

Einfluss von Tributylzinn und Triphenylzinn auf die Genexpression der Succinatdehydrogenase

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn**

**Mohammed Abdullahi Isah
aus Bonn
2007**

**Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn**

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

- 1. Gutachter: Prof. Dr. med. Klingmüller**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. med. Dorn**

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.04.2007

**Aus dem Institut für Klinische Biochemie
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor Prof. Dr. rer. nat. Siekmann**

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	3
2 Abkürzungsverzeichnis	7
3 Einleitung	10
3.1 ORGANOZINNVERBINDUNGEN.....	10
3.1.1 Tributylzinn.....	11
3.1.2 Triphenylzinn.....	12
3.1.3 Verbreitung von Tributyl- und Triphenylverbindungen in der Umwelt.....	12
3.1.4 Effekte von Tributyl- und Triphenylverbindungen auf das Tierreich.....	13
3.1.5 Wirkung von Organozinnverbindungen auf die RNA-Expression.....	15
3.1.6 Succinatdehydrogenase.....	17
3.2 POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR).....	18
3.3 LUX®-PRIMER.....	21
3.4 ZIELE DER ARBEIT.....	22
4 Material und Methoden	23
4.1 CHEMIKALIEN, PRIMER UND SONSTIGE MATERIALIEN.....	23
4.1.1 Chemikalien.....	23
4.1.2 Zellkulturbedarf.....	24
4.1.3 Enzyme.....	24
4.1.4 Verwendete Kits.....	24
4.1.5 Oligodesoxyribonukleotide (Primer).....	25
4.1.6 Sonstige Materialien.....	25
4.2 ZELLINIE.....	25
4.3 GERÄTE.....	26
4.4 METHODEN DER ZELLKULTUR.....	27
4.4.1 Zellzucht.....	27
4.4.2 Mycoplasmen-Detection.....	27
4.4.3 Vitalitätstest.....	28
4.4.4 TPT und TBT Inkubation.....	29
4.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	29
4.5.1 mRNA-Isolierung.....	29
4.5.2 RNA-Quantifizierung.....	30
4.5.3 Reverse Transkription.....	31

4.5.4 PCR.....	32
Wahl der Primer.....	32
Wahl des Referenzgens.....	33
Primermatrix.....	35
Effizienz-Test.....	35
RT-PCR mit Sonde.....	37
RT-PCR mit LUX® Primern.....	38
4.6 COMPUTER TECHNISCHE UNTERSTÜTZUNG.....	39
5 Ergebnisse.....	40
5.1 VITALITÄTSMESSUNG.....	40
5.1.1 Vitalitätsmessung TPT.....	41
5.1.2 Vitalitätsmessung TBT.....	42
5.1.3 Mycoplasmen-Detektion.....	43
5.2 WAHL DES HOUSEKEEPINGGENS ALS REFERENZGEN.....	43
5.2.1 BETA-ACTIN.....	43
5.2.2 GAPDH.....	44
5.2.3 PBGD.....	45
TPT.....	47
TBT.....	47
5.3 PRIMER-MATRIX.....	48
5.4 EFFIZIENZ-TEST.....	48
5.4.1 RT-PCR mit Sonde.....	49
5.4.2 RT-PCR mit LUX®- Primern.....	49
5.5 PCR MIT SONDE.....	50
Inkubation mit TPT.....	52
Inkubation mit TBT.....	54
5.6 KOSTEN DER PCR.....	55
6 Diskussion.....	57
6.1 VITALITÄT.....	57
6.2 REFERENZGEN UND KALIBRATOR.....	60
6.3 WIRKUNG VON ORGANOZINNVERBINDUNGEN AUF DIE EXPRESSION DES SDH-GENS.....	62
6.4 VERGLEICH ZWISCHEN LUX®-PRIMERN UND HERKÖMMLICHER TaqMAN PCR.....	63
7 Zusammenfassung.....	65
8 Anhang.....	66
9 Literaturverzeichnis.....	70
10 Danksagung.....	80
11 Lebenslauf.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel TBT.....	11
Abb. 2: Strukturformel TPT.....	12
Abb. 3: Funktionsprinzip von Primerpaaren.....	19
Abb. 4: Funktionsprinzip der Fluoreszenz bei LUX- Primerpaaren	21
Abb. 5: CC1-Zellen ca. 30% konfluent (100fach Vergrößert).....	40
Abb. 6: CC1-Zellen für 24 h in 500 nM TPT inkubiert (100fach Vergrößert).....	40
Abb. 7: Relative Vitalität von CC-1-Zellen (TPT).....	41
Abb. 8: Relative Vitalität von CC-1-Zellen (TBT).....	42
Abb. 9: Abhängigkeit der ct-Werte von der Ausgangsmenge cDNA für die RT-PCR.....	44
Abb. 10: cDNA-Ausgangsgehalt der GAPDH in 20 ng Gesamt-cDNA.....	45
Abb. 11: cDNA-Ausgangsgehalt der PBGD in 20 ng Gesamt-cDNA.....	47
Abb. 12: cDNA-Ausgangsgehalt der PBGD in 20 ng Gesamt-cDNA.....	47
Abb. 13: Effizienztest der SDH- und PBGD-PCRs mit Sonden.....	49
Abb. 14: Effizienztest der SDH- und PBGD-PCRs mit LUX®-Primern.....	50
Abb. 15: Abhängigkeit der Expression des SDH Gens in CC1-Zellen von der TPT - Konzentration.....	52
Abb. 16: Abhängigkeit der ct-Werte des SDH Gens in CC1-Zellen von der TPT - Konzentration.....	53
Abb. 17: Abhängigkeit der Expression des SDH Gens in CC1-Zellen von der TBT - Konzentration.....	54
Abb. 18: Abhängigkeit der ct-Werte des SDH Gens in CC1-Zellen von der TBT - Konzentration.....	55

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kosten je PCR-Kavität (25 µl Reaktionsvolumen, in €).....	56
Tab. 2: Kosten je PCR-Kavität (25 µl Reaktionsvolumen, in €).....	56

Inhaltsverzeichnis

Tab. 3: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 1 (Sonde).....	66
Tab. 4: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 2 (Sonde).....	67
Tab. 5: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 3 (Sonde).....	68
Tab. 6: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 2 (LUX).....	69

2 Abkürzungsverzeichnis

β -ME	β -Mercaptoethanol
2-ddct	$2^{-\Delta\Delta ct}$ -Wert, Methode zum Vergleich der Expression
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BPB	Bromphenolblau
CC1	Name der verwendeten Zelllinie
CCD	Charge Coupled Device (elektronische Kamera)
cDNA	complementary DNA
ct	threshold cycle
CTG	CellTiter-Glo™
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM/F12	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (Zellkulturmedium)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukletid-5'-triphosphat
dUDP	Desoxyuridindiphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FAM	Reporter-Farbstoff (6-carboxy-fluorescein)
FCS	Fötale Kälberserum
FP	vorwärts Primer
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyzerin- aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HPLC-H ₂ O	Reinstwasser für Chromatographie
LC ₅₀	Dosis, die 50 % der Versuchstiere tötet
LUX	(Light Upon extension) fluoreszierender Primer
mRNA	messenger RNA

NAD [⊕]	Nicotinamidadenindinucleotid
NRF	nuclear respiratory factor
NTC	No Templet Controll (Leerwert ohne cDNA)
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	phosphate buffert saline (Zellwaschpuffer)
PCR	Polymerase- Kettenreaktion
PMF	penis morphogenic factor
PP _i	Phosphat
PS	Penicillin/Streptomycin
qPCR	quantitative PCR
RDD	DNA Digest Buffer
RLT	Lysepuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROX	passive reference dye (6-carboxy-X-rhodamin)
RP	rückwärts Primer
RPE	Waschpuffer für die RNA-Extraktion
Rt	Raumtemperatur
RT-PCR	realtime Polymerase- Kettenreaktion
RW1	Waschpuffer für die RNA-Extraktion
S	Sonde
SDH	Succinatdehydrognase
SDHA	Succinatdehydrognase Subunit A
TAMRA	Quencher-Farbstoff (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBT	Tributylzinn
TE	Tris-EDTA
TPT	Triphenylzinn
Tris	Tris-(hydroxy-methyl)aminomethan
UDG	Uracil N-Glykosylase

Chemische Verbindungen und Elemente

CO ₂	Kohlendioxid
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Wasser
HCL	Salzsäure
Mg	Magnesium
NaOH	Natronlauge
Sn	Zinn

3 Einleitung

Der Mensch greift auf unterschiedliche Weise in seine Umwelt ein. Dabei sind die Auswirkungen seines Handelns nicht immer sofort ersichtlich. Einige Folgen offenbaren sich erst nach Jahrzehnten. So stellen Umweltchemikalien zunehmend eine Bedrohung für Mensch, Tier und Umwelt dar. Sie können auf unterschiedliche Weise Organismen beeinflussen. Eine für die Umwelt schädliche Chemikaliengruppe, die Organozinnverbindungen, zeigen neben einer toxischen Wirkung auch eine Wirkung auf das Hormonsystem. Im Laufe der letzten Jahre mehrten sich die Aussagen, dass Organozinnverbindungen darüber hinaus auch direkt die RNA-Expression beeinflussen können.

3.1 Organozinnverbindungen

Jährlich werden weltweit über 50.000 Tonnen Organozinnverbindungen produziert (Snoeij et al., 1987). Die Tri-organozinnverbindungen, die zu den giftigsten anthropogen hergestellten Stoffen (WHO, 1980) gehören, werden als Fungizide (Landwirtschaft u.a.), Bakterizide, Helmizide, Herbizide, Insektizide, Nagetierschutzmittel, Konservierungsmittel für Holz, Papier und Textilien, Schutzmittel für Flüssigkeiten und Mauerwerk und vor allem als Antifoulingmittel in Schiffslacken (WHO, 1980) verwendet. Allein in der Europäischen Union werden jährlich etwa 1300 Tonnen Tributylzinn (TBT) in Schiffslacken verwendet (Trittin, 2002). Sie sollen den Bewuchs mit Algen, Seepocken und Muscheln verhindern und stellen somit einen wichtigen wirtschaftlichen Faktor dar, da der Bewuchs des Schiffsrumpfs den Wasserwiderstand und so die Transportkosten erhöht. Das für Schiffslacke verwendete TBT liegt in fester Form als Bis(tributylzinn)oxid vor. Wenn es in das Meer gelangt, jährlich etwa 90 bis 100 Tonnen allein in die Nordsee, wird es reduziert und liegt im Wasser gelöst als Tributylzinnchlorid vor. Die Belastung wirkt sich vor allem auf die im Wasser lebenden Organismen aus. Obwohl seit 1989 ein Anwendungsverbot von TBT

in Schiffslacken für Schiffe unter 25 m Länge besteht, konnte bis 1995 keine signifikante Abnahme der TBT-Konzentration an der deutschen Nord- und Ostseeküste festgestellt werden (Oehlmann, 2000). Die Triphenylzinn (TPT)-Konzentrationen in Muschelgeweben aus Nord- und Ostsee nahm von 1985 - 1999 stark ab. In nahezu jeder Probe konnte TBT und TPT nachgewiesen werden (Rudel et al., 2003). TBT und TPT werden, zumindest gegenüber Mollusken und Fischen, endokrintoxische Wirkungen zugeschrieben. Andere Organozinnverbindungen wie Ethyl- und Methylzinn wirken neurotoxisch. Generell kann gesagt werden, dass die Toxizität der Organozinnverbindungen von der Länge der, kovalent an Zinn gebundenen, Alkylkette abhängig ist.

3.1.1 Tributylzinn

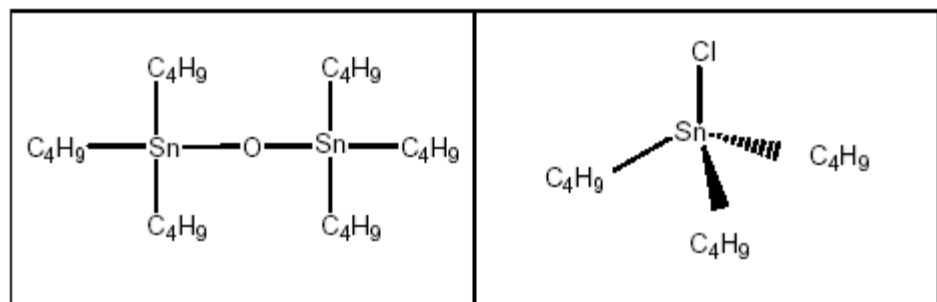


Abb. 1: Strukturformel TBT

Bis(tributylzinn)oxid
Summenformel $C_{24}H_{54}OSn_2$

Tributylzinnchlorid
 $C_{12}H_{27}ClSn$

TBT hat als Bis(tributylzinn)oxid eine Wasserlöslichkeit von 4 mg/l, als Tributylzinnchlorid jedoch eine von 17 mg/l (jeweils bei 20°C, pH 7) und liegt in Wasser gelöst vorwiegend als Tributylzinnchlorid vor. Bei der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) liegt die 24h LC_{50} , als Maß für die Toxizität, von TBT bei 28 µg Bis(tributylzinn)oxid/l. Eine Intersexbildung bei der Wasserschnecke (*Nucella lapillus*) wird schon bei einer viel geringeren Konzentration beobachtet. Die Intersexbildung tritt bei Konzentrationen von etwa 0,0005 µg Sn/l auf.

TBT wird in der Umwelt sehr langsam abgebaut. Die Halbwertszeit im Wasser liegt zwischen 6 Tagen und 4 Monaten, im Boden bei 40 bis 70 Tagen. Obwohl im Sediment die Halbwertszeit bei über einem Jahr liegt, hat der TBT Eintrag durch Remobilisierung

Einleitung

aus dem Sediment kaum Einfluss auf die TBT-Konzentration im Wasser. Der Eintrag erfolgt vor allem durch die Groß- und Fährschiffahrt sowie durch andere zum Teil noch unbekannte Quellen (Oehlmann, 2000).

3.1.2 Triphenylzinn

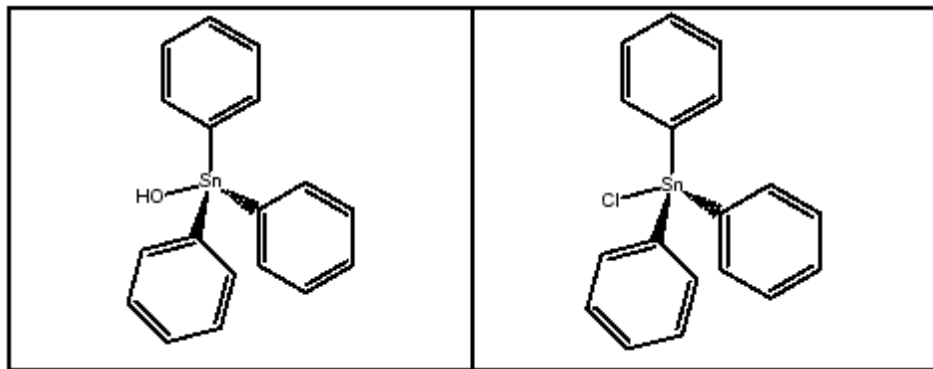


Abb. 2: Strukturformel TPT

Triphenylzinnhydroxid
Summenformel $C_{18}H_{16}OSn$

Triphenylzinnchlorid
Summenformel $C_{18}H_{16}ClSn$

Die Wasserlöslichkeit des Triphenylzinnchlorids liegt bei 40 mg/l. Triphenylzinnhydroxid hat mit 1 mg/l eine sehr viel geringere Wasserlöslichkeit (20°C, pH 7). Die Toxizität von Triphenylzinnhydroxid gemessen an der 24h LC_{50} der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) liegt bei 780 µg/l und ist damit geringer als die von Bis(tributylzinn)oxid. Die Halbwertszeit von Triphenylzinn im Boden liegt zwischen 20 und 40 Wochen.

3.1.3 Verbreitung von Tributyl- und Triphenylverbindungen in der Umwelt

Seit Dezember 1989 ist die Verwendung von zinnorganischen Verbindungen zur Verhinderung des Bewuchses durch Mikroorganismen, Pflanzen oder Tieren an Bootskörpern von weniger als 25 m Länge (Europäische Gemeinschaften, 1989) durch die Europäische Gemeinschaft verboten. Die Internationale Schifffahrtsorganisation (IMO) rief im Jahre 1999 dazu auf, bis zum 01. Januar 2003 das Auftragen

zinnorganischer Verbindungen als Antifoulingmittel weltweit zu verbieten und bis 2008 diese Verbindungen vollständig zu verbieten. Die Kommission der Europäischen Union nahm 2002 diesen Vorschlag tributylzinnhaltiger Schiffsfarben zu verbieten an (Europäische Gemeinschaften, 2002). In Deutschland wurde die EU-Richtlinie durch das Bundeskabinett zum Januar 2003 umgesetzt (Trittin, 2002).

3.1.4 Effekte von Tributyl- und Triphenylverbindungen auf das Tierreich

Seit Ende der 70er Jahre ist bekannt, dass TBT-haltige Schiffsanstriche einen schädlichen Einfluss haben. Seine für viele Organismen, wie Mikroorganismen, Algen, Mollusken oder Fische, toxische Wirkung machte TBT als Antifoulingmittel interessant, wobei sich die Toxizität gegenüber den verschiedenen Arten stark voneinander unterscheidet. Säugetiere und Invertebraten bauen TBT durch Cytochrom P450 Monooxygenasen in Anwesenheit von NADPH über Dibutylzinn und Monobutylzinn in anorganische Zinnverbindungen um. Da die Metaboliten von TBT weniger toxisch sind, sind diese Enzyme von großer Bedeutung.

Zahlreiche Enzyme werden durch TBT inhibiert wie z.B. die Cytochrom P450 Monooxygenase 1A bei Fischen (Fent et al., 1994), der ATP-Synthase Komplex, Antiporter (z.B. Na⁺/K⁺-ATPasen) und Ionenpumpen (Selwyn et al., 1970). TBT interagiert nicht nur mit Membranproteinen, sondern auch mit cytosolischen Proteinen. Histidin und Cystein, α -Aminosäuren, bilden mit dem TBT-Kation über ihre in der Seitenkette liegende funktionelle Gruppe einen Komplex wodurch die Funktion von betroffenen Proteinen gestört wird.

Eine immuntoxische Wirkung wird bei Fischen, Säugetieren und Menschen schon bei geringen Konzentrationen beobachtet. So bewirkt die Verabreichung von 20 mg TBT pro kg Körpergewicht bei Ratten eine Atrophie des Thymus und einen Lymphozytenmangel (Vos et al., 1984). Durch eine über Jahre andauernde Exposition mit TBT wurde bei Ratten eine Suppression der unspezifischen Immunreaktion der cytotoxischen Makrophagen und der natürlichen Killerzellen beobachtet. So führte eine zwei Jahre dauernde Fütterung von 5 ppm TBT-oxid zur Immuntoxizität und von 50 ppm

zum Auftreten endokriner Tumoren (Boyer, 1989; Wester et al., 1990). In den Konzentrationen, die bereits in menschlichem Blut nachgewiesen werden konnten, werden die Produktion und Funktion von menschlichen Lymphozyten wie T-Zellen und natürlichen Killerzellen sowie die Funktion der Phagozyten wie Granulozyten und Monozyten gehemmt.

Bei Muscheln bewirkt TBT schon in einer Konzentrationen von 2 ng/l eine verminderte Eiablage, Schalendeformitäten und Schädigungen der Larven (Batley et al., 1992). Dieses führte in den 80er Jahren zu einem Austernsterben und ökonomischen Verlusten von etwa 150 Millionen US-Dollar.

Bei getrenntgeschlechtlichen Vorderkiemern (Prosobrachiern), z.B. bei der Wattschnecke *Hydrobia ulvae* und der Strandschnecke *Littorina littorea*, führen bereits subtoxische Konzentrationen von TBT zu einer Reduktion der Populationsdichte durch die Induktion von Imposex oder Intersex (Oehlmann, 2000). Diese pathologischen Veränderungen können bis zur Sterilisierung führen.

Imposex beschreibt einen pseudo-hermaphroditischen Zustand weiblicher Schnecken (nach Maskulinisierung) durch eine zusätzliche Ausbildung männlicher Geschlechtsorgane im weiblichen Genitalsystem, z.B. bei der Wattschnecke. Höhere TBT-Konzentrationen führen zusätzlich zu einer Vernarbung der Eileiter (Bettin et al., 1996; Stroben et al., 1992).

