

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie II der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**NFκB, Caspase 3 und Cytochrom c Oxidase:
Licht- und elektronenmikroskopische,
immunhistochemische sowie biochemische
Untersuchungen am GalN/TNF-α-Modell der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DAN TAPALAGA

Gießen 2003

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie II der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Betreuer: Prof. Dr. S. Angermüller

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. F. Hartig

**NFκB, Caspase 3 und Cytochrom c Oxidase:
Licht- und elektronenmikroskopische,
immunhistochemische sowie biochemische
Untersuchungen am GalN/TNF-α-Modell der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
DAN TAPALAGA
Tierarzt aus Schäßburg/Rumänien

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. S. Angermüller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Hartig

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 01. 2003

Meinen Eltern und meiner Frau

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	6
2. Literaturübersicht	8
2.1 Morphologie und Funktion der Leber	8
2.1.1 Struktur	8
2.1.2 Funktion	9
2.1.3 Hepatocyten	9
2.2 Zelltod: Nekrose und Apoptose	9
2.2.1 Nekrose	10
2.2.2 Apoptose	10
2.2.3 Morphologisches Erscheinungsbild der Apoptose	12
2.2.4 Mechanismen der Apoptose	12
2.2.5 Mitochondrien	14
2.2.5.1 Aufbau der Mitochondrien	14
2.2.5.2 Mitochondrien als zentraler Kontrollpunkt der Apoptose	14
2.2.5.3 Cytochrom c Oxidase	15
2.2.6 Cytokine	15
2.2.7 Signaltransduktion durch Tumor Nekrose Faktor	15
2.2.8 Caspasen: Schlüsselmediatoren des programmierten Zelltodes	16
2.2.9 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B	17
2.2.9.1 Struktur von NF- κ B	17
2.2.9.2 NF- κ B: Ein Baustein zur Funktionalität des TNF-Systems	18
2.2.9.3 Regulation von NF- κ B durch I- κ B Proteine	19
2.2.9.4 Erkrankungen mit Beteiligung von NF- κ B	20
2.2.10 Inhibitor Proteine: die I- κ B-Familie	20
2.2.10.1 I- κ B α	21
2.2.10.2 I- κ B β	21
2.2.10.3 I- κ B-Kinasen (IKK): der Schlüssel der NF- κ B Aktivierung	21
2.2.11 Apoptose und Erkrankungen	22

3. Material und Methoden	23
3.1 Versuchstiere	23
3.2 Versuchssubstanzen	23
3.2.1 Galaktosamin (GalN)	23
3.2.2 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)	23
3.2.3 Klinik und Mortalität	24
3.2.4 Antikörper	24
3.3 Morphologische Methoden	24
3.3.1 Perfusionsfixierung	24
3.3.1.1 Fixantien und Pufferlösungen	26
3.3.2 Microslicerschnitte	26
3.3.3 Nachfixierung mit wässrigem Osmiumtetroxid	26
3.3.4 Einbettung	26
3.3.4.1. Paraffineinbettung	26
3.3.4.2. Eponeinbettung	27
3.3.4.3. LR-White-Einbettung	27
3.3.5 Herstellung von Schnitten, HE-Färbung von LR-White-Semidünnschnitten, Kontrastierung von Ultradünnschnitten	28
3.3.5.1 Herstellung von Gewebeschnitten	28
3.3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung	28
3.3.5.3 Kontrastierung von Ultradünnschnitten	28
3.3.6 Elektronenmikroskopische Auswertung	29
3.3.7 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind	29
3.3.7.1 Entparaffinieren	29
3.3.7.2 Antigen-Freilegung und Hemmung der endogenen Peroxidase	29
3.3.7.3 Einsatz der Antikörper	30
3.3.8 Kernfärbung mit DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie	30
3.3.8.1 Eindeckeln der Präparate	30
3.3.9 TUNEL-Test	30
3.3.10 Lichtmikroskopische Auswertung	31
3.4 Biochemische Methoden	31
3.4.1 Homogenisation des Lebergewebes	31
3.4.2 Isolierung von Zellkernen und Cytosol aus Lebergewebe	31
3.4.2.1 Kernisolierung	31
3.4.2.2 Cytosol-Isolierung	32
3.4.3 Isolierung von Mitochondrien und Cytosol aus Lebergewebe	32
3.4.3.1 Mitochondrienisolierung	32
3.4.3.2 Cytosol-Isolierung	33
3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford	33
3.4.5 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten	33
3.4.5.1 Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität	33
3.4.5.2 Messung der Caspase 3-Aktivität	34
3.4.6 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35

3.4.6.1 Zusammensetzung der Gele	35
3.4.7 Western-Blotting, Immuninkubation und Detektion der Immunkomplexe	36
3.4.7.1 Western-Blotting und Immuninkubation	36
3.4.7.2 Inkubation mit den Antikörpern	37
3.4.7.3 Detektion der Immunkomplexe	37
3.4.7.4 »Strippen« von Blotmembranen	37
3.4.7.5 Färben und Trocknen von Gelen	37
3.5 Datenverarbeitung und Statistik	38
3.5.1 Digitalisieren von Gewebeschnitten, Gelen und Blots, sowie Quantifizierung von immunreaktiven Banden und der Caspase 3-Aktivität	38
3.5.2 Quantifizierung der apoptotischen Zellen	
3.5.3 Statistische Analyse	38
3.5.4 Verwendete Computersoftware	39
4. Ergebnisse	40
4.1 Klinische Befunde	40
4.2 Mortalität	40
4.3 Lichtmikroskopische Darstellung der Leberzellveränderungen	40
4.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung	41
4.3.2 DAPI-Färbung	41
4.3.3 TUNEL-Test in der Leber	41
4.3.4 Zeitlicher Verlauf der morphologischen Zellveränderungen 2 ½ bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung	41
4.4 Elektronenmikroskopische Darstellung präapoptotischer und apoptotischer Veränderungen	45
4.4.1 Veränderungen der Mitochondrien	45
4.4.2 Apoptotischer Hepatocyt	45
4.4.3 Morphologie apoptotischer Körperchen und Nekrose	45
4.5 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen	47
4.5.1 Cytochrom c Oxidase-Aktivität 2 ½ bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung	47
4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von NF- κ B und I κ B in Hepatocyten 10 Minuten bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung	49
4.5.2.1 NF- κ B 30 Minuten bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung	49
4.5.2.2 I κ B β 10 Minuten bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung	49
4.5.2.3 I- κ B α	51
4.6 Isolierung von Zellkernen und Cytosol mittels Zellfraktionierung	51
4.6.1 Mikroskopische Darstellung der Kernfraktion	51
4.6.2 Proteinmuster der isolierten Zellkerne und des Cytosols von Kontrolltieren	51
4.7 GalN/TNF- α induzierte Veränderungen der Proteinmenge an NF- κ B und I κ B in Cytosol- und Zellkernfraktionen	53
4.7.1 NF- κ B ist 30 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung im Zellkern deutlich nachweisbar	53
4.7.2 I κ B β -ein reines cytoplasmatisches Protein	55
4.7.3 Translokation von I- κ B α in den Zellkern	56

4.8 Enzymatischer Nachweis der Caspase 3 Aktivität	56
4.9 Mitochondrien nach GalN/TNF- α -Behandlung	57
4.9.1 Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase	57
5. Diskussion	60
5.1 Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes	61
5.2 GalN/TNF- α löst in Hepatocyten Apoptose aus	61
5.3 Morphologisches Erscheinungsbild der Apoptosen nach GalN/TNF- α -Behandlung	62
5.3.1 Histologische Veränderungen der Leberzelle innerhalb von 48 Stunden	62
5.3.2 Darstellung der apoptotischen Veränderungen mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie	62
5.4 Tumor Nekrose Faktor- α führt zum Zelltod (Apoptose, bzw. Nekrose) und Zellproliferation der Hepatocyten	63
5.4.1 Signaltransduktion durch TNF- α	63
5.4.2 Die TNF Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2	63
5.5 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird unter TNF- α Einwirkung aktiviert	65
5.5.1 Aktivierung und nukleäre Lokalisation von NF- κ Bp65 nach TNF- α -Behandlung	65
5.5.2 TNF- α -Behandlung führt zu einem Absinken der NF- κ Bp65-Konzentration im Cytosol	66
5.6 I- κ B Proteine reagieren unterschiedlich auf GalN/TNF- α Gabe	67
5.6.1 I- κ B α transloziert in den Zellkern und verhindert die Bindung von NF- κ B an DNA	67
5.6.2 I- κ B β : Ein strikt cytoplasmatisches Protein	68
5.7 Aktivierung der Caspase 3 als ein Weg zur Apoptose	70
5.8 Mitochondrienveränderungen während der Apoptose	71
5.8.1 Ausstülpung der inneren durch die eingerissene äußere Mitochondrienmembran	71
5.8.2 Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität ist ein Indikator für die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran	72
5.9 Fazit	73
6. Zusammenfassung	74
7. Summary	76
8. Literaturverzeichnis	78
9. Anhang	96
9.1 Laborgeräte	96
9.2 Chemikalien	97
9.3 Allgemeine Materialien	99
9.4 Fotomaterial	99
Publikationsliste	100
Danksagung	101

Abbildungsverzeichnis

1	Morphologische Veränderungen der Zelle während der Nekrose und der Apoptose.	11
2	Die Proteine der NF- κ B- und I- κ B-Familien und der Mechanismus der NF- κ B-Aktivierung.	18
3	Perfusionsfixierung der Mausleber über die Vena portae.	25
4	Kinetik über das Auftreten von Apoptosen und weiteren Veränderungen in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.	42
5	Kinetik über das Auftreten von Kernveränderungen in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.	43
6	TUNEL-Test	44
7	Elektronenmikroskopische Darstellung präapoptotischer und apoptotischer Veränderungen in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen nach 3 ½ und 4 ½ Stunden.	46
8	Elektronenmikroskopische Darstellung der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen nach 24h.	47
9	Kinetik der Aktivitätsveränderungen von Cytochrom c Oxidase in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.	48
10	Immunhistochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B und seines Inhibitors I κ B β in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.	50
11	Immunhistochemischer Nachweis des Inhibitorproteins I κ B α in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.	52
12	Mikroskopische Darstellung der Reinheit isolierter Zellkerne.	52
13	Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von isolierten Zellkernen und Cytosol.	53
14	TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg von NF- κ B im Zellkern 2 ½ Stunden nach der Behandlung.	54
15	TNF- α führt zu einem kontinuierlichem Absinken von NF- κ B im Cytosol bis 2 ½ Stunden nach der Behandlung.	54
16	TNF- α führt zu einem kontinuierlichem Absinken von I- κ B β im Cytosol bis 2 ½ Stunden nach der Behandlung.	55
17	TNF- α führt zu einer Translokation von I- κ B α in den Zellkern schon 30 Minuten nach der Behandlung.	56

18	TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg von Caspase 3 im Cytosol 3 ½ Stunden nach der Behandlung.	57
19	TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg der Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Gesamthomogenat 8 Stunden nach der Behandlung.	58
20	TNF- α führt zunächst zu einem Absinken der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in den mitochondrialen Fraktionen 2 ½ Stunden nach der Behandlung.	59
21	Signalkomplexe von TNF-R und CD95 und mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Komplexen	64

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die verwendeten Antikörper.	24
2	Übersicht über die verwendete Computersoftware.	39

Abkürzungsverzeichnis

abs.	–	absolut
A. dest.	–	destilliertes Wasser
ALB	–	Albumin
AP-1	–	Activator Protein-1
APS	–	Ammoniumpersulfat
BSA	–	Bovines Serumalbumin
BSA-c	–	Acetyliertes Rinderserumalbumin
CHAPS	–	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat
DaG	–	Esel-anti-Ziege
DAB	–	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DDSA	–	2-Dodecenyln-Bernsteinsäureanhydrid (Epon-Härter)
DMP 30	–	2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)-Phenol (Epon-Beschleuniger)
DMSO	–	Dimethylsulfoxid
DTT	–	Dithiothreitol
dUTP	–	2'-deoxy-Uridin-5'-Triphosphat
ECL	–	Verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	–	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	–	Elektronenmikroskopie
ER	–	endoplasmatisches Retikulum
EtOH	–	Ethanol
FADD	–	Fas-associated death domain protein
g	–	Erdbeschleunigung
GA	–	Glutaraldehyd
GalN	–	D-Galaktosamin
GaM	–	Ziege-anti-Maus
GaR	–	Ziege-anti-Kaninchen
HCl	–	Salzsäure
H ₂ O ₂	–	Wasserstoffperoxid
H ₂ O	–	Wasser
HRP	–	Meerrettichperoxidase
IAP	–	inhibitor of apoptosis Proteine

IF	–	Indirekte Immunfluoreszenz
IgG	–	Immunglobulin G
I-κB	–	Inhibitor-κB
IL	–	Interleukin
i.p.	–	intaperitoneal
kDa	–	Kilo-Dalton
LM	–	Lichtmikroskopie
LPS	–	Lipopolysaccharid
mA	–	Milli-Ampere
MNA	–	Methyl-Nadic-Anhydrid (Epon-Härter)
MOPS	–	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MW	–	Molekulargewicht
NaCl	–	Natriumchlorid
NaHCO ₃	–	Natriumhydrogencarbonat
NaH ₂ PO ₄	–	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	–	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	–	Natronlauge
NF-κB	–	Nukleärer Faktor-κB
nm	–	Nanometer
OD	–	Optische Dichte
PAGE	–	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	–	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PEG	–	Polyethylenglykol
PIPES	–	Piperazin-N,N'-bis-2-Ethansulfonsäure
PMSF	–	Phenylmethylsulfonylfluorid
RIP	–	receptor-interacting protein
RITC	–	Rhodaminisothiocyant
RNA	–	Ribonukleinsäure
rpm	–	Umdrehungen pro Minute
RT	–	Raumtemperatur
SDS	–	Natriumdodecylsulfat
TBS	–	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBSA	–	TBS-Puffer mit 0,1 % BSA
TCA	–	Trichloressigsäure
TdT	–	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	–	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TiOSO ₄	–	Titaniumoxisulfatlösung
TNF	–	Tumor Nekrose Faktor

TNF-R	–	Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor
TRADD	–	TNFR-associated death domain
TRAF	–	TNFR-associated factor
Tris	–	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TVBE	–	Triton-, EDTA-, Bicarbonat-, Ethanol-haltiger Puffer
U	–	Unit
UV	–	Ultraviolett

1 Einleitung

Zur Untersuchung der Mechanismen apoptotisch bedingter Leberschädigungen sind mehrere experimentelle Modelle in der Maus entwickelt worden. In den Tiermodellen wird nach vorheriger Gabe von GalN (Transkriptionsinhibitor) LPS (»Lipopolysaccharid«), das TNF- α induziert, verabreicht oder direkt TNF- α gegeben. Die Effekte, nur Apoptose oder Apoptose und Nekrose gefolgt von letalem Schock, sind abhängig von der Dosierung des verabreichten TNF- α : Nur eine niedrige Dosierung führt zur Apoptose und zum Überleben der Tiere.

GalN wird nur in der Leber metabolisiert und hemmt die hepatische Transkription durch Depletion von Uracilnukleotiden (Keppler et al. 1970). GalN vermindert die hepatische Proteinsynthese und damit auch die Synthese protektiver Proteinen, die die Leber normalerweise als Antwort auf eine Infektion herstellt (Leist et al. 1995).

Durch die Blockierung von cytoprotektiven Proteine, (z.B. Caspase Inhibitoren), die eine TNF- α -vermittelte Apoptose unterdrücken, wird der apoptotische Zelltod durch TNF- α eingeleitet. Die kombinierte Applikation von GalN und TNF- α in einer niedrigen Dosierung von rekombinantem murinem TNF- α reicht aus, um in Mäusen reversible Leberschäden auszulösen.

Nach zahlreichen Apoptosen in Hepatocyten treten nekrotische Herde auf, auf die jedoch eine Leberregeneration erfolgt (Akerman et al. 1992). Eine wichtige Rolle für die Auslösung des programmierten Zelltodes spielen die Mitochondrien (Green und Kroemer 1998). Die erhöhte Permeabilität der Poren in der Mitochondrienmembran, als Folge einer toxischen Einwirkung, kann zur Apoptose (wenn ATP ausreichend vorhanden ist), zur Nekrose (ATP bereits verbraucht) oder zur Apoptose und Nekrose führen (Pessayre et al. 2000). Außerdem spielen immunpathologische Mechanismen eine Rolle, die auf der Wechselwirkung von TNF- α mit Abwehrmechanismen beruhen (Schiemanz 2002).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einer Kinetik die Veränderungen in Lebern von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen licht- und elektronenmikroskopisch in einem Zeitraum von 30 Minuten bis 48 Stunden zu untersuchen und die Morphologie innerhalb dieses Zeitraumes zu beschreiben.

Weiterhin sollte biochemisch und immunhistochemisch die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuclear factor- κ B) und seiner inhibitorischen Proteine I- κ B α und I- κ B β in einem Zeitraum von 5 min bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α Gabe bestimmt werden.

Durch eine flankierende enzymatische Messung der Caspase 3 Aktivität in der cytosolischen Fraktion sollte der Zeitpunkt für die Einleitung des apoptotischen Zelltodes überprüft werden.

Die Aktivität des Enzyms Cytochrom c Oxidase, die als Marker für die Intaktheit der inneren Mitochondrienmembran dient, sollte in einem Zeitabschnitt von 2½ bis 48 Stunden im Gesamthomogenat, in der schweren mitochondrialen Fraktion und im Cytosol gemessen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Morphologie und Funktion der Leber

Die Leber spielt eine wichtige Rolle im Kohlenhydrat-, Protein- und Fettstoffwechsel, aber auch bei der Entgiftung und Ausscheidung von Stoffwechselschlacken und Fremdstoffen.

Die Kupfferschen Sternzellen filtern als Mitglieder des Makrophagensystems partikuläres Material, einschließlich Erreger, aus dem Blut. Durch die Präsentation von MHC II-Molekülen sind sie an Immunreaktionen auf toxische Leberschädigungen beteiligt. Durch die spezielle Architektur der Leber und der funktionellen Beziehung zwischen den Zellen der Leber (Hepatocyten, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen, Sinusendothelzellen) wird die Erfüllung dieser wichtigen Funktionen gewährleistet. Jede Beeinträchtigung dieser einzelnen Komponenten und deren Interaktionen führt im Rahmen pathologischer Prozesse zu einer Funktionsstörung der Leber (Hermanns 1999; Liebich 1999).

2.1.1 Struktur

Als größte morphologische Untereinheit der Leber gilt das Leberläppchen, das aus Leberzellplatten und den dazwischenliegenden Sinusoiden, die in Richtung Zentralvene konvergieren, gebildet wird. Die Portalfelder liegen zwischen den Läppchen und enthalten Gefäße, Nerven und Gallengänge. Zwischen den Hepatocyten befinden sich die Sinusoide, die die Kupfferschen Sternzellen enthalten. Zwischen den Sinusoiden und den Hepatocyten befindet sich der Dissesche-Raum mit den Ito-Zellen (Fettspeicherzellen) und den Pit-Zellen (Hermanns 1999). Neben dem beschriebenen klassischen Leberläppchen gibt es weitere anatomische Gliederungsmöglichkeiten der Leber. Beim periportalen Läppchen steht der zentrale Gallengang mit den umgebenden Zentralvenen im Mittelpunkt. Es wird dabei die Funktion der Leber als exokrine Drüse hervorgehoben (Desmet 1994; Liebich 1999).

Die Blutversorgung der Leber wird durch Äste der Pfortader und der A. hepatica sichergestellt. Das Blut fließt durch die Sinusoide in die Zentralvene im Läppchenzentrum ab, diese vereinigen sich zu Sublobularvenen und schließlich zu den Vv. hepaticae, durch welche das Blut die Leber wieder verläßt.

Der Gallefluß erfolgt in entgegengesetzter Richtung. Die Galle wird von den Hepatocyten in die Gallenkanalikuli sezerniert; der weitere Abfluß erfolgt über ein Gangsystem, bestehend aus den

Hering-Kanälen (Cholangiolen) und den interlobulären Gallengängen in den Portalfeldern und über den Ductus hepaticus in den Ductus choledochus (Hermanns 1999; Liebich 1999).

2.1.2 Funktion

Die Leber erfüllt außer den schon erwähnten metabolischen Funktionen (Fettstoffwechsel u.a.) weitere anabole (Synthese von Serumproteinen, Gerinnungsfaktoren) und katabole Aufgaben (Abbau von Serumproteinen, Hormonen). Die Transformation von Fremdstoffen sowie Speicherfunktionen (Glykogen, Triglyceride, Metalle, Vitamine) unterstreichen die Wichtigkeit und Multifunktionalität dieses Organs. Nicht zuletzt spielt die Leber eine wichtige Rolle als Ausscheidungsorgan (Gallebestandteile). Eine Störung der Leberfunktion ist daher mit ausgeprägter klinischer Symptomatik verbunden (Hermanns 1999; Liebich 1999).

2.1.3 Hepatocyten

Die Leberzellen sind polygonale Zellen, ihr Durchmesser beträgt im Schnitt 20-30 µm. Die Zellkerne der Hepatocyten sind rund und haben 1-2 Nukleoli, etwa 25% von ihnen haben zwei Zellkerne. Das Chromatin der Zellkerne verhält sich aufgrund des Nucleinsäuregehaltes basophil und färbt sich mit dem basischen Hämatoxylin blau, während das Cytoplasma der Hepatocyten acidophil ist und sich mit saurem Eosin rot anfärbt. Die Glykogenmenge der Leber hängt von der Nahrungsaufnahme ab und dient dem Körper als Glukosedepot. Das glatte endoplasmatische Retikulum ist im Cytoplasma diffus verteilt. Das rauhe endoplasmatische Retikulum und freie Ribosomen dienen der Synthese von Proteinen (Desmet 1994; Hermanns 1999).

Auffällig sind in Hepatocyten die vielen Mitochondrien (bis zu 2000 pro Zelle). Sie sind meistens oval, immer cristaereich und spielen eine wichtige Rolle im oxidativen Stoffwechsel der Leberzelle. Form und Anzahl der Mitochondrien hängen stark vom Funktionszustand der jeweiligen Leberzelle ab. Die Lokalisation der Hepatocyten ist für die Größe der Mitochondrien ebenfalls von Bedeutung, so sind die Mitochondrien der periportalen Hepatocyten deutlich größer als die der zentralen (Loud 1968; Angermüller et al. 1994). Sie werden wie die meisten Zellbestandteile ständig erneuert, die durchschnittliche Umsatzrate der Strukturproteine der Mitochondrien wird auf 10 Tage geschätzt.

Ferner kommen in Hepatocyten viele Peroxisomen und Lysosomen vor, die für die Stoffwechselfvorgänge der Leber von essentieller Bedeutung sind (Desmet 1994).

2.2 Zelltod: Nekrose und Apoptose

Der Zelltod ist für den Organismus genauso wichtig wie die Zellteilung oder das Zellwachstum. Man unterscheidet zwei Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose.

Die Nekrose ist infolge physikalischer oder chemischer Schäden ein pathologischer Prozeß und löst eine inflammatorische Antwort aus, während die Apoptose zu keinen Entzündungen führt

(Rathmell und Thompson 1999). Die unterschiedlichen Veränderungen sind in einer graphischen Übersicht in Abbildung 1 dargestellt.

2.2.1 Nekrose

Als Nekrose bezeichnet man die Summe aller Veränderungen, die dem Zelltod in einem lebenden Gewebe oder Organ folgen. Sie ist die Folge der Denaturierung von Proteinen und der enzymatischen Auflösung von Zell- und Gewebekomponenten.

Die Nekrose ist ein passiver, degenerativer Prozeß, charakterisiert durch massive und irreversible Zellveränderungen. Durch die Schädigung der Zellmembran und den dadurch bedingten Verlust des osmotischen Gleichgewichtes kommt es zu einer Anschwellung und zum Platzen der Organellen, bzw. der gesamten Zelle (Wyllie 1981; Thompson 1998). Die dabei entstandenen Zellfragmente lösen im benachbarten Gewebe eine entzündliche Reaktion aus, das Kernchromatin zeigt eine unregelmäßige Kondensierung, der Zellkern schrumpft (Kernpyknose) und wird dann aufgelöst (Karyolyse).

2.2.2 Apoptose

Unter Apoptose (griechisch: Abfallen, Abtropfen) wird die genetisch determinierte Elimination von Zellen (=programmierter Zelltod) verstanden. Das genetische Programm der Apoptose ist in allen Säugetierzellen gespeichert und dauert von der Embryonalentwicklung bis zum Tode.

Der Begriff der Apoptose wurde von Kerr et al. 1972 eingeführt. Diese Gruppe fand heraus, daß es sich dabei um einen gleichbleibenden Vorgang des Zellsterbens — sowohl während der Entwicklung, als auch im reifen Organismus — handelt und dieser als Gegensatz zur Mitose betrachtet werden kann. Bei der Apoptose handelt es sich um einen aktiven, energieabhängigen Prozeß, der im Gewebe einzelne Zellen befällt und im Gegensatz zur Nekrose keine entzündlichen Reaktionen hervorruft. Dieser Prozeß, auch als »cell suicide« bezeichneter programmierter Zelltod (Lennon et al. 1991), wird primär durch physiologische Stimuli ausgelöst. Er tritt während der Embryogenese und der Metamorphose auf, bei der Entwicklung des Immunsystems und ganz besonders bei der normalen Zellerneuerung im Gewebe.

Die Apoptose spielt bei der Embryonalentwicklung durch den gezielten Tod bestimmter Zellen eine wichtige Rolle, so beispielsweise beim Mensch für die korrekte Ausbildung von Händen und Füßen oder bei der Ausbildung des Gehirns (Jacobson et al. 1997). Beim erwachsenen Menschen ist durch ein Gleichgewicht zwischen Zellteilung und Zelltod sichergestellt, dass Organe und Organsysteme, wie Darm, Ovar oder das Immunsystem, ständig erneuert werden und dabei in ihrer Zellzahl trotzdem relativ konstant bleiben. Nicht zuletzt hat die Apoptose auch die Funktion eines Schutzmechanismus gegen infektiöse Erreger, wie z.B. beim apoptotischem »Suizid« von virusbefallenen Zellen. Wie schon diese wenigen Beispiele zeigen, ist die Apoptose von besonderer Bedeutung für alle Lebewesen.

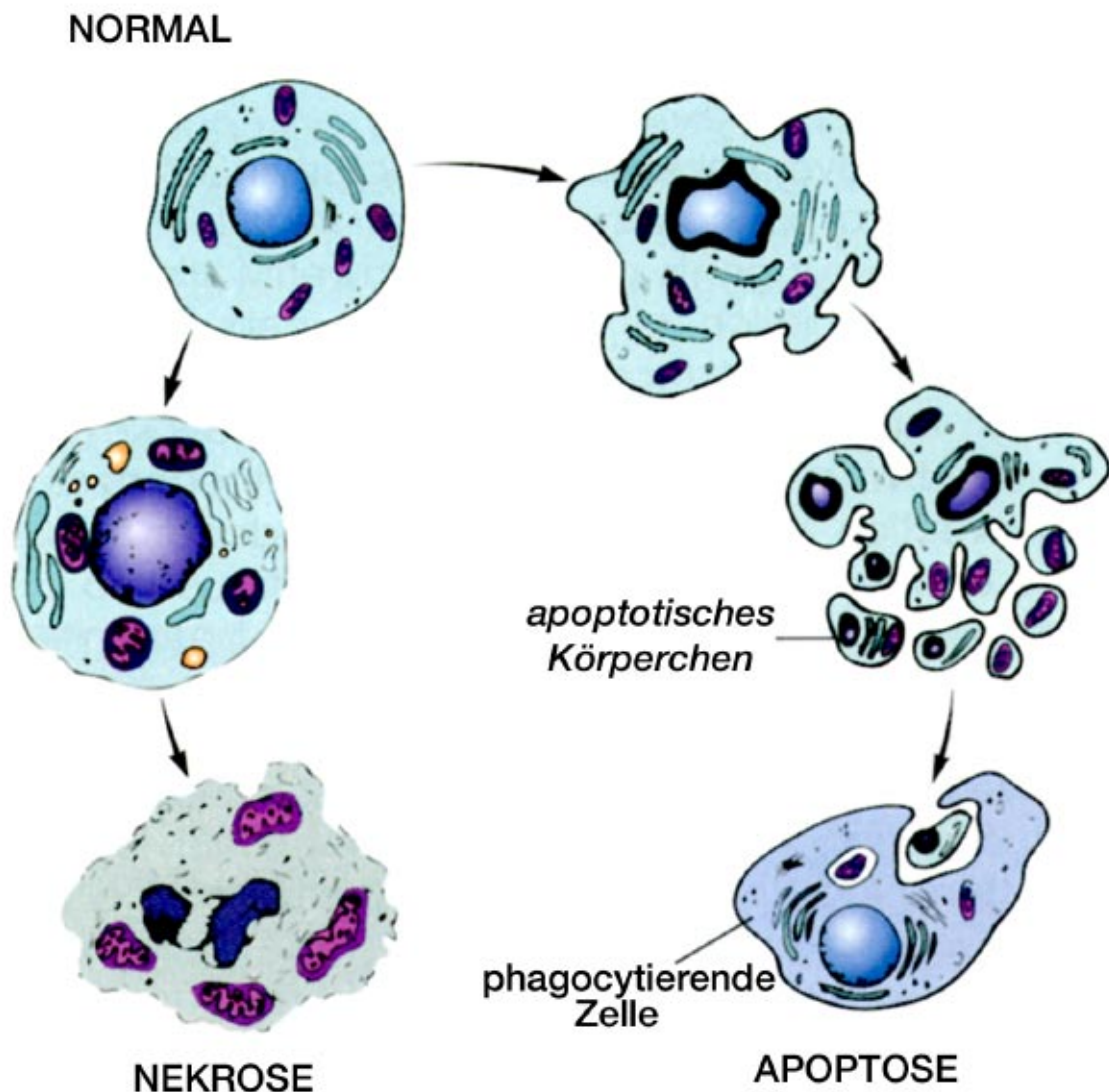


Abbildung 1: Morphologische Veränderungen der Zelle während der Nekrose (links) und der Apoptose (rechts)

Während der Apoptose Chromatinkondensierung und Fragmentierung der Zelle, Bildung der apoptotischen Körperchen und deren anschließende Phagozytose. Die Nekrose ist durch Chromatinschrumpfung, Schwellung der Zellorganellen und Membranschädigung charakterisiert.

Schema modifiziert nach Kerr und Harmon 1991.

Neben physiologischen Signalstoffen, wie dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) oder dem Liganden des APO-1/CD95-Rezeptors, können unter anderem Gamma- oder UV-Strahlen Apoptose induzieren (Magnusson und Vaux 1999). Chemotherapeutika, freie Radikale und Wasserstoffperoxid, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA können ebenfalls einen apoptotischen Zelltod auslösen (Van Antwerp et al. 1998).

Die Apoptose wird durch ein genetisch determiniertes »Selbstmord«-Programm der Zelle gesteuert; eine Vielzahl von Apoptosegenen ist heute bekannt. Das Programm läuft über ganz bestimmte, morphologisch erkennbare Etappen, welche je nach Zelltyp etwas unterschiedlich sein können. Dieser »programmierte« Zelltod ist ein aktiver, energiekonsumierender, nicht reversibler Prozess, bei

dem Veränderungen zuerst in den Mitochondrien, dann im Zellkern erscheinen (Angermüller et al. 1998). Morphologisch kann die Apoptose in drei Phasen unterteilt werden:

- 1) Zu Beginn des Prozesses wird eine Verringerung des Zellvolumens deutlich (Jeschke et al. 2001), die als Zellschrumpfung bekannt ist.
- 2) Es folgt eine Veränderung der Mitochondrien in ihrer Form, eine Ruptur der äußeren mit gleichzeitiger Ausstülpung der inneren Mitochondrienmembran sind charakteristisch. Die Veränderungen im Kern zu diesem Zeitpunkt werden durch die Chromatinkondensierung an der Kernmembran, die Kernfragmentierung und anschließender Bildung der sogenannten apoptotischen Körperchen charakterisiert.
- 3) Das Aussenden von Phagocytosesignalen (Cytokine) an Nachbarzellen führt zur Phagocytose und zum Abbau der apoptotischen Körperchen durch die Makrophagen (Hengartner 2001) oder die benachbarten Zellen (Zörnig et al. 2001).

2.2.3 Morphologisches Erscheinungsbild der Apoptose

Wie in der Einleitung skizziert, unterscheidet man im Verlauf der Apoptose drei unterschiedliche Phasen (Arends und Wyllie 1991):

In den frühen Apoptosestadien schrumpft die Zelle und es kommt zum Verlust von speziellen Membranstrukturen, wie z.B. den Mikrovilli. Im Zuge der Reduzierung des Zellvolumens kommt es zu einer Kondensierung des Cytoplasmas, zur Verdichtung cytoplasmatischer Organellen und zur Auflösung der Nukleoli. Die Mitochondrien zeigen in dieser Phase eine Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran, durch die hernienartig die innere Mitochondrienmembran herausquillt (Angermüller et al. 1998, 1999). Danach kommt es zur Chromatinkondensierung an der Kernperipherie.

Die zweite Phase ist durch die Fragmentierung des Zelle gekennzeichnet. Diese Fragmente bilden zusammen mit Cytoplasma und anderen Zellorganellen die sogenannten »apoptotischen Körperchen«. Durch das Aussenden von Signalen an bestimmte Rezeptoren der benachbarten Zelle (Zhou et al. 2001) wird die Phagocytose ausgelöst (Hengartner 2001) .

Im letzten Stadium des programmierten Zelltodes kommt es zum fortschreitenden Abbau der restlichen Kern- und Cytoplasmastrukturen in Makrophagen oder benachbarten Zellen.

2.2.4 Mechanismen der Apoptose

Die biochemischen Veränderungen während der Apoptose sind im Vergleich zu den morphologischen weniger gut definiert. Eine Erklärung dafür könnte die Lokalisation, bzw. der Befall einzelner Zellen im Gewebe sein, die wiederum von den umliegenden gesunden Zellen schnell phagozytiert werden. Damit sind biochemische Veränderungen schwieriger nachzuweisen. Trotzdem können sechs charakteristische Ereignisse des apoptotischen Zelltodes beschrieben werden (Arends und Wyllie 1991):

Zunahme der zellulären Dichte

Die auffallende Abnahme des Zellvolumens apoptotischer Zellen führte dazu, daß diese Art des Zelltodes zunächst als »shrinkage necrosis« (Kerr et al. 1972) beschrieben wurde.

In apoptotischen Zellen kommt es zur Ausdehnung des endoplasmatischen Retikulums (ER) und zur Bildung von Vesikeln, die mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt extrazellulär entleeren (Morris et al. 1984).

Intrazelluläre Veränderungen als Signale

Mittels Zelltyp- und Stimulus-spezifischer Rezeptoren werden verschiedene Reize (physiologisch oder pathologisch) wahrgenommen und lösen eine entsprechende Antwort in der Zelle aus. Mögliche intrazelluläre Signale für das Auslösen des programmierten Zelltodes sind Veränderungen in der Aktivität von Protein-Kinasen oder auch die Expression und Aktivierung von Onkogenen. In apoptotischen Zellen kommt es zu einem moderaten Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration (McConkey et al. 1989), während bei der Nekrose der Calcium-Gehalt schnell um das Tausendfache ansteigt.

