

3 Ergebnisse

3.1 Hepatocyten der Regenbogenforelle in Kultur

Hepatocyten aus der Regenbogenforelle lassen sich in hoher Zahl und mit einem hohen Reinheitsgrad aus dem Tier isolieren. Die Isolationsprozedur überleben rund 90% der Hepatocyten. Die Anzahl der Fremdzellen wie Fibrocyten oder Erythrocyten ist vergleichsweise gering und hängt entscheidend von den einzelnen Zentrifugationsschritten während der Isolation ab. Die Zentrifugation mit 110 g führt zu einer erhöhten Anzahl von Fibrocyten. Diese erleichtern zwar das Festheften der Leberzellen an das Substrat, sie beginnen jedoch die Hepatocyten nach einem Zeitraum von rund 10 Tagen zu überwachsen.

Bereits 24 Stunden nach der Isolation kann eine Reorganisation der Leberzellen in den Kulturgefäßen beobachtet werden. Unbelastete Zellen bilden Zell-Zell-Kontakte aus, so dass nach spätestens 3 Tagen eine netzartige Struktur entsteht (Abb. 3.1-1). Ob dieses Aneinanderlagern durch die Ausbildung echter Zellhaften zustande kommt, ist ungeklärt. Auf ultrastruktureller Ebene konnten in der vorliegenden Arbeit keine Desmosomen oder Tight junctions nachgewiesen werden. Eine Belastung von Hepatocyten mit verschiedenen Pharmaka oder toxischen Substanzen kann dazu führen, dass diese netzartige Organisation der Kulturmorphologie zerstört oder unterbunden wird (Abb. 3.1-2). Dies kann als ein früher Anzeiger für eine schädigende Wirkung der untersuchten Substanz angesehen werden.

Auf ultrastruktureller Ebene fällt auf, dass die Zellen etwa 24 Stunden nach der Isolation nicht rund oder oval sind, sondern vielmehr einen unregelmäßigen Umriss aufweisen. Die innere Organisation der Zellen wird durch die Isolation ebenfalls stark beeinflusst. Diese Unterschiede manifestieren sich in einer teilweisen Fragmentierung des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER), die sich im Verlauf der Inkubation rückbildet, so dass die bekannte Organisation des RER als Stapel in Kernnähe sowie in der Zellperipherie wieder hergestellt wird. Ferner sind 24 Stunden nach der Isolation deutliche Heterochromatinschollen im Zellkern erkennbar. Diese werden im Laufe der Kultur stark reduziert. Ebenfalls ist die typische oval- bis kreisrunde Form des Kerns nicht ausgeprägt. Diese stellt sich erst nach längerer Kultur wieder ein. Die Kerne weisen eher eine leicht lappige Struktur auf. Mitochondrien und Peroxisomen zeigen sich durch die Isolationsprozedur eher unbeeinflusst und entsprechen in ihrer Morphologie der aus Leberschnitten bekannten Form. Es fehlen größere Speicherareale mit Glykogen oder Lipid (Abb. 3.1-3). 4 Tage nach der Isolation sind diese Veränderungen weitgehend

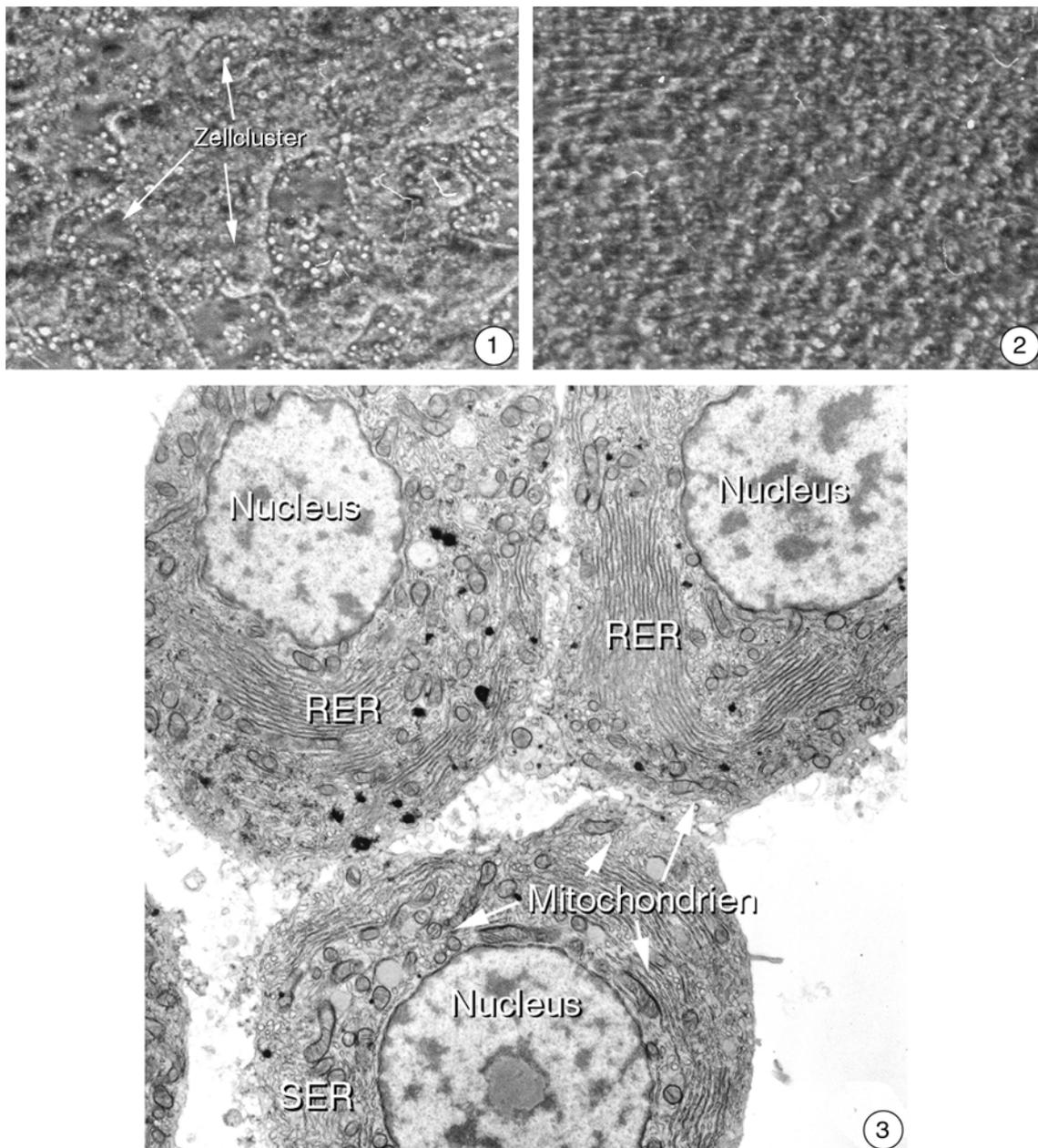
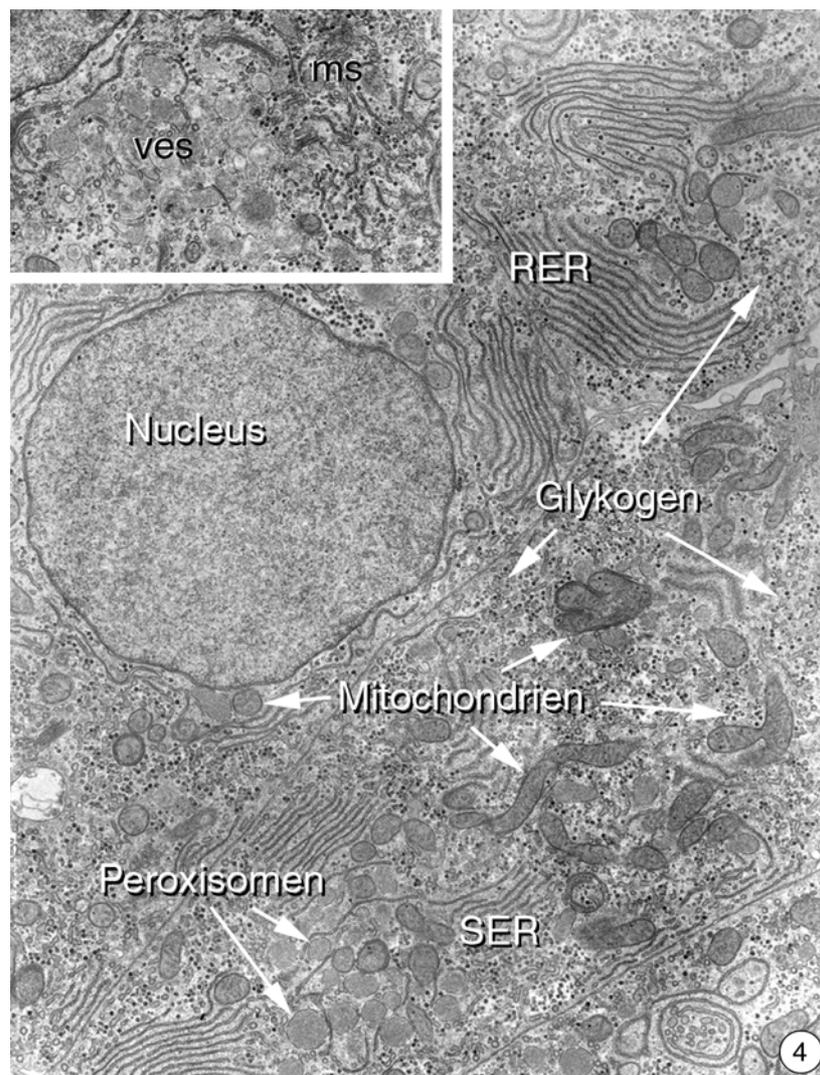


Abbildung 3.1-1 bis 4: Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle in Kultur

1: 24 Stunden nach der Isolation haben sich unbelastete Hepatocyten dicht aneinander gelegt und bilden Kontaktstellen miteinander aus. Dadurch entstehen nach rund 3 Tagen Zellcluster (Pfeile), die zwischen sich leere Stellen in den Kulturgefäßen erscheinen lassen (100x).

2: Werden Hepatocyten dagegen mit toxischen Substanzen behandelt, kann die Fähigkeit diese Cluster auszubilden verloren gehen. Statt dessen verbleiben die Zellen in ihrer aufgelockerten Form und die Bildung von Zellclustern bleibt aus (100x).

Fortsetzung nächste Seite →



← Fortsetzung Abbildung 3.1

3: Isolierte Hepatocyten, die 24 Stunden nach der Isolation einer ultrastrukturellen Untersuchung zugeführt werden, zeigen im Elektronenmikroskop eine unregelmäßige Form. Der Kern ist weitgehend rund und weist größere Heterochromatinschollen auf. Der Nucleolus ist deutlich erkennbar. Das Endomembransystem zeigt teilweise fragmentiertes raues endoplasmatisches Retikulum (RER). Auch das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist deutlich ausgeprägt. Peroxisomen und Mitochondrien erscheinen von der Isolationsprozedur unbeeinflusst und zeigen die aus Organschnitten bekannte Form (6.600x).

4: Änderungen gegenüber frisch isolierten Hepatocyten in der Ultrastruktur sind heterochromatinarme Kerne. Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) ist stark ausgebildet und das glatte endoplasmatische Retikulum ist ebenfalls sehr gut entwickelt (7.500x). *Einsatz:* 3 Tage nach der Isolation fällt der hochaktive Golgi-Apparat auf. Von den Membranstapeln (ms) der Golgi-Felder gehen große Vesikel (ves) ab und deuten auf eine hohe Stoffwechselaktivität der Zellen hin (8.100x).

verschwunden. Die Hepatocyten sind eng aneinander gelagert und an den Stellen wo drei Hepatocyten zusammentreffen bilden sie sogenannte „Pseudogallencanaliculi“ aus. An diesen Positionen liegen die Zellen nicht sehr dicht aneinander und lassen so einen kleinen Leerraum offen, in den Mikrovilli ragen. Die Zellen selbst besitzen eine polygonale Struktur und der Kern ist annähernd kreisrund. Die Menge an Heterochromatin ist gegenüber Zellen, die 24 Stunden nach der Isolation untersucht wurden, verringert. Der Nucleolus ist größer ausgebildet als in den isolationstechnisch jüngeren Zellen. Das raue endoplasmatische Retikulum ist weitgehend unfragmentiert und ist in Stapeln um den Kern und teilweise in der Peripherie der Zellen zu finden. Mitochondrien und Peroxisomen sind nach wie vor in ihrer Ausprägung vergleichbar mit der Morphologie histologischen Schnitten aus Leberproben (Abb.: 3.1-4). Ein deutlicher Unterschied zu den „jüngeren“ Leberzellen ist die hohe Anzahl von Golgifeldern, die sich in dieser hohen Anzahl auch in Leberschnitten nicht finden. Dies weist auf eine hohe Proteinsyntheseleistung der Zellen hin (Abb.: 3.1-4 Einsatz).

3.2 Belastung von Primärhepatocyten mit Clofibrat

Hepatocyten aus der Regenbogenforelle reagieren auf eine Belastung mit hohen Clofibratkonzentrationen (1 bzw. 2 mM) mit einer verminderten Reaggregation. Ferner lösen diese hohen Konzentrationen eine spezifische Art des Zelltods aus, die stark der Apoptose ähnelt. Diese Form des Zelltods beginnt zwischen einem und drei Tagen nach Expositionsbeginn und lässt sich mit verschiedenen morphologischen und biochemischen Studien näher analysieren. Eine Erhöhung der Konzentration auf 2 mM Clofibrat resultiert im Absterben der Hepatocyten innerhalb eines Tages. Diese toten Zellen lassen sich aber noch hinsichtlich verschiedener biochemischer und elektronenmikroskopischer Parameter untersuchen.

3.2.1 Ultrastrukturelle Veränderungen

Das Hauptaugenmerk in diesen Versuchen lag auf Hepatocyten, die 3 Tage mit Clofibrat belastet wurden. Die im Folgenden beschriebenen Veränderungen treten zwar auch schon früher auf, aber die Anzahl der veränderten Hepatocyten ist geringer und erschwert somit die Auswertung. Ferner sind nach dreitägiger Belastung bereits viele Zellen abgestorben.

Kontrolle: 3 Tage nach Versuchsbeginn (4 Tage nach Isolation) wiesen Kontrollhepatocyten peripher lokalisierte Nuclei auf, die einen deutlich entwickelten Nucleolus besaßen. Heterochromatin war nur sehr schwach ausgeprägt. In den meisten Zellen war es nicht vorhanden (Abb 3.1-5). Die Zellkerne waren von einigen Stapeln rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER) umgeben, weitere Zisternen konnten in der Peripherie der

Zellen gefunden werden. Das glatte endoplasmatische Retikulum war als ausgedehntes Netzwerk von kleinen Zisternen und Tubuli ausgebildet und auf die peripheren Glykogenfelder beschränkt (Abb. 3.1-4). Die Golgifelder bestanden aus Stapeln von bis zu 6 Zisternen. Große Vesikel unterschiedlicher Elektronendichte, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt wurden, deuteten auf eine hohe Syntheseleistung hin (Abb. 3.1-4 Einsatz). Mitochondrien erschienen als sphärische oder längliche, ovale Gebilde mit einem durchschnittlichen Durchmesser von rund 1 μm , die mit kleineren Zisternen von RER assoziiert waren. Die innere Mitochondrienmembran war in zahlreiche enge Cristae gefaltet. Die Peroxisomen besaßen die Größe kleiner Mitochondrien ($\sim 0,9 \mu\text{m}$). Das lysosomale Kompartiment war nur schwach ausgebildet, sekundäre Lysosomen waren selten. Als Speicherstoffe traten teilweise ausgedehnte Glykogenfelder in der Peripherie der Zellen auf (Abb. 3.1-4). Lipidtropfen waren nur sehr selten nachweisbar.

0,5 mM Clofibrat: Die Belastung von Hepatocyten mit 0,5 mM Clofibrat über 3 Tage erhöhte in geringem Maße die Menge an Heterochromatin. Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) war fast komplett in die Peripherie der Zellen gewandert (Abb. 3.2.1-1). Die Menge und die Lokalisation des glatten endoplasmatischen Retikulums war äquivalent zu den Kontrollen. Die Dictyosomen des Golgi-Apparats bestanden aus bis zu 6 Zisternen, und wie bei den Kontrollen gingen von diesen große Vesikel unterschiedlicher Elektronendichte ab, die teilweise wahrscheinlich primäre Lysosomen darstellten. Die Mitochondrien waren mit kleinen Zisternen aus RER assoziiert und entsprachen in ihrem Aussehen den Kontrollmitochondrien. Die Peroxisomen erschienen in Größe und Morphologie ebenfalls identisch zu den Kontrollen. Ein großer Unterschied zu den Kontrollen konnte beim lysosomalen Kompartiment beobachtet werden. Neben sekundären Lysosomen waren mehrfach Autophagosomen zu finden (Abb. 3.2.1-1; 2).