Intersex beschreibt die Modifizierung der Eileiter, die durch eine prostataähnliche Struktur ersetzt werden. Diese Veränderung tritt beispielsweise bei der Strandschnecke auf. Imposex und Intersex werden weltweit beobachtet und betreffen eine große Zahl von Schneckenarten. Imposex wird nicht nur durch TBT bei einem Schwellenwert von 1,5 ng/l ausgelöst, sondern auch durch TPT (Schulte-Oelmann et al., 2000). Dieses Phänomen wird durch Anstieg des Testosteron/Östrogen-Verhältnisses verursacht. Dieser resultiert aus dem Anstieg des endogenen Testosterongehalts, der durch die Hemmung der Cytochrom P450-Aromatase durch TBT verursacht wird (Bettin et al., 1996). Als ein weiterer Grund für die Imposexbildung wird die Inhibierung der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase durch TBT (McVey et al., 2003) diskutiert. Das Enzym 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase ist für die Biosynthese von Progesteron, Aldosteron, Cortisol Östrogen und Testosteron erforderlich. Eine Mutation in dem Gen der 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 führt bei der Frau zu einem leichten Grad an Einleitung

Vermännlichung der externen Genitalien. Chronische TBT-Belastung führt zu einer verminderten Wachstumsrate von Populationen (Leung et al., 2004), Imposex und die daraus resultierende Unfruchtbarkeit der Tiere zum Aussterben ganzer Populationen (Bryan et al., 1986).

Es wird vermutet, dass die neurotoxische Wirkungen von TBT in Schnecken darin besteht, dass es durch TBT zu einer erhöhten Freisetzung des Neuropeptids PMF (penis morphogenic factor) kommt (Feral et al., 1983; Oberdorster et al., 2002). Dieses Peptidhormon, das in Gastropoden von den cerebralen, pleuralen und abdominellen Ganglien des zentralen Nervensystems sezerniert wird, ist für die Sexualentwicklung mitverantwortlich. PMF induziert z.B. die Ausbildung des Penis und ist ein kritischer Faktor beim Imposex (Oberdorster et al., 2000; Oberdorster et al., 2002). Zunächst führt die Erhöhung des PMF-Spiegels zur Initiation männlicher Sexualorgane bei weiblichen Tieren. Diese wachsenden Organe produzieren Testosteron und andere Androgene und stimulieren damit eine weitere Freisetzung von PMF.

Eine weitere neurotoxische Wirkung wird bei Flussbarschen beobachtet. Durch eine vermehrte Produktion von gonadotropem Hormon in der Hypophyse entwickeln diese schon im ersten Lebensjahr einen fließreifen Hoden, der fast die gesamte Leibeshöhle einnimmt. Durch Inhibition der Aromatase könnte ein vermindertes Östradiol-Feedback eine Steigerung der Ausschüttung von gonadotropem Hormon aus der Hypophyse bewirken. Dieses würde wiederum zum unkontrolliertem Wachstum des Hodens führen (Allner et al., 1998).

Auf zellulärer Ebene führen TBT-Belastungen zum Abbruch der Proteinsynthese, Schäden der Morphologie und Funktion von Mitochondrien und zur Induktion des programmierten Zelltodes (Apoptose) bei Erythrozyten (Aldridge & Street, 1970; Snoeij et al., 1986; Tiano et al., 2003).

3.1.5 Wirkung von Organozinnverbindungen auf die RNA-Expression

Neuere Untersuchungen beschäftigen sich mit der Wirkung von Organozinnverbindungen auf die RNA-Expression. Eine einheitliche Wirkung konnte nicht gefunden werden. So werden im Hirngewebe von Ratten die Expression für die

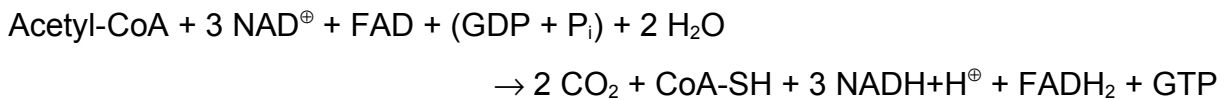
Thrombinrezeptoren PAR -1,-2,-3 (protease activated receptors) durch Trimethylzinn hochreguliert, wohingegen sich die Expression von Prothrombin und der Thrombin inhibierenden Protease Nexin-1 nicht wesentlich ändert (Pompili et al., 2004). Andere Untersuchungen zeigen, dass mRNA, die für zur Proliferin Familie zählenden Proteine codiert, durch Organozinnverbindungen verstärkt exprimiert werden (Parfett et al., 1993). Gleichzeitig wird eine morphologische Transformation der Zellen gefördert. Diese Veränderung tritt bei wachsenden Zellen stärker auf als bei schon konfluent wachsenden Zellkulturen (Parfett et al., 2000).

In einer aus Prostatakrebszellen erstellten Zelllinie wurde gezeigt, dass eine Stimulation der Zellen mit 100 nM TBT oder 1 nM TPT die Androgenrezeptor abhängige DNA Synthese und Expression von Genen im gleichen Mass wie 1 nM Dihydrotestosteron verstärkt. Die Expression des Androgenrezeptors selbst wurde nicht beeinflusst. Dabei konnte die Wirkung von TBT oder TPT nicht durch den Androgenrezeptor Antagonist Flutamid inhibiert werden, so dass eine Wirkungsweise an einem anderen Glied der Signalkette als dem Androgenrezeptor postuliert wird (Yamabe. et al., 2000).

Mittels eines cDNA-Microarrays mit 13.400 Protein codierenden Genen der Seeschnecke *Ciona intestinalis* wurde durch eine über 24 Stunden andauernde Exposition der adulten Tiere mit 100 nM TBT eine Hochregulierung der Expression vor allem bei Genen die Proteine für die Stressantwort und die Detoxifikation codieren gefunden. Darunter waren unter anderem die Gene, die für das Heat shock protein 70, die Cytochrom P450 und für Enzyme die Oxidoreduktionen katalysieren wie die Thioredoxinreduktase codieren. Andere Gene wie die für Kollagen, Annexin, Fibronectin und die Alkoholdehydrogenase wurden stark herunterreguliert. Insgesamt war die Zahl der heruntergeregelten Gene weitaus höher, so dass angenommen wurde, dass bereits Konzentrationen von 100 nM TBT für die Biosynthese und den Katabolismus toxisch sein könnte (Azumi et al., 2004). Andere Heat shock proteine wie Heat shock protein 89 und 70 wurden in menschlichen diploiden Fibroblasen durch submikromolare Konzentrationen von TBT verstärkt exprimiert (Zhang et al., 1992).

3.1.6 Succinatdehydrogenase

Die Succinatdehydrogenase (SDH), bestehend aus vier genetisch codierten Untereinheiten (SDHA, SDHB, SDHC und SDHD), ist ein membrangebundenes Enzym des Citratzyklus, lokalisiert in Mitochondrien. Dieses Flavoprotein enthält Flavinadenindinucleotid (FAD) als prosthetische Gruppe. Sie katalysiert die Reaktion von Succinat zu Fumarat. Der Wasserstoff der Oxidation von Succinat wird von FAD aufgenommen. Da die Dehydrierung von Succinat eine der geschwindigkeitsbestimmenden Schritte im Citratzyklus ist, ist die Funktion der SDH von großer Bedeutung. Der Citratzyklus stellt zusammen mit der Atmungskette die Versorgung des Organismus mit Energie (ATP) sicher. Durch die Reaktionen im Citratzyklus wird Acetyl-CoA schrittweise zu CO₂ und H₂O oxidiert. Dabei entstehen 3 NADH+H[⊕] und 1 FADH₂, die in der Atmungskette wieder oxidiert werden. Als weitere Produkte entsteht unter Sauerstoffverbrauch H₂O und ATP. Die Reaktionsgleichung des Citratzyklus lautet



Die SDH wird im Organismus durch Succinat aktiviert und durch Oxalacetat und Malonat kompetitiv im Sinne einer Feedback-Hemmung inhibiert. Zusätzlich wird die Enzymaktivität durch das Anion Bromid beeinflusst. Das Anion hemmt das Enzym auf zwei Arten. In einem hohen Verhältnis zum Succinat wird die SDH kompetitiv durch zwei Bromid-Ionen inhibiert. In einem niedrigen Verhältnis wurde beobachtet, dass bereits ein Ion ausreicht um eine nichtkompetitive Inhibition zu verursachen (Bonomi et al., 1981).

Als außerhalb der Membran befindliche, wasserlösliche Domäne der Succinat-Ubichinon-Oxireduktase, auch Komplex II genannt, bildet die SDH eine enge Verbindung zwischen Citratzyklus und Atmungskette. Dieser Komplex katalysiert die Wasserstoffübertragung von Succinat auf Ubichinon.

Mutationen der für die SDH codierenden Gene wurden als Ursache für eine Reihe von

Tumoren identifiziert. Zu diesen Tumoren gehören die überwiegend benignen chromaffine Tumoren Paragangliom und Phäochromozytom. Dieser Katecholamin produzierende Tumor bewirkt vor allem paroxysmale Hypertonie, Kopfschmerzen und Tachykardien. Es wird diskutiert, dass die SDH und die Fumarase, die in anaerob lebenden Organismen dieselbe Reaktion katalysiert, eine Rolle in der Proliferationskontrolle unter physiologischen Bedingungen spielen (Baysal, 2003). Die Tumorentstehung wird mit der durch die Mutation entstehende Pseudo-Hypoxie die mitochondriale Dysfunktion, die Beeinträchtigung der Apoptose und dem oxidativen Stress in Verbindung gebracht. Allerdings sind dies schlecht definierte Mechanismen und es konnten bisher keine Genmutationen aus Tumorgewebe isoliert werden (Pollard et al., 2003)

Die vier Untereinheiten werden an unterschiedlichen Geneloci codiert. Dabei müssen die im Zellkern erfolgende Transkription und die posttranskriptionelle Faltung und Modifizierung koordiniert werden.

Reporteranalysen des menschlichen SDH2 Promotors zeigen, dass die Transkription des Gens durch die NRF-1 und NRF-2 (nuclear respiratory factor) reguliert wird. Diese Faktoren binden nah oberhalb des Transkriptionsstarts und bewirken eine verstärkte Expression (Au et al., 1998).

Weiterhin wurden bei *Paenibacillus macerans* die Transkriptionsprodukte nur unter aerobem Wachstum gefunden. Dabei war die Menge direkt proportional zur Aktivität der SDH (Schirawski et al., 1998).

3.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion wurde Mitte der 80er Jahre entwickelt. Sie dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten, die durch die Wahl des Forward Primers (FP) und des Reverse Primers (RP) definiert werden.

Diese DNA-Fragmente werden durch wiederholte Zyklen einer enzymatischen *in vitro* Replikation unter nicht limitierenden Bedingungen exponentiell amplifiziert.

Um eine online-Detektion der PCR zu ermöglichen, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem die Amplifikation und der Nachweis des PCR-Produkts simultan im gleichen

Reaktionsgefäß ermöglicht wird. Dieses Verfahren wird Real-Time-PCR genannt. Dabei wird eine spezifische Sonde, die komplementär zu einem DNA-Abschnitt zwischen Forward- und Reverse-Primer ist, am 5'-Ende mit einem fluorogenen Reporter-Farbstoff (Fluorezein-Derivat) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) versehen. Durch die räumliche Nähe des Reporters zum Quencher wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes unterdrückt. Diese Sonde wird, nachdem sie wie die Primer an den Matrizen-Strang hybridisiert hat, durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase bei der Amplifikation abgebaut, so dass die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes nicht mehr unterdrückt wird.

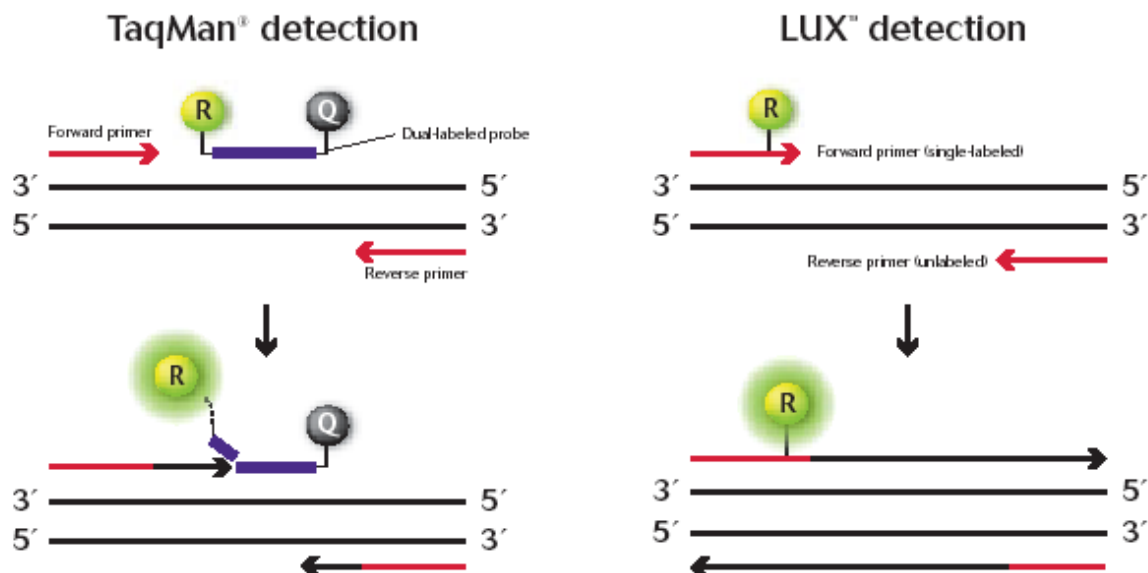


Abb. 3: Funktionsprinzip von Primerpaaren.

Bei traditioneller TaqMan Detektion wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes (R) durch den QuencherFarbstoff (Q) unterdrückt. Bei der Amplifikation wird die Sonde abgebaut und die Fluoreszenz nicht mehr unterdrückt. Bei LUX Detektion wird die Fluoreszenz durch die Struktur des Primers unterdrückt. Dieser Effekt wird durch den Einbau des Primers während der Amplifikation aufgehoben.

Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffes steigt entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt mit jedem Zyklus an. Da das gebildete Signal streng sequenzspezifisch ist, ist die Stärke des Fluoreszenzsignals ein Maß für die gebildete Menge des spezifischen PCR-Produkts. Das Fluoreszenzsignal wird mit dem ABI PRISM® 7700

Sequence Detection System nach jedem Zyklus aufgezeichnet und erlaubt so die Auswertung der PCR (Schild, 1996).

Der ΔR_n -Wert als Maß für die Fluoreszenz am Ende eines Zyklus wird berechnet nach der Formel:

$$\Delta R_n = \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{sample}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{ROX}}} - \frac{\text{Fluoreszenz}_{\text{sample, initial}}}{\text{Fluoreszenz}_{\text{ROX, initial}}}$$

3.3 LUX[®]-Primer

Eine Variation des TaqMan Prinzips der RT-PCR wurde von der Firma Invitrogen entwickelt. Nach Aussagen der Firma liegen die Vorteile in einer hohen Leistungsfähigkeit und geringen Kosten. Zusätzlich werden für viele häufig verwendete Housekeepinggene von Menschen, Mäusen und Ratten fertige Primer-Sets angeboten. Jedes LUX[®]-Primer Paar besteht aus einem mit einem Fluoreszenzfarbstoff (FAM) versehenen (labeled) und einem Primer ohne Farbstoff (unlabeled). Der Fluoreszenzfarbstoff wird an dem 3'-Ende des Primers angehängt, außerdem enthält der Labeled-Primer am 5'-Ende eine 4 - 6 Nucleotide lange Sequenz die komplementär zum 3'-Ende ist. Die daraus entstehende Haarnadel-Struktur des Primers unterdrückt ein Fluoreszieren des Farbstoffes, so dass kein zusätzlicher Quench-Farbstoff nötig ist. Dieser Effekt wird durch den Einbau des Primers während der Amplifikation aufgehoben und das Fluoreszenzsignal wird um das 10fache verstärkt. Da der Primer selbst den Fluoreszenzfarbstoff trägt, ist eine Sonde überflüssig.

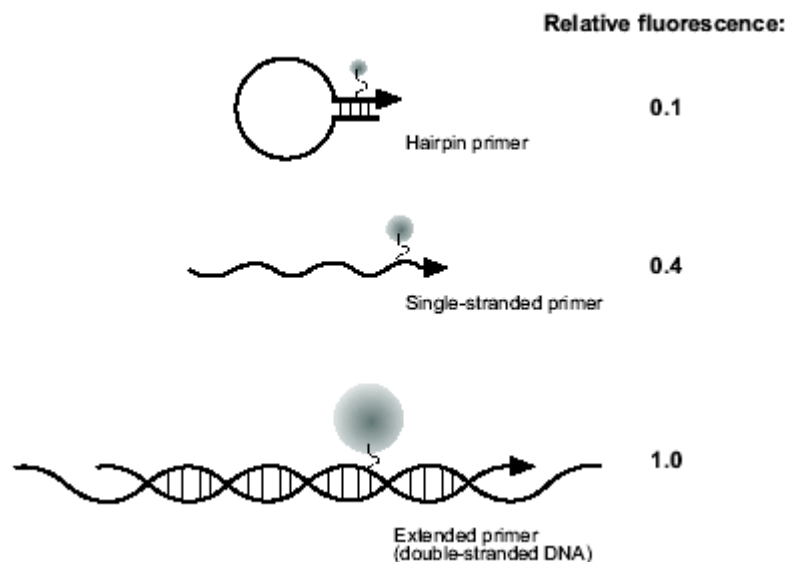


Abb. 4: Funktionsprinzip der Fluoreszenz bei LUX- Primerpaaren

Die Fluoreszenz des Farbstoffes wird durch die Haarnadel-Struktur des Primers unterdrückt. Die Aufhebung der Haarnadel-Struktur verstärkt die Fluoreszenz um den Faktor 4. Durch Hybridisierung an den Matrizen-Strang und Amplifikation steigt die Fluoreszenz um den Faktor 10.

3.4 Ziele der Arbeit

Zunächst sollte ein Methodenvergleich von traditioneller RT-PCR mit Primern und Sonden mit einer Realtime PCR mit LUX[®]-Primern erarbeitet werden. Anhand der geeigneteren Methode war es dann das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, inwiefern die Expression des für die Succinatdehydrogenase (SDH) codierenden Gens durch die Exposition der Zellen mit den Organozinnverbindungen Tributylzinn oder Triphenylzinn beeinflusst wird. Dabei sollte untersucht werden, ob ein für die Aromatase postulierter Regelkreis, der mit Hemmung des Enzyms und konsekutiver Aktivierung der Expression des entsprechenden Gens einhergeht, auf die Succinatdehydrogenase übertragen werden kann.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Primer und sonstige Materialien

4.1.1 Chemikalien

β -Mercaptoethanol (β -ME)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromphenolblau (BPB)	Biorad (München)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich (München)
DNA-Molecular Weight Marker VII	Boehringer (Mannheim)
Ethanol absolut zur Analyse	Merck (Darmstadt)
Extran [®]	Merck (Darmstadt)
Frekanol	Fresenius (Bad Homburg)
HCl (Salzsäure)	Merck (Darmstadt)
NaOH (Natronlauge)	Merck (Darmstadt)
NuSieve [®] 3:1 Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
RDD DNA Digest Buffer	Qiagen (Hilden)
RNase Away	Molecular BioProducts (San Diego, USA)
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Salzsäure 25%	Merck (Darmstadt)
Sterilium	Bode (Hamburg)
TBE-Puffer	Roth (Karlsruhe)
TE-Puffer	Qiagen (Hilden)
TE-Puffer, 20x	Molecular Probes (Eugene, USA)
Wasser, HPLC-	Merck (Darmstadt)

4.1.2 Zellkulturbedarf

Ampuva-Wasser	Fresenius (Bad Homburg)
Aqua ad iniectabilia	Delta select (Pfullingen)
DMEM/F12	Cambrex (Verviers, Belgien)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Cölbe)
PBS „Cellwash“	Becton Dickinson (Erembodegem, Belgien)
Penicillin / Streptomycin	PAA (Cölbe)
Trypsin 10x	Biochrom (Berlin)
Zellkulturschalen Falcon	Becton (Franklin Lakes, USA)
Zellkultur-Testplatten 6, 12 u. 24	Becton (Franklin Lakes, USA)
Zellkultur-Testplatten 96 weiß	Becton (Franklin Lakes, USA)
Zellkultur-Testplatten 96	Greiner Bio-One (Frickenhausen)

4.1.3 Enzyme

DNase I [®]	Qiagen (Hilden)
Superskript [™] II	Invitrogen (Carlsbad, USA)

4.1.4 Verwendete Kits

CellTiter-Glo [™] Cell Viability Assay	Promega (Madison, USA)
Mycoplasma Detection Kit	Biochrom (Berlin)
Platinum [®] Quantitative PCR SuperMix-UDG	Invitrogen (Carlsbad, USA)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
Ribogreen	Molecular Probes (Eugene, USA)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden)
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)

