

3.5 RTG-2-Zellen

Bei den Versuchen zu den Auswirkungen einer Schadstoffbelastung von RTG-2-Zellen fiel auf, dass es sich bei den im Labor kultivierten RTG-2-Zellen um zwei unterschiedliche Typen handelte. Wie eine Anfärbung der lebenden Zellen mit einem Acridinorange/Ethidiumbromidgemisch verdeutlichte, war die Anzahl der Lysosomen in einem Typus sehr stark erhöht (Abb. 3.5-1; 2). Diese massive Ansammlung war im anderen Zelltyp nicht zu finden (Abb. 3.5-3; 4). Beide Typen dieses Zellstamms reagierten allerdings gleichförmig auf die Belastung mit Clofibrat und die anderen getesteten Substanzen.

3.5.1 Cytotoxizitätstests

Zur allgemeinen Bewertung der Toxizität verschiedener benutzter Substanzen wurden Toxizitätstests an RTG-2 Zellen durchgeführt.

3.5.1.1 Clofibrat

Clofibrat zeigte in den Cytotoxizitätstests hinsichtlich der Toxizität ein von den anderen durchgeführten Versuchen stark abweichendes Ergebnis. Dadurch wurde eine Entdeckung der beobachteten Phänomene erst ermöglicht. RTG-2 Zellen erwiesen sich in Cytotoxizitätstests zunächst als weitaus unempfindlicher als in den anschließenden Versuchen. So konnten mittels der Trendfunktion von MS Excel[®] EC₅₀-Werte ermittelt werden, die nach 24 Stunden bei 2,6 mM und nach 48 Stunden Belastung bei 2,44 mM lag (Tab. 3.5.1-1; Abb. 3.5.1-1; 2). Aus diesem Grund fanden die ersten Belastungstests von Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 2 mM statt. Dies führte jedoch, wie bereits beschrieben, zu einem sehr schnellen Absterben der Zellen. Auch in weiteren Versuchen mit RTG-2-Zellen, die nicht in 96-Well Platten durchgeführt wurden, erwiesen sich Konzentrationen über 0,5 mM als toxisch.

Tabelle 3.5.1-1: Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von Clofibrat über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden belastet wurden. Dargestellt sind die Neutralrotextinktionen im Vergleich zur Kontrolle, die als 100 % der möglichen Extinktion angenommen wurden (Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung)

Konzentration	Kontrolle	0,08	0,16	0,31	0,63	1,25	2,5	5
24 Stunden	100 $\pm$ 9,3	101,43 $\pm$	105,4 $\pm$	106,4 $\pm$	109,1 $\pm$	64,0 $\pm$	45,0 $\pm$ 3,2	7,5 $\pm$ 1,2
		10,8	11,8	12,1	7,2	10,1		
48 Stunden	100 $\pm$ 4,3	108,2 $\pm$ 5,3	105,0 $\pm$	91,2 $\pm$ 3,3	96,2 $\pm$ 2,5	65,5 $\pm$ 3,7	37,6 $\pm$ 5,0	5,5 $\pm$ 2,3
			5,1					

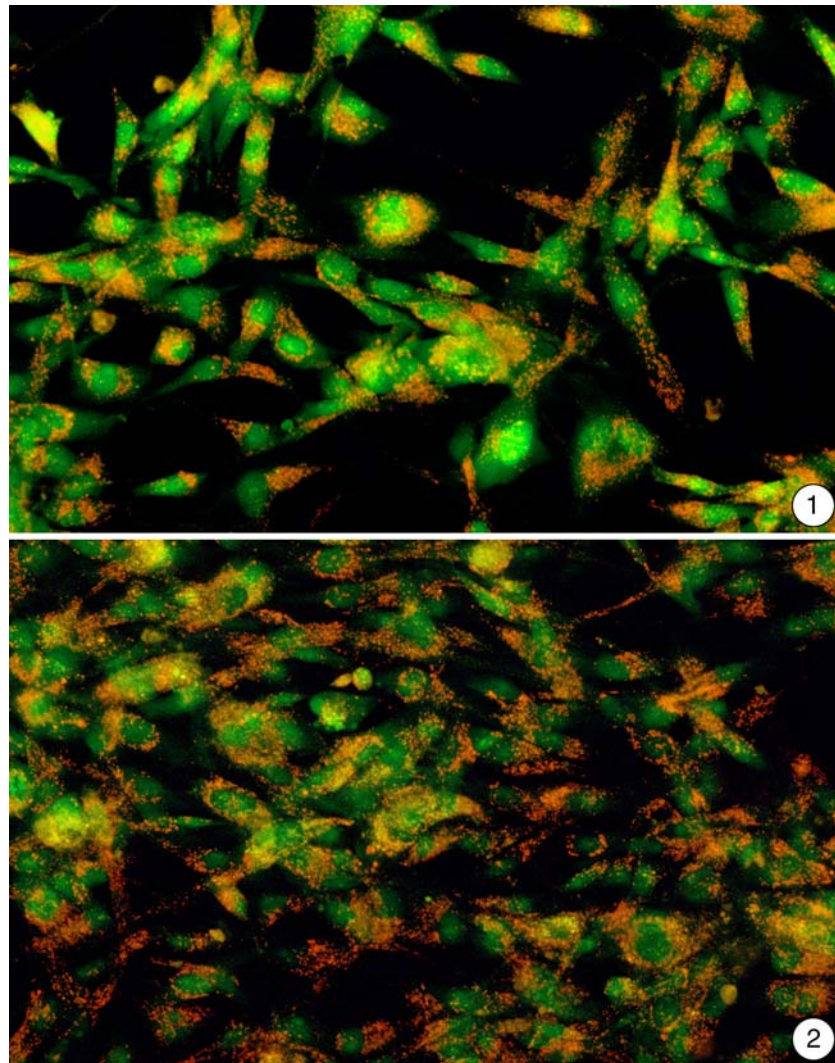


Abbildung 3.5-1 und 3.5-2: Unbelastete RTG-2-Zellen zeigen nach einer Anfärbung mit einer 1:1 Mischung aus Acridinorange und Ethidiumbromid einen langgestreckten Zellleib mit intensiv grün leuchtendem Zellkern. Auffällig sind in diesen Proben die Vielzahl kleiner stark orangerot markierter Strukturen im Zellkörper, die als Lysosomen interpretiert werden können.

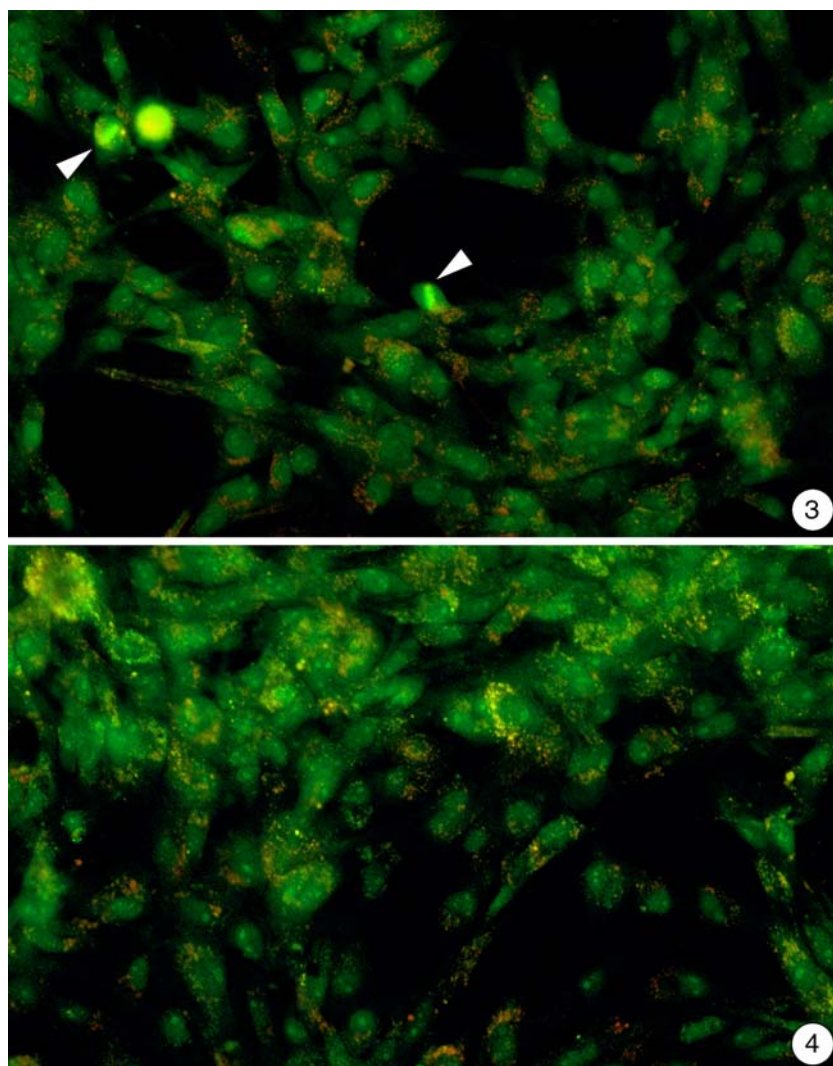


Abbildung 3.5-3 und 3.5-4: Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen RTG-2-Zellen (s.o.) zeigen diese beiden Abbildungen nur eine schwache Ausprägung der orangerot leuchtenden Lysosomen. Dadurch wird klar, dass sich im Laborbestand zwei verschiedene Populationen von RTG-2-Zellen befanden.

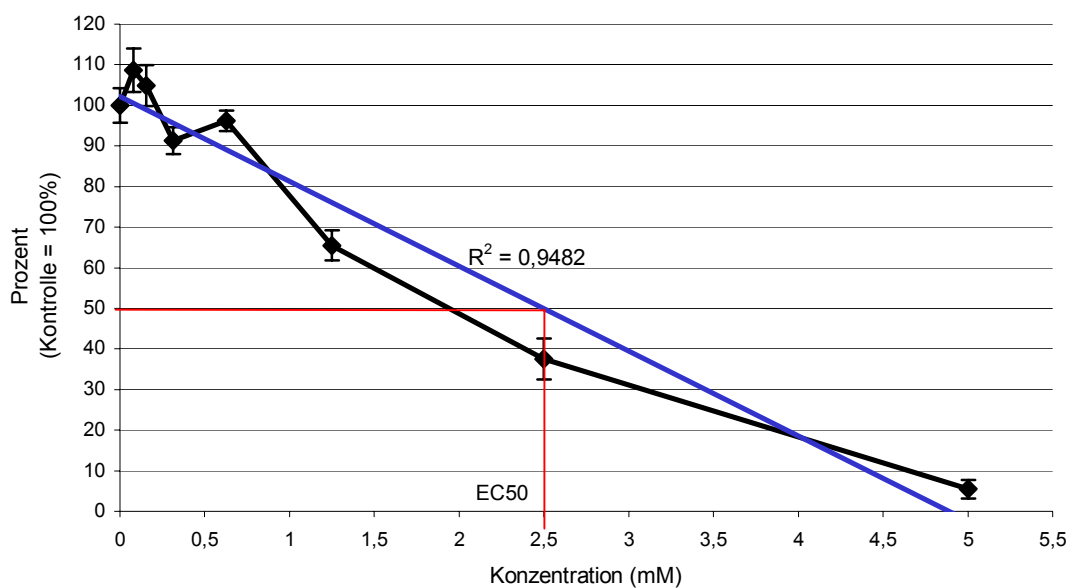


Abbildung 3.5.1-1: Extinktionsabnahme im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden Belastung von RTG-2-Zellen mit Clofibrat. Der EC_{50} -Wert lässt sich aus dieser Grafik auf rund 2,5 mM festlegen.

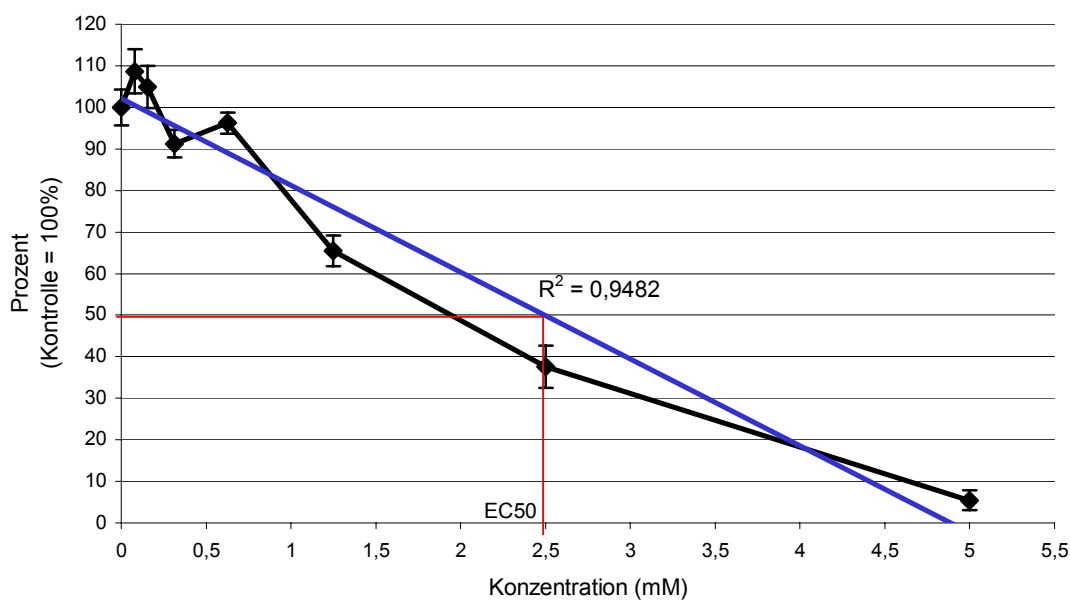


Abbildung 3.5.1-2: Extinktionsabnahme im Vergleich zur Kontrolle nach 48 Stunden Belastung von RTG-2-Zellen mit Clofibrat. Der EC_{50} -Wert lässt sich aus dieser Grafik auf rund 2,5 mM festlegen.

3.5.1.2 Dehydroepiandrosteron (DHEA)

DHEA erwies sich im Cytotoxizitätstest als schädlicher für die Fibrocyten als Clofibrat. Mit der Trendfunktion von MS Excel[®] wurden ED₅₀ Werte ermittelt, die nach einer Belastung über einen Zeitraum von 24 Stunden bei 445 µM und nach 48 Stunden bei 441 µM lagen. Grafisch ermittelte ED₅₀ Werte lagen dagegen bei knapp 470 µM nach 24 Stunden und bei 480 µM nach 48 stündiger Belastung (Tab.: 3.5.1-2; Abb.: 3.5.1-3; 4).

Tabelle 3.5.1-2: Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von DHEA über einen Zeitraum von 24 und 48 Stunden belastet wurden. Dargestellt sind die Neutralrotextinktionen im Vergleich zur Kontrolle, die als 100 % der möglichen Extinktion angenommen wurden. (Mittelwerte ± Standardabweichung)

Konzentration	0	15,6	31,3	62,5	125	250	500	1000
24 Stunden	100 ± 7,6	90,7 ± 4,3	96,6 ± 2,3	91,1 ± 3,3	90,4 ± 4,0	48,4 ± 7,1	31,7 ± 3,9	14,7 ± 0,5
48 Stunden	100 ± 2,9	106,7 ± 4,0	94,2 ± 4,2	90,9 ± 3,8	83,7 ± 4,2	42,3 ± 1,8	40,4 ± 1,2	14,7 ± 0,7

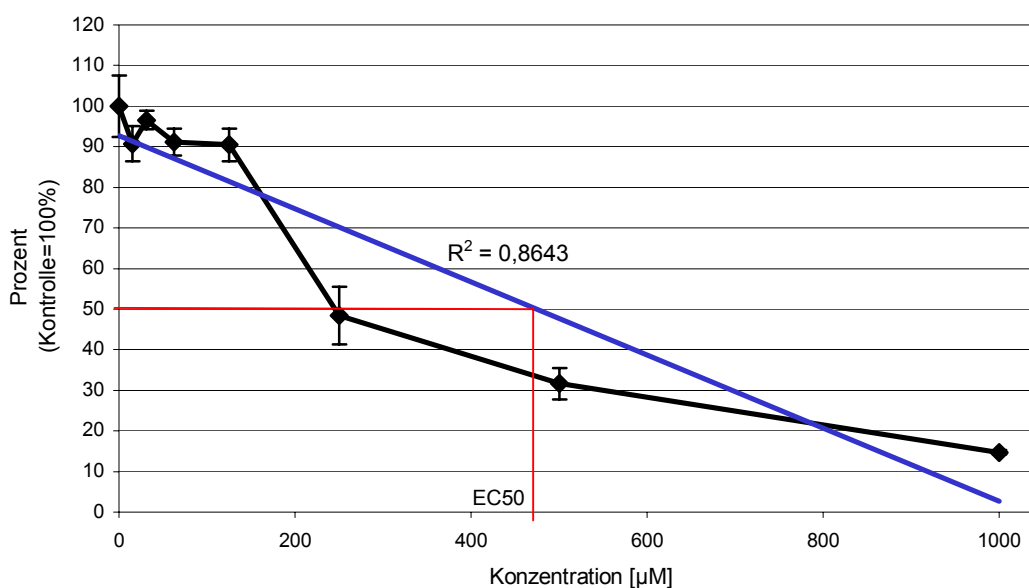


Abbildung 3.5.1-3: Extinktionsabnahme im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden Belastung von RTG-2-Zellen mit DHEA. Der EC₅₀-Wert lässt sich aus dieser Grafik auf rund 470 µM festlegen.

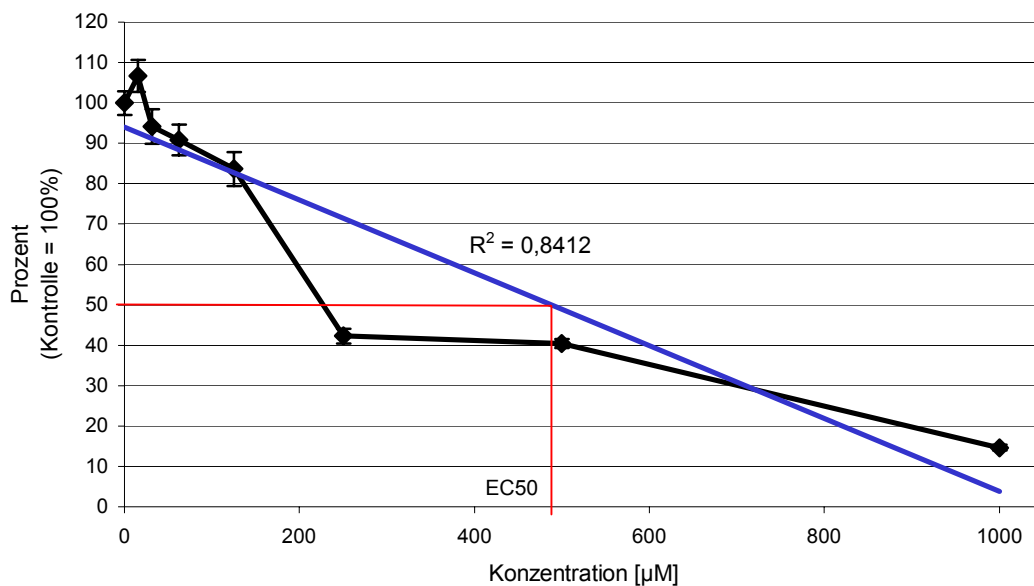


Abbildung 3.5.1-4: Extinktionsabnahme im Vergleich zur Kontrolle nach 48 Stunden Belastung von RTG-2-Zellen mit DHEA. Der EC_{50} -Wert lässt sich aus dieser Grafik auf rund 480 µM festlegen.

3.5.2 Belastung von RTG-2-Zellen mit Clofibrat

Im Vergleich zu Hepatocyten aus der Regenbogenforelle reagierten RTG-2 Zellen weit- aus sensibler, wenn diese nicht in 96-Well Platten kultiviert wurden. Bereits 0,5 mM Clofibrat reichten aus, um in den Zellen innerhalb einer Stunde eine verstärkte Apopto- serate zu erzeugen bzw. die Zellen innerhalb eines Tages abzutöten.