Inhibierung der Protein- und RNA-Synthese

Schon in den frühen Apoptosestadien kommt es zur Einstellung der gesamten Protein- und RNA-Synthese-Tätigkeit.

Chromatin-Spaltung

Internukleosomale Chromatin-Spaltung durch endogene Endonukleasen wird beinahe ausschließlich bei der Apoptose beobachtet. Die Spaltung internukleosomaler DNA erzeugt Oligonukleotide mit DNA-Längen von 180-200 Basenpaaren und Vielfachen davon. Diese DNA-Fragmente können als typische »DNA-Leiter« mit Hilfe der Gelelektrophorese nachgewiesen werden (Arends und Wylie 1991).

Transglutaminase-Aktivität

Mit Beginn der Apoptose kommt es zur Induktion und Aktivierung von Gewebe-Transglutaminasen, die cytoplasmatische Proteine über Lysin-Bänder miteinander vernetzen und die Bildung von Proteingerüsten bewirken. Somit kommt es während des programmierten Zelltodes zu einem Anstieg von Transglutaminase (mRNA und – Protein), deren Enzymaktivität und des Gehaltes an proteingebundenem Lysin (Piacentini et al. 1991; Darzynkiewicz et al. 1997).

Veränderungen der Zelloberfläche

Charakteristisch für apoptotische Zellen ist deren schnelle Erkennung und Phagozytose durch ihre Nachbarzellen oder Makrophagen, die bevorzugt an apoptotische Zellen binden (Wyllie 1997; Savill 1998). So werden beispielsweise apoptotische Nager-Thymocyten durch zuckerabhängige Mecha-

nismen erkannt (Duvall et al. 1985). Die Freisetzung von Glykan-Gruppen an der Zelloberfläche scheint als Erkennungssignal zu funktionieren, um eine Anheftung und anschließende Phagozytose durch Makrophagen zu ermöglichen (Arends und Wyllie 1991).

2.2.5 Mitochondrien

Die Mitochondrien sind die zentralen Organellen des Energiestoffwechsels in der Zelle und haben meistens eine ellipsoide Form und eine Länge von 2-4 µm. Durch die Oxidation der Kohlenhydrate und Fettsäuren entsteht CO₂ und Wasser. Energiereiches ATP entsteht durch die oxidative Phosphorylierung. Mitochondrien enthalten ein eigenes, ringförmiges DNA-Molekül, das genetische Informationen für einen Teil der mitochondrialen Enzyme trägt (Pessayre et al. 2000).

2.2.5.1 Aufbau der Mitochondrien

Mitochondrien bestehen aus einer inneren gefalteten Membran, einer äußeren Membran, die das Mitochondrium vom Cytosol abgrenzt, sowie der Matrix. Die äußere mitochondriale Membran enthält zahlreiche Poren (Kroemer et al. 1998) und ist durch diese auch für einige höhermolekulare Substanzen (MW > 1500 Da) durchgängig. Viel strukturierter zeigt sich die innere Membran mit ihren zahlreichen Falten, die als Cristae bezeichnet werden. Die mitochondriale Innenmembran hat eine besondere Bedeutung für den Zellstoffwechsel als Träger der Enzymsysteme der Atmungskette, sowie der oxidativen Phosphorylierung. Durch ihren hohen Proteingehalt (75 % Proteine und nur 25 % Lipide) unterscheidet sie sich von allen anderen Membranen. Die mitochondriale Matrix enthält Enzyme der β -Oxidation, des Cytrazyklus sowie Teile des Harnstoffzyklus (Pessayre et al. 2000).

2.2.5.2 Mitochondrien als zentraler Kontrollpunkt der Apoptose

Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle in der Apoptose (Angermüller et al. 1998; 1999). Als Reaktion auf spezifische Stimuli wie beispielsweise TNF- α (Hatano et al. 2000) wird Cytochrom c, ein Protein der Atmungskette ins Cytoplasma abgegeben und wirkt so als Kofaktor für die Aktivierung der Caspasen (Green 1998; Martinou et al. 2000; Joza et al. 2001).

Wegen der zentralen Rolle von Cytochrom c bei der Aktivierung von Caspasen haben zahlreiche Versuche den Freisetzungsmechanismus aus dem Mitochondrium während der Apoptose aufgeklärt. So haben die Proteine der Bcl-2 Familie (Newmeyer et al. 1994; Ferri und Kroemer 2001; Martinou und Green 2001) eine hemmende Wirkung auf die Freisetzung von Cytochrom c, während Bax- und BH3-Proteine einen ausschließlich proapoptotischen Effekt besitzen (Tsujimoto und Shimizu 2000). Die meisten dieser sogenannten proapoptotischen Homologa befinden sich in inaktiver Form im Cytoplasma; unter Einwirkung eines Stimulus passieren sie die Mitochondrienmembran und in Wechselwirkung mit anderen Proteinen bewirken sie die Freisetzung von Cytochrom c (Gottlieb 2000). Die Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol ist ein wichtiger Schritt für die Einleitung des

apoptotischen Zelltodes; über die genauen Mechanismen wird aber weiterhin diskutiert (Reed und Green 2002).

2.2.5.3 *Cytochrom c Oxidase*

Die oxidative Phosphorylierung findet an der inneren Mitochondrienmembran statt, also in unmittelbarer Nachbarschaft des Citratcyclus. Die Atmungskette besteht aus vier Multienzymkomplexen. Diese Multienzymkomplexe haben bestimmte Untereinheiten, die eine Redoxkette bilden.

Die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) ist ein Mitglied dieser Atmungskette der Mitochondrien; der Elektronentransfer von Cytochrom Reduktase (Komplex III) zur Cytochrom c Oxidase wird über Cytochrom c sichergestellt und hat die Reduzierung von Sauerstoffmolekülen zu Wasser zur Folge (Wang 2001; Barrientos et al. 2002). Cytochrom c Oxidase ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert.

2.2.6 Cytokine

Cytokine sind Gewebshormone von besonderer Bedeutung, sie werden von verschiedenen Zellen freigesetzt und regulieren die Proliferation, bzw. die Differenzierung und Funktion ihrer Zielzellen. Die Sekretion erfolgt meistens parakrin, d.h. die Signalübertragung erfolgt durch Diffusion von der sezernierenden zur direkt benachbarten Zelle. Es sind bis heute mehr als 100 Cytokine bekannt, die in vier Gruppen unterteilt werden können (Feldmann et al. 1996): proinflammatorische (IL-1, TNF- α u.a.), immunregulatorische (z.B. IL-4, IL-10), chemotaktische (z.B. IL-8) und mitogene Cytokine (z.B. »fibroblast growth factor«).

2.2.7 Signaltransduktion durch Tumor Nekrose Faktor

Der Tumor Nekrose Faktor (TNF) ist ein 26kDa monomeres Protein (Darnay und Aggarwal 1999), gehört zu der Klasse der proinflammatorischen Cytokine und ist mit Hilfe unterschiedlicher immunmodulatorischer Gene in der Lage, eine Reihe von zellulären Antworten auszulösen (Fiers et al. 1995; May und Ghosh 1998). TNF aktiviert wie IL-1 den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der für die Regulierung einer Reihe von Genen, die für eine entzündliche Reaktion benötigt werden, zuständig ist (May und Ghosh 1998). TNF wird vor allem in den Makrophagen, aber auch in T-Zellen, Fibroblasten und Muskelzellen synthetisiert. Erstmals durch seine antitumorale Aktivität sowohl *in vivo* als auch *in vitro* definiert, wird er nach neueren Erkenntnissen als ein Polypeptidmediator für entzündliche und immunologische Antworten der Zelle beschrieben (Schütze et al. 1992). Außerdem soll TNF eine antivirale Aktivität induzieren können (Mestan et al. 1986; Wong und Goeddel 1998) und für die Zelle eine wichtige schützende Rolle bei parasitären Infektionen gewährleisten (Malik und Balkwil 1988). Wie bei den anderen Cytokinen ist auch bei TNF das Auslösen einer zellulären Antwort vom Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors auf der Zellmembran direkt abhängig.

Nach der Aktivierung des Rezeptors durch TNF wird eine Kaskade von Reaktionen innerhalb der Zelle eingeleitet.

Die Rezeptoren des TNF/Fas Systems verfügen über eine intrazelluläre Domäne, die sogenannte »death domain« (Yuan 1997), die mit Hilfe von Enzymen das Signal weiter übertragen; zu ihnen gehören die Mitglieder der Caspase-, Phospholipase- und der Proteinkinase-Familien (Wallach et al. 1999). Eine von den multiplen funktionellen Veränderungen, die durch diese Enzyme reguliert werden können, stellen die veränderten Genaktivitäten dar, die eine Folge der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- κ B) sind. Andere Effekte, wie die Einleitung des Zelltodes, ergeben sich unabhängig von der Genaktivierung.

Das Einwirken von TNF- α auf die Zelle wird durch seine zwei Rezeptoren TNF-R1 (Locksley et al. 2001) und TNF-R2 (Darnay und Aggarwal 1999) sichergestellt. Die Bindung von TNF- α an die zwei Rezeptoren induziert eine Trimerisierung des jeweiligen Rezeptors und die Aktivierung einiger Signalproteine (Wallach et al. 1997) in dem cytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors. Das erste von TNF-R1 angelagerte Protein ist TRADD (»TNF-R1-associated death domain protein«), das als Plattform für die drei Mediatoren RIP (»receptor-interacting protein«), FADD (»Fas-associated death domain protein«) und TRAF2 (»TNF-receptor-associated factor 2«) fungiert (Takeuchi et al. 1996). In Folge dieser Interaktionen wird die Caspasenkaskade ausgelöst, die zu dem programmierten Zelltod führt (Wallach 1997; Baud und Karin 2001).

2.2.8 Caspasen: Schlüsselmediatoren des programmierten Zelltodes

Die Caspasen gehören zur Familie der Cystein Aspartat-Proteasen, sie spielen eine besonders wichtige Rolle im Prozeß der Apoptose und spalten eine Anzahl von Proteinen, die in normale Zellfunktionen involviert sind (Nicholson und Thornberry 1997; Harper et al. 2001).

Caspasen befinden sich normalerweise als inaktive Vorläufer (Procaspasen) in der Zelle (Cohen 1997). Extrazelluläre Signale, wie TNF- α leiten die Aktivierung eines plasmamembranständigen »Todesrezeptors« (TNF-Rezeptor) ein, der die ersten Schritte in der Caspasenkaskade auszulösen scheint (Thornberry und Lazebnik 1998). Die aktivierte Caspase (Caspase-8) löst eine zur Apoptose führende Signalkaskade aus. Dieser extrinsische Mechanismus, bei dem die Caspasen beteiligt sind, ist einer von den zwei beschriebenen Pathomechanismen, die zur Einleitung des Zelltodes führen (Grütter 2000). Beim Menschen sind bisher 40 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind.

Der zweite Weg, der intrinsische, kommt ohne externe Signale aus; an der Aktivierung der Caspasen sind mitochondriale Proteine wie Cytochrom c beteiligt (Segal und Beem 2001). Die Caspasenaktivierung findet mittels des Apoptosoms statt (Srinivasula et al. 1998), einem heterogenen Proteinkomplex, zu dessen Komponenten Cytochrom c, das Protein Apaf-1 (»apoptotic protease-activating factor«), die Procaspase-9 und dATP zählen (Liu et al. 1996; Li et al. 1997; Rathmell und Thompson 1999). Die Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und dadurch die Caspase-9 freige-

setzt. Sie aktiviert wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7, die schließlich Enzyme aktivieren, deren Wirkungen zwingend zum Absterben der Zelle führen (Nicholson et al. 1995; Stennicke et al. 1998). Hierzu zählt insbesondere die DNA-Spaltung in der Zelle. Caspase 12-Aktivierung wird ebenfalls durch einen intrinsischen Mechanismus ausgelöst, nämlich durch Stress des endoplasmatischen Retikulums und führt auch zur Apoptose (Nakagawa et al. 2000).

Durch die Hemmung von Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden. Einige Viren können durch die Hemmung von Caspasen den Tod der Wirtszelle verhindern und damit ihr eigenes Überleben sichern (Kühnel et al. 2000).

2.2.9 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B (»Nukleärer Faktor- κ B«) ist ein Sammelbegriff für dimerische Transkriptionsfaktoren (Karin und Ben-Neriah 2000), die DNA-bindende Proteine der Rel-Familie sind und alle ein gemeinsames Sequenzmotiv erkennen. Bei Säugetieren sind bislang 5 Rel Proteine identifiziert worden (Ghosh et al. 1998): NF- κ B1 (p50 und sein Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und sein Vorläufer p100), c-Rel, RelA (p65) und RelB (siehe auch Abbildung 2). Erstmals beschrieben wurde er im Jahre 1986 von Sen und Baltimore als ein nukleärer Faktor in B-Zellen, der an den »Enhancer« der κ -leichten Kette des Immunglobulins bindet. Weitere Forschungen führten zu der Schlussfolgerung, daß dieses Protein auch in anderen Zellen und Geweben, wie beispielsweise der Leber (Taub 1998), zu finden ist. In der Leber wird das Protein als Antwort auf Gewebeschädigung, partielle Hepatektomie oder andere Störungen aktiviert (Fitz Gerald et al. 1995).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B hat durch seine ungewöhnliche und schnelle Regulation sowie sein breites Spektrum zur Kontrolle mehrerer Gene in den letzten Jahren das Interesse vieler Forscher geweckt. Die zentrale Rolle bei immunologischen Prozessen, die große Bandbreite der Verbindungen als Dimere und nicht zuletzt die direkte Beteiligung an verschiedenen Erkrankungen (Baldwin 1996) unterstreichen die Wichtigkeit dieses Proteins. Es sind einige gut beschriebene Mechanismen bekannt, die zur Aktivierung der Transkription führen. Vor allem ist aber der NF- κ B-Weg einzigartig, was die Schnelligkeit seiner Aktivierung betrifft.

In seiner aktiven DNA-bindenden Form bildet NF- κ B Hetero-Dimere, deren Monomere der NF- κ B/Rel-Familie angehören (Schmitz et al. 2001).

2.2.9.1 Struktur von NF- κ B

Der erste beschriebene NF- κ B Komplex war ein Heterodimer der p50 und p65 Proteine (Grilli et al. 1993).

Jedes dieser Proteine enthält eine N-terminale Domäne von 300 Aminosäuren (Joyce et al. 2001), bekannt als RHD-Domäne (»rel homology domain«). Diese Domäne ist für die DNA-Bindung, die Dimerisierung und die Interaktion mit Proteinen der I- κ B-Familie zuständig. Sie enthält auch die für die nukleäre Lokalisation benötigte NLS (»nuclear localization sequence«). Ein zweiter Funktionsbe-

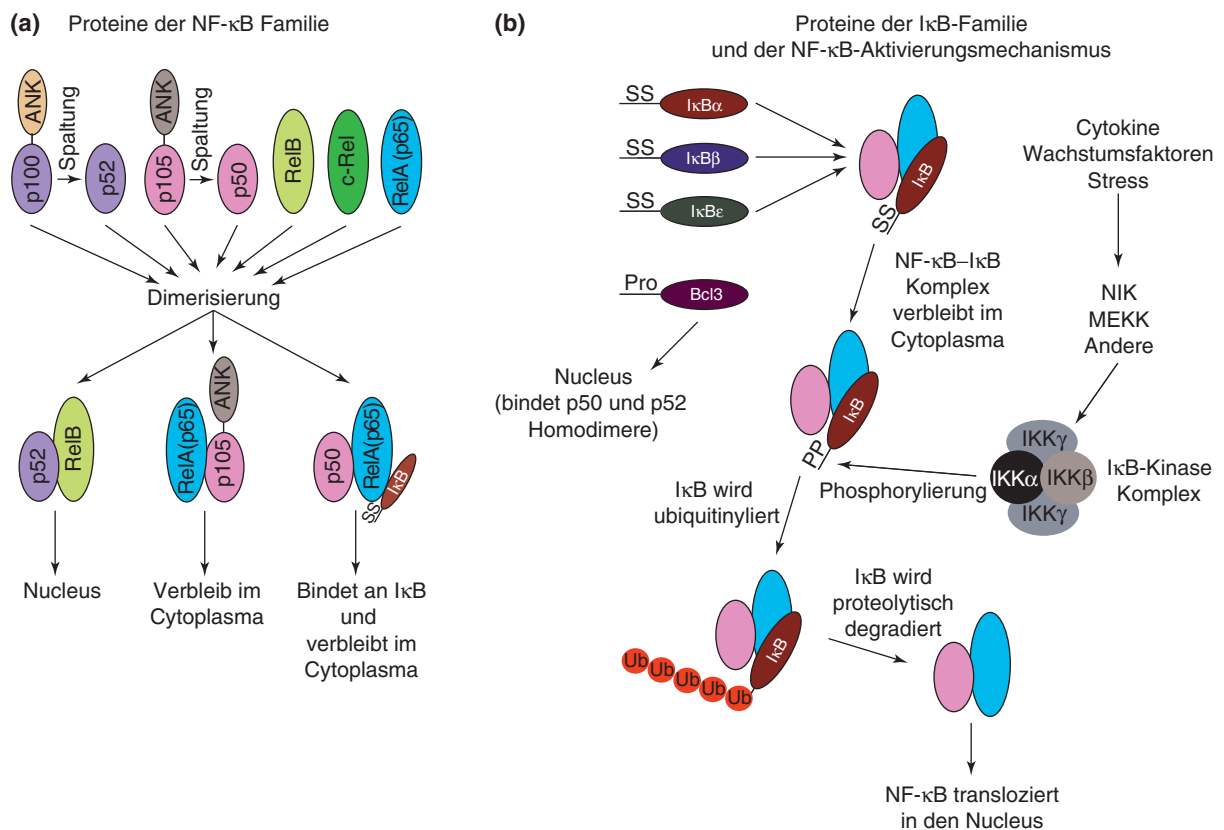


Abbildung 2: Die Proteine der NF-κB- und I-κB-Familien und der Mechanismus der NF-κB-Aktivierung
 (a) Die fünf Mitglieder der Rel/NF-κB Familie. Mit einigen Ausnahmen können alle NF-κB-Untereinheiten homo- und heterodimerisieren. Die meisten NF-κB-Komplexe bilden mit einem Mitglied der I-κB-Familie einen Komplex und verbleiben im Cytoplasma. Eine Ausnahme ist p52-RelB, das nicht an I-κB bindet und direkt in den Zellkern transloziert wird. (b) Die wichtigsten Mitglieder der I-κB-Familie und der NF-κB-Aktivierungsmechanismus. I-κBα, I-κBβ und I-κBε interagieren mit NF-κB Komplexen und maskieren deren NLS. Bcl3 wird direkt in den Kern transloziert, bindet die p50- und p52-Homodimere und fungiert als Transkriptionsaktivator. Abkürzungen: NIK (NF-κB induzierende Kinase); NLS (nukleäres Lokalisationssignal); PP (Phosphorylierung); Pro (Prolin-reiche Domäne); SS (die zwei Serinreste der I-κB-Proteine); Ub (Ubiquitin)
 Schema aktualisiert nach Perkins 2000.

reich bildet die C-terminale Domäne, die für das Aktivieren der NF-κB gesteuerten Gene zuständig ist.

2.2.9.2 NF-κB: Ein Baustein zur Funktionalität des TNF-Systems

Die Familie der NF-κB Transkriptionsfaktoren spielt eine entscheidende Rolle für das Immunsystem (Wallach et al. 1999). Mehr als 60 separate proinflammatorische Gene, die z.B. an der Kontrolle der Zelladhäsion, der Apoptose, dem Redox-Metabolismus und der Produktion von Mediatoren involviert sind, werden durch NF-κB reguliert (Baeuerle 1998). In den meisten Zellen befindet sich NF-κB in einer inaktiven Form im Cytoplasma, da er an inhibitorische Proteine bindet, die der I-κB Familie angehören (Baeuerle und Henkel 1994; Baeuerle und Baltimore 1996; Thanos und Maniatis 1995; Verma et al. 1995). Diese inaktiven Komplexe können über TNF/Fas-Rezeptoren aktiviert werden.

TNF- α hat zwei unterschiedliche Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2; in den meisten Zellen wird die Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe des ersten realisiert. TNF-R1 interagiert mit TRADD (»TNF-R1-associated death domain protein«), das wie ein Verbindungsstück für die Aktivierung anderer Proteine (z.B. RIP) fungiert. RIP (»receptor-interacting protein«) ist eine für die Aktivierung von NF- κ B erforderliche Kinase (Wallach et al. 1998).

2.2.9.3 Regulation von NF- κ B durch I- κ B Proteine

NF- κ B ist in seiner inaktiven Form an I- κ B im Cytoplasma gebunden und erst durch seine Aktivierung wird es in den Zellkern transloziert (Traenckner et al. 1994). Die Aktivierung erfolgt unter Einfluß unterschiedlicher Stimuli, wie z.B. durch die proinflammatorischen Cytokine TNF- α oder Interleukin-1 (IL-1). Stress, wie UV-Licht oder auch bakterielle und virale Infektionen können ebenfalls zu einer Aktivierung von NF- κ B führen (Li und Karin 1999). Werden Zellen solchen Stimuli ausgesetzt, erfolgt eine rasche Phosphorylierung, Ubiquitylierung und proteolytische Degradierung der Inhibitor-Proteine I- κ B, so daß die Komplexverbindung NF- κ B/I- κ B aufgelöst wird (Simeonidis et al. 1999). Das freigesetzte NF- κ B wird nun in den Zellkern transloziert (Baldwin 1996; Verma und Stevenson 1997). Die Degradierung der Inhibitor-Proteine, vor allem von I- κ B α , unter Einfluß potenter Aktivatoren wie TNF- α kann innerhalb weniger Minuten stattfinden (Manos und Jones 2001).

Die Phosphorylierung von I- κ B wird durch eine Serie von Kinasen, den I κ B Kinasen (IKK), reguliert (Israel 2000). Sie bestehen aus zwei Untereinheiten: IKK α und IKK β , beide sind in der Lage, eine korrekte Phosphorylierung durchzuführen (Karin 1999). Die Aktivierung von NF- κ B nach TNF- α Gabe wird in Maushepatocyten meistens über IKK β eingeleitet und hat im Vergleich zur Aktivierung über IKK α einen antiapoptotischen Effekt (Hatano und Brenner 2001; Hatano et al. 2001). Antioxidantien oder Proteaseinhibitoren, die auch eine Phosphorylierung inhibieren, verhindern die Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Fischer et al. 1999).

Das Ubiquitin-Proteolyse-System ist wahrscheinlich das meist genutzte proteolytische System im Organismus (Karin und Ben-Neriah 2000). Ursprünglich als Abbausystem für alte, geschädigte oder fehlgebildete Proteine beschrieben, gilt es heute auch als Kontrollsystem für eine große Anzahl von regulatorischen Proteinen, Transkriptionsfaktoren und Zellwachstumsmodulatoren. Die Ubiquitylierung und Degradierung von I- κ B Proteinen verläuft in drei voneinander getrennten Phasen: zunächst erfolgt die kovalente Angliederung von einem oder mehreren Ubiquitin Polypeptiden an das Protein, gefolgt von der Ubiquitin-Ubiquitin-Konjugierung, was zur Bildung eines Polymers führt und als letztes erfolgt die Degradierung des Ubiquitin-gebundenen Proteins durch den 26S Proteasom-Komplex (Barkett und Gilmore 1999; Glickman und Ciechanover 2002).

Die Aktivierung von NF- κ B, ein Schritt in der Kaskade der Signaltransduktion durch TNF- α , ist ein hervorragendes Beispiel für die Wirkungsweise eines regulatorischen Proteins (I- κ B), durch die u.a. das Ubiquitin-Proteasom System aktiviert wird (Gilmore 1999). Mit einigen Ausnahmen, wie z.B. UV-Licht, haben alle Stimuli, die eine Aktivierung von NF- κ B bewirken, die I- κ B Proteine (I-

$\kappa B\alpha$, I- $\kappa B\beta$, I- $\kappa B\epsilon$) als Ziel, um so eine IKK-vermittelte Degradierung durch das Ubiquitin-System zu erreichen. Der Abfall des nukleären NF- κB nach UV-Licht Exposition erfolgt auf einem I- κB -unabhängigem Weg über die Degradierung der p50 und p65 Untereinheiten des cytoplasmatischen NF- κB (Djavaheri-Mergny et al. 1999).

2.2.9.4 Erkrankungen mit Beteiligung von NF- κB

Eine der physiologischen Funktionen von NF- κB ist die schnelle Expression von Genen des Immunsystems als Antwort auf verschiedene Stimuli (Hatada et al. 2000), wie virale oder bakterielle Infektionen oder auch auf physischen Stress (Baeuerle 1998a, 1998b). Wegen der direkten Rolle bei der Regulierung der zellulären Antwort auf inflammatorische Cytokine oder Endotoxine kann die Aktivierung von NF- κB eine entscheidende Rolle für die Entwicklung chronischer Erkrankungen einnehmen, wie z.B. bei rheumatischen Arthritiden oder auch in akuten Situationen, wie dem septischen Schock (Baldwin 1996). Bei einigen viralen Erkrankungen, wie im Fall der HIV-Infektion, aktiviert NF- κB viruseigene Gene und beschleunigt die Stimulierung und Proliferation der Lymphocyten, in denen die Virusreplikation stattfindet. Dysregulation von NF- κB ist direkt beteiligt an neurodegenerativen und gastrointestinalen Erkrankungen (Schmid und Adler 2000), einigen Krebsarten und Lungenerkrankungen (Gurujeyalakshmi et al. 2000).

In den meisten Zellen schützt NF- κB -Aktivierung (Liu et al. 1996; Beg und Baltimore 1996; Van Antwerp et al. 1996; Wang et al. 1998; Southall et al. 2001) durch die Induktion von protektiven Genen vor Apoptose, obwohl es unter bestimmten Bedingungen und in bestimmten Zelltypen auch die Apoptose einleiten kann (Baichwal und Baeuerle 1997; Barkett und Gilmore 1999; Jones et al. 2000a). In der Leber schützt die NF- κB -Aktivierung in den meisten Fällen vor Apoptose, es gibt aber auch Studien, die eine Einleitung der Apoptose durch NF- κB belegen, wie z.B. in HepG2-Zellen die mit einem DEN (Dengue Virus) Typ 1 infiziert worden sind (Marianneau et al. 1997).

2.2.10 Inhibitor Proteine: die I- κB Familie

Die I- κB Familie gehört zu der Gruppe der regulatorischen Proteine und umfaßt I- $\kappa B\alpha$, I- $\kappa B\beta$, I- $\kappa B\gamma$, I- $\kappa B\epsilon$, Bcl-3, die Vorstufen von NF- $\kappa B1$ (p105) und NF- $\kappa B2$ (p100) und das Drosophila-Protein Cactus. Physiologisch wird ihnen eine cytoplasmatische Lokalisation zugeordnet. Ein neues Mitglied dieser Familie I- $\kappa B\zeta$ (zeta), das eine vorwiegend nukleäre Lokalisation besitzen soll, wurde von Yamazaki et al. 2001 beschrieben. Von besonderer Bedeutung für die Regulation von NF- κB bei Säugetieren sind I- $\kappa B\alpha$, I- $\kappa B\beta$ und I- $\kappa B\epsilon$, die als einzige die N-terminale Domäne enthalten (Li und Nabel 1997; Whiteside et al. 1997). Alle I- κB Proteine haben fünf bis sieben Ankyrin-Motive, die das NLS (»nuclear localization signal«) von NF- κB maskieren (May und Ghosh 1998) und damit dessen Translokation in den Zellkern verhindern. I- κB Proteine sind nicht nur für die Sequestration von NF- κB im Cytoplasma nicht stimulierter Zellen zuständig, sondern binden auch transloziertes NF- κB im Zellkern und leiten damit dessen Rücktransport ins Cytoplasma ein.

2.2.10.1 I- κ B α

Das am besten untersuchte I- κ B-Protein ist I- κ B α , zumal es als erstes Mitglied dieser Familie geklont wurde (Davis et al. 1991). Es ist ein 37 kDa Protein und besteht – genauso wie I- κ B β – aus drei Funktionsbereichen:

Die N-terminale Domäne, die unter Einwirkung von Kinasen phosphoryliert wird, ein zentraler Ankyrinmotiv und die C-terminale PEST Sequenz (»proline, serine, aspartic acid and threonine residues rich sequence«), die für die Neusynthese und Degradation des Proteins unter physiologischen Umstände zuständig ist (Verma et al. 1995; Ghosh et al. 1998). I- κ B α bindet mit seinem Ankyrinmotiv vorwiegend an die nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) des p65 (Rel A) (Jobin und Sarter 2000).

Die charakteristische Eigenschaft von I- κ B α besteht physiologisch in der Fähigkeit als Inhibitorprotein, eine schnelle aber kurzfristige Aktivitätsinduktion von NF- κ B zu ermöglichen (Roff et al. 1996; Phelps et al. 2000). Unter Einwirkung von NF- κ B Aktivatoren, wie LPS (»Lipopolysaccharide«), IL-1 oder TNF- α , wird eine meistens komplette Degradierung von I- κ B α binnen weniger Minuten erreicht (Han et al. 1999). Dieser Prozeß, der im 26S Proteasom abgeschlossen wird, ist abhängig von der Phosphorylierung des I- κ B α durch IKK α (Steffan et al. 1995; Aggarwal 2000) an zwei Serinreste (Ser-32 und Ser-36) der N-terminalen Domäne (DiDonato et al. 1996; 1997; Regnier et al. 1997; Woronicz et al. 1997). Angesichts der gleichzeitigen Blockierung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern und dessen DNA-Bindung sowie der Hemmung der Phosphorylierung des Inhibitors, ist I- κ B α ein multifunktionseller Inhibitor für NF- κ B (Jacobs und Harrison 1998; Reuther und Baldwin 1999).

2.2.10.2 I- κ B β

I- κ B β ist ein 45 kDa Protein, das – obwohl es auch geklont wurde – nicht so gut charakterisiert ist wie I- κ B α (Cheng et al. 1998). Die Phosphorylierung von I- κ B β erfolgt ebenfalls durch die I- κ B-Kinasen (Mercurio und Manning 1999) an zwei Serinresten (Ser-19 und Ser-23). Die meisten der p50:p65 und p50:c-Rel-Komplexe werden durch I- κ B- α und I- κ B- β reguliert (Thompson et al. 1995). Es wird vermutet, dass I- κ B β an unterschiedliche Rel-Proteine im Vergleich zu I- κ B α bindet, jedoch zeigten Thompson et al. 1995 die gleichzeitige Bindung beider I- κ Bs am gleichen Rel-Protein.

2.2.10.3 I- κ B-Kinasen (IKK): der Schlüssel der NF- κ B Aktivierung

Der kritische Schritt bei der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist die Phosphorylierung der Serinreste Ser-32 und Ser-36 für I- κ B- α oder der ihnen entsprechenden Äquivalente durch die zuständigen Proteinkinasen (Verma und Stevenson 1997; Zandi et al. 1997; Zandi et al. 1998). Di Donato et al. 1997 beschrieben eine für die N-terminale Domäne von I- κ B α und I- κ B β spezifische Proteinkinase-Aktivität. Diese I- κ B-Kinase ist serinspezifisch und wird durch eine Reihe von NF- κ B-Aktivatoren induziert, die wichtigsten davon sind TNF und IL-1. Weitere Untersuchungen gaben Aufschluß über die Zusammensetzung von IKK (Li et al. 1997). Es wurden drei IKK-Polypeptide

identifiziert: IKK α (IKK1) und IKK β (IKK2) mit katalytischen Funktionen und IKK γ (NEMO), das eine regulatorische Funktion besitzt (Di Donato et al. 1997; Mercurio et al. 1997; Régnier et al. 1997; Woronicz et al. 1997). IKK β ist für die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α erforderlich, während IKK α für diesen Prozeß entbehrlich zu sein scheint (Tang et al. 2001a, 2001b).

2.2.11 Apoptose und Erkrankungen

Die Funktionsfähigkeit vielzelliger Organismen erfordert einen Mechanismus, der Zellen, die nicht mehr gebraucht werden oder deren Funktion gestört ist, gezielt absterben läßt. Diese Art des physiologischen Zelltodes, ohne Einwirkung eines entzündlichen Faktors, wird durch die Apoptose erreicht (Carson und Ribeiro 1993; Czaja et al. 1995). Eine gestörte Regulation des programmierten Zelltodes spielt eine Rolle in der Ätiologie von Krebs, AIDS, Autoimmunkrankheiten und degenerativen Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (Thatte und Dahanukar 1997). Diese Störungen können dazu führen, daß Zellen, die sterben sollen, überleben oder solche, die überleben sollen, sterben. So kann man Erkrankungen, bei denen der programmierte Zelltod eine entscheidende Rolle spielt, zwei unterschiedlichen Gruppen zuordnen: Erkrankungen mit einer zu niedrigen Apoptoserate und Erkrankungen, bei denen die Apoptoserate zu hoch ist. Zu der ersten Gruppe gehören u.a. Krebs, Diabetes und das Pfeiffersche Drüsenfieber. Eine hohe Apoptoserate ist bei AIDS (Thatte und Dahanukar 1997; deMartin et al. 1999), neurodegenerativen Störungen (Alzheimersche Krankheit, Parkinsonismus), ischämische Insulte (Herzinfarkt, Schlaganfall) und Toxin-induzierten Lebererkrankungen (z.B. durch Alkoholabusus) zu beobachten (Jones und Gores 1997).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die Apoptose sehr wichtig für den vielzelligen Organismus ist; eine Störung in ihrer Regulation kann fatale Folgen haben. Die pharmakologische Manipulation dieses Prozesses öffnet neue Möglichkeiten in der Vorbeugung und Behandlung der entsprechenden Erkrankungen. Eine pharmakologische Modulierung der Apoptose wurde bereits in der Krebstherapie eingesetzt. Es scheint ebenfalls klar zu sein, dass die Modulierung der Apoptose in Zellen, die an einer Inflammation beteiligt sind, eine interessante Alternative in der Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen werden könnte (Thatte und Dahanukar 1997).

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die Gesamtzahl der Tiere im Versuch betrug 98. Es wurden männliche c/BALB AnN Cr/Br-Mäuse (24–26g) mit einem Alter von 6–8 Wochen verwendet. Die Tiere wurden von der Fa. Charles River Laboratories, Sulzfeld bezogen. Die Haltung erfolgte in Gruppen von 4-5 Tiere in durchsichtigen Polycarbonatkäfigen (Makrolon) des Types II auf staubfreiem Weichholzgranulat. Raumtemperatur: 22°C, relative Luftfeuchtigkeit: 55 %, Belichtung: von 7⁰⁰ bis 19⁰⁰ Uhr. Die Tiere wurden kontinuierlich mit pelletiertem Futter (Altromin 1324) von der Fa. Altromin GmbH, mit folgender Zusammensetzung gefüttert: Inhaltsstoffe (19 % Rohprotein, 0,9 % Lysin, 4,0 % Rohfett, 6 % Rohfaser, 7,0 % Rohasche, 0,9 % Calcium, 0,7 % Phosphor) und Zusatzstoffe je kg (Vitamin A 15000IE, Vitamin D3 600IE, Vitamin E 75 mg, Kupfer 5 mg). Leitungswasser wurde ad libitum über Tränkflaschen gegeben. Die Tierversuche wurden unter der Versuchsnummer 35-9185.81/145/98 im Einklang mit dem § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.

