messbaren Komplex reagieren.

Abbildung 3.17 zeigt, dass eine solche Erhöhung der Menge an „TBARS“ (nmol/mg Zellprotein) für beide Organozinnverbindungen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden nicht gemessen werden konnte. Die Menge an „thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen“ in den Kontrollen lag bei $1,1 \pm 0,03$ nmol/mg Protein; einen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied dazu ergaben die Messungen der Menge, die in den mit der Positivkontrollsubstanz CHP (100 μ M) behandelten Zellen vorhanden war und bei $3,2 \pm 0,43$ nmol/mg Zellprotein lag. Weder nach Exposition mit 1 μ M TBT noch mit 3 μ M TBT ($0,94 \pm 0,18$ nmol/mg Zellprotein) konnte ein ähnlicher Effekt beobachtet werden.

1 μ M TBT führte sogar mit $0,75 \pm 0,02$ nmol/mg Zellprotein zu einer signifikant geringeren Menge TBARS als die Kontrollen.

Auch TMT wirkte nicht lipidperoxidierend; sowohl in einer Konzentration von 100 μ M ($0,78 \pm 0,18$ nmol/mg Zellprotein) als auch in einer Konzentration von 1000 μ M ($1,42 \pm 0,17$ nmol/mg Zellprotein) war keine Erhöhung gegenüber den Kontrollen zu verzeichnen (s. Abb. 3.17).

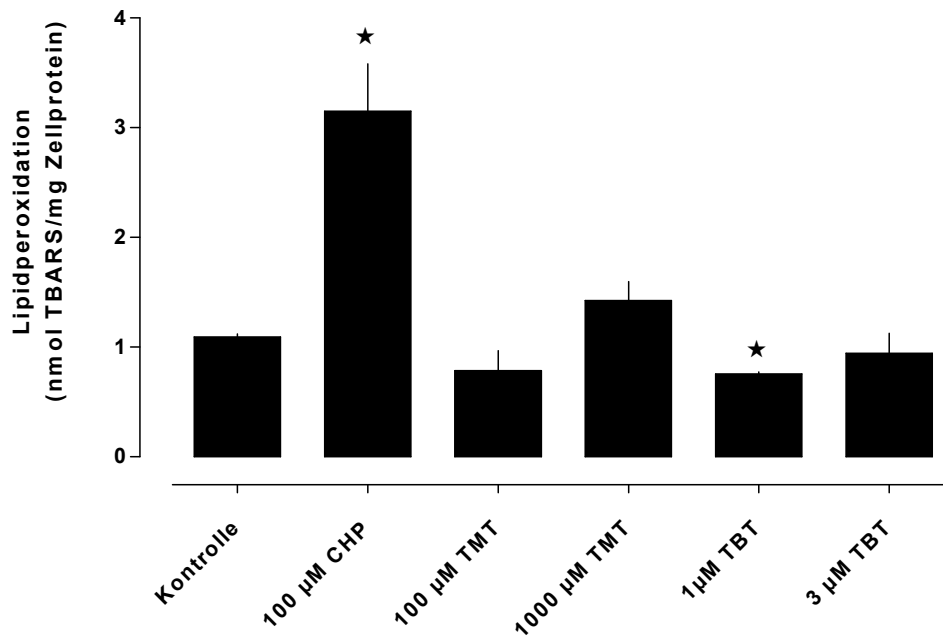


Abb. 3.17: Einfluss der Organozinnverbindungen auf Lipidperoxidation in C6 Gliomazellen

Die Zellen wurden für 24 Stunden in DMEM mit den unterschiedlichen Konzentrationen an TBT bzw. TMT inkubiert. Dargestellt ist die Menge der Thiobarbitursäure reaktiven Substanzen (TBARS), die in den exponierten Zellen entstehen, als Mittelwerte aus 3 Versuchen (\pm SEM). (* $p < 0,05$, gepaarter t-test)

4 Diskussion

Bezug nehmend auf frühere Studien, die sich mit den Unterschieden zwischen der zytotoxischen Wirkung von TBT und TMT befassten (Seibert et al., 2004), galt es in dieser Arbeit zunächst zu prüfen, ob die früheren Ergebnisse hier reproduzierbar waren.

Dazu wurden Versuche mit 24stündiger Expositionszeit durchgeführt, die als Endpunkt den Verlust von Zellen, der durch die beiden Organozinnverbindungen hervorgerufen wurde, verwendeten.

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse decken sich dabei in hohem Maße mit den aus der Literatur für dieses Verfahren bekannten Werten. Der EC_{50} -Wert nach 24stündiger Exposition lag für TBT bei 0,34 μM , Seibert et al. konnten unter gleichen Versuchsbedingungen einen Wert von 0,35 μM festhalten.

Der für TMT gemessene EC_{50} -Wert von 5,1 μM deckt sich ebenfalls mit den von Seibert et al. beschriebenen Werten (5,2 μM).

Bei alleiniger Beurteilung der Zytotoxizität anhand des verursachten Zellverlustes nach 24 Stunden erscheint TBT um ein vielfaches potenter als TMT.

Die hier eingesetzte Zellproteinmessung stellt eine einfache Möglichkeit dar, Aussage über die Zytotoxizität von Verbindungen zu treffen. Der Proteinverlust spiegelt dabei den Anteil der Zellpopulation wider, der sich vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst hat und beim Waschen der Kulturen verloren geht. Übrig bleiben angeheftete Zellen, deren Zellprotein im Verlauf quantifiziert wird (s. 2.4.1). Ob abgelöste Zellen jedoch nicht mehr vital sind und ob dieses Verfahren deshalb stichhaltige Hinweise auf eine zytoletale Wirkung liefern kann, bleibt letztlich offen.

Vor diesem Hintergrund wurde ein zweiter Assay in die Messung der zytotoxischen Wirkung der Verbindungen einbezogen: Der MTT-Assay erlaubt eine Aussage über die Stoffwechselaktivität von Mitochondrien (s. 2.4.2) und damit über die Vitalität der Zellen. Durch einen Verzicht auf das Waschen der Kulturen am Ende der Exposition bleiben auch abgelöste Zellen im System erhalten. Damit unterscheidet sich dieses Verfahren von der Zellproteinmessung und liefert zusätzliche Informationen.

Tatsächlich konnte ein Unterschied festgestellt werden zwischen den Ergebnissen, die beide Verfahren lieferten. Dieser war bei Versuchen, in denen TBT zum Einsatz kam, erkennbar: Niedrigere Konzentrationen waren nötig, um einen Verlust von Zellprotein gegenüber der Kontrolle zu erzeugen als um einen Vitalitätsverlust gleichen Ausmaßes im MTT-Assay zu

bewirken. Der Unterschied betrug ca. Faktor 3,5 bezogen auf die EC_{50} -Werte in der MTT-Messung. Diese Tatsache lässt den Schluss zu, dass die Zellen, die nach Exposition mit TBT ihre Anheftungsfähigkeiten verlieren, zu einem gewissen Anteil noch Vitalität besitzen.

Der Unterschied zwischen den Ergebnissen beider Verfahren zeigte sich jedoch viel stärker nach Exposition mit TMT. Eine um etwa 90fach höhere Konzentration an TMT war nötig, um einen Vitalitätsverlust zu erzeugen als um einen Zellproteinverlust gleichen Ausmaßes zu erzeugen. Auch hier muss demnach ein Anteil der Zellen, für dessen Ablösung TMT verantwortlich ist, noch am Leben sein. Im Gegensatz zu TBT ist dieser Anteil vitaler abgelöster Zellen jedoch ungleich höher.

Es erscheint also möglich, dass TBT ein Ablösen der Zellen vom Untergrund bewirkt, dass dieses aber zum Großteil mit dem Tod der Zellen einhergeht. Ganz anders scheint TMT zu wirken. Es erzeugt in niedrigen Konzentrationen ein Ablösen der Zellen, jedoch sind diese Zellen zum überwiegenden Teil noch vital und sterben erst bei sehr viel höheren Konzentrationen.

Misiti et al. konnten in ihren Versuchen 2008 mit dem MTT-Assay für TMT in PC12-Zellen (Phäochromozytomzellen) einen ähnlichen Effekt zeigen: Nach Auszählung nicht angehefteter Zellen nach Exposition mit TMT zeigte sich, dass die Menge dieser nicht mit dem im Viabilitätsassay gemessenen Vitalitätsverlust korrelierte (Misiti et al., 2008). Auch hier war die Adhärenz stets stärker beeinflusst als die Vitalität der Zellen.

Welche biochemischen und molekularen Wirkmechanismen und Angriffsorte dabei involviert sind, ist bislang unklar. Deshalb und auf Grund der starken Unterschiede in der Toxizität von TBT und TMT bestand das Interesse, die den Zelltod herbeiführenden Mechanismen nach der Exposition mit Organozinnverbindungen und eventuelle Unterschiede in diesen Abläufen zu ergründen.