3.5.2.1 DNA-Färbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid

Nach Färbung lebender Kontrollzellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid war in den langgestreckten Zellen ein grün fluoreszierender Kern erkennbar. Ferner zeigte sich in mehreren Ansätzen, wie bereits erwähnt, eine starke Anhäufung intensiv orange-rot fluoreszierender lysosomaler Elemente (Abb. 3.5-1). Es ist bekannt, dass Acridinorange in lebenden Zellen neben einer grünen Markierung der DNA auch Lysosomen als oran- gerote Vesikel sichtbar macht. Häufig konnten verschiedene Mitosestadien beobachtet werden (Abb. 3.5-2).

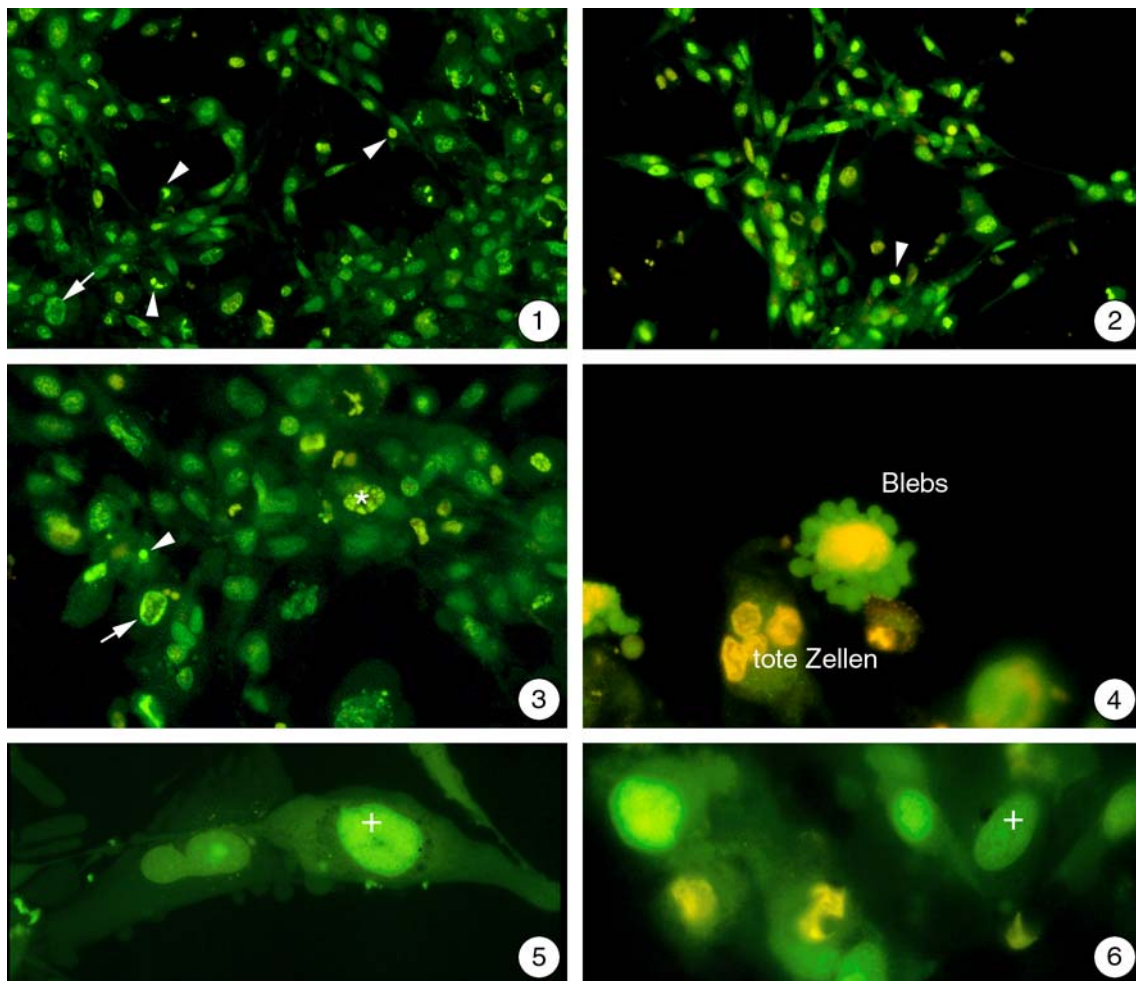


Abbildung 3.5.2-1 bis 6: Belastung von RTG-2-Zellen mit 0,5 mM Clofibrat für 3 Stunden.

1: Die Morphologie der RTG-2-Zellen ist verändert. Zu einem größeren Teil sind die Zellausläufer verkürzt, die Zellen nehmen rundlichere Formen an. Teilweise findet man Zellen, deren Kerne sehr kompakt sind (Pfeilspitzen). Andererseits gibt es auch Zellen mit großen Kernen, die eine Kondensierung von Chromatin in der Peripherie des Zellkerns aufweisen (Pfeil).

2: RTG-2-Zellen weisen nach einer Belastung mit 0,5 mM Clofibrat kompakte Kerne auf. Die Zellmembranen sind zu diesem Zeitpunkt allerdings vollkommen intakt, wie das Fehlen einer gelborangen Fluoreszenz von Zellkernen durch eingedrungenes Ethidiumbromid deutlich macht.

3: Ringförmige Kondensierung von Chromatin im Zellkern (Pfeil) lässt sich des öfteren in RTG-2-Zellen erkennen. In einzelnen Zellen sind die Kerne in viele kleine Fragmente zerfallen (*). Auch pyknotische Kerne können in diesem Bild wieder gefunden werden (Pfeilspitze).

Fortsetzung siehe nächste Seite →

Bereits nach 3-stündiger Exposition mit 0,5 mM Clofibrat war die lichtmikroskopische Morphologie der RTG-2 Zellen verändert. Die langgestreckten Zellausläufer der Zellen verkürzten sich teilweise (Abb. 3.5.2-1). Weiterhin traten aber auch Zellen auf, die wie die Kontrollen langgestreckte Zellausläufer besaßen. Die Kerne wurden kompakter und waren zum Teil pyknotisch (Abb. 3.5.2-1 bis 3). Auch eine ringförmige Kondensierung von Chromatin konnte vereinzelt beobachtet werden (Abb. 3.5.2-1; 3). Im Gegensatz zu clofibratbelasteten Hepatocyten trat bei RTG-2-Zellen nach Belastung das typische Blebbing auf (Abb. 3.5.2-4). Eine zu beobachtende Besonderheit bei den belasteten Zellen war das gehäufte Auftreten von stark geschwollen erscheinenden Zellkernen mit hohem Heterochromatinanteil (Abb. 3.5.2-5). Zellen mit zerstörter Zellmembran waren ebenfalls auffindbar. Sie fielen durch die Anfärbung des Chromatins durch Ethidiumbromid auf (Abb. 3.5.2-4; 6).

3.5.2.2 Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme

Die Inkubation der RTG-2 Zellen mit PhiPhiLux[®] führte zu einem sehr deutlichen Ergebnis: Die Kontrollen erschienen zunächst im Phasenkontrast als langgestreckte Zellen. Grüne Fluoreszenz, ausgelöst durch die Spaltung des PhiPhiLux-Präparats, war selten, aber nicht vollständig fehlend (Abb. 3.5.2-7).

Bereits 1 Stunde nach Beginn der Belastung mit 0,5 mM Clofibrat änderte sich dieses Bild: Während die im Phasenkontrast erkennbare langgestreckte Morphologie der RTG-2-Zellen noch weitgehend erhalten war, wiesen deutlich mehr Zellen als in den Kontrollen eine über den gesamten Zellleib verteilte grüne Fluoreszenz auf. Dies deutete darauf hin, dass hier ein Caspase 3-artiges Enzym aktiv war, das das angebotene Substrat in sein fluoreszierendes Produkt spaltete (Abb. 3.5.2-8).

Zwei Stunden nach Expositionsbeginn war die Morphologie der RTG-2 Zellen verändert. Die Zellausläufer waren verkürzt und die Anzahl der grün fluoreszierenden Zellen nahm weiter zu (Abb. 3.5.2-9).

Drei Stunden Belastung mit 0,5 mM Clofibrat führten zu einer deutlichen Abrundung der RTG-2 Zellen. Grüne Fluoreszenz fand sich nun konzentriert in diesen runden Gebilden. Überraschenderweise waren bei einigen Zellen die Kerne ebenfalls angefärbt. Dies ist insofern ungewöhnlich, als es sich bei der Caspase 3 um ein cytoplasmatisches Protein handelt (Abb. 3.5.2-10).

← Fortsetzung Abbildung 3.5.2

4: Die Belastung der RTG-2-Zellen führt zu Zellen, die intensives Blebbing aufweisen. Einige wenige Zellen besitzen bereits zerstörte Zellmembranen, was durch das Eindringen von Ethidiumbromid und dem daraus resultierenden orangefarbenen Leuchten der Zellkerne belegt wird.

5: Selten findet man unter den belasteten RTG-2-Zellen stark geschwollene Formen, bei denen auch der Kern (+) sehr groß erscheint.

6: Zum Teil treten belastete RTG-2-Zellen auf, deren Zellmembran zerstört ist und die Kerne von sehr unregelmäßiger Form besitzen.

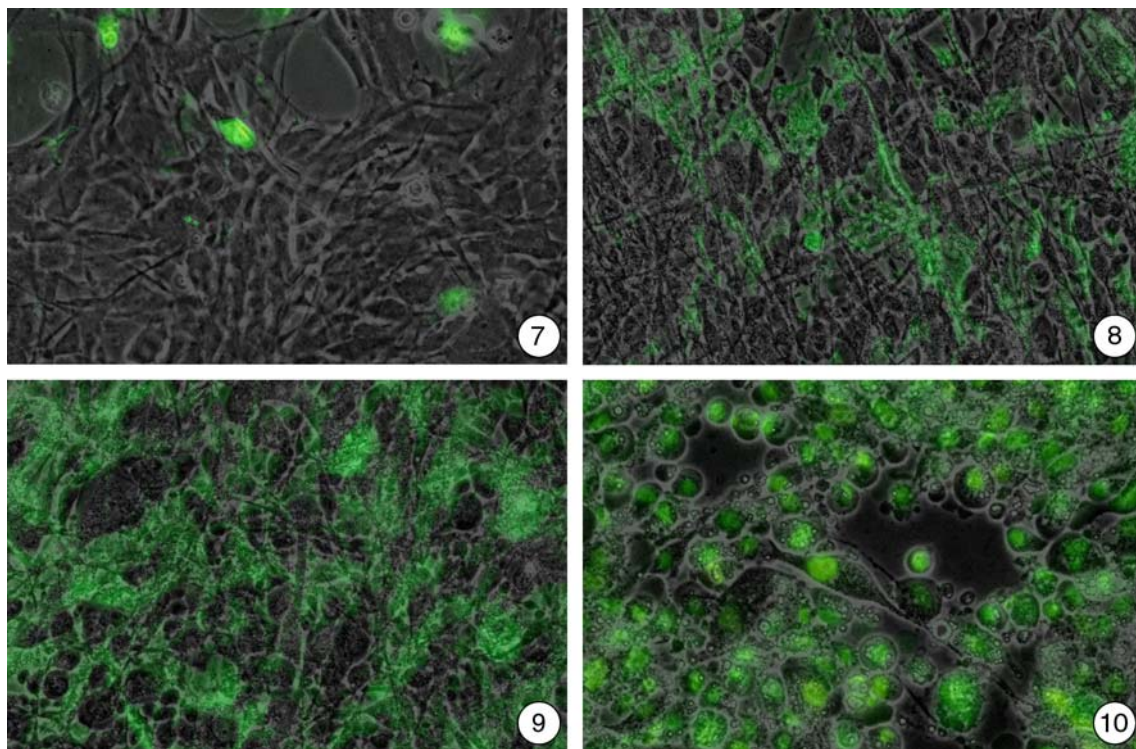


Abbildung 3.5.2-7 bis 10: Behandlung von RTG-2-Zellen mit einem membranpermeablen Caspase 3-Substrat.

7: Unbelastete RTG-2-Zellen zeigen im Phasenkontrast langgestreckte Zellkörper. Grüne Fluoreszenz, wie sie durch die Spaltung des angebotenen Substrats zustande kommt, tritt selten auf. Dies zeigt aber, dass es auch in unbehandelten RTG-2-Zellen spontan zur Aktivierung von Caspase 3 kommt.

8: Eine einstündige Belastung von RTG-2-Zellen mit 0,5 mM Clofibrat zeigt langgestreckte Zellen im Phasenkontrast. Teilweise können komplett grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Hier ist es zur Aktivierung der Caspase 3 gekommen, so dass das angebotene Substrat gespalten werden konnte. Im Unterschied zur vereinzelt auftretenden Fluoreszenz in den Kontrollen, die dort nur in abgerundeten Zellen auftritt, sind hier auch langgestreckte Formen betroffen.

9: 2 Stunden Belastung mit 0,5 mM Clofibrat führen in RTG-2-Zellen zu einer verstärkten Abrundung der Zellen. Die Anzahl von fluoreszierenden Zellen ist gegenüber den kürzer belasteten RTG-2-Zellen erhöht.

10: Nach einer dreistündigen Belastung mit 0,5 mM Clofibrat ist die Morphologie der Zellen verändert. Sie erscheinen nun stark abgerundet und weisen so auch eine Konzentrierung der grünen Fluoreszenz in Kernnähe auf. Manchmal scheint auch der Kern selbst angefärbt zu sein.

3.6 Morphometrische Erfassung der ultrastrukturellen Veränderungen in Lebern von Zebrabärblingen, die im Life-Cycle-Versuch mit 100µg/l DHEA gehältert wurden

Zebrabärblinge, die im Life-Cycle-Versuch mit 100 µg/l DHEA belastet wurden (Dissertation Ute Bieberstein, Zoologisches Institut 1 der Universität Heidelberg, 2001), zeigten bei der morphometrischen Analyse eine Zunahme der Organellen die am Lipidstoffwechsel beteiligt sind. Ferner nahm auch Lipid selbst als Energiereserve zu. Obwohl diese Veränderungen nur gering waren, zeigte die statistische Analyse dennoch signifikante Unterschiede zu den Kontrollen, die mit 0,05 % DMSO belastet wurden. Der Anteil von Mitochondrien, Peroxisomen und Lipidtropfen nahm zu (Abb. 3.6-1 bis 3).

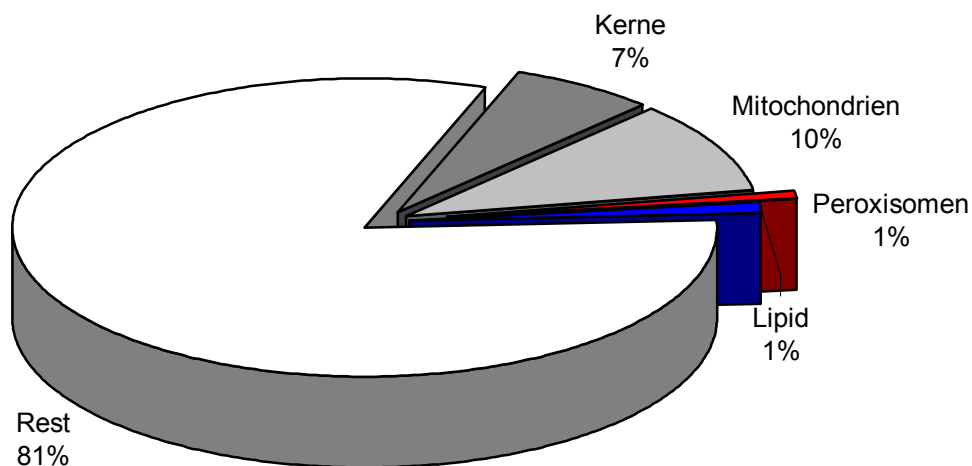


Abbildung 3.6-1: Prozentualer Anteil der morphometrisch erfassten Organellen in Bezug auf eine Gesamtfläche von 10 µm² in Kontrollzebrabärblingen. Auf den Rest entfallen Strukturen, die nicht erfasst wurden wie das gesamte Endomembransystem und Glykogenfelder

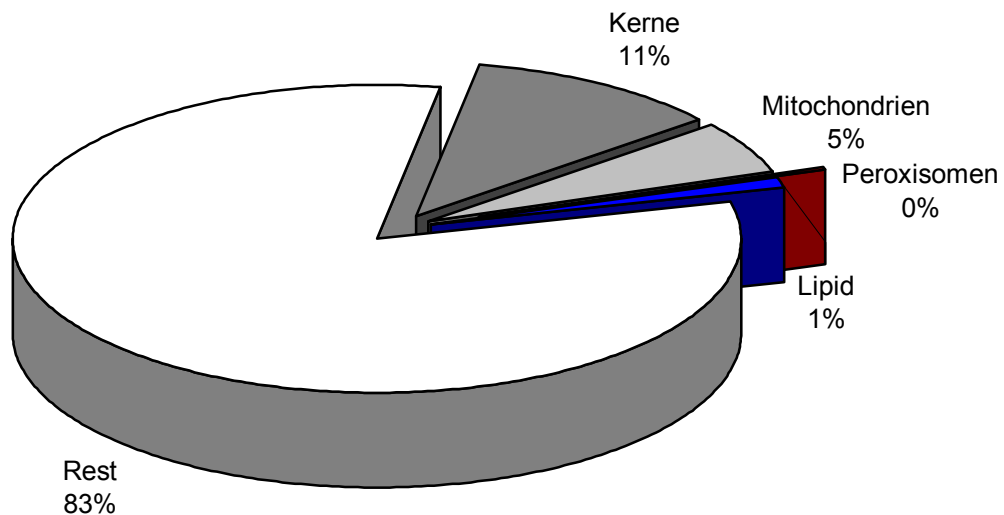


Abbildung 3.6-2: Prozentualer Anteil der morphometrisch erfassten Organellen in Bezug auf eine Gesamtfläche von $10 \mu\text{m}^2$ in Zebrabärblingen, die über 6 Monate mit 0,05 % DMSO belastet wurden. Der Anteil der Kerne an der Gesamtfläche ist deutlich größer als in den Kontrollen. Dagegen ist der Anteil von Mitochondrien und Peroxisomen verringert. Der Lipidanteil bleibt nahezu unverändert.

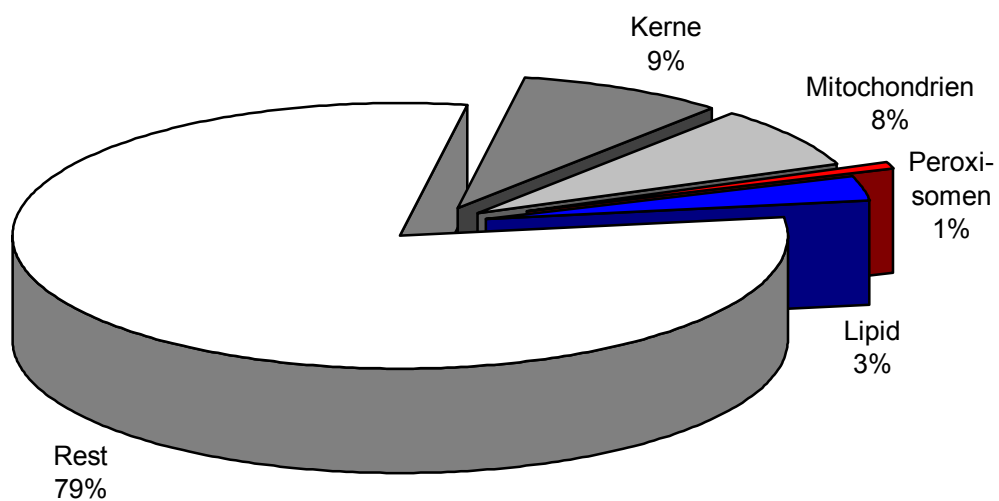


Abbildung 3.6-3: Prozentualer Anteil der morphometrisch erfassten Organellen in Bezug auf eine Gesamtfläche von $10 \mu\text{m}^2$ in Zebrabärblingen, die über 6 Monate mit 100 $\mu\text{g/l}$ DHEA belastet wurden. Der Anteil der Kerne an der Gesamtfläche ist gegenüber den Kontrollen größer, bleibt aber hinter dem Umfang des DMSO-Ansatzes zurück. Der Anteil der Mitochondrien ist geringer als in den Kontrollen aber stärker ausgeprägt im Vergleich zu den Tieren die mit DMSO belastet wurden. Genauso verhält es sich mit den Peroxisomen. Besonders deutlich ist die Zunahme von Lipid auf 3,3% des Gesamtanteils.