4.1.5 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Name	Pos.	5'→3' Sequenz
PBGD_rat FP	851	CTGGAGTCTAGATGGCTCAGATAGC
PBGD_rat RP	932	TGGACCATCTTCTTGCTGAACA
PBGD_rat S	883	[6~FAM]AGACCATGCAGGCCACCATCCAG[TAMRA~&~FAM]
SDHA_rat FP	1673	CGTCCGATCAGCGACACA
SDHA_rat RP	1764	GGAGGATTTATCAGCGTGCATT
SDHA_rat S	1705	[6~FAM]CCTGCCCGCCTTTCCCGAACTT [TAMRA~&~FAM]
BETA-ACTIN FP	27	CACAGCTTCTTTGCAGCTCCTT
BETA-ACTIN RP	106	ACCAGCGCAGCGATACG
GAPDH FP	950	CGCTCCTGGAAGATGGTGAT
GAPDH RP	1042	TGACTCCACTCACGGCAAATT
PBGD_LUX_RAT_836FL	836	GTACAGTTTGATGAAGGATGGGGCAACTG[FAM]AC
PBGD_LUX_RAT_836FL_876	876	TGGCCTGCATGGTCTCTTG
RU		

LUX™ Fluorogenic Primers Invitrogen (Carlsbad, USA)

Mouse/Rat SDHA-Certified LUX® Primer Set Invitrogen (Carlsbad, USA)

Primer und Sonden Operon (Qiagen)

4.1.6 Sonstige Materialien

Optical Adhesive Covers Applied Biosystems (Darmstadt)

QIAshredder® Qiagen (Hilden)

Thermo-Fast 96 Detection Plates Abgene (Epsom, UK)

4.2 Zelllinie

Zelllinie CC1 ECACC (Salisbury, England)

4.3 Geräte

„Axiovert S100“- Mikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
Automatic CO2 Incubator Model 160IR	ICN Flow
Clean Spot	Coy Laboratory Products (Grass Lake, USA)
Elektrophorese:	
Mini Power Pack™ P20	Biometra (Göttingen)
Horizontal-Elektrophoresekammern	Stratagene (La Jolla, USA)
Julabo U3/8	Julabo Labortechnik (Seelbach)
Kameras:	
Polaroid Typ DS39 s/w-Sofort	Polaroid (Waltham, USA)
Minolta SRT 101 mit Mikroskop-Adapter	Minolta (München)
Luminometer:	
Centro LB960	Berthold Technologies (Oak Ridge, USA)
Polarstar Galaxy	BMG Labtech (Jena)
MS1 Minishaker	IKA-Works (Wilmington, USA)
Poratest 655	Knick (Berlin)
Spektrometer:	
GeneQuant II	Pharmacia (Freiburg)
550S	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Thermocycler:	
Thermocycler TC1	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Thermoblock	Biometra (Göttingen)
ABI PRISM® 7700	Applied Biosystems (Darmstadt)
XE-2100 (Zellzählautomat)	Sysmex (Mundelein, USA)
Zentrifugen:	
Sigma Nr. 113	Sigma (Osterode am Harz)
Sigma 1-15	Sigma (Osterode am Harz)
Varifuge RF	Heraeus Instruments (Hanau)
CPKR Centrifuge	Beckmann (München)

4.4 Methoden der Zellkultur

4.4.1 Zellzucht

Die Ratten Hepatocyten Zelllinie CC1 wurde nach den üblichen Protokollen der Zellkultur kultiviert. Die Zellen wuchsen in DMEM/F12 mit L-Glutamin, dem 10% FCS sowie 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Die Bedingungen im Brutschrank wurden konstant bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

Die Zellen wurden in der Regel in 10 cm Zellkulturschalen in einer Dichte ausgesät, so dass sie nach einer Woche etwa 70-90 % konfluent waren. Nach drei bis vier Tagen wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und nach einer Woche eine Passage. Für die Passage wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 5 min trypsinisiert. Die Zellen wurden 10 min bei 300 x g zentrifugiert und in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellkonzentration der Suspension wurde im XE-2100 (Sysmex), einem für die Blutbildbestimmung verwendeten Zellzähl-Automat, ermittelt. Pro Zellkulturschale wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen in 10 ml Kulturmedium ausgesät.

4.4.2 Mycoplasmen-Detection

Mycoplasmen sind zellwandlose Mikroorganismen, die parasitär Zellen befallen. Da eine Infektion den Metabolismus der Wirtszelle verändert, Mycoplasmen einen 0,2 µm Sterilfilter passieren können und sie bei einfacher mikroskopischer Kontrolle nicht sichtbar sind, müssen Zellkulturen regelmäßig auf Kontamination untersucht werden. Der Nachweis wurde mittels des Mycoplasmen-Testkits der Firma Biochrom nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die DNA der Wirtszelle und evtl. vorhandener Mycoplasmen wird dabei durch einen Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimidazol) angefärbt. Zellkulturen, die mit Mykoplasmen kontaminiert sind, zeigen neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich des Zytoplasmas und zwischen den Zellen. Dieser Test wurde sowohl vor als auch nach den Versuchen durchgeführt.

4.4.3 Vitalitätstest

Die Wirkung von toxischen Substanzen auf die Expression von Genen ist nur sinnvoll zu beurteilen, wenn die Zellen nicht durch die Substanz in ihrer Vitalität beeinträchtigt werden. Die Untersuchung auf Veränderungen in der Expression des Genes für die SDH sollten deshalb im subtoxischen Bereich durchgeführt werden.

Zur Ermittlung der Konzentrationen, die für die Zellen toxisch sind, wurde der „CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay“ der Firma Promega verwendet. Dazu wurden die Zellen in einer Zellkultur-Testplatte mit 96 Zellkulturkavitäten in einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Zellkulturkavität ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit Konzentrationen zwischen $0,05 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ in Schritten von $0,1 \mu\text{M}$ TPT bzw. TBT inkubiert. TPT und TBT wurden in Ethanol gelöst, wobei die Ethanol-Konzentration mit $0,25\%$ unter der für die Zellen toxischen Konzentration lag.

Für die Negativkontrolle wurde reines Ethanol zugesetzt. Ein Leerwert (nur Kulturmedium und Ethanol) diene dazu, eine mögliche Lichtemission der Zellkultur-Testplatte zu erkennen. Jede Probe wurde als Triplikat angesetzt.

Die Zellen wurden nach einem bis vier Tagen Inkubation auf ihre Vitalität untersucht. Mittels des Tests wird die ATP-Menge gemessen, indem Beetle Luciferin unter Sauerstoffverbrauch mit ATP durch Katalyse von Firefly Luciferase und Mg^{2+} zu Oxyluciferin, AMP, PP_i , CO_2 und Licht reagiert. Die Messung des Lichtsignals erfolgte im Centro LB960 (Berthold Technologies) unter Verwendung der folgenden Einstellungen:

Plate type:	8x12 plate
Plate mode:	measurement
measurement order:	By Rows
Delay:	Duration: 2.0
	Meas. operation: by well
Firefly:	Counting Time 0,03

Durch Vergleich mit der Negativkontrolle mit Medium inklusive 0,25% Ethanol und dem Leerwert wird die relative Vitalität nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Vitalität} = \frac{(\text{TPT oder TBT}) - \text{Leerwert}}{\text{EtOH} - \text{Leerwert}}$$

Verwendet wurden jeweils die Mittelwerte aus Triplikaten. Der Wert für Ethanol entspricht 0 μM TPT oder TBT und ergab dadurch immer 1. Jedes Experiment wurde dreifach durchgeführt.

4.4.4 TPT und TBT Inkubation

Für die Wahl der Primer sowie die Untersuchung auf Veränderungen in der Expression des Genes für die SDH wurden die Zellen in Zellkultur-Testplatten mit sechs Zellkulturkavitäten in einer Dichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro Zellkulturkavität ausgesät. Einen Tag später wurden die Zellen mit TPT und TBT inkubiert. Die Organozinnverbindungen wurden in Ethanol gelöst in den Konzentrationen 5, 15, 30, 50 und 100 nM in Triplikaten angesetzt. Als Negativkontrolle wurde reines Ethanol zugesetzt. Dabei lag die Ethanol Konzentration bei 0,25%. Nach 48 Stunden wurde die RNA extrahiert. Dieser Versuch wurde dreifach durchgeführt. In drei aufeinander folgenden Passagen der selben Zelllinie wurde jeweils ein Versuch durchgeführt.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 mRNA-Isolierung

Da nahezu ubiquitär RNasen vorhanden sind, wurden sämtliche Arbeiten mit RNA unter nahezu RNase-freien Bedingungen durchgeführt.

Plastikmaterial wurde über 12 Stunden in eine Lösung aus je 1000 μl DEPC auf 1000 ml destilliertem Wasser getaucht und anschließend autoklaviert, um das DEPC zu

inaktivieren. HPLC-Wasser wurde durch Zusatz von 1% DEPC über 12 Stunden mit anschließender Autoklavierung von RNasen befreit.

Die Zellen wurden trypsinisiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in RLT, dem je Milliliter 10 µl β-ME beigefügt wurden, lysiert und bei -80°C gelagert. Das Lysat wurde bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit einem QIAshredder® homogenisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit nach dem Protokoll der Firma Qiagen. Das RNeasy Mini Kits ermöglicht es bis zu 100 µg Gesamt-RNA aus tierischen Zellen, Gewebe, Bakterien oder Pilzen zu isolieren. Durch Zugabe von DNase I® wurden eventuell zurückgebliebene DNA-Fragmente zerstört. Die RNA wurde in 30 µl HPLC-Wasser eluiert, und bei -80°C gelagert.

4.5.2 RNA-Quantifizierung

Der RNA Gehalt der einzelnen Proben wurde mit Ribogreen® gemessen. Ribogreen® ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an RNA bindet und durch den Vergleich mit einer durch Molecular Probes mitgelieferten Standard RNA eine exakte Mengenbestimmung ermöglicht.

Der Farbstoff, die Proben und die Standard RNA wurde in festgelegten Verhältnissen mit TE-Puffer verdünnt. Nach Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes konnte die Lichtemission mit Hilfe des Luminometers „Polarstar Galaxy“ unter Verwendung folgender Einstellungen gemessen werden.

Modus:	Well	Excitation Filter:	485 nm
Gain:	52	Emmission filter:	520 nm
Intervallzeit:	0,5 s	Platte:	Falcon 3072 96
Zahl der Blitze:	10		

Anhand der Geradengleichung des Graphen für die Standard-RNA konnte die RNA-Menge jeder Probe berechnet werden.

Mit Gene Quant II® wurden die Proben photometrisch auf Proteinverunreinigungen getestet.

4.5.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine enzymatische Reaktion, bei der RNA durch reverse Transkriptasen in cDNA umgeschrieben wird. Es wurden je Probe 3000 ng RNA eingesetzt. Da davon ausgegangen werden kann, dass die RNA 1 zu 1 umgeschrieben wird, entstanden dadurch jeweils 3000 ng cDNA. Mit den verwendeten Reagenzien können zwischen 1 ng und 5 µg RNA umgeschrieben werden. Jeder Ansatz wurde in der Regel wie folgt angesetzt

3000	ng Probe
1	µl random Hexamers
0,5	µl 20 mM dNTP Mix
ad 12	µl DEPC H ₂ O

Nach einer 5-minütigen Denaturierung bei 65°C wurden die Ansätze sofort auf Eis gestellt, um ein Reannealing zu verhindern. Dann wurde jeweils

4	µl 5x First-Strand Puffer
2	µl 0,1 M DTT
1	µl RNaseOut® Recombinant Ribonuclease Inhibitor

zugegeben. Die Ansätze wurden zentrifugiert und 2 Minuten auf 42°C erhitzt. Anschließend wurden jeweils

1	µl Superskript II (200 Units)
---	-------------------------------

zugegeben. Die Ansätze wurden 10 Minuten auf 25°C und 50 Minuten auf 42°C erhitzt.

Abschließend wurden die Enzyme 15 Minuten bei 70°C inaktiviert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert. Die Amplifikation erfolgte in der Regel auf dem Thermocycler TC1 (Perkin Elmer).

Zur Verwendung als Kalibrator wurde die cDNA vierer Ansätze mit jeweils 4000 ng RNA Einsatz vermischt und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Proben und der Kalibrator wurden mit DEPC-H₂O auf 20 ng/µl verdünnt.

4.5.4 PCR

Wahl der Primer

Die Sequenzen der Gene

BETA-ACTIN	NM_007393
GAPDH	(Glyzerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), NM_008084
PBGD	(Porphobilinogen-Desaminase), NM_013168
SDH	(Succinatdehydrognase Subunit A), AF095938

der Ratte wurden der Genbank des NCBI „Entrez PubMed“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) entnommen. Die Primerwahl wurde mit Hilfe der Software „PrimerExpress™ v1.5“ durchgeführt. Es wurden jeweils ein Primerpaar mit dazu passender Sonde herausgesucht. Über einen Abgleich mit Hilfe von „NCBI BLAST“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) wurde sichergestellt, dass die Primer genspezifische Amplifikate ergaben.

Die Primer und Sonden wurden per email bei Operon (oligo@operon.com) bestellt, um Kopierfehler bei der Basenabfolge zu vermeiden.

Die LUX[®]-Primer für SDH wurden von der Firma Invitrogen als Fertigset geliefert.

Die Wahl der LUX[®]-Primer für PBGD erfolgte online über einen von der Firma Invitrogen auf ihrer Website (<http://www.invitrogen.com>) zur Verfügung gestelltes Suchprogramm. Der FP war FAM-markiert, der RP war nicht markiert.

Die Primer wurden in steril filtriertem TE-Puffer, pH 7, die Sonden in TE-Puffer, pH 8 gelöst, so dass eine 100 μM Lösung vorlag. Für die PCR wurde diese Lösung mit DEPC H_2O auf 10 μM verdünnt. Die Lagerung der Primer und Sonden erfolgte bei -20°C . Arbeitslösungen für den täglichen Bedarf wurden bei 4°C gelagert.

Wahl des Referenzgens

Das Referenzgen dient dazu die Messung der RNA Expression unabhängig vom metabolischen Zustand der Zelle zu erfassen, üblicherweise werden hierzu Housekeepinggene analysiert. Optimalerweise wird dieses Gen zu jedem Zeitpunkt und unabhängig vom Umwelteinfluss konstant exprimiert. Zu diesem Zweck wurden die Gene für BETA-ACTIN, GAPDH und PBGD auf ihre Eignung als Referenzgene getestet.

Dazu wurde eine PCR mit folgendem Reaktions-Mix

20-40	ng cDNA
25	μl Platinum [®] Quantitative PCR SuperMix-UDG
0,2	μM FP [10 μM]
0,2	μM RP [10 μM]
ad 50	μl DEPC H_2O

auf dem Thermoblock von Biometra durchgeführt. Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten verwendet.

2 min	50°C	
2 min	95°C	
15 s	95°C	┘
30 s	55°C	35x
30 s	72°C	┘

Die Überprüfung der PCR-Produkte auf Primerdimere oder unspezifische Amplifikationsprodukte erfolgte per Agarosegelelektrophorese. Die Agarosegele wurden 4%ig in TBE-Puffer angesetzt. Als Elektrophoresepuffer diente ebenfalls TBE-Puffer.

Die DNA wurde mit Sybrgreen angefärbt. Als Standard wurde der „DNA-Molecular Weight Marker VII“ der Firma Boehringer verwendet. Die Spannung wurde zu Beginn auf 30 - 40 Volt eingestellt, später auf etwa 90 Volt erhöht. Nach etwa 90 Minuten wurde das Ergebnis auf einer UV-Bank beurteilt und fotografisch dokumentiert.

Nach photometrischer Ermittlung der DNA-Konzentration dieser aus Amplifikat bestehenden Probe im GeneQuant II wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, so dass in späteren qPCR Messungen eine Standardkurve mit Werten zwischen 10^{-6} ng/PCR-Kavität und 0,1 ng/PCR-Kavität erstellt werden konnte.

Die qPCR wurde mit „QuantiTect™ SYBR® Green® PCR“ durchgeführt. Diese enthält mit „HotStarTaq™ DNA Polymerase“, „QuantiTect SYBR Green PCR Puffer“, „dNTP mix mit dUDP“, „SYBR Green I“, ROX (passive reference dye) und 5 mM MgCl₂ alle für eine PCR notwendigen Reagenzien, sowohl für die Amplifikation, als auch für die Detektierung mittels des ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System.

Für die PCR wurde ein Primer - Mastermix erstellt, der sich aus QuantiTect™ SYBR® Green® PCR und jeweils 0,6 µM FP und RP zusammensetzte.

Je PCR-Kavität wurden 20 ng cDNA zugesetzt. Und das Volumen der Probe wurde ad 25 µl mit DEPC H₂O aufgefüllt. Die Endkonzentration von FP und RP lag bei 0,3 µM.

Die Verdünnungsstufen von 10^{-6} ng/PCR-Kavität bis 0,1 ng/PCR-Kavität, die Proben und NTC's wurden als Triplikate angesetzt.

Die qPCR wurde mit dem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System durchgeführt.

Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten verwendet:

10 s	50°C	
15 min	95°C	
15 s	94°C	┘
30 s	58°C	40x
30 s	72°C	┘

Anschließend wurde eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, um zu überprüfen, dass nur ein spezifisches Amplifikat gebildet wurde. Dazu wird die DNA bei 95°C geschmolzen und anschließend erfolgt eine kontinuierliche Temperatursenkung auf 60°C. Das beim Re-annealing entstehende Lichtsignal wird kontinuierlich aufgezeichnet. Dies beruht auf folgendem Prinzip: der Farbstoff SYBR Green legt sich in die Doppelhelix der DNA und emittiert ein Fluoreszenzsignal, so dass Doppelhelices detektiert werden können. Jeder DNA-Strang hat eine von seiner Länge und Basenabfolge abhängige Schmelztemperatur, bei der sich die Doppelhelix spaltet bzw. bei Abkühlung aneinanderlagert. Durch diese Schmelzkurven-Analyse kann festgestellt werden, ob bei der PCR Primerdimere oder mehrere Produkte entstanden sind. Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten verwendet:

15 s 95°C

20 s 60°C

innerhalb 19:59 min kontinuierliche Temperaturerhöhung

auf 95°C

Primermatrix

Um eine optimale Amplifikation bei der PCR zu erreichen, wurden verschiedene Verhältnisse der FP- und RP- Konzentrationen miteinander verglichen. Durch die Anwendung asymmetrischer Primer-Konzentrationen wird eine Veränderung der programmierten Annealing-Temperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$ simuliert. Es wird für jeden Primer ein Temperaturbereich von 4°C überprüft. Es wurden Primerkonzentrationen von 50, 300 und 900 nM in allen Kombinationsmöglichkeiten gegeneinander getestet.

Effizienz-Test

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines nicht regulierten Referenzgens normiert. Dabei werden nicht die absoluten cDNA

Ausgangskonzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites konstitutiv exprimiertes Gen, dem Referenzgen, bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Referenzgen betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf einen Kalibrator bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes ($2^{-\Delta\Delta ct}$ - Wert) kann über die sogenannte $\Delta\Delta ct$ -Methode erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der ct-Wert des Referenzgens vom ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta ct = ct \text{ Zielgen} - ct \text{ Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom Δct -Wert der experimentell behandelten Proben der Δct -Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta ct$). Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe wird nach folgender Formel berechnet:

$$X_{N,kal} = 2^{-\left((ct_{SDH,x} - ct_{PBGD,x}) - (ct_{SDH,kal} - ct_{PBGD,kal}) \right)}$$

Wobei x = Probe, kal = Kalibrator und $X_{N,kal} = 2^{-\Delta\Delta ct}$ - Wert

Die Anwendung der $\Delta\Delta ct$ -Methode erfordert, dass die Amplifikation des zu testenden Gens und die des Housekeepinggenes mit der gleichen Effizienz abläuft. Dazu wurde in einer RT-PCR eine Verdünnungsreihe, mit den Verdünnungsstufen 10, 31,6, 100, 200, 316, und 1000 ng cDNA/PCR-Kavität mit den Primern für SDH und PBGD durchgeführt. Die ct-Werte der einzelnen Konzentrationen wurden voneinander subtrahiert und in einem Graphen dargestellt. Sofern die Steigung der

Regressionsgerade nicht signifikant von 0 verschieden ist, ist die Effizienz der PCR bei beiden Primern gleich.

RT-PCR mit Sonde

Zur Expressionsanalyse des SDH-Gens, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Als Referenzgen diente PBGD.

Die Ursprungsvariante der RT-PCR unter Verwendung von FAM gelabelten Sonden wurde verwendet, um einen Vergleich zwischen Sonden-Analyse und der neueren Analyse mit LUX[®]-Primern ziehen zu können.

Für die Sondenanalyse wurde der „TaqMan[®] Universal PCR Master Mix“ verwendet, der alle für die PCR notwendigen Reagentien enthält.