Zwei grundsätzlich zu unterscheidende Formen des Zelltodes stellen Apoptose und Nekrose dar. Unter der Vorstellung, dass ein apoptotischer Zelltod ein Geschehen ist, bei dem komplexe biochemische Abläufe programmiert vonstatten gehen und diese eine morphologische Veränderung bedingen, war es vorstellbar, dass das langsame Ablösen der Zellen, ohne sofort sämtliche Vitalität zu verlieren, ein Ausdruck eines apoptotischen Geschehens ist. Eine apoptotische Zelle schrumpft, trennt sich vom umgebenden Gewebe und fragmentiert (Saraste et Pulkki, 2000), sodass für TMT ein solcher Verlauf denkbar war.

Eine weitere Besonderheit, die den MTT-Assay betrifft, beobachteten schon Karpiak und Eyer 1999. Sie konnten in Zellen, die mit einer niedrigen, in anderen Verfahren nicht als toxisch nachweisbaren Konzentration von TMT behandelt worden waren, einen Anstieg der Formazanbildung nach 24 Stunden messen. Sie vermuteten hinter dieser Beobachtung

einen Anstieg der metabolischen Zellaktivität in den mit TMT behandelten Zellen, der einer Schädigung vorausgeht. Einiges spricht dafür, dass TMT eine Verbindung ist, die in vielerlei Hinsicht zunächst eine Aktivierung in Zellen hervorruft. In Astrozyten scheint TMT eine Aktivierung auszulösen, die durch eine erhöhte Synthese des „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) gekennzeichnet ist (s.u.).

Gleichwohl konnte eine Erhöhung der Formazanbildung in mit TMT behandelten Zellen in den hier durchgeführten Versuchen nie beobachtet werden. Möglich ist jedoch, dass einzelne Anteile der hier behandelten Kulturen solch eine Umsatzerhöhung zeigen, diese aber durch den Vitalitätsverlust anderer Zellen überlagert wird. Resultat dieser Überlagerung könnte das Plateau sein, das in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve auffällt.

Abgesehen von den Unterschieden zwischen den Ergebnissen beider Messverfahren für jeweils TBT und TMT blieb auch nach der MTT-Messung der große Unterschied in der zytotoxischen Potenz beider Substanzen augenfällig. TBT wirkte mit einem EC_{50} -Wert von $1,2 \mu\text{M}$ um ein Vielfaches vitalitätsschädigender als TMT ($440 \mu\text{M}$).

Vergleicht man die in der Literatur veröffentlichten EC_{50} -Werte, fällt auf, dass die Werte für TBT-Exposition stets dicht beieinander liegen. Dabei ist es relativ unerheblich, welche Zellen mit TBT behandelt werden, die EC_{50} -Werte bewegen sich stets in dem hier gemessenen Bereich von ca. $0,3 \mu\text{M}$ (Zellproteinverlust) bzw. ca. $3 \mu\text{M}$ (MTT-Assay) (vgl. z.B. Röhl et al., 2001; Viviani et al., 1998).

Die Situation ist für TMT eine andere: Verschiedene Studien, die sich mit der zytotoxischen Wirkung von TMT befassen, zeigten große Unterschiede in den wirksamen Konzentrationen. Richter-Landsberg und Besser (1994) stellten EC_{50} -Werte von $2,5 \mu\text{M}$ TMT fest. Im Kontrast dazu standen Untersuchungen von Cookson et al. (1995), Karpiak und Eyer (1999) oder Röhl et al. (2001), mit Werten von $550 \mu\text{M}$, $>100 \mu\text{M}$ und $800 \mu\text{M}$. Der in dieser Arbeit ermittelte Wert von $5,1 \mu\text{M}$ in der Proteinmengenverlustbestimmung bzw. $440 \mu\text{M}$ im MTT-Assay fügt sich damit in das Bild einer stark differierenden Potenz der Verbindung.

Ein Grund für die Unterschiede in den EC_{50} -Werten mag in den unterschiedlichen Nachweismethoden der Toxizität liegen. Unterschiedliche Endpunkte wie MTT-Reduktion (in dieser Arbeit; Cookson et al.; Röhl et al. 2001), LDH-Freisetzung (Karpiak und Eyer) und der „neutral red uptake“ Assay (Richter-Landsberg) wurden zur Bewertung der Zytotoxizität herangezogen. Dass verschiedene Verfahren unterschiedliche Ergebnisse liefern können, ist in dieser Arbeit, wie oben beschrieben, deutlich bewiesen. Allein durch Unterschiede in den Testverfahren sind die starken Varianzen der EC_{50} -Werte bei TMT aber nicht zu erklären.

Der wichtigste Erklärungsansatz dafür liegt in der Zelltypspezifität der Wirkung von TMT begründet. Cristofol konnte 2004 zeigen, dass es eine entscheidende Rolle spielt, welche Zellen mit TMT behandelt werden. Es zeigte sich, dass hippokampale Nervenzellen hoch sensitiv auf 24stündige TMT-Exposition reagierten; der LC₅₀-Wert lag hier bei 1,4 µM. Damit geben diese Versuche den In-vivo-Untersuchungen Recht, die eine hohe Vulnerabilität des Hippocampus für die toxischen Effekte von TMT gezeigt haben (Koczyk, 1996). Ganz anders reagierten Astrozyten auf die Exposition. Cristofol konnte einen LC₅₀-Wert von 610 µM ermitteln. Die hier verwendeten C6 Gliomazellen gelten als ein gutes Modell für Astrozytentoxizität (Cookson et al., 1995). Die Ursachen für die unterschiedliche Wirksamkeit auf verschiedene Zellen sind noch immer weitgehend unklar.

Dass gerade Astrozyten bzw. Gliazellen deutlich unempfindlicher auf TMT zu reagieren scheinen als andere Zellen, führte zu zahlreichen Untersuchungen. Auch In-vivo-Studien bestätigten die spezifische Rolle der Astrozyten in der TMT Toxizität. Es konnte gezeigt werden, dass die neurotoxisch verursachten Veränderungen in vivo stets begleitet waren von einer Hypertrophie hippocampaler Astrozyten (Matthews and Scallet, 1991; Maier et al., 1995) und einer erhöhten Konzentration des astrozyten-spezifischen „glial fibrillary acidic protein (GFAP)“ (Brock et O`Callaghan, 1987; McCann et al., 1996; Aschner et Aschner, 1992). So konnte davon ausgegangen werden, dass diese Zellen eine wichtige Rolle in der Neurotoxizität von TMT spielen.

Diese als sogenannte „reaktive Gliose“ betitelte Veränderung wurde als biochemischer Marker für die Toxizität von TMT angenommen und führte zu der Vermutung, dass Astrozyten als primäre Mediatoren für den neuronalen Schaden durch TMT fungieren (Figiel et Fiedorowicz, 2002). Fraglich blieb allerdings, welchen Stellenwert die Veränderungen in der Glia einnehmen und inwieweit die Astroglie tatsächlich Wegbereiter oder aber Begleiterscheinung, eventuell lediglich Konsequenz eines durch TMT ausgelösten neuronalen Schadens ist.

Zahlreiche Studien, die sich mit der Klärung dieser Frage beschäftigen (Figiel et Fiedorowicz, 2002; Röhl et al., 2001; Holden et Coleman, 2007), ergaben, dass Astrozyten keineswegs Mediatoren für die toxische Wirksamkeit von TMT darstellen, sondern vielmehr in komplexen Interaktionen den Neuronenverband schützen und dass dieser Schutz von einer Aktivierung im Sinne einer Astroglie (GFAP-Expression) begleitet wird.

In Übereinstimmung dazu konnte gezeigt werden (Gunasekar et al., 2001 a), dass im Vergleich von reinen neuronalen, astrozytären und Co-Culturen ein Zellschaden durch TMT in Neuronen stets am größten war, dass Astrozyten weniger stark geschädigt wurden und ihre Anwesenheit in den gemischten Kulturen die Neuronen vor einem Schaden schützte.

Um zu klären, welche Mechanismen hinter dem neuronalen Schutz durch Astrozyten stecken, muss genauer verstanden werden, wie TMT wirkt.

Es gibt bisher keine Hinweise dafür, dass eine Exposition mit TBT zu der für TMT so typischen Astroglie in gemischten Kulturen führt, jedoch scheint das komplexe Gefüge von Glia und Neuronen auch für die Neurotoxizität dieser Verbindung eine Rolle zu spielen. So konnten Woehrling et al. 2007 nicht nur für TMT sondern auch für TBT einen gewissen schützenden Effekt anwesender Astrozyten auf Neuronen zeigen.

