

**Aus dem
Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Titel der Dissertation:

**Expressionsanalyse der nukleären Rezeptoren PPAR- α / γ -1/ γ -2 und der
Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 nach Stimulation von dermalen
Endothelzellen mit den Weichmacher, Di(2-ethylhexyl)phthalat-Metaboliten 2-
Ethylhexanol und 4-Heptanon.**

**Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg**

**vorgelegt von
Ralf Michael Dutescu**

**aus
Aachen**

Marburg, 2011

**Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 25.03.2011**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan: Prof. Dr. Rothmund
Referent: PD Dr. Dr. Wahl
1. Korreferent: Prof. Dr. Czubyko
2. Korreferent: Prof Dr. Moll**

Zusammenfassung

Expressionsanalyse der nukleären Rezeptoren PPAR- α / γ -1/ γ -2 und der Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 nach Stimulation von dermalen Endothelzellen mit den Weichmacher- Di(2-ethylhexyl)phthalat- Metaboliten, 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon.

Hintergrund: Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) als Weichmacher aus der Familie der Phthalate ist bekannt für seinen schädlichen Einfluss auf Organe wie Herz, Leber und die Geschlechtsorgane. Im Gegensatz zu anderen Weichmachern bildet ausschließlich DEHP die Metabolite 2-Ethylhexanol (2EH) und 4-Heptanon (4HP), welchen eigene toxische Wirkungen zugeschrieben werden. Die Biodistribution des DEHP und seiner Metabolite über das kardiovaskuläre System, hat uns veranlaßt das Expressionsverhalten von nukleären Rezeptoren in mikrovaskulären Endothelzellen nach Stimulation durch 2EH und 4HP zu untersuchen.

Methoden: MEHC1 Zellen wurden kultiviert und über 24 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von 2-EH (500, 1000, 2000 μ g/ml) und 4-HP (250, 500, 1000, 2000 μ g/ml) inkubiert und anschließend nach RNA isolation für real-time PCR herangezogen. Die Expression der Transkriptionsfaktoren PPAR- α , γ -1, γ -2, T-bet und GATA-3 wurde relativ quantifiziert. Dabei wurde die Expression der unterschiedlich stimulierten Proben in Bezug zu einer unstimulierten Zellreihe untersucht.

Ergebnisse: Die Untersuchungen zeigen eine Inhibition des an PPAR- α , γ -1 und γ -2 nach 2-EH Exposition (500, 1000 μ g/ml) sowie Hochregulation des PPAR- α und Herabregulation des PPAR γ -1 und γ -2 in 4-HP (500, 1000 μ g/ml) inkubierten Zellen. GATA-3 wird durch 2-ETH als auch durch 4-HP in allen Konzentrationen stimuliert. Die 2000 μ g/ml Konzentration von 2-EH und 4HP ergab geringe cDNA Level, welches auf eine erhöhte Zelltod hinweist. T-bet war in den Proben in Spuren nachweisbar.

Diskussion: PPAR- α und γ werden vasodilatatorische Effekte zugeschrieben. Unter Stimulation mit 2-EH bzw. 4-HP zeigen sich gegenläufige Einflüsse auf die PPAR-Expression und somit auf den Gefäßtonus. GATA-3-Expression wird im Zusammenhang mit der VCAM vermittelten Extravasation von Entzündungszellen gesehen. Auch hier zeigen sich antagonistische Einflüsse des 2EH gegenüber dem 4HP. In Zukunft könnten letztlich nur in-vivo Toxizitätsuntersuchungen abschliessend klären, welcher Einfluß sich aus dem gemeinsamen Auftreten der Metabolite ergibt. Zusammengenommen unterstützen die Ergebnisse jedoch die geforderte Einschränkung des DEHP- Gebrauchs.

Summary:

Expression analysis of nuclear receptors PPAR- α / γ -1/ γ -2 and transcription factors T-bet and GATA-3 after exposure to metabolites Di(2-ethylhexyl) phthalate methabolites 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon in dermal microvascular endothelial cells.

Purpose: Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is known to elicit marked impact on the heart, liver and lung and the reproductive system. In contrast to other members of the phthalates 2-ethylhexanole (2EH) and 4-heptanone (4HP) result solely from the DEHP metabolism and express there own distinctive toxicity. Since 2EH and 4HP are biodistributed via the vascular system we looked at the expression of nucleic receptors in endothelial cells after expositor to 2EH and 4HP.

Methods: MEHC1 cells were cultivated and stimulated over 24h with 2-EH (500, 1000, 2000 μ g/ml) and 4-HP (250, 500, 1000, 2000 μ g/ml) and subsequently harvested for real time PCR. Transcription factors PPAR- α , γ -1, γ -2, T-bet and GATA-3 expression was quantified relative to a standard curve of known DNA-concentrations and compared to the expression pattern of unstimulated cells.

Results: Data showed an inhibition of PPAR- α γ -1 and γ -2 after 2-EH exposure (500, 1000 μ g/ml) with up regulation of PPAR- α and downregulation of PPAR γ -1 and γ -2 in 4-HP (500, 1000 μ g/ml) incubated cells. GATA-3 was stimulated by 2-ETH and 4-HP in all concentrations. The 2000 μ g/ml 2-EH as well as 4HP yielded low cDNA levels indicating cell death. T-bet was barely detectable in 4HP stimulated cells.

Discussion: It is assumed that PPARs cause vasodilation. Results suggest that 2-ETH as well as 4-HP present an oppositional impact on vascular tonus. GATA-3 has been shown to reduce the extravasation of immuno cells by inhibiting VCAM expression. Here we see a conflictive influence of 2EH comared to 4HP on GATA-3 expression. Future 2EH and 4HP in-vivo co-stimulation experiments could clarify witch metabolite outbalance the other on it's impact on vascular function. So far the shown toxicity supports the idea of restricting the widespread use of DEHP.

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
BP	Basenpaar
C	Cytosin
CD 4/17	engl. cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CP	Crossingpoint
DEHP	Di-2-(ethylhexyl)-phthalat
DIDP	Diisodecylphthalat
DINP	Diisononylphthalat
DNA	Deoxiribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol, ein Reduktionsmittel
E	Effizienz
EPA	Environmental Protection Agency
G	Guanin
GATA-3	engl. GATA factor encoding gene-3
HMEC-1	human dermal microvascular endothel cells.
IL 4/5/12	Interleukin- 4/5/12
INF- Y	Interferon- gamma
KG	Körpergewicht
LH	Luteinisierendes Hormon
MEHP	Monoethylhexylphthalate
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
PCR	engl. polymerase chain reaction
PPAR	Peroxisomen proloiferierende Rezeptoren
PPAR-alpha	
PPAR-gamma	
PVC	Polyvinylchlorid
RNase	RNA verdauendes Enzym
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-
SSII RT	Superscript II- Reverse Transkriptase
T	Thymin
T-bet	TATA- Box bindendes Protein-beta
T-box	TATA-box Genfamilie
TH-1	T-Helferzellen-1
TH-2	T-Helferzellen-2
VCAM-1	engl. vascular cell adhesion molecule-1

Inhaltsverzeichnis:..... Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung	3
1.1 Eigenschaften und Verwendung von Weichmachern.....	3
1.2. DEHP Exposition der Bevölkerung.....	6
1.2.1 Belastung der Allgemeinbevölkerung	6
1.2.2 Weichmacher in Medizinprodukten	7
1.3 Di-2-(ethylhexyl)-phthalat (DEHP).....	8
1.3.1 DEHP und sein Metabolismus in vivo:	8
1.3.2 DEHP ein Gesundheitsrisiko?.....	9
1.3.3 2- Ethylhexanol.....	11
1.3.4 4-Heptanon	12
1.4 Die Untersuchten Gene im Einzelnen.....	13
1.4.1 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptoren–Alpha, -Gamma-1, -Gamma-2 (PPAR- α / γ -1, γ -2)	14
1.4.2 GATA-DNA-Sequenz bindendes Protein 3 (GATA3) und T-Box-Exprimiert in T-Zellen (T-bet) getriggerte Immunreaktionen	15
1.4.3 Die Vorgestellten Gene im Bezug zum Endothel:	17
1.5 Fragestellung.....	19
2. Materialien und Methoden	19
2.1 Erstellen einer Zellkultur	19
2.1.1 Herkunft der Zellen	19
2.1.2 Kulturmedium	19
2.1.3 Erstellen einer Zelllinie	20
2.2 Stimulation der Zellen	21
2.2.1 Umsetzen der Zellen auf Wellplatten.....	21
2.2.2 Stimulation mit 4-Heptanon	23
2.2.3 Stimulation mit 2-Ethylhexanol	23
2.3 RNA Isolierung	24
2.3.1 Zellyse und Nukleinsäureisolation.....	24
2.3.2 DNA Inaktivierung.....	25
2.3.3 RNA Konzentrationsbestimmung	26
2.4 Reverse Transkription.....	26

2.4.1 cDNA Synthese	26
2.5 Polymerase Kettenreaktion	28
2.5.1 Grundlegende Prinzipien.....	28
2.5.2 Erstellen geeigneter Primersequenzen	30
2.5.3 Anfertigung einzelner PCR Ansätze	33
2.5.4 Aufbau und Funktion des LightCyclers	34
3. Ergebnisse	39
3.1 RNA-Isolierung.....	39
3.2 Expressionsanalyse über quantitative realtime PCR im Lightcycler	40
3.3.1 Expressionsanalyse 2-Ethylhexanol-stimulierter HMEC-1 Zellen	42
3.3.2 Expressionsanalysen 4-Heptanon-stimulierter HMEC-1 Zellen ..	50
4. Diskussion	59
4.1 Diskussion der Methodik	59
4.1.1 Zellkultur	59
4.1.2 Extraktion der mRNA und Erstellen einer cDNA-Bank.....	59
4.1.4 Realtime PCR im Vergleich zu anderen quantitativen	
Nachweisverfahren	60
4.2 Diskussion der Ergebnisse	61
4.2.1 2-Ethylhexanol als Ligand der PPAR-Rezeptoren.....	61
4.2.2 PPAR-Isoformen im vaskulärem System.....	62
4.2.3 4-Heptanon als Ligand der PPA-Rezeptoren	65
4.2.4 GATA-3	67
4.2.5 T-bet	68
5. Zusammenfassung.....	69
6. Literaturverzeichnis:.....	72
7. Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1. Einleitung

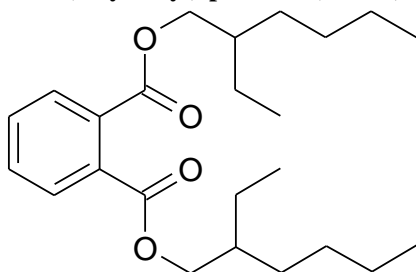
1.1 Eigenschaften und Verwendung von Weichmachern

Weichmacher sind organische Verbindungen, die zu Stoffen hinzugegeben werden, um deren Flexibilität und Weichheit zu erhöhen

Weichmacher werden in der Herstellung von Kunststoffen, Textilien, Lacken, Abdichtungsmaterialien und Beschichtungsmitteln eingesetzt. Je nach Einsatzgebiet werden an die Weichmacher unterschiedliche Ansprüche gestellt. In der Lebensmittelindustrie wird gefordert, dass Weichmacher in Verpackungsmaterialien geruchs- und geschmacklos sind. Die in der Automobil- und Bau- Industrie eingesetzten Weichmacher sollen der zugefügten Kunststoffmatrix Temperatur-, Chemikalien- und Wasserbeständigkeit bieten. Weltweit werden jährlich 6 Millionen Tonnen Weichmacher verarbeitet. In der EU werden über 90 % der Weichmacher für die Veredelung des Kunststoffes PVC verwendet.

Da sie jedoch keine chemischen Bindungen eingehen sondern lediglich physikalische Wechselwirkungen zu ihrer Kunststoffmatrix besitzen, können sie in die Umwelt entweichen. Um dies zu mindern werden in der Industrie häufig Weichmacher mit einem geringen Dampfdruck verwendet. Dies fördert den Zusammenhalt des Stoffgemisches. Weitere Gefahren für das Entweichen von Weichmachern aus Kunststoffen stellen der Kontakt zu Benzin und Alkoholen dar, welche besonders gut lipophile Substanzen lösen können. UV-Strahlung kann zur Inaktivierung und Polymerisation von Weichmachern führen, welches zur vermehrten Brüchigkeit von Kunststoffen unter Sonnenexposition führt. Eine häufig verwendete Gruppe von Weichmachern sind die Phthalate wie:

Abbildung 1: Di-2-(ethylhexyl)-phthalat (DEHP) und



Di-n-Butylphthalat (DBP).

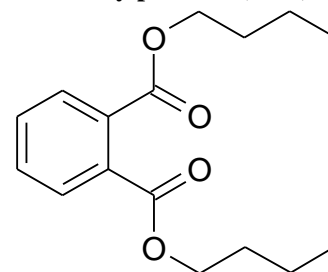
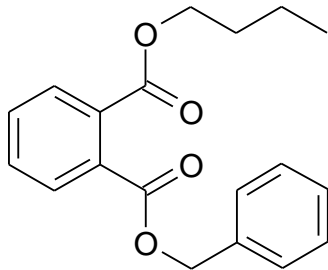


Abbildung 2: Butylbenzylphthalat (BBP) und



Diisononylphthalat (DINP).

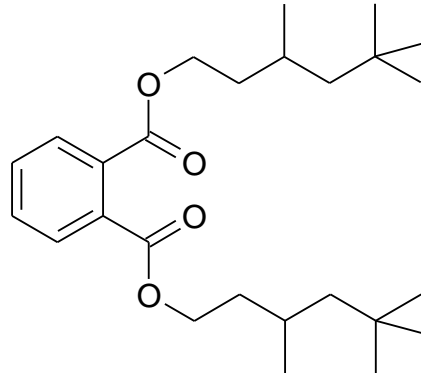
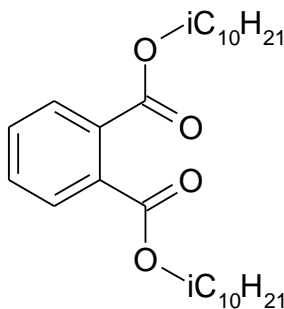
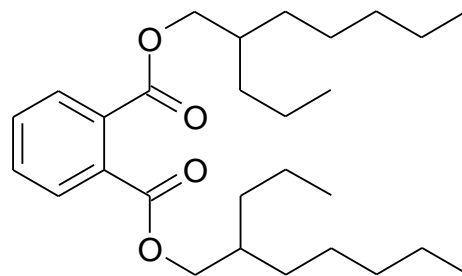


Abbildung 3: Diisodecylphthalat (DIDP) und



Di-2-propylheptylphthalat (DPHP).



In den letzten Jahren sind mögliche gesundheitliche Risiken des universellen Gebrauchs der Weichmacher zunehmend diskutiert worden. Hier ist besonders DEHP in die Kritik geraten.

Eine Arbeitsgruppe der EU verhängte Ende 1999 mit der Entscheidung 1999/815/EG ein Verwendungsverbot für 6 Phthalate (s.u.) in Spielzeug- und Babyartikeln, die dazu bestimmt sind, von Kindern unter drei Jahren in den Mund genommen zu werden .

Ende Juli 2005 erließ das EU Parlament eine Richtlinie, nach der die als fortpflanzungsschädlich eingestuften Weichmacher DEHP DBP und BBP nicht mehr in Spielwaren eingesetzt werden dürfen. Die Weichmacher DINP, DIDP und DNOP dürfen hierbei in Spielzeug nicht mehr verwendet werden, welches Kleinkinder üblicherweise in den Mund nehmen. DEHP gilt als bestuntersuchte Substanz dieser Gruppe, es wird als fruchtschädigend im Mutterleib und fortpflanzungsfähigkeitsbeeinflussend eingestuft (EU-Richtlinie 2005). In Hinblick auf eine Karzinogenität nahm die IARC (International Agency for Research on Cancer) ihre

frühere Risikobewertung möglicherweise karzinogen, durch mangelnde Übertragbarkeit von tierexperimentellen Daten auf den Menschen wieder zurück (Brody, DiGangi et al. 2003).

So werden nach 67/548/EEC für den Umgang mit DEHP zurzeit folgende Gefahrenhinweise verwendet:

R 60: Kann die Fortpflanzung beeinträchtigen.

R 61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

Seit 30.7.2002 müssen DEHP und Zubereitungen, die mehr als 0.5 % DEHP enthalten, EU-weit mit dem Buchstaben T (Toxic) und dem Giftsymbol gekennzeichnet werden. Für die Lebensmittelindustrie gilt nach der Richtlinie über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen (EU-Richtlinie 2002): Für DEHP ist ein spezifischer Migrationsgrenzwert (SML) von 3 mg/kg vorgegeben (EU-Richtlinie 2003). Aufgrund der kritischen Beurteilung des DEHP ist dessen Produktion zunehmend zugunsten der Weichmacher DINP und DIDP reduziert worden:

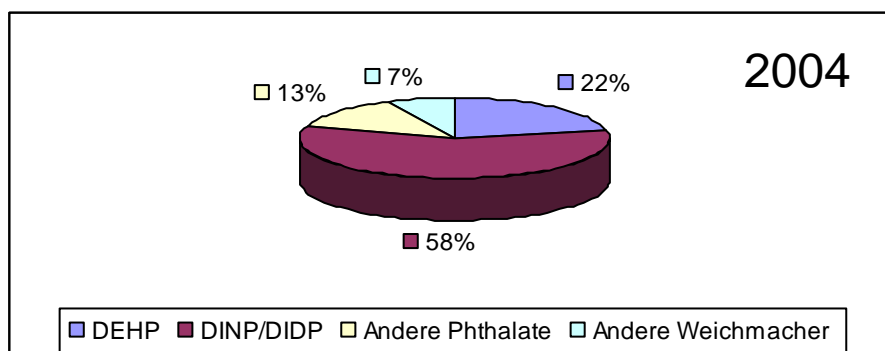
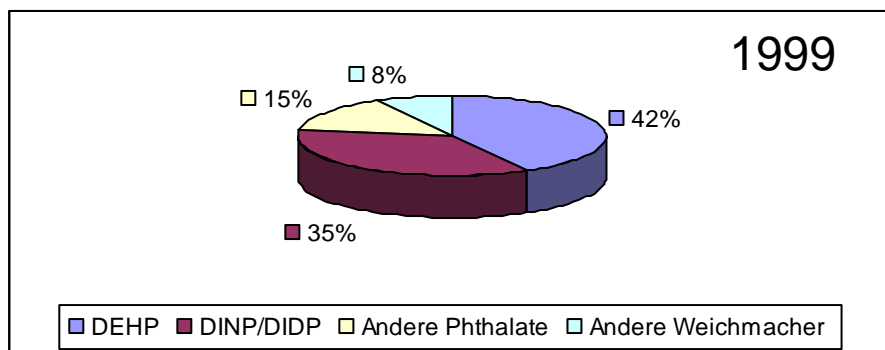


Abbildung 4: Wandel der Weichmacherproduktion in Europa zwischen den Jahren 1999 und 2004 (Quelle: European Council for Plasticisers and Intermediates (ECPI)), (EU-Richtlinie 2003).

1.2. DEHP Exposition der Bevölkerung

1.2.1 Belastung der Allgemeinbevölkerung

Der Ausschuss für Toxizität, Ökotoxizität und Umwelt der Europäischen Kommission (CSTEE) legte NOAEL- Werte für die tägliche DEHP Aufnahme von 3,7 mg/kg/KG fest (Arcadi et al., 1998). Bei NOAEL-Werten (Non Observed Adverse Effect Level) handelt es sich um Expositionskonzentrationen eines Stoffes in chronischen Studien, bei der keine signifikant erhöhten schädigenden behandlungsbedingten Befunde in der Morphologie, Funktion, Wachstum, Entwicklung oder Lebensdauer beobachtet werden. In diesem Fall leiten sich die Grenzwerte von Tierversuchen ab, bei denen Ratten DEHP oral zugeführt wurde (Poon, Lecavalier et al. 1997).

Die Environmental Protection Agency (EPA) der Vereinigten Staaten definierte eine nicht zu überschreitende DEHP Referenzdosis (RfD) von 20 µg/kg/KG/Tag (Doull, Cattley et al. 1999). Der RfD-Wert ist diejenige tägliche Dosis eines Schadstoffes, die ein Mensch ein Leben lang aufnehmen kann, ohne dass er dadurch nachteilige Wirkungen auf seine Gesundheit zu erwarten hat. Eine Studie an Individuen der Durchschnittsbevölkerung (85 Personen) wies eine erhöhte Urinexkretion der DEHP-Metabolite MEHP, 5OH-MEHP und 5oxo-MEHP, auf. Die Konzentrationen der Metabolite wurde dabei um die Kreatininexkretion korrigiert zu Metabolit in µg/g Kreatinin (Koch, Drexler et al. 2003). In einer Folgestudie wurden die Urinkonzentrationen der Metabolite 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP und MEHP im Urin von Schulkindern im Vergleich zu Ihren Lehrern und Eltern bestimmt. Aus der Summe der Metabolitkonzentrationen wurde eine im Durchschnitt doppelt so hohe DEHP-Aufnahme der Kinder im Vergleich zu den Erwachsenen bestimmt (Koch, Rossbach et al. 2003). Die Aufnahme von DEHP über die Nahrung gilt für Kinder als besonders ungünstig, da sie im Vergleich zu Erwachsenen eine höhere tägliche Nahrungsaufnahme pro kg/KG besitzen. (Koch, Drexler et al. 2003);(Becker, Seiwert et al. 2004).

Neben der Nahrung gelten auch in geringerem Maße Raumluft und Hausstaub als Aufnahmequelle (Doull, Cattley et al. 1999).

1.2.2 Weichmacher in Medizinprodukten

Die Verwendung von Weichmachern in der medizinischen Versorgung der Bevölkerung bedarf besonderer Aufmerksamkeit. Neben allgegenwärtigen Kunststoffen des Bauwesens wie z.B. Bodenbeläge, gelten als Gefahrenquelle Stoffe, die direkt mit Sekreten des Menschen in Kontakt treten.

Hier einige Beispiele:

- Blutbeutel (Buchta, Bittner et al. 2005)
- Dialysesysteme (Wahl, Hong et al. 2004)
- Katheter (Kambia, Dine et al. 2003)
- Intubationsschläuche (Kambia, Dine et al. 2003)
- PEG (Ferruti, Mancin et al. 2003)

Weichmacher, und hierbei vor allem DEHP, besitzen in PVC-Produkten einen Massenanteil von 20 bis 80% (Rubin and Schiffer 1976). Die Migration des DEHP aus Blutbeuteln und deren Verteilung auf die verschiedenen Gewebe des Menschen konnte bereits in den frühen 70er Jahre belegt (Valeri, Contreras et al. 1973) und später bestätigt werden (Gotardo and Monteiro 2005).

Patientenkollektive wie Dialysepatienten, Frühgeborene und Patienten auf Intensivstationen weisen eine beträchtlich höhere Exposition durch Weichmacher und ihre Metabolite im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung auf.

So ließ sich bei Dialysen von 4 Stunden Dauer nachweisen, dass sich durchschnittlich 105 mg DEHP aus dem Dialysesystem lösen und auf den Patienten übertragen werden (Flaminio, Bergia et al. 1988);(Flaminio, De Angelis et al. 1988).

Nach Angaben der EPA ergab sich eine DEHP- Belastung bei Hämodialysepatienten von durchschnittlich 457 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$, für an invasive Beatmungssysteme angeschlossene Patienten lagen die Werte bei 700 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$. Diese Werte liegen deutlich über der von der EPA geforderten maximalen täglichen Belastung von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$. Übertragungswege, die die enterale Metabolisierung des DEHP umgehen, gelten hierbei als risikoärmer (Doull, Cattley et al. 1999). Der Weg über die enterale Hydrolyse des DEHP durch die pankreatische Lipase führt im Vergleich zu anderen Aufnahmewegen zu einer erhöhten MEHP Bildung. MEHP wirkt wie DEHP

über Peroxisomen-proliferierende Rezeptoren, tritt jedoch im Gegensatz zum DEHP schneller in die Blutbahn über (Ljungvall, Tienpont et al. 2004).

Aus gesundheitlichen Gesichtspunkten ergeben sich gesonderte Anforderungen für die verwendeten Materialien. Wichtig ist vor allem die Biokompatibilität. Organisches Material, wie z. B. Blut darf durch den Kontakt mit dem verwendeten Kunststoff keine Änderung erfahren. So machen es geeignete Herstellungsverfahren möglich, die Adhäsion von Thrombozyten an Oberflächen zu verhindern. Weiterhin ist eine mechanische Barrierefunktion gebräuchlicher Beutel und Schläuche zur Vermeidung von Gas und Flüssigkeitsaustausch oder Keimverschleppung unerlässlich.

Die hohe Stabilität der Kunststoffe bei Temperaturschwankungen macht es möglich zu verwendende Materialien zu sterilisieren und gegebenenfalls erneut zu verwenden. So gibt es auf dem Markt für die verschiedenen Arten der Sterilisation (Dampf-, Strahlen-, Gassterilisation) mit ihren unterschiedlichen Arten der Belastung auch spezialisierte Kunststoffe.

