

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom- Biologin Haristi Gaitantzi

aus Mannheim

Tag der mündlichen Prüfung: 01.07.2014

T h e m a

Untersuchungen zum Alkoholbedingten Leberschaden:

Rolle von Lipopolysacchariden (LPS) *in vivo*
und *transforming-growth-factor- β* (TGF- β) *in vitro*

Gutachter: Prof. Dr. Stefan Wölfel

Prof. Dr. Steven Dooley

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt in hohem Maße Frau PD Dr. Breitkopf – Heinlein, die mir stets mit großer Geduld, zahlreichen Tipps und hilfreichen Hinweisen sowohl im praktischen als auch beim Zusammenschreiben der Dissertationsschrift stets zur Seite stand und mich in den richtigen Momenten zu motivieren wusste – kurz für eine exzellente Betreuung!

Danken möchte ich herzlich meinem Erstgutachter Herrn Prof. Dr. Stefan Wöfl für die wohlwollende Begleitung meines Promotionsverfahrens sowie Herrn Prof. Dr. Steven Dooley für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens und die Überlassung meines Arbeitsplatzes.

Weiterhin danke ich der Arbeitsgruppe Dooley für das angenehme Arbeitsklima. Dabei möchte ich Frau Alexandra Müller für die freundliche Unterstützung in allen Bereichen des Laboralltags hervorheben.

Weiter möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Spannagel für die Überlassung der Alkoholdampfkammern am Zentralinstitut für seelische Gesundheit (ZI) bedanken und bei Herrn Fernando Leonardi-Essmann für die freundliche Einarbeitung an den Alkoholdampfkammern sowie Frau Nadja Waldi für die Betreuung der Tiere am ZI.

Die folgende Arbeit wurde dankenswerterweise durch ERAB (European Research Advisory Board) gefördert.

Einen besonderen Dank an Herrn Thomas Berau für das bereitwillige Korrekturlesen und die großzügige Unterstützung vor allem in den letzten Phasen der Dissertation.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Nikolaos und Angeliki Gaitantzis für ihr vorbehaltloses Vertrauen danken.

Untersuchungen zum Alkoholbedingten Leberschaden: Rolle von Lipopolysacchariden (LPS) *in vivo* und transforming-growth-factor- β (TGF- β) *in vitro*

Chronischer Alkoholmissbrauch führt häufig zur Fibrose der Leber, die bei andauernder Schädigung zu einer Zirrhose und schließlich zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) führen kann. Um den alkoholbedingten Leberschaden zu untersuchen wurde *in vivo* die Rolle von LPS in Mäusen mit vorgeschädigter Leber (MDR – 2 KO) und *in vitro* die Rolle von TGF- β auf primäre Maushepatozyten in Kultur, erforscht.

In Alkohol-Dampfkammern wurden MDR – 2 knock out Mäuse (negativ für den Gallensäuretransporter MDR – 2) mit den entsprechenden Kontrollstämmen (Balb-c) 8 Wochen lang jeweils 5 Stunden täglich mit Alkohol bedampft. Da mit dieser Methode die Darmpassage des Alkohols und damit die erhöhte Endotoxinproduktion ausbleibt, wurde eine Gruppe MDR 2 KO- und Kontrolltiere mit LPS (Lipopolysaccharid/ i.p Injektion) und Alkohol behandelt. Die resultierenden Serumwerte für ALT und AST zeigten keine signifikanten Veränderungen nach LPS – Injektion oder Alkoholbedampfung. Die ALP Aktivität stieg jedoch nach Alkoholexposition bei den gesunden Tieren an. In den vorgeschädigten Lebern der MDR – 2 KO Mäusen führte LPS alleine, Alkohol alleine und die Kombination der beiden Substanzen, mit einigen Schwankungen zu erhöhten Serumwerten. Eine Hepatomegalie bekamen die MDR 2 KO Mäuse, die mit Alkohol und bei den Wildtyp Mäusen diejenigen, die mit Alkohol und LPS behandelt wurden.

Nach quantitativer Auswertung von Sirius Rot Färbungen aller Mäuse im Versuch wurde sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den MDR 2 KO – Tieren durch LPS Gabe eine leichte Erhöhung der Kollagenablagerung in der Leber beobachtet, die bereits durch Alkohol alleine verstärkt wurde und sich bei den Wildtypen durch beide Substanzen zusammen erhöhte. Bei den MDR 2 KO Mäusen mit Alkohol zeigte die zusätzliche LPS-Gabe keine weitere Erhöhung. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Kollagenablagerung bei den Wildtyptieren perisinusoidal und perizentral auftrat, wobei sie bei den MDR 2 KO Mäusen eher periportal zu sehen war. Somit konnte *in vivo* die Rolle von LPS und Ethanol getrennt voneinander und die Wirkung von beiden Substanzen zusammen untersucht werden. Bei einer leichten Vorschädigung der Leber erhöhte sich der Schaden durch beide Substanzen zusammen, wobei weder der Alkohol noch LPS alleine zu einem deutlichen Schaden führte.

Das pro-fibrogene Zytokin TGF- β ist im Serum von Patienten mit alkoholischer Lebererkrankung stark erhöht und die TGF- β Signalwege sind in fibrotischen Arealen der Lebern solcher Patienten verstärkt aktiv.

Ethanol und TGF- β zeigten *in vitro* auf primäre Maushepatozyten einen Dosis-abhängigen zytotoxischen Effekt, wobei durch beide Substanzen zusammen die Zellen durch Aktivierung von Caspase 3 und Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, in Apoptose gingen. Ethanol reduzierte die basale Aktivität von Akt, induzierte den TGF- β Rezeptor II und PTEN. Nach Inhibierung des TGF- β Rezeptor I durch SB431542 wurde auch die Caspase 3 Aktivität reduziert, was auf eine Smad-abhängige Apoptose-Induktion hindeutet. Die Hemmung der PI3K Aktivität durch LY294002 verstärkte die Apoptose wobei die Inhibierung von GSK3 sie verminderte. Antiapoptotisches Bcl2 wurde durch Ethanol herunterreguliert was offenbar zur pro-apoptischen Wirkung von TGF- β beitrug. Zusammenfassend induzierte TGF- β *in vitro* zunächst „survival“-Signalwege, in Kombination mit Alkohol wurde jedoch verstärkt der programmierte Zelltod eingeleitet. Weder Ethanol noch TGF- β alleine führte die Zellen in Apoptose, was mit den *in vivo* Ergebnissen korreliert, dass Alkohol alleine unter „gesunden“ Grundbedingungen und in begrenzten Mengen meistens zu keinem massiven Schaden führt, dass Alkohol aber in Kombination mit mindestens einer weiteren schädigenden Noxe deutlich mehr Zelltod und somit Organschaden bewirkt.

Studies on alcohol – mediated liver damage: The role of lipopolysaccharides (LPS) *in vivo* and transforming-growth-factor- β (TGF- β) *in vitro*

Chronic alcohol abuse often leads to liver fibrosis, which can accelerate to cirrhosis and finally to hepatocellular carcinoma (HCC).

To investigate the alcohol-mediated liver damage, we analyzed the role of LPS in mice with predamaged liver (MDR - 2 KO's) *in vivo* and the role of TGF- β on primary mouse hepatocytes in culture *in vitro*.

MDR - 2 knock out mice (negative for the bile acid transporter MDR - 2) and the corresponding wildtype mice (Balb-c) were intoxicated with alcohol in alcohol vapor chambers, 5 hours per day for 8 weeks. Since this method avoided the intestinal passage and thereby leakage of bacterial endotoxin LPS (Lipopolysaccharid) from the gut into the blood stream, some animals of both groups were additionally treated with LPS (i.p. injections).

The results showed that in healthy animals serum levels of liver damage (ALT, AST, ALP) are not significantly changed by any of the treatments except for moderately increased levels of ALP caused by ethanol alone. In the pre-damaged livers of MDR - 2 KO mice, LPS alone, alcohol alone and the combination of the two substances together, led with some fluctuations, to increased serum levels in these animals. A hepatomegaly was observed in MDR - 2 KO mice which were treated with alcohol and wildtype mice which were treated with alcohol and LPS.

Quantitative analyses of Sirius red stainings showed a mild increase of fibrotic areas in all groups (wildtype - and MDR 2 knockout mice) after treatment with LPS, which was also elevated by ethanol alone and reached a higher level with both substances together in wildtype animals. In the MDR 2 KO mice with alcohol the additional LPS administration showed no further increase. In addition, it was observed that the collagen deposition in wildtype mice occurred perisinusoidal and pericentral, whereas in MDR 2 knockout mice it was observed rather in periportal areas. Thus, the role of LPS and ethanol separately and the effect of the two substances together was examined *in vivo*. With some pre-damage of the liver (increasing cholestasis on the KO mice), both substances together led to higher damage, which couldn't be achieved neither by alcohol nor by LPS alone.

The pro-fibrogenic cytokine TGF- β is elevated in the serum of patients with alcoholic liver disease and the TGF- β signaling pathway is activated in fibrotic areas of the livers in these patients. Ethanol and TGF- β showed *in vitro* a dose-dependent cytotoxic effect on primary mouse hepatocytes, while both substances together led to massive apoptosis as documented by activation of caspase 3 and cytochrome c release from the mitochondria.

Ethanol reduced the basal activity of Akt and induced expression of the TGF- β receptor II and PTEN. After inhibition of TGF- β receptor I by SB431542 the caspase 3 activity was also inhibited, which suggested a Smad-dependent mechanism of apoptosis induction.

Inhibition of PI3K activity by LY294002 increased apoptosis and inhibition of GSK3 reduced it. Anti-apoptotic Bcl 2 was downregulated by ethanol possibly supporting the pro-apoptotic effect of TGF- β . In summary, TGF- β first induced "survival" pathways but with pre-damage due to alcohol its effects switched to induction of programmed cell death.

Neither ethanol nor TGF- β alone caused strong apoptosis, which correlates with the *in vivo* results that alcohol alone under otherwise "healthy" conditions and within a certain dosage does not lead to massive damage. In combination with at least one additional noxe the effects of alcohol are significantly enhanced *in vivo* as well as *in vitro*.

Den Menschen gewidmet, die ich am meisten bewundere.

*Freunde, deren Liebe mich gewärmt hat,
Mentoren, deren Klugheit mich geleitet hat,
Ermutiger, deren Worte mich bestärkt haben,*

meinen Eltern.

A	Arteria
Abb	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALK	activin receptor – like kinase
ALP (AP)	Alkalische Phosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AMH	Anti Müllerian Hormon
AST	Aspartat-Aminotransferase
Bad	Bcl-2-Antagonist of Cell Death
bp	Basenpaare
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BMPs	bone morphogenetic proteins
BSA	bovine serum albumin
Bsep	bile salt export pump
Casp	Caspase
CES	Camurati-Engelmann-Syndrom
CREB	cAMP-responsive-element-binding-protein
CTGF	Connective tissue growth factor
CytC	Cytochrome C
d	day
DD	death domain
DED	death effector domain
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
4E-BP	Eukaryotischer-Translations-Initiations-Faktor- bindendes Protein
eNOS	Endotheliale-Stickoxid-Synthase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fetal calf serum
FKHR	Forkhead-Transkriptionsfaktoren

g	gramm
GDF	growth and differentiation factors
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
GS	Gallensäuren
GSK3	Glycogen-Synthase-Kinase-3
h	hour
HC	hepatocyte
HSC	hepatic stellate cell
IKK	I κ B-Kinase
kDA	kilo Dalton
KO	knock out
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen – aktivierte – Proteinkinase
MDR	multi drug resistance protein
MEOS	mikrosomale Ethanol-oxidierende System
mHC	mouse Hepatocyte
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
Mrp2	multi drug resistance –associated protein2
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF κ B	Kernfaktor κ B
Ntcp	Na ⁺ - taurocholate cotransporting polypeptide
OA	organische Anione
Oat	organic anion transporting polypeptides
PCR	polymerase chain reaction
PDK	Phosphatidylinositol-depent-kinase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat

PKB	Proteinkinase B
PtdIns	Phosphoinoside
PTEN	Phosphatase und Tensin-homologes
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
Smad	Sma von <i>Caenorhabditis elegans</i> <u>s</u> mall genes 2/3/4 und Mad von <i>Drosophila melanogaster</i> <u>M</u> others <u>a</u> gainst <u>d</u> ecapentaplegic
Tab	Tabelle
TGF- β	Transforming-growth-factor- β
TNF-RI	TNF-Rezeptor-DD-assoziierte Protein
TRADD	Tumornekrosefaktor-Rezeptor I
V	Vena
WHO	World health organization

INHALT

<i>Abkürzungen</i>	v
1. EINLEITUNG	
1.1. Die Leber.....	1
1.1.1 Anatomie und Funktion.....	2
1.1.2 Leberenzyme – Leberwerte.....	8
1.1.3 Hepatitis – Leberfibrose – Zirrhose	10
1.2 Alkohol.....	13
1.2.1 Ethanol/ROS/LPS.....	15
1.3 Versuchstiere –	
1.3.1 MDR 2 knock out - Mäuse.....	18
1.4 Vapor chamber	20
1.4.1 Funktionsweise der Alkohol-Dampfkammer-Apparat.....	20
1.5 TGF- β	22
1.6 Apoptose.....	25
1.6.1 Initiationsphase – Extrinsischer Weg.....	26
1.6.2 Initiationsphase – Intrinsischer Weg.....	28
1.6.3 Effektorphase – Caspase – Kaskade.....	29
1.7 PI3K – Akt – Signalweg.....	30
1.8 Zielsetzung.....	33
2. MATERIAL UND METHODEN	
<i>In vivo Experimente</i>	
2.1 Wiegen der Mäuse und LPS-Gabe.....	34
2.2 Blutentnahme aus der <i>Vena Saphena</i>	34
2.3 Alkoholkonzentrationsbestimmung im Serum.....	36
2.4 Asservierung der Leber und Blutentnahme aus dem Auge.....	38
2.5 Bestimmung der Leberwerte.....	40
2.6 Leberhistologie.....	41
2.7 Sirius Rot Färbung.....	42

<i>In vitro Experimente</i>	
2.8 Isolation von Maushepatozyten.....	42
2.9 Kultur von Maushepatozyten auf Kollagen beschichtung.....	44
2.9.1 Ausplattieren der Hepatozyten.....	44
2.9.2 Kultivierung der Hepatozyten.....	45
2.10 Ethanol- und TGF- β -Behandlung auf Maushepatozyten.....	45
2.11 RNA Isolation.....	47
2.11.1 RNA Lysate	47
2.11.2 RNA Agarosegel.....	48
2.12 Umschreiben von RNA in cDNA.....	50
2.13 PCR (Polymerase Kettenreaktion).....	51
2.14 Real time PCR.....	52
2.15 Westernblot.....	54
2.16 LDH – Assay.....	56
2.17 Apoptose – Assay.....	56
2.18 CAGA – Assay.....	58
2.19 Mitochondrien – Isolation.....	59
3. ERGEBNISSE	
<i>In vivo Experimente</i>	60
3.1 Blut-Alkoholkonzentrationen.....	61
3.2 Veränderung des Körpergewichts.....	62
3.3 Das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht.....	64
3.4 Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von ALT, AST und ALP im Serum.....	65
3.5 Der <i>De-Ritis-Quotient</i>	73
3.6 Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von anderen Lebermarkern im Serum.....	74
3.7 Sirius Rot Färbungen.....	74
3.7.1 Quantitative Auswertung.....	82
3.7.2 Zusammenfassung aller Tiere.....	86

In vitro Experimente

3.8	Dosis-abhängiger zytotoxischer Effekt von Ethanol und TGF- β	87
3.9	Ethanol und TGF- β zusammen führten zu einer deutlichen Erhöhung des Zelltodes.....	88
3.10	Morphologie von Maushepatozyten nach 48 Stunden Ethanol-/TGF- β Stimulation.....	88
3.11	Bestimmung der Apoptose.....	89
3.12	Ethanol und TGF- β führten zur Superinduktion des Profibrogenen Mediators CTGF (<i>Connective tissue growth factor</i>).....	90
3.13	Expression von TGF- β Rezeptoren.....	91
3.14	Verstärkte Smad-Phosphorylierung durch Alkohol.....	93
3.15	Phosphorylierung von Akt nach Ethanol und TGF- β Behandlung.....	94
3.16	Die Inhibierung von PI3K/Akt durch LY 294002 führte, wie Ethanol zu verstärkter Apoptose.....	95
3.17	Die Inhibierung von GSK3 führte zu einer Hemmung der Apoptoseinduktion.....	96
3.18	Induktion des Akt-Inhibitors PTEN durch Alkohol.....	97
3.19	Cytochrom C Freisetzung ins Zytoplasma durch Schädigung der Mitochondrien	98
3.20	Antiapoptotische Bcl2 Expression.....	99
3.21	Smad-abhängige Apoptose Induktion.....	100

4. DISKUSSION***In vivo Experimente***

4.1	Veränderung des Körpergewichts.....	102
4.2	Das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht.....	103
4.3	Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von ALT, AST und ALP im Serum.....	104
4.4	Der <i>De-Ritis-Quotient</i>	106
4.5	Sirius Rot Färbungen und Quantitative Auswertung.....	107

In vitro Experimente

4.6 Die Zytotoxizität bei Maushepatozyten nach Ethanol - /TGF- β – Behandlung.....	109
4.7 Ethanol und TGF- β führten zur Superinduktion des Profibrogenen Mediators CTGF (<i>Connective tissue growth factor</i>).....	110
4.8 Expression von TGF- β Rezeptoren / Verstärkte Smad-Phosphorylierung durch Alkoholvorbehandlung/ Smad-abhängige Apoptoseinduktion.....	111
4.9 PI3K/ Akt/ PTEN/ GSK3.....	112
4.10 Cytochrom C Freisetzung durch Schädigung der Mitochondrien.....	113
4.11 Antiapoptotische Bcl2 Abgabe.....	113
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	114
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	116

*Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.*

Aristoteles (384 – 322 v. Chr.)

1. Einleitung

1.1 Die Leber

„Wer schaffen will muss fröhlich sein“ (Theodor Fontane / 1819-1898)

Die Leber war bereits bei den Menschen der Urzeit als mächtigstes und blutreichstes Organ des tierischen Körpers bekannt und wurde sogar als „Sitz des Lebens“ bezeichnet.

Für Priester und Wahrsager bekam sie eine große mantisch-religiöse Bedeutung, so dass bei den Babyloniern und Assyrern die „Eingeweideschau“, die in Wirklichkeit eine Leberschau darstellte, die wichtigste Methode der Schicksalsbefragung war. Das wohl älteste Modell einer aus Ton gefertigten Schafsleber stammt aus einem babylonischen Tempel aus der Zeit um 2000 v. Chr. Die Kunst der Hepatoskopie, die von Mesopotamien zu den Griechen gelangte und bis zum Ende des römischen Reiches reichte, wurde nicht nur bei allen staatlichen Entscheidungen vorgenommen, sondern sollte auch bei wichtigen Persönlichkeiten medizinische Prognosen stellen oder Lebensereignisse vorhersagen.

In der spekulativen Medizin (um 1550 v. Chr.) wurde die Leber als der Sitz des Gemütslebens beschrieben, wie etwa der Sitz der Affekte, der Gefühle, der Begierden und der sexuellen Kraft (Babylonier). Die medizinischen Vorstellungen der Griechen über die Leber waren stark vom Mythos geprägt. So berichteten *Hesiod* (8 Jh. v. Chr.) und *Äschylus* (525 – 456 v. Chr.) von dem durch die Götter an den Kaukasus geschmiedeten *Prometheus*: als Strafe dafür, dass er den Menschen das Feuer zurückgebracht hatte, fraß ihm alle ein bis zwei Tage ein Adler die ständig nachwachsende Leber - womit erstmals die Tatsache der Leberregeneration angenommen wird.

Die Lage der Leber im rechten Oberbauch sowie ihre enge Beziehung zum Zwerchfell wurde bei *Homer* beschrieben, wobei ein Stich in die Leber als tödliche Verletzung angesehen wurde.

Aristoteles von Stageiros (384 – 322 v. Chr.) hat erstmals die extrahepatischen Gallengänge beschrieben und unterschied Arterien und Venen mit ihren intrahepatischen offenen Gefäßenden und differenzierte innerhalb des venösen Systems die Pfortader. Er sah die Leber zusammen mit der Lunge als komplementierende Exkretionsorgane des Körpers an.

Erasistratos von Keos (300 – 250 v. Chr.) prägte für das Lebergewebe den Begriff „*parenchyma*“ (das „Danebengegossene“), da es sich durch Gerinnung des aus den Gefäßen austretenden Blutes bilde, und beschreibt erstmals den „*choledochos*“, der die vermeintlich nutzlose, eher schädliche Galle aufnehme und ableite.

In der römischen Medizin erklärt *Celsus* (etwa 30 v. Chr – 50 n.Chr.) unter anderem, dass die Leberchirurgie wegen des Blutraichtums der Leber mit dem Glühmesser durchgeführt werden müsse. *Plinius d. Ältere* (23/24 – 79 n.Chr) empfahl die Behandlung von Leberleiden mittels Wolfsleber und Honig oder Eselsleber mit Petersilie und Honig, *Caelius Aurelianus* (5 Jh. N. Chr.) mittels Kataplasmen und Laxantien. *Rufus von Ephesus* (1 – 2. Jh n. Chr.), der Pfortadersystem, Venen und Arterien der Leber unterschied nannte die Gelbsucht „*ikteros*“, abgeleitet von dem gelben Vogel (Goldamsel), dessen Anblick dem Gelbsüchtigen Heilung, dem Vogel jedoch den Tod bringe.

Mit *Paracelsus* (1493 – 1541) beginnt das Zeitalter der Iatrochemie und sieht die Leber als den Ort chemisch – stofflicher Umsetzung.

Für die Erklärung der Stoffwechselfvorgänge gewinnt nun die Galle eine immer größere Bedeutung (*J.B von Helmont*, 1579 – 1644).

Den wohl bedeutsamsten Markstein der Leberforschung bildete die 1764 von *A. von Haller* (1708 – 1777) vorgelegte „*Elementa physiologiae corporis humani*“. In dieser gewaltigen Enzyklopädie entstand ein umfassendes Bild der für das 18. Jahrhundert gültigen Hepatologie (6. Band), die sich als unentbehrliche Grundlage für die weitere Leberforschung der Neuzeit erweisen sollte.

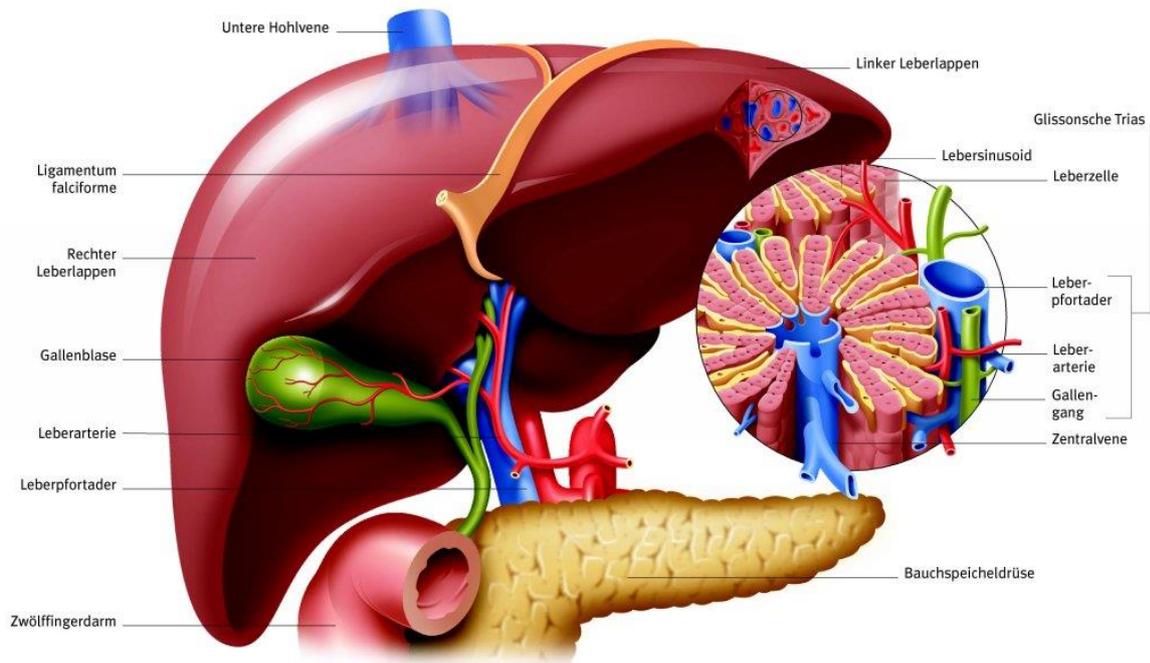
In den folgenden Jahren haben eine Reihe wichtiger Erkenntnisse die Hepatologie wesentlich bereichert. Die Leber wurde als „chemisches Labor“ und als „Zentrum des intermediären Stoffwechsels“ erkannt.

So wurde 1837 die Leberzelle durch *J.E Purkinje* sowie durch *J. Henle* (1838) und *F. Dujardin*, wahrscheinlich aber schon früher durch *M. H. Dutrochet* (1824), entdeckt.

1869 beschreibt *E. Ponfick* erstmals die Kupffer’schen Zellen und ihre Phagozytose-Fähigkeit, über die 1874 von *J. Peszke* und 1876 von *K.W. Kupffer* ausführlicher berichtet wurde. Die 1864 (*MacGillavry*) vermuteten „Disse’schen Räume“ werden 1890 durch *J. Disse* als perivaskuläre Lymphgefäße nachgewiesen [1].

1.1.1 Anatomie und Funktion

Die Leber (*Hepar*) (Abb. 1) ist mit einem Gewicht von 1,4 bis 1,8 Kilo das zentrale und schwerste Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Zu ihren Aufgaben gehört die nahrungsabhängige Speicherung, Umwandlung und Freisetzung von Zuckern und Fetten, der Abbau und die Ausscheidung körpereigener und fremder Giftstoffe, die Bildung der meisten Bluteiweiße und der Gallenflüssigkeit sowie zahlreiche weitere Aufgaben (siehe Tab. 1).



www.bertelsmann-bkk.de/fileadmin/Redakteure/Bilder/gesundheitslexikon/524970.jpg

Abbildung.1: Die Leber

Schematische Darstellung der humanen Leber. Beschreibung siehe Text.

Die humane Leber ist ein weiches, ziemlich gleichmäßig strukturiertes Organ, das im rechten Oberbauch liegt. Makroskopisch lässt sich die Leber in 4 verschiedene Lappen (*Lobi*) unterteilen: *Lobus hepatis dexter* (rechter Leberlappen, der unter dem Zwerchfell liegt und mit diesem teilweise verwachsen ist), *Lobus hepatis sinister* (der größere linke Leberlappen, der bis in den Oberbauch reicht). Von dorsocaudal betrachtet liegt ventral der *Lobus quadratus* und dorsal der *Lobus caudatus*.

An der Unterseite der Leber liegt die Leberpforte (*Porta hepatis*), über die die Pfortader und Leberarterie in die Leber eintreten und die extrahepatischen Gallengänge sie verlassen. Die *Leberläppchen* sind kleine morphologische Struktureinheiten des Lebergewebes und bestehen hauptsächlich aus Hepatozyten. Jeweils drei Leberläppchen begrenzen eine kleine Bindegewebszone, die man als *Periportalfeld* bezeichnet. Sie hat im histologischen Schnitt etwa die Form eines Dreiecks und enthält die so genannte *Glisson-Trias*, die aus dem *Ductus biliferus* (Gallengang), der *Arterie interlobularis* (Ast der Leberarterie) und der *Vena interlobularis* (Ast der Pfortader) besteht (siehe Abb. 2). Die Mitte jedes *Leberläppchens* bildet eine *Zentralvene*. Um sie herum sind radiär Reihen von *Hepatozyten* angeordnet, die sich als große Zellen mit einem runden Zellkern und deutlichem *Nukleolus* darstellen. Aufgrund ihrer linearen Anordnung spricht man auch von *Leberzellbalken* bzw. *-bälkchen*.

Zwischen den *Leberzellbalken* befinden sich erweiterte KapillargefäÙe, die *Lebersinusoiden*. In ihnen mischt sich das arterielle Blut der *Leberarterie* mit dem venösen Blut der *Pfortader* und fließt in Richtung der Zentralvene.

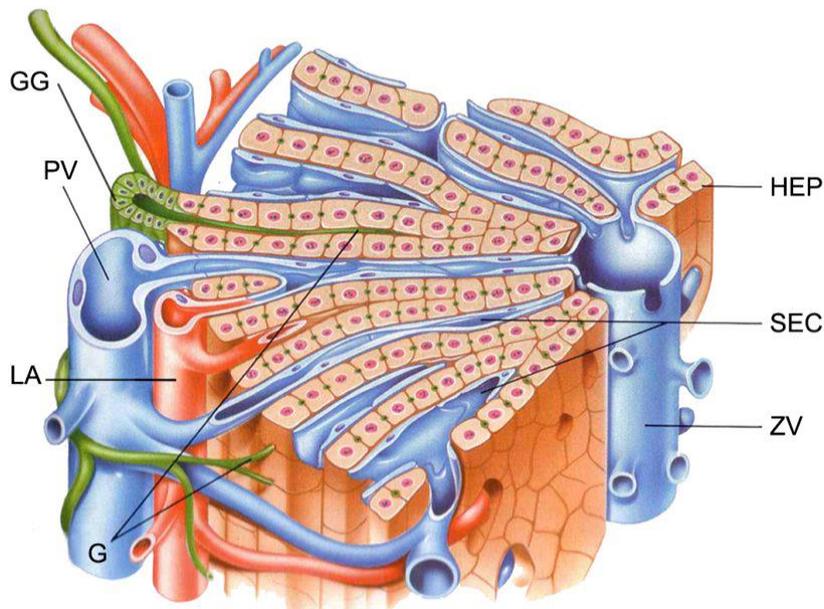


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Leberläppchens (*lobus hepatici*)

HEP: Hepatozyten, ZV: Zentralvene, G: Gallencanaliculi, LA: Leberarterie, PV: Portalvene, GG: Gallengang.

Im Portalfeld (links) verlaufen Äste der Portalvene (PV), Leberarterie (LA) und des Gallengangs (GG) (portale Triade). Die Zentralvene (ZV) stellt das Zentrum eines *lobules* dar. Sinusoide verbinden PV und LA mit der ZV [2].

Strukturell und histologisch lässt sich die Leber in 4 gewebliche Systeme einteilen:

- (1) das intrahepatische Gefäßsystem (A. hepatica, V. portae, V. hepatica, Gallengangssystem, LymphgefäÙe)
- (2) das Stroma (Leberkapsel, Perivaskuläres Bindegewebe, Glisson'sche Portalfelder, retikuläres Netzwerk)
- (3) die sinusoidalen Zellen (Sinusendothelzellen, Kupffer-Zellen, Ito-Zellen [auch: hepatische Sternzellen], PIT-Zellen)
- (4) die Hepatozyten [3]

Das *intrahepatische Gefäßsystem* geht aus der *Vena portae* und *Arteria hepatica propria* hervor, die ihr Blut den *Lebersinusoiden* zuführen, die von gemischtem Blut durchströmt werden und aus denen die der Leber über das Blut zugeführten Inhaltsstoffe zu den

Hepatozyten gelangen. Die von den Hepatozyten sezernierte Galle gelangt in Gallenkanälchen, die als Gallenkapillaren zwischen den Hepatozyten beginnen und sich als Gallenwege fortsetzen.

Die *Vena portae hepatis* (Pfortader) führt Blut mit resorbierten Nährstoffen aus den Kapillargebieten aller unpaaren Bauchorgane (Magen, Darm, Milz), wobei die *Arteria hepatica propria* sauerstoffreiches Blut aus dem *Truncus coeliacus* (Bauchhöhlenstamm), der von der *Aorta abdominalis* gespeist wird, führt [3].

Die *Leberkapsel* ist die derbe, bindegewebige Außenhülle der Leber, die das Leberparenchym umschließt [4].

Die *Lebersinusoiden* besitzen ein weiteres Lumen als die Blutkapillaren und weisen eine diskontinuierliche Endothelauskleidung auf, die sie von den Hepatozyten bzw. vom Disse'schen Raum abgrenzt. Die Poren zwischen den platten Endothelzellen sind nicht von einer Basallamina verschlossen, so dass auch größere Molekülkomplexe (z.B. Chylomikronen) das Endothel passieren können. Im Endothelverband befinden sich in das Lumen der Sinus hineinragende *Kupffer-Zellen*, antigenpräsentierende Makrophagen, die Fremdkörper speichern und alte und geschädigte Erythrozyten abbauen können. Die Kupffer-Zellen sind der monozytären Zelllinie zuzuordnen, können sich abrunden, aus dem Epithelverband lösen und mit dem Blutstrom die Leber verlassen. Ferner kommen intravasal leberspezifische Lymphozyten vor, die an den Wandzellen haften und dort bis zu zwei Wochen verweilen können. Es handelt sich um natürliche Killerzellen, die als *PIT-Zellen* bezeichnet werden. PIT-Zellen sind spezialisierte Lymphozyten, die im Disse'schen Raum des Lebergewebes zu finden sind. Zusammen mit den *Ito-Zellen* oder *hepatischen Sternzellen*, wie sie noch genannt werden, gehören sie zu den nicht – parenchymatösen Zellen des Lebergewebes. Die hepatischen Sternzellen sind Perizyten, in deren Zytoplasma sich zahlreiche Fetttropfen finden, in denen Vitamin A gespeichert wird. Sie sind darüber hinaus an der Synthese der extrazellulären Matrix beteiligt. Sie können sich zu Myofibroblasten differenzieren und synthetisieren dann Kollagen Typ I, welches für das Gerüst von retikulären Fasern verwendet wird, das den Disse'schen Raum durchzieht [4].

Die *Hepatozyten*, auch Leberzellen genannt (Abb. 3 und 4), haben eine Grösse von etwa 20 bis 30 μm und nehmen etwa 80% des Lebervolumens ein. Sie entstammen dem Entoderm der Darmanlage, sind metabolisch stark aktiv und enthalten zahlreiche Zellorganellen wie diploide bis polyploide Zellkerne, Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen, Endoplasmatisches Retikulum (ER), Glykogenfelder, einen stark entwickelten Golgi-Apparat, sekretorische Vesikel und ein gut entwickeltes Zytoskelett.

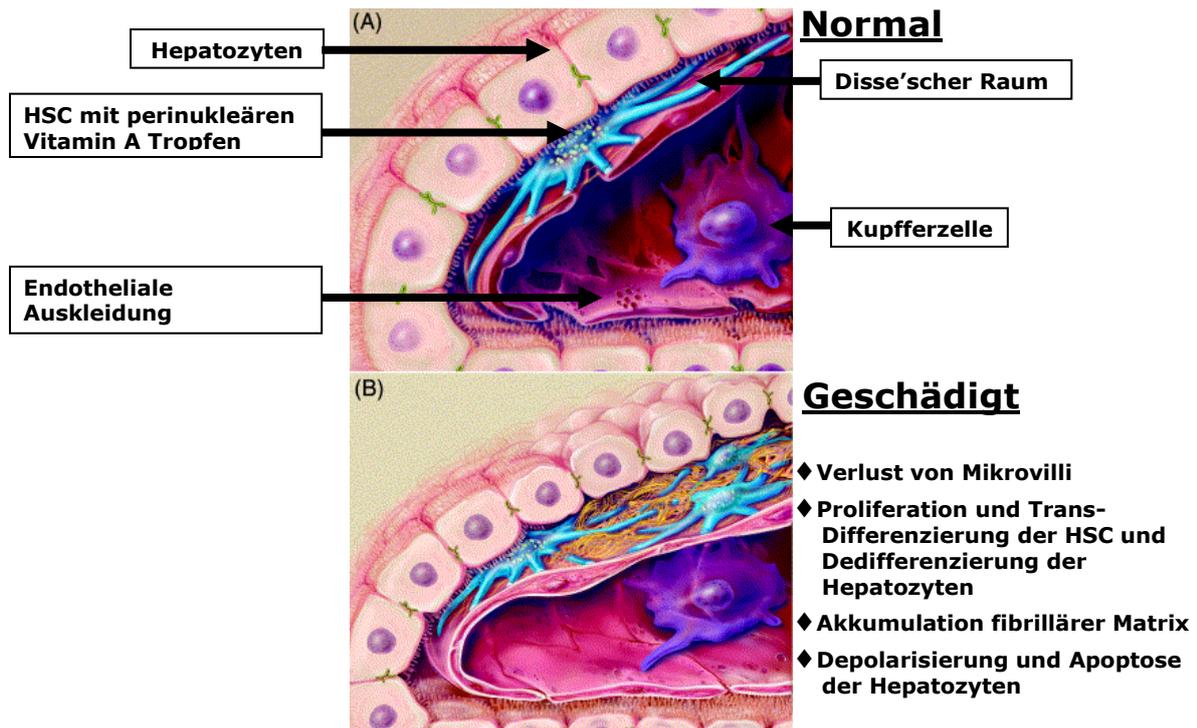


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Leberzellen im Verband

Veränderungen der Zellen und Funktionen in der geschädigten im Vergleich zur gesunden Leber. HSC: Hepatische Sternzellen [5].

Sie sind wie alle Epithelzellen polarisiert, besitzen eine *basolaterale* (sinusoidale) und eine *apikale* (kanalikuläre) Membran. Die schmale *apikale Membrandomäne* bildet mit jeweils einer Nachbarzelle ein Gallenkanälchen (*Canaliculus bilifer*). Sie trägt zahlreiche Mikrovilli und sezerniert Gallenflüssigkeit. Die breite *basolaterale Membrandomäne* grenzt an den Disse'schen Raum bzw. die Lebersinusoide und ist für den Austausch von Substanzen zwischen Blut und Hepatozyten verantwortlich. Sie besitzt ebenfalls viele Mikrovilli und keine Basallamina. Die Hepatozyten stehen untereinander durch Zell-Zellkontakte (*tight junctions, Desmosomen, Gap junctions*) in Verbindung (Abb. 4).

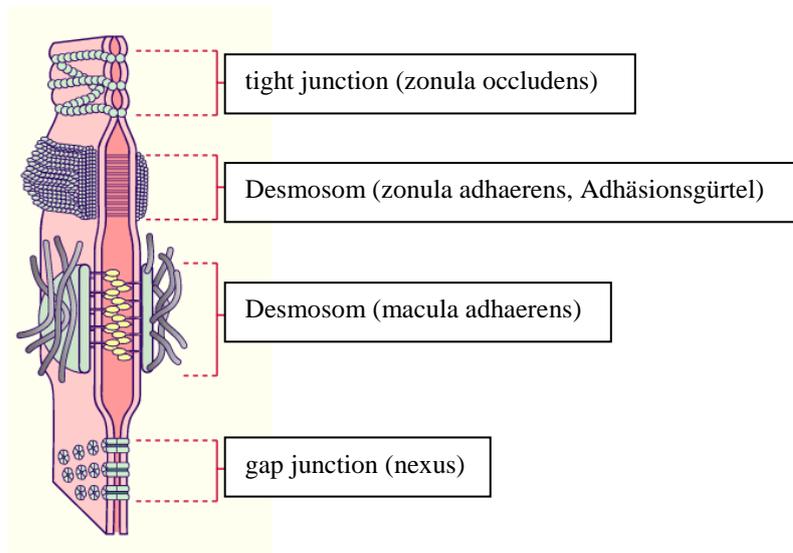


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Zell-Zellkontakte [6]

Hepatozyten sind an vielen Stoffwechselfvorgängen beteiligt [Tab. 1] und haben folgende wichtige Funktionen:

- Detoxifizierung mit zahlreichen Umwandlungsreaktionen (Harnstoffzyklus, Klasse-I- und Klasse-II-Transformationsreaktionen)
- Synthese von Fettsäuren
- Synthese von Gallensäuren
- Proteinsynthese (z.B. Albumin, Lipoproteine, Gerinnungsfaktoren, Cholinesterasen)

Hepatozyten sind aber auch das Hauptziel lebertoxischer Agenzien (biologischer oder chemischer Art) und ihre Verletzung kann zu akuten oder chronischen Lebererkrankungen führen .

→ Tab 1. Hauptfunktionen der Leber [7]

<u>Zentrum des Metabolismus:</u>	<i>Energie-Versorgung des Organismus</i>
	Glukose-Aufnahme und -Freisetzung
	Aminosäure-Aufnahme und -Freisetzung
	Harnstoff-Produktion
	Lipid-Prozessierung
	Ketonkörper-Bildung

	Biosynthese- und Abbau
	Plasmaprotein-Synthese und -Abbau
	Gallenbildung (Exkretion von Endo- und Xenobiotika)
<u>Abwehrzentrum:</u>	Metabolismus von Xenobiotika, Oxygenierung
	Phagozytose
	Aufnahme und biochemischer Abbau von fremden Makromolekülen (Bakterien, Viren, Parasiten)
	Eliminierung von Tumorzellen
	Akut-Phase-Reaktion
<u>Kontrolle des Hormonhaushalts:</u>	Inaktivierung und Eliminierung von Hormonen und Mediatoren
	Synthese und Ausschüttung von (Pro)-Hormonen
	Synthese von Hormon-Bindeproteinen
<u>Immunregulatorische Funktion:</u>	Antigen-Präsentation für Lymphozyten
<u>Sonstige Funktionen:</u>	Bildung und Aufrechterhaltung der Organstruktur
-	Synthese und Degradierung von Komponenten der EZM

1.1.2 Leberenzyme – Leberwerte

Die **Leberenzyme** sind eine Anzahl teilweise ubiquitär im Körper vorkommender, teilweise auch leberspezifischer Enzyme, deren Bestimmung im Serum Aufschluss über Gewebsschädigungen der Leber gibt. Die gängigsten Parameter sind: Alanin-Aminotransferase (**ALT**), (alte Nomenklatur: Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)), Aspartat-Aminotransferase (**AST**), (alte Nomenklatur: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)) und die Gamma-Glutamyltransferase (**γ -GT**) [8].

Die **ALT** gehört zur Gruppe der Transaminasen, die durch Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren und umgekehrt katalysieren. **ALT** liegt im Zytoplasma der Hepatozyten vor. Die Bestimmung der **ALT** erfolgt im zusammengesetzten optischen Test, bei dem L- Alanin und α - Ketoglutarat zu Pyruvat und L-Glutamat umgesetzt werden.

Eine Erhöhung (siehe Tab. 2) der **ALT**-Aktivität ist klinisch ein Indiz für Schäden des Parenchyms der Leber mit Membranpermeabilitätsstörung und zusammen mit der Bestimmung des **AST**-Wertes finden sie Verwendung als (unspezifische) Alkoholismus-Marker.

Andere Ursachen für eine Erhöhung der ALT-Werte sind Hepatitis, Leberkrebs, Entzündungen von Gallenblase und -gang, toxische Leberschäden (Vergiftungen).

Die **AST**, die auch zur Gruppe der Transaminasen gehört, katalysiert die Umwandlung von α -Ketoglutarat in Glutaminsäure und ist zellulär zu 70 % mitochondrial gebunden und zu 30 % im Zytoplasma gelöst. Bei schwachen Zellschädigungen wird vorwiegend der zytoplasmatische Anteil im Plasma erscheinen. Bei schweren Schäden werden zusätzlich mehr mitochondrial gebundene Enzyme ins Plasma freigesetzt [9].

Die Messung der Aktivität der Aspartat-Aminotransferase erfolgt im zusammengesetzten optischen Test, bei dem L-Aspartat und α -Ketoglutarat durch die AST zu Oxalacetat und L-Glutamat umgesetzt werden. Im nächsten Schritt, einer Malat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion reagieren Oxalacetat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Malat und NAD^+ .

Die **AST** ist im Körper weit verbreitet. Erhöhte Werte (siehe Tab. 2) finden sich vor allem bei Leber-, Herz- und Skelettmuskelschädigungen sowie bei Hämolyse. Die **AST**-Konzentration in den Erythrozyten ist etwa 40fach höher als im Plasma [9].

Der Quotient aus AST:ALT (jeweils Serumkonzentrationen), der *De-Ritis-Quotient*, eingeführt von de Ritis et al. [10, 11] gibt Hinweise auf die zellulären Schädigungen.

Der Referenzbereich des dimensionslosen De-Ritis-Quotienten beträgt 0,6–0,8.

Ein kleiner De-Ritis-Quotient (< 1) spricht für einen geringen, ein großer Quotient (> 1) für einen schwerwiegenden Leberschaden.

Bei Alkoholikern liegt das Verhältnis der Transaminasen: $\text{AST} > \text{ALT}$, oft $\text{AST}:\text{ALT} > 2$

Die Transaminasen sind bei alkoholassozierten Lebererkrankungen oft nur mäßig (bis zum Fünffachen der oberen Normgrenze) erhöht. Stärkere Anstiege sprechen eher für eine andere Ursache, z.B. eine viral oder autoimmun verursachte Hepatitis.

Die **γ -GT** (γ -Glutamyltransferase) wird in der Membran von Zellen mit hoher sekretorischer oder absorptiver Aktivität exprimiert und kommt in Leber, Nieren, Pankreas, Darm und Prostata vor. Erhöhungen (Tab. 2) der γ -GT findet man bei jeglicher Form von Lebererkrankungen.

Weitere Leberparameter sind Bilirubin und die alkalische Phosphatase.

Bilirubin ist das Abbauprodukt des Häms. Es wird als „indirektes Bilirubin“ (an Albumin gekoppelt) zur Leber transportiert und dort durch Glukuronidierung in die wasserlösliche Form gebracht, in der es als „direktes Bilirubin“ in die Gallenkapillaren sezerniert wird. Die Glukuronidierung wird im Endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten durch das Enzym UDP-Glukuronyltransferase katalysiert [8]. Eine Erhöhung der Bilirubin-Werte auf mehr als

2mg/dl (siehe Tab. 2) bedeutet *Ikterus* (Gelbsucht) und kommt durch die Einlagerung des Bilirubins in die Haut bzw. Bindehaut der Augen zustande, was als Gelbfärbung zu erkennen ist.

Die **alkalische Phosphatase** ist ein zinkhaltiges Enzym und kommt in Form verschiedener Isoenzyme in nahezu jedem Gewebe vor. In der Leber ist das Enzym an den Mikrovilli der Gallenkanälchen lokalisiert. Die Aktivität der AP im Serum setzt sich normalerweise aus den Isoenzymen von Leber und Knochen zusammen. Ob eine AP-Erhöhung hepatischer Genese ist, kann entweder durch Bestimmung der Isoenzyme (die Leber-AP ist hitzestabiler als die Knochen-AP) oder durch Vergleich mit den γ -GT-Werten ermittelt werden (letztere bei Cholestase erhöht, bei Knochenerkrankung hingegen nicht).

Bei alkoholischer Steatohepatitis sind Bilirubin und AP deutlich erhöht [8].

AST	Männer	10 - 50 U/l
	Frauen	10 - 35 U/l
ALT	Männer	10 - 50 U/l
	Frauen	10 - 35 U/l
γ -GT	Männer	< 66 U/l
	Frauen	< 39 U/l
Bilirubin		< 1,1 mg/dl
AP	Männer	40 - 129 U/l
	Frauen	35 - 104 U/l

Tab 2: Normwerte der Leber (basierend auf allgemeinen klinischen Laborwerten)

1.1.3 Hepatitis – Leberfibrose – Zirrhose

Während die regenerative Kapazität der Leber generell eine vollständige Wiederherstellung nach akuten, mäßiggradigen Läsionen erlaubt, heilen chronische Schädigungen nicht so effektiv, und die Fibrose ist die Hauptkomplikation von vielen bekannten Lebererkrankungen. So führen chronische Leberschädigungen durch Alkoholmissbrauch, virale Hepatitiden, toxische Substanzen, metabolische Erkrankungen, übermäßige Eisen- und Kupferspeicherung und die Zerstörung von Hepatozyten oder Gallengangsepithelzellen durch Autoimmunprozesse sowie auch angeborene Abnormalitäten zur Leberfibrose.

Leberfibrose ist definiert als abnorme Akkumulation extrazellulärer Matrix in der Leber [12] (Abb. 5).

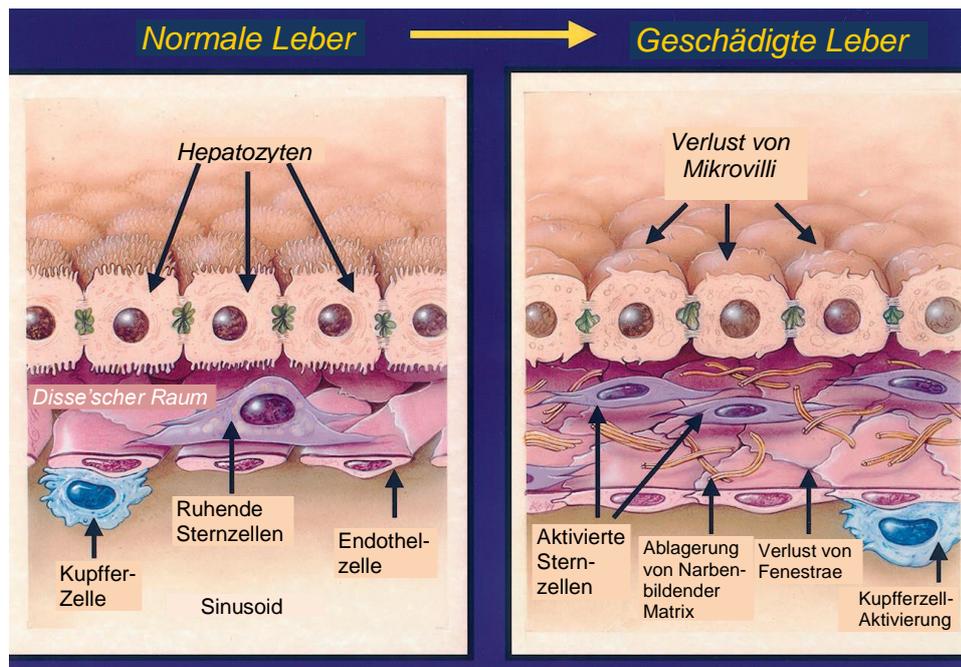


Abbildung 5: Veränderungen im Sinusoiden während fibrosierender Schädigung

Während der Fibrogenese finden Veränderungen zwischen dem sinusoidalen und dem Disse'schen Raum statt, wobei es zur Bildung von extrazellulärer Matrix kommt. Nach der Aktivierung von Hepatischen Sternzellen kommt es zur Akkumulation von Narbengewebe und zum Verlust von Mikrovilli bei Hepatozyten, was zum Verlust von Leberfunktionen führt. Zusätzlich werden Kupferzellen aktiviert, die wiederum parakrin die Aktivierung von Hepatischen Sternzellen auslösen. EZM-Ablagerung im Disse'schen Raum führt zum Verlust der Fenestrae, die für eine Endothelauskleidung charakteristisch sind. Dadurch wird der normale bidirektionale metabolische Austausch zwischen Portalvene und Hepatozyten beeinträchtigt. Diesen Prozess nennt man Kapillarisation der Sinusoide [13].