Unter Berücksichtigung all dieser Erkenntnisse wird klar, dass der in vivo beschriebene Effekt einer toxischen Verbindung, hier besonders TMT, immer das Abbild vielfältiger Wirkungen ist. So stellt sich die Frage, inwieweit Kulturen einzelner Zelllinien überhaupt Modelle für die Zytotoxizität in komplexen Geweben darstellen können.

Ein anderer, bisher wenig Beachtung findender Ansatzpunkt, um die starke Varianz in den EC_{50} -Werten für TMT zu erklären, ergibt sich aus dem Vergleich der einzelnen Expositionszeiten, die vor der Messung der Endpunkte gewählt wurden.

Dass eine Veränderung der Expositionszeiten einen solchen Einfluss auf die zytotoxische Potenz von TMT hat, konnte im weiteren Verlauf der Versuche gezeigt werden.

Schon frühere Untersuchungen zeigten in Versuchen, die eine Exposition der Zellen über viele Stunden beinhalteten, einen wesentlichen Unterschied im Wirkverhalten beider Organozinnverbindungen (Seibert et al., 2004; Karpiak et Eyer, 1999): TBT wirkte sehr schnell und die zytotoxische Aktivität blieb dann relativ unbeeinflusst von einer verlängerten Expositionszeit. TMT hingegen zeigte eine sogenannte „delayed toxicity“ (Karpiak et Eyer, 1999), eine verzögerte Wirkung.

Seibert et al. stellten diese Besonderheit mit Hilfe der Zellproteinmessung fest. Nachdem die hier durchgeführten Versuche über 24 Stunden Expositionszeit zeigten, dass die Verfahren MTT-Vitalitätsmessung und Proteinmessung durchaus unterschiedliche Ergebnisse lieferten, lag es nahe, mit Hilfe des MTT-Assays den Vergleich der Zytotoxizität von TBT und TMT auch bezüglich des zeitlichen Verlaufes zu tätigen.

Es fiel auf, dass TBT die Vitalität der Zellen in einer sehr raschen Geschwindigkeit beeinflusste. Nach einer Stunde Exposition mit 3 μ M TBT setzte ein erkennbarer zytotoxischer Effekt ein. Betrachtet man die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der verschiedenen Expositionszeiten, fällt auf, dass sie sehr dicht beieinander liegen (s. Abb. 3.4). Daran lässt sich erkennen, dass die zytotoxische Wirkung von TBT sehr früh ihr Maximum erreicht und dann eine weitgehende Unabhängigkeit vom Expositionszeitraum

besteht. Zwar sind auch für TBT über den Zeitverlauf noch Veränderungen der EC_{50} -Werte zu beobachten, doch spielen sich diese in einem engeren Konzentrationsbereich ab.

Um den kombinierten Einfluss von Konzentration und Zeit auf die Zytotoxizität zu charakterisieren, sind in Abbildung 4.1 die EC_{50} -Werte gegen die Expositionsdauer aufgetragen.

Bei Beurteilung der Kurve für TBT fällt auf, dass die maximale zytotoxische Aktivität spätestens nach 24 Stunden erreicht ist. Demzufolge ist die Beziehung von toxischer Potenz und Zeit nicht linear. In der Darstellung wird eine Kurve erkennbar, die sich rasch einem Wert annähert. Dieser Wert ist interpretierbar als diejenige Konzentration, die für die Substanz TBT mindestens von Nöten ist, um bei unendlich langer Expositionszeit einen zytotoxischen Effekt im Sinne einer Reduktion der Vitalität auf 50 Prozent zu erreichen. Dieser minimale Wert kann als „incipient toxicity“ bezeichnet werden (Seibert et al., 2004). Die Regressionsanalyse dieser Kurve erlaubt es, die Potenz/Zeit-Abhängigkeit mit einer Gleichung darzustellen: $c = k \times t^n$, wobei c den EC_{50} -Wert angibt und k und n Konstanten darstellen.

Wenn der Exponent der Zeit $n = 1$ ist, ist das simpelste Verhältnis von Potenz zu Zeit erfüllt, das auch als „Habersche Regel“ (Miller et al., 2000) bekannt ist.

Wird, wie beim TBT, ein Schwellenwert erreicht, so muss diese „incipient toxicity“ als zusätzliche Variable in die Gleichung eingebracht werden. So lautet die Gleichung für TBT: $c = k \times t^n + c^\infty$, wobei c^∞ die „incipient toxicity“ darstellt. Dieser Schwellenwert liegt für TBT bei $1,3 \mu\text{M}$.

Ganz anders als beim TBT, stellte sich die Zeitabhängigkeit der Wirkung von TMT dar. Die hier präsentierten Daten bestätigen frühere Beobachtungen (Karpiak et Eyer, 1999): TMT zeigte eine verzögerte Wirkung. Die Kurven der einzelnen Expositionszeiten staffeln sich über einen weiten Konzentrationsbereich - nahezu jede getestete Konzentration ist zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Lage, einen zytotoxischen Effekt zu erzielen (s. Abb. 3.4, 3.6). Der EC_{50} -Wert verändert sich über den Verlauf von 72 h um etwa das 1000fache.

Weiterhin fällt auf, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die längeren Expositionszeiten ein charakteristisches Plateau aufweisen. In Abschnitt 3.2 ist beschrieben, dass ein solches Plateau nicht die einfache graphische Ermittlung eines EC_{50} -Wertes aus der Kurve erlaubt, sondern dass realistischere Werte durch die Teilung der Kurven in zwei Abschnitte und die nachfolgende Ermittlung jeweils zweier EC_{50} -Werte entstehen. Die Idee, die sich dahinter verbirgt, ist, dass das Plateau, welches sich nach TMT-Exposition ergibt, Abbild einer besonderen Wirkung der Substanz ist: zwei toxische Prozesse, die sich zu

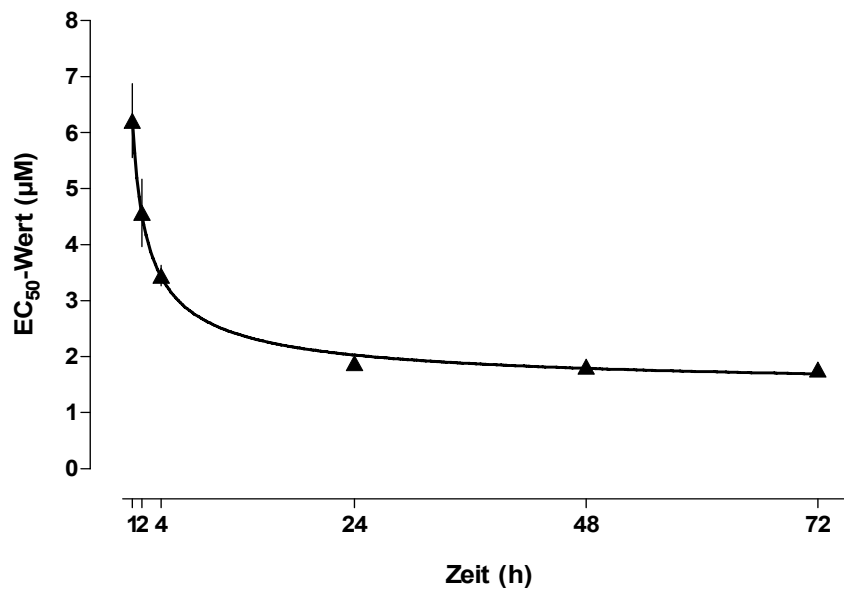
unterschiedlichen Zeiten in unterschiedlichen Konzentrationsbereichen abspielen, überlagern sich und geben das Bild einer gemischten Wirksamkeit.

In Abbildung 4.1 B ist der Zusammenhang von zytotoxischer Potenz von TMT und der Expositionszeit gezeigt. Zum einen zeigt die Graphik eine Kurve der EC_{50} -Werte, wie sie ohne Einbeziehung der zusätzlichen EC_{50} -Werte, die sich durch das Plateau ergeben, vorliegt. Diese Kurve ergibt erneut ein Plateau. Dadurch ist eine Kurvenanpassung nicht möglich. Es fällt auf, dass die Kurve, anders als beim TBT, abgesehen vom Plateau kontinuierlich abfällt und keine Schwelle erreicht. Die sogenannte „incipient toxicity“ wird möglicherweise nicht erreicht. Dadurch scheint zunächst ein Unterschied zum TBT gegeben. Durch Einbeziehung der EC_{50} -Werte, die auf Grund des zweiphasigen Verlaufs der einzelnen Konzentrations-Wirkungs-Kurven ermittelt wurden, stellen sich zwei Kurven für TMT dar. Die ursprüngliche Kurve kann damit als zusammengesetzt aus den nun entstandenen begriffen werden. Es wird erkennbar, dass die ursprüngliche Kurve in frühen Expositionszeiten in ihrem Verlauf von der in höheren Konzentrationen liegenden Kurve dominiert wird und dass zu späteren Zeiten die zweite Kurve, die in einem geringeren Konzentrationsbereich verläuft, den Verlauf der ursprünglich gemessenen Kurve bestimmt.