3.2 Versuchssubstanzen

3.2.1 Galaktosamin (GalN)

Zur Sensibilisierung der Leber gegenüber TNF- α wurde eine Lösung von Galaktosamin in der Konzentration 70 mg/ml verwendet. Um das Lebergewebe für die anschließende TNF- α Behandlung zu sensibilisieren wurde als getrennte Injektion GalN intaperitoneal appliziert. Die Dosis betrug 700 mg/kg.

3.2.2 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

Im Versuch wurde murines TNF- α verwendet. Die Stammlösung wurde vor der Applikation mit 0,9 % Natriumchlorid und 0,1 % HSA (Humanes serumalbumin) auf eine Konzentration von 1 μ g/ml eingestellt. 15 Minuten nach der Sensibilisierung erfolgte über die Schwanzvene der Maus eine

intravenöse Gabe von TNF- α (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$). In Vorversuchen wurde eine Dosierung von 7, 8, bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ angewendet. Das Volumen jeder Lösung beträgt 0,25 ml pro Tier.

3.2.3 Klinik und Mortalität

Die Tiere wurden klinisch überwacht. Verhalten und Todesfälle wurden registriert.

3.2.4 Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Antikörper werden in der folgenden Tabelle in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet:

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Antigen	Tier	Reinheit	Verwendung	Verdünnung
IkB α	hum. IkB α	Ziege	IgG	Immunhistochemie	1:200
				Western-Blotting	1:200
IkB β	hum. IkB β	Kaninchen	IgG	Immunhistochemie	1:200
				Western-Blotting	1:1000
NF κ B p65	hum. NF κ B	Ziege	IgG	Immunhistochemie	1:500
				Western-Blotting	1:1000
DaG-IgG-HRP	IgG (Ziege).	Kaninchen	Serum	Western-Blotting	1:10000
GaR-IgG-HRP	IgG (Kan).	Ziege	Serum	Western-Blotting	1:10000

3.3 Morphologische Methoden

3.3.1 Perfusionsfixierung

Um eine optimale Strukturhaltung des Gewebes zu gewährleisten, wurden die Mausebern per-fusionsfixiert. Den Mäusen wurde das Futter 16 Stunden vor der Narkose entzogen, um den Glyko-gehalt der Leber abzusenken.

Für die Perfusion wurden die Mäuse mit Xylazin 2% (10 mg/kg) und Ketamin 10% (200 mg/kg) intraperitoneal (i.p.) narkotisiert.

Vorbereitung:

Nach der Narkotisierung wurde das Abdomen (ausgehend von der Linia alba) durch zwei Schnitte eröffnet. Der Darm wurde auf die linke Seite ausgelagert und in eine feuchte Mullkom-pressen gelegt, um die Vena portae darzustellen. Die Vena cava wurde ebenfalls dargestellt. Der gesamte Bauchraum wurde mit steriler NaCl-Lösung (0,9%) feucht gehalten.

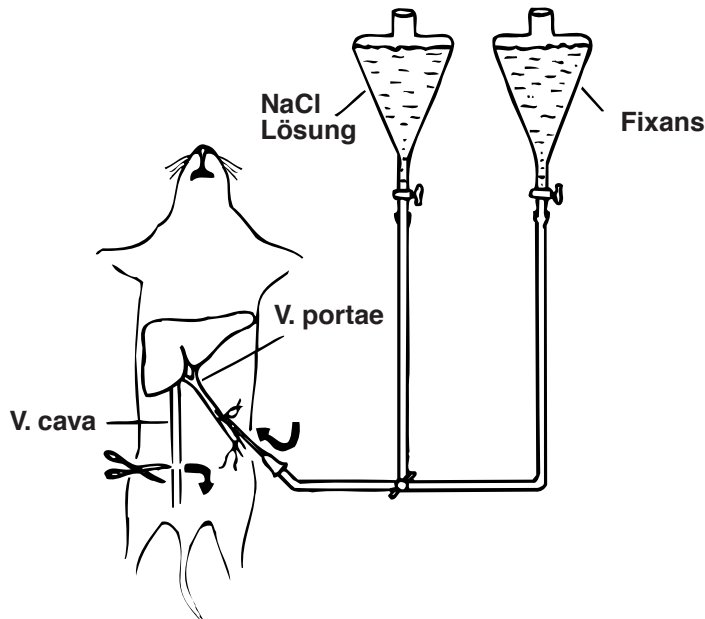


Abbildung 3: Perfusionsfixierung der Mauseleber über die Vena portae

Durchführung:

Die Perfusion der Lebern erfolgte über die Vena portae mittels einer Infusionsnadel (Butterfly), welche mit dem Infusionsbesteck in Verbindung stand und darüber sowohl mit der NaCl-Lösung als auch mit dem Fixans verbunden war (siehe Abbildung 3). Beide Lösungen konnten durch Umstellen des Dreiweghahnes nacheinander infundiert werden. Die Flaschen mit den Lösungen wurden ca. 1 m über der Maus befestigt, so daß eine Durchflußrate von etwa 25 ml/min eingestellt werden konnte.

Die Perfusion wurde durch Spülen für 60 sec mit 0,9%iger NaCl-Lösung und sofortigem Eröffnen der V. cava caudalis begonnen. Das Öffnen der Vena cava gewährleistet, daß die Perfusionslösung über die Lebervenen durch die Leber hindurch läuft und aus der Vena cava austritt.

Lebergewebe, das für biochemische Untersuchungen benötigt wurde, wurde sofort nach dem Spülen mit NaCl-Lösung entnommen und entsprechend weiterbehandelt (siehe Kapitel 3.3.1). Für morphologische Untersuchungen wurde unmittelbar nach der NaCl-Lösung 5 Minuten lang mit Fixans perfundiert. Eine gute Perfusion führte durch das Ausspülen der Erythrocyten innerhalb weniger Sekunden zur Aufhellung der Leber und verhinderte damit eine Bildung von Artefakten. Die Fixierung führte zu einer Härtung und gelbliche Färbung des Lebergewebes und entschied mit der Perfusion über die Qualität der histologischen Strukturhaltung.

Nach der Fixierung wurde die Leber aus der Bauchhöhle freipräpariert und mit einer Rasierklinge in kleine Würfel (Kantenlänge ca. 0,5 cm) geschnitten, die in 0,15 M PIPES - Puffer aufbewahrt wurden.

3.3.1.1 Fixantien und Pufferlösungen

Fixans für Elektronenmikroskopie

0,25% Glutaraldehyd (v/v)

2% Saccharose (w/v)

in 0,1 M PIPES-Puffer pH 7,4, frisch angesetzt

Fixans für Immunhistochemie

4% Paraformaldehyd (w/v)

0,05% Glutaraldehyd (v/v)

in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4

PIPES-Puffer (0,2 M, 500 ml Stammlösung)

30,2 g PIPES

500 ml A. dest.

Einstellen auf pH 7,4 mit 4 N NaOH (frisch angesetzt)

3.3.2 Microslicerschnitte

Nach der Perfusionsfixierung mit Glutaraldehyd (0,25%) wurden mit dem Microslicer 50 µm dicke Schnitte für die anschließende Einbettung in Epon angefertigt. Weiterhin wurden 70 µm dicke Schnitte für die Einbettung in LR-White angefertigt.

3.3.3 Nachfixierung mit wässrigem Osmiumtetroxid

Zur kontrastreichereren Darstellung phospholipidhaltiger Membranen wurde das Gewebe direkt vor der Einbettung in Epon mit 2% wässrigem Osmium bei 4 °C für 60 Minuten nachfixiert (Karnovsky 1971).

3.3.4 Einbettung

3.3.4.1 Paraffineinbettung

Es wurden größere Leberstückchen oder ganze Leberlappen eingebettet. Die Entwässerungsschritte und das Überführen des Gewebes in Paraffin wurde mit Hilfe des folgenden Protokolls durchgeführt, bei dem die Verweildauer des Gewebes in den einzelnen Lösungen wie folgt gewählt wurde:

2 × 70 % Ethanol	je 30 min
1 × 80 % Ethanol	je 30 min
3 × 96 % Ethanol	je 30 min
3 × abs. Ethanol	je 30 min
4 × Xylol	je 30 min
in Paraffin	über Nacht
2 × Paraffin	2 × 120 min
Einbettung in frischem Paraplast in Einbettformen	

3.3.4.2 Eponeinbettung

Für die morphologischen Untersuchungen, sowohl für die Licht- als auch für die Elektronenmikroskopie, wurden Microslicerschnitte in Epon eingebettet. Dazu wurden die Microslicerschnitte wie folgt dehydriert und in Epon überführt:

3 × 75 % Ethanol	je 5 min	4°C
3 × 85 % Ethanol	je 5 min	4°C
3 × 95 % Ethanol	je 5 min	4°C
3 × abs. Ethanol	je 5 min	RT
3 × Propylenoxid		RT
30 min Propylenoxid:Epon (1:1)		RT

Über Nacht in reinem Epon bei RT

Eponeinbettung in Beamkapseln, 36 h lang bei 60°C polymerisieren lassen (Wärmeschrank)

Eponeinbettungsmedium (25 ml)

13 g	Epon 812
6,1 g	DDSA Epon Härter
8,1 g	MNA Epon Härter
0,375 ml	DMP 30 Beschleuniger

3.3.4.3 LR-White-Einbettung

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die 70 µm dicken Microslicerschnitte mit der Rasierklinge in kleine Quadrate zerteilt (Kantenlänge 1-1,5 mm) und nach folgender Vorschrift dehydriert und in LR-White eingebettet:

70 % Ethanol	2 × 60 min	-10 °C
70 % Ethanol:LR-White (1:2)	30 min	-10 °C
LR-White	60 min	0 °C
LR-White	über Nacht	0 °C, auf Rotator
LR-White	2 × 60 min	RT

Einbettung in Gelatine kapseln, 24 h lang bei 50°C polymerisieren lassen (Wärmeschrank)

3.3.5 Herstellung von Schnitten, HE-Färbung von LR-White-Semidünnschnitten, Kontrastierung von Ultradünnschnitten

3.3.5.1 Herstellung von Gewebeschnitten

Das Schneiden der Paraffinblöckchen erfolgte mit einem Schlitten-Mikrotom. Die Schnittdicke betrug ca. 2 µm. Semidünnschnitte (1 µm) von LR-White eingebetteten Blöckchen wurden mit einem Histo-Diamantmesser am Ultramikrotom hergestellt.

Ultradünnschnitte von 30 nm wurden mit einem Diamantmesser am gleichen Mikrotom hergestellt.

3.3.5.2 Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist eine Methode, die auf einer Kombination von zwei Farbstoffen basiert. Hämatoxylin färbt den Zellkern und andere saure Strukturen (wie z.B. RNA-reiche Anteile des Cytoplasmas) blau, Eosin färbt das Cytoplasma rot.

Ablauf der HE-Färbung von LR-White Schnitten:

10 min lang	Hämatoxylin (nach Mayer)
7 min	Bläuen mit fließendem Leitungswasser
kurz	A. dest.
1–2 min lang	Eosin 0,1 %
kurz	Differenzieren in A. dest.
Eindeckeln in Eukitt	

Färbelösungen (nach Romeis 1989)

Hämatoxylin nach Mayer

1 g Hämatoxylin in 1000 ml A. dest. lösen
200 mg Natriumjodat (NaJO_3) und
50 g Kalilaun in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen
(Lösung ist blauviolett)
50 g Chloralhydrat und
1 g Zitronensäure zugeben (Farbton schlägt zu rotviolett um)
Filterieren, in geschlossener Flasche lange haltbar

Eosin (zur Plasmafärbung)

0,1 % wäßrige Lösung mit Eosin Y (ist löslich in Wasser und Alkohol)

3.3.5.3 Kontrastierung der Ultradünnschnitte

Bei der Elektronenmikroskopie hängt die Effektivität der Kontrastmittel von der Ordnungszahl der in ihnen enthaltenen Atome ab. Je höher deren Ordnungszahl ist, desto mehr Elektronen werden vom kontrastierten Schnitt gestreut und desto stärker ist der Kontrast. Durch das Kontrastieren der

Ultradünnschnitte mit Schwermetallsalzen, die Blei oder Uran enthalten, werden zelluläre Strukturen mit dem Elektronenmikroskop sichtbar gemacht.

Kontrastierlösungen:

Bleicitrat (nach Reynolds 1963)

0,665 g $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$

0,88 g $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

im 25 ml Erlenmeyerkolben für 30 min schütteln, bis alle Kristalle gelöst sind

1 M NaOH (ca. 4ml) zufügen, bis Lösung klar ist

mit A. dest. auf 25 ml auffüllen, ~pH7,2, vor Gebrauch 5 min zentrifugieren

Die Inkubation mit Bleizitrat erfolgte in Gegenwart von NaOH-Plätzchen unter einer Petrischale. Dadurch wurde vermieden, daß CO_2 der Raumluft eine Verbindung mit Blei eingeht und unerwünschte Hintergrundfärbungen hervorruft (Entstehung von NaHCO_3).

3.3.6 Elektronenmikroskopische Auswertung

Die kontrastierten Ultradünnschnitte des Lebergewebes wurden mit einem Philips 301 G Elektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV ausgewertet. Fotografiert wurde mit einer Plattenkamera auf Elektronenmikroskopie-Negative, die mit Hilfe eines Scanners eingescannt und ausgewertet wurden.

3.3.7 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinen, die an der Apoptose beteiligt sind

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixierten Paraffinschnitten durchgeführt.

3.3.7.1 Entparaffinieren

Die auf Objektträgern plazierten Paraffinschnitte wurden mit Xylol (2×5 min) entparaffiniert und mit einer absteigenden Alkoholreihe und destilliertem Wasser rehydriert. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte mit einem Fettstift umfahren. Durch diese hydrophobe Diffusionsbarriere konnte bei Tropfen-Inkubationen auf dem Schnitt das Volumen des Inkubationsmediums (z.B. Antikörperlösung) stark reduziert werden, ohne ein Austrocknen des Schnittes zu riskieren.

3.3.7.2 Antigen-Freilegung und Hemmung der endogenen Peroxidase

Die Demaskierung der Proteine zur Freilegung antigener Domänen erfolgte nach zweiminütigem Kochen der Schnitte in Zitronensäurepuffer in einem Dampfkochtopf. Danach erfolgte ein 3×2 minütiges Waschen mit A. dest. bei RT. Die Hemmung der endogenen Peroxidase wurde durch Inkubation mit 3% H_2O_2 für 10 Minuten erreicht. Mit PBS-Puffer wurden die Schnitte für 3×5 Minuten gespült und dann die nichtspezifischen IgG-Bindungsstellen für 60 Minuten mit Blocking-Serum abgesättigt.

3.3.7.3 Einsatz der Antikörper

Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei RT mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:500 für NF- κ B, bzw. 1:200 für I- κ B α und I κ B β) inkubiert.

Nach 3×5 Minuten Waschen mit PBS folgte die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (30-90 min); dann erneutes Waschen mit PBS (3×5 min). Für die Visualisierung von NF- κ B wurden die Schnitte mit einem biotinylierten Esel-anti-Ziege IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20 für 30 Minuten inkubiert. Durch das Avidin-Biotin-System kann das NF- κ B-Signal an der Antikörperbindungsstelle amplifiziert werden. Die Visualisierung von I κ B β erfolgte mit Hilfe eines Merrettich-Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen IgG Sekundärantikörper. Für die Visualisierung von I- κ B α wurde ein biotinylierter Esel-anti-Ziege IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20 für 30 Minuten verwendet. Vor dem Eindeckeln in Kaisers Gelatine wurden die Schnitte unter Sichtkontrolle mit Peroxidase-Substrat gefärbt. Bei den Negativkontrollen wurden die Schnitte mit TNB-Puffer anstatt mit dem Primärantikörper inkubiert.

3.3.8 Kernfärbung mit DAPI für die Fluoreszenzmikroskopie

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der selektiven Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI an DNA und der Bildung von stark-fluoreszierenden DNA-DAPI-Komplexen mit hoher Spezifität. DAPI wird von Zellen sehr rasch in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, während eine zytoplasmatische Fluoreszenz nicht nachweisbar ist. Sie wird u.a. zum Nachweis von Apoptosen, Nekrosen und Mitosen eingesetzt.

Die Zellkerne wurden mit DNA-interkalierenden Fluorophoren markiert. Dafür wurden die Präparate für 5 min mit $2 \mu\text{g/ml}$ 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) inkubiert. Mit UV-Licht (Wellenlänge 360 nm) angeregt, fluoresziert DAPI mit Wellenlängen im Bereich zwischen 400 und 500 nm (blau).

3.3.8.1 Eindeckeln der Präparate

Die Präparate wurden in Mowiollösung (20 g Mowiol 4-88 in 80 ml PBS und 40 ml Glycerin) luftblasenfrei eingeschlossen. Um ein Ausbleichen der Schnitte zu vermeiden, wurde der Mowiollösung 25% (w/v) Bleichschutz (2,5 g n-Propylgallat in 50 ml PBS und 50 ml Glycerin) zugefügt (Giloh und Sedat 1982). Lichtgeschützt bei 4°C gelagert sind die Präparate über Jahre hinweg haltbar.

3.3.9 TUNEL-Test

Für die Markierung der DNA-Strangbrüche in Zellkernen von Hepatocyten wurden in LR-White eingebettete Semidünnschnitte von Mäusen $4\frac{1}{2}$ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung verwendet. Der Test wurde nach der Methode von Gavrieli et al. 1992 mit Hilfe des In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, durchgeführt. Die Schnitte wurden mit Proteinase K ($20 \mu\text{g/ml}$) in Tris-HCl-Puffer

für 7 Minuten bei 37°C inkubiert, mit PBS gespült und im Anschluß mit TdT und Fluoreszein dUTP für 60 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Spülen wurden die Präparate in Mowiol eingedeckelt. Die spezifische TUNEL-Kontrolle wurde nur mit dUTP inkubiert.

3.3.10 Lichtmikroskopische Auswertung

Die Gewebeschnitte wurden mit einem Leica DMLB Lichtmikroskop bei unterschiedlichen Vergrößerungen untersucht und ausgewertet. Eingesannt wurden sie mit einer Sony Photo-Videokamera und mit Hilfe des Adobe Photoshop-Programms digitalisiert.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Homogenisation des Lebergewebes

Das frisch entnommene Lebergewebe wurde gewogen, mit einer Schere in kleine Stückchen zerschnitten und sofort in eisgekühltem Homogenisationspuffer (5 ml/g Leber) mit einem Potter homogenisiert (1000 rpm 2 strokes, je/min).

Das Homogenat wurde in Zentrifugationsröhrchen abgefüllt und anschließend in einer gekühlten Tischzentrifuge bei 50 g für 10 min zentrifugiert, wodurch Zellen, Zelltrümmer und Bindegewebe pelletiert wurden. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung und anschließende Messungen der Enzymaktivitäten benutzt (Völkl und Fahimi 1985).

Homogenisationspuffer

250 mM Saccharose

5 mM MOPS

1mM EDTA

0,1 % Ethanol

mit KOH auf pH 7,4 eingestellt

3.4.2 Isolierung von Zellkernen und Cytosol aus Lebergewebe

3.4.2.1 Kernisolierung

Zur Untersuchung der Menge und Aktivität verschiedener Proteine und deren Lokalisation wurde aus der Mausleber eine Kernfraktion und eine cytosolische Fraktion separiert. Die Isolierung der Zellkerne und des Cytosols erfolgte nach einer modifizierten Methode von Rickwood et al. (1997).

Die Lebern wurden mit einer Schere fein zerkleinert, mit Puffer A suspendiert (9ml/g Leber) und anschließend mit dem Potter S bei 1000 rpm (2 strokes, je/min) homogenisiert. Nach dem Filtrieren

ren durch Mullgewebe wurde das Homogenat mit einer Beckman J2-HS Zentrifuge bei 600 g und 5°C 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde mit Puffer A resuspendiert (die Hälfte des ursprünglichen Volumens) und noch einmal 10 min bei 600 g zentrifugiert. Dieses Pellet wurde mit der 9-fachen Menge Puffer B resuspendiert, bei 1000 rpm mit dem Potter homogenisiert (2 strokes, /pro min) und mit der Beckman L5-65B Ultrazentrifuge bei 70000 g bei 5°C 80 min zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation enthält die Zellkerne, die hergestellten Proben wurden bei -80°C gelagert.

Puffer A

0,25 M Saccharose

5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl

pH 7,4

Puffer B

2,2 M Saccharose

5 mM MgCl₂

10 mM Tris-HCl

pH 7,4

3.4.2.2 Cytosol-Isolierung

Die cytosolische Fraktion wurde aus dem Überstand der ersten Zentrifugation (siehe Kernisolierung) mittels 30 minütiger Zentrifugation bei 100000 g und 5°C in der Beckman L5-65B Ultrazentrifuge isoliert.

3.4.3 Isolierung von Mitochondrien und Cytosol

3.4.3.1 Mitochondrienisolierung

Für die Isolierung der Mitochondrien wurde das Lebergewebe homogenisiert und zentrifugiert (siehe 3.3.1). Der gewonnene Überstand wurde abpipettiert, das Pellet mit 2 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und ein zweites Mal mit der Beckman TJ-6 Zentrifuge bei 50 g und 5°C 10 min zentrifugiert. Die beiden gewonnenen Überstände bildeten zusammen die Fraktion A. Vor der Weiterverarbeitung dieses Homogenates wurden Aliquots für die Proteinbestimmung und die enzymatischen Messungen entnommen.

Die Fraktion A wurde bei 4°C und 2860 g in der Beckman J2-HS Zentrifuge 10 min zentrifugiert, das Pellet mit 2 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und einer zweiten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen unterzogen. Das Pellet wurde mit 4 ml TVBE-Puffer resuspendiert und bildete die schwere mitochondriale Fraktion (Fraktion B). Die Überstände dieser zwei Zentrifugationen (Fraktion C) wurden auf Eis aufbewahrt.

Von allen Fraktionen wurden Aliquots für Proteinbestimmungen und Messungen der Aktivität und Menge bestimmter Proteine entnommen; der Rest wurde bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert.

TVBE-Puffer

1 mM NaHCO₃

1mM EDTA

0,1% Ethanol

0,1% Triton X-100

pH 7,2

3.4.3.2 Cytosol-Isolierung

Die sogenannte postmitochondriale Fraktion (Fraktion C) diente der Gewinnung der cytosolischen Fraktion. Von den einzelnen Proben wurden jeweils 4 ml entnommen und bei 100000 g und 4 °C 30 min mit der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation war die cytosolische Fraktion.

3.4.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Bradford (1976) angewandt.

Prinzip:

Die Bindung von Coomassie Brilliant Blau an Proteine verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm. Die optische Dichte (OD) wird damit bei 595 nm gemessen.

Durchführung:

100 µl Probe (mit TVBE verdünnt) wurde mit 1 ml Bradford-Reagenz (Bio-Rad Färbelösung mit destilliertem Wasser 1:5 verdünnt) gemischt, 10 min bei RT inkubiert und die optische Dichte bei 595 nm gegen den TVBE-Nullwert gemessen. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin (BSA) in einer Konzentration von 0,05mg/ml.

3.4.5 Bestimmung der spezifischen Enzymaktivitäten

Die Messung der spezifischen Enzymaktivitäten von Cytochrom c Oxidase und Caspase 3 in den isolierten Fraktionen sollte Hinweise auf morphologische Veränderungen geben, die in der Zelle nach GalN/TNF-α Behandlung stattfanden.

3.4.5.1 Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität

Die Messung der Aktivität der Cytochrom c Oxidase wurde mit dem Gesamthomogenat, der mitochondrialen und der cytosolischen Fraktion durchgeführt. Die Enzymaktivität ist in U/ml angegeben (1U= µmol umgesetztes Substrat oder gebildetes Produkt pro min).

Die Enzymaktivität der Cytochrom c Oxidase wurde nach Cooperstein und Lazarow (1977) bestimmt.

Prinzip:

Durchführung: 50 µl Probe wurden mit 10 µl Triton 10% (mit Wasser verdünnt) und 440 µl TVBE gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert (Verdünnung 1:10).

Aus diesem Gemisch wurden 50 µl entnommen und mit 450 µl TVBE gemischt (Verdünnung 1:100), wovon erneut 50 µl Probe entnommen und mit 450 µl TVBE gemischt wurden (Verdünnung 1:1000). Die optische Dichte (OD) wurde anschließend spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

Die Cytochrom c Oxidaseaktivität wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\log \frac{OD_{\text{Start}}}{OD_{\text{Ende}}}}{\text{min}} \times \frac{\text{Verdünnung}}{\text{Startvolumen}} \times \frac{\text{Reaktionsvolumen}}{100}$$

3.4.5.2 Messung der Caspase 3-Aktivität

Die Messung der Caspase 3-Aktivität wurde in der cytosolischen Fraktion nach der Methode von Stenicke und Salvesen (1997) durchgeführt. Die Enzymaktivität ist in U/ml angegeben (1U= µmol umgesetztes Substrat oder gebildetes Produkt pro min).

Prinzip: Die aktive Caspase 3 spaltet das fluorogene Ac/DEVD/AMC-Substrat (Asp-Glu-Val-Asp/7-Amino-4-Methyl-Coumarin) zwischen D und AMC und führt zur Freisetzung des fluorogenen AMC. Die AMC-Fluoreszenz wurde spektrofluorometrisch quantifiziert, indem eine Excitationswellenlänge von 380 nm benutzt wurde. Die Emissionswellenlänge lag zwischen 420 und 460 nm.

Durchführung: 150 µg cytosolische Probe wurde mit 1 ml »Caspase«-Puffer gemischt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C mit 10 µl fluorogenem Ac/DEVD/AMC-Substrat inkubiert. Als Kontrolle der Reaktion wurde 10 µl eines spezifischen Inhibitors (AcDEVD-CHO) dem Inkubationsmedium zugefügt und bei gleicher Wellenlänge gemessen.

»Caspase«-Puffer

20 mM PIPES

100 mM NaCl

1mM EDTA

10 mM DTT

0,1 % CHAPS

10 % Saccharose

pH 7,2

3.4.6 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wurde für die Untersuchung von Menge und Vorhandensein bestimmter Proteine eingesetzt. Die SDS-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteinproben stammten aus den verschiedenen Zellfraktionen. Mit Probenpuffer (60 mM Tris, 10% Glycerin, 2% SDS, 0,005% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol, pH 6,8) im Verhältnis 1:1 gemischt, wurden die Proben für 10 min bei 95°C denaturiert. Es wurden selbstgegossene Gele (85 × 75 × 1 mm) mit 13 Auftragespuren verwendet. Zusätzlich zum Auftragen von 5–25 μ l der mit Probenpuffer gekochten Proteinproben wurde zur späteren Bestimmung des Molekulargewichtes der Polypeptidbanden bei jedem Gel mindestens ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Nach dem Auftragen wurden die Proteine unter Verwendung von Tris-Glycin-SDS-Puffer (0,05 M Tris, 0,38 M Glycin, 0,01% SDS, pH 8,3) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurde eine Stromstärke von 15 mA für das Sammeln der Polypeptide im Sammelgel und von 25 mA für deren Trennung im Trenngel appliziert.

3.4.6.1 Zusammensetzung der Gele

Alle Elektrophoresen wurden mit 10 bzw. 12,5 %igen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Gelkonzentration wurde abhängig vom Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins ausgewählt. Die Trenn- und Sammelgele waren wie folgt zusammengetzt:

<i>10%ige Gele</i>			
<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>	
Acrylbisacrylamid (30:0,8)	370 μ l	Acrylbisacrylamid(30:0,8)	1850 μ l
0,5 M Tris, pH 6,8	0,5 μ l	0,5 M Tris, pH 6,8	1450 μ l
APS (10%)	20 μ l	APS (10%)	40 μ l
SDS (10%)	20 μ l	SDS (10%)	60 μ l
A.dest.	1300 μ l	A.dest.	2100 μ l
<i>12,5%ige Gele</i>			
<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>	
Acryl-bis-acrylamid(30:0,8)	370 μ l	Acryl-bis-acrylamid (30:0,8)	1850 μ l
0,5 M Tris, pH 6,8	0,5 μ l	0,5 M Tris, pH 6,8	1450 μ l
APS (10%)	20 μ l	APS (10%)	40 μ l
SDS (10%)	20 μ l	SDS (10%)	60 μ l
A. dest.	1300 μ l	A. dest.	2100 μ l

Der Mix wurde nach Zugabe von jeweils 2 μ l TEMED (Beschleuniger der Polymerisation des Acrylamid) vorsichtig gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen.

*Verwendete Molekulargewichtstandards:**»Low range« Standard*

<i>Molekulargewicht (kDa)</i>	<i>Protein</i>
97,4	Phosphorylase B
66,2	Rinderserumalbumin
45	Ovalbumin
31	Karboanhydrase
21,5	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
14,4	Lysozym

3.4.7 Western-Blotting, Immuninkubation und Detektion der Immunkomplexe

Zum spezifischen Nachweis von bestimmten Proteinen (z.B. NF- κ B) erfolgte nach der Gelelektrophorese der zu untersuchenden Proteinproben zunächst das Blotting des Gels zum Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran. Den Immuninkubationen der Membran mit den jeweiligen Antikörpern schloß sich die Detektion der Immunkomplexe mittels Chemilumineszenz an.

3.4.7.1 Western-Blotting und Immuninkubation

Nach der Elektrophorese (Towbin et al. 1979) wurde das Gel und das Blotting-Papier mit Blotpuffer äquilibriert, die PVDF-Membran mit Methanol für 1 min inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Der Blotpuffer wurde direkt vor der Verwendung entgast. Das Blotting der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte durch Elektrotransfer im Semi-Dry-Verfahren für 30 min bei 150 mA. Nach dem Blotvorgang wurden die Banden der Molekulargewichtstandards auf der Membran mit einem Bleistift markiert, mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und mit dem Primärantikörper über Nacht auf dem Schüttler bei RT inkubiert (siehe 3.3.7.2). Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau für 30 min angefärbt und anschließend durch mehrmaliges Waschen solange entfärbt bis der Gelhintergrund klar wurde (siehe 3.4.7.5).

<i>PBS (»Phosphate buffered saline«)</i>	<i>PBS/Tween-Puffer</i>
137 mM NaCl	PBS
2,68 mM KCl	0,05% Tween 20
1,66 mM NaH ₂ PO ₄	
9,58 mM Na ₂ HPO ₄	
pH 7,4	

Blotpuffer

20 mM Tris pH 8,3
150 mM Glycin
20% Methanol

3.4.7.2 Inkubation mit den Antikörpern

Die Membran wurde mit Blocking-Puffer (PBS/Tween-Puffer mit Milch mit einem Fettgehalt von 0,3% im Verhältnis 1:1 gemischt) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, zweimal kurz mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und dann mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper wurde die Blotmembran 4×10 min mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG oder Meerrettich-Peroxidase-konjugiertes Kaninchen-anti-Ziege IgG, Verdünnung 1:10000) 1h bei RT inkubiert. Die Detektion der Immunkomplexe erfolgte nach erneutem Waschen (2×5 , 3×10 min mit PBS/Tween).

3.4.7.3 Detektion der Immunkomplexe

Die Immunkomplexe wurden mit Hilfe der ECL-Reaktion (»Enhanced Chemiluminescence«) nachgewiesen (Kaufmann et al. 1987). Dazu wurden die Blots für 1 min bei RT mit dem ECL-Reagenz (jeweils 2 ml von den beiden Amersham-Reagentien) inkubiert. Im Anschluß wurde der Blot in eine Folie gelegt, ein Negativfilm aufgelegt und in einer Kassette für 1-45 min exponiert. Nach 2 min Wässern, 3 min Entwickeln, 10 min Fixieren und 20 min erneutem Wässern wurden die Filme getrocknet.

3.4.7.4 »Strippen« von Blotmembranen

Das »Strippen« von Blotmembranen ermöglichte es, bereits ausgewertete Blotmembranen für weitere Antikörperinkubationen zu benutzen. Beim »Strippen« bewirkt der Stripping-Puffer das Ablösen aller Antikörper und des Blocking-Reagenz von der Blotmembran. Die Inkubation der Membran wurde in einem Hybridisierungssofen bei 52°C wie folgt durchgeführt:

3×20 min Inkubation mit Stripping-Puffer, 3×15 min mit PBS/Tween-Puffer, jeweils unter Schwenken.

Diese »gestrippte« Membran konnte für eine neue Inkubation verwendet werden oder sie wurde in Folie eingeschweißt, bei -20°C aufbewahrt und bei Bedarf aufgetaut und wiederverwendet.

Stripping-Puffer

100 mM β -Mercaptoethanol

2% SDS

62,5 mM Tris

pH 6,7

3.4.7.5 Färben und Trocknen von Gelen

Die Visualisierung der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden erfolgte durch die Coomassie-Färbung. Die Gele wurden nach Abschluß des Blotvorganges für 30 min mit Coomassie-Lösung inkubiert, mit Entfärbelösung durch deren mehrfaches Wechseln entfärbt und mehrmals

mit Wasser gewaschen. Nach ausreichendem Wässern wurden die Gele zwischen zwei in Wasser eingeweichten Zellophanblättern auf einer Glasplatte luftblasenfrei aufgespannt und getrocknet.

Coomassie Brilliant Blau

0,5 g Coomassie-Blau R 250

400 ml Methanol

100 ml Essigsäure

500 ml A. dest

Entfärbelösung

400 ml Methanol

100 ml Essigsäure

500 ml A. dest

3.5 Datenverarbeitung und Statistik

3.5.1 Digitalisieren von Gewebeschnitten, Gelen und Blots, sowie Quantifizierung von immunreaktiven Banden und der Caspase 3-Aktivität

Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe einer Lichtmikroskopkamera (Kaiser Scando dyn color) eingescannt und ebenso wie eingescannte gefärbte Polyacrylamidgele, Immunoblots und Negative elektronenmikroskopischer Aufnahmen unter Verwendung der Adobe Photoshop Software digitalisiert. Die Intensität der immunreaktiven Banden der Immunoblots wurde mit der NIH-Image Software (Version 1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) densitometrisch quantifiziert. Die Quantifizierung der biochemischen Ergebnisse wurde mit Hilfe des Excel 2001 Programmes durchgeführt. Beschriftungen und Layouts der Abbildungen wurden mit dem Adobe Illustrator Programm fertiggestellt, während das Layout und das Formatieren dieser Arbeit mit dem Adobe InDesign Programm erfolgte.

3.5.2 Quantifizierung der apoptotischen Zellen

Die Quantifizierung der apoptotischen Hepatocyten wurde an HE-gefärbten Semidünnschnitte von Mäusen 4½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung durchgeführt (n=3). Insgesamt wurden 300 Zellkerne nach dem Zufallsprinzip ausgezählt, der Prozentsatz der Kerne mit Chromatinkondensierung auf die Gesamtzahl bezogen und ausgerechnet.