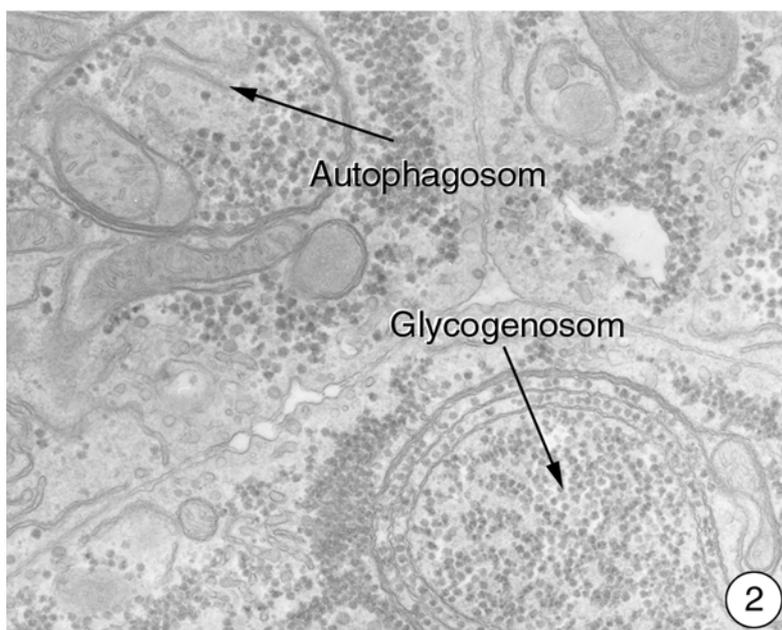
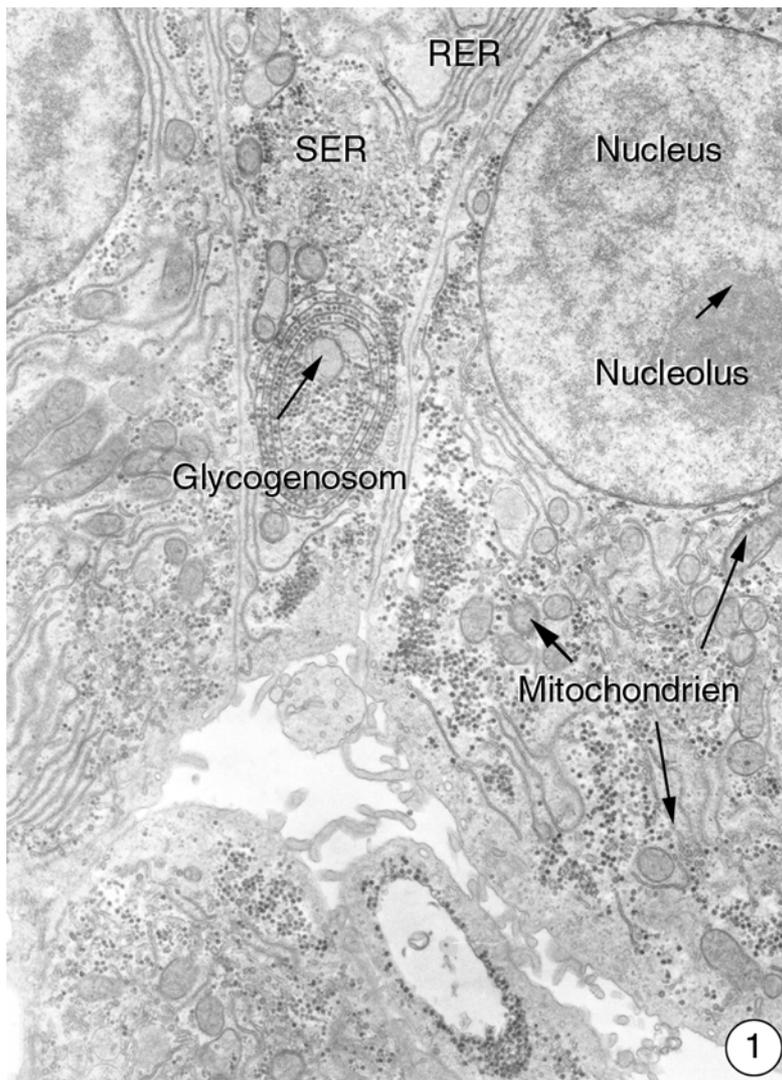
1 mM Clofibrat: Eine Belastung mit 1 mM Clofibrat führte zu einer sehr heterogenen Population von Hepatocyten in den Kulturgefäßen. Es ließen sich drei verschiedene Gruppen von Hepatocyten erkennen. Die erste Gruppe bestand aus toten Zellen, darauf folgten Zellen, die gegenüber den Kontrollen starke Veränderungen aufwiesen und schließlich die dritte Gruppe, bei der die Unterschiede zur Kontrolle nur gering waren. Die nur leicht veränderten Hepatocyten wiesen ausgedehnte Stapel aus rauem endoplasmatischen Retikulum (RER) auf, die sich teilweise vom Zellkernbereich bis zur Zellperipherie ausdehnten. Der Fragmentierungsgrad war deutlich erhöht und teilweise kondensierten einzelne Membranstapel zu myelinartigen Strukturen (Abb. 3.2.1-3). Der Golgi-Apparat bestand aus großen Zisternen, von denen große Vesikel mit unterschiedlicher Elektronendichte abgingen. Ein Teil der Mitochondrien war geschwollen und die Organisation der inneren Mitochondrienmembran wich zum Teil stark von den Kontrollen ab. Die Cristae waren kollabiert oder in ihrer Anordnung nicht mit Kontrollen vergleichbar (Abb. 3.2.1-5). Der Gehalt lysosomaler Elemente war gegenüber den Kontrollen erhöht (Abb. 3.2.1-4). Der Glykogengehalt war im Vergleich zu den Kontrollen re-

duziert, wogegen nun eine Zunahme von elektronendichten Lipidtropfen mit typischem Leaflet erkennbar wurden (Abb. 3.2.1-6).

Die Gruppe der stark geschädigten Zellen wies eine Vielzahl morphologischer Änderungen auf. Die auffälligste Veränderung bestand in der Kondensierung von Chromatin in der Peripherie der Zellkerne (Abb. 3.2.1-7). Ab und zu konnte eine Ablösung dieses kondensierten Materials von der Kernhülle beobachtet werden (Abb. 3.2.1-8). Eine Kernlamina war auch bei höheren Vergrößerungen nicht zu erkennen. Das kondensierte Chromatin war nicht homogen in der Peripherie verteilt, sondern bildete sphärische Regionen aus, die deutlich voneinander zu unterscheiden waren (Abb. 3.2.1-9). Der Nucleolus war in eine amorphe Struktur verwandelt (Abb. 3.2.1-12). Die typische Ausprägung des Endomembransystems trat nicht mehr auf, sondern wurde von einer neuen Organisation von Membranen abgelöst. Einzelne Membranzisternen bildeten eine netzartige Struktur, die von Knotenpunkten, gebildet von annullierten Lamellen, ausgingen (Abb. 3.2.1-10). Das ultrastrukturelle Bild legt nahe, dass diese Neuorganisation dazu dient, große Teile des Cytoplasmas in einzelne Vesikel zu verpacken. Eine weitere Änderung des Endomembransystems bestand darin, dass die äußere Kernmembran weite Ausläufer in den Zellkörper bildete, die ebenfalls am „Verpacken“ von Zellbestandteilen beteiligt waren (Abb. 3.2.1-11). Die Mitochondrien erschienen wie in der nur leicht veränderten Gruppe, mit dem Unterschied, dass die Anzahl veränderter Organellen weiter erhöht war (Abb. 3.2.1-13; 14). Die innere Mitochondrienmembran teilte die Mitochondrienmatrix teilweise in zwei verschiedene Bereiche (Abb. 3.2.1-15). Einen Teil, der einem normalen Kontrollmitochondrium entsprach und einen zweiten Teil, der als große intramitochondriale Vakuole interpretiert werden kann (Abb. 3.2.1-16). Als weitere Veränderung an den Mitochondrien konnten teilweise zerstörte äußere Membranen entdeckt werden (Abb.: 3.2.17-22). Glykogenfelder waren nicht mehr vorhanden und die Anzahl der dunkel gefärbten Lipidtropfen war weiter erhöht.

Die dritte Gruppe von Hepatocyten nach Belastung mit 1 mM Clofibrat bestand aus toten Zellen. Der Nucleus war in dieser Gruppe kaum noch erkennbar, auch andere Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen waren nur noch sehr selten zu finden. Einzig das Endomembransystem mit allen Veränderungen, die bereits bei den geschädigten Hepatocyten beschrieben wurden, war noch deutlich zu erkennen. Der Habitus der Zellen entsprach den abgestorbenen Hepatocyten, die über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 2 mM Clofibrat belastet wurden.

2 mM Clofibrat: Hepatocyten aus der Regenbogenforelle, die mit 2 mM Clofibrat belastet wurden, waren nach 3 Tagen komplett abgestorben. Die ultrastrukturellen Veränderungen entsprachen denen der Gruppe toter Zellen nach Belastung mit 1 mM Clofibrat. Organellen waren nur selten erkennbar, der Nucleus war, wenn überhaupt auffindbar, eine von einer Doppelmembran umgebene Struktur mit Chromatinflocken



Abbildungserläuterungen siehe nächste Seite →

(Abb. 3.2.1-23). Der erkennbare Rest der Zellen bestand aus dem beschriebenen Netzwerk von Membranwirbeln und -tubuli (Abb. 3.2.1-23; 24).

←

Abbildung 3.2.1-1 und 2: Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach einer Belastung mit 0,5 mM Clofibrat für 3 Tage.

1: Die Kerne erscheinen rund und besitzen wenig Heterochromatin. Der Nucleolus ist deutlich ausgeprägt. Das raue endoplasmatische Retikulum (RER) ist in Form einiger Zisternen um den Zellkern und in der Peripherie der Leberzellen angeordnet. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist ebenfalls deutlich ausgebildet. Auffällige Veränderungen gegenüber den Kontrollen findet man im lysosomalen Kompartiment, das eine Vermehrung von Glykogenosomen und anderen Autophagosomen aufweist (8.000x).

2: Die Belastung mit 0,5 mM Clofibrat führt zu einer deutlichen Zunahme von Autophagosomen und Glykogenosomen. Mehrere Membranzisternen befinden sich ebenfalls in diesen lysosomalen Organellen (16.000x).

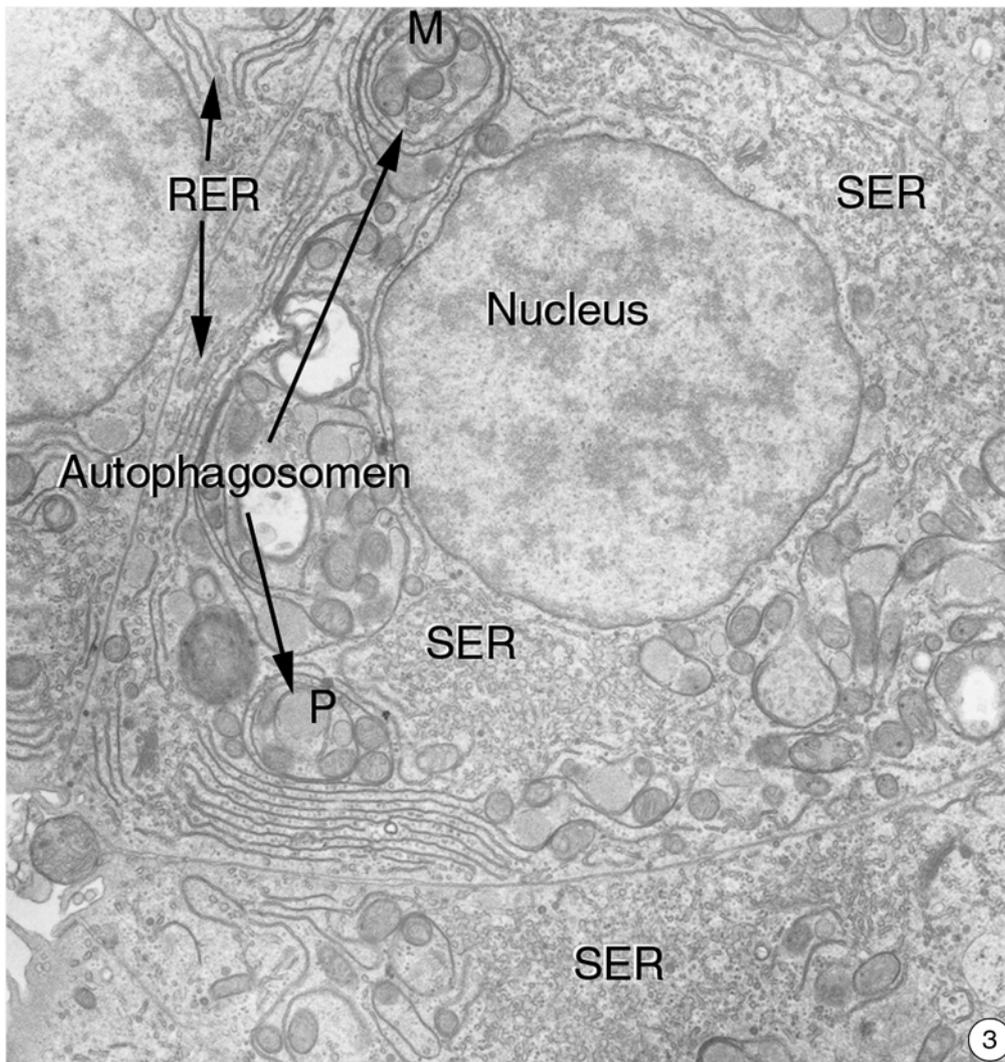


Abbildung 3.2.1-3: Die Belastung von Hepatocyten führt nach drei Tagen zu verschiedenen morphologischen Unterschieden. Leicht geschädigte Zellen findet man den bereits bei geringeren Konzentrationen beobachteten Effekt der Zunahme von Autophagosomen. In diesen können nun deutlich Mitochondrien (M) und Peroxisomen (P) erkannt werden. Das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist extrem stark ausgebildet (9.300x).

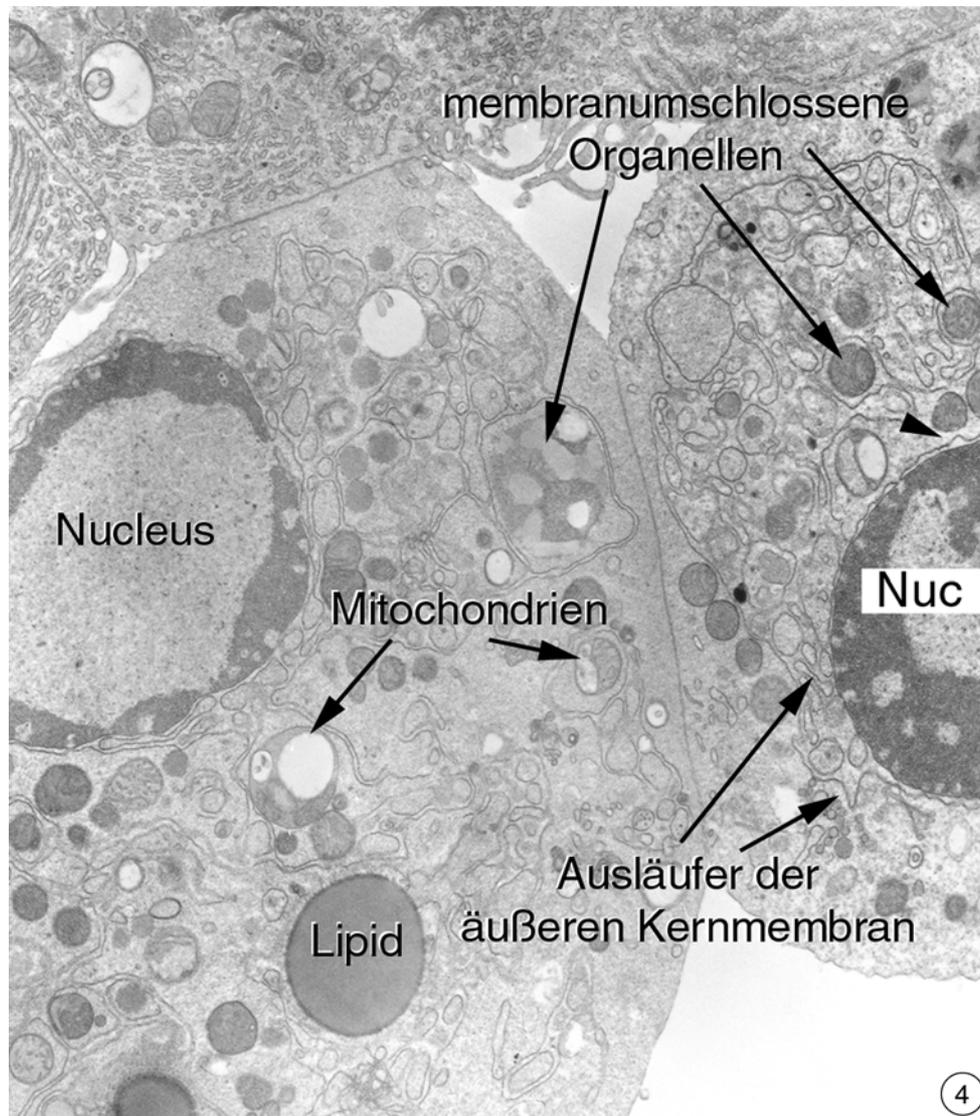
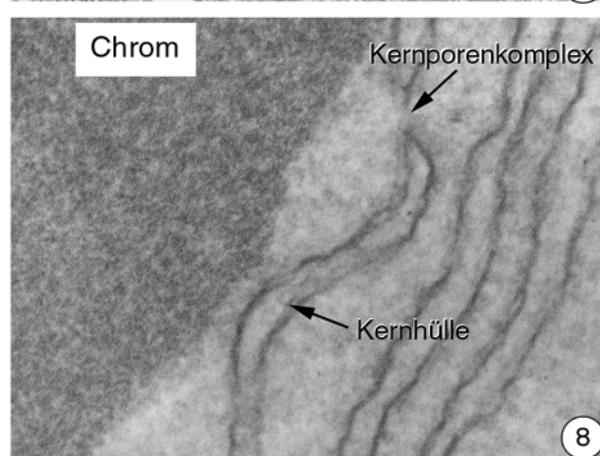
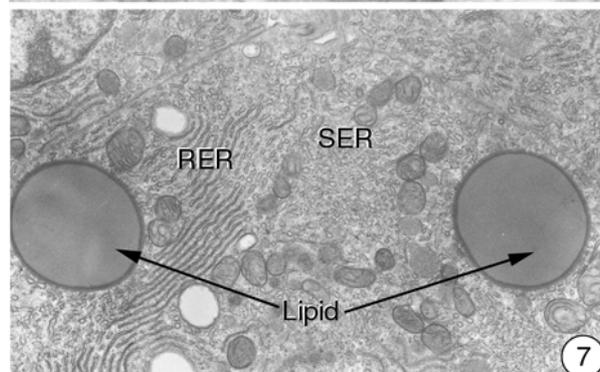
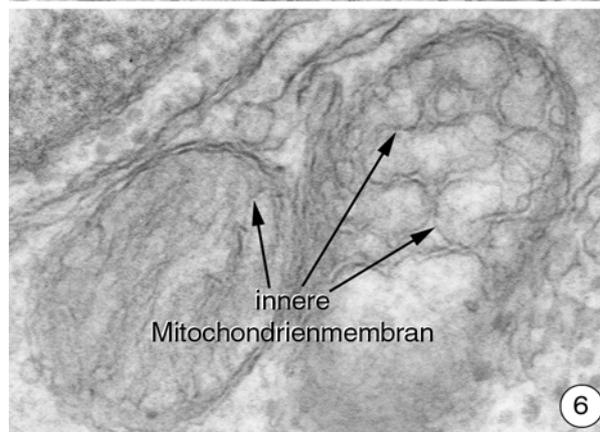
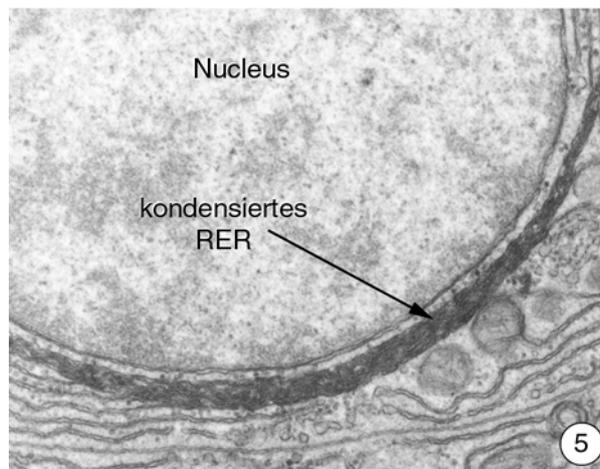


Abbildung 3.2.1-4: Neben den beschriebenen geringeren Veränderungen gegenüber den Kontrollen treten sehr viele Zellen auf, die extreme Schäden aufweisen. Besonders auffällig ist hier die Kondensierung des Chromatins als ringförmige Struktur in der Peripherie des Zellkerns und die Auflösung des Endomembransystems. Es ist in einzelne Zisternen aufgelöst, die durch das Cytoplasma ziehen. Auch die äußere Kernmembran ist Veränderungen unterworfen indem von dort Ausläufer in das Cytoplasma abgehen. An anderen Stellen ist die Kernhülle stark dilatiert (Pfeilkopf; 9.100x).