Bei Beurteilung dieser beiden Kurven ist ein stetig abfallender Verlauf nicht mehr nachvollziehbar. Vielmehr deutet sich nun auch für TMT pro Kurve ein Wert an, dem sich der Graph annähert und der als „incipient toxicity“ EC_{50} -Wert aufgefasst werden kann. Die nun mögliche Analyse ergibt Werte von 596 μM als hohe Konzentrationsschwelle und 5,3 μM als niedrigen Schwellenwert.

Es scheint also, dass nach kurzen Expositionszeiten ein Prozess, der sich in einem sehr hohen Konzentrationsbereich abspielt, die Toxizität von TMT vermittelt. Erst später nimmt ein zweiter Prozess überhand und löst den ersten ab, bzw. überlagert diesen. Dieser Teilprozess wirkt in einem sehr geringen Konzentrationsbereich; die Schwellentoxizität dieses letzteren Prozesses liegt nahe der der Wirkung von TBT.

A



B

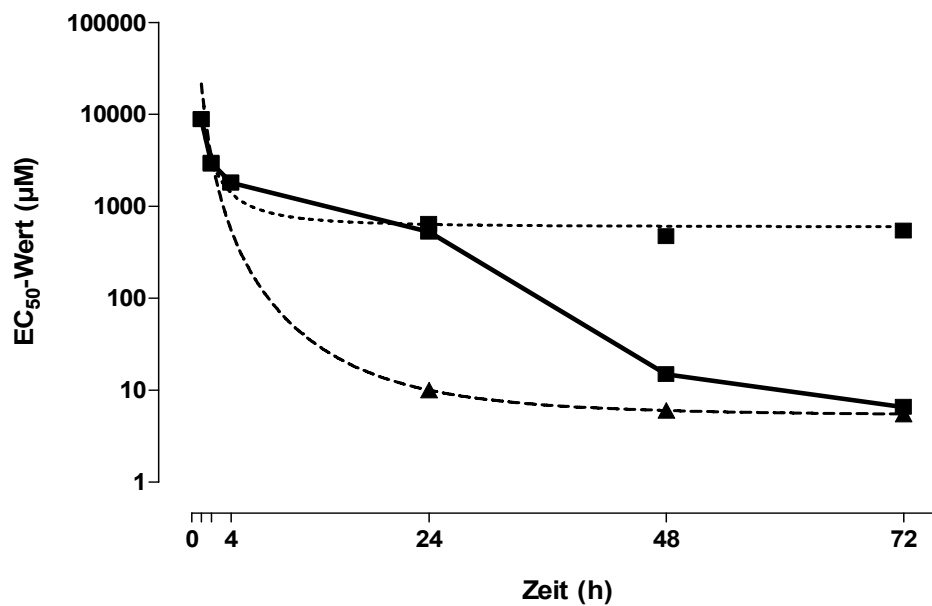


Abb. 4.1: Veränderung der zytotoxischen Wirkung der Organozinnverbindungen über einen Zeitverlauf von mehreren Stunden

Dargestellt sind die Mittelwerte der EC₅₀-Werte aus 3 (TMT) bzw. 2 (TBT) Versuchen. Die EC₅₀-Werte ergeben sich aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven basierend auf den Extinktionswerten im MTT-Test. Der Extinktionswert aus einem Einzelversuch entspricht dem Mittelwert des MTT-Signals aus sechs Wells. Die in Abbildung B ebenfalls dargestellten 2 zusätzlichen Kurven für TMT ergeben sich aus der graphischen Ermittlung der EC₅₀-Werte anhand der Mittelwertskurven aus den Versuchen über 72 Stunden, wie in Abbildung 3.5 gezeigt. Die Kurven wurden, soweit möglich, angepasst.

A TBT

B TMT (fett: Kurve der aus den Gesamtkurven ermittelten EC₅₀-Werte; gepunktet: Kurven, die sich aus den EC₅₀-Werten ergeben, die für die Kurvenabschnitte ober- bzw. unterhalb des Plateaus ermittelt wurden (vgl. 3.2).)

Vergleicht man exemplarisch die Werte für den kürzesten und den längsten Expositionszeitraum, so ist TBT nach kurzen Inkubationszeiten um ein vielfaches toxischer als TMT, später jedoch sind beide Verbindungen ähnlich potent.

Es wird klar, dass letztlich jeder ermittelte Wert für eine Toxizität stets nur eine Momentaufnahme abbildet, zu einem anderen Zeitpunkt kann sich, wie das Beispiel TMT zeigt, eine zytotoxische Potenz in völlig anderen Größenordnungen abspielen. Der Faktor der Expositionsdauer muss demnach stets bei Aussagen zur Zytotoxizität bedacht werden.

Die verzögerte Zytotoxizität, die für TMT gezeigt werden konnte, lässt erneut unterschiedliche Toxizitätsmechanismen für TBT und TMT vermuten. Karpiak et al. (1999) vermuteten (1999), dass möglicherweise durch TMT erzeugte subtile Störungen im Zellmetabolismus für diese Verzögerung verantwortlich seien. Diese könnten einer Schädigung vorausgehen und eine Kette von Veränderungen bewirken, die erst sehr spät zum Untergang der Zelle führen. Seibert et al. (2004) vermuteten Unterschiede in der Hydrophilie/Lipophilie und damit unterschiedliche Aufnahmekinetiken als verantwortlich für die Diskrepanz in der Zytotoxizität beider Substanzen.

Letztlich sind die Ursachen für die unterschiedliche Zeitabhängigkeit der Toxizität von TBT und TMT aber noch unklar. Es ergab sich abermals die Hypothese, dass jeder toxischen Verbindung möglicherweise eine Form des Zelltods zugeordnet werden kann, die die Unterschiede bedingt.

Das komplexe biochemische Aufeinanderfolgen verschiedener Prozesse bei der Apoptose lässt die Annahme zu, dass ein solcher Zelltod ein Mindestmaß an Zeit benötigt, um abzulaufen. Im Gegensatz dazu ist der nekrotische Zelltod ein rapides Geschehen. Die verzögerte Wirkung von TMT ließ sich unter Berücksichtigung dieser Überlegungen gut mit dem Ablauf eines apoptotischen Zelltods in Zusammenhang bringen. Andererseits war es vorstellbar, die rasche Toxizität von TBT einem nekrotischen Zelltod zuzuordnen.

Im weiteren Verlauf der Versuche zeigte sich jedoch, dass eine Zuordnung der zwei Verlaufsformen zu den beiden Verbindungen nicht möglich war.

So gab beim TBT allein die morphologische Auswertung an Hand der aufgenommenen Bilder der angefärbten Zellen klare Hinweise auf ein apoptotisches Geschehen. Die Versuche über 24 Stunden zeigten Aufnahmen, in denen sich spätapoptotische Kerne häuften (s. Abb. 3.7). Eine fehlende Erhöhung der Caspase 3-Aktivität zu diesem Zeitpunkt führte dazu, Versuche über mehrerer Stunden anzuschließen.

Zu frühen Messzeitpunkten war eine Erhöhung der Aktivität deutlich messbar. Dass dieses Enzym nach 24 Stunden keine Aktivität zeigt, ist durch die generelle Schädigung der Zellen

zu erklären. Eine Zuordnung anhand der Kernmorphologie zu den apoptotischen Zellen ist nach 24 Stunden zwar noch möglich, eine Enzymaktivität als Stoffwechselprozess, der eine Vitalität erfordert, ist in Residuen der Zellen nicht mehr messbar. Die deutliche Schädigung wurde bestätigt durch den hohen Anteil sogenannter desintegrierter Zellen, der durch TBT erzeugt wurde. Die Versuche zeigten, dass eine Erhöhung der Caspase 3-Aktivierung stets den morphologischen Veränderungen zeitlich vorausging. Diese Tatsache deckt sich gut mit den heutigen Vorstellungen zum Ablauf eines apoptotischen Zelltods.

Die hier durchgeführten Versuche zur Zellkernmorphologie und zur Caspase 3-Aktivierung ergeben somit klar eine Apoptoseinduktion durch TBT.

Dies deckt sich mit anderen Studien (Stridh et al., 1999; Umabayashi et al., 2004; Woehrling et al., 2007). Die Induktion von Apoptose durch TBT ist in vielen Zellen gezeigt worden, doch gibt es auch Hinweise, dass TBT einen nekrotischen Zelltod auslösen kann: Stridh et al. zeigten in ihren Versuchen an Jurkat-Zellen (Stridh et al., 1998), dass TBT in kleinen Konzentrationen Apoptose, in höheren Nekrose auslöst.