Bei Kathetern und Infusionsbeuteln ist es auch erwünscht, dass die Kunststoffe transparent sind und somit Flüssigkeitspiegel erfasst werden können. Nicht zuletzt spielen Kostenfaktoren bei der Auswahl der Materialien eine Rolle. All diese Anforderungen lassen sich mit Polymeren und den zugesetzten Weichmachern erreichen.

1.3 Di-2-(ethylhexyl)-phthalat (DEHP)

1.3.1 DEHP und sein Metabolismus in vivo:

Bereits 1975 konnte der Metabolismus des DEHP durch Versuche mit Ratten in vivo belegt werden (Albro 1975). In dieser Arbeit werden die Metabolite 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon, welche sich auch in erhöhten Konzentrationen bei DEHP exponierten Menschen nachweisen ließen, näher untersucht. DEHP wird im Tiermodell zu MEHP und 2-Ethylhexanol hydrolysiert. Über Schritte der ω und $\omega-1$ Oxidation und weiterer Beta-Oxidation konnte auch 4-Heptanon der weiteren Metabolisierung des DEHP zugeordnet werden (Albro 1975). Für den Menschen zeigte sich, dass oral aufgenommenes DEHP durch Lipasen des Interstitiums zu MEHP und 2-Ethylhexanol hydrolysiert wird. Weitere Bestätigung für den im Tierversuch gezeigten Metabolismus erlangte man durch Bestimmung des Vorkommens und der Verhältnisse von DEHP,

MEHP und Phthalat zueinander im Serum von DEHP exponierten Hämodialysepatienten (Pollack, Buchanan et al. 1985). Später ließen sich bei Hämodialysepatienten auch erhöhte Konzentrationen von 4-Heptanon und 2-Heptanon im Plasma nachweisen (Wahl 2004).

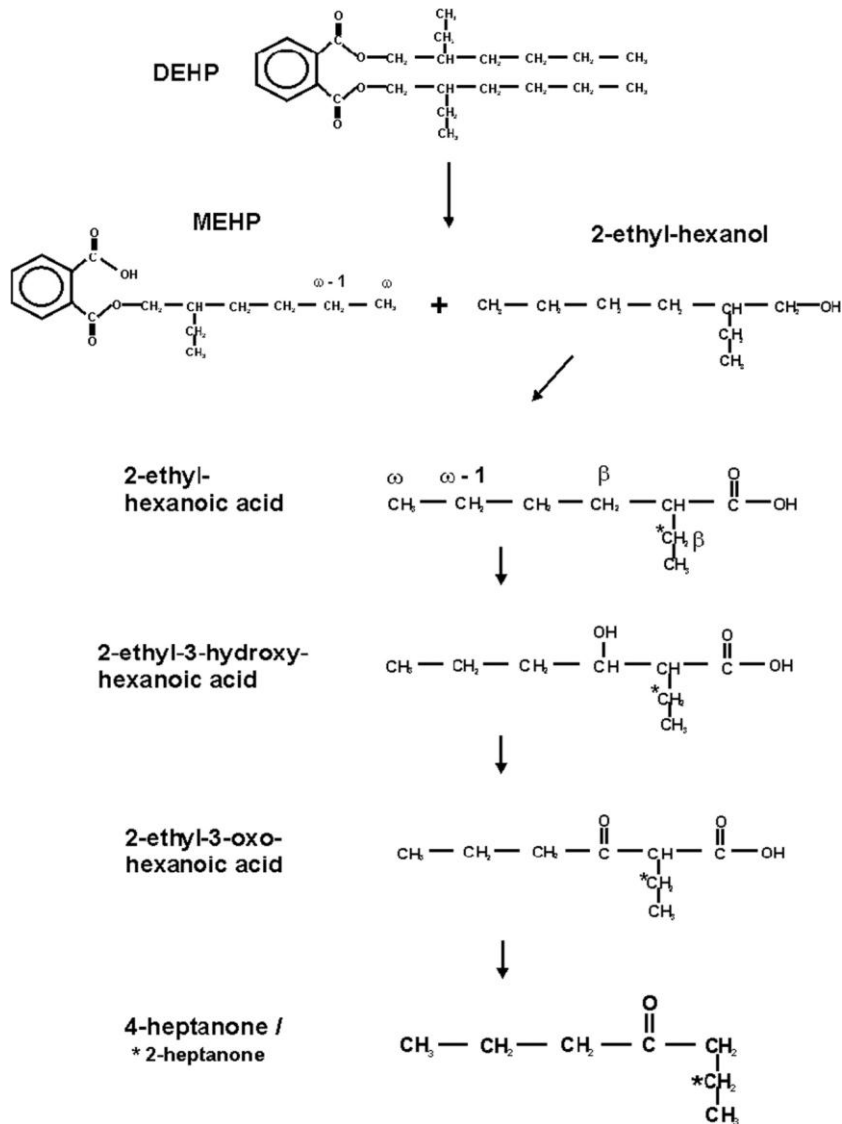


Abbildung 5: Metabolismus des DEHP in Ratten (Quelle:(Wahl, Hong et al. 2004).

1.3.2 DEHP ein Gesundheitsrisiko?

Der Weichmacher DEHP aus der Gruppe der Phthalate war bis vor wenigen Jahren mit einem Marktanteil von 42% die gebräuchlichste Verbindung (Stand 1999).

DEHP zeigt im Tiermodell toxische Effekte in Lunge, Leber, Herz, Fortpflanzungsorganen und dem Endokrinen System die auch beim Menschen vermutet

werden (Sharpe 2001);(Tickner, Schettler et al. 2001). Besonders intensiv wurden die Veränderungen in der Leber untersucht. DEHP führte in Mausversuchen zur Lebervergrößerung, Induktion von peroxisomalen Enzymen und zu vermehrter Eosinophilie und Peroxisomen im Zytoplasma von Hepatozyten (Ward, Peters et al. 1998). Bei DEHP-exponierten Ratten kam es zum vermehrten Auftreten von Lebertumoren, welches sich beim Menschen jedoch nicht bestätigte (Ashby, Brady et al. 1994);(Morimura, Cheung et al. 2006). So zeigte sich beim Menschen eine Peroxisomenproliferation von lediglich 1- 10% der in Tierversuchen gemessenen Werten (Palmer, Hsu et al. 1998). Bei der DEHP-induzierten Tumorgenese in Mäusen zeigten sich Peroxisomenproliferations-unabhängige, wohlmöglich der oxidativen Stressreaktion nahestehende Effekte, die zur Tumorinduktion führen können (Hasmall, Pyrah et al. 1997). Die Übertragbarkeit dieser in Nagern gewonnenen Daten auf den Menschen ist nicht gegeben. Somit wird in der EU in der Kennzeichnung von gefährlichen Substanzen laut 67/548/EEC keine karzinogene Wirkung aufgeführt.

In Bezug auf das endokrine System zeigten sich bei Ratten Missbildungen aufgrund einer reduzierten fetalen Testosteronsynthese (Parks, Ostby et al. 2000). Erhöhte Serumspiegel von LH, Östrogen und Cholesterin sowie ein vorzeitiger Eintritt in die Pubertät unter oraler DEHP-Exposition konnten nachgewiesen werden (Ma, Kondo et al. 2006);(Kurahashi, Kondo et al. 2005; Ma, Kondo et al. 2006).

In Tierversuchen zeigten sich auch Veränderungen der Fortpflanzungsorgane. Während der Pubertät zeigten männliche Mäuse eine reduzierte Spermienproduktion (Lamb, Chapin et al. 1987). Dies zeigt eine verminderte Fertilität an. Beteiligte molekularbiologische Mechanismen scheinen hierbei die DEHP induzierte Aktivierung von Apoptose- Genen PPAR- γ und Pro-Caspase-3 zu sein (Ryu, Whang et al. 2007). Auch Weibchen zeigten über polyzyklische Ovarien und anovulatorische Zyklen Zeichen verminderter Fertilität (Lovekamp-Swan and Davis 2003);(Lovekamp-Swan, Jetten et al. 2003).

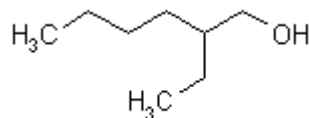
Versuche an Ratten widerlegten Vermutungen zu teratogenen Veränderungen in den Hoden (Poon, Lecavalier et al. 1997).

Aus den aus Tierversuchen gewonnenen Erkenntnissen hat die EU zusammenfassend eine Gefahrenstoffklassifikation (67/548/EEC) für das DEHP erarbeitet. Danach wird DEHP als fortpflanzungsgefährdend der Kategorie 2 eingestuft. Die Kategorie 2 gilt für Stoffe, deren krebserzeugende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsgefährdende Wirkung bei Tieren nachgewiesen und beim Menschen vermutet wird. Im Detail gelten

die R-Sätze (R für risk); R60, kann die Fortpflanzung beeinträchtigen und R61, kann das Kind im Mutterleib schädigen.

Bei der toxikologischen Einschätzung des DEHP besteht die Gefahr, aufgrund der zahlreichen in vivo gebildeten Metabolite des DEHP (siehe Abbildung 5), sekundäre, womöglich den Metaboliten zuzuschreibende Wirkungen zu verkennen. So konnte bereits für den primäre Metabolit des DEHP, MEHP, eine deutlich stärkere peroxisomenproliferative Wirkung im Vergleich zum DEHP in vitro nachgewiesen werden (Kusu, Oishi et al. 2008). So bleibt auch für sekundäre DEHP- Metabolite zu klären, inwieweit sie toxikologisch relevant sind. Diese Arbeit beschäftigt sich aus diesem Grund mit den zwei Hauptmetaboliten, 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon.

1.3.3 2- Ethylhexanol



Vorkommen:

2- Ethylhexanol wird industriell zur Herstellung einer Vielzahl von Produkten verwendet. 2-Ethylhexanol dient als Lösungsmittel für Farbstoffe, Öle, Fette, Wachse und zur Herstellung nichtionischer Tenside. Als Bestandteil des Octocrylene befindet es sich in Sonnencremes. Es bietet der Sonnencreme durch seine Eigenschaft als Fettalkohol eine gewisse Wasserresistenz und zusätzlich eine Pflege für eine weiche Haut.

Der weitaus größte Teil des 2-Ethylhexanol wird jedoch in Form von verschiedenen Estern als Weichmacher in der Kunststoffindustrie eingesetzt. So kann 2-Ethylhexanol mit Säure zu schwerflüchtigen Estern verarbeitet werden. Auf diese Weise wird es in Form von Diethylhexylphthalat (DEHA) als auch für die Synthese des DEHP eingesetzt. Dabei dient in PVC-Folien eingesetztes DEHA unter anderem zur Verpackung von Lebensmitteln wie Käse und frischem Obst.

Toxizität:

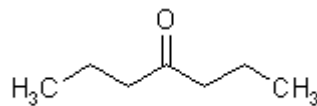
Die akute Toxizität des 2-Ethylhexanol nach oraler Aufnahme in Ratten und Mäusen ist relativ gering. Es ruft Haut-, Augen-, Lungen- und gastrointestinale Irritationen hervor (Rowe 1982). Bei Gabe über 13 Wochen zeigten sich bei Ratten erhöhte Volumina von

Leber, Niere, Hoden und Magen bei insgesamt reduziertem Gesamtgewicht (Astill, Deckardt et al. 1996).

Eine Studie zeigte, dass Symptome von Asthmatikern sich bei Exposition durch 2-Ethylhexanol verschlechtern (Norback, Wieslander et al. 2000).

Ein bei Exposition erniedrigter Zinkserumspiegel von Rattenembryonen konnte mit einer erhöhten Fehlbildungsrate in Zusammenhang gebracht werden (Bui 1998). Der Bezug des 2-Ethylhexanol zu den in dieser Studie untersuchten Genen wird in Kapitel 1.4 weiter erläutert.

1.3.4 4-Heptanon



Vorkommen:

4-Heptanon ist ein niedermolekulares Keton welches bei Raumtemperatur als klare Flüssigkeit vorliegt. Als Keton besitzt es eine nicht endständige Carbonylgruppe als funktionelle Gruppe, welche Additions- und Kondensationsreaktionen ermöglicht. Einige wenige Veröffentlichungen haben sich bisher mit diesem Keton beschäftigt. Nach Erstbeschreibung des Metabolismus des 2-Ethylhexanol (siehe Abb. 5) zu 4-Heptanon im Organismus der Ratte (Albro 1975) konnte 4-Heptanon auch im menschlichen Urin als Abbauprodukt des 2-Ethylhexanols nachgewiesen werden (Wahl, Hong et al. 2004). Dies ähnelt dem Metabolismus der Valproinsäure zu 3-Heptanon über die β -Oxidation (Walker and Mills 2001)..

Toxizität:

Ketone allgemein verursachen beim Auftreten von Dämpfen eine Schleimhautreizung sowie Husten und Atemnot nach Einatmen. Nach wiederholtem Hautkontakt wirken sie entfettend, welches eine sekundäre Entzündungsreaktion induziert. Perorale Aufnahme größerer Mengen führt zu Depression durch Veränderungen im zentralen Nervensystems (Sicherheitsdatenblatt).

Speziell für das 4-Heptanon zeigte sich in Tierversuchen an Kaninchen eine akute Toxizität (LD 50 Werte von 5660 mg/kg) für die dermale Applikation. Der LD-50 Wert nach oraler Aufnahme bei der Ratte lag bei 3730 mg/kg (<http://chemie.uni-lueneburg.de/gefahr/8035/803505.pdf>). Die LD-50 Werte (Mittlere Letale Dosen)

beschreiben diejenige Dosis eines Stoffes, bei der 50% der Versuchstiere nach einmaliger Applikation sterben.

Insgesamt ist die Datenlage bezüglich der Toxizität als 4-Heptanon dürftig einzuschätzen. Ein vermuteter Zusammenhang zwischen erhöhten 4-Heptanon Konzentrationen und Diabetes mellitus konnte nicht bestätigt werden (Wahl, Hoffmann et al. 1999).

1.4 Die Untersuchten Gene im Einzelnen

Die Wahl der untersuchten Gene fiel zuerst auf die Gruppe der Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptoren (PPAR). Dies basiert auf frühen DEHP Toxizitätsuntersuchungen an Mäusen, bei denen eine hepatozelluläre Peroxisomenproliferation als PPA-Rezeptor (PPAR-alpha) vermittelt beschrieben wurde (Ward, Peters et al. 1998).

PPARs sind Rezeptoren der Steroidrezeptor Superfamilie (Willson, Brown et al. 2000). Steroidrezeptoren sind nukleäre Rezeptoren, die nach Aktivierung durch intrazellulär aufgenommene, niedermolekulare, hydrophobe Proteine wie Retinol, Aldosteron, Calcitriol, Östrogen, Thyroid-Hormone (T₃), Gallensäuren bzw. Fettsäuren aktiviert werden (Germain 2006). Rezeptoren aus dieser Familie besitzen zwei Untereinheiten, eine Liganden- Bindungsdomäne, an die spezifische Liganden binden können, und eine DNA-Bindungsdomäne, über die rezeptorspezifische Reaktionen über eine selektive DNA-Promotorregion vermittelt werden (Kliwer, Xu et al. 2001). PPARs werden über endogene (Fettsäuren) sowie exogene (Clofibrat, DEHP) Liganden aktiviert und haben Einfluss auf die Zelldifferenzierung, sowie den Metabolismus von Fetten, Proteinen und Kohlenhydraten (Berger 2005). Weiterhin wird ihnen eine antagonistische Wirkung in der Insulin like Growth Factor (IGF) vermittelten Tumorprogression zugesprochen (Belfiore, Genua et al. 2009). Bisher wurden die PPAR Isoformen α , β/δ und γ beschrieben, wovon die Genexpression von den Subtypen PPAR- α , γ -1 und γ -2 in dieser Studie untersucht wurden und unter 1.4.1 näher beschrieben werden.

Es gibt zunehmende Evidenz, dass speziell PPAR-gamma und seine Liganden Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen-1 bzw. T-Helferzellen-2 und Natürlichen Killerzellen haben. Abbildung 6 verdeutlicht eine postulierte Interaktion verschiedener Modulatoren der T-Helferzellendifferenzierung (Zhang et al. 2002). Dabei fällt bei Betrachtung der Abbildung die zentrale Stellung der nukleären Rezeptoren T-Box-exprimiert in T-Zellen (T-bet) und GATA-DNA-Sequenz bindendes Protein 3 (GATA-

3) auf, welche als entgegen gerichtete Modulatoren der Zelldifferenzierung zu Th1 oder TH2-Zellen angesehen werden (Bowen, Kelly et al. 2008). Dieser gemeinsame Einfluss von PPAR- γ , T-bet und GATA-3 in der T-Helferzellendifferenzierung hat uns veranlasst, auch die Genexpression von T-bet und GATA3 in unseren Stimulationsversuchen zu untersuchen. Eine Beschreibung dieser Gene findet in Kapitel 1.4.2 statt. .

Der Bezug zu den in dieser Studie untersuchten Endothelzellen ergibt sich aus der Überlegung, dass Endothelzellen einer vermehrten Exposition gegenüber vaskulären Toxinen wie den beschriebenen Weichmachermetaboliten aufweisen. Bis auf T-bet wurde die Expression der untersuchten Gene bereits im Endothel nachgewiesen (Umetani, Mataka et al. 2001);(Umetani, Mataka et al. 2001; Ahmed, Ziouzenkova et al. 2007).

1.4.1 Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptoren–Alpha, -Gamma-1, -Gamma-2 (PPAR- α / γ -1, γ -2)

PPAR- α ist ein intrazellulärer Rezeptor, der neben braunem Fettgewebe, Muskel und Nierengewebe besonders in der Leber exprimiert wird. Die Expression des PPAR- α ist vom Ernährungszustand des Individuums und der damit einhergehenden hormonellen Steuerung abhängig. Hierbei reduziert Insulin seine Expression, wohingegen Glykokortikoide sie steigert (Steiniger, Sorensen et al. 1994). Ein Effekt der Rezeptoraktivierung ist die gesteigerte Transkription von Genen der Glukoneogenese in der Leber (Patsouris, Mandard et al. 2004). Als Aktivator der β -Oxidation von Fettsäuren führt PPAR- α Aktivierung zur vermehrten Bereitstellung von für den Körper nutzbarer Energieformen. PPAR- α Aktivatoren wie Pharmaka aus der Gruppe der Fibrate führen durch den Mechanismus des vermehrten Fettsäureabbaus zu einer deutlichen Reduktion von Triglyceriden im Blut (Duez, Fruchart et al. 2001); (Kliwer, Xu et al. 2001).

In Tierversuchen führten exogene Peroxisomen- Stimulatoren wie DEHP zu einer PPAR- α -Aktivierung und daraufhin zum Auftreten von Lebertumoren. Dabei war das vermehrte Auftreten vergrößerter Peroxisomen auffällig (Takashima, Ito et al. 2008). Eine Aktivierung des PPAR- α führt zu einer erhöhten Produktion von peroxisomalen Enzymen und Cytochrom P450 Enzymen (Schoonjans, Martin et al. 1997).

Tierversuche mit PPAR- α -defizienten Knockout Mäusen zeigten hingegen kein gehäuftes Auftreten von Lebertumoren (Gonzalez 1997). Bei menschlichen Hepatozyten ließ sich, im Vergleich zu Leberzellen der untersuchten Nagetiere, nur 1-10% der PPAR- α Aktivität nachweisen. Dies macht ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Lebertumoren unwahrscheinlich (Palmer 1996). Es ließ sich beim Menschen auch keine signifikante Zunahme von Peroxisomenzahl- und Volumina nachweisen (Willson, Brown et al. 2000). Auch eine geringere PPAR- α - Rezeptordichte in humanen im Vergleich zu murinen Hepatozyten konnte gezeigt werden.(Maloney and Waxman 1999).

PPAR- γ -Rezeptoren lassen sich in verschiedensten menschlichen Geweben nachweisen. Er wird in hämatopoetischen, Fett-, Leber-, Milz-, Kolon-, Herz- und Hodenzellen exprimiert. Ein Ligand an diesem Rezeptor ist Troglitazon, ein Insulinsensitizer, welcher in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzt wird. Ein Rezeptoreffekt ist die Differenzierung von Preadipozyten in Adipozyten, welche die Fettspeicherung fördert (Brun, Kim et al. 1997). Auch andere Zelltypen wie Fibroblasten scheinen durch PPAR- γ Aktivierung einer Metaplasie zu Adipozyten zu unterliegen (Hamm, el Jack et al. 1999).

Es lassen sich zwei Subtypen unterscheiden. In in vivo Stimulationsversuchen führte Östrogen zu einer durch PPAR- γ -1 Aktivierung induzierten Peroxisomenproliferation in der uropygialen Drüse; PPAR- γ -2 hat einen Einfluss auf die Fettgewebisdifferenzierung (Ma, Tam et al. 1998). PPAR- γ -1 gewinnt auch an Bedeutung in der Krebsforschung. Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms exprimieren besonders ausgeprägt PPAR- γ -1 und scheinen dadurch Ihre Sensitivität auf verschiedene Chemotherapeutika zu verlieren (Kim, Hwang et al. 2007).

1.4.2 GATA-DNA-Sequenz bindendes Protein 3 (GATA3) und T-Box-Exprimiert in T-Zellen (T-bet) getriggerte Immunreaktionen

GATA-3 wird zur Familie der GATA(Guanin/Adenin/Thymin/Adenin)-bindenden Rezeptoren gezählt. GATA [genauer: T/A(GATA)A/G] ist eine DNA-Basensequenz, welche für die Promoter-induzierte Expression von spezifischen Genen als essentiell angesehen wird (Orkin 1992). Initial wurde GATA-DNA-Sequenz vermittelte

Genexpression anhand von Globulinen in Erythrozyten beschrieben (Evans, Reitman et al. 1988). GATA-Rezeptoren gelten als evolutionsbiologisch im hohen Grad konserviert (Ko and Engel 1993). GATA-3 gilt als Schlüsselgen im Lymphohaematopoetischen System. So fehlt GATA-3 defiziente Mäusen die Fähigkeit, frühe Thymozyten aus lymphopoetischen Vorläuferzellen zu bilden (Pai, Truitt et al. 2004). Auch fehlt es diesen Mäusen an der Bildung von reifen peripheren T-Lymphozyten (Ting 1996) ;(Kim, Hwang et al. 2007). GATA-3 gilt besonders als TH-2-Zell Differentiator und als Regulator einer TH-2-Antwort des Immunsystems. Interleukin 4 ist der bekannteste Stimulator einer GATA-Expression. Einmal aktiviert, kann GATA-3 isoliert eine Vielzahl von TH-2 Zytokinen steuern (Barnes 2008).

In letzter Zeit wird auch ein Einfluß des GATA-3 Transkriptionsfaktors auf nichtimmunologische Prozesse diskutiert. So lässt sich GATA-3 auch in Zellen des zentralen Nervensystems, der Haut und während der Embryogenese nachweisen (George, Leonard et al. 1994) ;(Rivolta and Holley 1998) ;(Kaufman, Zhou et al. 2003). Darüber hinaus konnte GATA-3 eine expressionsfördernde Wirkung auf Wachstumsfaktoren in entarteten luminalen Brustkrebszellen nachgewiesen werden (Fang, Chen et al. 2008).

T-bet (Tbx-21) ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor. Er gehört zu der Familie der T-box Genfamilie, die sich durch eine homologe DNA-Bindungsregion auszeichnet. Schwerwiegende Defekte dieser Gene sind durch ihre Bedeutung in der Gastrulation und Organogenese mit dem Leben nicht vereinbar (Naiche, Harrelson et al. 2005). Das Holt-Oram-Syndrom wird ebenfalls im Zusammenhang mit T-box Gendefekten genannt und zeichnet sich durch Fehlbildungen des Herzens und der oberen Extremitäten aus (Plageman and Yutzey 2006) ;(Hasson, Del Buono et al. 2007).

T-bet ist einer dieser etwa 20 bekannten Faktoren. An Bedeutung hat T-bet erlangt durch seine verschiedenen Regulationsmechanismen der T- Lymphozyten So zeigen Knock-Out-Mausversuche, dass ohne ein funktionsfähiges Gen sich keine TH1- Zellen ausbilden (Szabo, Sullivan et al. 2002). Darüber hinaus lässt sich T-bet auch in dendritischen Zellen, B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen nachweisen. Es ergeben sich zusätzlich weit reichende Einflüsse auf das Immunsystem, durch die Steuerung von Cytokinen und Chemokinen. Nach heutiger Sicht wird T-bet in vieler seiner Funktionen als Antagonist des GATA-3 gesehen. So führt T-bet zur Freisetzung von Zytokinen vom Th1-Typ wie $\text{INF-}\gamma$ und supprimiert die Bildung von IL-4 und IL-

5 (Szabo, Sullivan et al. 2002). GATA-3 hingegen führt zur Bildung der TH-2 Zytokine wie IL-4. So führt z. B. die Stimulation des T-Zell-Rezeptors einer TH-4-Zelle zur vermehrten T-bet, IL12 und IF- γ Bildung, wohingegen GATA-3 vermindert exprimiert wird (Ariga, Shimohakamada et al. 2007).