Abbildungsbeschriftungen siehe nächste Seite →

← **Abbildung 3.2.1-3 bis 8:** Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von 3 Tagen.

5: Die Hepatocyten tendieren dazu, Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) in der Kernregion zu kondensieren, so dass myelinartige Strukturen entstehen (16.000x).

6: Die morphologischen Veränderungen betreffen auch die Mitochondrien. Die innere Cristastruktur erscheint stark gestört (6.800x).

7: Während Lipid in den Kontrollen nur sehr selten erkannt werden konnte, treten diese Energiespeicher nun sehr häufig auf. Die Lipidtropfen sind von einem dunklen Saum umgeben, der auf einen hohen Anteil von Phospholipiden hinweist (6.500x).

8: Streckenweise kommt es zu einer kompletten Ablösung der Kernhülle vom Chromatin (Chrom). Eine Kernlamina kann jedoch in solchen Fällen nicht entdeckt werden (72.000x).

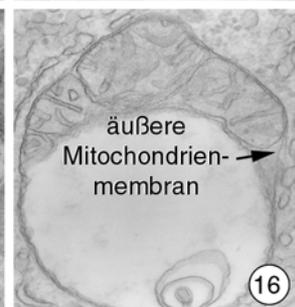
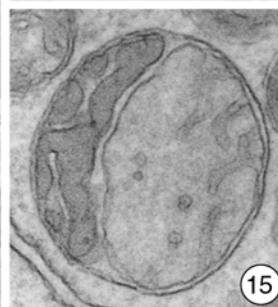
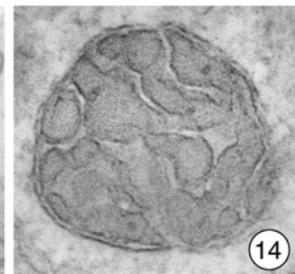
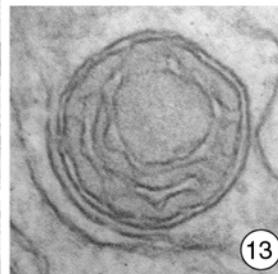
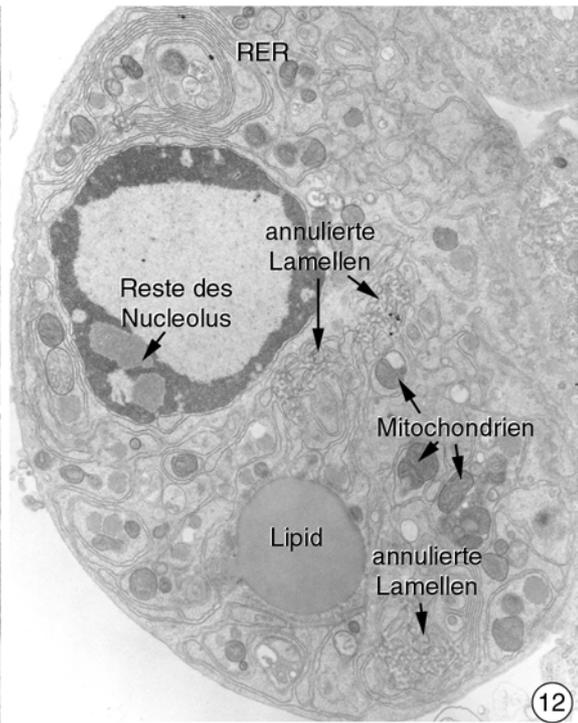
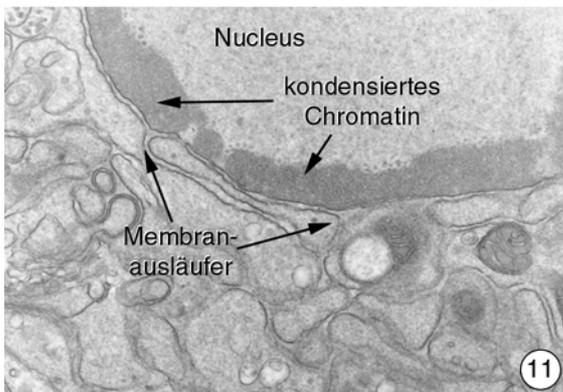
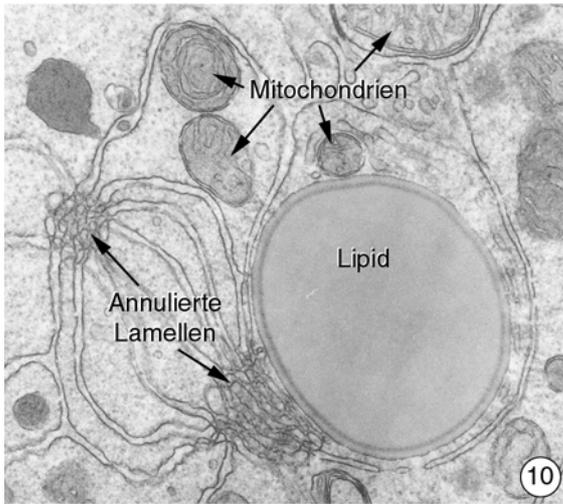
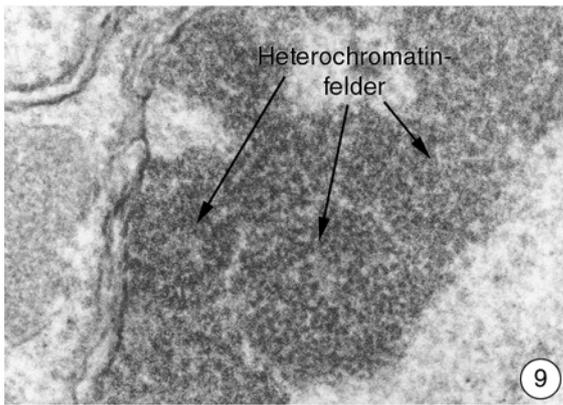


Abbildung 3.2.1-9-16: Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach 3 Tagen Belastung mit Clofibrat.

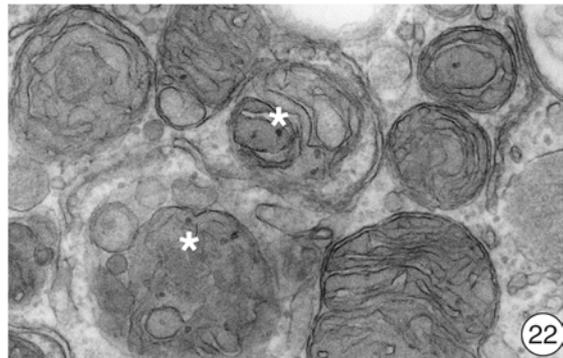
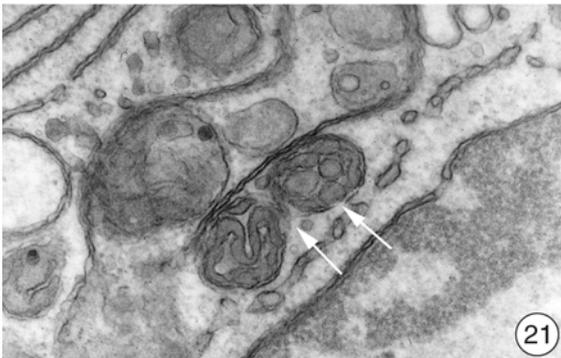
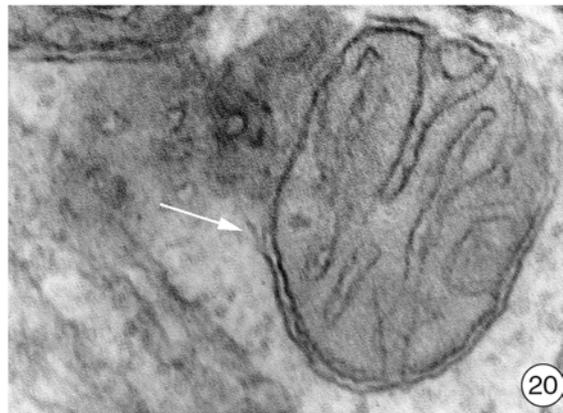
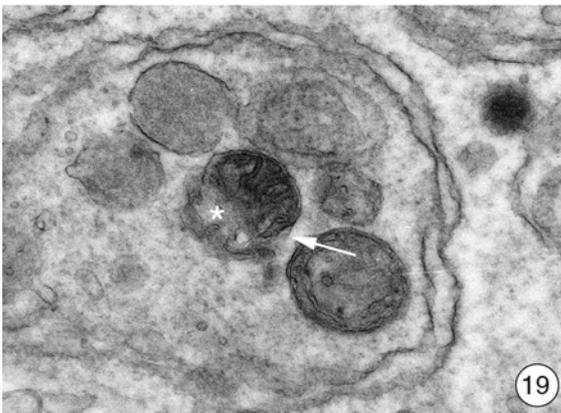
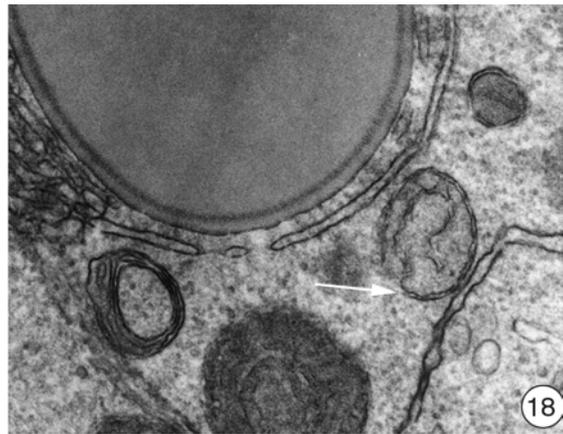
9: Bei genauerer Betrachtung des kondensierten Chromatins in den Zellkernen fällt auf, dass es nicht homogen verteilt ist. Vielmehr sind rundliche Strukturen erkennbar. In unmittelbarer Nachbarschaft zu Kernporenkomplexen findet man nur selten Heterochromatin (81.000x).

10: Das Endomembransystem bildet nach seinem Zusammenbruch neue Strukturen in Form von annullierten Lamellen aus, die miteinander über Membranzisternen in Verbindung stehen. An dem dargestellten Lipidtropfen fällt die enge Anlagerung von Membranstrukturen auf, die streckenweise in direktem Kontakt mit dem Lipid zu stehen scheinen (7.500x).

11: Von der äußeren Kernmembran ziehen Ausläufer in das Cytoplasma und vereinigen sich mit anderen Membranzisternen (25.600x).

12: Innerhalb der Population stark geschädigter Zellen gibt es auch noch immer einige wenige Hepatocyten, die noch intakte Strukturen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) aufweisen. Andere Merkmale der Schädigung wie veränderte Mitochondrienmorphologie, Ausbildung annullierter Lamellen und Anhäufung von Lipidtropfen treten auch hier auf. Eine weitere auffällige Veränderung in den Leberzellen ist die Kollabierung des Nucleolus in eine amorph erscheinende Struktur (17.600x).

13-16: Die Veränderungen der Mitochondrienmorphologie scheinen einem bestimmten Muster zu folgen. Zunächst bilden die inneren Membranstrukturen konzentrische Kreisstrukturen (**13**) oder ein ungeordnetes Geflecht aus (**14**). Die nächste Stufe ist die Teilung des Mitochondriums in zwei unterschiedliche Bereiche. Ein Bereich ist reich an inneren Membranstrukturen, während der andere Teil fast komplett frei davon ist (**15**). Dieser fast membranfreie Bereich geht in einer großen intramitochondrialen Vakuole auf (**16**). Mitochondrien mit dieser Morphologie sind oft in den stark geschädigten Zellen zu finden (55.000x).



Abbildungsbeschriftungen siehe nächste Seite →

← **Abbildung 3.2.1-17-22:** Die Mitochondrien weisen zum Teil eine geschädigte äußere Mitochondrienmembran auf.

17: Die äußere Membran ist zerrissen (Pfeile) und die innere Membran wird in das Cytosol exponiert (46.000x).

18: Auch hier ist die äußere Membran unterbrochen (Pfeil) und ein großer Teil des Inter-membranraums öffnet sich zum Cytosol (42.000).

19: Dieses Mitochondrium weist neben einer zerrissenen Außenmembran (Pfeil) auch einen Anteil der inneren Membran auf, der sich in das Cytosol entfaltet (*; 44.000x).

20: Die innere Mitochondrienmembran besitzt eine Form, die von einem intakten Organell bekannt ist. Bei genauerer Betrachtung fällt aber auch hier wieder die unterbrochene äußere Membran auf (Pfeil; 46.000x).

21: Bei dieser Struktur ist nicht eindeutig zu klären ob es sich um zwei kleine Mitochondrien oder ein einzelnes größeres Organell handelt, da die äußere Membran kaum erkennbar ist (Pfeile; 30.000x).

22: Komplette zerstörte Mitochondrien, die nur Wirbel der inneren Mitochondrienmembran erkennen lassen (*; 34.000x).

3.2.2 DNA-Färbung in lebenden Hepatocyten

Zur Färbung der DNA in lebenden Zellen können verschiedene Farbstoffe angewendet werden. In dieser Arbeit wurden eine 1:1-Mischung aus Acridinorange und Ethidiumbromid und Hoechst 33342 eingesetzt. Beide Farbstoffe emittieren im Fluoreszenzmikroskop bei UV-Anregung Licht. Acridinorange führt dabei zu einem grünen Leuchten der DNA, RNA erscheint schwach rot. Ethidiumbromid hingegen, das nicht in lebende Zellen eindringen kann, bewirkt bei Zellen mit perforierter Zellmembran ein intensiv orangefarbenes Leuchten des Zellkerns. Apoptotische Zellen sind durch eine Fragmentierung und Kondensierung der DNA im Zellkern gekennzeichnet.

Kontrollhepatocyten wiesen nach Anfärbung mit Acridinorange/Ethidiumbromid intensiv grün leuchtende Kerne auf, die teilweise Schollen noch intensiver strahlender Strukturen besaßen. Dies deutet auf eine Verdichtung von DNA an diesen Stellen hin. Der Rest des Zellkörpers leuchtete nur schwach. Rote Markierungen durch Anfärbung von RNA oder Lysosomen waren nur sehr schwach ausgebildet (Abb. 3.2.2-1). Die Behandlung der Hepatocyten mit Hoechst 33342 führte nicht zu einer Markierung des Zellkörpers bei UV-Anregung. Die Kerne dagegen erschienen in intensiver blauer Fluoreszenz. Dieses Leuchten war nicht homogen verteilt, sondern wies auch hier eine deutliche Strukturierung des Kerns in stärkere und schwächere Fluoreszenz auf, was auf eine Unterteilung des Kerns in Eu- und Heterochromatin hindeutete (Abb. 3.2.2-5).

Diese Fluoreszenzverteilung blieb nach einer Belastung der Zellen mit 0,5 mM Clofibrat erhalten.

Viele Leberzellen, die mit 1 mM Clofibrat belastet wurden, wiesen schon 1 Tag nach Expositionsbeginn ein verändertes Färbemusters im Zellkern auf. Zum einen traten apoptotische Zellen mit intakter Zellmembran auf, die nach Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung einen intensiv grün leuchtenden Chromatinring in der Peripherie des Kerns aufwiesen (Abb. 3.2.2-2). Andere Zellen wiesen eher gelblich erscheinende Chromatinverdichtungen in der Kernperipherie auf (Abb. 3.2.2-3). Dies deutet auf ein späteres Apoptosestadium hin, bei dem die Zellmembran bereits geschädigt ist. Weiterhin waren auch Zellen erkennbar bei denen sich die Färbung weiter in den orangeroten Bereich verschob. Einige Hepatocyten trugen einen vollständig und intensiv orange leuchtenden Zellkern (Abb. 3.2.2-4). Dies deutete auf eine massive Penetration der Leberzellen mit Ethidiumbromid hin. Auch eine Färbung mit Hoechst 33342 zeigte deutlich die Reorganisation des Chromatins in Form eines Rings in der Kernperipherie in vielen Hepatocyten nach der Belastung mit 1 mM Clofibrat (Abb. 3.2.2-6).