Um den Prozess der Apoptose einleiten zu können, muss die Zelle trotz ihrer Schädigung noch einen gewissen Spiegel an ATP besitzen, um die biochemischen Abläufe für die Apoptose auf den Weg zu bringen. Leist et al. (1997) konnten diese Energieabhängigkeit feststellen und zeigen, dass Zellen, die nicht mehr über diese Reserven verfügen, einem nekrotischen Zelltod zum Opfer fallen. Für TBT konnten Stridh et al. 1999 zeigen, dass das Level an ATP in Lymphozyten direkt über die Art des Zelltods entschied, der durch TBT ausgelöst wurde. Es konnte gezeigt werden, dass nach Exposition mit TBT eine Aufrechterhaltung von zellulären ATP-Spiegeln zu einer Aktivierung der Caspase 3 führt - beweisend für einen apoptotischen Zelltod - ,dass bei Verlust dieser ATP Spiegel jedoch ein Umschalten auf einen nekrotischen Zelltod stattfindet. Tatsächlich kann TBT selbst die mitochondrale ATP-Produktion hemmen (Stridh, 1999). Es ist also möglich, dass das Ausmaß einer Schädigung durch TBT über die ATP-Spiegel den Weg entweder in eine Apoptose oder in eine Nekrose lenkt. So könnte TBT in niedrigen Konzentrationen Apoptose induzieren, in höheren Nekrose.

Die hier durchgeführten Versuche an Kulturen wachstumsgehemmter C6 Zellen fanden also, legt man diese Überlegungen zu Grunde, stets unter Bedingungen statt, die den Zellen noch ausreichend ATP zur Verfügung stellen und so die „Chance zur Apoptose bieten“.

Für die 24stündige Exposition mit TMT zeigten die Bilder eine schwerer einzuordnende Situation als für TBT. Die Kerne konnten nicht als apoptotisch gewertet werden, sie zeigten

keine klaren Charakteristika wie Kondensation und Fragmentation des Chromatins. Dennoch blieb der Verdacht auf ein apoptotisches Geschehen; die Exposition mit 1000 μM TMT führte zu auffälligen, grob-granulierten Zellkernen, deren Chromatin sich deutlich von dem der Zellen in den unbehandelten Kontrollen unterschied. Die Messung der Caspase 3-Aktivität zeigte dann eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität nach 24stündiger Exposition.

Ein apoptotischer Zelltod, will man ihn strikt definieren, ist dann gegeben, wenn eine Caspaseaktivierung den Zelltod bedingt (Leist et Jäätelä, 2001). Bezug nehmend auf diese Überlegungen, können wir davon ausgehen, dass TMT mit einer hohen Wahrscheinlichkeit wie TBT Apoptose induziert, auch wenn morphologische Kennzeichen nicht denen nach TBT-Exposition entsprechen. Um zu prüfen, ob sich die Morphologie im Zeitverlauf verändert, wurden auch für TMT Expositionszeiten über mehrere Stunden untersucht.

Diese zeigten keine klareren morphologischen Veränderungen. Die Aktivierung der Caspase blieb nach Einbeziehung der Messungen aus zusätzlichen Expositionszeiten der wesentliche Indikator für eine durch TMT ausgelöste Apoptose. Auffällig ist, dass die Erhöhung der Enzymaktivität sich tatsächlich erst nach 24 Stunden Exposition ergab. Damit ist wiederholt eine zeitliche Verzögerung gegenüber der Wirkung des TBT gegeben.

So bleibt festzuhalten, dass auch TMT einen apoptotischen Zelltod in wachstumsgehemmten C6 Zellen erzeugt, dass dieser jedoch weitaus langsamer verläuft als beim TBT.

Die hier gezeigte apoptoseinduzierende Wirkung von TMT ist in zahlreichen früheren Studien beschrieben (Gunasekar et. al. 2001 b; Zhang et al., 2006; Jenkins et Barone, 2004; Mundy et Freudenrich, 2006; Fiegiel and Fiedorowicz, 2002; Wang et al., 2008). Das zeitliche Wirkprofil rückt bei diesen Studien jedoch in den Hintergrund.

Aber auch die Induktion von Nekrose durch TMT ist beschrieben: Gunasekar et al. postulierten 2001 (b), TMT könne sowohl einen apoptotischen als auch einen nekrotischen Zelltod induzieren, abhängig davon, welche Konzentrationen eingesetzt würden. Kleinere Konzentrationen führten in ihren Versuchen an cerebellären Zellen zu einem apoptotischen, höhere zu einem eher nekrotischen Zelltod. Diese Konzentrationsabhängigkeit der Art des induzierten Zelltods ist auch für TBT beschrieben (s.o.) und ist vermutlich über die unterschiedlich starke Wirkung auf Stoffwechselprozesse, die für einen programmierten Zelltod nötig sind, zu erklären.

Auf die komplexen Interaktionen zwischen Gliagewebe und Neuronen, die in der Toxizität von TMT eine große Rolle zu spielen scheinen, wurde bereits eingegangen. Auch für die Induktion von Apoptose scheint dieses Zusammenspiel der Zellen eine Rolle zu spielen:

Anhand seiner vergleichenden Versuche an gemischten Astrozyten/Neuronen Kulturen und reinen Neuronenkulturen, stellten Woehrling et al. (2007) fest, dass TMT in den Neuronen keine Apoptose induzierte, in den Kokulturen jedoch durchaus. Seine Interpretation dieser Beobachtung liegt in der These, Astrozyten könnten Neuronen möglicherweise für eine Apoptose empfindlich machen. Eventuell ist dies auch ein Aspekt des Schutzes, den die Astrozyten, wie oben beschrieben, Neuronen gewähren können: der apoptotische Tod als programmierter Zelltod stellt gegenüber einer Nekrose die gewebeschonendere Variante eines Zelltods dar.

Die hier durchgeführten Versuche sind an Gliazellen durchgeführt und erlauben deshalb keine Aussage über eine mögliche Interaktion von unterschiedlichen Zellen.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Verbindungen einen apoptotischen Zelltod in wachstumsgehemmten C6 Gliomazellen induzieren, die zeitlichen Abläufe dieser Induktion jedoch wiederholt deutliche Unterschiede zeigten, mussten Prozesse untersucht werden, die einer Apoptose vorgeschaltet sind.

Ein möglicher Prozess ist die Auslösung von oxidativem Stress. Den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Apoptose beschreiben zahlreiche Studien (Wang et al. 2009; Payne et al., 1995). Für TBT ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach Exposition bekannt (Gennari et al., 2000) und direkt mit der Induktion einer Apoptose in Zusammenhang gebracht worden (Nakatsu et al., 2007). Auch für die apoptoseinduzierende Wirkung von TMT ist als ein auslösender Mechanismus die Bildung von oxidativem Stress beschrieben (Wang et al., 2008; Jenkins et Barone, 2004; Zhang et al., 2006). Gunasekar et al. konnten 2001 (b) die Beteiligung von oxidativem Stress für TMT sowohl in Zusammenhang mit einem nekrotischen als auch mit einem apoptotischen Zelltod beobachten, jedoch variierte die Intensität und Art der oxidativen Spezies, die involviert waren, je nach TMT-Konzentration. Die Quellen, aus denen oxidative Spezies entstehen können, sind vielfältig, die Untersuchungen von Gunasekar et al. lassen vermuten, dass TMT multiple oxidative Spezies erzeugen kann.

Es lag also nahe zu prüfen, ob die in dieser Arbeit beobachtete Induktion einer Apoptose durch TBT und TMT begleitet wurde von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Dazu wurden Messungen mit 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat durchgeführt, die dazu dienen, ein Maß für den zellulären ROS-Status der Zellen zu bekommen (s. 2.4.5).

Die Messung ergab für keine eingesetzte Konzentration der Verbindungen zu keiner untersuchten Zeit eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies gegenüber den Kontrollen.

Die Induktion der Apoptose war demnach unabhängig von einer Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.

Auch eine Lipidperoxidation als ein weiteres Zeichen für oxidativen Stress, gemessen mit Hilfe des Thiobarbiturat-Tests (s. 2.4.6), konnte für TBT und TMT nicht gezeigt werden. Im Gegenteil: 1 μ M TBT führte gar zu einer signifikant geringeren Lipidperoxidation im Vergleich zur Kontrollen. Die Gründe dafür sind unklar.

Auch warum andere Studien, anders als hier, eine durch Organozinn induzierte ROS-Bildung zeigen konnten, bleibt fraglich. Möglicherweise ist diese Diskrepanz der Tatsache geschuldet, dass andere Studien neuronale Zellen verwendeten, die sich von den hier exponierten glialen Zellen unterscheiden. Warum Gliazellen diesen Unterschied zu Neuronen zeigen, ist unklar. Denkbar ist, dass sie über ein aktiveres antioxidatives System verfügen. Auf die zelltypspezifische Toxizität von TMT wurde bereits hingewiesen; es mag sein, dass ein Aspekt der Unempfindlichkeit von Gliazellen gegenüber TMT durch die mangelnde Bildung von oxidativem Stress bedingt ist.