Im Fall einer wiederkehrenden oder chronischen Schädigung verschiebt sich das Verhältnis von Matrixdeposition und Matrixresorption in Richtung Fibrogenese, was schließlich zur Narbenbildung führt. Hierbei dürfte die chronische Gewebedestruktion mit geringer oder fehlender Regeneration von besonderer Bedeutung sein. Dadurch bietet sich Platz für die Matrixdeposition. Mit fortschreitender Vernarbung von der Brückenfibrose zur Bildung von kompletten Knoten kommt es zur Zerstörung der Gewebearchitektur und schließlich zur Leberzirrhose.

Zirrhose wird als fortgeschrittenes Stadium der Leberfibrose verstanden, welches durch die Bildung von Regeneratknoten (Pseudolobuli) aus Leberparenchym charakterisiert ist, getrennt durch fibrotische Septen, die aus dem Absterben von Hepatozyten, verstärkter Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Gefäßreorganisation resultieren. Die fibrotischen

Septen verbinden Portaltrakte und Lebervenen, was zu portoportalen, portovenösen wie auch zu arteriovenösen Shunts unter Umgehung der Parenchymknoten führt. Leberfibrose wird allgemein als reversibel angesehen. Strittig hingegen ist die regenerative Kapazität der zirrhotischen Leber [12].

Verschiedene Formen der Lebererkrankung führen zu verschiedenen Fibrosemustern. So können portal- und zentralbasierte Fibrosen unterschieden werden (Abb.6).

Die häufigsten portal-basierten Erkrankungen, die zur Zirrhose führen, umfassen chronisch virale Hepatitiden, chronische cholestatische Erkrankungen und Hämochromatose. Zentralbasierte Erkrankungen umfassen die Steatohepatitis (alkoholisch und nichtalkoholisch) und chronische venöse Abflussbehinderungen. Die Septen können in portoportale (z. B. als Folge von cholestatischen Erkrankungen), zentroportale (z. B. bei alkoholischer Lebererkrankung) und portozentrale Septen (z. B. im Falle chronischer Virushepatitis) unterteilt werden [12, 14].

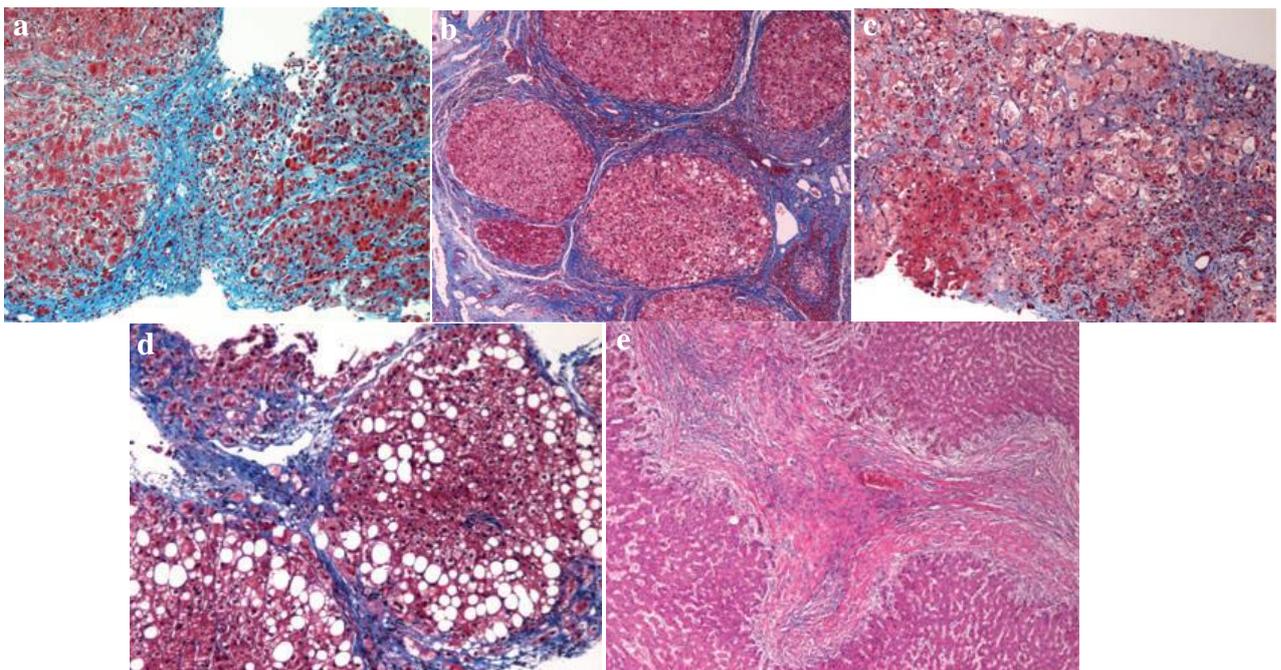


Abbildung 6: Fibrosemuster unterschiedlicher Ätiologie

(a) Autoimmunhepatitis. Portal-Zentralvenen Brückennekrose. (b) Chronische virale Hepatitis C. Trichromfärbung zeigt portal-zentrale fibrotische Septen und noduläre Formation. (c) Akute alkoholische Hepatitis. Anlagerung von extrazellulärer Matrix um die Hepatozyten herum und Ballonierung der Hepatozyten. (d) Nichtalkoholische Steatohepatitis. Trichromfärbung zeigt makrovesikuläre Steatosis und perizelluläre Fibrose. (e) Biliäre Zirrhose. Portal-portale fibrotische Septen und Proliferation von Gallengängen [15].

Die durch Alkoholabusus bedingte Hepatitis und die nichtalkoholische Steatohepatitis (verursacht durch Insulinresistenz, Adipositas, Diabetes mellitus und/oder Hypertriglyzeridämie etc.) sind mit histologisch fassbarer vermehrter Lipidspeicherung in Hepatozyten, ballonierten Hepatozyten, Nekrose von Hepatozyten und Infiltration mit neutrophilen Granulozyten verbunden. Diese Alterationen führen zu einem besonderen Fibrosetyp. Frühe fibrotische Veränderungen konzentrieren sich auf die Gebiete um die Zentralvenen:

- um die Sinusoide (z. B. perisinusoidale Fibrose) mit Kapillarisation der Sinusoide (Defenestrierung und Bildung einer durchgehenden Basalmembran),
- um die Gruppen von Hepatozyten herum (sog. Maschendrahtmuster - *chicken wire fibrosis*) und
- um die Zentralvene mit perivenöser Fibrose.

Bei letzterem Typ der Fibrose werden fibrogene Zellen aus dem Zentrum des Leberläppchens rekrutiert: aktivierte hepatische Sternzellen, *Second-layer*-Myofibroblasten um die Zentralvenen und glatte Muskelzellen der Venenwand der Zentralvene [16].

1.2 Alkohol

„*Ev oίνω αλήθεια* - im Wein liegt die Wahrheit.“ (Alkaios von Mytilene, 630 v. Chr. - 580 v. Chr.)

Der Genuss gegorener Getränke in Form von Trauben- und Apfelsaft reicht bis ins Neolithikum zurück, als der Mensch in vorgeschichtlicher Zeit den Keimungs- und Gärungsprozess entdeckte. Archäologische Funde belegen die Kenntnis und den Konsum von Getränken aus gegorenem Weizen. Bereits in der Antike wurde der Wein in der Pharmakopöe erwähnt. Zu den ältesten Hinweisen auf die medizinischen Eigenschaften des Weins (ca. 3000 v. Chr.) gehört die ärztliche Empfehlung, Schmerzen und Trauer mit Wein zu besänftigen. Zudem sah man im Wein einen Schutz gegen Infektionsgefahren in Gebieten, wo kein sauberes Wasser zur Verfügung stand. Auch diente der Wein zum Auswaschen und Säubern von Wunden vor dem Anlegen eines Verbands. Hippokrates beschrieb die therapeutische Ambivalenz des Weines sehr treffend: «*Der Wein ist ein Ding, in wunderbarer Weise für den Menschen geeignet, vorausgesetzt, dass er bei guter und schlechter Gesundheit sinnvoll und in rechtem Maße verwandt wird.*»

In unserer heutigen Gesellschaft hat der Alkohol einen wichtigen Stellenwert: Kein anderes Konsumgut wird so geschätzt, hat einen solchen Status und ist in unserem sozialen, kulturellen und gastronomischen Leben so verankert.

Jahrelang ist die Gesamtmortalität als globales Maß für die gesundheitlichen Auswirkungen des Alkoholkonsums untersucht worden. Matthew Baillie entdeckte 1793 den Zusammenhang zwischen Alkoholabusus und dem Auftreten einer Leberzirrhose [8].

1926 berichtete Perl, dass starke Trinker das höchste Mortalitätsrisiko aufweisen [17], während Trinker mit leichtem bis mäßigem Alkoholkonsum ein geringeres Risiko haben als Abstinenzler [18].

Ein Alkoholismus liegt laut WHO vor bei *„exzessivem Trinken, wobei die Abhängigkeit vom Alkohol einen solchen Grad erreicht hat, dass deutliche Störungen oder Konflikte in der körperlichen und geistigen Gesundheit, in zwischenmenschlichen Beziehungen und sozialen und wirtschaftlichen Funktionen bestehen oder aufgrund der typischen Prodromi einer solchen Entwicklung eintreten werden“*.

Im Jahr 2009 wurde mit 9,7 Liter reinen Alkohols 2,0% weniger getrunken als im Jahr zuvor (2008: 9,9 Liter reiner Alkohol). Im internationalen Vergleich der WHO (2005) steht Deutschland mit einem Alkoholkonsum der über 15-Jährigen von 11,8 Litern registrierten plus 1 Liter nicht registrierten reinen Alkohols nach Tschechien, Estland, Irland, Frankreich, Österreich, Portugal, Ungarn, Slowenien, Litauen und Luxemburg an elfter Stelle. (2003: fünfter Platz mit 12,0 plus 1,0 Liter reinen Alkohols). Seit Jahren muss von jährlich über 73.000 Todesfällen ausgegangen werden, die auf alkoholbezogene Gesundheitsstörungen zurückzuführen sind. Gut ein Fünftel aller Todesfälle zwischen 35 und 65 Jahren sind alkoholbedingte Todesfälle, allein bei den Männern dieser Altersgruppe ein Viertel aller Todesfälle. Von den 9,5 Mio. Menschen in Deutschland, die Alkohol konsumieren, trinken 2,0 Mio. missbräuchlich und 1,3 Mio. abhängig Alkohol. [19]

Durch Alkohol induzierte Leberschäden treten nach Überschreiten einer Schwellendosis von 40 – 60 g/d Alkohol beim Mann und 20 g/d bei der Frau auf.

60g Alkohol sind enthalten in:

- 1,5 l Exportbier
- 1,0 l Starkbier
- 0,7 l Wein
- 160 ml Cognac
- 140 ml Obstler
- 120 ml Melisengeist (= 69%iger Kräuterlikör)

„Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.“ Paracelsus Theophrastus Philippus Aureolus Bombastus von Hohenheim (Paracelsus) 1493 -1541.

Der kontinuierliche Alkoholkonsum birgt ein höheres Schädigungspotential als rezidivierende Alkoholexzesse.

Folgende Mengen pro Tag sollten nach Empfehlung der WHO (2004) auch von gesunden Menschen nicht überschritten werden:

Männer: 20 g/d= 0,25 l Wein oder 0,5 l Bier

Frauen: 10 g/d= 0,125 l Wein oder 0,25 Bier

Nach histopathologischen Kriterien führt der chronische Alkoholabusus an der Leber stadienhaft zur alkoholischen Fettleber, - Hepatitis, - Leberzirrhose.

Die Zufuhr von 200 g Alkohol täglich bewirkt nach 1 – 3 Wochen eine ausgeprägte, bis zu 50%ige Verfettung des Leberparenchyms. Mit einer Zirrhosenentwicklung ist bei regelmäßiger hoher Alkoholzufuhr nach 5 – 25 Jahren zu rechnen. Allerdings entwickeln nur 81 % der Alkoholiker eine Fettleber, 10 – 25 % eine alkoholische Fettleberhepatitis und 10 – 15 % eine Leberzirrhose. Zusätzliche Risikofaktoren (genetische Disposition, Ernährungssituationen, Trinkgewohnheiten) müssen demnach ebenfalls eine Rolle spielen.

Nach Aufnahme von Alkohol wird ein geringer Teil bereits im Magen durch drei Isoformen einer gastralen Alkoholdehydrogenase metabolisiert, wobei Männer die höheren Enzymaktivitäten aufweisen.

Der Großteil des Alkohols wird im Darm durch einfache Diffusion resorbiert. Beschleunigt wird die Diffusion durch Erwärmen (Glühwein), Zucker – (Punsch) und CO₂-Zusatz (Sekt), verzögert durch die gleichzeitige Nahrungsaufnahme.

Der größte Teil des resorbierten Alkohols wird in der Leber verstoffwechselt, nur 2 – 10% verlassen den Körper über Lunge und Nieren in unveränderter Form. Beim gesunden Mann werden pro Stunde 100 mg/kg Alkohol abgebaut, was (bei 70 kg Körpergewicht) 7 g Alkohol oder 0,1 Promille pro Stunde entspricht [8].

1.2.1 Ethanol/ROS/LPS

Ethanol (C₂H₅OH)

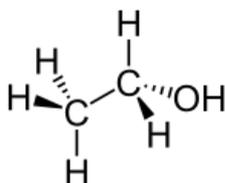


Abbildung 7: Strukturformel von Ethanol

Als alkoholische Getränke werden Getränke bezeichnet, die „Äthylalkohol“ – in der rationalen Nomenklatur: Ethanol – enthalten. Zwar können in ihnen geringe Mengen anderer Alkohole vorkommen, doch wird im allgemeinen Sprachgebrauch unter dem Trivialnamen Alkohol einzig Ethanol verstanden [20].

Ethanol ist ein in reifen Früchten und Säften natürlich vorkommendes Produkt der alkoholischen Gärung. Es ist Wasser- und fettlöslich und ein kleines Molekül. Sein Öl-Wasser-Verteilungsquotient von 1:30 bedingt, dass er sich nur im Körperwasser verteilt, andererseits aber durch Membranen diffundieren kann.

Der Ethanolmetabolismus verändert das intramitochondriale Redoxpotential mittels Produktion von NADH durch die Alkoholdehydrogenase. Außerdem verursacht der Ethanolabbau oxidativen Stress [21 – 25].

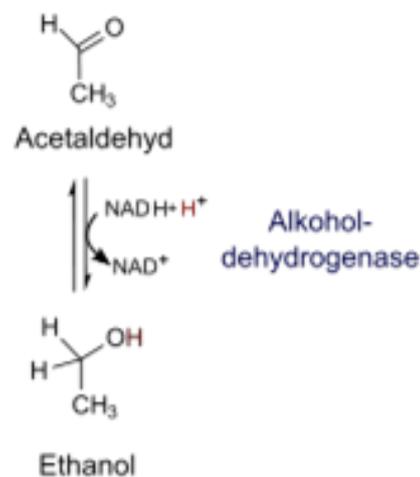


Abbildung 8: Ethanolmetabolismus

Der Ethanolabbau durch die Alkoholdehydrogenase, wobei Acetaldehyd gebildet wird.

Fortwährender Ethanolkonsum induziert in Hepatozyten das sogenannte mikrosomale Ethanol-oxidierende System (MEOS), das, neben der Alkoholdehydrogenase (ADH) und der peroxisomalen Katalase, ein weiteres enzymatisches Metabolisierungssystem für Ethanol darstellt. Das wichtigste Enzym des MEOS ist Zytochrom P 450 2E1 (CYP2E1). CYP2E1 produziert außer Acetaldehyd, dem ersten Metabolit von Ethanol, weitere reaktive Ethanolderivate, darunter das 1-Hydroxyethyl-Radikal und zusätzlich sog. *Reaktive Sauerstoff-Spezies* (ROS), wie z.B. *Wasserstoffperoxid* (H₂O₂), das *Hydroxylradikal* (HO·) oder das *Superoxid Anion* (O₂·)

Eine weitere und vermutlich noch größere Quelle von ROS bei der alkoholischen Lebererkrankung sind aktivierte *Kupffer-Zellen*, die ortsständigen Makrophagen der Leber. Diese Zellen werden hauptsächlich von aus dem Darm stammendem Endotoxin (*Lipopolysaccharid* – LPS), einem Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, aktiviert. Da Ethanol zu einer Überwucherung der intestinalen Mikroflora mit gramnegativen Bakterien führt und auch aufgrund von schleimhautschädigenden Eigenschaften die Permeabilität der Darmwand für Makromoleküle steigert, wird Endotoxin in großen Mengen aus dem Dünndarm in den portalen Blutkreislauf eingeschwenmt (Abb. 9) [26]. LPS ist ein starker Stimulus für die inflammatorische Immunantwort in der Leber. Bei der Endotoxin-bedingten Aktivierung des hepatischen Immunsystems kommt es zu einer erhöhten phagozytotischen und bakteriziden Aktivität sowie einer gesteigerten Produktion von *Zytokinen* und *Chemokinen* [27].

Chemokine bewirken eine Rekrutierung von peripheren Immunzellen in die Leber, was die Entzündung des Organs neben der fortschreitenden Verfettung noch verstärkt. Zytokine, die vornehmlich von aktivierten Kupffer-Zellen freigesetzt werden, sind für den apoptotischen oder nekrotischen Zelltod von Hepatozyten bei der alkoholischen Steatohepatitis verantwortlich [28 – 30].

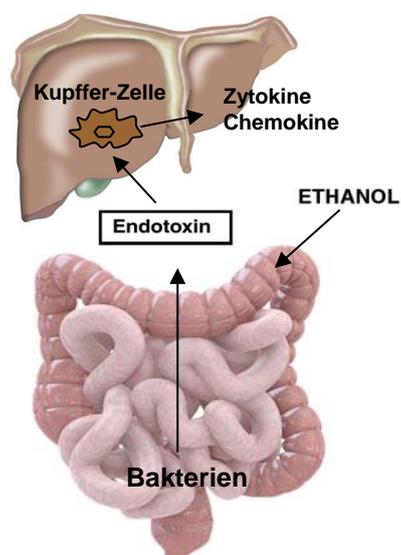


Abbildung 9: Endotoxin-Freisetzung aus dem Darm durch Alkohol

Ethanol modifiziert Darmbakterien, was zu einer Überwucherung an gram-negativen Bakterien in der Darmflora führt. Die Konzentration der Endotoxine nimmt im Blut zu, das LPS erreicht die Leber und Kupffer-Zellen werden aktiviert (verändert nach [26]).

1.3 Versuchstiere

1.3.1 MDR 2 knock out – Mäuse



Fotos aus dem Internet (google)

Mehrere Gründe machen Mäuse und Ratten zu geeigneten Forschungsobjekten: ihre hohe Reproduktionsrate und vergleichsweise einfache Haltung oder die Ähnlichkeit grundlegender biologischer Mechanismen im Vergleich zum Menschen (Konstruktvalidität). Ferner können Mäuse und Ratten auch sehr gut genetisch manipuliert werden. Es ist heute insbesondere bei Mäusen möglich, gezielt Gene auszuschalten bzw. sie verstärkt zu exprimieren. Eines der zahlreichen Beispiele bietet hierfür die *MDR 2 knock out* – Maus (siehe unten), die auf einen *Balbc*-Hintergrund aufgebaut ist. Eine *Balbc* ist eine im Labor gezüchtete, von der Hausmaus (*Mus musculus*) abstammende und von zahlreichen Unterstämmen abgeleitete Albinomaus. Mehr als 200 Generationen, die vom Original aus New York (1920) stammen, sind global verteilt und bilden den am häufigsten genutzten Inzucht-Stamm für Tierexperimente.

Auf der kanalikulären Seite der Hepatozyten erfolgt die Exkretion monovalenter Gallensäuren hauptsächlich über die sog. *bile salt export pump* (Bsep), während divalente Gallensäuren gemeinsam mit organischen Anionen über die Konjugatexportpumpe Mrp2 sezerniert werden. Phospholipide werden über das *multidrug resistance protein* MDR2 (bei Ratte/Maus) bzw. MDR3 (beim Menschen) in die Galle ausgeschieden, wo sie gemeinsam mit Gallensäuren und Cholesterin gemischte Mizellen bilden. An der basolateralen Seite existiert über weitere Isoformen das *multidrug resistance-associated protein* (Mrp1, Mrp3) ein alternativer Weg der Ausscheidung von Gallensäuren und anderen organischen Anionen (Abb.10) [31].

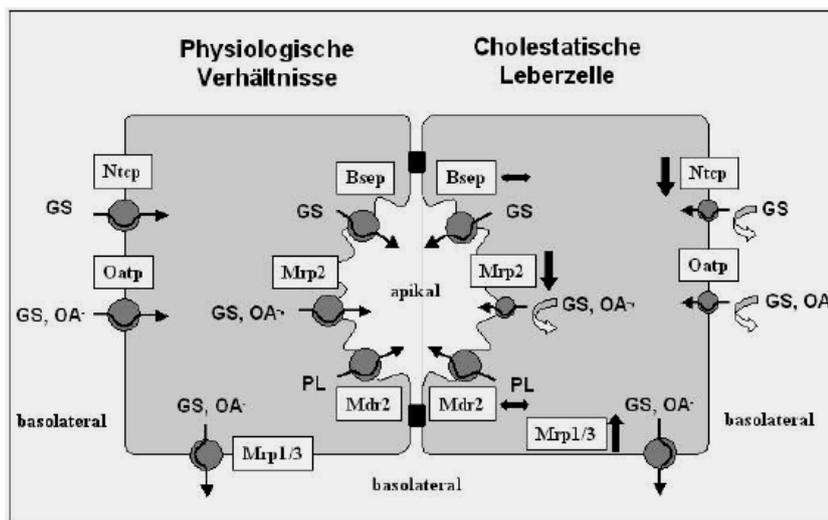


Abbildung 10: Schematische Darstellung von Hepatozyten und des Gallensäureflusses

Ntcp: Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (Aufnahme der Gallensäuren); Oatp: organic anion transporting polypeptides (Aufnahme der Gallensäuren und zentrale Rolle in der Extraktion organischer Anionen und zahlreicher Medikamente); GS: Gallensäuren; OA: organische Anione; Bsep: bile salt export pump; Mrp2: multidrug resistance-associated protein; Mdr2: multidrug resistance protein; ein Multidrug – Efflux – Transporter, überwiegend auf der apikalen Domäne der Hepatozyten exprimiert. In MDR 2-knock-out-Mäusen wird das multidrug resistance protein (MDR 2) gezielt ausgeschaltet, wodurch die Gallensäuren nicht abtransportiert werden können und die Leber cholestatisch und progressiv fibrotisch wird [31].

Unter Cholestase versteht man eine Störung des Gallenflusses, die zum einen durch eine Störung der Gallenbildung und zum anderen durch einen verhinderten Gallenabfluss entstehen kann. Dabei kommt es zum Rückstau gallepflichtiger Substanzen ins Blut.

Das MDR2 Genprodukt, MDR2 P-Glykoprotein, arbeitet als Phospholipid-Translokator, indem es gallenspezifische Phospholipide (nämlich Phosphatidylcholin) von der inneren an die äußere Seite der kanalikulären Membran der Hepatozyten transportiert. Dieser Schritt ist essentiell für die Sekretion der Phospholipide in die Galle.

Smit et al. generierten homozygote Mäuse mit einem knock out auf dem MDR2 Gen (*MDR2*(-/-)). Diesen Mäusen fehlt die Fähigkeit Phospholipide in die Galle zu sezernieren [32].

Dies führt zu einer Entzündung im Portal Trakt (Glissonsche Trias) und folglich zur progressiven Fibrose, die der progressiven familiären intrahepatischen Cholestase beim Menschen ähnelt [33].

1.4 Vapor chamber

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten Mäusen oder Ratten Alkohol zu verabreichen, z.B. mit der *Lieber DeCarli*-Diät (flüssige Nahrung, die mit einer definierten Menge von Alkohol versetzt wird), der *Bolusinjektion* (meist durch eine Schlundsonde verabreichter Alkohol – Einmalgabe), durch Alkohol im Trinkwasser, durch Verabreichung des Alkohols mittels einer Pumpe auf dem Rücken (langzeitige Alkoholgabe definierter Menge) oder durch Bedampfung des Alkohols mittels *vapor chamber* (Alkohol-Dampfkammer, Abb. 11).



Abbildung 11: Alkohol Dampfkammer für Mäuse

Eine Balbc-MDR2-knock-out-Maus (Nr. 47) wird mit 95%igem Ethanol definierter Menge bedampft.

Die Methode der Alkoholbedampfung erlaubt dem Experimentator, die Dosis und die Dauer des applizierten Alkohols ohne größeren Aufwand zu kontrollieren. Es handelt sich um eine flexible Methode im Labor, bei der die Parameter dieses Verfahrens den Zielen des Experimentes angepasst werden können [34].

1.4.1 Funktionsweise der Alkohol-Dampfkammer-Apparatur

Eine typische Dampfkammer-Apparatur (siehe Abb. 12) besteht aus 8 Tierkammern unterschiedlicher Größe, abhängig davon, ob es sich um Ratten oder Mäuse handelt. Jede Kammer hat zwei Einschlüsse für je zwei Luftschläuche. Der eine Schlauch führt Luft bzw.

Alkoholdampf in die Kammern, während der andere sie wieder abführt. Die Luftschläuche sind mit Spezialsteckern ausgerichtet und die Kammern mit Gummiringen versiegelt, so dass nichts entweichen kann. Die Kammern sind zusätzlich mit Wasser- und Futterflaschen ausgestattet.

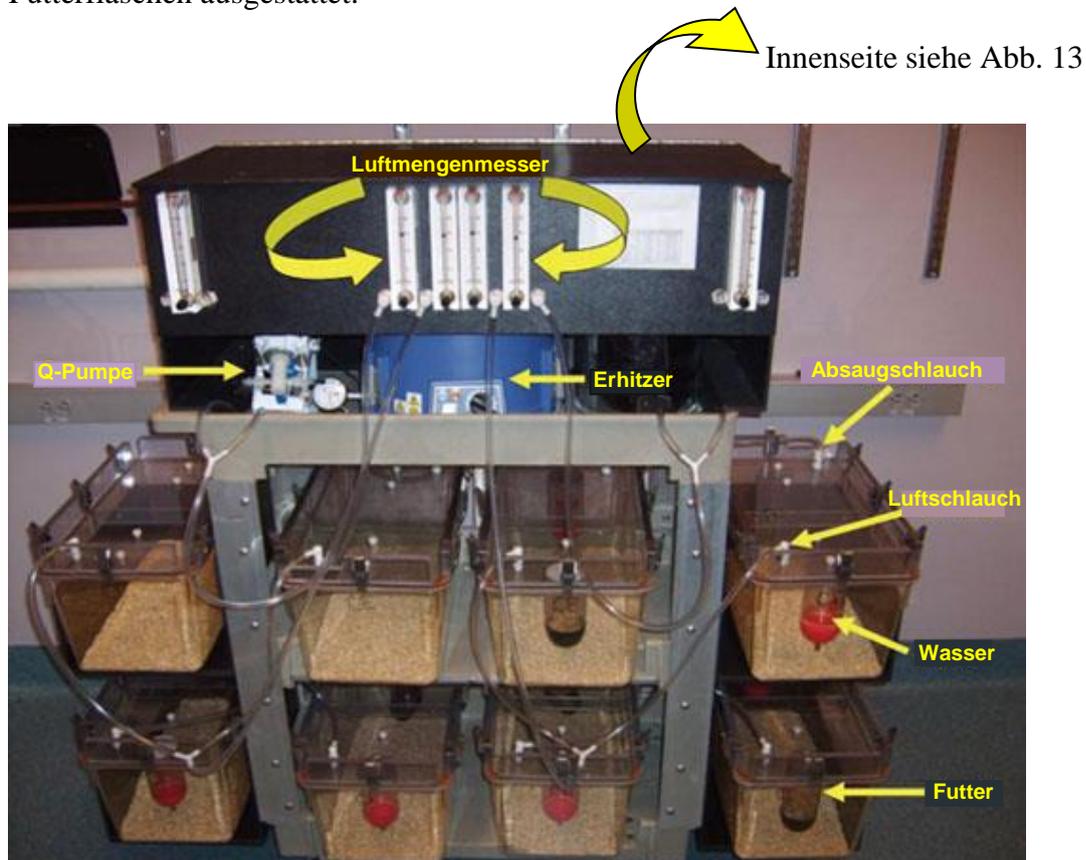


Abbildung 12: Typische Dampfkammer-Apparatur

Vorderansicht einer gängigen Dampfkammer-Apparatur von La Jolla Alcohol Research, Inc.

Zu sehen: der Absaugschlauch, der Luftschlauch (enthält Umgebungsluft und Alkohol oder nur Umgebungsluft), das Wasser- und das Futterreservoir, die Q-Pumpe, der Erhitzer („heater“) und die Luftmengenmessgeräte (Bild aus [34]).

Von den Kammern laufen die Luftschläuche durch die Luftmengenmesser in einen Kolben, der auf einem Erhitzer positioniert ist. Das Ethanol wird durch die verstellbare Q-Pumpe angesaugt und fließt tröpfchenweise in den Kolben, der erhitzt wird. Durch die Hitze verdampft das Ethanol und vermischt sich mit der Umgebungsluft, die durch die Luftmengenmesser in die Kammern gelangt. Auf dem Deckel der Apparatur befindet sich ein Ventilator, der verhindern soll, dass sich die Apparatur durch den Erhitzer aufheizt und somit ein Schaden entsteht (Abb. 13).

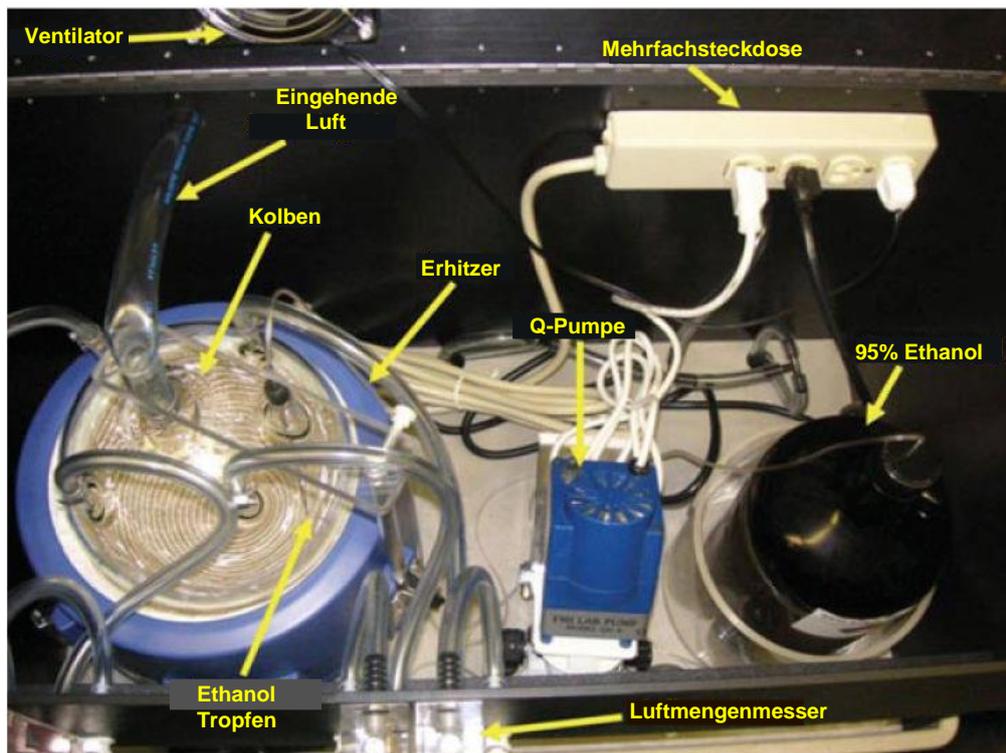


Abbildung 13: Typische Dampfkammer-Apparatur

Das Ethanol wird durch einen dünnen Schlauch mittels der Q-Pumpe angesaugt (Menge ist an der Pumpe einstellbar) und in den Kolben geleitet, wo es durch den Erhitzer verdampft und mit der eingehenden Luft vermischt wird. Diese fließt durch die Luftschläuche, die Luftmengenmesser passierend, in die Kammern. Der Ventilator, der am Deckel befestigt ist, gewährleistet eine sichere Temperatur in der Nähe des Erhitzers (Bild aus: [34]).

Weitere Einzelheiten des genauen Einsatzes der Alkohol-Dampfkammern werden im Versuchsaufbau beschrieben. Für allgemeine Informationen siehe auch [34].

1.5 TGF- β

Transforming-growth-factor- β (TGF- β) ist ein Mitglied der TGF- β -Superfamilie, zu der unter anderem die TGF- β -Zytokine, *bone morphogenetic proteins* (BMPs), *growth and differentiation factors* (GDF) und die *Aktivine* gehören [35, 36].

Durch diese multifunktionalen Proteine werden eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z.B. Zellzykluskontrolle, Apoptoseinduktion, Aufbau der extrazellulären Matrix, Regulation der

Zelldifferenzierung, Hämatopoese, Angiogenese, Chemotaxis, Wundheilung und Immunfunktionen gesteuert [37, 38].

Die TGF- β Superfamilie zeichnet sich durch ein gemeinsames Strukturmotiv, den Zysteinknoten aus, der zur Bildung von drei konservierten Paaren von intrazellulären Disulfidbrücken führt. Die Superfamilie wird üblicherweise anhand der Signalweiterleitung durch die rezeptorassoziierten Smads und wegen der Sequenzhomologien in zwei Familien unterteilt. Die Aktivin/TGF- β -Familie und die BMP (*bone morphogenetic protein*)-Familie. Die Mitglieder der Aktivin/TGF- β -Familie binden bevorzugt an Rezeptoren, die zur Phosphorylierung von Smad 2 und Smad 3 führen. Die Mitglieder der BMP Familie, die GDF Proteine und die AMH (*Anti Müllerian Hormone*) leiten ihre Signale hingegen eher durch Smad 1, 5 und 8 weiter (Abb. 14).

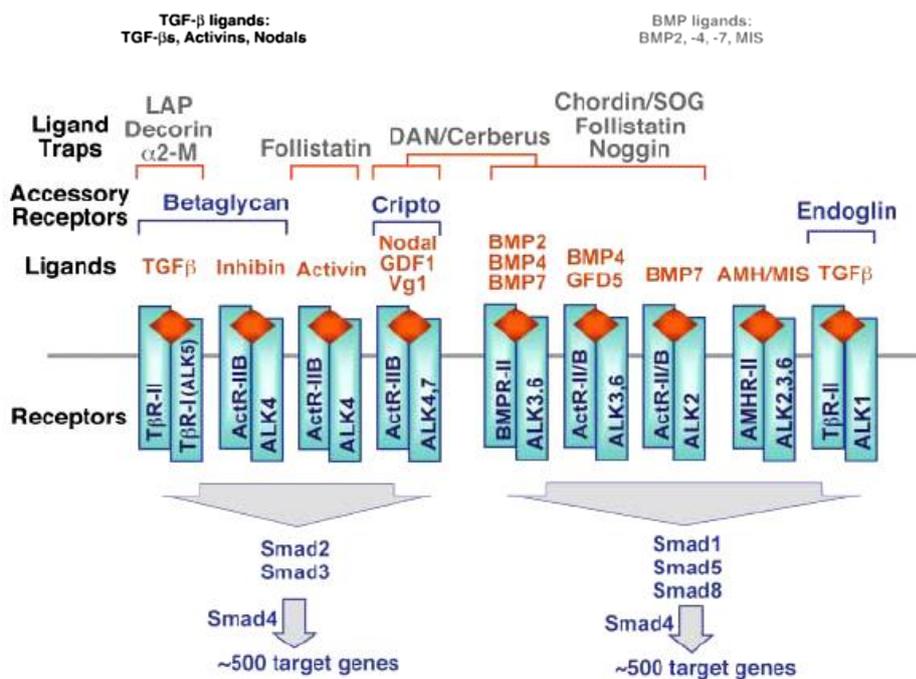


Abbildung 14: Schematische Darstellung der TGF- β -Liganden, der Liganden-Bindungsstellen, der zugehörigen Typ I- und II-Rezeptoren in Vertebraten [39]

Die TGF- β -Rezeptorfamilie, eine Gruppe von Transmembranproteinen mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität, wird anhand von Struktur und Funktion der Kinase in Typ I und Typ II Rezeptoren unterteilt (Abb. 15) [36].

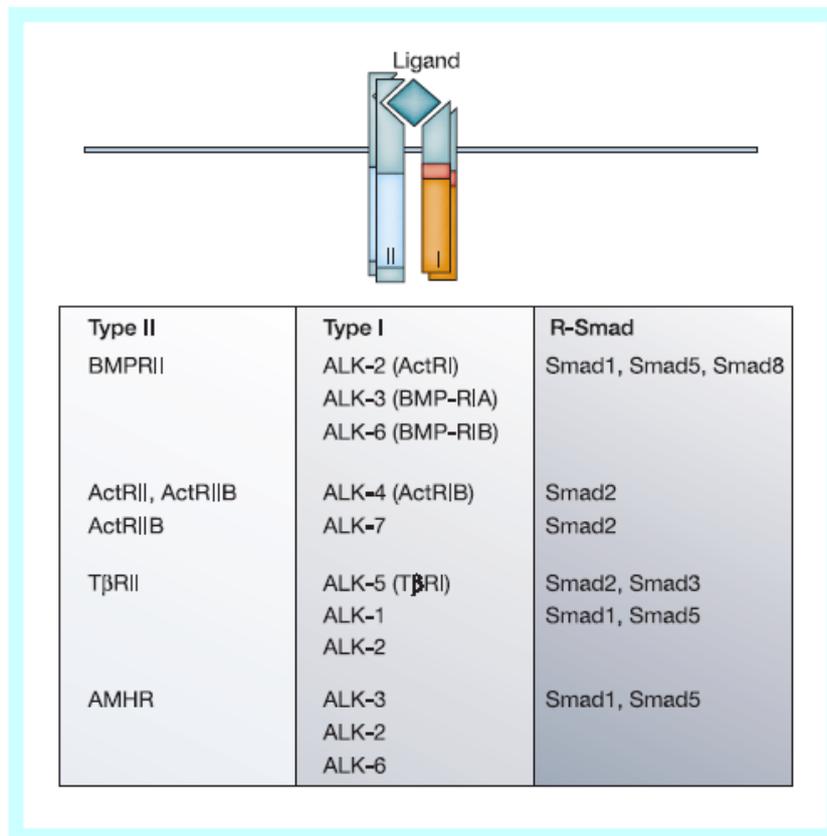


Abbildung 15: Kombinatorische Interaktionen von TypI- und TypII-Rezeptoren bestimmen die Signalantwort

Es sind nur die bestdokumentierten Rezeptorkombinationen und ihre R-Smads aufgelistet [40].

Die TGF- β -Unterfamilie besteht aus drei hoch homologen Isoformen von TGF- β ; TGF- β_1 , TGF- β_2 und TGF- β_3 [41]. Jede Isoform wird gewebeabhängig und im Verlauf der Entwicklung unterschiedlich exprimiert [42]. TGF- β_1 , ein 112 Aminosäure (12,5 kD) grosses Protein mit konservierten Zysteinresten, wird von dem komplexesten Promotor der drei Isoformen reguliert. Die Bedeutung des Zytokins zeigt sich auch darin, dass seine Expression bei verschiedenen Krankheiten verändert ist. TGF- β_1 -knock-out-Mäuse sterben innerhalb von 3 bis 4 Wochen nach der Geburt durch Lymphozyten und Makrophageninfiltration in multiplen Organen und an massiven Entzündungen [43].

Beim Menschen führt eine Mutation auf dem TGF- β_1 -Gen zum Camurati-Engelmann-Syndrom (CES), eine seltene autosomal-dominant vererbte Krankheit. Sie beginnt in der Kindheit mit einer generalisierten Knochendysplasie mit einer Ausweitung der Diaphysen der Röhrenknochen [44].

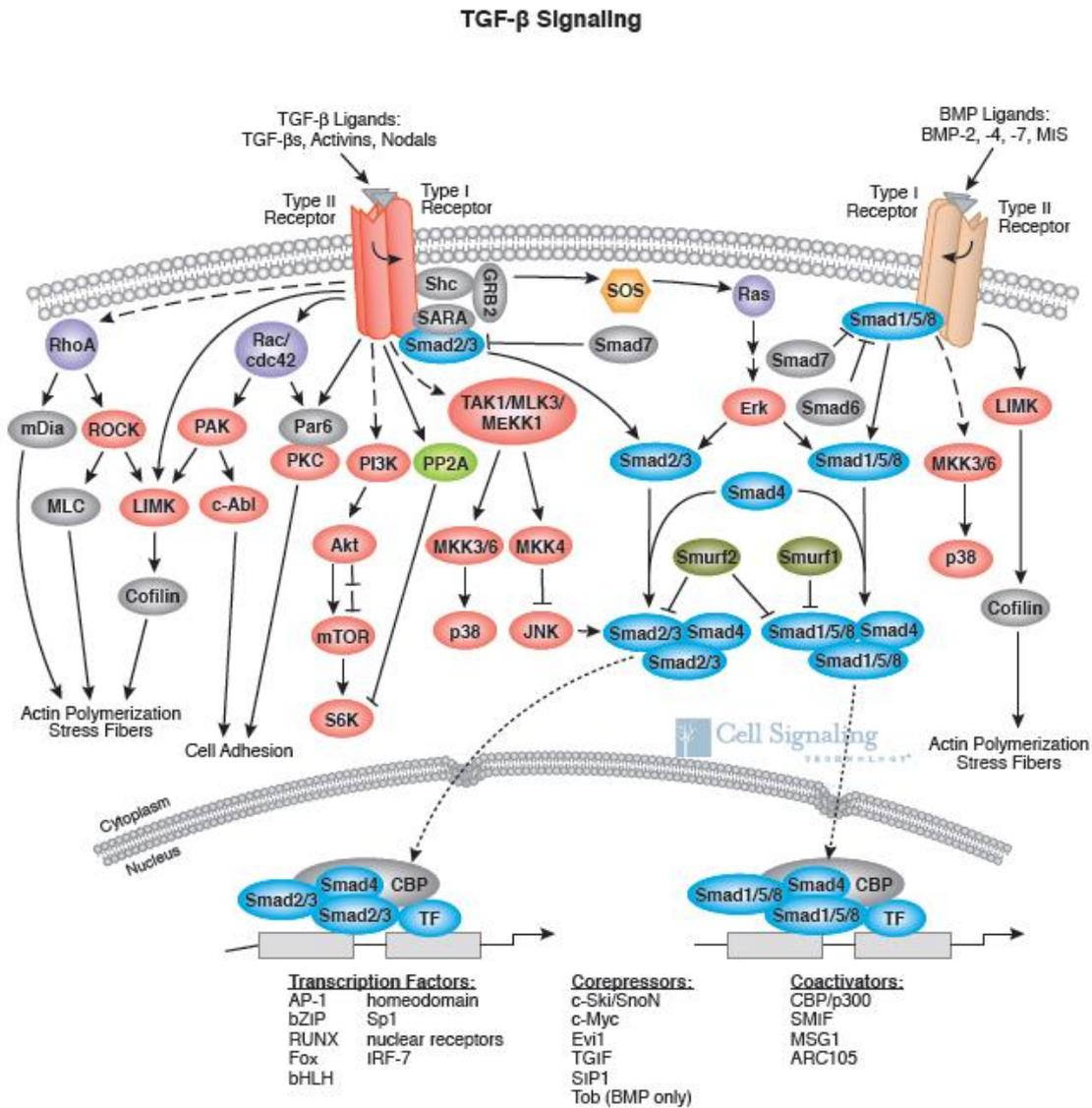


Abbildung 16: TGF-β-Signalwege

TGF-β ist ein multifunktionales Protein, mit einem breiten Spektrum an zellulären Aktivitäten, wie der Kontrolle von Zellwachstum und Apoptose.

(Bild aus: Cell Signaling TECHNOLOGY®)

1.6 Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein wichtiger Prozess in der normalen Entwicklung und Funktion vielzelliger Organismen. Als Antwort auf verschiedene Stimuli sterben die Zellen kontrolliert und auf regulierte Art und Weise. Es bilden sich sogenannte „apoptotic bodies“, die alle Zellbestandteile umschließen.

Im Gegensatz dazu werden bei der Nekrose, dem unkontrollierten Zelltod, die Zellen lysiert, wodurch sämtliche Zellbestandteile frei werden, was zu Entzündungsreaktionen und Schädigungen im Organismus führen kann.

Abnormalitäten beim kontrollierten Zelltod können zu verschiedenen Krankheiten, wie Krebs, Autoimmunkrankheiten (bei verminderter Apoptose) und degenerativen Störungen (bei verstärkter Apoptose), führen.

Das Wort Apoptose stammt aus dem griechischen Wort *apo* (από) – *ptosis* (πτώσις) und bedeutet wörtlich das „Ab – fallen“, wie z.B. das Abfallen der Blätter eines Baumes im Herbst. Wie elektronenmikroskopische Aufnahmen gezeigt haben, verändern sich die Zellen während der Apoptose morphologisch. Die Zellen lösen sich aus ihrem Zellverband, das Chromatin kondensiert, das Zytoplasma schrumpft und rundet sich ab, und an der Plasmamembran bilden sich Bläschen. Das Phosphatidylserin wandert von der Innenseite der Membran auf die Außenseite, so dass es als Signal für die Makrophagen und somit für die Phagozytose dient. Molekulare Veränderungen während der Apoptose schließen u.a. die internukleosomale DNA-Spaltung ein.

Die Apoptose wird in zwei Phasen unterteilt, die Initiationsphase, bei der wiederum der extrinsische (Typ I) und der intrinsische (Typ II) – Weg unterschieden werden und die Effektorphase.

1.6.1 Initiationsphase – Extrinsischer Weg

Der extrinsische Weg wird durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF (*Tumornekrosefaktor*)-Rezeptorfamilie (z.B. CD95) eingeleitet. Abhängig vom Zelltyp und anderen Signalen, die die Zelle erreichen, können diese Rezeptoren die Proliferation, das Überleben, die Differenzierung und den Tod der Zelle auslösen. Die meisten dieser Liganden (TNF- α , andere Zytokine) sind Membran – verankerte Trimere, deren aufwendige Rezeptorbindung für die Signalübertragung erforderlich ist.

CD95 (auch Fas oder APO-1 genannt) und TNF-RI (*Tumornekrosefaktor-Rezeptor I*), ebenso wie andere Mitglieder dieser Familie enthalten eine zytoplasmatische Region, die Todesdomäne (DD, *death domain*), die essentiell für die Induktion der Apoptose ist.

Durch die induzierte Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an die nun Adaptermoleküle mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden können. In einem ersten Schritt wird das *TNF-Rezeptor-DD-assoziierte Protein* (TRADD) rekrutiert.

Anschließend bindet an die DD des TRADD das *Fas assoziierte Protein mit Todesdomäne* (FADD). FADD besitzt neben der DD auch eine *Todeseffektordomäne* (DED, *death effector domain*), über die die pro-Caspase 8 mit ihrer DED an den Komplex bindet. Diese kann sich nun durch die entstandene hohe lokale Konzentration autokatalytisch aktivieren. Die aktive Caspase 8 löst ihrerseits die sogenannte Caspase-Kaskade aus, wodurch in einer signalverstärkenden Rückkopplung weitere Caspase-8-Moleküle aktiviert werden. In Abb. 4 ist eine mögliche Zusammenfassung der Signalwege der Typ I – Apoptose aufgezeigt. Ein Beispiel für den extrinsischen Weg bilden zytotoxische T-Lymphozyten, die auf ihrer Oberfläche Todesrezeptor-spezifische Liganden exprimieren um virusbefallene Zellen in Apoptose zu schicken [45, 46].