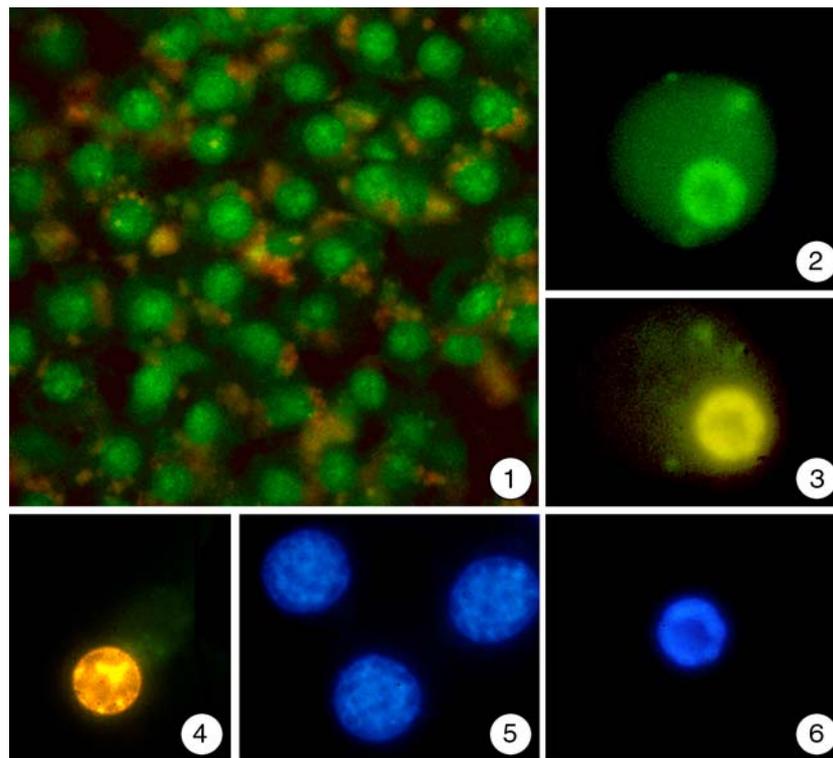


Abbildung 3.2.2-1 bis 6: Isolierte Hepatocytan aus der Regenbogenforelle nach Behandlung mit DNA-färbenden Substanzen.

1: Vitale Kontroll-Hepatocytan nach Anfärbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid. Deutlich sind die intensiv grün leuchtenden Zellkerne zu erkennen. Der Rest der Zelle erscheint ebenfalls leicht grün und teilweise lässt sich ein leichtes rötlich-oranges Leuchten ausmachen. Es handelt sich dabei um lysosomale Elemente, die von Acridinorange markiert werden.

2: Nach Behandlung mit 1 mM Clofibrat für 3 Tage treten vermehrt Zellen auf, die im Kern eine ringförmige Verdichtung der grünen Fluoreszenz aufweisen. Es handelt sich dabei um kondensiertes Chromatin. Das Fehlen einer orangefarbenen Fluoreszenz im Kern macht aber deutlich, dass in solchen Leberzellen die Zellmembran noch vollständig intakt ist und kein Eindringen von Ethidiumbromid möglich ist.

3: 30 Minuten nach Beobachtungsbeginn mischen sich bei den Zellen mehr rote Anteile in den Bereich von kondensiertem Chromatin, was verdeutlicht, dass es zu einer Schädigung der Zellmembran kommt, und Ethidiumbromid in die Zelle eindringen kann.

4: 60 Minuten nach der Probennahme ist ein grünes Leuchten kaum noch erkennbar. Die Markierung des Zellkerns durch Ethidiumbromid überwiegt. Diese Zellen sind sehr stark geschädigt bzw. bereits abgestorben.

5: Kontrollhepatocytan nach Anfärbung mit Hoechst 33342. Dieser Farbstoff markiert Adeninreste in der DNA. Das resultierende Bild ist mit den Acridinorange/Ethidiumbromid gefärbten Leberzellen vergleichbar. Deutlich erkennt man, dass das Chromatin nicht gleichmäßig über den Kern verteilt ist, sondern dass es intensiver leuchtende Strukturen innerhalb des Kerns gibt.

6: Die Auswirkungen von Clofibrat werden auch bei einer Färbung mit Hoechst 33342 deutlich. Wiederum erkennt man eine ringförmige Kondensierung des Chromatins im Kern.

3.2.3 Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme

Die Aktivität der Caspase 3 lässt sich in Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit dem zellmembranpermeablen Substrat PhiPhiLux[®] untersuchen.

Leberzellen, die 3 bis 4 Tage nach der Isolation mit diesem Substrat inkubiert wurden, erschienen im Phasenkontrastmikroskop annähernd kreisrund. Einige Hepatocyten besaßen nach diesen Untersuchungen aktive Caspase 3, deutlich erkennbar an der grünen Fluoreszenz. Dies zeigt, dass auch in unbelasteten Proben stets in gewissem Umfang Apoptose auftritt (Abb. 3.2.3-1).

Die Belastung der Hepatocyten mit 1 mM Clofibrat für 2 Tage führte zu einer extremen Zunahme der Zellen mit grüner Fluoreszenz (Abb. 3.2.3-2). Die angefärbten Zellen erinnerten auch in ihrer Morphologie nur noch entfernt an Hepatocyten. Die typische runde Form einzelner Hepatocyten in Kultur war verloren gegangen. Vielmehr erschienen die Leberzellen als unregelmäßige „rau“ wirkende Gebilde (Abb. 3.2.3-2), was als ein Anzeichen für das von der Apoptose bekannte „Blebbing“ gewertet werden kann.

Nach 3 Tagen waren alle untersuchten Hepatocyten apoptotisch, was durch die intensive Grünfärbung deutlich wurde (Abb. 3.2.3-3). Es konnten auch viele kleinere Partikel in den untersuchten Proben dokumentiert werden, die ebenfalls eine grüne Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 3.2.3-3).

Eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid brachte weiteren Aufschluss über den Zustand der untersuchten Zellen. Nach 2 Tagen Inkubation mit 1 mM Clofibrat besaßen rund 50 % aller Zellen einen mit Propidiumiodid angefärbten intensiv gelb-orange leuchtenden Zellkern. Dies deutete auf eine Schädigung der Zellmembran hin.

Es konnten verschiedene Stadien der Apoptose unterschieden werden: So fanden sich vereinzelt Zellen, die nur grün leuchteten, was zwar auf eine intakte Zellmembran hinwies, aber bereits mit einer Aktivierung der Caspase 3 einherging (Abb. 3.2.3-4). Der Kernbereich war in diesen Zellen nicht angefärbt und erschien im Bild als dunkle Struktur. Neben diesem Typus waren auch Hepatocyten vorhanden, die zwar einen hohen Anteil von grüner Fluoreszenz besaßen, aber der Kernbereich erschien nicht mehr dunkel. Vielmehr konnte dort der Beginn einer orangefarbenen Markierung erkannt werden, die teilweise als ringförmige Struktur erschien (Abb. 3.2.3-4; 5). Schließlich fanden sich auch noch Hepatocyten, die zwar ebenfalls eine grüne Fluoreszenz im cytoplasmatischen Bereich aufwiesen, doch waren hier die Kerne bereits sehr stark mit Propidiumiodid angefärbt (Abb. 3.2.3-6), so dass man hier von einer extremen Schädigung der Zellen ausgehen muss, die innerhalb kürzester Zeit den Tod zu Folge hat. Als letzten Typus konnten noch Zellen gefunden werden, die keine grüne Fluoreszenz besaßen und nur intensiv orange-gelb gefärbte Kerne aufwiesen (Abb. 3.2.3-7).

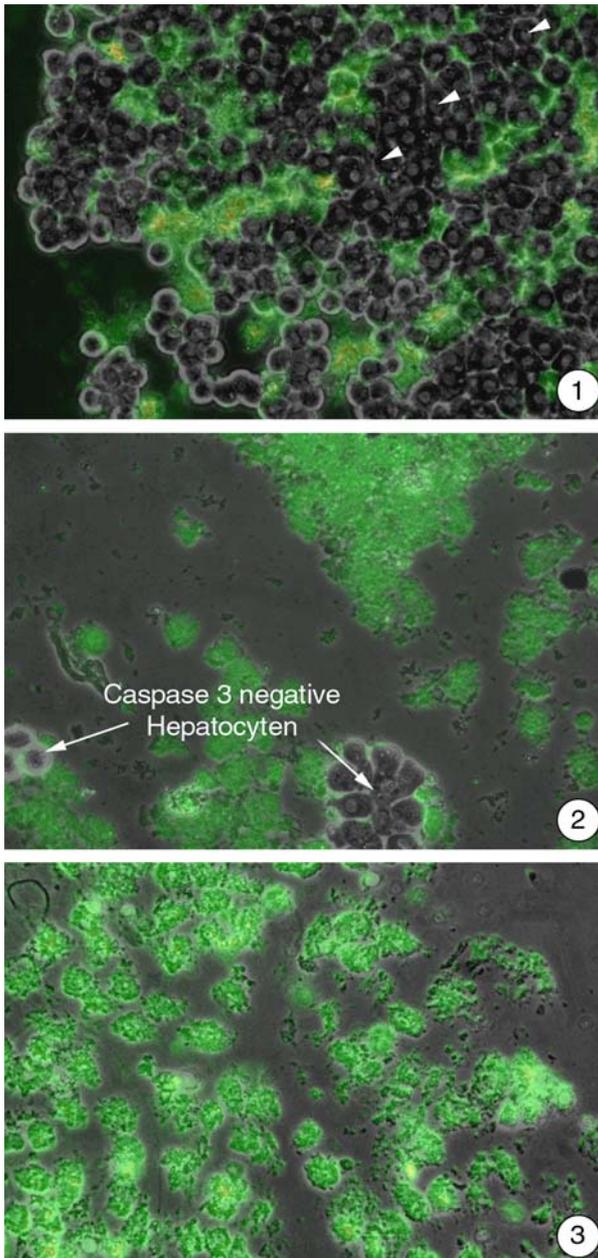


Abbildung 3.2.3-1 bis 3: Isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat und Inkubation mit einem membranpermeablen Caspase 3-Substrat (PhiPhiLux[®]), das nach Spaltung grün fluoresziert.

1: Kontrollhepatocyten, die mit einem Caspase 3-Substrat inkubiert wurden, zeigen im Phasenkontrastmikroskop runde Zellen mit einem deutlichen Kern (Pfeilspitzen). Eine grüne Fluoreszenz, die durch die Spaltung des dargebotenen Substrats zustande kommt, ist zwar vorhanden, aber selten.

2: Eine Behandlung der Hepatocyten mit 1mM Clofibrat für 2 Tage verändert das Ergebnis auf dramatische Art. Die runde Form der Zellen ist zum größten Teil verloren gegangen; sie erscheinen jetzt als rau und wellig wirkende Gebilde. Leberzellen dieses Habitus zeigen durchweg eine intensive grüne Fluoreszenz. Es treten aber auch noch Hepatocyten auf, die in ihrer Form und Färbung den Kontrollen entsprechen.

3: Nach 3 Tagen sind alle untersuchten Hepatocyten stark geschädigt und weisen eine intensive grüne Fluoreszenz auf. Es fallen ferner auch etliche kleinere Partikel auf, die ebenfalls in grüner Fluoreszenz erscheinen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Apoptosekörper und andere Zelltrümmer bereits abgestorbener Zellen.

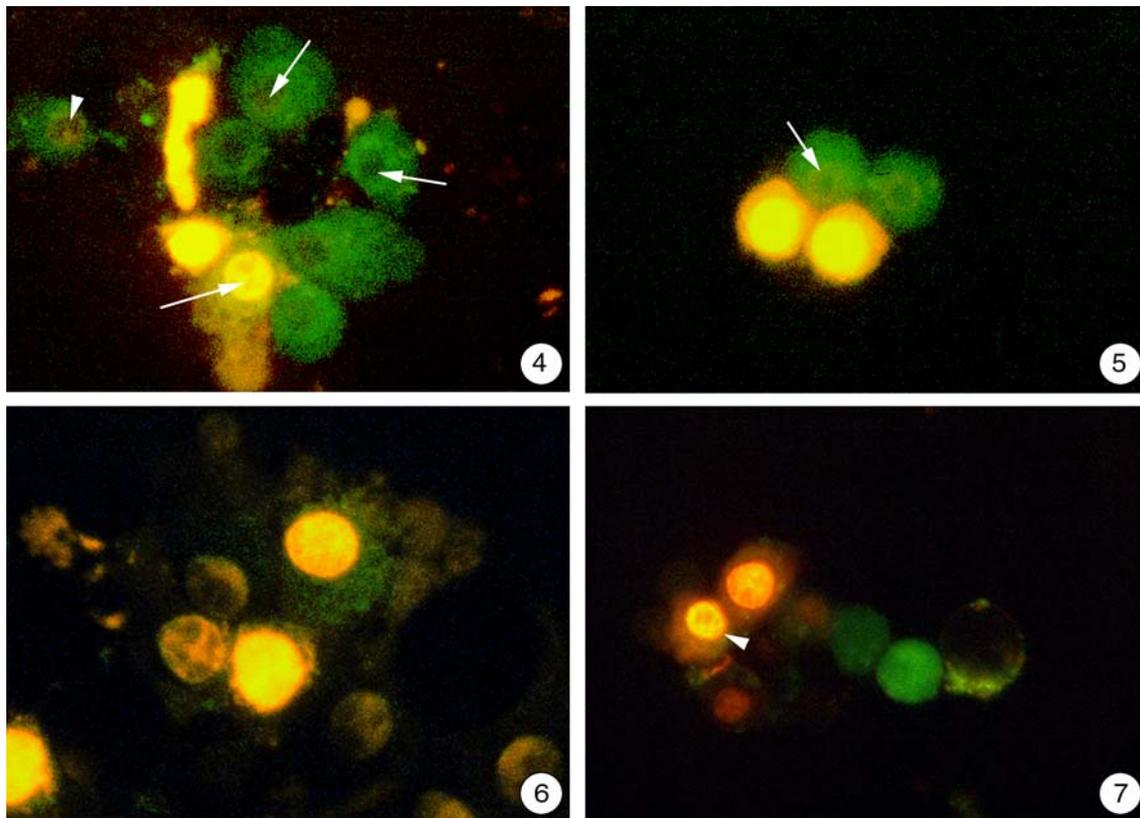


Abbildung 3.2.3-4 bis 7: Zur Verdeutlichung des Grades der Schädigung der Zellen nach drei Tagen Inkubation mit 1 mM Clofibrat, wurden verschiedene belastete Proben auch mit Propidiumiodid gegengefärbt, um eine klarere Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen zu ermöglichen.

4: Zellen mit intakter Zellmembran und aktiver Caspase 3 erscheinen in deutlicher grüner Fluoreszenz, die im Bereich des Kerns (Pfeile) nicht gefunden werden kann. Als Übergangsformen treten grün leuchtende Zellen auf, deren Kern bereits leichte Tendenzen zu gelblicher bis oranger Fluoreszenz zeigt (Pfeilkopf). Tote Zellen erscheinen mit Kernen intensiver gelboranger Farbe.

5: Zum Zeitpunkt der Zerstörung der Zellmembran wird von Propidiumiodid zunächst eine ringförmige Struktur im Kern markiert. Dies deutet auf die aus der Ultrastruktur bekannte Verteilung des Chromatins im Kern hin.

6: Auch Hepatocyten, die bereits intensiv mit Propidiumiodid gefärbt sind, weisen durchaus noch aktive Caspase auf, was durch das grüne Leuchten deutlich wird.

7: Tote Zellen zeigen zum Teil eine ringförmige Kondensierung des Chromatins in der Peripherie des Zellkerns.

3.2.4 Caspase 3-Gehalt

Westernblots mit einem polyklonalen Antikörper gegen menschliche Caspase 3 führte in allen Versuchsansätzen zur Anfärbung einer spezifischen Bande, die auf ein Protein hinwies, dessen Molekulargewicht bei 54,9 kDa lag. Untereinheiten, die auf eine Spaltung der Procaspase hindeuten würden, konnten nicht nachgewiesen werden. Der Gehalt des nachgewiesenen Proteins blieb über den gesamten Zeitraum annähernd konstant bzw. nahm in einigen Proben leicht zu. Diese Zunahme war allerdings auch in Kontrollzellen zu erkennen, im Vergleich zu den anderen Versuchsansätzen sogar am deutlichsten.

In Hepatocyten, die als Kontrollen dienten, war über den Versuchszeitraum von 72 Stunden eine stete Zunahme dieses Proteins nachweisbar (Abb. 3.2.4-1). Das Bestimmtheitsmaß des abgeleiteten Trends belegt diese Beobachtung mit einem Wert von 81% Wahrscheinlichkeit.

Nach Belastung der Zellen mit 0,5 % DMSO war ein so deutliches Ergebnis nicht zu erkennen. Der Gehalt des nachgewiesenen Proteins schien über den gesamten Zeitraum mehr oder weniger gleich zu bleiben. Das Bestimmtheitsmaß des Trends zeigt mit 8% Wahrscheinlichkeit keinen sicheren Verlauf der Entwicklung des Proteingehalts in den untersuchten Proben (Abb. 3.2.4-2).

0,5 mM Clofibrat bewirkte bei Hepatocyten eine Zunahme des Gehalts des untersuchten Proteins wie bei den Kontrollen. Allerdings war der Anstieg nicht so deutlich ausgeprägt. Das Bestimmtheitsmaß von knapp 96% zeigt aber eine hohe Wahrscheinlichkeit der Zunahme (Abb. 3.2.4-3).