3.5.3 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden durch den »one-way ANOVA«-Test analysiert. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des InStat-Programmes (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) durch den Dunnett Multiple Comparisons Test und dem Bonferroni-Test (Vergleich mit der Kontrolle) ermittelt ($p \leq 0,05$). Alle Daten in dieser Studie sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

3.5.4 Verwendete Computersoftware

Für die Erstellung dieser Arbeit wurden die in der folgenden Tabelle aufgelisteten Computerprogramme benutzt:

Tabelle 2: Übersicht über die verwendete Computersoftware

Programm	Hersteller	Anwendung
Excel 2001	Microsoft	Erstellen von Graphiken, Tabellenkalkulation
Illustrator 10	Adobe	Layout von Bildern und Graphiken
InDesign 2.0.1	Adobe	Layout der vorliegenden Arbeit
InStat	Graph Pad Software	Statistische Auswertung
NIH-Image 1.62	NIH	Quantifizierung von Proteinbanden
Photoshop 7.0	Adobe	Einscannen und digitale Bildbearbeitung
Word	Microsoft	Textverarbeitung

4 Ergebnisse

4.1 Klinische Befunde

Vor der Verabreichung von GalN und TNF- α war das Allgemeinbefinden der Tiere ungestört; sie zeigten rege Bewegungsaktivität.

Nach 4 bis 8 Stunden waren einige der GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen in ihren Bewegungen eindeutig eingeschränkt und hochgradig apathisch. Die Extremitäten und die sichtbaren Schleimhäute waren blass, das Fell stumpf und gesträubt.

Nach 16 Stunden hatten sich die überlebenden Tiere weitgehend erholt und nahmen wieder aufmerksam an der Umgebung teil.

Nach 24 Stunden zeigten einige von den Tieren ein etwas stumpfes Fell, die Bewegungsaktivität war aber nicht mehr eingeschränkt. Die Tiere waren wieder an der Umgebung interessiert.

Bei den Tieren der Kontrollgruppen konnte keine Störung des Allgemeinbefindens im Verlauf der Versuche festgestellt werden.

Für diese Arbeit wurden Tiere, die eine Dosierung von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TNF- α erhielten, verwendet.

4.2 Mortalität

In Vorversuchen mit einer hohen TNF- α -Konzentration zwischen 7-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ war die Mortalität hoch, sie lag hier bei etwa 50%. Diese Tiere starben oder wurden in der Zeit zwischen 4 und 8 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung getötet.

Eine Reduzierung der TNF- α auf 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ führte ebenfalls zu apoptotischen Veränderungen in der Leber und zu einer deutlichen Erhöhung der Überlebensrate. Während dieser Versuche mussten insgesamt 6 von insgesamt 72 Tiere aufgrund ausgeprägter agonaler Symptomatik vorzeitig getötet werden.

4.3 Lichtmikroskopische Darstellung der Leberzellveränderungen

Um die diversen Zellveränderungen nachzuweisen, wurden die GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäuse zu verschiedenen Zeiten narkotisiert und die Leber über die V. portae perfundiert und

fixiert. Die präapoptischen und apoptotischen Veränderungen wurden mit Hilfe folgender Färbemethoden lichtmikroskopisch dargestellt:

4.3.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

In LR-White eingebettete Semidünnschnitten lassen sich mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung im Gegensatz zu eponieingebetteten Schnitten Apoptosen und Mitosen leicht identifizieren. Das Chromatin der Zellkerne verhält sich aufgrund des Nucleinsäuregehaltes basophil und färbt sich mit dem basischen Hämatoxylin blau. Das Cytoplasma der Hepatocyten ist acidophil und färbt sich mit saurem Eosin rot an (Abbildung 4). Die Apoptosen, charakterisiert durch die Chromatinkondensierung an der Kernmembran, sind nach 3 ½ Stunden erstmals nachweisbar (Abbildung 4c) und sind bis einschließlich 24 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung identifizierbar. Die meisten Apoptosen treten nach 4 ½ Stunden auf und betreffen etwa 30% der Hepatocyten. Nach 48 Stunden treten die ersten Mitosen auf (Abbildung 4h), ein Zeichen dafür, dass sich die Leber regeneriert.

4.3.2 DAPI-Färbung

Mit der DAPI (Diamino-phenylindol) - Kernfärbung wurden die Apoptosen und Mitosen fluoreszenzmikroskopisch an LR-White-Semidünnschnitte nachgewiesen.

Die für die Apoptose charakteristischen girlandenartigen Heterochromatinverdichtungen an der Kernmembran sind auch mit dieser Methode erstmals nach 3 ½ Stunden und bis 24 Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung nachweisbar (Abbildung 5c-g). Nach 48 Stunden sind keine Apoptosen, jedoch zahlreiche Mitosen darstellbar (siehe Abbildung 5h).

4.3.3 TUNEL-Test in der Leber

Mit Hilfe des TUNEL-Tests (TdT-mediated dUTP nick end labeling) werden die freien Enden der DNA-Bruchstücke markiert, die im Verlauf des apoptotischen Zelltodes entstehen. Die Polymerisierung des dUTP an den 3'-OH-Enden der fragmentierten DNA führt zu einem fluoreszierenden Reaktionsprodukt, das in den Zellkernen der apoptotischen Hepatocyten identifiziert werden konnte (Abbildung 6c). Die Chromatinkondensierung ist auch hier deutlich zu erkennen. Die Negativkontrolle an einem nicht behandeltem Tier (Abbildung 6a) und die spezifische TUNEL-Kontrolle (Fluoreszein dUTP ohne TdT) an einem GalN/TNF- α -behandeltem Tier (Abbildung 6b) zeigten keine fluoreszierende Reaktion.

4.3.4 Zeitlicher Verlauf der morphologischen Zellveränderungen 2 ½ bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung

Um die Zeitabhängigkeit der Effekte von GalN/TNF- α in den Hepatocyten der Mäusen nachzuweisen, wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten narkotisiert und die Leber über die V. portae

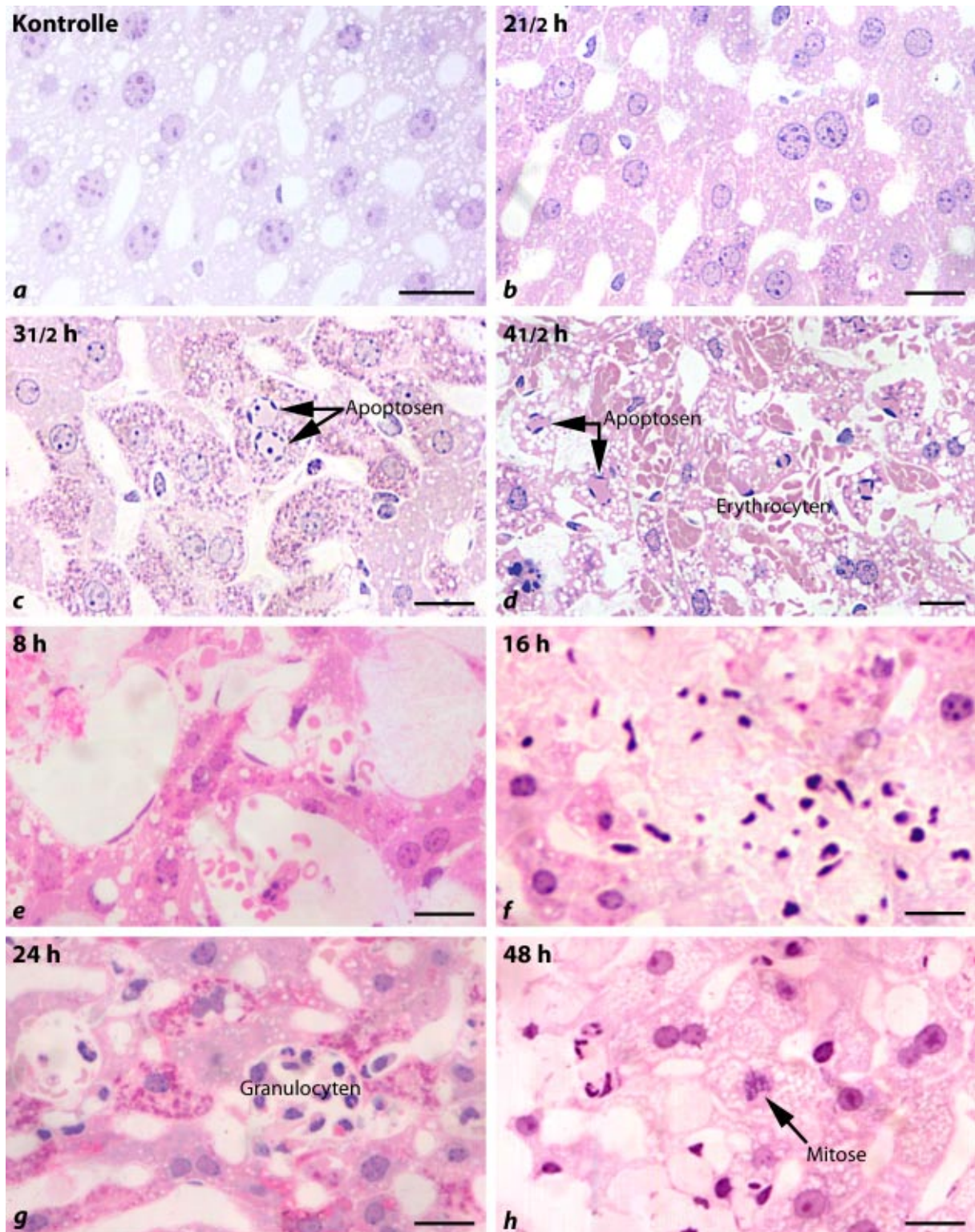


Abbildung 4: Kinetik über das Auftreten von Apoptosen und weiteren Veränderungen in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen.

Lichtmikroskopische Aufnahmen von HE-gefärbten LR-White Semidünnschnitten der Leber.

a) Kontrollleber b) keine morphologischen Veränderungen 2 1/2 Stunden nach Behandlung c) Apoptotische Hepatocyten mit typischer Chromatinkondensierung entlang der Kernwand nach 3 1/2 Stunden d) zahlreiche apoptotische Hepatocyten, Blutfülle in den Sinusoiden 4 1/2 Stunden nach Behandlung e) gleichzeitiges Auftreten von Apoptosen und Nekrosen nach 8 Stunden f) multiple Nekroseherde als Zeichen der massiven Leberschädigung nach 16 Stunden g) Nekrose mit Granulocytenherd nach 24 Stunden h) Leberregeneration gekennzeichnet durch Mitosen 48 Stunden nach Behandlung. Maßstab 20 μm .

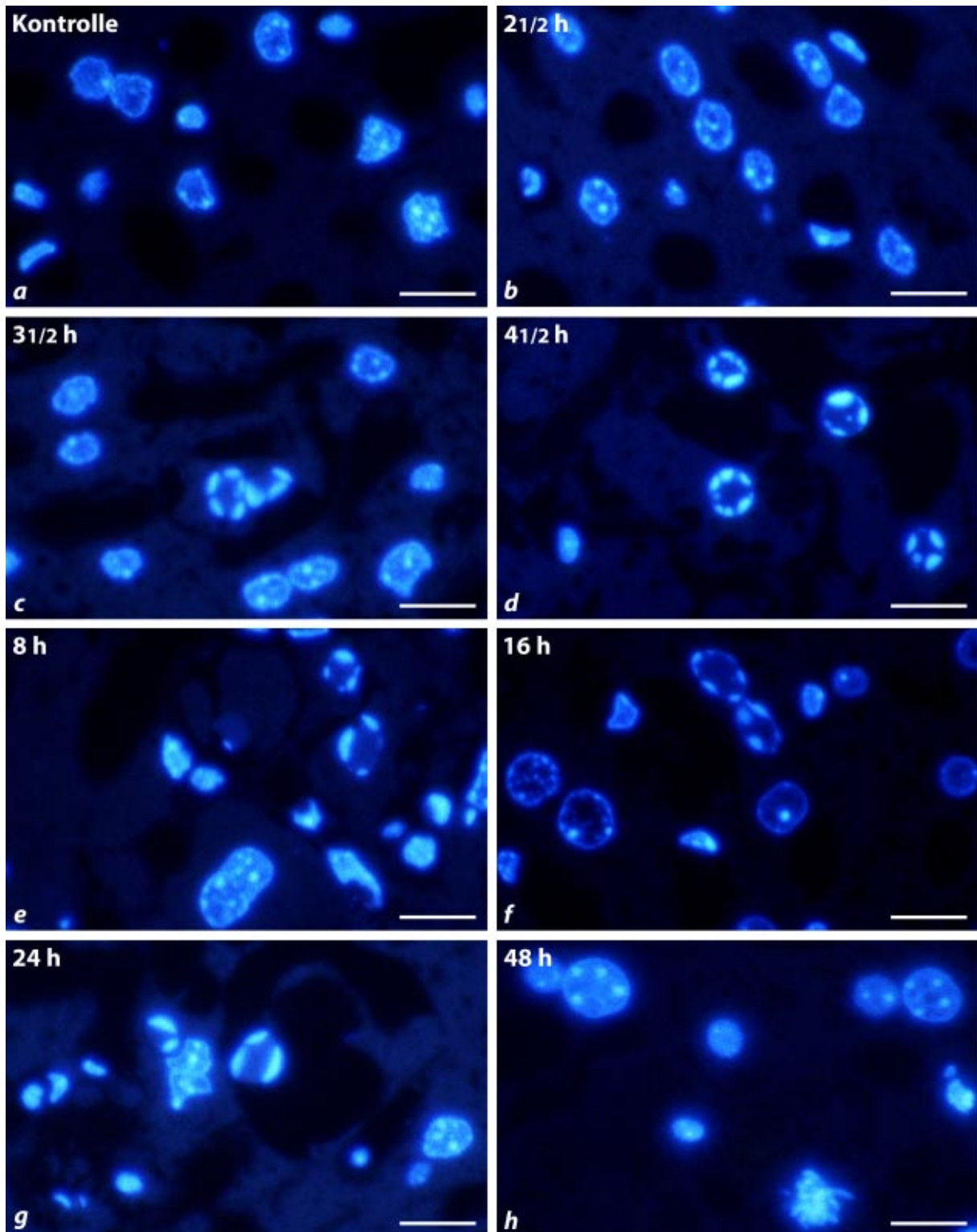


Abbildung 5: Kinetik über das Auftreten von Kernveränderungen in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen (LR-White Schnitte, DAPI-Methode, Kernfluoreszenz).

a) Kontrollleber **b)** keine morphologischen Veränderungen in den Kernen 2½ Stunden nach Behandlung **c)** einzelne girlandenartige Heterochromatinverdichtungen an der Kernmembran nach 3½ Stunden **d)** zahlreiche apoptotische Hepatocyten 4½ Stunden nach Behandlung **e)** Verringerung der Anzahl apoptotischer Kerne nach 8 Stunden **f)** unveränderte Zellkerne, dazwischen einzelne apoptotische Zellkerne 16 Stunden nach Behandlung **g)** einzelne Apoptosen nach 24 Stunden **h)** Auftreten von Mitosen 48 Stunden nach Behandlung. Maßstab 20 μ m.

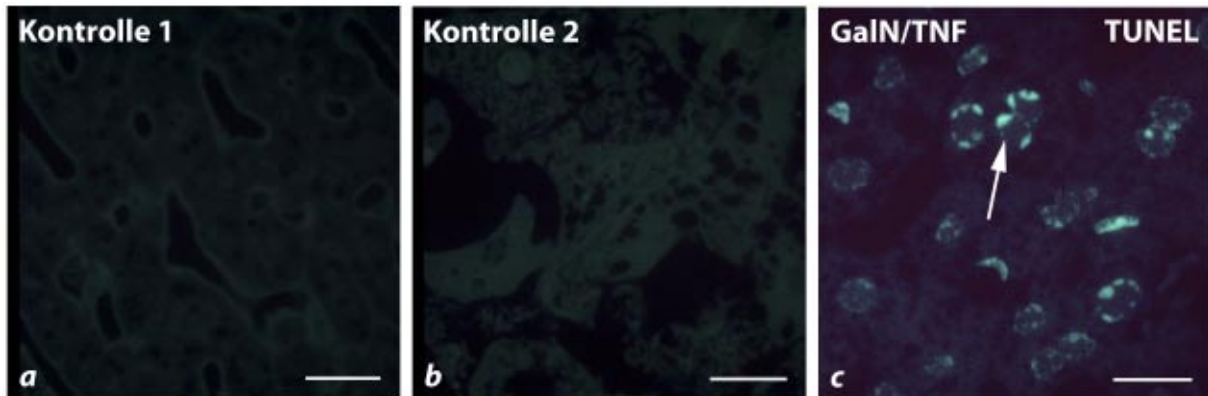


Abbildung 6: TUNEL-Test (LR-White eingebettete Semidünnschnitte)

a) Kontrolle 1: Lebergewebe von unbehandelten Mäusen inkubiert mit TdT und Fluoreszein dUTP **b)** TUNEL-spezifische Kontrolle: Lebergewebe von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen mit Fluoreszein dUTP ohne TdT **c)** Leber von GalN/TNF- α -behandelten Mäusen: Fluoreszenzreaktion der Chromatinkondensierung in den apoptotischen Hepatocyten. Maßstab 20 μ m.

perfundiert. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von 2 $\frac{1}{2}$ bis 48 Stunden. Untersuchungen vor diesem Zeitraum (30, 60, 90 min) zeigten keine morphologischen Veränderungen (Ergebnisse nicht gezeigt). Als Kontrolle dienten Lebergewebeschnitte von unbehandelten Mäusen.

Die Chromatinkondensierung am Zellkernrand als typisches Erscheinungsbild der Apoptose konnte erstmals 3 $\frac{1}{2}$ Stunden nach Behandlung festgestellt werden (Abbildung 4c). Diese apoptotischen Veränderungen waren nach 4 $\frac{1}{2}$ Stunden (30 %) am zahlreichsten (Abbildung 4d). Auffällig war zu diesem Zeitpunkt auch die große Anzahl an Erythrocyten in den Sinusoiden, was auf eine durch Gewebeschädigung hervorgerufene erschwerte Perfusion des Lebergewebes zurückgeführt wurde.

8 Stunden nach der Behandlung konnte man ein distinktiertes Bild der Zellveränderungen beobachten, bei dem neben Apoptosen, charakterisiert durch Abrundung der Hepatocyten und Loslösen aus dem Verband, auch Nekroseherde präsent waren (Abbildung 4e). Die pathologischen Veränderungen im Leberläppchen waren bereits zu diesem Zeitpunkt sehr ausgeprägt und nahmen zu bis 16 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt dominierten die nekrotischen Herde (Abbildung 4f).

Nach 24 Stunden konnten noch Apoptosen nachgewiesen werden, das Lebergewebe begann sich ab diesem Zeitpunkt langsam zu erholen (Abbildung 5g). Untersuchungen, die 36 Stunden nach der Behandlung erfolgten (Ergebnisse nicht gezeigt), zeigten keine Apoptosen, im Leberläppchen waren noch vereinzelt kleine Nekroseherde zu sehen.

48 Stunden nach TNF- α -Behandlung konnten durch die HE- und DAPI-Färbung Mitosen nachgewiesen werden (Abbildung 4h, 5h). Auch mit dem Nachweis der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Epon-eingebetteten Semidünnschnitten konnten nach 48 Stunden Mitosen nachgewiesen werden (Abbildung 9h). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß lichtmikroskopisch zunächst Apoptosen, gefolgt von Apoptosen zusammen mit massiven Nekrosen nachweisbar sind. Die Leber erholt sich jedoch von diesen pathologischen Veränderungen und als Zeichen der Regeneration sind nach 48 Stunden Mitosen nachweisbar.

4.4 Elektronenmikroskopische Darstellung präapoptotischer und apoptotischer Veränderungen

Wichtige Hinweise zum Auftreten der präapoptotischen Veränderungen liefert die elektronenmikroskopische Darstellung des Lebergewebes. Hier werden Veränderungen der einzelnen Zellorganellen gezeigt, so dass die Wirkung von zellulären Signalen, ausgelöst durch TNF- α , demonstriert werden kann.

4.4.1 Veränderungen der Mitochondrien

3 ½ Stunden nach TNF- α Behandlung fielen in präapoptotischen Hepatocyten Mitochondrien auf, bei denen durch das Einreißen der äußeren Membran eine hernienartige Ausstülpung der inneren Membran nach außen zu erkennen war (Abbildung 7a,b).

4.4.2 Apoptotischer Hepatocyt

4 ½ Stunden nach TNF- α Behandlung sah man zahlreiche apoptotische Hepatocyten losgelöst aus dem Zellverband, mit glatter Plasmamembran, kondensiertem Chromatin und Mitochondrien mit hernienartigen Ausstülpungen. Zu diesem Zeitpunkt waren einige »apoptotic bodies«, bestehend aus einem Konglomerat apoptotisch veränderter Mitochondrien, die von einer benachbarten Leberzelle phagocytiert worden sind, zu erkennen (Abbildung 7d).

4.4.3 Morphologie apoptotischer Körperchen und Nekrose

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnten apoptotische Körperchen schon nach 4 ½ Stunden genau dargestellt werden (Abbildung 7d). Nach 24 Stunden waren viele apoptotische Zelltrümmer mit veränderten Mitochondrien und zahlreiche Nekrosen vorhanden (Abbildung 8a). Die Zelltrümmer waren teilweise von den Hepatocyten phagocytiert und lysosomal verdaut worden oder lagen als Kluster im Sinus (Abbildung 8b).

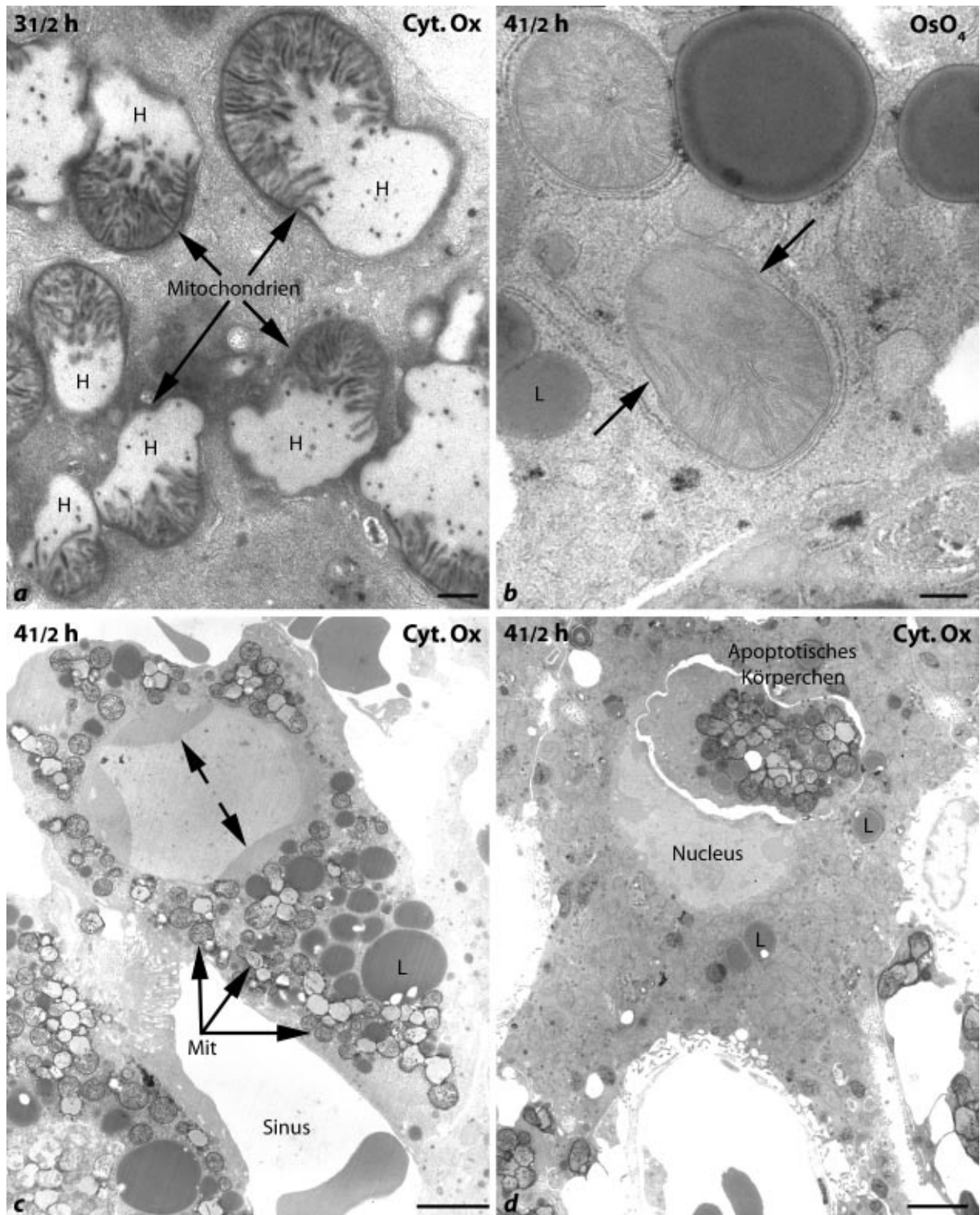


Abbildung 7: Elektronenmikroskopische Darstellung präapoptotischer und apoptotischer Veränderungen in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen nach 3 $\frac{1}{2}$ und 4 $\frac{1}{2}$ Stunden (Epon Schnitte, DAB-Methode zur Darstellung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Mitochondrien a, c und d).
a) präapoptotische Veränderungen der Mitochondrien: Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran mit Hernienbildung (H) der inneren Mitochondrienmembran **b)** Mitochondrium mit Ruptur der äußeren Membran (Pfeile) **c)** Chromatinkondensierung (Pfeile) entlang der Kernmembran eines apoptotischen Hepatocyten **d)** »Apoptotisches Körperchen« mit veränderten Mitochondrien, von einer Leberzelle phagocytiert. L = Lipid
 Maßstab a und b 0,2 μ m; c und d 2 μ m.

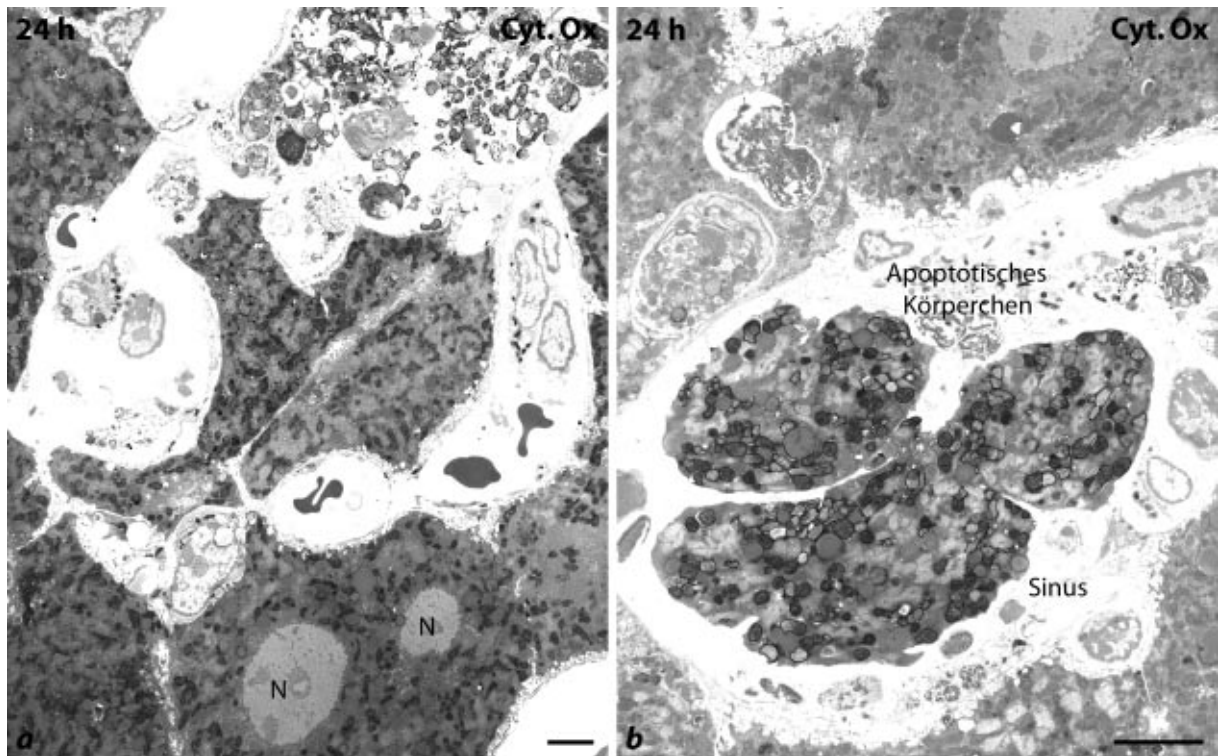


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Darstellung der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen nach 24 h (Epon Schnitte, DAB-Methode, Darstellung Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Mitochondrien).

a) apoptotische Zelltrümmer und großflächige Nekrosen 24 Stunden nach Behandlung **b)** Cluster von »apoptotischen Körperchen« im Sinus sowie Phagozytose »apoptotischer Körperchen« durch Hepatocyten. N = Nucleus, Maßstab 4 μ m.

4.5 Histochemische und immunhistochemische Untersuchungen

Lichtmikroskopisch wurden neben den morphologischen auch histo-, bzw. immunhistochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität, als Marker für den mitochondrialen Stoffwechsel präapoptotischer und apoptotischer Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen, sowie die Präsenz von NF- κ B und dessen Inhibitorproteine im Zellkern und Cytoplasma dieser Zellen sollten die morphologisch bereits beschriebenen Ergebnisse bestätigen und unterstreichen.

4.5.1 Cytochrom c Oxidase-Aktivität 2 ½ bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung

Mit Hilfe der DAB-Methode (Angermüller und Fahimi 1981) wurde der Aktivitätsnachweis der Cytochrom c Oxidase durchgeführt. Morphologisch zeichneten sich die ersten präapoptotischen Veränderungen in den Hepatocyten, die durch ein Konglomerat von DAB-gefärbten Mitochondrien charakterisiert sind, schon nach 2 ½ Stunden ab (Abbildung 9b). Apoptotische Hepatocyten (Abbildung 9c–f) weisen eine hohe Aktivität von Cytochrom c Oxidase auf. In Kontrollen und nach

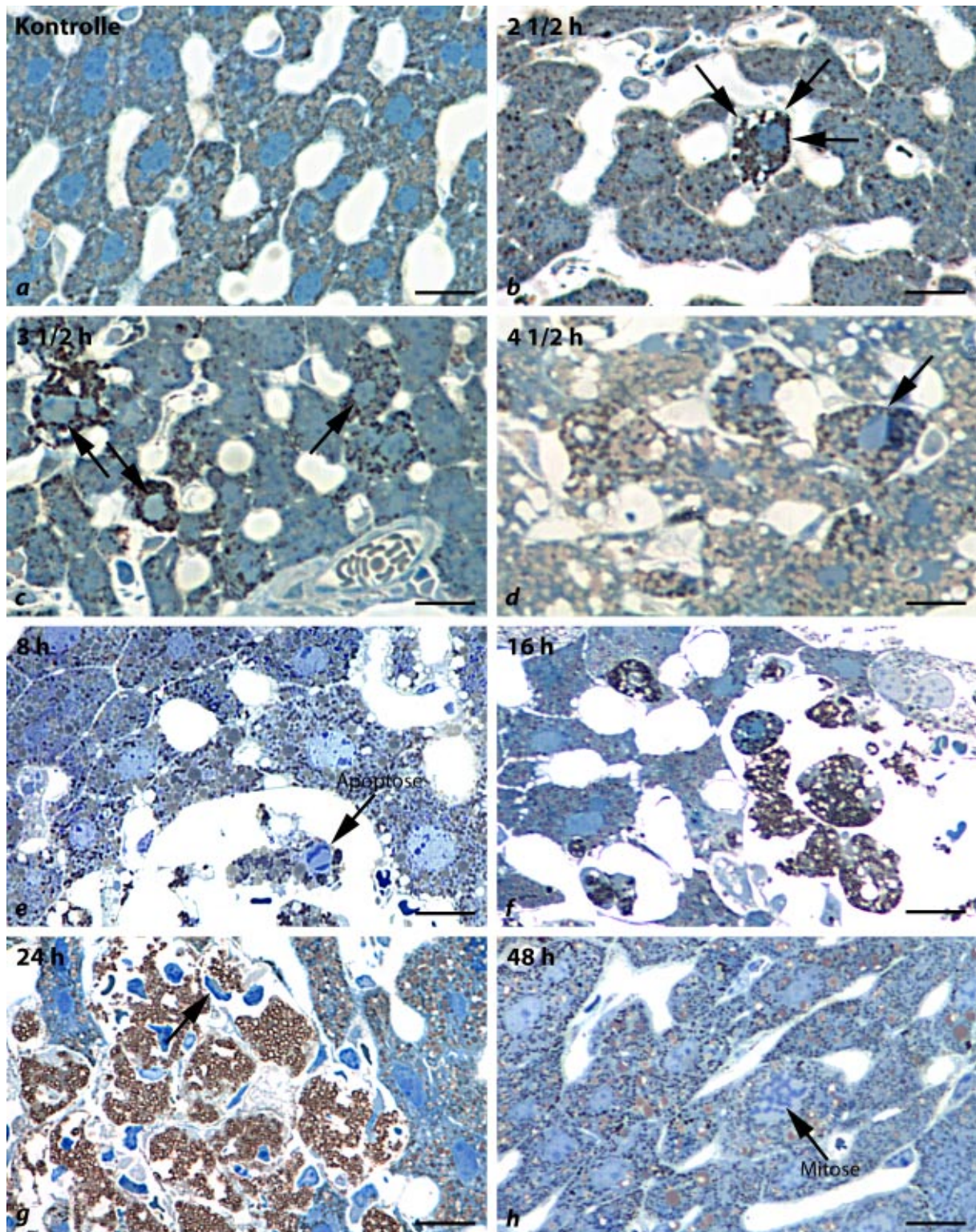


Abbildung 9: Kinetik der Aktivitätsveränderungen von Cytochrom c Oxidase in der Leber von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen (Epon-Einbettung, Semidünnschnitte, DAB-Methode zur Darstellung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität).

a) Kontrollleber mit unterschiedlicher Aktivität in verschiedenen Hepatocyten **b)-d)** hohe Aktivität in präapoptotischen Hepatocyten ($b=2\frac{1}{2}$ h) (Pfeil) und apoptotischen Hepatocyten ($c=3\frac{1}{2}$ h und $d=4\frac{1}{2}$ h) (Pfeile) **e)** gleichzeitiges Auftreten von Apoptosen und Nekrosen im Lebergewebe nach 8 Stunden **f)** multiple Nekroseherde als Zeichen der massiven Leberschädigung 16 Stunden nach Behandlung **g)** einzelne nachzuweisende Apoptosen, umgeben von Nekrosen nach 24 Stunden **h)** morphologisch intakte Leberzellen mit stärkerer Aktivität als in den Kontrollen, vereinzelt Mitosen 48 Stunden nach Behandlung. Maßstab 20 μ m.