Immunantworten vom TH1-Typ treten in Kontakt des Organismus mit intrazellulären Mikroorganismen auf, während eine TH-2-Antwort auf parasitäre, allergische Stimuli geschieht. Gerade bei chronischen Erkrankungen spielen Fehlregulierungen dieser beiden Systeme eine Rolle. So lässt sich eine dysregulierte TH-1-Antwort bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, nachweisen (Behrens, Himsel et al. 2007). Eine typischerweise hochregulierte Th-2-Antwort bei niedrigen Spiegeln an Th-1 Zytokinen findet sich bei kutanen Lymphomen wie dem Sezary-Lymphom (Hahtola, Tuomela et al. 2006). Hingegen zeigt sich beim systemische Lupus Erythematoses eine Hochregulierung beider Systeme (Lit, Wong et al. 2007).

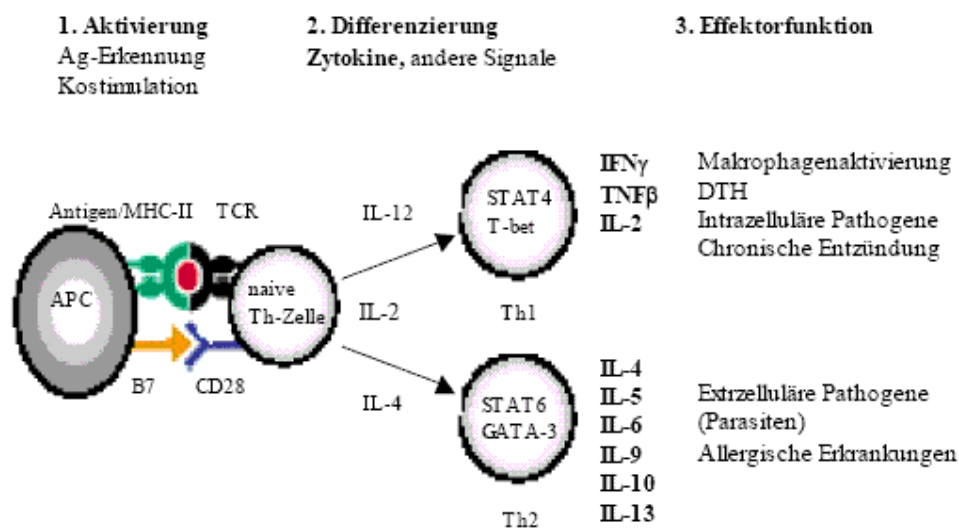


Abbildung 6: T-Helferzellendifferenzierung in TH-1 und TH-2 Zellen durch T-bet bzw. GATA-3 (Zhang 2004).

1.4.3 Die Vorgestellten Gene im Bezug zum Endothel:

In dieser Arbeit wurden Stimulationsversuche an Endothelzellen (HMEC-1) durchgeführt. Für diese Zellen konnte nachgewiesen werden, dass sie PPAR- α und PPAR- γ exprimieren (Ahmed, Ziouzenkova et al. 2007). In letzter Zeit wurde der Zusammenhang zwischen Atherosklerose und PPAR-Expression untersucht:

Atherosklerose wird unter anderem über die Proliferation glatter Muskelzellen vermittelt. Dabei fungiert Endothelin-1 als einer der Botenstoffe, der die Proliferation glatter Muskelzellen fördert (Komuro, Kurihara et al. 1988). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl PPAR- α als auch PPAR- γ in Endothelzellen (HMEC-1) die Endothelinexpression hemmen. So wird ein Atherosklerose hemmender Effekt der PPARs diskutiert (Delerive, Martin-Nizard et al. 1999).

In Endothelzellen zeigte sich weiterhin, dass eine Überexpression von GATA-3 zu einer reduzierten TNF- α induzierten VCAM-1 Expression führt (Umetani, Mataka et al. 2001). VCAM-1 ist ein Mediator der Extravasation von Leukozyten in entzündliche Regionen (Oppenheimer-Marks 1991).

Über das Vorkommen und die Funktion von T-bet in Endothelzellen ist in der Literatur bis zu diesem Zeitpunkt nichts zu finden. Als klassischer Gegenpart zu GATA-3 findet er in dieser Arbeit Beachtung.

1.5 Fragestellung

- a) Zeigt sich eine toxische Wirkung des 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon auf mikrovaskuläre Endothelzellen?
- b) Wird die für DEHP gezeigte PPAR-Aktivierung auch durch seine Metabolite 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon induziert?
- c) Rufen 2-Ethylhexanol bzw. 4-Heptanon eine Immunmodulation hervor?
- d) Welchen Bezug haben mögliche veränderte Gen-Expressionsmuster auf die Funktion des Endothels?
- e) Wird T-bet in Endothelzellen expremiert?

2. Materialien und Methoden

2.1 Erstellen einer Zellkultur

2.1.1 Herkunft der Zellen

HMEC-1 steht für „human dermal microvascular endothel cells“. Es ist eine immortalisierte Zelllinie bestehend aus vaskulären Endothelzellen der menschlichen Haut. Sie zeigen im Wachstum Endothelzeleigenschaften (Pflastersteinmuster des konfluierenden Monolayers) und besitzen den primären Zellen entsprechende Funktionen (Ades, Candal et al. 1992).

Herkunft der HMEC-1- Zellen: Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, USA

2.1.2 Kulturmedium

Als Kulturmedium diente das MCDB 131 Formular. Es wurde speziell für das klonale Wachstum von humanen mikrovaskulären Zellen entwickelt (Knedler and Ham 1987). Es wurden 10 mM L-Glutamin, 10 ng/ml Epidermal Growth Factor, 1 µg/ml Hydrokortison und 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin als Antibiotikum hinzugegeben. Kurz vor Gebrauch wurde, aufgrund seiner geringen Haltbarkeit Fetales Kälberserum (FCS) hinzugegeben. Der Anteil am Gesamtmedium betrug 10%.

Material:

- Gibco MCDB 131 Formula, Invitrogen, Karlsruhe, D
- L- Glutamin, Sigma, Deisenhofen, D
- EGF: Epidermal Groth Factor, Biochrom, Berlin, D
- Hydrokortison, Sigma, Deisenhofen, D
- Penicillin/Streptomycin, Biochrom, Berlin, D
- FCS: Fetales Kälberserum, PAA Laboratories, Cölbe, D

2.1.3 Erstellen einer Zelllinie

Die vom Hersteller tiefgefroren gelieferten Zellen wurden im Wärmebad aufgetaut und in eine Zellkulturflasche überführt. Die Zelllinie wurde nun bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Das weitere Wachstum der Zellen wurde täglich mikroskopisch überwacht. Bei einer Generationszeit von 2 bis 3 Tagen konnten, nach Bildung eines dichten Zellrasens, die Zellen einer 200 ml Zellkulturflasche auf 2 gleichartige Kulturflaschen überführt werden.

Die Endothelzellen sollten nicht mehr als 70% des Zellkulturflaschenbodens bedecken, da weiteres Wachstum ein Mangel an Nährmedium und Platz für die einzelne Zelle bedeutet. So ist der exponentielle Anteil der Wachstumskurve der Zelllinie für eine einheitliche Stoffwechselaktivität und somit einer einheitlichen Expressivität am günstigsten. Weiterhin wurde die Zahl von 10 Passagen beim Fortführen der Zelllinie nicht überschritten. Dieses dient der Reproduzierbarkeit der Experimente.

Zum Überführen der Zellen einer Zellkulturflasche auf zwei weitere Zellkulturflaschen, mussten sie an einen sterilen Arbeitsplatz (Laminar Flow Bench) gebracht werden. Dort wurde unter Schräghalten der Zellkulturflasche das Nährmedium abgesaugt. Zur Reinigung der Zellen wurde die Zellkolonie zwei Minuten mit 10 ml Ca²⁺/Mg²⁺ freier PBS Lösung behandelt, welche danach wieder abgesaugt wurde. Da es sich um adhärente Zellen handelt, war es nun erforderlich, mit Hilfe von 2 ml Trypsin, unter mikroskopischer Kontrolle, die Zellen zu lösen. Es ist zu beachten, dass die proteolytische Wirkung des Trypsins bei Überschreiten der empfohlenen Einwirkzeit von 1 bis 5 Minuten zur Lyse der Zellen führt. Sobald nun unter mikroskopischer Sicht, sich ein Großteil der Zellen gelöst hat, konnte die Proteolyse durch Dilution mit 8 ml Medium gestoppt werden. Nun wurden die verbliebenen 10 ml Zell-Suspension in ein 50 ml Tube pipettiert. Dieses Tube wurde dann unter Zuhilfenahme eines Gegengewichtes gleicher Masse bei 1300 u/min sechs Minuten lang zentrifugiert. Dadurch bildeten sich am Boden des Tubes ein Zellpellet und darüber eine flüssige Phase, die abpipettiert und verworfen wurde. Das verbleibende Zellpellet wurde, durch Zugabe von 20 ml Medium und mehrfaches Auf- und Abpipettieren im Medium resuspendiert, so dass keine Zellagglomerate bei Betrachtung mehr sichtbar waren.

Von dieser Suspension konnten dann je 10 ml auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt werden. Nun wurden die Zellsuspensionen mit jeweils 10 ml Medium ergänzt und zur

weiteren Inkubation in den Brutschrank gestellt. Falls bei geringem Wachstum nach zwei Tagen die Zellen noch nicht umgesetzt werden mussten, war es nötig das Medium zu erneuern, wobei das verbrauchte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS Buffer gereinigt und nach absaugen des PBS Puffers mit 20 ml Medium ergänzt wurden.

Material:

- Dulbecco`s PBS, PAA Laboratories, Cölbe, D
- 2,5%iges Trypsin in HANK`scher Lösung, Sigma, Hamburg, D
- Brutschrank Thermo Electron, Haereus, Hanau, D
- Mikroskop MX51, Olympus, Hamburg, D
- Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, D
- Clean Bench, Heraeus. Hanau, D
- Sonstiges Standardlaborzubehör

2.2 Stimulation der Zellen

2.2.1 Umsetzen der Zellen auf Wellplatten

Zur Vorbereitung der Stimulationsversuche war es erforderlich, eine ausreichende Anzahl an Zellen heranwachsen zu lassen. Die verschiedenen Stimulationsversuche wurden auf Sechs-Wellplatten durchgeführt. Bei gewünschten Stimulationen für fünf Konzentrationen 4-Heptanon plus vier Konzentrationen 2-Ethylhexanol mit jeweils einer unstimulierten Zellreihe waren 11 Wells notwendig.

Ein Teil des 4-Heptanons und des 2-Ethylhexanols geht bei Raumtemperatur in den gasförmigen Zustand über und kann zu einer Verunreinigung benachbarter Wells führen. Um späteren Fehlmessungen zu entgehen, wurde jede Stimulation in einer eigenen 6- Wellplatte durchgeführt und ein Sicherheitsabstand zwischen den Wellplatten innerhalb des Brutschrankes eingehalten. Nach Angaben des Herstellers des verwendeten RNA-Isolationskits, ist, um die einzelnen Filter nicht zu überlasten und eine ausreichende RNA Konzentration zu erhalten, eine Zellzahl im Bereich von $1 \cdot 10^5$ bis $1 \cdot 10^7$ zu wählen.

Zur Bestimmung und Überführung einer ausreichenden Zellzahl wurden vier 20 ml Zellkulturflaschen aus dem Brutschrank an einen sterilen Arbeitsplatz gebracht. Nach Reinigung jeder einzelnen Zellkultur mittels 10 ml PBS Buffer, Lyse durch 2 ml Trypsin und Stoppen der Lyse mittels 8 ml Medium wurden die Zellen aller vier Zellkulturflaschen in ein 50 ml Tube pipettiert. Diese Tube wurde wiederum bei 1300 u/min 6 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überstand abpipettiert, so dass nur das Zellpellet im Tube übrig blieb. Für die Suspension des Zellpellets wurden 20 ml Medium hinzu gegeben und gründlich auf- und abpipettiert. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl dient eine Neubauer Zählkammer. Die Kammern, bestehend aus 4 Quadraten, wurden mit 100 µl Zellsuspension gefüllt und wie folgt ausgezählt.

83	81
81	98

Mittelwert: 85,75

100 µl Zellsuspension haben einen Anteil an der gesamten Suspension von 1/10.000* 20 (ml).

Daraus resultiert eine Gesamtzahl an Zellen in dem Tube von:

$$\mathbf{85,75 * 10.000 * 20 \text{ (ml)} = 17,15 * 10^6 \text{ in 20 ml}}$$

Bei Verteilung der 20 ml auf 11 Wells ergibt sich pro Well eine Zellzahl von $1,56 * 10^6$ Zellen. Diese Zahl liegt im Bereich der vom Hersteller empfohlenen Konzentration. Somit konnten 1,8 ml Zellsuspension pro Well verteilt werden. Hinzu kamen noch 1,2 ml Medium um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Zur Vorbereitung der Stimulation wurden die 11 Sechs-Wellplatten mit je einem kultivierten Well zur Adhesion der Zellen für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Material:

- Neubauer Zählkammer, VWR, Darmstadt, D
- 4- Heptanon (Merck, Chemicals, Darmstadt, D)
- 2- Ethylhexanol (Merck, Chemicals, Darmstadt, D)

2.2.2 Stimulation mit 4-Heptanon

Stimuliert wurden die Zellen mit den Konzentrationen 250, 500, 750, 1000 und 2000 $\mu\text{g/l}$ über 24 Stunden. 4-Heptanon besitzt eine Dichte von 0,817 g/ml. Somit entspricht 1 g 4-Heptanon 1,22 ml.

Zur Stimulation werden somit 0,305 $\mu\text{l/l}$, 0,61 $\mu\text{l/l}$, 0,915 $\mu\text{l/l}$, 1,22 $\mu\text{l/l}$ und 2,44 $\mu\text{l/l}$ eingesetzt.

Als Verdünnungsflüssigkeit diente das MCDB 131 Medium. Es wurde nun das in den Wells befindliche Medium durch je 3 ml der einzelnen Heptanonkonzentrationen ersetzt. Die Zellen eines Wells blieben unstimuliert. Das Erstellen einer Stammlösung, aus der eine Verdünnungsreihe fortgeführt werden kann, erleichtert das Pipettieren und beugt Fehlern vor.

2.2.3 Stimulation mit 2-Ethylhexanol

Bei der Stimulation mit 2-Ethylhexanol wurden Konzentrationen von 500, 1000, 2000 und 10000 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. 2-Ethylhexanol hat eine Dichte von 0,832 g/ml. Somit entspricht 1 g 2-Ethylhexanol 1,202 ml.

Zur Stimulation werden somit 0,6 $\mu\text{g/l}$, 1,2 $\mu\text{g/l}$, 2,4 $\mu\text{g/l}$ und 12,02 $\mu\text{g/l}$ eingesetzt.

Auch hier wird im Weiteren wie bei der 4-Heptanon- Stimulation verfahren.

Stimuliert wurde in beiden Fällen über einen Zeitraum von 24 Stunden.

2.3 RNA Isolierung

2.3.1 Zellyse und Nukleinsäureisolation

Alle Schritte für die RNA-Isolierung mussten zügig an einem sterilen Arbeitsplatz durchgeführt werden. Zur Lyse und RNA-Extraktion wurde das Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit 250 verwendet. Nach Ablauf der 24 Stunden Stimulation wurde das eingesetzte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen.

Nach Stimulation waren mikroskopisch keine Abweichungen vom normalen Wachstumsverhalten der Zellen nachweisbar. Nach Angaben des Herstellers wurde wie folgt vorgegangen:

- Zur Lyse wurde jedes Well mit 700 µl Lysis Solution R versetzt, welche über 2 Minuten auf- und abpipettiert wurde, bis sich die Zellenadhäsionen und Membranstrukturen gelöst hatten.
- Jede Suspension wurde auf einen sich im Receiver Tube befindlichen DNA Spin Filter gegeben und 1 Minute lang inkubiert. Danach wurde 2 Minuten lang zentrifugiert (12000U/min), woraufhin der DNA Filter entfernt werden konnte.
- Anschließend wurde dem Lysat je 2* 700 µl 70%iger Ethanol hinzugeführt und nach gründlichem Auf- und Abpipetieren auf einen sich in einem neuen Receiver Tube befindlichen RNA Binding Spin Filter gegeben und 1 Minute inkubiert.
- Nach Gebrauch der Mikrozentrifuge (10.000 U/min, über 30 s) konnte das Filtrat verworfen werden. Das Aufbringen der RNA musste erneut durchgeführt werden, da der Filter ein Fassungsvermögen von nur 700 µl besitzt. Darauf folgten 2 Aufreinigungsschritte.
- Erst wurde der RNA Binding Spin Filter mit 600 µl Wash Buffer R1 versetzt und erneut zentrifugiert (10.000 U/min, über 30 s). Das Filtrat wurde verworfen.
- Anschließend wurden 500 µl Wash Buffer R2 auf den Filter pipettiert und zentrifugiert (10.000 U/min, für 30 s). Dieser Schritt wurde wiederholt und das jeweilige Filtrat verworfen.
- Ein weiteres Zentrifugieren (12.000 U/min über 3 min) diente der Trocknung des Filters.
- Der Filter wurde in ein RNase- free Elution Tube gesetzt und mit 80 µl Elution Buffer versetzt.

- Nach 2 Minuten Ruheinkubation und Zentrifugieren (10.000 U/min, über 1 min), konnte der Filter verworfen werden und die eluierten Nukleinsäuren bei – 80 °C konserviert werden.

Materialien:

- Invisorb Spin Cell Mini Kit (250), Invitex, Berlin, D
- 70%iger Ethanol, Sigma, Steinheim, D
- Mikrozentrifuge, Eppendorf, Hamburg, D

2.3.2 DNA Inaktivierung

Ziel dieses Schrittes ist es, Proben zu erstellen, die nach Möglichkeit nur RNA enthalten. DNA wurde bereits durch den DNA Spin Filter aus den Proben herausfiltriert und verworfen. Um sicher zu gehen wurde nun DNA mittels DNase verdaut. So ist davon auszugehen, dass nur die transkribierte cDNA und nicht die des Nukleus zu vergleichenden Untersuchungen heran gezogen wird.

Hierzu diente das DNA- free Kit (Firma Ambion).

Nach Auftauen der Proben, wurde die weitere RNA- Aufreinigung den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt.

- Zuerst wurden den einzelnen Volumina 8 µl DNase 1 Buffer (0,1 µl/µl Volumen) und 1 µl DNase I zugegeben und 20 bis 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.
- Inaktiviert wurde dieses Enzym daraufhin mittels je 8 µl DNase Inactivation Reagent (0,1 µl/µl Volumen).
- Zuletzt wurde nach 2 Minuten Ruheinkubation bei Raumtemperatur abschließend zentrifugiert (10.000 U/min über 1 min) und auf Eis gelagert.

Material:

- DNA- free Kit, Ambion, Kassel, D

2.3.3 RNA Konzentrationsbestimmung

Zur RNA Konzentrationsbestimmung konnte ein Photometer den Proben entsprechend (Nukleinsäure/RNA, Verdünnungsfaktor/50, Messzeit 5s) eingestellt werden. Der 0-Abgleich erfolgte in der zugehörigen gereinigten Küvette mittels Aqua dest. Nun konnte jede Probe auf Ihren RNA- Gehalt überprüft werden.

So wurden jeder Probe jeweils 2 µl entnommen und mit 98 µl Aqua dest. verdünnt. Die so vorbereitete Küvette wurde in den Strahlengang des Photometers gesetzt. Jede Probe wurde dreifach gemessen, so dass aus diesen Werten später Mittelwerte gebildet wurden. Zwischen den Messungen musste die Küvette von Rückständen gereinigt werden.

2.4 Reverse Transkription

2.4.1 cDNA Synthese

Zur Bestimmung selektiver RNA- Sequenzen sind 2 Schritte von Nöten. Zuerst wird eine RNA- Probe in ihre komplementäre cDNA umgeschrieben. Im Weiteren werden selektive Basenfolgen in der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und ihre Quantität bestimmt. Verfahren, die reverse Transkription und PCR in einem Arbeitsschritt durchführen, sind mit geeigneter Technik möglich, in dieser Arbeit jedoch nicht verwirklicht worden.

Die Transkription ist die Biosynthese von RNA an der DNA nach dem Prinzip der Basenpaarung. Bei der reversen Transkription dient jedoch umgekehrt die RNA als Template und die cDNA ist das Produkt der Reaktion. Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt dabei die isolierte RNA um. Es wird DNA für den PCR- Ansatz benötigt, da das verwendete Enzym HotStarTaq DNA Polymerase spezifisch DNA Sequenzen amplifiziert.

Die reverse Transkription wurde nach dem Pipettierschema des SuperScript II RT Kits (Invitrogen) durchgeführt. Das Kit wurde entwickelt, um durch effektive Reduktion der RNase H Aktivität (RNase OUT), größere Mengen ungekürzter cDNA zu generieren. Auch bei einer Probe, die Gesamt-RNA enthält, gibt es kaum Interferenzen mit transfer

RNA (tRNA) und ribosomaler RNA (rRNA). So dient dem Enzym selektiv mRNA als Template.

Um RNA-Proben in einheitlichen Konzentrationen zu erhalten, mussten sie mit unterschiedlichen Mengen RNAase freiem Wasser verdünnt werden. Dabei war die niedrigste, bei der photometrischen Messung erhaltene, RNA-Konzentration gleich 1 zu setzen. So wurde diese Probe unverdünnt eingesetzt und die weiteren Proben entsprechend ihrem RNA-Gehalt verdünnt. Im Einzelnen wurde unter sterilen Bedingungen wie folgt vorgegangen:

- Die Summe aus der jeweiligen RNA-Probe und Wasser wurde gleich 10 μ l gesetzt und pipettiert. Als Leerkontrolle wurde eine Probe aus 10 μ l reinem Wassers mitgeführt.
- Nun wurde den einzelnen Proben 1 μ l Random Primer (250 ng/ μ l) und 1 μ l Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) zugeführt, nach Vortexen bei 65 °C über 5 Minuten inkubiert und darauf kurz auf Eis gesetzt.
- Zu den Proben wurden nun je 4 μ l 5* First Strand Buffer, 2 μ l DTT (0,1 M) und 1 μ l RNaseOUT (40 U/ μ l) pipettiert. Nach kurzem Zentrifugieren (8000 U/min über 30 s) folgten 2 Inkubationsschritte.
- Erst wurde für 10 Minuten bei 25 °C und anschließend für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Weitere 1 μ l SuperScript II Reverse Transkriptase (SSII RT) (400 U/ μ l) wurden zu den Proben pipettiert und leicht zentrifugiert.
- Erneute Inkubation für 50 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70 °C im Wärmeblock führten zum letzten Schritt:
- Das Pipettieren von 1 μ l E-coli RNase H pro Probe, weitere Inkubation für 20 Minuten bei 37°C beendete die Reaktion. Die Proben konnten nun wieder im Gefrierschrank gelagert werden.

Material:

- SuperScript II RT, Invitrogen, Karlsruhe, D
 - Random Primer
 - dNTP Mix
 - DTT
 - RNaseOUT
 - SSII RT, Superscript II- Reverse Transkriptase
 - First Strand Buffer

- E.coli RNase H
- Heizplatte, IKA, Staufen, D

2.5 Polymerase Kettenreaktion

2.5.1 Grundlegende Prinzipien

Die erstmals von Mullis (Mullis, Faloona et al. 1986) beschriebene Methode dient der *in-vitro*-Amplifizierung von DNA. Dieses Verfahren ist von Nöten, da die intrazelluläre DNA für ihren Nachweis ohne Vervielfältigung nicht ausreicht. Die ersten Versuche waren jedoch sehr ineffektiv, da sie große Mengen an DNA-Polymerase und auch an Zeit benötigten. Erst die Entdeckung einer thermostabilen DNA-Polymerase, stammend aus bei Temperaturen von über 100 °C lebenden Bakterien (*Thermus aquaticus*), brachte den Durchbruch (Saiki, Gelfand et al. 1988). Ältere Techniken waren von Mikroorganismen abhängig (Arnheim and Erlich 1992).

Diese Polymerase Kettenreaktion ist angelehnt an die *in-vivo* DNA-Replikation während der Mitose. So werden auch einem solchen Reaktionsansatz eine DNA-Probe und eine Polymerase zugefügt, die wiederum einen Primer als Initiator der Synthese benötigt. Dieser Primer ist eine DNA-Sequenz, die so ausgewählt wird, dass sie komplementär zu einem Abschnitt eines gesuchten Gens ist. Sie ist somit für die Selektivität der Amplifikation verantwortlich. So wird nur der zur Primersequenz komplementäre DNA-Strang amplifiziert. Die in der Ausgangsprobe befindliche restliche cDNA wird nicht amplifiziert, und man erhält mit jedem Amplifikationsschritt einen geringeren Anteil an der Gesamt-DNA.

Heute hat diese Technik vielfältige Anwendungsbereiche, um z.B. die Täterschaft verdächtiger Personen nachzuweisen, Erbkrankheiten zu diagnostizieren oder auch prähistorische Erbinformation zu entschlüsseln.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode ist die in dieser Arbeit angewendete Realtime-PCR. Das Prinzip basiert darauf, dass nach jedem Replikationszyklus die entstandene doppelsträngige DNA mengenmäßig erfasst wird. Um die DNA quantifizieren zu können, wird sie mit einem Farbstoff markiert.