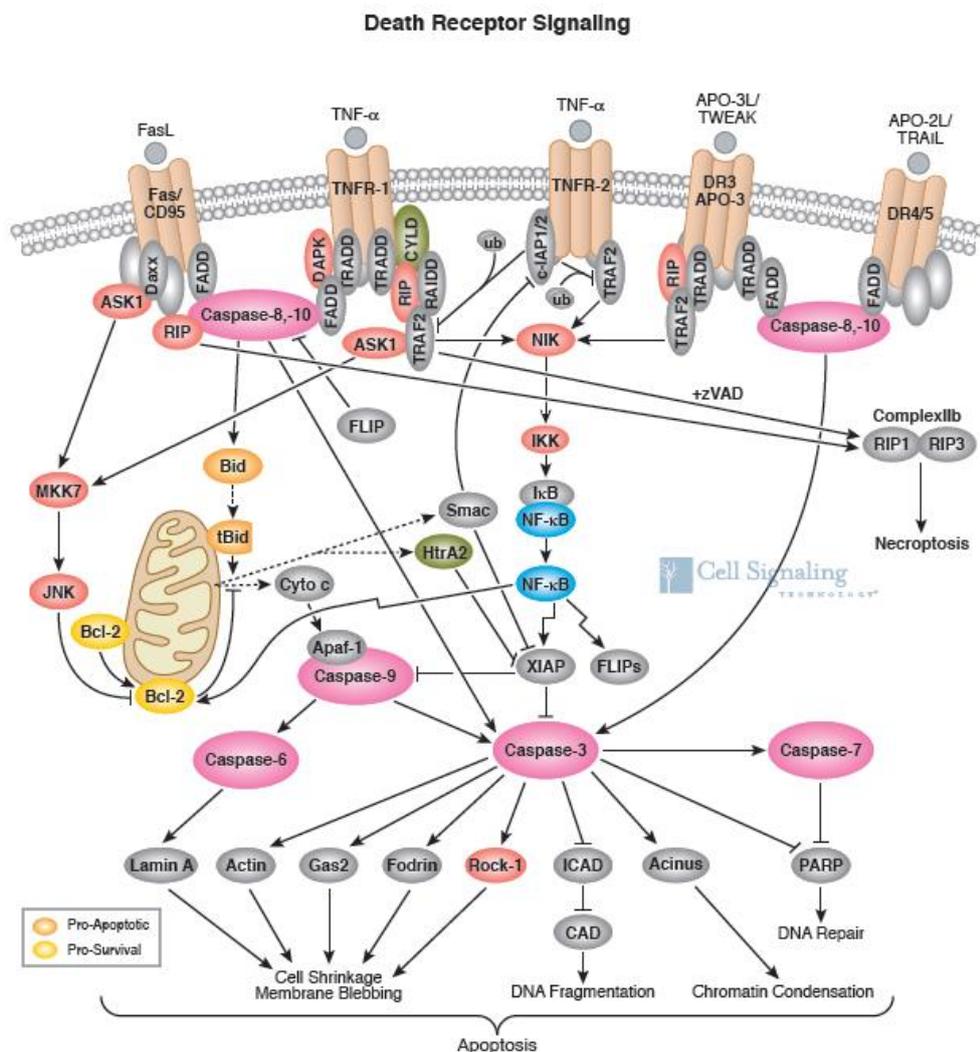


Abbildung 17: Todes-Rezeptor-Signalweg

Mitglieder der TNF-Rezeptor Familie: Fas/CD95, TNF-RI, TNF-RII, DR3/APO-3, DR4/5 und deren dazugehörige Liganden FasL, TNF-α, APO-3L, APO-2L/TRAIL. Die Todes – Rezeptoren sind Oberflächen-Rezeptoren, die nach Bindung der spezifischen Liganden das apoptotische Signal

weiterleiten und somit eine Caspase – Kaskade innerhalb von Sekunden auslösen können. (Bild aus: Cell Signaling TECHNOLOGY®)

1.6.2 Initiationsphase – Intrinsischer Weg

Beim intrinsischen Weg spielen die Mitochondrien der in Apoptose gehenden Zellen eine wichtige Rolle. Sie enthalten viele pro-apoptotische Proteine, wie den Apoptose-induzierenden-Faktor (AIF), Smac/DIABLO und Cytochrom C. Diese Faktoren werden aus den Poren, PTP (*permeability transition pore*) der Mitochondrienmembran abgegeben.

Diese Poren bilden sich durch die Aktivität der *pro-apoptotischen* Mitglieder der Bcl-2 Familie, die wiederum durch apoptotische Signale, wie zellulären Stress, freie Radikale oder den Mangel an Wachstumsfaktoren aktiviert werden.

Die Mitglieder der Bcl-2 Familie zeichnen sich durch eine Sequenzhomologie im Bereich der sog. „Bcl-2 homology“ (BH)-Domänen aus. Mittlerweile sind viele solcher Bcl-2 Proteine beschrieben worden [47, 48]. Sie können sowohl anti-apoptotisch sein (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, A1, Mcl-1, Bfl-1, Brag-1, NR-13), als auch pro-apoptotisch (Bcl-x_S, Bax, Bad, Bak, Bid, Bik, Hrk) (Abb. 18) [49].

Die Anfälligkeit der Zelle auf den apoptotischen Stimulus kann vom Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Bcl-2 Proteinen abhängen. Wenn die Tendenz auf der Seite der pro-apoptotischen Proteine liegt, dann ist die Zelle anfälliger für Apoptose, und wenn sie mehr auf der Seite der anti-apoptotischen Proteine liegt, dann wird die Zelle mit großer Wahrscheinlichkeit überleben. Pro-apoptotische Bcl-2 Proteine werden oft im Zytosol (Cytoplasma) der Zellen nachgewiesen, wo sie als Sensoren für zellulären Schaden oder Stress fungieren. Dem zellulären Stress folgend lassen sie sich auf der Oberfläche der Mitochondrien nieder, wo die anti-apoptotischen Proteine lokalisiert sind. Durch Interaktion zwischen den beiden Proteintypen kommt es zur Porenbildung der Mitochondrien und der Ausschüttung von Cytochrom C, einem weiteren pro-apoptotischen Protein aus dem Intermembranraum.

Viele toxische Substanzen, wie z. B. Chemotherapeutika, wirken jedoch auch direkt auf die Mitochondrien und können so die Typ II Apoptose induzieren.

Durch die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD Domäne der Procaspase 9 binden kann. Die Bildung dieses Heterodimers ist eine Voraussetzung für die autolytische

Aktivierung der Caspase 9. Dieser Komplex wird Apoptosom genannt und stellt die aktive Form der Caspase 9 dar. Analog zu Caspase 8 initiiert aktive Caspase 9 die Caspase-Kaskade (Abb. 18) [45, 46].

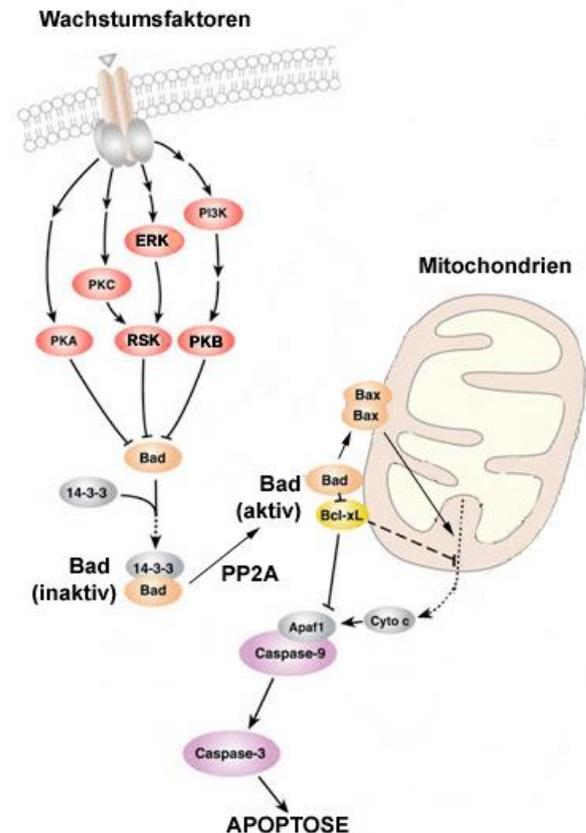
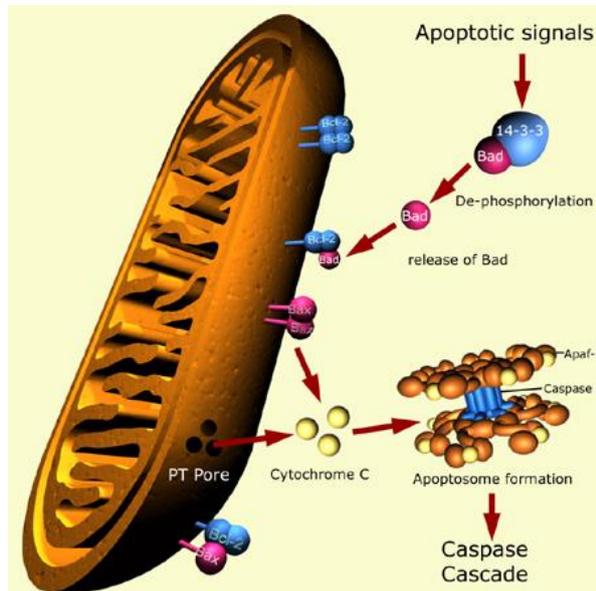


Abbildung 18: Initiationsphase – intrinsischer

Weg/ Typ II- Apoptose

Pro-apoptisches Bad, das an Protein 14-3-3 gebunden ist, wird nach Stimulation eines apoptotischen Signals durch Dephosphorylierung frei und bindet sich an Proteine der Bcl-2 Familie. Wenn die Mehrheit der pro-apoptischen Proteine überwiegt, wird aus dem Intermediärraum der Mitochondrien Cytochrom C ausgeschüttet, das an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) bindet. Caspase 9 wird aktiv, was wiederum Caspase 3 aktiviert und Apoptose auslöst [45, rechtes Bild aus Cell Signaling TECHNOLOGY®].

1.6.3 Effektorphase – Caspase – Kaskade

In einer Vielzahl von Organismen spielen Caspasen, eine Gruppe von Cystein-Proteasen, eine essentielle Rolle beim programmierten Zelltod. In Säugetieren sind 14 Caspasen identifiziert worden [50 – 52]. Diese Enzyme erkennen Tetrapeptid-Motive und spalten ihre Substrate am Carboxylende eines Aspartatrestes. Caspasen werden als Proenzyme mit geringer intrinsischer enzymatischer Aktivität synthetisiert. Das voll-aktive Enzym ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei identischen Untereinheiten von ~20 kD und zwei identischen Untereinheiten von ~10 kD [53, 54].

Sogenannte Initiator-Caspasen (z.B. Caspase 8 und Caspase 9) lösen eine Lawine steigender Caspase-Aktivität, durch Prozessierung und Aktivierung sogenannter Effektor-Caspasen (Caspasen 3, 6 und 7), aus [52]. Diese spalten und inaktivieren grundlegende zelluläre

Proteine, wie Lamin (in der Zellkernmembran), Gelsolin und MDM2 (Inhibitor von p53) [55, 56].

Andererseits aktivieren sie sekundäre Zielproteine, z.B. „Caspase – aktivierte DNase“ (CAD), oder andere Caspasen durch Proteolyse.

Die DNase spaltet genomische DNA an internukleosomalen gekennzeichneten Regionen (*linker region*) und produziert 180–185 bp große Fragmente. Dieses charakteristische Längenmuster lässt sich in einer Agarose-Gel-Elektrophorese als „Apoptoseleiter“ darstellen. Die Darstellung der „Apoptoseleiter“ ist deshalb eine sensitive Methode, um Apoptose vom ischämischen oder toxischen Zell-Tod abzugrenzen. Ein weiterer Aspekt ist die Caspase-vermittelte Unterdrückung der DNA-Reparatur. Letztlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die wiederum durch Phagozyten aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt hierbei die Zellmembran intakt [45, 46].

1.7 PI3K – Akt – Signalweg

Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation zellulärer Funktionen als Antwort auf extrazelluläre Signale. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weg ist eines der Beispiele für den anti-apoptotischen Weg, der in einer Zelle eingeschaltet wird, um ihr Überleben zu sichern.

Ein wichtiger *downstream effektor* von PI3K ist die Serin-Threonin-Kinase *Akt* die als Antwort auf die PI3K-Aktivierung eine Vielzahl von Ziel-Kinasen, Transkriptionsfaktoren, und anderen regulatorischen Molekülen phosphoryliert und reguliert [57, 58].

Ein Beispiel für den komplexen PI3K-Akt-Signalweg ist in Abbildung 6 wiedergegeben.

Eine Vielzahl von Plasma-Membran-Rezeptoren, darunter einige mit Thyrosin-Kinase-Aktivität, können PI3-Kinasen aktivieren [59].

Diverse Botenstoffe wirken über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivierend auf die PI3K. Nach der Translokation an den Rezeptor phosphoryliert die PI3K die in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinositole an der 3'-Position des Inositolringes. Vornehmlich das Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) dient anschließend anderen Enzymen als Bindungsstelle. Zu diesen Enzymen gehören die Protein-Kinase-B (PKB), auch *Akt* genannt, sowie deren Aktivatoren, die PDKs (phosphatidylinositol-dependent kinases). Die Aktivierung der PKB führt zu einer Reihe von Enzymphosphorylierungen, die für den „Survival Pathway“ (Überlebens-Signalweg) entscheidend sind. Zu den PKB-Effektorproteinen des „Survival-Pathway“ gehören unter anderem Caspase-9, BAD,

Glycogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3) und die Transkriptionsfaktoren FKHR (Forkhead-Transkriptionsfaktoren), CREB (cAMP-responsive-element-binding-protein) und NFκB (Kernfaktor κB) (Abb. 19 und 20) [60, 61].

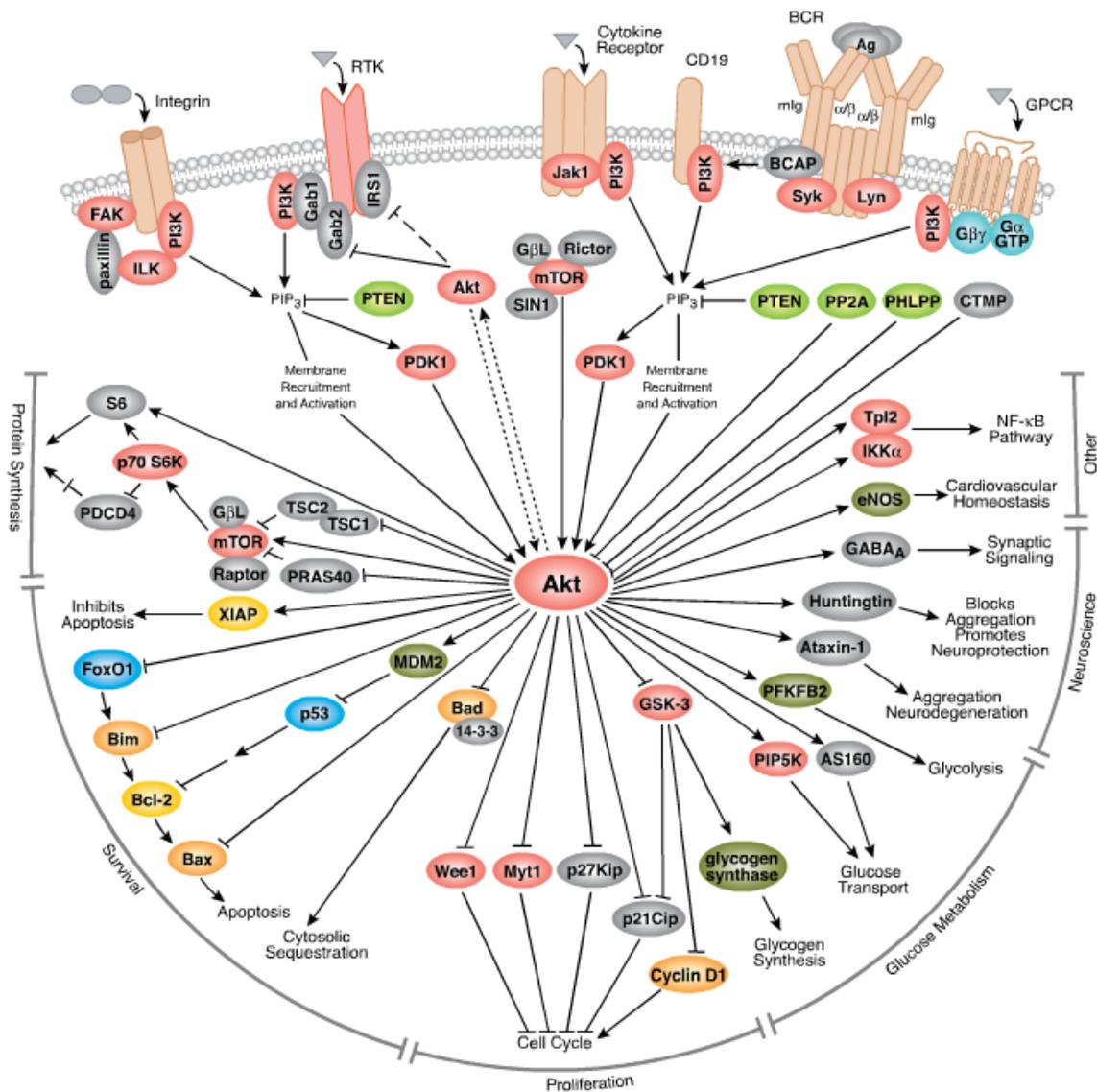


Abbildung 19: PI3K-Akt-Signalweg

PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; PTEN: Phosphatase und Tensin-homologes gelöscht auf Chromosom 10 (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) ist ein Tumorsuppressorgen, das auf dem Chromosom 10q23 lokalisiert ist; GSK3: Glykogen-Synthase-Kinase; PDK: Phosphatidylinositol-abhängige Kinase (Phosphatidylinositol-dep-ent-kinase) (Bild aus: Cell Signaling TECHNOLOGY[®])

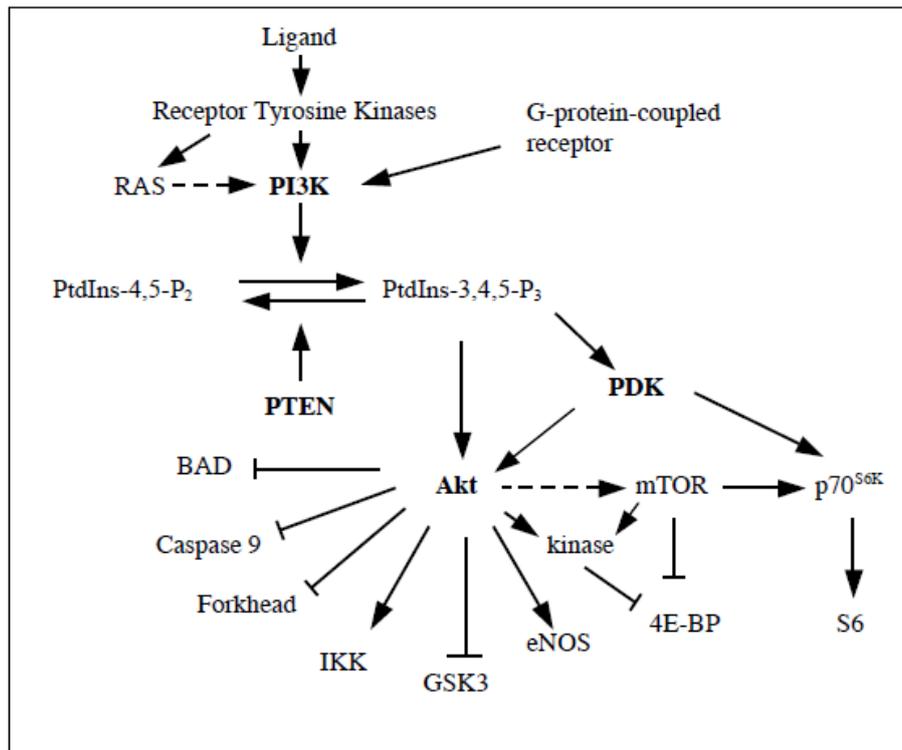


Abbildung 20: PI3K-PTEN-Akt-Signalweg

PtdIns: Phosphoinoside sind seltene Lipide. PI3K katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat (PtdIns-4,5-P₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PtdIns-3,4,5-P₃). GSK3 (Glykogen Synthase 3), Caspase 9 und Bad (das pro-apoptotisch ist und mit den anti-apoptotischen Bcl-2 und Bcl_L antagonisiert) werden von Akt, das von PDK (Phosphatidylinositol-abhängige-Kinase) durch Phosphorylierung aktiviert wird, inhibiert.

P70^{S6K} (Ribosomales-Protein-S6-Kinase); *IKK* (IκB-Kinase); *eNOS* (Endotheliale-Stickoxid-Synthase); *mTOR* (mammalian target of rapamycin); 4E-BP (Eukaryotischer-Translations-Initiations-Faktor- bindendes Protein) [59].

1.8 Zielsetzung

Der chronische Alkoholkonsum hat pathologische Konsequenzen zur Folge (Ethanol-abhängige Lebererkrankungen wie Hepatomegalie, Fettleber, alkoholische Hepatitis und Zirrhose), wobei die Mechanismen, die für die Hepatotoxizität des Alkohols verantwortlich sind, noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Auch die Rolle von TGF- β (*transforming growth factor beta*) in Hepatozyten, insbesondere unmittelbar nach einer Alkoholintoxikation, ist bislang wenig untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollten im ersten Teil genetisch modifizierte Mäuse, die über kein funktionales Gen für die Expression des Gallensäuretransporters MDR2 verfügen (MDR2 KO-Mäuse) und durch diesen Defekt basal eine leichte Leberfibrose entwickeln, in Alkohol-Dampfkammern einer definierten Alkoholmenge ausgesetzt und die schädigenden Effekte auf die Leber untersucht werden. Durch den Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Tieren sollte der Einfluss einer solchen Vorschädigung auf die Organschädigende Wirkung von Alkohol analysiert werden. Die Aufnahme des Alkohols über die Lunge (Alkoholdampfkammer) ermöglicht die Erforschung der Alkoholwirkung unter Umgehung der Magen-Darmpassage und somit ohne vermehrten Übertritt von Lipopolysacchariden (LPS) in den Blutkreislauf. Somit sollte dieser Versuchsaufbau des Weiteren ermöglichen, speziell die Rolle von LPS verglichen mit Alkohol alleine bzw. beiden Noxen zusammen zu untersuchen.

Nach Sicherstellung des Erreichens der definierten Alkoholkonzentration im Blut sollte festgestellt werden, ob und inwieweit sich durch die Alkoholintoxikation das Körpergewicht der Mäuse verändert und ob dies mit einer Lebervergrößerung (Hepatomegalie) einhergeht. So wie beim Menschen die Auswertung von Lebermarkern bei einer Blutuntersuchung zur Routine gehört, sollten bei den Mäusen verschiedene Enzymaktivitäten als Indiz auf eventuelle Leberschäden analysiert werden. Darüber hinaus sollte der Kollagengehalt der Lebern durch histologische Färbungen quantifiziert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Wirkung des Alkohols in Form von Ethanol *in vitro* durch direkte Stimulation primärer Maushepatozyten in Zellkultur untersucht werden und hier insbesondere die modulierende Rolle des Zytokins TGF- β auf die Apoptose-Induktion in diesen Zellen.

2. Material und Methoden

In vivo Experimente

2.1 Wiegen der Mäuse und LPS-Gabe



Abbildung 21: Intraperitoneale LPS-Injektion

Bildquelle: <http://www.procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse/>

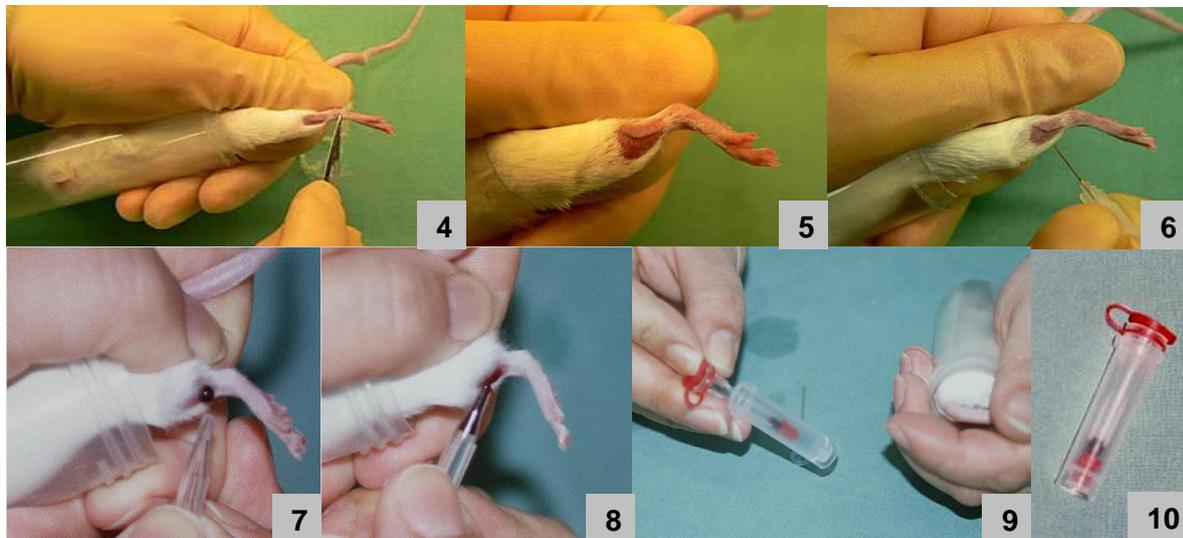
Alle Versuchstiere wurden 3 x die Woche gewogen. Dabei wurde das Tier in ein mit Streu ausgekleidetes Gefäß gelegt und das Ganze auf eine Waage platziert.

Danach wurde den Tieren der LPS-Gruppe das LPS in einer Konzentration von 10 µg LPS / 25 g Körpergewicht für 6 Wochen und 25 µg LPS / pro 25 g Körpergewicht für 2 Wochen intraperitoneal gespritzt (siehe Abb. 21).

Das LPS wurde in 0,9% Kochsalzlösung verdünnt und den Tieren in einem Volumen von 100 µl verabreicht.

2.2 Blutentnahme aus der *Vena Saphena*





Bilder aus dem Internet (Quelle unbekannt)

Abbildung 22: Blutentnahme an der *Vena Saphena*

Bildliche Darstellung (1 – 10) der Mauspräparation für die Blutentnahme an der *Vena Saphena* zur Blutalkoholkonzentrationsbestimmung.

Für die Blutentnahme zur Blutalkoholkonzentrationsbestimmung wurden folgende Utensilien (Abb.22) benötigt:

- Microvette CB 300 (System zur Kapillargewinnung)
- Einmal Kanüle (26 G)
- 50 ml Falcon Gefäß (worin Löcher eingeschnitten wurden)
- Skalpell bzw. Veet-Enthaarungscreme (nicht auf dem Bild)

Direkt nach der Alkoholbedampfung wurde die Maus fixiert, indem sie in das Falcongefäß gesetzt und ein Bein freigelegt wurde (Bild 2, 3). Nachdem das Beinchen vorher mit einer Enthaarungscreme enthaart wurde, um die *Vena Saphena* sichtbar zu machen, wurde sie mit einer Kanüle (26 G) punktiert (Bild 4 – 6). Das Blut wurde mit einer Microvette aufgesammelt (7 – 10) und bei 8000 x g für 10 min, bei 4°C zentrifugiert.

Anschließend wurde im Serum die Alkoholkonzentration nach dem „Ethanol FS[®]“ von „DiaSys (Diagnostic Systems International)“ gemessen.

2.3 Alkoholkonzentrationsbestimmung im Serum



Ethanol FS*

Diagnostic reagent for quantitative in vitro determination of ethanol in serum and plasma on photometric systems

Order information

Cat. No.	Kit size
1 0881 99 10 930	R1 4 x 20 mL + R2 2 x 10 mL
1 0881 99 90 314	R1 10 x 20 mL + R2 2 x 30 mL
1 0890 99 10 349	10 Ampoules with 1 mL Ethanol Standard 0.5 mg/mL
1 0910 99 10 349	10 Ampoules with 1 mL Ethanol Standard 1.0 mg/mL
1 0920 99 10 349	10 Ampoules with 1 mL Ethanol Standard 2.0 mg/mL
1 0930 99 10 349	10 Ampoules with 1 mL Ethanol Standard 3.0 mg/mL

Summary

The determination of ethanol belongs to the most frequent analyses in the forensic and toxicological laboratory. It serves for the diagnosis of intoxications and poisonings particularly for emergency room patients.

Method

Enzymatic UV test with alcohol dehydrogenase (ADH)

Principle

Ethanol + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{ADH}}$ Acetaldehyde + NADH + H⁺

In the presence of NAD Ethanol is converted by alcohol dehydrogenase. The measured absorbance of the produced NADH is proportional to the ethanol concentration in the sample.

Reagents

Components and Concentrations

R1: Buffer	pH 9.0	300 mmol/L
Stabilizers and preservatives		
R2: Buffer	pH 6.6	40 mmol/L
NAD		≥ 10 mmol/L
Alcohol dehydrogenase (ADH)		≥ 200 kU/L
Stabilizers and preservatives		

Storage Instructions and Reagent Stability

The reagents are stable up to the end of the indicated month of expiry, if stored at 2 – 8 °C and contamination is avoided. Do not freeze the reagents! The standards are stable up to the end of the indicated month of expiry, if stored at 15 – 25 °C. The content of the ampoules must be used immediately after opening since the indicated concentration changes due to evaporation. Opened ampoules of standards and controls can be used only once.

Warnings and Precautions

Materials required but not provided

NaCl solution 9 g/L
General laboratory equipment

Specimen

Serum and Plasma (heparin and EDTA) [3]
The stability in serum and plasma is 2 weeks at 20 - 25 °C, 6 months at 4 - 8 °C and 6 months at -20 °C. Samples must be stored tightly closed. Don't use alcohol or volatile disinfectants during ethanol measurement. Discard contaminated specimens!

Assay Procedure

Application sheets for automated systems are available on request.

Wavelength	376 nm (360 – 380 nm)
Optical path	1 cm
Temperature	37 °C
Measurement	Against reagent blank

The observance of exact measuring times and absolute equal treatment of all samples, standards and controls must be respected.

	Reagent blank	Sample / Standard
Sample / Standard	-	10 µL
Dist. water	10 µL	-
Reagent 1	1000 µL	1000 µL
Mix and incubate 5 min. at 37 °C. Read absorbance A1 then add:		
Reagent 2	250 µL	250 µL
Mix and incubate 5 min. at 37 °C. Read absorbance A2 immediately.		

$$\Delta A = (A2 - A1) \text{ Sample / Standard}$$

Calculation

One point or multi-point calibration

One-Point Calibration:

With standard 3.0 mg/mL (3.0 g/L);
Cat. No. 1 0930 99 10 349

$$\text{Ethanol [mg/mL]} = \frac{\Delta A_{\text{Sample}}}{\Delta A_{\text{Standard}}} \times \text{Conc. Standard [mg/mL]}$$

1. The reagents contain sodium azide (0.95 g/L) as preservative. Do not swallow! Avoid contact with skin and mucous membranes.
2. Please refer to the safety data sheets and take the necessary precautions for the use of laboratory reagents.

Waste Management

Please refer to local legal requirements.

Reagent Preparation

The reagents and the standards are ready to use.

Controls

For internal quality control DiaSys TruLab Ethanol should be assayed with each batch of samples.

	Cat. No.	Kit size
TruLab Ethanol	5 0900 99 10 349	10 x 1 mL

Performance characteristics

Measuring Range

The test has been developed to determine ethanol concentrations up to 3.5 g/L. When values exceed this range samples should be diluted 1+1 with NaCl solution (9 g/L) and the result multiplied by 2.

Specificity/Interferences

No interference was observed by ascorbic acid up to 30 mg/dL, bilirubin up to 60 mg/dL, lipemia up to 2000 mg/dL triglycerides, hemoglobin up to 1000 mg/dL, creatinine up to 250 mg/dL, glucose up to 2000 mg/dL, urea up to 2000 mg/dL and LDH up to 2000 U/L.

Sensitivity/Limit of Detection

The lower limit of detection is 0.1 g/L.

Precision (at 37 °C)

Intra assay n = 20	Mean [g/L]	SD [g/L]	CV [%]
Sample 1	0.51	0.01	1.67
Sample 2	0.98	0.02	1.95
Sample 3	1.99	0.01	0.66

Inter assay n = 20	Mean [g/L]	SD [g/L]	CV [%]
Sample 1	0.51	0.02	3.36
Sample 2	1.01	0.02	2.03
Sample 3	1.99	0.03	1.66

Multi-Point Calibration

The ethanol concentration of unknown samples is derived from a calibration curve using a linear algorithm. The calibration curve is obtained with four standards at different levels (see order information) and NaCl solution (9 g/L) for determination of the zero value.

Conversion factor

Ethanol [g/L] x 21.7 = Ethanol [mmol/L]

Ethanol [g/L] x 0,8 = Ethanol ‰

Method comparison

A comparison of DiaSys Ethanol FS (y) with a commercially available assay (x) using 30 samples gave following results: $y = 1.0 x + 0.1$ g/L; $r = 0.999$.

Reference Range [2]

Ethanol is present in serum and blood only after ingestion.

- 0.3 – 1.2 g/L: Slowed reflexes, diminution of attention, judgment and control
- 1.2 – 2.5 g/L: Reduced visual acuity and increased reaction time
- 2.5 – 3.5 g/L: Muscular incoordination, decreased response to stimuli
- > 3.5 g/L: Impairment of circulation and respiration, possible death

Literature

1. Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics. 1st ed. Frankfurt: TH-Books Verlagsgesellschaft; 1998. p. 1168-1170.
2. William H., Porter Ph.D. Clinical Toxicology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1999. p. 922-923.
3. Guder WG, Zawta B et al. The Quality of Diagnostic Samples. 1st ed. Darmstadt: GIT Verlag; 2001; p. 28-9.

Manufacturer

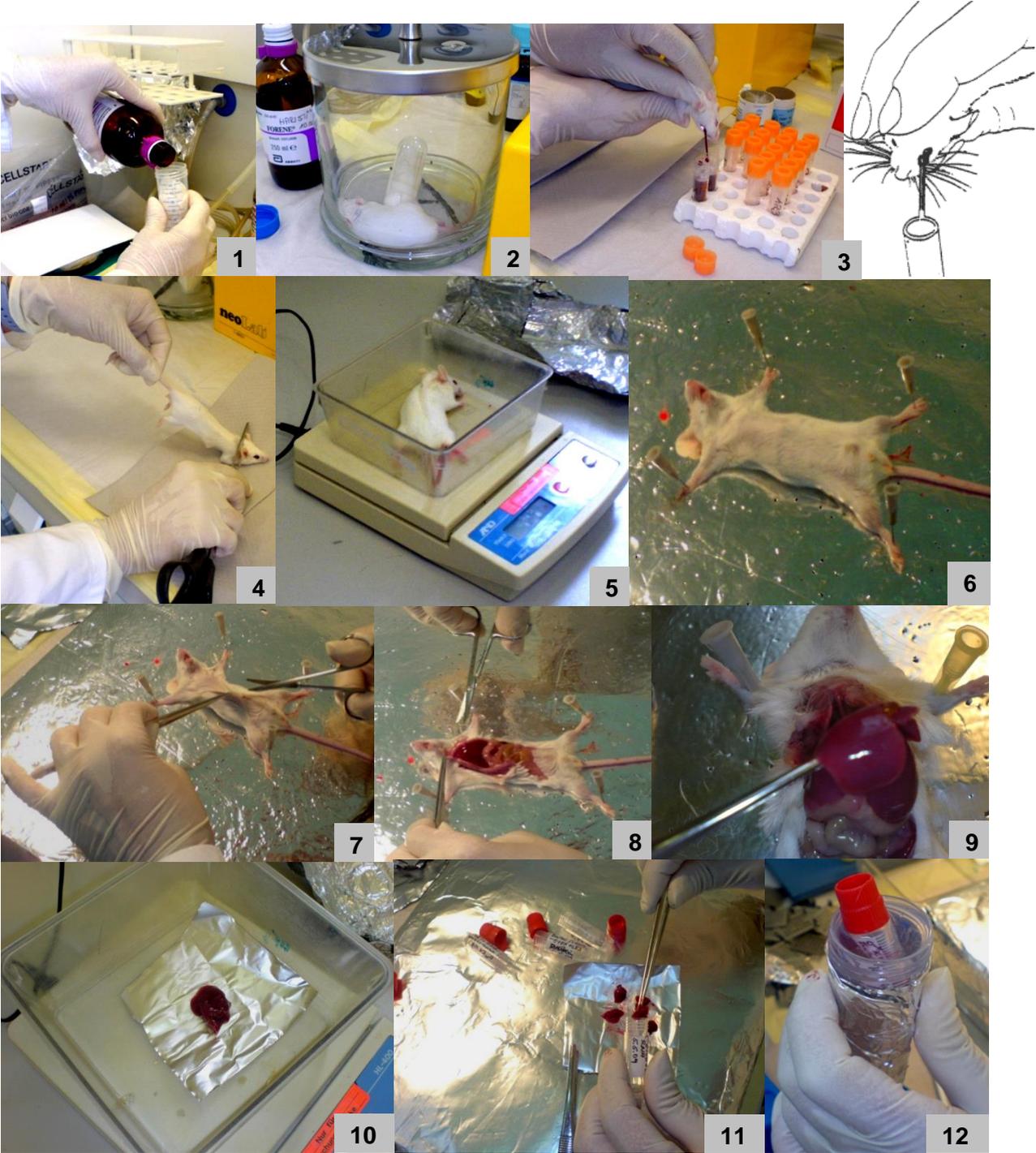
DiaSys Diagnostic Systems GmbH
Alte Strasse 9 65558 Holzheim Germany

Abbildung 23: Messung der Blutalkoholkonzentration nach Ethanol FS®

Protokoll nach dem die Alkoholkonzentration im Serum der Mäuse gemessen wurde. Quelle:

<http://diasystem.se/package%20inserts%20hemsida/Clinical%20Chemistry/PI-e-Ethanol%20FS-7.pdf>

2.4 Asservierung der Leber und Blutentnahme aus dem Auge



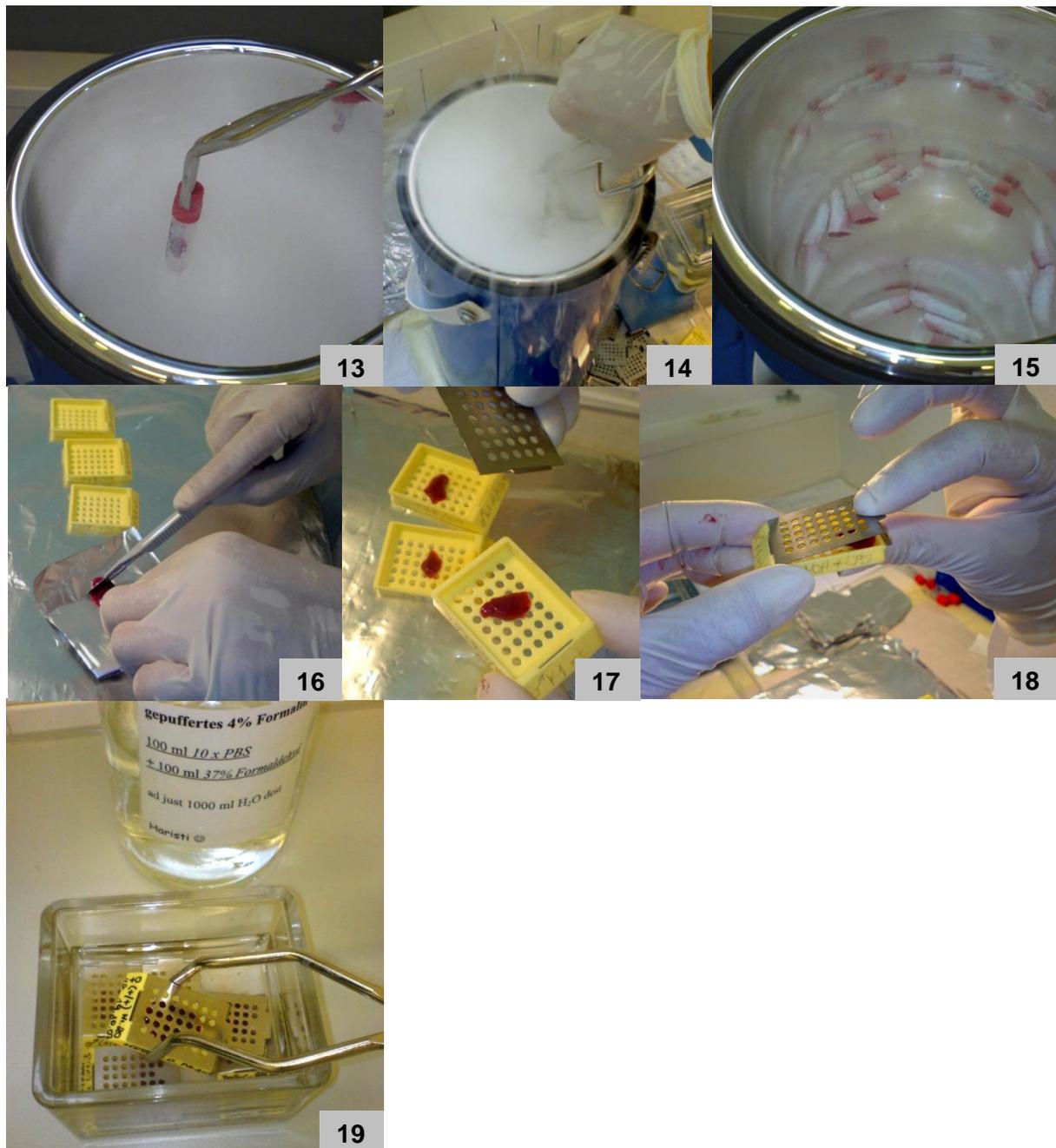


Abbildung 24: Die schrittweise Assevierung der Leber nach Abschluss der Alkoholbedampfung

Betäubung der Maus (1, 2); Retrobulbäre Blutentnahme (3); zervikale Dislokation (4); Wiegen (5), Fixieren (6) und Sezieren (7, 8, 9) der Maus; Wiegen (10) und Transfer der Leber in Kryotubes (11); Einlegen in 2-Methylbutan (12); Einfrieren in flüssigem Stickstoff (13, 14, 15); Platzierung der Leber in „Schlitten“ zur Leberhistologie (16, 17, 18); Einlegen in 4%-ig gepuffertem Formalin (19)

Nachdem die Tiere 8 Wochen lang mit Alkohol bedampft wurden, wurde ihnen die maximale Menge an Blut abgenommen. Nach dem Töten wurde die Leber herauspräpariert und für weitere Experimente asserviert, wie folgt:

1. Isofluran wurde tröpfchenweise in ein mit einem Taschentuch ausgefülltes 50 ml –Falcon Gefäß gegeben. Da es sich um ein volatiles Anästhetikum handelt, wurde die Betäubung und Blutabnahme unter einem Abzug durchgeführt.
2. Das Falcon Gefäß und die Maus wurden in ein geschlossenes Glasgefäß gelegt.
3. Nach ungefähr 30 sec wurde aus dem Auge der betäubten Maus mit einer Einmal-Mikropipette (Blaubrand[®]) Blut abgenommen und in Li-Heparin Microvetten (Sarstedt) gesammelt. Die Microvetten wurden nach mehrmaligem schwenken auf Eis gestellt um dann bei 8000 x g für 10 min, bei 4°C für die Gewinnung des Serums zentrifugiert zu werden.
4. Nach erfolgreicher Blutentnahme wurde die Maus durch zervikale Dislokation getötet.
5. Das Gewicht des Tieres wurde durch einfaches Wiegen bestimmt
6. Die Maus wurde zum Sezieren mit 4 Kanülen auf eine Styroporunterlage fixiert.
7. 8. 9. Nachdem die Bauchdecke aufgeschnitten wurde, wurde die Leber nach Durchtrennen der Leberfortader freigelegt.
10. Das Gewicht der Leber wurde bestimmt und diese dann in kleine Stücke geschnitten (11)
12. Nachdem die Leberstücke in Kryotubes transferiert wurden, wurden sie zuerst in 2-Methylbutan und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren, zur Isolation von RNA. (13, 14, 15)
16. Weitere Leberstücke wurden zu Zwecken der Leberhistologie in größere Teile geschnitten, in Schlitten platziert (17 + 18) und in 4%ig gepuffertes Formalin gelegt (19).

2.5 Bestimmung der Leberwerte

Um verschiedene Leberwerte, wie ALT, AST, ALP, LDH, Cholesterol, Cholinesterase, Triglycerinwerte, Glucose, Bilirubin, Amylase und Lipase zu bestimmen wurde den Tieren alle zwei Wochen jeweils 300µl Blut aus dem Auge entnommen und mit Hilfe des „Hitachi-Systems“ [64] die jeweilige Enzymaktivität bestimmt.

2.6 Leberhistologie

Nach dem Einlegen der Lebern in 4%-ig gepuffertem Formalin wurden sie am nächsten Tag zur Dehydrierung in ein „Autotechnikon“ überführt (Automatische Gewebeeinfiltration [65]) und später in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinblöcke wurden für ein paar Stunden in -20°C gestellt und danach wurden $3\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt.

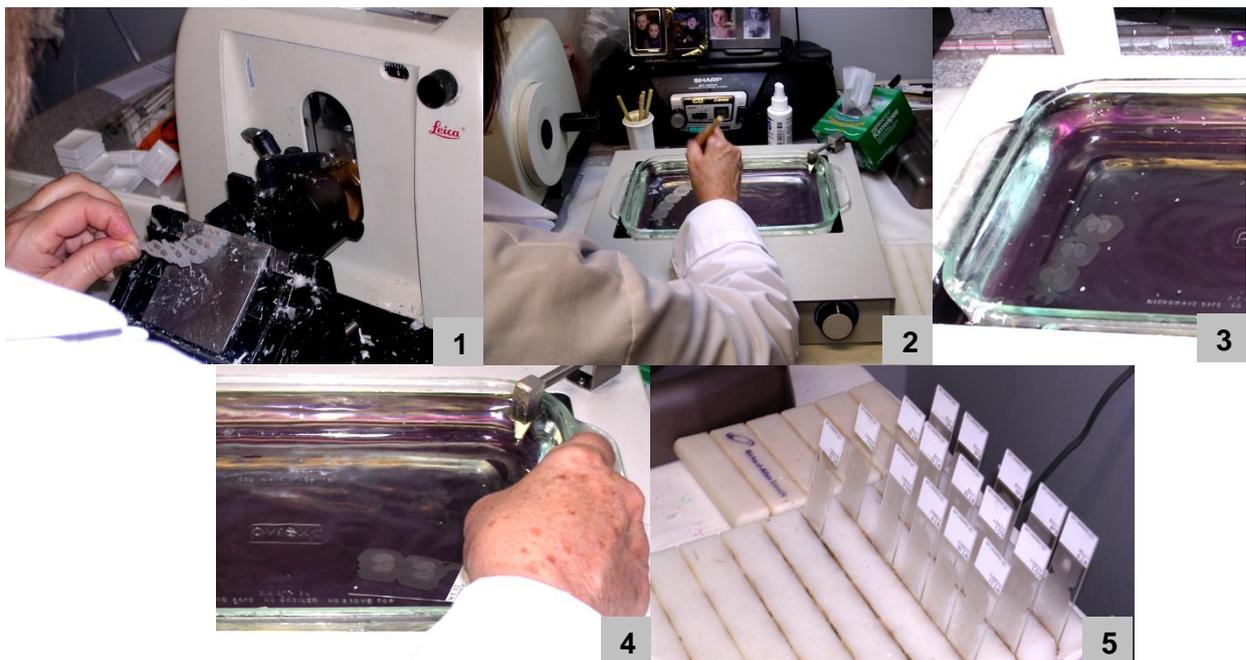


Abbildung 25: Histologische Schnitte am Mikrotom

Mikrotomschnitte am Paraffinblock (1); Platzieren der Schnitte im Wasserbad (2,3); Auffangen mit Objektträger (4); Trocknen (5)

Bilder aus einem Labor der Cleveland-Clinic in Ohio USA.

1: Der Paraffinblock wurde am Mikrotom eingespannt und auf $3\mu\text{m}$ gestellt

2 + 3: Die entstandenen Schnitte wurden vorsichtig in einem Wasserbad bei 42°C ausgedehnt, mit einem Objektträger aufgefangen (4) und zum Trocknen aufgestellt (5).

2.7 Sirius Rot Färbung

Für die Sirius Rot Färbung wurden die histologischen Leberschnitte auf den Objektträgern wie folgt behandelt:

- Objektträger 10 Minuten bei 60°C *de-paraffinisiert*
- 3 x 10 Minuten in Xylol um das Paraffin auszuwaschen
- 2 x 10 Minuten in 100% Ethanol um das Xylol auszuwaschen
- 1 x 10 Minuten in 95% Ethanol
- 1 x 10 Minuten in destilliertem Wasser um den Alkohol auszuwaschen
- 10 – 15 Minuten in Sirius Rot-Lösung (100ml Pikrinsäure + 0,1g Sirius Rot pulver)
- Für ein paar Sekunden in Ethanol getaucht
- Schnitte in Malinol eingebettet

In vitro Experimente

2.8 Isolation von Maushepatozyten

Aus 8 – 13 Wochen alten Mäusen der Linie C57/BL – 6 wurden Hepatozyten wie folgt gewonnen:

Narkose:

0,8 ml Rompun ® 2% (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	} davon jeweils 0,1ml pro 10g Maus
1,2 ml Hostaket ® 10% (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml)	
8 ml steriles NaCl (0,9%)	

Perfusion mit EGTA und Kollagenase Puffer

Grundsätzliche Information

Alle chirurgischen Instrumente, Tubes, Puffer, wurden autoklaviert. Alles was mit den Hepatozyten in Kontakt kam musste steril und auf 37°C vorgewärmt sein. Die Fließgeschwindigkeit für EGTA und den Kollagenasepuffer sollte ~ 10 ml/min betragen.

Perfundiert wurde die Vena Cava Superior (Vena portae abgeschnitten) mit 150 ml EGTA Puffer und anschliessend mit 50 ml Kollagenasepuffer was 20 mg Kollagenase Typ: CLSII; 317 U/mg enthielt.

