

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Thomas Berbner

aus: Viernheim

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die Wirkungen von Peroxisomenproliferatoren
auf primäre Hepatocyten aus der Regenbogenforelle
(*Oncorhynchus mykiss*) und die permanente Fischzell-
linie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle**

Gutachter: HD Dr. Thomas Braunbeck
Zoologisches Institut I, Universität Heidelberg
Prof. Dr. Dr. Alfred Völkl
Institut für Anatomie und Zellbiologie II, Universität Heidelberg

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter, die den Abschluss dieser Arbeit leider nicht mehr erlebte.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mir die Durchführung dieser Dissertation ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn HD Dr. Thomas Braunbeck für das in mich gesetzte Vertrauen und die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, die Bereitstellung von Arbeitsraum und den benötigten Materialien. Ich danke ihm auch für den Freiraum, den er mir ließ, und mir immer beratend zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Dr. Völkl danke ich für die Übernahme des Korreferats und die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen großen und kleinen Tipps.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt auch Dr. Ute Bieberstein, die mich immer wieder neu motiviert hat, für mich da war und nicht zuletzt bei der Korrektur des Manuskripts hilfreich zur Seite stand.

Ich danke auch Dr. Markus Islinger, mit dem ich viele nützliche Diskussionen führen konnte.

Mein Dank geht auch an Dr. Helge Arnold, Marcus Bouwhuis, Alexander Froschauer, Dr. Henner Hollert, Jochen Holzschuh, Dr. Susanne Knörr, Dr. Jens Konradt, Erik Leist, Dr. Yasmina Oulmi, Sascha Pawlowski, Anne Sagner, Dr. Andreas Schnurstein, Dr. Marija Strmac, Thorsten Uhde, Bernhard Wetterauer und Dr. Thomas Zahn, der mir sehr viel beigebracht hat.

Allen weiteren Mitarbeitern des Zoologischen Instituts, im Besonderen: Thomas Wehe, Dr. Ulrich Weinhold, Heike Bierlein, Dr. Dirk Brandis und HD Dr. Günter Vogt.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an Andrew Rastall aussprechen, der mir immer ein guter Freund war und es mir ab und an mal ermöglichte, die Dinge in einem anderen Licht zu betrachten.

Ferner danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ERSATZMETHODEN ZU TIERVERSUCHEN.....	3
1.1.1	Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	3
1.1.2	Die permanente Zelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle	4
1.2	PEROXISOMENPROLIFERATOREN	4
1.2.1	Gefährdung von Mensch und Umwelt durch Peroxisomenproliferatoren.....	5
1.3	APOPTOSE UND KREBS	6
1.3.1	DNA-Schäden.....	7
1.3.2	Mechanismus der Apoptose	8
1.3.2.1	Induktion.....	8
1.3.2.2	p53	9
1.3.2.3	Die Bcl-2-Familie	10
1.3.2.4	Exekution.....	14
1.4	ZIELE DER ARBEIT	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	TIERE.....	17
2.2	PERMANENTE ZELLLINIEN.....	17
2.2.1	Vorbereiten der Zellen für die einzelnen Versuche.....	17
2.3	ISOLATION VON HEPATOCYTEN AUS DER REGENBOGENFORELLE	17
2.4	UNTERSUCHTE SUBSTANZEN	19
2.4.1	Dehydroepiandrosteron (DHEA).....	20
2.4.2	Clofibrat.....	22
2.4.2.1	Durchgeführte Untersuchungen.....	22
2.4.3	Staurosporin.....	23
2.4.4	Bestrahlung von isolierten Hepatocyten mit ultraviolettem Licht.....	23
2.5	CYTOTOXIZITÄTSTESTS	24
2.5.1	Durchführung	24
2.5.1.1	Clofibrat.....	25
2.5.1.2	DHEA	26
2.6	AUFBEREITUNG DER ZELLEN FÜR BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ISO- LIERTEN HEPATOCYTEN.....	26
2.6.1	Zellernte.....	26
2.6.2	Homogenisierung	26
2.6.3	Proteinbestimmung für Westernblotting	26
2.7.	ELEKTRONENMIKROSKOPIE	27

2.8	DNA-FÄRBUNGEN IN ZELLEN	28
2.8.1	Acridinorange/Ethidiumbromid Kombinationsfärbung	28
2.8.2	Hoechst 33342	28
2.8.3	Propidiumiodid	28
2.9	NACHWEIS AKTIVER CASPASE 3-ARTIGER ENZYME IN LEBENDEN ZELLEN.....	29
2.9.1	Aktivierung der Caspase 3 in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat	29
2.9.2	Aktivierung der Caspase 3 in RTG-2-Zellen nach Belastung mit Clofibrat ...	30
2.10	HERSTELLEN EINER MITOCHONDRIENFRAKTION	30
2.11	WESTERNBLOT	31
2.11.1	Durchführung Westernblot	31
2.11.1.1	p53	32
2.11.1.2	Caspase 3 (Apopain/ CPP32)	32
2.11.1.3	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	32
2.11.1.4	Cytochrom c	33
2.12	DNA-DEGRADATIONSUNTERSUCHUNGEN	33
2.12.1	DNA-Isolation	33
2.12.2	DNA-Elektrophorese	34
2.13	MORPHOMETRIE	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	HEPATOCYTEN DER REGENBOGENFORELLE IN KULTUR	35
3.2	BELASTUNG VON PRIMÄRHEPATOCYTEN MIT CLOFIBRAT	38
3.2.1	Ultrastrukturelle Veränderungen	38
3.2.2	DNA-Färbung in lebenden Hepatocyten	51
3.2.3	Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme	53
3.2.4	Caspase 3-Gehalt	56
3.2.5	p53-Gehalt	56
3.2.6	Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien durch Zellhomogenat von clofibratbelasteten Hepatocyten	57
3.2.7	Morphometrische Untersuchungen an Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat	60
3.2.8	DNA-Abbau	63
3.2.9	Belastung von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat zusammen mit einem membranpermeablen Caspase 3-Inhibitor.....	65
3.2.9.1	Ultrastrukturelle Untersuchungen.....	65
3.3	BESTRAHLUNG VON PRIMÄRHEPATOCYTEN MIT ULTRAVIOLETTEM LICHT.....	77
3.3.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen	77
3.3.2	Ultrastrukturelle Untersuchungen.....	79
3.3.3	Westernblotting	109

3.3.3.1	Caspase 3 nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.....	109
3.3.3.2	p53 nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht.....	109
3.3.3.3	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase nach Bestrahlung mit UV-Licht.....	108
3.4	BELASTUNG VON HEPATOCYTEN MIT STAUROSPORIN.....	111
3.4.1	Ultrastruktur.....	111
3.4.2	Ultrastrukturelle Veränderungen in Hepatocyten bei simultaner Inkubation mit 100 nM Staurosporin und 10 µM eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors.....	120
3.5	RTG-2-ZELLEN.....	123
3.5.1	Cytotoxizitätstests.....	123
3.5.1.1	Clofibrat.....	123
3.5.1.2	Dehydroepiandrosteron (DHEA).....	127
3.5.2	Belastung von RTG-2-Zellen mit Clofibrat.....	128
3.5.2.1	DNA-Färbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid.....	128
3.5.2.2	Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme.....	130
3.6	MORPHOMETRISCHE ERFASSUNG DER ULTRASTRUKTURELLEN VERÄNDERUNGEN IN LEBERN VON ZEBRABÄRBLINGEN, DIE IM LIFE-CYCLE-VERSUCH MIT 100 µG/L DHEA GEHÄLTERT WURDEN.....	132
4	DISKUSSION.....	134
4.1	CLOFIBRAT.....	134
4.2	CYTOTOXTESTS MIT CLOFIBRAT AN RTG-2-ZELLEN.....	136
4.3	APOPTOSE DURCH CLOFIBRAT IN PRIMÄREN HEPATOCYTEN AUS DER Regenbogenforelle?.....	136
4.3.1	Die Rolle der Mitochondrien.....	137
4.3.2	Das Endomembransystem.....	140
4.3.3	Ergebnisse der biochemischen Versuche.....	140
4.3.4	Vergleich mit RTG-2-Zellen.....	144
4.4	BELASTUNG VON HEPATOCYTEN MIT STAUROSPORIN.....	145
4.5	BELASTUNG VON HEPATOCYTEN MIT ULTRAVIOLETTEM LICHT.....	146
4.6	MORPHOMETRISCH ERFASSBARE VERÄNDERUNGEN IN DER LEBER VON <i>DANIO RERIO</i> NACH LANGZEITBELASTUNG MIT DEHYDROEPIANDROSTERON (DHEA).....	148
4.7	FAZIT.....	150
4.8	AUSBLICK.....	154
5	LITERATUR.....	156
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	180

1 Einleitung

Die vorliegende Dissertation befasst sich primär mit der Wirkung von Clofibrat auf Fischzellen. Clofibrat wird unter den Handelsnamen Regelan[®] oder Atromid S[™] zur Senkung der Blutfettwerte und des Cholesteringehalts im Blut als Medikament vertrieben und angewendet (Reuter, 1982a, 1982b). Die Wirkung hoher Konzentrationen des nur schwer löslichen Stoffes, der im flüssigen Aggregatzustand vorliegt, an isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) ist als dramatisch zu bewerten, da bisher unbeobachtete Phänomene in den untersuchten Zellen auftraten.

Das Industriezeitalter hat der Menschheit und dem Planeten Erde in den letzten Jahrzehnten rund 4 Millionen neue chemische Verbindungen beschert, die auf natürliche Weise nicht entstehen (Ditton und Erdinger, 1994). Jährlich kommen zu diesen Stoffen rund 1500 neue Chemikalien hinzu (López-Barea und Pueyo, 1998). Um die Wirkung dieser Stoffe zumindest teilweise einschätzen zu können wurde mit dem Chemikaliengesetz in der Bundesrepublik Deutschland 1982 veranlasst, dass durch verschiedene Tests in Erfahrung gebracht werden soll, ob und in welcher Art und Weise Organismen verschiedener Evolutionsstufen mit diesem Material umgehen können und ob diese Substanzen eine Gefahr für die belebte Umwelt darstellen. Leider betrifft dieses Gesetz nur alle Stoffe, die nach der Verabschiedung in Umlauf gebracht wurden. Die Tests werden vorwiegend mit Bakterien, Algen, Wasserflöhen und Fischen durchgeführt (Rudolph und Boje, 1987).

Spezielle Tests in Bezug auf die Wirkung von Pharmaka auf Nicht-Säugetiere sind allerdings nicht vorhanden, obwohl gerade Arzneimittel zu dem Zweck entwickelt und produziert werden, die Physiologie eines Organismus zu beeinflussen. Schon geraume Zeit ist bekannt, dass etliche Arzneimittel in den Abläufen von Kläranlagen und auch in Fließgewässern auftreten (Stumpf *et al.*, 1996; Halling-Sorensen *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1999). In einer Studie von (Stumpf *et al.*, 1996) ist der Anteil der Clofibrinsäure bei den gemessenen Medikamenten im Ablauf einer kommunalen Kläranlage am größten. (Henschel *et al.*, 1997) untersuchten verschiedene Medikamente, deren Vorhandensein in der Umwelt belegt ist, bezüglich ihrer Toxizität an verschiedenen Organismen. Sie konnten für die Clofibrinsäure eine EC₅₀ von 0,4 mM an Fischembryonen und für BF2 Zellen, einer Fischzelllinie, von 0,08 mM bestimmen. Ein Derivat der Clofibrinsäure stellt das Clofibrat dar, bei dem es sich um einen Ester handelt, der aus Ethanol und Clofibrinsäure entsteht. Bei der Metabolisierung dieses unpolaren Derivats wird über das Cytochrom P450-System, genauer dem Cytochrom P450 3A4 in der Zelle die Esterbindung gespalten, und es entsteht die freie Clofibrinsäure und Ethanol.

Zur Untersuchung der Wirkung von Pharmaka auf die belebte Umwelt eignen sich im Labor sicher Versuche am Ganztier. So sind beispielsweise in Deutschland Untersuchungen vorgeschrieben, in denen Goldorfen Abwässern in verschiedenen Verdünnungen über einen definierten Zeitraum (normalerweise 96 Stunden) ausgesetzt werden, um die Toxizität der in die Oberflächengewässer eingeleiteten Flüssigkeiten abzuschätzen. Je nach Giftigkeit müssen dann vom Einleiter Abgaben gezahlt werden. Bei diesen Untersuchungen wird nicht die Toxizität einer einzelnen Substanz erfasst, sondern vielmehr die kumulative oder auch subtraktive Wirkung eines Gemisches unzähliger Stoffe bewertet.