4 Diskussion

4.1 Clofibrat

Clofibrat ist ein Derivat der Clofibrinsäure und gehört zur größeren Gruppe der Fibrate. Diese werden aufgrund ihrer Eigenschaft, in Ratten, Mäusen und Kaninchen die Aktivität der Acyl-CoA-Oxidase und die Vermehrung der Anzahl der Peroxisomen in diesen Tieren zu stimulieren, funktionell auch zur Gruppe der Peroxisomenproliferatoren gezählt.

Im Blut wird Clofibrat an Albumine gebunden transportiert (Miller und Spence, 1998). Generell werden Fibrate im Körper von Säugern über das hepatare Cytochrom P450 3A4 verstoffwechselt (Miller und Spence, 1998). Im Falle des Clofibrat wird dabei die Esterbindung gespalten und Clofibrinsäure entsteht als aktiver Metabolit.

Clofibrat führt in Ratten auch noch zu einer Induktion von Cytochrom P450 4A1 (Lenart *et al.*, 1998). Die Induktion dieses Enzyms verläuft wahrscheinlich über die Bindung von Clofibrat an den Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR), die eine erhöhte Transkription des CYP4A1-Gens zur Folge hat (Simpson, 1997).

Die Proliferation von Peroxisomen durch Fibrate konnte im Menschen nicht nachgewiesen werden (Passilly *et al.*, 1996; Richert *et al.*, 1996; Goll *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei Säugern scheint auch bei Fischen die Fähigkeit verschiedener Stoffe, die Proliferation von Peroxisomen anzuregen, stark von der untersuchten Tierart abzuhängen. Verschiedene Fischarten (*Oncorhynchus mykiss*, *Dicentrarchus labrax*) sind refraktär in Bezug auf Peroxisomenproliferation (Orner *et al.*, 1995; Pretti *et al.*, 1999). Zum Teil wurde aber für gleiche Fischarten (*Oncorhynchus mykiss*) oder andere Arten eine Proliferation der Peroxisomen beobachtet (Yang *et al.*, 1990; Scarano *et al.*, 1994). Auch in der vorliegenden Arbeit konnte morphometrisch keine signifikante Zunahme der Peroxisomen in clofibratbehandelten Hepatocyten nachgewiesen werden. Insgesamt existieren nur wenige Arbeiten zur Peroxisomenproliferation in Fischen.

Clofibrat wird seit den 60er Jahren eingesetzt, um die Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin im Blutplasma zu senken. Damit geht eine Senkung des Herzinfarktrisikos einher. Die Werbung zu Regelan[®] (unter diesem Namen wurde Clofibrat in Deutschland verkauft) versprach „bestmöglichen Schutz vor einem Herzinfarkt“. Trotz dieser guten Aussichten wurde das Mittel seit Ende der 70er Jahre nur noch selten verschrieben. Dies lag nicht zuletzt daran, dass, laut International Programme on Chemical

Safety (INCHEM, 1996), 1978 eine Studie im Namen der World Health Organization (WHO) in Angriff genommen wurde, die klären sollte ob das Herzinfarktrisiko durch Clofibrat wirklich gesenkt werden kann. Im Verlauf dieser Untersuchung wurde ein nicht signifikanter Anstieg der Todesfälle aufgrund von Krebs bei den behandelten Patienten beobachtet. Dadurch wurde das wissenschaftliche Interesse an Clofibrat neu geweckt, und es wurden zahlreiche Untersuchungen hinsichtlich der Auslösung von Krebs durch Clofibrat durchgeführt.

Clofibrat ist auch eines der ersten Medikamente, das in Oberflächengewässern nachgewiesen wurde. So konnte es beispielsweise im Grundwasser des Berliner Umfelds gefunden werden (Halling-Sorensen *et al.*, 1998) und auch in verschiedenen Trinkwasserproben konnte Clofibrinsäure nachgewiesen werden (Bernini *et al.*, 1983), wobei die maximale gefundene Konzentration bei 70 ng/l lag.

Der Mechanismus der Krebsinduktion ist jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Modelle werden zur Zeit diskutiert: Zum Einen vermutet man, dass es durch die Peroxisomenproliferation zu einer Steigerung der Produktion reaktiver Sauerstoffmoleküle kommt (Kim *et al.*, 1998). Zum Anderen wird auch die Carcinogenese durch Aktivierung des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK)-Systems beschrieben (Rokos und Ledwith, 1997).

Die meisten Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen, die an Säugerzellen oder Säugtieren durchgeführt wurden (Kryvi *et al.*, 1990; Ostlund Farrants *et al.*, 1990), und die meisten Untersuchungen beziehen sich auf das Phänomen der Peroxisomenproliferation. In niederen Vertebraten wurden nur wenige Studien unternommen (Ruyter *et al.*, 1997; Pedrajas *et al.*, 1998; Ertl *et al.*, 1999; Pretti *et al.*, 1999; Sabourault *et al.*, 1999). Die Fähigkeit von Clofibrat, Apoptose auszulösen, wurde nur *in vitro* in menschlichen HepG2- und den von der Ratte stammenden AH-130-Zellen untersucht (Canuto *et al.*, 1997; Canuto *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen von Clofibrat auf primäre Hepatocyten aus der Regenbogenforelle und die ebenfalls aus der Regenbogenforelle stammenden RTG-2-Zellen untersucht. Nachdem zunächst ein Hauptaugenmerk auf eine mögliche Peroxisomenproliferation gelegt wurde, legten die ersten Ergebnisse nahe, diesen Prozess nicht weiter zu verfolgen und das gefundene Phänomen des Absterbens der Zellen genauer zu untersuchen. Der Verdacht, dass es sich bei dieser Art des Zelltods um Apoptose handelt, sollte anhand weiterer Versuche mit einem bekannten chemischen Induktor der Apoptose (Staurosporin) sowie einer Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, verfolgt werden.

In der Tat weisen viele der Ergebnisse aus den Versuchen mit Clofibrat darauf hin, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen tatsächlich Apoptose handelt. Allerdings sind auch einige Ergebnisse nicht in den Zusammenhang mit Apoptose zu bringen.

4.2 Cytotoxtests mit Clofibrat an RTG-2-Zellen

Nach Abschluss der Arbeiten ist verwunderlich, dass in ersten Cytotoxizitätstests mit RTG-2-Zellen die ED_{50} von Clofibrat auf über 2 mM bestimmt wurde (Abb. 3.5.1-1; 2). Wie sich zeigte, waren diese Konzentrationen für Hepatocyten aus der Regenbogenforelle eindeutig zu hoch und führten rasch zum Tod der Zellen. Auch später durchgeführte Arbeiten mit RTG-2-Zellen wiesen darauf hin, dass eine Konzentration von 2 mM auch für diesen Zelltyp toxisch waren. Alle benutzten Materialien wie Medium, Mediumzusätze (Antibiotika, Puffer) und eingesetztes Clofibrat waren identisch. Der einzige Unterschied lässt sich im benutzten Zellkulturmaterial finden. 24-Well- und 96-Well-Platten bestehen aus dem gleichen Material, so dass chemische Ursachen für die Unterschiede nicht in Betracht kommen. Eine mögliche Erklärung liegt in den physikalischen Eigenschaften der Kulturplatten. 96-Well-Platten besitzen im Vergleich zu 24-Well-Platten in Bezug auf die nutzbare Kulturfläche eine größere Oberfläche, so dass für die gemessenen Unterschiede in der Toxizität eine hohe Adsorptionsrate des stark lipophilen Clofibrat verantwortlich sein könnte. Eine Vertiefung in einer 96-Well-Platte besitzt eine Kulturfläche von $0,3 \text{ cm}^2$ (Nunc, Wiesbaden). Bei einem Arbeitsvolumen von 300 μl ergibt sich daraus eine Gesamtoberfläche von $2,18 \text{ cm}^2$. Damit beträgt die nutzbare Fläche rund 15% an der Gesamtfläche. Im Gegensatz dazu beträgt die Kulturfläche in einer 24-Well-Platte $1,9 \text{ cm}^2$. Das Arbeitsvolumen betrug 2 ml, woraus sich eine Gesamtfläche von $7,03 \text{ cm}^2$ errechnet. Der prozentuale Anteil der nutzbaren Fläche liegt hier demnach bei rund 27%. Aus diesen Berechnungen wird ersichtlich, dass bei einer Adsorption von Clofibrat aus dem Medium an das Plastikmaterial in einer 96-Well-Platte wesentlich mehr Material verloren geht als in einer 24-Well-Platte.

4.3 Apoptose durch Clofibrat in primären Hepatocyten aus der Regenbogenforelle?

Primärhepatocyten aus der Regenbogenforelle erleiden bei einer Belastung mit 1 mM Clofibrat extreme Schädigungen (Abb. 3.2.1-3 bis 16). Die Zellen überleben eine Belastung mit 1 mM Clofibrat nicht über einen längeren Zeitraum. Zu beachten ist dabei, dass eine einmalige Gabe von Clofibrat ausreicht, um diese Effekte hervorzurufen. Somit sind die beobachteten Veränderungen nicht reversibel. 0,5 mM Clofibrat führten dagegen zu weniger dramatischen Auswirkungen, die qualitativ auch eher an adaptive Antworten auf Stress darstellen (Abb. 3.2.1-1; 2; Braunbeck, 1995).

Die Belastung mit 1 mM Clofibrat führt zu einer Zunahme von p53 in den Hepatocyten (Abb. 3.2.5-1), zur Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme (Abb. 3.2.3-1 bis 7) und einer ringförmigen Kondensierung von Chromatin in der Zellperipherie (Abb.

3.2.1-7, 11 und 12). Ferner kommt es zu einer kompletten Umgestaltung des Endomembransystems und zur Akkumulation von Lipid (Abb. 3.2.1-6). Eine dramatische Veränderung erfährt auch die Morphologie der Mitochondrien bis hin zur Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran (Abb. 3.2.1-13 bis 22).

Die Kondensierung des Chromatins und die Aktivierung Caspase 3-artiger Enzyme stellen die deutlichsten Merkmale eines Absterbens durch Apoptose dar. Die Kondensierung der Erbsubstanz wurde als eines der wichtigsten Merkmale für Apoptose angeführt, genauer gesagt wurde das Phänomen der Apoptose anhand dieses Effekts erstmals beschrieben (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980).

Die anderen Phänomene weisen nicht zwangsläufig auf diese Art des Zelltods hin, und Hepatocyten, die über einen Zeitraum von 3 Tagen mit 2 mM Clofibrat belastet wurden, sind deutlich nekrotisch (Abb. 3.2.1-23 und 24). Im Organismus werden apoptotische Zellen durch Makrophagen aufgenommen, so dass es nicht zu Entzündungserscheinungen kommt. Da in der Zellkultur jedoch dieses schonende „Entsorgen“ apoptotischer Zellen fehlt, verbleiben die Reste apoptotischer Zellen in den Kulturgefäßen. Dies bezeichnet man als sekundäre Nekrose (Cotter und Al Rubeai, 1995).

4.3.1 Die Rolle der Mitochondrien

Die ultrastrukturellen Befunde zur mitochondrialen Morphologie sind zunächst nicht in einen direkten Zusammenhang mit einer Apoptose zu bringen. Es ist bekannt, dass im Verlauf der Apoptose die äußere Mitochondrienmembran für Cytochrom c durchlässig wird, so dass dieses aus dem Intermembranraum ins Cytoplasma gelangt. Dieses Protein dient als Schalter für die Apoptose. Verschiedene Modelle versuchen eine Erklärung des Freisetzungsmechanismus. Eines dieser Modelle geht von einer Öffnung eines Membrankanals, der sogenannten „Permeability Transition Pore“ (PTP), aus (Kroemer *et al.*, 1997; Green und Reed, 1998). Dieser besteht aus zwei Proteinkomplexen, jeweils einem in der inneren, dem Adeninnucleotid Translokator (ANT), und einem in der äußeren Mitochondrienmembran, dem spannungsabhängigen Anionenkanal (Voltage-Dependent Anion Channel, VDAC). Die Pore kann an den Stellen, an denen innere und äußere Membran zusammentreffen, gebildet werden (Bernardi *et al.*, 1994; Petit *et al.*, 1996). Durch die Öffnung dieser Pore wird der H^+ -Gradient zerstört und die oxidative Phosphorylierung wird entkoppelt (Green und Reed, 1998). Ferner kann Wasser in die Matrix der Mitochondrien eindringen, wodurch die Matrix anschwillt und schließlich die äußere Membran zerstört werden kann. Die Öffnung dieser Pore kann durch Bcl-2 verhindert werden (Zamzami *et al.*, 1996) während Bax die Öffnung fördert (Xiang *et al.*, 1996; Zamzami *et al.*, 1996). In einer Studie von Angermüller *et al.* (1998) konnte die Veränderung der Mitochondrienmorphologie inklusive der Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran in galactosaminsensitiven Mäusen nach Auslösen der Apoptose durch den Tumor-Nekrose-Faktor gezeigt werden. Die Zerstörung der äußeren Mito-

chondrienmembran kann einige, aber nicht alle Arten auftretender Apoptose erklären, da sehr viele Untersuchungen zur Apoptose zeigen, dass die Mitochondrienmorphologie nicht zwangsläufig zerstört sein muss (Eskes *et al.*, 1998; Martinou *et al.*, 2000). Es müssen daher auch noch andere Mechanismen der Cytochrom c-Freisetzung existieren. Bax und Bak, zwei proapoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie, sind in der Lage, in planen Lipidbilayern von sich aus Kanäle zu bilden (Antonsson *et al.*, 1997; Schlesinger *et al.*, 1997). Dies könnte ein Indiz für eine direkte Öffnung von Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran sein (Green und Reed, 1998). Jedoch ist der Durchmesser der Kanäle, die durch Bax oder Bak gebildet werden, nicht groß genug, um den Austritt von Cytochrom c in das Cytosol zu erlauben (Shimizu *et al.*, 1999). Bax bzw Bak sind jedoch in der Lage mit VDAC zu interagieren. Shimizu *et al.* (1999) rekonstituierten VDAC in Liposomen und nach Zugabe von Bax oder Bak konnte Cytochrom c die Membran passieren.

Die in dieser Studie dokumentierten ultrastrukturellen Veränderungen an den Mitochondrien weisen eindeutig auf eine Störung des inneren Milieus dieser Organellen hin (Abb. 3.2.1-13 bis 22). Die scheinbare Teilung in zwei Organellen, die jedoch keine Vollendung findet, betrifft vor allem die Organisation der mitochondrialen Matrix, aber auch die Ausbildung der Cristae. Eine Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran konnte nachgewiesen werden. Diese tritt allerdings erst spät auf, das Chromatin im Kern ist in den meisten Zellen dann schon kondensiert. Die Restrukturierung der Matrix eines Teils des geschädigten Mitochondriums in eine elektronenlichte Vakuole impliziert einen Vorgang der Schwellung, da es scheinbar zur Aufnahme von Wasser und gelösten Salzen kommt.

Cytosolisches Cytochrom c bindet in Anwesenheit von ATP an den Apoptotic Protease Activating Factor-1 (APAF-1) und die Procaspase 9. Dadurch wird das sogenannte Apoptosom gebildet (Li *et al.*, 1997), aus dem die aktive Caspase 9 entlassen wird. Diese Caspase aktiviert daraufhin andere Caspasen, darunter auch die Caspase 3.

Auch wenn in dieser Arbeit der eindeutige Nachweis einer Freisetzung von Cytochrom c in das Cytosol nicht geführt werden kann, da die Ergebnisse aus den Westernblots zwar tendenziell eine Verschiebung des Proteins von den Mitochondrien zum Cytoplasma hin nahelegen, diese Ergebnisse aber nicht zwingend auf Cytochrom c hindeuten, da das detektierte Protein viel größer war als das Cytochrom c aus anderen Tierarten, so ist doch bekannt, dass Clofibrat *in vitro* die Mitochondrien direkt beeinflusst. Es hemmt die Aktivität der Palmitoyl-CoA-Hydrolase und führt dadurch zu einer Anreicherung von Acyl-CoA. Dies wiederum bewirkt die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und die Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (Dixon *et al.*, 1990). Ferner wurde eine direkte Depolarisierung des mitochondrialen Membranpotentials *in vitro* beobachtet (Zhou und Wallace, 1999). Es könnte also auch in Hepatocyten aus der Regenbogenforelle zur Freisetzung von Cytochrom c kommen. Auch Qu *et al.* (1999) beschrieben die Mitochondrien als ein primä-

res Ziel von Clofibrat. Andererseits konnte *in vitro* in isolierten Mitochondrien von hungernden Albinoratten eine Verringerung des Cytochrom c-Gehalts durch Clofibrat nicht nachgewiesen werden (Rasheed *et al.*, 1980).

Ein besonders interessanter Aspekt, auch in Hinblick auf die Mitochondrien, wird durch die nachgewiesene Stabilisierung von p53 deutlich (Abb. 3.2.5-1). p53 ist ein Transkriptionsfaktor und eines der wichtigsten Proteine bei der Regulation von Apoptose und Zellzyklus. Es ist hauptsächlich im Kern einer Zelle zu finden und wird im Normalzustand durch Bindung an MDM2 aus dem Kern exportiert (Gottifredi und Prives, 2001) und zum Abbau markiert (Vousden und Woude, 2000). Im normalen physiologischen Zustand der Zelle ist p53 daher meist nicht oder nur in sehr geringen Mengen nachweisbar. Die Expression von MDM2 wird von aktivem p53 gefördert, wodurch es zu einer negativen Feedbackschleife kommt (Vousden, 2000). Gerät die Zelle unter Stress, zum Beispiel durch Schäden an der DNA, dann wird p53 aktiviert bzw. stabilisiert (Oren, 1994; Ko und Prives, 1996; Levine, 1997; Devireddy und Jones, 1999; Andoh, 2000; Huang *et al.*, 2000; Reaves *et al.*, 2000). Dies geschieht teilweise durch Inhibierung von MDM2 und kann auf verschiedene Arten realisiert werden. Zum Einen kann p53 phosphoryliert werden, wodurch MDM2 nicht mehr an dieses Protein binden kann (Shieh *et al.*, 1997). Zum Anderen erfolgt eine Bindung an ARF (alternate reading frame), einem Protein, dessen genetische Information beim Menschen im p16^{INK4A}-Locus zu finden ist, an MDM2, wodurch eine Bindung von MDM2 an p53 ebenfalls verhindert wird (Sherr und Weber, 2000). Nach der Stabilisierung und Aktivierung von p53 vollzieht dieses Molekül seine Funktion als Transkriptionsfaktor. Die meisten der stark induzierten Gene codieren Proteine, die mit dem Redoxstatus der Zelle in Zusammenhang stehen. Sie werden teilweise auch durch oxidativen Stress induziert oder generieren von sich aus reaktive Sauerstoffmoleküle (Polyak *et al.*, 1997). Reaktive Sauerstoffmoleküle sind ihrerseits wieder potente Induktoren der Apoptose (Kroemer *et al.*, 1997). Polyak *et al.* (1997) untersuchten daraufhin auch den Cardiolipingehalt in der Mitochondrienmembran. Cardiolipin ist besonders anfällig für zelluläre Oxidation (Petit *et al.*, 1995) und schon kurz nach der Aktivierung nahm der Gehalt von Cardiolipin deutlich ab (Polyak *et al.*, 1997). Dies zeigt eine starke Schädigung der Mitochondrien. Als Antwort auf eine p53-Aktivierung kommt es auch zu einer verstärkten Expression von Bax (Miyashita und Reed, 1995; Meßmer und Brüne, 1997). Auf die besonderen Funktionen von Bax wird weiter unten noch näher eingegangen.

Nach den erwähnten direkten Auswirkungen von Clofibrat auf die Mitochondrien, die in anderen Untersuchungen gezeigt wurden und die Effekte, die über eine Aktivierung von p53 ausgelöst werden, können die beobachteten Veränderungen in der Mitochondrienmorphologie in einen direkten Bezug zur Apoptose gebracht werden.