Es wurde ein Reaktionsvolumen von 25 µl angesetzt, mit folgender Zusammensetzung:

12,5 µl	TaqMan [®] Universal PCR Master Mix
0,75 µl	FP [10 µM]
0,75 µl	RP [10 µM]
0,5 µl	S [10 µM]
20 ng	cDNA
ad 25 µl	DEPC H ₂ O

Jede Probe sowie die NTCs und der auf jeder Platte mitgeführte Kalibrator wurden in Triplikaten angesetzt. Die RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM[®] 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten verwendet:

2 min	50°C	
10 min	95°C	
15 s	95°C	┐
		40x

1 min 60°C J

Bei der RT-PCR wird nach jedem Zyklus über eine CCD-Kamera ein Fluoreszenzsignal, welches in seiner Stärke proportional zur vorhandenen Amplifikat-Menge ist, aufgezeichnet. Dieses Signal wird logarithmisch gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Graphen für alle PCR-Kavitäten verlaufen in dem Bereich optimaler Reaktionen, der exponentiellen Phase, parallel zueinander. Werte dieses Bereichs wurden der Quantifizierung zugrunde gelegt. Es wurde ein Schwellenwert (Threshold) definiert, dessen Ordinatenabschnitt für jede PCR derselbe war. Der Threshold definiert den Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal das Hintergrundrauschen übersteigt. Der Schnittpunkt des Threshold mit der Fluoreszenzkurve liefert einen ct-Wert („Threshold-Cycle“), der ein Maß für die Menge der spezifischen cDNA aus der Gesamt cDNA ist. Zusätzlich zur $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode wurde eine weitere Auswertungsmethode verwendet. Diese beruht auf der Annahme, dass unter der Voraussetzung, dass eine genaue Quantifizierung des cDNA-Ausgangsgehalts erfolgt ist, ein direkter Vergleich der ct-Werte erfolgen kann. Die Quantifizierung erfolgte durch Ribogreen, wodurch eine ausreichend präzise Quantifizierung erfolgte. Hierfür notwendige Voraussetzung ist die Definition des Threshold, der für jede PCR denselben Wert haben und jeweils in der exponentiellen Phase liegen muss.

RT-PCR mit LUX[®] Primern

Für den Vergleich zwischen Sonden-Analyse und Analyse mit LUX[®]-Primern wurde die RT-PCR zusätzlich unter Verwendung von LUX[®]-Primern durchgeführt. Dazu wurde der „Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG“ verwendet. Dieser Mix ist für quantitative RT-PCR einschließlich LUX[™] Fluorogenic Primers geeignet und enthält alle für die PCR notwendigen Reagentien. Zusätzlich wurde ROX hinzugegeben, um die Menge der gebildeten DNA am Ende der RT-PCR direkt vergleichen zu können, somit ist ROX ein Indikator, um Pipettierunterschiede entdecken zu können.

Es wurde ein Reaktionsvolumen von 25 μl mit folgender Zusammensetzung angesetzt:

12,5 µl Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG
 0,5 µl FP [10 µM]
 0,5 µl RP [10 µM]
 0,5 µl ROX
 20 ng cDNA
 ad 25 µl DEPC H₂O

Jede Probe sowie die NTCs und der auf jeder Platte mitgeführte Kalibrator wurden in Triplikaten angesetzt. Die RT-PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Es wurden folgende Temperaturen und Zeiten verwendet:

2 min	50°C	
2 min	95°C	
15 s	95°C	↓
30s	55°C	40x
30s	72°C	↓

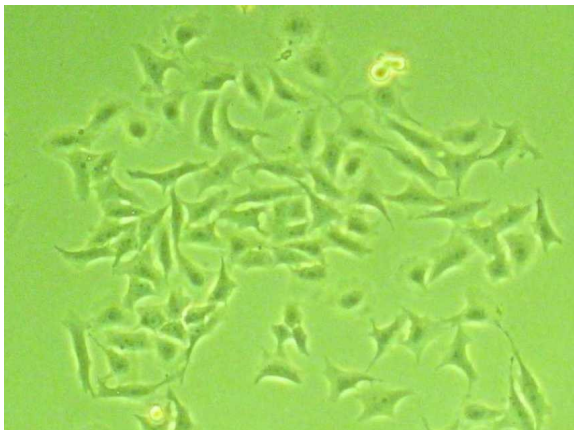
4.6 Computer technische Unterstützung

Fig. P	Fig. P Software Corporation (Durham, USA)
Fluostar Galaxy	BMG Labtech (Jena)
MikroWin 2000 v4.29	Berthold Technologies (Oak Ridge, USA)
PrimerExpress™ v1.5	Applied Biosystems (Darmstadt)
Sequence Detection Systems v1.7	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Entrez PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi)	
NCBI BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)	
www.invitrogen.com	

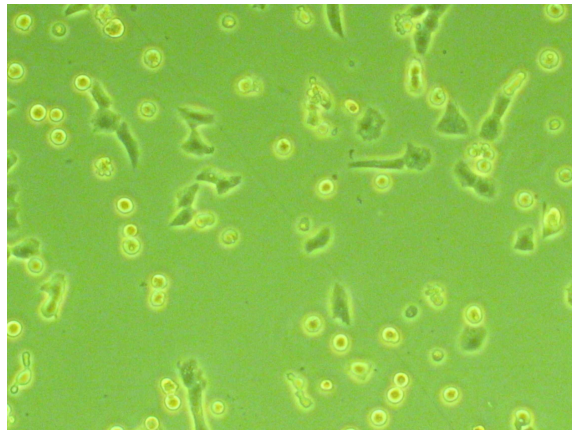
5 Ergebnisse

5.1 Vitalitätsmessung

Die mikroskopische Kontrolle der Zellkulturen zeigte bis etwa 300 nM TPT oder TBT ein normales Aussehen der Zellen. Bei Konzentrationen über 300 nM zeigten die Zellen eine rundliche Form und bildeten keinen festen Zellrasen mehr auf Boden der Zellkulturschale.



**Abb. 5: CC1-Zellen ca. 30% konfluent
(100fach Vergrößert)**



**Abb. 6: CC1-Zellen für 24 h in 500 nM
TPT inkubiert (100fach Vergrößert)**

Bei der Auftragung der mittels des „CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay“ ermittelten relativen Vitalität gegen die TPT oder TBT Konzentration wird deutlich, dass sich die Vitalität reziprok zur Organozinnkonzentration verhält. Bis zu einer Konzentration von 0,2 μM TPT oder TBT liegt die relative Vitalität über 80%. Bei weiter steigender Konzentration fällt die Vitalität stark ab. Die Dauer der Inkubation hatte keinen zusätzlichen Einfluss auf die Vitalität.

Es wurde eine Konzentration von 0,2 μM TPT oder TBT als toxischer Grenzwert ermittelt. Um sicher im subtoxischen Bereich zu bleiben, wurde für die Untersuchung der Expression eine maximale Konzentration von 100 nM TPT oder TBT gewählt.

Um bei den Untersuchungen auch längerfristige Auswirkungen der zinnorganischen Verbindungen TPT und TBT auf die Genexpression zu erfassen, wurde eine Inkubationszeit von 48 Stunden verwendet.

5.1.1 Vitalitätsmessung TPT

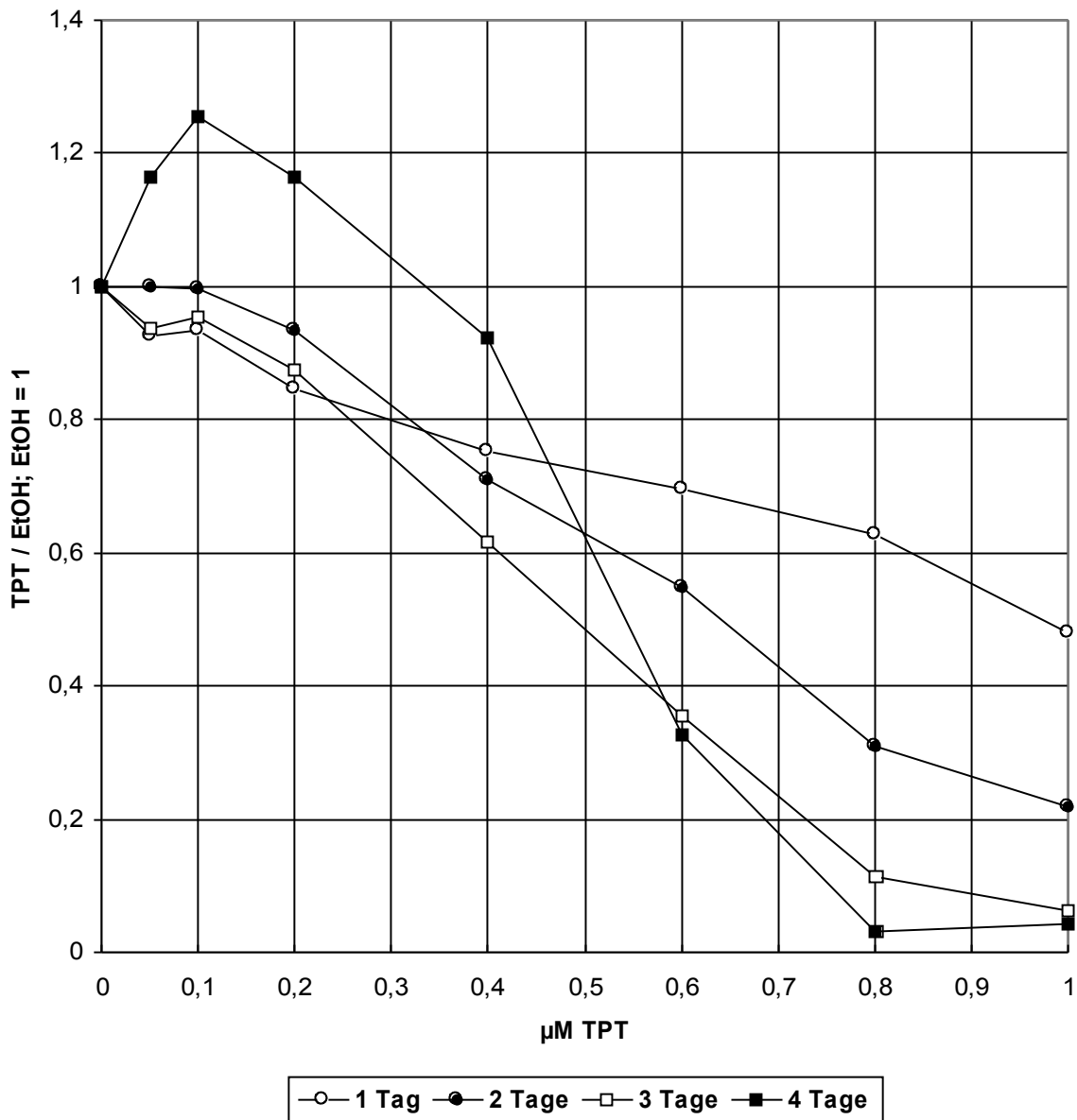


Abb. 7: Relative Vitalität von CC-1-Zellen (TPT)

Aufgetragen sind die Vitalität (ATP Menge in der Probe / ATP Menge in der Leerwertprobe) gegen die TPT- Konzentration. Die einzelnen Graphen beschreiben die Dauer den Inkubation.

Ergebnisse

5.1.2 Vitalitätsmessung TBT

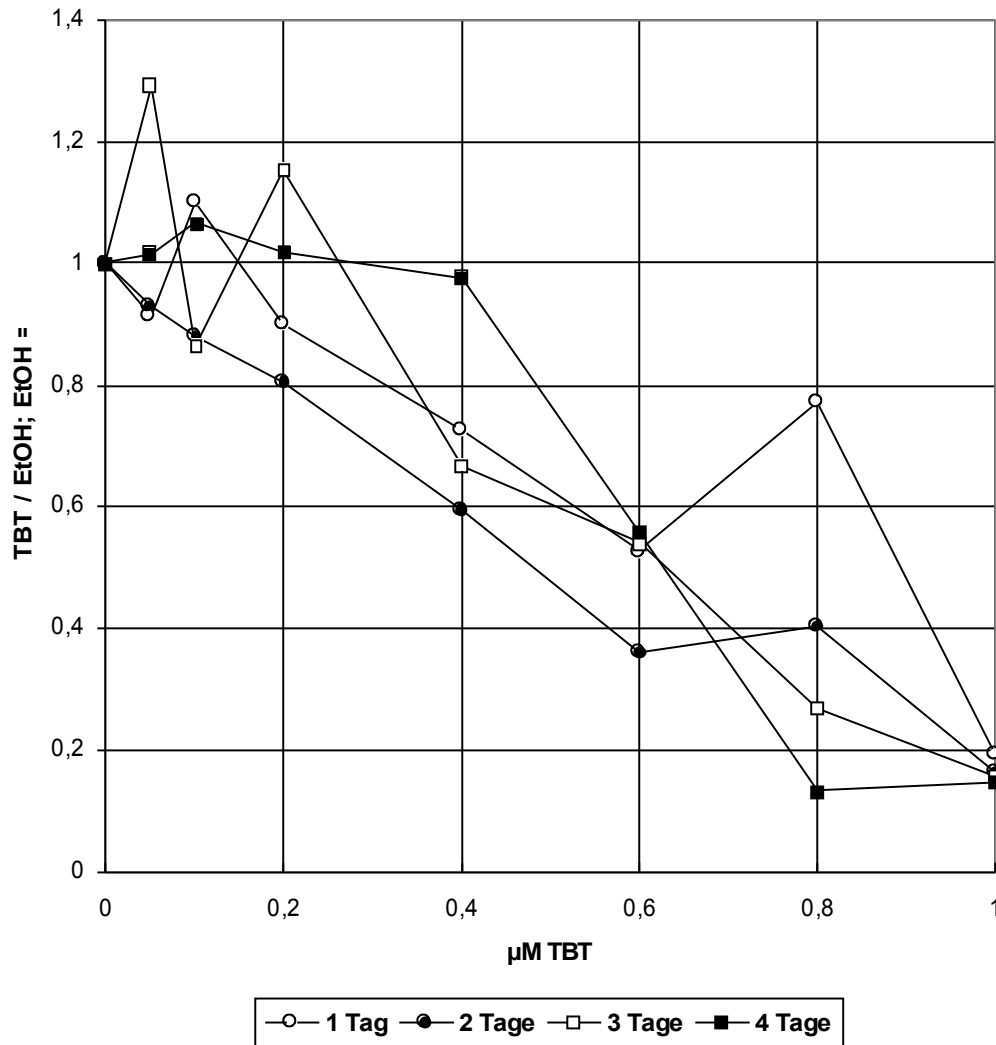


Abb. 8: Relative Vitalität von CC-1-Zellen (TBT)

Aufgetragen sind die Vitalität (ATP Menge in der Probe / ATP Menge in der Leerwertprobe) gegen die TBT- Konzentration. Die einzelnen Graphen beschreiben die Dauer den Inkubation.

5.1.3 Mycoplasmen-Detektion

Bei den durchgeführten Tests auf Mycoplasmen-Kontamination wurde nur DNA angefärbt, welche sich in den Zellkernen der Zellen befand. Das Cytosol sowie der extrazelluläre Raum waren frei von DNA. Die Zellkulturen waren also zu jedem Zeitpunkt frei von Mycoplasmen. Der Metabolismus der Zellen wurde demnach nicht durch eine Kontamination mit Mycoplasmen beeinflusst.

5.2 Wahl des Housekeepinggens als Referenzgen

Housekeepinggene werden konstitutiv exprimiert. Die durch sie codierten Proteine werden von der Zelle für ihr Überleben benötigt. Solche Proteine sind beispielsweise Enzyme der Glykolyse (GAPDH) oder Proteine des Cytoskeletts (BETA-ACTIN). Ziel war es, ein Gen zu finden, welches durch den Einfluss von TPT oder TBT nicht reguliert wird. BETA-ACTIN, GAPDH und PBGD wurden auf ihre dahingehende Eignung getestet.

5.2.1 BETA-ACTIN

Actin ist ein Protein, das in allen eukaryontischen Zellen vorkommt. Es ist Bestandteil des Cytoskeletts und gleichzeitig das häufigste Protein in Eukaryonten. Die verschiedenen Isoformen, von denen eines das BETA-ACTIN ist, unterscheiden sich nur in wenigen Aminosäuren.

Die ct-Werte für BETA-ACTIN lagen bei gleichem cDNA Einsatz zwischen 31 und 37. Diese im Vergleich zu SDH relativ hohen ct-Werte sind Zeichen dafür, dass von den Zellen unter den Versuchsbedingungen sehr wenig mRNA für BETA-ACTIN gebildet wurde. Deshalb war BETA-ACTIN nicht als Housekeepinggene geeignet.

5.2.2 GAPDH

Die Glyzerin-aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ist ein Enzym der Glycolyse, eine Sequenz enzymatischer Reaktionen zum Abbau von Glucose, die sämtlich anaerob ablaufen. Die GAPDH katalysiert die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Diphosphoglycerat. Bei der Reaktion wird ein Phosphatrest gebunden und der entstehende Wasserstoff von NAD^{\oplus} übernommen.

Zur Erstellung einer Standardkurve für GAPDH wurden PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 10^{-6} ng/PCR-Kavität und 0,1 ng/PCR-Kavität aus einer Verdünnungsreihe einer aus reinem Amplifikat bestehenden DNA-Probe angesetzt und die ermittelten ct-Werte gegen die errechnete Ausgangsmenge cDNA aufgetragen. Alle dargestellten Werte geben den Mittelwert aus drei Messwerten wieder. Diese Standardkurve diente zur Ermittlung des cDNA-Ausgangsgehalts des untersuchten Gens GAPDH in 20 ng Gesamt-cDNA.

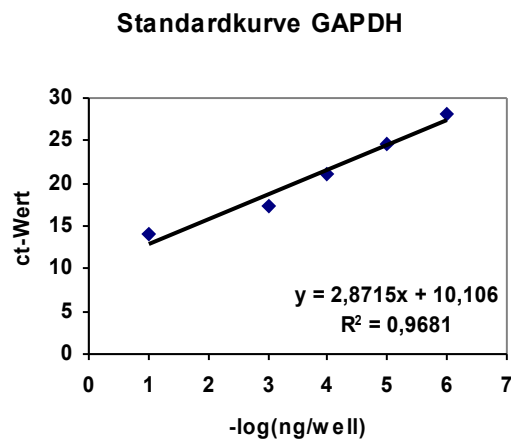


Abb. 9: Abhängigkeit der ct-Werte von der Ausgangsmenge cDNA für die RT-PCR.

Aufgetragen sind der ct-Wert gegen die cDNA Menge umgerechnet in $-\log(\text{ng}/\text{PCR-Kavität})$. Aus der Gleichung der Standardkurve ist ihre Steigung und der Ordinatenabschnitt zu entnehmen.

Mit Hilfe der Standardkurve, mit der Gleichung $y = ax + b$, konnte aus den ct-Werten der einzelnen Proben ihr cDNA-Gehalt berechnet werden. Dazu wurde die Steigung (a) sowie der Ordinatenabschnitt (b) der Standardkurve in folgende Formel eingesetzt.

Ergebnisse

$$c_A = 10^{\frac{ct-b}{-a}}$$

Wobei c_A = cDNA-Ausgangsgehalt und ct = ct-Wert

Der cDNA-Ausgangsgehalt des untersuchten Gens in 20 ng Gesamt-cDNA wurde anhand des Mittelwertes aus drei unabhängigen Ansätzen ermittelt. Für jeden Ansatz wurde der Mittelwert von Triplikaten zugrunde gelegt.

Es ist ersichtlich, dass bereits durch 5 nM TPT die Expression des GAPDH-Gens herunterreguliert wird, weshalb es als Referenzgen nicht geeignet ist.

Daraufhin wurde verzichtet, das Gen auf eine Regulierung der Expression durch TBT zu untersuchen.