48 Stunden findet man das heterogene Muster Cytochrom c Oxidase aktiver und inaktiver Hepatocyten. Nach 48 Stunden war die Cytochrom c Oxidase-Aktivität in den Mitochondrien stärker als in den Kontrolllebern (Abbildung 9h). Mitosen sind nach 48 Stunden identifizierbar (Abbildung 9h).

4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von NF- κ B und I κ B in Hepatocyten 10 Minuten bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an Paraformaldehyd-fixierten Paraffinschnitten durchgeführt.

Im Vordergrund dieser Untersuchungen stand der Nachweis von NF- κ B und I κ B und deren unterschiedliche Lokalisation nach TNF- α -Behandlung. Der Komplex aus NF- κ B und I κ B befindet sich in inaktiver Form im Cytosol.

Das I κ B-Protein hat die Rolle des Inhibitors für NF- κ B und führt zur Stabilität dieses Komplexes und dessen Verbleib im Cytoplasma. Unter Einwirkung verschiedener Cytokine, wie z.B. TNF- α wird diese Verbindung gelöst, I κ B wird phosphoryliert, ubiquitinyliert und anschließend im Proteasom degradiert. NF- κ B wird nach dem Ablösen von I κ B in den Zellkern transloziert.

4.5.2.1 NF- κ B 30 Minuten bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung

NF- κ B ist in Kontrolllebern nur im Cytoplasma der Hepatocyten nachweisbar (Abbildung 10b). Als Kontrolle wurden die Schnitte mit TNB-Puffer statt des Primärantikörpers inkubiert. Es wurde dabei kein Reaktionsprodukt nachgewiesen (Abbildung 10a). Die Translokation von NF- κ B in den Zellkern begann 30 min nach GalN/TNF- α Behandlung (Abbildung 10c). Nach 4 ½ Stunden war es noch im Heterochromatin apoptotischer Hepatocyten nachweisbar, während in den nicht apoptotischen Zellkernen kein Reaktionsprodukt detektierbar war (Abbildung 10d). Eine diffuse Färbung des Cytoplasmas dieser Hepatocyten nach 4 ½ Stunden zeigte die Translokation von NF- κ B zurück ins Cytoplasma (Abbildung 10d).

4.5.2.2 I κ B β 10 Minuten bis 3 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung

I κ B β ist genau wie NF- κ B im Cytoplasma von Hepatocyten der Kontrolllebern zu identifizieren und zeigte eine starke Immunreaktion (Abbildung 10f). Das Ersetzen des Primärantikörpers mit TNB-Puffer diente als Kontrolle und führte zu keiner Reaktion im Cytoplasma der Hepatocyten von Kontrolllebern (Abbildung 10e). 10 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung ist es im Cytoplasma noch sichtbar (Abbildung 10g), konnte in dem Zeitraum 30 Minuten bis 2 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). I κ B β taucht jedoch nach 3 ½ Stunden erneut im Cytoplasma auf (Abbildung 10h).

Im Zellkern konnte I κ B β zu keinem der untersuchten Zeitpunkte nachgewiesen werden.

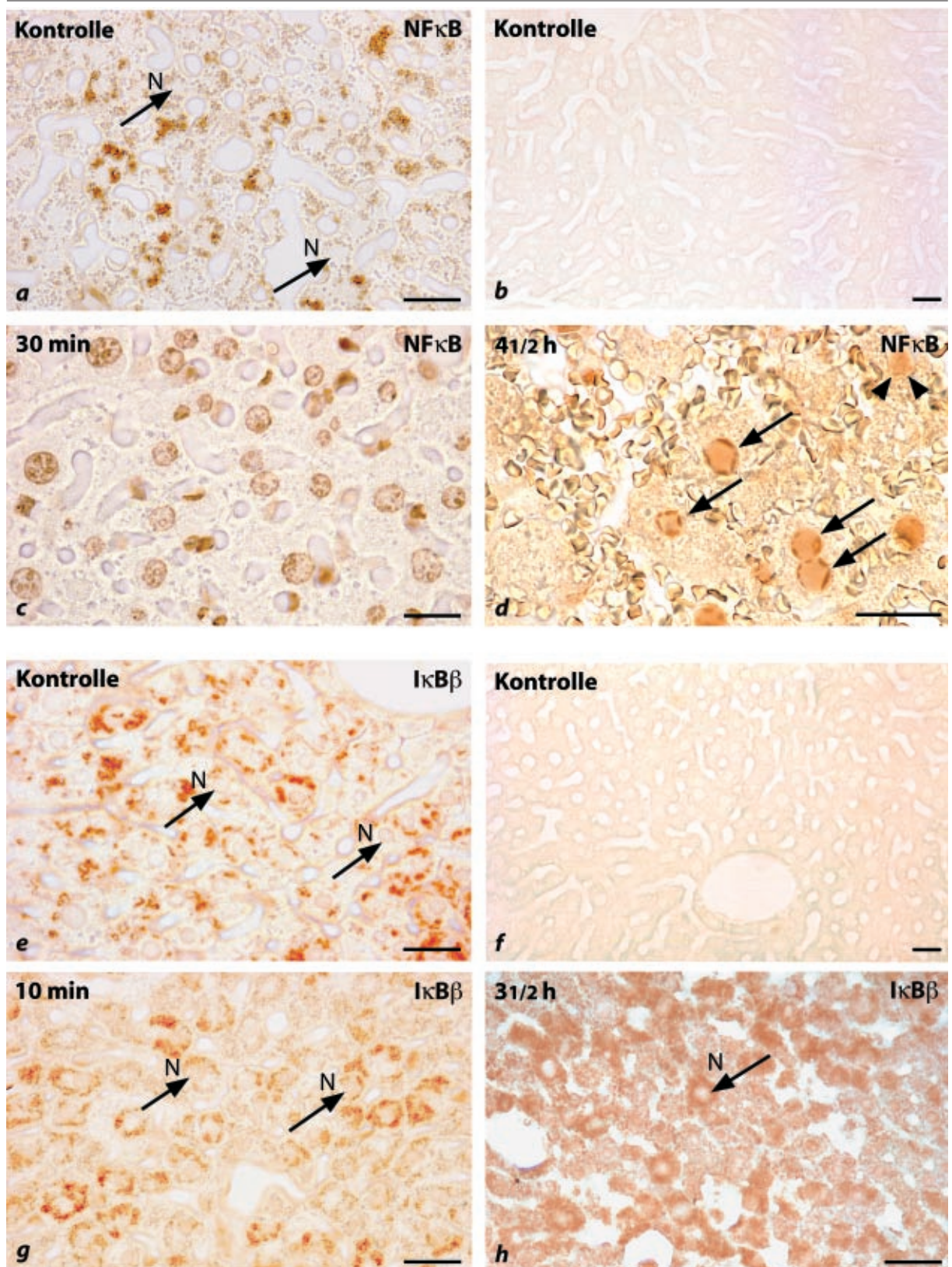


Abbildung 10: Immunhistochemischer Nachweis des Transkriptionsfaktors NF- κ B (a-d) und seines Inhibitors I κ B β (e-h) in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen (Lichtmikroskopie, Paraffinschnitte, Inkubation mit NF- κ Bp65-Antikörper, bzw. I κ B β -Antikörper).

a) NF- κ Bp65 im Cytoplasma der Hepatocyten unbehandelter Mäuse **b), f)** Kontrollleber ohne Antikörperinkubation **c)** 30 Minuten nach GalN/TNF- α Behandlung ist NF- κ Bp65 im Zellkern der Hepatocyten identifizierbar **d)** apoptotische Zellkerne enthalten NF- κ Bp65 im kondensierten Chromatin **e)** I κ B β im Cytoplasma der Hepatocyten unbehandelter Mäuse **g)** Verringerung der Menge an I κ B β im Cytoplasma 10 Minuten nach GalN/TNF- α Behandlung **h)** I κ B β im Cytoplasma wieder sichtbar 3 ½ Stunden nach Behandlung. N = Nucleus, Pfeilspitzen = kein Reaktionsprodukt im Kern eines nicht apoptotischem Hepatocyt, Maßstab 20 μ m.

4.5.2.3 I κ B α

Immunhistochemisch konnte I κ B α im Cytoplasma nicht nachgewiesen werden. Im Zellkern bei den Kontrolltieren war es nur andeutungsweise zu identifizieren. 30 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung nimmt die Kernreaktion leicht zu (Abbildung 11b).

4.6 Isolierung von Zellkernen und Cytosol mittels Zellfraktionierung

Für biochemische Untersuchungen verschiedener Proteine, die an der Apoptose beteiligt sind, wurden aus Lebergewebe Zellkerne und Cytosol mittels differentieller Zellfraktionierung isoliert. Um die Reinheit der hergestellten Kernfraktionen morphologisch zu überprüfen, wurden die Proben fixiert und im Anschluß in Epon eingebettet.

4.6.1 Mikroskopische Darstellung der Kernfraktion

Verschiedene Kernfraktionen wurden licht- und elektronenmikroskopisch untersucht, um deren Reinheit und somit deren Eignung für biochemische Messungen zu beurteilen. Die Abbildung 12a verdeutlicht, daß die Kernfraktion hauptsächlich Zellkerne enthielt. Elektronenmikroskopisch war die Strukturhaltung der Zellkerne der Kontrollen hervorragend (Abbildung 12b). Die Abbildung 12c zeigt die Kernfraktion 4½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung mit typischer apoptotischer Chromatinkondensierung an der Kernmembran einiger Zellkerne.

4.6.2 Proteinmuster der isolierten Zellkerne und des Cytosols von Kontrolltieren

Zellkerne und Cytosol wurden mittels differentieller Zellfraktionierung aus den Lebern männlicher c/BALB-Mäuse isoliert. Das Muster der Polypeptidbanden im Coomassie-gefärbten SDS-Gel demonstriert die unterschiedliche Verteilung der Proteine in Zellkernen und Cytosol (Abbildung 13). Im Vergleich zur Zellkernfraktion ist im Cytosol bei 65 kDa eine Proteinbande zu erkennen, die dem Protein NF- κ Bp65 zugeordnet wird.

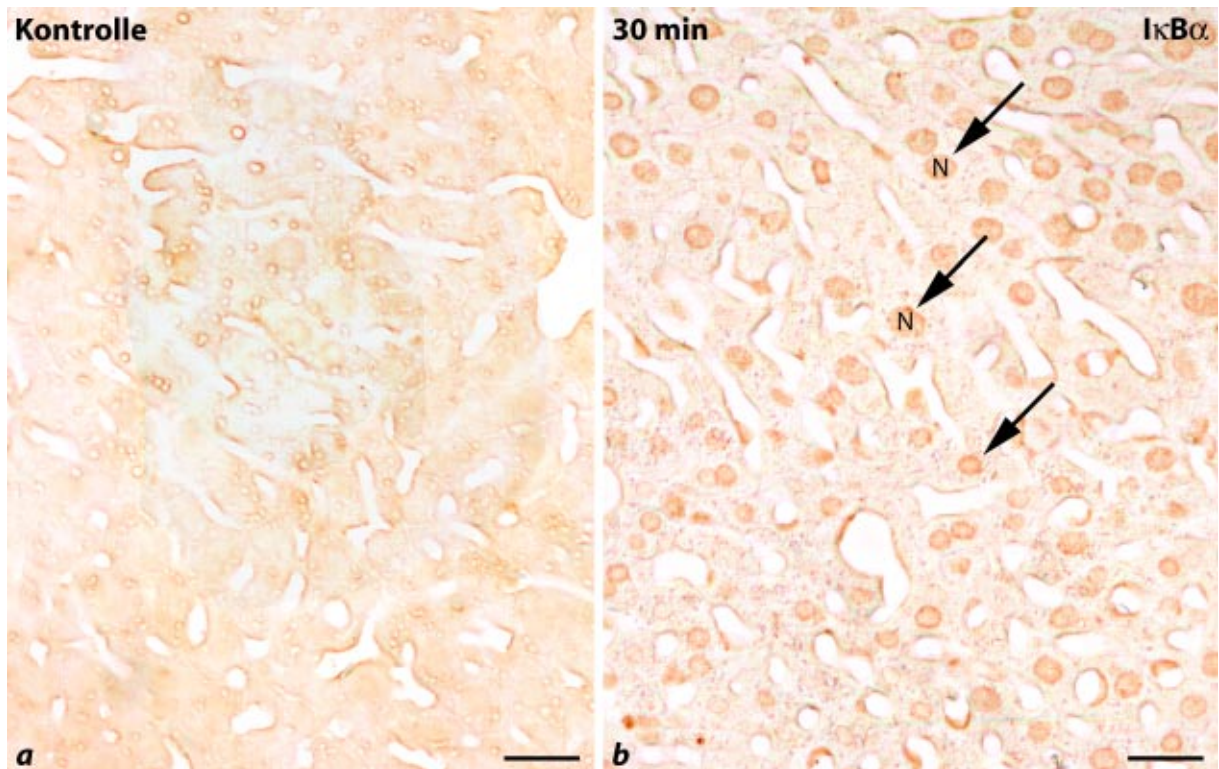


Abbildung 11: Immunhistochemischer Nachweis des Inhibitorproteins IκBα in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF-α-behandelten Mäusen (Lichtmikroskopie, Paraffinschnitte, Inkubation mit IκBα-Antikörper).

a) unbehandeltes Lebergewebe, IκBα konnte hier weder im Zellkern, noch im Cytoplasma nachgewiesen werden b) Lebergewebe 30 Minuten nach GalN/TNF-α-Behandlung, mit Lokalisation von IκBα im Zellkern. Maßstab 20 μm.

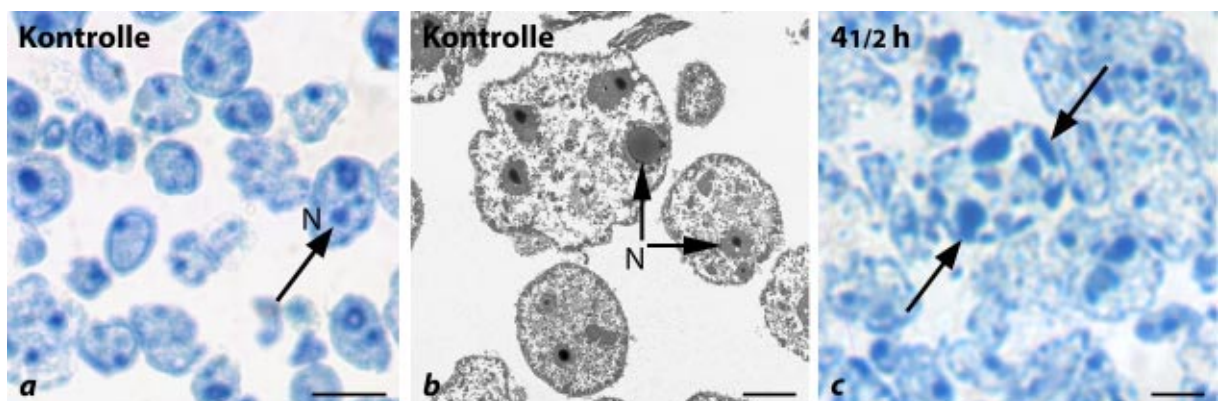


Abbildung 12: Mikroskopische Darstellung der Reinheit isolierter Zellkerne (Epon- Einbettung, Richardson-Färbung für Lichtmikroskopie; 1,5% Glutaraldehyd, Osmiumtetroxid-Fixierung für Elektronenmikroskopie).

(a) Licht- und (b) elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellkernfraktionen von Kontrolllebern und (c) Lebergewebe von GalN/TNF-α-behandelten Mäusen. Auffällig die Kerne apoptotischer Hepatocyten mit Chromatinkondensierung entlang der Kernmembran. Maßstab a und c 40 μm, b = 2 μm.

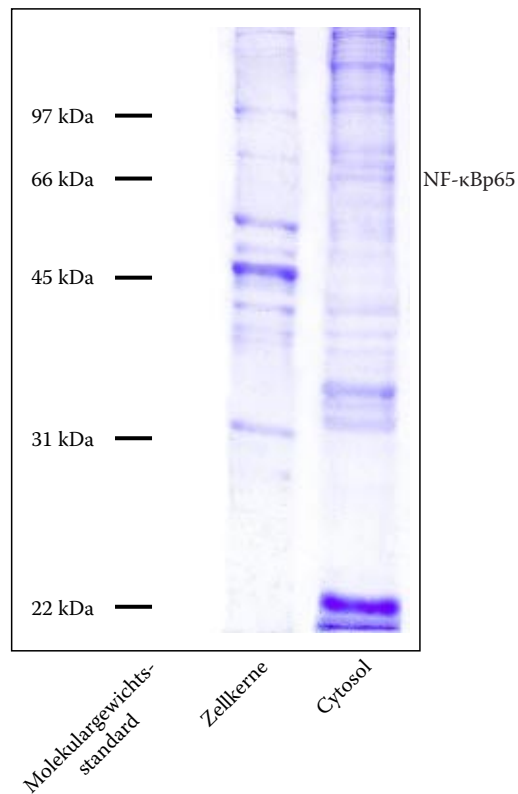


Abbildung 13: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel von isolierten Zellkernen und Cytosol.

Eine isolierte Zellkernfraktion und isoliertes Mäuselebercytosol wurden auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen, das nach SDS-PAGE mit Coomassie gefärbt wurde. Zur Bestimmung des Molekulargewichts diente der »low range« Molekulargewichtstandard.

4.7 GalN/TNF- α induzierte Veränderungen der Proteinmenge an NF- κ B und I κ B in Cytosol- und Zellkernfraktionen

NF- κ B und I- κ B (siehe Kapitel 3.4) wurden in isolierten Kern- und Cytosolfractionen biochemisch quantifiziert.

Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von 5 min bis 4½ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung (n=3).

4.7.1 NF- κ B ist 30 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung im Zellkern deutlich nachweisbar

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der eine besondere Rolle bei der Apoptose in Lebern von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen spielt, stand im Vordergrund der biochemischen Untersuchungen. NF- κ B war zu jedem untersuchtem Zeitpunkt nach TNF- α -Behandlung sowohl im Zellkern als auch im Cytosol nachweisbar.

Ein schwaches Signal im Zellkern wurde bereits 5, 10, bzw. 20 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung festgestellt (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine statistische Auswertung erfolgte beginnend

mit der Tiergruppe 30 Minuten nach TNF- α -Behandlung. Danach stieg die nachgewiesene Proteinnmenge kontinuierlich an und erreichte nach 2½ Stunden das Maximum, um danach abzufallen. Nach 4½ Stunden sank die quantifizierte NF- κ B-Menge auf 30% dieses Maximumwertes (Abbildung 14) ab. In der Kernfraktion der Kontrolltiere konnte kein NF- κ B nachgewiesen werden (Abbildung 14). Von den gleichen Tieren wurde die NF- κ B Menge im Cytosol bestimmt (Abbildung 15).

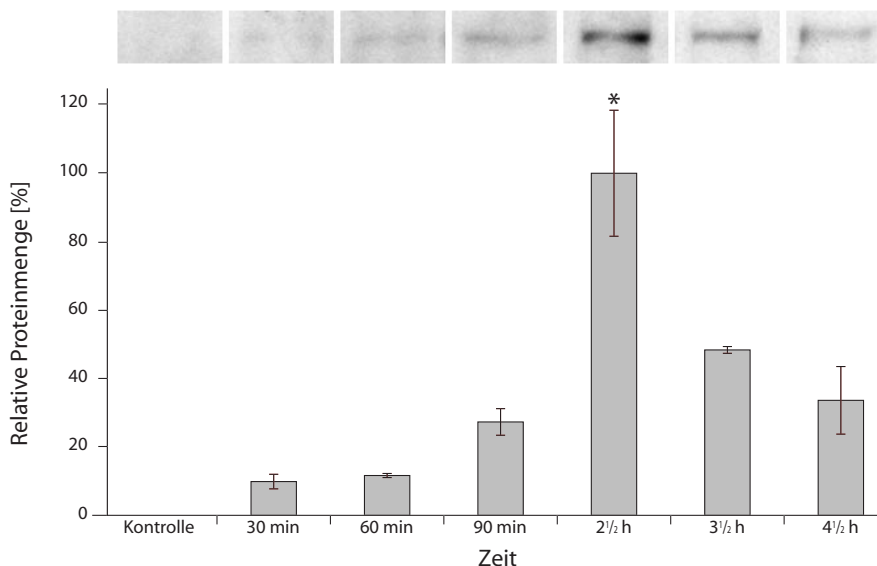


Abbildung 14: TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg von NF- κ B im Zellkern 2½ Stunden nach der Behandlung.

Kinetik der Western Blot-Analyse des 65 kDa-Proteins NF- κ B in den Zellkernfraktionen der Mäuseleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung (oben) und deren Quantifizierung (unten) [n=3]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Dunnett Multiple Comparisons Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

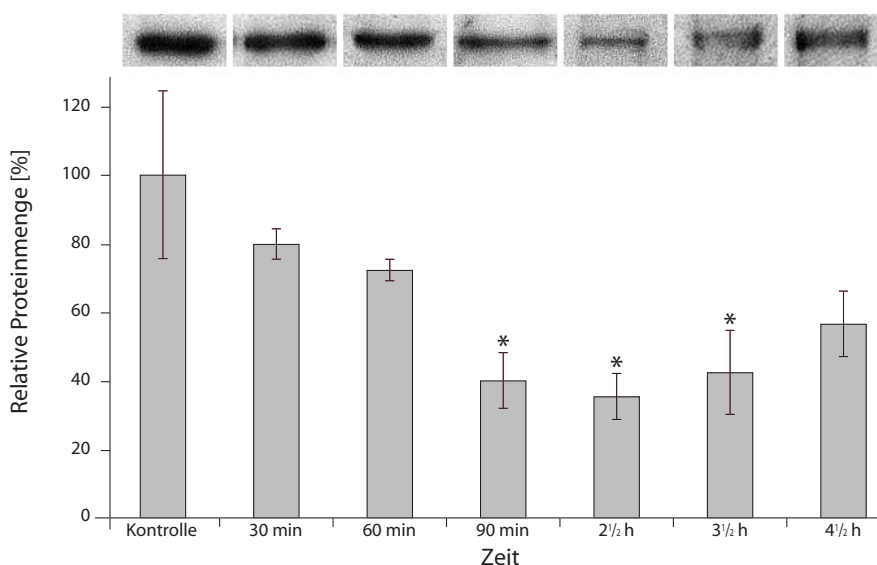


Abbildung 15: TNF- α führt zu einem kontinuierlichem Absinken von NF- κ B im Cytosol bis 2½ Stunden nach der Behandlung.

Kinetik der Western Blot-Analyse des 65 kDa-Proteins NF- κ B in den cytosolischen Fraktionen der Mäuseleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung (oben) und deren Quantifizierung (unten) [n=3]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Dunnett Multiple Comparisons Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

Hier war der höchste Wert bei den Kontrolltieren meßbar. Nach GalN/TNF- α -Behandlung fiel die NF- κ B Proteinmenge nach 2 ½ Stunden auf ungefähr 40 % ab, nach 3 ½ Stunden zeichnete sich eine steigende Tendenz ab, die aber auch nach 4 ½ Stunden nicht den Wert der Kontrollen erreicht.

Somit ist der eindeutige Anstieg von NF- κ B im Zellkern bis 2 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung mit einer gleichzeitigen Abnahme im Cytosol verbunden. Nach 2 ½ bis 4 ½ Stunden nimmt die Menge an NF- κ B im Cytosol wieder zu, während sie im Zellkern sinkt.

4.7.2 I κ B β -ein reines cytoplasmatisches Protein

Als Inhibitoren von NF- κ B kommen mehrere Proteine der I κ B-Familie in Frage.

I κ B β ist nach einigen Autoren (Baldwin 1996; Cheng et al. 1998; Fenwick et al. 2000) ein sehr stabiles Protein.

Im Cytosol lag der höchste Wert bei den Kontrolltieren. Nach der Behandlung fiel die I κ B β -Menge bis 2 ½ Stunden kontinuierlich auf ungefähr 50 % ab und stieg anschließend wieder an (Werte bis 4 ½ Stunden gezeigt), konnte aber den Wert der Kontrolle nicht wieder erreichen (Abbildung 16).

Im Zellkern konnte zu keinem Zeitpunkt der Nachweis dieses Inhibitorproteins erbracht werden.

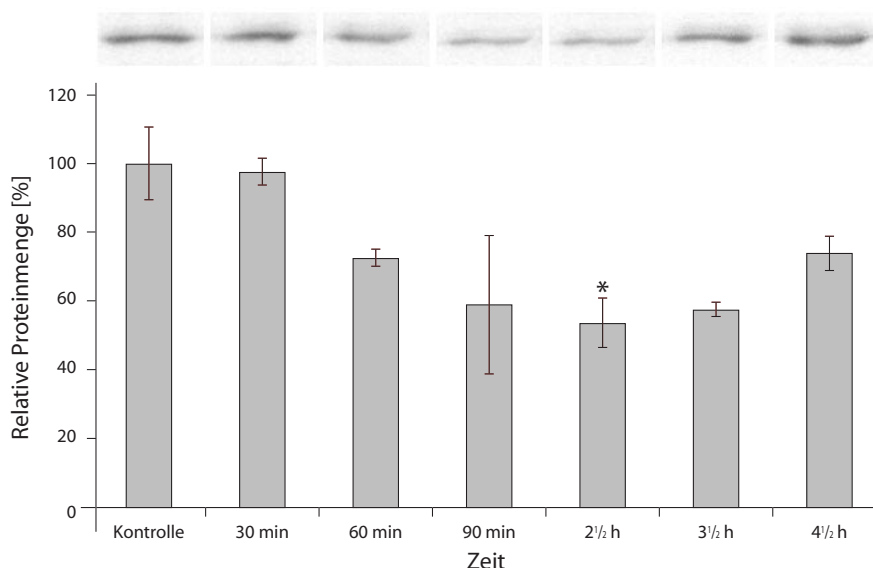


Abbildung 16: TNF- α führt zu einem kontinuierlichem Absinken von I- κ B β im Cytosol bis 2 ½ Stunden nach der Behandlung.

Kinetik der Western Blot-Analyse des 45 kDa-Proteins I- κ B β in den cytosolischen Fraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung (oben) und deren Quantifizierung (unten) [n=3]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Dunnett Multiple Comparisons Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

4.7.3 Translokation von I- κ B α in den Zellkern

Im Gegensatz zu I- κ B β konnte I- κ B α 30 min nach TNF- α Behandlung im Zellkern nachgewiesen werden (Abbildung 17). Nach 4 ½ Stunden war das I- κ B α -Signal im Zellkern immer noch vorhanden.

Ein schwaches Signal dieses Proteins wurde, wie in Abbildung 17 zu erkennen ist, auch bei den Kontrolltieren gemessen. Wegen der geringen Anzahl an Tieren wurde hier auf eine statistische Auswertung verzichtet.

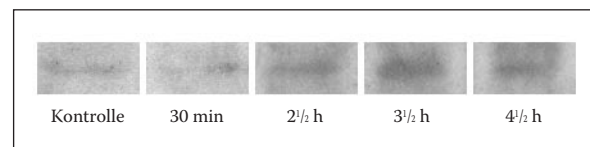


Abbildung 17: TNF- α führt zu einer Translokation von I- κ B α in den Zellkern schon 30 Minuten nach der Behandlung.

Kinetik der Western Blot-Analyse des 35 kDa-Proteins I- κ B α in den Zellkernfraktionen zu verschiedenen Zeitpunkte nach GalN/TNF- α -Behandlung [n=2].

4.8 Enzymatischer Nachweis der Caspase 3 Aktivität

Die reduzierte Synthese von cytoprotektiven Proteinen, hervorgerufen durch die GalN-Sensibilisierung, induziert den apoptotischen Zelltod in Hepatocytten von Mäusen nach TNF- α Behandlung. Die Familie der Caspasen gehört zu den Schlüsselmediatoren, die dieses apoptotische Programm auslösen. Eine besondere Rolle bei diesem Mechanismus spielt die Familie der Caspasen, insbesondere die Caspase 3, eine der sogenannten »Effektorcaspasen«.

AMC-Fluoreszenz, als Anzeichen für die Caspase 3-Aktivität machte sich im Vergleich zu den Kontrolltieren schon 2 ½ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung leicht bemerkbar. 3 ½ Stunden nach Behandlung war dieser Anstieg signifikant und erreichte im Vergleich zu den Kontrolltieren den fünffachen Wert (Abbildung 18). 4 ½ Stunden nach Behandlung war der Wert so angestiegen, daß er nicht mehr gemessen werden konnte. Peptidaldehyde, wie DEVD-CHO binden stark an die Caspase 3-aktive Seite und blockieren somit das Abspalten der fluoreszierenden AMC-Gruppe. Aufgrund dieser Eigenschaft wurde es als Inhibitor 3 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung eingesetzt und reduzierte die Caspase 3-Aktivität auf ein Niveau vergleichbar mit den Kontrolltieren. Diese Ergebnisse bestätigen die elektronenmikroskopischen Untersuchungen, wo apoptotische Hepatocytten erstmals 3 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung identifiziert werden konnten.

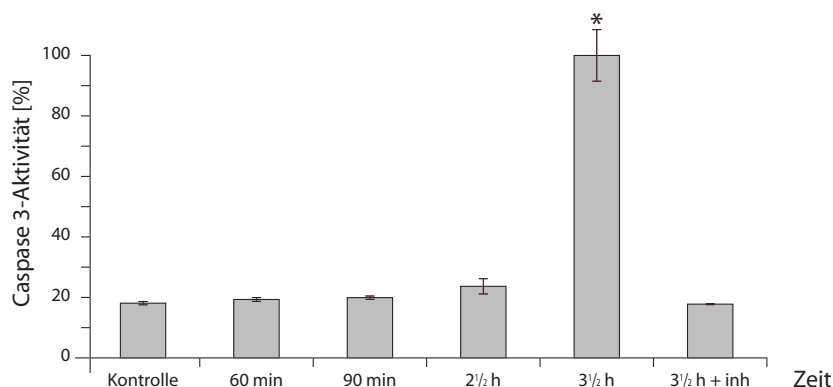


Abbildung 18: TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg von Caspase 3 im Cytosol 3 1/2 Stunden nach der Behandlung.

Kinetik der Caspase 3 Aktivität in der cytosolischen Fraktion des Mäuselebergewebes zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung [n=3]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Als Inhibitor (inh) wurde der AcDEVD-CHO-spezifische Inhibitor eingesetzt. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Dunnett Multiple Comparisons Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

4.9 Mitochondrien nach GalN/TNF- α -Behandlung

Die Isolierung der Mitochondrien aus Lebergewebe erfolgte mittels Zellfraktionierung und sollte Aufschluß über die Enzymaktivität der Cytochrom c Oxidase nach GalN/TNF- α -Behandlung geben. Cytochrom c Oxidase ist ein Enzym der Atmungskette und spielt eine wichtige Rolle im Elektronentransport. Mit der Messung ihrer Aktivität in den Hepatocyten wurde eine mögliche Änderung im Zellstoffwechsel während des apoptotischen Prozesses untersucht. Die Enzymaktivitätsbestimmung ermittelte den Zeitpunkt der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in einem Zeitraum von 2 1/2 bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung.

Für den Nachweis der Cytochrom c Oxidase-Aktivität wurden neben dem Gesamthomogenat 3 verschiedene Fraktionen isoliert: die schwere mitochondriale Fraktion, die postmitochondriale Fraktion und die cytosolische Fraktion.

4.9.1 Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase

Da die apoptotischen Hepatocyten eine hohe Aktivität an Cytochrom c Oxidase aufweisen, was lichtmikroskopisch mittels der DAB-Inkubation nachgewiesen worden war (Abbildung 9b-f), wurde die Enzymaktivität in den o.g. Fraktionen über einen Zeitraum von 2 1/2 Stunden bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung gemessen.

Die Ergebnisse im Gesamthomogenat und in der schweren mitochondrialen Fraktion wurden ausgewertet, da sich in diesen Fraktionen die Mitochondrien befinden.

Gesamthomogenat: Eine zunehmende Cytochrom c Oxidase Aktivität im Gesamthomogenat im Vergleich zu den Kontrollen ließ sich ab 3 1/2 Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung beobachten.

Nach 8 Stunden wurde die höchste Aktivität gemessen. Danach sank die Aktivität, stieg aber nach 16 Stunden wieder an (Abbildung 19).

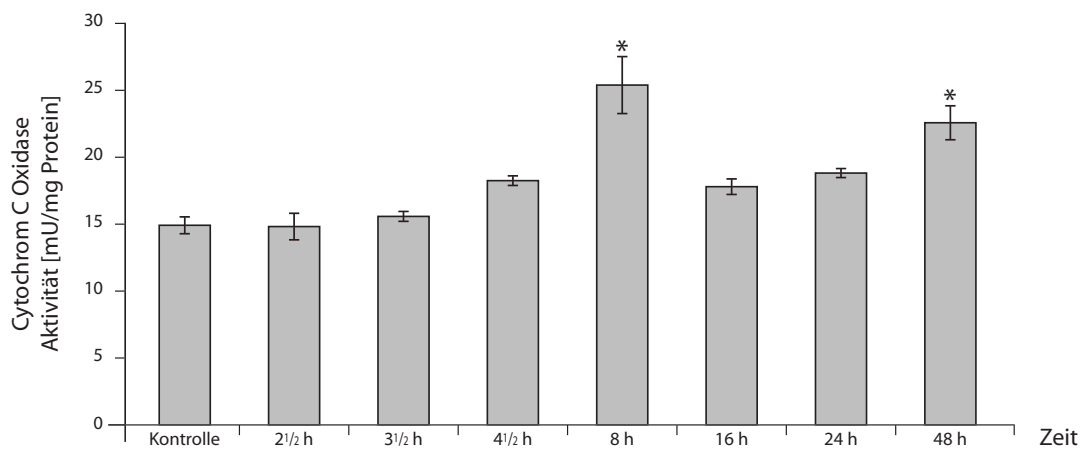


Abbildung 19: TNF- α führt zu einem deutlichen Anstieg der Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Gesamthomogenat 8 Stunden nach der Behandlung.

Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Gesamthomogenat vor der Zellfraktionierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung [n=4]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Bonferroni-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

Schwere mitochondriale Fraktion: In der mitochondrialen Fraktion war die Aktivität der Cytochrom c Oxidase nach 2 1/2 Stunden niedriger als bei den Kontrollen, um nach 4 1/2 Stunden ein etwas höheres Niveau als das der Kontrollen zu erreichen. Die niedrigste Enzymaktivität war nach 8 Stunden zu messen, was auf den Verlust der Integrität der Mitochondrien hindeuten könnte. Diese geschädigten Mitochondrien konnten dadurch in dieser Fraktion nicht erfaßt werden. Im Vergleich dazu war im Gesamthomogenat zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte Cytochrom c Oxidase-Aktivität meßbar. Die niedrige Aktivität der Cytochrom c Oxidase wurde durch die auftretenden Nekrosen aufrechterhalten. Nach 24 Stunden stieg sie wieder an und erreichte nach 48 Stunden sogar einen höheren Wert als die Kontrollen. Dies ist ein Hinweis für einen erhöhten Stoffwechsel in der Leberzelle, der im Zusammenhang mit den auftretenden Mitosen stehen könnte (Abbildung 20).