Der Trend der Zunahme des Gehalts des nachgewiesenen Proteins bestätigte sich auch in Leberzellen, die mit 1 mM Clofibrat belastet wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von rund 75%. Die Zunahme war deutlicher als in Zellen, die mit 0,5 mM Clofibrat belastet wurde, blieb jedoch hinter der Zunahme in den Kontrollen zurück (Abb. 3.2.4-4).

3.2.5 p53 Gehalt

Westernblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen menschliches p53 führten zur Markierung einer einzelnen Bande. Das Signal entsprach einem Protein mit einem Molekulargewicht von rund 53 kDa. Kontrollhepatocyten wiesen nach drei Tagen eine schwache, aber deutliche Bande in Westernblots auf. Eine Belastung mit 0,5 mM Clofibrat über einen Zeitraum von 3 Tagen führte zu einer deutlichen Zunahme der Farbeintensität der Bande im Blot. Rechnerisch vervierfachte sich der Gehalt des Proteins im Vergleich zur Kontrolle. Das Bild wurde noch deutlicher bei einer Belastung der Leberzellen mit 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von 3 Tagen. Hier war der Gehalt von p53 um das knapp 5fache gegenüber den Kontrollen erhöht. Eine Belastung der Hepatocyten mit 2 mM Clofibrat führte dagegen zu einem Einbruch des

cyten mit 2 mM Clofibrat führte dagegen zu einem Einbruch des p53 Gehalts zurück auf das Kontrollniveau (Abb. 3.2.5-1).

3.2.6 Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien durch Zellhomogenat von clofibratbelasteten Hepatocyten

Westernblots mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Cytochrom c der Maus führten zu einer Anfärbung von zwei Proteinbanden auf den Membranen. Diese Doppelbanden traten bei allen untersuchten Proben auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei tatsächlich um zwei verschiedene Antigene für den Antikörper handelte. Im Gegensatz zur Säugerform ist einmal mehr das nachgewiesene Molekulargewicht der beiden nachgewiesenen Proteine von den bekannten Formen abweichend. Dies ist insofern verwunderlich, da das Cytochrom c zu den konservativsten bekannten Proteinen zählt (Tab. 3.2.6-1). Abgesehen von diesem Unterschied ist aber die Relation des Cytochrom c-Gehalts vom Zellhomogenat belasteter Hepatocyten zu Mitochondrienfraktionen aus unbelasteten Forellen und dem Zellhomogenat unbelasteter Hepatocyten zu Mitochondrienfraktionen deutlich in Richtung Homogenat verschoben (Abb. 3.2.6-1).

Tabelle 3.2.6-1: Cytochrom c in verschiedenen Fischarten und Vergleich der Sequenzähnlichkeiten in Bezug zum Cytochrom c aus der Maus

	Aminosäuren Identisch (%)	Positiv (%)
<i>Cyprinus carpio</i>	103	80
<i>Katsuwonus pelamis</i>	103	83
<i>Thunnus thynnus</i>	103	83
<i>Squalus acanthias</i>	104	82
<i>Lampetra tridentata</i>	104	81

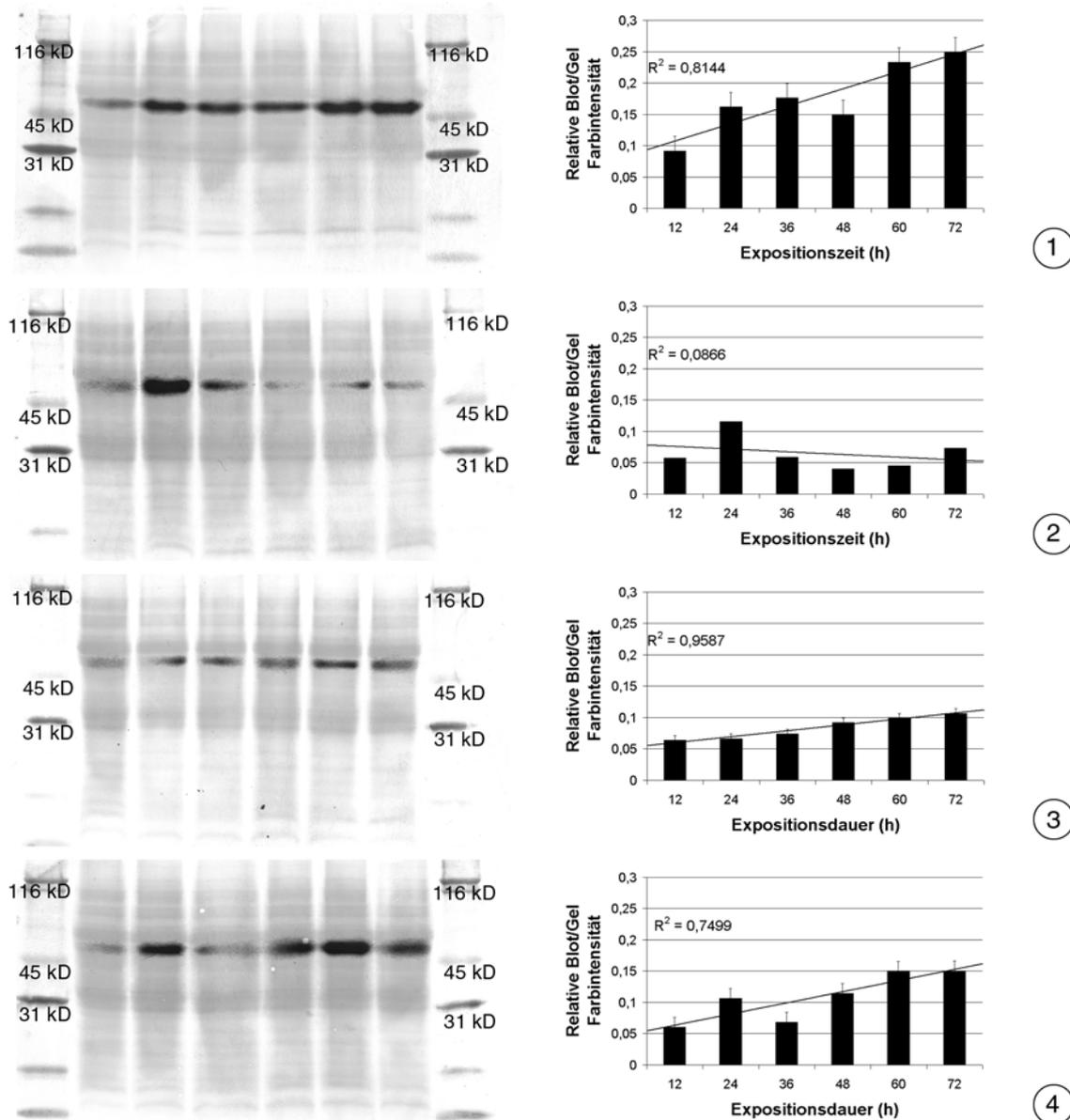


Abbildung 3.2.4-1 bis 3: Polyklonale Antikörper gegen die Caspase 3 des Menschen führen in isolierten Hepatocyten nach dreitägiger Belastung mit Clofibrat aus der Regenbogenforelle zur Anfärbung einer spezifischen Bande auf Westernblots.

1: Über einen Zeitraum von 72 Stunden nimmt der Gehalt des Proteins, das durch den polyklonalen Antikörper gegen humane Caspase 3 angefärbt wird, in den Kontrollen stetig zu. Das Molekulargewicht liegt bei rund 55kD. Untereinheiten, die durch die Aktivierung der Procaspase 3 entstehen, sind nicht zu finden.

2: Die bei unbehandelten Hepatocyten beobachtete Zunahme des 55kD Proteins tritt bei den Leberzellen, die mit 0,5% DMSO behandelt wurden, nicht auf. Untereinheiten durch eine Spaltung der Procaspase 3 treten auch hier nicht auf.

3: Eine Behandlung der Hepatocyten mit 0,5 mM Clofibrat bewirkt eine Zunahme des Proteins, das mit dem benutzten Antikörper detektiert wird. Die Zunahme wie auch die Intensität des Proteins ist aber nicht so stark ausgeprägt wie in den Kontrollen. Untereinheiten, die durch die Spaltung der Proform entstehen, können auch hier nicht gefunden werden.

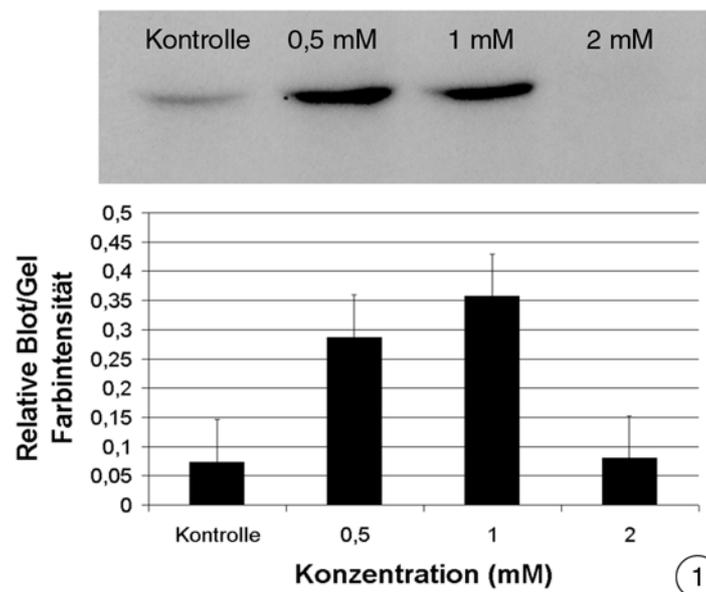


Abbildung 3.2.5-1: Westernblot mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes p53 erzeugt auf den Blots die Markierung eines Moleküls in einem Gewichtsbereich von 53 kD. Der Gehalt dieses Proteins nimmt in Hepatocyten, die mit 0,5 und 1 mM Clofibrat über einen Zeitraum von 3 Tagen belastet wurden, stetig zu. 2 mM Clofibrat tötet die Zellen nach 3 Tagen komplett ab, so dass die Signalstärke nur noch gering ist.

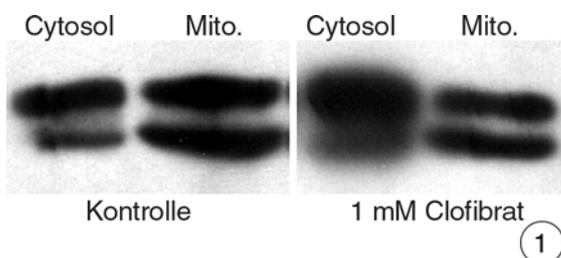


Abbildung 3.2.6-1: Westernblots mit monoklonalen Antikörpern gegen Cytochrom c aus der Maus führen im Westernblot zur Markierung eine Doppelbande. Die Belastung der isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und anschließender Trennung der Mitochondrienfraktion vom Cytosol zeigt eine leichte Verschiebung des Cytochrom c-Anteils aus den Mitochondrien in Richtung Cytosol. Dies ist ein Indiz für die Induktion der Apoptose nach Belastung mit Clofibrat, auch wenn die Freisetzung nicht komplett ist, d.h. noch immer ist ein großer Teil des Cytochrom c in den Mitochondrien zu finden. Das Vorhandensein von Cytochrom c im Cytosol der Kontrollen kann auf eine nicht vollkommen erfolgreiche Abtrennung der Mitochondrien vom Cytosol betrachtet werden.

← Fortsetzung Abbildung 3.2.4-4

4: Mit 1 mM Clofibrat behandelte Zellen zeigen einen steileren Anstieg des Gehalts des nachgewiesenen Proteins als bei 0,5 mM, doch auch hier bleibt der Anstieg hinter dem der Kontrollen zurück. Auch hier können keinerlei Markierungen in kleineren Molekulargewichtsbereichen gefunden werden.

3.2.7 Morphometrische Untersuchungen an Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat

Bei der morphometrischen Untersuchung von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle, die mit 0,5 mM und 1 mM Clofibrat belastet wurden, wurde darauf verzichtet, apoptotische Zellen mit in die Auswertung einzubeziehen. Von größerem Interesse waren eventuell auftretende Veränderungen in der Zellzusammensetzung, bevor es zur Ausprägung der erwähnten apoptotischen Merkmale kam.

Bei allen Gruppen (Kontrolle, 0,5 mM und 1 mM) war der prozentuale Anteil des Kerns an der Gesamtfläche am größten. An zweiter Stelle folgte das Endomembransystem (Zusammenfassung von glattem und rauem endoplasmatischem Retikulum sowie den vermessenen Golgifeldern). An dritter Stelle lagen die Mitochondrien. Die anderen Organellen waren nur schwach ausgebildet.

Größere Unterschiede in der Zellzusammensetzung in den einzelnen Gruppen waren nur selten zu finden. Die statistische Analyse wies allerdings Unterschiede im prozentualen Anteil der Mitochondrien der mit 0,5 mM Clofibrat belasteten Zellen zu der mit 1 mM Clofibrat belasteten Gruppe auf. Ferner unterschied sich der Anteil des glatten endoplasmatischen Retikulums zwischen Kontrolle und 0,5 mM Clofibrat signifikant voneinander. Weitere signifikante Veränderungen traten zwar nicht auf, aber es ist darüber hinaus möglich, verschiedene Tendenzen zu erkennen. Der Anteil des rauhen endoplasmatischen Retikulums nahm mit steigender Clofibratkonzentration zu. Schwächer ausgeprägt war die Tendenz der konzentrationsabhängigen Zunahme der Lysosomen. Genau wie bei der elektronenmikroskopischen Auswertung zeigte sich auch in der Morphometrie die Zunahme von Lipid in den Hepatocyten, die mit 1 mM Clofibrat belastet wurden (Abb. 3.2.7-1; 2; 3; 4).

Tabelle 3.2.7-1: Morphometrische Analyse von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat (Werte in Prozent gegenüber einer Gesamtfläche von 10 μm^2)

	Kontrolle	0,5 mM	1 mM
Kerne	12,02 \pm 5,18	11,74 \pm 7,18	12,18 \pm 6,34
Raues endoplasmatisches Retikulum	5,52 \pm 3,58	7,77 \pm 4,31	8,74 \pm 4,44
Glatte endoplasmatisches Retikulum	8,64 \pm 3,24	4,57 \pm 1,49 *	6,88 \pm 3,23
Golgi-Apparat	0,44 \pm 0,27	0,26 \pm 0,24	0,39 \pm 0,23
Mitochondrien	6,69 \pm 1,19	7,10 \pm 0,97	5,59 \pm 1,27 **
Peroxisomen	1,42 \pm 0,43	1,87 \pm 0,72	1,49 \pm 0,45
Lysosomen	1,87 \pm 1,02	1,89 \pm 0,88	2,85 \pm 1,60
Lipid	0,02 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,61 \pm 0,94

* = P<0,05 gegenüber Kontrolle

** = P<0,05 gegenüber 0,5 mM Clofibrat

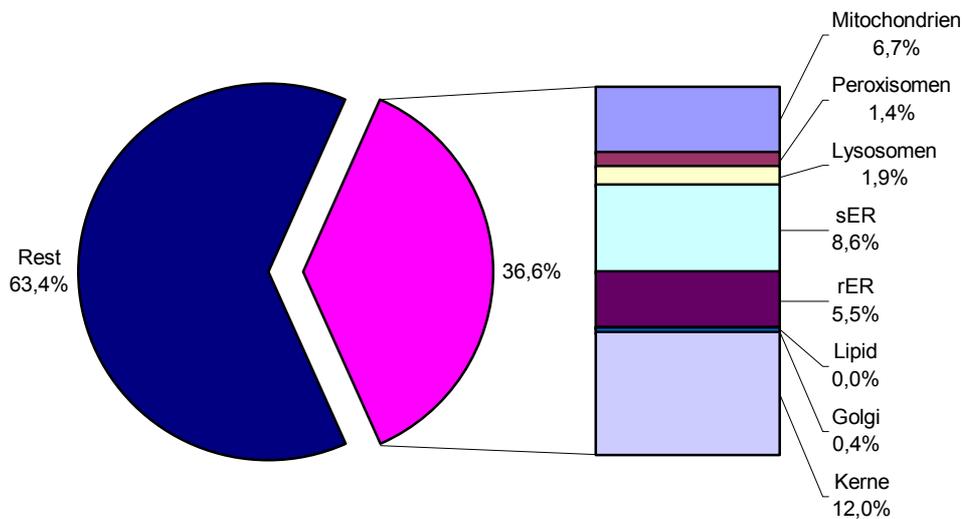


Abbildung 3.2.7-1: Prozentualer Anteil der vermessenen Organellen an einer Gesamtfläche von $10 \mu\text{m}^2$ in Kontrollhepatocyten nach 4 Tagen in Kultur. Es fällt auf, dass das glatte endoplasmatische Retikulum (sER) stärker ausgebildet ist als das raue endoplasmatische Retikulum (rER). Nach Kernen und sER entfällt der nächstgrößere Posten auf die Mitochondrien. Auf das gesamte Endomembransystem entfallen 14,5 %.

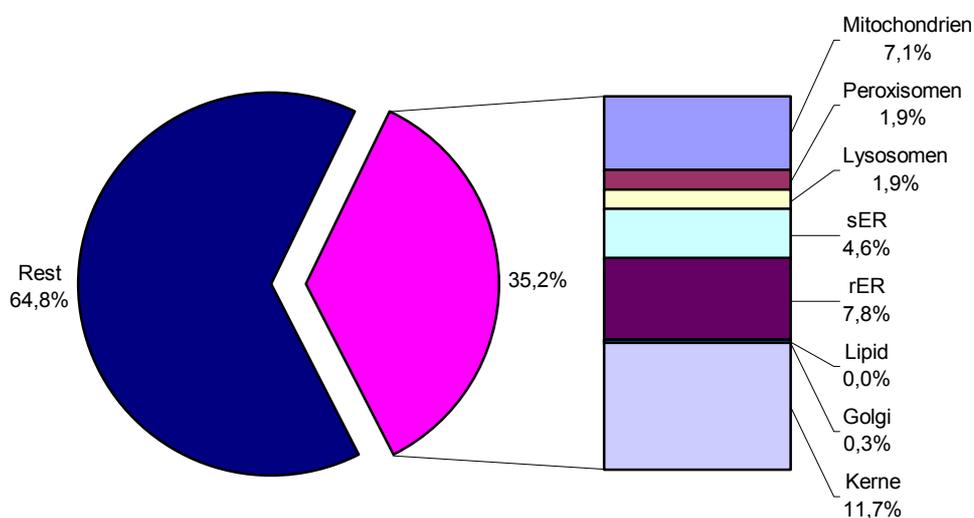


Abbildung 3.2.7-2: Prozentualer Anteil der vermessenen Organellen an einer Gesamtfläche von $10 \mu\text{m}^2$ in Hepatocyten nach 3-tägiger Belastung mit 0,5 mM Clofibrat. Gegenüber den Kontrollen ist der Anteil von glattem endoplasmatischem Retikulum verringert, während der Anteil des rER leicht angestiegen ist. Zusammen erreicht das Endomembransystem einen Anteil von 12,7 % und ist damit schwächer ausgeprägt als in den Kontrollen.