4.3.2 Das Endomembransystem

Im Zusammenhang mit Apoptose noch nie erwähnt wurden die beobachteten Veränderungen des Endomembransystems. In dieser Form treten diese Veränderungen beim UV- oder Staurosporin-induzierten Zelltod nicht auf. Die Ausläufer von der äußeren Kernmembran in das Cytosol wurde an tierischen Zellen in dieser Form bisher überhaupt nicht beschrieben (Abb. 3.2.1-11). Ein ähnliches Phänomen tritt unmittelbar vor der Beendigung der Zellteilung in Wurzelhaubenzellen von Pflanzen auf (Prof. Dr. Dr. E. Schnepf, persönlich). Die komplette Umgestaltung des Endomembransystems in einzelne das Cytoplasma durchziehende Zisternen (Abb. 3.2.1-7 und 10) wurde aber auch dort noch nicht beschrieben. Die Bedeutung bzw. Funktion dieser Veränderung bleibt unklar. Das endoplasmatische Retikulum spielt als Calciumspeicher eine Rolle in der Zellhomöostase, und die Freisetzung großer Mengen Calcium in das Cytosol wird ebenfalls als Induktor von Apoptose diskutiert (Jiang *et al.*, 1994). Ein morphologischer Effekt, der bei der Apoptose beschrieben wird, ist oft die Dilatierung des endoplasmatischen Retikulums (Lin *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 2000). Es wäre denkbar, dass diese Zisternen dazu benutzt werden, cytoplasmatisches Material in kleinere Portionen zu verpacken und durch Verschmelzung der so gebildeten Vesikel mit der Plasmamembran eine besondere Form des Blebbings zu bilden. In keiner der untersuchten Proben konnte jedoch eine Interaktion zwischen Zisternen des Endomembransystems und der Plasmamembran entdeckt werden.

Zusammen mit der Veränderungen des Endomembransystems kommt es zu einer Vermehrung der im Elektronenmikroskop dunkel gefärbten Lipidtropfen (Abb. 3.2.1-6). Eine hohe Osmiophilie deutet auf einen hohen Phospholipidanteil in diesen Tropfen hin. Hieraus entsteht ein neuer Ansatzpunkt für die Induktion der Apoptose. So konnten Pennacchiotti *et al.* (1996) ebenfalls eine Zunahme von Phospholipiden in Lebern aus mit Clofibrat behandelten Mäusen nachweisen. In letzter Zeit wird verstärkt über die Rolle von Phospholipiden als sekundäre Boten bei der Apoptose diskutiert (Zusammenfassung bei Kolesnick und Krönke, 1998).

4.3.3 Ergebnisse der biochemischen Versuche

Die Interpretation der biochemischen Ergebnisse ist zum Teil problematisch, da die benutzten Materialien grundsätzlich auf Säugersysteme abgestimmt sind und nicht zwangsläufig vergleichbare Ergebnisse in Systemen liefern, die auf Fischen basieren.

Westernblots mit polyklonalen Antikörpern gegen humane Caspase 3 führten in den untersuchten Proben immer zu einer Anfärbung einer einzelnen Bande, die in den Kontrollen ebenfalls deutlich zu erkennen ist. Bei Proben aus Säugetieren erkennen die An-

tikörper sowohl Procaspase 3 als auch die aktiven Untereinheiten der Protease. Das Molekulargewicht der Procaspase 3 liegt beim Mensch bei rund 32 kD (Fernandes-Alnemri *et al.*, 1994). Das nachgewiesene Protein bei der Regenbogenforelle ist wesentlich größer als humane Caspase 3 und besitzt ein Gewicht von rund 54 kD (Abb. 3.2.4-1 bis 3). Dies entspricht eher der Caspase 8 des Zebrafisches (Inohara und Nunez, 2000), das zu 52% homolog zu humaner Caspase 3 ist (Altschul *et al.*, 1997). Es wäre daher durchaus denkbar, dass es sich bei dem nachgewiesenen Protein nicht um die Caspase 3 der Regenbogenforelle handelt, sondern vielmehr eine Antigen-Antikörperreaktion mit der Proform der Caspase 8 darstellt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht erklärbar, in wie fern Caspase 8 bei der Auslösung der Apoptose in Forellenhepatocyten nach Belastung mit 1 mM Clofibrat beteiligt ist, jedoch lässt sich unter der Annahme, dass das detektierte Protein statt Procaspase 3 die Proform der Caspase 8 darstellt, feststellen, dass diese Caspase bei der Vermittlung der Apoptose durch Clofibrat nicht involviert ist, da eine Spaltung auszubleiben scheint. Caspase 8 (FLICE/MACH) wird im Normalfall als erste Caspase bei der FAS- bzw. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-induzierten Apoptose aktiviert (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Diese aktive Form spaltet ihrerseits wiederum die Procaspase 3 in ihre aktive Form (Fulda *et al.*, 1998). Ausgehend von den Annahmen, dass es sich bei dem identifizierten Protein um die Procaspase 8 handelt und dieser Protease im Fisch eine ähnliche bis identische Funktion zugeordnet werden kann wie bei Säugetieren ist es unwahrscheinlich, dass es im Verlauf der Apoptoseinduktion zu einer Aktivierung der Caspase 8 kommt. Woraus sich der Schluss ziehen lässt, dass FAS- und TNF-Rezeptoren an der durch Clofibrat ausgelösten Form des Zelltods nicht beteiligt sind.

Die Untersuchungen mit einem membranpermeablen Substrat der Caspase 3 im Verlauf des clofibratinduzierten Zelltods zeigen allerdings, dass eine Aktivierung stattfindet, so dass davon auszugehen ist, dass im Verlauf des Mechanismus, der letztlich zum Tode der Zellen führt, die nicht identifizierte Procaspase 3 oder ein in seiner Funktion homologes Enzym aktiviert wird und damit die finalen Schritte zum Abtöten der Zellen einleitet (Abb. 3.2.3-1 bis 7).

Der Einsatz eines membranpermeablen Inhibitors der Caspase 3 ist nicht in der Lage, das Absterben der Zellen zu verhindern (Abb. 3.29-1 bis 15). Dies bedeutet, vor allen Dingen im Vergleich zu Leberzellen, die mit Staurosporin und Inhibitor belastet wurden, bei denen die beobachteten Effekte, die durch Staurosporin hervorgerufen wurden, verschwanden (Abb. 3.4.3-1 bis 3), dass Clofibrat einen alternativen bzw. anderen Weg in der Vernichtung der Zellen gehen muss. Wenn das Abtöten der Hepatocyten durch Clofibrat auf Apoptose beruht, wie kann dann diese stattfinden, wenn die Caspase 3 als zentrale Caspase inhibiert wird? Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Bax und Bak (ein weiterer proapoptotischer Vertreter der Bcl-2-Familie) in der Lage sind, einen apoptoseartigen Zelltod auszulösen, auch wenn Caspasen inhibiert werden. So werden die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* durch Bax ab-

getötet, obwohl diese Hefen keine Bcl-2-artigen Proteine oder Caspasen besitzen (Zha *et al.*, 1996; Ink *et al.*, 1997; Jurgensmeier *et al.*, 1997). Diese Art des Abtötens kann durch die Zugabe von Bcl-2 verhindert werden (Abb.: 4.3-1; Green und Reed, 1998). Ferner ist Bax in der Lage, selbst in Anwesenheit eines Caspaseinhibitors den Zelltod auszulösen. Dabei treten sowohl DNA-Kondensierung als auch Membranveränderungen auf (Xiang *et al.*, 1996; McCarthy *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998). Ein Nachweis für eine Induktion oder das Vorhandensein von Bax konnte in dieser Arbeit allerdings nicht gezeigt werden, da die benutzten polyklonalen Säuger-Antikörper kein Protein im Westernblot detektierten. Auch der Apoptosis inducing factor (AIF) ist in der Lage, trotz einer Hemmung von Caspasen einen an Apoptose erinnernden Zelltod auszulösen.

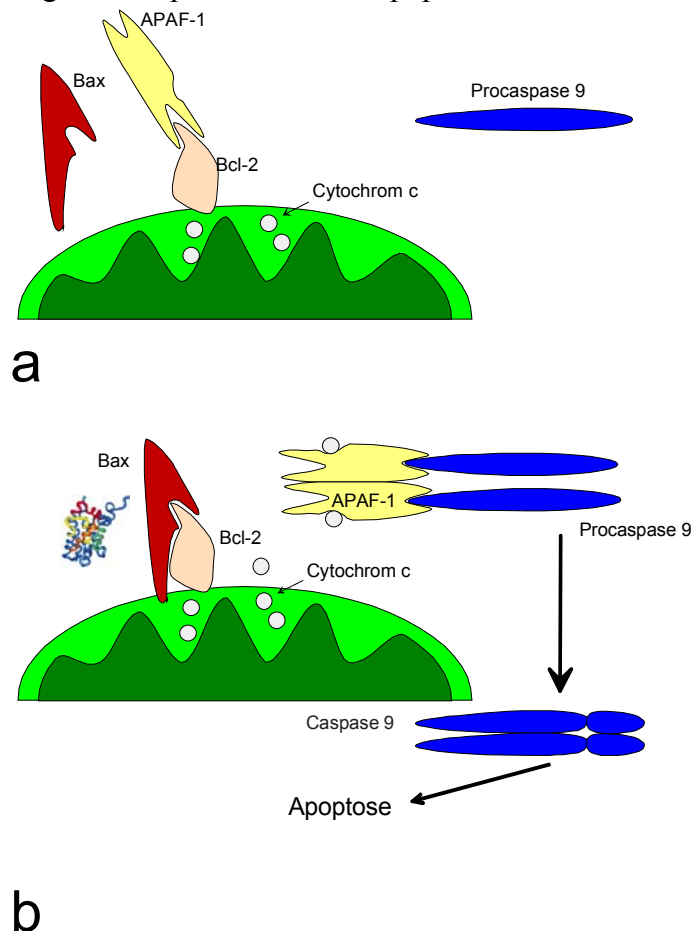


Abbildung 4.3-1: Die Interaktion zwischen pro- und antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie verhindert oder ermöglicht die Bindung von APAF-1. Wenn APAF-1 and das antiapoptotische Protein gebunden ist, tritt kein Cytochrom c aus den Mitochondrien aus (a). Interagieren allerdings pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, können Poren in der äußeren Mitochondrienmembran gebildet werden und Cytochrom c tritt aus. Dieses bindet (in Anwesenheit von ATP) an APAF-1. An das N-terminale Ende von APAF-1 kann daraufhin auch die Procaspase 9 binden, die im weiteren Verlauf aktiviert wird und als aktive Caspase 9 den Komplex verlässt (b, nach Adams und Cory, 1998, verändert).

Die Substrate der Caspasen sind vielfältig und etliche morphologisch erkennbare Veränderungen im Verlauf der Apoptose lassen sich auf die Spaltung von Proteinen durch Caspasen zurückführen. Grundsätzlich können die Substrate der Caspasen in drei größere Kategorien unterteilt werden (Rosen, 1996).

- Proteine, die eine Rolle in der Homöostase der Zelle spielen
- Strukturproteine
- Proteine mit unbekannter Funktion wie beispielsweise Huntingtin (Goldberg *et al.*, 1996) und die Preseniline, die eine Rolle bei Alzheimer spielen (Kim *et al.*, 1997; Loetscher *et al.*, 1997)

Zur ersten Gruppe gehören beispielsweise PARP (Kaufmann *et al.*, 1993; Lazebnik *et al.*, 1994), die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{CS}; (Casciola-Rosen *et al.*, 1995; Casciola-Rosen *et al.*, 1996; Han *et al.*, 1996; Song *et al.*, 1996), einige Komponenten des RNA-splicing-Komplexes (Casciola-Rosen *et al.*, 1994; Casciola-Rosen *et al.*, 1996) und die Ribonukleoproteine C1 und C2 (Waterhouse *et al.*, 1996). Durch die Spaltung solcher Proteine wird eine geregelte DNA-Reparatur und ein korrektes Splicen von mRNA unmöglich, wodurch die Tendenz zum Absterben der Zellen steigt (Casciola-Rosen *et al.*, 1996).

Weiterhin gehören in diese erste Gruppe von Homöostase-relevanten Proteinen noch zahlreiche Signaltransduktionsmoleküle wie die Proteinkinase C δ , D4-GDI als der GDP-Dissoziationsinhibitor der Rho-Familie-GTPasen und die Sterolregulationselement-bindenden Proteine SREBP1 und SREBP2. Besondere Beachtung gilt dem D4-GDI, da es durch seine Spaltung zu einer Aktivierung der Rho-Familie-GTPasen kommt. Diese GTPasen veranlassen eine Neuordnung des Cytoskeletts und eine Aktivierung der Stressaktivierten Proteinkinasen (SAPK/JNK), die in Zusammenhang mit Apoptose stehen (Zusammenfassung bei (Cryns und Yuan, 1998).

Zu den betroffenen Strukturproteinen gehören β -Actin (Mashima *et al.*, 1995; Kayalar *et al.*, 1996), die α -Untereinheit des actinbindenden Proteins Fodrin (Martin *et al.*, 1995; Cryns *et al.*, 1996) und Gas2 (Brancolini *et al.*, 1995). Die Spaltung von Actin wird als Induktor der Apoptose diskutiert, da die Zerstörung der Actinfilamente durch Polymerisationsinhibitoren wie Cytochalasin B und E zu Apoptose führt (Kolber *et al.*, 1990). Durch die Beeinflussung dieser Strukturelemente kommt es zur Schrumpfung und Abrundung der Zellen, was auch in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte. Auch die Lamine A, B und C sind Zielproteine von Caspasen, durch deren Spaltung die Kernlamina aufgelöst und die Kernfragmentierung eingeleitet wird (Lazebnik *et al.*, 1995; Orth *et al.*, 1996; Weaver *et al.*, 1996). Der Abbau der Kernlamina kann auch in clofibratbelasteten Zellen beobachtet werden, da es dort zu einer Ablösung des Chromatins von der Kernhülle kommt und keinerlei Anzeichen einer Lamina gefunden werden konnten (Abb. 3.2.1-8).

Der Mechanismus, der dem durch Clofibrat induzierten Zelltod zugrunde liegt, kann bisher nur hypothetisch dargestellt werden (Abb. 4.7-2), wobei es verschiedene alternative Möglichkeiten gibt. Als gesichert kann betrachtet werden, dass die Induktion der Apoptose über die Mitochondrien verläuft.

Clofibrat dringt in die Zellen ein und wird durch das Cytochrom P450 3A4 durch die Spaltung des Esters in seinen aktiven Metaboliten, die Clofibrinsäure, metabolisiert. Clofibrinsäure wirkt direkt an den Mitochondrien und durch Hemmung der Palmitoyl-CoA-Hydrolase und der daraus resultierenden Anreicherung von Acyl-CoA wird die oxidative Phosphorylierung entkoppelt, woraus eine Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran resultiert. Auch eine direkte Depolarisierung der äußeren Mitochondrienmembran ist denkbar. Die Depolarisierung der Membran könnte die Öffnung der Permeability Transition Pore (PTP) auslösen, Wasser dringt ein, die Mitochondrienmatrix schwillt und Cytochrom c kann aus dem Intermembranraum der Mitochondrien austreten und so die Apoptose einleiten. Ein anderer Ansatz basiert auf den Erkenntnissen aus einer Studie von (Qu *et al.*, 1999). Sie konnten nachweisen, dass Clofibrat in Leberzellen aus der Maus die Menge von 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG) und die Respirationsrate in den Mitochondrien erhöht und die Aktivität der Adenosintriphosphatase (ATPase) verringert. Dies weist auf oxidativen Stress in den Mitochondrien hin, der nicht unmittelbar auf den peroxisomenproliferierenden Effekt von Clofibrat zurückzuführen ist. Wie bereits erwähnt, kann oxidativer Stress in Zellen zu einer Schädigung der DNA führen. DNA-Schäden sind Stressfaktoren, die dazu führen, dass es zu einer Stabilisierung von p53 kommt. Dies kann letztlich wieder zur Induktion der Apoptose führen.

Im Vergleich zu apoptotischen Säugerzellen fehlen in den untersuchten Fischhepatocyten auch einige typische Merkmale. Hier ist vor allem das nur schwach ausgeprägte Blebbing zu nennen. Dies tritt in RTG-2-Zellen auf. Im Unterschied zu primären Hepatocyten proliferieren diese Zellen. In wie fern dieser Unterschied allerdings für das Blebbing relevant ist bleibt ungeklärt.

4.3.4 Vergleich mit RTG-2-Zellen

Nach den Ergebnissen aus den Cytotoxizitätstests wurde zunächst 2 mM Clofibrat als höchste Konzentration für die primären Hepatocyten gewählt. Diese erwiesen sich jedoch als zu hoch und die Leberzellen starben schnell ab. Spätere Untersuchungen mit RTG-2-Zellen zeigten, dass auch bei diesem Zelltyp eine Konzentration von 2 mM Clofibrat schnell zum Absterben der Zellen führt. Aber auch eine Konzentration von 1 mM Clofibrat erwies sich für Untersuchungen mit RTG-2-Zellen als zu hoch. Daher wurde für weitere Versuche als höchste Konzentration 0,5 mM gewählt. Bereits nach 1 Stunde konnten bereits Apoptosemerkmale identifiziert werden (Abb. 3.5.2-1 bis 10). RTG-2-Zellen reagieren also empfindlicher auf Clofibrat als Hepatocyten. Zum einen lässt sich

dieser Umstand mit der höheren Kulturtemperatur erklären, da Temperaturunterschiede in der Zellkultur die Toxizität von Stoffen erhöhen kann (Babich und Borenfreund, 1987), doch kann dies den Unterschied nicht ausreichend erklären. Der Temperaturunterschied ist nicht groß genug (14 °C bei Hepatocyten gegenüber 20 °C bei RTG-2-Zellen).

Es bestehen erhebliche Unterschiede zwischen RTG-2-Zellen und Hepatocyten. Zum einen sind primäre Leberzellen nicht in der Lage sich in Kultur zu vermehren wie die permanente Zelllinie. Ferner sind die metabolischen Fähigkeiten der RTG-2-Zellen im Vergleich zu Hepatocyten sehr begrenzt, da es sich dabei nicht um Zellen mit zentraler Stoffwechselfunktion im Gesamtorganismus handelt, sondern um Fibroblasten, die ursprünglich aus der Gonade der Regenbogenforelle stammen (Wolf und Quimby, 1962). Goncalves *et al.* (1998) konnten zeigen, dass RTG-2-Zellen im Vergleich zu anderen Zelllinien aus Fischen mehr Glucose verbrauchen und mehr Lactat produzieren. Dies zeigt an, dass diese Zellen weniger Stoffwechselaktivität aufweisen als Leberzellen aus der Regenbogenforelle.

Es wäre daher denkbar, dass RTG-2-Zellen auf eine Belastung mit Clofibrat in der Weise zu reagieren wie dies bei Hepatocyten auftritt. Das Biotransformationsvermögen ist in RTG-2-Zellen schwächer ausgebildet als bei den Leberzellen. Es wäre denkbar, dass RTG-2-Zellen nicht in der Lage sind, Clofibrat in nennenswertem Umfang zu metabolisieren. Dadurch käme es zu einer direkteren Wirkung von Clofibrat als dies in den Hepatocyten der Fall ist, da es dort neben der beschriebenen direkten Wirkung an den Mitochondrien auch noch zu einer Metabolisierung zu Clofibrinsäure kommt. Daher steht in den RTG-2-Zellen mehr Clofibrat zur Verfügung als dies in den Leberzellen der Fall ist. Hypothetisch wäre es daher möglich, dass Clofibrat selbst und nicht die Clofibrinsäure als Auslöser des Zelltods in Betracht gezogen werden muss.

4.4 Belastung von Hepatocyten mit Staurosporin

Staurosporin wird in Untersuchungen sehr häufig zur Induktion der Apoptose genutzt, da es Proteinkinasen inhibiert, was diese Art des Zelltods auslöst (Ferraris *et al.*, 1997; Bredel *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Hepatocyten aus der Regenbogenforelle mit 100 nM Staurosporin belastet. Bereits 2 Tage nach Beginn der Belastung zeigten sich in der Ultrastruktur Anzeichen einer beginnenden Apoptose mit unregelmäßigen Kernen und erhöhtem Chromatingehalt (Abb. 3.4.2-1 bis 5). Die Zellen selbst werden ebenfalls kleiner. Nach 3 Tagen sind diese Merkmale nicht mehr so deutlich ausgeprägt, aber im Cytosol finden sich etliche chromatinhaltige lysosomale Strukturen und auch deutlich apoptotische Zellen können beobachtet werden (Abb. 3.4.2-6 bis 11). Ein wichtiger Unterschied zu den mit Clofibrat belasteten Zellen ist die Unterdrückung aller be-

obachteten Veränderungen, wenn die Hepatocyten in Kombination mit Staurosporin und einem membrangängigen Caspase 3-Inhibitor simultan belastet werden (Abb. 3.4.3-1 bis 3). Dadurch wird belegt, dass es neben einem Caspase 3-vermittelten Absterben der Zellen noch eine weitere Art des Absterbens von Hepatocyten durch Clofibrat geben muss, die nicht speziell über die Caspase 3 vermittelt wird.