Postmitochondriale Fraktion: Sie enthält im wesentlichen andere Zellorganellen und nur wenig Mitochondrien oder Mitochondrienreste. Um eine Aussage über die Reinheit der schweren mitochondrialen Fraktion treffen zu können, wurde auch hier eine Enzymmessung durchgeführt, auf eine graphische Darstellung dieser aber verzichtet. In der postmitochondrialen Fraktion konnte eine leichte Aktivität gemessen werden und zeigt somit die sehr geringe Anzahl an Mitochondrien in dieser Zellfraktion.

Cytosolische Fraktion: In der cytosolischen Fraktion war die Cytochrom c Oxidase-Aktivität so gering, dass eine genaue Messung mit dem Photometer teilweise nicht möglich war.

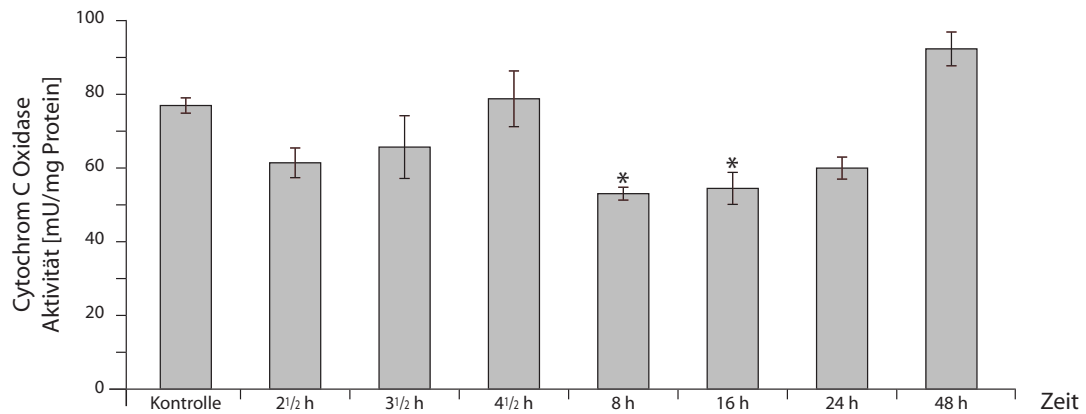


Abbildung 20: TNF- α führt zunächst zu einem Absinken der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in den mitochondrialen Fraktionen 2 1/2 Stunden nach der Behandlung.

Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität in der mitochondrialen Fraktion des Mäuselebergewebes nach Zellfraktionierung zu verschiedenen Zeitpunkten nach GalN/TNF- α -Behandlung [n=4]. Die Säulen sind Mittelwerte \pm Standardfehler. Signifikante Unterschiede gegenüber der Kontrollfraktion wurden mit dem Bonferroni-Test ermittelt ($p \leq 0,05$).

5 Diskussion

Apoptose ist ein wichtiger zellulärer Mechanismus, der ein Gleichgewicht zwischen der Zellteilung und dem Zelltod sicherstellt, so dass Organe und Organsysteme ständig regenerieren können und dabei in ihrer Zellzahl konstant bleiben.

Histologisch wurden in der vorliegenden Arbeit in einer Kinetik von 2½ bis 48 Stunden Veränderungen in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen untersucht. Elektronenmikroskopisch wurden präapoptotische und apoptotische Veränderungen gezeigt und beschrieben. Biochemische Untersuchungen wurden durchgeführt, um einige an der Apoptose beteiligte Proteine nachzuweisen und zu quantifizieren.

Es sollte ermittelt werden, inwiefern sich das Lebergewebe durch Gabe von Galaktosamin und TNF- α verändert und ob morphologische Unterschiede über einen Zeitraum von 2½ bis 48 Stunden nach dieser Behandlung festzustellen sind. Um die Struktur und Verteilung der vorkommenden Zellveränderungen im Lebergewebe zu beschreiben, wurden Proben licht- und elektronenmikroskopisch untersucht. Mit Hilfe dieser Methoden konnten in dem von uns untersuchten Zeitraum eindeutig diverse Zellveränderungen in den Hepatocyten nach GalN/TNF- α -Gabe identifiziert werden.

Biochemisch wurde der Zeitpunkt nach GalN/TNF- α Behandlung ermittelt, zu dem eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und seine damit verbundene Translokation in den Zellkern der Hepatocyten stattfindet. Es wurde dabei die zeitliche Abhängigkeit der Konzentration von NF- κ B im Zellkern und Cytosol über einen Zeitraum von 5 Minuten bis 4½ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung ermittelt. Besonderes Augenmerk galt dabei auch dem Nachweis der Inhibitorproteine I- κ B α und I- κ B β , insbesondere deren Lokalisation und Quantität in dem erwähnten Zeitraum. Die enzymatische Messung der Caspase 3-Aktivität im Cytosol wies den Zeitpunkt der Einleitung des Zelltodes nach.

Mit der Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität über einen Zeitraum von 2½ bis 48 Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung wurden die Veränderungen der Integrität der Mitochondrien untersucht und deren Bedeutung für den komplexen Prozeß der Apoptose hervorgehoben.

5.1 Wahl der Methode für die Analyse des Zelltodes

Die geeignete Methode zur Identifizierung verschiedener Formen des Zelltodes ist abhängig vom ausgewählten Untersuchungssystem, von der Wirkungsweise des eingesetzten Stimulus, der Art des Zelltodes und nicht zuletzt von der Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.

Da die ersten Beschreibungen des apoptotischen Zelltodes (Kerr et al. 1972) auf den charakteristischen morphologischen Veränderungen basieren, wie beispielsweise Chromatinkondensierung, sollte eine mikroskopische Untersuchung immer herangezogen werden. Trotz der zahlreichen neuen biochemischen und molekularbiologischen Möglichkeiten zur Untersuchung des Zelltodes gilt die licht- und elektronenmikroskopische Analyse der Apoptose immer noch als die sicherste und zuverlässigste Untersuchungsmethode und sollte deshalb immer zusätzlich zu den anderen Methoden eingesetzt werden.

5.2 GalN/TNF- α löst in Hepatocyten Apoptose aus

In unseren Versuchen wurden durch GalN/TNF- α -Gabe apoptotische Veränderungen hervorgerufen. Die Galaktosamin-Sensibilisierung erzeugte in den Versuchstieren eine Blockierung der cytoprotektiven Proteine, die eine TNF- α -induzierte Apoptose verhindern (Schümann und Tiegs 1999).

Nach Sensibilisierung mit Galaktosamin führt die Behandlung von Mäusen mit TNF- α oder LPS u.a. zu einer hepatischen Apoptose mit anschließenden massiven Gewebeschädigungen (Leist et al. 1994, 1995; Bohlinger et al. 1996; Jaeschke et al. 1998; Lawson et al. 1998; Nagaki et al. 1999). Frühere biochemische Studien zeigten, dass GalN die hepatische Transkription durch eine Verringerung der Uridin-Nukleotide und somit die mRNA-Synthese blockiert (Decker und Keppler 1972; Bradham et al. 1998a). Bei Mäusen, die nur mit D-Galaktosamin oder TNF- α behandelt wurden, konnten keine prä- und auch keine apoptotischen Veränderungen identifiziert werden (Angermüller et al. 1998; Osawa et al. 2001). In einer Rattenhepatocyten-Zelllinie konnte durch TNF- α -Behandlung keine Apoptose erzielt werden (Xu et al. 1998); erst die Kombination mit einem Transkriptionshemmer (Actinomycin D) führte zum anschließenden Zelltod (Pierce et al. 2000). Ohne eine vorhergehende Blockierung der Transkription ist TNF- α in den meisten Zellen nicht in der Lage, einen apoptotischen Zelltod einzuleiten (Flick und Gifford 1984; Sugarman et al. 1985; Leist et al. 1995). Die Rolle von GalN ist noch nicht ganz geklärt, wie eine neuere Untersuchung mit der hepatischen Zelllinie Huh-7 (Osawa et al. 2001) zeigt.

5.3 Morphologisches Erscheinungsbild nach GalN/TNF- α -Behandlung

5.3.1 Histologische Veränderungen der Leberzelle innerhalb von 48 Stunden

Ziel unserer Untersuchungen war es, die morphologischen Veränderungen der Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen darzustellen. Es sollte dabei einerseits so genau wie möglich der Zeitpunkt der ersten Veränderungen in der Zelle festgestellt werden und andererseits Aufschluß darüber gegeben werden, über welchen Zeitraum sich diese erstrecken.

Eine fokale verstärkte Cytochrom c Oxidase-Aktivität, als präapoptotisches Anzeichen, konnte morphologisch bereits 2 ½ Stunden nach der Behandlung beobachtet werden. Die Apoptosen traten nach 3 ½ Stunden auf. Zahlenmäßig waren sie nach 4 ½ Stunden am häufigsten vertreten (ca. 30 % der Hepatocyten befallen), um danach wesentlich seltener zu werden (Angermüller et al. 1998). 24 Stunden nach Behandlung waren immer noch Apoptosen zu erkennen. Nekroseherde waren nach 8 Stunden, Mitosen nach 48 Stunden zu sehen. Das Auftreten von Mitosen deutet auf die Regeneration des Gewebes. In den Hepatocyten der Kontrolltiere wurden keine Apoptosen und keine Mitosen identifiziert.

Apoptosen treten sehr selten in der gesunden Mausleber auf. Eine Anzahl von 1 bis 5 apoptotischen Zellen pro 10000 Hepatocyten wurden in der Leber von unbehandelten Mäusen beschrieben (Schulte-Hermann et al. 1995).

5.3.2 Darstellung der apoptotischen Veränderungen mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie

Um die apoptotischen Merkmale hervorzuheben, wurde das Lebergewebe mittels Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht. Die Lichtmikroskopie konnte neben Apoptosen und Mitosen auch die präapoptotischen Zeichen darstellen: »Cluster« von Hepatocyten mit erhöhter Cytochrom c Oxidase-Aktivität 2 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung. Mit der DAPI-Färbemethode und dem TUNEL-Test konnten Apoptosen nachgewiesen werden. 48 Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung konnten einzelne Mitosen mit der DAPI-Färbemethode gezeigt werden. Die apoptotischen Veränderungen umfassen hauptsächlich die Kerne mit kondensiertem Chromatin an der Kernmembran. Mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Untersuchung konnten feinstrukturelle Veränderungen innerhalb der Zelle dargestellt werden. Die Ruptur der äußeren mit gleichzeitiger Ausstülpung der inneren Mitochondrienmembran in den apoptotischen Zellen 3 ½ Stunden nach Behandlung, gefolgt von Zellkernveränderungen (Chromatinkondensierung an der Kernmembran) konnten hier gezeigt werden. Weiterhin konnte das Erscheinungsbild der sogenannten »apoptotischen Körperchen« dargestellt werden.

5.4 Tumor Nekrose Faktor- α führt zum Zelltod (Apoptose, bzw. Nekrose) und Zellproliferation der Hepatocyten

Wir haben in unserer Studie TNF- α eingesetzt. In der Literatur wurden die TNF- α -Effekte auf zahlreiche zelluläre Signalwege untersucht.

Carswell et al. identifizierten 1975 TNF als ein Produkt von Lymphocyten und Makrophagen, das zur Auflösung bestimmter Zelltypen (insbesondere der Tumorzellen) führte. Diese und weitere Studien belegten den potentiellen Anti-Tumor-Effekt von TNF. Molekularbiologische Experimente führten 1984 zur Klonierung von humanem TNF (Pennica et al. 1984). Weiterhin wirkt TNF als Mediator der Immunregulation und der inflammatorischen Reaktion. So wurde er Ende der achtziger Jahre auch in klinische Versuche eingeführt (Goeddel 1999). Seine systemische Toxizität führte aber zu immer mehr Einschränkungen seiner Anwendung als Anti-Tumor Präparat. TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen, Gallengangszellen und Kupffer-Zellen synthetisiert (Fiers 1991) und übt gegensätzliche biologische Effekte auf Hepatocyten aus: die Stimulierung der Zellproliferation oder die Einleitung des Zelltodes (Jeschke et al. 2001). So stimuliert TNF- α die Proliferation der Rattenhepatocyten nach partieller Hepatektomie (Akerman et al. 1992; Yamada et al. 1997) einerseits, induziert aber andererseits den Zelltod nach einer hepatotoxischen Gewebeschädigung (Czaja et al. 1995).

5.4.1 Signaltransduktion durch TNF- α

Die Forschung über TNF- α hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt (Baud und Karin 2001), insbesondere was den molekularen Mechanismus der von TNF- α herbeigeführten zellulären Antwort betrifft. Die Bindung von TNF- α an seine zwei Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 leitet eine Signaltransduktion ein, die zur Aktivierung der Caspasen und der zwei Transkriptionsfaktoren AP-1 (Activator Protein-1) und NF- κ B führt (Kirillova et al. 1999, Manna et al. 2000).

5.4.2 Die TNF Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2

Das Signal des Tumor Nekrose Faktors (Lewis et al. 1991; Tartaglia und Goeddel 1992; Tartaglia et al. 1993) wird durch zwei verschiedene Zelloberflächenrezeptoren übermittelt: TNF-R1 (55 kDa) und TNF-R2 (75 kDa).

TNF-R1 enthält im Vergleich zu TNF-R2 ein intrazelluläres Protein, genannt »death domain« (DD), das bei der Aktivierung des apoptotischen Weges involviert ist (Wajant und Scheurich 2001). Über TNF-R1 (Hsu et al. 1996) aktiviert TNF- α die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 (Ashkenazi und Dixit 1998) und führt zur Induktion proinflammatorischer und immunmodulatorischer Gene, kann aber in einigen Zelltypen auch die Apoptose einleiten (Abbildung 21). TNF- α trimerisiert TNF-R1 durch seine Bindung an den Rezeptor (Jones et al. 2000a, 2000b) und induziert die Verbindung von TRADD zu der »death domain«, die sowohl zur Aktivierung von NF- κ B, als auch

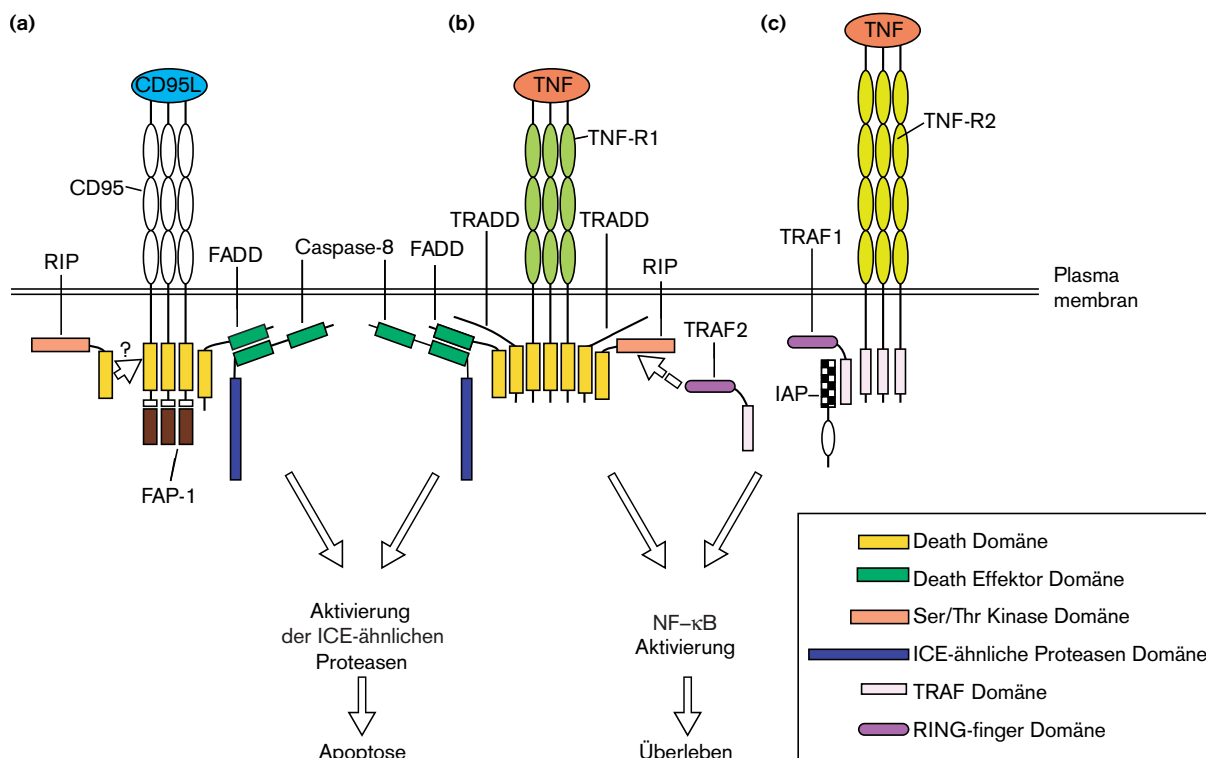


Abbildung 21: Signalkomplexe von TNF-R und CD95 und mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Komplexen

(a) Die Aktivierung von CD95 durch Bindung an CD95L resultiert aus der Anlagerung von FADD und Caspase-8 an CD95, RIP könnte auch miteinbezogen werden. Dieser CD95 Komplex führt zur Aktivierung der ICE-ähnlichen Proteasen und zur Apoptose. (b) Die Bindung von TNF zu TNF-R1 induziert die Anlagerung von Caspase-8, FADD, TRADD, RIP und TRAF2 zu TNF-R1 und bildet das TNF-R1 Signalkomplex. (c) Die Aktivierung des TNF-R2 Komplexes durch TNF ist eine Folge der Anlagerung von TRAF1 und IAP-Proteine und führt zur Aktivierung von NF-κB und des Überlebens via TRAF2.

Schema aktualisiert nach Yuan, 1997.

zur Einleitung der Apoptose führen kann (Yuan 1997). Durch TRADD (TNF-R-associated death domain), die als Adapter fungiert, entsteht eine Verbindung zwischen deren »death domain« und der des TNF-Rezeptors (Leist et al. 1995; Kühnel et al. 2000; Locksley et al. 2001). TRAF2 (TNF-R-associated factor-2) und RIP (receptor-interacting protein) stimulieren den Stoffwechselweg, der zu einer Aktivierung von NF-κB führt (Baldwin 1996; Wajant und Scheurich 2001), während über FADD (Fas associated death domain) durch die Aktivierung der ICE-ähnlichen Proteasen die Einleitung der Apoptose herbeigeführt wird (Henkart 1996; Nagata 1997). Zum Vergleich führt die Aktivierung von CD95 durch die Anlagerung von FADD über die Aktivierung der ICE-ähnlichen Proteasen ebenfalls zur Einleitung des apoptotischen Zelltodes (Yuan 1997).

TNF-R2 dagegen ist ein Rezeptor, der mit einem oder mehreren Mitgliedern der Familie der TRAF-Proteine, (das sind Mediatoren der NF-κB-Aktivierung und des Zellüberlebens), direkt interagiert (Tartaglia et al. 1991; Rothe et al. 1994). TRAF1 (Leo et al. 2001) und TRAF2 (Wang et al. 1998) können zusammen Hetero- oder Homodimere bilden, wobei eine Interaktion zwischen TRAF1 und TNF-R2 scheinbar nur mittels TRAF2 möglich ist (Yuan 1997). Die TRAF1 und 2 Hetero- und

Homodimere funktionieren als Adapter für die korrekte Lokalisation der IAP-Proteine (inhibitor of apoptosis proteins) c-IAP1 und c-IAP2 (Song et al. 1996; Yuan, 1997). Das Protein c-IAP2 hat eine direkte Einwirkung auf die ausgelöste TNF-Signalkaskade, die zu einer Aktivierung von NF- κ B führt und damit eine Suppression der TNF-induzierten Apoptose bewirkt (Chu et al. 1997).

5.5 Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird unter TNF- α Einwirkung aktiviert

Die wichtige Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B als ein Regulator der Immunantwort wurde schon bei seiner Entdeckung als ein nukleärer Transkriptionsfaktor in reifen B-Zellen offensichtlich (Sen und Baltimore 1986a, 1986b). Durch seine Bindung an ein Verstärkerelement im Gen, welches die leichte κ -Kette des Immunglobulins kodiert, wurde er als »nuclear factor κ B« definiert (NF- κ B). Später stellte sich heraus (Baldwin 1996), daß NF- κ B einen Komplex aus zwei Untereinheiten mit molekularem Gewicht von 50 kD (p50) und 65 kD (p65) bildet. In den meisten Zelltypen befindet er sich in einer inaktiven cytoplasmatischen Form an das inhibitorische Protein I- κ B gekoppelt. Durch seine rapide Aktivierung blockiert NF- κ B die sogenannten »Todessignale« (Nagaki et al. 2000) schon vor der Einleitung der hepatischen Apoptose, wahrscheinlich durch eine Verhinderung der Aktivierung der Caspase 8, die zum Auslösen der Caspasenkaskade und dem daraus resultierenden apoptotischen Zelltod führt. Durch weitere Untersuchungen bestätigte sich die Beteiligung von NF- κ B an der Immunantwort. Inflammatorische Cytokine (TNF- α , IL-1) bewirken eine Dissoziation vom inhibitorischem Protein I- κ B und führen so zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Baldwin 1996). Hier erfolgt die Aktivierung verschiedener Gene, wie z.B. I- κ B α (Li et al. 1999; Pahl 1999). Die Aktivierung antiapoptotischer Gene wie c-IAP1, c-IAP2, TRAF1, TRAF2, deren Proteine als Caspaseinhibitoren wirken, führt zum Überleben der Zelle (Chu et al. 1997; Wang et al. 1998). Dies erklärt warum TNF- α keine Apoptose verursacht, wenn die NF- κ B Aktivierung (Tang et al. 2001a, 2001b) unterdrückt wird, wie z.B. nach Gabe von Glukokortikoiden (Crinelli et al. 2000), obwohl eine TNF- α -Induktion sowohl zu einer Aktivierung der Caspasen als auch zur Aktivierung von NF- κ B führt.

5.5.1 Aktivierung und nukleäre Lokalisation von NF- κ Bp65 nach TNF- α -Behandlung

Ziel der hier dargestellten Experimente war die Lokalisation von NF- κ B in Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen und dabei insbesondere dessen »Shuttle« in den Zellkern und zurück ins Cytosol. Ein Nachweis im Zellkern kann als eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Han und Brasier 1997; Verma und Stevenson 1997) NF- κ B beurteilt werden und beweist dadurch den TNF- α -Effekt in Maushepatocyten.

30 Minuten nach GalN/TNF- α -Gabe ist NF- κ B deutlich im Zellkern nachzuweisen, nach 2½ Stunden erreicht es dort die höchste Konzentration, danach nimmt es wieder ab. Die NF- κ B-Menge im Zellkern ist nach 4½ Stunden auf etwa 30% im Vergleich zum Höchstwert nach 2½ Stunden

gesunken. Nach 4½ Stunden sind aufgrund einer quantitativen Bestimmung 30% der Zellen apoptotisch. Immunhistochemisch haben wir zu diesem Zeitpunkt NF-κB nur in Kernen apoptotischer Zellen nachgewiesen. Apoptotische Zellen sind in ihrer Proteinsynthese eingeschränkt (Leist et al. 1994), was eine unzureichende Synthese von I-κBα und den dadurch eingeschränkten Rücktransport des Transkriptionsfaktors NF-κB ins Cytoplasma zur Folge hat. Nicht apoptotische Zellen enthielten das Reaktionsprodukt im Cytoplasma.

Eine ähnliche Untersuchung an c/BALB Mäusen (Nagaki et al. 2000) zeigte 60 Minuten nach TNF-α-Gabe die Aktivierung von NF-κB im Zellkern, und eine anschließende Abnahme allerdings erst nach 5 Stunden.

Der Weg zur Aktivierung von NF-κB durch GalN/TNF-α führt über die Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und anschließende Degradierung der I-κB-Inhibitorproteine durch das 26S Proteasom. In einem Ischämie/Reperusionsmodell der Leber bei c/BALB Mäusen wurde eine Aktivierung von NF-κB, die unabhängig von einer Degradierung der I-κB Proteine stattfindet, beschrieben (Zwacka et al. 1998). Die Dissoziation von NF-κB aus dem Komplex wird durch die Phosphorylierung von I-κBα durch eine Tyrosinkinase (I-κB Tyrosin Kinase) sichergestellt. TNF-α kann auch die Phosphorylierung von NF-κB (RelA/p65) induzieren, soll aber keinen negativen Effekt weder auf die Translokation noch auf die Bindung an die DNA haben und führt ausschließlich zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität (Wang et al. 1998).

Ein wichtiger Punkt bei der Aktivierung von NF-κB ist sicherlich auch die Art des Signalstoffes. So wird durch H₂O₂ eine im Vergleich zu den Cytokinen relativ langsame Aktivierung (120 Minuten) eingeleitet (Bowie und O'Neill 2000). Von den Cytokinen induziert TNE, im Vergleich zu den Hepatocyten, in vaskulären Endothelzellen eine schnelle (20 Minuten) und persistente (>20 h) Aktivierung von NF-κB, während bei IL-1 zwar eine schnelle aber nach 3 Stunden bereits absinkende Aktivierung stattfindet (Johnson et al. 1996). Die Inaktivierung der NF-κB-Kaskade durch andere Proteine, wie z.B Par-4 potenziert die TNF-α-Wirkung und führt zum apoptotischen Zelltod (Diaz-Meco et al. 1999).

Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten ist es gelungen, NF-κB im Zellkern von Hepatocyten zu einem früheren Zeitpunkt (30 Minuten) als in vergleichbaren Studien nachzuweisen (Nagaki et al. 2000). Unsere Untersuchungen zeigten 5, 10 bzw. 20 Minuten nach TNF-α-Behandlung schon ein schwaches Signal im Zellkern (Ergebnisse nicht gezeigt).

5.5.2 TNF-α-Behandlung führt zu einem Absinken der NF-κBp65-Konzentration im Cytosol

NF-κB konnte zu jedem Zeitpunkt der durchgeführten Messungen im Cytosol nachgewiesen werden, was ein sicherer Hinweis auf das Vorhandensein der NF-κB/I-κB-Komplexe in dieser Fraktion ist und daher eine Aussage bezüglich des inaktiven NF-κB ermöglicht.

Bei den Kontrolltieren war der höchste NF-κB-Wert nachzuweisen, was durch die fehlende Einwirkung eines Stimulus wie TNF-α und der somit fehlenden Translokation von NF-κB in den Zellkern zu erklären ist. Schon 30 Minuten nach TNF-α-Behandlung deutete sich eine Reduktion von

NF- κ B im Cytosol an, nach 2 ½ Stunden war NF- κ B auf ca. 40% des Wertes der Kontrolltiere gesunken. Ein leichter Anstieg war nach 3 ½ Stunden zu beobachten, nach 4 ½ Stunden war der Wert auf 60% im Vergleich zur Kontrolle angestiegen. Diese Resultate stimmen mit den bereits diskutierten Ergebnissen von NF- κ B in der Kernfraktion überein: während die NF- κ B-Konzentration 2 ½ Stunden nach TNF- α -Behandlung im Cytosol deutlich absinkt, findet zur gleichen Zeit ein entsprechender Anstieg in der Zellkernfraktion statt.

Eine schnelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B findet in unserem Tiermodell unter GalN/TNF- α -Behandlung statt. Diese Befunde werden durch die Untersuchungen von Johnson et al. 1996 und Nagaki et al. 2000 bestätigt. Die Gabe von Glukokortikoiden (Dexamethason) führt durch eine beschleunigte Resynthese von I- κ B α zu einer Repression der NF- κ B Aktivierung (Crinelli et al. 2000)

5.6 I- κ B Proteine reagieren unterschiedlich auf GalN/TNF- α Gabe

Proteine der I- κ B-Familie sind als Inhibitoren von NF- κ B bekannt (Huxford et al. 1998). Die zwei wichtigsten Vertreter – I- κ B α und I- κ B β – sind sowohl in ihrer Zusammensetzung, als auch in ihren Funktionen sehr unterschiedlich (Thompson et al. 1995; Turpin et al. 1999; Phelps et al. 2000). Entscheidend für ihr Mitwirken ist vor allem der Stimulus, z.B. TNF, IL-1, CD95: einige verursachen eine schnelle, aber vorrübergehende Aktivierung von NF- κ B durch die Dissoziation von I- κ B α , andere eine persistente Aktivierung mit Einbeziehen beider Inhibitorproteine (Thompson et al. 1995).

In dieser Dissertationsarbeit wurde die Auswirkung der GalN/TNF- α -Behandlung auf diese zwei Proteine untersucht, der Schwerpunkt lag dabei auf der Lokalisation von I- κ B β . Über I- κ B α und seinem Wirkmechanismus stehen zahlreiche Daten zur Verfügung (Beg und Baldwin 1993; Chiao et al. 1994; Baldwin 1996; Arenzana-Seisdedos et al. 1997; Han et al. 1999), während I- κ B β nicht so genau untersucht worden ist und dadurch noch einige Fragen offen sind.

5.6.1 I- κ B α transloziert in den Zellkern und verhindert die Bindung von NF- κ B an DNA

In den untersuchten Proben konnte I- κ B α bereits 30 Minuten nach GalN/TNF- α -Behandlung im Zellkern nachgewiesen werden, ein Hinweis dafür, daß die Neusynthese des Proteins schon eingeleitet worden ist. Eine Präsenz im Zellkern konnte auch zu späteren Zeitpunkten, einschließlich 4 ½ Stunden nach Applikation von GalN/TNF- α , gezeigt werden. In den Kontrollen wurde nur ein schwaches Signal nachgewiesen.

Ähnliche Ergebnisse werden auch in einer Studie mit HT29 Zellen berichtet, wo eine Phosphorylierung von I- κ B α bereits fünf Minuten nach TNF- α -Behandlung eingeleitet wurde und nach 20 Minuten das Protein komplett degradiert war (Manos und Jones 2001). Freies neu synthetisiertes I- κ B α reichert sich innerhalb von 60 Minuten (Arenzana-Seisdedos et al. 1995) nach Stimulusein-

wirkung (TNF) im Cytosol an und wird in den Zellkern transloziert, wo es an das DNA-gekoppelte NF- κ B bindet und dessen Rücktransport ins Cytoplasma bewirkt (Arenzana-Seisdedos et al. 1995). I- κ B α maskiert nur die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) des p65 Polypeptides und nicht die des p50 Polypeptides; der NF- κ B/I- κ B α -Komplex ist damit ein nukleocytoplasmatischer Komplex (Tam et al. 2001). Der Rücktransport des Komplexes ins Cytoplasma erfolgt (Malek et al. 2001) durch die CRM1-abhängige nukleäre Exportsequenz (NES) (Johnson et al. 1999; Tam et al. 2000) des Inhibitorproteins I- κ B α (Rodriguez et al. 1999; Huang et al. 2000). Diese CRM1-bindende Sequenz wurde ausschließlich in der N-terminalen Domäne von I- κ B α identifiziert (Tam et al. 2000). Eine Blockierung dieser Sequenz führt zur bleibenden nukleären Lokalisation von I- κ B α (Johnson et al. 1999) und zu einem Anstieg der NF- κ B-Aktivität im Zellkern um das sechsfache (Carlotti et al. 2000). Eine Lokalisation von I- κ B α im Zellkern nicht stimulierter Zellen wird auf Importine, Proteine die eine nukleäre Lokalisationsequenz besitzen und mit dem Ankyrinabschnitt von I- κ B α interagieren können, zurückgeführt (Turpin et al. 1999). Im Cytoplasma von WT-Zellen (Tanaka et al. 1999) konnte eine Reduzierung des I- κ B α 15 Minuten nach TNF- α -Behandlung festgestellt werden, nach 60 Minuten wurde der Ausgangswert wieder erreicht. Diese Erholung ist eine Folge der neuen Produktion von I- κ B α , die durch die Aktivierung von NF- κ B induziert wird (Barnes und Karin 1997). In Zellkulturen wird eine komplette Degradierung von I- κ B α in der cytosolischen Fraktion 5 min nach TNF- α -Behandlung beschrieben (Gallois et al. 1998). NF- κ B wird durch I- κ B α mittels zweier Mechanismen reguliert: Zunächst wird durch die Degradierung des I- κ B α in den Proteasomen die Transkriptionsaktivität von NF- κ B gewährleistet; der zweite Mechanismus greift zu dem Zeitpunkt ein, bei dem die Transkriptionsaktivität von NF- κ B nicht mehr benötigt wird und führt zum retrograden Transport von NF- κ B ins Cytoplasma (Renard et al. 2000). Eine ständige Translokation der inaktiven NF- κ B/I- κ B α -Komplexe zwischen Zellkern und Cytosol in Abwesenheit von NF- κ B-Aktivierungssignalen wie z.B. TNF- α , wird in einer neuen Studie (Huang et al. 2001) beschrieben. Die Degradierung von I- κ B α und die daran anschließende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist vom Signalstoff abhängig. So führt eine Pervanadat-Behandlung von HeLa-Zellen (wie die TNF- α -Behandlung von Mäusen) zu einem vergleichbar langsamen (nach 30 min) Beginn der Degradierung von I- κ B α mit einem Maximum nach 180 Minuten, gefolgt von einer NF- κ B-abhängigen Neusynthese von I- κ B α . Die komplette Degradierung von I- κ B α wurde in dieser Studie nach 240 Minuten erreicht (Mukhopadhyay et al. 2000).

Als Schlußfolgerung dieser Untersuchungen kann man eine Bindung von I- κ B α an den Transkriptionsfaktors NF- κ B im Zellkern und dessen Rücktransport ins Cytoplasma, nach GalN/TNF- α Gabe, als erwiesen betrachten.

5.6.2 I- κ B β : ein strikt cytoplasmatisches Protein

NF- κ B wird durch Mitglieder der I- κ B Proteinfamilie im Cytoplasma sequestriert. Ziel der durchgeführten Experimente sollte der Nachweis der Lokalisation von I- κ B β nach GalN/TNF- α -Behandlung sein.

Im Cytosol war I- κ B β zu jedem der von uns untersuchten Zeitpunkte nachweisbar und hatte bei den Kontrolltieren den höchsten Wert. Eine leichte Reduktion konnte schon nach 30 Minuten festgestellt werden, nach 2 ½ Stunden war die I- κ B β -Konzentration im Vergleich zu den Kontrolltieren auf etwa die Hälfte gesunken. Danach stieg die Proteinmenge geringgradig an. Es hat bis 4 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung den Ausgangswert nicht wieder erreicht und wird auf eine durch GalN gehemmte Resynthese des Proteins zurückgeführt (Leist et al. 1994).

Ähnliche Ergebnisse liefern auch Untersuchungen an TNF-behandelten Endothelzellen, wo eine schnelle Reduzierung von I- κ B β auf 50% des Kontrollwertes beobachtet wurde und eine komplette Erholung des I- κ B β -Wertes auch nach 22 Stunden noch nicht festgestellt werden konnte (Johnson et al. 1996). Übereinstimmend mit den hier vorgestellten Resultaten ist in einer Arbeit mit murinen T-Zellen eine im Vergleich zu I- κ B α langsamere Degradierung von I- κ B β beschrieben worden (Weil et al. 1997).