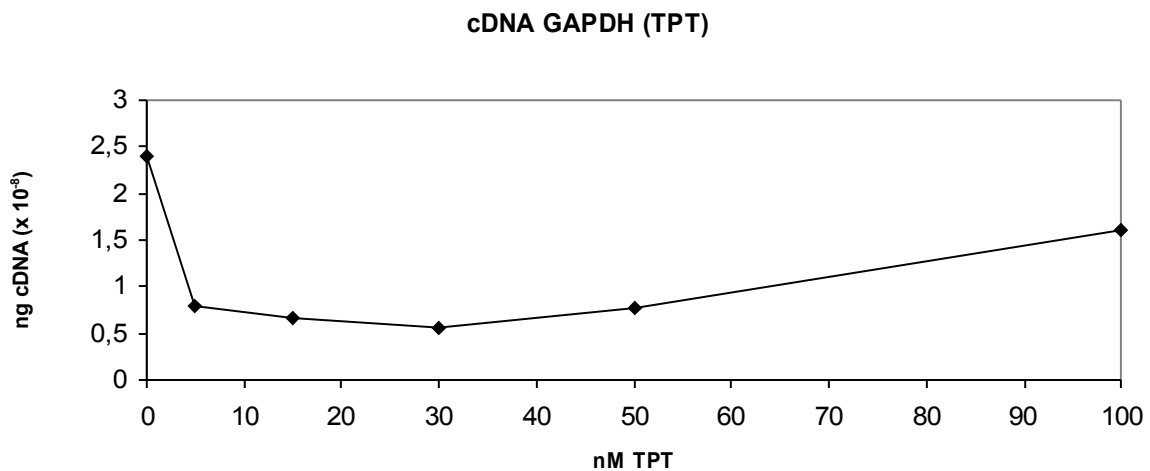


Abb. 10: cDNA-Ausgangsgehalt der GAPDH in 20 ng Gesamt-cDNA

Aufgetragen ist der cDNA-Ausgangsgehalt gegen die TPT-Konzentration, mit der CC1 Zellen 48 Stunden inkubiert wurden.

5.2.3 PBGD

Die Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) ist ein Enzym der Häm synthese. Ausgangspunkt der Häm synthese in den Mitochondrien sind Succinyl-CoA und die

Ergebnisse

Aminosäure Glycin. Die daraus entstehende Amino- β -keto adipinsäure decarboxyliert spontan zur Aminolävulinsäure. Nach Übertritt ins Cytosol kondensieren zwei Moleküle Aminolävulinsäure unter Wasserabspaltung zum Porphobilinogen, einem Pyrrol-Derivat. Die PGBD kondensiert sukzessive drei weitere Porphobilinogen (Ringe B, C und D) unter Ammoniakabspaltung an diesen Ring A, so dass ein Tetrapyrrol-Derivat entsteht. Als Zwischenprodukt tritt dabei das Hydroxymethylbilan auf. Während der vierten Kondensation wird der Ring B gedreht, so dass die Acetyl- und Propionylseitenketten ausgetauscht werden. Durch diese Reaktionen entsteht das Uroporphyrinogen III; daneben entstehen auch geringe Mengen Uroporphyrinogen I, bei dem die Vertauschung der Seitenketten nicht stattgefunden hat. Auf dem Schritt zum Koproporphyrinogen III werden die Carboxylgruppen der Acetylseitenketten durch Decarboxylierung entfernt, so dass Methylgruppen übrig bleiben. Nach Übertritt des Koproporphyrinogen III in das Mitochondrium werden nun auch die Propionylseitenketten der Ringe A und B decarboxyliert und gleichzeitig dehydriert, so dass Vinylseitenketten entstehen (Protoporphyrinogen III). Anschließend wird das Porphyringerüst selbst modifiziert, indem die verbindenden Methylgruppen zu Methingruppen reduziert werden (Protoporphyrin IX). Der Einbau von zweiwertigem Eisen vervollständigt die Hämsynthese.

Die Graphiken (Abb. 11 und 12) zeigen den cDNA-Ausgangsgehalt der PGBD in 20 ng Gesamt-cDNA. Der Berechnung wurde der Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen, für die je der Mittelwert von Triplikaten ermittelt wurde, zugrunde gelegt. Der Versuch wurde dreifach durchgeführt.

Da die Expression von PGBD offensichtlich nicht durch die Inkubation mit TPT oder TBT beeinflusst wird, wurde dieses Gen als Referenzgen gewählt.

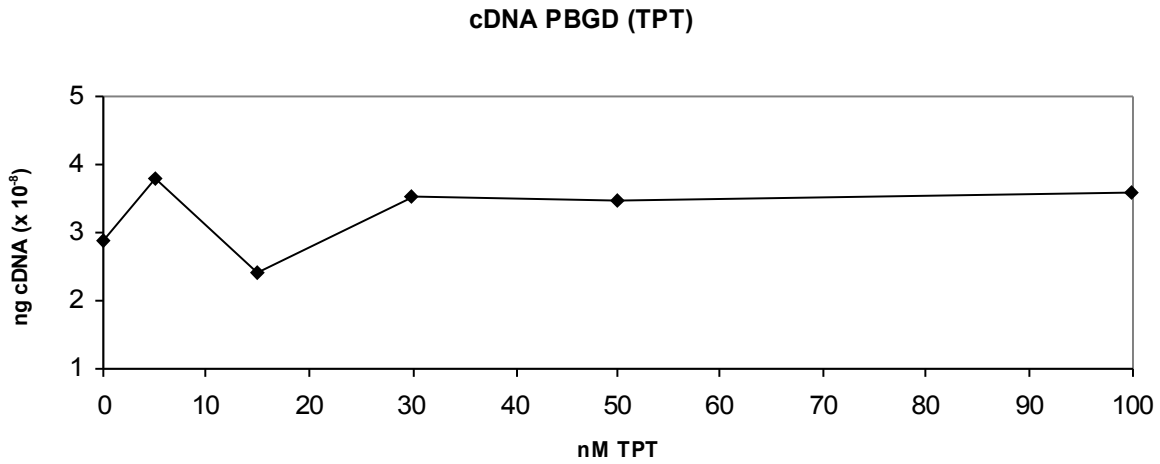
TPT

Abb. 11: cDNA-Ausgangsgehalt der PBGD in 20 ng Gesamt-cDNA

Aufgetragen ist der cDNA-Ausgangsgehalt gegen die TPT-Konzentration, mit der CC1 Zellen 48 Stunden inkubiert wurden.

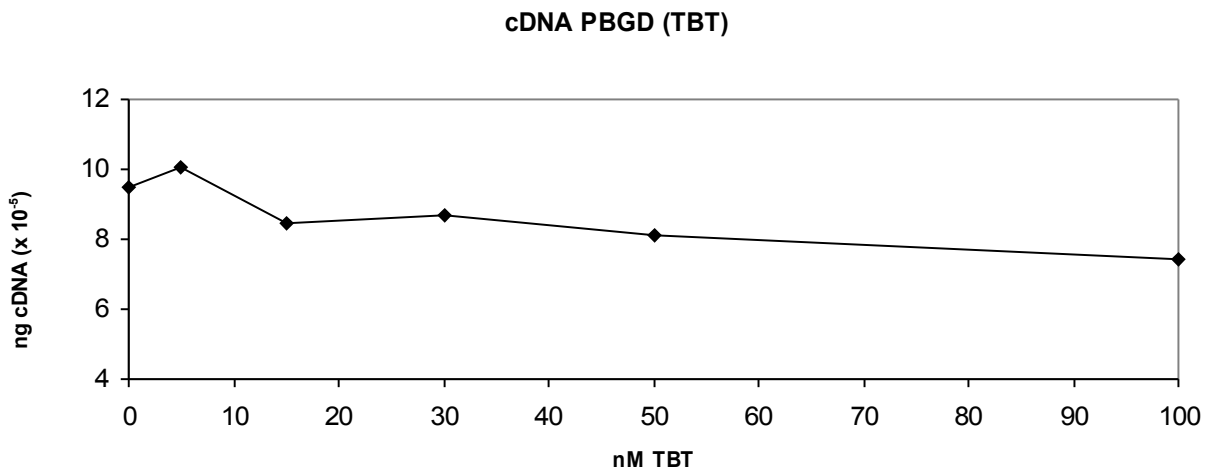
TBT

Abb. 12: cDNA-Ausgangsgehalt der PBGD in 20 ng Gesamt-cDNA

Aufgetragen ist der cDNA-Ausgangsgehalt gegen die TBT-Konzentration, mit der CC1 Zellen 48 Stunden inkubiert wurden.

5.3 Primer-Matrix

Die Primer-Matrix wurde durchgeführt, um eine optimale Amplifikation bei der PCR zu erreichen. Bei dem Versuch werden durch die Anwendung asymmetrischer Primerkonzentrationen eine Veränderung der programmierten Annealing-Temperatur um $\pm 2^\circ\text{C}$ simuliert.

Die Stärke des Fluoreszenzsignals wurde in diesem Fall als Endpunktmessung durchgeführt. Der ΔR_n -Wert sollte möglichst groß bei gleichzeitig möglichst kleinem ct-Wert sein. Dieses zeigt an, dass die Unterschiede im Hybridisierungsverhalten der beiden Primer kompensiert werden. Es zeigte sich, dass sich mit einer Primerkonzentration von je 300 nM für FP und RP gute Ergebnisse erzielen lassen.

5.4 Effizienz-Test

Um die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode anwenden zu dürfen, muss die PCR mit den beiden Primerpaaren (SDH und PBGD) jeweils mit der gleichen Effizienz ablaufen. Mittels des Effizienztests wird getestet, ob diese Vorbedingung erfüllt wird.

Der Logarithmus der eingesetzten Menge von aus mRNA umgeschriebener cDNA wird gegen die Differenz der Zyklenzahlen/den Δct -Werten dargestellt.

Die Effizienz berechnet sich nach der Formel:

$$E = 10^{\frac{-1}{a}}$$

Wobei E = Effizienz und a = Steigung der Regressionsgeraden

Ergebnisse

5.4.1 RT-PCR mit Sonde

Die PCR des SDH Gens verläuft mit einer errechneten Effizienz von 1,94. Die PCR des PBGD Gens mit einer Effizienz von 1,88.

Die graphische Darstellung der Differenz der ct-Werte ergibt eine Gerade mit einer Steigung von -0,161984 mit einer Standardabweichung von 0,067442.

Die Steigung ist auf dem 5% Niveau nicht signifikant verschieden von 0. Somit laufen beide PCRs mit der gleichen Effizienz ab und daher ist die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode anwendbar.

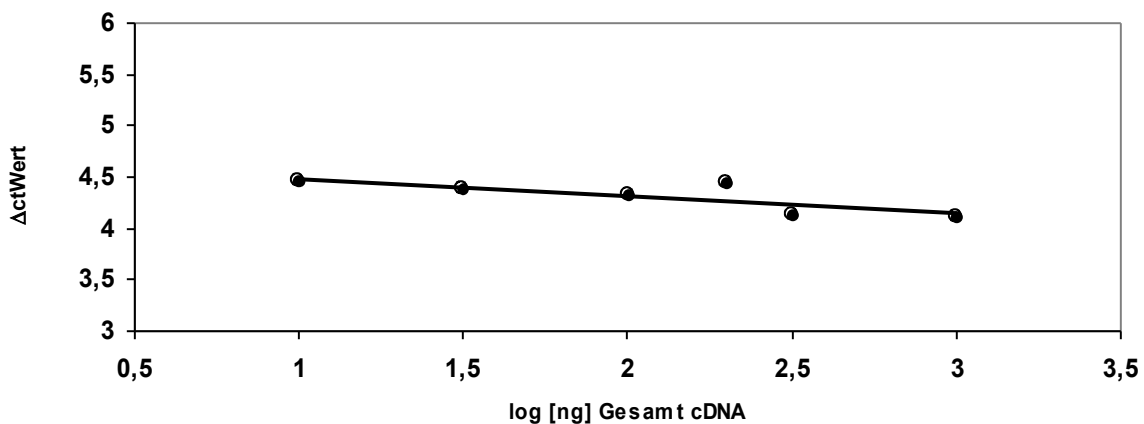


Abb. 13: Effizienztest der SDH- und PBGD-PCRs mit Sonden.

Aufgetragen sind die Δct -Werte gegen die cDNA-Ausgangsmenge. Die Δct -Werte ergeben sich aus der Subtraktion: $\text{ct}_{\text{PBGD}} - \text{ct}_{\text{SDH}}$

5.4.2 RT-PCR mit LUX®- Primern

Die PCR des SDH Gens verläuft mit einer errechneten Effizienz von 1,88. Die PCR des PBGD Gens mit einer Effizienz von 2,04. Bei einer maximalen Effizienz von 2 werden die DNA-Fragmente bei jedem Zyklus verdoppelt.

Die graphische Darstellung der Differenz der ct-Werte ergibt eine Gerade mit einer Steigung -0,412708, mit einer Standardabweichung von 0,589317.

Die Steigung ist auf dem 5% Niveau nicht signifikant verschieden von 0. Somit laufen beide PCRs mit der gleichen Effizienz ab und daher ist die $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode anwendbar.

Ergebnisse

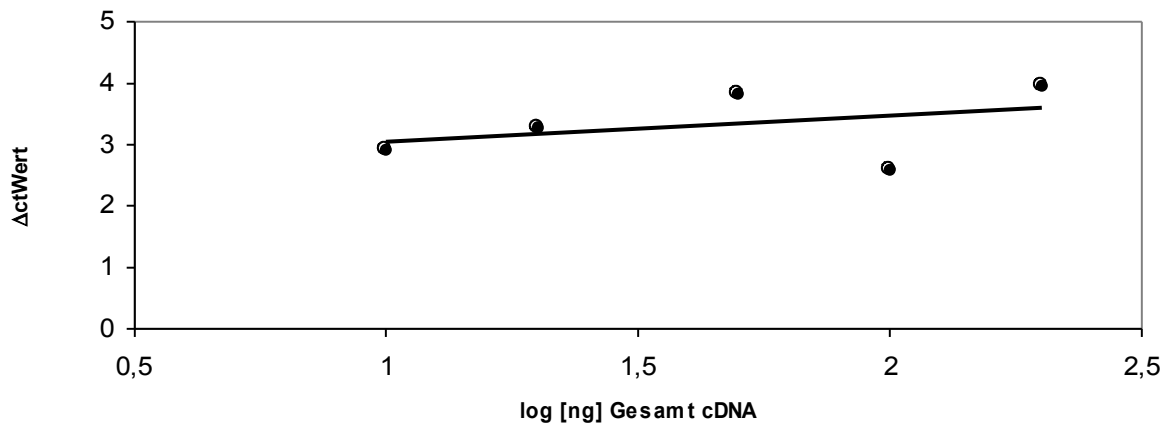


Abb. 14: Effizienztest der SDH- und PBGD-PCRs mit LUX®-Primern.

Aufgetragen sind die Δct -Werte gegen die cDNA-Ausgangsmenge. Die Δct -Werte ergeben sich aus der Subtraktion: $ct_{\text{PBGD}} - ct_{\text{SDH}}$

5.5 PCR mit Sonde

Für die Berechnung des Expressionsunterschiedes ($2^{-\Delta\Delta ct}$ - Wert) wurde jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Ansätzen ermittelt. Für jeden Ansatz wurde der Mittelwert von Triplikaten zugrunde gelegt. Die errechneten Werte wurden gegen die TPT oder TBT Konzentration aufgetragen. In den Abbildungen 15 und 17 ist die relative Expression des SDH-Gens bei Inkubation mit TPT (Abb. 15) und TBT (Abb. 17) graphisch dargestellt.

Die Abbildungen 16 und 18 zeigen die auf denselben Threshold normierten ct-Werte der SDH für die Inkubationsversuche mit TPT (Abb. 16) und mit TBT (Abb. 18).

Dargestellt sind die Ergebnisse der drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche.

Die Fehlerbalken beschreiben jeweils den Maximal- und Minimalwert der relativen Expression des SDH-Gens bzw. des ct-Werts. Der als „Mittelwert“ bezeichnete Graph setzt sich aus den Mittelwerten der drei Versuche zusammen. Dabei wurde für jeder Graphik ein eigener Mittelwertgraph erstellt.

Ergebnisse

Es zeigt sich deutlich, dass die jeweils zu einem Versuch gehörenden Werte sowohl bei der Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode als auch bei dem direkten Vergleich der ct-Werte keine Tendenz zeigen.

Die Expression von SDH wird offensichtlich nicht durch die Inkubation mit TPT oder TBT beeinflusst.

Für den Methodenvergleich wurde mit der cDNA, aus einem der drei unabhängig voneinander durchgeführten Inkubationsansätzen, zusätzlich eine RT-PCR mit LUX[®]-Primern durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Versuches sind über dieselben Formeln berechnet worden und wurden ebenfalls in den Graphiken dargestellt. Hier zeigen sich allerdings große Unterschiede in der relativen Expression der drei Ansätze. Besonders stark sind diese Unterschiede bei der Negativkontrolle und dem Wert für 50 nM TBT. Die minimale relative Expression der Negativkontrolle liegt bei 2,99, wohingegen der Maximalwert bei 10,29 liegt.

Auffällig ist, dass die PCR mit LUX[®]-Primern bei gleichem cDNA-Ausgangsgehalt ein um etwa 3 Zyklen höheren ct-Wert ergibt. Diese relativ zur herkömmlichen RT-PCR hohen ct-Werte bedingen die Schwankungen der $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ - Werte. Der ct-Wert korreliert reziprok mit der Genauigkeit der Ergebnisse.

Inkubation mit TPT

Analyse der Expression des SDH-Gens unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode:

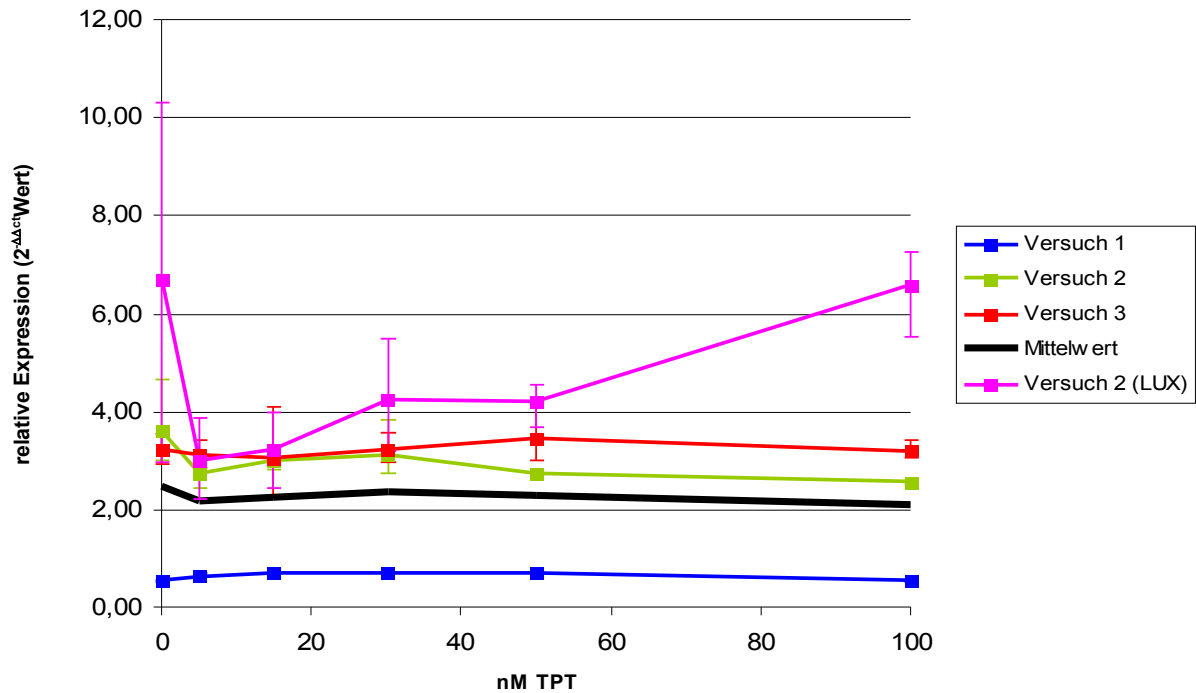


Abb. 15: Abhängigkeit der Expression des SDH Gens in CC1-Zellen von der TPT - Konzentration

Die relative Expression wurde nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode berechnet. Die Balken zeigen die jeweiligen Maximal- und Minimalwerte an. Zur besseren graphischen Darstellung wurde der als „Mittelwert“ bezeichnete Graph hinzugefügt, der sich aus den Mittelwerten der relativen Expression der Versuche 1 bis 3 zusammensetzt.