Einen anderen Ansatz stellen Versuche an einer ganzen Fischpopulation dar. Hier finden hauptsächlich Zebraquarienfische (*Danio rerio*) Anwendung, da diese einfach zu halten sind und die Kosten für deren Aufzucht und Pflege überschaubar bleiben. Ferner ist diese Fischart in der Lage, über das gesamte Jahr verteilt Nachkommen zu produzieren, so dass auch über das komplette Jahr Versuche durchgeführt werden können (Laale, 1977). Trotzdem sind Versuche an Ganztieren mit einem erheblichen Material- und Personalaufwand verbunden, so dass die Kosten für solche Experimente sehr hoch sein können. Um kosteneffizient zu arbeiten, wird daher schon seit vielen Jahren wenn möglich auf den Versuch am Ganztier verzichtet, und es werden Untersuchungen an Zellkulturen durchgeführt. Zellen lassen sich rasch in großer Anzahl und hoher Reinheit gewinnen und bieten somit eine ideale Grundlage für reproduzierbare Untersuchungen. Generell lassen sich zwei Ansätze unterscheiden: Versuche an permanenten Zelllinien, die im Labor vermehrt werden können und somit jederzeit in ausreichenden Mengen verfügbar sind und Experimente mit Primärkulturen, die direkt durch die Isolation aus Organen von Ganztieren gewonnen werden können (Baksi und Frazier, 1988). Vorteile dieser Primärkulturen sind vor allem die Nähe zum Ganztier. Während permanente Zelllinien entweder auf entartete Stammzellen, meist Krebszellen, zurückgehen oder bestimmte vermehrungsfähige ursprüngliche Primärzellen mit beschränkten physiologischen Fähigkeiten (z.B. Fibrocyten) darstellen, sind Primärzellen aus geeigneten Organen in der Lage, die physiologischen Fähigkeiten des Organs *in vitro* nachzuahmen. Die beiden größten Nachteile primärer Zellen sind einerseits deren Kurzlebigkeit, da normalerweise in Kultur keine Vermehrung stattfindet, und andererseits die größere Variabilität aufgrund ihrer Herkunft aus verschiedenen Tieren, deren physiologischer Zustand nicht vergleichbar sein muss (Braunbeck, 1992). Ein weiterer Nachteil, der allerdings sowohl permanente als auch primäre Zellen betrifft, ist die letztendlich doch limitierte Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse auf das Ganztier geschweige denn auf die Umwelt. Während eine Substanz im *In vitro*-Versuch direkt am Ziel agiert, sprich an der Zelle selbst, durchläuft die Substanz im Ganztier extrem unterschiedliche Strukturen innerhalb des Tieres, wobei es schon zu starken Modifikationen der Chemikalie kommen kann. Im Extremfall ist eine hohe Toxizität im *In vitro*-Versuch im Ganztier nicht feststellbar, da dort verschiedene Organe zusammen eine Entgiftung bewirkt haben.

In dieser Promotionsarbeit wurden sowohl permanente RTG-2-Zellen, die ursprünglich aus der Gonade der Regenbogenforelle gewonnen wurden, benutzt, als auch Primärzellen aus der Leber der gleichen Tierart.

1.1 Ersatzmethoden zu Tierversuchen

Bereits seit etlichen Jahren ist das Bewusstsein der Menschheit gewachsen, dass Tiere nicht unnötigerweise im Dienst der Wissenschaft oder zu Zwecken der Substanztestung in der kosmetischen Industrie benutzt werden sollten. Daher ist das Bestreben der modernen Forschung darauf ausgelegt, die Anzahl der Tiere, die Versuchen unterzogen werden, soweit wie möglich zu begrenzen und stetig zu verringern. Wenn auch in verschiedenen Bereichen, wie zum Beispiel der Entwicklung von Pharmaka, eine Reduktion kaum vollständig erreicht werden kann, so existieren doch mittlerweile eine ganze Reihe von Ersatzmethoden: Der Versuch am ganzen Tier erfährt in zunehmendem Maße eine Reduktion auf Tests an Zellkulturen. Diese können sowohl direkt aus einem Tier gewonnen werden, es entstehen sogenannte primäre Zellkulturen, bei denen das gewünschte Organ aus einem Tier entfernt wird und die Zellen mechanisch und enzymatisch vereinzelt und anschließend in Kultur genommen werden. Neben diesen primären Zellkulturen existieren eine Vielzahl permanenter Zelllinien, die den Vorteil besitzen, dass diese Zellen in Kultur proliferieren und so einheitliche physiologische Grundmerkmale aufweisen.

An Zellkulturen lassen sich grundlegende physiologische Studien betreiben, ferner sind sie sehr gut geeignet, um routinemäßig die Toxizität von Substanzen und Substanzgemischen zu erfassen (Braunbeck, 1994, 1995).

In der aquatischen Toxikologie werden bevorzugt Zellen aus Fischen eingesetzt, da diese Wirbeltiere in der aquatischen Umgebung in Bezug auf deren Biomasse dominierend sind und auch am oberen Ende der Nahrungskette stehen. Dadurch ist die Bioakkumulation von Schadstoffen in diesen Tieren am höchsten und Auswirkungen auf die Biozönose und das Biotop können am ehesten hier erfasst werden.

1.1.1 Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*)

Leberzellen lassen sich auf einfache Art und Weise in hoher Reinheit aus dem Gesamttier isolieren. Diese Zellen bewahren über einen Zeitraum von mindestens 5 Tagen ihre normalen physiologischen Funktionen, die sie auch im Gesamttier erfüllen (Braunbeck und Storch, 1992). Daher eignen sich Hepatocyten aus der Regenbogenforelle sehr gut zum Studium physiologischer als auch toxikologisch relevanter Fragestellungen. Im Zusammenhang mit isolierten Hepatocyten darf allerdings nicht vergessen werden, dass

Ergebnisse aus einem *In vitro*-Test nicht ohne weiteres auf den Gesamtorganismus übertragbar sind, da die simulierte direkte Belastung der Leberzellen in dieser Form im Tier nicht auftritt. Vielmehr legt eine zu testende Substanz im Tier gewisse Wege zurück, auf welchem bereits vielfältige Modifikationen des Stoffes auftreten können.

Fische können Schadstoffe auf verschiedenen Wegen aufnehmen. Zum einen gibt es den Weg über die Haut, deren äußerste Schicht, die Epidermis, im Gegensatz zum Säuger aus lebenden und nicht toten Zellen besteht. Bereits hier können enzymatische Reaktionen an der Testsubstanz erfolgen. Der zweite Weg besteht in der Aufnahme über die Kiemen und abschließend kann ein Stoff auch verschluckt werden und über den Darm resorbiert werden. Der Weg von der Körperoberfläche bis zur Leber ist daher lang und kann schon auf diesem Weg zu einem kompletten Abbau des Stoffes führen. Der *In vitro*-Ansatz simuliert dagegen eine Exposition gegenüber einer Substanz, die völlig unverändert bei der Leber ankommt und dort ihr Wirkungspotential entfaltet.

Die Leber ist andererseits das zentrale Stoffwechselorgan, und eine der Hauptfunktionen besteht in der Entgiftung körpereigener und körperfremder Stoffe.

1.1.2 Die permanente Zelllinie RTG-2 aus der Gonade der Regenbogenforelle

Im Gegensatz zu isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle stammen RTG-2-Zellen aus der Gonade der gleichen Tierart (Wolf und Quimby, 1962). Es handelt sich dabei um fibroblastoide Zellen, die in Kultur nahezu unbegrenzt proliferieren. RTG-2-Zellen haben verstärkt Bedeutung im Screening von Umweltproben gewonnen (Martin-Alguacil *et al.*, 1991; Munoz *et al.*, 1994; Hollert *et al.*, 2000; Nehls und Segner, 2001), auch wenn die Übertragbarkeit auf den Gesamtorganismus als strittig angesehen werden muss. Die physiologischen Funktionen dieses Zelltyps sind als gering zu bezeichnen. Biotransformation, wie sie aus Tieren oder auch primären Hepatocyten der Regenbogenforelle bekannt ist, ist nur gering ausgeprägt (Holzschuh, 1996).

1.2 Peroxisomenproliferatoren

Peroxisomenproliferatoren stellen eine Gruppe unterschiedlicher chemischer Substanzen dar, die in Nagetieren zu einer Vermehrung der hepatischen Peroxisomen führen. Zu dieser Gruppe zählen zum einen die Fibrate (Moody und Reddy, 1978; Svoboda und Azarnoff, 1979; Gray *et al.*, 1983b; Vainio *et al.*, 1983). Eine weitere Gruppe sind Phtalatester (Gray *et al.*, 1982; Gray *et al.*, 1983a, 1983b; Ganning *et al.*, 1984; Lake *et al.*, 1984). Als Steroidhormon gilt auch Dehydroepiandrosteron (DHEA) als potenter Peroxisomenproliferator (Frenkel *et al.*, 1990; Rao *et al.*, 1992; Prough *et al.*, 1994; Ram und Waxman, 1994; Rao *et al.*, 1994; Waxman, 1996; Beier *et al.*, 1997).

Bis heute stellen sich Peroxisomenproliferatoren in ihren Auswirkungen auf Organismen als sehr heterogen dar. Die Wirkung scheint extrem artspezifisch zu sein. Während Nagetiere und Kaninchen mit zum Teil sehr starker Proliferation auf Fibrate reagieren, lassen sich in Primaten nur schwache bis keine peroxisomenproliferierende Wirkungen erkennen (Bieri *et al.*, 1988; Blaauboer *et al.*, 1990; McKee, 2000; Pugh *et al.*, 2000). In Bezug auf Fische ist eine Peroxisomenproliferation umstritten. Während verschiedene Arbeiten eine Induktion der Acyl-CoA-Oxidase nachweisen (Scarano *et al.*, 1994; Haasch *et al.*, 1998), gibt es auch Untersuchungen, die zeigen, dass Fische refraktär für Peroxisomenproliferation sind und nicht mit einer Aktivitätserhöhung der mit Peroxisomen in Verbindung stehenden Enzymsysteme oder einer Vermehrung dieser Organellen reagieren (Orner *et al.*, 1995; Pretti *et al.*, 1999). Nur zukünftige Arbeiten zum Thema Peroxisomenproliferatoren in Fischen können hier Klarheit schaffen, da die Anzahl der Studien bisher sehr gering ist.

1.2.1 Gefährdung von Mensch und Umwelt durch Peroxisomenproliferatoren

Untersuchungen haben ergeben, dass viele Peroxisomenproliferatoren ein erhöhtes Krebsrisiko in sich bergen. Jedoch basieren diese Ergebnisse ausschließlich auf Untersuchungen an Nagetieren (Reddy und Rao, 1978; Reddy und Qureshi, 1979). Der Mechanismus dieser Krebsentstehung ist weitgehend ungeklärt. Jedoch existieren verschiedene Modelle, die versuchen, die Art und Weise der Carcinogenese zu erklären. Von einem Teil der Autoren wird die ausgelöste Peroxisomenproliferation verantwortlich gemacht. Durch die massive Vermehrung dieser Organellen vermutet man eine erhöhte Produktion aktiver Sauerstoffmoleküle und -verbindungen (H_2O_2 , O_2^- ; Kasai *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1998). Diese nucleophilen Substanzen greifen direkt den DNA-Doppelstrang an und können zu einer Schädigung des Erbguts in Form von Strangbrüchen oder Basenmodifikation führen, die im nächsten Replikationszyklus Mutationen zur Folge haben können, wenn Reparaturmechanismen erfolglos bleiben (Friedberg *et al.*, 1995). So kann es zu einem unkontrollierten Wachstum der geschädigten Zellen kommen und Carcinome können entstehen.

Beim Menschen kann neben der ausbleibenden Peroxisomenproliferation auch keine krebserregende Wirkung ermittelt werden (Zusammenfassung in Cohen und Grasso, 1981). Dies spricht für die Theorie, dass die Carcinombildung mit der Peroxisomenproliferation zusammen hängt. Allerdings gibt es auch Arbeiten, die sich gegen diese Hypothese aussprechen, da dort keine Zunahme des oxidativen Stress durch den Peroxisomenproliferator [4-chloro-6-(2,3-xylylidino)-2-pyrimidinylthio]-Essigsäure (WY-14,643) festgestellt werden konnte (Soliman *et al.*, 1997).

Interessanterweise scheint die Regenbogenforelle, wie der Mensch, ebenfalls gegen eine Peroxisomenproliferation resistent zu sein (Orner *et al.*, 1995). Im Unterschied zum Menschen ist aber die Möglichkeit der DNA-Reparatur bei Fischen scheinbar begrenzt (Ishikawa *et al.*, 1984; Walton *et al.*, 1984a, 1984b; Moore und Myers, 1994).

Die vorliegende Arbeit sollte ursprünglich dazu dienen, mehr Informationen über peroxisomenproliferierende Stoffe (Clobibrat und DHEA) in Fischen zu sammeln und die Ergebnisse in den Kontext bestehender Arbeiten zu integrieren.

1.3 Apoptose und Krebs

In den letzten 25 Jahren trat das Phänomen der Apoptose immer mehr in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses. Zunächst wurde erkannt, dass eukaryotische Zellen sowohl tierischer als pflanzlicher Herkunft, durch zwei verschiedene Phänomene zugrunde gehen. Während eine Art als ungerichtete und ungesteuerte Aktion zum Tod der Zellen führt und als Onkose bezeichnet wird, handelt es sich bei der Apoptose um einen hochgradig auf genetischer Ebene regulierten Prozess (Trump *et al.*, 1997; Trump und Berezsky, 1998). Es handelt sich dabei um einen hoch konservierten Vorgang, der bereits bei Protozoen nachgewiesen werden konnte (Ameisen, 1998). Ziel des programmierten Zelltods, wie Apoptose auch genannt wird, ist die Eliminierung von Zellen, die im Organismus nicht gewünscht sind oder deren Vermehrung zu Gefahren für den Gesamtorganismus führen kann. Eins der besten Beispiele ist in diesem Zusammenhang die Entwicklung von Tumoren. Zellen, deren Zellzyklus gestört ist, was unter Umständen zu einer unkontrollierten Proliferation dieser Zellen führen kann, müssen unter allen Umständen entfernt werden. Wäre das Abtöten dieser Zellen nicht gewährleistet, hätte sich auch die Spezies *Homo sapiens* nicht in seiner heute bekannten Art entwickeln können.