Nichtsdestotrotz wird auch ohne eine Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder Lipidperoxidation in den hier behandelten C6 Zellen Apoptose induziert. Die Bildung von oxidativem Stress kann also möglicherweise in Neuronen an einer Apoptoseinduktion beteiligt sein, in Gliazellen sind TMT und TBT jedoch in der Lage, durch einen anderen Mechanismus Apoptose zu erzeugen.

Da die Bildung von oxidativem Stress somit weder für TBT noch für TMT gezeigt werden konnte, müssen demnach andere, biochemisch der Apoptose vorgelagerte Prozesse die Unterschiede bedingen.

Zahlreiche Studien befassen sich mit den Wirkmechanismen von TBT und TMT. Für TBT zeigte sich dabei immer wieder die rasche Geschwindigkeit eines Wirkeintritts. So setzte eine Reduktion zellulärer ATP-Spiegel in mit TBT behandelten Neuronen bereits nach 30 Minuten ein (Nakatsu et al., 2007). Auch Vorgänge, deren direkter Zusammenhang mit einem apoptotischen Zelltod bekannt ist, liefen nach TBT Exposition sehr rasch ab: Eine oft beschriebene zelluläre Reaktion auf eine Exposition mit TBT ist die exzessive Erhöhung intrazellulärer Calciumspiegeln in Zellen (Chow et al. 1992; Viviani et al., 1995, Nakatsu et al., 2007). Ein Zusammenhang zwischen dieser und der Induktion von Apoptose wird für die Toxizität zahlreicher chemischer Verbindungen vermutet (Kass et Orrenius, 1999). Gerade für TBT ist dieser Zusammenhang immer wieder gezeigt worden (Nakatsu et al., 2007). Diese calciummobilisierende Wirkung von TBT läuft ebenfalls sehr rasch ab.

Bekannt ist, dass viele verschiedene Abläufe an der Induktion eines apoptotischen Zelltods beteiligt sein können. Grob können als auslösende Mechanismen zwei Pfade unterschieden werden: Der eine wird eingeleitet durch die Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren der Zellmembran. Dieser wird auch als der „extrinsische“ Weg bezeichnet. Der andere, mitochondrale oder „intrinsische“ Weg, vermittelt Apoptosesignale, die von zytotoxischen Substanzen oder beispielsweise von veränderter Onkogenexpression verursacht werden. Ein Schlüsselvorgang dabei ist die Freisetzung von Cytochrom C und anderen caspaseaktivierenden Faktoren aus dem Mitochondrium (Saraste et Pulkki, 2000). Beide Pfade enden in einer, wie in dieser Arbeit gemessenen Caspase 3-Aktivierung, die ihrerseits zur Aktivierung weiterer Caspasen und zum apoptotischen Zelltod führt.

Die calciummobilisierende Wirkung von TBT könnte sowohl durch eine Interaktion mit dem extrinsischen Aktivierungspfad als auch über einen direkten Einfluss auf das mitochondriale Membranpotential mit Freisetzung von Cytochrom c zur Apoptose führen (Kass et Orrenius, 1999).

Doch scheint auch TMT wie TBT auf die Calciumkonzentration im Zytosol der exponierten Zellen Einfluss zu nehmen. Cristofol et al. (2004) konnten in ihren Versuchen zeigen, dass eine Hemmung der Calciumflüsse die Zytotoxizität von TMT herabsetzte. Bereits Viviani et al. schrieben 1998 intrazellulärem Calcium eine Schlüsselrolle für eine TMT-Toxizität zu.

Da eine Calciumerhöhung für beide Verbindungen beschrieben ist, ist dieser Mechanismus als derjenige auszuschließen, der für Unterschiede in der Zytotoxizität verantwortlich ist, wenngleich Calcium sicher eine entscheidende Rolle im durch Organozinnverbindungen ausgelösten apoptotischen Zelltod spielt.

Besonders für die Zytotoxizität von TMT benennen zahlreiche Studien das Mitochondrium als wesentliche Zielstruktur: Versuche an neuronalen Zellen lassen vermuten, dass TMT die mitochondrale Atmungskette stört und zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials führt (Misiti 2008; Zhang et al. 2006). Ein entscheidendes Zielprotein auf der Mitochondrienmembran könnte dabei Stannin sein, ein Protein, mit dem TMT, wie gezeigt werden konnte, interagiert (Thompson et al. 1996) und das als Vermittler einer TMT induzierten Apoptose gehandelt wird. Die Änderung des mitochondrialen Membranpotentials mag der initiierende Prozess sein, der einer hier zu beobachtenden Apoptose vorausgeht. Insgesamt erscheint es wahrscheinlich, dass der „intrinsische“, mitochondrale Weg die durch TMT induzierte Apoptose einleitet.

Doch auch für TBT ist ein solcher Effekt beschrieben worden, wenngleich die Prozesse sich wiederum in einer viel rascheren Abfolge abspielten: Nach Exposition konnte bereits nach wenigen Minuten ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und die

Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien gezeigt werden (Stridh et al., 1998). Diese Ergebnisse sprechen auch bei TBT für eine Apoptoseinduktion auf dem „intrinsischen“ Pfad. Neue Studien vermuten als eine molekulare Zielstruktur der Toxizität von TBT das Proteasom (Shi et al., 2009). Die Anhäufung von überflüssigen Proteinen nach Blockierung dieses Zellorganells könnte im Verlauf zu einem apoptotischen Zelltod führen. Doch auch für andere Organozine ist dieser Wirkmechanismus gezeigt worden (TPT). Möglicherweise spielt auch für TMT das Proteasom eine Rolle als molekulare Zielstruktur.

Auch für TMT sind einzelne biochemische Wirkmechanismen untersucht. So konnten Studien eine Aktivierung der JNK/c-Jun, des p38-Pathways oder der MAP-Kinase in einen Zusammenhang mit einem durch TMT verursachten apoptotischen Zelltod bringen (Mundy et al., 2006; Jenkins et al., 2004). Es bleibt fraglich, ob sich diese einzelnen Bausteine eines Wirkablaufs in ein vollständiges, konsekutiv aufeinander aufbauendes Bild fügen lassen oder ob stets nur einzelne Bruchstücke eines Wirkmechanismus' beleuchtet werden. Möglicherweise ist ein geradliniger Ablauf auch gar nicht anzunehmen. Denkbar ist auch, dass sich einzelne Prozesse im Sinne einer sich selbst aufrechterhaltenden Schleife aktivieren (vgl. Jenkins et al., 2004).

Ein Ansatz zur Klärung der Unterschiede zwischen der Zytotoxizität von TBT und TMT findet sich in diesen Überlegungen wohl nicht. Es bleibt ein wichtiges anzustrebendes Ziel, sowohl für TBT als auch für TMT die Hierarchie einzelner Signalwege im Wirkablauf aufzudecken.

Möglicherweise ist das Phänomen der Apoptose auch nicht als einzelner Prozess anzusehen, der stets gleichmäßig verläuft. Es gibt Hinweise darauf, dass die Apoptose zwar eine gut beschriebene und möglicherweise auch die häufigste Form des programmierten Zelltods darstellt, dass aber auch andere nicht-apoptotische Typen eines Zelltods, die nicht als Nekrose zu klassifizieren sind, eine biologische Signifikanz besitzen (Leist et al., 2001). Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass TBT und TMT unterschiedliche Verlaufsformen eines programmierten Zelltods verursachen. Es ist sogar möglich, dass innerhalb einer Substanz, je nach Expositionsbedingung, unterschiedliche Kaskaden von biochemischen Prozessen zu einem apoptotischen oder auch nekrotischen Zelltod führen. Dabei könnte es sein, dass je nach Expositionsbedingungen wie Zelltyp, eingesetzter Konzentration, Dauer der Exposition usw. unterschiedliche Prozesse ablaufen. Einige Einflussgrößen sind eventuell auch noch völlig unentdeckt. Die hier beobachtete Apoptose und die Induktion dieser kann somit immer nur für die getestete Zelllinie und alle übrigen Umgebungsfaktoren gelten.

Darüber hinaus ist im Verlauf zahlreicher Bestrebungen, den Ablauf des apoptotischen Zelltods zu verstehen, eine neue Sicht auf die Vorgänge entstanden: Es wird vermutet, dass

alle Zellen eines multizellulären Lebewesens intrinsisch auf einen selbstdestruierenden Zelltod programmiert sind und tatsächlich unverzögert sterben würden, wenn nicht der Zelltod ständig durch Überlebenssignale wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Nährstoffe unterdrückt würde. Diese Signale führen zur Expression bzw. Aktivierung von antiapoptotischen Regulatormolekülen, die die proapoptotischen Faktoren „im Zaum“ halten (Ameisen, 2002; Raff et al., 1994). Dieses möglicherweise realistischere Bild von einem apoptotischen Geschehen stellt einen interessanten Ansatz dar. Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass TBT bzw. TMT an unterschiedlichen Stellen eines komplizierten Kontrollmechanismus' die antiapoptotischen Signale stören und letztlich beide, jedoch auf unterschiedlichen Wegen und dadurch in unterschiedlicher Geschwindigkeit, zu einer Apoptoseinduktion führen.