4.5 Belastung von Hepatocyten mit ultraviolettem Licht

Die Belastung von Zellen mit ultraviolettem Licht führt zu Photoprodukten (Basendimere) und DNA-Proteinvernetzungen (Hagen, 1994). Ferner wird durch UV-Strahlung auch die Expression von *c-fos* und *c-jun* induziert. Dies führt zur Bildung des AP-1-Transkriptionskomplexes, der an die AP-1-Promotersequenzen bindet und die Zielgene zur Expression anregt (Abate *et al.*, 1990; Devary *et al.*, 1991). Sowohl FOS als auch JUN besitzen Redox-sensitive Cysteinreste in ihrem DNA-bindenden Bereich, wodurch unter Umständen die Transkriptionsaktivität reguliert werden kann (Abate *et al.*, 1990). Ein weiterer Effekt von UV-Strahlung in Zellen ist die Aktivierung von MAP-Kinasen und JNK. JNK ist in der Lage *c-jun* zu phosphorylieren und damit zu aktivieren (Lo und Cruz, 1995; Lo *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden Hepatocyten aus der Regenbogenforelle für 10 Minuten einer UV-Strahlung im Wellenlängenbereich von 314 nm (UVB) ausgesetzt. Die Veränderungen in der Ultrastruktur setzen unmittelbar nach der Bestrahlung ein (Abb. 3.3.2-4 bis 6). Besonders auffällig sind die Fragmentierung des endoplasmatischen Retikulums sowie das Anschwellen der Mitochondrien. Auch Blebs, die von den Zellen abgeschnürt werden, konnten nachgewiesen werden. In wie fern diese allerdings auf Apoptose zurückzuführen sind, bleibt offen, da zumindest unmittelbar nach der Bestrahlung noch kein kondensiertes Material im Zellkern auftritt. Auch bei der Onkose ist eine leicht modifizierte Form des Blebbings gezeigt worden (Majno und Joris, 1995). Die zu späteren Zeitpunkten untersuchten lichtmikroskopischen Proben (ab 2h nach Bestrahlung) wiesen immer wieder kleinere Zellfragmente auf, die wie die Färbung zeigt, Chromatin beinhalten (Abb. 3.3.1-1 bis 6). Hier ist eher von einem Blebbing durch Apoptose auszugehen. Das Auftreten von Zellen mit Kernen, die extrem kondensiertes Chromatin enthielten (4 Stunden nach der Bestrahlung, Abb. 3.3.2-11 und 12), lässt immer noch keinen zwingenden Rückschluss auf den zugrunde liegenden Mechanismus zu, da diese Formen bei der Onkose ebenfalls auftreten können (Trump und Berezsky, 1998). Für ein Absterben der Zellen durch Onkose spricht auch das massive Auftreten von intrazellulären Vakuolen, die mit elektronenlichtem Inhalt gefüllt sind. Erst 6 Stunden nach Abschluss der Behandlung sind erste eindeutige Kennzeichen der Apoptose in Form von Apoptosekörpern zu finden (Abb. 3.3.2-13). Diese Anzeichen

treten jedoch nur selten auf. Im weiteren Verlauf zeigt ein großer Teil der Zellen Zeichen einer Regeneration, was ebenfalls mehr in Richtung Tod durch Onkose hinweist, da die Apoptose, wenn sie erst induziert wurde, ohne Zugriff von außen nicht mehr gestoppt wird (Abb. 3.3.2-18 und 19). Erst zu einem sehr späten Zeitpunkt (ab 54 h nach Bestrahlung) können kompakte Zellen mit stark deformierten Kernen in größerer Anzahl gefunden werden (Abb. 3.3.2-40 und 41).

Das dargestellte Bild beschreibt einen zweiphasigen Prozess. Zunächst kommt es durch die UV-Strahlung zu einer direkten Schädigung der Zellen, die nicht auf apoptoseinduzierte Vorgänge zurückzuführen sind. Zu einem späteren Zeitpunkt überwiegen dann Merkmale, die auf ein Absterben durch Apoptose hinweisen. Ein alternativer Erklärungsansatz kann gegeben werden, wenn man in Betracht zieht, dass es neben der Onkose und der Apoptose auch eine modifizierte Art der Apoptose gibt, die auch lysosomaler Zelltod genannt wird (Zakeri, 1998, Tab.: 4.5-1). Als Besonderheit im Gegensatz zur klassischen Apoptose tritt zunächst beim lysosomalen Zelltod eine massive Vermehrung lysosomaler Elemente in den Zellen auf während der Zellkern zunächst unverändert bleibt. Durch die Vermehrung der Lysosomen, die zu einem großen Teil Autophagosomen darstellen, wird der Hauptteil des Cytoplasmas abgebaut und die Zelle schrumpft. Erst in einem späten Stadium tritt dann die bekannte Kondensierung des Chromatins auf. Zu dieser Art des Zelltods lassen sich ebenfalls einige Parallelen aus den Versuchsergebnissen ziehen. Hierzu zählen vor allem das Auftreten großer Vakuolen, die auch Lysosomen darstellen können, und das verzögerte Kondensieren des Chromatins.

Tabelle 4.5-1: Unterschiede zwischen Apoptose und lysosomalen Zelltod Arten des physiologischen Zelltods im Vergleich zur Onkose. Die gegebenen Beispiele betreffen Zellen, die ohne speziellen Induktor absterben. Nach: Zakeri, 1998; verändert

Art des Zelltods	Apoptose	Lysosomal	Onkose
	Aktiver oder physiologischer Zelltod		
Synonyme	Typ 1	Typ 2; Vakuolär	
Beschreibung	Schrumpfen des Zellkerns und des Cytoplasmas, DNA-Leitern, TUNEL-positiv, Zellfragmentierung, Blebbing	Vermehrung der Lysosomen und anderer Vakuolen, späte Kondensierung des Chromatins aber möglicherweise TUNEL-positiv, Zellfragmentierung	Osmotisch bestimmte Schwellung und Zerstörung des Zelleibs
Auftreten	Primär Zellen mit lymphatischer und blutbildender Herkunft (kurzlebig)	Längerlebige Zellen	Jede schwerer beschädigte Zelle
Beispiele	Lymphocyten und Thymocyten	Insektenmuskel und Labialdrüse, Brustdrüsenzellen beim Säuger	

Der p53-Gehalt nimmt während des Versuchsverlaufs ab, so dass eine Induktion von Apoptose durch dieses Protein nahezu ausgeschlossen ist (Abb. 3.3.3-2). Dies steht in krassem Widerspruch zu Studien mit Säugetieren oder Säugerzellen. Dort ist eine UV-Bestrahlung mit einer Zunahme des p53-Gehalts korreliert (Campbell *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1993; Lu und Lane, 1993; Perry *et al.*, 1993; Zhan *et al.*, 1993). Westernblots mit polyklonalen Antikörpern gegen die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) zeigen 12 Stunden nach der Belastung eine deutlich intensiver gefärbte Bande, die auf ein Spaltprodukt hinweisen könnte, doch liegt auch hier wieder, wie bereits beim Westernblot gegen Procaspase 3/Caspase 3 keine Übereinstimmung der entdeckten Molekulargewichte mit dem PARP aus Säugern vor (Auer *et al.*, 1989). In diesem Fall ist das detektierte Molekül zu klein, so dass auch die Ergebnisse aus diesen Versuchen keinen Aufschluss über einen eventuellen Übergang von Onkose zu Apoptose geben können.

Es wäre denkbar, dass die Bestrahlung zu einer thermischen Schädigung der Hepatocyten geführt hat. Die Zellen, die solche Schäden überstehen und Zeichen der Regeneration zeigen, erhalten erst zu einem späteren Zeitpunkt das Signal zur Apoptose, da eine erfolgreiche Reparatur induzierter DNA-Schäden ausbleibt. Wie der programmierte Zelltod ausgelöst wird, wenn p53 in seinem Gehalt abnimmt, bleibt ungeklärt. Es ist allerdings bekannt, dass nicht jede Form der Apoptose über eine p53-Aktivierung ausgelöst wird.

4.6 Morphometrisch erfassbare Veränderungen in der Leber von *Danio rerio* nach Langzeit- belastung mit Dehydroepiandrosteron (DHEA)

DHEA ist ein zentraler Metabolit während der Synthese von Sexualhormonen (Zwain und Yen, 1999). Es ist, wie Clofibrat auch, als Peroxisomenproliferator in Nagetieren bekannt. Ein Mangel an endogenem DHEA resultiert häufig in Krankheiten wie Fettleber, Diabetes, Bluthochdruck, Immunschwächekrankheiten, Erkrankungen der Koronargefäße und Autoimmunkrankheiten (Zumoff *et al.*, 1981; Nestler *et al.*, 1988; Schriock *et al.*, 1988; Stahl *et al.*, 1992; Casson *et al.*, 1993; Labrie *et al.*, 1998). Die Umweltrelevanz von DHEA ist bislang umstritten, jedoch ist der zum Teil hohe Konsum, vor allem in den Vereinigten Staaten von Amerika, als Alterungshemmer und in Bezug auf andere die Lebensqualität verbessernde Effekte Grund genug, diese Substanz in ihrer Auswirkung auf andere Organismen zu untersuchen. DHEA wird als wahres Wundermittel angepriesen und im Internet findet man zahllose Einträge, die DHEA als *das* Medikament schlechthin anpreisen. Interessanterweise findet man auf diesen Seiten auch meist eine Möglichkeit, DHEA sofort käuflich zu erwerben.

Die Untersuchungen von Dr. Ute Bieberstein, die Zebrabärblinge im Life-Cycle-Ver-such mit DHEA belastete, zeigen Hodenstrukturveränderungen, Ovo-Testes in männ-lichen Tieren und verstärkte Atresie in Weibchen (Bieberstein, 2000). Männliche Tiere, die mit 100 µg/l DHEA belastet wurden, waren nicht zur Reproduktion befähigt (Bieberstein, 2000).

Eine quantitative Analyse der Ultrastruktur der Leber von makroskopisch männlichen Zebrabärblingen, die mit 100 µg/l DHEA belastet wurden, ist im Rahmen der vorlie-genden Arbeit durchgeführt worden. Die Ergebnisse weisen auf eine Beeinflussung des Lipidmetabolismus in den belasteten Tieren hin (Abb. 3.6-1 bis 3). Das verstärkte Auf-treten von Mischgonaden in diesen Tieren weist auf die Induktion der Vitellogenin-synthese hin. Vitellogenin stellt ein Phospholipoglycoprotein dar und wird in der Leber als Antwort auf im Kreislauf zirkulierendes Estrogen produziert. Es gelangt über das Blut zu den Ovarien. Dort wurde es über Pinocytose in die Oocyten aufgenommen und in die Dotterproteine Phosphitin und Vitellin gespalten (Wahli *et al.*, 1981; Tyler *et al.*, 1988; Specker und Sullivan, 1993; Buerano *et al.*, 1995). Der Lipidanteil im Vitello-genin von Teleosteen beträgt zwischen 13 und 22 % (Redshaw und Follett, 1971; Hori *et al.*, 1979; Campbell und Idler, 1980; de Vlaming *et al.*, 1980; Hara *et al.*, 1980; Nor-berg und Haux, 1985; Komatsu *et al.*, 1996). Die beobachtete Zunahme des Peroxiso-menanteils in den DHEA-belasteten Tieren gegenüber den DMSO-Behandelten Fischen lässt darauf schliessen, dass eine erhöhte Metabolisierung längerkettiger Fettsäuren stattfindet und durch DHEA eine Anregung des Lipidmetabolismus stattfindet. Die ultrastrukturellen Untersuchungen an DHEA-belasteten Zebrabärblingen zeigten eine Zunahme von Lipidtropfen im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) der Ver-suchstiere (Bieberstein, 2000). Dieses Phänomen wird allgemein als Steatose bezeichnet und tritt bei Säugetieren häufig auf. Es kann durch verschiedene Substanzen ausgelöst werden. Dazu gehören Glucocorticoide, Acetaminophen, Methotrexat, L-Asapargin-säure, Antibiotika, Colchicin, Ethionin, Insektenrepellentien und Pestizide (Phillips *et al.*, 1987). In Zebrabärblingen konnte Steatose nach einer Belastung mit γ-Hexachloro-cyclohexan (Lindan) nachgewiesen werden (Braunbeck *et al.*, 1990). Steatose verdeut-licht zusammen mit dem erhöhten Lipidmetabolismus zwei Faktoren, die bei der Vitel-logenese eine Rolle spielen. Zum einen werden im RER Exportproteine gebildet und damit auch das Vitellogenin selbst. Für dieses Protein muss Lipid bereitgestellt werden. Die exzessive Bereitstellung von Fett im RER könnte eine Fehlsteuerung des Lipidim-ports oder –exports in das RER oder aus diesem heraus darstellen. Ferner wird durch die Induktion der Vitellogenese der Energiebedarf in den Hepatocyten durch die erhöhte Proteinproduktion stark erhöht. Dieser Energiebedarf kann am besten mit Lipid gedeckt werden, da dieser Energielieferant die beste Ausbeute an ATP in Bezug auf das Mole-kulargewicht ermöglicht. Für eine Erhöhung des Energiestoffwechsels spricht auch die

Zunahme der Mitochondrien in DHEA-belasteten Tieren im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen.

4.7 Fazit

Diese Promotionsarbeit kann noch kein umfassendes Bild der Apoptose infolge Clofibratexposition von Fischzellen liefern. Zu viele Faktoren konnten nicht näher untersucht werden. Die größten Probleme lagen bei den verwendeten Materialien: Selbst bei scheinbar sehr konservativen Proteinen konnten etliche Antikörper gegen die homologen Säuger- oder Vogelproteine in der Regenbogenforelle nur bedingt eingesetzt werden. Die Resultate können trotz eindeutiger Reaktionen nicht zu hundert Prozent klären, ob es sich bei den jeweils detektierten Proteinen tatsächlich um homologe Formen der Proteine handelt. Leider sind Antikörper speziell gegen die gewünschten Fischproteine nicht im Handel erhältlich und eine Eigenproduktion derselben hätte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschritten. Weiterhin ist über die untersuchten, an der Apoptose beteiligten Proteine am Fisch selbst nur extrem wenig bekannt. So finden sich in den großen Proteindatenbanken zum Eintrag „caspase teleostei“ nur 8 Einträge (28. September 2001). Von diesen beschreiben 7 Caspasen aus *Danio rerio*, einem Modellversuchsfisch in der Molekularbiologie. 1 Eintrag beschreibt die Caspase 6 der Regenbogenforelle. Die Abfrage „PARP teleostei“ führt sogar nur zu einem einzelnen Treffer (28. September 2001), der das aktive Zentrum von PARP in *Oncorhynchus masou* darstellt. Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass kein allzu großes Interesse an den Sequenzen von Proteinen besteht, die an der Apoptose in Fischen beteiligt sind. Auch eine Suche nach Bax („Bax teleostei“) liefert nur einen Eintrag. Dabei handelt es sich um das Bax von *Danio rerio*. Im Laufe dieser Dissertationsarbeit wurden auch Untersuchungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Bax aus der Maus durchgeführt, da die Expressierung von Bax durch p53 angeregt wird und somit die Zellphysiologie in Richtung Tod gelenkt wird. Leider konnte keine Bindung des Antikörpers an ein Fischprotein im Westernblot festgestellt werden. Dies ist erstaunlich, da es sich bei Bax um ein sehr konservatives Protein handelt. Die Übereinstimmung zwischen Bax aus *Danio rerio* und *Mus musculus* beträgt 71% (Altschul *et al.*, 1997).

Im Falle des p53 ist die Lage nicht ganz so trostlos, da man sich in der Ökotoxikologie erhofft, dieses Protein als Biomarker etablieren zu können. Eine Stabilisierung und Aktivierung von p53 kann als Anzeiger für eine Belastung mit DNA-schädigenden Substanzen dienen.

Abschließend können folgende Erkenntnisse festgehalten werden: Clofibrat führt in isolierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle zur Apoptose, die auf zwei verschiedene Arten ausgelöst werden könnte. Zum einen über eine Stabilisierung von p53, das zu Produktion von BAX und reaktiven Sauerstoffmolekülen führt und so letztlich zur

Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien führt und dadurch die finalen Schritte der Apoptosekaskade einleitet. Alternativ ist eine direkte Wirkung von Clofibrat an Mitochondrien denkbar, so dass die Kaskade des Zelltods unmittelbar mit der Freisetzung von Cytochrom c beginnt. Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse aus den verschiedenen Zelltod-induzierenden Experimenten (Clofibrat, Staurosporin und UV-Licht), so werden einige Parallelen, aber auch viele Unterschiede deutlich. Allen Versuchen gemein ist zum einen die sekundäre Nekrose, die dadurch entsteht, dass Apoptosekörper nicht von anderen Zellen aufgenommen werden. Zurück bleiben Zellhüllen, die scheinbar nur noch aus Membranen bestehen. Eine weitere Gemeinsamkeit ist das Auftreten der dunklen Lipidtropfen, die sehr oft eng mit Zisternen des Endomembransystems vergesellschaftet sind. Weiterhin ist die Schwellung der Mitochondrien in allen Untersuchungen zu finden. Dies stellt aber nicht zwingend ein Merkmal von Apoptose dar, da das Anschwellen dieser Organellen oft auch eine unspezifische Reaktion auf eine Störung der Zellhomöostase darstellt (Abb. 4.1.7-1; Braunbeck, 1995).

Auch die Ausprägung der Kernform ist bei UV-, Staurosporin- und Clofibratbehandlung zu finden. Die Verteilung des Chromatins ist jedoch nicht immer gleich. Eine extreme Marginalisierung wie bei clofibratbelasteten Hepatocyten tritt bei Staurosporin und UV-Licht seltener auf.

Abschließend lässt sich der in Abbildung 4.7-2 dargestellte hypothetische Verlauf des durch Clofibrat induzierten Zelltods feststellen.



Abbildung 4.1.7-2: Hypothetischer Verlauf des Zelltods in Hepatocyten aus der Regenbogenforelle nach Belastung mit Clofibrat. Auch wenn die Caspase 3 gehemmt wird, sterben die Zellen ab. Dies bedeutet, dass ein alternativer Weg des Abtötens der Zellen existieren muss. Ein Ansatz dafür ist die nachgewiesene Fähigkeit von Bax oder auch Bak, Zellen in Anwesenheit eines Caspaseinhibitors abzutöten.

Generell reagierten Hepatocyten aus der Regenbogenforelle auf apoptoseinduzierende Stimuli wie Säugerzellen. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich beim Phänomen der Apoptose um einen hoch konservierten Prozess handelt, der bei allen eukaryotischen Organismen gleich ist. Er tritt schon bei Protozoen auf (Ameisen, 1998) und ist auch bei

Pflanzen ein häufig beobachtetes Phänomen (Mittler, 1998). Unterschiede zwischen Säugern und Fischen bestehen aber offensichtlich im zeitlichen Ablauf der Apoptose. Während bei Säugern dieser Prozess schon nach ein paar Stunden maximale Raten erreicht, dauert es bei den Hepatocyten aus der Regenbogenforelle erheblich länger. Dies lässt sich nicht alleine auf einen Temperaturunterschied zurückführen, da dieser zwar groß ist (14 °C Inkubationstemperatur bei Hepatocyten aus der Regenbogenforelle gegenüber 37 °C bei Säugerzellkulturen), aber nicht so gravierend ist, um die zeitliche Verzögerung von rund 48 Stunden bei Staurosporin bzw. 72 Stunden bei Clofibrat zu erklären. Weiterhin sind die effektiven Konzentrationen von Staurosporin in einem weitaus höheren Bereich angesiedelt als dies von Säugerzellen bekannt ist. Die Konzentration von Clofibrat bzw. Clofibrinsäure ist schwerer zu beurteilen. Viele Studien an Säugern wurden mit höheren Konzentrationen durchgeführt als Hepatocyten von Fischen in Kultur auch nur für kurze Zeit überleben. Dagegen gibt es auch Studien, die zeigen, dass auch Säugerzellen nach einer Behandlung mit 1mM Clofibrat über Apoptose zugrunde gehen (Canuto *et al.*, 1997; Canuto *et al.*, 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse stehen in Widerspruch zu den Befunden verschiedener anderer Studien. So wiesen (Donohue *et al.*, 1993) eine Zunahme der Acyl-CoA-Oxidase in Primärhepatocyten aus männlichen Regenbogenforellen nach 48-stündiger Belastung mit 2,25 – 3 mM Clofibrinsäure nach, ohne cytotoxische Phänomene zu beobachten. Furukawa *et al.* (1988) behandelten kultivierte Rattenhepatocyten mit 2 mM Natriumclofibrat für Untersuchungen zur Peroxisomenproliferation. Keller *et al.* (1990) perfundierten Rattenlebern mit 15 mM Clofibrat für Untersuchungen zur Toxizität, fanden allerdings bereits 20 min nach Beginn der Behandlung die ersten Anzeichen einer Schädigung durch das Auftauchen von Lactatdehydrogenase im aus der Leber austretenden Perfusionsmedium.