EGTA Puffer*

- **124 ml Glukose Lösung** (9g D-Glucose/L)
- **20 ml KH Puffer** (60g NaCl/L, 1,75g KCL/L und 1,6g KH₂PO₄/L; mit NaOH auf pH 7,6 bringen)
- **20 ml Hepes Puffer** (60g HEPES mit NaOH auf pH 8,5 bringen)
- **30 ml Aminosäurelösung** (0,27g/L L-Alanin, 0,14g/L Aspartinsäure, 0,4g/L L-Asparagin, 0,27 g/L L-Citrullin, 0,14g/L L-Cystein, 1,0 g/L L-Histidin, 1,0g/L L-Glutaminsäure, 1,0g/L L-Glycin, 0,40 g/L L-Isoleucin, 0,8g/L-Leucin, 1,30 g/L L-Lysin, 0,55 g/L L-Methionin, 0,65 g/L L-Ornithin, 0,55g/L L-Phenylalanin, 0,55g/L L-Prolin, 0,65 g/L L-Serin, 1,35 g/L L-Threonin, 0,65g/L L-Tryptophan, 0,55 g/L L-Tyrosin, 0,80 g/L L-Valin, bei Aminosäuren die nicht bei neutralem pH in Lösung gehen, 10 N NaOH zugeben und anschliessend mit HCL auf pH 7,6 bei 37°C bringen.)
- **2,0 ml Glutaminlösung** (7g L-Glutamin/L; frisch angesetzt)
- **1,0 ml Insulinlösung** (2g Insulin/L gelöst in 1 n, mit HCL auf pH 7,6 bringen; frisch ansetzen)
- **0,8 ml EGTA Lösung** (47,5g EGTA/L; gelöst in NaOH, mit HCL auf pH 7,6 bringen)

Kollagenasepuffer*

- **155 ml Glukoselösung**
- **25 ml KH Puffer**
- **25 ml HEPES Puffer**
- **38 ml Aminosäurelösung**
- **1,2 ml Insulinlösung**
- **10 ml CaCl₂ Lösung** (19g CaCl₂ · 2 H₂O/L)
- **2,5 ml Glutaminlösung**

Auf 50 ml Kollagenasepuffer kommen 20 mg Kollagenase Typ:CLSII (steril filtriert).

Nach der Perfusion wurde die Leber vom Tier und die Leberklemme mit Hilfe einer Pinzette entfernt, und vorsichtig in Suspensionspuffer getrennt.

Suspensionspuffer*

- **620 ml Glukoselösung**
- **100 ml KH Puffer**
- **100 ml HEPES Puffer** (auf pH 7,6 bringen; ohne Carbogenequibrierung)
- **150 ml Aminosäurelösung**

- **5 ml Insulinlösung**
- **8 ml CaCl₂ Lösung**
- **10 ml Glutaminlösung**
- **4 ml MgSO₄ (24,6g/L MgSO₄ · 7 H₂O)**
- **2 g BSA/L**

Die Lebersuspension wurde durch eine Gaze mit 100 µm Porengröße filtriert und für 5 min bei 50 x g zentrifugiert.

Es wurde zweimal mit Suspensionspuffer gewaschen, wieder zentrifugiert und in 30 ml Suspensionspuffer resuspendiert. Daraus wurden 100 µl entnommen, mit 100 µl Trypan Blue (0,4%) verdünnt und die Zellen mit Hilfe der Neubauer Kammer gezählt.

Die Zellkonzentration errechnete sich aus:

$$N (\text{Anzahl der gezählten Zellen}) \times 2 \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

*(beschrieben nach [Hengstler et.al.,2000](#))

2.9 Kultur von Maus-Hepatozyten auf Kollagenbeschichtung

2.9.1 Ausplattieren der Hepatozyten

Hepatozyten wurden auf Kollagenbeschichteten Kulturschalen in FCS Zellmedium (s.u) ausplattiert. Für 9 cm (Durchmesser) Kulturschalen wurden Hepatozyten mit einer Dichte von 5×10^6 Zellen/Schale in 10 ml FCS-Kulturmedium ausplattiert. Für 6-well-Platten wurden 1×10^6 Zellen/Schale in 3 ml FCS-Kulturmedium ausplattiert.

FCS-Zellkulturmedium: Zusatz von William's Medium E mit

- 10% FCS
- 10 µM Insulin (I-6634; 28,5 IU/mg insulin)
- 100 nM Dexamethason
- 2 mM L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung

2.9.2 Kultivierung der Hepatozyten

Die Zellen wurden zunächst in einem befeuchteten Inkubator (5% CO₂) bei 37 °C für 4 h kultiviert. Danach waren die Hepatozyten an den Kollagenbeschichteten Platten angeheftet und das FCS Zellkulturmedium wurde gegen serumfreies Zellmedium ausgetauscht.

Serumfreies Zellkulturmedium wurde bei Wachstumsfaktorstudien und zur Analyse von Signaltransduktionswegen benötigt.

Serumfreies-Zellkulturmedium: Zusatz von William's Medium E mit

- 100 nM Dexamethason
- 2 mM L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin Lösung

2.10 Ethanol- und TGF- β -Behandlung auf Maushepatozyten

Protokoll:

Eingesetzte -

-Ethanol Konzentration: 150mM = **17,5 μ l EtOH** (99%) in 2 ml Medium

-TGF- β Konzentration: 5ng/ml = **1 μ l TGF- β** (vom 10ng/ μ l Stock) in 2 ml Medium

Williams Medium Nr.1: + 50ml FCS (fetal calf serum)

+ 500 μ l Dexamethason

+ 5 ml L-Glutamin

+ 5 ml Streptomycin

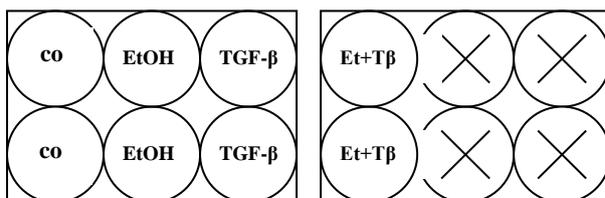
Williams Medium Nr.3: + 5 ml L-Glutamin

+ 5 ml Streptomycin

Zum Waschen: Hank's BSS (ohne Ca & Mg und Phenol red)

Day 0: (0 hours)

Ausplattieren der Maushepatozyten in Medium No 1. (auf 6 well Platten mit Duplikaten)



Mediumwechsel 1 nach 4 Stunden und Waschen der Zellen (Hanks BSS).

Stimulation mit Ethanol (EtOH), TGF- β und beide zusammen wie folgt:

Nach 4 Stunden Attachment:

- co: 2 ml Medium 3/well → 2 wells: 4ml Medium 3
- EtOH: 2 ml Medium 3 + 17,5µl EtOH (absolute)/ well → 2 wells: 4ml Medium 3 + 35µl EtOH
- TGF-β: 2 ml Medium 3 + 1µl TGF- β / well → 2 wells: 4 ml Medium 3 + 2 µl TGF- β
- Et+Tβ: 2 ml Medium 3 + 17,5µl EtOH + 1µl TGF- β /well → 2wells: 4 ml Medium 3 + 35µl EtOH + 2 µl TGF- β

Um das Evaporieren des Alkohols zu vermeiden wurden die Platten mit Parafilm bedeckt.

Kultur über Nacht bei 37°C and 5% CO₂

Tag 1: (24 Stunden)

Nur Stimulation: mit EtOH, TGF-β und beiden zusammen direkt ins Medium!!!Kein Mediumswechsel. Weiterhin Parafilm.

Zum Beispiel:

- co: nur Medium
- EtOH: 17,5 µl pro well (direct ins Medium)
- TGF-β: 1µl TGF-β pro well
- Et+Tβ: 17,5 µl + 1µl TGF-β pro well
- Über Nacht bei 37 °C und 5% CO₂

Tag 2: (nach 48 Stunden)

Waschen der Zellen mit Hank's BSS (2ml /well)

Und: - für die RNA Isolation Zugabe von 200 µl RNA Lysispuffer / well

- für die Protein Isolation Zugabe von ~ 70 – 100 µl Proteinlysispuffer / well

2.11 RNA-Isolation

2.11.1 RNA-Lysate

Um RNA-Lysate herzustellen wurde pro well (6-well-Platte) je 300 µl Lysispuffer dazugegeben. Anschließend wurden die Hepatozyten mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Es wurden anschliessend noch 200 µl HBSS auf die wells gegeben und nochmal abgeschabt.

RNA Lysispuffer:

4,5 M Guanidinhydrochlorid [95,53 g/mol]

50 mM Tris-HCl [121,14 g/mol]

30% Triton-X-100 (w/v)

pH = 6,6

Herstellung:

Die Salze wurden in einen 100 ml großen Zylinder mit etwas DEPC Wasser gelöst. Anschliessend wurde unter Rühren das Triton-X-100 dazu gegeben. Durch HCl-Zugabe wurde der pH-Wert eingestellt und anschliessend mit DEPC Wasser aufgefüllt.

Die RNA wurde aus den Hepatozyten, die sich in Lysispuffer befanden mithilfe des „High Pure RNA Isolation Kit“ von Roche isoliert.

Benutzte Reagenzien:

Lysis/Bindungspuffer

- 25 ml
- [4,5 M guanidine-HCl, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton-X-100 (w/v), pH 6,6 (25°C)]

Dnase I, rekombinant, lyophilisiert

- 10 KU lyophilisierte Dnase I
- Resuspendiert in 0,55 ml Elutionspuffer

Dnase Inkubationspuffer

- 10 ml
- [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl und 10 mM MnCl₂, pH 7,0 (25°C)]

Waschpuffer I

- 33 ml (vor dem ersten Gebrauch plus 20ml Ethanol hinzugeben)
- 5 M guanidin hydrochlorid und 20 mM Tris-HCl, pH 6,6 (25°C)]

Waschpuffer II

- 10 ml (plus 40 ml Ethanol vor dem ersten Gebrauch)
- [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7,5 (25°C)]

Elutionspuffer

- 30 ml
- Nucleasefreies, doppeldestilliertes Wasser

Anschliessend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

2.11.2 RNA-Agarosegel

Stocklösung für Natriumacetat und EDTA

- Natriumacetat-Trihydrat 1M

M=136,08 g/mol

Herstellung von 100ml (1M) Lösung plus 13,6g NaOAc (1M) in destilliertem H₂O

- EDTA

M=372,24g/mol

Herstellung von 100ml (0,5M) Lösung plus 18,69g EDTA (1M) in destilliertem H₂O

Für 1x MOPS Puffer werden 8mM NaOAc benötigt → für 5x MOPS Puffer = 40mM NaOAc

Wir verwenden für 1L 5x MOPS Puffer 40 ml von den 100ml NaOAc 1M

5x MOPS Puffer

Für 1 Liter Puffer : - 40 ml Natriumacetat-Trihydrat (40mM)

- 10 ml EDTA (0,5 M)

Mit HCl auf pH 7 bringen

- Zugabe von destilliertem H₂O bis 800 ml (750 ml)

- 810 µl DEPC (unterm Abzug!)

Die Flasche wird über Nacht im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

- 20,6 g MOPS

Mit NaOH auf pH 7 bringen

Zugabe von destilliertem H₂O bis 1 Liter

Autoklavieren

Aufbewahrung bei 4°C in Aluminiumfolie.

10x Ladepuffer

- 7,5 ml Glycerol (steril)
- 30 µl EDTA 0,5M
- 60 mg Bromphenolblau
- 60 mg Xylen-Cyanol
- 7 ml DEPC H₂O

Tube dunkel und bei 4°C aufbewahren.

(DEPC H₂O → 1ml DEPC in 1 Liter H₂O, über Nacht bei Raumtemperatur stehen lassen.
Autoklavieren, bei 4°C aufbewahren)

RNA-Denaturierungspuffer

Unterm Abzug:

- 238µl 5x MOPS-Puffer
- 208µl Formaldehyd
- 595µl Formamide
- 6µl Ethidiumbromid
- 54µl DEPC H₂O
- 119µl 10x Ladepuffer

Tube dunkel und bei 4°C aufbewahren

1x MOPS-Puffer

- 100ml 5x MOPS-Puffer
- 400ml destilliertes H₂O

Herstellen des Agarosegels

Für ein grosses Gel wurde 1g Agarose in 70ml destilliertem H₂O aufgeköcht.

Unter dem Abzug erfolgte die Zugabe von 20 ml 5x MOPS und 8 ml Formaldehyd.

Das noch flüssige Gel wurde in die Gelkammer gegossen und eventuelle Luftblasen mit einer Pipettenspitze beseitigt. Das Gel wurde in ca. 30 min fest und danach in den Gelschlitten gelegt. Der Gelkamm wurde herausgerausgezogen und der Schlitten mit 1x MOPS-Puffer aufgefüllt. Die Geltaschen wurden mit 1x MOPS-Puffer vom Formaldehyd ausgewaschen.

Anfertigung der Proben

Pipettiert wurde auf Eis.

Es wurden x μg RNA (meistens 500ng) plus das 4-fache des Endvolumens RNA-Denaturierungspuffer dazu gegeben. Das Ganze wurde gevortext und abzentrifugiert.

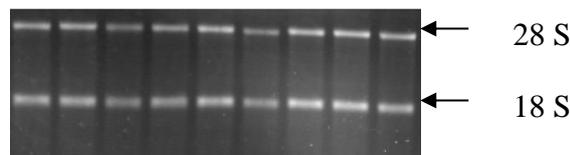
Die Proben wurden für 10 min auf 68°C erhitzt um eventuelle Sekundärstrukturen zu denaturieren. Anschliessend wurde abzentrifugiert. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis aufbewahrt.

Gelelektrophorese

Die Taschen wurden mit den Proben beladen und bei 70 Volt für ungefähr 1 Stunde Laufzeit angeschlossen.

Erwartet werden 2 Banden ribosomale RNA: 28S und 18S die scharf zu sehen und in jeder Spur gleich stark sein sollten. Diffuse Banden („Schmier“) deuten auf Degradation hin und Unterschiede in der Bandenstärke bedeuten, dass die Konzentrationsmessung fehlerhaft war.

Beispiel für ein Formaldehyd-RNA-Gel



2.12 Umschreiben von RNA in cDNA

Die Umschreibung der gesamt-RNA in cDNA erfolgte mithilfe des „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit“ von Roche.

Verwendete Reagenzien:

Transkriptor Reverse Transkriptase Reaktionspuffer

- 5x konz.: 250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl₂, pH ~ 8,5 (25°C)
- Einsatz: 4 μl x Probenanzahl

Protector Rnase Inhibitor

- 40 U/ μl
- Aufbewahrungspuffer: 20 mM HEPES-KOH, 50 mM KCl, 8 mM Dithiothreitol, 50% Glycerol (v/v), pH ~ 7,6 (bei 4°C)
- Einsatz: 0,5 μl x Probenanzahl

Deoxynukleotid-Mix

- 100 µl (10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Einsatz: 2 µl x Probenanzahl

Transkriptor Reverse Transkriptase

- 20 U/µl
- Aufbewahrungspuffer: 200 mM Kaliumphosphat, 2 mM Dithiothreitol, 0,2% Triton-X-100 (v/v), 50% Glycerol (v/v), pH ~ 7,2
- Einsatz: 0,5 µl x Probenanzahl

Die Proben wurden für 1 h auf 50°C und zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 5 Min auf 85°C erhitzt.

2.13 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Es wurde der „FastStart High Fidelity PCR System“ Kit von der Firma Roche benutzt.

Pipettieransatz:Destilliertes autoklaviertes Wasser

- 12,7 µl x Probenanzahl

FastStart High Fidelity Reaktionspuffer, 10x konzentriert mit 18 mM MgCl₂

- 1 ml (125 U)
- 2 x 1 ml (500 U)
- 6 x 1 ml (2500U)

dATP, dCTP, dGTP, dTTP

- 0,2 µl x Probenanzahl

FastStart High Fidelity Enzyme Blend (5 U/µl)

- 25 µl (125 U)
- 2 x 50 µl (500 U)
- 10 x 50 µl (2500 U)
- Enzym Gemisch Aufbewahrungspuffer: 20 mM Tris-HCl, 1 mM Dithiothreitol, 0,1 mM EDTA, 0,1 M KCl, 0,2% Tween 20 (v/v), pH 9,0 (bei 25°C)
- 0,1 µl x Probenanzahl

PCR Programm

1. 95°C, 00:05:00 min
2. 95°C, 00:00:30 min
3. 57°C – 60°C, 00:00:30 min
4. 72°C, 00:01:15 min
5. Zyklenzahl (meist 30)
6. 72°C, 00:07:00
7. Inkubation bei 4°C.

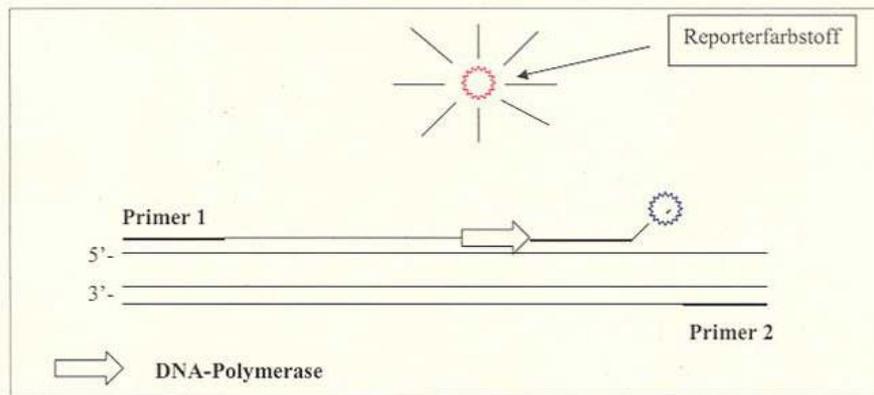
2.14 Real time PCR

Die Real Time PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt (Fluoreszenz-Energietransfer, FRET).



Markierte Hybridisierungssonde

Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren.

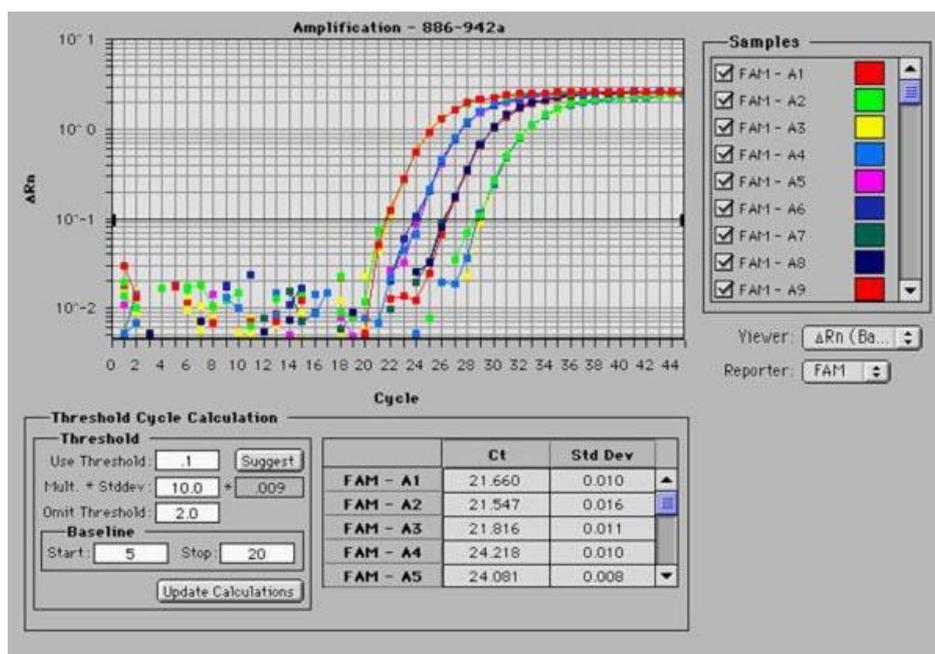


Reporterfarbstoff emittiert Fluoreszenzlicht

Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional.

Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten CT-Wert ("threshold cycle"). Der CT-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird.

Ermittlung des CT-Wertes



Standardreihe mit bekannten DNA-Mengen



Erstellung einer Standardkurve

Der entscheidende Vorteil der real-time PCR im Vergleich zur konventionellen PCR ist dass mittels real-time PCR quantitative Aussagen über die Expression der Zielgen-RNA getroffen werden können. Mittels konventioneller PCR ist dies nur sehr begrenzt möglich.

2.15 Western Blot

Protein-Lysate

Um Proteinlysate herzustellen wurde pro 6-well 70 - 150 µl RIPA-Proteinlysispuffer (Roche) zugegeben, 5 min bei RT inkubiert und die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgeschabt.

RIPA Puffer:

Tris	50 mM (6,050 g)
NaCl	250 mM (14,610 g)
Nonidet P 40	2% (v/v) (20,0 ml)
EDTA-Na	2,5mM (0,93 g)
SDS	0,1% (w/v) (1,0 g)
DOC	0,5%

pH = 7,2

Herstellung:

Zur Herstellung des RIPA- Proteinpuffers wurden Tris, NaCl und EDTA-Na eingewogen und in 600 ml H₂O unter Einstellung des pH-Wertes, gelöst. Anschliessend wurden das SDS und DOC dazugegeben und der pH-Wert eingestellt. Danach wurde Nonidet P 40 dazugegeben

und auf 1000 ml unter pH-Wert Einstellung, aufgefüllt. Es wurden je 50 ml-Aliquots hergestellt und bei -20°C aufbewahrt.

Zu 50 ml aufgetautem Puffer wurde 1 Tablette *Complete Protease Inhibitor cocktail tablet* von Roche dazu gegeben. Daraus wurden 5 ml entnommen und 50 µl *Phosphatase Inhibitor cocktail II* von Sigma zugegeben.

Die Proteinlysate wurden nach dem „Ernten“ für 10 Minuten auf 4°C bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschliessend aliquotiert und die Proteinkonzentration wurde photometrisch (690-750 nm / TECAN) bestimmt.

Als Gel wurde das „NuPAGE Novex Bis-Tris Gel“ von Invitrogen verwendet.

Zu den Proben wurde RIPA, 1 M 1,4 Dithiothreitol und Loading Buffer (4X + 200 mM 1,4 Dithiothreitol) zugegeben und abzentrifugiert. Danach wurden sie für 10 min auf 70°C gestellt (shaken).

Es wurde anschliessend 25 ml 20X Laufpuffer (NuPAGE Mops SDS) auf 500 ml mit Wasser aufgefüllt. Bei den Gelen wurden die Kämme entfernt und die Taschen mit dem Laufpuffer gewaschen. Die Proteinproben wurden schliesslich in die Taschen pipettiert und der Laufpuffer wurde von 1/3 des Bodens her aufgefüllt. (Lauf: 150 V, 75 min)

Semi-dry Transfer-Verfahren

Für das Blotten wurde Papier zurechtgeschnitten: 15x Whatman (Grösse wie Gel), 1x Nitrozellulose (Hybond C, Grösse wie Gel) und 4 Schalen vorbereitet: 1x Anoden-Lsg. 1, 1x Anoden-Lsg. 2, 2x Kathoden-Lsg. Es wurde Nitrozellulose in Anoden-Lsg. 2 equilibriert (ca. 20min) und die Graphitplatten gewässert. Anschließend wurde das Gel zurechtgeschnitten und für 5min. in Kathoden-Lsg. equilibriert.

Das Whatman-Papier wurde genässt: 6 Stück in Anode 1, 3 Stück in Anode 2, 6 Stück in Kathode und der Blot Blasen-frei auf der Anodenplatte (+) aufgebaut:

- Whatmans Anode 1
- Whatmans Anode 2
- Nitrozellulose
- Gel



- Whatmans Kathode

Die Kathodenplatte wurde aufgelegt und der Strom angeschlossen: ca. 1mA/cm² (kleines Gel: 50mA), ca. 1h

Protein-Detektion

Der Marker wurde angezeichnet, der Blot mit Ponceau-Rot gefärbt und mit Wasser abgewaschen. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde der Blot 30min in Blockmilch inkubiert. Danach wurde der 1. Antikörper* in Milch drauf gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3x 10min mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurden 10ml frische Blockmilch für 10min auf den Blot gegeben und danach der 2. Antikörper in PBS. Das Ganze inkubierte auf dem Shaker bei Raumtemperatur für 45min.

Danach wurde ebenfalls 3x 10min mit PBS-Tween gewaschen.

Es wurden je 1ml ECL A mit ECL B (Amersham) gemischt, 5min auf den Blot gegeben und anschließend mit dem LAS 1000 (Raytest) detektiert.

Lösungen

Blockmilch: 5% Magermilchpulver (w/v) in PBS-Tween

PBS-Tween: 1x PBS + 0,5% Tween 20

Antikörper:

* [CTGF (Santa Cruz), Phospho-Akt (Cell Signaling), Bcl-2 (Cell signaling), Cleaved Caspase-3 (Cell signaling), GAPDH (Santa Cruz), Phospho-Akt (Cell signaling), TGFβ RII (Santa Cruz), Cytochrome C (Cell Signaling), Albumin (abcam), Phospho Smad 1/3 (Biomol)]

2.16 LDH-Assay

Es wurde der “Cytotoxicity Detection Kit“ (LDH) von Roche Applied Science verwendet.

Der Cytotoxizitäts-Detektions-Kit erfasst kolorimetrisch die Zytotoxizität/ Zytolyse durch Messung der LDH-Aktivität aus geschädigten Zellen.

Es wurde genau nach dem Protokoll von Roche-Applied-Science [66] verfahren.

2.17 Apoptose – Assay

Hierfür wurde der Cell-death – ELISA-Kit von Roche verwendet, der die Histon-Komplexe der DNA Fragmente quantifiziert, die nach Induktion von Apoptose oder Nekrose aus dem Zytoplasma der Zellen austreten.

Es wurde nach dem Protokoll aus dem „Cell-death-detection-Kit“ von Roche [67] verfahren.

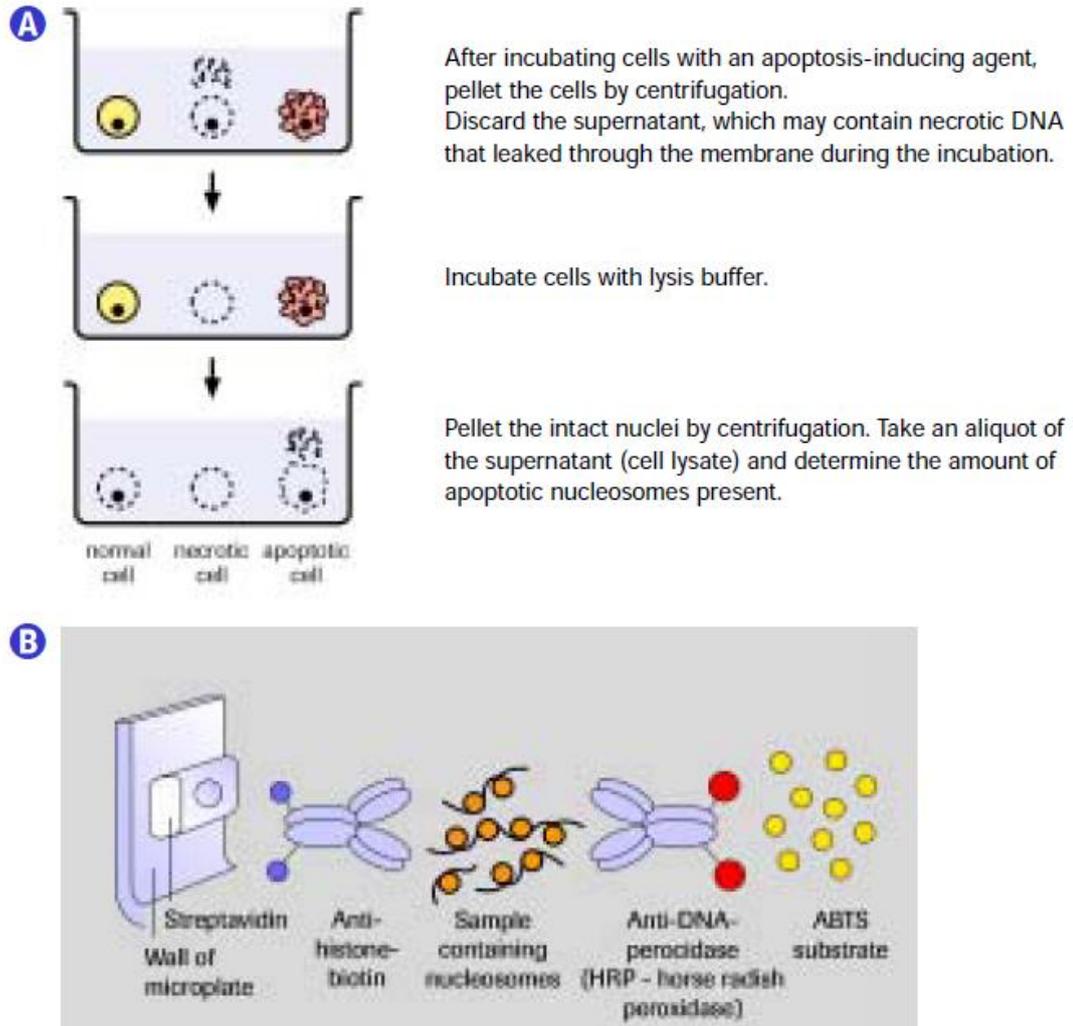


Abbildung 26: Aus dem Cell Death Detection ELISA PLUS

Das Prinzip, nach dem der ELISA Kit funktioniert

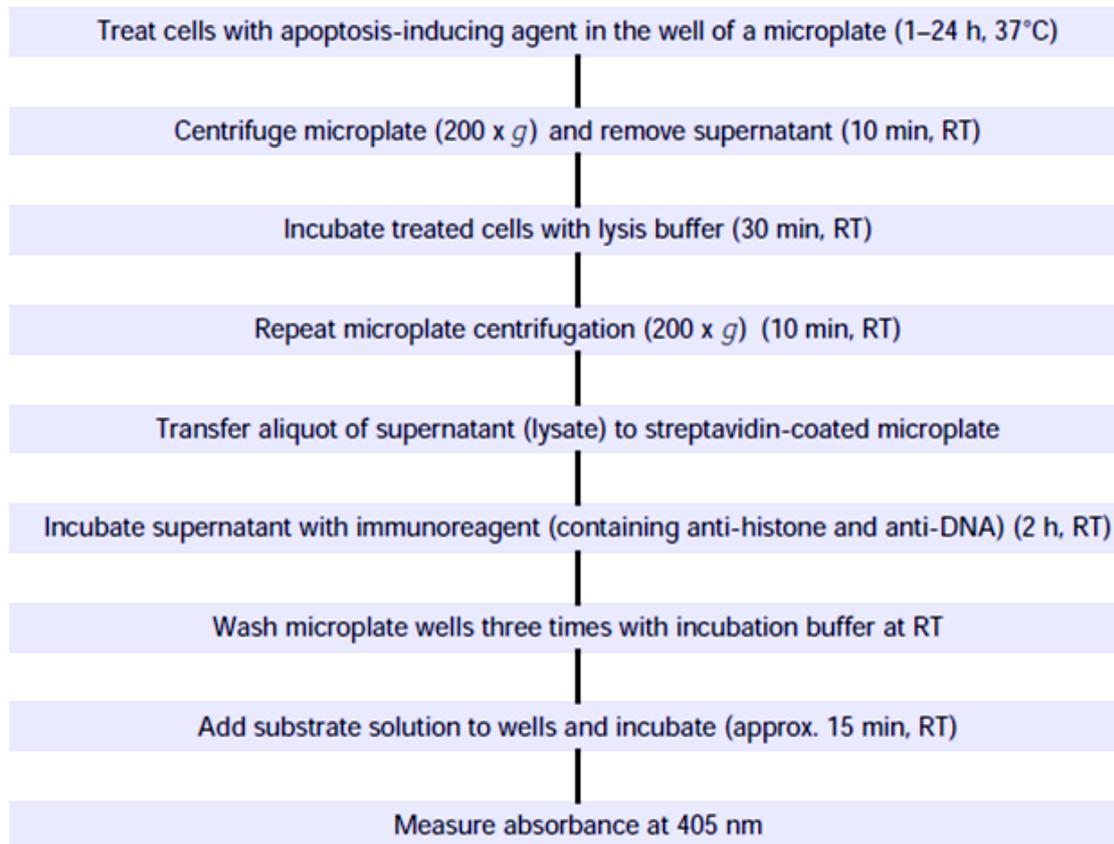


Abbildung 27: Aus dem Cell Death Detection ELISA PLUS

Probenaufbereitung nach dem Protokoll von Roche.

2.18 CAGA-Assay

- Ausplattieren von 20.000 Zellen pro well einer 96-well Platte (Medium mit Zusätzen), Mediumwechsel nach 4 Stunden (Medium ohne Zusätze, 10% FCS)
- Am nächsten Tag Zellen mit 50000 infektiösen Partikeln pro Zelle infizieren: Medium absaugen, 2x mit HBSS waschen, Zugabe von 50µl Medium (+ 5% FCS + Virus) pro well
- Nach 2 Stunden Zellen 2x mit HBSS waschen. Zusatz von 0.5% FCS-Medium, 100 µl/well
- Am nächsten Tag stimulieren (50 µl 0.5 % Medium +/- Stimulanz pro well)
- Nach der erforderlichen Zeit (3 – 24 Stunden) 50 µl Lysisbuffer (bei Raumtemperatur) (steady glo von Promega) zu jedem Well zugeben und 10 min warten.
- Messung der Luciferase Aktivität am Luminometer.

2.19 Mitochondrien-Isolation

Für die Aufreinigung von Mitochondrien aus Eukaryotischen Zellen wurde der „Qproteome Mitochondria Isolation Kit“ von QIAGEN® verwendet.

Protokoll:

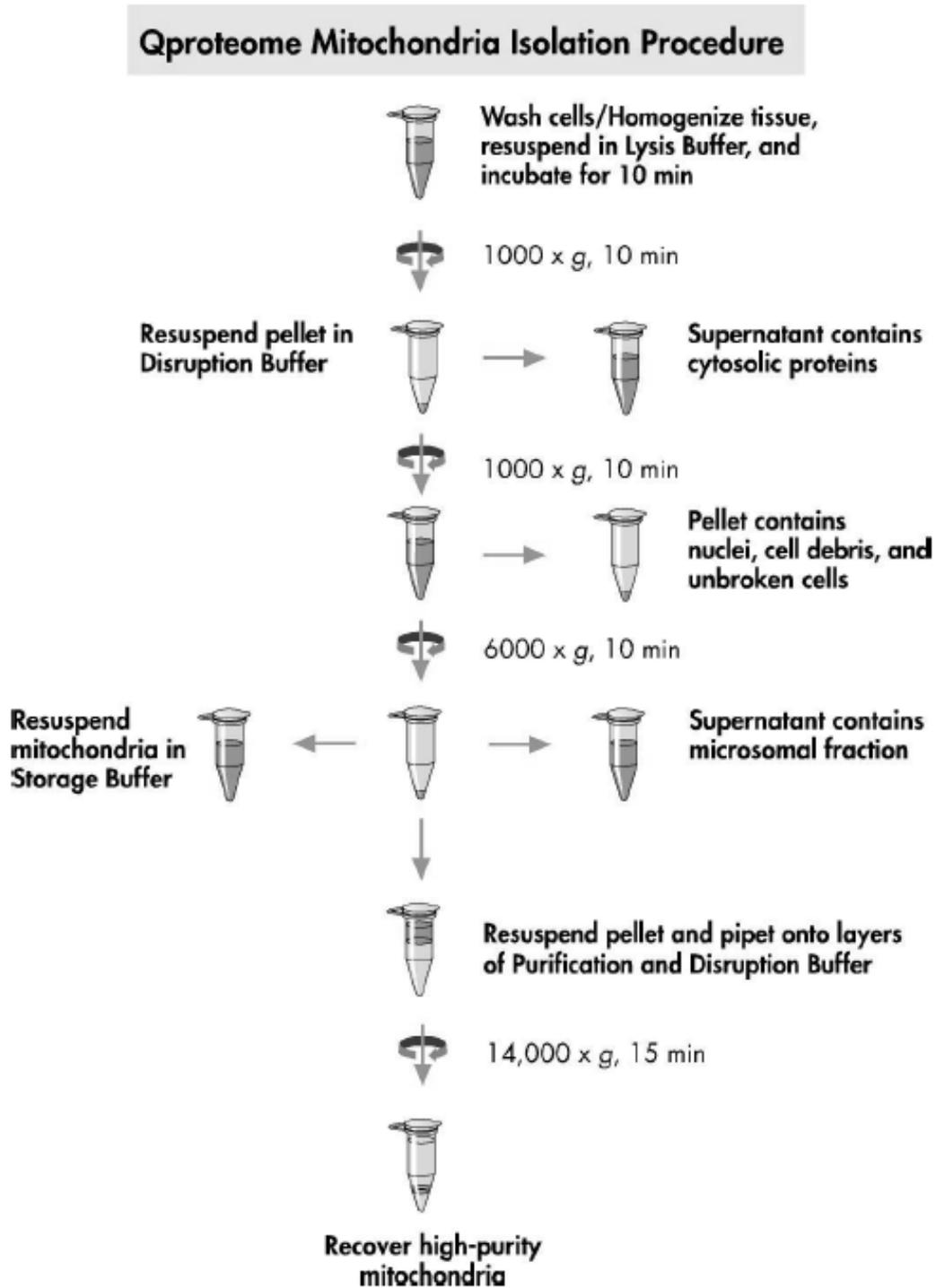


Abbildung 28: Aus dem Qproteome Mitochondria Isolation Kit

Für nähere Information siehe: [68]

3. ERGEBNISSE

In vivo Experimente

In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl Wildtyp- als auch genetisch modifizierte Mäuse (MDR 2 knock out) in Alkohol-Dampfkammern einer definierten Alkoholmenge ausgesetzt und die schädigenden Effekte auf die Leber untersucht.

Die MDR 2 knock out Mäuse, die über kein funktionales Gen für die Expression des Gallensäuretransporters MDR2 mehr verfügen entwickeln durch diesen Defekt eine leichte Leberfibrose. Diese Tiere wurden daher als Model für Alkoholeffekte auf eine bereits vorgeschädigte Leber eingesetzt.

Es ist bekannt, dass chronischer Alkoholkonsum durch die Schädigung der Darmmukosa einen LPS-Anstieg im Serum und somit einen zusätzlichen toxischen Stimulus in der Leber verursacht (siehe auch Abb. 9 in der Einleitung). Bei Aufnahme des Alkohols mittels Inhalation, also unter Umgehung der Magen-Darm Passage, wird vermutlich kein Schaden der Darmmukosa und somit keine Aufnahme von LPS ins Blut verursacht. Um also unterscheiden zu können, welche Effekte der Alkohol alleine hat bzw. welche dem LPS zuzuschreiben sind, wurde nun untersucht, ob der Alkohol durch zusätzliche LPS-Injektion toxischer auf die Lebern der Mäuse wirkt als ohne dieses Bakterientoxin.

Je vier BalbC-Wildtyp-, sowie vier BalbC-MDR2-knock-out Männchen wurden jeweils mit Alkohol und LPS behandelt, wie in Tabelle Tab.1 angegeben.

Balbc-Wildtyp-Mäuse (Männchen)			
- LPS		+ LPS	
- Ethanol	+ Ethanol	- Ethanol	+ Ethanol
A, 65, 52, 53	70, 71, 72, 73	K1, K2, K3, K4	120, 121, 122, 123

MDR2 KO Mäuse (Männchen)			
- LPS		+ LPS	
- Ethanol	+ Ethanol	- Ethanol	+ Ethanol
40, 43, 44, 45	46, 47, 48, 49	95, 96, 97, 102	103, 104, 105, 106

Tab.3: Behandlungsschema der einzelnen Versuchstiere

Die Mäuse, die mit Alkohol bedampft worden sind, wurden einzeln in die Dampfkammern gesetzt. In jeder der vier Kammern wurde die gleiche Menge an Streu und Futter verwendet.

Alle vierer Gruppen, die mit Alkohol bedampft wurden, waren Geschwister, die dazugehörigen Kontrollen (ohne Ethanol) nur teilweise.

Die Alkoholbedampfung (1,1 ml absolut Ethanol pro Minute) erfolgte jeweils 5 Stunden am Tag, 7 Tage die Woche über 8 Wochen. Zur Kontrolle wurde die Luft-Alkoholkonzentration stichprobenartig während der Bedampfung mit einem Alkoholatemgerät gemessen und betrug im Schnitt 18 mg EtOH /l Luft.

3.1 Blut-Alkoholkonzentrationen

Die Tiere sollten einen Blut-Alkoholspiegel von 150-200 mg/dl Blut erreichen. Zur Kontrolle der Blut-Alkoholkonzentrationen wurde den „Alkohol-Mäusen“ mehrmals pro Woche in den ersten Wochen und danach nur sporadisch (und nicht bei allen Tieren), direkt nach der 5-stündigen Alkoholexposition, durch Punktion der *Vena Saphena* ca. 20µl Blut abgenommen und die Alkoholkonzentration bestimmt.

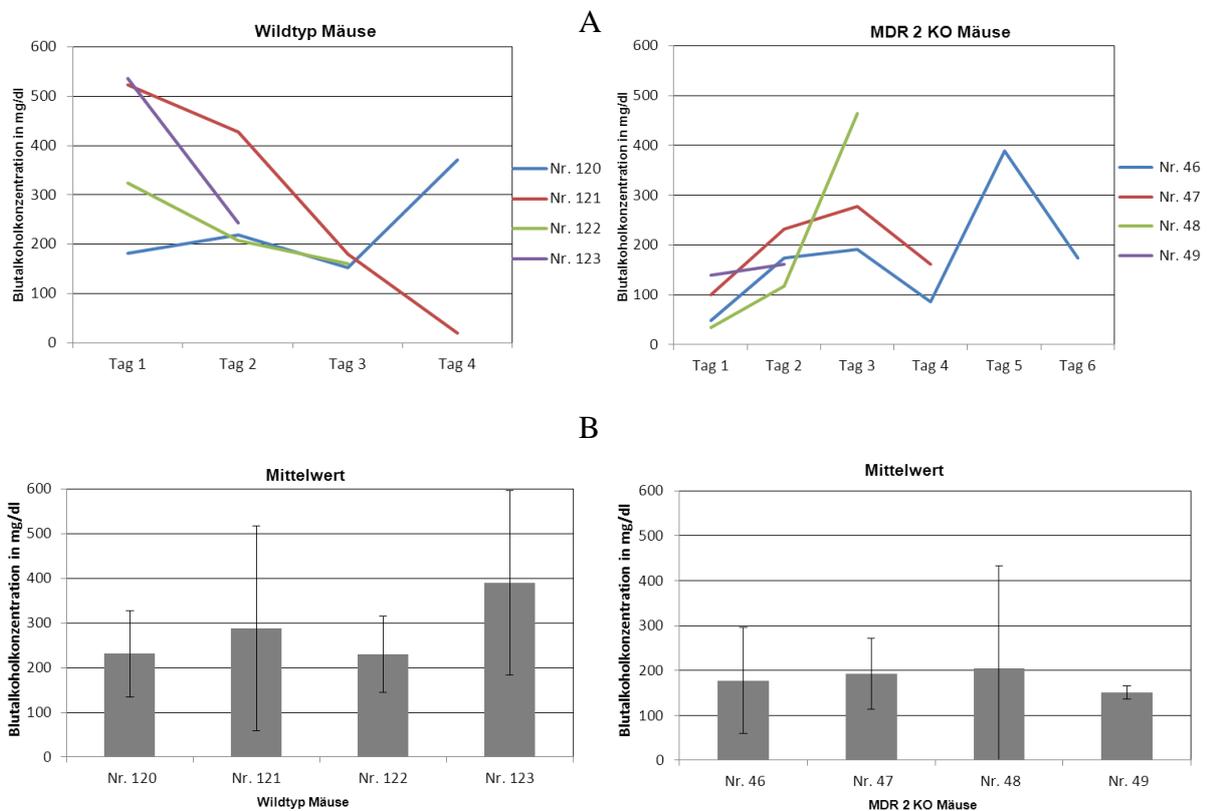


Abbildung 29: Die Blutalkoholkonzentration in Wildtyp- und MDR2- KO-Mäusen

A: Gemessen an verschiedenen Tagen direkt nach 5-stündiger Alkoholbedampfung.

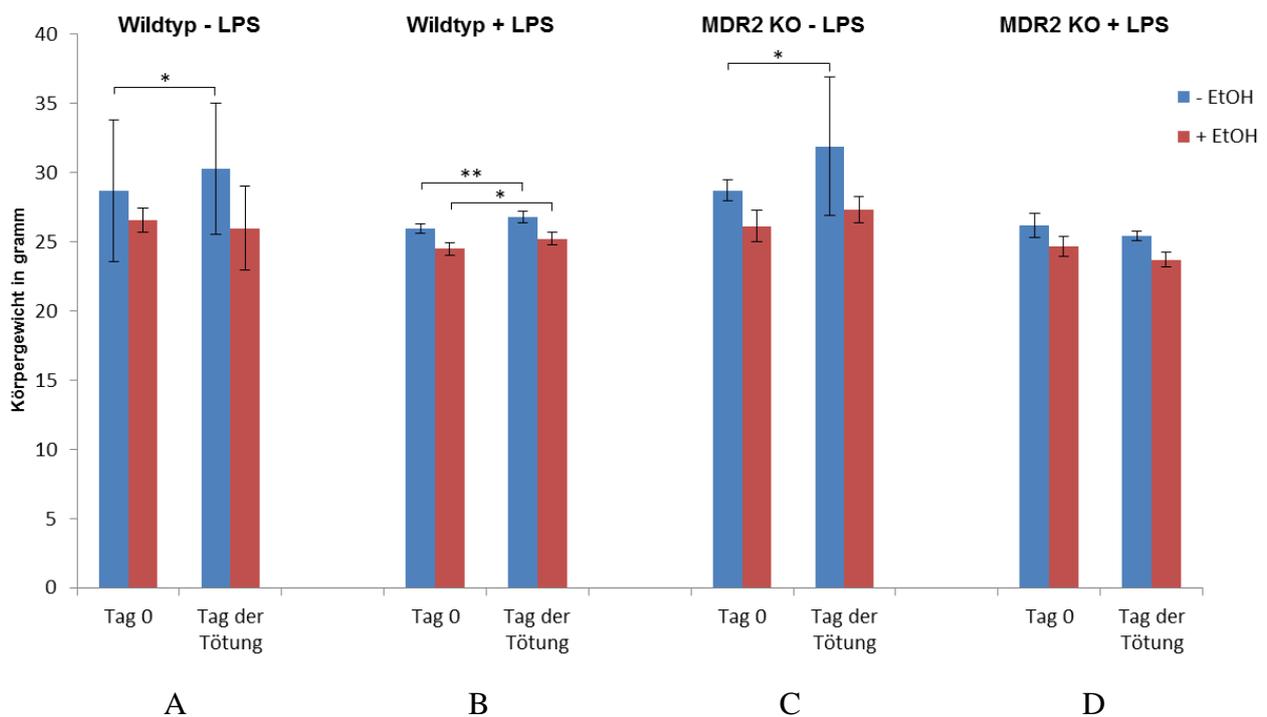
B: Für jedes Tier wurde der Mittelwert der Blutalkoholkonzentrationen an den verschiedenen Tagen ermittelt und zusammengefasst.

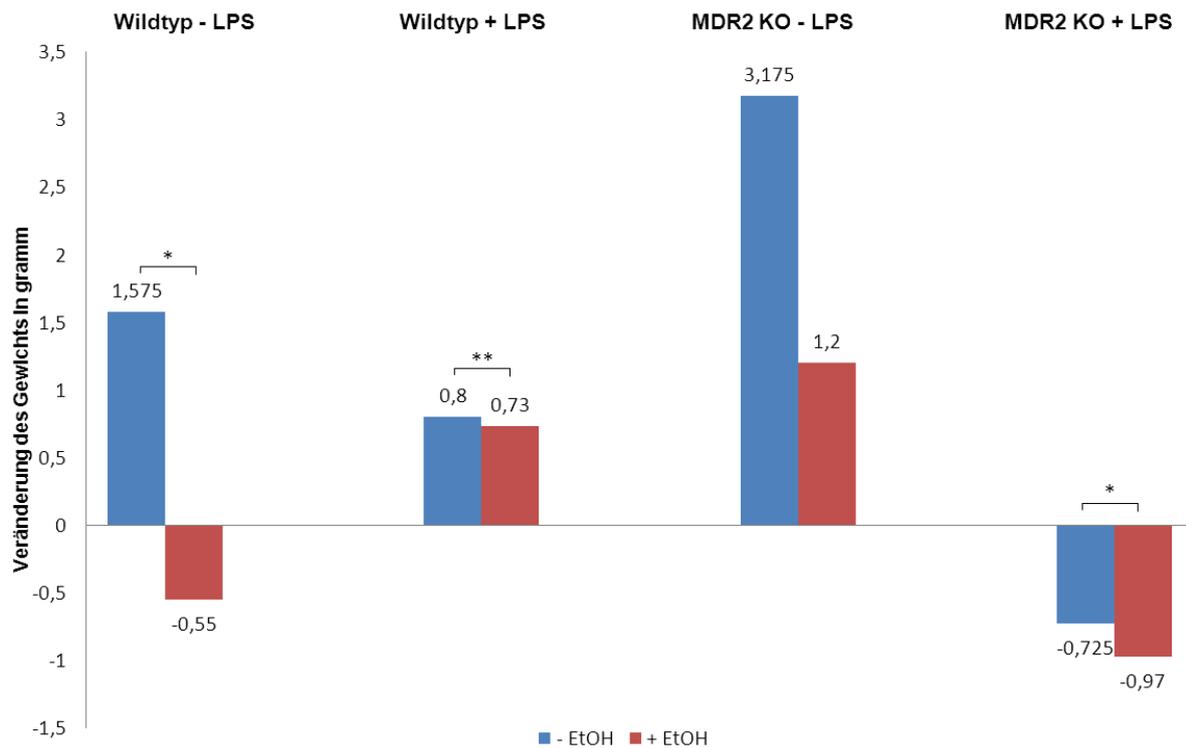
Die gemessene Alkoholkonzentration im Blut der Versuchstiere schwankte zwischen 136 mg/dl und 315 mg/dl, was ungefähr 1,08 bis 2,52 Promille entspricht.

Bakterielles LPS, ein Bestandteil der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien, gelangt aus dem Darm über die *Vena portae* in die Leber.

Da in diesem Experiment der Alkohol eingeatmet und somit die Darmflora nicht modifiziert wurde und daher kein LPS aus dem Darm in die portale Zirkulation übertreten sollte, wurde jeweils 16 Tieren zusätzlich LPS verabreicht. Dies erfolgte erst dreimal wöchentlich für sechs Wochen mit 10 µg LPS / 25 g Körpergewicht, dann für zwei Wochen mit 25 µg LPS / pro 25 g Körpergewicht (intraperitoneale Injektion).

3.2 Veränderung des Körpergewichts





E

Abbildung 30: Mittelwert und Veränderung des Gewichts

A, B, C, D: Der Mittelwert des Körpergewichts bei allen Tieren im Vergleich vom ersten Tag bis zum Tag ihrer Tötung.