Analyse der Expression des SDH-Gens durch direkten Vergleich der ct-Werte:

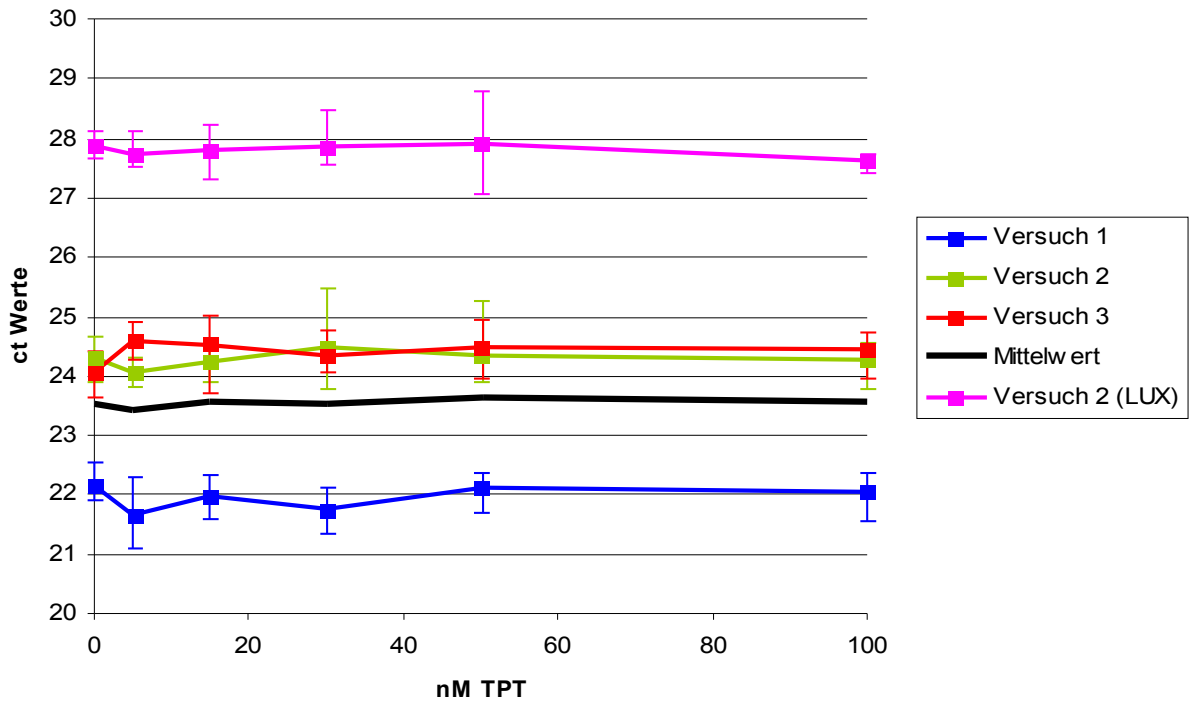


Abb. 16: Abhängigkeit der ct-Werte des SDH Gens in CC1-Zellen von der TPT - Konzentration.

Die ct-Werte wurden auf denselben Threshold normiert, um sie vergleichen zu können. Die Balken zeigen die jeweiligen Maximal- und Minimalwerte an. Zur besseren graphischen Darstellung wurde der als „Mittelwert“ bezeichnete Graph hinzugefügt, der sich aus den Mittelwerten der ct-Werte der Versuche 1 bis 3 zusammensetzt.

Inkubation mit TBT

Analyse der Expression des SDH-Gens unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode:

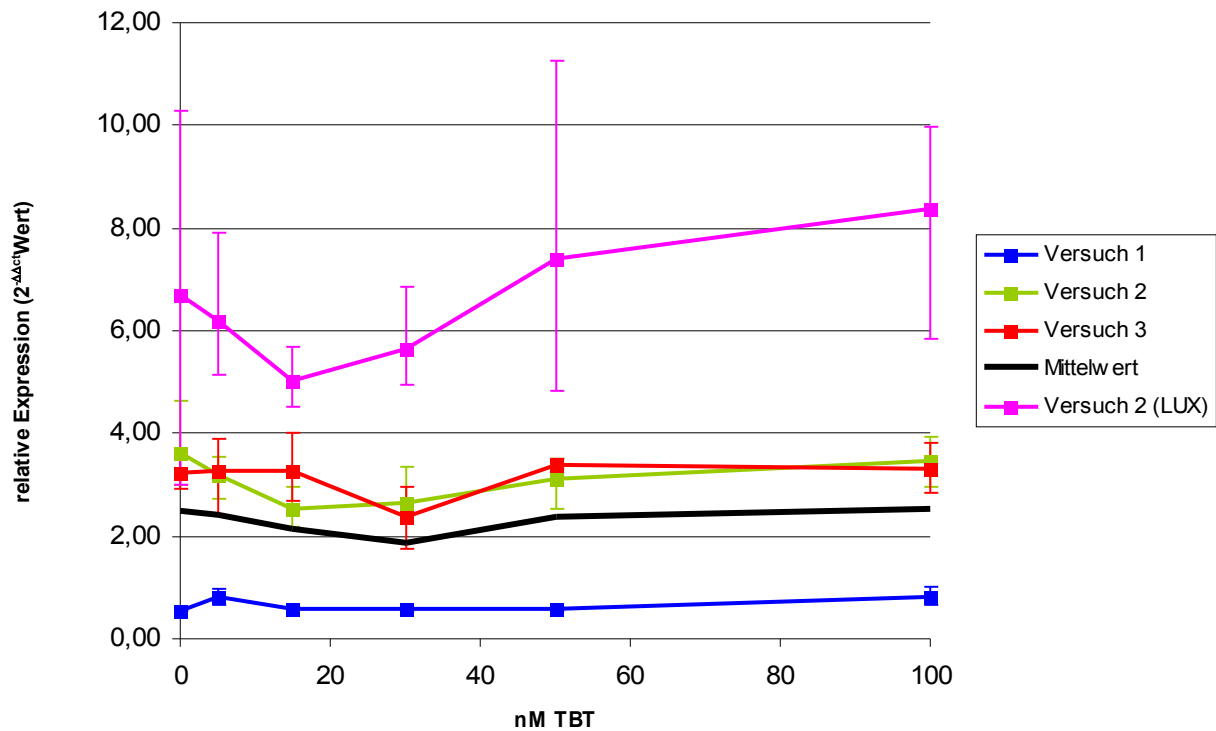


Abb. 17: Abhängigkeit der Expression des SDH Gens in CC1-Zellen von der TBT - Konzentration.

Die relative Expression wurde nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode berechnet. Die Balken zeigen die jeweiligen Maximal- und Minimalwerte an. Zur besseren graphischen Darstellung wurde der als „Mittelwert“ bezeichnete Graph hinzugefügt, der sich aus den Mittelwerten der relativen Expression der Versuche 1 bis 3 zusammensetzt.

Analyse der Expression des SDH-Gens durch direkten Vergleich der ct-Werte:

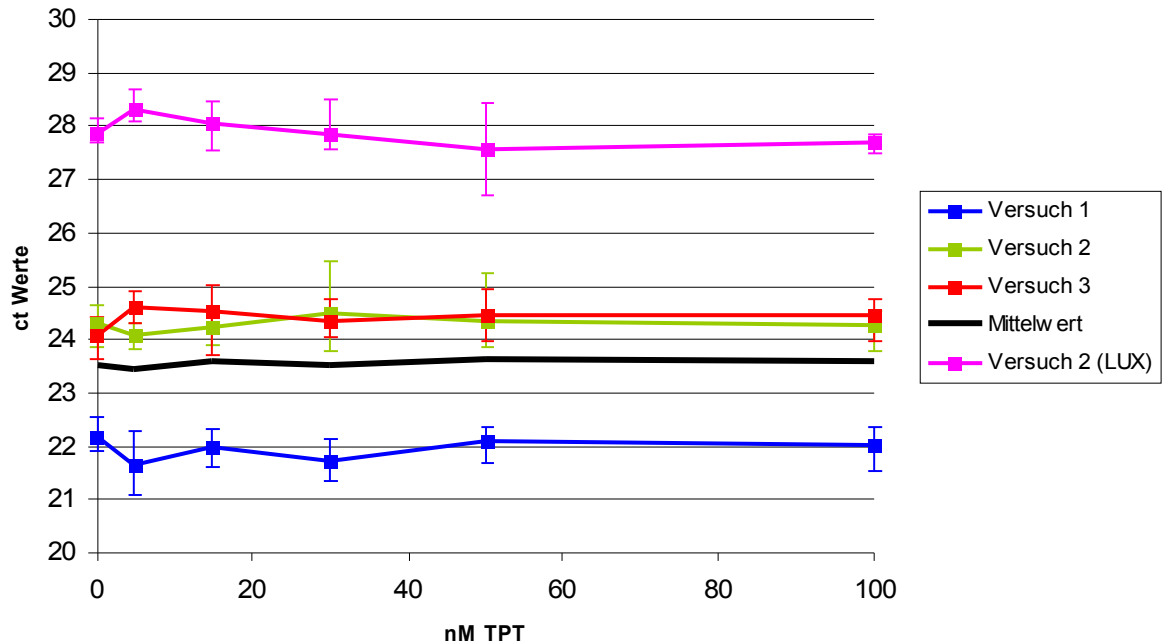


Abb. 18: Abhängigkeit der ct-Werte des SDH Gens in CC1-Zellen von der TBT - Konzentration.

Die ct-Werte wurden auf denselben Threshold normiert, um sie vergleichen zu können. Die Balken zeigen die jeweiligen Maximal- und Minimalwerte an. Zur besseren graphischen Darstellung wurde der als „Mittelwert“ bezeichnete Graph hinzugefügt, der sich aus den Mittelwerten der ct-Werte der Versuche 1 bis 3 zusammensetzt.

5.6 Kosten der PCR

Ein Vergleich zwischen den verschiedenen RT-PCR Methoden beinhaltet auch einen Vergleich der Kosten, die für die einzelnen Methoden anfallen. Verwendet wurden der „Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG“ der Firma Invitrogen, das „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ der Firma Qiagen sowie der „TaqMan Universal PCR Master Mix“ der Firma Applied Biosystems. Bei den verwendeten Primern, die über die Firma Operon bezogen wurden, errechnete sich der Preis aus der Länge der DNA-Oligos, wobei je Base 0,56€ berechnet wurden. Die folgende Tabelle zeigt die Kosten für Primer und Sonden, die jeweils für eine Reaktion anfallen.

Ergebnisse

Tab. 1: Kosten je PCR-Kavität (25 µl Reaktionsvolumen, in €)

Dargestellt sind die Kosten für das Primerpaar, sowie die Kosten für das Primerpaar und die Sonde.

	Primerpaar	Primerpaar + Sonde
SDH	0,0012	0,2277
PBGD	0,0022	0,0895
PBGD (LUX)		0,0147
SDH (Certified LUX® Primer Set)		0,44

Während ein Primerpaar ohne Sonde je Reaktion Kosten von unter 0,01€ verursacht liegen die Kosten für das „SDH (Certified LUX® Primer Set)“ der Firma Invitrogen bei 0,44€ je Reaktion.

Darüber hinaus müssen die für die Mastermixes entstehenden Kosten mitberücksichtigt werden. LUX®-Primer wurden mit dem „Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG“ verwendet, Primerpaare mit dem „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ und der „TaqMan Universal PCR Master Mix“ wurde mit einem Primerpaar und einer Sonde verwendet.

Tab. 2: Kosten je PCR-Kavität (25 µl Reaktionsvolumen, in €)

Dargestellt sind die Kosten für den Mastermix, sowie die Gesamtkosten, abhängig vom jeweilige Gen.

	Mastermix	+ SDH	+ PBGD
TaqMan Universal PCR Master Mix	0,722	0,95	0,81
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	0,786	0,79	0,79
Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG	0,737	1,17	0,75

Bei Verwendung des dem „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ fallen nahezu nur die Kosten für den Mastermix an. Bei der Verwendung von Primern und Sonden sowie LUX®-Primern, fallen je nach Kosten für die Primer niedrigere oder höhere Kosten an. Interessanterweise waren die LUX®-Primer je nach Gen die teuersten sowie die preisgünstigsten.

6 Diskussion

Die Untersuchung biologischer Zusammenhänge kann nur anhand von Modellen untersucht werden. Diese Modelle können nicht die Komplexität der realen Umwelt imitieren, sondern nur Teilaspekte darstellen. Um ein möglichst der Realität entsprechendes Bild zu bekommen, müssen die Ergebnisse aus verschiedenen Modellen / Ansätzen zu einem umfassenden Bild zusammengefügt werden.

Es gibt eine Vielzahl von Modellen. Diese können Lebewesen, Teile von ihnen oder leblos sein. Hier wurde ein lebendes Modell verwendet, da ein für das (Über-)Leben der Zelle wichtiger Vorgang untersucht werden sollte. Die Succinatdehydrogenase ist ein für den Energiehaushalt, und somit für das Leben der Zelle entscheidendes Enzym. Deshalb ist auch die Expression des für die SDH codierenden Genes für die Zelle lebenswichtig.

Das hier verwendete Modell der Rattenleber Zelllinie CC1 wurde verwendet, weil im Rattenleber - Cytosol eine Hemmung der SDH - Aktivität durch TBT bzw. TPT nachgewiesen werden konnte. In Rattenlebermitochondrien bewirken Organozinnverbindungen eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung. Dabei konnte die Wirkung auf die Oxidierung von Succinat durch of 2,4-Dinitrophenol antagonisiert werden (Chandra et a., 1989).

Nun sollte untersucht werden, ob bei der SDH ähnlich wie bei der Aromatase, bei der zusätzlich zur Hemmung der Aktivität eine Aktivierung der RNA - Expression gefunden wurde (Heidrich 2001), eine Regulierung auf der Expressionsebene stattfindet.

6.1 Vitalität

Die verwendeten Konzentrationen müssen unterhalb der toxischen Schwelle liegen. Einen Einfluss von Organozinnverbindungen auf die Expression bei Zellen, die einer für sie toxischen Umgebung ausgesetzt sind, zu entdecken ist irrelevant, da sich Zellen

unter diesen Bedingungen in einer veränderten Stoffwechsellage befinden. Allerdings könnte eine, sich bei toxischen TPT - oder TBT - Konzentrationen entwickelnde, Hemmung der Expression, des für die SDH codierenden Gens, einen Anteil an der Toxizität von Organozinnverbindungen haben.

Obwohl die Vermutung geäußert wurde, dass bei der Seeschnecke *Ciona intestinalis* bereits Konzentrationen von 100 nM TBT für die Biosynthese und den Katabolismus toxisch sein könnten (Azumi et al., 2004), wurde eine maximale Konzentration von 100 nM TPT oder TBT als sicher in dem für Zellen nicht toxischen Bereich liegend gefunden. Die Untersuchung von Saitoh et al, 2001 beschreibt einen sofortigen Zelltod innerhalb von 24 Stunden bei Konzentrationen von über 1000 ng/ml TBT und Konzentrationen von 200 ng/ml TBT als Ursache für die Apoptose der Zellen.

Darüberhinaus verursachen Konzentrationen von 200 nM TBT über 24 Stunden einen signifikanten Verlust der zytotoxischen Funktion Natürlicher Killerzellen (Thomas et al., 2004).

Die gefundenen Ergebnisse über die Toxizität von TPT und TBT widersprechen also nicht den bereits publizierten Ergebnissen.

Die Schwankungen der Kurven der Vitalitätsmessung (Abb. 7 und 8) lassen sich nicht allein damit erklären, dass in den nebeneinander liegenden Zellkulturkavitäten nicht exakt dieselbe Anzahl Zellen ausgesät werden kann. Die Messwerte von drei Parallelansätzen einer Konzentration lagen in der Regel relativ nah beieinander. Eher sind sie auf Schwankungen in den Versuchsbedingungen zurückzuführen. Deutlich lässt sich die Tendenz erkennen, dass mit höherer TPT oder TBT Konzentrationen die Toxizität zunimmt. Bei TPT - oder TBT - Konzentrationen unterhalb von 0,2 µM liegt die Vitalität der Zellen bei über 80%. Bei 0,6 µM liegt die Vitalität nur noch bei etwa 50%. Konzentrationen von 1 µM reduzieren die Vitalität auf unter 20%.

Allerdings würde eine Veränderung der Expression des für die SDH codierenden Genes sich auch auf die ATP-Menge in den Zellen auswirken. Der CellTiter-Glo™ Cell Viability Assay bestimmt die Zellvitalität anhand der ATP-Menge. Jedoch zeigten die Zellen bis etwa 0,3 µM TPT oder TBT bei mikroskopischer Betrachtung ein normales Aussehen. Bei höheren Konzentrationen veränderten die Zellen ihr Aussehen in eine rundliche Form und sie bildeten keinen festen Zellrasen mehr auf dem Boden der

Zellkulturschale. Dieser grobe Anhalt für die Vitalität zeigt, dass die Zellen zumindest ab einer Konzentration von 0,3 μM TPT oder TBT in ihrer Vitalität bereits stark eingeschränkt waren.

Da die Steigung des Graphen zur Konzentrationsabhängigkeit der Vitalität von den TBT- oder TPT-Konzentrationen bis 0,2 μM nahezu null ist, die Vitalität in diesem Konzentrationsbereich über 80% liegt und ein starker Abfall der Vitalität erst bei höheren Konzentrationen auftritt, wurde 0,2 μM TPT bzw. TBT als toxischer Grenzwert ermittelt. Bei früheren Untersuchungen wurde ein Einfluss von Organozinnverbindungen auf die mRNA-Expression des CYP19-Gens schon bei sehr geringen Konzentrationen, unter 100 nM TPT oder TBT, (Heidrich, 2001) festgestellt. Aus diesem Grunde und weil die Verfälschung der Ergebnisse durch einen toxischen Einfluss sicher ausgeschlossen werden sollte, wurde für die Untersuchung der mRNA-Expression eine maximale Konzentration von 0,1 μM TPT oder TBT verwendet.

Um bei den Versuchen eine langfristige Wirkung von Organozinnverbindungen zu simulieren, wurde eine Inkubationsdauer von 48 Stunden festgelegt. In der Umwelt kommen eher chronische als akute Intoxikationen mit Organozinnverbindungen vor, da Organozinnverbindungen nahezu ubiquitär vorkommen. Die von anderen Arbeitsgruppen verwendeten Inkubationszeiten schwanken zwischen 24 und 48 Stunden (Fent et al., 1998; Leung et al., 2004; Parfett et al., 2000; Saitoh et al., 2001).

Bei der Konzipierung der Versuche wurde angenommen, dass die Konzentrationen der Organozinnverbindungen nicht durch Metabolisierung in den Zellen verändert, wurde. Einerseits wird die für den Abbau notwendige Monooxygenase durch Organozinnverbindungen gehemmt und andererseits wurde bei der Suche nach einem geeigneten Housekeepinggene eine Hemmung der GAPDH mRNA Expression durch TPT festgestellt. Ein Abbau der Organozinnverbindungen hätte diesen Effekt verdeckt. Eine andere Möglichkeit wäre, dass durch Organozinnverbindungen die Expression dauerhaft verändert wird. In diesem Falle wäre die effektive Konzentration am Ende der Versuche uninteressant, dann wäre aber auch der Zeitpunkt des Versuchendes unerheblich.

Aus diesen Gründen kann, bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden, eine gültige Aussage, über die Wirkung von Organozinnverbindungen, auf die Expression der für die Succinatdehydrogenase (SDH) codierenden mRNA, getroffen werden.

6.2 Referenzgen und Kalibrator

Ziel dieser Untersuchung war es, ein geeignetes Referenzgen zu finden, dessen Expression nicht durch Inkubation mit TPT oder TBT beeinflusst wird.

Mit PBGD wurde ein Gen ermittelt, das diese Bedingungen erfüllt. Zwar schwankten die absoluten mRNA Mengen, die bei der quantitativen PCR ermittelt wurden. Allerdings zeigte sich keine Tendenz, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Expression des PBGD-Gens durch TPT und TBT weder aktiviert noch gehemmt wird. Allerdings wurde in derselben Arbeitsgruppe nach Abschluss der Versuche eine Hemmung der Expression des PBGD-Gens durch TPT bei einer anderen Zelllinie festgestellt (mündliche Mitteilung). Ein Vergleich der Rohdaten, also der ct-Werte, zeigte sowohl bei der RT-PCR, die zur Suche nach dem Housekeepinggene durchgeführt wurde, als auch bei der RT-PCR zur Untersuchung der SDH - Genexpression keine Veränderung in der PBGD - cDNA - Menge.

Mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Expressionsanalyse des PBGD-Gens, könnten in der sich unterscheidenden Sensibilität von Rattenleberzellen und menschlichen Chorionzellen auf Organozinnverbindungen liegen. Während es eine der Aufgaben der Leber ist, die verschiedensten Giftstoffe zu metabolisieren, bilden Chorionzellen die Chorionzotten, die sich in die Gebärmutterschleimhaut einsenken und so den fetalen Teil der Plazenta bilden. Über die Chorionzotten wird der Stoffaustausch mit der Mutter gewährleistet.

So könnte durch eine verstärkte Expression des Multi-Drug-Resistance-Gens-1 (MDR1) eine verstärkte Bildung eines P170-Glykoproteins, welches als transmembranes Transportprotein eine Effluxpumpe darstellt, erfolgen. Dieser Vorgang des aktiven Transports aus der Zelle heraus, stellt eine der häufigsten Ursachen für eine Mehrfachresistenz dar (Mutschler, 1997; Bosch et al., 1996).

Unter dieser Voraussetzung ist es denkbar, dass bei der (lebenden Zelllinie) CC1 in subtoxischen Konzentrationen von TPT und TBT diese Substanzen durch das P170-Glykoprotein umgehend wieder aus der Zelle ausgeschleust wird. Dies könnte erklären, dass kein Effekt dieser Substanzen unter den gewählten Bedingungen beobachtet werden konnte. Somit könnten sich die Ergebnisse erklären lassen, dass weder die PBGD noch die SDH bei Inkubation mit Organozinnverbindungen reguliert werden.