Hierfür wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der nur an das Produkt, doppelsträngige DNA, bindet. Dies geschieht proportional zu deren Gehalt und unspezifisch in Bezug auf die Sequenz:

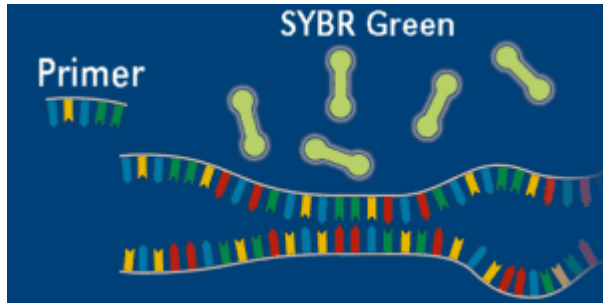


Abbildung 7: Primer, DNA-Doppelhelix und SYBR-Green-Detektionssonden vor der DNA-Amplifikation. Quelle: University of Strathclyde in Glasgow (<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/lect403.html>).

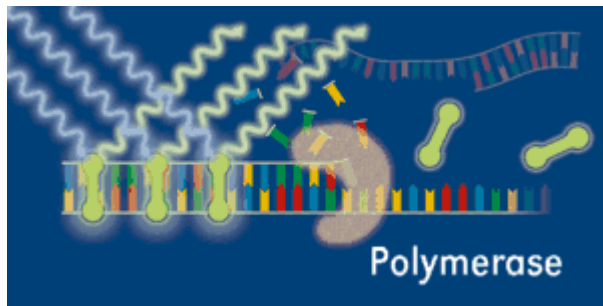


Abbildung 8: Vorranschreitende Transkription der Zielsequenz mit Einbau des SYBR-Green in die doppelsträngige DNA und resultierender Fluoreszenz-Emission. Quelle: University of Strathclyde in Glasgow (<http://homepages.strath.ac.uk/~dfs97113/BB310/lect403.html>).

In dieser Arbeit wurde der asymmetrische Cyanin-Farbstoff SYBR- Green verwendet. Er besitzt die Eigenschaft, blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{max}} = 498 \text{ nm}$ zu absorbieren und rotes Licht bei $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$ zu emittieren (Zipper, Brunner et al. 2004).

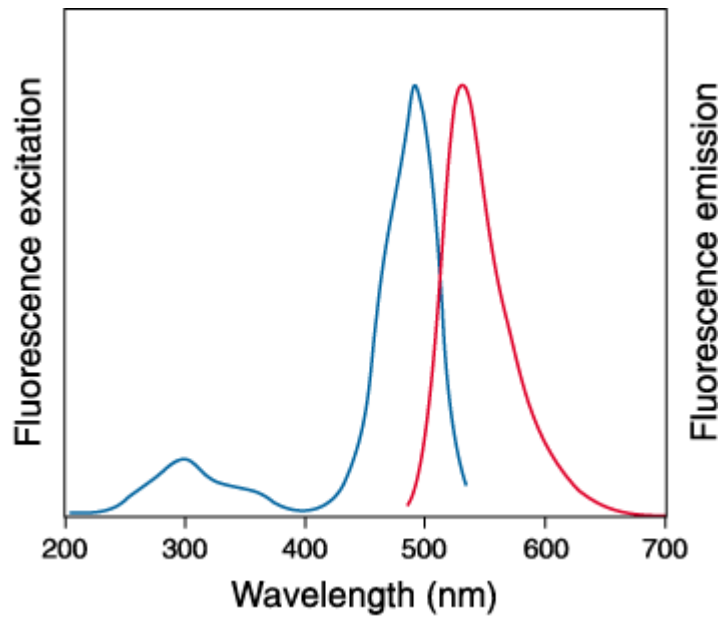


Abbildung 9: Darstellung der photometrischen Erregbarkeit des SYBR- Green in Bezug zur Wellenlänge in nm.

Quelle: Firma Invitrogen (<http://probes.invitrogen.com/handbook/print/0804.html>)

2.5.2 Erstellen geeigneter Primersequenzen

Für die Expressionsanalysen wurden die Primer PPAR-alpha, PPAR-gamma 1 sowie 2, Gata-3 sowie T-bet gewählt. Auf ihre Bedeutung wurde bereits in Kapitel 1.6 eingegangen. Die Primer wurden mit Hilfe der frei zugänglichen Onlinesoftware Primer 3 erstellt. (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi).

Primer	Primer- Sequenz	Veröffentlichungen, welche diese Primersequenzen verwendeten:	Länge der Basenpaare (bp)
PPAR- α Upstream: Downstream:	atcagccacacctttccag ctgagctgtaggtaaccggc	(Barrero, Camarero et al. 2003)	20 20
PPAR- γ -1 Upstream:	gctggcctccttgatgaata	(Greene, Blumberg et al. 1995)	19

Downstream:	ttggtgactttatggagccc		19
PPAR- γ -2 Upstream:	cct cacagctgtttgccaag	(Yanase 1997)	20
Downstream:	ctgcaggagatctacaaggac		20
GATA-3 Upstream:	gccgtcttgatacttcaga		20
Downstream:	ttaacatcgacggtaagg		20
T-bet Upstream:	ttggtgtggactgagattgc		20
Downstream:	gctgtcaccactggaaggat		20

Tabelle 1: Überblick über die Primersequenzen im Einzelnen.

Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Länge von 19 bis 20 Basenpaaren und eine Produktlänge von 100 bis 150 Basenpaaren bilden. Die Annealingtemperatur der Primer liegt bei 60°C.

Eine einfache Formel zur Berechnung der Annealingtemperatur ist:

$$T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T) \text{ °C}$$

Es besteht die Gefahr, besonders bei der Wahl kürzerer Sequenzen, die Spezifität für das gesuchte Gen zu verlieren, wodurch in der Folge auch Sequenzen anderer Gene amplifiziert würden. Bei längeren Sequenzen kann hingegen, auch bei Wahl hoher Annealingtemperaturen, nicht verhindert werden, dass innerhalb der Primer zueinander komplementäre Sequenzen existieren und untereinander Bindungen eingehen. Dies behindert ein regelrechtes Anlagern an das cDNA- Template. Eine gewählte Primerlänge von 16 bp kommt statistisch gesehen nur einmal im menschlichen Genom vor (4^{16} Basen = 4,29 Milliarden). So wird eine Primerlänge im Variationsbereich von 17 bis 25 Basenpaaren bevorzugt verwendet.

Weitere Gebote für die Primerwahl sind (Rychlik 2007).

- Guanin/Cytosin-Gehalt zwischen 50% und 60%
- Nie mehr als 3 Guanin-Basen in Folge.
- Das 3'-Ende sollte nicht mit einer Guanin oder Cytosin-Base enden.
- Die einzelnen Primer sollten ähnliche Schmelztemperaturen haben.

Falls Sequenzen gefunden wurden, die neben dem gesuchten Gen auch in anderen Genen vorkommen, mussten andere Sequenzen gesucht werden.

Um die Amplifikation nukleärer DNA zu verhindern, wurden die Primer möglichst aus mehreren Exonbereichen oder Exongrenzen-überschreitend gewählt. Ein zusätzlich durchgeführter DNase-Verdauung reduziert dieses Risiko wie oben beschrieben.

Relative Quantifizierung

Die relative RT-PCR vergleicht eine Ziel-DNA mit einer endogenen Referenz-DNA, einem ubiquitär homogen exprimierten Gen (Housekeeping-Gen). Da sowohl Ziel-Gen als auch Referenz-Gen denselben Einflüssen unterliegen, heben sich viele Störfaktoren gegenseitig auf. Jedoch gilt die Homogenität der Expression von Housekeeping-Genen nicht sicher, da auch deren Expression ungewünschten Einflüssen unterliegt (Selvey, Thompson et al. 2001). Die in dieser Arbeit herangezogene Methode der relativen Quantifizierung beschreibt die relative Ziel-Nukleinsäuremenge im Bezug zu einer externen Kalibrierkurve. So wird in dieser Arbeit kein Housekeeping-Gen als Referenzgröße benutzt, sondern eine Verdünnungsreihe von DNA, welche in einem RT-PCR-Ansatz mitgeführt wird (Stahlberg, Zoric et al. 2005). So lässt sich die Lage der einzelnen Ziel-DNA auf der Kalibrierkurve bestimmen und miteinander vergleichen. Es werden zwei gleichartig stimulierte Zellpools unabhängig voneinander untersucht und am Ende verglichen. So lässt sich die Expression von stimulierten und nicht stimulierten Genen relativ zueinander vergleichen. Weitere Hinweise zur Methodik sind unter 2.5.4 beschrieben.

2.5.3 Anfertigung einzelner PCR Ansätze

Für die PCR wurde zuerst ein Mastermix hergestellt. So wurden für jede einzelne Probe 1 µl Upstream- und 1 µl Downstream- Primer, 6 µl Nuklease-freies Wasser und 10 µl QuantiTec SYBR Green Master Mix benötigt.

Für jede Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, indem Light-Cycler-Kapillaren mit je mit 2µl derselben Probe und je 18 µl des Mastermixes gefüllt wurden. Zusätzlich wurde zur relativen Quantifizierung eine Verdünnungsreihe, bestehend aus 5 Proben bekannter cDNA-Konzentrationen mitgeführt. Die Verdünnungsreihe wurde so gewählt, dass die zu erwartenden Konzentrationen der Amplifikate innerhalb der Verdünnungsstufen liegen.

Verdünnungsstufen: 1:10, 1:50, 1:100, 1:150, 1:250.

Als Negativkontrolle diente eine Probe mit RNase-freiem Wasser. Auch für die Verdünnungsreihe und die Negativkontrolle galt das Verhältnis 18µl Mastermix zu 2 µl Probe.

Die einzelnen Proben konnten dann in nummerierte Light-Cycler-Kapillaren übertragen werden. Diese wurden vorher in Zentrifugenadapter gesetzt, die sich in einem Kühlblock befanden. Die sterilen Light-Cycler-Kapillaren wurden in Dreiergruppen pipettiert und sofort danach verschlossen, um Verunreinigungen vorzubeugen. Nach Fertigstellung der Ansätze wurden die Proben kurz zentrifugiert (8000 U/min über 1 min) und aus den LightCycler Adaptern in das Proben-Karussell des LightCyclers überführt.

Zuletzt wurde mit Hilfe der zugehörigen Software ein PCR-Ablauf eingestellt und gestartet. Die Software erlaubt grundsätzlich die Probenbezeichnungen zu übernehmen, die Temperaturen für die einzelnen Schritte einzustellen und die Anzahl der Zyklen festzulegen.

Nach einer initialen Denaturierungsphase von 15 Minuten bei 95 °C folgten 50 Amplifikationszyklen nach folgendem Schema:

Vorgang	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	59 °C	25 s
Elongation	72 °C	25 s

Tabelle 2: Temperaturprofil eines einzelnen Amplifikationszykluses:

Material:

- QuantiTec SYBR Green PCR Master Mix
 - HotStarTaq DNA Polymerase
 - Optimized PCR Buffer
 - SYBR Green
 - dNTPs
 - ROX (Referenzfarbstoff)

- RNase-freies H₂O
- Forward bzw. Reward Primer, Metabion, Planegg-Martinsried, D)
- LightCycler Cetrifuge Adapters, Roche, Mannheim, D
- Light Cycler Kapillaren, Roche, Mannheim
- LightCycler Software Version 3.5, Roche, Mannheim, D
- LightCycler System Version 2.0, Roche, Mannheim

2.5.4 Aufbau und Funktion des LightCyclers

Um jede Probe messen zu können, bewegt ein Motor das Probenkarussell in den Lichtstrahl der Photodiode. Eine Heizspirale, ein Ventilator, ein Kühlkörper und die Möglichkeit Luft zu entlassen sorgen für einheitliche Temperaturbedingungen und raschen Temperaturwechsel innerhalb der Thermokammer. Am Ende eines Zyklus und zuletzt bei Messung der Schmelzkurve sendet eine Photodiode einen Lichtblitz aus. Durch dieses Licht wird der an doppelsträngige DNA gebundene Fluoreszenzfarbstoff

SYBR Green sowie der Referenzfarbstoff ROX erregt und deren Licht-Emission kann gemessen werden.

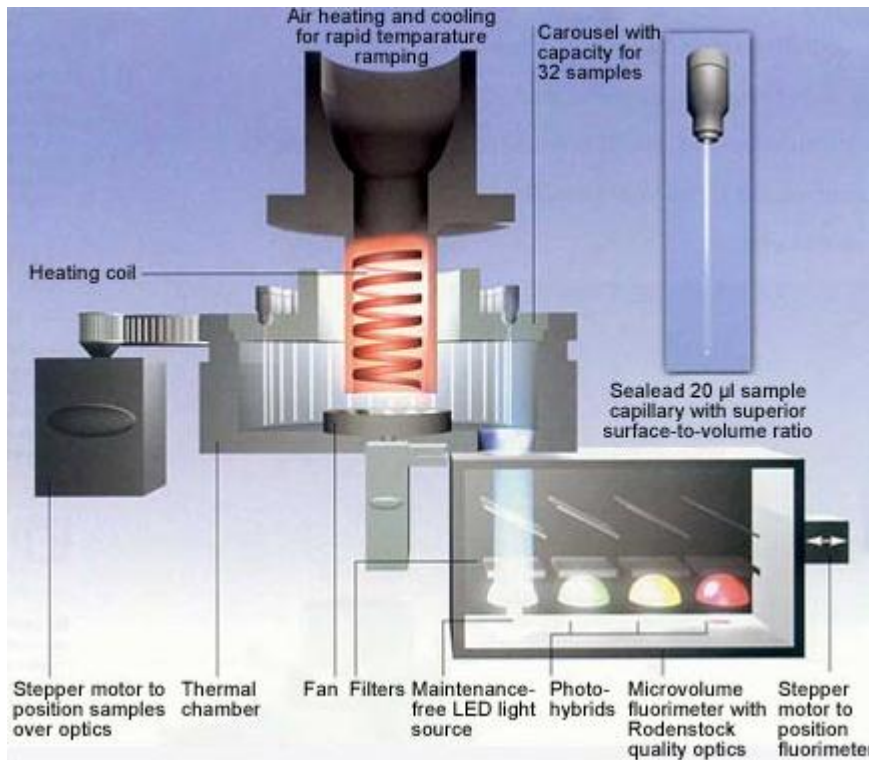


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Light- Cyclers 2.0 der Firma Roche.
Quelle: Firma Roche, Light-Cycler 2.0 Handbuch

Betrachtet man die quantitativ gemessene Fluoreszenz einer Probe im Verlauf der Zyklen, entsteht eine Kurve, die man in drei Phasen unterteilen kann: Anfangs-, Logarithmische- & Pateau-Phase.

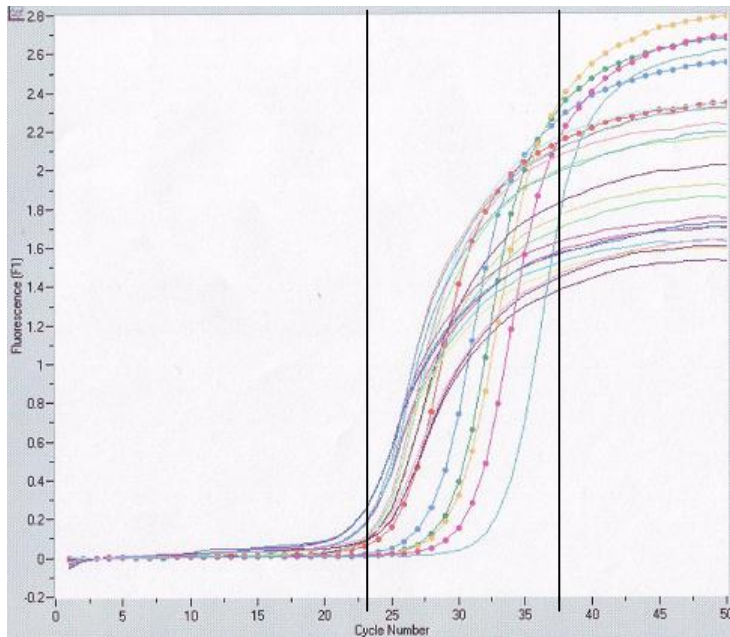


Abbildung 11: Amplifikation verschiedener DNA-Proben mittels Light-Cycler 2.0 der Firma Roche

In der Anfangs-Phase ist eine relativ gleichmäßige Fluoreszenz messbar, welche als Grundrauschen zu verstehen ist. Erst wenn die zunehmende Menge an Ziel-DNA einen Schwellenwert überschreitet, lässt sich der logarithmische Teil der Kurve darstellen. Dieser Schwellenwert wird Crossingpoint (CP) genannt. Er wird ermittelt, indem eine Tangente an die Steigung der Kurve in der logarithmischen Phase gelegt und deren Schnittpunkt (CP) mit der X- Achse bestimmt wird. Die Einheit der Crossingpoints ist die Zyklenanzahl.

Aus den 5 Proben der Verdünnungsreihe erhält man fünf CPs, durch die sich eine Regressionsgeraden ziehen lässt. So kann man die CPs der untersuchten cDNA-Proben zur Konzentration in Bezug stellen.

Effizienz der PCR:

Es ist weiterhin wichtig zu erfahren, um welchen Faktor die untersuchte cDNA Sequenz über die einzelnen PCR Zyklen im Durchschnitt zunimmt. Dieser Faktor wird Effizienz einer PCR genannt. Theoretisch müsste die Effizienz den Wert 2 annehmen, da in der Elongationsphase eines Amplifikations-Zyklus für jede Sequenz die komplementäre Sequenz synthetisiert wird. In Wirklichkeit liegen die Effizienzen immer unter dem Wert 2, da die Verhältnisse von Enzym, Primern und Nukleotiden zueinander und die Genauigkeit bei der Bestimmung der Fluoreszenz limitierend wirken. Eine Effizienz von 1 würde bedeuten, dass keine Amplifikation stattgefunden hat.

Die Effizienz lässt sich über folgende Formel berechnen:

$$E = 10^{1/\text{Steigung}}$$

Schmelzkurven-Analyse:

Nach Beendigung der Amplifikationszyklen wurde die Temperatur in der Thermokammer des LightCyclers zunehmend erhöht und während dessen weiterhin die Fluoreszenz gemessen. Ab einer bestimmten Temperatur werden die cDNA Proben denaturiert. Dies führt dazu, dass das SYBR Green aus der doppelsträngigen cDNA freigesetzt wird und keine Fluoreszenz mehr emittiert.

Es lässt sich so ein Abfall der Fluoreszenz gegen die Temperatur graphisch darstellen:

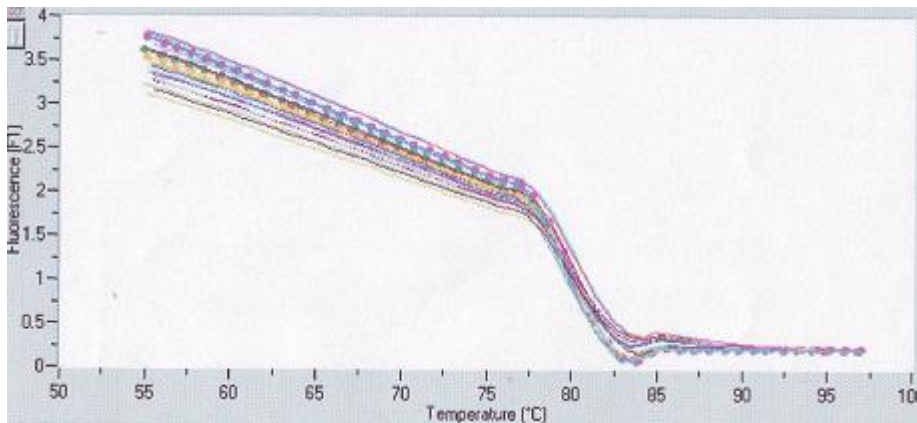


Abbildung 62: Darstellung der Schmelzkurven verschiedener DNA-Amplikate.

Erst die Schmelzkurvenanalyse gibt darüber Auskunft, ob die gemessene Fluoreszenz von der gewünschten amplifizierten Sequenz stammt. Denn SYBR Green lagert sich unspezifisch doppelsträngiger DNA an, welches zu Fehlbestimmungen führen kann.

Da die PCR-Produkte den Primern entsprechend einheitlich sein sollten, müssten sie auch die gleiche Schmelztemperatur aufweisen. So löst sich bei Erreichen der Schmelztemperatur der Zielsequenz auch die Bindung des SYBR Green zur DNA und es kommt zum rapiden Abfall der Fluoreszenz. Dieser Fluoreszenzabfall sollte somit einheitlich sein.

Ein uneinheitlicher Abfall der Fluoreszenz kann bedeuten, dass der gewählte Primer für ein Gen nicht spezifisch ist sondern verschiedene Sequenzen amplifiziert hat. Auch Verunreinigungen können die Schmelzkurve beeinflussen.

3. Ergebnisse

3.1 RNA-Isolierung

Um zu untersuchen, ob 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon die Expression spezifischer Gene beeinflusst, wurde der Stoffwechsel der Zellen auf mRNA Ebene betrachtet.

So wurde nach Zellyse und RNA-Aufreinigung die Gesamt-RNA der einzelnen Proben mittels Photometer bestimmt. Jede Probe wurde dreifach bestimmt, und aus diesen Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Die Konzentration an Gesamt-RNA lagen je nach Probe zwischen 82 und 1014 µg/ml.

Für die einzelnen Proben ergaben sich folgende Konzentrationen:

4-Heptanon-konzentrationen (µl/ml)	Stimulation 1 (ng/ml)	Stimulation 2 (ng/ml)
250	1014	348
500	339	203
1000	142	294
2000	82	137
Medium, unstimuliert	307	100

Tabelle 3: Mittelwerte der RNA-Konzentrationen 4-Heptanon-stimulierter HMEC-1 Zellen

2-Ethylhexanol-konzentrationen in µl/ml	Stimulation 1 (ng/ml)	Stimulation 2 (ng/ml)
500	122	246
1000	126	219
2000	76	65
Medium, unstimuliert	79	91

Tabelle 4: Mittelwerte der RNA-Konzentrationen 2-Ethylhexanol-stimulierter HMEC-1 Zellen

Die in **Tabelle 3 und 4** bestimmten RNA-Konzentrationen dienten der Berechnung einheitlicher cDNA-Konzentrationen für die jeweiligen RT-PCR-Ansätze. Dabei wurden die niedrigste Konzentration gleich 100 Prozent gesetzt und die restlichen Proben entsprechend verdünnt.

3.2 Expressionsanalyse über quantitative realtime PCR im Lightcycler

Für die Gewährleistung der Verlässlichkeit der Experimente wurden die Effizienz bestimmt und mittels Schmelzkurvenanalyse die Homogenität der Amplifikate untersucht.

Es wurden nur solche Ergebnisse zu Vergleichen herangezogen, welche eine Effizienz von mindestens 1,75 aufweisen. Hier exemplarisch aufgeführt am Beispiel der PPAR-alpha Amplifikate der 2-Ethylhexanol- Stimulation:

$$\text{Effizienz (PPAR-alpha)} = 10^{1/3,6237} = 1,88782196$$

Schmelzkurvenanalyse:

Mittels Schmelzkurvenanalyse lässt sich die Reinheit der PCR-Produkte nachweisen. So ergab sich ein Schmelzpunkt, der in dem Bereich des für die einzelnen Primer errechneten Schmelzpunktbereiches lag. Ergebnisse, die stark abweichende Schmelzpunkte lieferten, oder bei denen sich mehrere Schmelzpunkte ergaben, wurden verworfen.

3.3 Darstellung der Gen-Expressions-Analysen:

Im Folgenden wurden die cDNA-Konzentrationen der verschiedenen Stimulationsversuche verglichen. Dabei wurden die verschiedenen Konzentrationen von

2-Ethylhexanol bzw. 4-Heptanon mit einer unstimulierten Probe in Bezug gesetzt. Die unstimulierte Probe wurde als Referenz gleich 100 % gesetzt.

So lässt sich der Einfluss der Weichmachermetabolite auf die untersuchten Gene beurteilen. Es wurden zwei gleichartige Zellpools unabhängig voneinander in die beschriebenen Versuchsreihen einbezogen. Jeder Zellpool wurde zu einer Hälfte für die 4-Heptanon, zur anderen Hälfte für die 2-Ethylhexanon-Stimulationen verwendet. Von jedem Stimulationsversuch wurden drei Proben in die RT-PCR eingebracht und deren Ergebnisse gemittelt, um die Validität der Ergebnisse zu erhöhen.

Unterschiede zwischen den einzelnen cDNA-Transkripten lassen sich in der Graphik durch die Abstände der Crossing points ermitteln.

In dem Diagramm der RT-PCR (Abbildung 11) ist die Fluoreszenzzunahme (y-Achse) gegen die Amplifikationszyklen (x-Achse) aufgetragen. Dadurch ergeben sich sigmoide Kurven der Fluoreszenzzunahme. Für die Auswertung von Bedeutung sind die sogenannten Crossing points. Diese werden von der Light-Cycler-Software bestimmt indem eine Regressionsgerade durch den logarithmisch verlaufenden Teil der Fluoreszenzzunahme gelegt wird, und deren Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt wird. Diese Punkte entsprechen der Zyklenzahl, an der sich das Fluoreszenzsignal der Ziel-DNAs zum ersten Mal über das Grundrauschen erhebt. Über die Crossing-Points lassen sich vergleichende Analysen über die zu Beginn enthaltene DNA-Menge durchführen.