D: n=3 (bei den Tieren + EtOH)

E: Veränderung des Gewichts durch Alkohol und LPS in Gramm.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$

Die Wildtypmäuse ohne LPS-Behandlung (A), die nicht mit Ethanol bedampft wurden haben im Durchschnitt um eineinhalb Gramm zugenommen, wobei die Alkoholmäuse um ein halbes Gramm an Gewicht abnahmen.

Wildtypiere, die mit LPS (B) behandelt wurden, zeigten ohne Alkoholeinfluss nur eine leichte Zunahme ihres Körpergewichts die mit Alkohol jedoch noch geringer ausfiel.

Die unbehandelten MDR2-KO-Mäuse (C) erfuhren in einem Zeitverlauf von 8 Wochen eine Gewichtszunahme von 3 Gramm, die allerdings bei den Alkoholbehandelten Tieren, nur noch 1,2 Gramm betrug.

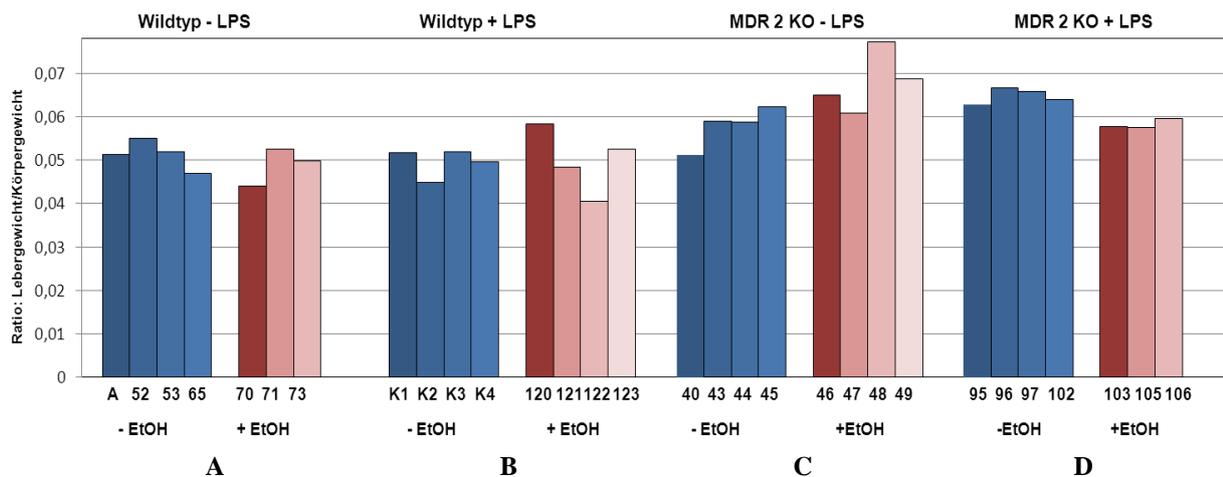
Im Vergleich zu den nicht mit LPS behandelten MDR2-KO-Mäusen verloren die LPS-gespritzten Tiere (D) nach 8 Wochen an Gewicht. Dies verstärkte sich noch bei den Tieren, die zusätzlich mit Ethanol bedampft wurden.

Im Allgemeinen hatten die Alkoholbedampften Tiere am Ende der 8 Wochen im Verhältnis zu den nicht bedampften Tieren ein niedrigeres Körpergewicht.

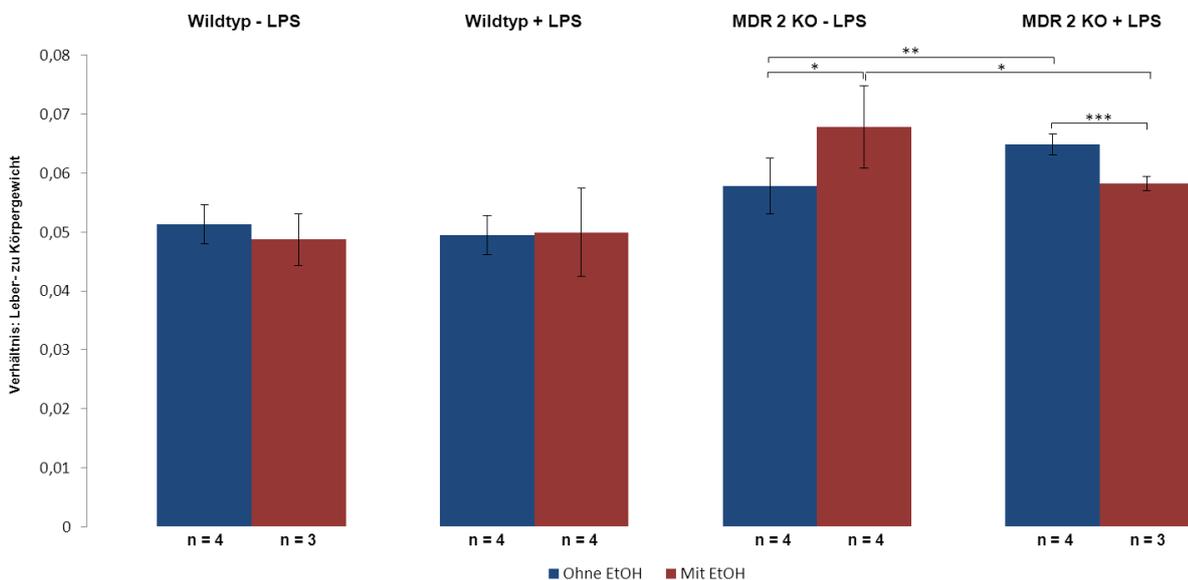
Interessanterweise bewirkte das LPS in den KO-Tieren selbst ohne zusätzlichen Alkoholeinfluss eine Gewichtsreduktion.

3.3 Das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht

Im Folgenden wurde der Einfluss von Alkohol auf die relative Größe der Leber untersucht.



Mittelwert



E

Abbildung 31: Mittelwert und Veränderung des Gewichts

A, B, C, D: Das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht bei allen Tieren.

E: Die Mittelwerte des Verhältnisses Leber- zu Körpergewicht der vier Gruppen.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$

Die Lebern der Wildtypiere zeigten kaum Veränderung in ihrem Gewicht nach Ethanol und LPS-Behandlung.

Die Lebern der alkoholisierten MDR 2 KO-Mäuse zeigten eine leichte Vergrößerung im Vergleich zu denen ihrer unbehandelten Geschwister. Wurden die Tiere jedoch zusätzlich mit LPS gespritzt *schrumpften* die Lebern signifikant im Verhältnis zum Körpergewicht durch Alkohol. Der Vergleich des Lebergewichts unabhängig vom Körpergewicht ergab das gleiche Bild. (Abb.32)

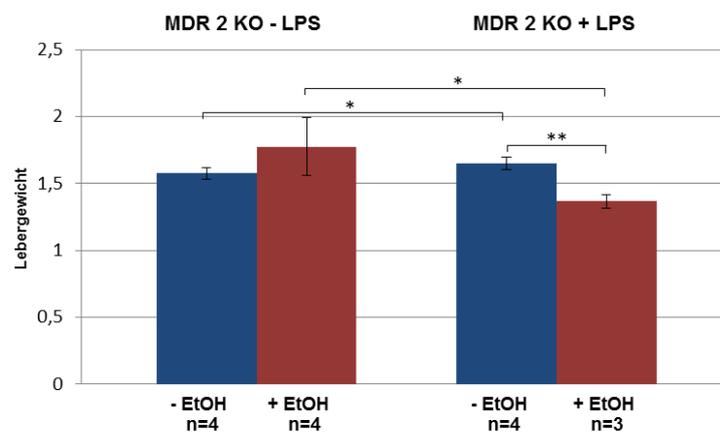


Abbildung 32: Mittelwert des Lebergewichts bei den MDR 2 KO-Mäusen

Durch Alkohol, ohne LPS Vergrößerung der Leber, mit LPS Verkleinerung der Leber im Vergleich zu den Nicht-alkoholisierten Lebern.

3.4 Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von ALT, AST und ALP im Serum

Um zu untersuchen, ob unter den hier gewählten Bedingungen Alkohol alleine oder in Kombination mit LPS einen toxischen Einfluss auf die Leber ausübt wurden die Enzymaktivitäten von ALT, AST und ALP in Serumproben aller Tiere gemessen.

Hierfür wurde den Versuchstieren alle 2 Wochen jeweils 300µl bzw. nach den 8 Wochen im Rahmen der Tötung, 1ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen.

ALT bei Wildtyp Mäusen

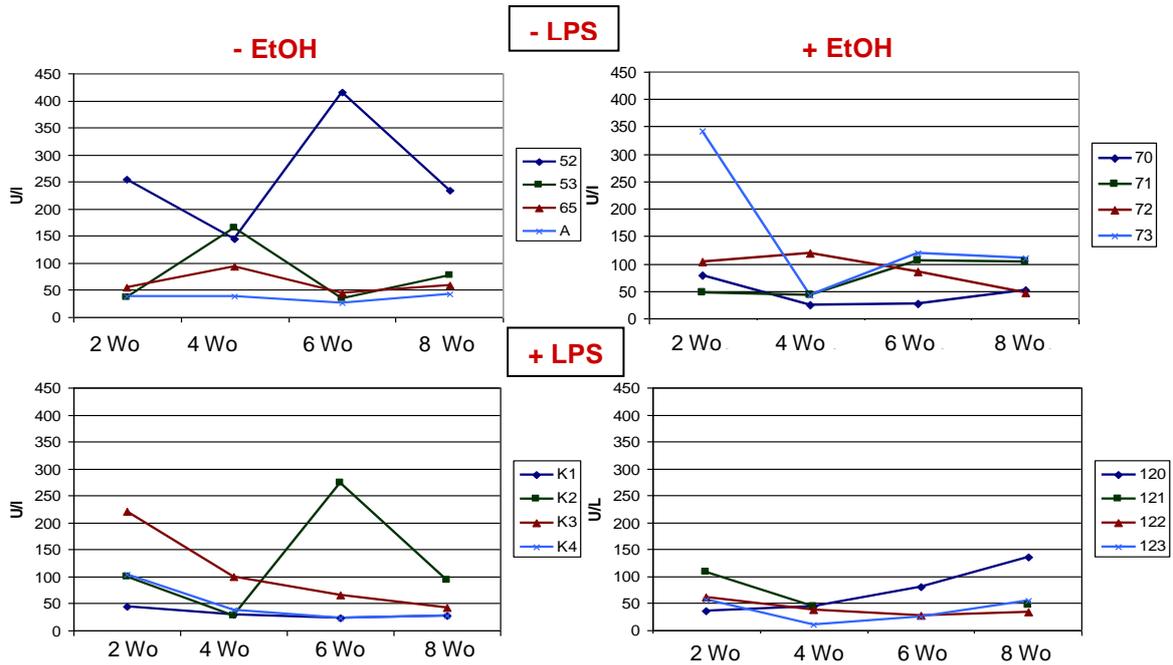


Abbildung 33: ALT-Werte im Serum von Wildtyp Mäusen

ALT Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); Wo: Wochen; LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol.

ALT bei MDR 2 KO Mäusen

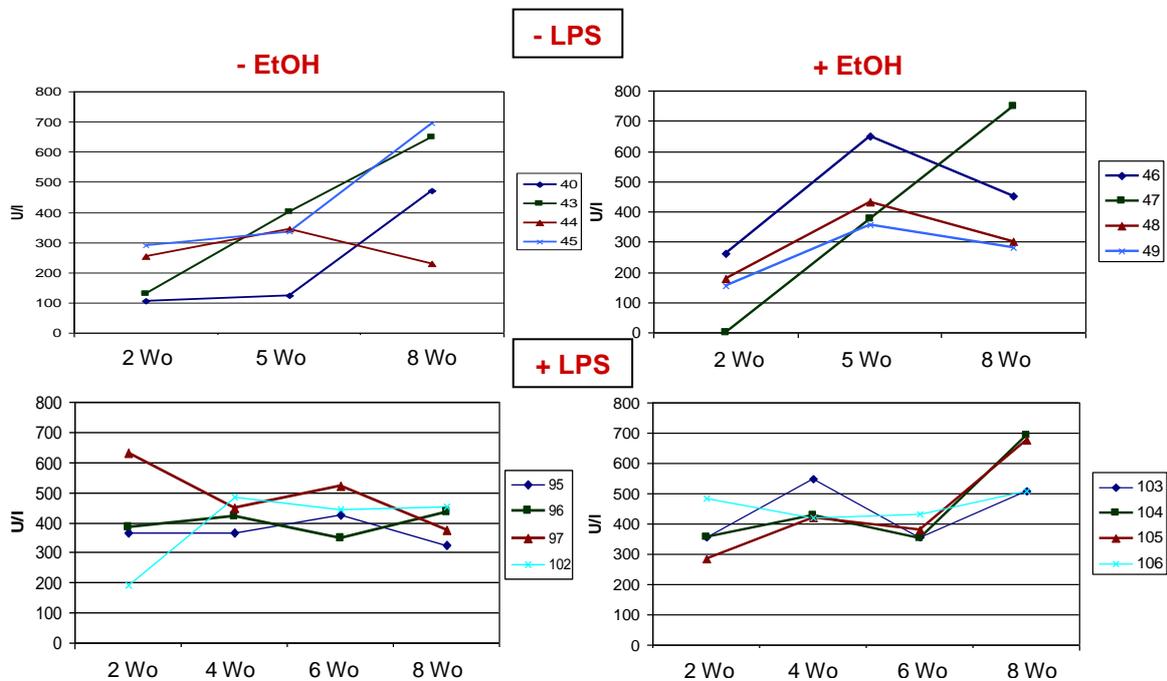


Abbildung 34: ALT-Werte im Serum von MDR 2 KO - Mäusen

ALT Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); Wo: Wochen; LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol.

Um eine Aussage darüber zu treffen, inwieweit sich der ALT Wert bei allen Tieren innerhalb der 8 Wochen verändert hat, wurde der Durchschnitt der ALT Aktivität von 4 Tieren pro Gruppe in Woche 8 verglichen mit Woche 2 aufgetragen:

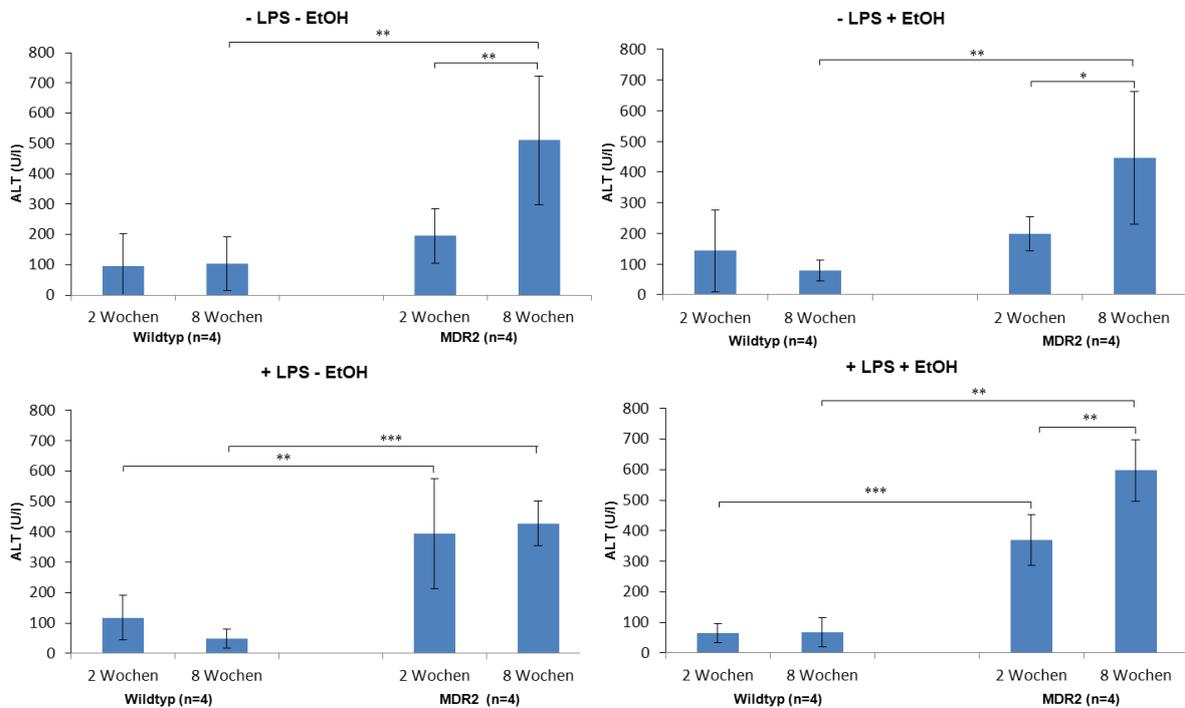


Abbildung 35: Durchschnitt der ALT Aktivität

ALT Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol; ALT - Durchschnittswert aller vier Tiere pro Gruppe (Wildtyp / MDR 2 KO) zum Zeitpunkt von 2 bzw. in 8 Wochen.

A: * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001

Wie aus Abbildung 33 ersichtlich, weichen die Werte für Maus Nr. 52 und 73 deutlich von denen der Übrigen in derselben Gruppe ab. Lässt man also die Werte dieser Tiere außer Acht ergibt sich folgendes Bild:

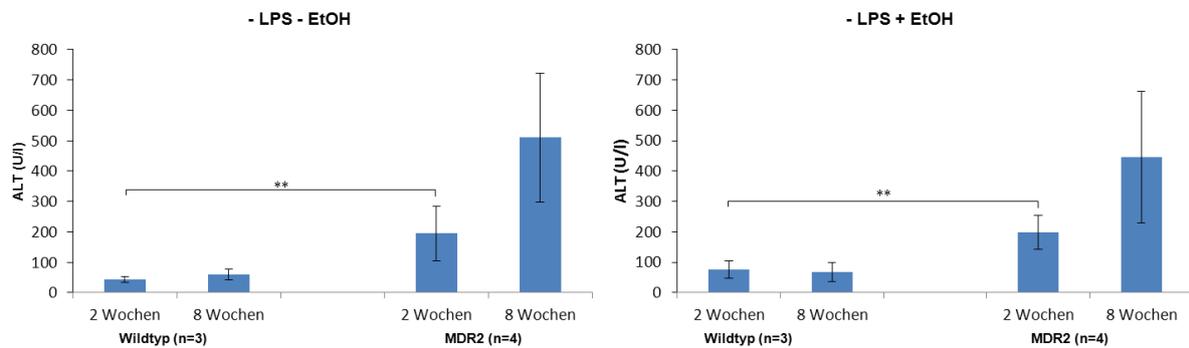


Abbildung 36: Durchschnitt der ALT Aktivität ohne Tier Nr. 52 und 73

ALT Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol; ALT - Durchschnittswert aller vier Tiere pro Gruppe, außer dem Wildtyp-Tier mit der Nummer 52 (linker Graph) und Wildtyp-Tier Nummer 73 (rechter Graph) aufgetragen in 2 bzw. in 4 Wochen.

(** $p \leq 0,01$)

Bei den Wildtyp Mäusen ohne LPS- und Ethanolbehandlung ist wie erwartet, abgesehen vom Tier Nr. 52 keine Veränderung der ALT Werte über den Versuchszeitraum hinweg, zu verzeichnen.

Von einzelnen „Ausreißern“ abgesehen, zeigte sich auch bei den Alkohol und/oder LPS behandelten Wildtyp-Tieren nach 8 Wochen kein deutlicher Anstieg der ALT Aktivität.

Im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen, waren die ALT Werte bei den MDR 2 KO Mäusen wie erwartet bereits basal erhöht, wobei durch LPS eine weitere Erhöhung zu beobachten war.

Während bei den Wildtyp Tieren eine Enzymaktivität von 50 – 100 U/l gemessen wurde, waren es bei den MDR 2 KO Tieren ca. 300 U/l.

Im Versuchsverlauf stieg dieser Wert bei den MDR 2 KO, aber nicht bei den Wildtyp-Tieren weiter an, allerdings wurde dieser Anstieg durch Alkohol nicht mehr verstärkt. (Abb. 35)

AST bei Wildtyp Mäusen

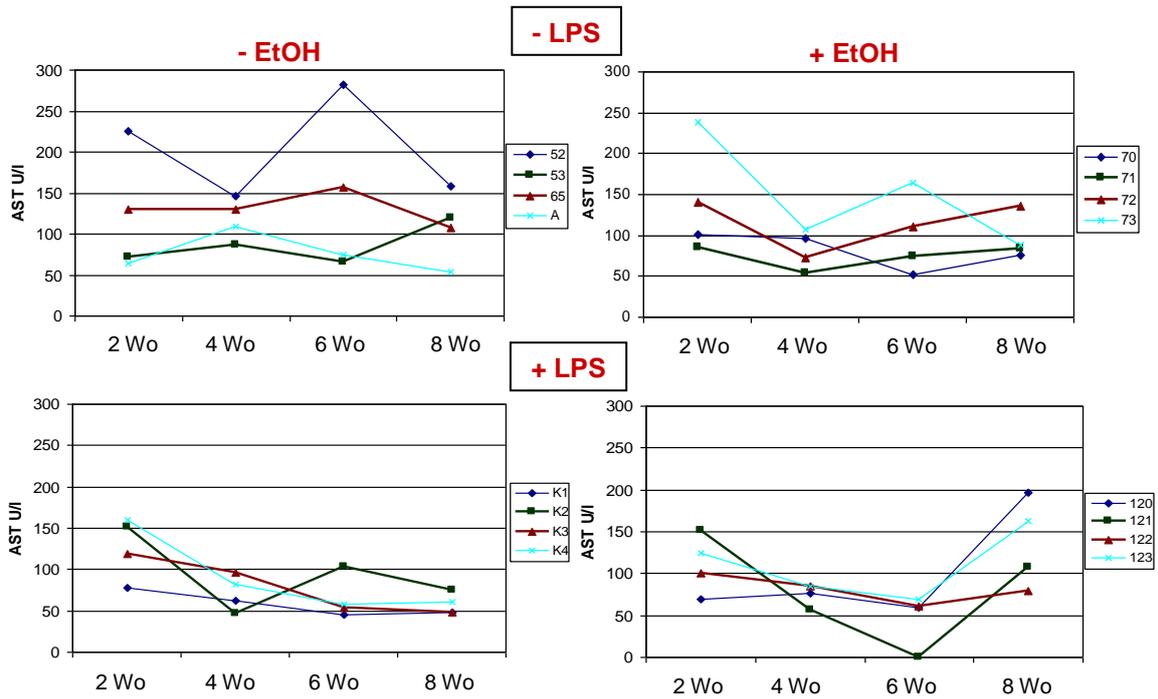


Abbildung 37: AST-Werte im Serum von Wildtyp Mäusen

AST Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); Wo: Wochen; LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol.

AST bei MDR 2 KO Mäusen

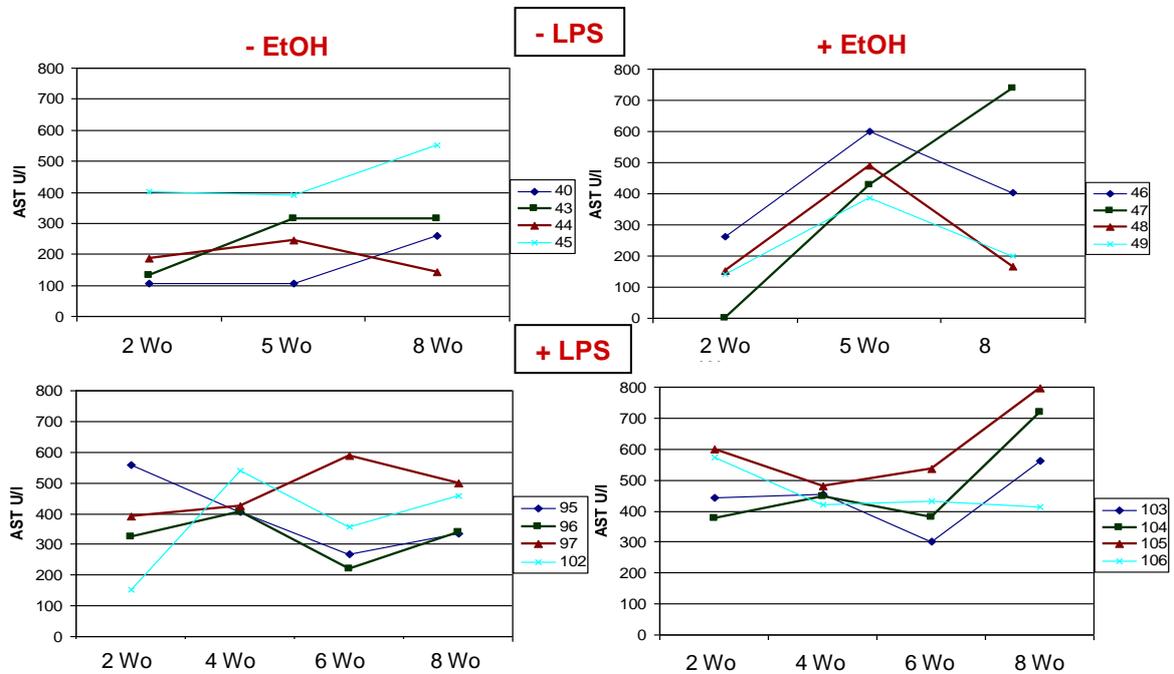


Abbildung 38: AST-Werte im Serum von MDR 2 KO - Mäusen

AST Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); Wo: Wochen; LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol.

Um den Verlauf der AST Werte nach 2 bzw. 8 Wochen zu vergleichen wurden wiederum alle Tiere einer Gruppe zusammengefasst und diese Zeitpunkte wie folgt aufgetragen:

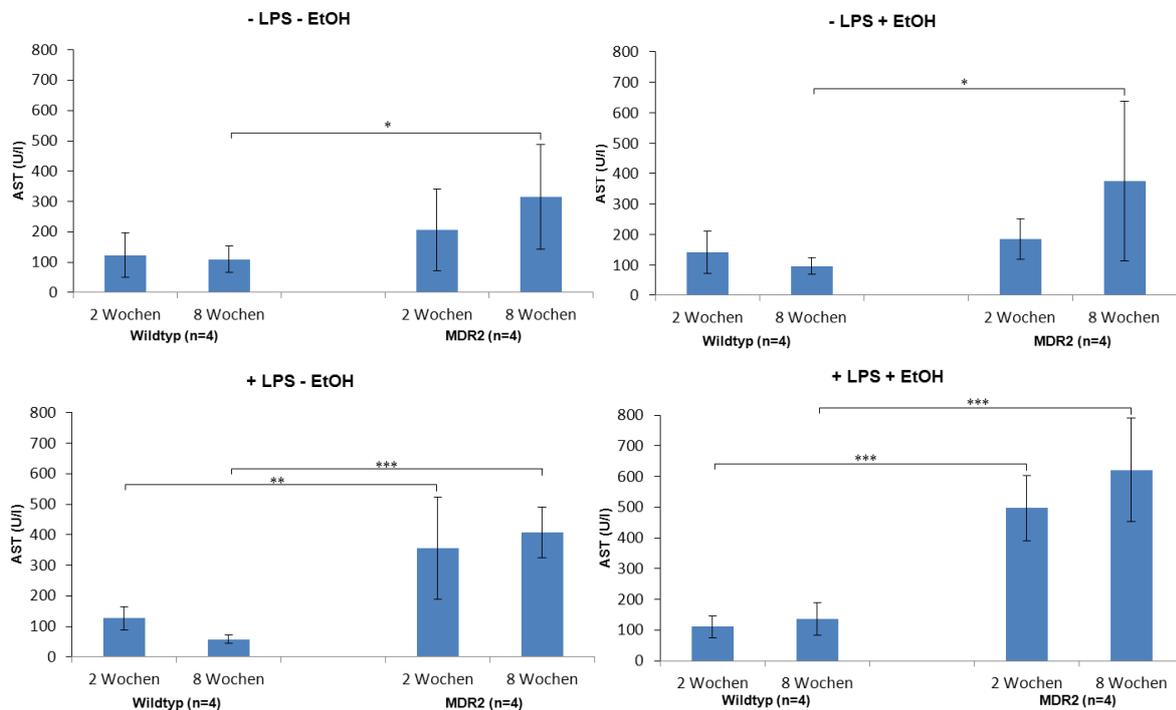


Abbildung 39: Durchschnitt der AST Aktivität

AST Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol; AST - Durchschnittswert aller vier Tiere pro Gruppe (Wildtyp / MDR 2 KO) aufgetragen in 2 bzw. in 8 Wochen.

(* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$)

Abgesehen vom Tier mit der Nummer 52, bei den Wildtypmäusen, dessen AST Werte (ähnlich wie die ALT Werte, siehe oben) stark variierten, blieben die Werte der übrigen Kontrollmäuse relativ konstant. Durch Alkohol oder LPS alleine war kein Anstieg von AST zu verzeichnen. Auch beim Vernachlässigen des Tieres Nummer 52 zeigten die AST Werte der Kontrollmäuse keinerlei Veränderung.

Erst durch die zusätzliche LPS Behandlung stiegen die AST Werte mit Alkohol in der experimentellen Schlussphase zwischen Woche 6 und 8, an.

Vermutlich durch die genetische Veränderung der MDR 2 KO Tiere, die mit einem zunehmenden cholestatischen Leberschaden einhergeht, waren die AST-Werte bei den MDR 2 KO Mäusen schon basal höher als bei den Wildtyp-Tieren (100 – 300 U/l). Zudem stiegen

Abbildung 41: ALP-Werte im Serum von MDR 2 KO - Mäusen

ALP Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); Wo: Wochen; LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol.

Um zu vergleichen wie sich die ALP Werte innerhalb von 8 Wochen bei allen Tieren veränderten, wurde der Durchschnitt aller Tiere pro Gruppe (n=4) nach 2 Wochen verglichen mit 8 Wochen graphisch ausgewertet.

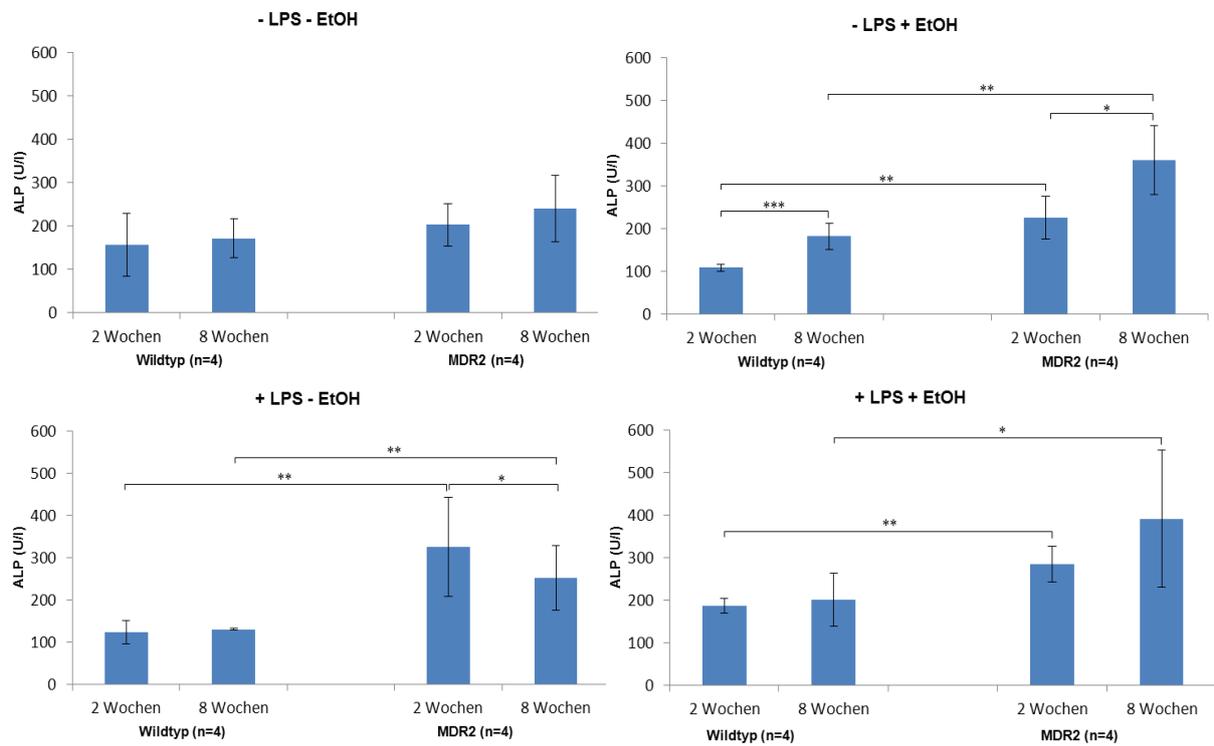


Abbildung 42: Durchschnitt der ALP Aktivität

ALP Werte gemessen in U/l (Units pro Liter); LPS (Lipopolysaccharid); EtOH: Ethanol; ALP - Durchschnittswert aller vier Tiere pro Gruppe (Wildtyp / MDR 2 KO) aufgetragen in 2 bzw. in 8 Wochen.

* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001

Die Basalwerte (ohne LPS, ohne EtOH) sowohl der Wildtyp- als auch der MDR 2 KO Mäuse blieben im Laufe der 8 Wochen relativ konstant.

Tendenziell erhöhten sich die ALP Werte durch Alkoholbehandlung in allen Gruppen und auch durch LPS alleine, zumindest in den vorgeschädigten Knock-out Tieren.

Im Gegensatz zu AST und ALT war der ALP-Wert in den MDR2 KO Tieren nach LPS Behandlung nach 2 Wochen sogar etwas höher als nach 8 Wochen. Durch zusätzliche Alkoholgabe wurde dieser Effekt jedoch nicht weiter verstärkt.

3.5 Der *De-Ritis-Quotient*

Ein Anstieg der Transaminasen ist ein Zeichen für die Schädigung der Hepatozyten.

Beim Menschen gibt der *De-Ritis-Quotient*, eingeführt von de-Ritis et al, das Verhältnis der Leberenzyme AST und ALT an und liefert einen Hinweis auf die zugrundeliegende Erkrankung der Leber. [69]

Bei Alkohol-induzierten Lebererkrankungen wird meist ein Verhältnis von AST/ALT von > 2 gefunden. Bei anderen Lebererkrankungen ist dieser Quotient hingegen meist < 1. Der Referenzbereich des dimensionslosen *De-Ritis-Quotienten* beträgt 0,6–0,8 beim Menschen.

Die Auswertung des *De-Ritis-Quotienten* bei den Wildtyp-Tieren ergab folgendes Ergebnis:

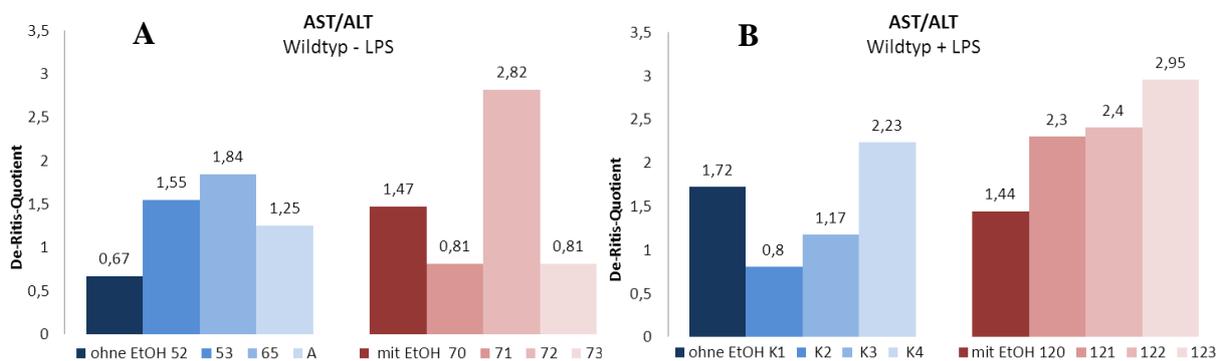


Abbildung 43: *De-Ritis-Quotient* für alle Wildtyp-Mäuse nach 8 Wochen

A: Der *De-Ritis-Quotient* von AST durch ALT bei Wildtypmäusen ohne LPS Behandlung.

B: Der *De-Ritis-Quotient* von AST durch ALT bei Wildtypmäusen mit LPS Behandlung.

In Anlehnung an die humanen Werte war bei den Wildtyp-Tieren mit LPS und Alkohol ein höherer *De-Ritis-Quotient* im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollen erkennbar.

Da die AST und ALT Werte bei den MDR 2 KO Mäusen durch den basalen Schaden sehr hoch sind konnte hier der *De-Ritis-Quotient* nicht angewendet werden.

Insgesamt zeigten die Serumwerte, ALT, AST und ALP dass es durch Alkohol, besonders in Verbindung mit LPS, zu einem leichten Leberschaden vor allem der LPS-behandelten MDR 2 KO Mäuse kam. Die Vorschädigung der Lebern dieser Tiere begünstigte offenbar eine zusätzliche Schädigung durch Alkohol und/oder Endotoxin, die bei ansonsten gesunden Organen deutlich schwächer ausfiel.

3.6 Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von anderen Lebermarkern im Serum

Zusätzlich zu ALT, AST und ALP wurden LDH (Lactat-Dehydrogenase), Bilirubin, Cholesterol, Cholinesterase, Triglyceride, Amylase, Lipase und Glucose gemessen, jedoch konnten keine signifikanten Veränderungen durch Alkohol und/oder LPS festgestellt werden.

3.7 Sirius Rot Färbungen

Um den Kollagengehalt der Lebern und somit eine beginnende Fibrose zu untersuchen, wurden die fixierten Mauslebern histologisch untersucht. Mit Hilfe der Sirius Rot Färbung wurden vorhandene Kollagenstrukturen rot angefärbt.

Wildtyp Tiere ohne LPS ohne Ethanol

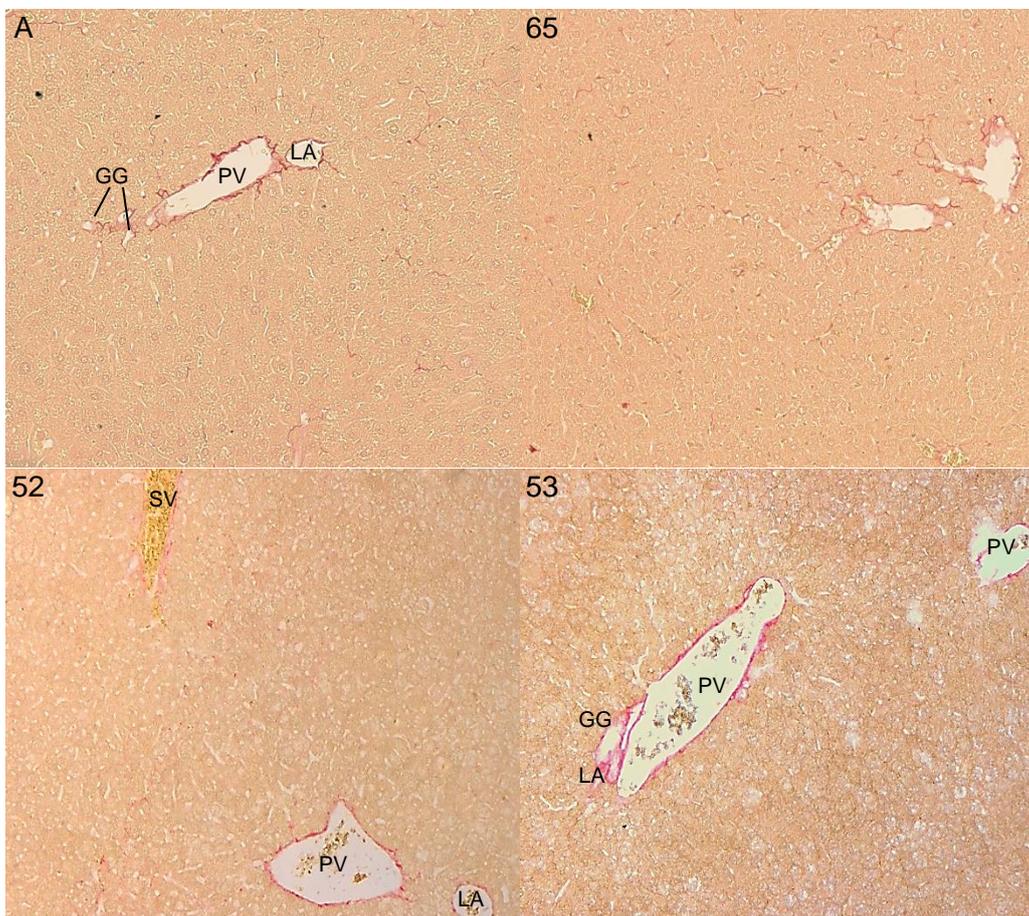


Abbildung 44: Sirius Rot Färbungen der Lebern von Wildtyptieren ohne LPS- und ohne Ethanolbehandlung

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der unbehandelten Wildtyptiere A, 65, 52, 53.

LA: Leberarterie; PV: Portalvene; GG: Gallengang; (Vergrößerung: 25-fach)

Die Kontrolltiere, A, 65, 52 und 53 wiesen, wie erwartet keinerlei fibrotisches Gewebe auf. Zu sehen sind normale Hepatozyten, die Leberarterie (LA), Portalvene (PV), der Gallengang (GG). Die leichte Rotfärbung entlang der Gefäße entspricht dem normalen Kollagenanteil der Gefäßwände.

Wildtyp Tiere mit LPS ohne Ethanol

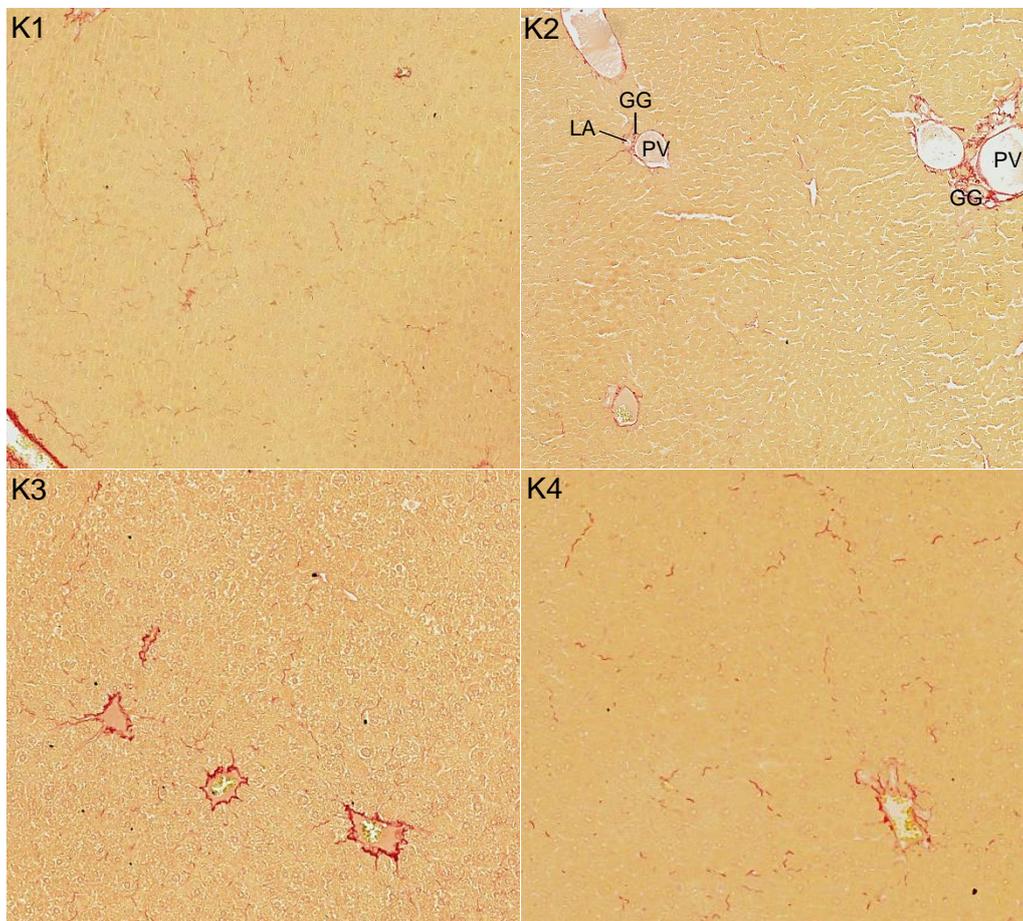


Abbildung 45: Sirius Rot Färbungen von Wildtyptieren mit LPS- und ohne Ethanolbehandlung

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der LPS behandelten Wildtyptiere K1, K2, K3, K4.

LA: Leberarterie; PV: Portalvene; GG: Gallengang; ZV: Zentralvene (V. centralis). (Vergrößerung: 25-fach)

Durch die LPS Behandlung alleine war eine leichte Zunahme der Kollagenablagerung in den Lebern der nicht alkoholisierten Wildtypmäuse zu beobachten.

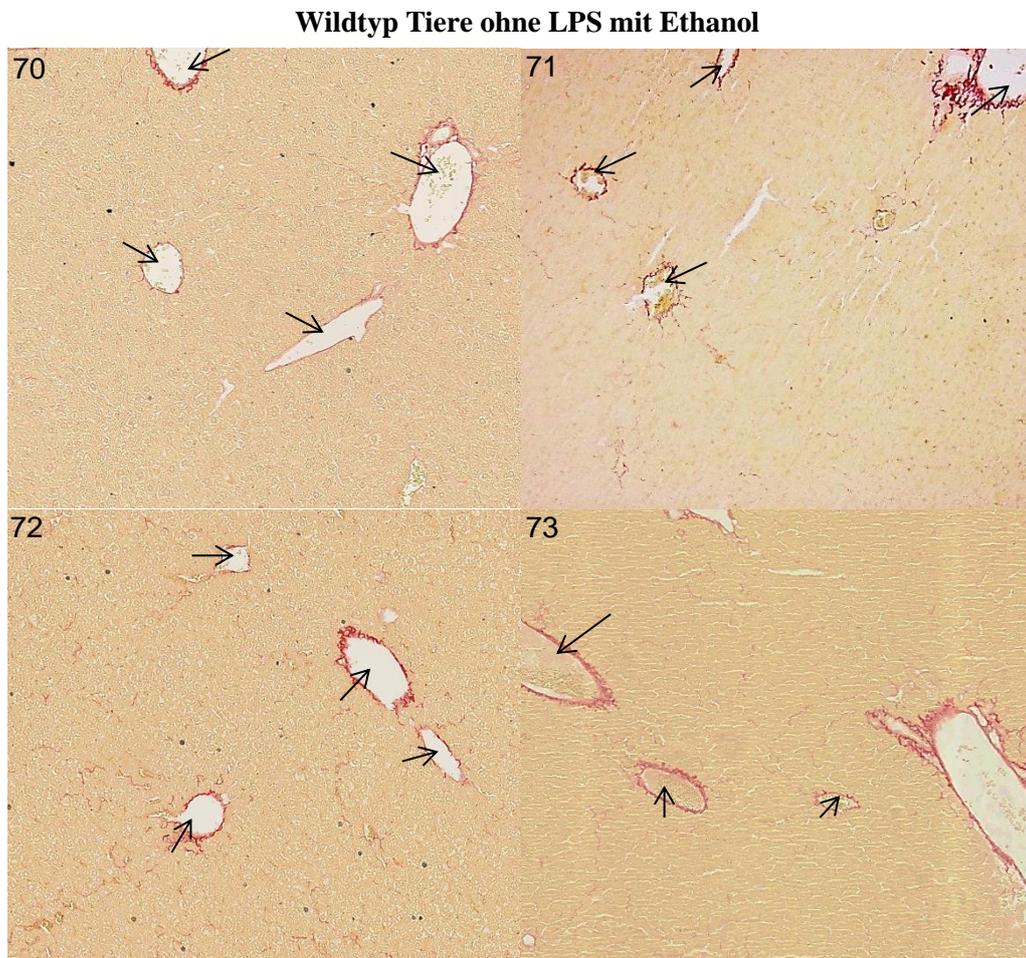
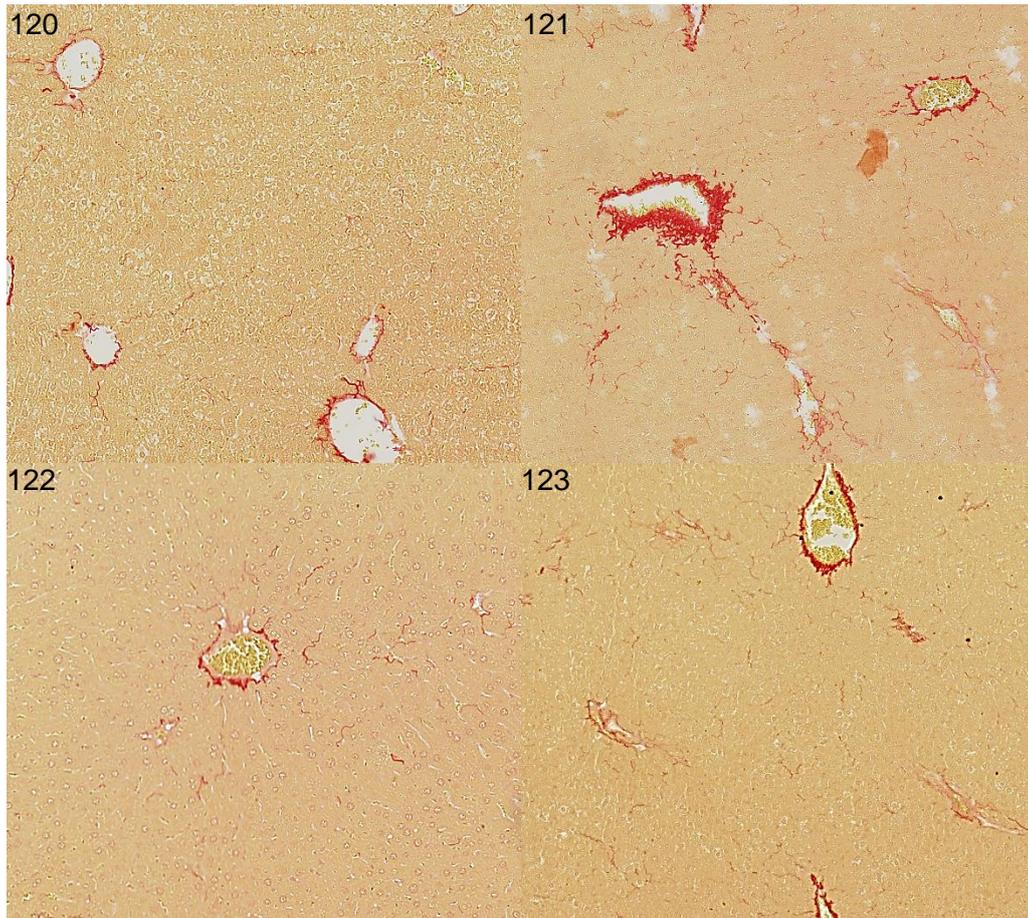


Abbildung 46: Sirius Rot Färbungen der Lebern von Wildtyptieren ohne LPS- und mit Ethanolbehandlung

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der Ethanolbehandelten Wildtyptiere 70, 71, 72, 73.