In unseren Untersuchungen konnte in den isolierten Kernfraktionen zu keinem Zeitpunkt der Nachweis von nukleärem I- κ B β erbracht werden und dementsprechend postulieren wir für I- κ B β eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen stehen Untersuchungen an COS-7- und HeLa-Zellen, bei denen der Nachweis von nukleärem I- κ B β beschrieben wurde (Suyang et al. 1996; Tran et al. 1997). Die Autoren vermuten eine Bindung von NF- κ B an neu synthetisiertes und nicht phosphoryliertes I- κ B β , das im Gegensatz zu phosphoryliertem I- κ B β nicht in der Lage sein soll, die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) von NF- κ B zu maskieren, so daß dieser NF- κ B/I- κ B β -Komplex in den Zellkern importiert wird.

Neuere Untersuchungen (Malek et al. 2001) bestätigen die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse: freies I- κ B β wird in dieser Studie als ausschließlich cytoplasmatisches Protein beschrieben, und liegt als NF- κ B/I- κ B β -Komplex im Cytosol. Die Bindung von NF- κ B mit I- κ B β -Protein ist stabiler als die des NF- κ B/I- κ B α -Komplexe (Baldwin 1996; Cheng et al. 1998); ein nukleärer Import wird durch die Maskierung beider NLS-Sequenzen des NF- κ B durch I- κ B β verhindert. I- κ B β ist nicht in den nukleocytoplasmatischen Pendelverkehr involviert und kann im Gegensatz zu I- κ B α keinen Rücktransport nukleärer Proteine durchführen. Diese Ergebnisse führen zur Schlußfolgerung, daß die Proteine der I- κ B-Familie unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen unterliegen (Tam et al. 2001).

In der hier vorgestellten Studie konnte I- κ B β nicht im Kern nachgewiesen werden, was den Ergebnissen einer anderen Gruppe (Suyang et al. 1996) widerspricht; dies könnte auf eine Unreinheit in deren Kernfraktion oder auf unspezifische Kreuzreaktionen von deren Antikörpern zurückzuführen sein. Unklar ist in der Studie von Suyang et al. (1996) auch, warum das ungebundene NF- κ B nicht an neu synthetisiertes I- κ B α bindet.

Basierend auf den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitabstände nach GalN/TNF- α -Behandlung kann eine Lokalisation von I- κ B β im Kern zu einem späteren Zeitpunkt als unwahrscheinlich gesehen werden.

5.7 Aktivierung der Caspase 3 als ein Weg zur Apoptose

Die Caspase 3 gehört zusammen mit den Caspasen 6 und 7 zu der Gruppe der sogenannten Effektor-Caspasen, während die Caspasen 2, 8, 9 und 10 der Gruppe der Initiator-Caspasen angehören (Budihardjo et al. 1999; Kaufmann und Hengartner 2001). Die Aktivierung der Caspase 3 (Henkart 1996; Enari et al. 1998) nach GalN/TNF- α -Behandlung kann als Effektor der Apoptose über zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden (Deveraux und Reed 1999; Leo et al. 2001). Der von vielen Autoren vertretene Weg verläuft zunächst über den Zelloberflächenrezeptor TNF-R1, dann über TRADD, FADD (Abbildung 21) und einer anschließenden Aktivierung der Caspasenkaskade über Caspase 8 (Martin et al. 1998). Dies führt zur Aktivierung der Caspase 3, die wiederum die Spaltung diverser Zellproteine vorantreibt, was zum Zelltod führt (Salvesen und Dixit 1999; Rath und Aggarwal 1999). Ein zweiter Weg (siehe 2.2.5) führt über die Freisetzung des mitochondrialen Membranproteins Cytochrom c ins Cytoplasma (Zou et al. 1997; Tafani et al. 2000) und dortiger Verbindung mit AIF (»apoptosis induced factor«)-Protein (Susin et al. 1999) zur Aktivierung der Procaspase 9 (Kuida et al. 1998; Zamzami und Kroemer 2001). Die darauffolgende Aktivierung der Caspase 3 leitet dann den apoptotischen Zelltod ein.

Ein Anstieg der Caspase 3-Aktivität in den cytosolischen Fraktionen sollte in unseren Untersuchungen Hinweise zur Einleitung der Apoptose liefern. Ein leichter Aktivitätsanstieg im Vergleich zu den Kontrolltieren war 2 ½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung zu erkennen. Nach 3 ½ Stunden stieg die Aktivität signifikant auf den fünffachen Wert im Vergleich zu Kontrollen an; ein deutliches Signal dafür, dass das apoptotische Programm angeschaltet worden ist. Nach 4 ½ Stunden war die Caspase-Aktivität so hoch, daß sie nicht mehr mit dem Photometer gemessen werden konnte.

Ähnliche Untersuchungen an Mäusen mit Einleitung der Apoptose über eine GalN-Sensibilisierung und *Salmonella abortus equi* Endotoxin-Behandlung zeigten eine Erhöhung der Caspase 3-Aktivität nach 5 Stunden (Jaeschke et al. 1998). Der Zeitunterschied von 2 Stunden wird durch die endogene Produktion von TNF- α nach Endotoxin-Gabe erklärt. Nagaki et al. 2000 beobachteten bei c/BALB Mäusen eine Erhöhung der Caspase 3-Aktivität um das 7,5-fache 5 Stunden nach GalN/TNF- α -Gabe im Vergleich zu den Kontrollen. Wenn die Transkription gehemmt wird, leitet auch Concanavalin A die TNF-R1-abhängige Aktivierung der Caspase 3 ein, während der Breit-Spektrum-Caspase-Inhibitor eine Concanavalin A-induzierte Leberschädigung bei Mäusen verhindert (Künstle et al. 1999).

Die alleinige Gabe von D-Galaktosamin zeigt keine Apoptosen (Angermüller et al. 1998). Sie induziert zwar eine Hepatotoxizität, die ist aber nicht auf eine Aktivierung der Caspase 3 zurückzuführen (Itokazu et al. 1999).

5.8 Mitochondrienveränderungen während der Apoptose

Mitochondrien spielen im Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod unumstritten eine entscheidende Rolle (Zamzami 1996; Green und Reed 1998). Morphologisch wurden sie in diesem Zusammenhang früher vernachlässigt, weil es zunächst so schien, als blieben die Mitochondrien von der Apoptose, zumindest was ihre Form betrifft, unberührt (Kerr et al. 1972). Spätere Studien bewiesen das Gegenteil und zeigten, daß sie sich in ihrer Form verändern (Mancini et al. 1997; Zhuang et al. 1998; Martinou et al. 1999; Desagher und Martinou 2000) und daß diese Veränderungen als präapoptotische Ereignisse zu betrachten sind (Angermüller et al. 1998).

5.8.1 Ausstülpung der inneren durch die eingerissene äußere Mitochondrienmembran

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten sehr wichtige Veränderungen, die in den Zellorganellen während des apoptotischen Zelltodes stattfinden. Besonders auffällig waren dabei die Veränderungen in den Mitochondrien, die sich mit einer Ruptur der äußeren und zugleich einer hernienartigen Ausstülpung der inneren Mitochondrienmembran (Abbildung 7) bemerkbar machten (Angermüller et al. 1998, 1999).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beschrieben frühere Studien die Mitochondrien der apoptotischen Zellen als normal (Searle et al. 1987; Cosarizza et al. 1995; Majno und Joris 1995; Kimura et al. 1997) oder leicht angeschwollen (Krippner et al. 1996). Die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran mit einer Reduzierung der Anzahl der Cristae zeigte eine Untersuchung an apoptotischen Thymocyten (Petit et al. 1995). Eine Ruptur wurde auch in epithelialen apoptotischen Prostatazellen bei Ratten nach Kastration beschrieben (Kwong et al. 1999). Die Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran ist wahrscheinlich eine Folge der Anschwellung dieser Zellorganelle am Anfang des apoptotischen Prozesses (Van der Heiden et al. 1997, 1999; Green und Reed 1998; Kroemer und Reed 2000). Die Folgen sind die Ausschüttung der mitochondrialen Intermembranproteine ins Cytosol, eine mitochondriale Depolarisierung und anschließend der Zelltod. Es ist möglich, daß Bcl-2-Proteine die Homeostasis der Mitochondrien kontrollieren. Apoptotische Signale ändern die oxidative Phosphorylierung und den Ionenaustausch der Mitochondrien und rufen die Organelenschwellung hervor, was zum Einreißen der äußeren Membran führt (Hengartner 2000). Die Ruptur der äußeren Membran nach mitochondrialer Schwellung ist als einer der Mechanismen zu betrachten (Lemasters 1999), die zu einer Freisetzung von Cytochrom c und der intermembranären NF- κ B/I- κ B-Komplexe ins Cytosol führen (Bottero et al. 2001). Als weiterer Mechanismus wird die erhöhte Permeabilität der Membranporen gesehen, die einen Ausstrom von Cytochrom c ermöglicht (Bradham et al. 1998b). So wird eine große Pore für Wasser durchlässig, was zum Anschwellen der Mitochondrien und anschließendem Platzen der äußeren Membran führt. Dadurch wird die Ausschüttung von Cytochrom c und anderen mitochondrialen Proteinen ermöglicht. Diese Veränderungen der Mitochondrien sind vom Typ des Zelltodes abhängig. In einigen apoptotischen Prozessen bleiben die Mitochondrien unverändert (Martinou 1999) so daß es auch andere Mecha-

nismen für die Einleitung der Apoptose geben muß. Eine Ausschüttung von Cytochrom c, ohne morphologische Veränderungen der Mitochondrien, wird in der Arbeit von Green und Reed 1998 beschrieben und beruht auf der Bildung einer Pore, die größer als dieses Protein ist (Cytochrom c Durchmesser 3 nm).

In den hier vorgestellten Untersuchungen werden die präapoptotischen Veränderungen der Mitochondrienmembran nach GalN/TNF- α -Behandlung gezeigt. Diese präapoptotischen Veränderungen treten noch vor den morphologischen Veränderungen im Zellkern auf.

5.8.2 Die Cytochrom c Oxidase-Aktivität ist ein Indikator für die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran

Die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) ist ein Mitglied der Atmungskette in den Mitochondrien; der Elektronentransfer von Cytochrom Reduktase (Komplex III) auf Cytochrom c Oxidase wird über Cytochrom c sichergestellt und hat die Reduzierung von Sauerstoffmolekülen zu Wasser zur Folge (Wang 2001; Barrientos et al. 2002).

Die Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität ist ein Indikator für die Integrität der Mitochondrienmembran, was der elektronenmikroskopische Nachweis des Enzyms mittels DAB-Reaktion bestätigte (Abbildung 7 und 8). Das biochemisch ermittelte Absinken der Cytochrom c Oxidase-Aktivität 2½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung in der mitochondrialen Fraktion könnte auf die erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran für Cytochrom c zurückzuführen sein; trifft aber in dieser Studie nicht zu, da Cytochrom c als Substrat für die Messung angeboten wurde. Dafür spricht auch, dass zu diesem Zeitpunkt die Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Gesamthomogenat im Vergleich zu den Kontrollen unverändert ist. Der Abfall nach 8 Stunden dürfte auf die Nekrose und der damit verbundenen Mitochondrienzerstörung zurückzuführen sein. Der erste Anstieg der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in der mitochondrialen Fraktion 4½ Stunden nach GalN/TNF- α -Behandlung weist auf eine sehr starke Aktivierung der Atmungskette und auf einen hohen Energieumsatz hin. Hinzu kommt auch ein Nachlassen der TNF- α -Wirkung zu diesem Zeitpunkt (Hill et al. 1999). Der Anstieg nach 48 Stunden (Werte höher als bei den Kontrolltieren) ist mit der Regeneration der Hepatocyten und der Mitoseaktivität zu erklären.

In der cytosolischen Fraktion konnte bis einschließlich 48 Stunden nach der Behandlung nur eine geringe Aktivität gemessen werden.

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Krippner et al. 1996, dass sich die Aktivität der Cytochrom c Oxidase in Fas-induzierten apoptotischen T-Zellen nicht verändert, während durch die Inhibierung von Cytochrom c die entscheidenden Signale für die Apoptose in Gang gesetzt werden.

5.9 Fazit

Die Apoptose ist ein kontrollierter Prozeß, mit dessen Hilfe »unerwünschte« Zellen selektiv abgebaut werden. Die Entdeckung der Beteiligung von TNF- α an sowohl apoptotischen als auch anti-apoptotischen Effekten bei der hepatozellulären Gewebeschädigung liefert neue Erkenntnisse zum Pathomechanismus der destruktiven Lebererkrankungen. So induziert TNF- α in virusbefallenen oder medikamentös vorgeschädigten Hepatocyten die Apoptose und schützt gleichzeitig die gesunden Hepatocyten vor apoptotischen Stimuli.

Die hohe Anzahl der Gene, die durch NF- κ B kontrolliert werden, in Verbindung mit der hohen Anzahl an Stimuli, die seine Aktivierung auslösen können, demonstrieren seine bedeutende Rolle für viele zelluläre Prozesse. NF- κ B und sein Regulator I- κ B stehen im Zusammenhang mit pro- und anti-apoptotischen Ereignissen, welche Schlüssel für Signalsysteme sind, die zu zellulären Veränderungen im Organismus beitragen. Die Beteiligung an diversen Erkrankungen unterstreicht die Wichtigkeit dieser Proteine (Plümpe et al. 2000).

Die pro- und anti-apoptotische Wirkungsweise von NF- κ B wirft vor allem eine Frage auf: Wie werden diese zwei unterschiedlichen Effekte in physiologischen und pathologischen Prozessen innerhalb der Zelle kontrolliert?

Die hier vorgelegte Arbeit liefert einen Beitrag zum Verständniss des Transkriptionsfaktors NF- κ B im apoptotischen Geschehen in der Leber und stellt einen Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung der Apoptosemechanismen dar.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser kinetischen Studie war die Untersuchung der Veränderungen der Hepatocyten von GalN sensibilisierten TNF- α -behandelten Mäusen in einem Zeitraum von 48 Stunden. Der apoptotische Effekt von TNF- α wurde durch die Blockierung der Synthese cytoprotektiver Proteine mittels GalN erzielt. Diese Proteine verhindern physiologisch eine von TNF- α induzierte Apoptose. Besonderer Wert wurde auf die Untersuchung der hepatozellulären Apoptose gelegt.

Im ersten Teil der Arbeit wurden in Form einer Literaturübersicht die Morphologie und die Mechanismen der Apoptose beschrieben. Weiterhin wurde auf einige Proteine, die an diesem Prozeß beteiligt sind, näher eingegangen, wobei der Transkriptionsfaktor NF- κ B und sein Inhibitor I- κ B im Vordergrund stehen.

In diesen Untersuchungen wurde Mäuselebergewebe nach einer standardisierten Perfusionsfixierung mit 4% Paraformaldehyd oder 0,25% Glutaraldehyd fixiert und in unterschiedlichen Medien für Licht-, Elektronen-, Fluoreszenzmikroskopie und für Immunhistochemie eingebettet.

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung konnten die präapoptische und apoptotische Veränderungen der Mitochondrien und des Zellkernes dargestellt werden. 3½ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung zeigten apoptotische Hepatocyten Mitochondrien mit einer Ruptur der äußeren Membran, durch die die innere Membran in Form einer Hernie hervorquoll. Ebenfalls traten die Veränderungen im Zellkern auf, die durch Chromatinkondensierung am Kernrand und schließlich 4½ Stunden nach GalN/TNF- α Behandlung durch Bildung der apoptotischen Körperchen charakterisiert werden.

Nekrosen wurden vermehrt nach acht Stunden identifiziert und begleiteten dabei die apoptotischen Veränderungen, die ihrerseits nach 24 Stunden verschwanden. Nach 48 Stunden waren kaum noch nekrotische Herde sichtbar und als ein Zeichen der Leberregeneration traten vereinzelt Mitosen auf.

Der nukleäre Transkriptionsfaktor- κ B (NF- κ B) befindet sich in inaktiver Form an Proteine der I- κ B Familie gebunden im Cytoplasma. Eine Aktivierung mit anschließender Translokation in den Zellkern wurde durch TNF- α erreicht. Die Aktivierung von NF- κ B wurde 30 min nach Behandlung immunhistochemisch und mittels Western-Blotting nachgewiesen. Die Tendenz war bis 2½ Stunden steigend. Danach nahm NF- κ B ab, war aber nach 4½ Stunden im Zellkern mit 30% im Vergleich zu den Kontrollen immer noch stark erhöht.

Die Inhibitorproteine I- κ B α und I- κ B β sind als Regulatoren des Transkriptionsfaktors, obwohl sie der gleichen Familie zugehören, in ihrer Zusammensetzung und Funktion doch sehr verschieden. Während I- κ B α instabil ist, was die Komplexbildung mit NF- κ B betrifft, ist die Verbindung NF- κ B/I- κ B β durch die Maskierung beider NLS-Sequenzen (»nuclear localization signal«) wesentlich stärker. I- κ B α konnte dementsprechend schon nach 30 min im Kern nachgewiesen werden, I- κ B β hatte dagegen bis 4½ Stunden nach Behandlung eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation.

Nach 3½ Stunden stieg die Caspase 3-Aktivität um das fünffache im Vergleich zu den Kontrolltieren an.

Die Messung der Cytochrom c Oxidase-Aktivität in der mitochondrialen Fraktion bestätigte die licht- und elektronenmikroskopischen Ergebnisse. Sie fiel 2½ Stunden nach Behandlung ab, was durch eine erhöhte Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran erklärt wurde. Ein Anstieg nach 4½ Stunden wurde auf das Nachlassen der TNF- α -Wirkung und der Aktivierung der Atmungskette zurückgeführt. Die nekrotischen Veränderungen verursachten nach 8 Stunden ein erneutes Absinken der Cytochrom c Oxidase-Aktivität. Die Regeneration der Hepatocyten wurde nach 48 Stunden durch ein erneutes Ansteigen dieser, charakterisiert. Zu diesem Zeitpunkt war sie sogar höher als in den Kontrollen.

Dies unterstreicht den Zusammenhang zwischen GalN/TNF- α induzierten Effekten: auf der einen Seite die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und der »Kampf« der Zelle ums Überleben mit dem Anstieg der Cytochrom c Oxidase-Aktivität, auf der anderen Seite die Apoptose mit ihren morphologischen Veränderungen, der Aktivierung der Caspase 3 und der Einleitung des Zelltodes.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass die Translokation von NF- κ B zurück in das Cytoplasma nach GalN/TNF- α -Behandlung gestört ist. Ungefähr 30 % von NF- κ B verbleibt in den Zellkernfraktionen und wurde ausschließlich im Heterochromatin apoptotischer Hepatocyten nachgewiesen. Außerdem war das Erscheinen der apoptischen Hepatocyten mit einem enormen Anstieg der Caspase 3-Aktivität verbunden.

7 Summary

The aim of this kinetic study was to analyse the alterations of hepatocytes of GalN sensitized TNF- α -treated mice during 48 hours. The apoptotic effect of TNF- α was achieved by blocking the synthesis of cytoprotective proteins using GalN. These proteins prevent physiologically the apoptosis induced by TNF- α . The main focus of this study was the analysis of the hepatocellular apoptosis.

In the first part the mechanisms and the morphology of apoptosis have been reviewed in a survey of literature. The roles of transcription factor NF- κ B and its inhibitor I- κ B together with some proteins, which are involved in this induction process were of special interest.

In our morphologic studies mouse liver tissue was fixed using a medium containing 4% paraformaldehyde or 0,25% glutaraldehyde. The tissue was embedded for light-, electron- and fluorescence microscopy as well as for immunohistochemistry .

By electron microscopic examination pre-apoptotic and apoptotic changes of mitochondria and nuclei have been studied. At 3½ hours after GalN/TNF- α administration apoptotic hepatocytes contained mitochondria with a rupture of the outer membrane and herniation of the inner membrane through those gaps. Changes were also observed in nuclei, characterized by heterochromatin condensation along the nuclear envelope followed by the formation of apoptotic bodies 4½ hours after GalN/TNF- α stimulation .

Necrosis appeared after eight hours, accompanied at the same time by apoptotic changes, which disappeared after 24 hours. After 48 hours, only few necrotic changes were seen and isolated mitosis appeared as a sign of liver regeneration.

The inactive nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) bound to proteins of the I- κ B family is located in cytoplasm. The activation followed by the translocation into the nucleus was induced by TNF- α . In the nucleus NF- κ B was detectable 30 min after stimulation by immunohistochemistry and Western-Blotting. The translocation into the nucleus increased until 2½ hours, decreasing thereafter. However, even after 4½ hours it was still elevated in the nucleus by about 30% in comparison to the control.

The inhibitor proteins I- κ B α and I- κ B β differ in their structure und function as regulators of the transcription factor, although they belong to the same protein family. Whereas I- κ B α shows instability in binding to NF- κ B, the binding of NF- κ B/I- κ B β is considerably stronger due to masking of both NLS-sequences (nuclear localization signals). Accordingly I- κ B α was detected in the nucleus

already 30 min after stimulation. In contrast, I- κ B β showed an exclusively cytoplasmatic localisation during 4½ hour period after stimulation.

After 3½ hours caspase 3-activity increased more than five fold in comparison to control animals.

The measurement of cytochrome c oxidase-activity in the mitochondrial fraction confirmed the light- and electron microscopic results. An increase of the activity after 4½ hours was explained by the decrease of the TNF- α -effect and by the activation of the respiratory chain. The necrotic changes seen 8 hours after administration caused a decrease of the cytochrome c oxidase-activity. The regeneration of hepatocytes after 48 hours was characterized by an increase of cytochrome c oxidase-activity. At this time point the activity was even higher than the controls.

This alterations emphasizes the complex relation between the effects induced by GalN/TNF- α : the activation of the transcription factor NF- κ B and the »struggle« of the cell for survival with an increase of cytochrome c oxidase-activity on one hand and induction of cell death on the other hand with apoptosis and activation of caspase 3.

The results of the present study indicate, that the shuttle of NF- κ B back to the cytoplasm is disturbed after GalN/TNF- α treatment. Approximately 30% of NF- κ B remained in the nuclear fractions and could be observed exclusively in the heterochromatin of the nuclei of apoptotic hepatocytes. In addition the appearance of apoptotic hepatocytes was correlated with an enormous increase of caspase-3 activity.

8 Literaturverzeichnis

Aggarwal BB (2000)

Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B.

Ann Rheum Dis 59:6–16

Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, Diehl AM (1992)

Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy.

Am J Physiol 263:579–585

Angermüller S, Fahimi HD (1981)

Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3,3'-diaminobenzidine.

Histochemistry 71:33–44

Angermüller S, Fahimi HD (1986)

Ultrastructural cytochemical localization of uricase in peroxisomes of rat liver.

Histochem Cytochem 34:159–165

Angermüller S, Juchem R, Beier K, Konrad T, Kusterer K (1994)

Zonal heterogeneity of calcium distribution in rat hepatocytes: an electron microscopic study with a combined glutaraldehyde-osmium-pyroantimonate technique.

J Histochem Cytochem 42:593–598

Angermüller S, Künstle G, Tiegs G (1998)

Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice.

J Histochem Cytochem 46:1175–1183

Angermüller S, Schümann J, Fahimi HD, Tiegs G (1999)

Ultrastructural alterations of mitochondria in pre-apoptotic and apoptotic hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice.

Ann NY Acad Sci 887:12–17

Arends MJ, Wyllie AH (1991)

Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology.

Int Rev Exp Pathol 32:223–254

Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelierie F, Thomas D, Hay RT (1995)

Inducible nuclear expression of newly synthesized I κ B α negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF- κ B.

Mol Cell Biol 15:2689–2696

Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL, Dargemont C (1997)

Nuclear localization of I κ B α promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm.

J Cell Science 110:369–378

Ashkenazi A, Dixit VM (1998)

Death receptors: Signaling and modulation.

Science 281:1305–1308

Baetu TM, Kwon H, Sharma S, Grandvaux N, Hiscott J (2001)

Disruption of NF- κ B signaling reveals a novel role for NF- κ B in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression.

J Immunol 167:3164–3173

- Baeuerle PA, Henkel T (1994)
Function and activation of NF- κ B in the immune system.
Annu Rev Immunol 12:141–179
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996)
NF- κ B: Ten years after.
Cell 87:13–20
- Baeuerle PA (1998a)
I κ B-NF- κ B structures: At the interface of inflammation control.
Cell 95:729–731
- Baeuerle PA (1998b)
Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF- κ B puzzle?
Curr Biol 8:19–22
- Baichwal VR, Baeuerle PA (1997)
Apoptosis: Activate NF- κ B or die?
Curr Biol 7:94–96
- Baldwin AS Jr. (1996)
The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights.
Annu Rev Immunol 14:649–681
- Barkett M, Gilmore TD (1999)
Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors.
Oncogene 18:6910–6924
- Barnes PJ, Karin M (1997)
Nuclear factor- κ B - a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.
The New Engl J Med 336:1066–1071
- Barrientos A, Barros MH, Valnot I, Rötig A, Rustin P, Tzagoloff A (2002)
Cytochrome oxidase in health and disease.
Gene 286:53–63
- Baud V, Karin M (2001)
Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives.
Trends in Cell Biol 11:372–377
- Beg AA, Baldwin AS Jr. (1993)
The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors.
Genes Dev 7:2064–2070
- Beg AA, Finco TS, Nantermet PV, Baldwin AS Jr. (1993)
Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation.
Mol Cell Biol 13:3301–3310
- Beg AA, Baltimore D (1996)
An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death.
Science 274:782–784
- Bendayan M, Zollinger M (1983)
Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique.
J Histochem Cytochem 31:101–109
- Bohlinger I, Leist M, Gantner E, Angermüller S, Tiegs G, Wendel A (1996)
DNA fragmentation in mouse organs during endotoxic shock.
Am J Pathol 149:1381–1393.
- Bottero V, Rossi F, Samson M, Mari M, Hofman P, Peyron J-F (2001)
I κ B- α , the NF- κ B Inhibitory Subunit, Interacts with ANT, the Mitochondrial ATP/ADP Translocator.
J Biol Chem 276:21317–21324
- Bowie A, O'Neill LAJ (2000)
Oxidative stress and Nuclear Factor- κ B activation. A reassessment of the evidence in the light of recent discoveries.
Biochem Pharmacol 59:13–23

- Bradford M (1976)
A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72:248–254
- Bradham CA, Plümpe J, Manns MP, Brenner DA, Trautwein C (1998a)
Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 275:387–392
- Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ (1998b)
The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release.
Mol Cell Biol 18:6353–6364
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999)
Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.
Annu Rev Cell Dev Biol 15:269–290
- Carlotti F, Dower SK, Qwarnstrom EE (2000)
Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation.
J Biol Chem 275:41028–41034
- Carson DA, Ribeiro JM (1993)
Apoptosis and disease.
Lancet 341:1251–1254
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975)
An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.
Proc Natl Acad Sci U S A 72:3666–3370
- Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R (1998)
Functional redundancy of the nuclear factor kB inhibitors I κ B α and I κ B β .
J Exp Med 188:1055–1062
- Chiao PJ, Miyamoto S, Verma IM (1994)
Autoregulation of I kappa B alpha activity.
Proc Natl Acad Sci U S A 91:28–32
- Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997)
Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control.
Proc Natl Acad Sci USA 94:10057–10062
- Cohen GM (1997)
Caspases: the executioners of apoptosis.
Biochem J 326:1–16
- Cooperstein SJ, Lazarow A (1977)
Uptake of amino acids by islet of Langerhans and other tissues of the toadfish.
Am J Physiol 233:19–27
- Cossarizza A, Franceschi C, Monti D, Salvioli S, Bellesia E, Rivabene R, Biondo L, Rainaldi G, Tinari A, Malorni W (1995)
Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria.
Exp Cell Res 220:232–240
- Crinelli R, Antonelli A, Bianchi M, Gentilini L, Scaramucci S, Magnani M (2000)
Selective inhibition of NF- κ B activation and TNF- α production in macrophages by red blood cell-mediated delivery of dexamethasone.
Blood Cells, Mol and Diseases 26:211–222
- Czaja MJ, Xu J, Alt E (1995)
Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor.
Gastroenterology 108:1849–1854.
- Darnay BG, Aggarwal BB (1999)
Signal transduction by tumour necrosis factor and tumour necrosis factor related ligands and their receptors.
Ann Rheum Dis 58:2–13

- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F (1997)
Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).
Cytometry 27:1–20
- Davis N, Ghosh S, Simmons DL, Tempst P, Liou HC, Baltimore D, Bose HRJ (1991)
Rel-associated pp40: an inhibitor of the Rel family of transcription factors.
Science, 253:1268–1271
- de Martin R, Schmid JA, Hofer-Warbinek R (1999)
The NF- κ B/Rel family of transcription factors in oncogenic transformation and apoptosis.
Mutat Research 437:231–243
- Decker K, Keppler D (1972)
Galactosamine induced liver injury.
Prog Liver Dis 4:183–199
- Desagher S, Martinou JC (2000)
Mitochondria as the central point of apoptosis.
Cell Biol 10:369–377
- Desmet VJ (1994)
Organizational principles. In Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA. *The Liver. Biology And Pathobiology*
Raven Press New York:3–14
- Deveraux QL, Reed JC (1999)
IAP family proteins-suppressors of apoptosis.
Genes Dev 13:239–252
- Diaz-Meco MT, Lallena MJ, Monjas A, Frutos S, Moscat J (1999)
Inactivation of the inhibitory κ B protein kinase/nuclear factor κ B pathway by par-4 expression potentiates tumor necrosis factor α -induced apoptosis.
J Biol Chem 274:19606–19612
- DiDonato J, Mercurio F, Rosette C, Wu-Li J, Suyang H, Ghosh S, Karin M (1996)
Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation.
Mol Cell Biol 16:1295–1304
- DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997)
A cytokine-responsive I κ B kinase that activates the transcription factor NF- κ B.
Nature 388:548–554.
- Djavaheeri-Mergny M, Gras MP, Mergny JL, Dubertret L (1999)
UV-A-induced decrease in nuclear factor- κ B activity in human keratinocytes.
Biochem J 338:607–613
- Duvall E, Wyllie AH, Morris RG (1985)
Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis).
Immunology 56:351–358.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998)
A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
Nature 391:43–50
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996)
Role of cytokines in rheumatoid arthritis.
Annu Rev Immunol 14:397–440
- Fenwick C, Na S-Y, Voll RE, Zhong H, Im S-Y, Lee JW, Ghosh S (2000)
A subclass of Ras proteins that regulate the degradation of I κ B.
Science 287:869–873
- Ferri KF, Kroemer G (2001)
Organelle-specific initiation of cell death pathways
Nature 3:255–263
- Fiers W (1991)
Tumor necrosis factor: characterization at molecular, cellular, and in vivo level.
FEBS Lett 224:199–212

- Fiers W, Beyaert R, Boone E, Cornelis S, Declercq W, Decoster E, Denecker G, Depuydt B, De Valck D, De Wilde G, Goossens V, Grooten J, Haegeman G, Heyninck K, Penning L, Plaisance S, Vancompernelle K, Van Criekinge W, Vandenabeele P, Vanden Berghe W, Van de Craen M, Vandevoorde V, Vercammen D (1995)
TNF-induced intracellular signaling leading to gene induction or to cytotoxicity by necrosis or by apoptosis.
J Inflamm 47:67–75
- Fischer C, Page S, Weber M, Eisele T, Neumeier D, Brand K (1999)
Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I κ B kinase signalsome activation and I κ B proteolysis.
J Biol Chem 274:24625–24632
- Fitz Gerald MJ, Webber EM, Donovan JR, Fausto N (1995)
Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration.
Cell Growth Differ 6:417–427
- Flick DA, Gifford GE (1984)
Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor.
J Immunol Meth 68:167–175
- Gallois C, Habib A, Tao J, Moulin S, Maclouf J, Mallat A, Lotersztajn S. (1998)
Role of NF κ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumor necrosis factor- α in human hepatic stellate cells.
J Biol Chem 273:23183–23190
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992)
Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation.
J Cell Biol 119:493–501
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998)
NF κ B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses.
Annu Rev Immunol 16:225–260
- Gilmore TD (1999)
The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction.
Oncogene 18:6842–6844
- Giloh H, Sedat JW (1982)
Fluorescence microscopy: reduced photobleaching of rhodamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate.
Science 217:1252–1255
- Glickman MH, Ciechanover A (2002)
The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction.
Physiol Rev 82:373–428
- Goeddel DV (1999)
Signal transduction by Tumor Necrosis Factor: The Parker B. Francis Lectureship.
Chest 116:69-73
- Gottlieb RA (2000)
Mitochondria: execution central.
FEBS 482:6–12
- Green DR (1998)
Apoptotic pathways: the roads to ruin.
Cell 94:695–698
- Green DR, Kroemer G (1998)
The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria?
Trends Cell Biol 8:267–271
- Green DR, Reed JC (1998)
Mitochondria and Apoptosis.
Science 281:1309–1312
- Green DR, Evan GI (2002)
A matter of life and death.
Cancer Cell 1:19–30

- Grilli M, Chiu JJ, Lenardo MJ (1993)
NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system.
Int Rev Cytol 143:1–62
- Grütter MG (2000)
Caspases: key players in programmed cell death.
Curr Op in Struct Biol 10:649–655
- Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN (2000)
Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor- κ B in mice.
J Pharm Exp Therap 293:82–90
- Han Y, Brasier AR (1997)
Mechanism for biphasic Rel A NF- κ B1 nuclear translocation in Tumor Necrosis Factor α -stimulated hepatocytes.
J Biol Chem 272:9825–9832
- Han Y, Meng T, Murray NR, Fields AP, Brasier AR (1999)
Interleukin-1-induced Nuclear Factor- κ B-I κ B α autoregulatory feedback loop in hepatocytes.
J Biol Chem 274:939–947
- Harper N, Farrow SN, Kaptein A, Cohen GM, MacFarlane M (2001)
Modulation of Tumor Necrosis Factor apoptosis-inducing Ligand-induced NF- κ B activation by inhibition of apical caspases.
J Biol Chem 276:34743–34752
- Hatada EN, Krappmann D, Scheiderei C. (2000)
NF- κ B and the innate immune response.
Curr Opin in Immunol 12:52–58
- Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA (2000)
The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes.
J Biol Chem 275:11814–11823
- Hatano E, Brenner DA (2001)
Akt protects mouse hepatocytes from TNF- α and Fas-mediated apoptosis through NF- κ B activation.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281:1357–1368
- Hatano E, Bennett BL, Manning AM, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA (2001)
NF- κ B stimulates inducible nitric oxide synthase to protect mouse hepatocytes from TNF- α - and fas-mediated apoptosis.
Gastroenterol 120:1251–1262
- Hengartner MO (2000)
The biochemistry of apoptosis.
Nature 407:770–776
- Hengartner MO (2001)
Apoptosis: Coralling the corpses.
Cell 104:325–328
- Henkart PA (1996)
ICE family proteases: mediators of all apoptotic cell death?
Immunity 4:195–201
- Hermanns W (1999)
Leber. In Dahme E, Weiss E. Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart:200–230
- Hill MR, Clarke S, Rodgers K, Thornhill B, Peters JM, Gonzalez FJ, Gimble JM (1999)
Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators on tumor necrosis factor expression in mice during endotoxemia.
Infect Immun 67:3488–3493.
- Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV (1996)
TRADD–TRAF2 and TRADD–FADD Interactions Define Two Distinct TNF Receptor 1 Signal Transduction Pathways.
Cell 84:299–308