Neben der benötigten Apoptose im Verlauf der Genese eines Organismus, die dafür verantwortlich ist, dass sich die Körperform und die Organe in ihrer normalen Art entwickeln (Zakeri, 1998), gibt es auch viele verschiedene äußere Einflüsse, die Apoptose im Organismus auslösen können (Trump *et al.*, 1997). Dazu gehören sowohl physikalische als auch chemische Faktoren. Physikalisch kann durch hochenergetische Strahlung (ultraviolettes Licht oder auch radioaktive Strahlung) ein geregeltes Absterben induziert werden, da durch die in die Zelle eingebrachte Energie der Strahlung verschiedene chemische Veränderungen am Erbgut hervorgerufen werden (Fujikawa *et al.*, 2000; Kulms und Schwarz, 2000; Patel *et al.*, 2000; Bolaris *et al.*, 2001; Lackinger *et al.*, 2001; Lonskaya *et al.*, 2001; Vavrova *et al.*, 2001). Auch verschiedene chemische Einflüsse führen zur Auslösung des programmierten Zelltods. So führt beispielsweise die Blockierung verschiedener Proteinkinasen durch Staurosporin im Allgemeinen zum Tod der Zellen, da sonst die Gefahr besteht, dass verschiedene Protooncogene aktiviert wer-

den und so wiederum Krebs auslösen können (Ferraris *et al.*, 1997; Bredel *et al.*, 1999). Camptothecin, ein Alkaloid aus *Camptotheca acuminata* (Wall *et al.*, 1966), wirkt dagegen als Hemmer der Topoisomerase 1 α (Hsiang *et al.*, 1985; Hsiang *et al.*, 1989). Diese Hemmung kann im nächsten Replikationsschritt zur fehlerhaften Synthese des neuen DNA-Stranges führen und so Mutationen hervorrufen, die dem Organismus gefährlich werden können. Daher bewirkt die Belastung von Zellen mit Camptothecin die Induktion von Apoptose (Gorczyca *et al.*, 1993; Onishi *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1993).

Die Kenntnis um Substanzen, die gezielt Apoptose auslösen können, ist in der Krebsforschung von extremer Wichtigkeit, da mit solchen Hilfsmitteln Tumore in ihrem Wachstum gehindert oder gar vollständig eliminiert werden können. Im Gegensatz dazu gibt es verschiedene genetisch bedingte Krankheiten, bei denen die Apoptose außer Kontrolle gerät. Dazu gehört beispielsweise die Alzheimer'sche Krankheit (Zusammengefasst in Cotman *et al.*, 1998) oder auch AIDS (Zusammenfassung in Finkel und Casella, 1998). Daher sind Kenntnisse über Substanzen, welche die Apoptosekaskade an verschiedenen Stellen unterbinden können, ebenfalls von hoher Wichtigkeit.

1.3.1 DNA-Schäden

Die DNA ist der Träger der Erbinformation. Jeder Schaden an diesem Molekül im lebenden Organismus kann zu starken oder gar letalen Änderungen in der Physiologie führen oder aber, abhängig von Lokalisation und Art des Schadens, völlig unauffällig bleiben.

DNA-Schäden können auf verschiedene Arten auftreten. Zum einen ist DNA von Natur aus durch den molekularen Aufbau nur bedingt stabil und unterliegt spontanen und von außen induzierten Veränderungen (Vonarx *et al.*, 1998). Beispielsweise können bei der DNA-Replikation spontan Basen falsch gepaart werden (Friedberg *et al.*, 1995). Um diesen Veränderungen entgegen zu wirken, müssen Enzymsysteme des Organismus ständig den Zustand der DNA prüfen und im Fall eines Schadens diesen beheben.

DNA-Schäden können auch durch chemische und physikalische Einflüsse von außen entstehen. In diesem Zusammenhang sind oxidativer Stress und hochenergetische Strahlung zu nennen. Oxidativer Stress tritt durch reaktive Sauerstoffformen auf. Dies sind beispielsweise das Superoxidradikalanion, das Hydroxylradikal, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff. Diese Moleküle greifen zelleigene Moleküle an und können zu schädlichen Veränderungen in den Zellen führen. Durch die Evolution ist aber bedingt, dass aktive Sauerstoffmoleküle auch im zelleigenen Stoffwechsel entstehen, so dass hier, ähnlich den Reparatursystemen für die DNA Systeme existieren, die in der Lage sind, die verschiedenen Sauerstoffformen unschädlich zu machen (Superoxiddismutase, Katalase oder Radikalfänger wie Glutathion und Vitamin C). Schlägt die Eliminierung fehl, d.h. können die entsprechenden Sauerstoffformen nicht rechtzeitig beseitigt wer-

den, kann es zu negativen Auswirkungen kommen. Die genannten Sauerstoffspezies reagieren scheinbar zu einem großen Teil nicht direkt mit der DNA, sondern produzieren in einer Fenton-Reaktion mit Eisenionen Hydroxylradikale (Dizdaroglu, 1992). Durch Hydroxylradikale können apurinische/apyrimidinische Stellen (AP-Stellen) in der DNA oder Basenmodifikationen induziert werden, die bei der Replikation zu Mutationen führen können, sofern eine Reparatur erfolglos bleibt.

Andere chemische Induktoren zur Modifikation der DNA sind alkylierende Substanzen, die nukleophile Stellen in Makromolekülen alkylieren (Friedberg *et al.*, 1995). Führt die Reaktion mit der DNA dazu, dass zwei Stellen der DNA, die sich unter Umständen sogar auf verschiedenen Strängen befinden können, miteinander verbunden werden, spricht man von *cross linking*, was bedeutet, dass dort keine korrekte Replikation mehr stattfinden kann. Auch eine Bindung von Chemikalien an die DNA (Adduktbildung) tritt auf. Diese Art der DNA Modifikation gilt als ein wichtiger Auslöser der chemisch induzierten Carcinogenese (Maccubin, 1994).

Als physikalische Induktoren für Modifikationen an der DNA sind hauptsächlich UV- und ionisierende Strahlung zu nennen, die direkt oder indirekt über radikalische Reaktionen zu Basendimeren oder AP-Stellen führen können (Arlett *et al.*, 1993; Alapetite *et al.*, 1996; Sak *et al.*, 1996; Tornaletti und Pfeifer, 1996; Kruszewski *et al.*, 1998; Wojewodzka *et al.*, 1998).

1.3.2 Mechanismus der Apoptose

Apoptose kann auf vielen verschiedenen Wegen induziert werden. Ab einem gewissen Punkt innerhalb dieses Mechanismus ist die ausgelöste Apoptose jedoch nicht mehr auf den ursprünglichen Induktor zurückzuführen.

Grundsätzlich existieren zwei bekannte Möglichkeiten zum Auslösen der Apoptose: Entweder sind an der Induktion Rezeptoren beteiligt oder der Stimulus greift direkt innerhalb der Zelle an. Insbesondere die rezeptorvermittelte Auslösung der Apoptose ist bei zwei unterschiedlichen Systemen gut untersucht. Zum einen die Bindung des FAS-Liganden an den FAS-Rezeptor und die Bindung von Tumor-Nekrose-Faktor an den Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor 1 (TNFR1).

1.3.2.1 Induktion

Besonders ausführlich ist die Induktion der Apoptose durch Bindung des FAS-Liganden an seinen Rezeptor untersucht. Der FAS-Rezeptor (Fas, auch APO-1 oder CD95 genannt) gehört zur großen Gruppe der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNFR; Übersicht bei (Nagata und Golstein, 1995)). Sowohl Fas als auch TNFR1 besitzen cytoplasmatische Domänen die als Death Domains bekannt sind und eine zentrale Rolle bei der Induktion der Apoptose spielen. Diese Death Domains interagieren mit cytoplasmati-

schen Proteinen, die ihrerseits ebenfalls solche Domänen besitzen. Fas interagiert dabei mit FADD und TNFR mit TRADD. Diese beiden Proteine besitzen ihrerseits wiederum einen weiteren wichtigen Abschnitt in ihrer Struktur, der Death Effector Domain genannt wird. Damit eine Interaktion zwischen Fas und FADD zustande kommt, müssen 3 ligandentragende Fas-Rezeptoren einen Komplex bilden (Trimerisierung; Zusammenfassung bei Krammer, 1996). Dieser Komplex interagiert seinerseits wiederum mit einem anderen cytoplasmatischen Protein, das als FLICE bzw. MACH bekannt geworden ist und mittlerweile als Procaspase 8 zur Familie der Caspasen gezählt wird (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Die Procaspase 8 besitzt wie FADD oder TRADD eine Death Effector Domain, welche die Anlagerung an diese Proteine ermöglicht. Im Verlauf der Interaktion zwischen Fas, FADD und Procaspase 8 wird letzteres Protein gespalten und es entsteht die aktive Caspase 8, die ihrerseits nun Effektorcaspasen aktivieren kann und somit den Zelltod einleitet.

Weniger genau untersucht ist die Induktion der Apoptose durch nicht rezeptorvermittelte Signale. Es ist z. B. bekannt, dass durch UV-Licht verursachte DNA-Schäden zu einer Stabilisierung von p53 führen (Campbell *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1993; Lu und Lane, 1993; Perry *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1993). Dieses multifunktionale Protein spielt bei der Induktion der Apoptose eine wichtige Rolle.

1.3.2.2 p53

Eine Stabilisierung von p53 führt in Zellen zu vielen verschiedenen Reaktionen. Zum einen ist p53 in der Lage, DNA-Schäden zu entdecken und DNA-Reparaturenzyme zu aktivieren (Oren und Rotter, 1999). Eine weitere Funktion, die sich unmittelbar an die Entdeckung eines DNA-Schadens anschließt, offenbart eine weitere Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor: Er bindet spezifisch an bestimmte Stellen der DNA und leitet damit die Expression von mehreren Enzymen ein. Darunter befindet sich das p21-Gen (auch Waf1 oder Cip1 genannt), dessen Produkt einen Inhibitor für cyklinabhängige Kinasen darstellt (el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). Die Hemmung dieser Kinasen führt zu einer Unterbrechung des Zellzyklus, so dass eine Vermehrung von Zellen mit Defekten in der DNA zu verhindert wird (Brugarolas *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995). Neben diesem Einfrieren des Zellzyklus werden noch weitere Gene zur Expression angeregt. So wird die Produktion von Proteinen angeregt, die mit dem Redoxzustand der Zellen und der Produktion von aktiven Sauerstoffspezies in Zusammenhang stehen (Polyak *et al.*, 1997). Schließlich werden auch noch Gene exprimiert, die in direktem Zusammenhang mit der Induktion und Regulation der Apoptose in Verbindung stehen, wie Bax und Fas (Übersicht bei Janus *et al.*, 1999).

1.3.2.3 Die Bcl-2 Familie

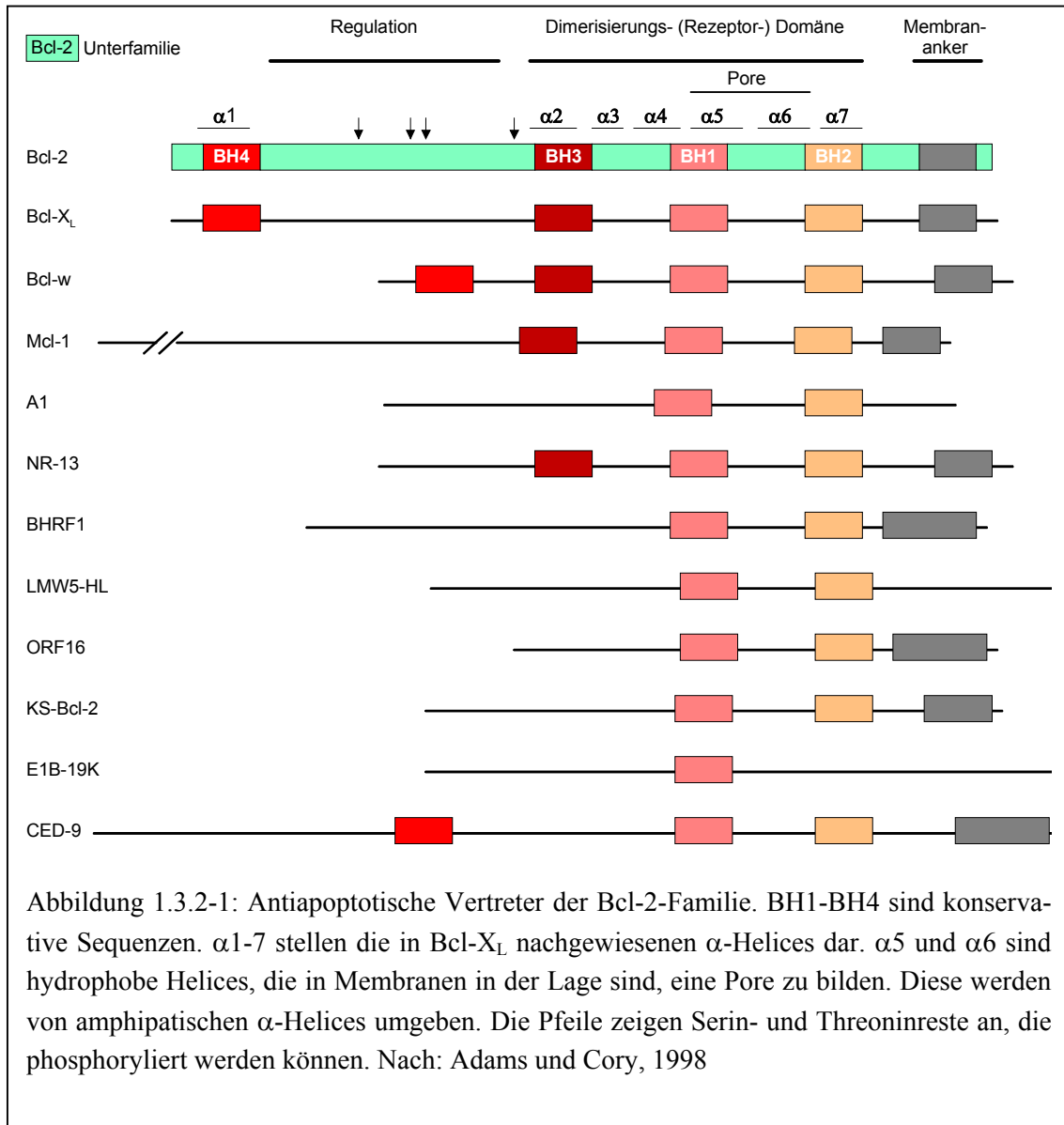
Das bereits erwähnte Bax gehört zu einer Familie von Proteinen, die sehr ähnliche Strukturen in ihrem Aufbau aufweisen. Zum ersten Mal entdeckt wurde ein Vertreter dieser Familie, das Bcl-2, im folliculären B-Zell-Lymphom; (Bakhshi *et al.*, 1985; Tsujimoto *et al.*, 1985; Cleary und Sklar, 1995) und deckte die Existenz einer neuen Gruppe von Onkogenen auf, die Krebs nicht durch Anregung der Zellproliferation als vielmehr durch Verhinderung des Absterbens von Zellen fördern (Vaux *et al.*, 1988; McDonnell *et al.*, 1989; Hockenbery *et al.*, 1990; Korsmeyer, 1992).