Neben den einzelnen cDNA-Proben wurde eine aus einer DNA-Probe gewonnene Verdünnungsreihe mitgeführt, anhand derer die Light-Cycler-Software eine lineare Regressionsgerade erstellt. So ließen sich die Crossing points unbekannter cDNA Templates in Bezug zu dieser Regressionsgeraden setzen und anschließend untereinander relativ zueinander vergleichen. Dafür ist es notwendig, die Konzentrationen der Verdünnungsreihe so zu wählen, dass die cDNA Templates eine Konzentration besitzen, die im Bereich der Verdünnungsreihe liegt. Die Validität der Regressionsgeraden lässt sich über den Korrelationsfaktor (r) bestimmen. Er sollte stets nahe dem Wert 1 liegen.

3.3.1 Expressionsanalyse 2-Ethylhexanol-stimulierter HMEC-1 Zellen

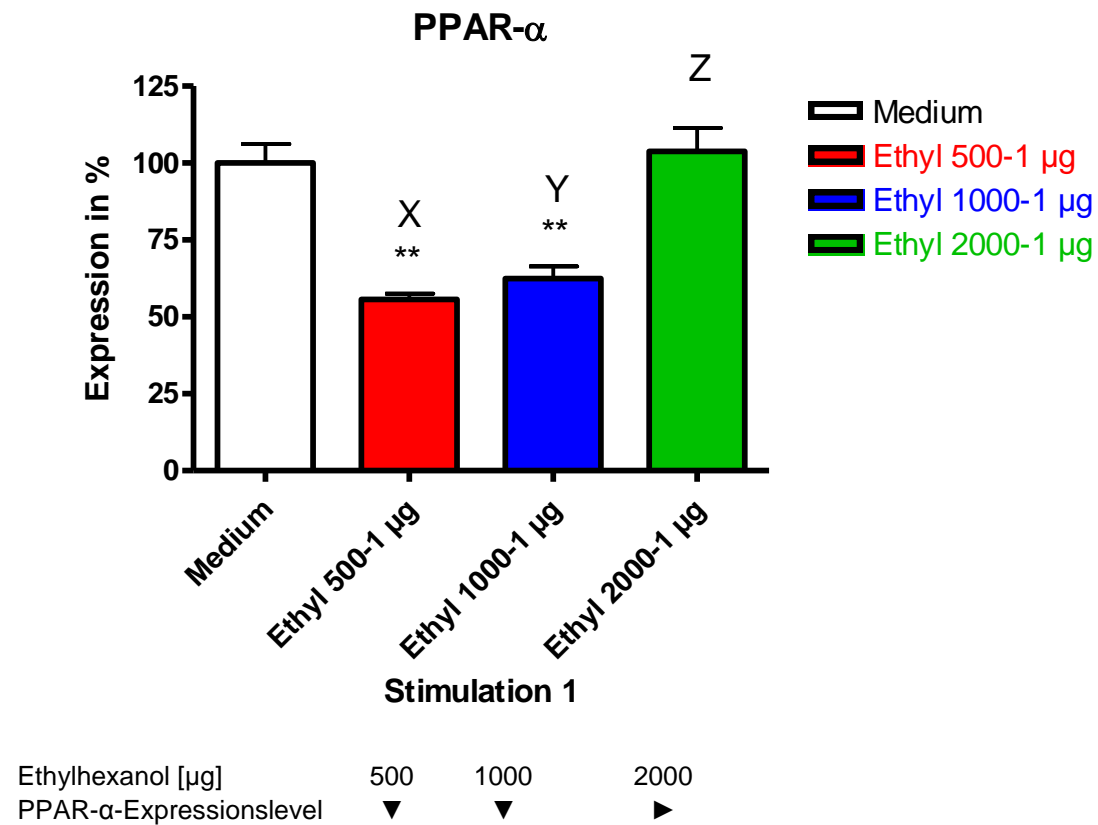
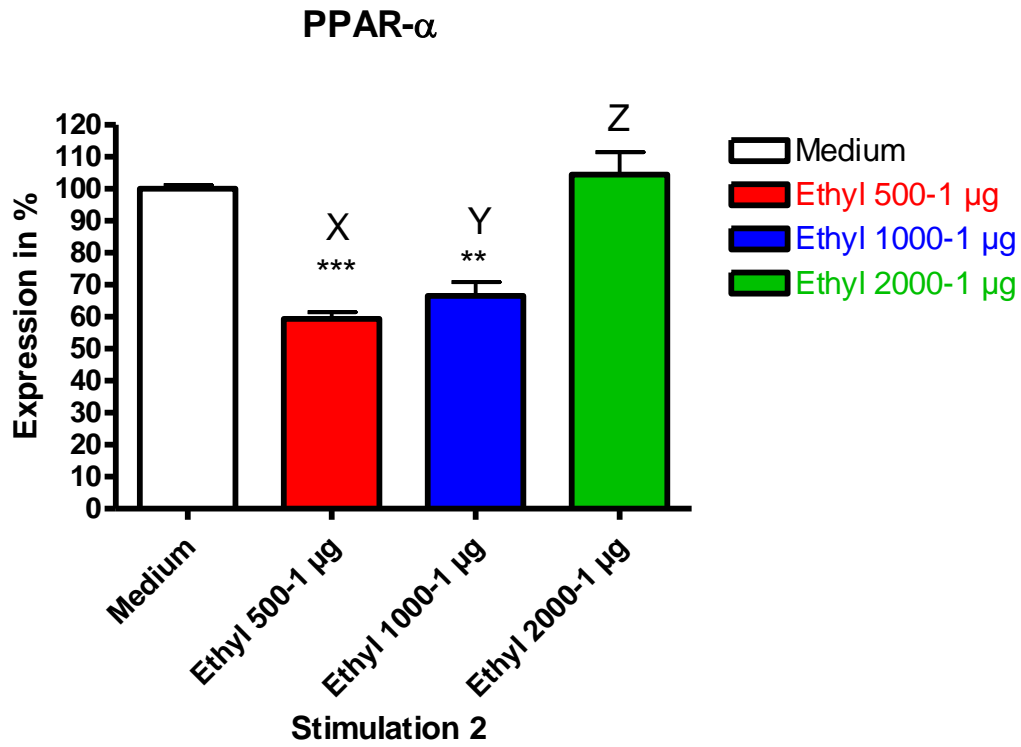
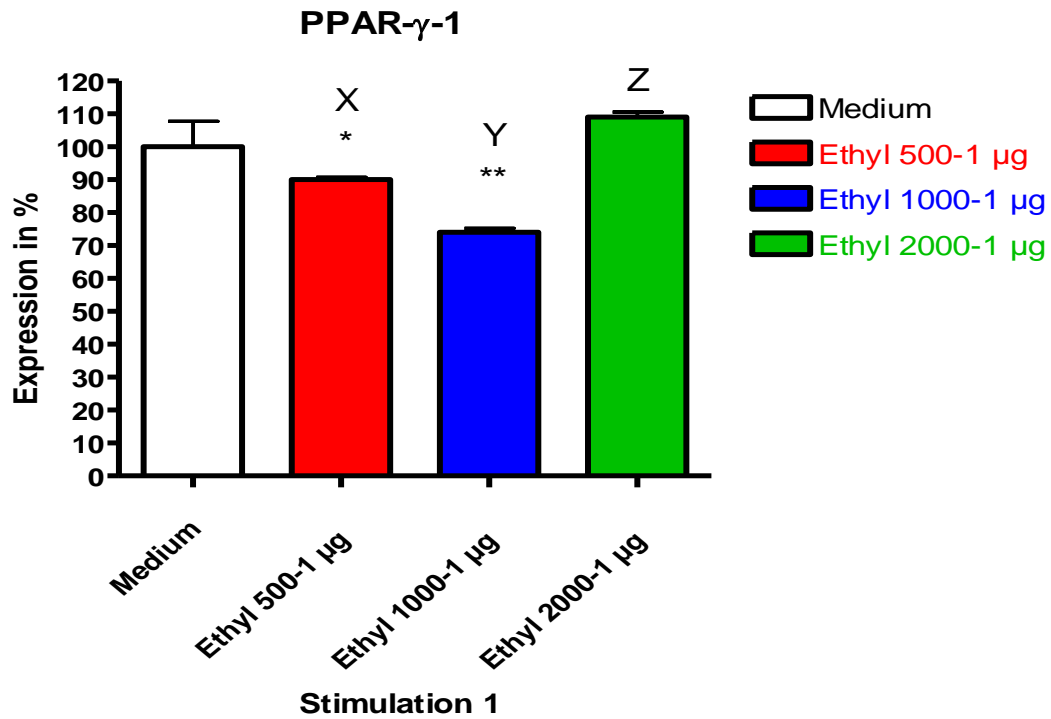


Abbildung 73: Expression der PPAR- α mRNA in dermalen mikrovasculären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- α -Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz ($p > 0,05$).



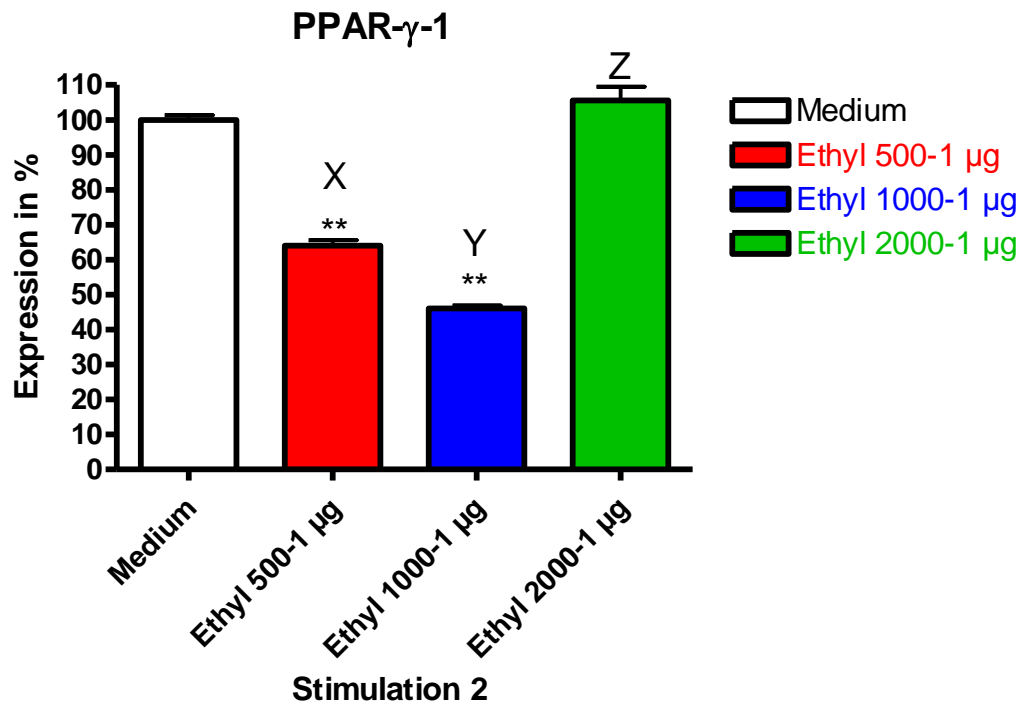
Ethylhexanol [µg]	500	1000	2000
PPAR- α -Expressionslevel	▼	▼	►

Abbildung 84: Expression der PPAR- α mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- α -Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,001$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz.



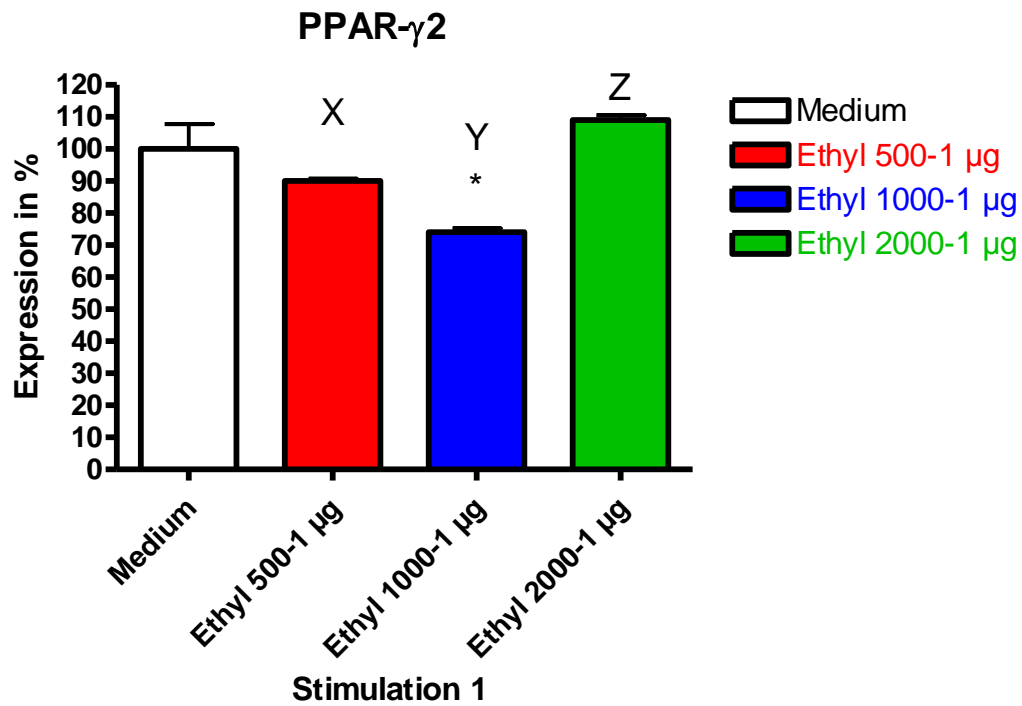
Ethylhexanol [µg]	500	1000	2000
PPAR- γ -1-Expressionslevel	▼	▼	►

Abbildung 95: Expression der PPAR- γ -1 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -1-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,05$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz.



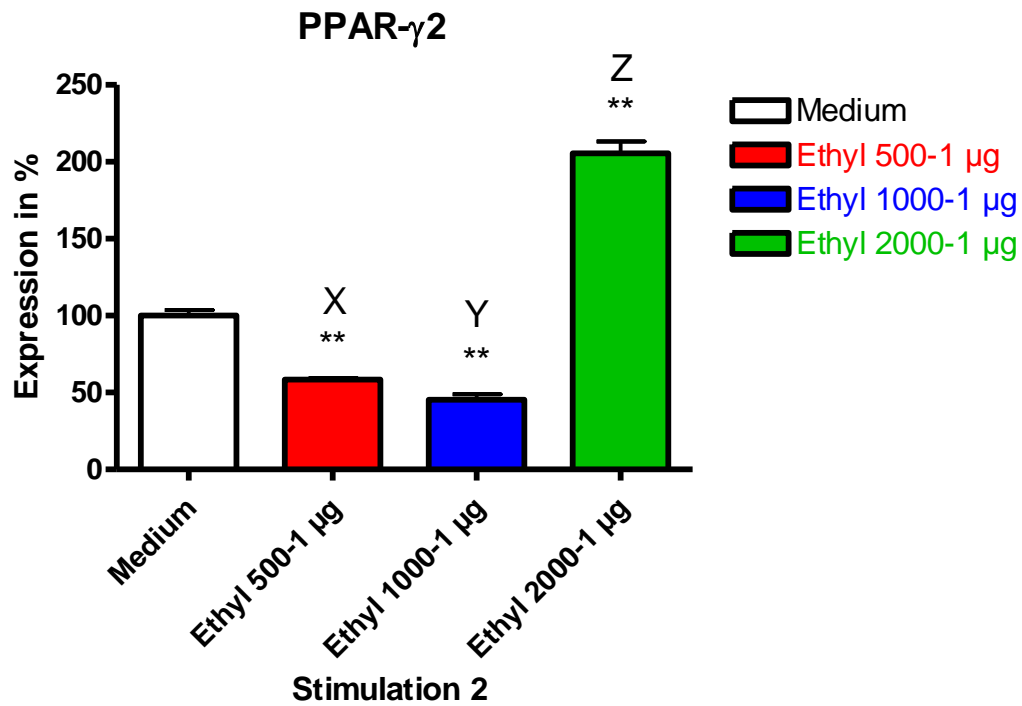
Ethylhexanol [µg]	500	1000	2000
PPAR- γ -1-Expressionslevel	▼	▼	►

Abbildung 106: Expression der PPAR- γ -1 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -1-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz.



Ethylhexanol [µg] 500 1000 2000
 PPAR- γ -2-Expressionslevel ▼ ▼ ►

Abbildung 117: Expression der PPAR- γ -2 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -2-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt keine Signifikanz gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz.



Ethylhexanol [µg]	500	1000	2000
PPAR- γ -2-Expressionslevel	▼	▼	▲

Abbildung 128: Expression der PPAR- γ -2 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -2-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$.

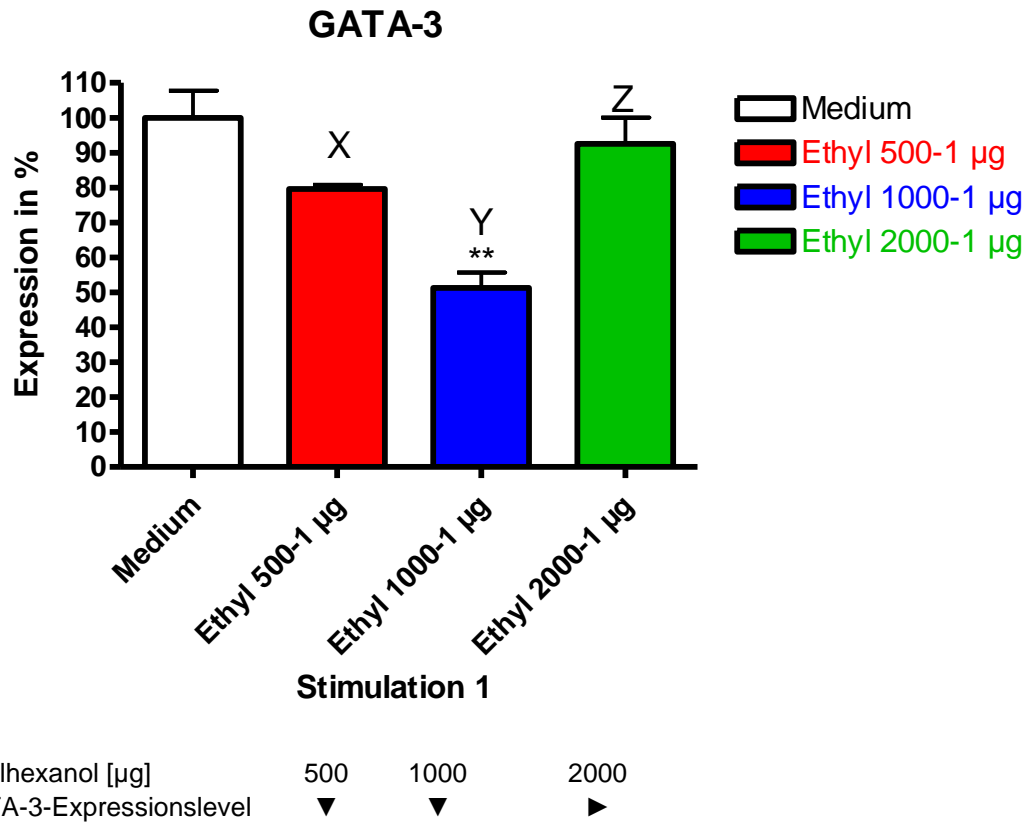
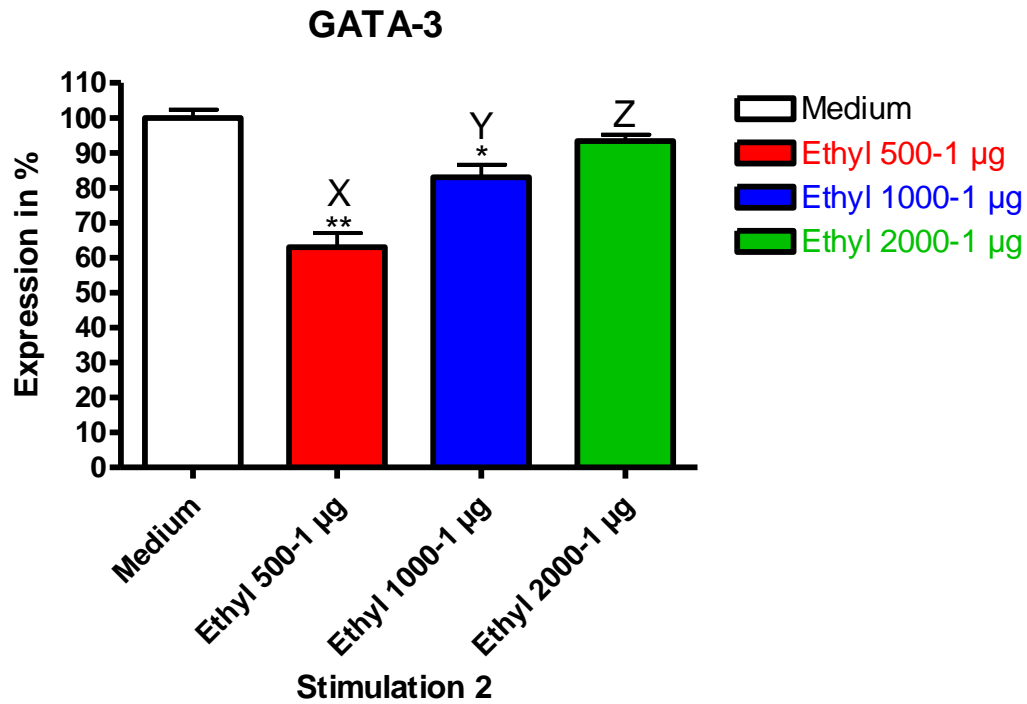


Abbildung 139: Expression der GATA-3 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der GATA-3-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt keine Signifikanz ($p > 0,05$) gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz ($p > 0,05$).



Ethylhexanol [µg] 500 1000 2000
 GATA-3-Expressionslevel ▼ ▼ ▶

Abbildung 2014: Expression der GATA-3 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der GATA-3-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,05$, Z zeigt keine Signifikanz, da $p > 0,05$.