- Huang TT, Kudo N, Yoshida M, Miyamoto S (2000)
A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes.
Proc Natl Acad Sci USA 97:1014–1019
- Huang TT, Miyamoto S (2001)
Postrepression activation of NF- κ B requires the amino-terminal nuclear export signal specific to I κ B- α .
Mol Cell Biol 21:4737–4747
- Huxford T, Huang DB, Malek S, Ghosh G (1998)
The crystal structure of the I κ B/NF- κ B complex reveals mechanisms of NF- κ B inactivation.
Cell 95:759–770
- Israel A (2000)
The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B?
Trends Cell Biol 10:129–133
- Itokazu Y, Segawa Y, Inoue N, Omata T (1999)
D-galactosamine-induced mouse hepatic apoptosis: possible involvement with tumor necrosis factor, but not with caspase-3 activity.
Biol Pharm Bull 22:1127–1130
- Jacobs MD, Harrison SC (1998)
Structure of an I κ B α /NF- κ B complex.
Cell 95:749–758
- Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997)
Programmed cell death in animal development.
Cell 88:347–354
- Jaeschke H, Fisher MA, Lawson JA, Simmons CA, Farhood A, Jones DA (1998)
Activation of Caspase 3 (CPP32)-Like Proteases Is Essential for TNF α -Induced Hepatic Parenchymal Cell Apoptosis and Neutrophil-Mediated Necrosis in a Murine Endotoxin Shock Model.
J Immunol 160:3480–3486
- Jeschke MG, Low JFA, Spies M, Vita R, Hawkins HK, Herndon DN, Barrow RE (2001)
Cell proliferation, apoptosis, NF- κ B expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280:1314–1320
- Jobin C, Sartor RB (2000)
The I- κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection.
Am J Physiol Cell Physiol 278:451–462
- Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ (1999)
An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I κ B α .
EMBO J 18:6682–6693
- Johnson DR, Douglas I, Jahnke A, Ghosh S, Pober JS (1996)
A sustained reduction in I κ B- β may contribute to persistent NF- κ B activation in human endothelial cells.
J Biol Chem 271:16317–16322
- Jones BA, Gores GJ (1997)
Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 273:1174–1188
- Jones BE, Lo CR, Liu H, Pradhan Z, Garcia L, Srinivasan A, Valentino KL, Czaja MJ (2000a)
Role of caspases and NF- κ B signaling in hydrogen peroxide- and superoxide-induced hepatocyte apoptosis.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 278:693–699
- Jones BE, Lo CR, Liu H, Srinivasan A, Streetz K, Valentino KL, Czaja MJ (2000b)
Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor- α cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways.
J Biol Chem 275:705–712
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CYJ, Sasaki T, Elia AJ, Cheng H-YM, Ravagnan L, Ferri KE, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong Y-Y, Mak TW, Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001)
Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death.
Nature 410:549–554

- Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG (2001)
NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection.
Cytokine and Growth Factor Rev 12:73–90
- Karin M (1999)
The beginning of the end: I κ B Kinase (IKK) and NF κ B activation.
J Biol Chem 274:27339–27342
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000)
Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF κ B activity.
Annu Rev Immunol 18:621–663
- Karnovsky MJ (1971)
Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy.
J Cell Biol:A284
- Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH (1987)
The erasable Western Blot.
Analytical Biochem 161:89–95
- Kaufmann SH, Hengartner MO (2001)
Programmed cell death: alive and well in the new millennium.
Trends Cell Biol 11:526–534
- Keppeler DO, Rudiger JF, Bischoff E, Decker KF (1970)
The trapping of uridine phosphates by D-galactosamine, D-glucosamine, and 2-deoxy-D-galactose. A study on the mechanism of galactosamine hepatitis.
Eur J Biochem 17:246–253
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR (1972)
Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br J Cancer 26:239–257
- Kerr JFR, Harmon BV (1991)
Definition and incidence of apoptosis: A historical perspective. In Tomei LD, Cope FO. Apoptosis: The molecular basis of cell death.
Cold Spring Harbor Laboratory Press:5–28
- Kimura K, Sasano H, Shimosegawa T, Kato K, Noguchi T, Mochizuki S, Sawai T, Koizumi M, Toyota T, Nagura H (1997)
Ultrastructural and confocal laser scanning microscopic examination of TUNEL-positive cells.
J Pathol 181:235–242
- Kirillova I, Chaisson M, Fausto N (1999)
Tumor necrosis factor induces DNA replication in hepatic cells through nuclear factor kappaB activation.
Cell Growth Differ 10:819–828
- Krippner A, Matsuno-Yagi A, Gottlieb RA, Babior BM (1996)
Loss of function of cytochrome c in Jurkat cells undergoing fas-mediated apoptosis.
J Biol Chem 271:21629–21636
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M (1998)
The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.
Annu Rev Physiol 60:619–642
- Kroemer G, Reed JC (2000)
Mitochondrial control of cell death.
Nature Med 6:513–519
- Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, Kubicka S (2000)
NF κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis.
J Biol Chem 275:6421–6427
- Kuida K, Haydar TE, Kuan C-Y, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS-S, Rakic P, Flavell RA (1998)
Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9.
Cell 94:325–337
- Künstle G, Hentze H, Germann PG, Tiegs G, Meergans T, Wendel A (1999)
Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation.
Hepatology 30:1241–1251

- Kwong J, Choi HL, Huang Y, Chan FL (1999)
Ultrastructural and biochemical observations on the early changes in apoptotic epithelial cells of the rat prostate induced by castration.
Cell Tissue Res 298:123–136
- Laemmli UK (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227:680–685
- Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H (1998)
Parenchymal cell apoptosis as a signal for sinusoidal sequestration and transendothelial migration of neutrophils in murine models of endotoxin and Fas-antibody-induced liver injury.
Hepatology 28:761–767
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A (1994)
Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF- α requires transcriptional arrest.
J Immunol 153:1778–1788
- Leist M, Gantner F, Bohlinger I, Tiegs G, Germann PG, Wendel A (1995)
Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models.
Am J Pathol 146:1220–1234
- Lemasters JJ (1999)
V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 276:1–6
- Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG (1991)
Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli.
Cell Prolif 24:203–214
- Leo E, Deveraux QL, Buchholtz C, Welsh K, Matsuzawa S, Stennicke HR, Salvesen GS, Reed JC (2001)
TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor- α -induced apoptosis.
J Biol Chem 276:8087–8093
- Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, Chen EY, Goeddel DV (1991)
Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific.
Proc Natl Acad Sci U S A 88:2830–2834
- Li N, Karin M (1999)
Is NF- κ B the sensor of oxidative stress?
FASEB 13:1137–1143
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X (1997)
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.
Cell 91:479–489
- Li X, Fang Y, Zhao X, Jiang X, Duong T, Kain SR (1999)
Characterization of NF κ B activation by detection of green fluorescent protein-tagged I κ B degradation in living cells.
J Biol Chem 274:21244–21250
- Li Z, Nabel GJ (1997)
A new member of the I κ B protein family, I κ B epsilon, inhibits RelA (p65)-mediated NF- κ B transcription.
Mol Cell Biol 17:6184–6190
- Li ZW, Chu W, Hu Y, Delhase M, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R, Karin M (1999)
The IKK β subunit of I κ B kinase (IKK) is essential for nuclear factor κ B activation and prevention of apoptosis.
J Exp Med 189:1839–1845
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X (1996)
Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c.
Cell 86:147–157
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996)
Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B

- activation prevents cell death.
Cell 87:565–576
- Liebich HG (1999)
Funktionelle Histologie
Farbatlas und Kurzlehrbuch der Haussäugetiere
Schattauer Verlag, Stuttgart, New York
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001)
The TNF and TNF Receptor Superfamilies Integrating Mammalian Biology.
Cell 104:487–501
- Loud AV (1968)
A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells.
J Cell Biol 37:27–46
- Lotem J, Sachs L (1998)
Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds.
Proc Natl Acad Sci 95:4601–4606
- Magnusson C, Vaux DL (1999)
Signalling by CD95 and TNF receptors: Not only life and death.
Immunol Cell Biol 77:41–46
- Majno G, Joris I (1995)
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.
Am J Pathol 146:3–15
- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G (2001)
I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B nuclear localization sequences in resting cells.
J Biol Chem 276:45225–45235
- Malik S, Balkwil FR (1988)
Tumor necrosis factor.
Br Med J 296:1214
- Mancini M, Anderson BO, Caldwell E, Sedghinasab M, Paty PB, Hockenbery DM (1997)
Mitochondrial proliferation and paradoxical membrane depolarization during terminal differentiation and apoptosis in a human colon carcinoma cell line.
J Cell Biol 138:449–469
- Manna SK, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB (2000)
IFN- α suppresses activation of nuclear transcription factors NF- κ B and Activator Protein 1 and potentiates TNF-induced apoptosis.
J Immunol 165:4927–4934
- Manos EJ, Jones DA (2001)
Assessment of Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling pathways by transcriptional profiling.
Cancer Res 61:433–438
- Marianneau P, Cardona A, Edelman L, Deubel V, Despres P (1997)
Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF- κ B which in turn induces apoptotic cell death.
J Virol 71:3244–3249
- Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ (1998)
Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACH α 1) death signal.
J Biol Chem 273:4345–4359.
- Martinou JC (1999)
Apoptosis: Key to the mitochondrial gate
Nature 399:411–412
- Martinou I, Desagher S, Eskes R, Antonsson B, André E, Fakan S, Martinou J-C (1999)
The Release of Cytochrome c from Mitochondria during Apoptosis of NGF-deprived Sympathetic Neurons Is a Reversible Event.
J Cell Biol 144:883–889

- Martinou J-C, Desagher S, Antonsson B (2000)
Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing.
Nature Cell Biol 2:41–43
- Martinou J-C, Green DR (2001)
Breaking the mitochondrial barrier.
Nature Rev Mol Cell Biol 2:63–67
- Matthews JR, Hay RT (1995)
Regulation of the DNA Binding Activity of NF- κ B.
Int J Biochem Cell Biol 27:865–879
- May MJ, Ghosh S (1998)
Signal transduction through NF- κ B.
Immunol Today 19:80–88
- McConkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, Bellomo G, Wyllie AH, Orrenius S (1989)
Glucocorticoids activate a suicide process in thymocytes through an elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration.
Arch Biochem Biophys 269:365–370
- Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997)
IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation.
Science 278:860–866
- Mercurio F, Manning AM (1999)
Multiple signals converging on NF- κ B.
Curr Opin Cell Biol 11:226–232
- Mestan J, Digel W, Mitnacht S (1986)
Antiviral effects of recombinant tumor necrosis factor in vitro.
Nature 323:816–822
- Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH (1984)
Hormone-induced cell death. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis.
Am J Pathol 115:426–436.
- Mukhopadhyay A, Manna SK, Aggarwal BB (2000)
Pervanadate-induced nuclear factor- κ B activation requires tyrosine phosphorylation and degradation of I κ B α .
J Biol Chem 275:8549–8555
- Nagaki M, Tanaka M, Sugiyama A, Ohnishi H, Moriwaki H (1999a)
Interleukin-10 inhibits hepatic injury and tumor necrosis factor- α and interferon-gamma mRNA expression induced by staphylococcal enterotoxin B or lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice.
J Hepatol 31:815–824
- Nagaki M, Sugiyama A, Osawa Y, Naiki T, Nakashima S, Nozawa Y, Moriwaki H (1999b)
Lethal hepatic apoptosis mediated by tumor necrosis factor receptor, unlike Fas-mediated apoptosis, requires hepatocyte sensitization in mice.
J Hepatol 31:997–1005
- Nagaki M, Naiki T, Brenner DA, Osawa Y, Imose M, Hayashi H, Banno Y, Nakashima S, Moriwaki H (2000)
Tumor necrosis factor α prevents Tumor Necrosis Factor Receptor-mediated mouse hepatocyte apoptosis, but not fas-mediated apoptosis: Role of Nuclear Factor- κ B.
Hepatology 32:1272–1279
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000)
Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta.
Nature 403:98–103
- Nagata S (1997)
Apoptosis by Death Factor.
Cell 88:355–365
- Newmeyer DD, Farschon DM, Reed JC (1994)
Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria.
Cell 79:353–364

- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al (1995)
Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis.
Nature 376:37–43
- Nicholson DW, Thornberry NA (1997)
Caspases: killer proteases.
Trends Biochem Sci 22:299–306
- Osawa Y, Banno Y, Nagaki M, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S (2001a)
Caspase activation during hepatocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor- α in galactosamine-sensitized mice.
Liver 21:309–319
- Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Yamada Y, Imose M, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S (2001b)
Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against Tumor Necrosis Factor- α -induced hepatocyte apoptosis.
J Cell Physiol 187:374–385
- Pahl HL (1999)
Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors.
Oncogene 18:6853–6866
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV (1984)
Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin.
Nature 312:724–729
- Perkins ND (2000)
The Rel/NF- κ B family: friend and foe.
Trends in Biochem Sciences 25:434–440
- Pessayre D, Feldmann G, Haouzi D, Fau D, Moreau A, Neuman M (2000)
Hepatocyte apoptosis triggered by natural substances (cytokines, other endogenous substances and foreign toxins) In Cameron RG, Feuer G Apoptosis and Its Modulation by Drugs.
Handbook Exp Pharmacol 142:59–108
Springer Verlag Heidelberg
- Petit PX, Lecoecur H, Zorn E, Dauguet C, Mignotte B, Gougeon ML (1995)
Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis.
J Cell Biol 130:157–167
- Phelps CB, Sengchanthalangsy LL, Huxford T, Ghosh G (2000)
Mechanism of I κ B α binding to NF- κ B dimers.
J Biol Chem 275:29840–29846
- Piacentini M, Fesus L, Farrace MG, Ghibelli L, Piredda L, Melino G (1991)
The expression of „tissue“ transglutaminase in two human cancer cell lines is related with the programmed cell death (apoptosis).
Eur J Cell Biol 54:246–254
- Pierce RH, Campbell JS, Stephenson AB, Franklin CC, Chaisson M, Poot M, Kavanagh TJ, Rabinovitch PS, Fausto N (2000)
Disruption of redox homeostasis in tumor necrosis factor-induced apoptosis in a murine hepatocyte cell line.
Am J Pathol 157:221–236
- Plümpe J, Malek NP, Bock CT, Rakemann T, Manns Mp, Trautwein C (2000)
NF- κ B determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 278:173–183
- Rath PC, Aggarwal BB (1999)
TNF-induced signaling in apoptosis.
J Clin Immunol 19:350–364
- Rathmell JC, Thompson CB (1999)
The central effectors of cell death in the immune system.
Annu Rev Immunol 17:781–828

- Reed JC, Green DR (2002)
Remodeling for demolition: changes in mitochondrial ultrastructure during apoptosis.
Mol Cell 9:1–3
- Régnier CH, Song HY, Gao X, Goeddel DV, Cao Z, Rothe M (1997)
Identification and characterization of an I κ B kinase.
Cell 90:373–383
- Renard P, Percherancier Y, Kroll M, Thomas D, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F (2000)
Inducible NF- κ B activation is permitted by simultaneous degradation of nuclear I κ B α .
J Biol Chem 275:15193–15199
- Reuther JY, Baldwin AS (1999)
Apoptosis promotes a caspase-induced amino-terminal truncation of I κ B α that functions as a stable inhibitor of NF κ B.
J Biol Chem 274:20664–20770
- Reynolds ES (1963)
The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.
J Cell Biol 17:208–229
- Rickwood D, Messent A, Patel D (1997)
Isolation and characterization of nuclei and nuclear subfractions. In Graham JM, Rickwood D. *Subcellular fractions-A practical approach*.
Oxford Univ Press:71–105
- Rodriguez MS, Thompson J, Hay RT, Dargemont C (1999)
Nuclear retention of I κ B α protects it from signal-induced degradation and inhibits nuclear factor κ B transcriptional activation.
J Biol Chem 274:9108–9115
- Roff M, Thompson J, Rodriguez MS, Jacque JM, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Hay RT (1996)
Role of I κ B α ubiquitination in signal-induced activation of NF κ B in vivo.
J Biol Chem 271:7844–7850
- Romeis B (1989)
Mikroskopische Technik. 17. Auflage
Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore
- Rothe M, Wong SC, Henzel WJ, Goeddel DV (1994)
A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75kDa tumor necrosis factor receptor.
Cell 79:681–692
- Salvesen GS, Dixit VM (1999)
Caspase activation: the induced-proximity model.
Proc Natl Acad Sci U S A 96:10964–10967
- Savill J (1998)
Apoptosis. Phagocytic docking without shocking.
Nature 392:442–443
- Schiemenz N (2002)
Histopathologische, immunhistologische und biochemische Untersuchungen zur Prüfung der Wirksamkeit von Imexon im GalN/LPS-Modell der Maus unter besonderer Berücksichtigung der Milz.
Med. Vet. Dissertation Univ. Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin
- Schmid RM, Adler G (2000)
NF- κ B/Rel/I κ B: Implications in gastrointestinal diseases.
Gastroenterol 118:1208–1228
- Schmitz ML, Bacher S, Kracht M (2001)
I κ B-independent control of NF- κ B activity by modulatory phosphorylations.
Trends Biochem Sci 26:186–190
- Schulte-Hermann R, Bursch W, Grasl-Kraupp B (1995)
Active cell death (apoptosis) in liver biology and disease.
Prog Liver Dis 13:1–35

- Schümann J, Tiegs G (1999)
Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins.
Toxicology 138:103–126
- Schütze S, Machleidt T, Krönke M (1992)
Mechanismus of tumor necrosis factor.
Oncology 19:16–24
- Searle J, Harmon BV, Bishop CJ, Kerr JFR (1987)
The significance of cell death by apoptosis in hepatobiliary disease.
J Gastroenterol Hepatol 2:77–96
- Segal MS, Beem E (2001)
Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity.
Am J Physiol Cell Physiol 281:1196–1204
- Sen R, Baltimore D (1986a)
Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences.
Cell 46:705–716
- Sen R, Baltimore D (1986b)
Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF κ B by a posttranslational mechanism.
Cell 47:921–928
- Simeonidis S, Stauber D, Chen G, Hendrickson WA, Thanos D (1999)
Mechanisms by which I κ B proteins control NF- κ B activity.
Proc Natl Acad Sci USA 96:49–54
- Song HY, Rothe M, Goeddel DV (1996)
The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF- κ B activation.
Proc Natl Acad Sci U S A 93:6721–6725
- Southall MD, Isenberg JS, Nakshatri H, Yi Q, Pei Y, Spandau DE, Travers JB (2001)
The platelet-activating factor receptor protects epidermal cells from TNF- α and TRAIL-induced apoptosis through a NF- κ B-dependent process.
J Biol Chem
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998)
Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization.
Mol Cell 1:949–957
- Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV (1995)
Regulation of I κ B α phosphorylation by PKC- and Ca²⁺-dependent signal transduction pathways.
J Immunol 155:4685–4691
- Stennicke HR, Salvesen GS (1997)
Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8.
J Biol Chem 272:25719–25723
- Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H, Deveraux Q, Wolf BB, Yang X, Zhou Q, Ellerby HM, Ellerby LM, Bredesen D, Green DR, Reed JC, Froelich CJ, Salvesen GS (1998)
Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8.
J Biol Chem 273:27084–27090.
- Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MAJ, Shepard HM (1985)
Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro.
Science 230:943–945
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Abersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999)
Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.
Nature Letters 397:441–446
- Suyang H, Phillips R, Douglas I, Ghosh S (1996)
Role of unphosphorylated, newly synthesized I κ B β in persistent activation of NF- κ B.
Mol Cell Biol 16:5444–5449
- Tafari M, Schneider TG, Pastorino JG, Farber JL (2000)
Cytochrome c-dependent activation of Caspase-3 by Tumor Necrosis Factor requires induction of the

- mitochondrial permeability transition.
Am J Pathol 156:2111–2121
- Takeuchi M, Rothe M, Goeddel DV (1996)
Anatomy of TRAF2.
J Biol Chem 271:19935–19942
- Tam WF, Lee LH, Davis L, Sen R (2000)
Cytoplasmic sequestration of rel proteins by I κ B α requires CRM1-dependent nuclear export.
Mol Cell Biol 20:2269–2284
- Tam WF, Wang, W, Sen R (2001)
Cell-Specific Association and shuttling of I κ B- α provides a mechanism for nuclear NF- κ B in B lymphocytes.
Mol Cell Biol 21:4837–4846
- Tam WF, Sen R (2001)
I κ B family members function by different mechanisms.
J Biol Chem 276:7701–7704
- Tanaka M, Fuentes ME, Yamaguchi K, Durnin MH, Dalrymple SA, Hardy KL, Goeddel DV (1999)
Embryonic lethality, liver degeneration and impaired NF- κ B activation in IKK-b-deficient mice.
Immunity 10:421–429
- Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, Lin A (2001a)
Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes.
Nature 414:313–317
- Tang G, Yang J, Minemoto Y, Lin A (2001b)
Blocking Caspase-3-Mediated Proteolysis of IKK β Suppresses TNF- α -Induced Apoptosis.
Mol Cell 8:1005–1016
- Tartaglia LA, Weber RF, Figari IS, Reynolds C, Palladino MA Jr, Goeddel DV (1991)
The two different receptors for Tumor Necrosis Factor mediate distinct cellular responses.
Proc Natl Acad Sci USA 88:9292–9296
- Tartaglia LA, Goeddel DV (1992)
Two TNF receptors.
Immunol Today 13:151–153
- Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV (1993)
Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor.
J Biol Chem 268:18542–18548
- Taub R (1998)
Blocking NF- κ B in the liver: the good and bad news.
Hepatology 27:1445–1446
- Thanos D, Maniatis T (1995)
NF-kappa B: a lesson in family values.
Cell 80:529–532
- Thatte U, Dahanukar S (1997)
Apoptosis: clinical relevance and pharmacological manipulation.
Drugs 54:511–532
- Thompson EB (1998)
Special topic: apoptosis.
Annu Rev Physiol 60:525–532
- Thompson J, Phillips RJ, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S (1995)
I κ B- β regulates the persistent response in a biphasic activation of NF- κ B.
Cell 80:573–582
- Thornberry NA, Lazebnik Y (1998)
Caspases: Enemies within
Science 281:1312–1316
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some

- applications.
Proc Natl Acad Sci USA 76:4350–4354
- Traenckner EBM, Wilk S, Baeuerle A (1994)
A proteasome inhibitor prevents activation of NF- κ B and stabilizes a newly phosphorylated form of I κ B- α that is still bound to NF- κ B.
EMBO 13:5433–5441
- Tran K, Merika M, Thanos D (1997)
Distinct functional properties of I κ B α and I κ B β .
Mol Cell Biol 17:5386–5399
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000)
Bcl-2 family: Life-or-death switch.
FEBS 466:6–10
- Turpin P, Hay RT, Dargemont C (1999)
Characterization of I κ B- α nuclear import pathway.
J Biol Chem 274:6804–6812
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM (1996)
Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF- κ B.
Science 274:787–789
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Verma IM, Green DR (1998)
Inhibition of TNF-induced apoptosis by NF- κ B.
Trends Cell Biol 8:107–111
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB (1997)
Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria.
Cell 28:627–637
- Vander Heiden MG, Thompson CB (1999)
Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?
Nat Cell Biol 1:209–216
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995)
Rel/NF- κ B/I- κ B family: intimate tales of association and dissociation.
Genes Dev 9:2723–2735
- Verma IM, Stevenson J (1997)
I- κ B kinase: Beginning, not the end.
Proc Natl Acad Sci USA 94:11758–11760
- Völkl A, Fahimi HD (1985)
Isolation and characterization of peroxisomes from the liver of normal untreated rats.
Eur J Biochem 149:257–265
- Wajant H, Scheurich P (2001)
Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling.
The Intern J of Biochem and Cell Biol 33:19–32
- Wallach D (1997)
Cell death induction by TNF: a matter of self control.
Trends Biochem Sci 22:107–109
- Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E, Beyaert R, Vandenabeele P, Fiers W (1997)
Cell death induction by receptors of the TNF family: towards a molecular understanding.
FEBS Letters 410:96–106
- Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP (1998)
Death inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict.
Curr Opin Immunol 10:279–288
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP (1999)
Tumor necrosis factor receptor and fas signaling mechanism.
Annu Rev Immunol 17:331–367
- Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. (1996)
TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF- κ B.
Science 274:784–787

- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. (1998)
NF- κ B antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.
Science 281:1680–1683
- Wang D, Baldwin AS Jr. (1998)
Activation of Nuclear Factor- κ B-dependent transcription by Tumor Necrosis Factor- α is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529.
J Biol Chem 273:29411–29416
- Wang X (2001)
The expanding role of mitochondria in apoptosis.
Genes Dev 15:2922–2933
- Weil R, Laurent-Winter C, Israël A (1997)
Regulation of I κ B β Degradation. SIMILARITIES TO AND DIFFERENCES FROM I κ B α .
J Biol Chem 272:9942–9949
- Whiteside ST, Epinat JC, Rice NR, Israel A (1997)
I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity.
EMBO J 17:1413–1426
- Wong GH, Goeddel DV (1988)
Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor.
Science 242:941–944
- Woronicz JD, Gao X, Cao Z, Rothe M, Goeddel DV (1997)
I κ B Kinase- β : NF-kappaB activation and complex formation with I κ B Kinase- α and NIK.
Science 278:866–8669
- Wyllie AH (1981)
Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis.
Cell Death and Biol, ed. Chapman&Hall 9:34.
- Wyllie AH (1997)
Apoptosis: an overview.
Br Med Bull 53:451–465
- Xu Y, Bialik S, Jones BE, Iimuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, Brenner DA, Czaja MJ (1998)
NF- κ B inactivation converts a hepatocyte cell line TNF- α response from proliferation to apoptosis.
Am J Physiol Cell Physiol 275:1058–1066
- Yamada Y, Kirillova I, Peschon JJ, Fausto N (1997)
Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A 94:1441–1446
- Yamazaki S, Muta T, Takeshige K (2001)
A novel I κ B protein, I κ B- ζ , induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates Nuclear Factor- κ B in the nuclei.
J Biol Chem 276:27657–27662
- Yuan J (1997)
Transducing signals of life and death.
Curr Opin Cell Biol 9:247–251
- Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G (1996)
Mitochondrial control of nuclear apoptosis.
J Exp Med 183:1533–1544
- Zamzami N, Kroemer G (2001)
The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens.
Nature Reviews Mol Cell Biol 2:67–71
- Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M (1997)
The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation.
Cell 91:243–252
- Zandi E, Chen Y, Karin M (1998)
Direct phosphorylation of IkappaB by IKK α and IKK β : Discrimination between free and NF- κ B-bound

- substrate.
Science 281:1360–1363
- Zhou Z, Hartwig E, Horvitz HR (2001)
CED-1 is a transmembrane receptor that mediates cell corpse engulfment in *C. elegans*.
Cell 104:43–56
- Zhuang J, Dinsdale D, Cohen GM (1998)
Apoptosis, in human monocytic THP.1 cells, results in the release of cytochrome c from mitochondria prior to their ultracondensation, formation of outer membrane discontinuities and reduction in inner membrane potential.
Cell Death Differ 5:953–962
- Zörnig M, Hueber A, Baum W, Evan G (2001)
Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.
Biochim Biophys Acta 1551:1–37
- Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X (1997)
Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.
Cell 90:405–413
- Zumbansen M, Stoffel W (1997)
Tumor Necrosis Factor α activates NF- κ B in acid sphingomyelinase-deficient mouse embryonic fibroblasts.
J Biol Chem 272:10904–10909
- Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF (1998)
Ischemia/Reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and Nuclear Factor κ B independently of I κ B Degradation.
Hepatology 28:1022–1030

9 Anhang

9.1 Laborgeräte

Im folgenden sind die Laborgeräte, Chemikalien und alle weiteren verwendeten Materialien alphabetisch geordnet unter Angabe der Bezugsquellen aufgeführt:

Analysenwaage	R 180 D, Sartorius, Göttingen
Autoklav	Varioklav Typ 400 E, H+P Labortechnik München
Diamantmesser	Diatome, Bienne, Schweiz
Einbettautomat	Histomatic™, Fischer, USA
Elektronenmikroskop	EM 301 G, Philips, Eindhoven, Niederlande
Elektrophoresekammern	LMS, Dossenheim
Elektrophorese-Netzgerät	3000Xi, Bio-Rad, München
Eppendor fzentrifuge	Eppendorf 5414, Hamburg
GlasgefäÙe	neolab Migge, Heidelberg
Hybridisierungsöfen	HB-1D, Techne, Princeton, NJ, USA
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Lichtmikroskope:	Leica DMLB, Leica, Nußloch Orthoplan, Leitz, Wetzlar
Magnetrührer	Heidolph, neoLab Migge, Heidelberg
Microslicer	DTK-100D, Dosaka EM Co, Kyoto, Japan
pH-Meter	E 500, Metrohm, Herisau, Schweiz
Photometer	Uvikon 810, Kontron, Neufahrn
Photo-Videokamera	Sony, Japan
Potter	Potter S, Braun, Melsungen
Probenkocher	DB-1, neolab Migge, Heidelberg
Reinstwasseranlage	Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA
Scanner	Arcus II, Agfa-Gevaert, N.V. Mortsel, Belgien
Schlitten-Mikrotom	Leica SM 2000 R, Leica, Nußloch
Schüttler	ST 5, Zipperer, Staufen
Semi-Dry Blotgerät	Trans-Blot SD, Bio-Rad, München

Spektrofluorophotometer	RF-5301 PC, Shimadzu, Kyoto, Japan
Ultramikrotom	Reichert-Jung Ultracut S, Leica AG, Wien
Ultrazentrifuge	L5-65B, Beckman Instruments, München
Vakuum Konzentrierer	Bachhofer, Reutlingen
Venenpunktionsbesteck	Braun, Melsungen
Vortex MS 1	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Waage	LC821, Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifugen:	
-Beckmann J2-HS	Beckmann Instruments, München
-Beckmann L5-65B Ultrazentrifuge	Beckmann Instruments, München
-Beckmann TJ-6 Zentrifuge	Beckmann Instruments, München
-Biofuge	28 RS, Heraeus, Osterode
-Eppendorf-Tischzentrifuge	5412, Eppendorf, Hamburg

9.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Bioprobe Systems, Kanada
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Azur II	Merck, Darmstadt
Blocking Serum	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Boraxlösung	Merck, Darmstadt
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva, Heidelberg
DAB	Sigma, Taufkirchen
ECL-Reagenzien	Amersham, Braunschweig
EDTA	Roth, Karlsruhe
Epon 812	Fluka, Buchs, Schweiz
-Epon-Härter DDSA	Fluka AG, Ulm
-Epon Härter MNA	Fluka AG, Ulm
-Beschleuniger DMP 30	Serva, Heidelberg
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Fluka, Neu-Ulm
Glutaraldehyd	Polysciences, Eppelheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe

Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	Braun, Melsungen
LR-White Harz	The London Resin Co. Ltd., Basingstoke, England
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylenblau	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
MOPS	Serva, Heidelberg
Mowiol 4.88	Polysciences, Eppelheim
NaCl	Merck, Darmstadt
Na-Hydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Na-Zitrat	Roth, Karlsruhe
N,N-Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
OsO ₄	Polysciences, Eppelheim
Paraformaldehyd	Aldrich, Deisenhofen
Pb(NO ₃) ₂	Merck, Darmstadt
PIPES	Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
PMSF	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Polyethylenglycol (PEG 20000)	Serva, Heidelberg
Propylenoxid	Merck, Darmstadt
Saccharose	Boehringer Mannheim, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Serva, Heidelberg
Titanoxisulfat	Riedel-de-Haen, Seelze
Trichloressigsäure	Riedel-de-Haen, Seelze
Triethanolaminhydrochlorid	Merck, Darmstadt
Tris	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Riedel-de-Haen, Seelze

Alle verwendete Chemikalien entsprachen p.A. Qualität.

9.3 Allgemeine Materialien

Altromin 1324 Standardfutter	Altromin GmbH, Lage
c/BALB-Mäuse	Charles River Laboratoires, Sulzfeld
D-19 Entwickler	Kodak-Pathe', Paris, Frankreich
ECL-System	NEN, Boston, MA, USA
Einmachhaut	Ostmann, Bielefeld
Fixogum	Marabu, Tamm
Gel-Blotting Papier GB003	Schleicher&Schuell, Dassel
Immobilon-P Membran	Millipore, Bedford, MA, USA
Molekulargewichtsstandards	Bio-Rad, München
Nitrozellulosemembran	Sartorius, Göttingen
Nylonmembran	Qiabrane, Qiagen, Hilden
Paraplast plus	Sherwood Medical Co., St. Louis, USA
Röntgenfilm Kodak X-OMAT	Foto Hengstler, Heidelberg
Röntgenfilm BioMax MR-1	Kodak, Rochester, N.Y., USA
Trägernetze (Grids)	Polysciences, Eppelheim
Zentrifugenröhrchen	Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA

3.1.5 Fotomaterial

Lichtmikroskopie:

Ektachrome 64T	Kodak, Rochester, N.Y., USA
----------------	-----------------------------

Elektronenmikroskopie:

Electron microscope film 4489	Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA
-------------------------------	-------------------------------------

Publikationsliste

Aus dieser Studie hervorgegangene Publikationen:

Originalarbeiten:

Tapalaga D, Tiegs G, Angermüller S (2002)

NF- κ B and Caspase-3 activity in apoptotic hepatocytes of galactosamine-sensitized mice treated with TNF- α .

J Histochem & Cytochem 50(12):1599-1609.

Poster:

Tapalaga D, Tiegs G, Angermüller S (2000)

Translokation von NF- κ B und I- κ B α in Hepatocyten Galaktosamin/TNF- α behandelte Mäuse. Eine immunhistochemische und biochemische Studie.

Verhandlungen der anatomischen Gesellschaft in Münster Abstr. S.297 (2000). 50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie (DGZ) in Würzburg, 25.-27.9.2000.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sabine Angermüller für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu betreuen, für das Überlassen des Themas, sowie für die stimulierenden Diskussionen. Bei Herrn Prof. Dr. Franz Hartig bedanke ich mich herzlich für die Vertretung der Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen und für die gründliche Durchsicht. Herrn Prof. Dr. Dr. Alfred Völkl danke ich für die stetige Gesprächsbereitschaft und für wertvolle Ratschläge. Herrn Prof. Dr. H. Dariush Fahimi danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit im Institut für Anatomie und Zellbiologie II der Universität Heidelberg.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei:

- Frau Prof. Dr. Ingrid Essigmann für die Vermittlung dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Meinolf Thiemann für seine Unterstützung bei den biochemischen Untersuchungen, für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit, sowie für anregende Diskussionen und gutes Miteinander.
- Herrn Uwe Böhm für die Einführung in das Programm InDesign und seine Hilfe beim Layout dieser Arbeit.
- Herrn Dr. Arno Schad für die Unterstützung bei diversen Computerprogrammen.
- Frau Annette Stradtman für die Anfertigung von Gewebeschnitten und deren Vorbereitung für die Licht- und Elektronenmikroskopie.
- Herrn Heribert Mohr für die Einführung in biochemische Methoden.
- Frau Annemarie Achten für ihre Hilfe bei organisatorischen Fragen.
- Meiner Frau für ihre stete Unterstützung und Geduld.
- Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt gilt allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Anatomie und Zellbiologie II mein Dank für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.