Mittlerweile ist bekannt, dass in Säugetieren mindestens 15 Proteine zur Bcl-2-Familie gehören. Sie alle besitzen mindestens eines von vier konservativen Polypeptidmotiven, die Bcl-2-Homologiedomänen genannt werden (BH1 bis BH4; Abb. 1.3.2-1; 2; Cory, 1995; Yang und Korsmeyer, 1996; Strasser *et al.*, 1997; Chao und Korsmeyer, 1998). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Vertreter der Bcl-2-Familie mit Hilfe dieser ähnlichen Strukturen Heterodimere bilden können, was den Verdacht nahe legt, dass diese Wechselwirkung letztlich die biologische Wirkung dieser Proteine kontrolliert (Oltvai *et al.*, 1993).

Die gesamte Bcl-2-Familie unterteilt sich in 3 Unterfamilien. Die antiapoptotische Bcl-2- und die proapoptotischen Bax- und BH3-Unterfamilien. Bcl-2 ist in der äußeren Mitochondrienmembran, dem endoplasmatischen Retikulum und in der Kernhülle zu finden (Park und Hockenbery, 1996). Man vermutet, dass es dort in der Lage ist, Schäden am entsprechenden Organell zu erkennen und möglicherweise durch Änderung des Flux kleiner Moleküle und Proteine darauf zu reagieren (Kroemer, 1997a, 1997b; Green und Reed, 1998; Zamzami *et al.*, 1998). Nicht alle Vertreter der Bcl-2-Familie sind in Membranen verankert und auch Bcl-2 kann nach Eliminierung des Membranankers noch immer seine antiapoptotische Wirkung entfalten (Borner *et al.*, 1994; Nguyen *et al.*, 1994). Nicht alle Bcl-X_L-Moleküle inserieren in Membranen und auch Bax integriert erst nach einem apoptotischen Stimulus in Membranen (Hsu *et al.*, 1997; Hsu und Youle, 1998).

Über die Wirkung der Bcl-2-Familie konnte viel durch Experimente an *Caenorhabditis elegans* herausgefunden werden und auf Säugersysteme übertragen werden, da die ablaufenden Prozesse homolog sind (Chinnaiyan *et al.*, 1997; Chaudhary *et al.*, 1998). In der Zelle scheinen Proteine der Bcl-2-Unterfamilie den Apoptosis Protease Activating Factor-1 (APAF-1) zu binden und so zu verhindern, dass es zur Aktivierung von Caspasen kommt (Hu *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998). Diese Interaktion kann durch einen Überschuss an proapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie durch Bindung von Proteinen der Bcl-2-Unterfamilie aufgehoben werden, und Caspasen können aktiviert werden (Pan *et al.*, 1998).

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Bcl-X_L (Abb. 1.3.2-3) hat eine weitere Möglichkeit der Wirkungsweise von Bcl-2-Vertretern aufgezeigt. Die α 5- und α 6-Helices bilden eine von Bakterientoxinen (beispielsweise Diphtherie) bekannte Membraninserterungsdomäne, die eine Pore in Membranen bilden kann (Muchmore *et al.*, 1996; Sattler *et al.*, 1997). Es wäre damit durch direkte Schädigung von Organellen das Auslösen des Zelltods denkbar.



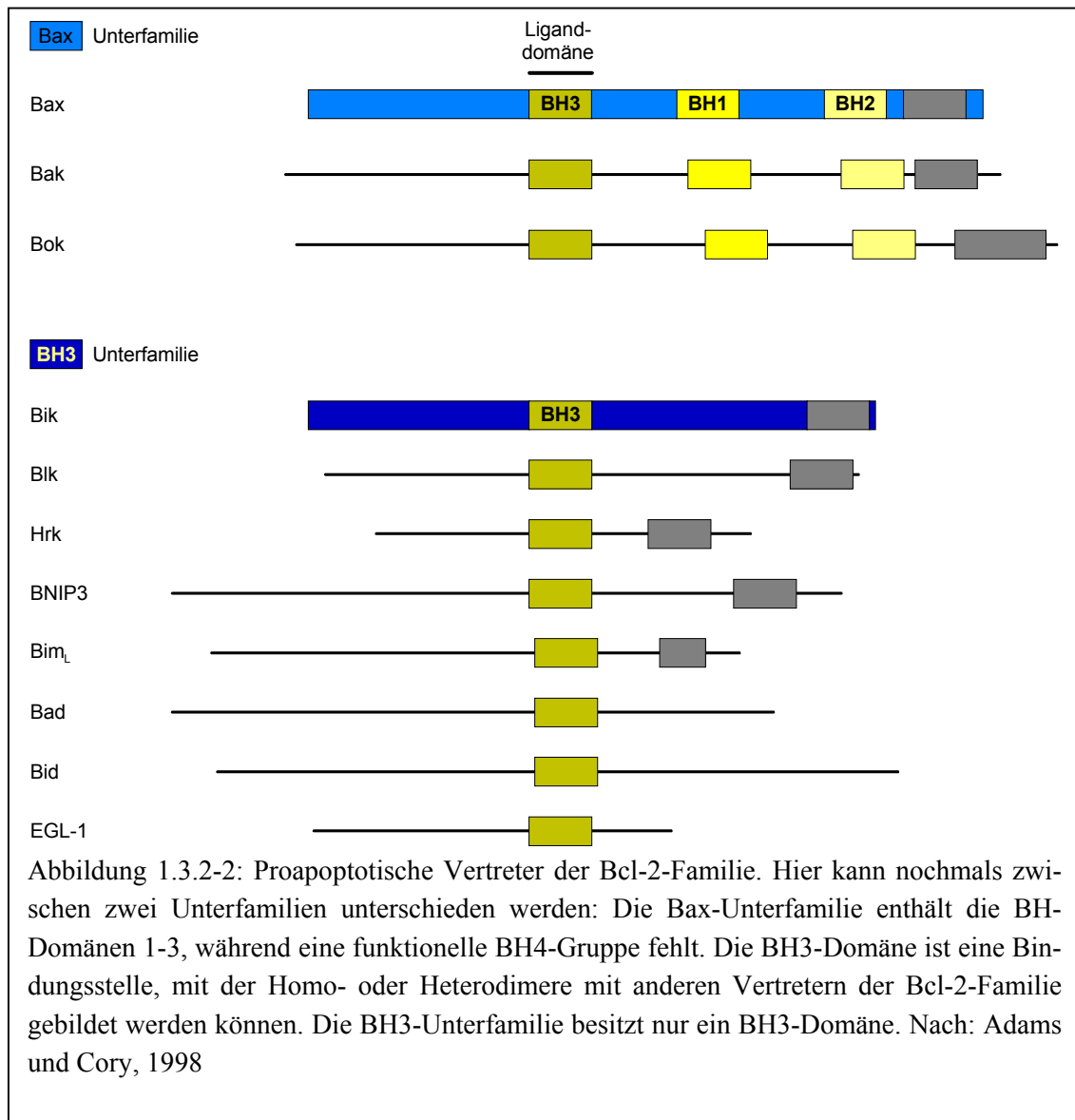


Abbildung 1.3.2-3: Dreidimensionale Struktur von Bcl-X_L. Die orangefarben dargestellte Helix gehört zu gebundenem Bad. Die BH1-Domäne ist gelb, BH2 rot und BH3 grün gefärbt. Aus Muchmore *et al.*, 1996

1.3.2.3.1 Mitochondrien, Cytochrom c und AIF

Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion (Green und Reed, 1998), wobei speziell die Wechselwirkung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie und der äußeren Mitochondrienmembran diskutiert werden, aber auch eine Änderung im Membranpotential kann eine zentrale Rolle bei der Induktion der Apoptose spielen (Green und Reed, 1998; Kroemer *et al.*, 1998).

Im Verlauf der Apoptoseinduktion kommt es zur Freisetzung von Molekülen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Patterson *et al.*, 2000). Darunter befinden sich sowohl der AIF (Apoptosis Inducing Factor; Susin *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996) und Cytochrom c (Liu *et al.*, 1996; Kluck *et al.*, 1997), als auch die Procaspasen 2, 3 und 9 (Mancini *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999). Der AIF stellt ein Flavoprotein dar, das nach seiner Freisetzung aus den Mitochondrien in den Nucleus transportiert wird und dort zur Fragmentierung der DNA führt. Wird AIF künstlich von außen in das Cytosol gebracht, führt dies ebenfalls zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (Zusammenfassung bei Daugas *et al.*, 2000). Die Freisetzung von Cytochrom c führt zu folgendem Szenario: In Anwesenheit von ATP bindet es an den APAF-1 (Apoptosis Proteases Activating Factor-1), der seinerseits mit der Procaspase 9 vergesellschaftet ist. Dieses Konglomerat aus Proteinen nennt man das Apoptosom, das letztlich die aktive Caspase 9 aus dem Komplex entlässt (Li *et al.*, 1997). Die aktive Caspase 9 kann ihrerseits Effektorcaspasen aktivieren und so die finalen Schritte des Absterbens von Zellen einleiten.

1.3.2.4 Exekution

Nachdem die Initiatorcaspasen (beispielsweise Caspase 8 und Caspase 9) aktiviert wurden, beginnen diese verschiedene Proteine des Cytoskeletts, darunter Vimentin (Engeland *et al.*, 1997), Actin (Kayalar *et al.*, 1996) und Fodrin (Martin *et al.*, 1995) zu zerstören. Weiterhin aktivieren sie die sogenannten Effektorcaspasen durch Spaltung (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Orth *et al.*, 1996). Diese können dann wiederum viele Substrate innerhalb der Zelle spalten und so letztlich den physiologischen Zustand der Zelle von lebend nach tot verschieben. Zu den Substraten gehören verschiedene Enzyme, die an der Aufrechterhaltung der DNA-Struktur beteiligt sind oder der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle dienen (Cryns und Yuan, 1998).

1.3.2.4.1 Caspasen

Apoptose wurde besonders intensiv in *Caenorhabditis elegans* untersucht. Dieser Nematode besteht im adulten Zustand aus 959 somatischen Zellen. Während der Entwicklung werden 1090 Zellen angelegt, von denen 131 per programmiertem Zelltod zugrun-

de gehen (Sulston und Horvitz, 1977; Kimble und Hirsch, 1979; Sulston *et al.*, 1983). Als zentrale Komponenten bei der Ausführung der Apoptose in diesen 131 Zellen konnten die Produkte der Gene *ced-3* und *ced-4* ausgemacht werden (Gartner und Hengartner, 1998).

In Vergleichstudien mit Säugetieren wurde erkannt, dass *ced-3* ein dem Interleukin-1 β -konvertierenden Enzym (ICE) homologes Protein codiert. ICE ist eine Protease, deren aktives Zentrum einen essentiellen Cysteinrest (Thornberry *et al.*, 1992) enthält und das pro-Interleukin-1 β zwischen Asparagin 116 und Alanin 117 spaltet (Cerretti *et al.*, 1992; Thornberry *et al.*, 1992; Yuan *et al.*, 1993).

Durch eine rasch wachsende Anzahl von Proteasen, die den gleichen katalytischen Mechanismus wie ICE benutzen, wurde diese Gruppe als Caspasen bezeichnet, da sie alle im aktiven Zentrum einen essentiellen Cysteinrest aufweisen und ihr Substrat immer hinter einem Asparaginsäurerest spalten (Alnemri *et al.*, 1996).