4.8 Ausblick

Die vorliegende Arbeit wirft viele Fragen hinsichtlich der Wirkung von Clofibrat auf Fischzellen auf. Der Mangel an Untersuchungen zur Apoptose an Fischen und die Fokussierung der Materialbereitstellung auf Säugersysteme erschwert die Interpretation der Ergebnisse.

Zur weiteren Vertiefung der auftretenden Abläufe in Zellen durch Belastung mit Clofibrat, sind biochemische und molekularbiologische Untersuchungen angezeigt, die speziell auf primäre Hepatocyten aus der Regenbogenforelle ausgelegt sind. Dazu muss zuerst der Bedarf an passenden Materialien gedeckt werden. Die Identifizierung von Proteinen und Genen, die in Fischen an der Apoptose beteiligt sind, und damit verbunden eine Entwicklung von Antikörpern und cDNA-Sonden gegen die gefundenen Pro-

teine und Gene können deutlichere biochemische Ergebnisse der Wirkung von Clofibrat auf Hepatocyten aus der Regenbogenforelle liefern.

Literatur

Abate, C., Patel, L. und Curran, T.; 1990: Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vivo; *Science*, **249** 1157-1161

Adams, J. M. und Cory, S.; 1998: The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival; *Science*, **281** 1322-1326

Alapetite, C., Wachter, T., Sage, E. und Moustacchi, E.; 1996: Use of the alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays; *Int. J. Radiat. Biol.*, **69** 359-369

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. und Yuan, J.; 1996: Human ICE/CED-3 protease nomenclature; *Cell*, **87** 171

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.; 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.*, **25** 3389-3402

Ameisen, J. C., 1998: The evolutionary origin and role of programmed cell death in single-celled organisms: A new view of executioners, mitochondria, host-pathogen interactions, and the role of death in the process of natural selection; 3-56, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

Andoh, T.; 2000: Signal transduction pathways leading to cell cycle arrest and apoptosis induced by DNA topoisomerase poisons; *Cell. Biochem. Biophys.*, **33** (2): 181-188

Angermüller, S., Kunstle, G. und Tiegs, G.; 1998: Pre-apoptotic alterations in hepatocytes of TNF α -treated galactosamine-sensitized mice; *J. Histochem. Cytochem.*, **46** (10): 1175-83

Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J. J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. und Martinou, J. C.; 1997: Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2; *Science*, **277** (5324): 370-372

Arlett, C. F., Lowe, J. E., Harcourt, S. A., Waugh, A. P. W., Cole, J., Roza, L., Diffey, B. L., Mori, T., Nikaido, O. und Green, M. H. L.; 1993: Hypersensitivity of human lymphocytes to UV-B and solar irradiation; *Cancer Res.*, **53** 609-614

Auer, B., Nagl, U., Herzog, H., Schneider, R. und Schweiger, M.; 1989: Human nuclear NAD⁺ ADP-ribosyltransferase(polymerizing): organization of the gene; *DNA*, **8** 575-580

Babich, H. und Borenfreund, E.; 1987: Aquatic pollutants tested in vitro with early passage fish cells; *Alternatives to Laboratory Animals*, **15** 116-122

Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L. und Korsmeyer, S. J.; 1985: Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18; *Cell*, **41** 899-906

Baksi, S. M. und Frazier, J. M.; 1988: A fish hepatocyte model for the investigation of the effects of environmental contaminants; *Mar. Environ. Res.*, **24** 141-145

Beier, K., Völkl, A., Metzger, C., Mayer, D., Bannasch, P. und Fahimi, H. D.; 1997: Hepatic zonation of the induction of cytochrome P450 IVA, peroxisomal lipid beta-oxidation enzymes and peroxisome proliferation in rats treated with dehydroepiandrosterone (DHEA). Evidence of distinct zonal and sex-specific differences; *Carcinogenesis*, **18** (8): 1491-1498

Bernardi, P., Broekemeier, K. M. und Pfeiffer, D. R.; 1994: Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane; *J. Bioenerg. Biomembr.*, **26** (5): 509-517

Bernini, F., Musanti, R., Trezzi, E., Corsini, A., Fumagalli, R., Meldolesi, J. und Catapano, A. L.; 1983: Experimental studies on the hypolipidemic activity of chloridarol; *Pharmacol. Res. Commun.*, **15** (2): 201-15

Bieri, F., Staubli, W., Waechter, F., Muakkassah-Kelly, S. und Bentley, P.; 1988: Stimulation of DNA synthesis but not of peroxisomal beta-oxidation by nafenopin in primary cultures of marmoset hepatocytes; *Cell. Biol. Int. Rep.*, **12** (2): 1077-1087

Blaauboer, B. J., van-Holsteijn, C. W., Bleumink, R., Mennes, W. C., van-Pelt, F. N., Yap, S. H., van-Pelt, J. F., van-Iersel, A. A., Timmerman, A. und Schmid, B. P.; 1990: The effect of beclobric acid and clofibrilic acid on peroxisomal beta-oxidation and peroxisome proliferation in primary cultures of rat, monkey and human hepatocytes; *Biochem. Pharmacol.*, **40** (3): 521-528

Bolaris, S., Bozas, E., Benekou, A., Philippidis, H. und Stylianopoulou, F.; 2001: In utero radiation-induced apoptosis and p53 gene expression in the developing rat brain; *Int. J. Radiat. Biol.*, **77** (1): 71-81

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V. und Wallach, D.; 1996: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease in FAS/APO-1- and TNF receptor induced cell death; *Cell*, **85** (6): 803-815

- Bonig, H., Korholz, D., Pafferath, B., Mauz-Korholz, C. und Burdach, S.; 1996: Interleukin 10 induced c-fos expression in human B cells by activation of divergent protein kinases; *Immunol. Invest.*, **25** (1-2): 115-128
- Borenfreund, E. und Puerner, J. A.; 1984: A simple quantitative procedure using monolayer for cytotoxicity assays (HTD/NR-90); *J. Tissue Cult. Methods*, **9** 7-9
- Borner, C., Martinou, I., Mattmann, C., Irmeler, M., Schaerer, E., Martinou, J. C. und Tschopp, J.; 1994: The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis; *J. Cell Biol.*, **126** (4): 1059-1068
- Bradford, M. M.; 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; *Anal. Biochem.*, **72** 248-254
- Brancolini, C., Benedetti, M. und Schneider, C.; 1995: Microfilament reorganization during apoptosis: The role of Gas2, a possible substrate for ICE-like proteases; *EMBO J.*, **14** 5179-5190
- Braunbeck, T., Gorge, G., Storch, V. und Nagel, R.; 1990: Hepatic steatosis in zebra fish (*Brachydanio rerio*) induced by long-term exposure to γ -hexachlorocyclohexane; *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **19** 355-374
- Braunbeck, T.; 1992: Isolated fish hepatocytes and permanent fish cell lines in cytotoxicity tests - an alternative to fish hepatocytes *in vivo*?; 153-154, H. Schoeffl, R. Schulte-Hermann und H. A. Tritthart; *Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen*; Springer; Wien & New York
- Braunbeck, T. und Storch, V.; 1992: Ageing of hepatocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in primary culture: cytological alterations; *Protoplasma*, **170** 138-159
- Braunbeck, T.; 1994: Entwicklung von Biotestverfahren mit Zellkulturen aus Fischen zum Nachweis letaler und subletaler Schäden von Organismen durch Umweltschadstoffe im Wasser; *Veröffentlichung PAO*, **8** 533-558
- Braunbeck, T.; 1995: Zelltests in der Ökotoxikologie, L. f. U. B. Württemberg, Projekt "Angewandte Ökologie", Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe,
- Bredel, M., Pollack, I. F., Freund, J. M., Rusnak, J. und Lazo, J. S.; 1999: Protein kinase C inhibition by UCN-01 induces apoptosis in human glioma cells in a time-dependent fashion; *J. Neurooncol.*, **41** (1): 9-20
-

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. und Hannon, G. J.; 1995: Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency; *Nature*, **377** 552-557

Buerano, C. C., Inaba, K., Natividad, F. F. und Morisawa, M.; 1995: Vitellogenesis of *Oreochromis niloticus*: identification, isolation, and biochemical and immunochemical characterization; *J. Exp. Zool.*, **273** 59-69

Campbell, C., Quinn, A. G., Angus, B., Farr, P. M. und Rees, J. L.; 1993: Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation; *Cancer Res.*, **53** (12): 2697-2699

Campbell, C. M. und Idler, D. R.; 1980: Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout as vitellogenin by the cross reactivity to ovarian yolk fractions; *Biol. Reprod.*, **22** 605-617

Canuto, R. A., Muzio, G., Maggiora, M., Autelli, R., Barbiero, G., Costelli, P., Bonelli, G. und Baccino, F. M.; 1997: Rapid and extensive lethal action of clofibrate on hepatoma cells in vitro; *Cell death and differentiation*, **4** (3): 224-232

Canuto, R. A., Muzio, G., Bonelli, G., Maggiora, M., Autelli, R., Barbiero, G., Costelli, P., Brossa, O. und Baccino, F. M.; 1998: Peroxisome proliferators induce apoptosis in hepatoma cells; *Cancer Detect. Prev.*, **22** (4): 357-66

Casciola-Rosen, L., Miller, D. K., Anhalt, G. J. und Rosen, A.; 1994: Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death; *J. Biol. Chem.*, **269** 30757-30760

Casciola-Rosen, L., Anhalt, G. J. und Rosen, A.; 1995: DNA-dependent protein kinase is one of a subset of autoantigens specifically cleaved early during apoptosis; *J. Exp. Med.*, **182** 1625-1634

Casciola-Rosen, L., Nicholson, D. W., Chong, T., Rowan, K. R., Thornberry, N. A., Miller, D. K. und Rosen, A.; 1996: Apopain/CPP32 cleaves proteins that are essential for cellular repair: A fundamental principle of apoptotic death; *J. Exp. Med.*, **183** 1957-1964

Casson, P. R., Andersen, R. N., Herrod, H. G., Stentz, F. B., Straughn, A. B., Abraham, G. E. und Buster, J. E.; 1993: Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women; *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **169** 1536-1539

Cerretti, D. P., Kozlovsky, C. J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T. A., March, C. J., Kronheim, S. R., Druck, T., Cannizzaro, L. A., Huebner, K. und Black, R. A.; 1992: Molecular cloning of the interleukin-1 β converting enzyme; *Science*, **256** 97-100

- Chang, S. H., Phelps, P. C., Berezesky, I. K., Ebersberger, M. L. und Trump, B. F.; 2000: Studies on the mechanisms and kinetics of apoptosis induced by microinjection of cytochrome c in rat kidney tubule epithelial cells (NRK-52E); *Am. J. Pathol.*, **156** (2): 637-649
- Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J.; 1998: BCL-2 family: regulators of cell death; *Annu. Rev. Immunol.*, **16** 395-419
- Chaudhary, D., O'Rourke, K., Chinnaiyan, A. M. und Dixit, V. M.; 1998: The death inhibitory molecules CED-9 and CED-4L use a common mechanism to inhibit the CED-3 death protease; *J. Biol. Chem.*, **273** (28): 17708-17712
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R. und Dixit, V. M.; 1997: Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death; *Science*, **275** (5303): 1122-1126
- Cleary, M. L. und Sklar, J.; 1995: Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** 7439-7443
- Cohen, A. J. und Grasso, P.; 1981: Review of the hepatic response to hypolipidaemic drugs in rodents and assessment of its toxicological significance to man; *Food Cosmet Toxicol*, **19** (5): 585-605
- Cory, S.; 1995: Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family; *Annu. Rev. Immunol.*, **13** 513-543
- Cotman, C. W., Cribbs, D. H., Pike, C. J. und Ivins, K. J.; 1998: Cell death in Alzheimer's disease; 385-410, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto
- Cotter, T. G. und Al Rubeai, M.; 1995: Cell death (apoptosis) in cell culture systems; *Trends in Biotechnology*, **13** 150-155
- Cryns, V. L., Bergeron, L., Zhu, H., Li, H. und Yuan, J.; 1996: Specific cleavage of α -fodrin during Fas- and tumor necrosis factor induced apoptosis is mediated by an interleukin-1 β -converting enzyme/Ced-3 protease distinct from the poly(ADP-ribose) polymerase protease; *J. Biol. Chem.*, **271** 31277-31282
- Cryns, V. L. und Yuan, J.; 1998: The cutting edge: Caspases in apoptosis and disease; 177-210, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto
-

- Daugas, E., Nochy, D., Ravagnan, L., Loeffler, M., Susin, S. A., Zamzami, N. und Kroemer, G.; 2000: Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis; *FEBS Lett.*, **476** 118-123
- de Vlaming, V. V., Wiley, H. S., Delahunty, G. und Wallace, R. A.; 1980: Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin: induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins; *Comp. Biochem. Physiol. B*, **67** 613-623
- Deng, C. X., Zhang, P. M., Harper, J. W., Elledge, S. J. und Leder, P.; 1995: Mice lacking p21 (CIP1/WAF1) undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control; *Cell*, **82** 675-684
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F. und Karin, M.; 1991: Rapid and preferred activation of the c-jun gene during the mammalian UV response; *Mol. Cell Biol.*, **11** 2804-2811
- Devireddy, L. R. und Jones, C. J.; 1999: Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release; *Journal of virology*, **73** (5): 3778-3788
- Dixon, A., Osterloh, J. und Becker, C.; 1990: Inhibition of palmitoyl co-enzyme A hydrolase in mitochondria and microsomes by pharmaceutical organic anions; *Journal of pharmaceutical sciences*, **79** (2): 103-105
- Dizdaroglu, M.; 1992: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin; *Mutat. Res.*, **275** 331-342
- Donohue, M., Baldwin, L. A., Leonard, D. A., Kosteki, P. T. und Calabrese, E. J.; 1993: Effect of hypolipidemic drugs gemfibrozil, ciprofibrate, and clofibric acid on peroxisomal beta-oxidation in primary cultures of rainbow trout hepatocytes; *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **26** (2): 127-132
- el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.; 1993: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression; *Cell*, **75** (4): 817-825
- Engeland, M. v., Kuipers, H. J., Ramaeckers, F. C., Reutelingsberger, C. P. und Schutte, B.; 1997: Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis; *Exp. Cell. Res.*, **235** 421-430
- Ertl, R. P., Bandiera, S. M., Buhler, D. R., Stegeman, J. J. und Winston, G. W.; 1999: Immunochemical analysis of liver microsomal cytochromes P450 of the American alligator, *Alligator mississippiensis*; *Toxicology and applied pharmacology*, **157** (3): 157-165
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. und Martinou, J. C.; 1998: Bax-induced cytochrome C release
-

from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg^{2+} ions; *J. Cell Biol.*, **143** (1): 217-224

Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G. und Alnemri, E. S.; 1994: CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme; *J. Biol. Chem.*, **269** (49): 30761-30764

Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G. und Alnemri, E. S.; 1996: In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** 7464-7469

Ferraris, C., Cooklis, M., Polakowska, R. R. und Haake, A. R.; 1997: Induction of apoptosis through the PKC pathway in cultured dermal papilla fibroblasts; *Exp. Cell Res.*, **234** (1): 37-46

Finkel, T. H. und Casella, C. R., 1998: AIDS and cell death; 289-318, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

Forth, W., 1992: *Pharmakologie und Toxikologie*, W. Forth, D. Henschler, W. Rummel und K. Starke, BI Wissenschaftsverlag; Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich

Frenkel, R. A., Slaughter, C. A., Orth, K., Moomaw, C. R., Hicks, S. H., Snyder, J. M., Bennett, M., Prough, R. A., Putnam, R. S. und Milewich, L.; 1990: Peroxisome proliferation and induction of peroxisomal enzymes in mouse and rat liver by dehydroepiandrosterone feeding; *J. Steroid Biochem.*, **35** (2): 333-342

Friedberg, E. C., Walker, G. C. und Siede, W., 1995: *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington DC

Fringes, B., Gorgas, K. und Reith, A.; 1988: Clofibrate increases the number of peroxisomes and of lamellar bodies in alveolar cells type II of the rat lung; *Eur. J. Cell Biol.*, **46** (1): 136-43

Fujikawa, K., Hasegawa, Y., Matsuzawa, S., Fukunaga, A., Itoh, T. und Kondo, S.; 2000: Dose and dose-rate effects of X rays and fission neutrons on lymphocyte apoptosis in p53(+/+) and p53(-/-) mice; *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **41** (2): 113-127

Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P. H., Peter, M. E. und Debatin, K. M.; 1998: Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells; *Cell Death Differ.*, **5** (10): 884-893

Furukawa, K., Mochizuki, Y. und Sawada, N.; 1984: Properties of peroxisomes and their induction by clofibrate in normal adult rat hepatocytes in primary culture; *In Vitro*, **20** (7): 573-84

Furukawa, K., Mochizuki, Y., Sawada, N., Gotoh, M. und Tsukada, H.; 1988: Morphometric and cytochemical evaluation of clofibrate-induced peroxisomal proliferation in adult rat hepatocytes cultured on floating collagen gels; *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.*, **55** (5): 279-85

Ganning, A. E., Brunk, U. und Dallner, G.; 1984: Phthalate esters and their effect on the liver; *Hepatology*, **4** (3): 541-547

Gartner, A. und Hengartner, M. O.; 1998: Genetic approaches to programmed cell death in *C. elegans*; 131-146, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

Goldberg, Y. P., Nicholson, D. W., Rasper, D. M., Kalchman, M. A., Koide, H. B., Graham, R. K., Bromm, M., Kazemi-Esfarjani, P., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P. und Hayden, M. R.; 1996: Cleavage of huntingtin by apopain, a proapoptotic cysteine protease, is modulated by the polyglutamine tract; *Nature Genetics*, **13** 442-449

Goll, V., Alexandre, E., Viollon-Abadie, C., Nicod, L., Jaeck, D. und Richert, L.; 1999: Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis, and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **160** (1): 21-32

Goncalves, L. M. D., Sousa, A. C. C., Lopez, T. und Carrondo, M. J. T.; 1998: *In vitro* testing of aquatic pollutants with established fish cell lines; *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, **1** (2): 55-60

Gorczyca, W., Gong, J. und Darzynkiewicz, Z.; 1993: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays; *Cancer Res.*, **53** (8): 1945-1951

Gottifredi, V. und Prives, C.; 2001: Getting p53 out of the nucleus; *Science*, **292** 1851-1852

Gray, T. J., Beamand, J. A., Lake, B. G., Foster, J. R. und Gangolli, S. D.; 1982: Peroxisome proliferation in cultured rat hepatocytes produced by clofibrate and phthalate ester metabolites; *Toxicol. Lett.*, **10** (2-3): 273-279

Gray, T. J., Lake, B. G., Beamand, J. A., Foster, J. R. und Gangolli, S. D.; 1983a: Peroxisomal effects of phthalate esters in primary cultures of rat hepatocytes; *Toxicology*, **28** (1-2): 167-179