Feile: Gefäße (Vergrößerung: 25-fach)

Nachdem die Tiere 8 Wochen lang mit Alkohol bedampft wurden, wiesen ihre Lebern eine leichte Kollageneinlagerung auf.

Wildtyp Tiere mit LPS mit Ethanol**Abbildung 47: Sirius Rot Färbungen von Wildtypieren mit LPS- und Ethanolbehandlung**

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der LPS- und Ethanolbehandelten Wildtypiere 120, 121, 122, 123. (Vergrößerung: 25-fach)

Durch den Alkohol und das LPS waren mittels Sirius Rot Färbung eindeutige Kollageneinlagerungen in der Leber zu sehen.

Durch das LPS scheint der Alkohol auf die Leber noch toxischer zu wirken als ohne. Eine echte Fibrose ist aber in ansonsten gesunden Wildtyp-Mäusen noch nicht zu beobachten.

Es stellte sich nun die Frage, ob ein bereits vorhandener, basaler Leberschaden in Form einer beginnenden Fibrose durch Alkohol und/oder LPS deutlich verstärkt würde.

Deshalb wurden nun Sirius Rot Färbungen von Leberschnitten der MDR 2 KO Mäuse durchgeführt.

MDR 2 KO Tiere ohne LPS ohne Ethanol

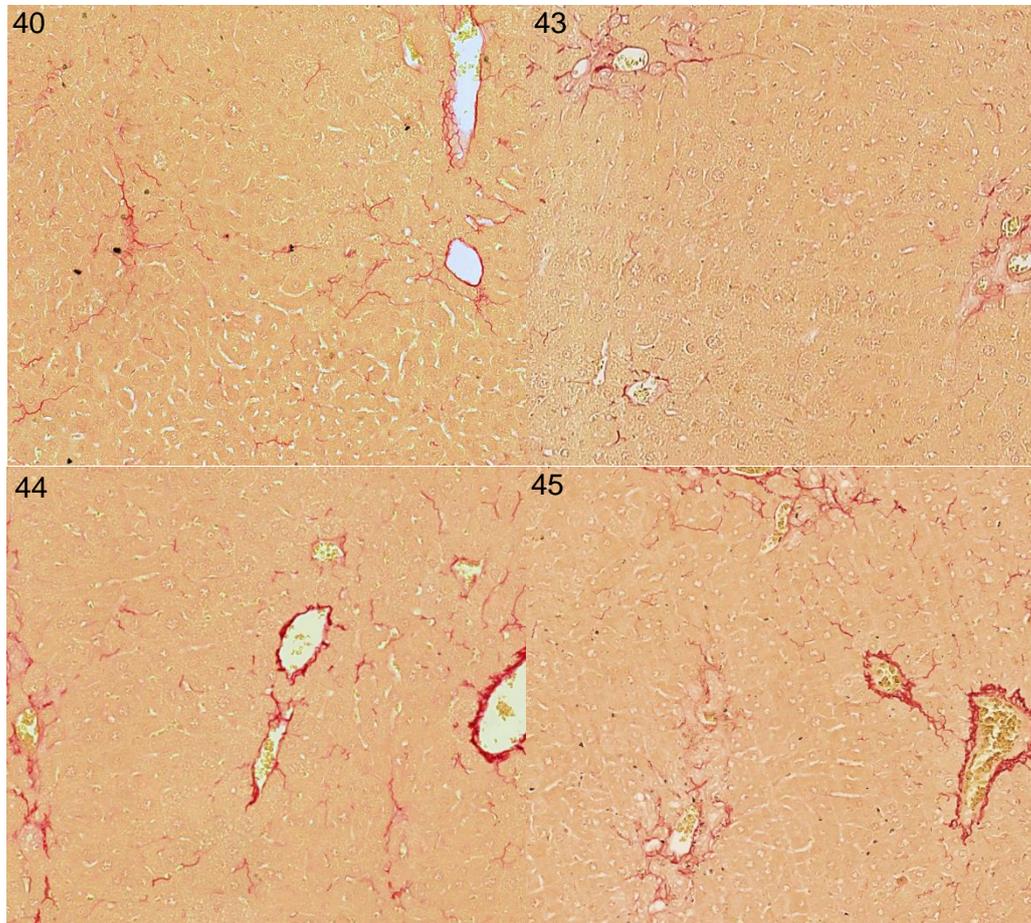
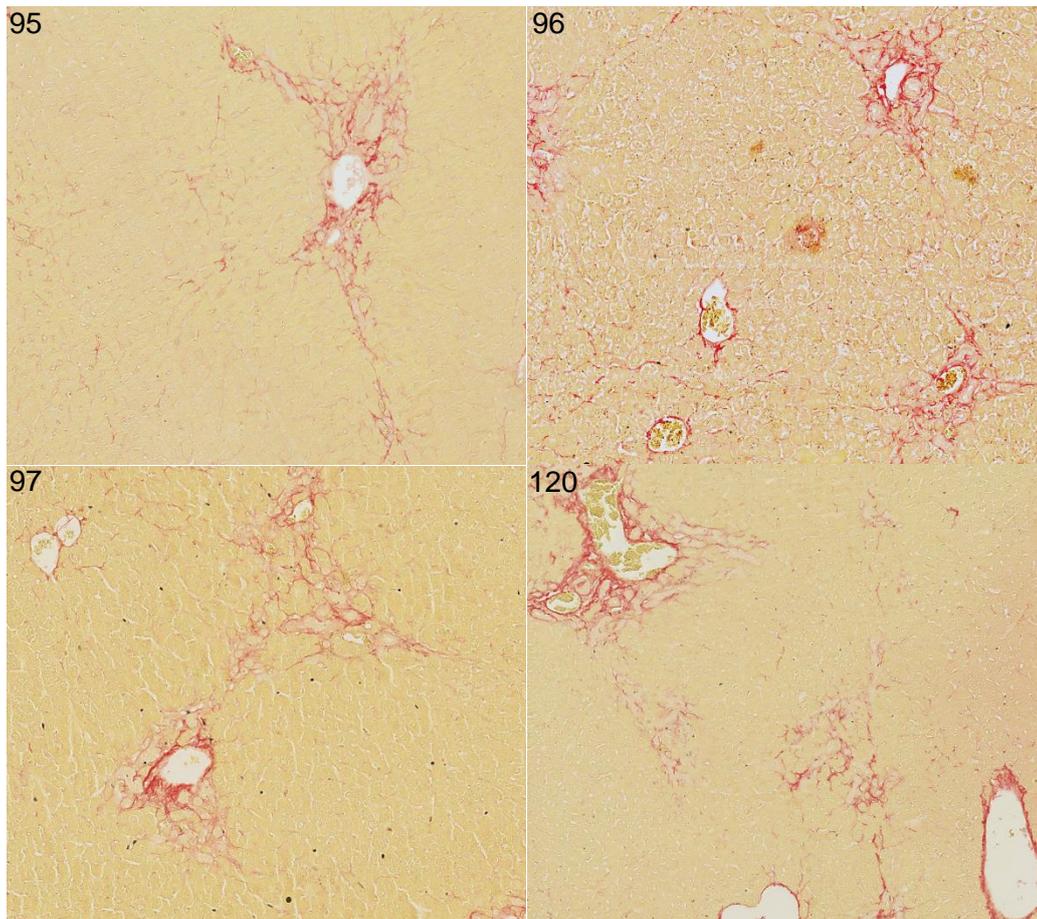


Abbildung 48: Sirius Rot Färbungen von MDR 2 KO Mäusen ohne LPS- und ohne Ethanolbehandlung

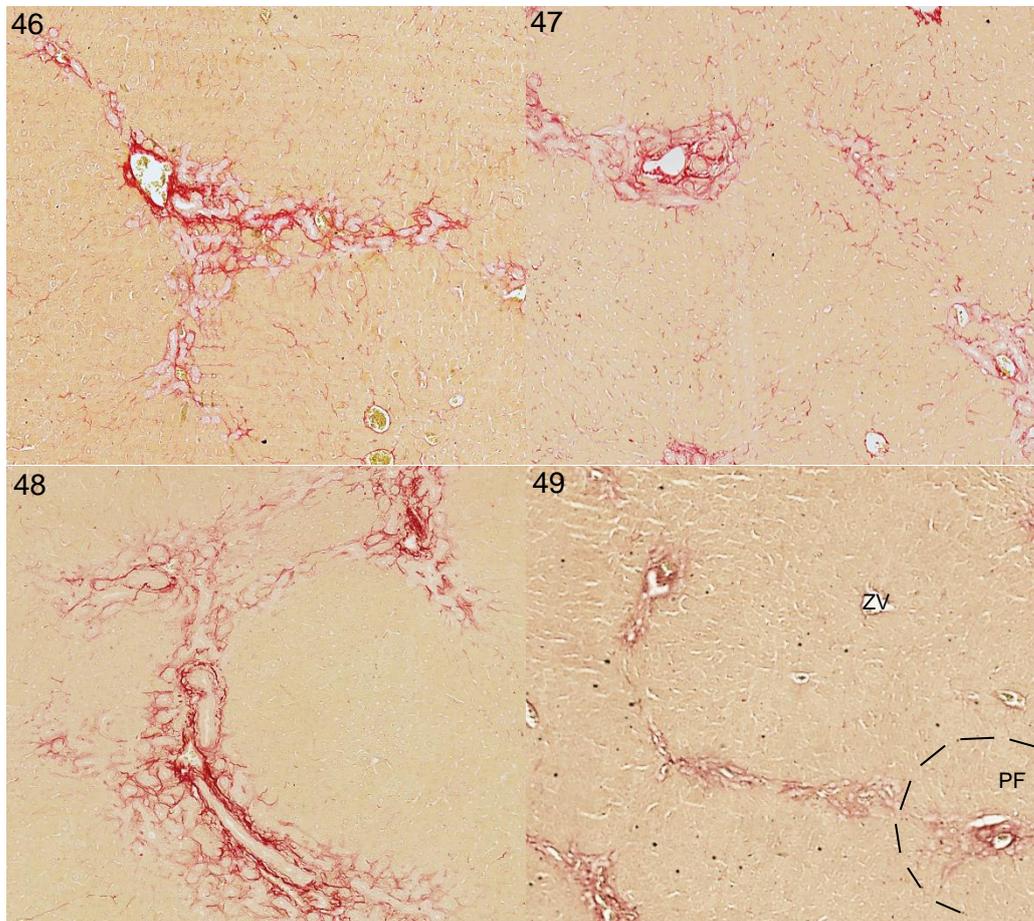
Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der unbehandelten MDR 2 KO Tiere 40, 43, 44, 45. (Vergrößerung: 25-fach)

Aufgrund des Cholestase-bedingten Schadens der MDR 2 KO Mäuse, zeigte sich bereits ohne weitere Stimulation der Tiere eine im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren erhöhte Kollageneinlagerung in ihrem Lebergewebe.

MDR 2 KO Tiere mit LPS ohne Ethanol**Abbildung 49: Sirius Rot Färbungen von MDR 2 KO Mäusen mit LPS- und ohne Ethanolbehandlung**

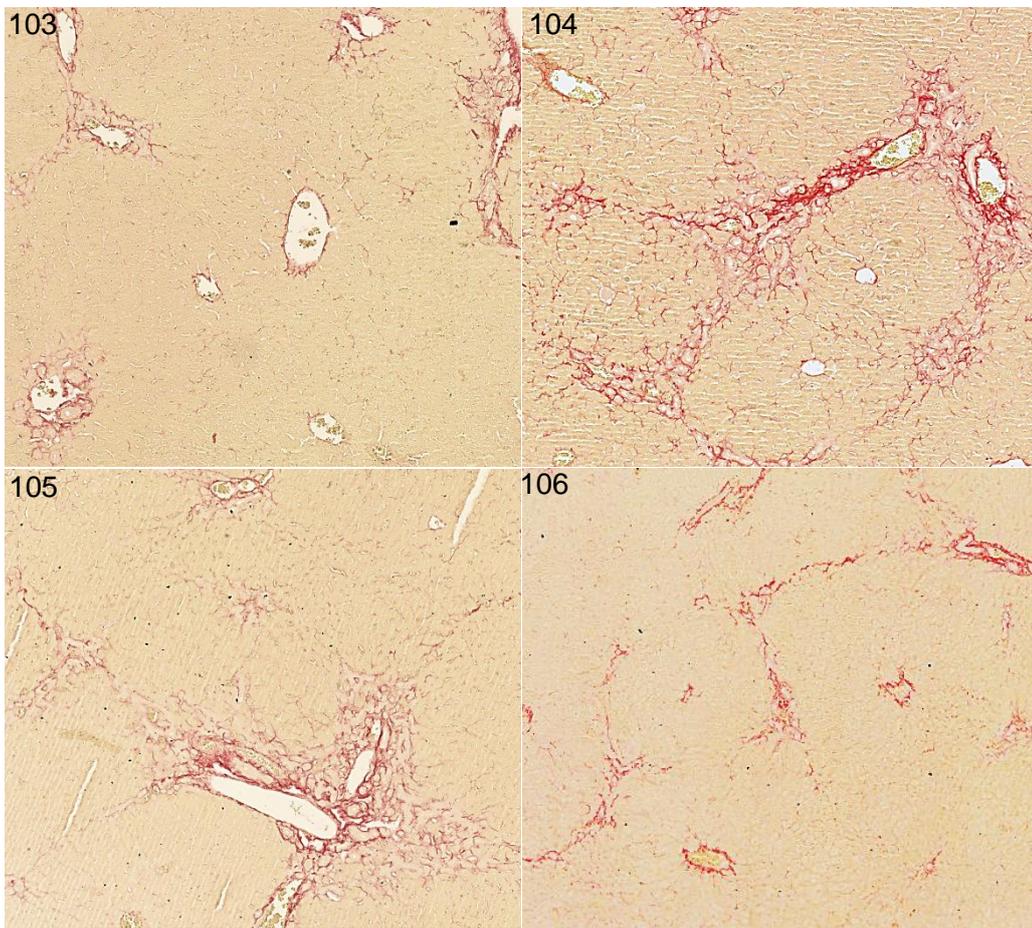
Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der LPS-behandelten MDR 2 KO Tiere 95, 96, 97, 102. (Vergrößerung: 25-fach)

Die LPS Injektionen führten zu einer weiter verstärkten Kollageneinlagerung bei den MDR 2 KO Mäusen.

MDR 2 KO Tiere ohne LPS mit Ethanol**Abbildung 50: Sirius Rot Färbungen von MDR 2 KO Mäusen ohne LPS- und mit Ethanolbehandlung**

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der Ethanolbehandelten MDR 2 KO Tiere 46, 47, 48, 49. (Vergrößerung: 25-fach); ZV: Zentralvene, PF: Portalfeld

Nach Alkoholbedampfung wiesen die MDR 2 KO Mäuse eine deutlich stärkere Kollageneinlagerung in der Leber auf, die periportal und perisinusoidal begann.

MDR 2 KO Tiere mit LPS mit Ethanol**Abbildung 51: Sirius Rot Färbungen von MDR 2 KO Mäusen mit LPS- und mit Ethanolbehandlung**

Kollagenanfärbung von Lebergewebeschnitten der LPS- und Ethanolbehandelten MDR 2 KO Tiere 103, 104, 105, 106. (Vergrößerung: 25-fach)

Nach gleichzeitiger Alkohol- und LPS-Behandlung wiesen die Tiere eine fibrotische Leber auf. Es fanden sich die für eine Leberfibrose charakteristischen Kollagenbrücken, welche teilweise vollständig geschlossen waren (siehe z.B. Tier 104 in Abb. 51).

Um die Intensität der einzelnen Färbungen und somit die Höhe des Leberschadens der einzelnen Tiere vergleichen zu können, wurden die Sirius Rot Färbungen quantitativ ausgewertet.

3.7.1 Quantitative Auswertung

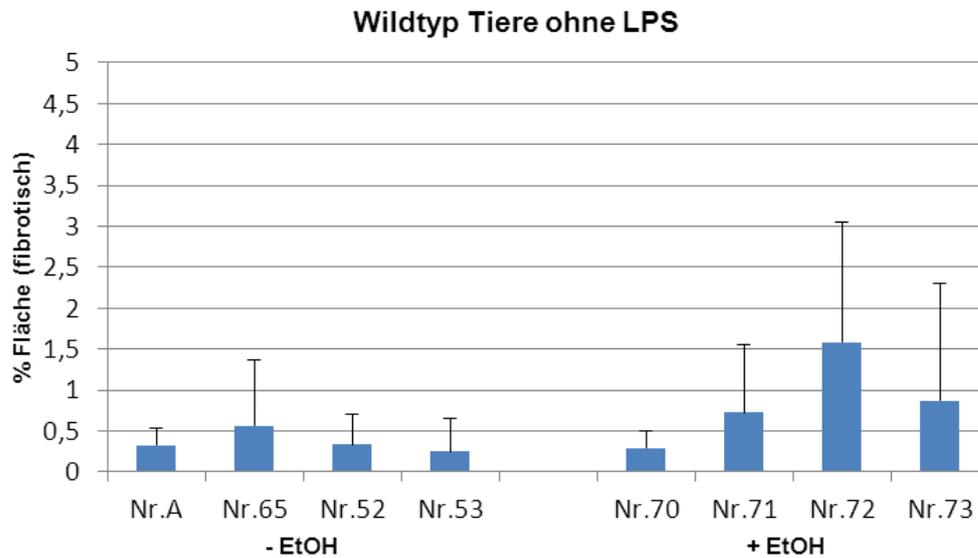


Abbildung 52: Quantitative Auswertung der Wildtypmäuse ohne LPS-Behandlung

Quantitative Analyse der Sirius Rot Färbung der Ethanolunbehandelten Wildtypmäuse A, 65, 52, 53 und der Ethanolbehandelten Wildtypmäuse 70, 71, 72, 73. Angegeben ist der Prozentanteil der Leberfläche, die Kollageneinlagerung aufwies.

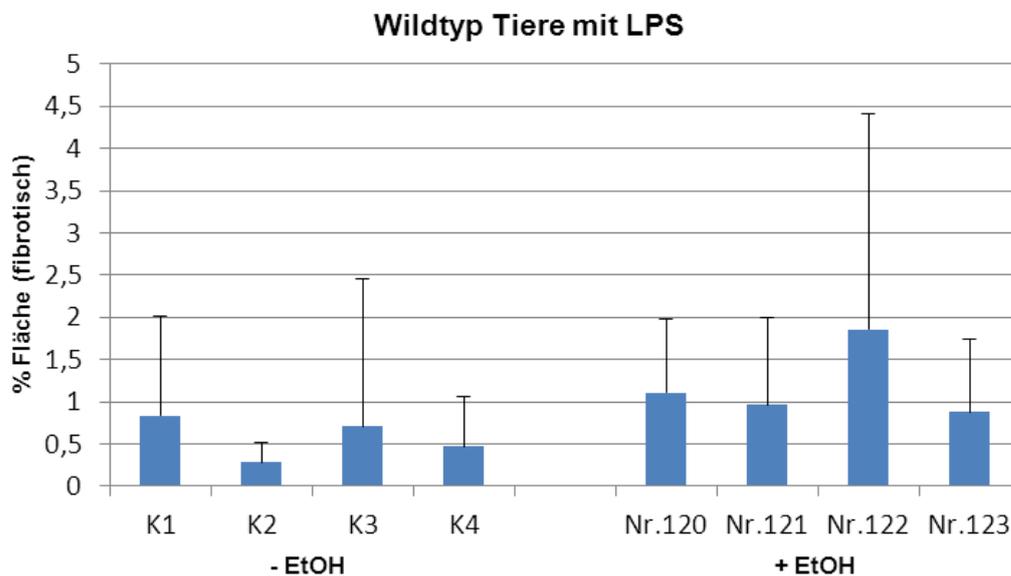


Abbildung 53: Quantitative Auswertung der Wildtypmäuse mit LPS-Behandlung

Quantitative Analyse der Sirius Rot Färbung der Ethanolunbehandelten Wildtypmäuse K1, K2, K3, K4 und der Ethanolbehandelten Wildtypmäuse 120, 121, 122, 123. Angegeben ist der Prozentanteil der Leberfläche, die Kollageneinlagerung aufwies.

Um eine klare Aussage über das Ausmaß der Schädigung zu treffen wurden die einzelnen Tiere einer Gruppe zusammengefasst.

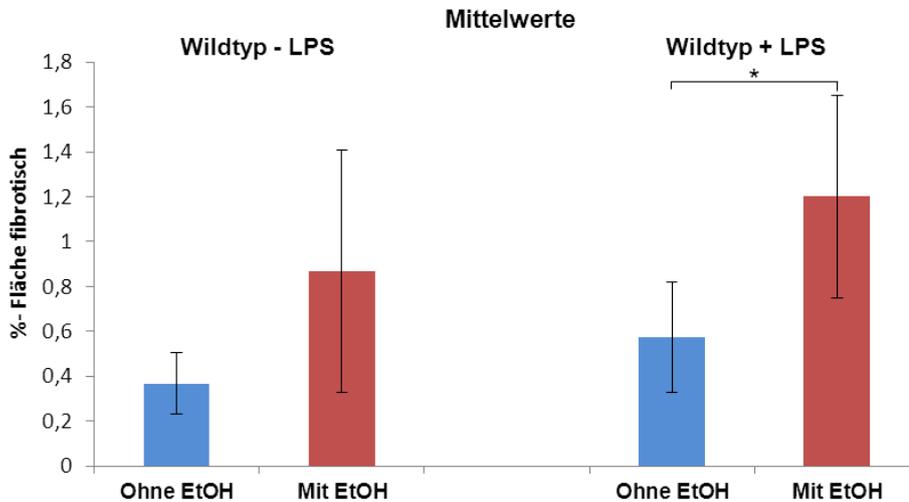


Abbildung 54: Durchschnitt der quantitativen Auswertung von Wildtypmäusen

Durchschnitt der in Prozent angegebenen fibrotischen Fläche der Leber aller Wildtypmäuse ohne und mit LPS Behandlung, ohne bzw. mit Ethanol Bedampfung.

* $p \leq 0,05$ [$p = 0,02$]

Durch die Alkoholbedampfung war eine klare Erhöhung des Leberschadens zu erkennen, wobei die LPS injizierten Tiere sowohl basal als auch durch Ethanol im Vergleich zu den Tieren ohne LPS, höhere Werte aufwiesen.

In gleicher Weise wurde auch mit den Schnitten der Lebern der MDR 2 KO Mäuse verfahren.

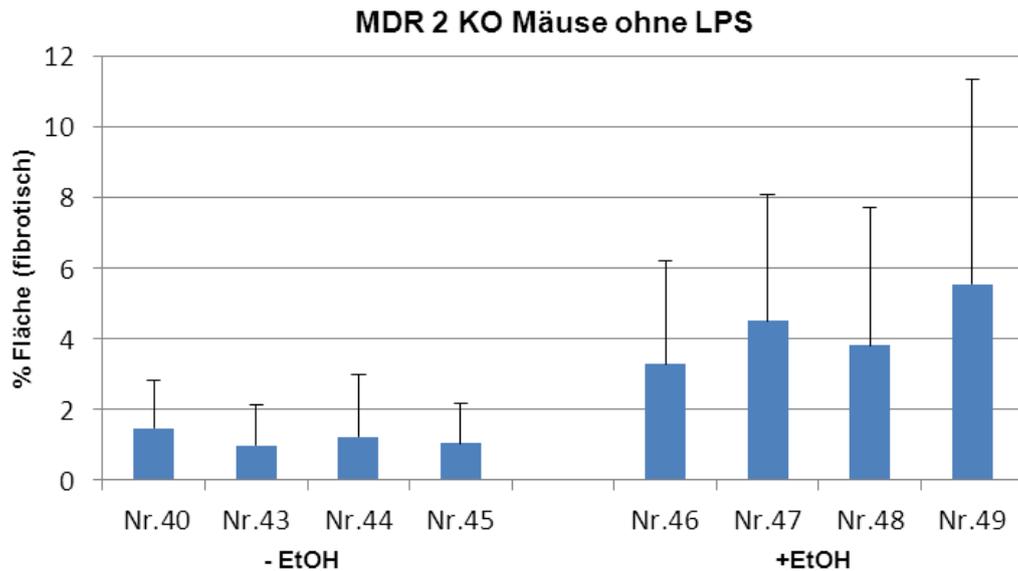


Abbildung 55: Quantitative Auswertung der MDR 2 KO Mäuse ohne LPS-Behandlung

Quantitative Analyse der Sirius Rot Färbung der Ethanolunbehandelten MDR 2 KO Mäuse 40, 43, 44, 45 und der Ethanolbehandelten MDR 2 KO Mäuse 46, 47, 48, 49. Angegeben ist der Prozentanteil der Leberfläche, die Kollageneinlagerung aufwies.

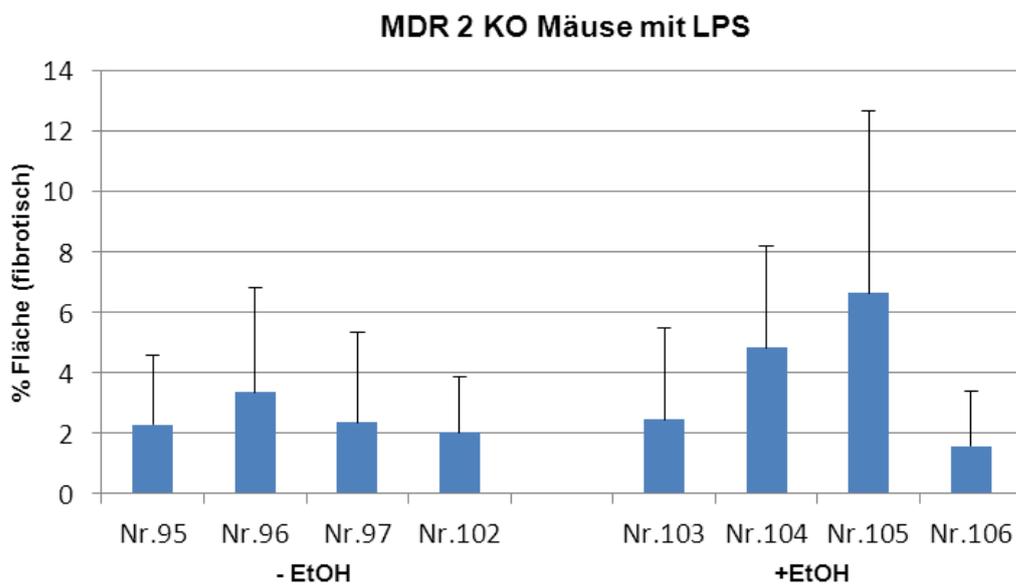


Abbildung 56: Quantitative Auswertung der MDR 2 KO Mäuse ohne LPS-Behandlung

Quantitative Analyse der Sirius Rot Färbung der Ethanolunbehandelten MDR 2 KO Mäuse 95, 96, 97, 102 und der Ethanolbehandelten MDR 2 KO Mäuse 103, 104, 105, 106. Angegeben ist der Prozentanteil der Leberfläche, die Kollageneinlagerung aufwies.

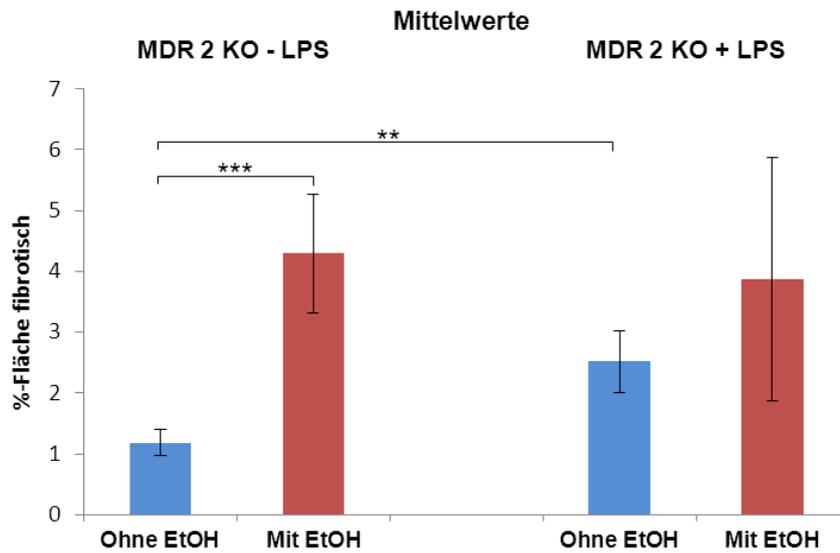


Abbildung 57: Durchschnitt der quantitativen Auswertung von MDR 2 KO Mäusen

Durchschnitt der in Prozent angegebenen fibrotischen Fläche der Leber aller MDR 2 KO Mäuse ohne und mit LPS Behandlung, ohne bzw. mit Ethanol Bedampfung.

** $p \leq 0,01$ [$p = 0,002$], *** $p \leq 0,001$ [$p = 0,0003$]

Auch bei den MDR 2 KO Mäusen war ein klarer Anstieg der fibrotischen Fläche in der Leber durch Alkohol zu beobachten. Durch die LPS Injektion wurden diese Werte noch weiter erhöht.

Interessant war der hoch signifikante Anstieg der fibrotischen Areale der Leber nach Ethanolgabe bei den MDR 2 KO Mäusen bereits ohne LPS-Behandlung.

Eine Signifikanz ließ sich auch basal, ohne Alkohol, nur durch LPS Behandlung beobachten.

Ein synergistischer Effekt beider Stimuli zusammen konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

3.7.2 Zusammenfassung aller Tiere:

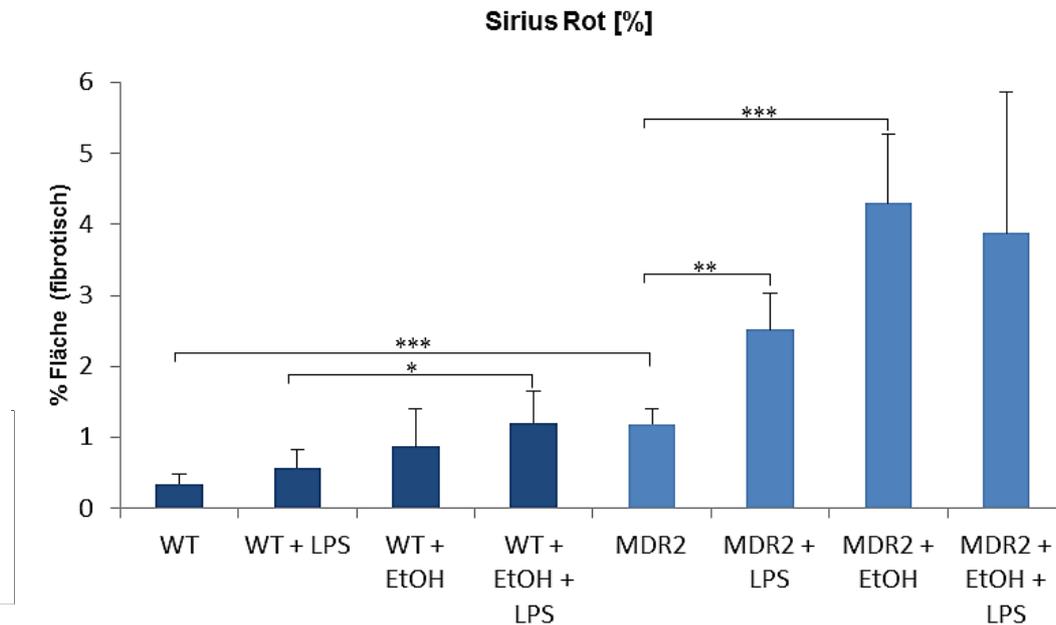


Abbildung 58: Durchschnitt der quantitativen Auswertung aller Mäuse im Versuch

Durchschnitt der in Prozent angegebenen fibrotischen Fläche der Leber aller Wildtyp- und MDR 2 KO Mäuse ohne und mit LPS Behandlung, ohne und mit Ethanol Bedampfung. WT: Wildtyp; LPS: Lippopolysaccharid; EtOH: Ethanol; MDR2: Multi-Drug-Resistance-2 (KO “knock out”)

(* p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001)

Durch die LPS Gabe war die Fibrosierung der Leber erhöht, wobei sie durch den Alkohol verstärkt wurde. Ein hoch signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und MDR 2 KO Mäusen lag darin, dass die knock-out Tiere schon basal auch ohne LPS einen höheren Schaden aufwiesen als die Wildtypmäuse. Durch den Ethanol stieg der Anteil der Kollageneinlagerung in der Leber sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den MDR 2 KO Mäusen an, wobei sich durch das LPS dieser Anstieg bei den MDR 2 KO Mäusen nicht weiter erhöhte.

In vitro Experimente

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Wirkung des Alkohols und des Zytokins TGF- β auf primäre Maushepatozyten *in vitro*.

3.8 Dosis-abhängiger zytotoxischer Effekt von Ethanol und TGF- β

Um herauszufinden, welche Ethanol- bzw. TGF- β Konzentration für primäre Maushepatozyten schädlich ist, wurde die Laktatdehydrogenase (LDH) Ausschüttung mit Hilfe eines LDH-Assays gemessen. Die LDH ist ein Enzym, welches die Oxidation von Lactat zu Pyruvat mit gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ zu NADH/H⁺ bzw. dessen Rückreaktion katalysiert und findet sich in allen Zellen, gelöst im Zytoplasma. Als klinischer Laborparameter zeigt eine Erhöhung der Aktivität dieses Enzyms im Serum an, dass über das normale Maß hinaus Zellen zugrunde gegangen sind und dabei ihre LDH freigesetzt haben.

Die Zellen wurden 48 Stunden mit Ethanol in einer Konzentration von bis zu 200 mM, und mit TGF- β in einer Konzentration von bis zu 10 ng/ml stimuliert. Danach wurde die Prozentzahl der toten Zellen anhand der LDH-Aktivität im Kulturüberstand bestimmt.

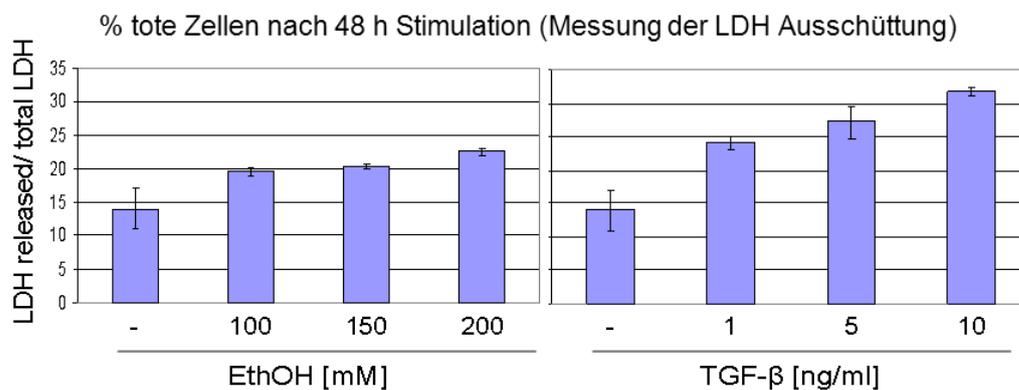


Abbildung 59: Messung der LDH-Aktivität

EthOH: Ethanol in mM; TGF- β in ng/ml. Gemessen wurde der Prozentanteil der toten Zellen nach 48 stündiger Stimulation in Form von freier LDH Aktivität im Verhältnis zur Gesamtaktivität der Zellen.

Es fand sich ein Dosis-abhängiger Effekt beider Substanzen. Für die weiteren Untersuchungen mit primären Maushepatozyten wurde Ethanol in einer Konzentration von 150 mM und TGF- β von 5 ng/ml eingesetzt. Ziel war es, den jeweiligen Effekt der

Einzelsubstanzen untersuchen zu können, ohne die Zellen dadurch bereits massiv zu schädigen.

3.9 Ethanol und TGF-β zusammen führten zu einer deutlichen Erhöhung des Zelltodes

Nachdem herausgefunden wurde, in welchen Konzentrationen Ethanol bzw. TGF-β toxisch auf Hepatozyten wirken, wurde geprüft welchen Effekt beide Substanzen zusammen ausüben.

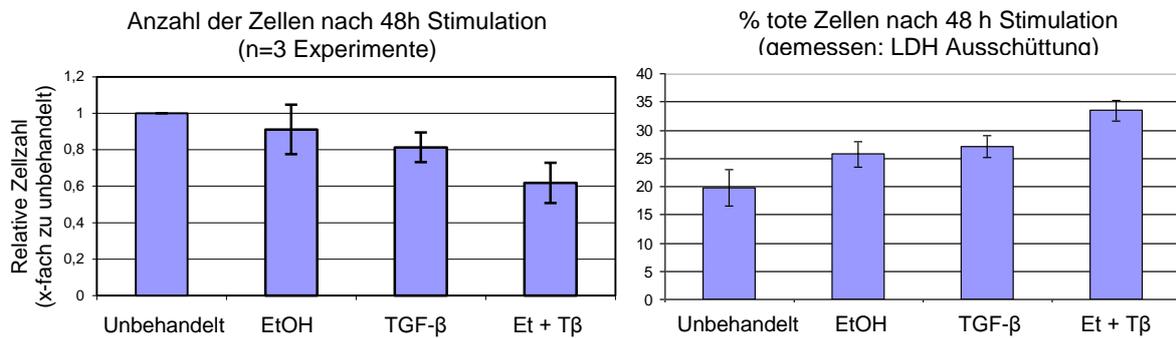


Abbildung 60: Erhöhter Zelltod durch Ethanol plus TGF-β

Links: Zahl der lebenden Zellen nach 48 stündiger Stimulation; Rechts: Prozentanteil an toten Zellen nach 48 stündiger Stimulation gemessen in Form von LDH-Aktivität.

(EtOH bzw. Et: Ethanol; Tβ: TGF-β: *transforming growth factor beta*)

Die Messung der LDH Aktivität zeigte eine zusätzlich gesteigerte Schädigung der Zellen nach Behandlung mit beiden Substanzen zusammen und damit einhergehend eine deutliche Abnahme der Zellzahl.

3.10 Morphologie von Maushepatozyten nach 48 Stunden Ethanol - /TGF-β Stimulation

Nachdem die Zellen 48 Stunden mit 150 mM Ethanol bzw. 5 ng/ml TGF- β behandelt wurden, wurde ihre Morphologie unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

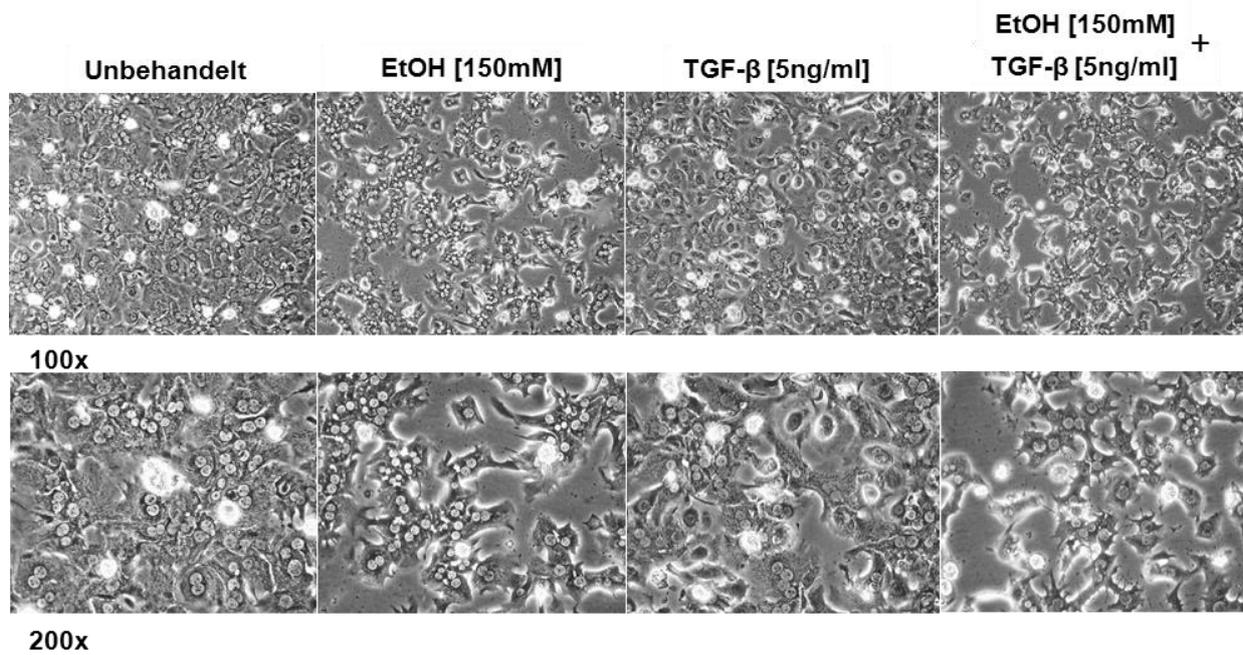


Abbildung 61: Morphologie der Zellen nach 48 stündiger Stimulation

Primäre Maushepatozyten nach 48 Stunden in Kultur.

EtOH: Ethanol (150 mM); TGF- β : *Transforming growth factor beta* (5 ng/ml)

Durch Ethanol verringerte sich die Zelldichte, wobei die Hepatozyten jedoch im Zellverband zusammen blieben. Durch TGF- β verloren die Zellen ihre ursprüngliche Morphologie und lösten sich aus dem Zellverband. Die Zell-Zellkontaktflächen nahmen deutlich ab. Die Behandlung der Zellen mit beiden Substanzen zusammen führte zu weiter vermehrtem Verlust der epithelialen Morphologie. Die Hepatozyten veränderten sich von kubischen zu langgezogenen Zellen mit sternförmigen Fortsätzen.

3.11 Bestimmung der Apoptose

Mit der Anwendung des *Cell death ELISA Kit's von Roche* zeigte sich, dass es sich beim Zelltod durch Ethanol und TGF- β hauptsächlich um Apoptose und weniger um Nekrose der primären Maushepatozyten handelt. Der Kit misst immunchemisch die Histon-Komplexe der DNA Fragmente. Bei der Nekrose von Zellen befinden sich die Histonkomplexe im Zellkulturüberstand während sie bei der Apoptose zunächst noch innerhalb der Zellen verbleiben und daher nur nach der Zellyse detektiert werden können. Daher war die hier durchgeführte Messung spezifisch für Apoptosedetektion.

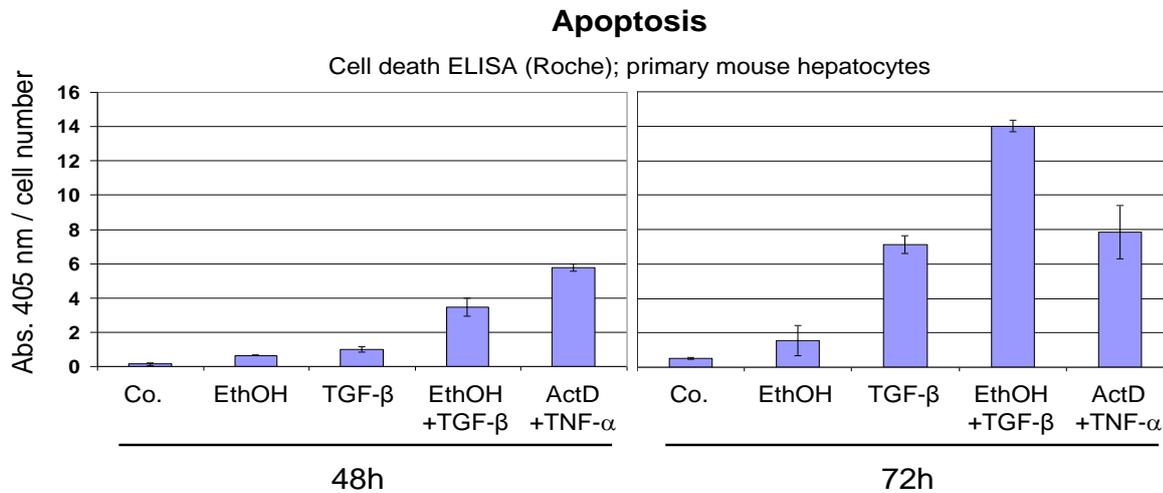


Abbildung 62: Bestimmung der Apoptoserate.

Mit Hilfe des *Cell Death* ELISA Kits von Roche wurde die Apoptoserate der Zellen nach 48 – bzw. 72-stündiger Stimulation gemessen. ActD (0,1 µg/ml) und TNF-α (10 ng/ml) wurden als Positivkontrollen eingesetzt und die Messwerte auf die Zellzahlen normalisiert.

Durch die Quantifizierung der Histonkomplexe mittels Spektrophotometrie wurde gezeigt, dass die Hepatozyten durch Alkohol oder TGF-β in Apoptose gehen, behandelte man sie jedoch mit beiden Substanzen zusammen, verstärkte sich die Apoptose schon nach 48 Stunden deutlich. Nach 72 h verstärkte sich dieser Effekt weiter und erreichte ein mehr als additives Niveau.

3.12 Ethanol und TGF-β führten zur Superinduktion des Profibrogenen Mediators CTGF (*Connective tissue growth factor*)

Einhergehend mit der verstärkten Apoptose konnte eine vermehrte Aktivierung der Caspase 3 im Westernblot nachgewiesen werden (Abb. 63). Interessant war, dass auch CTGF (Abb. 63), ein Heparin bindendes 38 kD großes, cysteinreiches Peptid und *downstream*-Mediator von TGF-β, das in fibrotischem Lebergewebe sehr stark exprimiert wird (Gressner, A.M., 2006), durch die Kostimulation verstärkt gebildet wurde. Dies ließ vermuten, dass die TGF-β Signaltransduktion in Gegenwart von Ethanol verstärkt wurde.

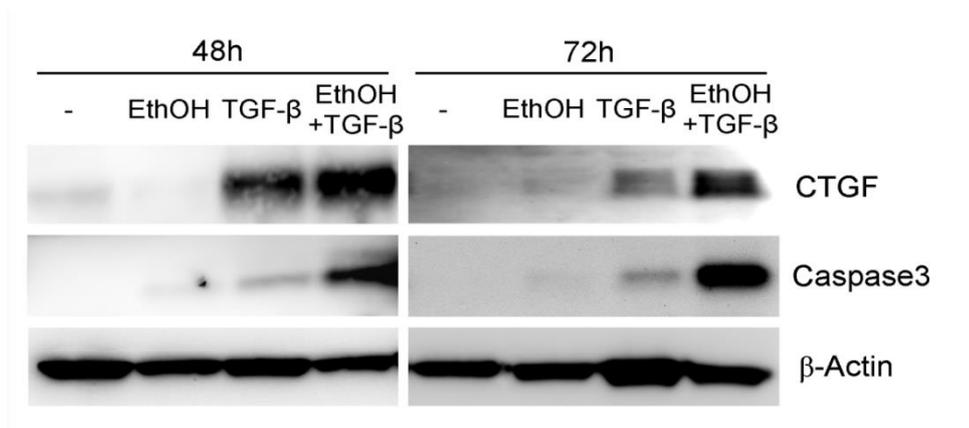


Abbildung 63: CTGF Induktion und Caspase 3 Aktivierung durch Ethanol und TGF-β

Westernblot. Stimulation von Maushepatozyten 48 bzw 72 Stunden. CTGF: Connective Tissue Growth Factor, 38 kD; Caspase 3: (aktiviert) 17, 19 kD. β-Actin: housekeepinggen.

Nachdem die primären Maushepatozyten 48 – bzw. 72 Stunden mit Ethanol und TGF-β behandelt worden waren, wurden die Zellen lysiert und die isolierten Proteine auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

Der Westernblot zeigte eine Superinduktion von CTGF und eine Aktivierung von Caspase 3 insbesondere nach Co-Stimulation mit Ethanol und TGF-β.

3.13 Expression von TGF-β Rezeptoren

Mittels PCR wurde gezeigt, dass TGF-β die Expression seiner Typ I Rezeptoren, ALK-1 und ALK-5 induzierte, während Ethanol eine erhöhte Expression des TGF-β Typ II Rezeptors (TβRII) bewirkte. (Abb. 64)

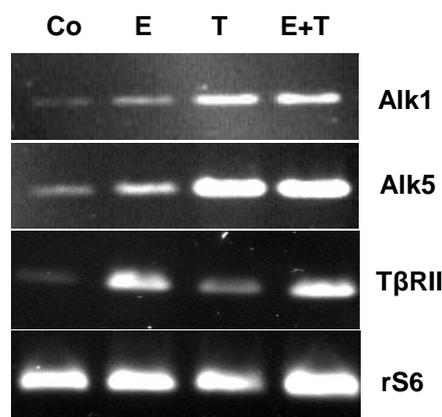


Abbildung 64: Expression von TGF-β Rezeptoren (RT-PCR) nach 48 Stunden Stimulation

Co: Kontrolle (unstimulierte Zellen); E: Ethanol [150 mM]; T: TGF- β [5 ng/ml]; E+T: Ethanol + TGF- β ; rS6: Housekeepinggen.

Nach 48 stündiger Stimulation von primären Maushepatozyten mit Ethanol und TGF- β wurden die Zellen lysiert, die isolierte RNA zu cDNA umgeschrieben und die Expressionsmuster der angegebenen RNAs mittels PCR untersucht.