14 Caspasen sind mittlerweile cloniert oder beschrieben worden (Nakagawa *et al.*, 2000). Viele dieser Proteasen lassen sich in drei Unterfamilien gliedern.

Die Caspase-1-Familie mit den Caspasen 1, 4, 5, 11 und 12, die Caspase-2-Familie mit den Caspasen 2 und 9 sowie die Caspase-3-Familie mit den Caspasen 3, 6, 7, 8 und 10 (Cryns und Yuan, 1998; Nakagawa *et al.*, 2000).

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst die Wirkungen von Peroxisomenproliferatoren auf isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle untersucht werden. Abhängig von den erzielten Ergebnissen wurde dieses Ziel aber bald aufgegeben und explizit die Wirkung von Clofibrat auf die Fischleberzellen untersucht. Neben Clofibrat wurde auch DHEA in Bezug auf sein peroxisomenproliferierendes Potential in Zebraabärblingen untersucht.

Das Ausbleiben einer deutlichen Peroxisomenproliferation und das Auftreten extremer morphologischer Veränderungen in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle führte zur Untersuchung verschiedener Fragen: Die beobachteten Effekte wiesen auf die Induktion von Apoptose hin, so dass ultrastrukturelle und biochemische Untersuchungen aufklären sollten, welcher Art dieser Zelltod ist und welche Schritte der Apoptose während der Belastung nachvollzogen werden können.

Ob es sich bei dem beobachteten Phänomen um Apoptose handelt, sollte durch Versuche mit den bekannten Apoptoseinduktoren Staurosporin und UV-B-Bestrahlung und einem Vergleich der erzielten Ergebnisse geklärt werden.

Zur Klärung, wie es zur Induktion des Zelltods durch Clofibrat kommt, wurde bei ultrastrukturellen Untersuchungen besonderes Augenmerk auf die Morphologie der Mitochondrien gelegt. Westernblots mit Antikörpern gegen Cytochrom c sollten zeigen, ob

es zu einer Verschiebung des Cytochrom c-Anteils zwischen Mitochondrien und Cytosol kommt. Ferner sollten Westernblots mit Antikörpern gegen p53 zeigen, ob dieses Protein im Clofibrat vermittelten Absterben der Zellen eine Rolle spielt und eventuell zur Induktion beiträgt.

Untersuchungen mit einem Caspase 3-Substrat sollten klären, ob es zu einer Aktivierung der Caspase 3 kommt; der Einsatz eines Caspase 3 Inhibitors sollte zeigen, ob das Absterben der Zellen durch die Hemmung der Caspase 3 verhindert werden kann.

Abschließend wurde versucht, durch die Ergebnisse einen Vorschlag für den Mechanismus des clofibratinduzierten Zelltods in Hepatocyten der Regenbogenforelle zu entwickeln.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) wurden von lokalen Forellenzüchtern bezogen und über einen Zeitraum von mindestens 2 Monaten an eine Wassertemperatur von 14°C und einen Hell/Dunkel-Zyklus von 12/12 Stunden in Durchflussbehältern adaptiert. Die Fütterung der Tiere erfolgte einmal täglich mit handelsüblichem Forellenfutter. Um geschlechtsabhängige Unterschiede zu vermeiden, wurden nur männliche Forellen mit einem Gewicht zwischen 200 und 450 Gramm benutzt.

2.2 Permanente Zelllinien

Als proliferierende Zelllinie wurden RTG-2-Zellen (aus der Gonade der Regenbogenforelle) benutzt (Borenfreund und Puerner, 1984). Die Zellen wurden in Medium M 199 (20 mM HEPES) bei 20 °C in 80 cm² Kulturflaschen (Greiner, Frickenhausen) kultiviert. Beim Erreichen des Konfluenzstadiums wurden die Zellen für die einzelnen Versuche geerntet und weiter verarbeitet.

2.2.1 Vorbereiten der Zellen für die einzelnen Versuche

Vor der Belastung der RTG-2 Zellen wurde zunächst das Medium aus den Kulturflaschen entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Danach wurden 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen) in die Flasche gegeben. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurden diese durch wiederholtes Aufziehen und Ausblasen mit einer sterilen 10 ml Glaspipette vereinzelt. Die Aktivität wurde durch Zugabe von Medium mit FKS abgestoppt und der Zelltitert auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt und die Zellen wurden in 4- bzw. 8-Well Chamber Slides kultiviert (Nunc) aus Permanox ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit der jeweils zu untersuchenden Substanz belastet.

2.3 Isolation von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle

Die Versuchsfische wurden in einer gesättigten Benzocain-Lösung (Ethyl-*p*-aminobenzoat, Sigma) betäubt, gewogen und äußerlich mit 70% Ethanol sterilisiert. Alle folgenden Schritte der Isolation wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Leibeshöhle wurde von den Bauchflossen bis vor das Diaphragma

ventral eröffnet. Die Leber wurde so freigelegt, dass der Eintritt der Vena porta in die Leber deutlich erkennbar wurde. Der Sinus venosus des Herzens wurde durch einen Schnitt eröffnet und sofort darauf eine Flügelkanüle (Durchmesser 0,8 mm) in die Vena porta eingeführt, mit einer Arterienklemme fixiert und mit der Perfusion begonnen. Die Perfusion unterteilte sich in drei Einzelschritte (Abb.: 2.3-1):

1. Perfusion der Leber mit sterilem PBS (2 g/L NaHCO₃ und 0,548 g/L Na₂EDTA, pH

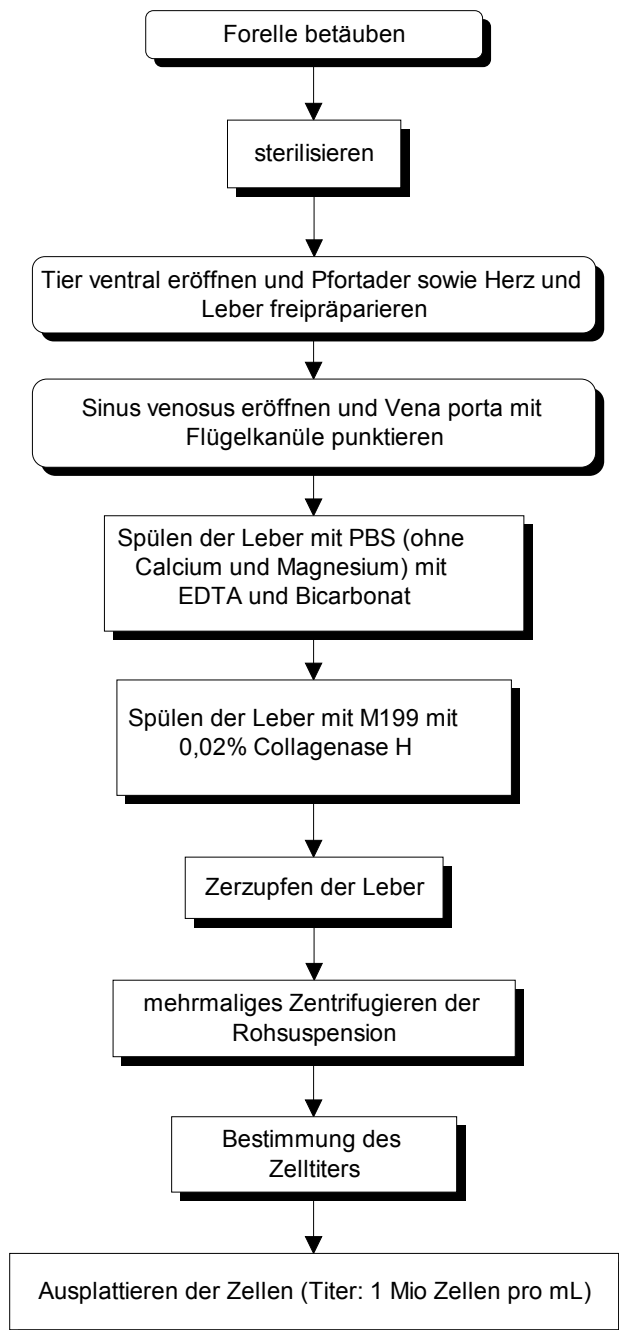


Abbildung 2.3-1: Schematischer Verlauf der Hepatocytenisolierung

7,5) durch eine peristaltische Pumpe (Ismatec Reglo M8) mit einem Kunststoffschlauch (Innendurchmesser 0,8 mm) bei ca. 7 mL/min über einen Zeitraum von maximal 8 Minuten. Parallel zur Perfusion wurde die Leber vollständig aus dem Tier entfernt und die Kanüle mit einer Plastikarterienklemme an einem Stativ befestigt.

2. Ohne Unterbrechung erfolgte der zweite Perfusionsschritt mit sterilem Medium 199 (20 mM HEPES, pH 7,5) und 0,02 % Collagenase H bei ca. 6 mL/min für 15 Minuten. Sobald die letzten Reste PBS aus der Leber gespült waren, wurde ein Perfusionsschleife mit dem collagenasehaltigen Medium geschlossen.

3. Ohne Unterbrechung wurde zum Abschluss für weitere 15 Minuten bei ca. 7 mL/min mit Medium 199 perfundiert.

Nach Abschluss der Perfusion wurde die Leber in eine sterile Petrischale mit 10 mL sterilem Medium 199 überführt und die Bindegewebskapsel des Organs mit einer sterilen Rasierklinge

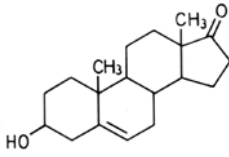
angeschnitten.

Mit einer Pinzette wurde die Leber soweit zerzupft, bis sich eine milchige Suspension aus isolierten Hepatocyten gebildet hatte. Die gesamte Rohsuspension wurde daraufhin über eine Filtrierglocke mit einem Nylongazenet (200 μm Maschenweite) filtriert, um grobe Bindegewebsanteile aus der Suspension zu entfernen. Zur Beseitigung feinerer Bindegewebspartikel und zur Vereinzelung der Hepatocyten erfolgte eine zweite Filtrierung über ein zweites Nylongazenet mit einer Maschenweite von 70 μm . Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit 70g für 7 Minuten in 50 mL Zentrifugenröhrchen (Firma Greiner) bei 14°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands und Resuspendierung der Zellen erfolgte eine zweite Zentrifugation (70g, 7 min) in frischem Medium 199 (25 mL pro Zentrifugenröhrchen) bei 14°C. Erneut wurden die Überstände verworfen und die erhaltenen Pellets in je 30 mL Medium 199 mit 1% Streptomycin/Penicillin-Lösung (10.000 $\mu\text{g}/10.000 \text{ E/mL}$) und 4% fötalem Kälberserum resuspendiert. Abschließend wurde nochmals für 7 min bei 70 g zentrifugiert. Die Pellets wurden in einem Becherglas in 100 mL frischem Medium aufgenommen und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und Ausblasen mit einer 10 mL-Pipette vereinzelt. Der Zelltiter wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Ermittlung der vitalen Zellen wurden 200 μL der Zellsuspension mit 200 μL 0,5% Trypanblaulösung versetzt. Die Gesamtzellausbeute ergab sich dann aus der Gesamtzahl der Zellen abzüglich des Anteils der toten oder geschädigten Zellen. Je 2 mL der Zellsuspension wurden dann in ein Well einer 24-Well-Platte (Firma Greiner) in einer Zelldichte von $1 \times 10^6/\text{mL}$ (Gesamtzellzahl: 2×10^6) ausgesät und über einen Zeitraum von 24 Stunden zur Adaption an die neuen Bedingungen kultiviert. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden Hepatocyten in 24-Well-Platten auf Thermanoxplättchen[®] (Nunc, Wiesbaden) kultiviert. Nach dieser Zeit erfolgte der Beginn des jeweiligen Tests.

2.4 Untersuchte Substanzen

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden Clofibrat und Dehydroepiandrosteron, zwei als Peroxisomenproliferatoren bekannte Substanzen, verwendet. Zum Vergleich der erhaltenen Ergebnisse aus den Versuchen mit Clofibrat wurden Hepatocyten zusätzlich mit Staurosporin behandelt oder für 10 Minuten mit UV-Licht (314nm) bestrahlt. Damit sollten Parallelen zum Mechanismus des Zelltods zwischen Clofibrat, Staurosporin und UV-Bestrahlung ermöglicht werden.

2.4.1 Dehydroepiandrosteron (DHEA)



DHEA ist ein Steroid, das endogen im Körper auftritt. Es wird, wie alle Steroide, aus Cholesterin synthetisiert. DHEA wird im Körper zu Testosteron umgewandelt (Abb. 2.4.1-1). Testosteron selbst wird über die Aromatase weiter zu Östradiol umgebaut.