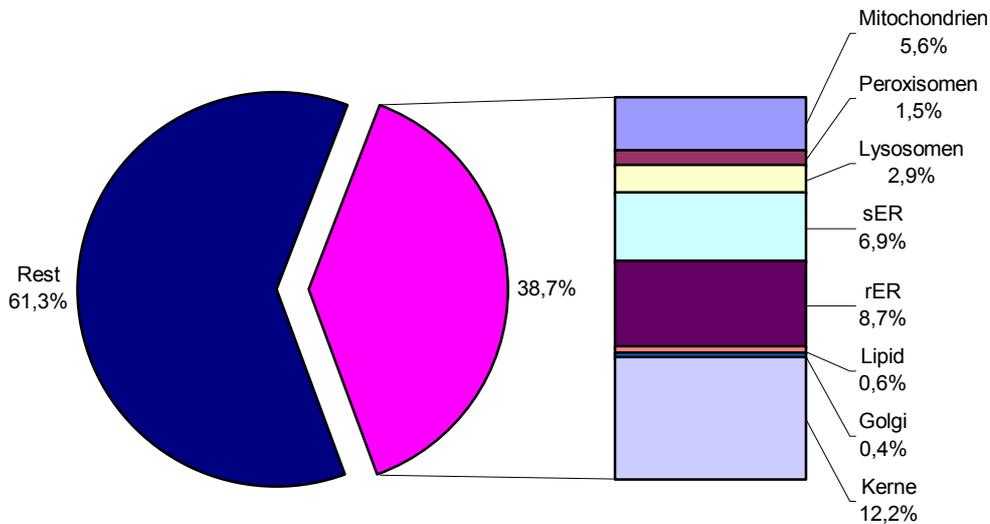


Abbildung 3.2.7-3: Anteil der Organellen an einer Gesamtfläche von $10 \mu\text{m}^2$ in Hepatocyten nach 3 Tagen Belastung mit 1 mM Clofibrat. Das sER ist stärker ausgeprägt als bei 0,5 mM Clofibrat, erreicht aber nicht den Umfang wie bei den Kontrollen. Das rER ist stärker ausgebildet als in den geringer belasteten Zellen. Das Endomembransystem erreicht 16 % der Gesamtfläche und ist im Vergleich zu den anderen Gruppen am stärksten ausgebildet. Die Mitochondrien gehen um 1,1 % zurück. Deutlich nehmen die Anteile von Lysosomen und Lipid zu.

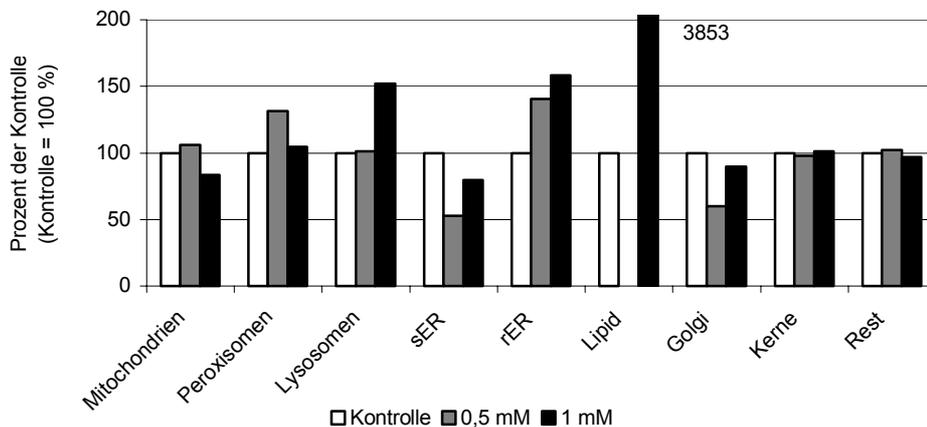


Abbildung 3.2.7-4: Prozentualer Anteil der vermessenen Organellen in Bezug auf die Kontrolle (100%). 0,5 mM Clofibrat führt zu einer nicht signifikanten Zunahme der Peroxisomen und des rER, während das sER und der Golgi-Apparat abnimmt. Lipid ist nicht vorhanden. 1 mM Clofibrat resultiert in einer 50%-igen Zunahme der Lysosomen und des RER.

3.2.8 DNA-Abbau

Die Isolation von DNA mittels des Qiagen DNeasy Tissue Kit resultierte bei den Kontrollen in zwei verschieden stark ausgeprägten Banden im Gel. Zum einen war eine kleine Menge an hochmolekularer DNA direkt an den Taschen des Gels zu finden. Der weitaus größere Teil fand sich jedoch im Größenbereich von 8 kbp. Wahrscheinlich traten während der Isolationsprozedur Scherkräfte auf, die zum Bruch der hochmolekularen DNA-Stränge führten. Bereits nach 1-tägiger Belastung mit Clofibrat war das Muster der DNA-Verteilung bei Hepatocyten, die mit 1 und 2 mM Clofibrat belastet wurden, etwas in Richtung leichterer DNA-Bruchstücke verschoben. Der Hauptanteil der gefärbten DNA war von niedrigerem Molekulargewicht als bei den Kontrollen oder den Hepatocyten, die mit 0,5 mM Clofibrat belastet wurden. Die Menge hochmolekularer DNA war ebenfalls leicht verringert. 3 Tage Belastung führten zu einem noch deutlicheren Bild. Die angefärbte DNA im Gel war bei den beiden hohen Konzentrationen über einen weiteren Bereich verteilt als bei mit 0,5 mM Clofibrat belasteten Zellen und den Kontrollen. Die Menge der höher molekularen DNA war weiter verringert. 8 Tage Belastung mit 1 und 2 mM Clofibrat führten zum kompletten Verlust der hochmolekularen DNA. Im Vergleich zu den Kontrollen war die Bande bei 8 kbp nur noch sehr schwach ausgeprägt. Statt dessen war die gesamte DNA über das Gel „verschmiert“. Eine gut ausgeprägte Leiterstruktur, wie sie von apoptotischen Zellen beschrieben wird, trat allerdings niemals auf (Abb.: 3.2.8-1).

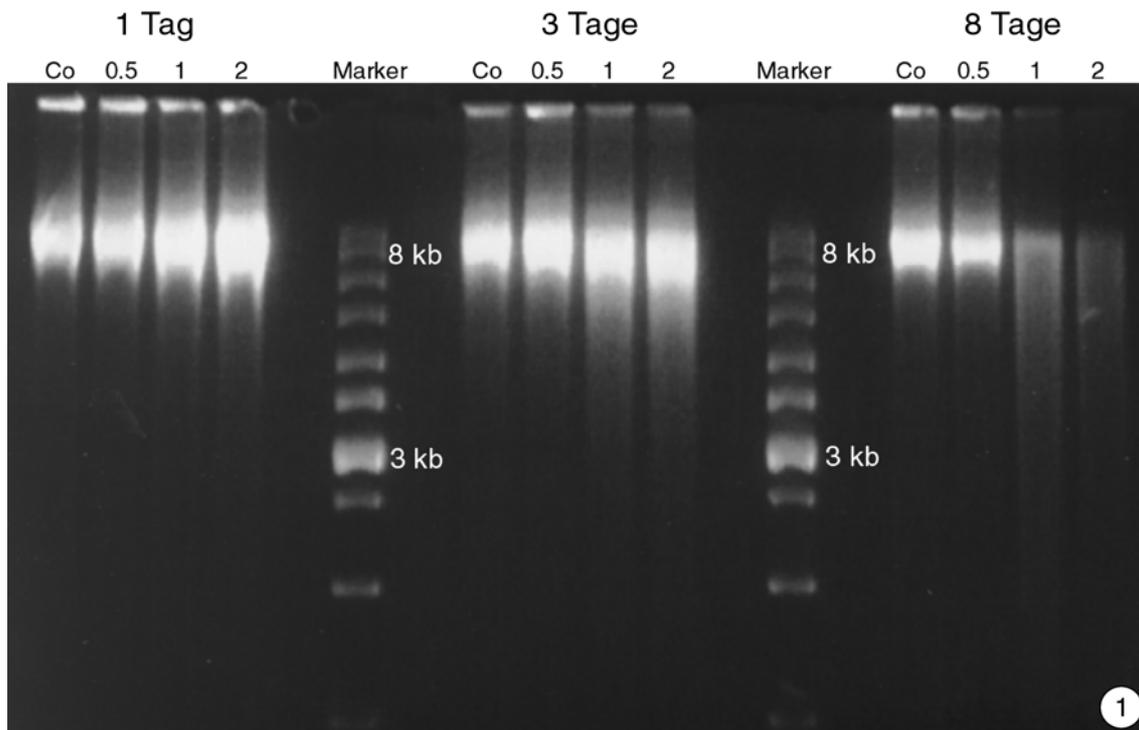


Abbildung 3.2.8-1: DNA-Gehalt und Molekulargewicht in Proben von Hepatocyten, die über verschiedene Zeiträume und mit verschiedenen Clofibrat-Konzentrationen behandelt wurden. 1 Tag nach Beginn der Behandlung können in allen Proben 2 Banden erkannt werden. Zum einen befindet sich DNA direkt unterhalb der Taschen, was auf sehr große DNA-Moleküle hinweist. Zum anderen ist weitaus mehr DNA im Molekulargewichtsbereich von 8 kB zu finden. Nach 3 Tagen Behandlung bleibt dieses Muster in allen Proben weitgehend erhalten. Allerdings ist bei den mit 1 und 2 mM Clofibrat behandelten Hepatocyten eine erhöhte Tendenz zu kleineren Bruchstücken erkennbar. Der Anteil von sehr schweren DNA Molekülen ist reduziert. 8 Tage nach Behandlungsbeginn können sowohl bei Leberzellen, die mit 1 oder 2 mM Clofibrat belastet worden waren, keine schweren DNA Moleküle mehr gefunden werden. Ebenso ist die Bande bei 8 kB stark verkleinert und es können nur noch verschmierte Banden kleiner DNA Bruchstücke auf den Gelen nachgewiesen werden.

3.2.9 Belastung von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat zusammen mit einem membranpermeablen Caspase 3-Inhibitor

3.2.9.1 Ultrastrukturelle Untersuchungen

Auf eine Darstellung der Ergebnisse von Hepatocyten, die 1 bzw. 2 Tage mit dem Inhibitor inkubiert wurden, wird hier verzichtet, da die Ultrastruktur weitestgehend mit den Ergebnissen nach 3 Tagen Inkubation übereinstimmen.

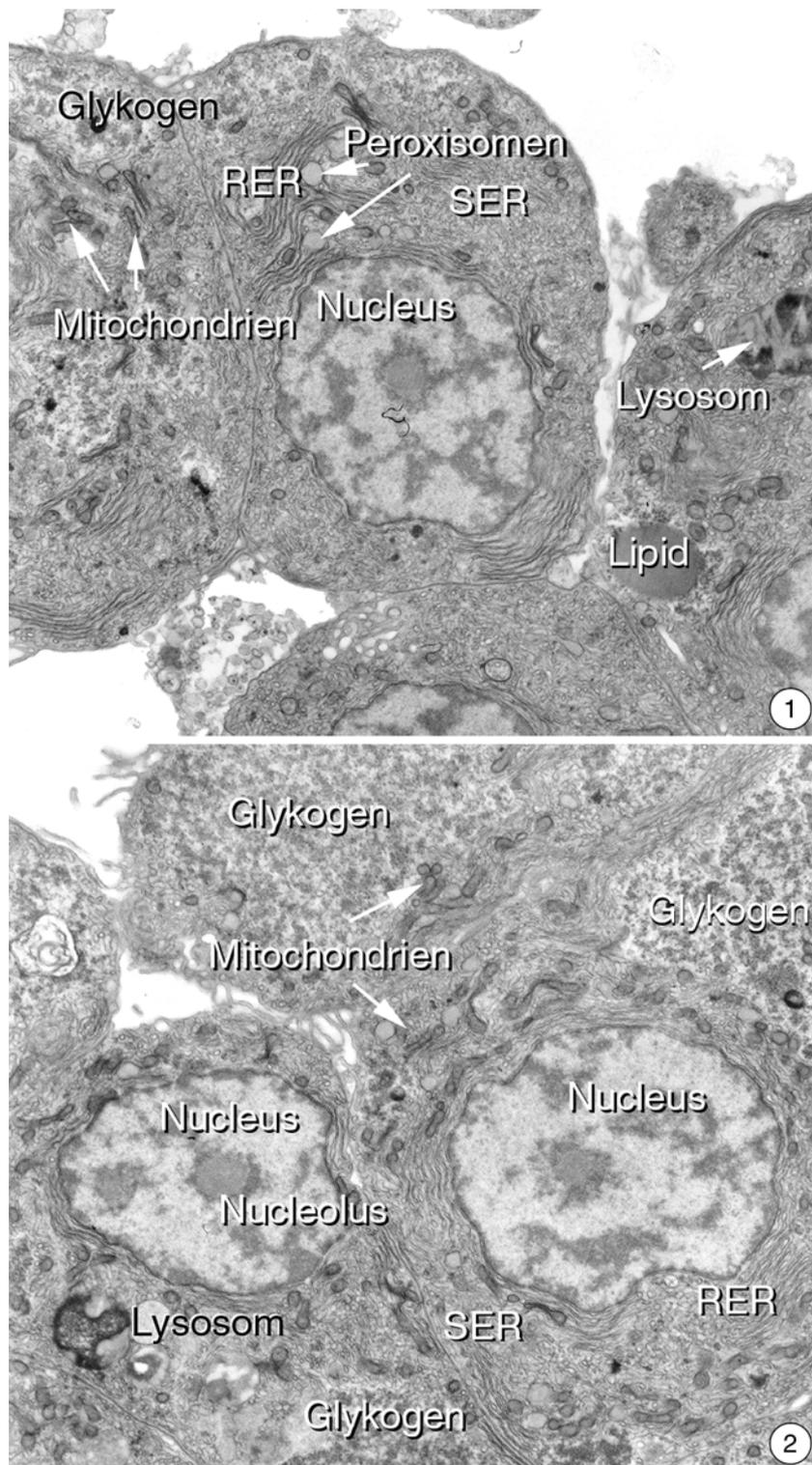
3 Tage Inkubation mit 10 μ M Caspase 3-Inhibitor: Hepatocyten, die über 3 Tage mit 10 μ M Inhibitor inkubiert wurden, wiesen im elektronenmikroskopischen Bild einen relativ großen Kern auf, der leicht gelappt erschien (Abb. 3.2.9-1; 2). Einige Heterochromatinschollen waren über den Zellkern verteilt und der Nucleolus war deutlich ausgebildet. Den Kern umgaben Stapel aus rauem endoplasmatischem Retikulum (RER). Zwischen den Stapeln des RER fanden sich Felder aus glattem endoplasmatischem Retikulum (SER). In diese RER-Stapel eingebettet fanden sich länglich-ovale Mitochondrien. Eine weitere Anhäufung dieser Organellen konnte außerhalb der RER-Manschette gefunden werden (Abb. 3.2.9-1; 2). Peroxisomen waren als hellgraue rundliche Strukturen zwischen den Mitochondrien eingestreut erkennbar (Abb. 3.2.9-1). Einige sekundäre Lysosomen waren in den Zellen verteilt (Abb. 3.2.9-1; 2). Als Energiespeicherstoffe traten ausgedehnte Glykogenfelder in der Zellperipherie auf (Abb. 3.2.9-1; 2), Lipidtropfen waren nur sehr schwach ausgebildet.

1 Tag Inkubation mit 1 mM Clofibrat + 10 μ M Caspase 3-Inhibitor: Die Kombination aus 1 mM Clofibrat und 10 μ M Caspase-3 Inhibitor führte in den Hepatocyten nach einem Tag Exposition zu deutlichen Veränderungen gegenüber den Kontrollzellen, die nur mit dem Inhibitor belastet wurden. Die Kerne vieler Hepatocyten entsprachen in Form und Heterochromatingehalt den Kontrollen (Abb. 3.2.9-3; 4), einige Zellen wiesen allerdings deutlich vermehrt Heterochromatin auf. Bei solchen Hepatocyten war auch die Kernform stark gelappt (Abb. 3.2.9-5; 6). Das Endomembransystem war im überwiegenden Anteil der Leberzellen in seiner typischen Ausprägung als raues und glattes endoplasmatisches Retikulum sowie Golgi-Zisternen nicht erkennbar. Es war unabhängig von der Kernbeschaffenheit in einzelnen Zisternen organisiert, die durch das Cytoplasma zogen (Abb. 3.2.9-3; 4; 5; 6) und teilweise annullierte Lamellen ausbildeten (Abb. 3.2.9-6). In dieses System mit einbezogen war auch die Kernhülle, von deren äußerer Membran Ausläufer in das Cytoplasma zogen und ebenfalls den annullierten Lamellen zustrebten (Abb. 3.2.9-3 bis 6). Die Mitochondrien schienen in ihrer Anzahl reduziert und die vorhandenen waren zu einem großen Teil geschwollen, und die Cristastruktur war stark verändert (Abb. 3.2.9-5 Einsatz). Die Anzahl der Peroxisomen erschien gegenüber den mit dem Inhibitor exponierten Zellen erhöht. Lysosomale Elemente waren als sekundäre Formen sichtbar, jedoch schien ihre Menge nicht höher zu

sein als in den Kontrollen (Abb. 3.2.9-3; 6). Große Glykogenfelder waren in der Peripherie der Leberzellen zu erkennen (Abb. 3.2.9-4). Dunkel gefärbte Lipidtropfen konnten in vermehrtem Maß gefunden werden (Abb. 3.2.9-3; 4).