3.3.2 Expressionsanalysen 4-Heptanon-stimulierter HMEC-1 Zellen

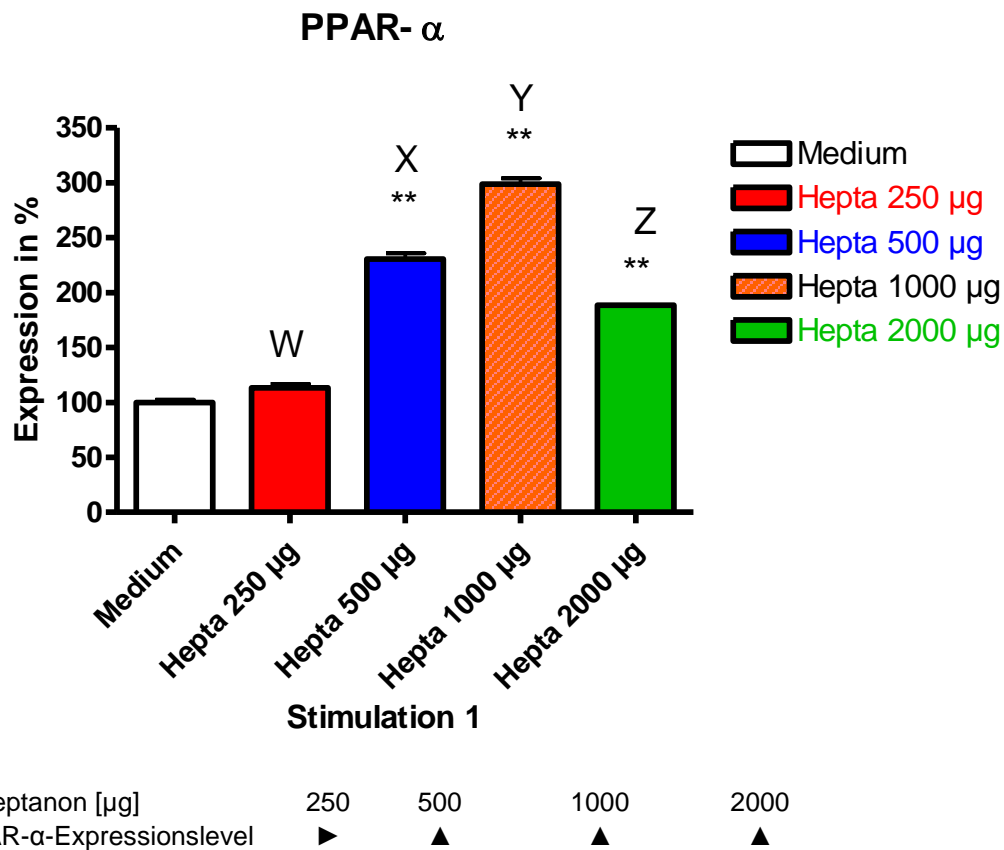
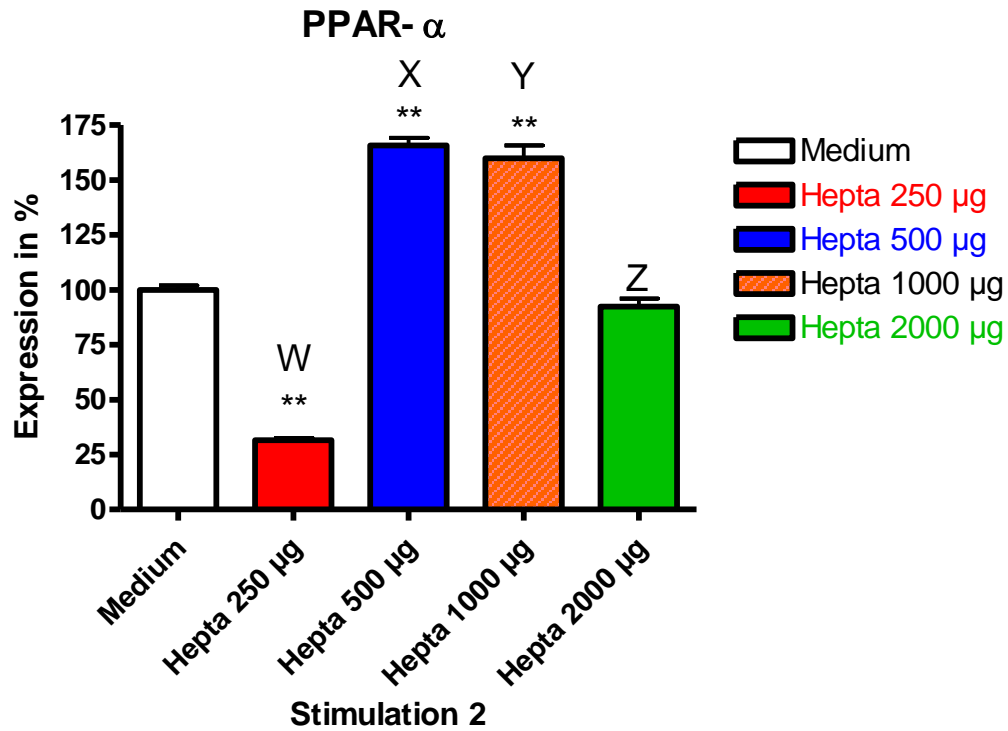
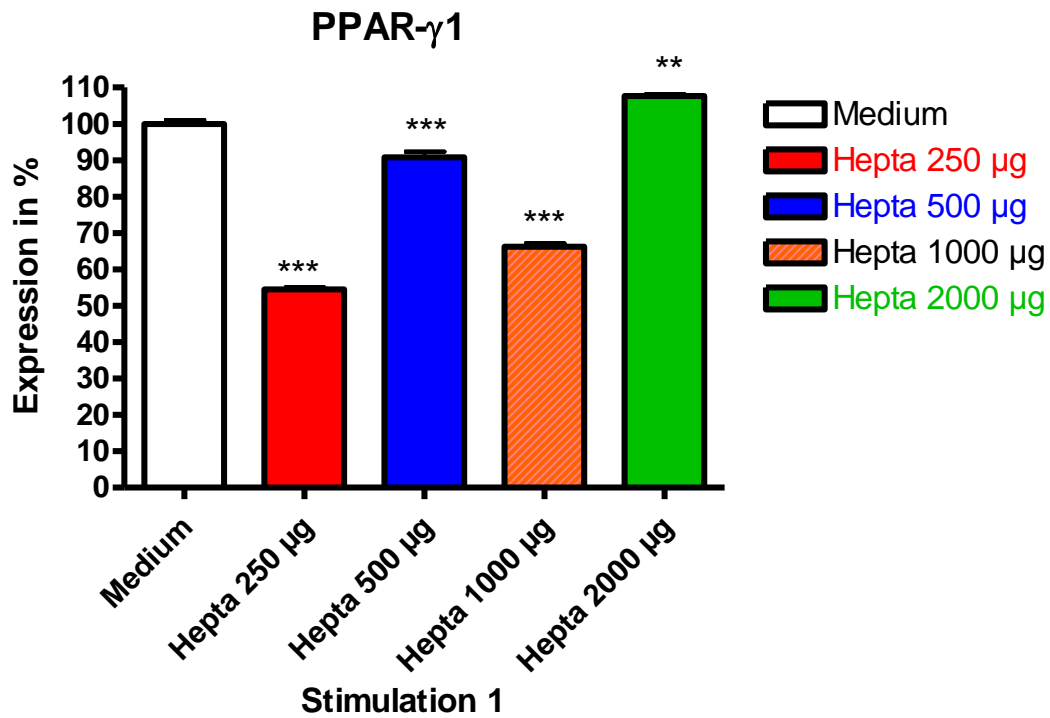


Abbildung 151: Expression der PPAR- α mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- α -Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt keine Signifikanz, da $p > 0,05$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $< 0,01$; Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$.



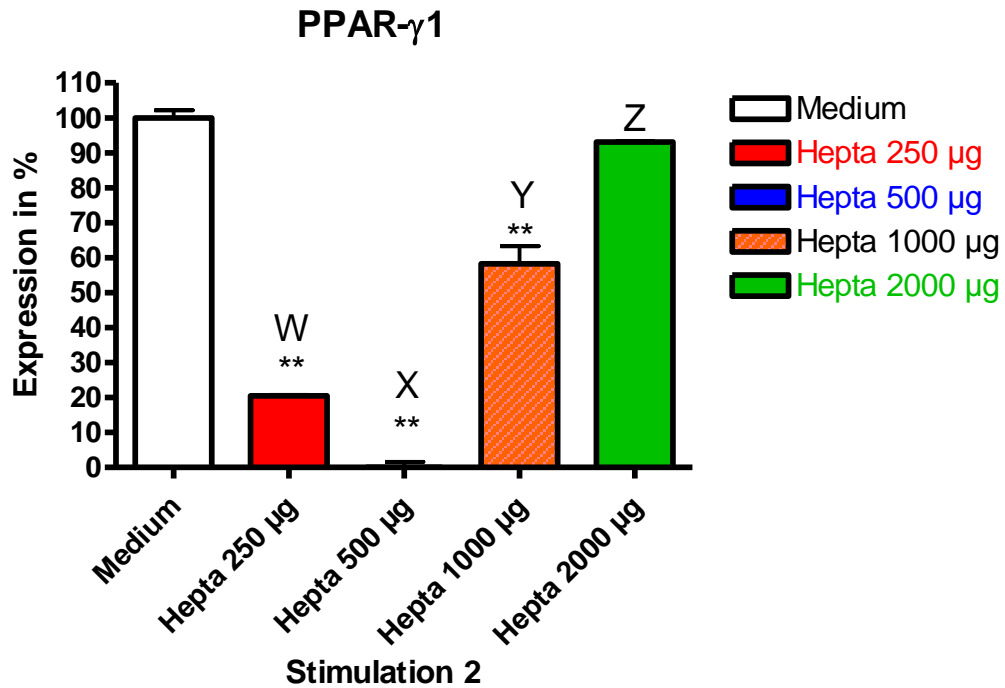
4-Heptanon [μg]	250	500	1000	2000
PPAR- α -Expressionslevel	▼	▲	▲	►

Abbildung 162: Expression der PPAR- α mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- α -Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz, da $p > 0,05$.



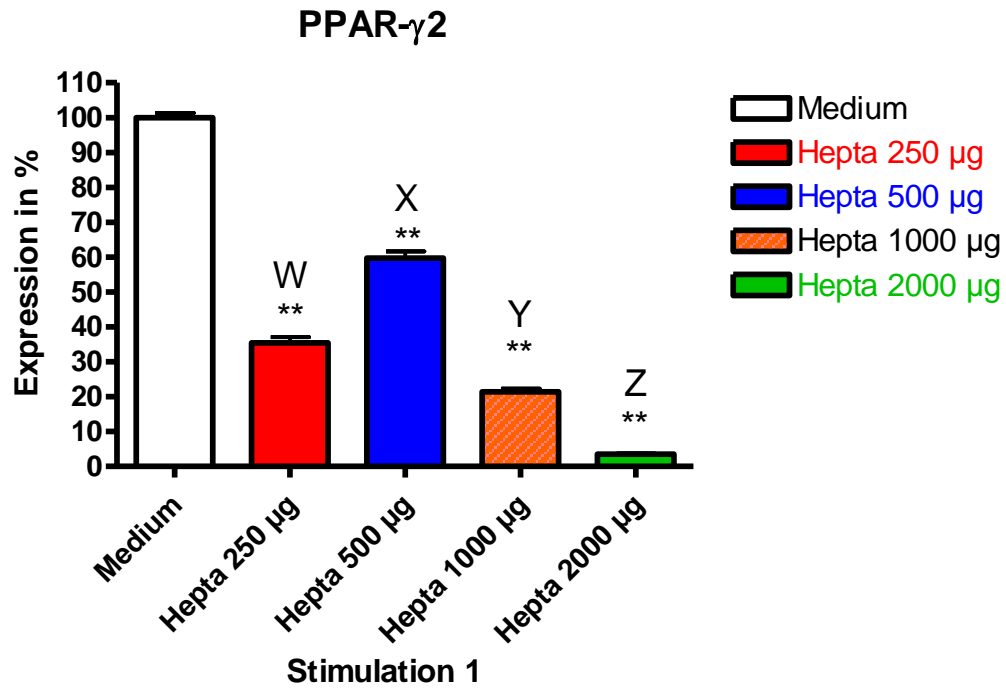
4-Heptanon [µg]	250	500	1000	2000
PPAR- γ -1-Expressionslevel	▼	▼	▼	▲

Abbildung 23: Expression der PPAR- γ -1 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -1-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt eine Signifikanz von $p < 0,001$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $< 0,001$, Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,001$, Z zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$.



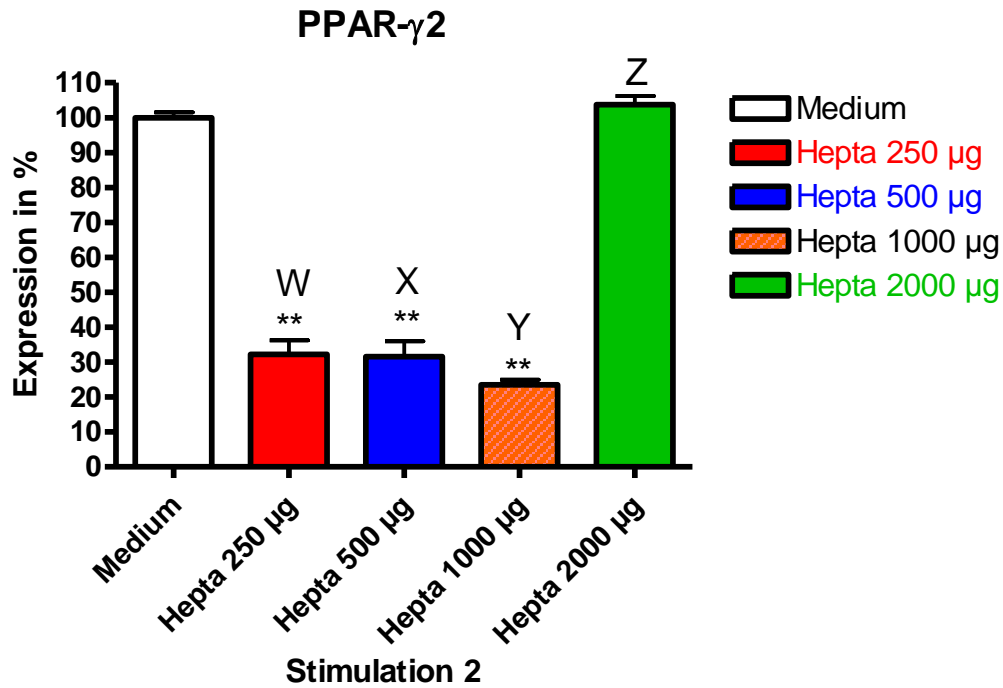
4-Heptanon [μ g] 250 500 1000 2000
 PPAR- γ -1-Expressionslevel ▼ ▼ ▼ ▶

Abbildung 174: Expression der PPAR- γ -1 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -1-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $< 0,01$, Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$, Z zeigt keine Signifikanz, da $p > 0,05$.



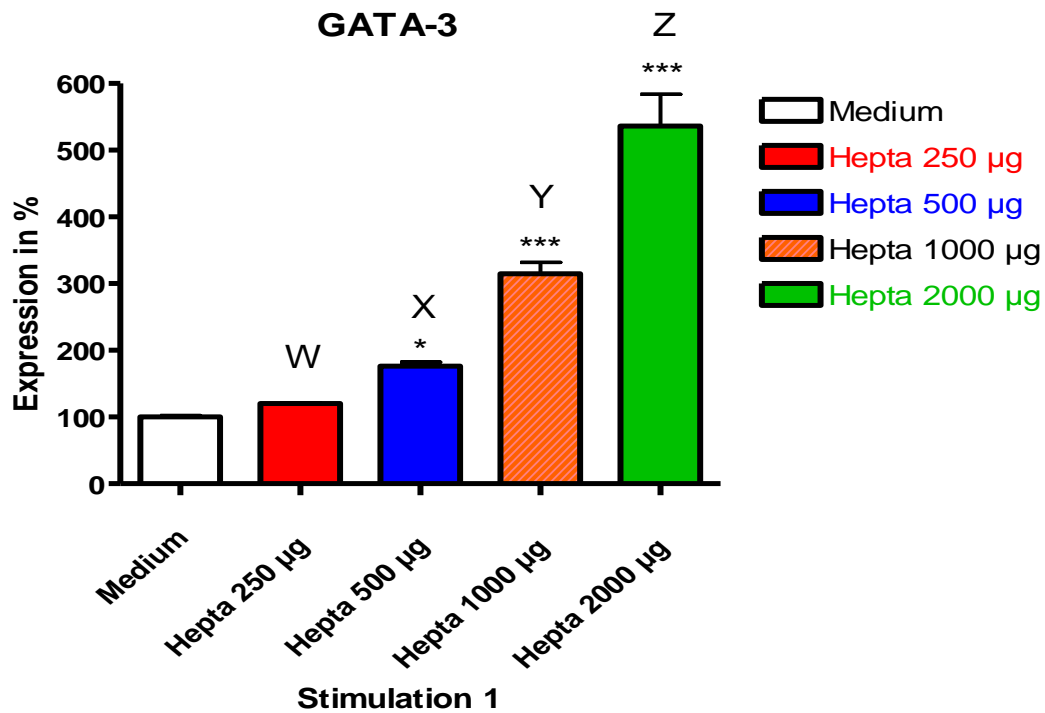
4-Heptanon [µg]	250	500	1000	2000
PPAR- γ -2-Expressionslevel	▼	▼	▼	▼

Abbildung 185: Expression der PPAR- γ -2 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -2 Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$; Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$; Z zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$.



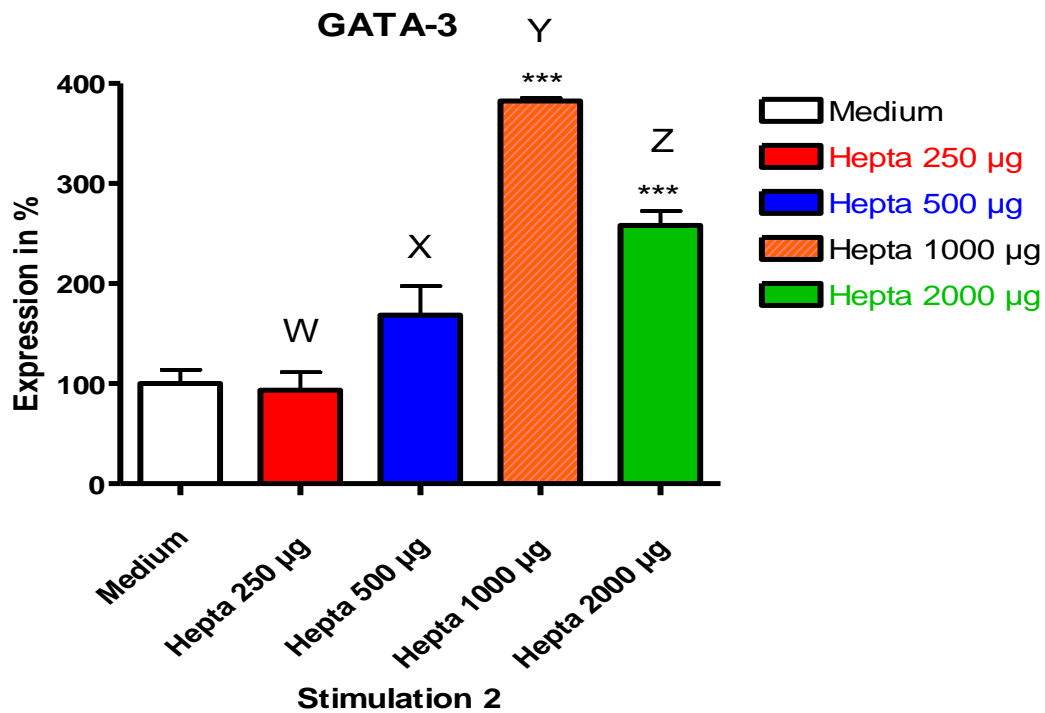
4-Heptanon [µg]	250	500	1000	2000
PPAR- γ 2-Expressionslevel	▼	▼	▼	►

Abbildung 196: Expression der PPAR- γ -2 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der PPAR- γ -2-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium- Zelllinie. W zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$ gegenüber dem Medium. X zeigt eine Signifikanz von $< 0,01$; Y zeigt eine Signifikanz von $p < 0,01$; Z zeigt keine Signifikanz, da $p > 0,05$.



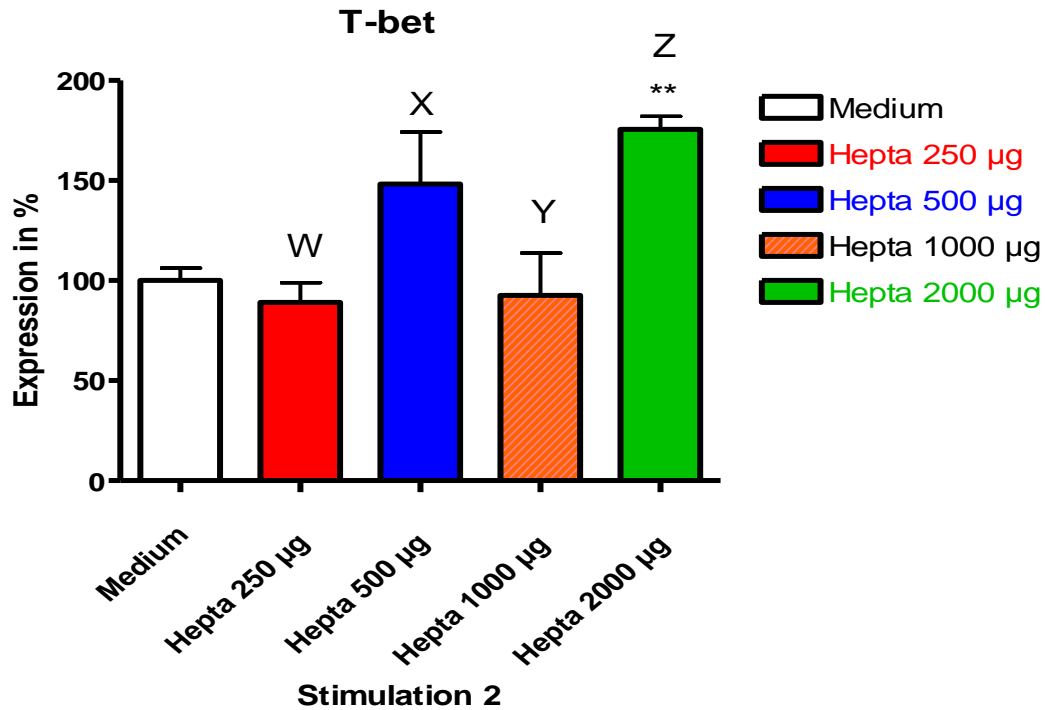
4-Heptanon [µg]	250	500	1000	2000
GATA-3-Expressionslevel	▶	▲	▲	▲

Abbildung 207: Expression der GATA-3 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der GATA-3-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W zeigt keine Signifikanz ($p > 0,05$) gegenüber dem Medium. X zeigt einen signifikanten Anstieg von $p < 0,05$, Y und Z zeigen einen signifikanten Anstieg von $p < 0,001$.



4-Heptanon [µg]	250	500	1000	2000
GATA-3-Expressionslevel	▶	▲	▲	▲

Abbildung 218: Expression der GATA-3 mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der GATA-3-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W und X zeigen keine Signifikanz ($p > 0,05$) gegenüber dem Medium. Y und Z zeigt einen signifikanten Anstieg von $p < 0,001$.



4-Heptanon [µg] 250 500 1000 2000
 T-bet-Expressionslevel ▶ ▶ ▶ ▲

Abbildung 229: Expression der T-bet mRNA in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Quantitative realtime PCR der T-bet-Expression mittels Lightcycler. Dargestellt ist das Expressionslevel relativ zur unstimulierten Medium-Zelllinie. W, X und Y zeigen keine Signifikanz ($p > 0,05$) gegenüber dem Medium. Z zeigt einen signifikanten Anstieg mit $p < 0,01$. Erläuterungen zu der hier aufgeführten Einfachmessung finden sich auf Seite 68.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Zellkultur

Die Wahl der Zellen fiel auf immortalisierte humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1). Die in dieser Arbeit untersuchten Weichmachermetabolite lassen sich im Serum nachweisen und treten so *in vivo* in Kontakt mit dem Endothel. Dies ist die Voraussetzung für Vergleiche zwischen von Weichmachermetaboliten vermittelten Effekten *in vitro* und der Situation *in vivo*. *In vitro*-Versuche haben grundsätzlich den Vorteil unter konstanten Bedingungen arbeiten zu können, da sie unabhängig von variablen Einflüssen des Gesamtorganismus sind.

HMEC-1 Zellen können über ein Dutzend Passagen fortgeführt werden, ohne ihr den Primärzellen entsprechendes Expressionsprofil zu verlieren. Primäre mikrovaskuläre dermale Endothelzellen zeigen im Gegensatz zu den immortalisierten HMEC-1-Zellen schon nach wenigen Passagen Seneszenz (Ades, Candal et al. 1992). Die Verwendung von primären Endothelzellen aus umbilikalen Venen (HUVEC) wurde aufgrund von höheren Kosten und einer aufwendigeren Generation nach ersten Versuchen verworfen (Jaffe 1980).

Die Wirkung von DEHP und seinen Metabolite ist ein bisher wenig untersuchtes Gebiet. Dies überrascht, da sowohl DEHP als auch seine Metabolite 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon im Serum nachgewiesen werden konnten und somit ein Kontakt zu Endothelzellen vorausgesetzt werden kann (Mettang, Pauli-Magnus et al. 2000); (Wahl, Hong et al. 2004).

4.1.2 Extraktion der mRNA und Erstellen einer cDNA-Bank

DNA-Inaktivierung

Erfolgreiche Amplifikation selektiver mRNAs über q-RT-PCR ist nur nach Isolation genomischer DNA möglich. Denn eine spätere Unterscheidung zwischen cDNA und genomischer DNA über Sequenzlängenvergleiche gelingt nicht (Bauer, Rolfs et al. 1997). Der DNA-Verdau wurde mit dem DNA-free Kit der Firma Ambion durchgeführt. Während der RNA-Isolation kommt es bereits zu einem DNA-Verdau,

jedoch wird eine zusätzliche DNA Inaktivierung von vielen Forschungsgruppen favorisiert.

Bei der photometrischen RNA-Konzentrationsbestimmung wurden stets Triplikate erzeugt. Es wurde über einen Zeitraum von 5 s gemessen, da die 1-Sekundenwerte in Vorversuchen teils erhebliche Standardabweichungen zeigten.

Die RNA-Ausbeute erster Versuche brachten kaum messbare RNA-Konzentrationen. Die hierbei initial verwendeten Zellen hatten eine uns unbekannt Passageanzahl und zeigten verlangsamtes Wachstum (Generationszeit >3 Tage), welches für eine geminderte Syntheseleistung der Zellen spricht. Erst durch Versuche an neu bestellten Zellen ließen sich geeignete RNA-Konzentrationen gewinnen. Die RNA-Konzentrationen lagen schließlich teils nur knapp oberhalb der von der Firma Roche für einen Light-Cycler Ansatz empfohlenen minimal einsetzbaren Konzentration (50 ng/ml).

Ein Teil der gewonnenen cDNA diente in Form einer Verdünnungsreihe als Kalibrierkurve für die relative Quantifizierung der RT-PCR. Die Lage der untersuchten Proben auf der Kalibrierkurve ist entscheidend, um die Lage der Proben untereinander und zur unstimulierten Kontroll-Zellreihe relativ vergleichen zu können. Die genannten weiteren Verdünnungsschritte führten zu teils unbrauchbaren Eichgeraden, so dass für die gezeigten Versuche cDNA höherer Ausgangskonzentration gewählt wurden. Beispiel: Probe für die Eichgerade, cDNA der 250 µl/ml-4-Heptanon Stimulation-1, Ausgangskonzentration 1014 ng/ml.