- Gray, T. J., Lake, B. G., Beamand, J. A., Foster, J. R. und Gangolli, S. D.; 1983b: Peroxisome proliferation in primary cultures of rat hepatocytes; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **67** (1): 15-25
- Green, D. R. und Reed, J. C.; 1998: Mitochondria and apoptosis; *Science*, **281** (5381): 1309-12
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M. C. und Korsmeyer, S. J.; 1998: Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis; *EMBO J.*, **17** (14): 3878-3885
- Groundwater, P., Solomons, K., Drewe, J. und Munawar, M.; 1996: Protein tyrosine kinase inhibitors; *Prog. Med. Chem.*, **33** 323-329
- Haasch, M. L., Henderson, M. C. und Buhler, D. R.; 1998: Induction of lauric acid hydroxylase activity in catfish and bluegill by peroxisome proliferating agents; *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, **121** (1-3): 297-303
- Hagen, U.; 1994: Strahlungen; 630-649, H. Marquardt und S. G. Schäfer; *Lehrbuch der Toxikologie*; BI Wissenschaftsverlag; Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich
- Hall, P. A., McKee, P. H., Menage, H. D., Dover, R. und Lane, D. P.; 1993: High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin; *Oncogene*, **8** (1): 203-207
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten Luetzhof, H. C. und Jorgensen, S. E.; 1998: Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review; *Chemosphere*, **36** (2): 357-393
- Han, Z., Malik, N., Carter, T., Reeves, W. H., Wyche, J. H. und Hendrickson, E. A.; 1996: DNA-dependent protein kinase is a target for CPP32-like apoptotic protease; *J. Biol. Chem.*, **271** 25035-25040
- Hara, A., Yamauchi, K. und Hirai, H.; 1980: Immunochemical identification of female-specific serum protein (vitellogenin) and egg yolk proteins in japanese eel (*Anguilla japonica*); *Comp. Biochem. Physiol. B*, **65** 315-320
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J.; 1993: The p21 CDK-interacting protein cip-1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases; *Cell*, **75** 805-816
- Henschel, K. P., Wenzel, A., Diedrich, M. und Fliedner, A.; 1997: Environmental hazard assessment of pharmaceuticals; *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **25** (3): 220-5
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K. und Kratz, K. L.; 1999: Occurrence of antibiotics in the aquatic environment; *Sci. Total Environ.*, **225** (1-2): 109-118
-

Hockenbery, D., Nunez, G., Millman, C., Schreiber, R. D. und Korsmeyer, S. J.; 1990: Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death; *Nature*, **348** 334-336

Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L. und Braunbeck, T.; 2000: Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the Neckar River (Germany) during a winter flood; *Environ. Toxicol. Chem.*, **19** (3): 528-534

Hori, S. H., Kodama, T. und Tanahashi, K.; 1979: Induction of vitellogenin synthesis in goldfish by massive doses of androgens; *Gen. Comp. Endocrinol.*, **37** 306-320

Hsiang, Y.-H., Hertzberg, R., Hecht, S. und Liu, L. F.; 1985: Camptothecin induces proteinlinked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I; *J. Biol. Chem.*, **260** 14873-14878

Hsiang, Y.-H., Lihou, M. G. und Liu, L. F.; 1989: Arrest of DNA replication by drug-stabilized topoisomerase I-DNA cleavable complexes as a mechanism of cell killing by camptothecin; *Cancer Res.*, **49** 5077-5082

Hsu, Y. T., Wolter, K. G. und Youle, R. J.; 1997: Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (8): 3668-3672

Hsu, Y. T. und Youle, R. J.; 1998: Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations; *J. Biol. Chem.*, **273** (17): 10777-10783

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. und Nunez, G.; 1998: Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95** (8): 4386-4391

Huang, C., Li, J., Zheng, R. und Cui, K.; 2000: Hydrogen peroxide-induced apoptosis in human hepatoma cells is mediated by CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system and may involve activation of wild-type p53; *Molecular biology reports*, **27** (1): 1-11

INCHEM, <http://www.inchem.org/documents/iarc/iarc/iarc794.htm>

Ink, B., Zornig, M., Baum, B., Hajibagheri, N., James, C., Chittenden, T. und Evan, G.; 1997: Human Bak induces cell death in *Schizosaccharomyces pombe* with morphological changes similar to those with apoptosis in mammalian cells; *Mol. Cell Biol.*, **17** (5): 2468-2474

Inohara, N. und Nunez, G.; 2000: Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish; *Cell Death Differ.*, **7** (5): 509-510

Ishikawa, T., Masahito, P. und Takayama, S.; 1984: Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens; *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **65** 35-43

Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F. und Deppert, W.; 1999: The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity; *Cell. Mol. Life Sci.*, **55** 12-27

Jiang, S., Chow, S. C., Nicotera, P. und Orrenius, S.; 1994: Intracellular Ca²⁺ signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca(2+)-ATPase inhibitor thapsigargin; *Exp. Cell Res.*, **212** (1): 84-92

Johnson, V. L., Ko, S. C., Holmstrom, T. H., Eriksson, J. E. und Chow, S. C.; 2000: Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis; *J. Cell Sci.*, **113** (17): 2941-2953

Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J. C. und Oltwie, S.; 1997: Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*; *Mol. Biol. Cell*, **8** (2): 325-329

Karnovsky, M. J.; 1971: Use of ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy; *J. Cell. Biol.*, **51** 284

Kasai, H., Okada, Y., Nishimura, S., Rao, M. S. und Reddy, J. K.; 1989: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following long-term exposure to a peroxisome proliferator; *Cancer Res.*, **49** (10): 2603-5

Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N. E. und Poirier, G. G.; 1993: Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: An early marker of chemotherapy-induced apoptosis; *Cancer Res.*, **53** 3976-3985

Kayalar, C., Örd, T., Testa, M. P., Zhong, L.-T. und Bredesen, D. E.; 1996: Cleavage of actin by interleukin 1 β -converting enzyme to reverse DNase I inhibition; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** 2234-2238

Keller, B. J., Yamanaka, H., Liang, D. C. und Thurman, R. G.; 1990: Hepatotoxicity due to clofibrate is oxygen-dependent in the perfused rat liver; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104** (2): 259-66

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. und Currie, A. R.; 1972: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics; *Br. J. Cancer*, **26** (4): 239-57

Kim, S. C., Hong, J. T., Jang, S. J., Kang, W. S., Yoo, H. S. und Yun, Y. P.; 1998: Formation of 8-oxodeoxyguanosine in liver DNA and hepatic injury by peroxisome proliferator clofibrate and perfluorodecanoic acid in rats; *J. Toxicol. Sci.*, **23** (2): 113-9

Kim, T.-W., Oettingell, W. H., Jung, Y.-K., Kovacs, D. M. und Tanzi, R. E.; 1997: Alternative cleavage of Alzheimer-associated presenilins during apoptosis by a caspase-3 family protease; *Science*, **277** 373-376

- Kimble, J. und Hirsch, D.; 1979: The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*; Dev. Biol., **87** 396-417
- Kluck, R. M., Bossy Wetzell, E., Green, D. R. und Newmeyer, D. D.; 1997: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis; Science, **275** (5303): 1132-6
- Ko, L. J. und Prives, C.; 1996: p53: puzzle and paradigm; Genes Dev., **10** 1054-1072
- Kolber, M. A., Broschat, K. O. und Landa-Gonzalez, B.; 1990: Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation; FASEB J., **4** 3021-3027
- Kolesnick, R. N. und Krönke, M.; 1998: Regulation of ceramide production and apoptosis; Annu. Rev. Physiol., **60** 643-665
- Komatsu, M., Matsumoto, W. und Hayashi, S.; 1996: Protease activity appeared after trypsin treatment of the purified vitellogenin from eel *Anguilla japonica*; Comp. Biochem. Physiol. B, **113** 561-571
- Korsmeyer, S. J.; 1992: Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death; Blood, **80** 879-886
- Krammer, P. H.; 1996: The CD95 (APO-1/Fas) receptor ligand system: death signals and diseases; Cell Death Differ., **3** 159-160
- Kroemer, G.; 1997a: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis; Nat. Med., **3** (6): 614-620
- Kroemer, G.; 1997b: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis (vol 3, pg 614, 1997); Nature Medicine, **3** (8): 934-934
- Kroemer, G., Zamzami, N. und Susin, S. A.; 1997: Mitochondrial control of apoptosis; Immunol. Today, **18** 44-51
- Kroemer, G., Dallaporta, B. und Resche Rigon, M.; 1998: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis; Annu. Rev. Physiol., **60** 619-42
- Kruszweski, M., Wojewodzka, M., Iwanenko, T., Collins, A. R. und Szumiel, I.; 1998: Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation II. Base damage; Mutat. Res., **416** 37-57
- Kryvi, H., Kvannes, J. und Flatmark, T.; 1990: Freeze-fracture study of rat liver peroxisomes: evidence for an induction of intramembrane particles by agents stimulating peroxisomal proliferation; Eur. J. Cell Biol., **53** (2): 227-33
-

- Kulms, D. und Schwarz, T.; 2000: Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis; *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **16** (5): 195-201
- Laale, H.; 1977: The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review; *J. Fish Biol.*, **10** 121-173
- Labrie, F., Bélanger, A., Luu-The, V., Labrie, C., Simard, J., Cusan, L., Gomez, J.-L. und Can-das, B.; 1998: DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: Its role during ageing; *Steroids*, **63** 322-328
- Lackinger, D., Eichhorn, U. und Kaina, B.; 2001: Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-Fos, p53 or both; *Mutagenesis*, **16** (3): 233-241
- Lake, B. G., Gray, T. J., Foster, J. R., Stubberfield, C. R. und Gangolli, S. D.; 1984: Comparative studies on di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat and hamster; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72** (1): 46-60
- Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G. und Earnshaw, W. C.; 1994: Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE; *Nature*, **371** 346-347
- Lazebnik, Y. A., Takahashi, A., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H. und Earnshaw, W. C.; 1995: Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92** 9042-9046
- Lenart, J., Komanska, I., Jasinska, R. und Pikula, S.; 1998: The induction of cytochrome P450 isoform, CYP4A1, by clofibrate coincides with activation of ethanolamine-specific phospholipid base exchange reaction in rat liver microsomes; *Acta Biochim. Pol.*, **45** (1): 119-126
- Levine, A. J.; 1997: p53, the cellular gatekeeper for growth and division; *Cell*, **88** 323-331
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S. und Wang, X.; 1997: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade; *Cell*, **91** (4): 479-489
- Lin, T. Y., Wang, S. M., Fu, W. M., Chen, Y. H. und Yin, H. S.; 1999: Toxicity of tunicamycin to cultured brain neurons: ultrastructure of the degenerating neurons; *J. Cell. Biochem.*, **74** (4): 638-647
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X.; 1996: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c; *Cell*, **86** (1): 147-157
-

- Lo, Y. Y. C. und Cruz, T. F.; 1995: Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes; *J. Biol. Chem.*, **270** 11727-11730
- Lo, Y. Y. C., Wong, J. M. und Cruz, T. F.; 1996: Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2 terminal kinases; *J. Biol. Chem.*, **271** 15703-15707
- Loetscher, H., Deuschle, U., Brockhaus, M., Reinhardt, D., Nelboeck, P., Mous, J., Grünberg, J., Haass, J. und Jacobsen, H.; 1997: Presenilins are processed by caspase-type proteases; *J. Biol. Chem.*, **272** 20655-20659
- Lonskaya, I. A., Volgareva, E. V. und Rozanov, Y. M.; 2001: Two different types of apoptosis in thymocytes; *Tsitologiya*, **43** (3): 244-249
- Lu, X. und Lane, D. P.; 1993: Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?; *Cell*, **75** (4): 765-778
- Maccubbin, A. E.; 1994: DNA adduct analysis in fish: Laboratory and field studies; 267-294, D. C. Malins und G. K. Ostrander; *Aquatic Toxicology: Molecular, biochemical, and cellular perspectives*; Lewis Publishers; Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo
- Majno, G. und Joris, I.; 1995: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death; *Am. J. Pathol.*, **146** (3): 3-15
- Mancini, M., Nicholson, D. W., Roy, S., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Casciola Rosen, L. A. und Rosen, A.; 1998: The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling; *J. Cell Biol.*, **140** (6): 1485-95
- Martin, S. J., O'Brien, G. A., Nishioka, W. K., McGahon, A. J., Mahboubi, A., Saido, T. C. und Green, D. R.; 1995: Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis; *J. Biol. Chem.*, **270** 6425-6428
- Martin-Alguacil, N., Babich, H., Rosenberg, D. W. und Borenfreund, E.; 1991: In vitro response of the brown bullhead catfish cell line, BB, to aquatic pollutants; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **20** (1): 113-117
- Martinou, J.-C., Desagher, S. und Antonsson, B.; 2000: Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing; *Nature Cell Biology*, **2** E41-E43
- Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K. und Tsuruo, T.; 1995: Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217** 1185-1192
-

- McCarthy, N. J., Whyte, M. K., Gilbert, C. S. und Evan, G. I.; 1997: Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak; *J. Cell Biol.*, **136** (1): 215-227
- McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., McKearn, J. P. und Korsmeyer, S. J.; 1989: bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation; *Cell*, **57** 79-88
- McKee, R. H.; 2000: The role of inhibition of gap junctional intercellular communication in rodent liver tumor induction by phthalates: review of data on selected phthalates and the potential relevance to man; *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **32** (1): 51-55
- Meßmer, U. K. und Brüne, B.; 1997: Attenuation of p53 expression and Bax down-regulation during phorbol ester mediated inhibition of apoptosis; *British Journal of Pharmacology*, **121** 625-634
- Miller, D. B. und Spence, J. D.; 1998: Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates); *Clin. Pharmacokinet.*, **34** (2): 155-62
- Mittler, R.; 1998: Cell death in plants; 147-174, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto
- Miyashita, T. und Reed, J. C.; 1995: Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene; *Cell*, **80** 293-299
- Moody, D. E. und Reddy, J. K.; 1978: The hepatic effects of hypolipidemic drugs (clofibrate, nafenopin, fibric acid, and Wy-14,643) on hepatic peroxisomes and peroxisome-associated enzymes; *Am. J. Pathol.*, **90** (2): 435-450
- Moore, M. J. und Myers, M. S.; 1994: Pathobiology of chemical-associated neoplasia in fish; 327-386, D. C. Malins und G. K. Ostrander; *Aquatic toxicology. Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*; Lewis Publishers; Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo
- Muchmore, S. W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Yoon, H. S., Nettesheim, D., Chang, B. S., Thompson, C. B., Wong, S. L., Ng, S. L. und Fesik, S. W.; 1996: X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death; *Nature*, **381** (6580): 335-341
- Munoz, M. J., Castano, A., Blazquez, T., Vega, M., Carbonell, G., Ortiz, J. A., Carballo, M. und Tarazona, J. V.; 1994: Toxicity identification evaluations for the investigation of fish kills: a case study; *Chemosphere*, **29** (1): 55-61
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E. und Dixit, V. M.; 1996: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like prote-
-

ase, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex; *Cell*, **85** (6): 817-827

Nagata, S. und Golstein, P.; 1995: The FAS death receptor; *Science*, **267** 1449-1456

Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A. und Yuan, J.; 2000: Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β ; *Nature*, **403** 98-103

Nehls, S. und Segner, H.; 2001: Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay; *Environ. Toxicol.*, **16** (4): 321-329

Nestler, J. E., Barlascini, C. O., Clore, J. N. und Blackard, W. G.; 1988: Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat but does not alter insulin sensitivity in normal man; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66** 57-61

Nguyen, M., Branton, P. E., Walton, P. A., Oltvai, Z. N., Korsmeyer, S. J. und Shore, G. C.; 1994: Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus; *J. Biol. Chem.*, **269** (24): 16521-4

Norberg, B. und Haux, C.; 1985: Induction, isolation and a characterization of the lipid content of plasma vitellogenin from two *Salmo* species: Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and sea trout (*Salmo trutta*); *Comp. Biochem. Physiol. B*, **81** 869-876

Oltvai, Z. N., Millman, C. L. und Korsmeyer, S. J.; 1993: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death; *Cell*, **74** (4): 609-19

Omura, S., Iwai, Y., Hirano, A., Nakagawa, A., Awaya, J., Tsuchiya, H., Takahashi, Y. und Masuma, R.; 1977: A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization; *Journal of antibiotics*, **30** (4): 275-282

Onishi, Y., Azuma, Y., Sato, Y., Mizuno, Y., Tadakuma, T. und Kizaki, H.; 1993: Topoisomerase inhibitors induce apoptosis in thymocytes; *Biochim. Biophys. Acta*, **1175** (2): 147-154

Oren, M.; 1994: Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death; *Cancer Biol.*, **5** 221-227

Oren, M. und Rotter, V.; 1999: Introduction: p53 - the first twenty years; *Cell. Mol. Life Sci.*, **55** 9-11

Orner, G. A., Mathews, C., Hendricks, J. D., Carpenter, H. M., Bailey, G. S. und Williams, D. E.; 1995: Dehydroepiandrosterone is a complete hepatocarcinogen and potent

- tumor promoter in the absence of peroxisome proliferation in rainbow trout; *Carcinogenesis*, **16** (12): 2893-2898
- Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Garg, M., Froelich, C. J. und Dixit, V. M.; 1996: The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A; *J. Biol. Chem.*, **271** 16443-16446
- Ostlund Farrants, A. K., Bjorkhem, I. und Pedersen, J. I.; 1990: Differential induction of peroxisomal oxidation of palmitic acid and 3 alpha,7 alpha,12 alpha-trihydroxy-5 beta-cholestanoic acid in rat liver; *Biochim. Biophys. Acta*, **1046** (2): 173-7
- Pan, G., O'Rourke, K. und Dixit, V. M.; 1998: Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex; *J. Biol. Chem.*, **273** (10): 5841-5845
- Park, J. R. und Hockenbery, D. M.; 1996: Bcl-2, a novel regulator of apoptosis; *J. Cell. Biochem.*, **60** 12-17
- Passilly, P., Jannin, B., Hassell, S. J. und Latruffe, N.; 1996: Human HepG2 and rat Fao hepatic-derived cell lines show different responses to ciprofibrate, a peroxisome proliferator: analysis by flow cytometry; *Exp. Cell Res.*, **223** (2): 436-442
- Patel, V., Ensley, J. F., Gutkind, J. S. und Yeudall, W. A.; 2000: Induction of apoptosis in head-and-neck squamous carcinoma cells by gamma-irradiation and bleomycin is p53-independent; *Int. J. Cancer*, **88** (5): 737-743
- Patterson, S. D., Spahr, C. S., Daugas, E., Susin, S. A., Irinopoulou, T., Koehler, C. und Kroemer, G.; 2000: Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition; *Cell. Death. Differ.*, **7** (2): 137-144
- Pedrajas, J. R., Gavilanes, F., Lopez Barea, J. und Peinado, J.; 1998: Incubation of superoxide dismutase with malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal forms new active isoforms and adducts. An evaluation of xenobiotics in fish; *Chem. Biol. Interact.*, **116** (1-2): 1-17
- Pennacchiotti, G. L., Rotstein, N. P. und Avelano, M. I.; 1996: Effects of clofibrate on lipids and fatty acids of mouse liver; *Lipids*, **31** (2): 179-85
- Perry, M. E., Piette, J., Zawadzki, J. A., Harvey, D. und Levine, A. J.; 1993: The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (24): 11623-11627
- Petit, P. X., Lecoer, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. und Gougeon, M. L.; 1995: Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis; *J. Cell Biol.*, **130** (1): 157-167
- Petit, P. X., Susin, S. A., Zamzami, N., Mignotte, B. und Kroemer, G.; 1996: Mitochondria and programmed cell death: back to the future; *FEBS Lett.*, **396** (1): 7-13
-