Widersprüchlich dazu ist allerdings die ermittelte Herunterregulierung des GAPDH-Gens. Da eine mögliche Regulierung des Genes ein Ausschlusskriterium war, wurde dieser Versuch jedoch nur einfach durchgeführt, so dass es sich dabei durchaus um einen Effekt von im nachhinein nicht mehr zu ermittelnden Einflüssen handeln könnte wie beispielsweise eine zu groß gemessene Menge an cDNA in der Leerprobe. Die Wirkung der Organozinnverbindungen auf die Expression des GAPDH-Gens bedarf weiterer Abklärung.

Das Housekeepinggene dient als endogene Referenz für die Expression. Da seine Expression durch TPT und TBT nicht verändert wird, ist sie ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Zellen und wird zur Standardisierung der RT-PCR verwendet. Bei der Suche nach einem geeigneten Housekeepinggene wurden die absoluten das Gen codierende mRNA - bzw. cDNA - Mengen miteinander verglichen.

Eine weitere Referenz ist der Kalibrator, der bei jeder RT-PCR mitgeführt wird und immer aus derselben Probe besteht. Die Anforderungen für eine als Kalibrator verwendete Probe sind relativ gering. Vor allem muss eine ausreichend große Menge vorhanden sein. Darüberhinaus sollten die zu untersuchenden Gene in ausreichender Konzentration vorhanden sein. In diesem Falle die Gene von PBGD und SDH.

Der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Wert gibt die relative Menge an SDH mRNA bezogen auf PBGD und den Kalibrator an. Er macht so die SDH mRNA-Expression jeder Probe miteinander direkt vergleichbar und ermöglicht es, auf eine auf jeder PCR-Platte durchgeführte Verdünnungsreihe verzichten zu können. Allerdings ergibt dieselbe Probe bei wiederholter RT-PCR unterschiedliche $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Werte. Das liegt an der exponentiellen Amplifikation der DNA bei der RT-PCR und der damit verbundenen Sensibilität, kleinste DNA - Mengen detektieren zu können. Es werden somit auch kleine Unterschiede erfasst. Diese kleinen Unterschiede der cDNA - Mengen in den jeweils zwei zu einer

Probe bzw. dem Kalibrator gehörenden Ansätzen bewirken die Veränderung des $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Wertes. Dabei konnte allerdings auch der Kurvenverlauf nur annähernd reproduziert werden. Das wird deutlich bei einer Wiederholung des zweiten Versuchansatzes unter Verwendung von LUX[®]-Primern.

6.3 Wirkung von Organozinnverbindungen auf die Expression des SDH-Gens

Eine Untersuchung des Einflusses von Organozinnverbindungen auf die Expression des SDH - Gens ist bislang noch nicht durchgeführt worden.

Die Untersuchung der Genexpression bei der Seeschnecke *Ciona intestinalis* zeigt, dass TBT eine Hochregulierung der Expression vor allem bei Genen die Proteine für die Stressantwort und die Detoxifikation codieren verursacht. Darunter waren Gene, die für Enzyme codieren, die die Oxidoreduktionen katalysieren (Azumi et al., 2004).

Die Succinatdehydrogenase katalysiert eine Oxidoreduktion, die Veröffentlichung von Azumi et al., 2004 beschreibt nur Enzymgruppen die einer veränderten Genexpression unterliegen, nicht aber einzelne Enzyme, so dass diese Veröffentlichung nicht unbedingt ein Widerspruch zu den hier ermittelten Ergebnissen darstellt.

Wir konnten zeigen, dass offensichtlich die Organozinnverbindungen Triphenylzinn (TPT) und Tributylzinn (TBT) nicht die Expression des für die Succinatdehydrogenase codierende Gens beeinflussen. Möglicherweise gilt diese Aussage nur für Rattenleberzellen der Zelllinie CC1. Für diesen Zelltyp konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Referenzgens (PBGD) ebenfalls nicht beeinflusst wird. Entsprechend der Erörterung zur Vitalität ist auch für diesen Befund die Aktivität des P170-Glykoproteins als möglicher Grund annehmbar.

Die beiden zur Auswertung der Versuche angewendeten Methoden, der direkte Vergleich der ct-Werte sowie die $\Delta\Delta ct$ -Methode ergeben gleiche Ergebnisse.

Für dieses Hormon wird ein Regelkreis postuliert, wobei eine Enzymhemmung eine konsekutive Aktivierung der Expression des entsprechenden Gens bewirkt.

6.4 Vergleich zwischen LUX[®]-Primern und herkömmlicher TaqMan PCR

Ein Vergleich der beiden RT-PCR Methoden wurde bislang nicht publiziert.

Die Verwendung von LUX[®]-Primern erfordert dieselbe Aufmerksamkeit wie eine herkömmliche TaqMan PCR.

Durch die Verwendung von „Certified LUX[®] Primer Set's“ erübrigt sich die Wahl eines passenden Primers. Gleichzeitig erfolgt die Wahl eines geeigneten Primers für eine beliebige DNA-Sequenz über das auf der Website der Firma Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) zur Verfügung gestellte Suchprogramm komplikationslos und schnell.

Die PCR erfolgt mit LUX[®]-Primern so effizient wie bei Verwendung herkömmlicher Primer. Die Ursache für die bei den Versuchen ermittelten höheren ct-Werte, die bei Normierung auf den gleichen Threshold entstehen bleibt ungeklärt. Bei Verwendung der LUX[®]-Primer wurde ein geringerer Primereinsatz von 0,2 µM verwendet gegenüber 0,3 µM bei Sonden PCR. Dieser Unterschied sollte allerdings nur Auswirkung auf die Signalthöhe des Sättigungsbereichs, aber nicht auf den ct-Wert haben. Sogar der Kallibrator der in allen Versuchen aus der selben Probe bestand erreichte einen höheren ct-Wert, und in späteren Versuchen bei Sonden PCR wieder einen niedrigeren, so dass auch das Alter der Proben und damit ein möglicher Abbau von cDNA unter den Lagerungsbedingungen nicht als Ursache identifiziert werden konnte.

Einen Vorteil bei der Zusammenstellung der für die PCR notwendigen Reagenzien bieten die LUX[®]-Primer nicht, da für einen am Ende der RT-PCR durchgeführten Vergleich der gebildeten DNA zusätzlich ROX (passive reference dye) hinzugegeben werden muss. Dieses liegt jedoch an der Tatsache, dass dem „Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG“ der Firma Invitrogen ROX hinzugefügt werden muss, während „TaqMan Universal PCR Master Mix“ und „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“ dieses Reagenz schon beinhalten. Weiterhin schlugen die Versuche der Verwendung von

LUX[®]-Primern mit den beiden anderen Mastermixes der Firmen Qiagen und Applied Biosystems fehl.

Daraus ergibt sich ein Nachteil der LUX[®]-Primer gegenüber der TaqMan-Methode. Während herkömmliche Primer universell auch für nicht quantitative PCRs einsetzbar sind oder qPCRs entweder unter Verwendung einer entsprechenden mit einem fluorogenen Farbstoff markierten Sonde oder ohne Sonde, aber mittels eines interkallierenden Farbstoffes, sind LUX[®]-Primer auf die eine gewählte Anwendung beschränkt.

Während die selbst erstellten LUX[®]-Primer die preisgünstigsten der verwendeten Primer waren, waren die von Invitrogen angebotenen Primer des „Mouse/Rat SDHA-Certified LUX[®] Primer Set's“ die teuersten. Dieses Primerpaar war etwa doppelt so teuer wie das entsprechende Primerpaar mit Sonde für die herkömmliche RT-PCR.

Beide Methoden die der herkömmlichen Sonden-Analyse sowie die Analyse unter Verwendung von LUX[®]-Primern bieten Vor- und Nachteile. Zusätzlich konnten keine klaren Vorteile einer Methode identifiziert werden, so dass beide Methoden als gleichwertig betrachtet werden können.

7 Zusammenfassung

Die Expression der für die Succinatdehydrogenase und die Porphobilinogen-Desaminase codierenden Gene wird nicht durch die Organozinnverbindungen Triphenylzinn und Tributylzinn beeinflusst.

Dahingegen ist die Beeinflussung der Expression des Gens, das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase codiert fraglich und bedarf weiterer Abklärung.

Der für die Aromatase postulierte Regelkreis mit Hemmung des Enzyms und konsekutiver Aktivierung der Expression des entsprechenden Gens kann so nicht auf die Succinatdehydrogenase übertragen werden.

Der Vergleich der beiden RT-PCR Methoden unter Verwendung von LUX[®]-Primer oder herkömmlicher Sonden-PCR erbrachte keinen klaren Vorteil für eine der Methoden. Sie können als gleichwertig betrachtet werden.

8 Anhang

Tabellen der ermittelten ct- Werte normiert auf denselben Threshold, und deren Umrechnung in die $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte nach der Formel:

$$X_{N,kal} = 2^{-((ct_{SDH,x} - ct_{PBGD,x}) - (ct_{SDH,kal} - ct_{PBGD,kal}))}$$

Tab. 3: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 1 (Sonde)

Bei den mit „Fehler“ bezeichnete Proben war ein Problem aufgetreten, so dass sie nicht ausgewertet werden konnten. Die in Anführungsstrichen stehenden ct-Werte waren Ausreißer.

Platte 1		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	35,85	36,79	37,75	36,80	40	40	40	40					
	Kal	22,04	22,01	21,95	22,00	24,9	24,6	24,87	24,79	-2,79	0,00	1,00		
5 nM TPT	A11.1	21,18	21,09	21,23	21,17	23,13	23,33	23,34	23,27	-2,10	0,69	0,62		
	A12.1	21,76	22,28	22,04	22,03	24,12	24,13	24,07	24,11	-2,08	0,71	0,61		
	A13.1	21,45	22	21,8	21,75	24,05	24	24,09	24,05	-2,30	0,49	0,71		
15 nM TPT	A21.1	22,34	22,17	22,16	22,22	24,4	24,39	24,39	24,39	-2,17	0,62	0,65		
	A22.1	Fehler												
	A23.1	22,01	21,66	21,6	21,76	24,22	24,19	24,18	24,20	-2,44	0,35	0,78		
30 nM TPT	A31.1	21,6	21,36	21,36	21,44	23,82	23,78	23,57	23,72	-2,28	0,51	0,70		
	A32.1	21,78	21,48	22,02	21,76	24,07	24,14	24,02	24,08	-2,32	0,47	0,72		
	A33.1	21,88	22,13	22,07	22,03	24,26	24,12	24,64	24,34	-2,31	0,48	0,72		
50 nM TPT	A41.1	22,36	21,74	22,27	22,12	24,35	24,53	24,66	24,51	-2,39	0,40	0,76		
	A42.1	22,28	22,23	22,01	22,17	24,31	24,14	24,24	24,23	-2,06	0,73	0,60		
	A43.1	22,28	"20,46"	21,7	21,99	24,32	24,38	24,35	24,35	-2,36	0,43	0,74		
Platte 2		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40					
	Kal	22,56	22,22	22,4	22,39	25,59	25,01	25,26	25,29	-2,89	0,00	1,00		
100 nM TPT	A51.1	21,96	21,54	22,09	21,86	24,05	23,9	23,98	23,98	-2,11	0,78	0,58		
	A52.1	21,97	22,03	22,12	22,04	24,02	23,97	24,09	24,03	-1,99	0,91	0,53		
	A53.1	22,36	22,26	22,05	22,22	24,21	24,25	24,36	24,27	-2,05	0,84	0,56		
EtOH	A61.1	22,15	22,09	22,01	22,08	24,08	24,1	24,02	24,07	-1,98	0,91	0,53		
	A62.1	22,56	22,26	22,17	22,33	24,36	24,36	24,45	24,39	-2,06	0,83	0,56		
	A63.1	22,27	21,91	22,12	22,10	24,05	24,13	24,19	24,12	-2,02	0,87	0,55		
5 nM TBT	B11.1	Fehler												
	B12.1	22,64	22,54	22,93	22,70	24,91	25,03	24,98	24,97	-2,27	0,62	0,65		
	B13.1	22,82	22,55	21,8	22,39	25,16	25,23	25,28	25,22	-2,83	0,06	0,96		
15 nM TBT	B21.1	22,8	23,23	23,08	23,04	25,22	25,23	25,25	25,23	-2,20	0,70	0,62		
	B22.1	Fehler												
	B23.1	23,23	23,28	22,99	23,17	25,26	25,25	25,36	25,29	-2,12	0,77	0,59		
30 nM TBT	B31.1	22,76	22,48	22,1	22,45	24,53	"23,04"	24,51	24,52	-2,07	0,82	0,57		
Platte 3		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40					
	Kal	22,25	22,46	22,85	22,52	25,29	25,1	25,35	25,25	-2,73	0,00	1,00		
30 nM TBT	B32.1	22,25	22,37	22,36	22,33	24,33	24,37	24,23	24,31	-1,98	0,74	0,60		
	B33.1	23,12	23,01	23,19	23,11	25,05	24,96	24,97	24,99	-1,89	0,84	0,56		

50 nM TBT	B41.1	22,86	22,84	22,84	22,85	24,65	24,65	24,66	24,65	-1,81	0,92	0,53
	B42.1	23	22,84	22,63	22,82	24,84	24,7	24,78	24,77	-1,95	0,78	0,58
	B43.1	22,93	22,63	22,56	22,71	24,74	24,71	24,73	24,73	-2,02	0,71	0,61
100 nM TBT	B51.1	22,49	22,44	22,23	22,39	24,53	24,52	24,6	24,55	-2,16	0,56	0,68
	B52.1	22,59	22,57	22,55	22,57	24,78	25,07	25,04	24,96	-2,39	0,33	0,79
	B53.1	22,38	22,39	22,64	22,47	24,72	25,96	24,99	25,22	-2,75	-0,03	1,02

Tab. 4: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 2 (Sonde)

Platte 1		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,21	22,06	22,21	22,16	24,84	24,7	24,86	24,80	-2,64	0,00	1,00		
5 nM TPT	A11.2	23,86	23,83	23,86	23,85	28,07	27,87	27,99	27,98	-4,13	-1,49	2,80		
	A12.2	24	24,23	24,15	24,13	27,57	28,32	28,27	28,05	-3,93	-1,29	2,44		
	A13.2	24,24	24,31	24,22	24,26	28,4	28,5	28,46	28,45	-4,20	-1,56	2,94		
15 nM TPT	A21.2	24,46	24,15	24,13	24,25	28,35	28,42	28,36	28,38	-4,13	-1,49	2,81		
	A22.2	24,53	24,39	24,07	24,33	28,56	28,57	28,85	28,66	-4,33	-1,69	3,23		
	A23.2	24,45	23,9	24,03	24,13	28,48	28,26	28,32	28,35	-4,23	-1,59	3,00		
30 nM TPT	A31.2	24,08	23,79	24,23	24,03	28,25	28,43	27,79	28,16	-4,12	-1,48	2,80		
	A32.2	24,31	24,17	24,23	24,24	28,77	28,76	28,9	28,81	-4,57	-1,93	3,82		
	A33.2	25,18	25,47	25,01	25,22	29,22	29,1	29,61	29,31	-4,09	-1,45	2,73		
50 nM TPT	A41.2	23,94	24	24,11	24,02	28,17	28,12	28,03	28,11	-4,09	-1,45	2,73		
	A42.2	25,26	24,9	25,05	25,07	29,32	29,09	29,19	29,20	-4,13	-1,49	2,81		
Platte 2		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,35	22,34	22,48	22,39	24,89	25,14	25,29	25,11	-2,72	0,00	1,00		
50 nM TPT	A43.2	23,93	24,06	23,87	23,95	28,05	28,2	28,09	28,11	-4,16	-1,44	2,72		
100 nM TPT	A51.2	23,79	24,14	23,99	23,97	28,05	28,07	28,07	28,06	-4,09	-1,37	2,59		
	A52.2	24,35	24,55	24,47	24,46	28,41	28,58	28,51	28,50	-4,04	-1,33	2,51		
	A53.2	24,27	24,4	24,37	24,35	28,48	28,19	28,58	28,42	-4,07	-1,35	2,56		
EtOH	A61.2	24,61	24,65	24,33	24,53	28,83	28,99	29,02	28,95	-4,42	-1,70	3,25		
	A62.2	23,87	24,13	24,57	24,19	28,64	28,4	28,43	28,49	-4,30	-1,58	3,00		
	A63.2	24,2	24,34	24,18	24,24	29,16	29,13	29,22	29,17	-4,93	-2,21	4,64		
5 nM TBT	B11.2	24,58	25,02	24,83	24,81	29,44	29,24	29,37	29,35	-4,54	-1,82	3,54		
	B12.2	25,09	25,49	25,02	25,20	29,7	29,6	29,63	29,64	-4,44	-1,73	3,31		
	B13.2	24,98	25,03	24,81	24,94	28,75	29,08	29,48	29,10	-4,16	-1,45	2,73		
15 nM TBT	B21.2	24,92	24,98	24,5	24,80	29,07	29,16	29,01	29,08	-4,28	-1,56	2,96		
Platte 3		ct-Wert (SDH)				Ø	ct- Wert (PBGD)				Ø	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,5	22,02	22,87	22,46	24,98	24,79	25,19	24,99	-2,52	0,00	1,00		
15 nM TBT	B22.2	24,82	24,43	24,42	24,56	28,32	28,15	28,17	28,21	-3,66	-1,13	2,19		
	B23.2	25,3	25,43	25,12	25,28	29,12	28,94	29,19	29,08	-3,80	-1,28	2,42		
30 nM TBT	B31.2	25,23	24,83	25	25,02	29,5	29,19	29,17	29,29	-4,27	-1,74	3,35		
	B32.2	25,17	24,73	24,68	24,86	28,65	28,78	28,31	28,58	-3,72	-1,20	2,29		
	B33.2	24,74	25,03	25,13	24,97	28,8	28,61	28,7	28,70	-3,74	-1,21	2,32		
50 nM TBT	B41.2	24,46	24,42	24,37	24,42	28,19	28,49	28,19	28,29	-3,87	-1,35	2,55		
	B42.2	24,51	24,34	24,4	24,42	28,61	28,64	28,76	28,67	-4,25	-1,73	3,32		
	B43.2	24,57	24,29	24,57	24,48	28,84	28,78	28,79	28,80	-4,33	-1,80	3,49		
100 nM TBT	B51.2	24,59	24,54	25,11	24,75	29,23	29,3	29,19	29,24	-4,49	-1,97	3,92		
	B52.2	24,71	24,41	24,84	24,65	28,67	29,12	29,11	28,97	-4,31	-1,79	3,46		
	B53.2	24,76	24,7	24,41	24,62	28,7	28,75	28,71	28,72	-4,10	-1,57	2,98		

Tab. 5: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 3 (Sonde)

Bei den mit „Fehler“ bezeichnete Proben war ein Problem aufgetreten, so dass sie nicht ausgewertet werden konnten.