Nachdem primäre Maushepatozyten 24-, 48- und 72 Stunden mit Ethanol stimuliert wurden, bzw. 48 Stunden mit Ethanol und TGF- β , zeigte sich auch auf Proteinebene, dass durch Ethanol der TGF- β -Rezeptor II hochreguliert wurde. (Abb.65)

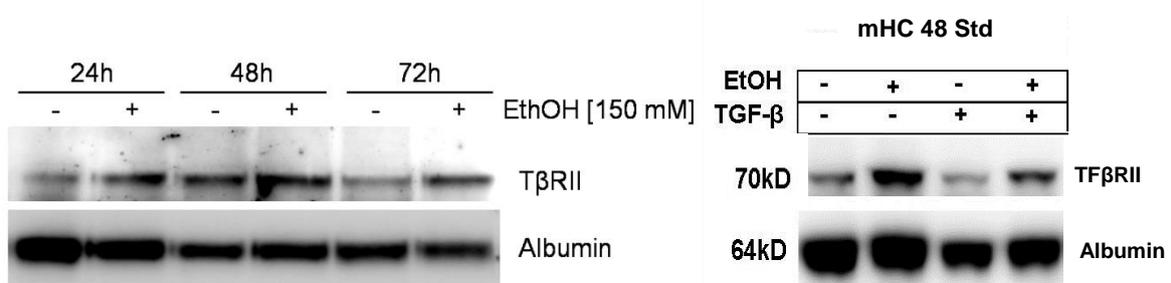


Abbildung 65: Induktion von T β RII durch Ethanol (Western Blot)

Primäre Maushepatozyten wurden für 24, 48, 72 h mit Ethanol stimuliert bzw. 48 h mit Ethanol und TGF- β . Die Zelllysate wurden mittels Westernblot auf Expression des T β RII (TGF- β Rezeptor II) untersucht. Die Expression von Albumin wurde als Ladungskontrolle ebenfalls bestimmt.

Auch *in vivo* Daten lieferten das Ergebnis, dass durch Ethanol der TGF- β Rezeptor II induziert wurde (Abb. 66). Im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Stuttgart-Hohenheim (Prof. Ina Bergheim) erhielten wir Gewebeproben von Alkohol-behandelten Mäusen. Durch Bolusinjektion, einer Injektion, die dazu dient in einem verhältnismäßig kurzen Zeitraum ein definiertes Flüssigkeitsvolumen direkt über die Speiseröhre zu verabreichen, wurde diesen Tieren 6 g Ethanol pro kg Körpergewicht zugeführt. Die Tiere wurden jeweils 12 bzw. 48 h später getötet und ihre Lebern asserviert. Die isolierte RNA aus dem Lebergewebe wurde in cDNA umgeschrieben und für die real-time-PCR zur Bestimmung der T β RII Expression eingesetzt.

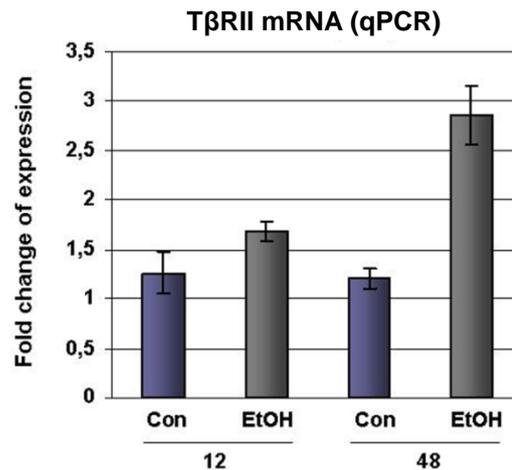


Abbildung 66: Induktion von TβRII durch Ethanol *in vivo* (Bolusinjektion)

Real-time-PCR. Erhöhte TGF-β Rezeptor II Expression nach Alkoholgabe. Leberproben von Prof. Dr. rer. nat. Ina Bergheim und die Aufarbeitung der Proben mit freundlicher Unterstützung von Dr.sc.hum. Loredana Ciucan.

Con: Kontrolle (Tiere ohne Ethanolgabe); EtOH: Ethanol [6g/kg Körpergewicht]; TβRII: TGF-β Rezeptor II; 12, 48: nach 12 bzw. 48 Stunden nach der Alkoholgabe getötet.

3.14 Verstärkte Smad-Phosphorylierung durch Alkohol

TGF-β induzierte die Expression seiner Typ I Rezeptoren, ALK-1 und ALK-5, während Ethanol zur vermehrten Expression des TGF-β Typ II Rezeptors (TβRII) führte. Im Folgenden wurde daher untersucht, ob die Co-Stimulation auch zu einer verstärkten Aktivierung des Signalwegs selbst führt.

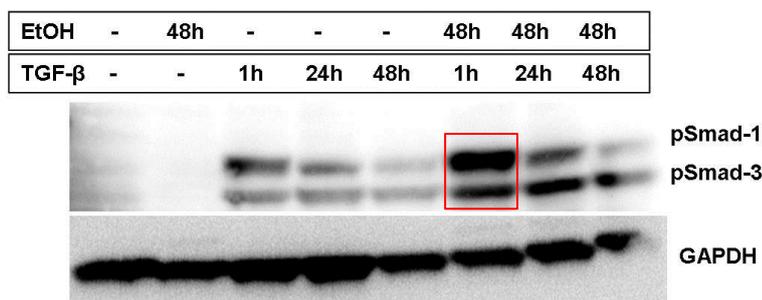


Abbildung 67: Induktion von pSmad1/3 durch Ethanol

Western Blot. Die Phosphorylierung der Smad Proteine wurde verstärkt durch Langzeitwirkung von Ethanol in Gegenwart von TGF-β (rot markiert).

(Ethanol [150 mM]; TGF-β [5ng/ml])

Tatsächlich bewirkten beide Stimulanzen zusammen eine verstärkte Phosphorylierung von Smad1 und -3. Offenbar war für diesen Effekt insbesondere die Prästimulation der Zellen mit Ethanol entscheidend, da dann bereits nach nur 1 h TGF- β Stimulation das Signal deutlich verstärkt war (Abb. 67).

Diese verstärkte Signalübertragung konnte mit Reportergen-Assays („CAGA“- bzw. „BRE“-Assay, s. Abb. 68) bestätigt werden.

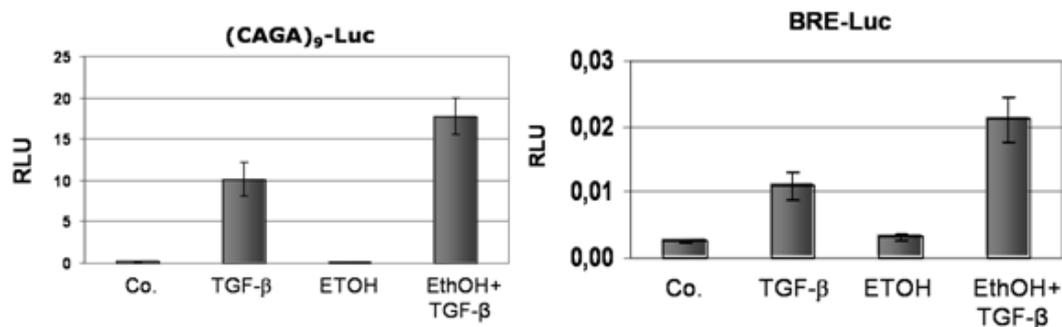


Abbildung 68: Reportergen-Assays zur Bestimmung der Smad-Signalwegaktivitäten

Einsatz zweier Reportergenkonstrukte (Smad 3/4 Response Elemente des PAI Promotors: CAGA-Luc; Smad1 Response Elemente des Id1 Promotors: BRE-Luc; ALK1 Signalweg [70 – 71]) zeigte, dass Prästimulation mit Ethanol beide durch TGF- β (5 ng/ml; 8 h) induzierten Signalwege in Hepatozyten verstärkt, während Ethanol alleine keine Induktion der Signalwege zeigte. Hepatozyten wurden transient transfiziert und 8 Stunden mit TGF- β bzw. / -und Ethanol stimuliert bevor die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten gemessen wurde. (RLU: relative light units)

Diese Ergebnisse entstanden mit freundlicher Unterstützung von Frau Dr.sc.hum. Loredana Ciucan.

3.15 Phosphorylierung von Akt nach Ethanol und TGF- β Behandlung

Da die primären Hepatozyten durch Ethanol und TGF- β verstärkt in Apoptose gehen, wurde im Weiteren untersucht, welcher Signalweg, angefangen von der T β RII-Induktion durch Alkohol bis zur Spaltung der Caspase 3 eingeschaltet wird und schliesslich zur Apoptose führt.

Akt ist eine Serin/Threonin-Kinase, die eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Prozessen spielt. Durch die Phosphorylierung von Akt werden apoptotische Prozesse inhibiert und „survival-pathways“, also Überlebenssignalwege in der Zelle eingeschaltet.

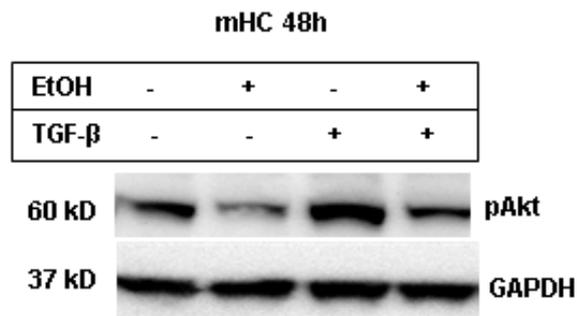


Abbildung 69: Die Inhibierung der Phosphorylierung von Akt durch Alkohol

Westernblot. Primäre Maushepatozyten wurden 48 Stunden mit Ethanol [150 mM], TGF- β [5 ng/ml] und Ethanol + TGF- β behandelt. pAkt: phosphoryliertes Akt; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, housekeepinggen.

Akt wird basal in Hepatozyten phosphoryliert, liegt also zu einem großen Teil in aktiver Form vor. Die Stimulation mit TGF- β verstärkte die Phosphorylierung von Akt. Ethanol hingegen reduziert die Akt-Phosphorylierung deutlich (Abb. 69). Bei Applikation beider Substanzen zusammen dominierte der Ethanol-Effekt und Akt wurde inhibiert. Diese Reduktion von pAkt scheint der erste Schritt zu apoptotischen Prozessen zu sein und die Beobachtung, dass TGF- β alleine diese Reduktion nicht bewirkte, könnte erklären, warum TGF- β (ohne Ethanol) nicht zur Apoptose führt.

3.16 Die Inhibierung von PI3K (Phosphatidylinositol – 3 Kinase)/Akt durch LY 294002 führte, wie Ethanol, zu verstärkter Apoptose

Die Inhibierung der PI3K und somit von Akt durch LY 294002 führte zur Caspase 3 Superinduktion wenn die Zellen mit Ethanol und TGF- β behandelt wurden.

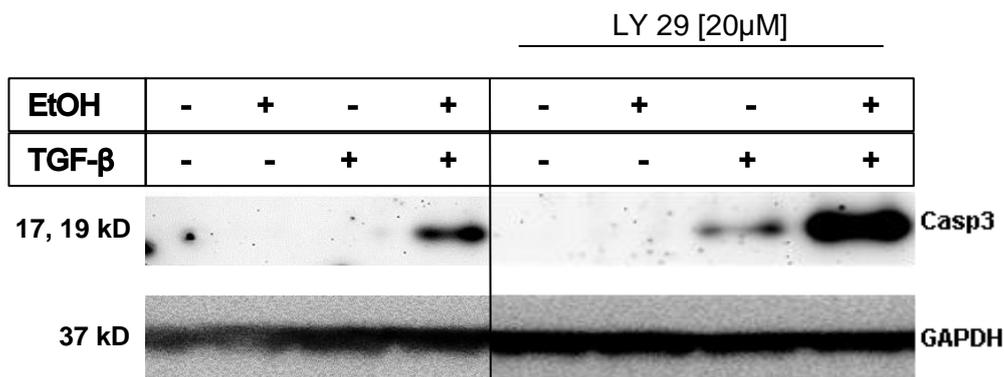


Abbildung 70: Verstärkte Apoptose durch Inhibition der PI3K/Akt

Westernblot – Primäre Maushepatozyten wurden 48h mit 150 mM Ethanol [EtOH], 5 ng/ml TGF-β und beiden Substanzen zusammen jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit des Akt-Inhibitors LY 29 stimuliert. Ohne den LY29-Inhibitor wurde eine geringere Casp3– Aktivität beobachtet (links) als mit dem Inhibitor (rechts).

[LY294002, Inhibitor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K); Casp3: aktivierte Caspase 3; GAPDH: Glycerinaldehyd – 3 – Phosphat – Dehydrogenase, housekeepinggen]

Somit bestätigt sich die Hypothese, dass eine verringerte Akt-Aktivität den ersten Schritt der Ethanol/TGF-β vermittelten Apoptose darstellt.

3.17 Die Inhibierung von GSK3 führte zu einer Hemmung der Apoptoseinduktion

Die Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3) ist eine ubiquitär exprimierte Serin/Threonin-Kinase, deren Inaktivierung entscheidend für das Überleben der Zelle ist. Phosphoryliertes Akt hemmt die Aktivität von GSK3.

Primäre Maushepatozyten wurden 48 h mit Ethanol und TGF-β behandelt beziehungsweise mit dem GSK3 Inhibitor SB 216763 prästimuliert um herauszufinden, welche Auswirkung die Inhibierung der GSK3 auf die Apoptose hat.

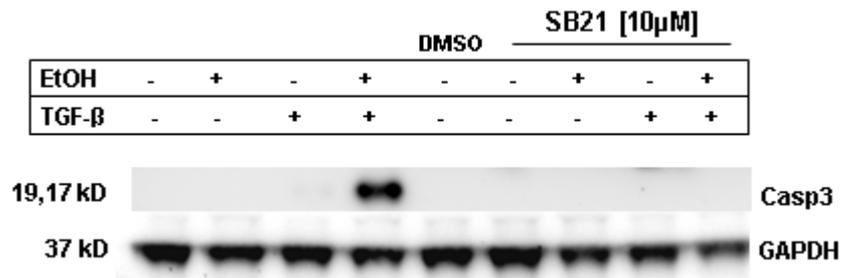


Abbildung 71: Caspase 3 Suppression durch GSK3 Inhibierung

Westernblot – Primäre Maushepatozyten wurden 48h mit 150 mM Ethanol [EtOH], 5 ng/ml TGF-β und beiden Substanzen zusammen jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit des GSK3-Inhibitors SB 216763 stimuliert. Durch die Hemmung der GSK3 Aktivität wurde die Casp 3 – Aktivität gehemmt. Da SB21 in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst war wurde DMSO als Kontrolle aufgetragen und zeigte, wie erwartet keinerlei Einfluss weder auf die Casp3 – Aktivität noch auf das housekeepinggen GAPDH.

Durch die Inaktivierung der GSK3 wurde auch die Caspase 3 Aktivität und somit die Apoptose gehemmt, was den Schluss nahelegt, dass die reduzierte Akt Aktivität durch Ethanol zu einer vermehrten Aktivierung der GSK3 führt was wiederum die Induktion von Apoptose durch TGF-β ermöglicht.

3.18 Induktion des Akt-Inhibitors PTEN durch Alkohol

Es ist bekannt, dass PTEN über PIP3 die Akt Aktivierung verhindert. [72 – 75]

Deshalb wurde untersucht, welchen Einfluss Ethanol, TGF-β oder beide Substanzen zusammen auf die PTEN Expression haben.

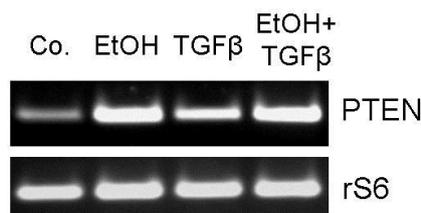


Abbildung 72: Expression von PTEN durch Ethanol

PCR. Primäre Maushepatozyten wurden 48h mit 150 mM Ethanol [EtOH], 5 ng/ml TGF- β und beiden Substanzen zusammen stimuliert, davon die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. PTEN: *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*. (Tumorsuppressorgen, das auf dem Chromosom 10q23 lokalisiert ist). Ethanol induzierte die Expression von Akt-Inhibitor PTEN.

Ethanol induzierte die Expression von PTEN was oben beschriebene Ergebnisse nach Inhibition der GSK3 bestätigt und die Hypothese unterstützt, dass durch Alkohol die Akt gehemmt wird, dadurch GSK3 aktiv wird und Apoptose induziert werden kann.

3.19 Cytochrom C Freisetzung ins Zytoplasma durch Schädigung der Mitochondrien

Im Zusammenhang mit der Caspase 3-Aktivierung in der Apoptose sind Signalwege identifiziert worden, die abhängig oder unabhängig von der mitochondrialen Cytochrom C Freisetzung sind. Ein möglicher Signalweg, der hier untersucht wird ist die Ausschüttung von Cytochrom C aus Mitochondrien-Außenmembran (MOMP), das die Caspase 3 Aktivierung fördert.

Um die mitochondriale Cytochrom C Freisetzung in primären Maushepatozyten, die in Apoptose gehen, nachdem sie 48 Stunden mit Ethanol und TGF- β behandelt worden waren zu untersuchen, wurden in diesen Zellen die Mitochondrien aufgereinigt und die Proteinlysate der Mitochondrien und die des Zytoplasmas getrennt voneinander aufgetragen.

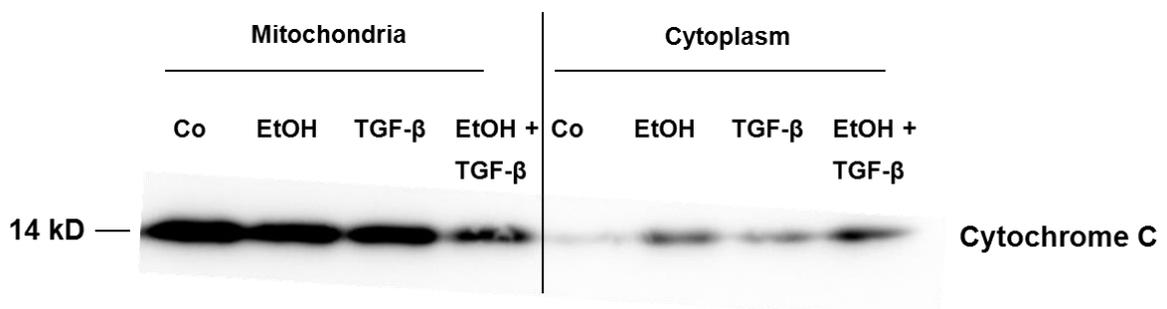


Abbildung 73: Cytochrom C Ausschüttung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma

Im Westernblot wurden die mitochondrialen und cytoplasmatischen Proteine getrennt voneinander aufgetragen. Vor der Isolation von Mitochondrien und Zytoplasma wurden die Zellen 48h mit 150 mM Ethanol [EtOH], 5 ng/ml TGF- β und beiden Substanzen zusammen behandelt. (Co: Kontrolle unbehandelt). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Nachdem die Mitochondrien und das Zytoplasma voneinander isoliert wurden und die Proteine auf einem SDS-Gel aufgetragen wurden, wurde die Cytochrom C Expression untersucht. In den Mitochondrien war nach Ethanol plus TGF- β Behandlung weniger Cytochrom C zu sehen während es im Zytoplasma zunahm, was anzeigt, dass durch die Schädigung der Mitochondrien das Cytochrom C ins Zytoplasma sezerniert wurde.

3.20 Antiapoptotische Bcl2 Expression

Die Intaktheit der Mitochondrien-Außenmembran wird durch die Interaktion von pro- und anti-apoptotischen Mitgliedern der BCL-2 Proteinfamilie gewährleistet.

Nach 48-ig stündiger Ethanol und TGF- β Behandlung der primären Maushepatozyten wurde im Westernblot die antiapoptotische Bcl2 Proteinexpression untersucht.

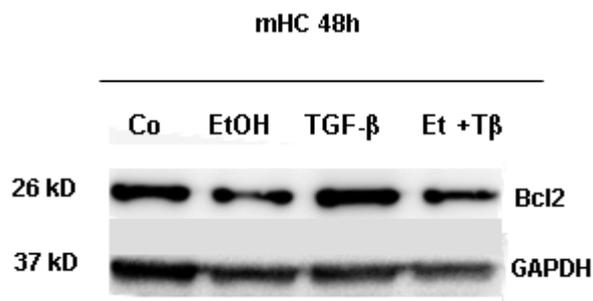


Abbildung 74: Bcl2 Regulation nach Ethanol und TGF- β -Behandlung

Westernblot. Co: Kontrolle (unbehandelt); EtOH: Ethanol; TGF- β : *transforming growth factor beta*; Et + T β : Ethanol + TGF- β ; primäre Maushepatozyten wurden 48 Stunden stimuliert.

Bei den Ethanolbehandelten Hepatozyten und den Ethanol plus TGF- β behandelten, wurde Bcl2 herunterreguliert. Da es antiapoptotisch wirkt, bedeutet dies, dass die Zellen unter diesen Konditionen in Apoptose gehen können.

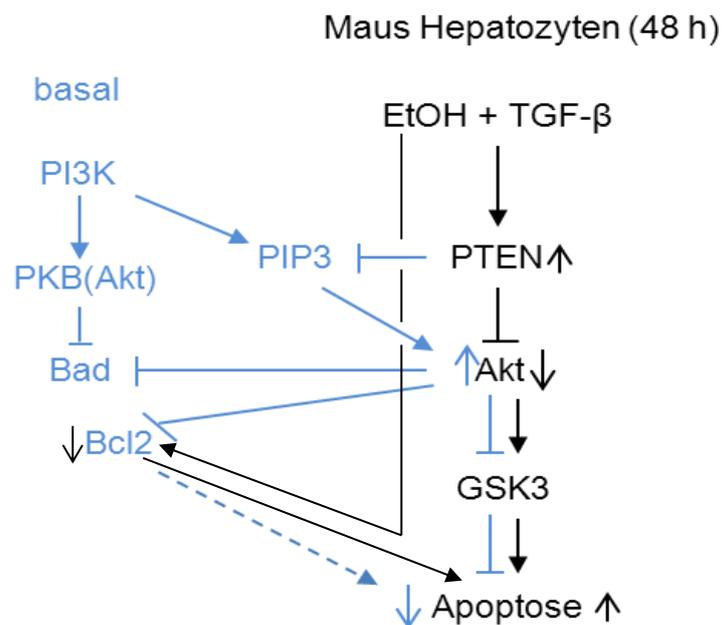


Abbildung 75: Schematische Darstellung der Apoptose bei primären Maushepatozyten

Wie Ethanol und TGF-β nach 48ig – stündiger Behandlung auf primäre Maushepatozyten zur Apoptose führen. Blau markiert ist links der basale Weg aufgezeigt, der die Zellen vor Apoptose schützt; rechts dagegen der Weg in primären Maus-Hepatozyten, der durch Ethanol und TGF-β die Zellen in die Apoptose führt.

Unter normalen physiologischen Bedingungen liegt Akt, das von PIP3 aktiviert wird, in den Zellen in phosphorylierter Form vor und gewährleistet das Überleben der Zelle unter anderem durch Blockade von pro-apoptotischen Proteinen Bad und Bcl2. Primäre Maushepatozyten zeigten nach 48 Stunden eine Erhöhung von PTEN durch Ethanol, welches durch die Hemmung von PIP3 auch Akt hemmt womit GSK3 aktiviert wurde. Durch Ethanol reduzierte sich die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bcl2 und durch Ethanol und TGF-β erhöhte sich im Zytoplasma die Konzentration von Cytochrom c was auf eine Destabilisierung der Mitochondrienmenbran hindeutet. Es folgt eine Aktivierung der Caspase 3 und die Vollendung der Apoptose.

3.21 Smad-abhängige Apoptose Induktion

Nachdem gewisse Schlüsselproteine der Apoptose, die in primären Maushepatozyten nach Alkohol-und TGF-β-Behandlung eine wichtige Rolle spielen, identifiziert worden sind, sollte abschließend noch untersucht werden, ob die Induktion der Apoptose durch TGF-β die Aktivierung der klassischen TGF-β Botenstoffe, der Smad Proteine benötigt oder ob sie Smad-unabhängig (z.B. über MAPKinase-Signalwege) vermittelt wird. Um dies

herauszufinden wurden die Zellen mit SB 431542 einem TGF- β Rezeptor Kinase Inhibitor vorbehandelt und anschließend mit Ethanol und TGF- β stimuliert.

Es wurde nachgewiesen, dass SB-431542 die TGF- β induzierte Transkription, Genexpression, Apoptose und Wachstumssuppression inhibiert [76].

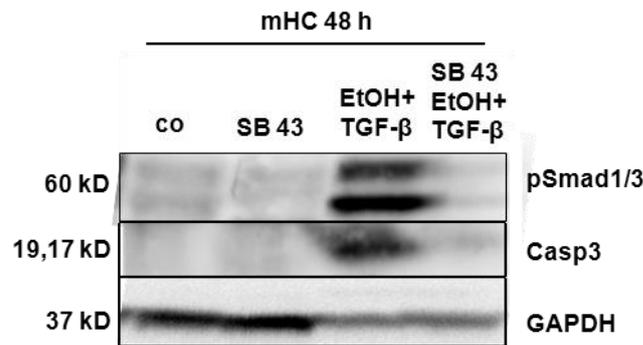


Abbildung 76: Apoptoseinduktion durch Aktivierung von Smads

Westernblot – Primäre Maushepatozyten wurden 48h mit 5 μ M SB43 (SB431542 TGF- β -Rezeptor-Kinase-Inhibitor), 150 mM Ethanol [EtOH] + 5 ng/ml TGF- β und alle drei Substanzen zusammen stimuliert. Smad 1/3 wurde, wie erwartet durch EtOH + TGF- β phosphoryliert und durch SB43 inhibiert. Caspase3 (Casp3) Aktivität wurde durch EtOH und TGF- β induziert. Als Kontrollen wurden GAPDH als housekeepinggen, unbehandelte Proteinlysate (co) und durch SB43-behandelte Proteinlysate eingesetzt.

Durch Inhibition der TGF- β Rezeptoraktivität wurde auch die Caspase 3 Aktivierung inhibiert, und die zusätzliche Behandlung durch Ethanol und TGF- β führte die Zellen nicht mehr zur Apoptose. Daraus kann geschlossen werden, dass die Smad-Phosphorylierung durch TGF- β für die hier untersuchte Induktion der Apoptose benötigt wird.

4. DISKUSSION

In vivo Experimente

Chronischer Alkoholmissbrauch führt häufig zu einer "Vernarbung" (Fibrose) der Leber, die bei andauernder Schädigung zu einer Zirrhose und schließlich zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) führen kann.

Die Leberfibrose ist eine Erkrankung, für die es im fortgeschrittenen Stadium keine Heilungschancen gibt. Die Lebertransplantation ist derzeit die einzige Therapieoption. In frühen Phasen sind die Schädigungen jedoch oft reversibel, so dass eine gezielte, möglichst nebenwirkungsfreie Behandlung erfolgversprechend wäre. Voraussetzung hierfür ist jedoch das detaillierte Wissen über die molekularen Grundlagen der Erkrankung.

Die hier durchgeführten Versuche sollten dem besseren Verständnis der zellbiologischen Mechanismen dienen, die zu einer Alkoholbedingten Leberschädigung führen.

Versuche in der Alkohol-Dampfkammer haben gegenüber klassischen "Trinkmodellen" den Vorteil, dass alle Tiere exakt gleiche Mengen an Alkohol zu sich nehmen, da dies über die Atmung geschieht. Ein Nachteil ist jedoch, dass so die Darmpassage umgangen wird und der Alkohol direkt ins Blut aufgenommen wird. Um dies auszugleichen wurde den Tieren zusätzlich LPS intraperitoneal zugeführt.

Unter oraler Aufnahme modifiziert Ethanol die Darmflora, wobei das LPS von gramnegativen Bakterien aus dem Darm in den Blutstrom gelangt und damit in die portale Zirkulation (Endotoxämie). Die Leber reguliert gezielt die Aufnahme von LPS und antwortet mit der Produktion von Zytokinen [77].

4.1 Veränderung des Körpergewichts

Durch Studien an Menschen wurde gezeigt, dass Alkoholiker verglichen mit Gelegenheitstrinkern ein niedrigeres Körpergewicht aufgrund der Verringerung der Fettmasse aufweisen [78].

Sowohl Anji A, Kumari M [79] als auch Gerry Gass et al. [81] zeigten in ihren Experimenten, dass auch Mäuse nach Alkoholzufuhr im Laufe der Zeit, auch wenn die Alkoholgabe in flüssiger Form zusammen mit einer nährstoffreichen Mahlzeit verabreicht wurde, ein geringeres Gewicht aufwiesen als die Kontrollmäuse ohne Alkoholintoxikation.

Nach täglicher 5 stündiger Alkoholbedampfung über 8 Wochen wiesen alle Tiere, sowohl Wildtyp als auch MDR 2 KO Mäuse vom Zeitpunkt des Versuchsbeginns bis zum Tag ihrer Tötung, eine Gewichtsreduktion auf, verglichen mit den Tieren ohne Alkoholzufuhr. Allen

Mäusen wurde normales Mausfutter *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Sowohl Wildtyp- als auch MDR 2 KO- Tiere der Kontrollgruppen nahmen in den 8 Wochen an Gewicht zu wobei die Tiere, die mit LPS behandelt worden waren entweder nur ganz leicht zunahmen (Wildtyp), oder sogar abnahmen (MDR 2 KO).

Tsukamoto et. al., lieferten einen direkten Beweis für die erhöhte Darm-Permeabilität bei Alkohol-gefütterten Tieren und wiesen nach parenteraler LPS-Gabe eine vorübergehende Erhöhung der Endotoxinkonzentration, sowohl im Bereich der Pfortader als auch im gesamten Körper nach [80]. Also ist davon auszugehen, dass das verabreichte LPS wegen seiner toxischen Eigenschaft eine Abnahme des Gewichts bei den MDR 2 KO Mäusen fördert wobei dies bei einem gesunden WildtypTier nicht ausreicht um auch dort eine Gewichtsreduktion zu erreichen.

4.2 Das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht

Bei chronischem Alkoholkonsum wird oft eine Hepatomegalie [82 – 83] festgestellt und das Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht ermittelt, das meist zwischen 15 – 30% durch den Alkohol erhöht ist [84 – 86].

Bei den Versuchen von Popov et al. entwickelten MDR 2 KO Mäuse schon nach 2 Wochen eine signifikante Hepatomegalie, die bis zur 8. Woche fortschritt [87].

Nach 8 Wochen Alkoholbedampfung wurden die Lebern der Versuchstiergruppe und der Kontrollgruppe gewogen und ihr Verhältnis zum jeweiligen Körpergewicht berechnet. Die alkoholisierten WildtypTiere, die noch zusätzlich mit LPS behandelt wurden, wiesen nur eine 1%ige Erhöhung des Verhältnisses von Leber – zu Körpergewicht auf, im Vergleich zu den Tieren, die keinen Alkohol eingeatmet hatten. Bei den MDR 2 KO Mäusen ohne LPS war das Verhältnis Leber – zu – Körpergewicht der alkoholisierten Lebern mit 17,3% signifikant höher als bei den nicht-alkoholisierten knock out Tieren.

Bei den WildtypTieren ohne und den MDR 2 KO Tieren mit LPS wurde ein gegenteiliges Ergebnis festgestellt. Zu 9 bzw. 10 % war das Leber-Körpergewicht-Verhältnis größer ohne Alkohol.

Die Gründe einer Lebervergrößerung sind Fettakkumulation, Hepatozytenvergrößerung durch einen geminderten Proteinkatabolismus und eine erhöhte Retention von intrazellulärem Wasser [88 – 98].

Nach den histologischen Befunden ist bei den mit Alkohol behandelten Tieren keine Einlagerung von Fett ersichtlich. Es ist zu vermuten, dass bei den MDR 2 KO Tieren, die mit Alkohol jedoch nicht mit LPS behandelt worden waren, ein geminderter Proteinkatabolismus

stattgefunden haben könnte. Dies erklärt jedoch nicht, warum bei den mit LPS behandelten Knock out Mäusen die alkoholisierten Lebern nicht vergrößert waren. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Lebern der mit Alkohol behandelten Tiere so fibrotisch waren, dass sie weniger intrazelluläres Wasser beinhalteten.

4.3 Einfluss von Alkohol und/oder LPS auf die Aktivitäten von ALT, AST und ALP im Serum

Durch die Bestimmung von Serum Markern der Leber kann das Ausmaß von Leberschaden und Leberfunktion abgeschätzt werden. Solche Marker wurden im Serum, das durch retrobulbäre Blutentnahme gewonnen wurde, gemessen bzw. deren Aktivität bestimmt. Im Vergleich zu anderen Methoden der Blutentnahme, wie der Punktion der Vena facialis (Unterkieferbereich) mittels der bei Fernandez et al. [99] höhere Level an ALT, AST, Triglyceriden und Cholesterol gemessen wurden, erlaubt die Punktion des retrobulbären Venenplexus in sehr kurzer Zeit das Sammeln einer größeren Menge Blut. Diese ist notwendig, da die meisten Enzymaktivitäten in einer relativ hohen Konzentration vorliegen müssen um messbar zu sein. Ein weiterer elementarer Vorteil der retrobulbären Blutentnahme gegenüber anderer Entnahme-Methoden ist die Möglichkeit des mehrmaligen Blutabnehmens, nach der klinisch – pathologische Effekte über einen bestimmten Zeitraum für ein und dasselbe Tier erforscht werden können [100].

Je nach der jeweiligen Methode der Blutabnahme wurden unterschiedliche Werte in den Aktivitäten von ALT, AST und ALP gemessen. Bei Champy et al. [101] und Mahl et al. [102] war z.B. die AST Aktivität mittels retrobulbärer Blutentnahme höher, als bei der Blutgewinnung über die Schwanzvene bzw. sublinguale Vene. Niedrigere Schwankungen der klinischen Parameter erzielten Arbeitsgruppen, die die Vena Cava punktierten oder das Blut direkt aus dem Herzen entnahmen. Diese Methoden sind allerdings nur einmalig durchführbar [103].

Schwankungen in den Leberwerten sind nicht nur das Ergebnis von unterschiedlichen Blutentnahme-Methoden sondern auch von Stamm, Alter und Geschlecht des Tieres, so wie die Wahl des Narkosemittels, die Art wie man das Tier während der Blutentnahme hält, der Hämolyse und die allgemeine Laborroutine, die mit Stress assoziiert ist, an die das Tier sich nicht leicht gewöhnen kann. [104 – 110].

Dies alles kann die relativ hohen Schwankungen der Leberwerte unter den einzelnen Tieren erklären.

Die Alanin-Aminotransferase (ALT) ist ein Enzym, das vor allem im Zytoplasma von Hepatozyten vorkommt, wobei erhöhte ALT-Werte auf eine Lebererkrankung hindeuten bei der die Hepatozyten geschädigt wurden.

Die Aspartat-Aminotransferase (AST) ist zellulär zu 70% mitochondrial gebunden und zu 30% im Zytoplasma gelöst. Bei schwachen Zellschädigungen erscheint vorwiegend der zytoplasmatische Anteil im Plasma. Bei schweren Schäden werden zusätzlich mehr mitochondrial gebundene Enzyme ins Plasma freigesetzt. [9]

Die Alkalische Phosphatase (ALP) wird in den Hepatozyten gebildet und befindet sich in großer Menge im Skelettsystem, im Leberparenchym und in den Gallengangsepithelien. Bei hepatobiliären Erkrankungen wird vermehrt ALP auf der Zellmembran verankert und durch die Phospholipase D des Plasmas von dieser abgelöst. Es kommt zu einer Erhöhung der ALP im Plasma. Der Konsum von Alkohol kann die ALP Werte der Leber erhöhen, auch wenn die Leber gesund ist [111 – 112].

Die Wildtypmäuse Balbc zeigten ohne Behandlung in der ALT-, AST- und ALP-Aktivität bis auf kleine Schwankungen (AST leichte Erniedrigung und ALP leichte Erhöhung) erwartungsgemäß keine Veränderungen zwischen der zweiten und der achten Woche.

Nach der Gabe von Alkohol blieben die ALT Werte unverändert, die AST Werte waren erniedrigt und nur die ALP Aktivität erhöhte sich erwartungsgemäß signifikant von Woche zwei zu Woche acht.

Es ist anzunehmen, dass durch den eingeatmeten Alkohol die Hepatozyten der Mäuse nicht bzw. nicht genügend geschädigt wurden um dies als erhöhte ALT oder AST anzuzeigen.

Nach Behandlung mit LPS zeigten die Wildtyptiere eine leichte Erniedrigung der ALT und AST Werte von der zweiten bis zur achten Woche.

Die ALP Aktivität blieb, wie erwartet eher unverändert. Das LPS schien bei den Wildtyptieren basal keine Reaktion auszulösen. Durch die zusätzliche Gabe von Alkohol erhöhten sich allerdings, auch wenn nur sehr gering, die Aktivitäten von ALT, AST und ALP im Laufe der Zeit.

Die MDR 2 KO Mäuse zeigten schon basal ohne LPS Behandlung eine Erhöhung der ALT, AST und ALP Aktivitäten von Woche 2 zu Woche 8 und wiesen schon in Woche 2 viel höhere Werte als die Wildtyptiere auf. Der Grund hierfür liegt darin, dass MDR 2 KO Mäuse durch das Ausschalten des MDR 2 Gens, nach kurzer Zeit eine ausgeprägte Entzündung und Fibrose der Leber entwickeln [113 – 114].

Durch Zugabe von Alkohol erfuhr die ALT und die AST Aktivität erwartungsgemäß eine starke Erhöhung von Woche 2 zu Woche 8. Dieser Anstieg unterschied sich jedoch kaum von den Werten der Kontrolltiere zum selben Zeitraum. Die ALP Aktivität wurde von Woche 2 zu Woche 8 durch Alkohol signifikant erhöht. Also schien der eingeatmete Alkohol nur eine leicht schädigende Wirkung auf die Leber zu haben.

Wie erwartet stiegen die ALT und AST Werte durch LPS allgemein an. Der Anstieg zwischen zweiter und achter Woche fiel allerdings sehr gering aus, vermutlich weil die gesunde Leber effektiv die Aufnahme und das Prozessieren von LPS reguliert [115].

Der ALP Wert der MDR 2 KO Tiere mit LPS war an Woche 2 erhöht fiel aber an Woche 8 ab.

Es ist bekannt, dass in der Leber die Alkalische Phosphatase eine Rolle für den Transport und die Metabolisierung von Lipiden, wie Cholin, Phosphorylcholin und Phosphatidylcholin spielt. Zum Beispiel führt ein intensiver Fettstoffwechsel zu einer zunehmenden Aktivität der ALP in den Hepatozyten, die mit einer erhöhten Cholinexkretion in die Galle verbunden ist. Dabei wird die membrangebundene ALP für die Hydrolyse des Phosphorylcholins verantwortlich gemacht, so dass das dephosphorylierte Cholin die Zellmembran durchdringen und in die Gallenkanälchen gelangen kann [116]. Bei den MDR 2 KO Mäusen ist die Leber jedoch nicht fähig Phospholipide oder Phosphatidylcholin in die Galle zu sezernieren so dass sich diese Proteine in der Leber anhäufen und so zur Schädigung der Leber führen [117 – 118].

Die erhöhte ALP-Aktivität der MDR 2 KO Mäuse an Woche 2 lässt vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt eine hohe Metabolisierungsrate in der Leber (durch ALP) vorliegt, die jedoch von den Hepatozyten "eingestellt" werden muss, da der Transport der Phospholipide durch den knock out nicht möglich ist. Somit stellt sich die Aktivität der alkalischen Phosphatase oder deren Bildung ein, was den niedrigen ALP Wert an Woche 8 erklären würde.

Durch die Gabe von Alkohol an die LPS behandelten MDR 2 KO Mäuse erhöhten sich alle Leberwerte, so dass vermutet werden kann, dass das eingeatmete Ethanol nach einem Zeitraum von 8 Wochen in den knock – out – Tieren und nur durch Kombination mit LPS seine schädigende Wirkung auf die Leber ausgeübt hat.

4.4 Der *De-Ritis-Quotient*

ALT wird vom Lebergewebe im Verhältnis zum Ausmaß der Hepatozellulären Schädigung in den Kreislauf entlassen. Es stellt daher einen sensitiven Marker von Leberschaden und Lebererkrankungsverlauf dar. Das Verhältnis AST/ALT (*De-Ritis-Quotienten*) >1 hat sich als

Indikator für Zirrhose erwiesen. AST und ALT sind hepatische Enzyme, die im Blut erhöht sind bevor ein klinisches Zeichen oder Symptome einer Leberkrankheit sichtbar werden.

Die Auswertung des *De-Ritis-Quotienten* bei den Wildtypmäusen ergab durchschnittlich in der Kontrollgruppe 1,33, unter Alkoholbedampfung 1,48, nach LPS Injektion alleine ebenfalls 1,48 und nach LPS und Alkohol 2,27. Beim Menschen zeigt ein Quotient von 0,6 – 0,8 eine gesunde Leber und ein Wert von über 2 oft eine alkoholinduzierte Lebererkrankung an.

Diese Werte aus der Literatur würden zu den Werten der Wildtypmäuse unter LPS- und Alkoholbehandlung passen, aber einerseits suggerieren die „hohen Werte“ in den Kontrollgruppen schon eine Leberschädigung, die nicht erwartet wurde und andererseits, findet der *De-Ritis-Quotient* am Menschen Anwendung und es gibt leider keine Erfahrungswerte für Mäuse.

Nach Tianhui Liu et al. hat sich beim Menschen das Verhältnis dieser zwei Enzyme für die Evaluierung der chronischen viralen Hepatitis als nützlich erwiesen. Für die Evaluierung des Stadiums der Fibrose, nach alkoholischer Fettlebererkrankung wird das Benutzen des Verhältnisses jedoch nicht empfohlen [119].

Es konnte bei den vorliegenden Mäusedaten zumindest eine Tendenz einer Leberschädigung erkannt werden ausgedrückt durch einen niedrigen Wert bei den Wildtypmäusen ohne Behandlung und einen hohen Wert bei den mit LPS- und Ethanol behandelten Wildtypieren. Die Gruppe Wildtyp plus Ethanol und Wildtyp plus LPS hatten den gleichen Wert, was vermuten lässt, dass diese zwei Substanzen getrennt voneinander, einen ähnlich „starken“ Effekt auf eine Leberschädigung erzeugt haben könnten.

4.5 Sirius Rot Färbungen und Quantitative Auswertung

Die Leberfibrose ist ein unspezifisches Reaktionsmuster der Leber auf eine chronische Schädigung der Hepatozyten, die durch eine vermehrte Ablagerung von extrazellulärer Matrix mit veränderter Zusammensetzung, insbesondere bestehend aus fibrillärem Kollagen gekennzeichnet ist. Die Verteilung des Kollagens ist abhängig von der Ursache der Leberschädigung. So führen die chronische Virushepatitis oder eine chronische Cholestase initial zur portalen Fibrose während die Fibrose bei alkoholischer Leberkrankheit perizentral und perisinusoidal (Maschendrahtfibrose „chicken wire fibrosis“) beginnt [119 – 121]. Anhand der Serumwerte konnte in der vorliegenden Arbeit ein gewisser Leberschaden nachgewiesen werden, bei welchem mittels Sirius Rot Färbung, bei der das Kollagen rot angefärbt wird, eine eventuelle Fibrose nachgewiesen werden sollte.

Nach der quantitativen Auswertung aller Mäuse im Versuch wurde sowohl bei den Wildtyp- als auch bei den MDR 2 KO- Tieren durch LPS Gabe eine leichte Erhöhung der Kollagenablagerung in der Leber beobachtet, die bereits durch Alkohol alleine verstärkt wurde und sich durch beide Substanzen zusammen bei den Wildtypen erhöhte. Bei den MDR 2 KO Mäusen mit Alkohol zeigte die zusätzliche LPS-Gabe keine weitere Erhöhung.

Beim Vergleich der einzelnen Bilder fiel auf, dass die Kollageneinlagerung bei den Wildtyptieren, auch wenn nur gering, eher entlang der Sinusoide und um die Zentralvene herum zu beobachten war, während die stärkere Kollageneinlagerung bei den MDR 2 KO Mäusen im Bereich der portalen Felder zu sehen war.

Die Durchströmung eines Leberläppchens erfolgt von peripher nach zentral. Die radiär angeordneten Sinusoide, münden im Läppchenzentrum in eine *V. ventralis* (Zentralvene) ein, die ihrerseits das Blut wieder zu den Schaltvenen (*Vv. Sublobulares*) und weiter zu den Lebervenen (*Vv. hepaticae*) abführt [122].

Das aus Pfortader- und Aortenzufluss in den Sinusoiden gemischte Blut ist zunächst noch relativ sauerstoffreich, nahe der Zentralvene dann aber recht arm an Sauerstoff. Folglich können periportal (am Rand des Zentralvenenläppchens) gelegene Hepatozyten aerob stoffwechseln. Demgegenüber sind Hepatozyten, die nahe der Zentralvene liegen, weitgehend auf anaerobe Prozesse beschränkt. Aber eben nicht vollständig, sodass sie von einem allgemeinen Sauerstoffmangel am stärksten betroffen sind. Hypoxisch bedingte Leberschäden manifestieren sich daher perizentral. Die mit dem Blutstrom angefluteten Nährstoffe stehen den periportal liegenden Hepatozyten in hoher, den zentral liegenden in erniedrigter Konzentration zur Verfügung. Toxisch bedingte Leberschäden manifestieren sich daher periportal [123].

Bei den Wildtypmäusen, deren Lebern gesund waren, löste der Alkohol auch in Kombination mit LPS, keinen massiven Schaden aus und es konnte nur eine leichte, perisinusoidale und perizentrale Fibrose beobachtet werden. Die MDR 2 KO Mäuse, die schon initial an Cholestase litten wiesen hingegen eine massive periportale Fibrose auf. Der Alkohol, der periportal anflutet wurde vermutlich von den Hepatozyten aerob metabolisiert, konnte jedoch in der Nähe der Zentralvene nicht mehr so gut verstoffwechselt werden, so dass es dort zur Kollageneinlagerung kam. Bei Hepatozyten die im periportalen Feld bereits geschädigt waren, wie im Fall der MDR 2 KO Mäuse, löste der Alkohol schon periportal eine Fibrosierung aus.

In vitro Experimente

Chronischer Alkoholkonsum geht oft einher mit schwerwiegenden und potentiell tödlichen Leberschäden, wie Hepatomegalie, alkoholische Hepatitis und Zirrhose.

Es ist bekannt, dass die klinische Abfolge des alkoholassozierten Leberschadens mit erhöhter hepatozellulärer Apoptose in Beziehung steht.

Der *transforming growth factor* β (TGF- β), ein sezernierter Botenstoff und Wachstumsfaktor, konnte als einer der wichtigsten Mediatoren der Leberfibrogenese auf zellulärer Ebene identifiziert werden. TGF- β initialisiert einerseits intrazelluläre Signalkaskaden, die eine Neusynthese von Narbengewebe (hauptsächlich Kollagenen) bewirken und kann andererseits dazu führen, dass Hepatozyten in Apoptose gehen [124 – 126].

Auf diese Weise reduziert sich nach einer Schädigung progressiv die Leberzellmasse und der frei werdende Raum wird durch Narbengewebe aufgefüllt. Dies führt insgesamt zu einem zunehmenden Funktionsverlust der Leber.

4.6 Die Zytotoxizität bei Maushepatozyten nach Ethanol - /TGF- β – Behandlung

Die Quantifizierung von LDH, das schnell nach Schädigung der Plasmamembran in den Kulturüberstand abgegeben wird stellt eine einfache, schnelle und präzise Methode da um die Zytotoxizität von Zellen zu bestimmen.

Demnach zeigten Ethanol und TGF- β nach 48 Stunden einen Dosis-abhängigen zytotoxischen Effekt auf primäre Maushepatozyten in Kultur. Die Zytotoxizität wurde basierend auf der Messung der LDH Aktivität quantifiziert (siehe Methodenteil) und so eine Konzentration von 150mM für Ethanol bzw. von 5ng/ml für TGF- β ermittelt, die noch keinen massiven Gewebsuntergang verursacht.

Der Zelltod wird klassischerweise über die Quantifizierung des Plasmamembranschadens evaluiert. Die Notwendigkeit den Zelltod quantitativ und präzise zu bestimmen, führte zur Entwicklung verschiedener Standard-Assays, die auf unterschiedlichen Methoden basieren, wie zum Beispiel tote und lebende Zellen farblich zu markieren und sie unter einem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop zu zählen [127 – 130]. Nachteil bei dieser Methode ist die niedrige Menge der Zellen, die verwendet werden kann und die Nicht-Berücksichtigung der bereits lysierten Zellen bei Langzeitkulturen und somit die fehlerhafte Angabe von toten Zellen. Eine weitere Methode stellt das Markieren der Zielzellen mit radioaktiven Isotopen, Fluoreszenzfarbstoffen oder Calcein AM (Acetoxymethylester) da wobei hier die Verwendung von Radioaktivität, die Notwendigkeit der Vormarkierung und das vorzeitige

Entlassen des Markers vor dem Zählen der Zellen ein Problem darstellt [131 – 134]. Eine dritte Methode ist die Messung zytoplasmatischer Enzymaktivität die von geschädigten Zellen sezerniert wird, wie die Alkalische und Saure Phosphatase, Aspartat-Aminotransferase (*Glutamat-Oxalacetat-Transaminase*), Alanin-Aminotransferase (*Glutamat-Pyruvat-Transaminase*) und Argininosuccinase, die jedoch in großen Mengen vorhanden sein müssen um detektierbar zu sein [135 – 138].

Die Behandlung der Hepatozyten mit Ethanol und TGF- β zusammen führte zu signifikanter Erhöhung des Zelltodes, der anhand des Cell-Death-Elisa-Kits nach Quantifizierung der Histonkomplexe der DNA Fragmente im Zellüberstand bzw. nach Lyse der Zellen (siehe Methodenteil) als Apoptose identifiziert werden konnte. Die Hepatozyten gingen also bei Behandlung mit 150mM Ethanol und 5ng/ μ l TGF- β nach 48 Stunden Zellkultur in den programmierten Zelltod.