- Phillips, M. J., Poucell, S., Patterson, J. und Valencia, P., 1987: The liver - An Atlas and Text of Ultrastructural Pathology, Raven Press, New York,
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1997: A model for p53-induced apoptosis; *Nature*, **389** (6648): 300-5
- Pretti, C., Novi, S., Longo, V. und Gervasi, P. G.; 1999: Effect of clofibrate, a peroxisome proliferator, in sea bass (*Dicentrarchus labrax*), a marine fish; *Environmental Research*, **80** (3): 294-296
- Prough, R. A., Webb, S. J., Wu, H. Q., Lapenson, D. P. und Waxman, D. J.; 1994: Induction of microsomal and peroxisomal enzymes by dehydroepiandrosterone and its reduced metabolite in rats; *Cancer Res.*, **54** (11): 2878-2886
- Pugh, G., Isenberg, J. S., Kamendulis, L. M., Ackley, D. C., Clare, L. J., Brown, R., Lington, A. W., Smith, J. H. und Klaunig, J. E.; 2000: Effects of di-isononyl phthalate, di-2-ethylhexyl phthalate, and clofibrate in cynomolgus monkeys; *Toxicol. Sci.*, **56** (1): 181-188
- Qu, B., Li, Q. T., Wong, K. P., Ong, C. N. und Halliwell, B.; 1999: Mitochondrial damage by the "pro-oxidant" peroxisomal proliferator clofibrate; *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (9-10): 1095-1102
- Ram, P. A. und Waxman, D. J.; 1994: Dehydroepiandrosterone 3 beta-sulphate is an endogenous activator of the peroxisome-proliferation pathway: induction of cytochrome P-450 4A and acyl-CoA oxidase mRNAs in primary rat hepatocyte culture and inhibitory effects of Ca(2+)-channel blockers; *Biochem. J.*, **301** (3): 753-758
- Rao, M. S., Musunuri, S. und Reddy, J. K.; 1992: Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat liver; *Pathobiology*, **60** (2): 82-86
- Rao, M. S., Reid, B., Ide, H., Subbarao, V. und Reddy, J. K.; 1994: Dehydroepiandrosterone-induced peroxisome proliferation in the rat: evaluation of sex differences; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **207** (2): 186-190
- Rasheed, B. K., Chhabra, S. und Kurup, C. K.; 1980: Influence of starvation and clofibrate administration on oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria; *Biochemical Journal*, **190** (1): 191-198
- Reaves, S. K., Fanzo, J. C., Arima, K., Wu, J. Y., Wang, Y. R. und Lei, K. Y.; 2000: Expression of the p53 tumor suppressor gene is up-regulated by depletion of intracellular zinc in HepG2 cells; *J. Nutr.*, **130** (7): 1688-1694
- Reddy, J. K. und Rao, M. S.; 1978: Enhancement by Wy-14,643, a hepatic peroxisome proliferator, of diethylnitrosamine-initiated hepatic tumorigenesis in the rat; *Br. J. Cancer*, **38** (4): 537-543
-

- Reddy, J. K. und Qureshi, S. A.; 1979: Tumorigenicity of the hypolipidaemic peroxisome proliferator ethyl-alpha-p-chlorophenoxyisobutyrate (clofibrate) in rats.; Br. J. Cancer, **40** (3): 476-482
- Redshaw, M. R. und Follett, B. K.; 1971: The crystalline yolk-platelet proteins and their soluble plasma precursor in an amphibian, *Xenopus laevis*; Biochem. J., **124** 759-766
- Reuter, W.; 1982a: Clofibrate therapy--current status from a gerontological viewpoint; ZFA, **37** (5): 341-8
- Reuter, W.; 1982b: Clofibrate therapy--the status quo; Z. Gesamte Inn. Med., **37** (2): 59-63
- Richert, L., Price, S., Chesne, C., Maita, K. und Carmichael, N.; 1996: Comparison of the induction of hepatic peroxisome proliferation by the herbicide oxadiazon in vivo in rats, mice, and dogs and in vitro in rat and human hepatocytes; Toxicol. Appl. Pharmacol., **141** (1): 35-43
- Rodriguez, C., Noe, V., Cabrero, A., Ciudad, C. J. und Laguna, J. C.; 2000: Differences in the formation of PPARalpha-RXR/alphaPPRE complexes between responsive and non-responsive species upon fibrate administration; Mol. Pharmacol., **58** (1): 185-193
- Rokos, C. L. und Ledwith, B. J.; 1997: Peroxisome proliferators activate extracellular signal-regulated kinases in immortalized mouse liver cells; J. Biol. Chem., **272** (20): 13452-7
- Rosen, A.; 1996: Huntington: New marker along the road of death?; Nature Genetics, **13** 380-382
- Ruegg, U. und Burgess, G.; 1989: Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but non-specific inhibitors of protein kinases; Trends Pharmacol. Sci., **10** 218-220
- Ruyter, B., Andersen, O., Dehli, A., Ostlund Farrants, A. K., Gjoen, T. und Thomassen, M. S.; 1997: Peroxisome proliferator activated receptors in Atlantic salmon (*Salmo salar*): effects on PPAR transcription and acyl-CoA oxidase activity in hepatocytes by peroxisome proliferators and fatty acids; Biochim. Biophys. Acta, **1348** (3): 331-8
- Sabourault, C., de Sousa, G., Amichot, M., Cuany, A., Rahmani, R., Salauen, J. P., Berge, J. B., Girard, J. P. und Lafaurie, M.; 1999: Tissue-specific induction and inactivation of cytochrome P450 catalysing lauric acid hydroxylation in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*; Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology, **122** (2): 253-260
- Sak, A., Stuschke, M., Stapper, N. und Streffer, C.; 1996: Induction of DNA double-strand breaks by ionizing radiation at the c-myc locus compared with the whole ge-
-

nome: a study using pulsed-field gel electrophoresis and gene probing; *Int. J. Radiat. Biol.*, **69** 679-685

Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R. P., Harlan, J. E., Eberstadt, M., Yoon, H. S., Shuker, S. B., Chang, B. S., Minn, A. J., Thompson, C. B. und Fesik, S. W.; 1997: Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis; *Science*, **275** (5302): 983-986

Scarano, L. J., Calabrese, E. J., Kostecki, P. T., Baldwin, L. A. und Leonard, D. A.; 1994: Evaluation of a rodent peroxisome proliferator in two species of freshwater fish: rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*); *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **29** (1): 13-19

Schlesinger, P. H., Gross, A., Yin, X. M., Yamamoto, K., Saito, M., Waksman, G. und Korsmeyer, S. J.; 1997: Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (21): 11357-11362

Schriock, E. D., Buffington, C. K., Hubert, G. D., Kurtz, B. R., Kitabchi, A. E., Buster, J. E. und Givens, J. R.; 1988: Divergent correlations of circulating dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone with insulin levels and insulin receptor binding; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **66** 1329-1331

Sherr, C. J. und Weber, J. D.; 2000: The ARF/p53 pathway; *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **10** (1): 94-99

Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y. und Prives, C.; 1997: DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2; *Cell*, **91** 325-334

Shimizu, S., Narita, M. und Tsujimoto, Y.; 1999: Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC; *Nature*, **399** (6735): 483-487

Simpson, A. E.; 1997: The cytochrome P450 4 (CYP4) family; *Gen. Pharmacol.*, **28** (3): 351-359

Soliman, M. S., Cunningham, M. L., Morrow, J. D., Roberts, L. J. und Badr, M. Z.; 1997: Evidence against peroxisome proliferation-induced hepatic oxidative damage; *Biochem. Pharmacol.*, **53** (9): 1369-1374

Song, Q., Lees-Miller, S. P., Kumar, S., Zhang, Z., Chan, D. W., Smith, G. C., Jackson, S. P., Alnemri, E. S., Litwack, G., Khanna, K. K. und Lavin, M. F.; 1996: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: A target for an ICE-like protease in apoptosis; *EMBO J.*, **15** 3238-3246

Specker, J. L. und Sullivan, C. V.; 1993: Vitellogenesis in fishes: status and perspectives; 304-315, K. G. Davey, R. E. Peter und S. S. Tobe; *Perspectives in Comparative Endocrinology*; National Research Council of Canada; Ottawa

- Stahl, F., Schnorr, D., Pilz, C. und Dorner, G.; 1992: Dehydroepiandrosterone (DHEA) levels in patients with prostatic cancer, heart diseases and under surgery stress; *Exp. Clin. Endocrinol.*, **99** 68-70
- Strasser, A., Huang, D. C. und Vaux, D. L.; 1997: The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumourigenesis and resistance to chemotherapy; *Biochim. Biophys. Acta*, **1333** (2): F151-F178
- Stumpf, M., Ternes, T., Haberer, K., Seel, P. und Baumann, W.; 1996: Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern; *Vom Wasser*, **86** 291-303
- Sulston, J. E. und Horvitz, H. R.; 1977: Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*; *Dev. Biol.*, **56** 110-156
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N.; 1983: The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*; *Dev. Biol.*, **100** 64-119
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M. und Kroemer, G.; 1996: Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease; *J. Exp. Med.*, **184** (4): 1331-1341
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M. C., Alzari, P. M. und Kroemer, G.; 1999: Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process; *J. Exp. Med.*, **189** (2): 381-394
- Svoboda, D. J. und Azarnoff, D. L.; 1979a: Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug; *Cancer Research*, **39** (9): 3419-3428
- Svoboda, D. J. und Azarnoff, D. L.; 1979b: Tumors in male rats fed ethyl chlorophenoxyisobutyrate, a hypolipidemic drug; *Cancer Res.*, **39** (9): 3419-3428
- Tan, S., Wood, M. und Maher, P.; 1998: Oxidative stress induces a form of programmed cell death with characteristics of both apoptosis and necrosis in neuronal cells; *J. Neurochem.*, **71** (1): 95-105
- Taylor, L. K., Marshak, D. R. und Landreth, G. E.; 1993: Identification of a nerve growth factor- and epidermal growth factor-regulated protein kinase that phosphorylates the protooncogene product c-Fos; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90** (2): 368-372
- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., Elliston, K. O., Ayala, J. M., Casano, F. J., Chin, J., Ding, G. J.-F., Egger, L. A., Gaffney, E. P., Limjuco, G., Palyha, O. C., Raju, S. M., Rolando, S. M., Salley, J. P., Yamin, T.-T., Lee, T. D., Shively, J. E., MacCross, M., Mumford, R. A., Schmidt, J. A. und Tocci, M. J.; 1992: A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes; *Nature*, **356** 768-774
-

Tornaletti, S. und Pfeifer, G. P.; 1996: UV damage and repair mechanisms in mammalian cells; *BioEssays*, **18** 221-228

Trump, B. F., Berezsky, I. K., Chang, S. H. und Phelps, P. C.; 1997: The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis; *Toxicol. Pathol.*, **25** (1): 82-8

Trump, B. F. und Berezsky, I. K., 1998: The reactions of cells to lethal injury: Oncosis and necrosis - the role of calcium; 57-96, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. und Corce, C. M.; 1985: The t(14;18) chromosome translocation involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining; *Science*, **229** 1390-1393

Tyler, C. R., Sumpter, J. P. und Bromage, N. R.; 1988: The selectivity of protein sequestration by vitellogenic oocytes of rainbow trout *Salmo gairdneri* in vivo; *J. Exp. Zool.*, **248** 199-206

Vainio, H., Linnainmaa, K., Kahonen, M., Nickels, J., Hietanen, E., Marniemi, J. und Peltonen, P.; 1983: Hypolipidemia and peroxisome proliferation induced by phenoxyacetic acid herbicides in rats; *Biochem. Pharmacol.*, **32** (18): 2775-2779

Vaux, D. L., Cory, S. und Adams, J. M.; 1988: Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells; *Nature*, **335** 440-442

Vavrova, J., Marekova, M. und Vokurkova, D.; 2001: Radiation-induced apoptosis and cell cycle progression in TP53-deficient human leukemia cell line HL-60; *Neoplasma*, **48** (1): 26-33

Vonarx, E. J., Mitchell, H. L., Karthikeyan, R., Chatterjee, I. und Kunz, B. A.; 1998: DNA repair in higher plants; *Mutat. Res.*, **400** 187-200

Vousden, K. H.; 2000: p53: Death Star; *Cell*, **103** 691-694

Vousden, K. H. und Woude, G. F.; 2000: The ins and outs of p53; *Nat. Cell Biol.*, **2** (10): E178-180

Wahli, W., Dawid, I. B., Ryffel, G. U. und Weber, R.; 1981: Vitellogenesis and the vitellogenin gene family; *Science*, **212** 298-304

Wall, M. E., Wani, M. C., Cook, C. E., Palmar, K. H., MacPhail, A. T. und Sim, G. A.; 1966: Plant antitumor agents, 1. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*; *J. Am. Chem. Soc.*, **88** 3888-3890

- Walton, D. G., Acton, A. B. und Stich, H. F.; 1984a: Comparison of DNA-repair synthesis, chromosome aberrations and induction of micronuclei in cultured human fibroblast, Chinese hamster ovary and central mudminnow (*Umbra limi*) cells exposed to chemical mutagens; *Mutat. Res.*, **129** 129-136
- Walton, D. G., Acton, A. B. und Stich, H. F.; 1984b: DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach, and intestinal cells isolated from rainbow trout; *Cancer Res.*, **44** 1120-1121
- Waterhouse, N., Kumar, S., Song, Q., Strike, P., Sparrow, L., Dreyfuss, G., Alnemri, E. S., Litwack, G., Lavin, M. und Watters, D.; 1996: Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1 β -converting enzyme-like proteases in apoptosis; *J. Biol. Chem.*, **271** 29335-29341
- Waxman, D. J.; 1996: Role of metabolism in the activation of dehydroepiandrosterone as a peroxisome proliferator; *J. Endocrinol.*, **150** (SupplS): 129-147
- Weaver, V. M., Carson, C. E., Walker, P. R., Chaly, N., Lach, B., Raymond, Y., Brown, D. L. und Sikorska, M.; 1996: Degradation of nuclear matrix and DNA cleavage in apoptotic thymocytes; *J. Cell. Sci.*, **109** 45-56
- Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Iwanenko, T., Collins, A. R. und Szumiel, I.; 1998: Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation I.; *Mutat. Res.*, **416** 21-35
- Wolf, K. und Quimby, M. C.; 1962: Established eurythermic line of fish cells *in vitro*; *Science*, **135** 1065-1066
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F. und Currie, A. R.; 1980: Cell death: the significance of apoptosis; *Int. Rev. Cytol.*, **68** 251-306
- Xiang, J., Chao, D. T. und Korsmeyer, S. J.; 1996: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (25): 14559-63
- Yang, E. und Korsmeyer, S. J.; 1996: Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death; *Blood*, **88** (2): 386-401
- Yang, J. H., Kostecki, P. T., Calabrese, E. J. und Baldwin, L. A.; 1990: Induction of peroxisome proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate; *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104** (3): 476-482
- Yoshida, A., Ueda, T., Wano, Y. und Nakamura, T.; 1993: DNA damage and cell killing by camptothecin and its derivative in human leukemia HL-60 cells; *Jpn. J. Cancer Res.*, **84** (5): 566-573
-

Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M. und Horvitz, H. R.; 1993: The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme; *Cell*, **75** 641-652

Zakeri, Z., 1998: The study of cell death by the use of cellular and developmental models; 97-129, R. A. Lockshin und Z. Zakeri; *When cells die - a comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death*; Wiley-Liss; New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto

Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez Monterrey, I., Castedo, M. und Kroemer, G.; 1996: Mitochondrial control of nuclear apoptosis; *J. Exp. Med.*, **183** (4): 1533-44

Zamzami, N., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A. und Kroemer, G.; 1998: Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins; *Oncogene*, **16** (17): 2265-2282

Zha, H., Fisk, H. A., Yaffe, M. P., Mahajan, N., Herman, B. und Reed, J. C.; 1996: Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells; *Mol. Cell Biol.*, **16** (11): 6494-6508

Zhan, Q., Carrier, F. und Fornace, A. J.; 1993: Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest; *Mol. Cell Biol.*, **13** (7): 4242-4250

Zhou, S. und Wallace, K. B.; 1999: The effect of peroxisome proliferators on mitochondrial bioenergetics; *Toxicol. Sci.*, **48** (1): 82-89

Zumoff, B., Levin, J., Rosenfeld, R. S., Markham, M., Strain, G. W. und Fukushima, D. K.; 1981: Abnormal 24-hr mean plasma concentrations of dehydroepiandrosterone and dehydroisoandrosterone sulfate in women with primary operable breast cancer; *Cancer Res.*, **41** 3360-3363

Zwain, I. H. und Yen, S. S. C.; 1999: Dehydroepiandrosterone: biosynthesis and metabolism in the brain; *Endocrinology*, **140** 880-887

Zusammenfassung

Clofibrat dient in der Medizin zur Senkung der Blutfettwerte und des Cholesterins im Blut. Wie andere Fibrate hat es in Nagetieren die Fähigkeit, die Aktivität und Anzahl der Peroxisomen zu erhöhen und zählt daher zu den Peroxisomenproliferatoren. Ein gefährliches Potential liegt in der Fähigkeit der Fibrate in Nagetieren Krebs auszulösen. Dies lässt sich allerdings im Menschen und vielen anderen Primaten nicht nachvollziehen. Hier bleibt auch eine Peroxisomenproliferation aus. Der Mechanismus der Krebsentstehung durch Fibrate ist noch ungeklärt. Es existieren zwei verschiedene Hypothesen: Zum einen wird diskutiert, dass durch eine Peroxisomenproliferation die Anzahl verfügbarer aktiver Sauerstoffradikale erhöht wird und diese zu Schäden an der DNA führen. Zum anderen ist auch eine Carcinogenese durch die Aktivierung des MAPK-Systems in der Diskussion. Bei Fischen wurden bislang nur wenige Studien zur Peroxisomenproliferation oder zu allgemeinen Auswirkungen von Peroxisomenproliferatoren unternommen und die erzielten Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Die vorliegende Arbeit sollte durch Untersuchungen der Wirkung von Clofibrat auf Hepatocyten aus der Regenbogenforelle dazu beitragen, Informationen über die Wirkung dieses Peroxisomenproliferators auf niedere Wirbeltiere zu liefern und in den Kontext anderer Studien zu integrieren. Die gewählten Konzentrationen lösten allerdings einen raschen Tod der Zellen aus und die Art des Absterbens erinnerte an die Abläufe, die beim programmierten Zelltod, der Apoptose, auftreten. Daher wurde eine Fokussierung auf dieses beobachtete Phänomen gelegt, da auch morphometrische Analysen anzeigten, dass eine signifikante Proliferation von Peroxisomen durch Clofibrat nicht auftritt. Die Art des Zelltods wurde anhand morphologischer Veränderungen lichtmikroskopisch durch DNA-Färbung und elektronenmikroskopisch näher untersucht. Biochemische Versuche beinhalteten den Nachweis von Caspase 3 und p53 sowie das Auftreten einer Verschiebung des Cytochrom c-Anteils aus den Mitochondrien in das Cytosol. Ferner wurde die Spaltung eines Caspase 3-Substrats durch clofibratbelastete Hepatocyten untersucht. Weiterhin sollte ein Caspase 3-Inhibitor zeigen, ob sich die auftretenden Veränderungen blockieren lassen. Zur Integration der Clofibratwirkung in das bestehende Bild des Apoptoseverlaufs, wurden Hepatocyten der Regenbogenforelle mit UV-Licht bestrahlt oder mit Staurosporin belastet. Die auftretenden Veränderungen durch diese Behandlungen wurden mit denen von Clofibrat verglichen.

Die Belastung von Hepatocyten der Regenbogenforelle mit 1 mM Clofibrat führt zu einer Kondensierung von Chromatin in der Peripherie des Zellkerns, zu stark deformierten bis zerstörten Mitochondrien und das Endomembransystem erfährt eine komplette Umgestaltung in einzelne Membranzisterne, die durch das Cytoplasma ziehen und annulierte Lamellen ausbilden. In diese Umgestaltung ist auch die äußere Kernmembran mit einbezogen. Es kommt zu einer Stabilisierung von p53 und einer Aktivierung Caspase 3-artiger Proteasen. Im weiteren Verlauf der Belastung sterben die Zellen ab. Dieser Zelltod lässt sich durch den Einsatz eines Caspase 3-Inhibitors nicht verhindern. Im Vergleich zu anderen Induktoren der Apoptose treten gemeinsame Merkmale auf, es sind aber auch Unterschiede, vor allem in Bezug auf das Endomembransystem und die Mitochondrienmorphologie, vorhanden. Die durch Staurosporin hervorgerufenen Effekte lassen sich mit einem Caspase 3-Inhibitor verhindern und die Bestrahlung mit ultravioletttem Licht führt zu einem Absterben der Zellen durch eine Mischung aus Onkose und Apoptose. Clofibrat führt zu einem Absterben der Hepatocyten durch Apoptose. Da sich die gezeigte Art des Zelltods nicht mit einem Caspase 3-Inhibitor unterbinden lässt, müssen weitere Mechanismen zur Abtötung der Zellen existieren. Hierbei könnten proapoptotische Vertreter der Bcl-2-Familie und der Apoptosis Inducing Factor (AIF) eine Rolle spielen, was im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht überprüft werden konnte.