2 Tage Inkubation mit 1 mM Clofibrat + 10 μ M Caspase 3 Inhibitor: 2 Tage nach Beginn der Belastung war in den meisten Zellen eine deutliche Kondensierung des Heterochromatins in der Kernperipherie zu finden (Abb. 3.2.9-7 bis 10). Das Endomembransystem erfuhr verstärkt eine komplette Umgestaltung in einzelne Zisternen, die im Cytoplasma zu finden waren (Abb. 3.2.9-8) oder wurde komplett aufgelöst. Es fanden sich nur noch Strukturen, die annullierte Lamellen darstellten (Abb. 3.2.9-7). Als dritte Form der Membransystemveränderung konnte eine komplette Auflösung aller Membranstrukturen innerhalb der Zellen, von der nur die Kernmembran nicht betroffen erschien, beobachtet werden. Dafür war diese aber stark dilatiert (Abb. 3.2.9-9; 10). Die Hepatocyten waren teilweise extrem arm an Organellen, manche Leberzellen erschienen fast „leer“ (Abb. 3.2.9-10). Sehr häufig traten dunkel gefärbte Lipidtropfen in den Zellen auf, die manchmal die Größe des Kerns übertrafen (Abb. 3.2.9-8). Als Energiespeicher traten ab und zu auch Glykogenfelder auf, die gegenüber den Kontrollen verkleinert erschienen (Abb. 3.2.9-12). Es wurden allerdings auch noch Hepatocyten gefunden, die als eine Art Übergangsstadium zwischen stark geschädigten und ungeschädigten Zellen aufgefasst werden konnten. Hier war der Kern relativ arm an Heterochromatin, das Endomembransystem war jedoch komplett in einzelne, den Zellleib durchziehende, Zisternen aufgelöst. Die Anzahl der Organellen war hoch, und auch aktive Golgi-Felder konnten in diesen Zellen gefunden werden (Abb. 3.2.9-11). Nur selten waren noch Zellen zu finden, die in ihrer Ultrastruktur den Kontrollen entsprachen (Abb. 3.2.9-12).

3 Tage Inkubation mit 1 mM Clofibrat + 10 μ M Caspase 3-Inhibitor: Im Unterschied zu den kürzer exponierten Zellen war die Anzahl der organellenarmen elektronenlichten Hepatocyten weiter erhöht. Die Kerne waren zum Teil stark kondensiert (Abb. 3.2.9-13). Einzelne Zellkerne waren relativ arm an Heterochromatin (Abb. 3.2.9-15). Dies war jedoch der einzige Unterschied zu Zellen mit viel Heterochromatin. Allen Zellen gemeinsam war das stark veränderte Endomembransystem, das entweder einzelne Zisternen im Cytoplasma aufwies (Abb. 3.2.9-13; 15) oder gar nicht mehr vorhanden war. In allen untersuchten Zellen fielen ferner Bereiche auf, die komplett frei von Organellen waren. Diese fanden sich nur noch als einzelne geschwollene Mitochondrien mit gestörter Cristastruktur. Auch hier konnten wieder viele größere dunkel gefärbte Lipidtropfen beobachtet werden (Abb. 3.2.9-13; 14).



Abbildungsbeschriftungen siehe nächste Seite →

← **Abbildung 3.2.9-1 bis 2:** Inkubation von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 10 μM eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors über einen Zeitraum von 3 Tagen.

1: Die Zellen besitzen einen runden, leicht gelappten Kern, der nur wenig Heterochromatin enthält. Umgeben sind diese Kerne von kleinen Manschetten aus rauem endoplasmatischem Retikulum (RER). Auch das glatte endoplasmatische Retikulum (SER) ist stark entwickelt. Die Mitochondrien sind als rundliche bis ovale Gebilde zu erkennen. Die Peroxisomen sind als hellgraue runde Strukturen erkennbar. Das lysosomale Kompartiment ist schwach entwickelt, vereinzelt finden sich sekundäre Lysosomen. Glykogenfelder und Lipidtropfen dienen als Energiespeicher (6.600x).

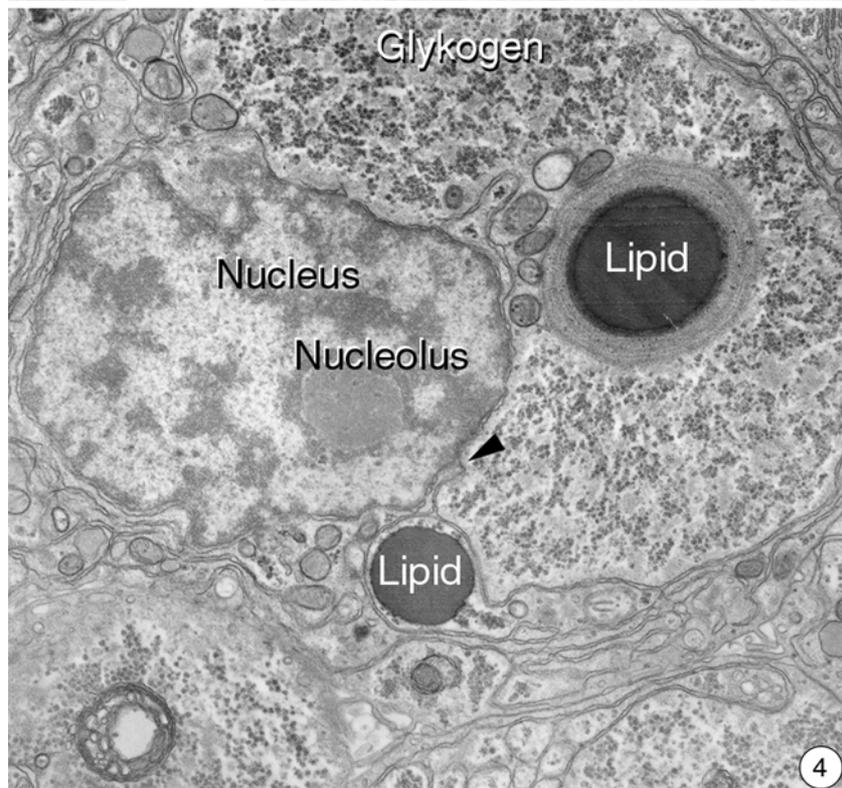
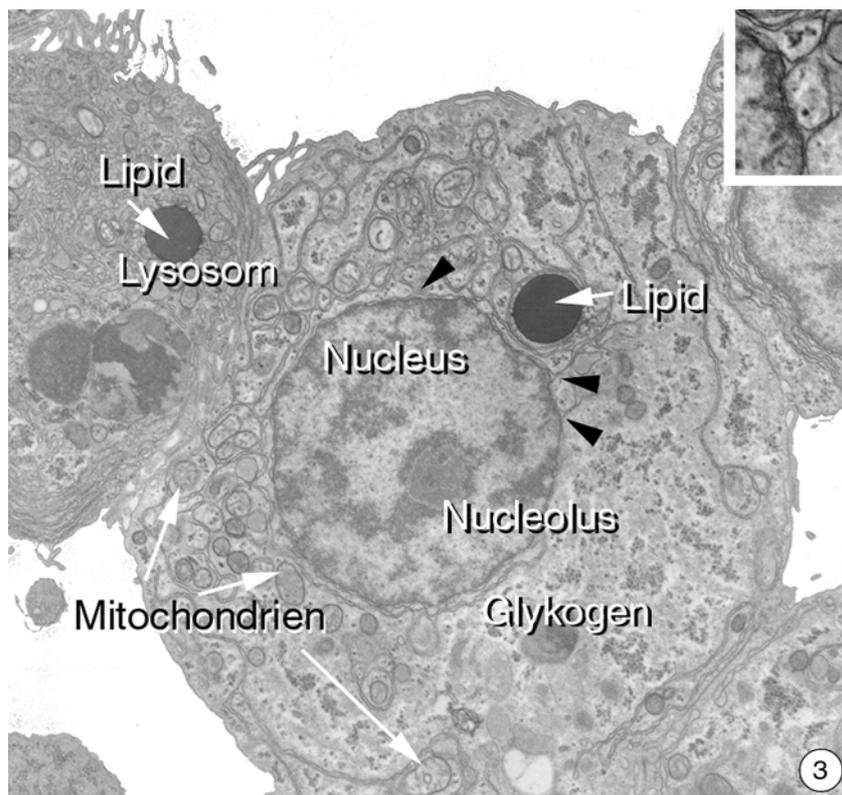
2: Die Glykogenfelder in den Hepatocyten sind teilweise beachtlich groß, was auf eine gute Versorgung der Zellen mit Nährstoffen hinweist (6.600x).

→

Abbildung 3.2.9-3 bis 4: Simultane Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und 10 μM eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors für einen 1 Tag.

3: Die Zellkerne vieler Zellen sind rund, und der Heterochromatinanteil ist gering. Die Auflösung des Endomembransystems in einzelne Zisternen tritt auch hier auf. Es können Ausläufer der äußeren Kernmembran (Pfeilspitzen, Einsatz) entdeckt werden. Glykogenfelder sind vorhanden. Die Mitochondrien erscheinen zum Teil als geschwollen (6.600x).

4: Der Anteil dunkel gefärbter Lipidtropfen mit dunklem Saum nimmt zu (10.000x).



← *Abbildungsbeschriftungen siehe vorherige Seite*

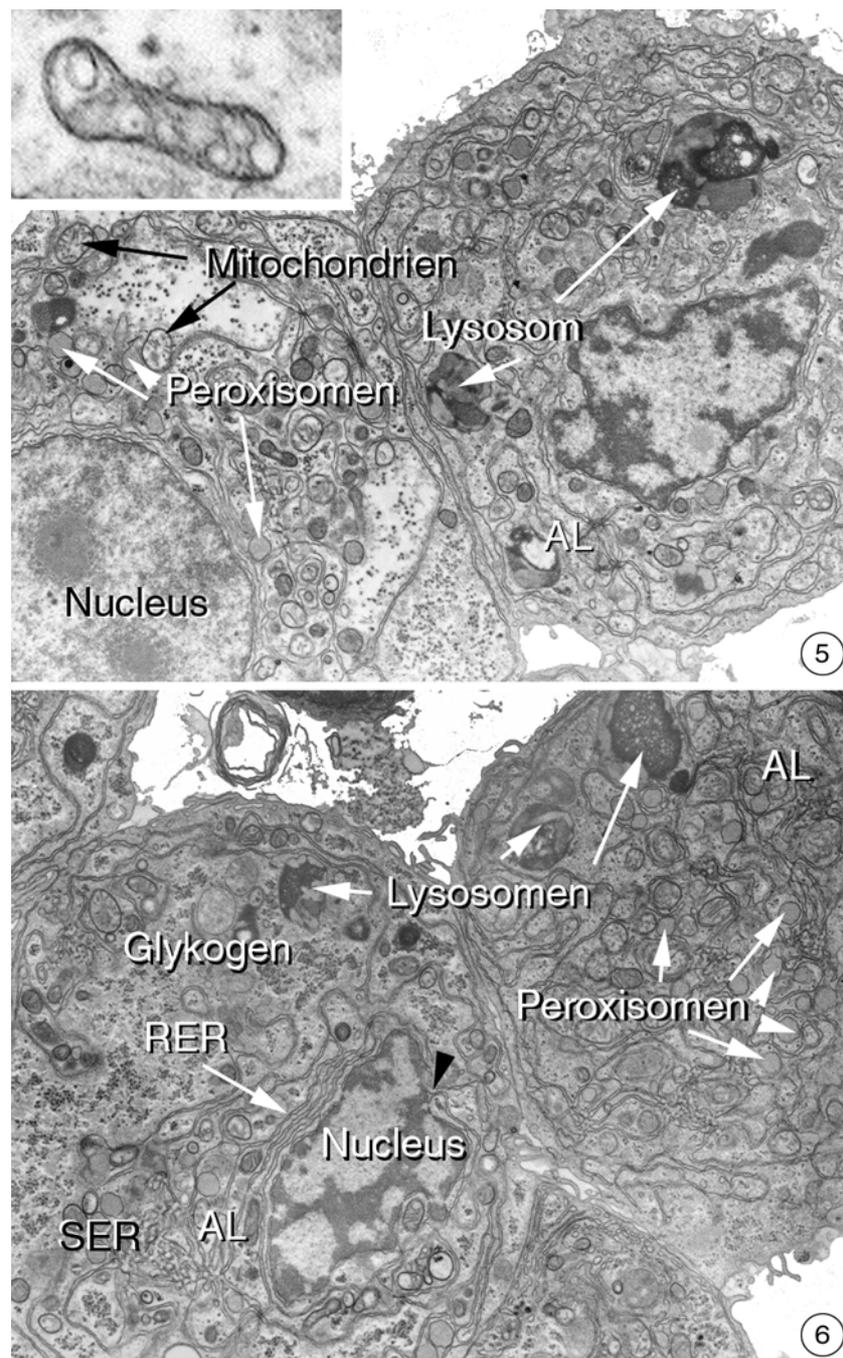
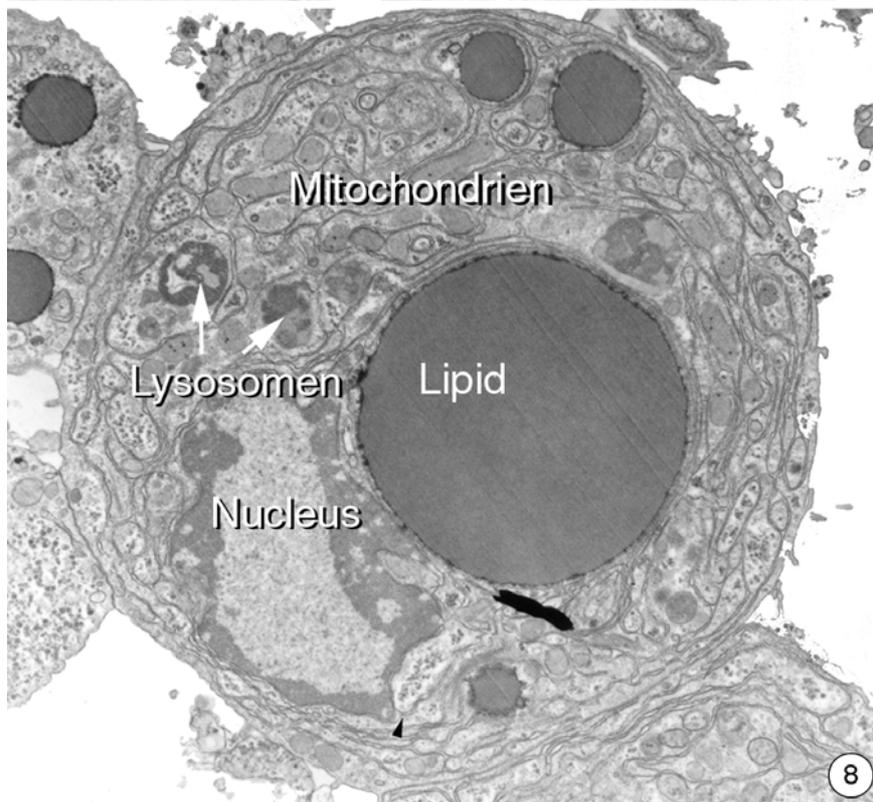
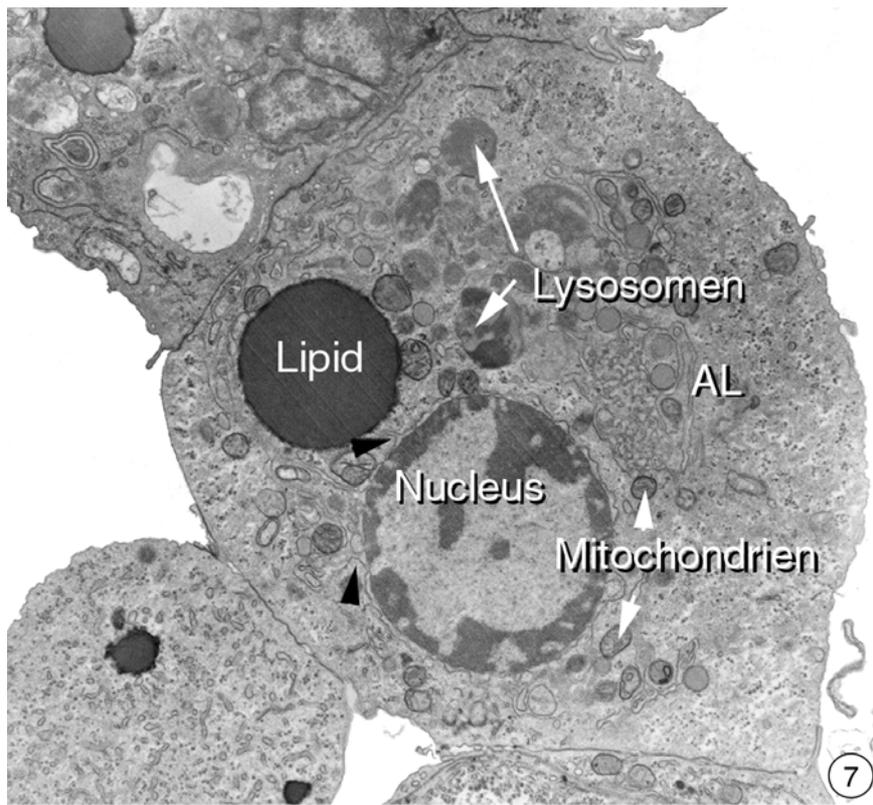


Abbildung 3.2.9-5 bis 6: Simultane Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors für einen 1 Tag.

5: Annulierte Lamellen (AL) können im Cytoplasma verteilt gefunden werden. Etliche Leberzellen besitzen Kerne, die stark gelappt sind und deren Heterochromatinanteil leicht erhöht erscheint. Die Organisation der inneren Membran ist in vielen Mitochondrien gestört (Einsatz). Lysosomen tauchen als unregelmäßige Strukturen auf (6.600x).

6: Teilweise können Hepatocyten gefunden werden, deren raues endoplasmatisches Retikulum (RER) noch nicht ganz aufgelöst ist. Genauso verhält es sich bei solchen Zellen mit dem glatten endoplasmatischen Retikulum (SER), das in der Nähe von bereits ausgebildeten annulierten Lamellen (AL) zu finden ist (6.900x).



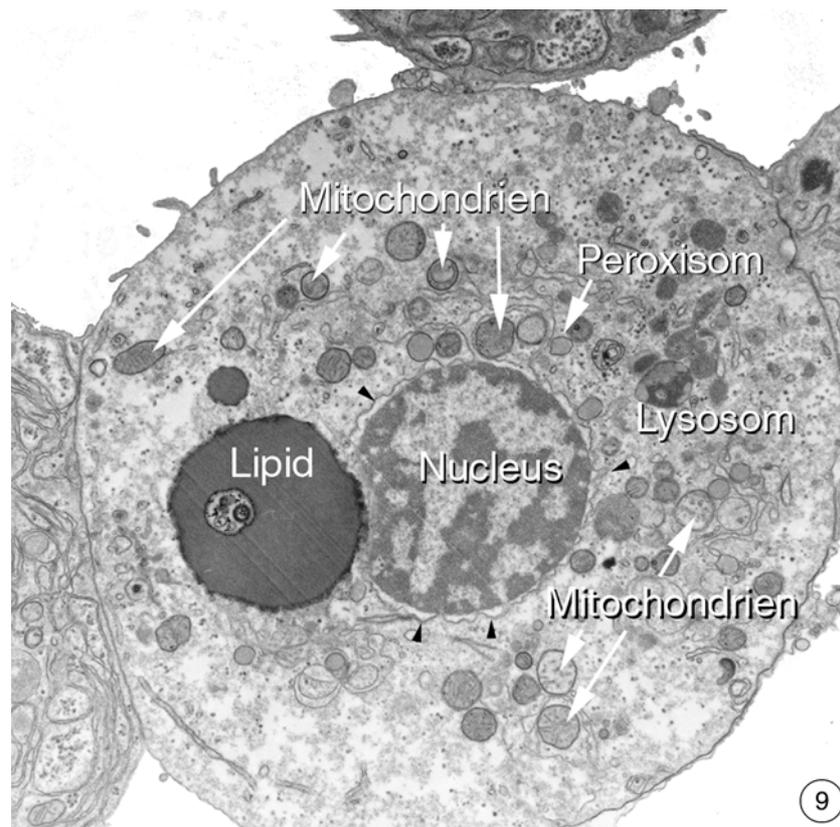
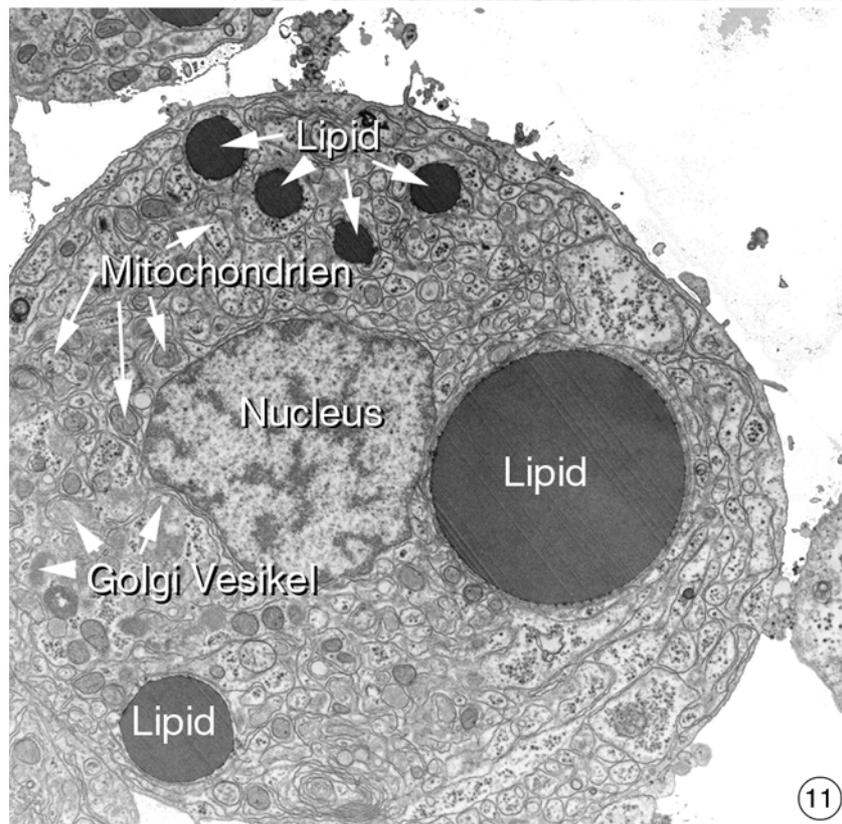
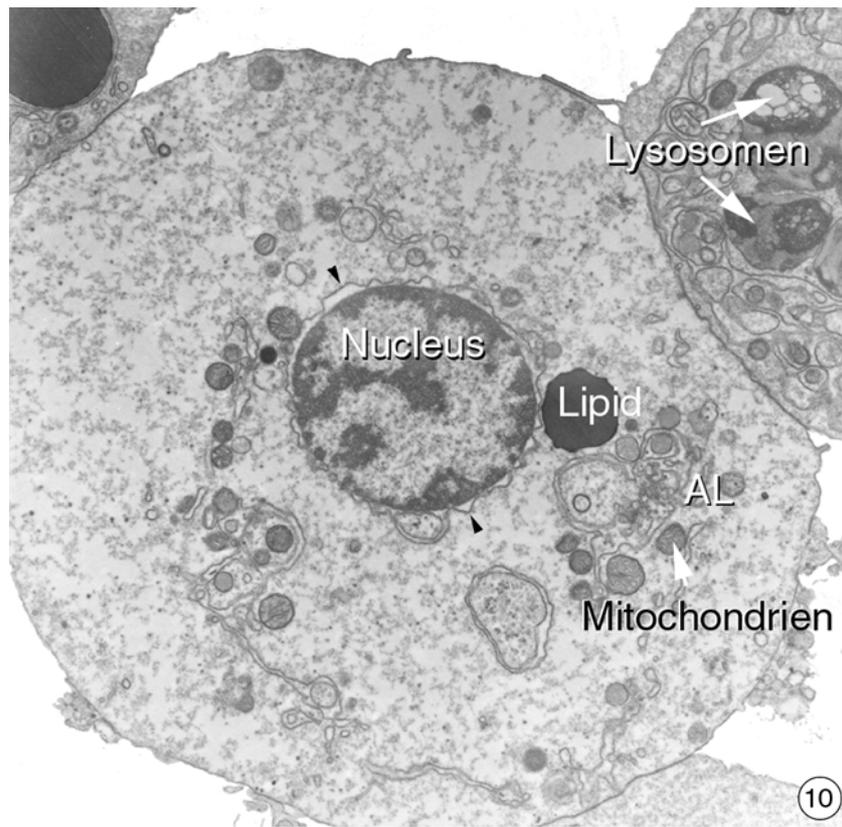


Abbildung 3.2.9-7-9: Simultane Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors über einen Zeitraum von 2 Tagen.

7: Im Kern ist das Chromatin unter der Kernhülle kondensiert. Die Kernmembran ist dilatiert und das Endomembransystem existiert nicht mehr. Als Membranstrukturen findet man annulierte Lamellen (AL). Die Mitochondrien sind geschwollen und die Anzahl der α -Glykogenpartikel in den Glykogenfeldern nehmen ab (5.500x).

8: Die Ausmaße der Lipidtropfen sind beachtlich, die Größe der Lipideinschlüsse liegt zum Teil über der Größe des Zellkerns (5.500x).

9: Viele Zellen sind sehr organellenarm. Neben einzelnen geschwollenen Mitochondrien findet man noch kleinere Lysosomen und Peroxisomen (5.500x).



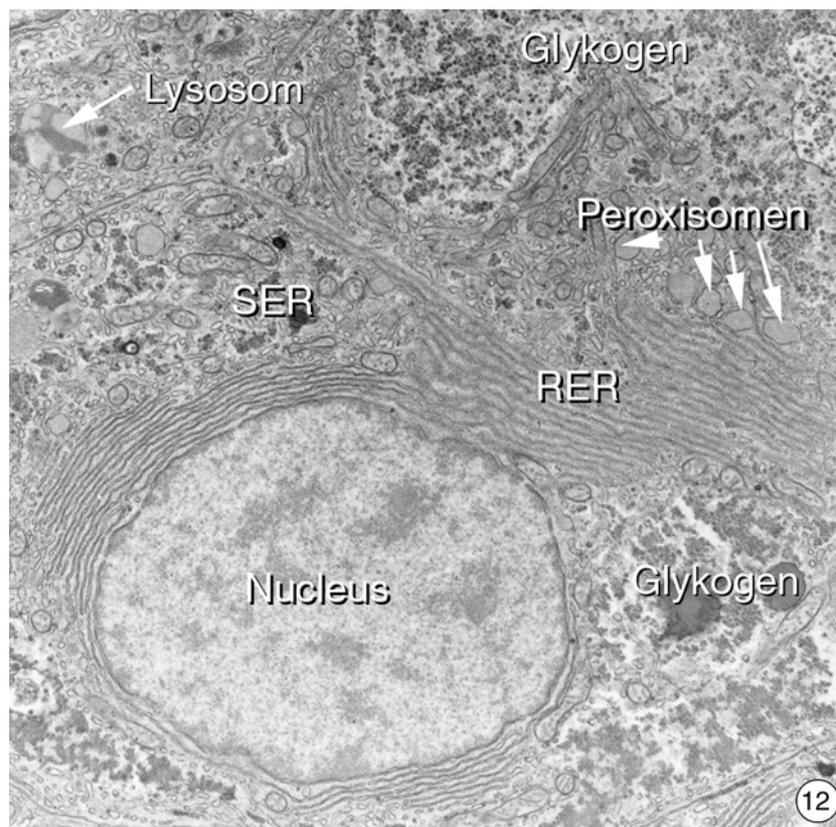
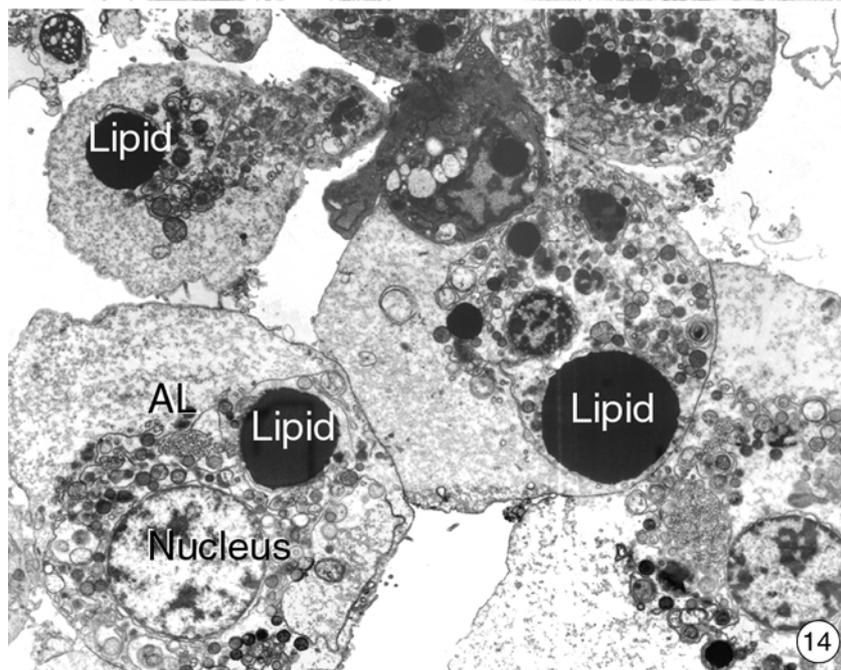
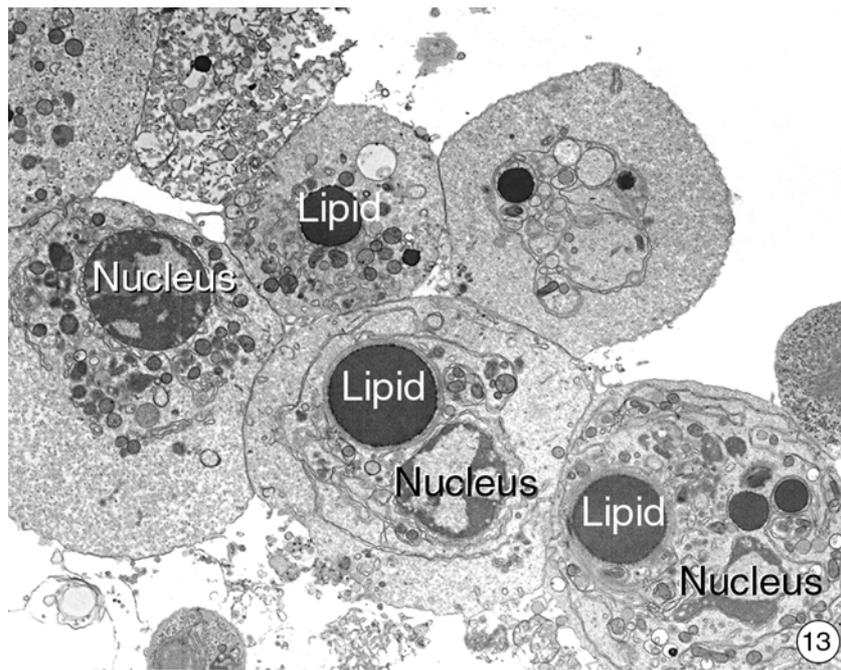


Abbildung 3.2.9-10-12: Simultane Belastung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors über einen Zeitraum von 2 Tagen.

10: Teilweise treten Lysosomen auf, die vakuolären Inhalt oder auch sehr dunkel angefarbtes Material enthalten (5.500x).

11: Selten findet man Hepatocyten, die ein sehr ausgeprägtes System an Membranzisternen im Cytoplasma aufweisen. Auffällig dabei ist, dass diese Zisternen nie mit der Zellmembran in Kontakt kommen (3.500x).

12: Extrem selten sind Leberzellen zu finden, die in ihrer Ultrastruktur mit rauem und glattem endoplasmatischem Retikulum (RER, SER), wenig Heterochromatin und ausgedehnten Glykogenfeldern weitgehend den Kontrollen entsprechen (5.500x).



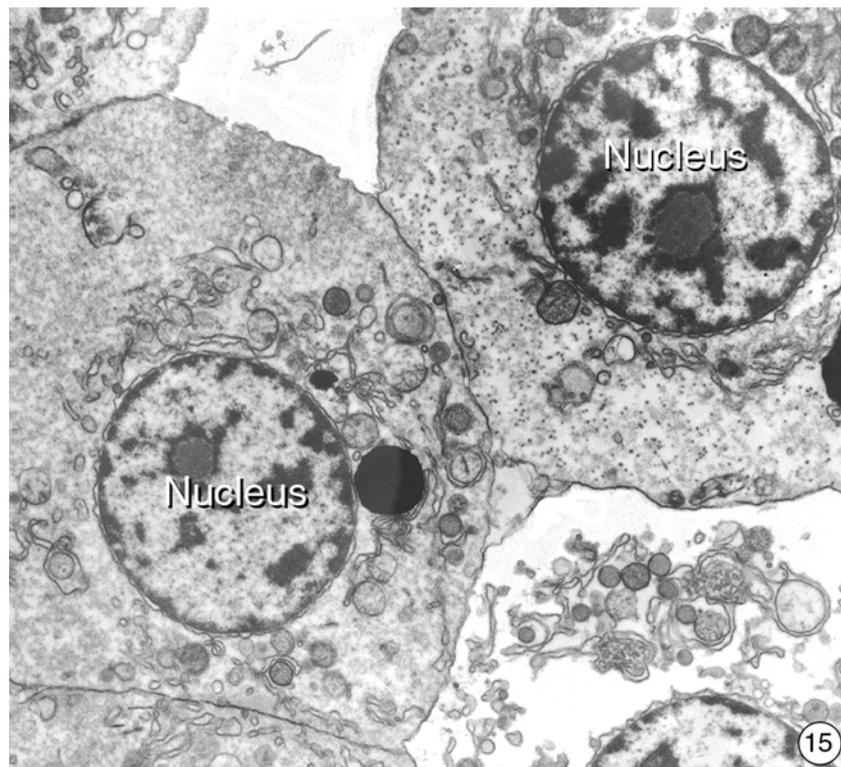


Abbildung 3.2.9-13 bis 15: Simultane Behandlung von isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat und 10 μ M eines membranpermeablen Caspase 3-Inhibitors über einen Zeitraum von 3 Tagen.

13: Der größte Teil der Zellen ist nach einer Belastung mit 1 mM Clofibrat und 10 μ M Inhibitor für 3 Tage extrem geschädigt. Der Heterochromatinanteil in den Zellkernen ist sehr hoch. Die Zellen sind sehr organellenarm und große Lipidtropfen treten auf (3.300x).

14: Dunkel gefärbte Zellfragmente sind in den Kulturgefäßen verteilt. Hepatocyten, die noch nicht in solchen Trümmern aufgegangen sind, sind sehr organellenarm und das Endomembransystem ist mit Ausnahme einzelner annullierter Lamellen (AL) nicht mehr vorhanden (3.300x).

15: Selten können auch noch Zellen des dargestellten Typs gefunden werden. Sie besitzen einen Zellkern mit relativ wenig Heterochromatin. Das Endomembransystem ist verschwunden und die Hepatocyten sind extrem arm an Organellen (6.600x).