



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Einfluss von Ethanol auf die TGF- $\beta$ 1 vermittelte Apoptose primärer Maushepatozyten**

Autor: Stefan Edgar Hofmann  
Institut / Klinik: II. Medizinische Klinik  
Doktormutter: Priv.-Doz. Dr. K. Breitkopf-Heinlein

Anhaltender Alkoholkonsum kann zu einer Leberschädigung in Form der Alkoholischen Leberzirrhose führen. Die vorherrschende Zellpopulation der Leber sind die Hepatozyten. In vitro Experimente konnten zeigen, dass diese durch 150 mM Ethanol alleine keine direkte Schädigung erfahren. Stattdessen potenziert Alkohol den schädigenden Effekt von TGF- $\beta$ 1 auf die Hepatozyten und führt so zur gesteigerten Apoptose im Vergleich zu TGF- $\beta$ 1 alleine. Dieses wird in der Leber bei Schädigung vermehrt gebildet und ist hauptverantwortlich für die Fibrosierung. Ziel dieser Arbeit war es daher mögliche Interaktionen zwischen Ethanol und TGF- $\beta$  aufzudecken.

Alkohol führt in vivo in der Leber zu der Entstehung von oxidativem Stress. Zwei wichtige Enzyme, welche zur Entstehung von oxidativem Stress führen können sind GCLC und Nox4. Daher erfolgten Untersuchungen auf RNA-Ebene und für GCLC zusätzlich auf Proteinebene. Diese Untersuchungen sprechen eher nicht für eine Rolle von GCLC oder Nox4 als Ursache für die Superinduktion der Apoptose.

Der Akt-Signalweg ist ein zentraler Promotor des Zellüberlebens. Akt kann zum Beispiel über Interaktion mit Smad3 direkt auf den TGF- $\beta$ -Signalweg wirken, aber auch über viele weitere Mechanismen Einfluss auf die Apoptose nehmen. Bei gleichzeitiger Stimulation der Hepatozyten mit TGF- $\beta$ 1 und Ethanol ist eine reduzierte Akt-Phosphorylierung nachweisbar, welche bei der alleinigen Behandlung sowohl mit TGF- $\beta$ , als auch Ethanol nicht zu finden ist. Die reduzierte Phosphorylierung hat eine verminderte Akt-Aktivität zur Folge und stellt somit eine mögliche Ursache für die gesteigerte Apoptose nach Kombinationsgabe von TGF- $\beta$ 1 und Ethanol dar. Reguliert wird die Phosphorylierung unter anderem durch die Proteine PTEN und IGF-1. Während IGF-1 die Phosphorylierung von Akt ermöglicht, wird diese durch PTEN gehemmt. Die RNA-Expression von PTEN unterscheidet sich nach Kombinationsgabe von TGF- $\beta$ 1 und Ethanol aber nicht von der alleinigen Stimulation mit TGF- $\beta$ 1, was eine Beteiligung an der Superinduktion der Apoptose unwahrscheinlich macht. Experimentell konnten auch reduzierte IGF-1 Level als Ursache für die verminderte Akt-Phosphorylierung ausgeschlossen werden. IGF-1-RNA war nach gleichzeitiger Stimulation sogar verstärkt exprimiert.

Akt phosphoryliert und inaktiviert unter anderem GSK-3 $\beta$ , was einen anti-apoptischen Effekt zur Folge hat. Daher erfolgte die Untersuchung der Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  im Zusammenhang mit der Stimulation durch TGF- $\beta$ 1, Ethanol und deren Kombination. Es waren hierbei jedoch keine Unterschiede der Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  nachweisbar. Trotzdem konnte durch Hemmung von GSK-3 $\beta$  mit SB 216763 die gesteigerte Apoptose auf das TGF- $\beta$ -Level reduziert werden. Der Aktivierungsstatus von GSK-3 $\beta$  wird somit in dem gewählten Setting durch Akt anscheinend nicht direkt beeinflusst. Aktives GSK-3 $\beta$  wird aber dennoch für die Superinduktion der Apoptose benötigt.

Dies spricht gegen eine direkte Interaktion von Akt mit Smad3 als Ursache für die gesteigerte Apoptose. GSK-3 $\beta$  wurde in der Literatur als wichtiger Co-Faktor für die hemmende Wirkung von Axin auf den TGF- $\beta$ -Signalweg beschrieben. Die Untersuchung von Axin zeigte, dass sowohl durch die alleinige Behandlung mit TGF- $\beta$ 1, als auch durch Ethanol die Expression signifikant induziert werden kann. Nach Kombinationsbehandlung besteht nochmals eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu der alleinigen Stimulation. Daher lässt sich vermuten, dass diese gesteigerte Axin-Expression nach Kombinationsbehandlung über eine verminderte Smad3-Aktivität für die Superinduktion der Apoptose verantwortlich ist.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die gleichzeitige Behandlung von primären Hepatozyten mit TGF- $\beta$ 1 und Ethanol zu einer reduzierten Akt-Aktivität und einer gesteigerten Axin-Expression führt. Beide Veränderungen können in kausalem Zusammenhang mit der Superinduktion der Apoptose stehen. GSK-3 $\beta$  unterliegt zwar keiner direkten Regulation durch Alkohol und TGF- $\beta$ 1, stellt aber einen wichtigen Co-Faktor bei der Superinduktion der Apoptose dar.