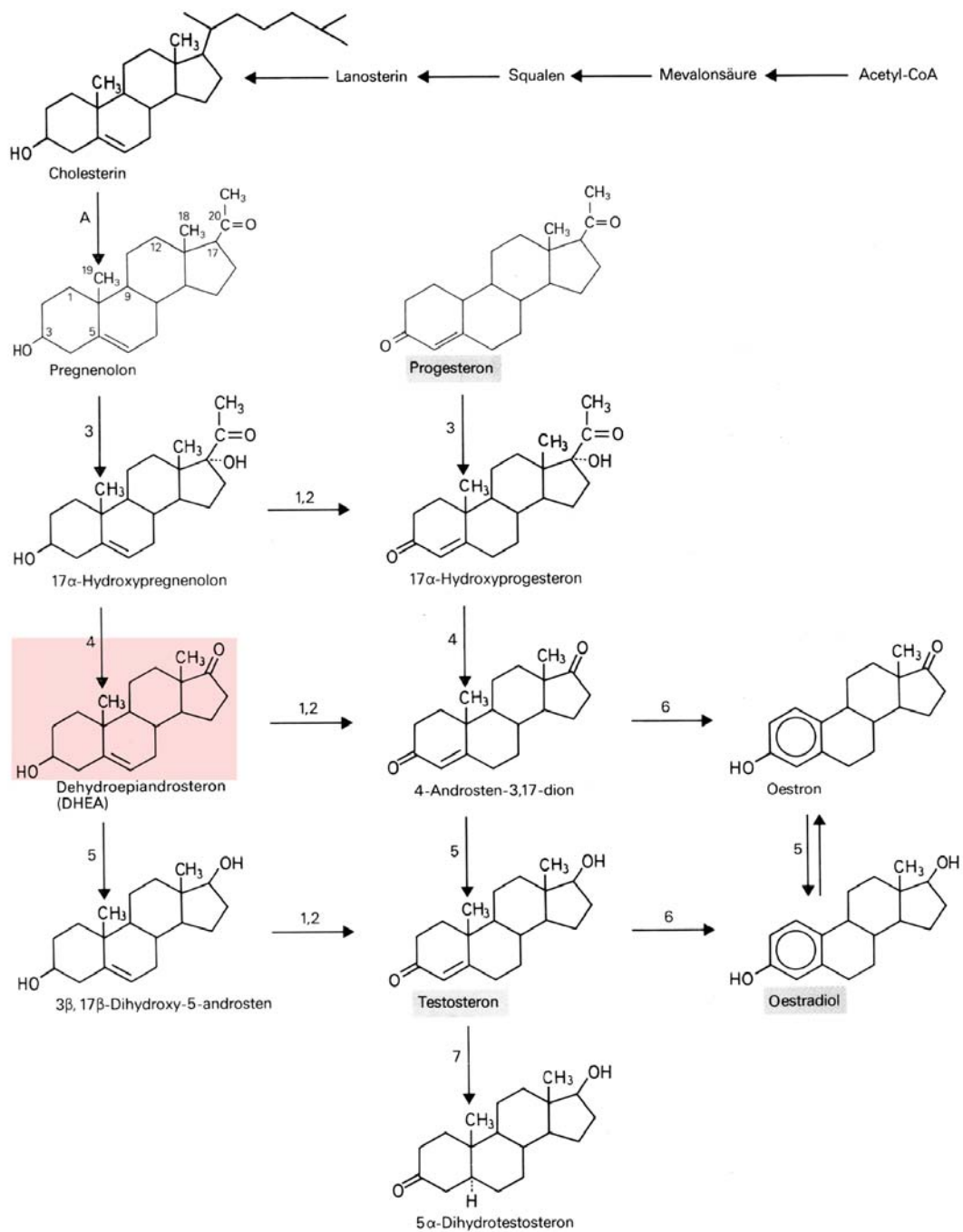


Abbildung 2.4.1-1: Genese von Sexualhormonen.

A: Pregnenolon-Synthetase

2: $\Delta^{4,5}$ -Isomerase

4: C-17,20-Lyase

6 : Aromatase

Aus: Forth, 1992

1: 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

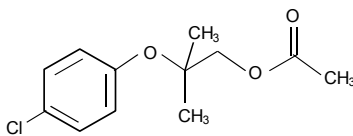
3: Steroid-17 α -Monooxygenase

5: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

7 : 5 α -Reduktase

In einem Lifecycle-Versuch mit dem Zebrafisch (*Danio rerio*), durchgeführt von Dr. Ute Bieberstein, wurden Zebrafische vom Ei bis zum Erreichen der Geschlechtsreife mit DHEA belastet. Von den Kontrollen und Tieren, die mit 100 µg/l DHEA belastet wurden, wurden elektronenmikroskopische Präparate angefertigt und morphometrisch ausgewertet, um eventuell auftretende Veränderungen in der Zusammensetzung der Hepatocyten zu erfassen. Vermessen wurden Kerne, Mitochondrien, Peroxisomen und Lipidtropfen.

2.4.2 Clofibrat



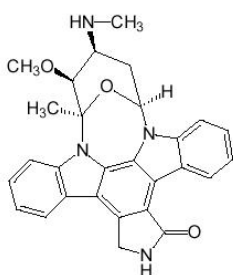
Clofibrat (Handelsname: Atromid S, Regelan) wird in der Medizin als Blutlipidsenker eingesetzt. Während es in Deutschland nicht mehr vertrieben wird, kann es in angrenzenden Ländern wie der Schweiz noch gekauft werden. Die Applikation führt zu einer Verringerung der Triglyceridlevel als auch des Cholesteringehalts im Blut. Die Applikation von Clofibrat führt in Kleinsäugetieren zu einer starken Zunahme von Peroxisomen in verschiedenen Organen (Furukawa *et al.*, 1984; Fringes *et al.*, 1988). Bei Laborversuchen mit Ratten zeigte sich, dass die Applikation von Clofibrat zur Entwicklung von hepatoären Carcinomen führte (Svoboda und Azarnoff, 1979). Eine direkte DNA schädigende Wirkung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Initialisierung des carcinogenen Effekts ist bisher nicht einwandfrei aufgeklärt. Beim Menschen konnte sowohl die Proliferation von Peroxisomen und die Entwicklung von hepatoären Tumoren bisher nicht nachgewiesen werden (zusammengefasst in Cohen und Grasso, 1981).

2.4.2.1 Durchgeführte Untersuchungen

Primäre Hepatocyten aus der Regenbogenforelle wurden mit 0,5 und 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von bis zu 8 Tagen belastet. Untersucht wurden sowohl lichtmikroskopisch erkennbare Veränderungen in der Chromatinstruktur durch Anfärbung mit Ethidiumbromid, Propidiumiodid, Acridinorange und Hoechst 33342 (alle Sigma). Zum Nachweis aktiver Caspase 3 nach Belastung mit Clofibrat wurde PhiPhiLux® (Alexis, Grünfeld) in lebenden Hepatocyten benutzt. Ferner wurden Westernblots mit polyklonalen Antikörpern gegen humane Caspase 3 (Pharmingen, Hamburg) und monoklonalen Antikörpern gegen humanes p53 (Pharmingen) durchgeführt. Eventuell auftretender DNA-Abbau wurde durch Isolierung der DNA und anschließender Elektrophorese überprüft. Ferner wurden Proben für ultrastrukturelle Untersuchungen aufbereitet.

RTG-2-Zellen aus der Gonade der Regenbogenforelle wurden mit Konzentrationen von 0,5 und 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von bis zu 2 Tagen belastet. Die Belastung erfolgte als einmaliger Austausch von 50 % des Kulturmediums durch schadstoffhaltige Nährlösung. Untersucht wurden Aktivierung der Caspase 3 und Veränderungen der Chromatinstruktur.

2.4.3 Staurosporin



1977 charakterisierten Omura *et al.* eine Substanz aus einer *Streptomyces*-Art, die im Verlauf der Substanzklassifizierung als eine neue Verbindung beschrieben wurde. Es stellte sich heraus, dass diese Substanz ein starker Inhibitor von Proteinkinasen war (Ruegg und Burgess, 1989; Groundwater *et al.*, 1996). Die Hemmung solcher Enzyme führt in Zellen zur Induktion der Apoptose (Tan *et al.*, 1998). Threoninkinasen spielen auch bei der Transformierung zu Krebszellen eine große Rolle, da es durch Phosphorylierungen zur Aktivierung von Protoonkogenen kommt (Taylor *et al.*, 1993; Bonig *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin über einen Zeitraum von 3 Tagen behandelt und darauf hin für ultrastrukturelle Untersuchungen aufbereitet.

2.4.4 Bestrahlung von isolierten Hepatocyten mit ultravioletttem Licht

Isolierte Hepatocyten wurden nach 24 Stunden in Kultur für 10 Minuten ultraviolettem Licht (314 nm) ausgesetzt. Proben wurden direkt vor und direkt nach der Bestrahlung, sowie nach 2, 4, 6, 9, 22, 24, 26, 28, 30, 54 und 100 Stunden genommen. Mit 4 % Formaldehyd (frisch aus Paraformaldehyd hergestellt) fixierte Hepatocyten wurden mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbt, um zwischen dem Anteil lebender und toter Zellen zu unterscheiden, als auch zur Untersuchung der Chromatinverteilung im Zellkern. Präparate für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden ebenfalls angefertigt und schließlich Zellhomogenate im Westernblot mit Antikörpern gegen

Caspase 3 und p53 sowie Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) inkubiert und ausgewertet.

2.5 Cytotoxizitätstests

Zur Festlegung der zu untersuchenden Konzentrationen bei den Versuchen mit isolierten Hepatocyten wurden zunächst Cytotoxizitätstests an RTG-2-Zellen durchgeführt. Da sich diese Zellen bekannterweise durch ihre geringen metabolischen Fähigkeiten zur Detoxifizierung auszeichnen, können in diesem Ansatz hohe Konzentrationen getestet werden und so einen Hinweis darauf geben, in welchen Konzentrationsbereichen die Untersuchungen an isolierten Hepatocyten durchgeführt werden sollten.

2.5.1 Durchführung

Kulturflaschen, die konfluent mit RTG-2-Zellen bewachsen waren, bieten genügend Zellen für den Cytotoxizitätstest. Das Medium wurde aus diesen Flaschen entfernt und die Zellen mit 10 ml 0,15 M PBS ohne Kalzium und Magnesium gewaschen. Darauf folgend wurden 2 ml Dissoziationslösung (0,05 % Trypsin/0,02% EDTA-Lösung in 0,15 M PBS ohne Kalzium und Magnesium, pH 7,5) in die Flaschen pipettiert, wodurch durch Komplexbildung zweiwertiger Ionen und den enzymatischen Abbau von Oberflächenproteinen die Zellen in den Flaschen abgelöst wurden. Die Proteinverdauung wurde, nachdem sich die Zellen vom Boden der Kulturflaschen gelöst haben, mit 10 ml PBS, das Kalzium und Magnesium enthält, abgestoppt. Die RTG-2 Zellen wurden daraufhin durch Aufziehen und Ausblasen mit einer 10 ml Pipette vereinzelt. Der Zelltitel wurde auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 100 μ l dieser Suspension wurden in je ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Diese Platten wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden bei 20 °C inkubiert, um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten.

Nach dieser Inkubationszeit wurde zunächst das Medium aus den Testplatten entfernt und in jedes Well wurden 200 μ l schadstoffhaltiges Medium gegeben. In je einer Spalte wurden immer gleiche Konzentrationen eingesetzt, so dass man je 8 Werte pro Konzentration erhielt. Die erste und die letzte Spalte dienten als Blindwert, das heißt dort wurde nur Medium ohne Zellen eingesetzt. Die zweite und elfte Spalte der Platte dienten als Kontrolle. Somit verblieben 8 Spalten für verschiedene Schadstoffkonzentrationen (Abb.: 2.5.1-1. Die Schadstoffkonzentration wurde in Verdünnungsschritten von je 1:1 in die einzelnen Spalten ausgebracht. Die Platten wurden daraufhin für 24 bzw. 48 Stunden bei 20 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium aus den Wells entfernt und je 100 μ l Neutralrotlösung (0,4 % Neutralrot in Aqua bidest, 1:80 in Medium 199 verdünnt) in jedes Well pipettiert. Neutralrot wird von intakten Zellen in die Lysosomen aufgenommen und gespeichert. Die Änderung der elektrischen Ladung

von Neutralrot durch das saure Milieu in den Lysosomen verhindert die Diffusion aus diesen Organellen. Nach einer Inkubation von 3 Stunden wurde das Färbemedium entfernt, und die einzelnen Wells wurden mit je 150 µl PBS gewaschen, der Puffer wurde entfernt, und in jedes Well wurden 150 µl Elutionslösung (50 % Ethanol, 1 % Essigsäure in Aqua bidest) gegeben und das Neutralrot durch 15-minütiges Schütteln aus den Zellen freigesetzt. Mit einem Spektralphotometer (SLT, Crailsheim) wurde die Extinktion des rückgelösten Neutralrots in den Wells bei einer Messwellenlänge von 540 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm bestimmt (Software: SLT-Easybase; NR-BMFT).

