

Anuschka Kerstin Lütkehaus
Dr. med.

Die essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B an der Downregulation der peroxisomalen Enzyme Acyl-CoA-Oxidase und Katalase in TNF- α behandelten humanen und Ratten-Hepatozyten

Geboren am 13.09.1975 in Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie
Doktorvater: Prof. Dr. H. D. Fahimi

Peroxisomen sind ubiquitäre, zytoplasmatische Organellen, die von einer Einheitsmembran umgeben werden. Die Ausstattung der Peroxisomen mit Enzymen variiert abhängig vom Gewebe, der Spezies und der Stoffwechselsituation. Vor allem Oxidasen, Katalase und die β -Oxidations-Enzyme treten in unterschiedlichen Konzentrationen auf. Letztere dienen vorwiegend dem Abbau langkettiger (C_{14} - C_{22}) und sehr langkettiger ($>C_{22}$) Fettsäuren. In Peroxisomen werden komplexe Lipidderivate wie Leukotriene und Prostaglandine abgebaut, die bei zu hohen Konzentrationen schwerwiegende Zellfunktionsstörungen verursachen können. Der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α , Syn. Cachectin) ist ein Zytokin mit verschiedenen biologischen Angriffspunkten und ein wichtiger Mediator in Entzündungsprozessen und in der Immunregulation. Der Nuklear Faktor-kappaB (NF- κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der u. a. durch TNF- α induziert werden kann und der aus verschiedenen homo- und heterodimeren Kombinationen der NF- κ B/Rel Proteine zusammengesetzt ist. Er kann durch ein breites Spektrum an Induktoren aktiviert werden. Dabei wird der NF- κ B/I κ B-Komplex im Zytoplasma durch eine Kinase (I κ B Kinase), die zur Phosphorylierung von I κ B führt, gespalten und dadurch gelangt NF- κ B in den Nukleus um die Transkription zahlreicher Gene zu beeinflussen. Oxidativer Stress ist ein bekannter Aktivator von NF- κ B und Thiooctsäure (α -Liponsäure) ist ein Antioxidans, welches das Freiwerden und die Translokation von NF κ B in den Nukleus inhibiert.

Vor einigen Jahren wurde in der Arbeitsgruppe am Institut für Anatomie und Zellbiologie II eine Erniedrigung der Aktivität und der Biosynthese der peroxisomalen Katalase und β -Oxidationsenzyme nach TNF- α -Behandlung in der Rattenleber beschrieben. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß TNF- α bei der humanen Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 eine Downregulation individueller peroxisomaler β -Oxidationsenzyme induziert.

Das Ziel der vorliegenden Studie war, die Rolle von NF- κ B an der Suppression der β -Oxidationsenzyme durch TNF- α in zwei Zellkulturmodellen zu untersuchen. Es wurden zunächst Experimente mit humanen HepG2-Zellen- und im Vergleich mit Ratten-H4IIEC3-Zellen- auf Proteinebene durchgeführt. Hierbei sollte zunächst das Verhalten von NF κ B p65 (induziert und nichtinduziert) im Zellkern und im Zytoplasma untersucht werden. Mit Hilfe von Western-Blot-Studien konnte bei beiden Zelllinien eine TNF-bedingte Erhöhung von NF κ B p65 in Zellkernen gezeigt werden. Beide Zelllinien reagierten auf die TNF-Behandlung leicht apoptotisch, wobei dies bei den menschlichen HepG2-Zellen viel schwächer der Fall war. Außerdem zeigte sich bei beiden Zelllinien, dass NF κ B p65 im Vergleich zu der Kontrolle durch die TNF-Behandlung eine Reduktion im Zytoplasma erfährt, was sich durch die Migration in den Zellkern erklären lässt. Bei der Untersuchung der NF κ B-Aktivierung im Zusammenhang mit dem NF κ B-Inhibitor I κ B- β , der für die Regulation der langlebigeren Form von NF κ B verantwortlich ist, zeigte sich, dass man nach 24 Stunden TNF-Gabe im Zytoplasma einen deutlichen Abfall von I κ B β erkennen konnte, in den Zellkernen hingegen eine leichte Induktion von I κ B β feststellen konnte. Beide Ergebnisse stehen in Zusammenhang mit der TNF-induzierten Aktivierung von NF- κ B, so dass diese Aktivierung wohl gleichzeitig

eine Induktion des Inhibitors I κ B β nach sich zieht. Desweiteren zeigte sich, dass es durch die Inhibition von NF κ B-Aktivierung mit Thiooctsäure, welches in den Redoxstatus der Zelle eingreift und so das Freiwerden und die Translokation von NF κ B-Aktivierung in den Nukleus verhindert, zu einer Aufhebung des TNF-induzierten Suppressionsmechanismus der peroxisomalen Enzyme AOX und Katalase kommt. Diese Effekte sprechen deutlich für eine Beteiligung von NF κ B an oben genannter Suppression. Um die Beteiligung von NF κ B p65 an der Downregulation peroxisomaler Enzyme AOX und Catalase genauer zu untersuchen, wurden anschließend Experimente auf RNA-Ebene durchgeführt. Bei beiden Zelllinien wurde eine TNF-bedingte Induktion von m-RNA für NF κ B p65 festgestellt; diese fällt jedoch nach 18 Stunden deutlich stärker als nach 24 Stunden. Die Enzyme AOX und Katalase zeigten ebenfalls während dieser Induktionsphase sowohl auf Protein- als auch auf m-RNA-Ebene eine deutliche Reduktion. Die zur morphologischen Darstellung des Vorgangs durchgeführten Immunfluoreszenzstudien bestätigten die Translokation von NF- κ B vom Zytoplasma in den Nukleus durch TNF- α -Behandlung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B bei Downregulation der peroxisomalen β -Oxidationsenzyme durch TNF- α in Leberzellen eine wichtige Rolle spielt und dadurch bei entzündlichen Lebererkrankungen von zentraler Bedeutung sein könnte.

Dies liefert einen Beitrag zum Verständnis der Rolle des Transkriptionsfaktors NF- κ B im Stoffwechsel der Peroxisomen und stellt einen Ausgangspunkt für die weitere Charakterisierung dieser Mechanismen dar.