Platte 1		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,21	22,27	22,09	22,19	24,84	24,44	25,07	24,78	-2,59	0,00	1,00	
5 nM TPT	A11.3	24,92	24,78	24,73	24,81	29,06	28,93	29,14	29,04	-4,23	-1,64	3,12	
	A12.3	24,36	24,67	24,29	24,44	28,7	28,99	28,75	28,81	-4,37	-1,78	3,43	
	A13.3	24,43	24,81	24,42	24,55	28,78	28,43	28,78	28,66	-4,11	-1,52	2,86	
15 nM TPT	A21.3	24,76	24,81	25,03	24,87	28,54	28,8	28,58	28,64	-3,77	-1,18	2,27	
	A22.3	24,85	24,6	23,7	24,38	28,95	29,03	29,04	29,01	-4,62	-2,03	4,08	
	A23.3	24,59	24,29	24,12	24,33	28,37	28,42	28,36	28,38	-4,05	-1,46	2,74	
30 nM TPT	A31.3	24,77	24,43	24,77	24,66	28,83	29,22	29,21	29,09	-4,43	-1,84	3,57	
	A32.3	24,07	24,26	24,12	24,15	28,29	28,29	28,37	28,32	-4,17	-1,57	2,98	
	A33.3	24,05	24,14	24,51	24,23	28,29	28,57	28,63	28,50	-4,26	-1,67	3,18	
50 nM TPT	A41.3	24,69	24,95	24,76	24,80	29,15	28,81	29,3	29,09	-4,29	-1,69	3,23	
	A42.3	24,14	23,96	24,64	24,25	28,69	29,04	28,98	28,90	-4,66	-2,06	4,18	
Platte 2		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,39	22,32	22,64	22,45	24,92	24,79	24,89	24,87	-2,42	0,00	1,00	
50 nM TPT	A43.3	24,43	24,41	24,28	24,37	28,29	28,5	28,36	28,38	-4,01	-1,59	3,02	
100 nM TPT	A51.3	24,54	24,35	24,54	24,48	28,66	28,6	28,75	28,67	-4,19	-1,78	3,43	
	A52.3	24,15	24,32	23,96	24,14	28,17	28,16	28,34	28,22	-4,08	-1,66	3,17	
	A53.3	24,71	24,75	24,63	24,70	28,64	28,7	28,8	28,71	-4,02	-1,60	3,03	
EtOH	A61.3	24,13	23,63	23,84	23,87	27,88	27,63	27,98	27,83	-3,96	-1,55	2,92	
	A62.3	24,06	24,1	24,22	24,13	28,32	28,16	28,29	28,26	-4,13	-1,71	3,28	
	A63.3	24,11	24,17	24,41	24,23	28,46	28,36	28,6	28,47	-4,24	-1,83	3,55	
5 nM TBT	B11.3	24,68	24,83	24,91	24,81	29,08	29,18	29,29	29,18	-4,38	-1,96	3,89	
	B12.3	24,05	24,21	24,02	24,09	27,76	27,74	27,83	27,78	-3,68	-1,27	2,41	
	B13.3	24,48	"21,52"	24,45	24,47	28,52	28,89	28,68	28,70	-4,23	-1,82	3,52	
15 nM TBT	B21.3	24,43	24,23	24,03	24,23	28,16	28,61	29,19	28,65	-4,42	-2,01	4,02	
Platte 3		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	22,55	22,77	22,78	22,70	25,09	24,89	25,16	25,05	-2,35	0,00	1,00	
15 nM TBT	B22.3	24,5	24,52	24,46	24,49	28,38	28,53	28,5	28,47	-3,98	-1,63	3,10	
	B23.3	24,59	24,52	24,36	24,49	28,24	28,26	28,28	28,26	-3,77	-1,42	2,68	
30 nM TBT	B31.3	25,1	25,07	25,25	25,14	28,29	28,26	28,37	28,31	-3,17	-0,82	1,77	
	B32.3	25,31	25,35	25,53	25,40	29,27	29,19	29,46	29,31	-3,91	-1,56	2,96	
	B33.3	Fehler											
50 nM TBT	B41.3	25,27	25,28	24,86	25,14	29,43	29,09	29,13	29,22	-4,08	-1,73	3,32	
	B42.3	25,23	25,15	25,09	25,16	29,06	29,3	29,56	29,31	-4,15	-1,80	3,49	
	B43.3	24,87	24,95	25,07	24,96	28,89	29,15	29,15	29,06	-4,10	-1,75	3,37	
100 nM TBT	B51.3	24,99	24,22	25,06	24,76	28,98	29,12	29,03	29,04	-4,29	-1,94	3,84	
	B52.3	25	25,26	25,13	25,13	28,94	29,18	29,38	29,17	-4,04	-1,69	3,23	
	B53.3	25,22	25,23	25,04	25,16	29,03	29,01	29	29,01	-3,85	-1,50	2,83	

Tab. 6: ct-Werte und $2^{-\Delta\Delta ct}$ - Werte; Versuch 2 (LUX)

Die in Anführungsstrichen stehenden ct-Werte waren Ausreißer.

Platte 1		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	25,98	25,67	25,52	25,72	28,08	29,21	28,5	28,60	-2,87	-0,23	1,18	
5 nM TPT	A11.2	27,82	28,11	27,54	27,82	31,7	32,07	31,05	31,61	-3,78	-1,14	2,21	
	A12.2	27,51	27,62	27,87	27,67	32,49	32,19	32,09	32,26	-4,59	-1,95	3,86	
	A13.2	27,73	27,67	27,67	27,69	31,88	31,94	31,84	31,89	-4,20	-1,56	2,94	
15 nM TPT	A21.2	27,46	27,3	27,63	27,46	32,46	32,37	31,45	32,09	-4,63	-1,99	3,97	
	A22.2	27,97	28,06	28,23	28,09	32,23	31,58	32,26	32,02	-3,94	-1,30	2,46	
	A23.2	27,88	27,72	27,92	27,84	32,41	32,75	31,43	32,20	-4,36	-1,72	3,29	
30 nM TPT	A31.2	27,62	27,62	27,56	27,60	31,43	31,77	32,57	31,92	-4,32	-1,68	3,21	
	A32.2	27,62	27,86	27,59	27,69	33,23	32,58	31,23	32,35	-4,66	-2,02	4,05	
	A33.2	28,49	"30,76"	28,29	28,39	33,88	33,04	33,55	33,49	-5,10	-2,46	5,50	
50 nM TPT	A41.2	27,13	27,11	27,07	27,10	31,27	32,08	32,45	31,93	-4,83	-2,19	4,56	
	A42.2	28,8	28,67	28,81	28,76	33,97	33,79	32,83	33,53	-4,77	-2,13	4,38	
Platte 2		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	40	40	40	40				
	Kal	26,2	25,99	25,73	25,97	29,14	28,35	28,82	28,77	-2,80	-0,08	1,06	
50 nM TPT	A43.2	27,84	27,99	27,96	27,93	32,18	32,36	33,06	32,53	-4,60	-1,89	3,70	
100 nM TPT	A51.2	27,56	27,56	27,75	27,62	33,05	32,81	32,55	32,80	-5,18	-2,46	5,51	
	A52.2	27,67	27,69	27,65	27,67	33,84	32,71	32,98	33,18	-5,51	-2,79	6,92	
	A53.2	27,66	27,59	27,43	27,56	33,18	32,79	33,45	33,14	-5,58	-2,86	7,28	
EtOH	A61.2	27,67	27,83	28,09	27,86	33,44	33,45	33,14	33,34	-5,48	-2,76	6,79	
	A62.2	28,13	27,96	27,87	27,99	32,87	31,75	32,23	32,28	-4,30	-1,58	2,99	
	A63.2	27,9	27,74	27,68	27,77	34,02	33,81	33,73	33,85	-6,08	-3,36	10,29	
5 nM TBT	B11.2	28,29	28,06	28,23	28,19	33,43	33,61	34,65	33,90	-5,70	-2,99	7,93	
	B12.2	28,68	28,74	28,54	28,65	33,87	33,35	33,97	33,73	-5,08	-2,36	5,13	
	B13.2	28,07	28,03	28,09	28,06	33,69	32,63	33,38	33,23	-5,17	-2,45	5,48	
15 nM TBT	B21.2	28,16	28,35	28,1	28,20	32,75	33,6	33,92	33,42	-5,22	-2,50	5,67	
Platte 3		ct-Wert (SDH)				∅	ct- Wert (PBGD)			∅	SDH-PBGD	- Kal	2-ddct
	NTC	40	40	40	40	30,03	40	40	36,68				
	Kal	"31,72"	25,71	25,66	25,69	28,82	28,77	"30,04"	28,80	-3,11	-0,59	1,50	
15 nM TBT	B22.2	27,75	27,83	27,75	27,78	33,02	31,37	33,03	32,47	-4,70	-2,17	4,51	
	B23.2	28,12	28,11	28,17	28,13	33,47	32,43	32,96	32,95	-4,82	-2,30	4,91	
30 nM TBT	B31.2	27,83	27,95	28	27,93	33,29	32,86	33,54	33,23	-5,30	-2,78	6,87	
	B32.2	27,67	27,63	27,77	27,69	32,32	31,92	33,48	32,57	-4,88	-2,36	5,13	
	B33.2	27,99	27,81	27,95	27,92	32,63	33,49	32,13	32,75	-4,83	-2,31	4,96	
50 nM TBT	B41.2	27,55	27,59	27,66	27,60	33,09	32,37	31,74	32,40	-4,80	-2,28	4,85	
	B42.2	27,71	27,54	27,35	27,53	34,11	33,16	33,38	33,55	-6,02	-3,49	11,26	
	B43.2	27,52	27,58	27,46	27,52	32,22	32,62	33,09	32,64	-5,12	-2,60	6,06	
100 nM TBT	B51.2	27,69	27,54	27,54	27,59	33,25	32,99	33,77	33,34	-5,75	-3,22	9,34	
	B52.2	27,66	27,78	27,54	27,66	33,72	33,35	33,44	33,50	-5,84	-3,32	9,99	
	B53.2	27,91	27,83	27,73	27,82	32,34	33,46	32,87	32,89	-5,07	-2,54	5,83	

9 Literaturverzeichnis

Ade T, Zaucke F, Krug HF.

The structure of organometals determines cytotoxicity and alteration of calcium homeostasis in HL-60 cells.

Anal Bioanal Chem. 1996; 354:609-614

Aldridge WN, Street BW.

Oxidative phosphorylation. The specific binding of trimethyltin and triethyltin to rat liver mitochondria.

Biochem J. 1970; 118:171-179

Allner B, Bergholz A, Möller M, Stahlschmidt-Allner P, Wegener G.

Wirkungen umweltrelevanter synthetischer Östrogene auf Fische. In:

Hessische Landesanstalt für Umwelt, Hrsg.

Arzneimittel in Gewässern - Risiko für Mensch, Tier und Umwelt? Tagungsband

Wiesbaden: 1998; 254:53 - 58.

Au HC, Scheffler IE.

Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene-both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required.

Eur J Biochem. 1998; 251:164-174.

Azumi K, Fujie M, Usami T, Miki Y, Satoh N.

A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians

Mar Environ Res. 2004; 58:543-546.

Batley GE, Scammell MS, Brockbank CI.

The impact of the banning of tributyltin-based antifouling paints on the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*.

Sci Total Environ. 1992; 122:301-314.

Baysal BE.

On the association of succinate dehydrogenase mutations with hereditary paraganglioma.

Trends Endocrinol Metab. 2003; 14:453-459.

Bettin C, Oehlmann J, Stroben E.

TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level.

Helgolander Meeresuntersuchungen 1996; 50:299-317.

Bonomi F, Pagani S, Cerletti P.

Catalytic and molecular modifications of succinate dehydrogenase by monovalent inorganic anions.

Eur J Biochem. 1981; 119:307-310.

Bosch I, Croop J.

P-glycoprotein multidrug resistance and cancer

Biochim Biophys Acta. 1996; 1288:F37-54

Boyer IJ.

Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals.

Toxicology. 1989; 55:253-298.

Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR.

The decline of the gastropod *Nucella Lapillus* around south-west England; evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints.

J.Mar.Biol.Ass.U.K. 1986; 66:611-640

Chandra S, Polya GM, James BD, Magee RJ.

Inhibition of oxidative phosphorylation by organotin thiocarbamates.

Chem Biol Interact. 1989; 71:21-36.

Chow SC, Kass GE, McCabe MJ Jr, Orrenius S.

Tributyltin increases cytosolic free Ca^{2+} concentration in thymocytes by mobilizing intracellular Ca^{2+} , activating a Ca^{2+} entry pathway, and inhibiting Ca^{2+} efflux.

Arch Biochem Biophys. 1992; 298:143-149.

Chow SC, Orrenius S.

Rapid cytoskeleton modification in thymocytes induced by the immunotoxicant tributyltin.

Toxicol Appl Pharmacol. 1994; 127:19-26.

Corsini E, Terzoli A, Bruccoleri A, Marinovich M, Galli CL.

Induction of tumor necrosis factor-alpha in vivo by a skin irritant, tributyltin, through activation of transcription factors: its pharmacological modulation by anti-inflammatory drugs.

J Invest Dermatol. 1997; 108:892-896.

Corsini E, Viviani B, Marinovich M, Galli CL.

Role of mitochondria and calcium ions in tributyltin-induced gene regulatory pathways.

Toxicol Appl Pharmacol. 1997; 145:74-81.

Daufeldt S.

Signalgebung durch Glucocorticoid- Agonisten: Schaltstelle Plasmamembran

Unveröffentlichte Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2000

Europäische Gemeinschaften.

Richtlinie 89/677/EWG des Rates vom 21. Dezember 1989 zur achten Änderung der Richtlinie 76/769/EWG zur Angleichung der Rechts- und verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten für Beschränkungen des Inverkehrbringens und der Verwendung gewisser gefährlicher Stoffe und Zubereitungen In:

Europäische Gemeinschaften, Hrsg.

Verabschiedete Binnenmarktrichtlinien

Straßburg: 1989; L398:24

Europäische Gemeinschaften.

Vorschlag für eine Verordnung des Europäischen Parlaments und des Rates über das Verbot zinnorganischer Verbindungen auf Schiffen In:

Europäische Gemeinschaften, Hrsg.

Bulletin EU 7/8-2002

Straßburg: 2002; Verkehr (9/17)

Fent K, Bucheli TD.

Inhibition of Hepatic Microsomal Monooxygenase System by Organotins in Vitro in Freshwater Fish.

Aquat Toxicol 1994; 28:107-126

Fent K, Meier W.

Effects of triphenyltin on fish early life stages.

Arch Environ Contam Toxicol. 1994; 27:224-231.

Fent K, Woodin BR, Stegeman JJ.

Effects of triphenyltin and other organotins on hepatic monooxygenase system in fish.
Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998; 121:277-288.

Fent K.

Ecotoxicology of organotin compounds.

Crit Rev Toxicol. 1996; 26:1-117.

Heidrich D.

Wirkung zinnorganischer Verbindungen auf den menschlichen Steroidhormon-
Metabolismus

Unveröffentlichte Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, 2001

Kreutzig T.

Biochemie, Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1.

Lübeck - Stuttgart - Jena - Ulm: Gustav Fischer Verlag, 1997

Leung KM, Morley NJ, Grist EP, Morrith D, Crane M.

Chronic toxicity of tributyltin on development and reproduction of the hermaphroditic
snail *Physa frontalis*: Influence of population density.

Mar Environ Res. 2004; 58:157-162.

McVey MJ, Cooke GM.

Inhibition of rat testis microsomal 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity by
tributyltin.

J Steroid Biochem Mol Biol. 2003; 86:99-105.

Mohamed MM, Shoukry MM.

Interaction of diphenyltin(IV) dichloride with some selected bioligands.

Chem Pharm Bull (Tokyo). 2001; 49:253-257.

Mutschler E.

Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie
Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1997

Oberdorster E, McClellan-Green P.

Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor.

Mar Environ Res. 2002; 54:715-718.

Oberdorster E, McClellan-Green P.

The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*.
Peptides. 2000; 21:1323-1330.

Oehlmann J, Ide I, Bauer B, Watermann B, Schulte-Oehlmann U, Liebe B, Fioroni P.
Erfassung morpho- und histopathologische Effekte von Organozinnverbindungen auf marine Mollusken und Prüfung ihrer Verwendbarkeit für ein zukünftiges biologisches Effektmonitoring.

Umweltbundesamt, Hrsg.

Berlin: 2000, UBA-Texte 46/98

Oehlmann J, Markert B, Stroben E, Schulte-Oehlmann U, Bauer B, Fioroni P.

Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms.

Anal Bioanal Chem. 1996; 354:540-545.

Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B.

Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part I: Bisphenol A and octylphenol as xeno-estrogens.

Ecotoxicology. 2000; 9:383-397.

Parfett CL, Marquardt T, Pilon R.

Promotion of morphological transformation by Di-n-butyltin dichloride in C3H/10T1/2 cells: prediction by prior expression of tumour promoter-responsive genes.

Food Chem Toxicol. 2000; 38:339-349.

Parfett CL, Pilon R.

Tri-n-butyltin chloride promotes morphological transformation and induces proliferin expression in C3H10T1/2 cells.

Cancer Lett. 1993; 71:167-176.

Pollard PJ, Wortham NC, Tomlinson IP.

The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase.

Ann Med. 2003; 35:632-639.

Pompili E, Nori SL, Geloso MC, Guadagni E, Corvino V, Michetti F, Fumagalli L.

Trimethyltin-induced differential expression of PAR subtypes in reactive astrocytes of the rat hippocampus.

Brain Res Mol Brain Res. 2004; 122:93-98.

Rudel H, Lepper P, Steinhanses J, Schroter-Kermani C.

Retrospective monitoring of organotin compounds in marine biota from 1985 to 1999: results from the German Environmental Specimen Bank.

Environ Sci Technol. 2003; 37:1731-1738.

Saitoh M, Yanase T, Morinaga H, Tanabe M, Mu YM, Nishi Y, Nomura M, Okabe T, Goto K, Takayanagi R, Nawata H.

Tributyltin or triphenyltin inhibits aromatase activity in the human granulosa-like tumor cell line KGN.

Biochem Biophys Res Commun. 2001; 289:198-204.

Scheffler IE.

Molecular genetics of succinate:quinone oxidoreductase in eukaryotes.

Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1998; 60:267-315.

Schild T.

Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie. 7700 SDS Workshop.

Weiterstadt: Applied Biosystems GmbH, 1996

Schirawski J, Hankeln T, Uden G.

Expression of the succinate dehydrogenase genes (sdhCAB) from the facultatively anaerobic paenibacillus macerans during aerobic growth.

Arch Microbiol. 1998; 170:304-308.

Schulte-Oehlmann U, Tillmann M, Markert B, Oehlmann J, Watermann B, Scherf S.

Effects of endocrine disruptors on prosobranch snails (Mollusca: Gastropoda) in the laboratory. Part II: Triphenyltin as a xeno-androgen.

Ecotoxicology. 2000; 9:399-412.

Selwyn MJ, Stockdale M, Dawson AP.

Multiple effects of trialkyltin compounds on mitochondria.

Biochem J. 1970; 116:15P-16P.

Snoeij NJ, Penninks AH, Seinen W.

Biological activity of organotin compounds--an overview.

Environ Res. 1987; 44:335-353.

Snoeij NJ, Punt PM, Penninks AH, Seinen W.

Effects of tri-n-butyltin chloride on energy metabolism, makromolecular synthesis, precursor uptake and cyclic AMP production in isolated rat thymocytes.

Biocim Biophys Acta. 1986; 852:234-243

Stroben E, Oehlmann J, Fioroni P.

Hinia reticulata and Nucella lapillus. Comparison of two gastropod tributyltin bioindicators.

Mar. Biol. 1992; 114:289-296.

Thomas LD, Shah H, Green SA, Bankhurst AD, Whalen MM.

Tributyltin exposure causes decreased granzyme B and perforin levels in human natural killer cells.

Toxicology. 2004; 200:221-233.

Tiano L, Fedeli D, Santoni G, Davies I, Falcioni G.

Effect of tributyltin on trout blood cells: changes in mitochondrial morphology and functionality.

Biochim Biophys Acta. 2003; 1640:105-112.

Trapp J.

Untersuchungen zur Resistenzentwicklung von Tumorzelllinien gegenüber Apoptose-Induktoren.

Unveröffentlichte Dissertation, Universität Karlsruhe, 2002

Trittin, J.

Verbot TBT-haltiger Schiffsanstriche entlastet die Meeresumwelt In:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Hrsg.

Pressemitteilung des BMU

Berlin: 2002; 189/02

Tsunashima K, Sadamatsu M, Takahashi Y, Kato N, Sperk G.

Trimethyltin intoxication induces marked changes in neuropeptide expression in the rat hippocampus.

Synapse. 1998; 29:333-342.

Ueno S, Susa N, Furukawa Y, Sugiyama M.

Role of cytochrome P450 in hepatotoxicity induced by di- and tributyltin compounds in mice.

Arch Toxicol. 1995; 69:655-658.

Vos JG, de Klerk A, Krajnc EI, Kruizinga W, van Ommen B, Rozing J.

Toxicity of bis(tri-n-butyltin)oxide in the rat. II. Suppression of thymus-dependent immune responses and of parameters of nonspecific resistance after short-term exposure.

Toxicol Appl Pharmacol. 1984; 75:387-408.

Wester PW, Krajnc EI, van Leeuwen FX, Loeber JG, van der Heijden CA, Vaessen HA, Helleman PW.

Chronic toxicity and carcinogenicity of bis(tri-n-butyltin)oxide (TBTO) in the rat.

Food Chem Toxicol. 1990; 28:179-196.

WHO (World Health Organisation).

Tin and organotin compounds: a preliminary review.

Environmental Health Criteria 1980; 15:1-109

Yamabe Y, Hoshino A, Imura N, Suzuki T, Himeno S.

Enhancement of androgen-dependent transcription and cell proliferation by tributyltin and triphenyltin in human prostate cancer cells.

Toxicol Appl Pharmacol. 2000; 169:177-184.

Zhang H, Liu AY.

Tributyltin is a potent inducer of the heat shock response in human diploid fibroblasts.

J Cell Physiol. 1992; 153:460-466.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Personen bedanken, die maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Klingmüller und Herrn Dr. A. Alléra für die Überlassung des Themas, die motivierende Unterstützung und die guten Arbeitsbedingungen am Institut, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. S. Daufeldt danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, für die Kritik und die Diskussionen.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern des Institutes, die durch ihre Hilfsbereitschaft mir über einige Schwierigkeiten hinweggeholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mir mein Studium ermöglichte und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.