Auch morphologisch änderten die Maushepatozyten nach 48 Stunden durch Ethanol - /TGF- β Stimulation ihre kubische Form zu langgezogenen Zellen mit sternförmigen Fortsätzen. Maushepatozyten verlieren ihre epitheliale, polarisierte Zellanordnung ohne Stimulation nach 4 Tagen in Kultur. Der Einfluss von TGF- β auf primäre Maushepatozyten ähnelte dem der hepatischen Sternzellen, die durch TGF- β zu Myofibroblasten differenzieren [139 – 140], denn auch Hepatozyten begannen schon nach 48 Stunden durch Zugabe des Zytokins ihren Phänotyp zu verändern. Nach Zugabe von Ethanol nahm die Zelldichte vermutlich durch das Sterben einiger Zellen ab, wobei auch hier die Zellen ihre kubische Form verloren.

4.7 Ethanol und TGF- β führten zur Superinduktion des Profibrogenen Mediators CTGF (*Connective tissue growth factor*)

CTGF ist ein profibrogenes Zytokin und wird nach Stimulation mit TGF- β sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene in Hepatozyten stark exprimiert [141 – 144].

Seine Überexpression spielt eine wichtige Rolle in TGF- β -abhängigen und zur Fibrose führenden Signalwegen [145].

Nach 48 Stunden wurde CTGF in primären Maushepatozyten auf Proteinebene durch Ethanol plus TGF- β stark induziert.

Da durch Ethanol alleine CTGF nicht exprimiert wurde und TGF- β alleine nur eine mäßige Expression hervorrief, jedoch beide zusammen zur „Superinduktion“ von CTGF führten, wird angenommen, dass der Alkohol die TGF- β Signaltransduktion verstärkte.

Vergleichbare Ergebnisse wurden durch Chen und Brigstock et al. in primären Maus HSC (*Hepatischen Sternzellen*) gefunden wo eine erhöhte CTGF Expression allerdings auf mRNA-Ebene als Antwort auf Ethanol und TGF- β gezeigt wurde [146].

Kim et. al. zeigten darüber hinaus, dass die Hochregulation von CTGF die apoptotischen Effekte von TGF- β verstärken kann und /oder Apoptose in den umliegenden Zellen („*human breast cancer cell line MCF-7*“, „*Smooth muscle cells*“) induziert [147].

4.8 Expression von TGF- β Rezeptoren / Verstärkte Smad-Phosphorylierung durch Alkohol-Vorbehandlung / Smad-abhängige Apoptose Induktion

Normalerweise führt die Bindung von aktivem TGF- β an den Rezeptor Typ II zur Phosphorylierung und Rekrutierung von TGF- β Rezeptor Typ I. Die Serin/Threonin-Kinase Aktivität des aktivierten Komplexes phosphoryliert Smad 2 und Smad 3, die dann an Smad 4 binden, in den Zellkern translozieren und zusammen mit Transkriptionsfaktoren in Kooperation mit der DNA die Genexpression von Zielgenen regulieren. Je nachdem welcher Rezeptor I, ALK1 oder ALK5, an den Rezeptor II bindet, werden entweder Smad 1/5/8 oder Smad 2/3 phosphoryliert [148 – 164].

TGF- β induzierte nach 48 Stunden seine Typ I Rezeptoren Alk1 und Alk5 auf mRNA-Ebene. Hingegen wurde der Rezeptor II nicht durch TGF- β , sondern sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene und *in vivo* (nach Bolusinjektion) durch Ethanol induziert. Es ist bekannt, dass bei der alkoholischen Leberfibrose Acetaldehyd die Produktion von TGF- β –mRNA steigert [165], die Aktivierung von latentem TGF- β fördert und die Expression des Typ II Rezeptors induziert [166 – 167].

Ob im vorliegenden Fall die Induktion des T β -RII durch Ethanol direkt oder durch dessen Hauptmetaboliten (Acetaldehyd) erfolgte, bleibt noch zu untersuchen.

Durch beide Substanzen zusammen wurden also auf mRNA-Ebene beide TGF- β Rezeptortypen induziert.

Einhergehend mit der Induktion der Rezeptoren nahm die Phosphorylierung von Smad 1 und Smad 3 nach Ethanol und TGF- β Behandlung zu. Smad-1 wurde nach 48h Ethanol- bzw. nach einstündiger TGF- β -Behandlung und Smad-3 nach 24- bzw. 48h TGF- β -Behandlung, aber nicht durch Ethanol, verstärkt phosphoryliert. Dies bedeutet, dass beide Stimulantien zusammen eine vermehrte Präsenz aller für die Signalübertragung notwendigen Rezeptoren induzierten und demnach eine verstärkte Signalübertragung bewirkten.

Zusätzlich wurde nach Inhibition der TGF- β Rezeptor-Kinasen I durch SB 431542 untersucht, ob die Induktion der Apoptose Smad-abhängig war [168 – 172]. Nachdem die Caspase 3 Aktivität durch Blockade des TGF- β Rezeptors I inhibiert wurde, erschloss sich

die Annahme, dass die Smad-Phosphorylierung für die Induktion der Apoptose in den Maushepatozyten benötigt wurde.

4.9 PI3K/Akt/PTEN/GSK3

Der PI3K/Akt Signalweg ist wichtig für das Zellüberleben und die Gewebsregulation.

Klasse I PI3-Kinasen wandeln Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP₃) um. Die PIP₃ Produktion wird durch PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), einer Phosphatase, streng kontrolliert. PTEN hemmt die Proliferation und fördert die Apoptose indem sie die Akt (Protein Kinase B) Aktivierung durch Dephosphorylieren und Umwandeln von PIP₃ zu PIP₂, verhindert. Somit wird die PIP₃ – Akt Interaktion blockiert.

Eine erhöhte Produktion von PIP₃ wiederum führt zur Bindung an Kinase Akt (Protein Kinase B), die viele „downstream-targets“ wie GSK3 phosphoryliert, und somit zur Zellteilung und Inhibierung der Apoptose führt. GSK3 ist eine prolin-gerichtete Serin/Threonin-Kinase, die anfänglich als phosphoryliertes und inaktiviertes Agenz der Glycogen Synthase identifiziert worden ist und durch Phosphorylierung inaktiv wird [173 – 181].

Die Inhibierung von PI3K durch LY294002 bewirkte nach Ethanol und TGF- β Behandlung eine verstärkte Caspase 3 Aktivierung, was darauf schließen lässt, dass die Kinaseaktivität der PI3K bzw. ein aktiver PI3K-Signalweg notwendig ist, um die Apoptose zu antagonisieren.

In Maushepatozyten, die 48h in Kultur waren, wurde basal phosphoryliertes Akt gefunden, welches nach Ethanol Gabe ab- und durch TGF- β zunahm. Durch Ethanol und TGF- β nahm die Phosphorylierung von Akt ebenfalls ab, folglich dominierte der Ethanol-Effekt.

Gleichzeitig war die Produktion von PTEN auf RNA Ebene durch Ethanol erhöht, was die reduzierte Aktivität von Akt erklären könnte. Durch Inhibierung von GSK3 wurde auch die Aktivierung von Caspase 3 durch Co-Stimulation vollständig gehemmt was zeigt, dass GSK3-Aktivität zur Apoptose-Induktion notwendig war.

Die Aktivität von Akt wurde durch Alkohol gehemmt, vermutlich über die Induktion von PTEN, was möglicherweise zusammen mit TGF- β zur Dephosphorylierung und Aktivierung von GSK3 führte und so Apoptose induziert wurde.

4.10 Cytochrom C Freisetzung durch Schädigung der Mitochondrien

Cytochrom C wird nach Bildung von BAX/BAX und BAK/BAK-Dimeren, die Porenkomplexe in der äußeren Mitochondrienmembran bilden was zur MOMP (*Mitochondrien – Außenmembran-Permealisation*) führt, aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma sezerniert.

Das Öffnen des BAX/BAK Kanals erlaubt den Efflux von Cytochrom C und anderen mitochondrialen Intermembranären Proteinen ins Zytoplasma, wodurch eine proteolytische Kaskade (Caspase – Kaskade) in Gang gesetzt wird und die Zelle in Apoptose geht [182]. Nachdem die Zellen 48 Stunden mit Ethanol und TGF- β behandelt worden waren, wurden die Mitochondrien vom Zytoplasma isoliert und die Proteine der jeweiligen Regionen getrennt voneinander aufgetragen. Wie im Western Blot ersichtlich wurde das Cytochrom C nach Ethanol und TGF- β - Behandlung aus den Mitochondrien ins Zytoplasma ausgeschüttet. Durch Ethanol alleine war nur ganz wenig Cytochrom C im Zytoplasma vorhanden und noch weniger durch TGF- β -Behandlung. Die durch Ethanol/TGF- β – induzierte Apoptose wurde offenbar über eine Cytochrome C – Freisetzung vermittelt.

4.11 Antiapoptotische Bcl2 Abgabe

Anti-apoptotische Bcl2 Proteine blockieren MOMP indem sie das Öffnen des BAX/BAK – Kanals blockieren und somit die Apoptose hemmen.

Die Bcl2 Proteinexpression in kultivierten Hepatozyten war nach 48 Stunden schon basal, nach TGF- β Behandlung etwas stärker erhöht, jedoch wurde eine Abnahme der Bcl2 Konzentration nach Ethanol- und nach Ethanol plus TGF- β -Behandlung beobachtet.

In Lymphomzellen reguliert TGF- β Bcl-2 sogar runter, was zur Apoptose führt [183].

In unserem Fall gingen jedoch die Hepatozyten allein durch TGF- β nicht in Apoptose, sondern erst durch Zugabe von Ethanol.

Ethanol ebnet offenbar durch Reduktion der Bcl2 Expression den Weg für eine anschließende pro-apoptotische Wirkung von TGF- β .

5. Zusammenfassung

Alkoholbedingte Leberschäden stellen eine häufige, mit deutlichem Leiden einhergehende Erkrankung des Menschen dar.

Ziel dieser Arbeit war es durch Etablierung eines Mausmodells den Grad einer Alkoholbedingten Leberschädigung (Alkoholaufnahme durch Inhalation) und die Rolle von Lipopolysaccharid (LPS) dabei sowohl in Wildtyp-Tieren als auch in Knock-out Tieren (fehlender Gallensäuretransporter MDR2) mit basal fortschreitendem cholestatischen Leberschaden zu bestimmen und zu vergleichen, sowie in vitro die molekularen Grundlagen, die zu diesen Schäden führen, zu erforschen.

Alle Tiere zeigten nach 8-wöchiger Behandlung mit Alkohol eine Gewichtsreduktion. Die vorgeschädigten MDR2 KO-Mäuse zeigten gar eine leichte Hepatomegalie durch Alkohol, wobei sich jedoch bei Alkohol plus LPS sogar eine leichte Leberschrumpfung nachweisen ließ. Bei den nicht vorgeschädigten Lebern der Wildtypmäuse wurde mittels Messung der Leberenzymwerte für ALT, AST und ALP im Serum der Tiere kein massiver Leberschaden angezeigt. Die Werte erhöhten sich nur gering und erst dann, wenn den Tieren intraperitoneales LPS gespritzt und zusätzlich Alkohol verabreicht wurde. Bei den MDR – 2 KO Mäusen, waren diese Leberwerte schon basal erhöht und stiegen durch LPS und/oder Alkohol weiter an. Durch quantitative Auswertung von Sirius-Rot Färbungen der extrazellulären Matrix konnte histologisch bei den Wildtypier-Lebern eine leichte, perisinusoidale und perizentrale Fibrose durch Alkohol und LPS nachgewiesen werden. Die vorgeschädigten Lebern der MDR 2 KO-Mäuse wiesen hingegen eine deutliche periportale Fibrose auf.

Somit zeigte sich, dass durch Inhalation aufgenommener Alkohol trotz täglicher Blutalkoholspiegel von durchschnittlich 225 mg/dl Blut nur in Kombination mit LPS zu einem leichten Leberschaden in gesunden Tieren führt, während ein bestehender Schaden durch jede Noxe alleine und besonders durch beide zusammen weiter verstärkt wird.

Auf zellulärer Ebene ist TGF- β , ein sezernierter Botenstoff und Wachstumsfaktor, als einer der wichtigsten Mediatoren der Leberfibrogenese bekannt und nach Ethanolintoxikation ist die TGF- β -Signaltransduktion in der Leber erhöht. In der vorliegenden Arbeit wurden primär kultivierte Hepatozyten in vitro mit TGF- β /Ethanol inkubiert. Die Kombination von Ethanol und TGF- β bewirkte eine verstärkte TGF- β Signaltransduktion mit "Superinduktion" von TGF- β Zielgenen und verstärkter Apoptoseinduktion verglichen mit jeder Substanz alleine.

Die Induktion von Apoptose ging einher mit reduzierter Aktivität von Akt und einer erhöhten T β RII Expression. Blockade von PI3K/Akt verstärkte und Inhibition der GSK3 verminderte die Apoptose. Durch Messung der Expression von Mitgliedern der Bcl2 Familie zeigte sich, daß TGF- β alleine offenbar zunächst „survival“ – Signalwege induziert und erst die zusätzliche Noxe Alkohol den Ausschlag hin zum Zelltod mediiert.

Diese in vitro Ergebnisse passen gut zu der oben beschriebenen Beobachtung im Tiermodell, die ebenfalls zeigte, dass Alkohol alleine unter "gesunden" Grundbedingungen kaum zu einem Schaden führt, während diese Regenerationskapazität durch zusätzliche Noxen wie LPS oder bei bereits vorhandener Schädigung (MDR-2 KO Maus) an ihre Grenzen stößt.

Somit tragen die hier gewonnenen Erkenntnisse zum weiteren Verständnis der molekularen Mechanismen des Alkohol-bedingten Leberschadens bei.

6. Literaturverzeichnis

[1] Erwin Kuntz und Hans-Dieter Kuntz

Praktische Hepatologie (Historie- Morphologie – Biochemie – Diagnostik – Klinik – Therapie)
Johann Ambrosius Barth, 1998

[2] Benner, U.

Lehrbuch: „Der Körper des Menschen“
Weltbild-Verlag GmbH, Augsburg, 1996

[3] Theodor H. Schiebler und Horst-W. Korf

Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie,
Topographie
Steinkopff Verlag, 10. Auflage, 2007

[4] Angelehnt an das

Doc Check Flexicon

<http://flexikon.doccheck.com/?PHPSESSID=583479a63dca3f9d4b9b2739d540fa89>

[5] Friedman, SL.

Liver fibrosis

J Hepatology 38 Suppl 1:S38-53 (2003)

[6] Université de Fribourg, 2005-2006

[7] Jungermann K

Zonation of metabolism and gene expression in liver
Histochem Cell Biol. 1995 Feb;103(2):81-91. Review

[8] Gunther Rexroth

Gastroenterologie

Sybille Tönjes, Verlag Hans Huber, 2005

[9] Lothar Thomas

Labor und Diagnose

5. Auflage, TH-Books- Verlagsgesellschaft, Frankfurt, 1998

[10] J. W. Keyser

Human Plasma Proteins: Their Investigation in Pathological Conditions
Wiley, Chichester 1987, S. 77.

[11] Fernando de Ritis, M. Coltori, G. Giusti

An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis: The transaminase serum activities.
Clinica Chimica Acta. 369, Nr. 2, 1957, S. 148-152

[12] B. Saile, G. Ramadori

Fibrogenese – Zirrhose

Gastroenterologie 2007 · 2:228–237 DOI 10.1007/s11377-007-0092-7 Online publiziert: 5. Juni 2007
© Springer Medizin Verlag 2007

[13] Scott L. Friedman

Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury
The Journal of Biol. Chemistry Vol.275, No.4 pp.2247-2250; Minireview, 2000

[14] Ramadori G, Saile B

Portal tract fibrogenesis in the liver
Lab Invest 84:153 – 159; 2004

[15] Virginia Hernandez-Gea and Scott L. Friedman

Pathogenesis of Liver Fibrosis
Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2011. 6:425–56

[16] Cassiman D, Roskams T

Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research
J Hepatol 37: 527–535, 2002

[17] Pearl R.

Alcohol and longevity
New York: Knopf; 1926

[18] Christine Brosteaux, Roger Darioli

Alkohol in der Ernährung
Moderater Alkoholkonsum und gesundheitlicher Benefit; Schweizer Zeitung für Ernährungsmedizin
Heft 1, 2009

[19] Dr. Raphael Gassmann, Christa Merfert-Dietz

Jahrbuch Sucht 2011
Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS), Westenwall 4, 59065 Hamm

[20] Hasso Spode

„Genussmittel“. Ein kulturgeschichtliches Handbuch
Thomas Hengartner und Christoph Maria Merki; Campus Verlag, Frankfurt/New York 1999

[21] Masayuki Adachi und Hiromasa Ishii

Role of mitochondria in alcoholic liver injury
Free Radic Biol Med. 2002 Mar 15;32(6):487-91

[22] Gavin E. Arteel

Oxidants and Antioxidants in Alcohol-Induced Liver Disease
Gastroenterology 2003;124:778–790

[23] Jan B. Hoek, Alan Cahill, and John G. Pastorino

Alcohol and Mitochondria: A Dysfunctional Relationship
Gastroenterology 2002;122:2049–2063

- [24] Jan B. Hoek, John G. Pastorino
Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury
Alcohol 27 (2002) 63–68
- [25] M.V. Singer A. Batra und K. Mann
Pharmakokinetik des Alkohols
„*Alkohol und Tabak; Grundlagen und Folgeerkrankungen/ Thieme Verlag*
- [26] R. G. Thurman
Mechanisms of Hepatic Toxicity II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 275:G605-G611, 1998.
- [27] Abraham P Bautista
Impact of alcohol on the ability of Kupffer cells to produce chemokines and its role in alcoholic liver disease
J Gastroenterol Hepatol 2000 Apr;15(4):349-56
- [28] M.V. Singer und S. Teyssen
Alkohol und Alkoholfolgeerkrankungen
2. Auflage; *Grundlagen, Diagnostik, Therapie; Springer-Verlag; 2005*
- [29] Diehl AM
Alcoholic and nonalcoholic Steatohepatitis
In: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA (eds)
The liver: biology and pathobiology. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 739-753
- [30] Diehl AM
Nonalcoholic fatty liver disease: implications for alcoholic liver disease pathogenesis
Alcohol Clin Exp Res 25:8S-14S
- [31] Trauner M. Boyer JL.
Bile Salt Transporters: Molecular Characterization, Function and Regulation
Physiol Rev 2003; 83: 633- 671
- [32] Smit JJM, Schinkel AH, Oude Elferink RPJ, Groen AK, Wagenaar B., von Deemter L, Mol CAAM, et al.
Mdr 2 Knockout Mice Link Biliary Phospholipid Deficiency With Small Bile Duct Destruction
Homozygous disruption of the murine mdr2 p-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease
Cell 1993;75:451-462
- [33] Mark Katzenellenbogen, Lina Mizrahi, Orit Pappo, Naama Klopstock, Devorah Olam, Jasmine Jacob-Hirsch, Ninette Amariglio, Gideon Rechavi, Eytan Domany, Eithan Galun, I and Daniel Goldenberg
Molecular Mechanisms of Liver Carcinogenesis in the Mdr2-Knockout Mice
Mol Cancer Res. 2007 Nov;5(11):1159-70

- [34] Nicholas W. Gilpin, Heather N. Richardson, Maury Cole, and George F. Koob
Vapor Inhalation of Alcohol in Rats
Curr Protoc Neurosci. 2008 Jul;Chapter 9:Unit 9.29
- [35] Kingsley, D.M.
The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms
Genes Dev. 8, 133 – 146 (1994)
- [36] Massagué, J.
TGF- β signal transduction
Annu. Rev. Biochem. 67, 753 – 791 (1998)
- [37] Massagué, J., Cheifetz, S., Boyd, F.T., Anders, J.L.
TGF- β receptors and TGF- β binding proteoglycans: Recent progress in identifying their functional properties
Ann. NY Acad. Sci 593, 59 – 72 (1990)
- [38] Schuster, N. and Kriegstein, K.
Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis
Cell Tissue Res. 307, 1 – 14 (2002)
- [39] Shi, Y. and Massague, J.
Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus
Cell, Vol. 113, 685–700 (2003)
- [40] Derynck, R. and Zang, Y.E.
Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling
Nature 2003 Oct 9;425(6958):577-84
- [41] Piek, E. und Roberts, A.B.
Suppressor and oncogenic roles of transforming growth factor-beta and its signaling pathways in tumorigenesis
Adv Cancer Res 83: 1-54 (2001)
- [42] Roberts, A.B. und Sporn, M.B.
Differential expression of the TGF-beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues
Mol Reprod Dev 32(2): 91-8 (1992)
- [43] Blobe, G., Kirkbride, K.
<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A002271&type=mmpdocs>
- [44] Albuisson, Dr. J
21.05.2006
<http://www.orpha.net/static/DE/camuratiengelmannsyndrom.html>

[45] Phil Dash

Apoptosis

Basic Medical Sciences, St. George's, University of London

[46] Andreas Strasser, Liam O'Connor, und Vishva M. Dixit

Apoptosis Signaling

Annu. Rev. Biochem. 2000. 69:217-45

[47] Thomas F. Gajewski and Craig B. Thompson

Apoptosis Meets Signal Transduction: Elimination of a BAD Influence (Minireview)

Cell, Vol. 87, 589-592, November 15, 1996

[48] Zoltan N. Oltvai, Curt L. Milkman and Stanley J. Korsmeyer

Bcl-2 Heterodimerizes In Vivo with a Conserved Homolog, Bax, That Accelerates Programed Cell Death

Cell, Vol. 74, 609-619, August 27, 1993

[49] Adams JM, Cory S

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival

Science 1998; 281: 1322-1326

[50] Emad S. Alnemri, David J. Livingston, Donald W. Nicholson, Guy Salvesen Nancy A. Thornberry, Winnie W. Wong, and Junying Yuan

Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature

Cell, Vol. 87, 171, October 18, 1996

[51] Kumar S, Lavin MF

The ICE family of cysteine proteases as effectors of cell death

Cell Death Differ. 1996 Jul;3(3):255-67

[52] Donald W. Nicholson and Nancy A. Thornberry

Caspases: Killer Proteases

[53] N. P. C. Walker, R. V. Talanian, K. D. Brady, L. C. Dang, N. J. Bump, C. R. Ferez, S. Franklin, T. Ghayur, M. C. Hackett, L. D. Hammill, L. Herxog, M. Hugunin, W. Houy, J. A. Mankovich, L. McGuiness, E. Orlewicz, M. Paskind, C. A. Pratt, P. Reis; A. Summani, M. Terranova, J. P. Welch, L. Xiong, A. MBller, D. E. Tracey, Ft. Kamen, and W. W. Wong

Crystal Structure of the Cysteine Protease Interleukin-1 P-Converting Enzyme: A (p20/pl O)* Homodimer

Cell, Vol. 78, 343-352, July 29, 1994

[54] Wilson KP, Black JA, Thomson JA, Kim EE, Griffith JP, Navia MA, Murcko MA, Chambers SP, Aldape RA, Raybuck SA, et al

Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme

Nature. 1994 Jul 28;370(6487):270-5

- [55] Rotonda J, Nicholson DW, Fazil KM, Gallant M, Gareau Y, Labelle M, Peterson EP, Rasper DM, Ruel R, Vaillancourt JP, Thornberry NA, Becker JW
The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis
Nat Struct Biol. 1996 Jul;3(7):619-25.
- [56] Nancy A. Thornberry and Yuri Lazebnik
Caspases: Enemies Within
Science 281, 1312 (1998)
- [57] Thomas F. Franke, David R. Kaplan, and Lewis C. Cantley
PI3K: Downstream AKTion Blocks Apoptosis (Minireview)
Cell, Vol. 88, 435–437, February 21, 1997
- [58] Scott G. Kennedy, Andrew J. Wagner, Suzanne D. Conzen, Joaquin Jordan, Alfonso Bellacosa, Philip N. Tsichlis and Nissim Hay
The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal
Genes Dev. 1997 Mar 15;11(6):701-13.
- [59] Paez J, Sellers WR.
PI3K/PTEN/AKT pathway. A critical mediator of oncogenic signaling
Cancer Treat Res. 2003;115:145-67
- [60] Michael P. Scheid and James R. Woodgett
PKB/AKT: Functional Insights From Genetic Models
Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Oct;2(10):760-8
- [61] Michael P. Scheid and James R. Woodgett
Phosphatidylinositol 3' kinase signaling in mammary tumorigenesis
Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia, Vol. 6, No. 1, 2001
- [62] Arthur I. Cederbaum, Lili Yang, Xiaodong Wang, and Defeng Wu
CYP2E1 Sensitizes the Liver to LPS- and TNF α -Induced Toxicity via Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases
Review Article Int J Hepatol 2012;2012:582790. Epub 2011 Oct 18.
- [63] Hengstler JG, Utesch D, Steinberg P, Platt KL, Diener B, Ringel M, Swales N, Fischer T, Biefang K, Gerl M, Böttger T, Oesch F
Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction.
Drug Metab Rev. 2000 Feb;32(1):81-118.
- [64] Internet:
http://www.roche-diagnostics.hu/portal/synergy/static/file/synergy/alfproxy/download/d13ce70b52bd11dfbf67075f2eb63675/last/cobas_c_311_en.pdf 1414-
- [65] Internet:
http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/downloads/Leica%20TP1020/Brochures/95.11565_Rev_B_Brochure_TP1020_EN.pdf

[66] Internet:

<http://www.roche-applied-science.com/pack-insert/1644793a.pdf>

[67] Internet:

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/MANUALS/CELL_MAN/apoptosis_015_017.pdf

[68] Internet:

<http://www.qiagen.com/resources/Download.aspx?id=%7BB13C089E-17EC-4707-8EFE-10D52D84349D%7D&lang=en&ver=1>

[69] Majhi S, Baral N, Lamsal M, Mehta KD.

De Ritis ratio as diagnostic marker of alcoholic liver disease

Nepal Med Coll J. 2006 Mar;8(1):40-2.

[70] Sylviane Dennler, Susumu Itoh, Denis Vivien, Peter ten Dijke, Stephane Huet1 and Jean-Michel Gauthier

Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene

The EMBO Journal Vol.17 No.11 pp.3091–3100, 1998

[71] Olexander Korchynskiy and Peter ten Dijke

Identification and Functional Characterization of Distinct Critically Important Bone Morphogenetic Protein-specific Response Elements in the Id1 Promoter

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 277, No. 7, Issue of February 15, pp. 4883–4891, 2002

[72] Victor M. Bondar, Bridget Sweeney-Gotsch, Michael Andreeff, Gordon B. Mills, and David J. McConkey

Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway Induces Apoptosis in Pancreatic Carcinoma Cells in Vitro and in Vivo

Mol Cancer Ther 2002;1:989-997

[73] Li Sen Hao, Xiao Lan Zhang, Jun Yan An, Justin Karlin, Xiao Peng Tian, Zhi Na Dun, Shu Rui Xie and Shuang Chen

PTEN expression is down-regulated in liver tissues of rats with hepatic fibrosis induced by biliary stenosis

APMIS 117: 681–691 _ 2009

[74] Tao Zeng, Cui-Li Zhang, Fu-Yong Song, Xiu-Lan Zhao, Li-Hua Yu, Zhen-Ping Zhu, Ke-Qin Xie

PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-induced fatty liver in mice

Toxicology 296 (2012) 56– 66

[75] M.V. Fiandalo, N. Kyprianou

Invited Review Caspase Control: Protagonists Of Cancer Cell Apoptosis

Exp Oncol 2012 34, 3 165-175

[76] Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK.

A specific inhibitor of TGF- β receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers

Neoplasia. 2005 May;7(5):509-21.

[77] Arthur I. Cederbaum, Lili Yang, Xiaodong Wang, and Defeng Wu
CYP2E1 sensitizes the liver to LPS- and TNF- α -Induced Toxicity via Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases.
Int J Hepatol. 2012;2012:582790. doi: 10.1155/2012/582790. Epub 2011 Oct 18

[78] Addorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarrini G
Influence of chronic alcohol abuse on body weight and energy metabolism: is excess ethanol consumption a risk factor for obesity or malnutrition?
J Intern Med. 1998 Nov; 244(5):387-95

[79] Anji A, Kumari M
Supplementing the liquid alcohol diet with chow enhances alcohol intake in C57 BL/6 mice
Drug Alcohol Depend. 2008 Sep 1;97(1-2):86-93. Epub 2008 May 13.

[80] Mathurin P, Deng QG, Keshavarzian A, Choudhary S, Holmes EW, Tsukamoto H.
Exacerbation of alcoholic Liver Injury by Enteral Endotoxin in Rats
Hepatology 2000;32:1008-1017

[81] Mariann R. Piano, James Artwohl, Shann Dixon Kim and Garry Gass
The Effects Of A Liquid Ethanol Diet On Nutritional Status And Fluid Balance In The Rat
Alcohol & Alcoholism Vol. 36, No. 4, pp. 298 – 303, 2001

[82] Israel Y, Orrego H.
On the characteristics of alcohol-induced liver enlargement and its possible hemodynamic consequences.
Pharmacol Biochem Behav. 1983;18 Suppl 1:433-7.

[83] Dagenais M, Giroux L, Belgiorno J, Huet PM.
The effect of alcohol-induced hepatomegaly on portal hypertension in cirrhotic rats.
J Hepatol. 1992 May;15(1-2):88-93.

[84] Born LJ, Kharbanda KK, McVicker DL, Zetterman RK, Donohue TM Jr.
Effects of ethanol administration on components of the ubiquitin proteolytic pathway in rat liver.
Hepatology 1996 Jun;23(6):1556-63.

[85] Mastai R, Huet PM, Brault A, Belgiorno J.
The rat liver microcirculation in alcohol-induced hepatomegaly.
Hepatology. 1989 Dec;10(6):941-5.

[86] Nath B, Levin I, Csak T, Petrasek J, Mueller C, Kodys K, Catalano D, Mandrekar P, Szabo G.
Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice.
Hepatology 2011 May;53(5):1526-37. doi: 10.1002/hep.24256.

- [87] Popov Y, Patsenker E, Fickert P, Trauner M, Schuppan D.
Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes.
J Hepatol. 2005 Dec;43(6):1045-54. Epub 2005 Aug 15.
- [88] Baraona E.
Alcohol induced changes of protein metabolism (author's transl)
Leber Magen Darm 1978 Oct;8(5):271-7.
- [89] Donohue TM Jr, McVicker DL, Kharbanda KK, Chaisson ML, Zetterman RK.
Ethanol administration alters the proteolytic activity of hepatic lysosomes.
Alcohol Clin Exp Res. 1994 Jun;18(3):536-41.
- [90] Zinchuk V, Zinchuk O, Akimaru K, Moriya F, Okada T.
Ethanol consumption alters expression and colocalization of bile salt export pump and multidrug resistance protein 2 in the rat.
Histochem Cell Biol. 2007 May;127(5):503-12. Epub 2007 Mar 24.
- [91] Israel Y, Orrego H, Colman JC, Britton RS.
Alcohol-induced hepatomegaly: pathogenesis and role in the production of portal hypertension.
Fed Proc. 1982 Jun;41(8):2472-7.
- [92] Baraona E, Leo MA, Borowsky SA, Lieber CS.
Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver.
Science. 1975 Nov 21;190(4216):794-5.
- [93] Donohue TM Jr, Sorrell MF, Tuma DJ.
Hepatic protein synthetic activity in vivo after ethanol administration.
Alcohol Clin Exp Res. 1987 Feb;11(1):80-6.
- [94] Smith-Kielland A, Blom GP, Svendsen L, Bessesen A, Mørland J.
A study of hepatic protein synthesis, three subcellular enzymes, and liver morphology in chronically ethanol fed rats.
Acta Pharmacol Toxicol (Copenh). 1983 Aug;53(2):113-20.
- [95] Baraona E, Leo MA, Borowsky SA, Lieber CS
Pathogenesis of alcohol-induced accumulation of protein in the liver.
J Clin Invest. 1977 Sep;60(3):546-54.
- [96] Born LJ, Kharbanda KK, McVicker DL, Zetterman RK, Donohue TM Jr.
Effects of ethanol administration on components of the ubiquitin proteolytic pathway in rat liver.
Hepatology 1996 Jun;23(6):1556-63.
- [97] Israel Y, Orrego H, Colman JC, Britton RS.
Alcohol-induced hepatomegaly: pathogenesis and role in the production of portal hypertension.
Fed Proc. 1982 Jun;41(8):2472-7.

- [98] Zinchuk V, Zinchuk O, Akimaru K, Moriya F, Okada T.
Ethanol consumption alters expression and colocalization of bile salt export pump and multidrug resistance protein 2 in the rat.
Histochem Cell Biol. 2007 May;127(5):503-12. Epub 2007 Mar 24.
- [99] Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodríguez-Cuesta J.
Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus.
J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010 Mar;49(2):202-6.
- [100] Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM.
Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters.
Hum Gene Ther. 2002 Jan 1;13(1):155-61.
- [101] Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J.
Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions.
Mamm Genome. 2004 Oct;15(10):768-83.
- [102] Mahl A, Heining P, Ulrich P, Jakubowski J, Bobadilla M, Zeller W, Bergmann R, Singer T, Meister L.
Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein.
Lab Anim. 2000 Oct;34(4):351-61.
- [103] Schnell MA, Hardy C, Hawley M, Propert KJ, Wilson JM.
Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters.
Hum Gene Ther. 2002 Jan 1;13(1):155-61.
- [104] Fernández I, Peña A, Del Teso N, Pérez V, Rodríguez-Cuesta J.
Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from the submandibular vein and retroorbital plexus.
J Am Assoc Lab Anim Sci. 2010 Mar;49(2):202-6.
- [105] Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C.
Laboratory routines cause animal stress.
Contemp Top Lab Anim Sci. 2004 Nov;43(6):42-51.
- [106] Champy MF, Selloum M, Piard L, Zeitler V, Caradec C, Chambon P, Auwerx J.
Mouse functional genomics requires standardization of mouse handling and housing conditions.
Mamm Genome. 2004 Oct;15(10):768-83.
- [107] Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B.
The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats.
Food Chem Toxicol. 2007 Sep;45(9):1709-18. Epub 2007 Mar 16.

- [108] Mazzaccara C, Labruna G, Cito G, Scarfò M, De Felice M, Pastore L, Sacchetti L.
Age-Related Reference Intervals of the Main Biochemical and Hematological Parameters in C57BL/6J, 129SV/EV and C3H/HeJ Mouse Strains.
PLoS One. 2008;3(11):e3772. doi: 10.1371/journal.pone.0003772. Epub 2008 Nov 20.
- [109] Schnell MA, Hardy C, Hawley M, ProPERT KJ, Wilson JM.
Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters.
Hum Gene Ther. 2002 Jan 1;13(1):155-61.
- [110] Mahl A, Heining P, Ulrich P, Jakubowski J, Bobadilla M, Zeller W, Bergmann R, Singer T, Meister L.
Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats: retrobulbar plexus versus sublingual vein.
Lab Anim. 2000 Oct;34(4):351-61.
- [111] Internet:
<http://www.livestrong.com/article/470400-alkaline-phosphatase-alcohol/#ixzz2HajlVDIO>
- [112] Ho WY, Yeap SK, Ho CL, Abdul Rahim R, Alitheen NB.
Hepatoprotective Activity of *Elephantopus scaber* on Alcohol-Induced Liver Damage in Mice.
Evid Based Complement Alternat Med. 2012;2012:417953. doi: 10.1155/2012/417953. Epub 2012 Aug 29.
- [113] Fickert P, Fuchsbichler A, Wagner M, Zollner G, Kaser A, Tilg H, Krause R, Lammert F, Langner C, Zatloukal K, Marschall HU, Denk H, Trauner M.
Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in *Mdr2* (*Abcb4*) knockout mice.
Gastroenterology. 2004 Jul;127(1):261-74.
- [114] Katzenellenbogen M, Mizrahi L, Pappo O, Klopstock N, Olam D, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Domany E, Galun E, Goldenberg D.
Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the *mdr2*-knockout mice.
Mol Cancer Res. 2007 Nov;5(11):1159-70.
- [115] Cederbaum AI, Yang L, Wang X, Wu D.
CYP2E1 Sensitizes the Liver to LPS- and TNF α -Induced Toxicity via Elevated Oxidative and Nitrosative Stress and Activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated Kinases.
Int J Hepatol. 2012;2012:582790. doi: 10.1155/2012/582790. Epub 2011 Oct 18.
- [116] Pekarthy JM, Short J, Lansing AI, Lieberman I.
Function and control of liver alkaline phosphatase.
J Biol Chem. 1972 Mar 25;247(6):1767-74.
- [117] Leveille-Webster CR, Arias IM.
Mdr 2 knockout mice link biliary phospholipid deficiency with small bile duct destruction.
Hepatology. 1994 Jun;19(6):1528-31.

- [118] Smit JJ, Schinkel AH, Oude Elferink RP, Groen AK, Wagenaar E, van Deemter L, Mol CA, Ottenhoff R, van der Lugt NM, van Roon MA, et al.
Homozygous disruption of the murine mdr2 P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease.
Cell. 1993 Nov 5;75(3):451-62.
- [119] Liu T, Wang X, Karsdal MA, Leeming DJ, Genovese F.
Molecular serum markers of liver fibrosis.
Biomark Insights. 2012;7:105-17. doi: 10.4137/BMI.S10009. Epub 2012 Jul 23.
- [120] Walther Siegenthaler, Hubert E. Blum
Klinische Pathophysiologie.
Thieme Verlag, 2001
- [121] Rasineni K, Casey CA.
Molecular mechanism of alcoholic fatty liver.
Indian J Pharmacol. 2012 May;44(3):299-303. doi: 10.4103/0253-7613.96297.
- [122] Johannes W. Rohen, Elke Lütjen-Drecoll
Funktionelle Histologie (Lehrbuch)
Shattauer (2000)
- [123] Thomas Heinzeller, Carl M. Büsing
Histologie, Histopathologie, und Zytologie für den Einsteiger
Thieme-Verlag, 2001
- [124] Matsuzaki K.
Modulation of TGF-beta signaling during progression of chronic liver diseases.
Front Biosci. 2009 Jan 1;14:2923-34.
- [125] Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W.
TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells.
Comp Hepatol. 2007 Feb 20;6:1.
- [126] Sánchez A, Alvarez AM, Benito M, Fabregat I.
Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates.
J Biol Chem. 1996 Mar 29;271(13):7416-22.
- [127] Cook JA, Mitchell JB.
Viability measurements in mammalian cell systems.
Anal Biochem. 1989 May 15;179(1):1-7.
- [128] Yuhás JM, Toya RE, Pazmiño NH.
Neuraminidase and cell viability: failure to detect cytotoxic effects with dye-exclusion techniques.

J Natl Cancer Inst. 1974 Aug;53(2):465-8.

[129] Parks DR, Bryan VM, Oi VT, Herzenberg LA.

Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Apr;76(4):1962-6.

[130] Jones KH, Senft JA.

An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide.
J Histochem Cytochem. 1985 Jan;33(1):77-9.

[131] Oldham RK, Ortaldo JR, Holden HT, Herberman RB.

Direct comparison of three isotopic release microtoxicity assays as measures of cell-mediated immunity to Gross virus-induced lymphomas in rats.
J Natl Cancer Inst. 1977 Apr;58(4):1061-7.

[132] Leibold W, Bridge S.

⁷⁵Se-release: a short and long term assay system for cellular cytotoxicity.
Z Immunitätsforsch Immunobiol. 1979 Mar;155(4):287-311.

[133] Kolber MA, Quinones RR, Gress RE, Henkart PA.

Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of the fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF).
J Immunol Methods. 1988 Apr 6;108(1-2):255-64.

[134] Danks AM, Hammond DN, Wainer BH, Van Buskirk RG, Isaacson RL.

Cellular alterations produced by the experimental increase in intracellular calcium and the nature of protective effects from pretreatment with nimodipine.
Brain Res Mol Brain Res. 1992 Nov;16(1-2):168-72.

[135] Decker T, Lohmann-Matthes ML

A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity.
J Immunol Methods. 1988 Nov 25;115(1):61-9.

[136] Szekeres J, Pacsa AS, Pejtsik B.

Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells.
J Immunol Methods. 1981;40(2):151-4.

[137] Masanet J, Gómez-Lechón MJ, Castell JV.

Hepatic toxicity of paraquat in primary cultures of rat hepatocytes.
Toxicol In Vitro. 1988;2(4):275-82.

[138] Martin A, Clynes M.

Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests.
In Vitro Cell Dev Biol. 1991 Mar;27A(3 Pt 1):183-4.

[139] Friedman SL.

Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies.

N Engl J Med. 1993 Jun 24;328(25):1828-35.

[140] Bachem MG, Sell KM, Melchior R, Kropf J, Eller T, Gressner AM.

Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts.

Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol. 1993;63(2):123-30.

[141] di Mola FF, Friess H, Martignoni ME, Di Sebastiano P, Zimmermann A, Innocenti P, Graber H, Gold LI, Korc M, Büchler MW.

Connective tissue growth factor is a regulator for fibrosis in human chronic pancreatitis.

Ann Surg. 1999 Jul;230(1):63-71.

[142] Gressner OA, Gressner AM.

Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases.

Liver Int. 2008 Sep;28(8):1065-79. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01826.x.

[143] Rachfal AW, Brigstock DR

Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis.

Hepatol Res. 2003 May;26(1):1-9.

[144] Kim KH, Park GT, Lim YB, Rue SW, Jung JC, Sonn JK, Bae YS, Park JW, Lee YS.

Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 11;318(4):819-25.

[145] Moussad EE, Brigstock DR.

Connective tissue growth factor: what's in a name?

Mol Genet Metab. 2000 Sep-Oct;71(1-2):276-92.

[146] Chen L, Charrier AL, Leask A, French SW, Brigstock DR.

Ethanol-stimulated differentiated functions of human or mouse hepatic stellate cells are mediated by connective tissue growth factor.

J Hepatol. 2011 Aug;55(2):399-406. doi: 10.1016/j.jhep.2010.11.025. Epub 2010 Dec 13.

[147] Kim KH, Park GT, Lim YB, Rue SW, Jung JC, Sonn JK, Bae YS, Park JW, Lee YS.

Expression of connective tissue growth factor, a biomarker in senescence of human diploid fibroblasts, is up-regulated by a transforming growth factor-beta-mediated signaling pathway.

Biochem Biophys Res Commun. 2004 Jun 11;318(4):819-25.

of Biochemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Republic of Korea.

[148] Hayashi H, Sakai T.

Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases.

Front Physiol. 2012;3:12. doi: 10.3389/fphys.2012.00012. Epub 2012 Feb 6.

- [149] Eickelberg O, Pansky A, Koehler E, Bihl M, Tamm M, Hildebrand P, Perruchoud AP, Kashgarian M, Roth M.
Molecular mechanisms of TGF-(beta) antagonism by interferon (gamma) and cyclosporine A in lung fibroblasts.
FASEB J. 2001 Mar;15(3):797-806.
- [150] Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF
Role of transforming growth factor beta in human disease.
N Engl J Med. 2000 May 4;342(18):1350-8.
- [151] Lutz M, Knaus P.
Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network.
Cell Signal. 2002 Dec;14(12):977-88.
- [152] Massagué J.
How cells read TGF-beta signals.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2000 Dec;1(3):169-78.
- [153] Xu L, Massagué J.
Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2004 Mar;5(3):209-19.
- [154] Nalesnik MA, Michalopoulos GK.
Growth factor pathways in development and progression of hepatocellular carcinoma.
Front Biosci (Schol Ed). 2012 Jun 1;4:1487-515.
- [155] Derynck, R. and Miyazono, K.
The TGF- β Family
Cold Spring Harbor Laboratory (2008)
- [156] Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P.
TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.
Nature. 1997 Dec 4;390(6659):465-71.
- [157] Wrana JL.
Regulation of Smad activity
Cell. 2000 Jan 21;100(2):189-92.
- [158] Shi Y, Massagué J.
Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.
Cell. 2003 Jun 13;113(6):685-700.
- [159] Guo X, Wang XF.
Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways.
Cell Res. 2009 Jan;19(1):71-88. doi: 10.1038/cr.2008.302.

[160] Yoshida K, Matsuzaki K.

Differential Regulation of TGF- β /Smad Signaling in Hepatic Stellate Cells between Acute and Chronic Liver Injuries.

Front Physiol. 2012;3:53. doi: 10.3389/fphys.2012.00053. Epub 2012 Mar 19.

[161] Cai Y, Zhou CH, Fu D, Shen XZ.

Overexpression of Smad ubiquitin regulatory factor 2 suppresses transforming growth factor- β mediated liver fibrosis.

J Dig Dis. 2012 Jun;13(6):327-34. doi: 10.1111/j.1751-2980.2012.00592.x.

[162] Brown KA, Ham AJ, Clark CN, Meller N, Law BK, Chytil A, Cheng N, Pietenpol JA, Moses HL.

Identification of novel Smad2 and Smad3 associated proteins in response to TGF-beta1.

J Cell Biochem. 2008 Oct 1;105(2):596-611. doi: 10.1002/jcb.21860.

[163] Derynck R, Zhang YE.

Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.

Nature. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.

[164] Xu P, Liu J, Derynck R.

Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling.

FEBS Lett. 2012 Jul 4;586(14):1871-84. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.010. Epub 2012 May 19.

[165] Casini A, Cunningham M, Rojkind M, Lieber CS.

Acetaldehyde increases procollagen type I and fibronectin gene transcription in cultured rat fat-storing cells through a protein synthesis-dependent mechanism.

Hepatology. 1991 Apr;13(4):758-65.

[166] Chen A.

Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells.

Biochem J. 2002 Dec 15;368(Pt 3):683-93.

[167] Manfred V. Singer, Anil Batra, Karl Mann

Alkohol und Tabak, Grundlagen und Folgeerkrankungen

Thieme, 2011

[168] Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP, Heer J, Kwon C, Lehr R, Mathur A, Olson BA, Weinstock J, Laping NJ.

Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5).

J Med Chem. 2002 Feb 28;45(5):999-1001.

[169] Inman GJ, Nicolás FJ, Callahan JF, Harling JD, Gaster LM, Reith AD, Laping NJ, Hill CS.

SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7.

Mol Pharmacol. 2002 Jul;62(1):65-74.

[170] Laping NJ, Grygielko E, Mathur A, Butter S, Bomberger J, Tweed C, Martin W, Fornwald J, Lehr R, Harling J, Gaster L, Callahan JF, Olson BA.

Inhibition of transforming growth factor (TGF)-beta1-induced extracellular matrix with a novel inhibitor of the TGF-beta type I receptor kinase activity: SB-431542.

Mol Pharmacol. 2002 Jul;62(1):58-64.

[171] Matsuyama S, Iwadate M, Kondo M, Saitoh M, Hanyu A, Shimizu K, Aburatani H, Mishima HK, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K.

SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells.

Cancer Res. 2003 Nov 15;63(22):7791-8.

[172] Halder SK, Beauchamp RD, Datta PK.

A specific inhibitor of TGF-beta receptor kinase, SB-431542, as a potent antitumor agent for human cancers.

Neoplasia. 2005 May;7(5):509-21.

[173] Liu JJ, Duan RD.

LY294002 enhances boswellic acid-induced apoptosis in colon cancer cells.

Anticancer Res. 2009 Aug;29(8):2987-91.

-JUN LIU1 and RUI-DONG DUAN2

[174] Fiandalo MV, Kyprianou N.

Caspase control: protagonists of cancer cell apoptosis.

Exp Oncol. 2012 Oct;34(3):165-75.

[175] Bénéteau M, Pizon M, Chaigne-Delalande B, Daburon S, Moreau P, De Giorgi F, Ichas F, Rebillard A, Dimanche-Boitrel MT, Taupin JL, Moreau JF, Legembre P.

Localization of Fas/CD95 into the lipid rafts on down-modulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway.

Mol Cancer Res. 2008 Apr;6(4):604-13. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0331.

Cancer Res 2008;6:604-613. Published online April 10, 2008.

[176] Bondar VM, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, Mills GB, McConkey DJ.

Inhibition of the phosphatidylinositol 3'-kinase-AKT pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vitro and in vivo.

Mol Cancer Ther. 2002 Oct;1(12):989-97.

[177] Liu F, Gong X, Zhang G, Marquis K, Reinhart P, Andree TH.

The inhibition of glycogen synthase kinase 3beta by a metabotropic glutamate receptor 5 mediated pathway confers neuroprotection to Abeta peptides.

J Neurochem. 2005 Dec;95(5):1363-72. Epub 2005 Nov 8.

[178] Hao LS, Zhang XL, An JY, Karlin J, Tian XP, Dun ZN, Xie SR, Chen S

PTEN expression is down-regulated in liver tissues of rats with hepatic fibrosis induced by biliary stenosis.

APMIS. 2009 Sep;117(9):681-91. doi: 10.1111/j.1600-0463.2009.02515.x.

[179] Zeng T, Zhang CL, Song FY, Zhao XL, Yu LH, Zhu ZP, Xie KQ.

PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-induced fatty liver in mice.

Toxicology. 2012 Jun 14;296(1-3):56-66. doi: 10.1016/j.tox.2012.03.005. Epub 2012 Mar 20.

[180] Coant N, Simon-Rudler M, Gustot T, Fasseu M, Gandoura S, Ragot K, Abdel-Razek W, Thabut D, Lettéron P, Ogier-Denis E, Ouziel R, Devière J, Lizard G, Tellier Z, Lebrech D, Moreau R.

Glycogen synthase kinase 3 involvement in the excessive proinflammatory response to LPS in patients with decompensated cirrhosis.

J Hepatol. 2011 Oct;55(4):784-93. doi: 10.1016/j.jhep.2010.12.039. Epub 2011 Feb 18.

[181] Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA.

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B.

Nature. 1995 Dec 21-28;378(6559):785-9.

[182] Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ.

Apoptosis: controlled demolition at the cellular level.

Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Mar;9(3):231-41.

[183] Bakhshayesh M, Zaker F, Hashemi M, Katebi M, Solaimani M.

TGF- β 1-mediated apoptosis associated with SMAD-dependent mitochondrial Bcl-2 expression.

Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2012 Apr;12(2):138-43. doi: 10.1016/j.clml.2011.12.001. Epub 2012 Jan 31.