Eine Voraussetzung für vergleichende Expressionsanalysen mittels RT-PCR ist eine hohe Effizienz der PCR. Die Gewählten Primer zeigten in Vorversuchen eine Effizienz nahe 2. Die Spezifität der Primer konnte mittels Schmelzkurvenanalyse belegt werden.

4.1.4 Realtime PCR im Vergleich zu anderen quantitativen Nachweisverfahren

Zur Beurteilung der Gen-basierten Syntheseleistung der Zelle werden zwei ineinander greifende Verfahren gebraucht. Der Nachweis auf mRNA Ebene und der Protein-basierte Nachweis. Da ein Gentranskript zur Bildung einer Vielzahl von Proteinen

führen kann, sind letztlich für ein umfangreicheres Verständnis einer Genexpression beide Verfahren notwendig.

Der Nachweis auf mRNA Ebene berücksichtigt nicht die posttraslationalen Prozesse, die zu einer Vielzahl von Produkten führt, und bietet so nur eine eingeschränkte Sicht auf funktionelle Prozesse. Ein Nachteil der Bestimmung auf Proteinebene ist, dass erst einmal gebildete Proteine längere Zeit in der Zelle persistieren können, so dass je nach Halbwertszeit neu synthetisierte Proteine schwierig abzugrenzen sind. Besonders schnell sezernierte Produkte wie Interleukine zeigen hingegen vergleichbare Ergebnisse auf mRNA- und Proteinbasis (Mena, Ioannou et al. 2002). Für vergleichende Untersuchungen, wie die hier beschriebenen Toxizitätstestungen, wird der Nachweis auf mRNA Ebene empfohlen (de Hoog 2004). Der Nachweis der Genexpression auf Proteinbasis wurde in unserem Arbeitskreis erbracht und wurde nicht erneut durchgeführt (Jungclas H., Dissertationsschrift).

Als Instrument der Quantifizierung auf mRNA Ebene diene an dieser Stelle die quantitative-RT-PCR. Q-RT-PCR ist im Vergleich zur herkömmlichen semiquantitativen PCR eine ausgesprochen sensitive und spezifische Methode mit einer guten Reproduzierbarkeit (Gibson, Heid et al. 1996); (Orlando, Pinzani et al. 1998); (Freeman, Lee et al. 1999). Gerade bei niedrigen RNA Konzentrationen bietet die q-RT-PCR zuverlässige Ergebnisse (Freeman, Lee et al. 1999); (Steuerwald, Cohen et al. 1999); (Mackay, Arden et al. 2002).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 2-Ethylhexanol als Ligand der PPAR-Rezeptoren

2-Ethylhexanol ist Produkt der Hydrolyse des DEHP in MEHP und 2-Ethylhexanol (Wahl, Hong et al. 2004). Die Peroxisomen-Proliferation entfalten ihre Wirkung über eine Gruppe von Rezeptoren, die als Peroxisomen proliferierende Rezeptoren zusammengefasst werden (Peters, Cattley et al. 1997).

In Hepatozyten der Ratte konnte DEHP 1982 erstmals als Peroisomenproliferator identifiziert werden. Als Indikator diene die enzymatische Aktivität der Carnitine Acetyltransferase (Gray, Beamand et al. 1982). Später konnte dieser Effekt auf

gesteigerte Expression nukleärer Rezeptoren aus der Familie der Peroxisomen proliferierenden Rezeptoren zurückgeführt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass gerade auch die Metabolite des DEHP für viele seiner toxischen Effekte verantwortlich sind (Rothenbacher, Kimmel et al. 1998); (Richburg and Boekelheide 1996).

MEHP, ein Hauptmetabolit des DEHP, führt zur vermehrter Expression der in dieser Arbeit untersuchten PPAR-Isoformen PPAR-alpha und -gamma in humanem Gewebe (Maloney and Waxman 1999).

Ein Versuch, die unterschiedliche Potenz der Metabolite des DEHP zu untersuchen, peroxisomale Proliferation hervorzurufen, wurde wie folgt unternommen.

Cyanid-unempfindliches Fettsäure-Acetyl-CoA diente als Marker peroxisomaler Proliferation. Dabei wurden primäre Hepatozyten-Zelllinien der Maus und der Ratte mit den unterschiedlichen Metaboliten inkubiert. Konzentrationen von 0.5 mM MEHP und 2-EH zeigten in beiden Spezies eine fünffache Induktion gegenüber einer bis zu 25- (Maus) bzw. 9-fachen (Ratte) Induktion durch 2-Ethylhexansäure (Cornu, Lhuguenot et al. 1992). 2-Ethylhexansäure und 2-Ethylhexanol-Exposition führte in einer anderen Studie zu einer vergleichbaren Gewichtszunahme der murinen Leber. Die letalen Dosen lagen bei 8 mmol/kgKG/Tag für 2-Ethylhexanol bzw. 13 mmol/kgKG/Tag für 2-Ethylhexansäure (Keith, Cornu et al. 1992).

4.2.2 PPAR-Isoformen im vaskulärem System

Grundsätzlich werden die PPAR-Isoformen alpha, gamma, und beta/delta in Endothelzellen exprimiert (Desvergne and Wahli 1999)

Besonders PPAR- α fand in den letzten Jahren aufgrund seines Einflusses auf metabolische- und Entzündungsprozesse in der Erforschung des Diabetes melitus und der Artherosklerose Beachtung (Zandbergen and Plutzky 2007). Betrachtet man das vaskuläre System, ist für die Funktion seiner Gefäße das Wechselspiel zwischen Vasokonstriktion und Dilatation von Bedeutung. Endothelin-1 verursacht dabei Vasokonstriktion, und Nitroxid (NO) führt zur Vasodilatation. Endothelin-1 spielt weiterhin eine Rolle in der Proliferation glatter Muskelzellen (Zhu, Zhang et al. 2008). Fehlsteuerung dieser Systeme können zu Atherosklerose führen (Verma, Buchanan et al. 2003). PPAR- α -Aktivatoren führen hierbei über eine reduzierte ET-1 Induktion und vermehrter Aktivität der NO-Synthetase zur Vasodilatation (Yakubu, Nsaif et al.

2007); (Martin-Nizard, Furman et al. 2002); (Goya, Sumitani et al. 2004); (Desvergne and Wahli 1999). Dies lässt auf einen vasoprotektiven Effekt der PPAR- α -Agonisten schließen und wird durch die als kardioprotektiv wirkenden Medikamente aus der Gruppe der Fibrate untermauert. So konnte Clofibrat als PPAR- α -Agonist identifiziert werden (Yakubu, Nsaif et al. 2007).

Weiterhin wird ein antithrombotischer Effekt des PPAR- α vermutet. Dieser Effekt soll über Inhibition des Tissue factors in Monozyten und Makrophagen hervorgerufen werden (Marx, Mackman et al. 2001).

Immunsuppressive Effekte werden dem PPAR- α über eine verminderte VCAM-Expression in Endothelzellen zugeschrieben, wobei VCAM-1 die Transzytose von Makrophagen und T-Lymphozyten über die Gefäßwand vermittelt (Oppenheimer-Marks 1991).

PPAR-gamma wird ebenfalls in den verschiedenen Zelltypen der Gefäßwand exprimiert, darunter Makrophagen, Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen (Jiang, Ting et al. 1998); (Marx, Mackman et al. 2001); (Ricote, Li et al. 1998).

In Endothelzellen scheint PPAR- γ ähnlich dem PPAR- α vasoprotektive Effekte zu haben. So inhibiert es die Endothelin-1-Expression und stimuliert die NO-Synthetase (Murakami, Murakami et al. 2006); (Delerive, Martin-Nizard et al. 1999).

Einen anti-angiogenetische Effekt lässt sich über eine PPAR- γ -Agonisten- vermittelte Reduktion des Vaskulären Endothelwachstumsfaktors (VEGF) zeigen. Dabei aktiviert Rosiglitazon PPAR- γ in umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVEC), welches zu einer über einen nukleären Faktor (NFATc1) vermittelten VEGF-Reduktion führt (Sander 2006).

Ein weiterer PPAR- γ -Aktivator, Ciglitazon, induzierte Apoptose in Endothelzellen (Padilla, Kaur et al. 2000). Neuere Untersuchungen sprechen jedoch eher für einen antiapoptotischen Effekt der PPAR- γ -Aktivatoren (Gensch, Clever et al. 2007). Je nach Konstitution des Organismus können sich aus diesen Daten positive oder negative Einflüsse ergeben. Eine Hemmung der VEGF vermittelten Neovaskulation könnte sich in chronisch ischämischen Gewebe wie im Fall der peripheren arteriellen Verschluss-Krankheit (PAVK) als negativ erweisen, bei Tumorerkrankungen jedoch als positiv. Es ist weiterhin interessant zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse gleichermaßen für die verschiedenen Endothelzelltypen zeigen lassen. Die in dieser Arbeit untersuchten

dermalen mikrovaskulären Endothelzellen reagierten unter Stimulation mit 2-Ethylhexanol in Konzentrationen von 500 und 1000 µg/l mit einer Reduktion der PPAR- γ -1 und -2-Expression.

Die Wirkung des 2-Ethylhexanol auf die Expression der Pezeptoren PPAR- α und - γ ist 1999 von Maloney und Waxman beschrieben worden. In deren Arbeit wurden verschiedene industrielle Chemikalien auf Ihre Potenz PPAR- α und - γ -1 zu aktivieren untersucht. Hierbei wurden african green Monkey Kidney Zellen (COS-1) mit humanen bzw. murinen PPAR- α und - γ -1 transfiziert und zusätzlich mit PPARE-luciferase-reporter cotransfiziert. Die Stimulationen mit 2-EH wurden wie in dieser Arbeit über 24 Stunden durchgeführt, jedoch diente als Vergleichsgröße eine Positivkontrolle mit klassischen PPAR-Aktivatoren, dem Wy-14,643 für PPAR- α und Troglitazon für PPAR- γ -1. Stimuliert wurde mit 2-EH-Konzentrationen von 100, 250 und 500 µg/l. Unter diesen Bedingungen ergab sich kein signifikanter Unterschied der Expression. Tendenziell zeigte sich jedoch ein Anstieg der PPAR- α und - γ Expression zur höchsten Konzentration von 500 µM hin.

Daher wurden in dieser Arbeit wurden Konzentrationen von 500, 1000 und 2000 µg/l verwendet, um diesen Trend weiter zu verfolgen.

Für PPAR- α ergab sich hier entgegen der Voruntersuchungen eine signifikante Herunterregulierung der Genexpression bei den 2-EH-Konzentrationen 500 und 1000 µg/l im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Eine maximale Herabregulierung zeigte sich bei der 500µg/l Konzentrationen von 41% für Stimulation 1 und 44% für Stimulation 2.

So scheint ungleich anderer bisher untersuchter DEHP-Metabolite 2-Ethylhexanol in bestimmten Konzentrationen PPAR- α und wie im Verlauf beschrieben auch PPAR- γ -1 und - γ -2 herabzuregulieren. Dies könnte in Analogie zur Lipopolysaccharid-vermittelten Reduktion der PPAR- γ -Expression in Kupffer-Zellen geschehen. Hier zeigte sich, dass der eigentliche PPAR-gamma- expressionshemmende Effekt sekundär über TNF- α abläuft (Zhou, Wu et al. 2008). TNF- α wiederum scheint über eine Reduktion des Enhancers CCAAR/enhancer-binding-proteins zur reduzierten PPAR-Expression zu führen (Kudo, Sugawara et al. 2004). Gewebsspezifität der PPAR Expression könnte ein weiterer Grund sein. Die 2000 µg/l Konzentration aller untersuchten PPARs haben ein Expressionslevel ähnlich dem der Mediumkontrolle. Zu vermuten ist ein toxischer Effekt, zumal die nach der Stimulation gewonnenen RNA-

Konzentrationen bei der 2000 µg/l Stimulation im Vergleich zu den anderen Konzentrationen bei beiden Zellpools am niedrigsten war. Diese niedrigen Konzentrationen könnten auch zu einem systematischen Fehler geführt haben. In der Tat konnte in einem Versuch sogar eine scheinbare Zunahme der PPAR- γ -2-Expression bestimmt werden, welche daraufhin zurückzuführen ist, dass für die qRT-PCR immer gleiche Mengen cDNA eingesetzt wurden, was bei stark verringerter mRNA-Menge einiger Proben zur Bestimmung überhöhter Werte der Genexpression führen kann.

Für die PPAR- γ 1 ergab sich eine Herabregulierung von maximal 26%/54%(Stimulation1/Stimulation2) für die 1000µg/l Konzentrationen. Für PPAR- γ -2 zeigte sich eine Herabregulierung von maximal 26%/55%(Stimulation1/Stimulation2) für die 1000µg/l Stimulationen.

Zusammengenommen zeigen sich über einen breiten Konzentrationsbereich eine Herabregulation des PPAR- α , - γ -1 sowie - γ -2 nach Stimulation mit 2-Ethylhexanol. In Bezug zu dem oben aufgeführten derzeitigen Wissensstand lässt sich daher ein prothrombotischer sowie arthrosklerotischer Effekt des 2-Ethylhexanol vermuten. PPAR- γ hemmt weiterhin VEGF. Eine Reduktion dieser Hemmung könnte zur vermehrten Neovaskularisation führen, welches sich in Netzhauterkrankungen und Tumorerkrankungen als äußerst negativ herausstellen könnte. In Zukunft wäre es sinnvoll, Gefäßmediatoren wie PEDF, VEGF, NO-Synthetase, VCAM und Endothelin-1 im Zusammenhang mit 2-Ethylhexanol-Spiegeln zu untersuchen, um ein möglichst umfassendes Bild der vaskulären Effekte zu bekommen.

4.2.3 4-Heptanon als Ligand der PPA-Rezeptoren

Über den Einfluss des DEHP Metabolites 4-Heptanon ist in der Literatur bis zu diesem Zeitpunkt kaum etwas zu finden. Selbst eine Interaktion des 4-Heptanon an den verschiedenen PPA-Rezeptorisoformen konnte noch nicht bestätigt werden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass viele dem DEHP zugeschrieben Effekte durch seine Metabolite bedingt sind (Rothenbacher, Kimmel et al. 1998); (Richburg and Boekelheide 1996). So gelten sowohl MEHP als auch 2-Ethylhexanol als Liganden der PPA-Rezeptoren (Venkata, Robinson et al. 2006); (Maloney and Waxman 1999).

In dieser Arbeit wurden Endothelzellen mit 4-Heptanonkonzentrationen von 250, 500, 1000 und 2000 µg/ml stimuliert. Dabei zeigte sich für die 250er Stimulationen kein

einheitliches Bild. Stimulation 1 zeigte eine nichtsignifikante Überexpression von 13% im Vergleich zur Mediumkontrolle, wobei Stimulation 2 einen signifikanten Abfall der PPAR- α -Expression von 68% zeigte. Die 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration zeigten in beiden Stimulationen einen signifikanten Anstieg der Expression. Stimulation 1 zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Expression von der 250 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration bis zur 1000 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration von maximal 299%. Stimulation 2 hingegen zeigte für die Stimulationen mit 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ einen Expressionsanstieg von 66 bzw. 60%. Die 2000 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration zeigte für beide Stimulationen einen Abfall der Expression gegenüber der 1000 $\mu\text{g/ml}$ Konzentration. Bei Stimulation 2 fiel die Expression bis auf einen Wert nahe der Mediumstimulation zurück. Hier lassen sich erneut toxische Effekte der 2000 $\mu\text{g/ml}$ Stimulation vermuten.

Für die PPAR- γ -1- und - γ -2-Stimulationen zeigte sich ein abweichendes Expressionsmuster. So zeigte sich für die Heptanonkonzentrationen von 250, 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ ein Abfall sowohl der PPAR- γ -1- als auch PPAR- γ -2-Expression. Für beide Konzentrationen konnte keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Für Stimulation 1 zeigte sich eine Schwankungsbreite des Expressionsrückgangs zwischen 42 und 99% für PPAR- γ -1 und einen Rückgang zwischen 9 und 46% für PPAR- γ -2.

Die PPAR- γ -2-Expressionen zeigten ähnlich einen nicht konzentrationsabhängigen Rückgang für die Heptanonkonzentrationen 250, 500 und 1000 $\mu\text{g/l}$ mit Werten zwischen von 40 und 79% bei Stimulation 1 und Werten zwischen 68 und 76% für Stimulation 2.

Die Stimulationen mit der höchsten Konzentration von Heptanon von 2000 $\mu\text{g/ml}$ zeigten einen Anstieg der Expression auf das Niveau der Mediumkontrolle mit Ausnahme der PPAR- γ -2-Expression in Stimulation 1, die dem niedrigeren Konzentrationen folgend um 96% fiel. Im Bezug zur weiter oben aufgeführten Literatur ergeben sich aus diesen Daten gegensinnige Vermutungen. Einer Überexpression des PPAR- α werden anti-arteriosklerotische Eigenschaften zugeschrieben, während eine Herabregulation des PPAR- γ vermutlich proatherosklerotisch wirkt. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse ließe sich letztlich besser an Tiermodelle untersuchen. Hier würde sich vermutlich direkt morphologisch zeigen lassen, ob pro- oder antiatherosklerotische Effekte überwiegen.

4.2.4 GATA-3

GATA-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine stark konservierte Gewebsverteilung aufweist (Orkin 1992). So lässt er sich in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems, der Niere, in Trophoblasten der Placenta und vor allem in hämatopoetischen Zellen nachweisen (Pandolfi, Roth et al. 1995); (Ma, Tam et al. 1998); (Zandbergen and Plutzky 2007); (Smith, Hargrave et al. 2002).

Aus der Embryologie ist bekannt, dass GATA-3 an der Entwicklung des kardiovaskulären Systems und des Endothels beteiligt ist (Laverriere, MacNeill et al. 1994); (Shivdasani and Orkin 1996).

Über die Steuerung der GATA-3 Expression in Endothelzellen ist bisher nicht viel bekannt. Für andere GATA Transkriptionsfaktoren konnte bereits gezeigt werden, dass deren Expression im Endothel durch Faktoren wie Insulin derived growth factor, IL2 und Erythropoitin gesteuert wird (Musaro, McCullagh et al. 1999); (Towatari, May et al. 1995). GATA-3 unterliegt dem Einfluss des TNF- α .

Wie bereits fuer PPAR- α gezeigt, scheint GATA-3 einen Einfluß auf die Transzytose von Lymphozyten aus der Blutbahn ins Gewebe zu haben. TNF- α induziert die VCAM-1 Expression in Endothelzellen. VCAM-1 mediiert die Migration von Entzündungszellen wie Makrophagen und T-Lymphozyten durch die Gefäßwand ins Gewebe hinein (Marx, Mackman et al. 2001). TNF- α -stimulierte Endothelzellen zeigen dabei eine erhöhte GATA-6-Expression und eine reduzierte GATA-3-Expression (Umetani, Mataka et al. 2001). Daher lässt sich vermuten, dass eine Überexpression von GATA-3 zu einer Suppression der TNF- α -induzierten VCAM-1-Expression führt. So könnten erhöhte GATA-3 Transskript-Level in diesem Zusammenhang einen entzündungshemmenden Effekt haben und im Gegensatz eine reduzierte GATA-3 Expression die Extravasation von Entzündungszellen fördern.

In dieser Arbeit ist erstmals der Einfluss der Weichmachermetabolite 4-Heptanon und 2-Ethylhexanol auf die GATA-3-Expression in Endothelzellen untersucht worden.

Dabei zeigte sich für die 2-Ethylhexanolstimulationen mit 500 und 100 μ g/l ein signifikanter Abfall der GATA-3-Level von 20 bzw. 49 % für Stimulation 1 und 27 bzw. 37% für Stimulation 2. Falls dieser mäßige Abfall der GATA-3-Expression einen Einfluss auf Endothelzellen hat, könnte er die Extravasation von Entzündungszellen fördern.

Für die Heptanonstimulation 1 zeigte sich ein Anstieg der GATA-3 Expression von 76, 215 und 436% für die Stimulationen mit 500, 1000 und 2000 µg/l. Stimulation 2 zeigte einen Anstieg von 86, 282 und 158%. Dieser Anstieg des GATA-3-Expressionsniveaus könnte in vivo die Extravasation von Entzündungszellen hemmen.

4.2.5 T-bet

Eine Expression von T-bet in dermalen mikrovaskulären Endothelzellen konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden. Lediglich die 4-Heptanon-Stimulation einer Zellreihe ergab Ergebnisse, die den Versuchsanforderungen genügten. Die Crossingpoints der restlichen Stimulationen lagen im Schnitt um die 24 Zyklen, die wenigen noch messbaren Crossingpoints der T-bet-Expressionen lagen hingegen weit über 30 Zyklen. Es ist daher zu vermuten, dass in die Expression des T-bet in den durchgeführten Versuchen unterhalb der Nachweisgrenze der PCR liegt. Eine Heraufsetzung der durchgeführten Zyklen brachte durch massive Standardabweichungen keine verwertbaren Ergebnisse. Einzig angeführt ist die 4-Heptanon-Stimulation 2, welche mit Ausnahme der 2000µg/l Stimulation keine von den unstimulierten Proben klar abgrenzbaren Expressionsunterschiede zeigte. Die Stimulation mit einer Konzentration von 2000 µg/l zeigte dabei einen Anstieg der Expression von 76%

5. Zusammenfassung

Weichmacher sind Verbindungen, die Kunststoffen hinzugeben werden, um deren Flexibilität, Weichheit und Temperaturbeständigkeit zu erhöhen. DEHP ist ein in der Industrie vielfältig eingesetzter Weichmacher dessen gesundheitsgefährdendes Potential Gegenstand intensiver Forschung ist. In Tierversuchen führte DEHP-Exposition zu pathologischen Veränderungen an Herz Lunge, Leber und Geschlechtsorganen mit einhergehender Infertilität. Basierend auf diesen Erkenntnissen verhängte die EU 2005 ein Verbot für den Einsatz von DEHP in Kinderspielzeug und Vergab die Gefahrenhinweise R 60 (Kann die Fortpflanzung beieinträchtigen) sowie R 61 (Kann das Kind im Mutterleib schädigen). DEHP unterliegt im menschlichen Organismus einem vielschrittigen Metabolismus, wobei seinen Metaboliten eigene toxische Effekte zugesprochen werden. In dieser Arbeit wurde die Toxizität der DEHP-Metabolite 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon untersucht.

In Voruntersuchungen wurde auf einen möglichen Zusammenhang zwischen DEHP und vaskulären Veränderungen hingewiesen. In unserer Versuchsreihe wurden daraus abgeleitet humane mikrovaskuläre Endothelzellen mit aufsteigenden Konzentrationen von 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon inkubiert. Nach Zellyse, RNA-Isolation und DNA-Inaktivierung wurde die gewonnene RNA anschließend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Proben der Stimulationen wurden in gleichen cDNA-Konzentrationen für die quantitative real-time-PCR verwendet und mittels unterschiedlicher Primer gewählter Zielgene amplifiziert. Die Expressionsunterschiede wurden relativ zu einer Ausgleichsgeraden aus aufsteigenden Konzentrationen von cDNA quantifiziert. So konnten Stimulationsunterschiede der 2-Ethylhexanol- und 4-Heptanon-Stimulationen im Vergleich zu unstimulierten Medium-Kontrollen beurteilt werden.

Die Wahl der Zielgene fiel in erster Linie auf die Familie der Peroxisomen Proliferierenden Rezeptoren (PPAR), die auch schon im Rahmen der Hepatotoxizität des DEHP Beachtung fanden. Es sind bisher die PPAR-Subtypen α , β/δ , γ -1 und γ -2 beschrieben worden. Im Einzelnen dient PPAR- α der Bereitstellung von Energie über Steigerung der Glukoneogenese und β -Oxidation von Fettsäuren. PPAR- γ hat über die Förderung der Lipogenese einen anti-diabetogenen Effekt. Im Bezug zum Endothel zeigt Aktivität der PPAR-Isoformen α und γ einen vasodillatorisch und somit

blutdrucksenkenden Effekt über Hemmung des Endothelin-1. PPAR- α induziert weiterhin die NO-Synthetase, welche für die Plastizität der Gefäße wichtig ist.

Das hier untersuchte Metabolit 2-Ethylhexanol könnte somit in den hier gezeigten Konzentrationen von 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ über Reduktion des PPAR- α , - γ -1 und - γ -2 gegenteilig die Gefäßlumina verengen. 4-Heptanon hingegen zeigt keinen eindeutigen Trend, da es zum einen in Konzentrationen von 500 und 1000 $\mu\text{g/ml}$ PPAR- α hochreguliert, als auch PPAR- γ -1 und - γ -2 hemmt. Daraus leitet sich sowohl eine mögliche Steigerung von Endothelin-1 als auch der NO-Synthetase ab, welches Gegenspieler in der Steuerung der Gefäßweite sind. 2-Ethylhexanol und 4-Heptanonkonzentrationen von 2000 $\mu\text{g/ml}$ ergaben in nahezu allen Stimulationen die niedrigsten gewonnenen cDNA-Konzentrationen und kein schlüssiges Expressionsmuster. Es ist somit von einem Zelluntergang durch die höchste gewählte Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ auszugehen.