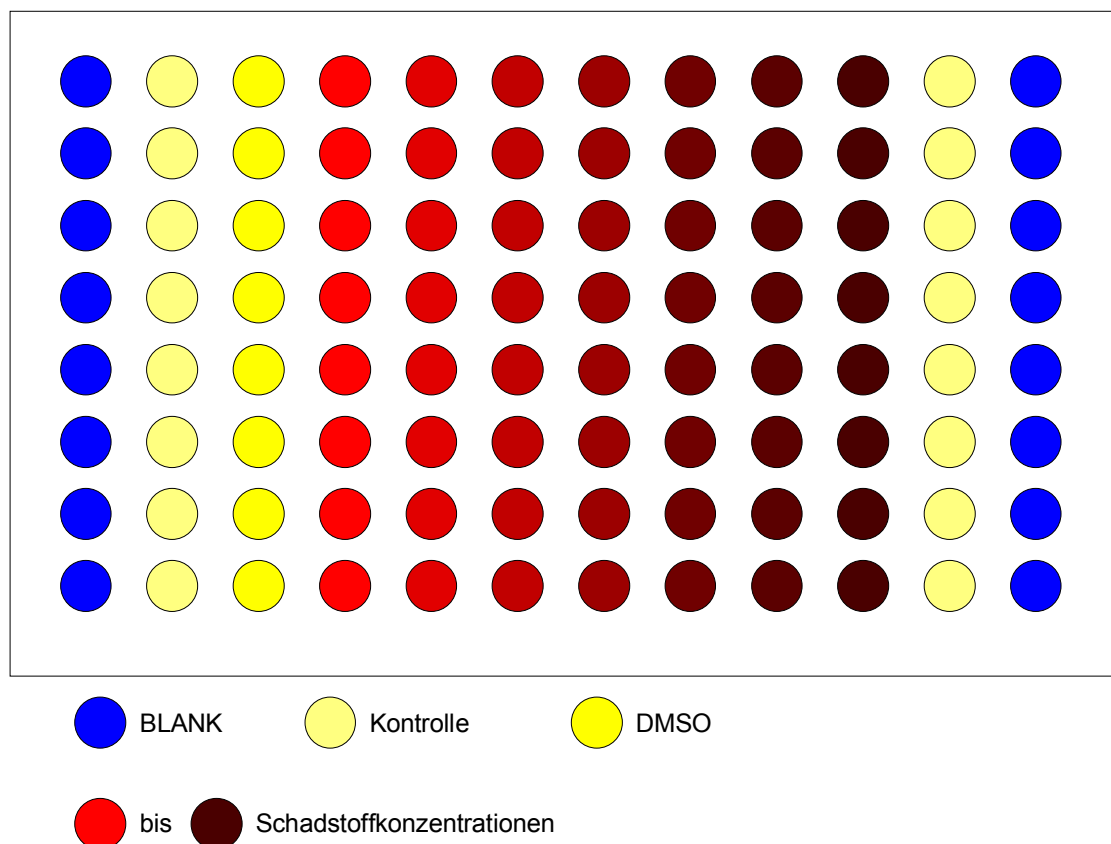


Abbildung 2.5.1-1: Pipettierungsschema für Cytotoxizitätstests

2.5.1.1 Clofibrat

Als höchste Clofibratkonzentration wurden 5 mM in 0,5 % DMSO (Endkonzentration) eingesetzt. In Verdünnungsschritten von 1:1 wurden folgende Konzentrationen getestet: 5; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3; 0,15 und 0,08 mM. Als Kontrollen dienten sowohl Zellen, die nur Medium erhielten, als auch RTG-2 Zellen, die mit 0,5 % DMSO belastet wurden.

2.5.1.2 DHEA

Cytotoxtests mit DHEA wurden in einem Konzentrationsbereich von 1000 bis 15 μM (in Verdünnungsschritten von 1:1) getestet. Als Kontrollen dienten wiederum Zellen in reinem Medium Zellen und RTG-2 Zellen, die mit 0,5 % DMSO inkubiert wurden.

2.6 Aufbereitung der Zellen für biochemische Untersuchungen an isolierten Hepatocyten

2.6.1 Zellernte

Nach Abschluss des jeweiligen Versuchs wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit je 100 μl Homogenisierungspuffer (2 M Saccharose, 20 mM MOPS, pH 7,4, 10 mM/1% EDTA/Ethanol, 0,1 M Phenylmethylsulfonylfluorid in Isopropanol, 130 mg/L ϵ -Aminocapronsäure, 0,3 M Mercaptoethanol, 670 mg/L Dithiothreitol) pro Well aus den Kulturgefäßen gewaschen, in Eppendorfcups überführt und bei 600 g und 4 °C für 7 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.6.2 Homogenisierung

Die in den Versuchen gewonnenen tiefgefrorenen Zellpellets wurden aufgetaut und mittels eines Polytron PT 1200 C Dispergiergerät (Kinematica, Luzern, Schweiz) für 30 s auf Eis aufgebrochen. Die erhaltenen Homogenate wurden sofort der Proteinbestimmung unterzogen und unmittelbar darauf bei -80 °C eingefroren.

2.6.3 Proteinbestimmung für Westernblotting

Je 10 μl Zellhomogenat wurden 1:50 mit Homogenisierungspuffer verdünnt; davon wurden 10 μl für 15 Minuten mit 250 μl Bradfordlösung (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 95% Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure, ad 1000 ml mit Aqua bidest; Bradford, 1976) inkubiert und gegen eine Eichreihe bekannter Proteinkonzentrationen (0,4; 0,2; 0,1; 0,05 und 0,025 mg/ml BSA (Sigma, Deisenhofen)) bei 595 nm spektrophotometrisch (Spectra-Photometer, Auswertungssoftware Spectra-Easybase) gemessen.

2.7 Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden auf Thermanoxplättchen (Nunc, Wiesbaden) kultivierte Zellen benutzt. Die Fixierung erfolgte direkt in den 24-Well-Platten auf Eis bzw. bei 4°C im Kühlschrank. Das Medium wurde aus den Wells entfernt und durch ein Formaldehyd-Glutardialdehyd Gemisch (1,5 % Formaldehyd, 1,5 % Glutardialdehyd, 4 % Polyvinylpyrrolidon in Phosphatpuffer, pH 7,6) ersetzt. Am folgenden Tag erfolgte ein Austausch des Fixierungsmittels mit 1 mL 2,5% Glutardialdehyd-Lösung in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) mit 4 % Polyvinylpyrrolidon (PVP; Serva, Heidelberg) und 0,05 % CaCl₂. In dieser zweiten Fixierlösung wurden die Proben für mindestens 1 Stunde belassen. Nach der Fixierung erfolgte dreimaliges Waschen in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) für jeweils 10 Minuten. Zur Nachfixierung der Membranen und der Glykogenanteile wurden die Zellen für 60 Minuten in reduzierter Osmiumlösung (1:1 Gemisch aus 2 % Osmiumtetroxidlösung und K₄(Fe(CN)₆) = Osmiumferrocyanit) nach Karnovsky (1971) bei 4°C fixiert. Danach wurde nochmals für dreimal 10 Minuten in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,6) gewaschen und anschließend dreimal für je 10 Minuten in 50 mM Maleatpuffer (pH 5,2) gespült. Nach Abziehen des Maleatpuffers aus den Wells wurden die Zellen über Nacht in 1 % Uranylacetat (in 50 mM Maleatpuffer, pH 5,2) *en bloc* kontrastiert. Am nächsten Tag wurde das Uranylacetat durch Waschen mit Maleatpuffer entfernt. Die Entwässerung der Proben erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe mit je drei Waschschrritten in vier verschiedenen Ethanolkonzentrationen (75 %, 85 %, 95 % und 100 %). Die ersten drei Entwässerungsschritte erfolgten mit kaltem Ethanol, während der reine Ethanol ungekühlt angewendet wurde. Die Einbettung in Spurr's Medium (Spurr, 1969) erfolgte durch schrittweises Ersetzen des Ethanols durch Spurr, um die Durchdringung des Gewebes durch das Kunstharz zu erleichtern. Im ersten Schritt wurde ein 1:1-Gemisch aus Spurr und Ethanol für eine Stunde verwendet, im zweiten Schritt erfolgte die Inkubation mit einem Gemisch von 3:1 Spurr:Ethanol über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gemisch aus den Wells entfernt und durch reines frisches Spurr ersetzt. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Einbettung in Beemkapseln. Die Thermanoxplättchen mit dem festgehefteten Zellrasen wurden aus den Wells genommen, in vier Teile geschnitten und mit dem Zellrasen nach unten auf die mit Spurr gefüllten Beemkapseln gelegt. Die Polymerisation erfolgte über 48 Stunden bei 70°C. Danach befanden sich die Hepatocyten im Einbettmedium, so dass die Thermanoxplättchen von den Beem-Kapseln entfernt werden konnten.

Von den Proben wurden Ultradünnschnitte mit einem Diamantmesser auf einem Ultramikrotom (Reichert, OM-U-2) angefertigt und zur Verstärkung des Kontrasts mit Bleicitrat (Reynolds, 1963) gefärbt. Die Auswertung der Ultrastruktur der isolierten Hepatocyten erfolgte an einem Zeiss EM 10.

2.8 DNA-Färbungen in Zellen

Lebende Zellen lassen sich mit verschiedenen Farbstoffen anfärben. Die Art der Bindung ist von Substanz zu Substanz verschieden. Während dieser Promotionsarbeit wurden drei verschiedene DNA-Färbemethoden angewandt.

2.8.1 Acridinorange/Ethidiumbromid Kombinationsfärbung

Sowohl Acridinorange als auch Ethidiumbromid interkalieren in die DNA. Während Acridinorange in der Lage ist, die Zellmembran zu durchdringen, kann Ethidiumbromid nur in Zellen mit geschädigter Zellmembran eindringen. Durch die Kombination dieser beiden Farbstoffe ist es möglich, zwischen lebenden und toten Zellen zu differenzieren. Die Zellen wurden mit 10 µl einer 1:1-Mischung aus je 10 mg/ml Acridinorange und Ethidiumbromid in PBS gefärbt und unter einem Leitz Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.8.2 Hoechst 33342

Im Gegensatz zu den beiden genannten DNA-Farbstoffen interkaliert Hoechst 33342 nicht in die DNA, sondern bindet an Adeninreste. Die Zellen wurden mit 10 µl einer 10 mg/ml Stammlösung gefärbt und unmittelbar nach der Färbung der Auswertung unter einem Leitz Fluoreszenzmikroskop unterzogen.

2.8.3 Propidiumiodid

Wie Ethidiumbromid ist auch Propidiumiodid (PI) nicht in der Lage, in lebende Zellen mit intakter Zellmembran einzudringen. In der Zelle interkaliert PI in die DNA. 10 µl einer 10 mg/ml PI-Lösung in PBS wurden zu je 2 ml Zellsuspension gegeben. Diese Färbung wurde zusammen mit dem Nachweis von aktiver Caspase 3 in Zellen durchgeführt, um eine Differenzierung von apoptotischen und nekrotischen Zellen zu ermöglichen.

2.9 Nachweis aktiver Caspase 3-artiger Enzyme in lebenden Zellen

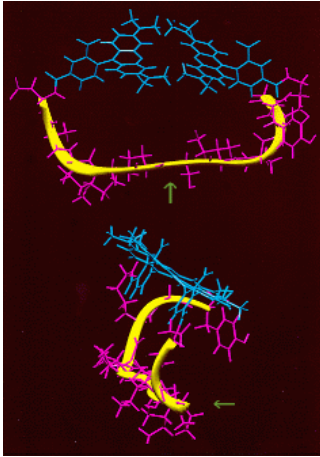


Abbildung 2.9-1: PhiPhiLux, die beiden gekoppelten FITC-Moleküle sind blau dargestellt. Der grüne Pfeil markiert die Spaltungsstelle (von: <http://www.phiphilux.com>)

Caspasen stellen eine Gruppe von Proteasen dar, die in ihrem aktiven Zentrum einen an der Reaktion beteiligten Cysteinrest besitzen und Zielproteine hinter einem Asparaginsäurerest spalten. Im normalen Zustand einer Zelle liegen die Caspasen in inaktiven Vorstufen (Procaspasen) vor. Bestimmte Stimuli sorgen bei der Initiierung der Apoptose für die Abspaltung der Prodomäne, was in der Aktivierung der jeweiligen Caspasen resultiert. Die Spezifität der Caspasen auf Asparaginsäuren wird durch Aminosäuren an der P4-Position (AS in Richtung des N-Terminus) weiter verfeinert. So spaltet die Caspase 3 (CPP32) bevorzugt hinter Asparaginsäureresten (zum C-Terminus) wenn an der P4 Position ein weiterer Asparaginsäurerest liegt. Dies lässt sich zum Nachweis aktivierter Caspase 3 nutzen, indem man dem

Enzym ein Substrat mit der bevorzugten Aminosäuresequenz anbietet. Im Rahmen dieser Dissertation wurde PhiPhiLux[®] (Alexis, Grünfeld) benutzt. Es handelt sich dabei um eine Peptid, welches mit zwei Molekülen FITC gekoppelt ist (Abbildung 2.9-1). Im Peptid gibt es eine klassische Spaltungsstelle für die Caspase 3. Im intakten Zustand beeinflussen sich die beiden Farbstoffmoleküle, so dass eine Anregung zur Fluoreszenz nur ein schwaches Leuchten hervorbringt. Nach Spaltung des Peptids entfällt diese Interaktion der beiden Farbstoffmoleküle und die Fluoreszenz wird erheblich stärker. Da das Peptid mit gekoppeltem Farbstoff von lebenden Zellen aufgenommen wird, kann die Aktivierung der Caspase 3 direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet und dokumentiert werden.