5 Zusammenfassung

Organozinnverbindungen stellen eine Gruppe von Umweltchemikalien dar, die weit verbreitet ist und deren Einsatz erhebliche Auswirkungen auf unsere Umwelt hat.

Zwei dieser Organozinnverbindungen sind die Verbindungen Tributylzinn (TBT) und Trimethylzinn (TMT). Ziel der Arbeit war es, die Unterschiede in der Zytotoxizität dieser beiden Substanzen herauszuarbeiten und gegebenenfalls Ursachen für diese zu finden. Dazu wurden Versuche mit wachstumsgehemmten Kulturen der Rattengliomazelllinie C6 durchgeführt, die besonders die Konzentrationsabhängigkeit und die Zeitabhängigkeit einer Toxizität messen sollten.

Die zytotoxische Wirkung wurde als Verminderung des Zellproteingehalts (Lowry Methode) bzw. der Zellvitalität (MTT-Assay) erfasst.

Um zu untersuchen, welche Form des Zelltods nach Exposition durch TBT und TMT induziert wird, wurden eine Anfärbung der Zellkerne und eine fluoreszenzmikroskopische Analyse durchgeführt. Dadurch und durch die Einbeziehung einer Caspase 3-Aktivitätsmessung konnte geprüft werden, ob die Organozinnverbindungen einen nekrotischen oder apoptotischen Zelltod auslösen.

Als eine mögliche Ursache für die Induktion von Apoptose wurde des Weiteren die Bildung von oxidativem Stress durch TBT und TMT gemessen. Dazu wurde die fluorimetrische Messung mit 2',7'-Dichlorofluoreszein-Diacetat durchgeführt. Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde durch die Messung Thiobarbiturat-reaktiver Substanzen (TBARS) bestimmt.

Die zytotoxische Potenz von TBT war nach 24stündiger Exposition stärker als die von TMT. Die Potenz war bei TBT nahezu unabhängig, bei TMT aber stark abhängig von der Expositionsdauer. Im zeitlichen Verlauf wurde TMT zytotoxischer und näherte sich der Potenz von TBT an.

Beide Substanzen induzierten Apoptose in den C6-Zellen. Dieser Zelltod wurde von TBT sehr rasch erzeugt, während TMT über eine längere Expositionsdauer hinweg Apoptose induzierte.

Weder TBT noch TMT führten zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder zu einer Lipidperoxidation.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ein erheblicher Unterschied in der Zytotoxizität von TBT und TMT besteht. Besonders in der Zeitabhängigkeit ihrer Wirkung unterscheiden sie sich stark. Die Gründe dafür bleiben fraglich; eine Zuordnung der beiden Verlaufsformen

des Zelltods, Apoptose und Nekrose, zu den beiden Verbindungen gelingt nicht. Beide Substanzen erscheinen als Apoptoseinduktoren, wobei im zeitlichen Verlauf der Apoptose wiederum Unterschiede bestehen.

Der durch die Organozinnverbindungen in C6 Gliomazellen ausgelöste Zelltod ist nicht durch die Bildung von oxidativem Stress verursacht.

Offen bleiben die Mechanismen, die den apoptotischen Zelltod von TBT und TMT vermitteln, und damit die Ursachen für die Unterschiede vor allem in Bezug auf die Zeitabhängigkeit ihrer Zytotoxizität. Um diese Fragen zu klären, bedarf es weiterer Versuche.

6 Literaturverzeichnis

Ameisen JC (2002): On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 2002 Apr;9(4):367-93. Review.

Aschner M, Aschner JL (1992): Cellular and molecular effects of trimethyltin and triethyltin: relevance to organotin neurotoxicity. *Neurosci Biobehav Rev.* 1992 Winter;16(4):427-35. Review.

Batley GE, Scammell MS, Brockbank CI (1992): The impact of the banning of tributyltin-based antifouling paints on the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*. *Sci Total Environ.* 1992 Jul 29;122(3):301-14.

Besser R, Krämer G, Thümler R, Bohl J, Gutmann L, Hopf HC (1987): Acute trimethyltin limbic-cerebellar syndrome. *Neurology.* 1987 Jun;37(6):945-50.

Boyer IJ (1989): Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology.* 1989 May 15;55(3):253-98. Review.

Brock TO, O'Callaghan JP (1987): Quantitative changes in the synaptic vesicle proteins synapsin I and p38 and the astrocyte-specific protein glial fibrillary acidic protein are associated with chemical-induced injury to the rat central nervous system. *J Neurosci.* 1987 Apr;7(4):931-42.

Chow SC, Kass GE, McCabe MJ Jr, Orrenius S (1992): Tributyltin increases cytosolic free Ca²⁺ concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca²⁺, activating a Ca²⁺ entry pathway, and inhibiting Ca²⁺ efflux. *Arch Biochem Biophys.* 1992 Oct;298(1):143-9.

Cookson M, Mead C, Austwick S, Pentreath V (1995): Use of the MTT assay for estimating toxicity in primary astrocyte and C6 glioma cell cultures. *Toxicol In Vitro.* 1995;9(1):39-48.

Cristòfol RM, Gassó S, Vilchez D, Pertusa M, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C (2004): Neurotoxic effects of trimethyltin and triethyltin on human fetal neuron and astrocyte cultures: a comparative study with rat neuronal cultures and human cell lines. *Toxicol Lett.* 2004 Aug 30;152(1):35-46.

Draper HH, Hadley M (1990): Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.

Duke RC (2004): Methods of analyzing chromatin changes accompanying apoptosis of target cells in killer cell assays. *Methods Mol Biol.* 2004;282:43-66.

Dyer RS (1982): Physiological methods for assessment of Trimethyltin exposure. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 1982 Nov-Dec;4(6):659-64.

Fait A, Ferioli A, Barbieri F (1994): Organotin compounds. *Toxicology.* 1994 Jun 17;91(1):77-82.

Fent K (1996): Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit Rev Toxicol.* 1996 Jan;26(1):1-117. Review.

Figiel I, Fiedorowicz A (2002): Trimethyltin-evoked neuronal apoptosis and glia response in mixed cultures of rat hippocampal dentate gyrus: a new model for the study of the cell type-specific influence of neurotoxins. *Neurotoxicology.* 2002 May;23(1):77-86.

Fortemps E, Amand G, Bomboir A, Lauwerys R, Laterre EC (1978): Trimethyltin poisoning. Report of two cases. *Int Arch Occup Environ Health.* 1978 Jan 27;41(1):1-6.

Gennari A, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R, Corsini E (2000): Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000 Dec 1;169(2):185-90.

Greenpeace Presseerklärung 29.8.00, Autor: Greenpeace

Gunasekar PG, Mickova V, Kotyzova D, Li L, Borowitz JL, Eybl V, Isom GE (2001 a): Role of astrocytes in trimethyltin neurotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol.* 2001;15(5):256-62.

Gunasekar P, Li L, Prabhakaran K, Eybl V, Borowitz JL, Isom GE (2001 b): Mechanisms of the apoptotic and necrotic actions of trimethyltin in cerebellar granule cells. *Toxicol Sci.* 2001 Nov;64(1):83-9.

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989): Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods.* 1989 May 12;119(2):203-10.

Holden LJ, Coleman MD (2007): Assessment of the astroglial responses of three human astrocytoma cell lines to ethanol, trimethyltin chloride and acrylamide. *Toxicology.* 2007 Nov 20;241(1-2):75-83. Epub 2007 Aug 15.

Jenkins SM, Barone S (2004): The neurotoxicant trimethyltin induces apoptosis via caspase activation, p38 protein kinase, and oxidative stress in PC12 cells. *Toxicol Lett.* 2004 Feb 28;147(1):63-72.

Karpiak VC, Eyer CL (1999): Differential gliotoxicity of organotin. *Cell Biol Toxicol.* 1999;15(4):261-8.

Kass GE, Orrenius S (1999): Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ Health Perspect.* 1999 Feb;107 Suppl 1:25-35. Review.

Koczyk D, Skup M, Zaremba M, Oderfeld-Nowak B (1996): Trimethyltin-induced plastic neuronal changes in rat hippocampus are accompanied by astrocytic trophic activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1996;56(1):237-41.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 1997 Apr 21;185(8):1481-6.

Leist M, Jäättelä M (2001): Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):589-98. Review.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75.