Einen Entzündungshemmenden Effekt vermittelt PPAR- α über eine Hemmung des VCAM, welches die Transzytose von Entzündungszellen aus der Zirkulation ins Gewebe fördert. Die gezeigte Reduktion des PPAR- α durch 2-Ethylhexanol könnte so den Übertritt von Entzündungszellen über die Gefäßwand fördern, während die PPAR- α -Induktion durch 4-Heptanon dies hemmen könnte. In Zukunft wäre es sinnvoll, Gefäßmediatoren wie PEDF, VEGF, NO-Synthetase, VCAM und Endothelin-1 unter dem Einfluß von 2-Ethylhexanol und 4-Heptanon direkt zu vergleichen.

Um den Einfluss auf Entzündungsprozesse besser zu verstehen, wurden 2 weitere nukleäre Rezeptoren, GATA-3 und T-bet untersucht. T-bet und GATA-3 gelten als antagonistisch wirkende Schlüsselgene in der Steuerung von Immunantworten des Organismus. So führt T-bet zur Freisetzung von Zytokinen der Th1-Antwort wie INF- γ und supprimiert die Bildung von IL-4 und IL-5. GATA-3 hingegen führt zur Bildung der TH-2 Zytokine wie IL-4. So führt z. B. die Stimulation des T-Zell-Rezeptors einer TH-4-Zelle zur vermehrten T-bet und damit zur vermehrten IL12 und IF- γ -Bildung. Im Bezug zum Endothel scheint dabei eine GATA-3-Aktivierung die Durchwanderung von Entzündungszellen durch die Gefäßwand ins Gewebe durch eine reduzierte VCAM Synthese zu hemmen. Gegensätzlich zeigt 2-Ethylhexanol eine mäßige Herabregulation und 4-Heptanon eine konzentrationsabhängige Hochregulation von GATA-3. Die Expression von T-bet in Endothelzellen konnte zum ersten Mal in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Eine direkte Expressionsabhängigkeit durch Stimulation der genannten DEHP-Metabolite konnte jedoch nicht abgeleitet werden.

Insgesamt geben die genannten Einflüsse auf die Gefäßplastizität und immunologischen Faktoren Grund, den Einsatz von DEHP und seinen Metaboliten weiter zu hinterfragen. Eine Ausweitung der Untersuchungen auf weitere vaskuläre und immunologische Faktoren sowie ein direkter morphologischer Nachweis der Effekte im Tiermodell wären wünschenswert.

6. Literaturverzeichnis:

- Ades, E. W., F. J. Candal, et al. (1992). "HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line." J Invest Dermatol 99(6): 683-90.
- Ahmed, W., O. Ziouzenkova, et al. (2007). "PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation?" J Intern Med 262(2): 184-98.
- Albro, P. W. (1975). "The metabolism of 2-ethylhexanol in rats." Xenobiotica 5(10): 625-36.
- Ariga, H., Y. Shimohakamada, et al. (2007). "Instruction of naive CD4+ T-cell fate to T-bet expression and T helper 1 development: roles of T-cell receptor-mediated signals." Immunology 122(2): 210-21.
- Arnheim, N. and H. Erlich (1992). "Polymerase chain reaction strategy." Annu Rev Biochem 61: 131-56.
- Ashby, J., A. Brady, et al. (1994). "Mechanistically-based human hazard assessment of peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis." Hum Exp Toxicol 13 Suppl 2: S1-117.
- Astill, B. D., K. Deckardt, et al. (1996). "Prechronic toxicity studies on 2-ethylhexanol in F334 rats and B6C3F1 mice." Fundam Appl Toxicol 29(1): 31-9.
- Barnes, P. J. (2008). "Role of GATA-3 in allergic diseases." Curr Mol Med 8(5): 330-4.
- Barrero, M. J., N. Camarero, et al. (2003). "Control of human carnitine palmitoyltransferase II gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor through a partially conserved peroxisome proliferator-responsive element." Biochem J 369(Pt 3): 721-9.
- Bauer, P., A. Rolf, et al. (1997). "Use of manganese in RT-PCR eliminates PCR artifacts resulting from DNase I digestion." Biotechniques 22(6): 1128-32.
- Becker, K., M. Seiwert, et al. (2004). "DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust." Int J Hyg Environ Health 207(5): 409-17.
- Behrens, F., A. Himsel, et al. (2007). "Imbalance in distribution of functional autologous regulatory T cells in rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 66(9): 1151-6.
- Belfiore, A., M. Genua, et al. (2009). "PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer." PPAR Res 2009: 830501.
- Berger, J. (2005). "PPARs: therapeutic targets for metabolic disease." Trends Pharmacol. Sci. 26(5): 244-51.
- Bowen, H., A. Kelly, et al. (2008). "Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells." Clin Exp Allergy 38(9): 1422-31.
- Brody, C., J. DiGangi, et al. (2003). "IARC downgrading of DEHP." Int J Occup Environ Health 9(4): 399-400.
- Brun, R. P., J. B. Kim, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the control of adipogenesis." Curr Opin Lipidol 8(4): 212-8.
- Buchta, C., C. Bittner, et al. (2005). "Transfusion-related exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in patients receiving plateletpheresis concentrates." Transfusion 45(5): 798-802.

- Bui, L. (1998). "Altered zinc metabolism contributes to the developmental toxicity of 2-ethylhexanoic acid, 2-ethylhexanol and valproic acid." Toxicology Feb(20): 126(1):9-21.
- Cornu, M. C., J. C. Lhuguenot, et al. (1992). "Identification of the proximate peroxisome proliferator(s) derived from di (2-ethylhexyl) adipate and species differences in response." Biochem Pharmacol 43(10): 2129-34.
- de Hoog, C., Mann M. (2004). "Proteomics." Annu Rev Genomics Hum Genet. 5: 267-93.
- Delerive, P., F. Martin-Nizard, et al. (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway." Circ Res 85(5): 394-402.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." Endocr Rev 20(5): 649-88.
- Doull, J., R. Cattley, et al. (1999). "A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA Risk Assessment Guidelines." Regul Toxicol Pharmacol 29(3): 327-57.
- Duez, H., J. C. Fruchart, et al. (2001). "PPARS in inflammation, atherosclerosis and thrombosis." J Cardiovasc Risk 8(4): 187-94.
- EU-Richtlinie (2002). "über Materialien und Gegenstände aus Kunststoff, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen." (2002/72/EG).
- EU-Richtlinie (2003). "A PRACTICAL GUIDE FOR USERS OF EUROPEAN DIRECTIVES." FOOD CONTACT MATERIALS, PRACTICAL GUIDE Updated to 15 April 2003.
- EU-Richtlinie (2005). "EU-Phthalat-Richtlinien 2005/84/EG."
- Evans, T., M. Reitman, et al. (1988). "An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes." Proc Natl Acad Sci U S A 85(16): 5976-80.
- Fang, S., Y. Chen, et al. (2008). "GATA-3 as a Marker of Hormone Response in Breast Cancer." Journal of Surgical Research [Epub ahead of print].
- Ferruti, P., I. Mancin, et al. (2003). "Polycaprolactone-poly(ethylene glycol) multiblock copolymers as potential substitutes for di(ethylhexyl) phthalate in flexible poly(vinyl chloride) formulations." Biomacromolecules 4(1): 181-8.
- Flaminio, L. M., R. Bergia, et al. (1988). "The fate of leached di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) in patients on chronic haemodialysis." Int J Artif Organs 11(6): 428-34.
- Flaminio, L. M., L. De Angelis, et al. (1988). "Leachability of a new plasticizer tri-(2-ethylhexyl)-trimellitate from haemodialysis tubing." Int J Artif Organs 11(6): 435-9.
- Freeman, T. C., K. Lee, et al. (1999). "Analysis of gene expression in single cells." Curr Opin Biotechnol 10(6): 579-82.
- Gensch, C., Y. P. Clever, et al. (2007). "The PPAR-gamma agonist pioglitazone increases neoangiogenesis and prevents apoptosis of endothelial progenitor cells." Atherosclerosis 192(1): 67-74.
- George, K. M., M. W. Leonard, et al. (1994). "Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene." Development 120(9): 2673-86.
- Germain, P. (2006). "Overview of nomenclature of nuclear receptors." Pharmacol. Rev. 58(4): 685-704.

- Gibson, U. E., C. A. Heid, et al. (1996). "A novel method for real time quantitative RT-PCR." Genome Res 6(10): 995-1001.
- Gonzalez, F. J. (1997). "Recent update on the PPAR alpha-null mouse." Biochimie 79(2-3): 139-44.
- Gotardo, M. A. and M. Monteiro (2005). "Migration of diethylhexyl phthalate from PVC bags into intravenous cyclosporine solutions." J Pharm Biomed Anal 38(4): 709-13.
- Goya, K., S. Sumitani, et al. (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(4): 658-63.
- Gray, T. J., J. A. Beamand, et al. (1982). "Peroxisome proliferation in cultured rat hepatocytes produced by clofibrate and phthalate ester metabolites." Toxicol Lett 10(2-3): 273-9.
- Greene, M. E., B. Blumberg, et al. (1995). "Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping." Gene Expr 4(4-5): 281-99.
- Hahtola, S., S. Tuomela, et al. (2006). "Th1 response and cytotoxicity genes are down-regulated in cutaneous T-cell lymphoma." Clin Cancer Res 12(16): 4812-21.
- Hamm, J. K., A. K. el Jack, et al. (1999). "Role of PPAR gamma in regulating adipocyte differentiation and insulin-responsive glucose uptake." Ann N Y Acad Sci 892: 134-45.
- Hasmall, S. C., I. T. Pyrah, et al. (1997). "Expression of the immediate-early genes, c-fos, c-jun, and c-myc: a comparison in rats of nongenotoxic hepatocarcinogens with noncarcinogenic liver mitogens." Fundam Appl Toxicol 40(1): 129-37.
- Hasson, P., J. Del Buono, et al. (2007). "Tbx5 is dispensable for forelimb outgrowth." Development 134(1): 85-92.
- Jaffe, E. (1980). "Culture of human endothelial cells." Transplant Proc. 1980 Sep;12(3 Suppl 1):49-53.(Sep;12): 49-53.
- Jiang, C., A. T. Ting, et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." Nature 391(6662): 82-6.
- Kambia, K., T. Dine, et al. (2003). "Evaluation of childhood exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate from perfusion kits during long-term parenteral nutrition." Int J Pharm 262(1-2): 83-91.
- Kaufman, C. K., P. Zhou, et al. (2003). "GATA-3: an unexpected regulator of cell lineage determination in skin." Genes Dev 17(17): 2108-22.
- Keith, Y., M. C. Cornu, et al. (1992). "Peroxisome proliferation due to di (2-ethylhexyl) adipate, 2-ethylhexanol and 2-ethylhexanoic acid." Arch Toxicol 66(5): 321-6.
- Kim, H. J., J. Y. Hwang, et al. (2007). "Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 splice variant that was identified in human lung cancers suppresses cell death induced by cisplatin and oxidative stress." Clin Cancer Res 13(9): 2577-83.
- Kliwer, S. A., H. E. Xu, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors: from genes to physiology." Recent Prog Horm Res 56: 239-63.
- Knedler, A. and R. G. Ham (1987). "Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum." In Vitro Cell Dev Biol 23(7): 481-91.
- Ko, L. J. and J. D. Engel (1993). "DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family." Mol Cell Biol 13(7): 4011-22.

- Koch, H. M., H. Drexler, et al. (2003). "An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population." Int J Hyg Environ Health 206(2): 77-83.
- Koch, H. M., B. Rossbach, et al. (2003). "Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine." Environ Res 93(2): 177-85.
- Komuro, I., H. Kurihara, et al. (1988). "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells." FEBS Lett 238(2): 249-52.
- Kudo, M., A. Sugawara, et al. (2004). "Transcription suppression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 gene expression by tumor necrosis factor alpha via an inhibition of CCAAT/ enhancer-binding protein delta during the early stage of adipocyte differentiation." Endocrinology 145(11): 4948-56.
- Kurahashi, N., T. Kondo, et al. (2005). "The effects of subacute inhalation of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the testes of prepubertal Wistar rats." Journal of Occupational Health 47(5): 437-44.
- Kusu, R., A. Oishi, et al. (2008). "Effects of phthalate ester derivatives including oxidized metabolites on coactivator recruiting by PPARalpha and PPARgamma." Toxicol In Vitro 22(6): 1534-8.
- Lamb, J. C. t., R. E. Chapin, et al. (1987). "Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse." Toxicol Appl Pharmacol 88(2): 255-69.
- Laverriere, A. C., C. MacNeill, et al. (1994). "GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut." J Biol Chem 269(37): 23177-84.
- Lit, L. C., C. K. Wong, et al. (2007). "Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol 34(1): 89-96.
- Ljungvall, K., B. Tienpont, et al. (2004). "Kinetics of orally administered di(2-ethylhexyl) phthalate and its metabolite, mono(2-ethylhexyl) phthalate, in male pigs." Arch Toxicol 78(7): 384-9.
- Lovekamp-Swan, T. and B. J. Davis (2003). "Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system." Environ Health Perspect 111(2): 139-45.
- Lovekamp-Swan, T., A. M. Jetten, et al. (2003). "Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells." Mol Cell Endocrinol 201(1-2): 133-41.
- Ma, H., Q. T. Tam, et al. (1998). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPAR-gamma1) as a major PPAR in a tissue in which estrogen induces peroxisome proliferation." FEBS Lett 434(3): 394-400.
- Ma, M., T. Kondo, et al. (2006). "Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions." Toxicol Sci 93(1): 164-71.
- Mackay, I. M., K. E. Arden, et al. (2002). "Real-time PCR in virology." Nucleic Acids Res 30(6): 1292-305.
- Maloney, E. K. and D. J. Waxman (1999). "trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals." Toxicol Appl Pharmacol 161(2): 209-18.
- Martin-Nizard, F., C. Furman, et al. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced

- endothelin-1 secretion in endothelial cells." J Cardiovasc Pharmacol 40(6): 822-31.
- Marx, N., N. Mackman, et al. (2001). "PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes." Circulation 103(2): 213-9.
- Mena, A., X. P. Ioannou, et al. (2002). "Th1/Th2 biasing effects of vaccination in cattle as determined by real-time PCR." J Immunol Methods 263(1-2): 11-21.
- Mettang, T., C. Pauli-Magnus, et al. (2000). "Influence of plasticizer-free CAPD bags and tubings on serum, urine, and dialysate levels of phthalic acid esters in CAPD patients." Perit Dial Int 20(1): 80-4.
- Morimura, K., C. Cheung, et al. (2006). "Differential susceptibility of mice humanized for peroxisome proliferator-activated receptor alpha to Wy-14,643-induced liver tumorigenesis." Carcinogenesis 27(5): 1074-80.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51 Pt 1: 263-73.
- Murakami, H., R. Murakami, et al. (2006). "Fenofibrate activates AMPK and increases eNOS phosphorylation in HUVEC." Biochem Biophys Res Commun 341(4): 973-8.
- Musaro, A., K. J. McCullagh, et al. (1999). "IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1." Nature 400(6744): 581-5.
- Naiche, L. A., Z. Harrelson, et al. (2005). "T-box genes in vertebrate development." Annu Rev Genet 39: 219-39.
- Norback, D., G. Wieslander, et al. (2000). "Asthma symptoms in relation to measured building dampness in upper concrete floor construction, and 2-ethyl-1-hexanol in indoor air." Int J Tuberc Lung Dis 4(11): 1016-25.
- Oppenheimer-Marks, N. (1991). "Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes." J. Immunol. Nov: 2913-21.
- Orkin, S. H. (1992). "GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells." Blood 80(3): 575-81.
- Orlando, C., P. Pinzani, et al. (1998). "Developments in quantitative PCR." Clin Chem Lab Med 36(5): 255-69.
- Padilla, J., K. Kaur, et al. (2000). "Peroxisome proliferator activator receptor-gamma agonists and 15-deoxy-Delta(12,14)(12,14)-PGJ(2) induce apoptosis in normal and malignant B-lineage cells." J Immunol 165(12): 6941-8.
- Pai, S. Y., M. L. Truitt, et al. (2004). "GATA-3 deficiency abrogates the development and maintenance of T helper type 2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 1993-8.
- Palmer, C. A. N., Hsu, M.-H., Muerhoff, A. S. Griffin, K. J. and Johnson, E. F. (1996). Species differences in PPAR- alpha expression levels may determine species specific responsiveness to peroxisome proliferators. 11th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, Los Angeles, CA.
- Palmer, C. N., M. H. Hsu, et al. (1998). "Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver." Mol Pharmacol 53(1): 14-22.
- Pandolfi, P. P., M. E. Roth, et al. (1995). "Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis." Nat Genet 11(1): 40-4.

- Parks, L. G., J. S. Ostby, et al. (2000). "The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat." Toxicol Sci 58(2): 339-49.
- Patsouris, D., S. Mandard, et al. (2004). "PPARalpha governs glycerol metabolism." J Clin Invest 114(1): 94-103.
- Peters, J. M., R. C. Cattley, et al. (1997). "Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643." Carcinogenesis 18(11): 2029-33.
- Plageman, T. F., Jr. and K. E. Yutzey (2006). "Microarray analysis of Tbx5-induced genes expressed in the developing heart." Dev Dyn 235(10): 2868-80.
- Pollack, G. M., J. F. Buchanan, et al. (1985). "Circulating concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and its de-esterified phthalic acid products following plasticizer exposure in patients receiving hemodialysis." Toxicol Appl Pharmacol 79(2): 257-67.
- Poon, R., P. Lecavalier, et al. (1997). "Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat." Food Chem Toxicol 35(2): 225-39.
- Richburg, J. and K. Boekelheide (1996). "Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes." Toxicology and Applied Pharmacology 137(1): 42-50.
- Ricote, M., A. C. Li, et al. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." Nature 391(6662): 79-82.
- Rivolta, M. N. and M. C. Holley (1998). "GATA3 is downregulated during hair cell differentiation in the mouse cochlea." J Neurocytol 27(9): 637-47.
- Rothenbacher, K. P., R. Kimmel, et al. (1998). "Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells." Hum Exp Toxicol 17(6): 336-42.
- Rowe, V. K., and McCollister, S. B. (1982). Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. New York, Wiley Interscience.
- Rubin, R. J. and C. A. Schiffer (1976). "Fate in humans of the plasticizer, di-2-ethylhexyl phthalate, arising from transfusion of platelets stored in vinyl plastic bags." Transfusion 16(4): 330-5.
- Rychlik, W. (2007). "OLIGO 7 primer analysis software." Methods Mol Biol 402: 35-60.
- Ryu, J. Y., J. Whang, et al. (2007). "Di(2-ethylhexyl) phthalate induces apoptosis through peroxisome proliferators-activated receptor-gamma and ERK 1/2 activation in testis of Sprague-Dawley rats." J Toxicol Environ Health A 70(15-16): 1296-303.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-91.
- Sander, T. (2006). "Rosiglitazone antagonizes vascular endothelial growth factor signaling and nuclear factor of activated T cells activation in cardiac valve endothelium." Endothelium May-Jun;13: 181-90.
- Schoonjans, K., G. Martin, et al. (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions." Curr Opin Lipidol 8(3): 159-66.
- Selvey, S., E. W. Thompson, et al. (2001). "Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR." Mol Cell Probes 15(5): 307-11.

- Sharpe, R. M. (2001). "Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals." Toxicol Lett 120(1-3): 221-32.
- Shivdasani, R. A. and S. H. Orkin (1996). "The transcriptional control of hematopoiesis." Blood 87(10): 4025-39.
- Sicherheitsdatenblatt, d. E.
"http://www.wnt.gsi.de/kernchemie/Deutsch/Arbeitssicherheit/SDB_d_pdf/Ethylmethyleketon_d.pdf."
- Smith, E., M. Hargrave, et al. (2002). "Coexpression of SCL and GATA3 in the V2 interneurons of the developing mouse spinal cord." Dev Dyn 224(2): 231-7.
- Stahlberg, A., N. Zoric, et al. (2005). "Quantitative real-time PCR for cancer detection: the lymphoma case." Expert Rev Mol Diagn 5(2): 221-30.
- Steiniger, H. H., H. N. Sorensen, et al. (1994). "Dexamethasone and insulin demonstrate marked and opposite regulation of the steady-state mRNA level of the peroxisomal proliferator-activated receptor (PPAR) in hepatic cells. Hormonal modulation of fatty-acid-induced transcription." Eur J Biochem 225(3): 967-74.
- Steuerwald, N., J. Cohen, et al. (1999). "Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT-PCR." Mol Hum Reprod 5(11): 1034-9.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2002). "Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells." Science 295(5553): 338-42.
- Takashima, K., Y. Ito, et al. (2008). "Different mechanisms of DEHP-induced hepatocellular adenoma tumorigenesis in wild-type and Ppar alpha-null mice." J Occup Health 50(2): 169-80.
- Tickner, J. A., T. Schettler, et al. (2001). "Health risks posed by use of Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review." Am J Ind Med 39(1): 100-11.
- Ting, C. (1996). "Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage." Nature Dec.(384): 474-8.
- Towatari, M., G. E. May, et al. (1995). "Regulation of GATA-2 phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and interleukin-3." J Biol Chem 270(8): 4101-7.
- Umetani, M., C. Mataka, et al. (2001). "Function of GATA transcription factors in induction of endothelial vascular cell adhesion molecule-1 by tumor necrosis factor-alpha." Arterioscler Thromb Vasc Biol 21(6): 917-22.
- Valeri, C. R., T. J. Contreras, et al. (1973). "Accumulation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in whole blood, platelet concentrates, and platelet-poor plasma. 1. Effect of DEHP on platelet survival and function." Environ Health Perspect 3: 103-18.
- Venkata, N. G., J. A. Robinson, et al. (2006). "Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast." Toxicol Lett 163(3): 224-34.
- Verma, S., M. R. Buchanan, et al. (2003). "Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease
10.1161/01.CIR.0000089191.72957.ED." Circulation 108(17): 2054-2059.
- Wahl, H. G. (2004). Nachweis und medizinische Relevanz von 4-Heptanon als Endmetabolit des Weichmachers Di(2-ethylhexyl) Phthalat.
- Wahl, H. G., A. Hoffmann, et al. (1999). "Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler." J Chromatogr A 847(1-2): 117-25.

- Wahl, H. G., Q. Hong, et al. (2004). "4-Heptanone is a metabolite of the plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in haemodialysis patients." Nephrol Dial Transplant 19(10): 2576-83.
- Walker, V. and G. A. Mills (2001). "Urine 4-heptanone: a beta-oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers." Clin Chim Acta 306(1-2): 51-61.
- Ward, J. M., J. M. Peters, et al. (1998). "Receptor and nonreceptor-mediated organ-specific toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-null mice." Toxicol Pathol 26(2): 240-6.
- Willson, T. M., P. J. Brown, et al. (2000). "The PPARs: from orphan receptors to drug discovery." J Med Chem 43(4): 527-50.
- Yakubu, M. A., R. H. Nsaif, et al. (2007). "peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation-mediated regulation of endothelin-1 production via nitric oxide and protein kinase C signaling pathways in piglet cerebral microvascular endothelial cell culture." J Pharmacol Exp Ther 320(2): 774-81.
- Yanase, T. (1997). "Differential expression of PPAR gamma1 and gamma2 isoforms in human adipose tissue." Biochem Biophys Res Commun Apr: 320-4.
- Zandbergen, F. and J. Plutzky (2007). "PPARalpha in atherosclerosis and inflammation." Biochim Biophys Acta 1771(8): 972-82.
- Zhang, S. (2004). "Klonierung Expression und initiale Charakterisierung vom humanen TIM3."
- Zhang, Y. H. and . (2002). "PPAR and immune system--what do we know?" Int Immunopharmacol. Jul;2(8): 1029-44.
- Zhou, M., R. Wu, et al. (2008). "Endotoxin downregulates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the increase in TNF-alpha release." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 294(1): R84-92.
- Zhu, Y., S. Zhang, et al. (2008). "Iptakalim inhibited endothelin-1-induced proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells through the activation of K(ATP) channel." Vascul Pharmacol 48(2-3): 92-9.
- Zipper, H., H. Brunner, et al. (2004). "Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications." Nucleic Acids Res 32(12): e103.

7. Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Dr. H.G. Wahl für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung und den Freiraum der mir gelassen wurde. Allen Mitarbeitern gilt mein Dank für die freundliche und humorvolle Atmosphäre, die mir auch Zeiten enttäuschender Laborarbeit leichter gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Henrik Jungclas für die Einarbeitung in molekularbiologische Techniken. Seine nützlichen Tipps und Ideen trugen maßgeblich zum Gelingen der Arbeit bei.

Olivia Merkel und Florian Müller danke ich für zahlreiche anregende Diskussionen und Unterstützung bei der Interpretation der Daten.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für das mir gegenüber entgegengebrachte Vertrauen und die moralische Unterstützung.