2.9.1 Aktivierung der Caspase 3 in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat

Zur Untersuchung der Aktivierung von Caspase 3 in Hepatocyten der Regenbogenforelle nach Belastung mit 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von 3 Tagen wurde nach Ende des Inkubationszeitraums das Medium vorsichtig aus den Kulturgefäßen entfernt, so dass der Zellrasen unbeschädigt blieb. Darauf folgend wurden je 50 µl des PhiPhi-

Lux-Substrats zu den Zellen hinzugefügt und für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Danach wurden die Hepatocyten durch vorsichtiges Aufziehen und Ausblasen mit einer Eppendorfpipette vom Untergrund der 24-Well-Platten abgelöst und auf einen Objektträger übertragen und unmittelbar danach unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.9.2 Aktivierung der Caspase 3 in RTG-2 Zellen nach Belastung mit Clofibrat

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der aktiven Caspase 3 in RTG-2-Zellen nach einer Belastung mit 0,5 mM Clofibrat für 60-180 Minuten nachgewiesen. Dazu wurden RTG-2-Zellen auf 8-Well Permanox[®] Chamber-Slides[®] (Nunc) ausgesät und über 24 Stunden bei 18°C inkubiert, um ein gutes Anwachsen der Zellen zu sichern. Danach wurde das Medium aus den Kammern entfernt und mit schadstoffhaltigem Medium ersetzt. Die Inkubation wurde nach 60, 120 und 180 Minuten gestoppt. Das schadstoffhaltige Medium wurde vorsichtig aus den Inkubationskammern entfernt und durch je 40 µl PhiPhiLux-Lösung ersetzt. Die Zellen wurden daraufhin im Dunkeln bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert. Danach wurde die Nachweislösung sehr vorsichtig entfernt, der Kammeraufsatz von den Objektträgern abgelöst und die Zellen mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auswertung erfolgte sofort danach unter einem Leitz Aristoplan Fluoreszenzmikroskop.

2.10 Herstellen einer Mitochondrienfraktion

Regenbogenforellen wurden direkt nach der Entnahme aus dem Aquarium durch einen Schlag auf den Kopf getötet. Die Leibeshöhle wurde ventral eröffnet und eine Flügelkanüle in die Pfortader eingeführt. Der Sinus venosus wurde durch einen Schnitt eröffnet, so dass Blut ungehindert austreten konnte. Die Leber wurde daraufhin mit 0,9 % NaCl-Lösung gespült, bis alles Blut aus der Leber entfernt war. Die Leber wurde nach der Perfusion entnommen und auf Eis in einem Becherglas mit dem doppelten Lebervolumen an Homogenisierungspuffer mittels einer Schere in kleine Stücke zerschnitten. Dieses Leber/Puffergemisch wurde daraufhin in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 300 Umdrehungen pro Minute durch 20 Auf- und Abwärtsbewegungen homogenisiert. Das so erhaltene Rohhomogenat wurde für 10 Minuten bei 50 g und 4°C zentrifugiert, nochmals im Potter homogenisiert und wiederum bei 4°C für 10 Minuten bei 50 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde dann einer weiteren Zentrifugation bei 19.000 g für 20 Minuten und 4°C unterzogen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in insgesamt 2 mL komplettem Medium aufgenommen, in 50 µl Aliquots portioniert und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.11 Westernblot

Verschiedene Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind, wurden auf Veränderungen des Gehalts in Hepatocyten der Regenbogenforelle mit Hilfe von Westernblots untersucht.

2.11.1 Durchführung Westernblot

Dem Homogenat wurde ein Volumen, das 15 µg Protein entsprach, entnommen und das gleiche Volumen von SDS-Probenpuffer (200 mM TRIS; pH 6,8; 40 % Glycerin, 0,3 % Dithiotreitol, 4 % Natriumdodecylsulfat, 0,025 % Bromphenolblau) zugesetzt. Nach 20-minütigem Kochen wurden die Proben in die Taschen eines Acrylamid/Bisacrylamid-Gels (Mischungsverhältnis 37,5:1, Biorad, München) eingeführt. Die Konzentration des Acrylamid/Bisacrylamid-Gemischs betrug im Sammelgel 3,8 % und im Trenngel 10 %. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Im Sammelgel betrug die Stromstärke 15 mA pro Gel, während sie im Trenngel auf 25 mA pro Gel erhöht wurde.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele aus den Halterungen genommen und in Blotpuffer (20 mM TRIS, 150 mM Glycin, 20 % Methanol) überführt. Als proteinaufnehmende Membran diente eine PVDF-Membran (Immobilon[®] Serva, Heidelberg), die zuvor für 30 Sekunden in Methanol eingelegt und daraufhin dreimal eine Minute in Aqua bidest gewaschen wurde. Nach dieser Prozedur wurde die Membran ebenfalls in Blotpuffer überführt. Die Übertragung der Proteine erfolgte in einer Semidry-Blotkammer (Biorad, München). Auf die Platinelektrode wurde eine Lage in Blotpuffer getränktes extra dickes Filterpapier (Biorad, München), die Immobilon-Membran, dann das Gel und darauf nochmals eine Lage in Blotpuffer getränktes extra dickes Filterpapier luftblasenfrei aufgelegt. Die Kammer wurde verschlossen und der Blot gestartet. Das Übertragen der Proteine auf die Membran erfolgte bei 0,8 mA pro cm² Blotfläche für 40 Minuten. Nach Abschluss des Blottens wurde die Membran in PBS-Puffer (0,15 M; 137 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 1,66 mM NaH₂PO₄, 9,58 mM Na₂HPO₄; pH 7,4; 0,05 % Tween 20) für dreimal 10 Minuten gewaschen. Blockiert wurde die Membran mit 5 % entfettetem Milchpulver in PBS-Puffer über einen Zeitraum von 2 Stunden. Der erste Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS mit 1 % Milchpulver über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten in PBS-Puffer gewaschen und dann für 2 Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Je nach Art des primären Antikörpers (monoklonal oder polyklonal) wurden sekundäre Antikörper benutzt, die entweder Maus- oder Kaninchen-IgG spezifisch waren. Bei diesen sekundären Antikörpern handelte es sich um handelsübliche IgGs (Biorad oder Sigma, Verdünnung 1:3000 in PBS-Puffer mit 1 %

entfettetem Milchpulver). Das Antikörperkonjugat war entweder Peroxidase oder alkalische Phosphatase, abhängig von der benutzten Nachweisreaktion. Nach Abschluss der Antikörperreaktion wurden die Membranen in PBS-Puffer (0,05 % Tween) gewaschen und der Färbereaktion unterzogen. Jede Membran, die mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper behandelt worden war, wurde in einem 1:1 Gemisch der beiden ECL-Lösungen für 1 Minute inkubiert. Das entstehende Lichtsignal wurde zur Belichtung von Photoplatten (Kodak ML) benutzt. An den Stellen, an denen eine spezifische Bindung des sekundären Antikörpers stattfand, trat auf den Photoplatten eine Schwärzung auf.

Die Auswertung der Blots erfolgte durch Scannen der entwickelten Photoplatten. Die so digitalisierten Blots wurden mittels der Software E.A.S.Y (Herolab, Wiesloch) densitometrisch ausgewertet. Die Blotmembranen selbst wurden mit Coomassie Blau gefärbt, um die Gesamtmenge der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Die Membranen wurden daraufhin ebenfalls gescannt und densitometrisch ausgewertet. Die Intensitäten der geschwärzten Banden auf den Photoplatten wurden durch die Intensitäten der Gesamtproteine dividiert und als relative Farbintensitäten berechnet und in einem Tabellenkalkulationsprogramm weiter ausgewertet und grafisch dargestellt.

2.11.1.1 p53

Monoklonale Antikörper gegen humanes p53 (Klon: Pab 240, Pharmingen, Hamburg) wurden benutzt. Ansonsten wurde der Westernblot wie beschrieben durchgeführt.

2.11.1.2 Caspase 3 (Apopain, CPP32)

Zum Nachweis von Caspase 3 in isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle wurde ein polyklonales Antiserum gegen Caspase 3 des Menschen (Pharmingen) benutzt. In Abweichung zum allgemeinen Teil der Durchführung des Westernblots wurden hier in jeder Tasche der Gele jeweils 60 µg Protein aufgetragen.

2.11.1.3 Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) versieht mRNAs mit dem PolyA-Schwanz. Sie ist aber auch ein Zielprotein der Caspase 3 und wird im Verlauf der Apoptose gespalten. Somit können im Westernblot beim Vorhandensein von aktiver Caspase 3 neben einer Bande von intaktem PARP auch weitere Banden des gespaltenen Proteins gefunden werden. Benutzt wurden polyklonale Antikörper gegen PARP aus der Maus (Pharmingen).

2.11.1.4 Cytochrom c

Cytochrom c befindet sich als Holoenzym im Intermembranraum der Mitochondrien. Während der Apoptose, in der auch die Mitochondrien involviert sind, kommt es zur Freisetzung des Enzyms durch Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran in das Cytosol. Somit kann in apoptotischen Zellen Cytochrom c außer in den Mitochondrien auch im Cytosol durch Westernblotting nachgewiesen werden. Benutzt wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Cytochrom c aus der Maus.

Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle wurden über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 1 mM Clofibrat belastet, anschließend homogenisiert und der Proteingehalt bestimmt. Von den Mitochondrienfraktionen wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein in einzelne Reaktionsgefäße überführt und mit Zellhomogenaten der belasteten und unbelasteten Zellen über einen Zeitraum von 2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Proben zur Trennung der Mitochondrien von den Homogenaten für 20 min bei 19000 g zentrifugiert und anschließend Westernblots von den Überständen und den Mitochondrienfraktionen mit dem Antikörper gegen Cytochrom c durchgeführt.

2.12 DNA-Degradationsuntersuchungen

2.12.1 DNA-Isolation

DNA aus isolierten Hepatocyten der Regenbogenforelle wurde mit dem Qiagen DNEasy Tissuekit (Qiagen, Hilden) isoliert. Nach der Belastung mit verschiedenen Clofibratkonzentrationen wurde das Medium aus den Wells der Kulturplatten entfernt. Daraufhin wurden 100 µl PBS zu den einzelnen Wells hinzugefügt und die Zellen mit einer Eppendorfpipette vom Untergrund der Wells abgelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die Hepatocyten wurden bei 500 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl frischem PBS aufgenommen und resuspendiert. Zum Proteinabbau wurden 20 µl Proteinase K-Lösung hinzugefügt und bei 70°C inkubiert bis keinerlei Zellbestandteile mehr erkennbar waren. Nach Abschluss des Proteinabbaus in den Proben wurden 200 µl Ethanol in die Eppendorfgefäße hinzugefügt. Dieses Gemisch, inklusive vorhandener Präzipitate, wurde daraufhin in mitgelieferte Zentrifugationsröhrchen (DNEasy Spin column), welche in 2 ml Eppendorfgefäße gesteckt wurden, überführt und anschließend bei Raumtemperatur für 1 min bei 7500 g zentrifugiert. Die Zentrifugationsröhrchen wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und 500 µl des Puffers AW1 hinzugefügt. Danach wurde erneut für 1 min bei 7500 g zentrifugiert, die Zentrifugationsröhrchen in neue Eppendorfgefäße gesteckt, 500 µl des Puffers AW2 zugegeben und bei Raumtemperatur für 3 min bei 12000 g zentrifugiert.

Die Röhrcchen wurden in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße gesteckt, auf die Membran der Zentrifugationsröhrcchen wurden 200 µl AE-Puffer gegeben und 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss dieser Inkubation wurde erneut bei 7500 g für 1 min zentrifugiert. Die Zentrifugationsröhrcchen verblieben in den Eppendorfgefäßen, es wurden nochmals 200 µl AE-Puffer auf die Membran gegeben, inkubiert und dann nochmals zentrifugiert. Somit erhält man aus jeder Probe 400 µl DNA-haltige Lösung.

2.12.2 DNA-Elektrophorese

30 µl der isolierten DNA wurden in je eine Tasche eines 20 x 34 cm großen 2 % Agarosegels in TBE-Puffer (89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 250 µM EDTA, pH 8,0) überführt. Die Elektrophorese erfolgte für 14 - 16 Stunden bei 60 V. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml Wasser) gefärbt und mittels einer Sony CCD-Kamera und der Analysesoftware E.A.S.Y. (Herolab, Wiesloch) ausgewertet.

2.13 Morphometrie

Isolierte Hepatocyten der Regenbogenforelle wurden nach dreitägiger Belastung mit 0,5 mM und 1 mM Clofibrat morphometrisch ausgewertet. Elektronenmikroskopische Bilder wurden bei einer Vergrößerung von 4000x an zufällig gewählten Stellen des Objekts erstellt. Pro untersuchter Konzentration wurden je 20 Bilder ausgewertet. Die Negative wurden auf ein Format von 17 x 19 cm belichtet. Diese Abzüge wurden mit einem Scanner digitalisiert und dann mit der Software SigmaScan (Jandel-SPSS, Erkrath) ausgewertet. Dazu wurde zunächst die reale Vergrößerung ermittelt und auf die Originalgröße (ohne Vergrößerung) zurück berechnet. Danach wurden die von Leberparenchym bzw. Hepatocyten eingenommenen Flächen auf den Bildern durch Umfahren mit der Computermaus ermittelt, so dass Blutgefäße und Fremdzellen in den Messungen unberücksichtigt blieben. Nach der Feststellung der Gesamtfläche wurden Anzahl, Fläche und Umfang von Zellkernen, Mitochondrien, Peroxisomen, Lysosomen, glattem und rauem endoplasmatischem Retikulum und des Golgi Apparates in gleicher Weise ermittelt und durch die Gesamtfläche geteilt bzw. auf eine Fläche von 10 µm² bezogen. Die so ermittelten Werte wurden statistisch mit der Software SigmaStat (Jandel-SPSS) ausgewertet und mit Microsoft Excel[®] grafisch aufbereitet.

Im Falle der mit 1 mM Clofibrat belasteten Zellen wurden nur Zellen vermessen, die nach drei Tagen Belastung nicht abgestorben waren oder Anzeichen des bevorstehenden Zelltods (z.B. Kondensierung von Chromatin) aufwiesen.