Maier WE, Brown HW, Tilson HA, Luster MI, Harry GJ (1995): Trimethyltin increases interleukin (IL)-1 alpha, IL-6 and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in rat hippocampus. *J Neuroimmunol.* 1995 Jun;59(1-2):65-75.

Matthews JC, Scallet AC (1991): Nutrition, neurotoxicants and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology.* 1991 Fall;12(3):547-57.

McCann MJ, O'Callaghan JP, Martin PM, Bertram T, Streit WJ (1996): Differential activation of microglia and astrocytes following trimethyl tin-induced neurodegeneration. *Neuroscience.* 1996 May;72(1):273-81.

Miller FJ, Schlosser PM, Janszen DB (2000): Haber's rule: a special case in a family of curves relating concentration and duration of exposure to a fixed level of response for a given endpoint. *Toxicology.* 2000 Aug 14;149(1):21-34. Review.

Misiti F, Orsini F, Clementi ME, Lattanzi W, Giardina B, Michetti F (2008): Mitochondrial oxygen consumption inhibition importance for TMT-dependent cell death in undifferentiated PC12 cells. *Neurochem Int.* 2008 May;52(6):1092-9.

Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Mundy WR, Freudenrich TM (2006): Apoptosis of cerebellar granule cells induced by organotin compounds found in drinking water: involvement of MAP kinases. *Neurotoxicology.* 2006 Jan;27(1):71-81. Epub 2005 Sep 21.

Nakatsu Y, Kotake Y, Ohta S (2007): Concentration dependence of the mechanisms of tributyltin-induced apoptosis. *Toxicol Sci.* 2007 Jun;97(2):438-47. Epub 2007 Mar 6.

O'Callaghan JP, Miller DB (1989): Assessment of chemically-induced alterations in brain development using assays of neuron- and glia-localized proteins. *Neurotoxicology.* 1989 Fall;10(3):393-406.

Payne CM, Bernstein C, Bernstein H (1995): Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. *Leuk Lymphoma*. 1995 Sep;19(1-2):43-93. Review.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD (1994): Programmed cell death and the control of cell survival. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1994 Aug 30;345(1313):265-8. Review.

Richter-Landsberg C, Besser A (1994): Effects of organotins on rat brain astrocytes in culture. *J Neurochem*. 1994 Dec;63(6):2202-9.

Röhl C, Gülden M, Seibert H (2001): Toxicity of organotin compounds in primary cultures of rat cortical astrocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2001;17(1):23-32.

Sadiki AI, Williams DT (1999): A study on organotin levels in Canadian drinking water distributed through PVC pipes. *Chemosphere*. 1999 Mar;38(7):1541-8.

Saraste A, Pulkki K (2000): Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000 Feb;45(3):528-37. Review.

Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Watermann B, Scherf S (2000): Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen. *Ecotoxicology*. 2000 Dec;9(6):399-412.

Seibert H, Mörchel S, Gülden M (2004): Cytotoxic potency of trialkyltins to C6 glioma cells in vitro: impact of exposure conditions. *Cell Biol Toxicol*. 2004 Sep;20(5):273-83.

Shi G, Chen D, Zhai G, Chen MS, Cui QC, Zhou Q, He B, Dou QP, Jiang G (2009): The proteasome is a molecular target of environmental toxic organotins. *Environ Health Perspect*. 2009 Mar;117(3):379-86. Epub 2008 Oct 23.

Smith BS (1981): Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints. *J Appl Toxicol*. 1981 Feb;1(1):22-5.

Snoeij NJ, Penninks AH, Seinen W (1987): Biological activity of organotin compounds--an overview. *Environ Res.* 1987 Dec;44(2):335-53. Review.

Stridh H, Kimland M, Jones DP, Orrenius S, Hampton MB (1998): Cytochrome c release and caspase activation in hydrogen peroxide- and tributyltin-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 1998 Jun 16;429(3):351-5. Erratum in: *FEBS Lett* 1998 Oct 16;437(1-2):163.

Stridh H, Fava E, Single B, Nicotera P, Orrenius S, Leist M (1999): Tributyltin-induced apoptosis requires glycolytic adenosine trisphosphate production. *Chem Res Toxicol.* 1999 Oct;12(10):874-82.

Takahashi S, Mukai H, Tanabe S, Sakayama K, Miyazaki T, Masuno H (1999): Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environ Pollut.* 1999 Aug;106(2):213-8.

Thompson TA, Lewis JM, Dejneka NS, Severs WB, Polavarapu R, Billingsley ML (1996): Induction of apoptosis by organotin compounds in vitro: neuronal protection with antisense oligonucleotides directed against stannin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996 Mar;276(3):1201-16.

Trittin, J (2002): Verbot TBT-haltiger Schiffsanstriche entlastet die Meeresumwelt. Pressemitteilung des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Berlin 2002;

Umebayashi C, Oyama Y, Chikahisa-Muramastu L, Nakao H, Nishizaki Y, Nakata M, Soeda F, Takahama K (2004): Tri-n-butyltin-induced cytotoxicity on rat thymocytes in presence and absence of serum. *Toxicol In Vitro.* 2004 Feb;18(1):55-61.

Viviani B, Rossi AD, Chow SC, Nicotera P (1995): Organotin compounds induce calcium overload and apoptosis in PC12 cells. *Neurotoxicology.* 1995 Spring;16(1):19-25.

Viviani B, Corsini E, Galli CL, Marinovich M (1998): Glia increase degeneration of hippocampal neurons through release of tumor necrosis factor-alpha. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Jun;150(2):271-6.

Vos JG, de Klerk A, Krajnc EI, Kruizinga W, van Ommen B, Rozing J (1984): Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. II. Suppression of thymus-dependent immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1984 Sep 30;75(3):387-408.

Wang H, Joseph JA (1999): Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med.* 1999 Sep;27(5-6):612-6.

Wang L, Wang H, Hu M, Cao J, Chen D, Liu Z (2009): Oxidative stress and apoptotic changes in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to lead. *Arch Toxicol.* 2009 May;83(5):417-27. Epub 2009 Apr 4.

Wang M, Li B, Wang C, Chen Y, Zuo Z (2008): The concentration-dependent induction of cell death by trimethyltin chloride in rat liver epithelial IAR20 cells. *Toxicol In Vitro.* 2008 Aug;22(5):1136-42. Epub 2008 Mar 18.

Wester PW, Krajnc EI, van Leeuwen FX, Loeber JG, van der Heijden CA, Vaessen HA, Helleman PW (1990): Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1990 Mar;28(3):179-96.

WHO (World Health Organisation) (1980): Tin and organotin compounds: a preliminary review. *Environmental Health Criteria* 1980; 15:1-109.

Woehrling EK, Hill EJ, Coleman MD (2007): Development of a neurotoxicity test-system, using human post-mitotic, astrocytic and neuronal cell lines in co-culture. *Toxicol In Vitro.* 2007 Oct;21(7):1241-6. Epub 2007 May 1.

Zhang L, Li L, Prabhakaran K, Borowitz JL, Isom GE (2006): Trimethyltin-induced apoptosis is associated with upregulation of inducible nitric oxide synthase and Bax in a hippocampal cell line. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006 Oct 1;216(1):34-43. Epub 2006 May 19.

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Maser für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut. Mein großer Dank gilt Herrn Dr. Seibert für die Betreuung meiner Arbeit, für die stets freundliche Motivation und die Möglichkeit, sich immer fragend an ihn zu wenden. Mein besonderer Dank gilt Sabine Seibert, die mir das Arbeiten im Labor beigebracht hat, viel Geduld hatte und die gute Seele der Zellkultur ist. Herrn Dr. Gülden danke ich für seine Anregungen und technischen Hilfestellungen. Ich danke meiner lieben Freundin Anne Kunert, dass ich diesen schönen Abschnitt meines Studiums mit ihr verbringen durfte und sie immer für mich da war. Weiterhin möchte ich Manuela Perle danken, die mir stets geduldig die Verfahren zur Detektion apoptotischer Zellen beigebracht hat. Yasser El-Hawari danke ich für die Hilfe in mathematischen Fragen und Sibylle Brenner für die Unterstützung beim Verfassen der Arbeit. Vielen Dank an alle anderen Mitarbeiter des Instituts, die immer für eine wunderbare Arbeitsatmosphäre gesorgt haben.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meinem Partner danken, die mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen haben.

8 Lebenslauf

Teresa Luise Meyer

geboren am 10.01.1985 in Cloppenburg

Schulbildung

1991-1995 Grundschule St. Augustinus Cloppenburg
1995-1997 Orientierungsstufe Cappelner Damm Cloppenburg
1997-2004 Clemens-August-Gymnasium Cloppenburg
2004 Abitur

Studium der Humanmedizin

2004-2006 Vorklinischer Abschnitt: Christian-Albrechts-Universität Kiel
2006 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006-2009 Klinischer Abschnitt: Christian-Albrechts-Universität Kiel
2009-2010 Praktisches Jahr: Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel