

Technische Universität-München

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, Institut für  
Toxikologie

## **Zum Mechanismus der Kupfer-assoziierten Leberschädigung bei der Long-Evans Cinnamon Ratte**

Matthias Finckh

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigten Dissertation.

Vorsitzender : Univ. Prof. Dr. H. Schmidbaur

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. Prof. Dr. H. Greim
2. Univ. Prof. Dr. W. Hiller

Die Dissertation wurde am 21.01.2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 19.03.2002 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Material und Methoden</b>	6
2.1. LEC und Wistar Ratten	6
2.1.1. Behandlung der Ratten	6
2.2. Präparative Verfahren	8
2.2.1. Gewinnung subzellulärer Fraktionen der Leber	8
2.2.2. Isolierung der Hepatozyten und der Kupffer'schen Sternzellen	10
2.2.3. Extraktion und Transkription der mRNA	11
2.3. Analytische Verfahren	11
2.3.1. Transmissionselektronenmikroskopie	11
2.3.2. Immunhistochemische Nachweise	12
2.3.3. Ermittlung des Apoptoseindex	13
2.3.4. Metallanalytik	13
2.3.5. Abschätzung des Hämolysegrades	13
2.3.6. Proteinbestimmung	14
2.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten und Bilirubin	14
2.3.8. Semiquantitative Bestimmung der Expression der Fas-Liganden mRNA	15
2.3.9. Quantitative Echtzeit PCR (TaqMan-Technologie)	16
2.4. Statistische Verfahren	21
2.5. Chemikalien	22
<b>3. Ergebnisse</b>	23
3.1. Pathologie und labordiagnostische Befunde	23

3.2.	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Cu in der Leber	34
3.2.1.	Isolierte Hepatozyten und Kupffer'sche Sternzellen	35
3.2.2.	Lysosomen	36
3.3.	Apoptoserelevante Parameter	39
3.3.1.	Apoptoseindex	39
3.3.2.	Genexpression von TNF-alpha	41
3.3.3.	Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen	42
3.3.4.	Genexpression des Fas-Liganden	43
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1.	Zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Cu	45
4.2.	Zur Toxizität von lysosomalem Cu	46
4.3.	Zur Rolle der Kupffer'schen Sternzellen bei der Toxizität von Cu	48
4.4.	Zur Rolle der Apoptose bei der chronischen Cu-Toxizität	50
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>

## Abkürzungen

AP	Saure Phosphatase
BSA	Rinderserumalbumin
Caspase	Cystein ASPartic acid specific proteASE
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CEL	Clodronat eingekapselt in Liposomen
Cu	Kupfer
dNTP	Desoxynukleotid Triphosphat
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal
LEC	Long-Evans Cinnamon
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Quencher-Farbstoff
R	Reporter-Farbstoff
RT	Reverse Transkriptase
SDH	Succinatdehydrogenase
TBS	Tris-Buffered Saline
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TS-Puffer	Tris-HCl / Sucrose

# 1. EINLEITUNG

Kupfer (Cu) ist ein essentielles Schwermetall und nach Zink und Eisen das dritthäufigste Spurenmetall im Körper von Säugetieren (1). Unter physiologischen Bedingungen kommt es vor allem in der reduzierten Oxidationsstufe Cu(I), in Übergangszuständen auch in der oxidierten Form Cu(II) vor. Die Möglichkeit zum Wechseln der Oxidationsstufe ist wesentlich für die Funktion verschiedener Cu-haltiger Enzyme (2, 3): Cu ist Kofaktor in Enzymen wie Cu/Zn-Superoxiddismutase, Ceruloplasmin, Cytochrom C Oxidase, Ascorbinsäureoxidase und Monoaminoxidase. Damit ist das Metall an der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies, dem zellulären Eisentransport, der zellulären Energiegewinnung, der Kollagenhydroxylierung und -vernetzung sowie der Catecholaminbildung beteiligt (4, 5).

Der Cu-Bedarf des Menschen von täglich 1-3 mg (6) wird nahezu ausschließlich über die Nahrung gedeckt (7). Nach der Resorption und der Passage durch die basolaterale Membran gelangt Cu, vor allem an Serumalbumin gebunden, zur Leber (8). In eukaryotischen Zellen wird die Aufnahme von Cu in die Zelle durch das Cu-Transportprotein CTR1 vermittelt (9, 10, 11). Innerhalb der Zelle kommt es zunächst zur Bildung von Komplexen von Cu mit Glutathion (12) oder spezifischen Transportmolekülen, sogenannten „Chaperones“, über die das Metall in Enzyme oder in das Cu-Speicherprotein Metallothionein eingebaut wird (13, 14, 15, 16).

Die Ausscheidung von Cu erfolgt hauptsächlich über die Galle (17, 18) und regelt im wesentlichen die Homöostase des Metalls (13). Während bei einem geringen Cu-Angebot nur wenig Cu ausgeschieden wird (19), steigt mit zunehmender Konzentration im Blut die biliäre Exkretion des Metalls proportional an (20). Die Ausscheidung führt über Cu-haltige Vesikel, die vom Transgolgi-Netzwerk abgeschnürt und durch lysosomale Exozytose auf die Gallengangsseite der Hepatozyten transportiert werden (10, 21, 22). Für diese Prozesse spielt das ATP7B-Gen offensichtlich eine wichtige Rolle. Dieses Gen codiert für eine Cu-

transportierende P-type ATPase, die vor allem im Golgi-Apparat lokalisiert ist und den Transport des Metalls aus der Zelle gewährleistet (23).

Aufgrund der wirksamen Regulation der Cu-Homöostase treten chronische Cu-Vergiftungen beim Menschen in der Regel nicht auf (24). Dennoch gibt es seltene Krankheiten, die durch Störungen der Cu-Aufnahme- oder Eliminationsmechanismen ausgelöst werden. Bei der erblichen Menkes'schen Krankheit kommt es infolge eines Defektes der Cu-Resorption im Darm zu einer Cu-Unterversorgung (25), die meist schon im frühen Kindesalter zum Tode führt. Zu einer Cu-Akkumulation in der Leber kann es bei der durch Cholestase bedingten primären biliären Zirrhose (26), bei der „Indian Childhood Cirrhosis“ (27) und dem autosomal rezessiv vererbten Morbus Wilson kommen. Während bei der „Indian Childhood Cirrhosis“ eine genetische Beteiligung vermutet wird (10), sind beim Morbus Wilson erworbene Mutationen im ATP7B-Gen die Ursache der Erkrankung. Morbus Wilson ist durch eine verminderte Ausscheidung des hepatischen Cu in die Galle (13) und fehlenden Einbau von Cu in Ceruloplasmin (28) gekennzeichnet und tritt mit einer Inzidenz von etwa 1:30.000 auf (23). Zunächst akkumuliert Cu im Zytosol der Hepatozyten. Bei zunehmender Cu-Anreicherung kommt es zu degenerativen Veränderungen der Leberzellkerne, Fettinfiltration und einer Sternzellhypertrophie (29, 30, 31). Eine Akkumulation von Cu in den Lysosomen wird insbesondere in späteren Stadien der Lebermanifestation beobachtet (32, 33). In diesem Zusammenhang wird auch eine Cu-bedingte Störung beziehungsweise der Bruch von Lysosomenmembranen als Ursache für die Schädigungen der Leberzellen diskutiert (34, 35). Durch die fortschreitende Leberschädigung werden zunehmende Mengen des Metalls in das Blut freigesetzt, wodurch es zu Schädigungen der Erythrozyten und einer hämolytischen Anämie kommen kann (36, 37). Unbehandelt führt die Krankheit gewöhnlich zum Tod durch eine hämolytische Krise oder Leberversagen (38). Die wirksamste Therapie des Morbus Wilson besteht in der Gabe von Cu-Komplexbildnern, wodurch die Ausscheidung des Metalls über die Niere erhöht wird (39). Weiterhin kann durch oral verabreichtes Zink die Resorption von Cu aus dem Gastrointestinaltrakt vermindert werden (40, 41). Begleitend zur medikamentösen Therapie wird eine Cu-arme Diät empfohlen (39).

Erst seit etwa einem Jahrzehnt steht mit der Long-Evans Cinnamon (LEC) Ratte ein geeignetes Tiermodell für den Morbus Wilson zur Verfügung (42, 43, 44). Dieser Inzuchtstamm trägt den homologen autosomal rezessiv vererbten genetischen Defekt wie Wilson Patienten (45). Der Vergleich der cDNA des Gens mit dem menschlichen Homolog zeigt eine weitgehende Übereinstimmung in den Aminosäuren (45). Auch die Entwicklung der Leberschädigung bei der LEC Ratte verläuft ähnlich wie beim Morbus Wilson. Als Folge der verringerten biliären Cu-Ausscheidung reichert sich das Metall bei normaler Diät in der Leber der LEC Ratte an und die Tiere entwickeln im Alter von 3-4 Monaten eine fulminante Hepatitis und hämolytische Anämie mit letalem Ausgang in etwa 50% der Fälle (42, 46, 47, 48). Die überlebenden Tiere bilden eine chronische Hepatitis, eine Cholangiofibrose und Leberzellkarzinome aus (49, 50). Die LEC Tiere zeigen aufgrund des defekten Einbaus von Cu in Ceruloplasmin erniedrigte Serumspiegel dieses Proteins (51, 52, 53). Die LEC Ratten sprechen auf eine Therapie mit Cu-Chelatoren wie D-Penicillamin oder Trientine an, und eine Cu-arme Diät kann die Entstehung der Hepatitis verzögern (54, 55, 56).

Ähnlich dem Morbus Wilson ist bei der LEC Ratte das Anfangsstadium der Erkrankung symptomfrei, aber histologisch durch eine erhöhte Anzahl von Riesenkernen, Councilman-Körpern, Lysosomen und Mitosen in der Leber gekennzeichnet (34, 57, 58). In den Hepatozyten werden Fetteinlagerungen und geschwollene Mitochondrien mit dilatierten Cristae beobachtet (42, 59). Erst im Stadium der akuten Hepatitis nehmen die GOT-Aktivität und das Bilirubin im Serum rasch zu und die Zahl der Riesenkern und Councilman-Körper erreicht ihr Maximum (57). Insbesondere im Stadium der akuten Hepatitis akkumuliert Cu auch in den Kupffer'schen Sternzellen (60).

Auf molekularer Ebene lässt sich die Toxizität von Cu über dessen direkte Effekte auf die Struktur und Funktion von Biomolekülen wie die DNA, Membranen und Proteinen und durch die Reaktivität über Cu gebildeter Sauerstoffradikale erklären (8). Cu bindet mit hoher Affinität an Histidin oder den Schwefel in den Aminosäuren Cystein und Methionin; auf diese Weise können Proteine inaktiviert werden (61, 62). Weiterhin kann reaktives Cu(II) membranständige Thiolatgruppen zu Disulfiden oxidieren, wodurch Membranfunktionen gestört werden können. Das hierbei gebildete Cu(I) kann durch Sauerstoff in der Zelle oder durch endogen aus der

Atmungskette stammendes Wasserstoffperoxid wieder zu Cu (II) oxidiert werden. In diesem Redoxzyklus entstehen reaktive Sauerstoffspezies - wie Superoxidradikale und Hydroxylradikale - die darüber hinaus zu oxidativen Schäden der Membranen führen können (12, 63, 64, 65).

Wenngleich die genetischen Ursachen für die Cu-Akkumulation beim Morbus Wilson und der LEC Ratte im wesentlichen geklärt sind, sind die pathobiochemischen Mechanismen, die schließlich zu der Leberschädigung führen, weitgehend unbekannt. Insbesondere in welcher Form das Cu in der Zelle toxisch wirkt, ist bislang nicht im Detail geklärt (66). Bei Wilson Patienten wurde eine Anreicherung von Cu in den Lysosomen der Leber beschrieben (33). Vor dem Hintergrund, dass lysosomales Cu als Auslöser der Zellschädigungen vermutet wird (67, 68), soll hier die Toxizität dieser Cu-Spezies am Modell der LEC Ratte untersucht werden. In diesem Zusammenhang scheinen auch die Kupfferschen Sternzellen von Bedeutung zu sein, da diese Zellen Cu in partikulärer Form speichern können (69). Da Kupffersche Sternzellen darüber hinaus auch an der Hepatotoxizität durch Chemikalien und Metalle wie Cadmium beteiligt zu sein scheinen (70, 71), stellt sich die Frage, ob diesen leberresidenten Makrophagen nicht auch bei der Schädigung der Leber durch Cu bei der LEC Ratte eine zentrale Bedeutung zukommt. So könnten Kupffer'sche Sternzellen über die Freisetzung von Zytokinen die Einwanderung und Stimulation weiterer inflammatorischer Zellen fördern und somit die Entzündung verstärken. Allgemein können bei Leberschädigungen Kupffersche Sternzellen Mediatoren wie Eikosanoide und reaktive Sauerstoffspezies freisetzen, und sie sind zudem die Hauptquelle von Tumor-Nekrose Faktor (TNF)-alpha in der Rattenleber (72, 73, 74, 75). Die Beteiligung dieses Zytokins an der Leberschädigung durch unterschiedlichste Hepatotoxine konnte nachgewiesen werden (76, 77). Über die Rolle der intrazellulären Signaltransduktion durch proinflammatorische oder proapoptotische Zytokine wie TNF-alpha (78) und Fas-Ligand (79) ist bei der Cu-bedingten Leberschädigung bisher wenig bekannt. Bei Wilson Patienten wurde über eine mögliche Beteiligung des Fas-Liganden an der Leberschädigung erst vor kurzem berichtet (80). Nach neueren Hinweisen scheint an der durch Cu hervorgerufenen Leberschädigung auch die Apoptose beteiligt zu sein (81, 82). Dieser morphologisch definierte Prozess (83), bezeichnet den kontrollierten Zelltod, der im Gegensatz zur Nekrose ohne Entzündungsreaktionen verläuft (84).

---

In dieser Arbeit sollen am Tiermodell der LEC Ratte folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Ist das in den Lysosomen der Leber akkumulierende Cu toxisch?

Die toxischen Effekte von Cu wie Hämolyse und die Erhöhung der Aktivität der Glutamin-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Serum wurden nach Freisetzung des Metalls aus den Kupfferschen Sternzellen untersucht.

2. Spielen die Kupffer'schen Sternzellen bei der chronischen Cu-Toxizität eine wesentliche Rolle?

Hierfür wurden Parameter für die Aktivierung der Lebermakrophagen wie Anzahl und die Größe sowie die Genexpression des zytotoxischen TNF-alpha bestimmt. Darüber hinaus wurden die Konsequenzen der experimentellen Elimination der Kupfferschen Sternzellen durch Behandlung der LEC Ratten mit Clodronat untersucht.

3. Kommt der Apoptose bei der chronischen Cu-Toxizität eine Bedeutung zu?

Die Bedeutung der Apoptose wurde über die Bestimmung des Apoptoseindex und apoptoserelevanter Parameter wie der Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen und der Genexpression des Fas-Liganden untersucht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. LEC und Wistar Ratten

Weibliche 5 Wochen alte LEC Ratten und weibliche Wistar Ratten wurden von Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan), bzw. Charles River Deutschland (Sulzfeld) bezogen. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Tag- und Nacht-Rhythmus bei konstanter Temperatur von 23-24°C und 50% Luftfeuchtigkeit gehalten und erhielten Leitungswasser und Standardfutter (Altromin, Lage; Cu-Gehalt 11 mg/kg) ad libitum.

#### 2.2.1. Behandlungen der Ratten

##### *Clodronat eingekapselt in Liposomen*

Bei den LEC Ratten wurden die Kupfferschen Sternzellen mittels Clodronat spezifisch eliminiert. Das Clodronat wurde eingekapselt in Liposomen (CEL) verabreicht. Die Clodronatliposomen wurden freundlicherweise von Dr. Nico van Rooijen (Abteilung für Zellbiologie und Immunologie, Universität Amsterdam) zur Verfügung gestellt. Das Prinzip dieser von van Rooijen (85) beschriebenen Methode beruht darauf, dass intravenös (i.v.) injizierte Liposomen bei der Leberpassage als partikuläre Bestandteile von den Makrophagen phagozytiert werden. Die Phospholipiddoppelschicht der Liposomen wird durch Phospholipasen abgebaut und das Clodronat freigesetzt. Auf diese Weise akkumuliert der hydrophile Wirkstoff in den Makrophagen (86). Daraufhin wird Apoptose induziert, vermutlich indem Clodronat in den intrazellulären Calciumstoffwechsel eingreift (87, 88). Eine Repopulation von Kupfferschen Sternzellen im Lebergewebe ist nach einmaliger CEL-Injektion frühestens nach 4-5 Tagen zu erwarten (89, 90).

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen eine langfristige Verminderung der Anzahl der Kupfferschen Sternzellen auf die Entwicklung der Hepatitis der LEC Ratten hat, wurden den gesunden Tieren ab dem Alter von 69 Tagen wiederholt Clodronatliposomen im Abstand von 3,5 Tagen verabreicht. Hierzu wurde den Ratten jeweils 0,4 ml CEL (ca. 5 mg Clodronat/ml) in eine der Schwanzvenen injiziert (85). Die LEC Tiere einer Gruppe wurden 3 mal mit CEL behandelt (LEC, 3xCEL ab Tag 69, Alter 79 Tage) und den Tieren einer anderen Gruppe wurde 7 mal CEL injiziert (LEC, 7xCEL ab Tag 69, Alter 93 Tage). Als Kontrolltiere dienten 2 Gruppen von jeweils 3 Wistar Ratten, die mit CEL nach dem selben Versuchsplan behandelt worden waren. Alle Injektionen wurden unter Ethernarkose vorgenommen.

Zwei der mit CEL behandelten LEC Ratten verstarben im Alter von 90 und 92 Tagen, jeweils 3 Tage nach der 6., beziehungsweise 2 Tage nach der 7. CEL-Injektion. Die Todesursache konnte nicht festgestellt werden. Eine Embolie durch die CEL-Injektionen kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da der Tod nicht direkt nach der CEL-Injektion eintrat. Bei der Autopsie war bis auf ein Hämatom im Atrium des Herzens nichts auffällig.

Um den Effekt der akuten Freisetzung von Cu aus den Kupfferschen Sternzellen zu erreichen, wurden LEC Ratten im Stadium der akuten Hepatitis einmalig mit CEL behandelt. Die LEC Ratten (LEC, 1xCEL am Tag 91, Alter 92 Tage) erhielten bei Serum-GOT-Aktivitäten von mehr als 870 U/l eine einmalige i.v. Dosis von 0,6 ml CEL (ca. 5 mg Clodronat/ml) und wurden etwa 16 Stunden nach der Behandlung getötet.

### *Zymosan*

Um zu untersuchen, ob CEL oder die Zerstörung der Kupfferschen Sternzellen toxische Effekte hat, wurden Wistar Ratten einmalig mit CEL behandelt. Zuvor wurde die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen bei den Wistar Tieren durch Zymosanbehandlung vergrößert (91). Die Wistar Ratten hatten eine mindestens ebenso große Anzahl von Kupfferschen Sternzellen, wie die LEC Ratten im Stadium der Hepatitis. Wistar Ratten wurde 2 mg/100 g Körpergewicht Zymosan (Sigma Chemie, Taufkirchen) i.v. injiziert. Drei der Tiere wurden nach 51 Stunden zur Quantifizierung der Kupfferschen Sternzellen getötet. Den anderen 3 Wistar Ratten

wurde 51 Stunden nach der Zymosaninjektion 0,6 ml CEL (ca. 5 mg Clodronat/ml) injiziert und 16 Stunden später wurden die Tiere getötet.

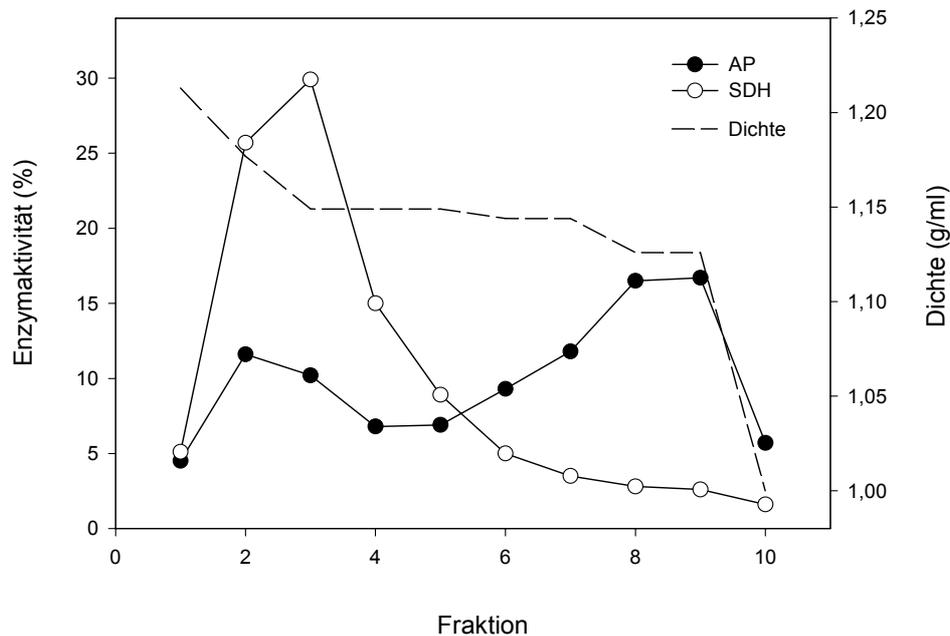
### *Concanavalin A*

Um eine Positivkontrolle zur erhöhten Expression der Fas-Liganden mRNA in der Leber zu erhalten, wurde einer Wistar Ratte Concanavalin A verabreicht (92). Der Wistar Ratte wurde 25 mg/kg Körpergewicht Concanavalin A (Sigma Chemie, Taufkirchen) i.v. injiziert und das Tier 6,5 Stunden nach der Injektion getötet.

## **2.2. Präparative Verfahren**

### **2.2.1. Gewinnung subzellulärer Fraktionen der Leber**

Zur Organentnahme wurden die Ratten mit Pentobarbital (i.p. 75 mg/kg Körpergewicht) betäubt. Anschließend wurden die Lebern in situ mit Hilfe einer Kanüle mit eiskühlter isotonischer Kochsalzlösung gespült, um das Gewebe weitgehend von Blut zu befreien. Ein Teil der Leber (ca. 0,5 g) wurde unmittelbar nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Extraktion der mRNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Ein Teil der Leber wurde für die Präparation der Gewebeschnitte auf einen Messingblock aufgebracht und in  $-80^{\circ}\text{C}$  kaltem Isopentan tiefgefroren. Der Rest der Lebern wurde unter Eiskühlung in 4 Volumenteilen  $\text{N}_2$ -gesättigtem 10 mM Tris-HCl, 250 mM Sucrose, pH 7,4 (TS-Puffer) mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel (Braun, Melsungen) bei 1.000 Upm homogenisiert. Zur Abtrennung der Zellkerne, Membranfragmente, Lysosomen und Mitochondrien wurde das Leberhomogenat für 20 Minuten bei 10.700  $g_{\text{max}}$  (9.500 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand bei 110.500  $g_{\text{max}}$  (35.000 Upm, 50 Ti Rotor, Beckmann Instruments, München) für 18 Stunden zentrifugiert. Nach Entfernen der Fettschicht wurde der resultierende Überstand (Zytosol) in Eppendorf Reaktionsgefäße portioniert und das überwiegend Mikrosomen-haltige Sediment verworfen. Das Sediment der Zentrifugation bei 10.700  $g_{\text{max}}$  wurde je 3 mal in 20 ml TS-Puffer rehomogenisiert und für 10 Minuten



**Abbildung 1:** Aktivitäten von saurer Phosphatase (AP) und Succinatdehydrogenase (SDH) in den Dichtefractionen der über den Nycodenzgradienten getrennten Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion. (Mittelwerte, n=17).

bei 120  $g_{max}$  zentrifugiert (1.000 Upm, Sorvall SS-34 Rotor). Das Sediment wurde schließlich in 8 ml TS-Puffer aufgenommen (Kern-Membran-Fraktion). Die Überstände aus den 3 Zentrifugationsschritten wurden vereint und bei 23.100  $g_{max}$  (13.900 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Sediment 3 mal mit je 10 ml TS-Puffer durch Resuspendieren in TS-Puffer und Zentrifugieren (23.100  $g_{max}$ ) gewaschen und schließlich in 4-5 ml TS-Puffer aufgenommen (Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion).

Die Mitochondrien und die Lysosomen wurden mittels eines Dichtegradienten aus Nycodenz<sup>®</sup> isoliert. Hierzu wurden 2 ml der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion auf einen Nycodenzgradienten folgender Zusammensetzung aufgetragen: 1 ml 40%, 1 ml 33%, 3 ml 28%, 2 ml 27% und 2ml 24% Nycodenz<sup>®</sup> in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4. Nach 3-stündiger Zentrifugation bei 74.100  $g_{max}$  (20.000 Upm, Sorvall AH-627 swing-out Rotor) wurde der Gradient in Anteilen zu je 1 ml fraktioniert. Die Identifikation der lysosomen- und mitochondrienspezifischen Fraktionen erfolgte anhand der Markerenzyme, saure Phosphatase (AP) beziehungsweise Succinatdehydrogenase

(SDH). Abbildung 1 zeigt die Verteilung der Aktivitäten der Markerenzyme in den Dichtefractionen der über den Nycodenzgradienten getrennten Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion aus der Leber von LEC Ratten. Die Fraktion 1 enthielt nicht die Markerenzyme AP und SDH. Nach elektronenmikroskopischen Befunden stellte sich heraus, dass die Fraktion 1 jedoch Lysosomen enthielt (vgl. Abschnitt 3.2.2., Abbildung 12 ). Die Leberhomogenate sowie sämtliche aus der Leber isolierten Fraktionen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.2. Isolierung der Hepatozyten und der Kupfferschen Sternzellen**

Die Lebern von 3 LEC Ratten mit Hepatitis wurden in situ mit Collagenase perfundiert und hierbei isolierte Leberzellsuspensionen gewonnen (93). Die Trennung der Hepatozyten und der Kupfferschen Sternzellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von ten Hagen et al. (94). Hierzu wurde die Leberzellsuspension 3 mal für 20 Sekunden bei  $30\text{ g}_{\text{max}}$  (500 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert. Der die Kupfferschen Sternzellen enthaltende Überstand wurde jeweils dekantiert und das die Hepatozyten enthaltende Sediment in Perfusionspuffer (93) resuspendiert. Die vereinigten Überstände wurden 5 Minuten bei  $120\text{ g}_{\text{max}}$  (1.000 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert. Das resuspendierte Sediment wurde in 28%-iger (w/v) Nycodenzlösung (Nycodenz<sup>®</sup> in 10 mM Tris-HCL, pH 7,4) im Verhältnis von 1:1,35 gemischt. Diese Mischung wurde mit 1 ml Puffer überschichtet und 20 Minuten bei  $480\text{ g}_{\text{max}}$  (2.000 Upm, Sorvall SS-34 Rotor) zentrifugiert. Die Kupfferschen Sternzellen wurden aus der Schicht zwischen Nycodenzlösung und Perfusionspuffer gewonnen (Sternzell-Fraktion).

Da Hepatozyten aufgrund ihrer Größe leicht von den anderen Leberzellen unterschieden werden können (95), wurde die Reinheit der Fraktion und die Zellzahl lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Fraktion der Hepatozyten war zu etwa 5% mit anderen Zellen verunreinigt. Die Sternzell-Fraktion enthielt 10-14% Hepatozyten und die in der Leber vorhandenen Endothelzellen. Der Protein- und Cu-Gehalt der Sternzell-Fraktion wurde um die in dieser Fraktion enthaltenen Hepatozyten korrigiert. Zur Korrektur wurde der Anteil des Cu und des

Proteins der Hepatozyten jeweils vom Gesamt-Cu- und Gesamtproteingehalt der Sternzell-Fraktion abgezogen.

### **2.2.3. Extraktion und Transkription der mRNA**

Zur Gewinnung der RNA wurden Leberproben (10-25 mg) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in 400  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer (Roche, Mannheim) mit dem Ultra Turrax T5 Fu (IKA, Staufen) homogenisiert. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „High Pure RNA Tissue Kits“ (Roche, Mannheim) extrahiert. Es wurden nur Proben weiterverarbeitet, deren Absorptionsverhältnis 260 nm : 280 nm mindestens 2,0 war, und die eine Mindestkonzentration von 40  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA/ml aufwiesen. Eine Absorption von einer Einheit bei 260 nm entspricht 40  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA/ml. Die mRNA aus 8  $\mu\text{l}$  dieser Lösung wurde mit Hilfe des „SuperScript™ First-Strand Synthesis System für RT-PCR“ (Gibco BRL, Karlsruhe) unter Verwendung von Random Hexameren als Primer in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

## **2.3. Analytische Verfahren**

### **2.3.1. Transmissionselektronenmikroskopie**

Zur Vorbereitung der Transmissionselektronenmikroskopie wurde Lebergewebe (ca. 1  $\text{mm}^3$ ) beziehungsweise isolierte Hepatozyten und isolierte Kupffersche Sternzellen in 1% Glutaraldehyd in „Phosphate-Buffered-Saline“ (PBS) fixiert und 15 Minuten in 2% Osmiumtetroxid in PBS nachfixiert. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Epon eingebettet und ultradünne Schnitte (70-80 nm) angefertigt. Nach Anfärbung mit Bleicitrat und Uranylacetat wurden die Schnitte bei 60-80 kV im Elektronenmikroskop (EM-10 C, Zeiss Oberkochen) untersucht. (Zusammenarbeit mit dem GSF-Institut für Pathologie).

### 2.3.2. Immunhistochemische Nachweise

Der immunhistochemische Nachweis der Kupfferschen Sternzellen und der peripheren Makrophagen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Hardonk et al. (96). Von den Leberproben wurden 8 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und auf Objektträger „Super Frost Plus“ (Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht. Hierzu wurden die getrockneten Kryostatschnitte zunächst bei 4°C für 10 min in Aceton fixiert und anschließend zweimal für jeweils 5 Minuten in „Tris-Buffered-Saline“ (TBS) gewaschen. Die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation mit 0,06% Wasserstoffperoxid in TBS. Nach zweimaligem Waschen in TBS (jeweils 5 Minuten) wurden die Proben eine Stunde mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) in TBS inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit den jeweiligen monoklonalen Mäuse-Antikörpern (1:20 in 1% BSA in TBS) 30 Minuten inkubiert. Hierzu wurde das ED2 Oberflächenantigen (Dianova, Hamburg) für den Nachweis von Kupfferschen Sternzellen und das zytosolische Antigen ED1 (Dianova, Hamburg) zum Nachweis aller Makrophagen (Makrophagen, gesamt) verwendet. Alle Proben wurden 5 mal für je 5 Minuten in TBS gewaschen. Nach 15-minütiger Inkubation mit einem Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat (Sigma Chemie, Taufkirchen; 1:20 in 1%-igem BSA in TBS) und 3-maligem Waschen mit TBS (jeweils 5 Minuten) wurden die Schnitte 30 Minuten lang mit der Substrat-Chromogen-Lösung (2 mM Diaminobenzidintetrahydrochlorid, 0,015% Wasserstoffperoxid in TBS) inkubiert. Die Proben wurden anschließend zweimal mit entionisiertem Wasser gewaschen (jeweils 1 Minute), mit Mayers Hämalaun (Merck, Darmstadt) gefärbt (jeweils 15 Sekunden), wiederum mit entionisiertem Wasser gewaschen und in Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Die Bestimmung der Anzahl und Fläche der ED1- und der ED2-positiven Zellen erfolgte lichtmikroskopisch (Axioskop 2, Zeiss, Jena) und mittels digitaler Bildanalyse (Optimas 6.2, Stemmer Imaging, Puchheim). Zur Auswertung der Schnitte wurden je Tier 15 unterschiedliche, zufällig ausgewählte Gesichtsfelder von jeweils 0,175 mm<sup>2</sup> bei 100-facher Vergrößerung ausgezählt.

### **2.3.3. Ermittlung des Apoptoseindex**

Der Apoptoseindex ist das Verhältnis der Anzahl der Apoptosen pro 100 Hepatozyten. Als Kriterien apoptotischer Hepatozyten wurden die Kondensation des Kernchromatins und die Schrumpfung der Zellen oder das Ablösen von den Nachbarzellen herangezogen. Diese sind frühe Vorgänge bei der Apoptose, die innerhalb weniger Stunden abgeschlossen sind (97). Da die Tiere 3 Tage nach der letzten CEL Behandlung getötet wurden, wurde die durch CEL induzierte Apoptose (87) der Kupfferschen Sternzellen dabei nicht erfasst. Es wurden mindestens 1.500 Hepatozyten pro LEC Ratte auf das Auftreten von Apoptose bei 100-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Jena) untersucht.

### **2.3.4. Metallanalytik**

Die Metallbestimmung erfolgte mit einem Atom-Emissions-Spektrometer mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung (Modell JY 70 P, Instruments SA, Neukeferloh), wobei die Richtigkeit durch Messung von Referenzproben (Aldrich, Steinheim) sichergestellt wurde. Die jeweiligen Proben (0,3 ml) wurden 24 Stunden mit 1,5 ml suprapurer, 65%-iger HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt) inkubiert und nach Zugabe von 1,2 ml entionisiertem Wasser analysiert. (Zusammenarbeit mit dem GSF-Institut für ökologische Chemie)

### **2.3.5. Abschätzung des Hämolysegrades**

Zur Abschätzung des Hämolysegrades wurde die Differenz zwischen der Eisenkonzentration im hämolytischen Plasma der einmalig CEL-behandelten LEC-Ratten und der Eisenkonzentration im Plasma gesunder LEC Tiere gebildet. Diese Differenz der Eisenkonzentrationen wurde zu dem Eisengehalt des Hämoglobins im

---

Vollblut gesunder Wistar Ratten in Beziehung gesetzt. Der Hämolysegrad wurde als % hämolysierter Erythrozyten ausgedrückt.

### **2.3.6. Proteinbestimmung**

Die Proteingehalte wurden in Anlehnung an die Methode von Bradford (98) mit dem Bio-Rad Protein Test (Bio-Rad, München) bestimmt. Als Standard wurde Standard Protein (Sigma Chemie, Taufkirchen) eingesetzt. Ein Aliquot von 10 µl der Proben wurden mit 200 µl Coomassie Blue-Lösung (1:5 Verdünnung der Stammlösung) gemischt und 30 Sekunden inkubiert. Nach 2 min wurde bei 595 nm die optische Dichte gemessen. Die Quantifizierung erfolgte in Mikrotiterplatten bei 595 nm mit dem Spektrometer (Spectramax 340, Molecular Devices, Ismaning).

### **2.3.7. Bestimmung von Enzymaktivitäten und Bilirubin**

Die Blutentnahmen zur Gewinnung von Serum und Plasma erfolgten unter Ethernarkose durch Punktierung der Sublingualvene der Ratten oder wurden bei Tötung der Tiere bei geöffneten Abdomen aus der Vena cava inferior durchgeführt. Plasma wurde unter Verwendung von Heparin (Liquemin, Roche, Grenzach-Wyhlen) hergestellt. Die Aktivität der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und die Konzentration von Bilirubin im Plasma oder Serum der LEC und Wistar Ratten wurden in einem Reflexionsphotometer ermittelt (Reflotron®, Roche, Mannheim). Die Aktivitäten der sauren Phosphatase und der Succinatdehydrogenase in den Fraktionen des Nycodenzgradienten wurden mit einem Testkit (104-AS, Sigma Chemie, Taufkirchen) beziehungsweise nach der Methode von Graham et al. (99) bestimmt.

Die Bestimmung der Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen wurde in Anlehnung an die Methode von Tiegs et al. (100) durchgeführt. Hierzu wurde das Leberzytosol mit einem hypotonen Puffer mit Proteaseinhibitoren (25 mM HEPES, pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 1 mM PEFA-block, sowie Pepstatin, Leupeptin

und Aprotinin jeweils 1 µg/ml) 15 Minuten bei 13.000g<sub>max</sub> zentrifugiert. Nach der Proteinbestimmung wurde der zytosolische Extrakt auf 1 mg Protein/ml verdünnt. Daraufhin wurden 3 ml des zytosolischen Extraktes 1:10 mit Substratpuffer (50 mM HEPES, pH 7,4, 1% Sucrose, 0,1% CHAPS, 10 mM Dithiothreitol, 50 µM fluorogenes Substrat AcDEVD-afc; Bachem, Heidelberg) verdünnt. Die Kinetik der Bildung des freien 7-Amino-4-Trifluoro-methylcoumarins und damit die Aktivität des Enzyms wurde durch Messung der Fluoreszenz (Anregung bei 400 nm, Emission bei 505 nm) mit dem Fluorimeter Spectrafluor JY3 D (Division Instruments S.A.) bestimmt.

### **2.3.8. Semiquantitative Bestimmung der Expression der FAS-Liganden mRNA**

Die Expression der Fas-Liganden mRNA wurde mittels PCR ermittelt, wobei Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als „Housekeeping Gen“ diente. Die cDNA wurde mit einem Thermo Cycler (Techne Genius, Techne Cambridge, England) unter Verwendung der Primer von MWG-Biotech, Ebersberg vervielfältigt. Die Primersequenzen für den FAS-Ligand wurde einer Veröffentlichung von Plunckett et al. (101) entnommen. Die Sequenz des Vorwärtsprimers für den Fas-Liganden war 5'-GAT CAA TGA GGC TGG GTT GT-3' und die des Rückwärtsprimers 5'-CCT GTT GGA CCT TGT GGT CT-3'. Das Amplikon des Fas-Liganden besteht aus 417 Basenpaaren. Die Primersequenzen für GAPDH stammten von Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA). Die Sequenz des Vorwärtsprimers war 5'-TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG GC-3', die des Rückwärtsprimers 5'-CAT GTA GGC ATG AGG TCC ACC AC-3'. Das GAPDH-Amplikon hat eine Länge von 983 Basenpaaren.

Die Reaktionslösung enthielt pro Probe (25 µl) jeweils 0,5 µl Vorwärts- und Rückwärts-Primer (12,5 µM), 0,125 µl Taq DNA Polymerase (Qiagen, Hilden), 2,5 µl Qiagen 10xPuffer, 0,5 µl Deoxynukleotid Triphosphat (dNTP, 10 mM) (Boehringer, Mannheim), 19,875 µl Wasser und 1µl der revers transkribierten cDNA-Probe. Die cDNA-Proben wurden bei 94°C für 3 Minuten denaturiert. Die cDNA von GAPDH wurde über 18 Zyklen und die cDNA des Fas-Liganden über 30 Zyklen vervielfältigt.

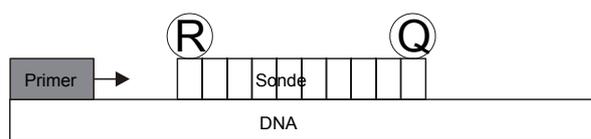
Jeder Zyklus bestand aus 30 Sekunden bei 94°C, 30 Sekunden bei 55°C und 60 Sekunden bei 72°C. Daraufhin wurden die Proben für 10 Minuten bei 72°C inkubiert. Nach der Vervielfältigung wurde die DNA (10 µl der Probe) nach Zugabe von 5 µl „Gel-Loading Solution“ (Sigma Chemie, Taufkirchen) in Novex Polyacrylamidgel TBE 4-20%, 1 mm (Novex, Frankfurt am Main) durch Elektrophorese getrennt. Das Gel wurde für 16 Stunden in einer Lösung aus 0,01% „Syber Green“ (Molecular Probes, Eugen, USA) in 30% Isopropanol gefärbt. Die Banden wurden bei ultraviolettem Licht (Wellenlänge 302 nm) photographiert. Die Größe der einzelnen PCR Produkte wurde durch Vergleich mit einer Standard DNA-Leiter (100-Basenpaar DNA-Leiter, MBI, Fermantas, St. Leon-Rot) ermittelt.

### **2.3.9. Quantitative Echtzeit PCR (TaqMan-Technologie) von TNF-alpha**

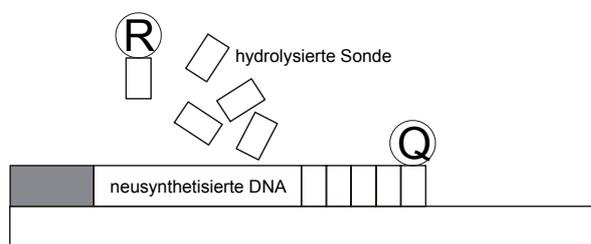
#### *Prinzip der Echtzeit PCR*

Das Prinzip der TaqMan Echtzeit-PCR besteht darin, dass bei jeder Replikation eines DNA-Stranges ein Signal entsteht, das während eines PCR-Laufes „online“ erfasst wird und eine Abschätzung der Startkopienzahl erlaubt. Hierfür wird eine spezielle fluorogene Sonde eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (R) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Q) trägt. Wird die intakte Sonde durch ultraviolettes Licht angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher unterdrückt. Während der PCR hybridisieren die Sonde und die Primer mit dem Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die DNA-Polymerase auf die Sonde und beginnt sie zu hydrolysieren. Hierbei macht man sich die 5'→3'-Endonukleaseaktivität der AmpliTaq-DNA Polymerase zunutze (Abbildung 2). Freie, nicht hybridisierte Sonde wird hingegen nicht hydrolysiert. Kommt es zur Sondenhydrolyse, so wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher aufgehoben. Entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem Zyklus an. Die Fluoreszenz wird dann nach jedem Zyklus mit einem Detektor erneut

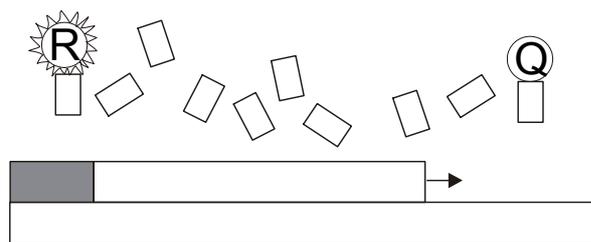
erfasst. In Abbildung 3 sind typische Amplifikationskurven von TNF-alpha cDNA-Proben und TNF-alpha cDNA-Standardverdünnungen dargestellt.



Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und eines Primers (R = Reporter Farbstoff, Q = Quencher-Farbstoff)



Synthese des PCR-Produktes und Sondenhydrolyse



Vollständige Synthese des PCR-Produktes und Trennung der Farbstoffe, Emission des Fluoreszenzsignals

**Abbildung 2:** Prinzip der TaqMan PCR

Die PCR von TNF-alpha und GAPDH und die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit dem „ABI PRISM 7700 Sequence Detector System“ (P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. GAPDH diene als „Housekeeping Gen“. Bei jeder Quantifizierung wurden Dreifachbestimmungen von jeder Standardkonzentration und jeder Probe mitgeführt.

#### *Herstellung der Standards für TNF-alpha und GAPDH*

Zur Gewinnung von DNA-Template für die Standardkurven wurde die mRNA aus der Leber einer mit Concanavalin A behandelten Wistar Ratte verwendet. Mit den unten beschriebenen TaqMan-Primern für TNF-alpha und GAPDH und mit Hilfe des „Titan One Tube RT-PCR Systems“ (Roche, Mannheim) wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und im Techne Genius Thermo Cycler vervielfältigt. Die Primer

hatten eine Endkonzentration von 300 nM. Zur Reversen-Transkriptase (RT)-PCR wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: Für das Primerannealing und die reverse Transkription wurde bei 50°C für 2 Minuten inkubiert. Die reverse Transkriptase wurde während 2 Minuten bei 94°C zerstört und die Template denaturiert. Es folgten 25 Zyklen für GAPDH und 35 Zyklen für TNF-alpha. Bei 94°C wurde für 2 Minuten denaturiert, das Primerannealing erfolgte bei 52°C für 30 Sekunden und die Strangverlängerung bei 68°C für 1 Minute. Bei der Strangverlängerung wurde ab dem 11 Zyklus eine Zyklusverlängerung von 6 Sekunden je Zyklus durchgeführt. Durch Elektrophorese in einem 1,5%-igen Agarosegel wurden die Proben aufgetrennt und durch Vergleich mit einer 100-Basenpaar DNA-Leiter identifiziert. Die Banden von TNF-alpha und GAPDH wurden ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen, Hilden) isoliert. Ein Aliquot des Eluats (30 µl) wurde 1:100 mit Wasser (Sigma Chemie, Taufkirchen) verdünnt. Ausgehend von dieser Lösung wurden relative Standardkonzentrationen von 1; 0,2; 0,04; 0,008; 0,0016; 0,00032 und 0,000064 hergestellt. Zur relativen Quantifizierung wurde die TNF-alpha Expression relativ zu dem normalerweise konstant exprimierten GAPDH-Gen bestimmt.

#### *Durchführung der Echtzeit-PCR*

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt: 50°C, 2 Minuten; 95°C, 10 Minuten gefolgt von 50 Zyklen: 95°C, 15 Sekunden; 60°C, 1 Minute.

Die optimalen Endkonzentrationen beider TNF-alpha Primer und der GAPDH-Primer waren 300 nM. Die optimalen Endkonzentrationen der Sonden für TNF-alpha und GAPDH waren 125 nM. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch mit einem 4-20% Novex Polyacrylamid-Gel auf Abwesenheit von unspezifischen PCR-Produkten überprüft.

#### Reaktionsansatz:

Universal Master Mix (P.E. Biosystems):	20 µl
Sonde:	4 µl
Vorwärtsprimer:	4 µl
Rückwärtsprimer:	4 µl
Wasser:	4 µl
Proben cDNA:	4 µl

Von diesen 40 µl wurden 38 µl in das Reaktionsgefäß pipettiert.

Primer und Sonden wurden von P.E. Applied Biosystems synthetisiert. Die Sonden wurden mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Fluorophor und 6-Carboxy-N, N, N', N',-Tetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert. Primer und Sonde für das „Housekeeping Gen“ GAPDH sind einer Veröffentlichung von Winer et al. (102) entnommen:

Vorwärtsprimer: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA-3'

Rückwärtsprimer: 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3'

Sonde: 5'-FAM-CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC TC-TAMRA-3'

Das Amplikon ist 177 Basenpaare lang.

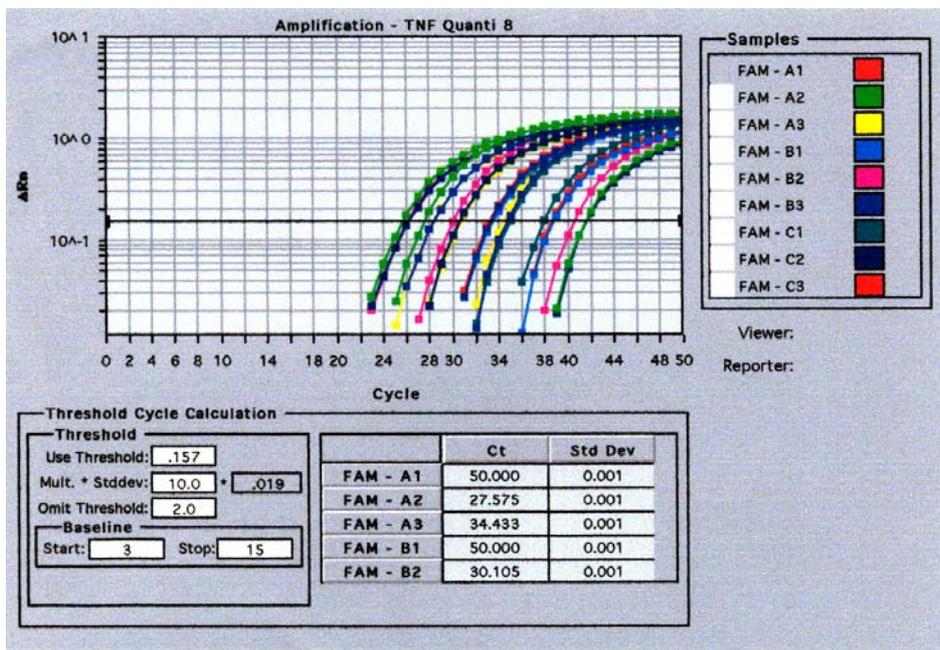
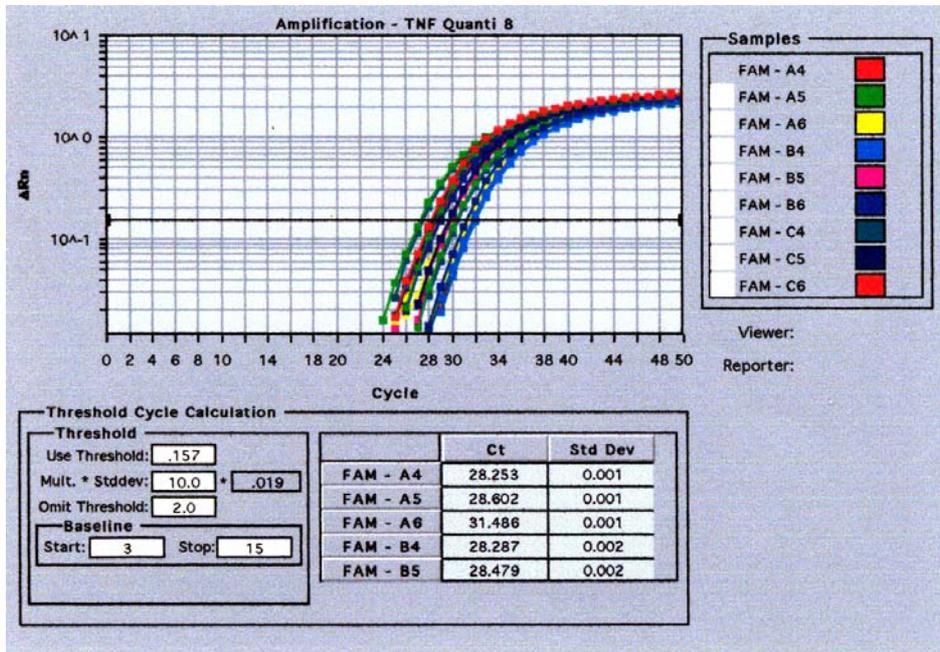
Primer und Sonde für TNF-alpha wurden einer Veröffentlichung von DePre et al. (103) entnommen und modifiziert. Damit der Rückwärtsprimer komplette Übereinstimmung mit der entsprechenden cDNA hat, wurde die vorletzte Base durch ein Guanosin ersetzt.

Vorwärtsprimer: 5'-ATC ATC TTC TCA AAA CTC GAG TGA C-3'

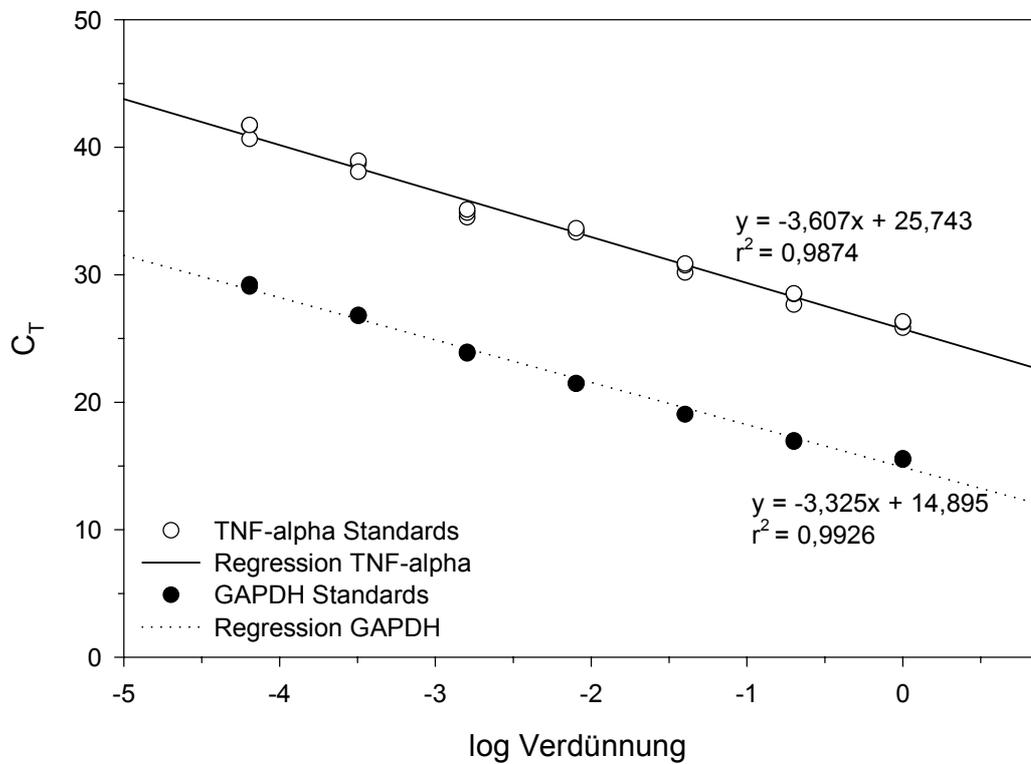
Rückwärtsprimer: 5'-TTG AGA TCC ATG CCA TTG G-3'

Sonde: 5'-FAM-AGC CCA CGT CGT AGC AAA CCA CC-TAMRA-3'

Das Amplikon ist 125 Basenpaare lang.



**Abbildung 3:** Typische Amplifikationskurven von TNF-alpha cDNA-Proben (oben) und TNF-alpha cDNA-Standardverdünnungen (unten). (Originalausdrucke „ABI Prism Sequence Detection Systems 1.6.3“; P.E. Applied Biosystems, Weiterstadt).



**Abbildung 4:** Repräsentative Standardkurven der cDNA von TNF-alpha und GAPDH (Einzelwerte).

Die Ausgangskonzentrationen der Zielsequenz TNF-alpha und des „Housekeeping Gens“ GAPDH wurden über die jeweiligen Standardkurven bestimmt (Abbildung 4). Die Expression der TNF-alpha mRNA wurde relativ zur Expression der GAPDH mRNA berechnet. Die relativen Expressionen der TNF-alpha mRNA wurden auf die relative Expression dieses Gens einer unbehandelten Wistar Ratte normalisiert.

## 2.4. Statistische Verfahren

Wenn nicht anders angegeben, sind die dargestellten Punkte Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 identischen Ansätzen bzw. Mittelwerte aus Einzelbestimmungen der jeweiligen Messparameter von mindestens 3

verschiedenen Tieren. Die Signifikanz des Vergleichs zweier Mittelwerte wurde mit dem Student t-Test ermittelt. Die entsprechenden Signifikanzniveaus sind jeweils bei den Abbildungen oder im Text angegeben. Bei Bestimmung der Signifikanzen wurden jeweils die Tiere aller Versuchsgruppen mit den LEC Ratten ohne Befund und den LEC Ratten mit Ikterus verglichen.

## **2.5. Chemikalien**

Alle nicht näher spezifizierten Chemikalien waren von der höchsten kommerziell erhältlichen Qualität.

## 3. ERGEBNISSE

### 3.1. Pathologie und labordiagnostische Befunde

*LEC, ohne Befund, Alter 70 Tage*

Erwartungsgemäß war bei den LEC Ratten im Alter von 70 Tagen der Cu-Gehalt im Plasma mit  $182 \pm 106$  ng/ml im Vergleich zu Wistar Kontrolltieren ( $1129 \pm 265$  ng/ml) aufgrund des Ceruloplasminmangels stark erniedrigt (Tabelle 1). Histologisch waren die Lebern ohne Befund (Abbildung 5 A) und entsprechend lagen die Aktivitäten der GOT, die Bilirubingehalte im Plasma und die Körpergewichte der LEC Tiere im Normalbereich (Tabelle 1).

In der normalen Leber lagen die Makrophagen nahezu ausschließlich als Kupffersche Sternzellen vor. Die Anzahl und die Größe dieser leberresidenten Makrophagen war in LEC Ratten ähnlich derjenigen von Wistar Tieren (Abbildungen 6, 7 A). In der Elektronenmikroskopie stellten sich allenfalls einzelne Hepatozyten mit aufgelockertem Zytoplasma und leicht dilatierten Cristae der Mitochondrien dar. Darüber hinaus zeigte sich ultrastrukturell vereinzelt kleinflächiges, kontrastreiches Material, vorwiegend in den hepatozytären Lysosomen (Abbildungen 8.1 A, B). Das endoplasmatische Retikulum und die äußere Zellmembran waren unauffällig. Die Kupfferschen Sternzellen zeigten die für diese Zellen typischen armförmigen Ausstülpungen.

**Tabelle 1:** Labordiagnostische Befunde und Leberpathologie

Tiergruppe (Anzahl der Tiere)	Alter (Tage) (Mittelwert ± SD)	GOT (U/l) (Mittelwert ± SD)	Bilirubin (mg/dl) (Mittelwert ± SD)	Serum-Cu (ng/ml) (Mittelwert ± SD)	Leber- pathologie
Wistar (n=3)	72 (72 ± 0)	101-115 (107 ± 7) <sup>#</sup>	<0,5	823-1511 (1129 ± 265) <sup>*</sup>	unauffällig
LEC, ohne Befund, Alter 70 Tage (n=3)	70 (70 ± 0)	123-157 (137 ± 18) <sup>#</sup>	<0,5	114-305 (182 ± 106) <sup>#</sup>	unauffällig
LEC, beginnende Leberschädigung, Alter 78 Tage (n=3)	78 (78 ± 0)	131-150 (138 ± 10) <sup>#</sup>	<0,5	154-274 (219 ± 61) <sup>*#</sup>	auffällig
LEC, Ikterus, Alter 92 Tage (n=4-8)	90-94 (92 ± 1)	810-1412 (1066 ± 223) <sup>*</sup>	1,3-23,9 (11,3 ± 9,1)	1098-1356 (1235 ± 115) <sup>*</sup>	auffällig
LEC, 3xCEL ab Tag 69, Alter 79 Tage (n=3)	79 (79 ± 0)	420-520 (468 ± 50) <sup>*#</sup>	<0,5	245-406 (299 ± 92) <sup>#</sup>	auffällig
LEC, 7xCEL ab Tag 69, Alter 93 Tage (n=3)	93 (93 ± 0)	1575-2219 (1890 ± 322) <sup>*#</sup>	0,6-1,1 (0,9 ± 0,3)	1287-1564 (1443 ± 115) <sup>*</sup>	auffällig
LEC, 1xCEL am Tag 91, Alter 92 Tage (n=5)	91-94 (92 ± 1,3)	3250-4720 (4054 ± 613) <sup>*#</sup>	5,8-24,6 (14,9 ± 8,4)	1795-2335 (2007 ± 205) <sup>*#</sup>	auffällig

\* signifikant verschieden von den LEC Ratten ohne Befund (p<0,01).

# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus (p<0,01).

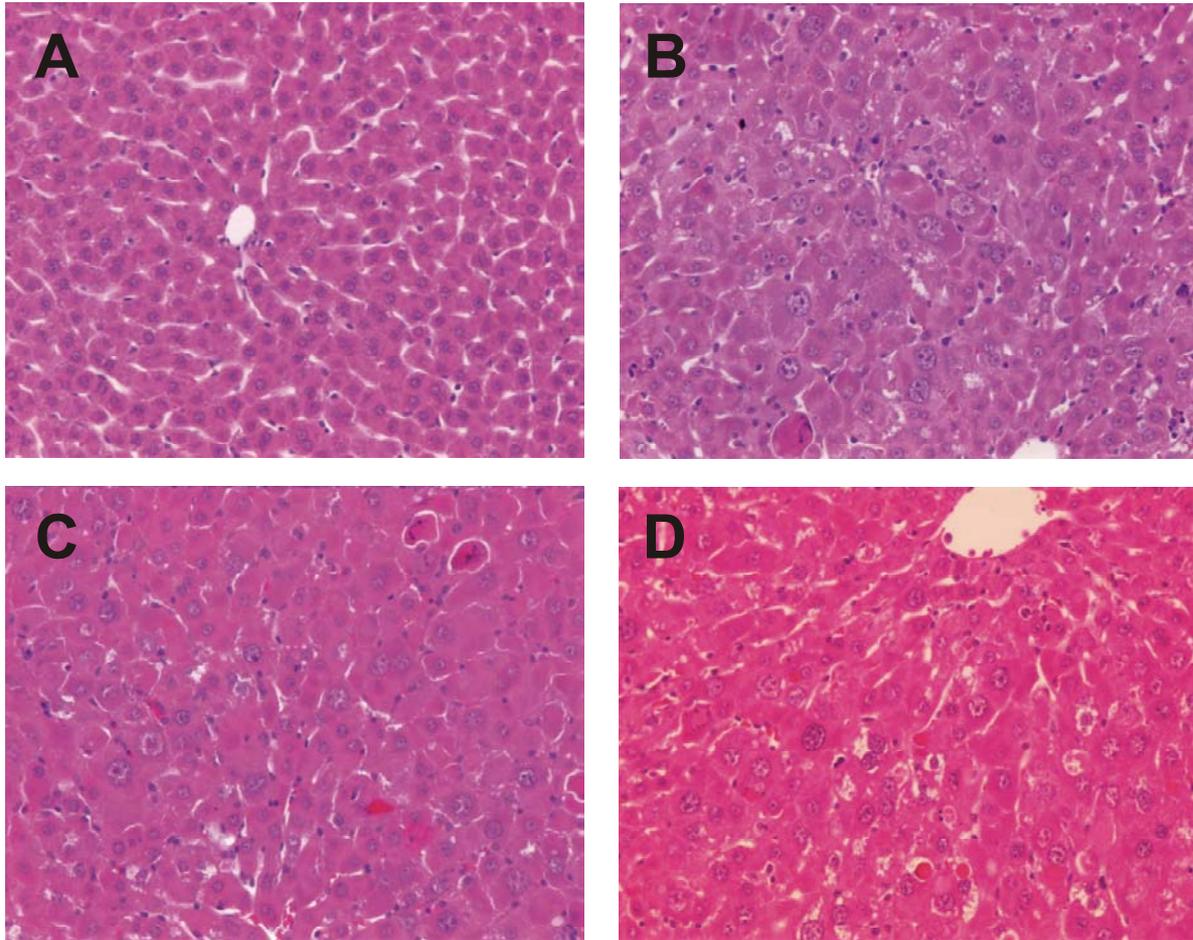
*LEC, beginnende Leberschädigung, Alter 78 Tage*

Der Cu-Gehalt im Plasma der LEC Ratten im Alter von 78 Tagen betrug 219 ± 61 ng/ml. Die GOT-Aktivitäten und Bilirubinwerte lagen im Bereich der Kontrollwerte

(Tabelle 1) und die Tiere wiesen eine normale Gewichtszunahme auf. Das histologische Bild der Lebern zeigte eine beginnende Schädigung. Es wurden vereinzelt apoptotische Zellen beobachtet, weiterhin wiesen die Lebern vereinzelte Leberzellmitosen und vergrößerte Leberzellkerne auf, zudem war das Zytoplasma der Hepatozyten teilweise vakuolisiert (nicht gezeigt). Die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen war gegenüber den LEC Tieren ohne Befund, im Mittel um das 1,5-fache erhöht, die Größe dieser Zellen war jedoch unverändert (Abbildungen 6, 7 B). Ultrastrukturelle pathologische Veränderungen, wie dilatierte Cristae der Mitochondrien sowie schütteres und vakuolisiertes Zytoplasma, traten in der Mehrzahl der Hepatozyten auf. Wie bei den LEC Ratten ohne Befund befand sich wenig elektronendichtes Material nahezu nur in den Lysosomen der Hepatozyten, die Zellen des retikuloendothelialen Systems hingegen waren diesbezüglich unauffällig (nicht gezeigt).

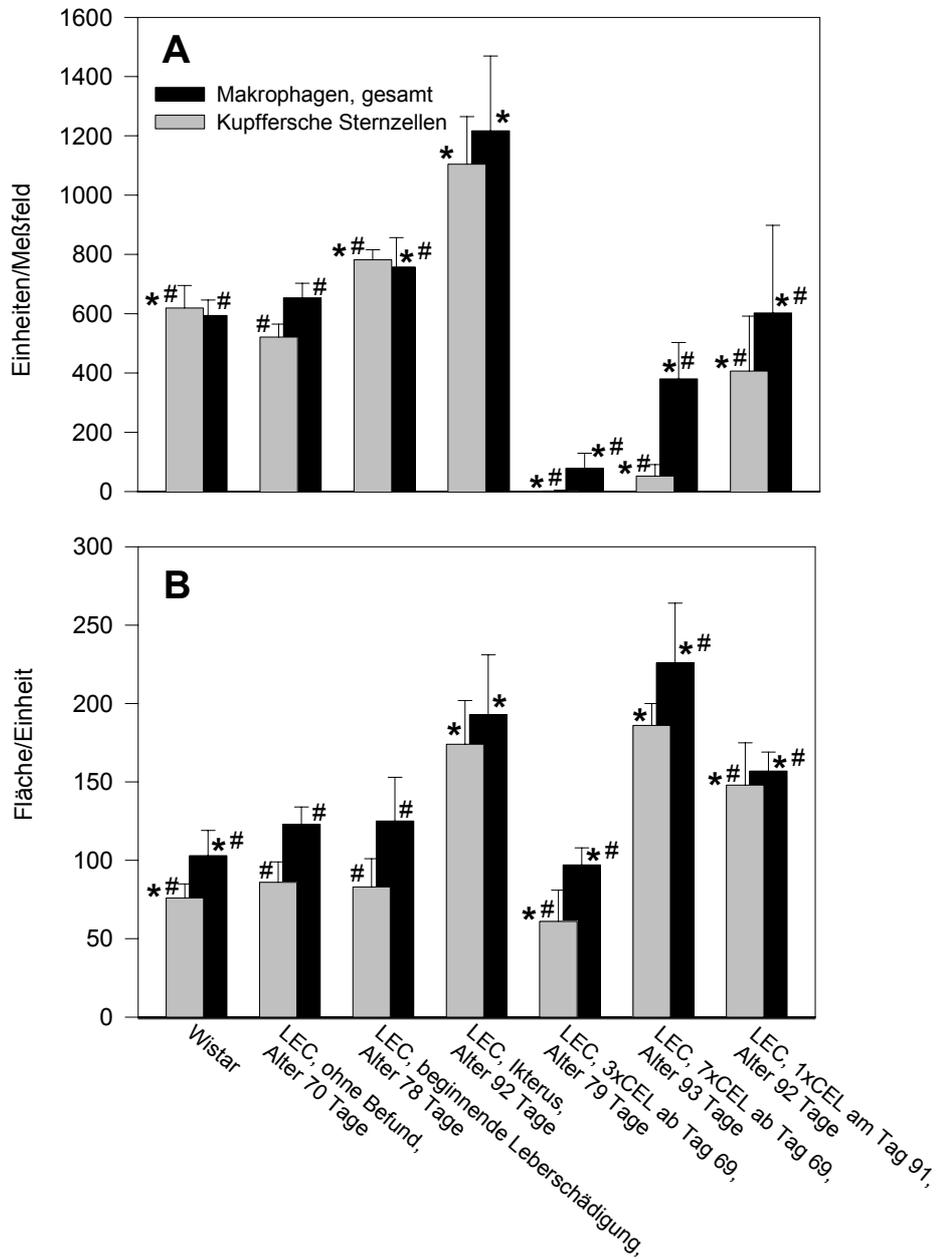
#### *LEC, Ikterus, Alter 92 Tage*

Bei den LEC Ratten im Alter von 90 bis 94 Tagen entwickelte sich eine akute Hepatitis mit Ikterus. Erste Anzeichen waren gelbe Ohren, Nasen und Pfoten der Tiere und Bilirubinurie. Der mittlere Cu-Gehalt im Plasma der LEC Ratten begann ab dem Alter von 83 Tagen anzusteigen und war während der klinisch fulminanten Phase der Hepatitis um den Faktor 6,8 gegenüber den Tieren ohne Befund erhöht. Die GOT-Aktivitäten stiegen ab dem Alter von 90 Tagen stark an, das Maximum der Aktivität lag im Mittel bei  $1066 \pm 223$  U/l und auch die Bilirubinwerte waren deutlich erhöht (Tabelle 1). Das Körpergewicht der Tiere nahm ab dem Alter von etwa 85 Tagen nicht weiter zu. Histologisch waren in den Lebern der Tiere zahlreiche apoptotische Zelluntergänge, sowie Einzelzellnekrosen und Gallethromben zu beobachten (Abbildungen 5 B, C). Bei etwa der Hälfte der Tiere kam es zu Erythrophagozytose. Die Hepatozyten waren hypertroph und etwa doppelt so groß wie normale Leberzellen, das Zytoplasma war mitunter sehr schütter und stark vakuolisiert. Gallengangproliferationen und viele Hepatozyten mit Riesenzellkernen wurden als mögliche Folge von Regenerationsprozessen festgestellt. Auch waren etliche zweikernige Leberzellen zu beobachten. Zahlreiche hepatische



**Abbildung 5:** Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte der Leber einer LEC Ratte ohne Befund (A), einer LEC Ratte mit Ikterus (B,C) und einer 7 mal mit CEL behandelten LEC Ratte (D). (Vergrößerung jeweils 100-fach).

Mesenchymzellen waren in Form von kleinkernigen Zellen in den Sinusoiden, aber auch zwischen den Hepatozyten zu erkennen (Abbildungen 5 B, C). Die Makrophagen der Leber waren fast ausschließlich Kupffersche Sternzellen. Die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen erreichte ihr Maximum im Stadium der akuten Hepatitis und war im Vergleich zu den LEC Ratten ohne Befund im Mittel verdoppelt. Auch die Fläche der Kupfferschen Sternzellen war im Mittel um den Faktor 2 größer (Abbildungen 6, 7 C). Vielfach fanden sich Aggregate aus Makrophagen, sogenannte mesenchymale Resorptionsknötchen, im Lebergewebe.



**Abbildung 6:** Anzahl (A) und Größe (B) der Kupferschen Sternzellen und der Summe aus Kupferschen Sternzellen und peripheren Makrophagen (Makrophagen, gesamt) in der Leber von LEC und Wistar Ratten (Mittelwerte ± SD, n=3-6).

\* signifikant verschieden von den LEC Ratten ohne Befund (p<0,01).

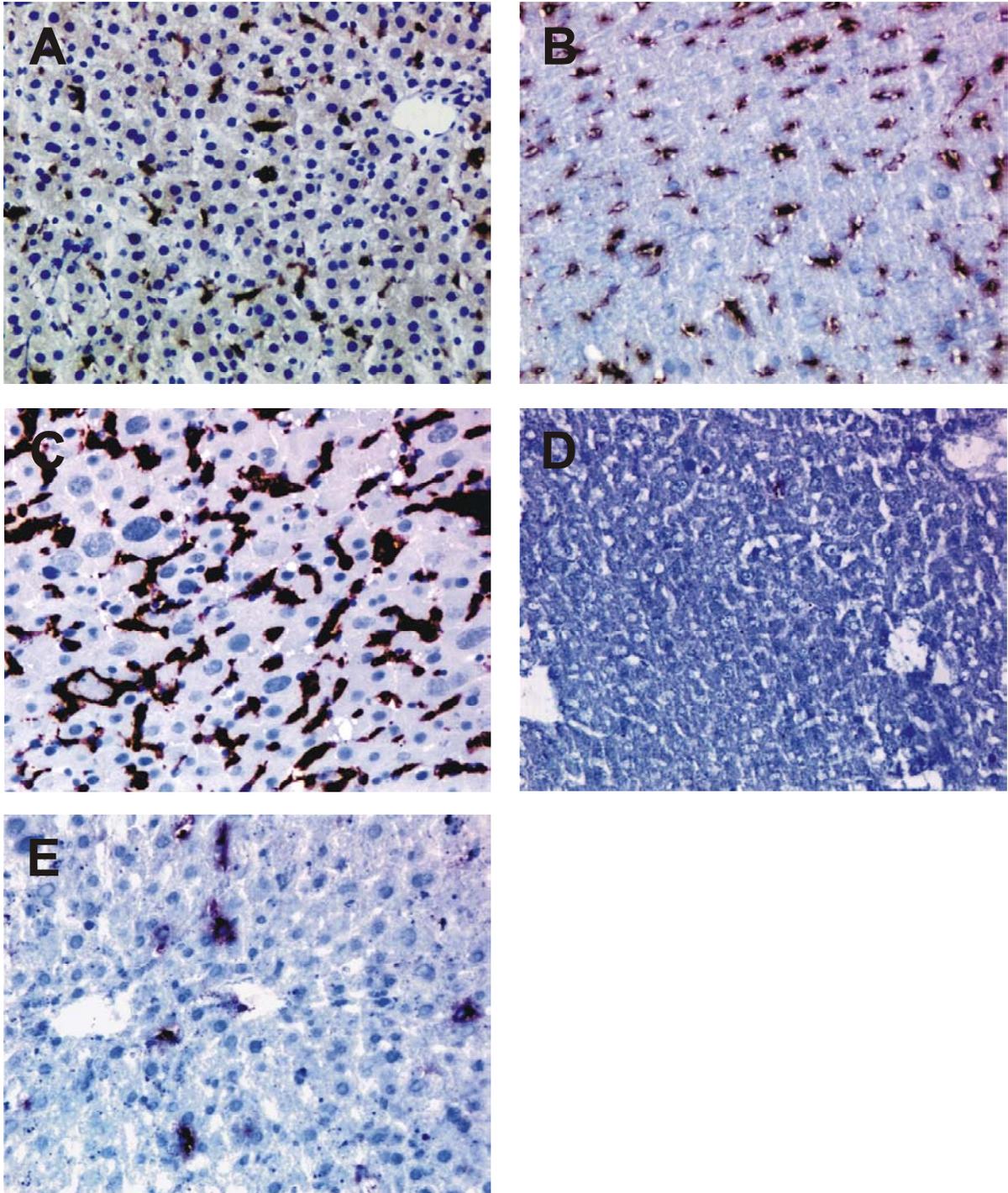
# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus (p<0,01).

---

Die Leberschädigung zeigte sich auch ultrastrukturell; in den Leberzellen erschien die Anzahl der Mitochondrien verringert und die Cristae der Mitochondrien sowie das endoplasmatische Retikulum waren erweitert. Darüber hinaus war das Zytosol vakuolisiert und enthielt zahlreiche Fetteinlagerungen. Die Hepatozyten waren teilweise derartig vergrößert und die Zellkontakte so verändert, dass die Zellmembran in der Elektronenmikroskopie nicht mehr deutlich auszumachen war. Die Oberfläche der Kupfferschen Stenzellen war im Vergleich zu denen der LEC Ratten ohne Befund glatter und nicht mehr durch Ausstülpungen gekennzeichnet. Die Makrophagen befanden sich im Gegensatz zu den gesunden Tieren auch zwischen den Leberzellen. In den Lysosomen der Hepatozyten und der Kupfferschen Sternzellen fand sich vermehrt elektronendichtes Material (Abbildungen 8.1 C, D), welches insbesondere in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen zu voluminösen Aggregaten zusammengepackt war. Auch in den isolierten Hepatozyten und Kupfferschen Sternzellen einer LEC Ratte mit Ikterus zeigten sich Partikel mit elektronendichtem Material in den Lysosomen (Abbildung 9), vor allem in denen der Kupfferschen Sternzellen.

#### *LEC, 3xCEL ab Tag 69, Alter 79 Tage*

Bei den 3-malig mit CEL behandelten LEC Ratten waren die Kupfferschen Sternzellen weitestgehend eliminiert (Abbildungen 6 A, 7 D). Das Plasma-Cu und Bilirubin lagen im Bereich der Normalwerte, die GOT-Aktivitäten waren jedoch im Mittel um den Faktor 3,4 signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber den Werten der gleichaltrigen Tiere mit beginnender Leberschädigung erhöht (Tabelle 1). Das Körpergewicht, die histopathologischen (Tabelle 1) und die elektronenmikroskopischen Befunde, insbesondere die Häufigkeit des elektronendichtes Materials in den Lysosomen der Hepatozyten, waren ähnlich wie bei den LEC Ratten mit beginnender Leberschädigung (nicht gezeigt).



**Abbildung 7:** Immunhistochemisch gefärbte Kupffersche Sternzellen in der Leber von LEC Ratten ohne Befund (A), LEC Ratten mit beginnender Leberschädigung (B), LEC Ratten mit Ikterus (C), 3 mal mit CEL behandelten LEC Ratten (D) und LEC Ratten die 7 mal mit CEL behandelt worden waren (E). (Vergrößerung jeweils 100-fach).

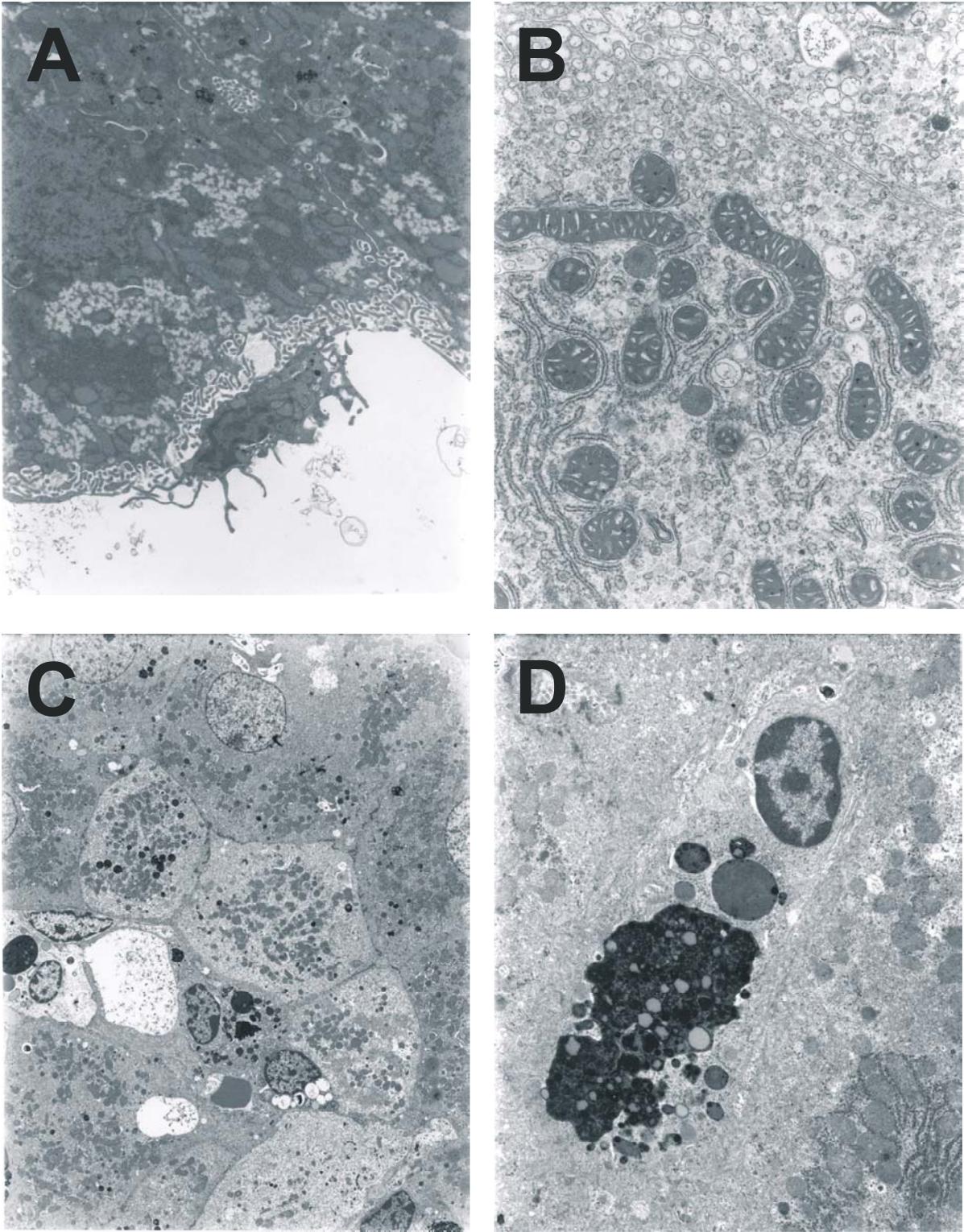
*LEC, 7xCEL ab Tag 69, Alter 93 Tage*

Die 7 mal mit CEL behandelten LEC Ratten erkrankten etwa im gleichen Alter wie die unbehandelten LEC Tiere an akuter Hepatitis. Die Plasma-Cu-Gehalte der CEL behandelten Tiere waren im Mittel mit  $1443 \pm 115$  ng/ml gegenüber denen der unbehandelten Tieren mit Ikterus ( $1235 \pm 115$  ng/ml) signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ). Die GOT-Aktivitäten waren ebenfalls im Mittel um den Faktor 1,8 signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht. Die höchste mittlere GOT-Aktivität betrug  $1890 \pm 322$  U/l. Die Bilirubinkonzentrationen waren hingegen nur leicht erhöht (Tabelle 1), das Körpergewicht der Tiere entsprach in etwa dem der LEC Ratten mit Ikterus und blieb etwa ab dem Alter von 85 Tagen unverändert.

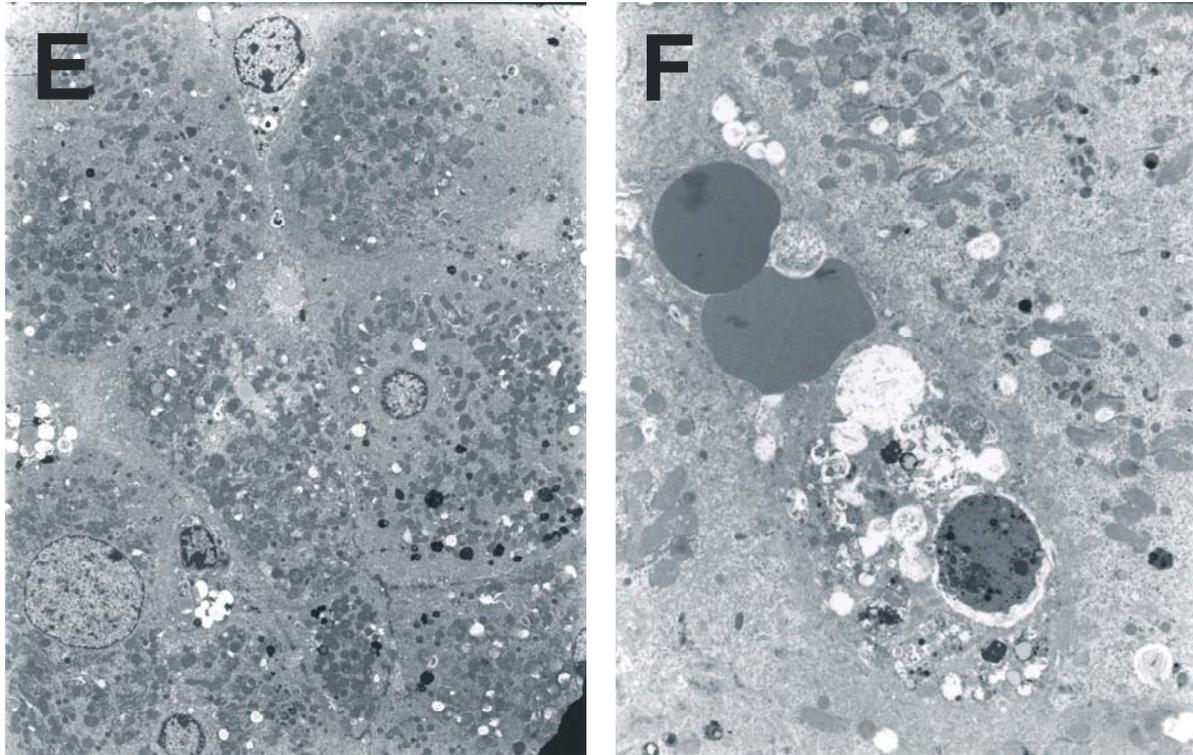
Histologisch waren die Lebern der 7 mal mit CEL behandelten Ratten ähnlich der Lebern der Tiere mit akuter Hepatitis, die Hepatozyten waren von einer kleinvakuolären Degeneration betroffen und das Zytoplasma schütter. Nahezu alle Leberzellen waren hypertroph und von ähnlicher Größe wie bei den Tieren mit Ikterus. Besonders auffällig waren Einzelzellnekrosen und ein häufiges Auftreten von Apoptose. Im Unterschied zu den unbehandelten Tieren mit Ikterus fanden sich zudem zahlreiche eosinophile, kugelförmige Einschlüsse im Leberparenchym, sogenannte Apoptosekörperchen (Abbildung 5 D).

Im Vergleich zum Behandlungsbeginn war bei diesen Tieren eine nur sehr geringe Anzahl von Kupfferschen Sternzellen, entsprechend etwa 8% der Anzahl bei den LEC Ratten ohne Befund, zu beobachten (Abbildungen 6 A, 7 E). Die Größe dieser Makrophagen glich der bei den Tieren mit Ikterus (Abbildung 6 B). Die Anzahl peripherer Makrophagen war bei diesen Ratten im Vergleich zu den 3 mal mit CEL behandelten Tieren deutlich erhöht (Abbildung 6 A).

Ultrastrukturell war das Lebergewebe stärker geschädigt als das der LEC Tiere mit Ikterus; etliche Hepatozyten befanden sich bereits im Untergang und vor allem erschienen die Mitochondrien stärker betroffen. Diese Organellen waren geschwollen und die Struktur der Cristae war in den meisten Fällen nicht mehr erkennbar. Sowohl in Hepatozyten als auch in Makrophagen waren elektronendichte Partikel zu erkennen (Abbildung 8.2 E).



**Abbildung 8.1:** Feinstrukturen der Leber einer LEC Ratte ohne Befund (A, B). und der Leber einer LEC Ratte mit Ikterus (C, D). (Vergrößerungen: (A, D) 4.320-fach, (B) 9.740-fach und (C) 1.280-fach).

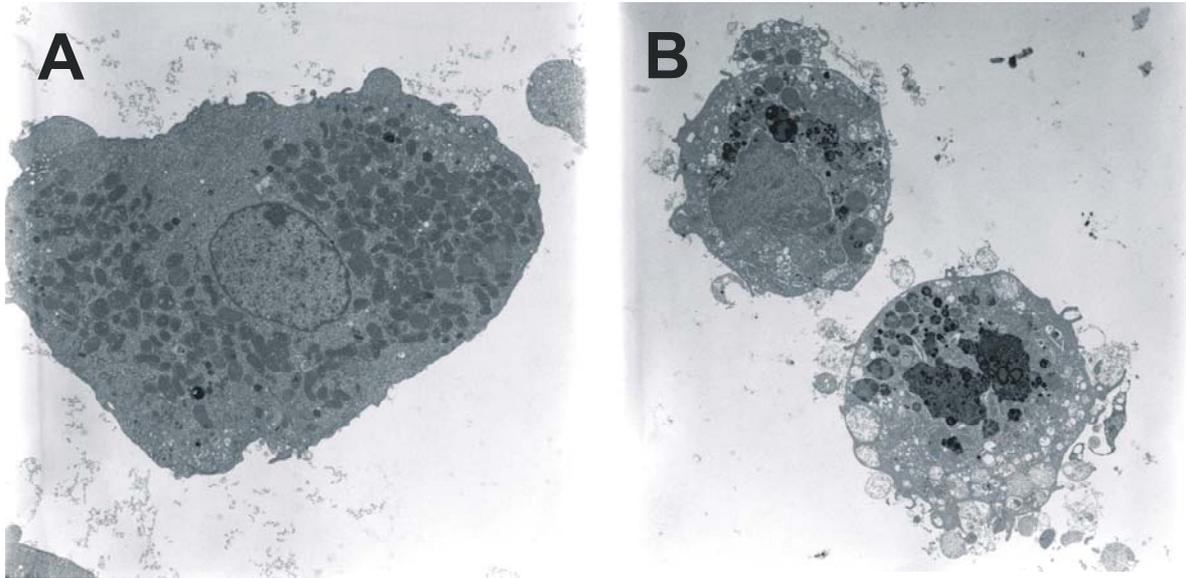


**Abbildung 8.2:** Feinstrukturen der Leber einer LEC Ratte, die 7 mal mit CEL behandelt worden war (E) und der Leber einer LEC Ratte, die einmalig mit CEL-behandelt worden war (F). (Vergrößerungen: (E) 1.280-fach, (F) 3.370-fach).

#### *LEC, 1xCEL am Tag 91, Alter 92 Tage*

Die LEC Ratten, die einmalig im Zustand der akuten Hepatitis mit CEL behandelt worden waren, hatten Plasma-Cu-Konzentration, die um 60% von  $1235 \pm 115$  ng/ml vor der CEL-Gabe auf  $2007 \pm 205$  ng/ml danach erhöht waren (nicht gezeigt). Außerdem wurde eine deutliche Hämurie und eine Hämolyse von 12% der Erythrozyten festgestellt. Die GOT-Aktivitäten von im Mittel  $4054 \pm 613$  U/l, beziehungsweise Bilirubingehalte von im Mittel  $14,9 \pm 8,4$  mg/dl waren massiv erhöht (Tabelle 1).

Histologisch wurden Einzelzellnekrosen, Apoptosen und Apoptosekörperchen und außerdem Hepatozyten mit disseminiert hydropischer kleinvakuolärer Degeneration beobachtet. Die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen war um 63% vermindert (Abbildung 6 A). In der Elektronenmikroskopie war zwischen den parenchymalen



**Abbildung 9:** Feinstruktur eines isolierten Hepatozyten (A) und von Kupfferschen Sternzellen (B) einer LEC Ratte mit Ikterus. (Vergrößerung jeweils 2.150-fach). In normalen Leberzellen finden sich keine elektronendichten Partikel in den Lysosomen (nicht gezeigt).

Leberzellen an vielen Stellen kontrastreiches Material zu beobachten, das nicht zellulär, d.h. von keiner Membran umgeben war (Abbildung 8.2 F). Kontrastreiche Partikel dieser Größe waren sonst nur in den Kupfferschen Sternzellen zu finden.

#### *Wistar Kontrolltiere*

Alle Wistar Ratten waren histologisch unauffällig, lediglich bei den mehrfach CEL-behandelten Tieren waren, wie erwartet, die Kupfferschen Sternzellen, ähnlich wie die der CEL-behandelten LEC Ratten, eliminiert. Die GOT-Aktivitäten der 3 mal und 7 mal mit CEL behandelten Wistar Tiere ( $205 \pm 34$  U/l beziehungsweise  $228 \pm 28$  U/l) waren gegenüber den nicht behandelten Wistar Ratten ( $107 \pm 7$  U/l) leicht erhöht (Tabelle 1). Die Parameter Bilirubin und Plasma-Cu lagen im Normalbereich.

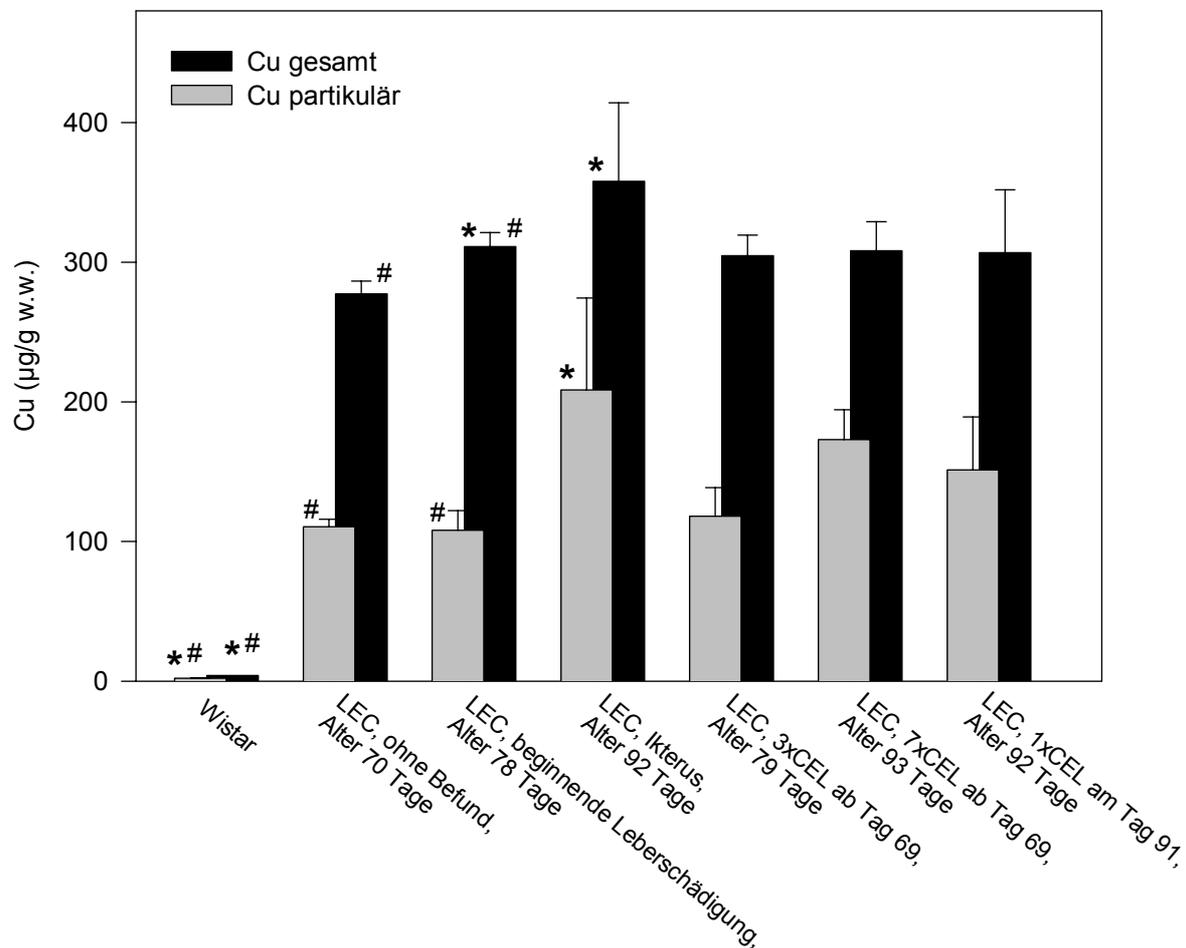
Um zu überprüfen, ob die Zerstörung der Kupfferschen Sternzellen mit CEL toxische Effekte hat, wurden mit Zymosan vorbehandelte Wistar Ratten einmalig mit CEL injiziert. Zymosan induziert das Wachstum der Kupfferschen Sternzellen (91). Nach

der Zymosan-Behandlung war die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen ähnlich der von LEC Ratten mit Ikterus. Durch die Behandlung der Wistar Ratten mit CEL war die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen von  $1349 \pm 130$  Einheiten/Messfeld auf  $120 \pm 14$  Einheiten/Messfeld vermindert worden (nicht gezeigt). Die Wistar Ratten zeigten keine Hämurie und auch die Bilirubinkonzentrationen waren normal. Die GOT Aktivitäten betragen im Mittel  $1060 \pm 423$  U/l und lagen deutlich unter den GOT-Aktivitäten der einmalig im Zustand der akuten Hepatitis mit CEL behandelten LEC Ratten ( $4054 \pm 613$  U/l) (nicht gezeigt).

Ob die einmalige CEL-Injektion oder Zymosan toxisch wirken, wurde durch entsprechende Behandlung von Wistar Ratten untersucht. Nur mit Zymosan behandelte Wistar Ratten hatten normale GOT-Aktivitäten von im Mittel  $132 \pm 40$  U/l. Die GOT-Aktivitäten von Wistar Ratten nach einer einmaligen CEL-Behandlung waren gegenüber denen der unbehandelten Wistar Ratten mit im Mittel  $729 \pm 224$  U/l erhöht (nicht gezeigt).

### **3.2. Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Cu in der Leber**

Der Cu-Gehalt in der Leber der unbehandelten LEC Tiere stieg kontinuierlich an und erreichte das Maximum im Stadium der akuten Gelbsucht (Abbildung 10). Die Zunahme des Gesamt-Cu-Gehaltes in der Leber bis zum Auftreten des Ikterus war in erster Linie dem Anstieg des Metallgehaltes in der partikulären Fraktion, welche die Mitochondrien, die Lysosomen, Zellkerne und Membranfragmente enthält, zuzuschreiben. Der Anteil des zytosolischen Cu, errechnet aus der Differenz zwischen dem Cu-Gehalt in der gesamten Leber und dem Cu-Gehalt in der partikulären Fraktion, betrug vor dem Auftreten der Hepatitis sowohl bei den Tieren mit Ikterus als auch bei den CEL-behandelten LEC Tieren etwa 60% des Gesamtleber-Cu. Nach dem Auftreten der Gelbsucht war der Anteil des zytosolischen Cu bei den LEC Ratten mit Ikterus und den 7-malig mit CEL behandelten LEC Ratten nur noch 40% des Gesamtleber-Cu (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Cu-Gehalte in der Leber von Wistar Ratten und LEC Ratten mit und ohne CEL-Behandlung (Mittelwerte ± SD, n=3-6).

\* signifikant verschieden von den LEC Ratten ohne Befund (p<0,05).

# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus (p<0,05).

### 3.2.1. Isolierte Hepatozyten und Kupffersche Sternzellen

Um die Verteilung von Cu in den Hepatozyten und den Kupfferschen Sternzellen zu quantifizieren, wurden die Lebern von LEC Ratten mit Ikterus mit Collagenase perfundiert, die Zellen isoliert und die Cu-Gehalte in den Fraktionen bestimmt. Abbildung 9 zeigt transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen eines

isolierten Hepatozyten und von zwei isolierten Kupfferschen Sternzellen. In den Lysosomen der Zellen, insbesondere der Kupfferschen Sternzellen ist eine Anreicherung von kontrastreichem Material zu erkennen.

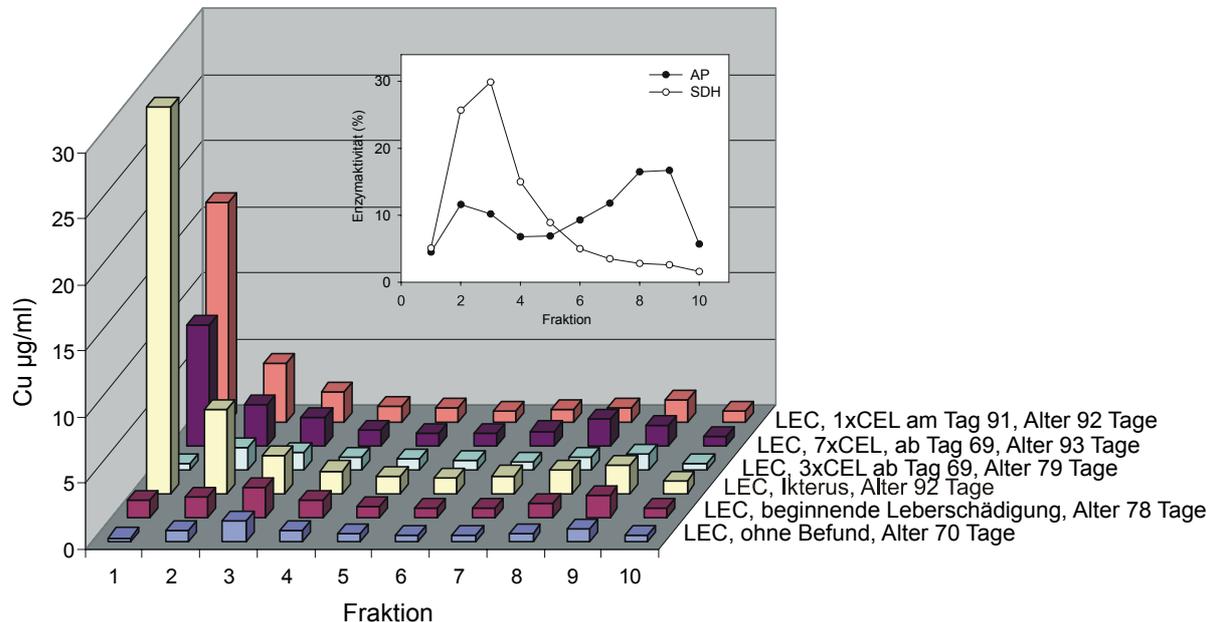
Der Cu-Gehalt der isolierten Hepatozyten einer LEC Ratte mit Ikterus betrug  $2428 \pm 442$  ng/10<sup>6</sup> Zellen. Der Gehalt der Fraktion der isolierten Kupfferschen Sternzellen mit Verunreinigung von Endothelzellen war  $419 \pm 226$  ng/10<sup>6</sup> Zellen.

Um die Cu-Menge abzuschätzen, die in den Kupfferschen Sternzellen einer LEC Ratte mit Ikterus enthalten ist, wurden folgende Daten aus der Literatur zugrunde gelegt. Ein Gramm Rattenleber (Feuchtgewicht) entspricht 100x10<sup>6</sup> Hepatozyten, 35x10<sup>6</sup> Endothelzellen und 25x10<sup>6</sup> Kupfferschen Sternzellen (104). Nach eigenen immunhistochemischen Daten war in den Lebern der LEC Ratten mit Ikterus die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen gegenüber den gesunden Tieren verdoppelt (Abbildung 6 A). Hieraus ergibt sich die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen in einem Gramm Leber einer LEC Ratte mit Ikterus zu etwa 50x10<sup>6</sup>. Der Anteil der Kupfferschen Sternzellen in der Fraktion, die Kupffersche Sternzellen und Endothelzellen enthält, beträgt über die Literaturangaben etwa 59%. Unter der Annahme, dass sich alles Cu dieser Fraktion in den Kupfferschen Sternzellen befindet, errechnet sich der Cu-Gehalt in diesen Zellen auf etwa 710 ng/10<sup>6</sup> Zellen. Aus der Anzahl der Zellen pro Gramm Leber und den Cu-Gehalten der isolierten Zellen ergeben sich die Cu-Gehalte in der Leber für die Hepatozyten mit 243 µg/g Feuchtgewicht und für die Kupfferschen Sternzellen mit 36 µg/g Feuchtgewicht. Die Summe des in den Hepatozyten und den Kupfferschen Sternzellen befindlichen Cu errechnet sich somit zu 277 µg/g Feuchtgewicht. Etwa 13% des in der Leber vorhandenen Cu befindet sich demnach in den Kupfferschen Sternzellen.

### **3.2.2. Lysosomen**

Die Verteilung von Cu in der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion der Leber von LEC Ratten nach Trennung über einen Dichtegradienten ist in Abbildung 11 dargestellt. Wie die Verteilungen der lysosomenspezifischen Aktivität der sauren Phosphatase (AP) und die Aktivität der mitochondrienspezifischen Succinatdehydrogenase (SDH)

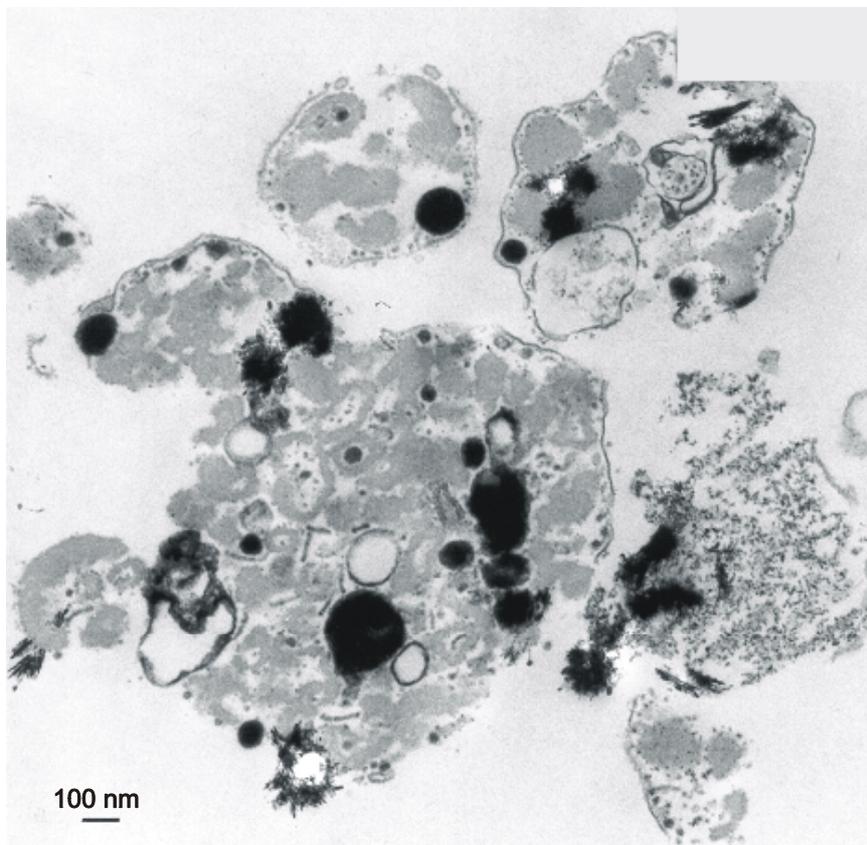
zeigen (Abbildung 11, eingeschobene Abbildung), ist Cu in den Fraktionen 6-9 überwiegend lysosomalen Ursprungs, während die Fraktionen 2-4 überwiegend Cu aus Mitochondrien beinhalten. Der Cu-Gehalt in der Fraktion 10 ist auf zytosolische Verunreinigungen zurückzuführen. Die Fraktion 1 des Dichtegradienten, die schwerste Fraktion, enthielt weder die lysosomen- noch die mitochondrien-spezifischen Markerenzyme AP und SDH und bestand aus unlöslichem, partikulärem Material. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieses Materials zeigten Lysosomen, in die elektronendichte Partikel eingeschlossen waren (Abbildung 12). Deutlich sind die Lysosomenmembranen zu erkennen. Warum in dieser Fraktion keine Aktivität der AP nachgewiesen werden konnte, ist ungeklärt.



**Abbildung 11:** Verteilung von Cu in der Lysosomen-Mitochondrien-Fraktion nach Trennung über einen Dichtegradienten. Die eingeschobene Abbildung zeigt die typische Verteilung der Aktivitäten von saurer Phosphatase (AP) und Succinatdehydrogenase (SDH) in den Fraktionen. (Mittelwerte, n=3-6).

Mit fortschreitender Leberschädigung wurde bei den Tieren mit Ikterus in den Lysosomen der Fraktion 6-9 eine Zunahme von Cu bis zum 2,5-fachen und in den Mitochondrien-Fraktionen 2-4 eine Anreicherung im Mittel bis zum Faktor 3,4 im Vergleich zu den Kontrolltieren (LEC, ohne Befund) beobachtet (Abbildung 11).

Sowohl bei den unbehandelten Tieren mit Ikterus als auch bei den 7 mal mit CEL behandelten Tieren wurden die höchsten Cu-Gehalte in den Lysosomen der Fraktion 1 beobachtet, wobei in den Lebern der CEL-behandelten Tiere deutlich weniger Cu in dieser Fraktion beobachtet wurde als bei den LEC Ratten mit Ikterus. Der Cu-Gehalt der Lysosomen in der Fraktion 1 der LEC Ratten mit Ikterus erreichte im Mittel  $29,3 \mu\text{g/ml}$  und lag damit um das 22-fache über dem der Tiere mit beginnender Leberschädigung und sogar um das 90-fache über dem Wert der LEC Ratten ohne Befund. Die Lysosomen der Fraktion 1 der 7 mal mit CEL behandelten LEC Ratten enthielten hingegen im Mittel  $9,1 \mu\text{g Cu/ml}$  und die der einmalig mit CEL behandelten LEC Ratten  $16,6 \mu\text{g Cu/ml}$ .

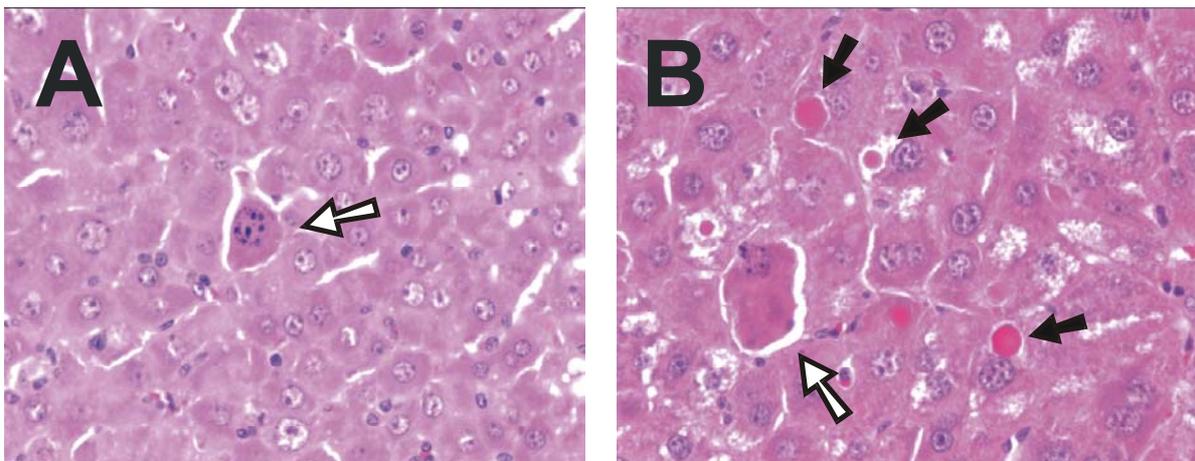


**Abbildung 12:** Feinstruktur der mittels Dichtegradientenzentrifugation isolierten Partikel hoher Dichte (Fraktion 1 des Nycodenzgradienten) aus der Leber einer LEC Ratte mit Ikterus. (52.400-fache Vergrößerung).

### 3.3. Apoptoserelevante Parameter

#### 3.3.1. Apoptoseindex

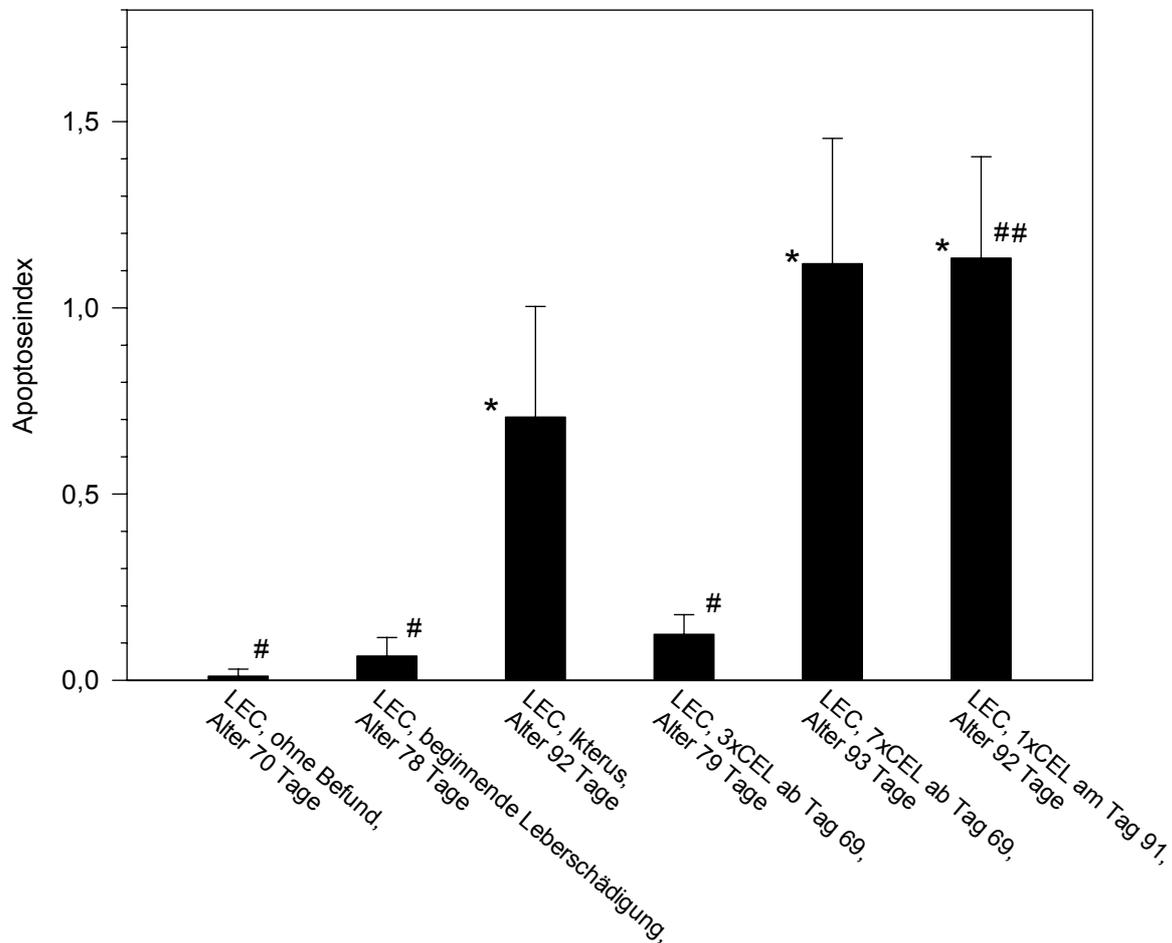
Abbildung 13 (A) zeigt eine apoptotische Zelle einer LEC Ratte mit Ikterus. Das Chromatin des Zellkerns ist kondensiert, die Zelle ist geschrumpft und von den Nachbarzellen abgelöst. Abbildung 13 (B) der Leber eines 7 mal mit CEL behandelten LEC Tieres zeigt eine apoptotische Zelle mit Chromatinkondensation, zusätzlich sind auch einige Apoptosekörperchen erkennbar. Diese Apoptosekörperchen traten bei den LEC Ratten mit Ikterus weit seltener auf.



**Abbildung 13:** Apoptotische Zelle mit Kondensation des Kernchromatins (weißer Pfeil) in der Leber einer LEC Ratte mit Ikterus (A). Aufnahme B der Leber einer 7 mal mit CEL-behandelten Ratte zeigt ebenfalls eine Apoptose mit typischer Zellschrumpfung (weißer Pfeil) und einigen eosinophilen Apoptosekörperchen (schwarze Pfeile). (Vergrößerung jeweils 200-fach).

Im Vergleich zu den LEC Tieren ohne Befund und denen mit beginnender Leberschädigung war eine massive Zunahme der apoptotischen Zellen bei den Tieren mit Ikterus sowie bei den 7 mal mit CEL und den einmalig mit CEL behandelten LEC Ratten zu verzeichnen. Die Apoptoseindices der LEC Tiere mit Ikterus betragen im Mittel  $0,7\% \pm 0,2\%$  und die der 7 mal mit CEL behandelten LEC

Ratten  $1,1\% \pm 0,3\%$ . Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei den einmalig mit CEL behandelten LEC Tieren war der Apoptoseindex mit  $1,1\% \pm 0,3\%$  signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Tieren mit Ikterus. Mit durchschnittlich  $0,1\%$  war der Apoptoseindex der Tiere mit beginnender Leberschädigung vergleichsweise gering. Der Apoptoseindex in den Lebern der LEC Ratten ohne Befund lag im normalen Bereich von  $0,01-0,1\%$  (105, 106) (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Apoptoseindex in der Leber von LEC Ratten mit und ohne CEL-Behandlung. Es wurden ausschließlich Zellen mit den typischen Veränderungen des Kernchromatins und/oder Zellschrumpfung zur Bestimmung herangezogen (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3-4$ ).

Bei gesunden Kontrollratten beträgt der Apoptoseindex  $0,01-0,1\%$  (105).

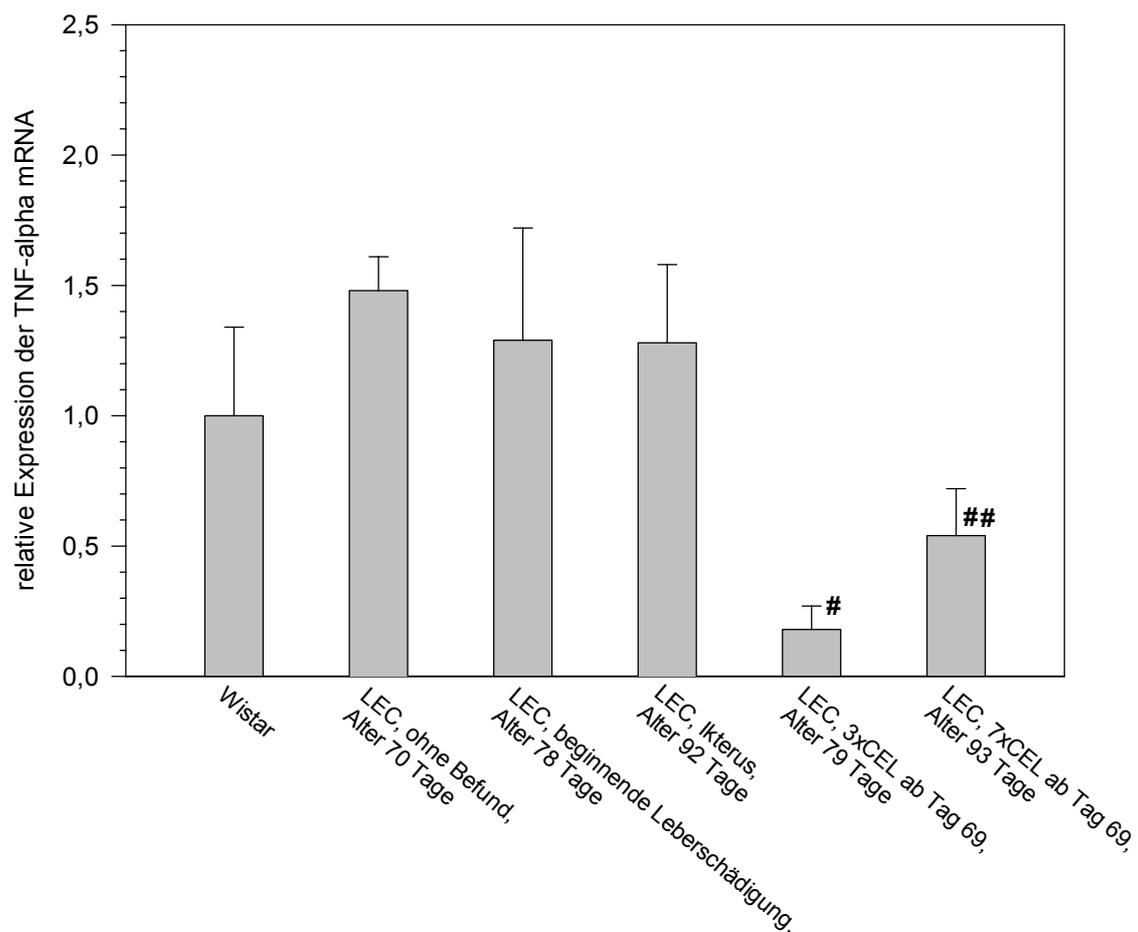
\* signifikant verschieden von den LEC Ratten ohne Befund ( $p<0,01$ ).

# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus ( $p<0,01$ ).

## signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus ( $p<0,05$ ).

### 3.3.2. Genexpression von TNF-alpha

Die Expression der TNF-alpha mRNA in den Lebern der Ratten wurde mit Hilfe der TaqMan Echtzeit-PCR bestimmt. Abbildung 15 zeigt die auf die Expressionen der GAPDH mRNA bezogene Expression der TNF-alpha mRNA in den Lebern gesunder, kranker und behandelter LEC Ratten. Die Expressionen der TNF-alpha mRNA der unbehandelten LEC Ratten blieben auch während der Erkrankungsphase konstant und waren ähnlich der Expression der Wistar-Kontrolltiere. Nach 3-maliger Behandlung mit CEL nahm die relative Expression der TNF-alpha mRNA um 88% signifikant ab. Nach der 7. CEL-Injektion betrug die Abnahme noch 64%.



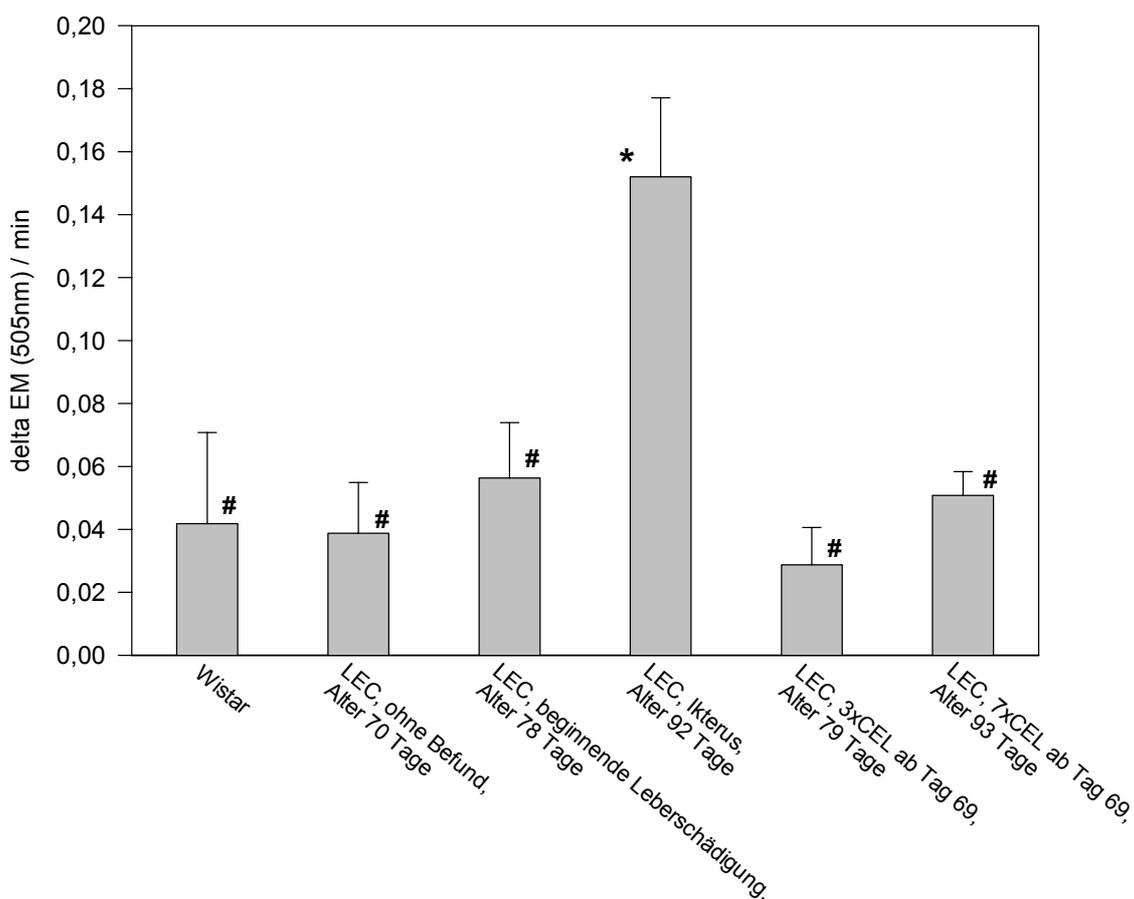
**Abbildung 15:** Relative Expression der TNF-alpha mRNA in den Lebern von LEC Ratten mit und ohne CEL-Behandlung (Mittelwerte  $\pm$  SD, n=3-7).

# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus ( $p < 0,01$ ).

## signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen

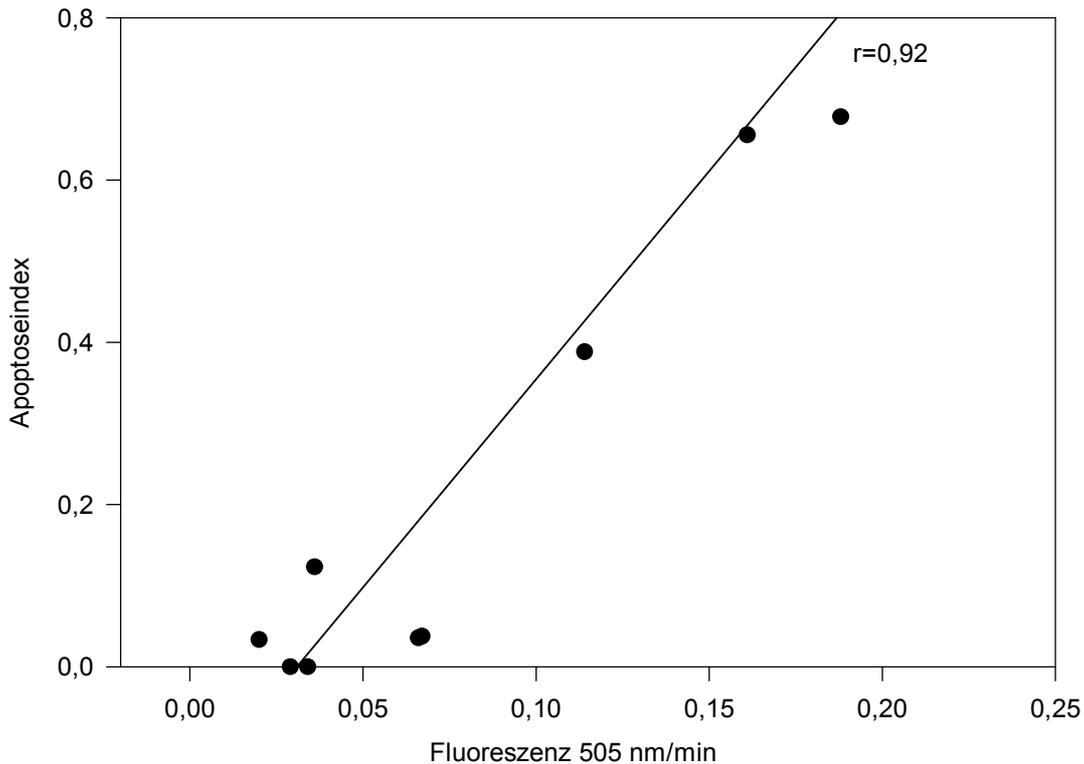
Die Kinetik der Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen wurde mittels enzymatischer Spaltung eines fluorigenen Substrats ermittelt. Die höchste Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen wurde in den Lebern der LEC Ratten mit Ikterus beobachtet (Abbildung 16). Die Aktivitäten der Caspase-3-ähnlichen Proteasen aller nicht behandelten LEC Ratten korrelierten gut mit den Apoptoseindices ( $r=0,92$ ) (Abbildung 17). Bei den 7 mal mit CEL behandelten Tieren war keine Erhöhung der Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen festzustellen.



**Abbildung 16:** Aktivität der Caspase-3 ähnlichen Proteasen in den Lebern von LEC Ratten mit und ohne CEL-Behandlung (Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3-10$ ).

\* signifikant verschieden von den LEC Ratten ohne Befund ( $p<0,01$ ).

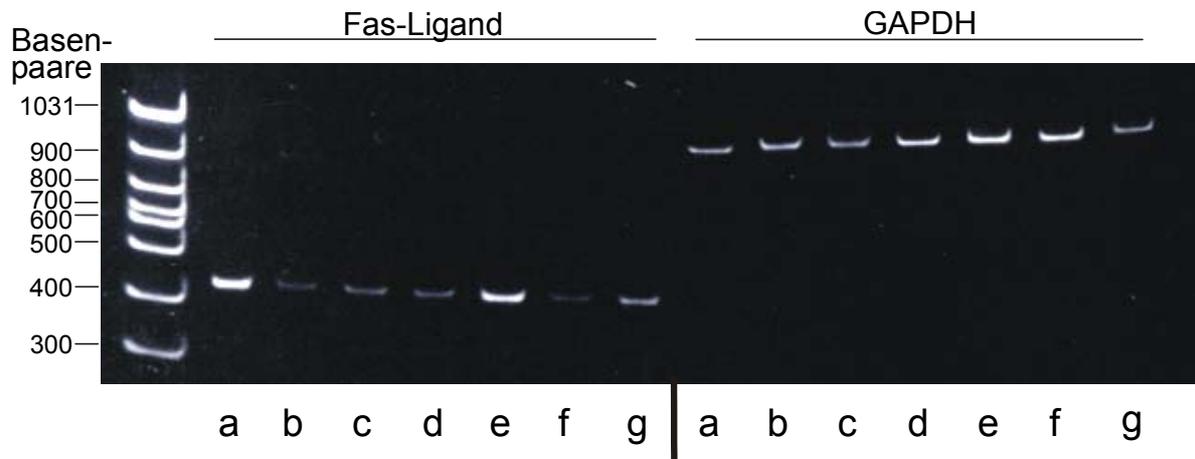
# signifikant verschieden von den LEC Ratten mit Ikterus ( $p<0,01$ ).



**Abbildung 17:** Korrelation zwischen der Aktivität der Caspase-3 ähnlichen Proteasen und dem Apoptoseindex von unbehandelten LEC Ratten (Einzelwerte).

### 3.3.4. Genexpression des Fas-Liganden

Die Expression der Fas-Liganden mRNA in den Lebern der Ratten wurde mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Abbildung 18 zeigt eine Aufnahme des Polyacrylamidgels nach elektrophoretischer Trennung der Proben. Bei den LEC Ratten mit Ikterus und bei den 7 mal mit CEL behandelten LEC Tieren war die Expression der Fas-Liganden mRNA erhöht. In ähnlicher Höhe wurde die Fas-Liganden mRNA auch durch Stimulation einer Wistar Ratte mit Concanavalin A exprimiert. Im Vergleich zu den LEC Tieren ohne Befund war die Expression der Fas-Liganden mRNA bei den 3 mal mit CEL behandelten Ratten verringert.



**Abbildung 18:** Expression der Fas-Liganden mRNA in den Lebern von LEC Ratten mit und ohne CEL-Behandlung. Die Expression der Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde zur Kontrolle der aus dem Gewebe extrahierten und auf das Gel geladenen DNA-Menge verwendet. Das Fas-Ligand PCR-Produkt hat eine Länge von 417 Basenpaaren und das GAPDH-PCR Produkt ist 983 Basenpaare lang.

- a: Wistar, Concanavalin A
- b: Wistar
- c: LEC, ohne Befund, Alter 70 Tage
- d: LEC, beginnende Leberschädigung, Alter 78 Tage
- e: LEC, Ikterus, Alter 92 Tage
- f: LEC, 3xCEL ab Tag 69, Alter 79 Tage
- g: LEC, 7xCEL ab Tag 69, Alter 93 Tage

## 4. DISKUSSION

Vor dem Hintergrund der noch ungeklärten Fragen zu den Mechanismen der Cu-vermittelten Lebertoxizität bei der LEC Ratte, dem Modell für Morbus Wilson, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob das in den Lysosomen der Leber akkumulierende Cu toxisch ist. Darüber hinaus wurde den Fragen nachgegangen, ob die Kupfferschen Sternzellen bei der chronischen Cu-Toxizität eine wesentliche Rolle spielen und welche Bedeutung der Apoptose bei der Leberschädigung zukommt.

### 4.1. Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von Cu

Aufgrund des genetischen Defektes der LEC Ratten, der zu einer verringerten Ausscheidung von Cu aus der Leber führt, nahm die Cu-Konzentration in den Lebern erwartungsgemäß stetig zu. Vor dem Auftreten der Hepatitis war eine Anreicherung von Cu vor allem im Zytosol der Lebern zu beobachten, bei den an Ikterus erkrankten Tieren hingegen war die Akkumulation von Cu in erster Linie auf eine Zunahme des Metalls in der partikulären Fraktion des Leberhomogenates, die die Zellorganellen und Membranen enthält, zurückzuführen (Abbildung 10). Die geänderte Verteilung des Cu in der Zelle im Verlauf der Erkrankung zeigte sich noch deutlicher bei Untersuchung der partikulären Zellbestandteile mittels Dichtegradientenzentrifugation. Hierbei fand sich bei den LEC Ratten ohne Befund und den Tieren mit beginnender Leberschädigung nur sehr wenig Cu in der schweren Fraktion, während bei den ikterischen Tieren der größte Anteil des Cu in dieser Fraktion beobachtet wurde (Abbildung 11). Nach den elektronenmikroskopischen Befunden enthielt die schwere Fraktion Lysosomen, die mit elektronendichtem Material beladen waren (Abbildung 12). Dieses Material konnte in einer früheren Arbeit (60) mittels energiedispersiver Röntgenmikroanalyse

---

als Cu-haltig identifiziert werden. Vermutlich handelt es sich dabei um Cu-haltige Polymere aus Metallothionein und dessen Abbauprodukten (60). Bei den jungen gesunden LEC Tieren war das Cu-haltige Material fast ausschließlich und nur in sehr geringen Mengen in den Lysosomen der Hepatozyten lokalisiert. Bei den älteren erkrankten Tieren mit hepatozytären Nekrosen und Apoptosen fand sich das Cu-haltige Material zum Teil in den Lysosomen der Hepatozyten, vor allem jedoch in massigen Aggregaten in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen. Die Anreicherung von Cu in der partikulären Fraktion des Leberhomogenats ist auch in früheren Untersuchungen an der LEC Ratte (59, 60, 107, 108, 109, 110), aber auch bei Patienten mit Morbus Wilson (33) beschrieben worden. Die besonders auffällige Akkumulation von Cu in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen der Tiere mit Ikterus könnte durch Phagozytose von Zellbruchstücken beziehungsweise des Cu-haltigen Materials von untergegangenen Hepatozyten erklärt werden. Damit übereinstimmend wiesen bei den Tieren mit Ikterus die nekrotischen und apoptotischen Zelluntergänge sowie die hohen GOT-Aktivitäten auf starke Leberschädigungen hin. Auch war bei experimentell mit Cu belasteten Ratten eine Anreicherung des Metalls in den Kupfferschen Sternzellen erst nach Beginn der Leberschädigung zu beobachten (20). Weil das Cu-haltige Material offensichtlich nicht abgebaut oder ausgeschieden werden kann, akkumuliert es in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen der ikterischen LEC Tiere (111). Durch Isolation von Kupfferschen Sternzellen aus den Lebern kranker LEC Ratten konnte der Anteil des Cu in den Kupfferschen Sternzellen am Gesamtleber-Cu auf etwa 13% abgeschätzt werden.

Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung der Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen als Speicherort für Cu lässt sich aus den Ergebnissen der mit CEL-behandelten LEC Tiere ableiten. Da die Kupfferschen Sternzellen dieser Tiere schon vor Auftreten der Hepatitis eliminiert worden waren, fand sich in der schweren Fraktion deutlich weniger Cu als bei den unbehandelten LEC Ratten mit Ikterus, deren Kupffersche Sternzellen noch intakt waren (Abbildung 11). Bei den CEL-behandelten Tieren standen demnach die Kupfferschen Sternzellen nicht als Speicherorte für das Cu-haltige Material zur Verfügung.

## 4.2. Zur Rolle von lysosomalem Cu bei der Toxizität des Metalls

Bereits früher wurde vermutet, dass die Hepatotoxizität von Cu sowohl bei Morbus Wilson als auch bei experimentell mit Cu-belasteten Ratten ursächlich mit einer Schädigung der lysosomalen Membran zusammenhängt (21). Einige Autoren vertraten jedoch die Auffassung, dass die Toxizität von Cu durch hohe Konzentrationen des Metalls im Zytosol hervorgerufen wird (33, 34, 49, 108). Unsere Ergebnisse, nach denen LEC Tiere ohne Befund höhere zytosolische Cu-Konzentrationen aufwiesen als LEC Ratten mit Ikterus (Abschnitt 3.2., Abbildung 10) sprechen jedoch gegen eine solche Bedeutung des zytosolischen Cu. Außerdem konnte bereits früher gezeigt werden, dass Cu im Zytosol der Leberzellen nahezu vollständig an Metallothionein gebunden vorliegt und in dieser Form nicht zytotoxisch ist (60, 69, 112, 113). Wenngleich es zu einer geringen Anreicherung des Metalls in den Lysosomen der Hepatozyten der LEC Ratten bereits vor Auftreten der Hepatitis kommt, treten deutliche Zellschädigungen jedoch erst auf, wenn sich das Metall massiv in den Lysosomen der Zellen anhäuft. Damit übereinstimmend war eine starke Zunahme von Zelluntergängen in den Lebern der LEC Ratten erst zu beobachten, wenn das Cu in der schweren lysosomenhaltigen Fraktion zugenommen hatte (Abbildung 11). Die Akkumulation von partikulärem Cu-haltigem Material in den Lysosomen könnte zur Aufrechterhaltung einer möglichst konstanten Cu-Konzentration im Zytosol beitragen (21, 111, 114, 115). Vermutlich reichert sich das Cu-haltige Material in den Lysosomen der Zellen so lange an, bis die Speicherkapazität dieser Organellen überschritten wird und es durch die Reaktivität dieses Cu zu Schädigungen der Lysosomen selbst kommt (68, 116). Dass Cu zu einer erhöhten Fragilität und zur Destabilisierung von Lysosomenmembranen führen kann, wurde mehrfach gezeigt (68, 115, 117). Man nimmt an, dass Cu über Fenton- und Haber-Weiss-Reaktionen zur Bildung von Hydroxylradikalen führt (118), die in der Folge über Lipidperoxidation strukturelle und funktionelle Membranschäden auslösen (115, 119, 120, 121). Daraufhin könnten reaktives Cu und lysosomale Enzyme (u.a. Cathepsin D, eine Cysteinprotease) in das Zytoplasma freigesetzt werden und zu Zellschädigung und Apoptose führen (34, 68, 122, 123, 124).

---

Ein direkter Nachweis der Reaktivität von Cu in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen gelang erstmals durch Freisetzung des Cu-haltigen Materials durch die selektive Zerstörung der Makrophagen in den Lebern ikterischer LEC Ratten mit Hilfe von CEL. Bei diesen Tieren kam es zu Hämolyse, wie sie für akute Cu-Vergiftungen typisch ist (125). Auch die ultrastrukturellen Befunde, nach denen extrazelluläres elektronendichtes Material zwischen den Hepatozyten vorkam (Abbildung 8.2), weisen auf eine Freisetzung des Cu-haltigen Materials hin. Weiterhin wurde in der schweren lysosomenhaltigen Fraktion des Dichtegradienten bei den einmalig CEL-behandelten Tieren deutlich weniger Cu gefunden als bei den LEC Ratten mit Ikterus (Abbildung 11). Insbesondere die im Vergleich zu LEC Ratten mit Ikterus um etwa 60% erhöhten Serum-Cu-Gehalte deuten darauf hin, dass in Folge der CEL Behandlung Cu aus den zerstörten Kupfferschen Sternzellen in das Blut der Tiere gelangte (Tabelle 1). Wenngleich die 16 Stunden nach der CEL-Behandlung bestimmte Cu-Konzentration von 2 µg/ml Serum nicht repräsentativ für den gesamten Zeitraum der Freisetzung sein kann, dürfte sie hämolytisch wirken. So führten bei Mäuseerythrozyten Cu-Konzentrationen von 1,9 µg/ml bereits zu einer 20%-igen Hämolyse (126). In Übereinstimmung mit den ultrastrukturellen Befunden von elektronendichtem Material zwischen den Hepatozyten scheint das aus den Kupfferschen Sternzellen freigesetzte Cu auch hepatotoxisch zu sein. Nach der Zerstörung der Makrophagen durch die CEL-Behandlung kam es zu einer starken Zunahme der GOT-Aktivitäten im Plasma.

Eine nur durch die Eliminierung der Kupfferschen Sternzellen hervorgerufene Hämolyse und Leberschädigung konnte in den Experimenten mit Zymosan vorbehandelten Wistar Ratten weitgehend ausgeschlossen werden. Bei Wistar Ratten, deren Anzahl Kupfferscher Sternzellen mindestens ebenso groß war wie die ikterischer LEC Ratten, führte die Zerstörung der Makrophagen mit CEL zu einer nur geringen Schädigung der Leber, gemessen an der GOT-Aktivität, und zu keiner Hämolyse.

### **4.3. Zur Rolle der Kupfferschen Sternzellen bei der Toxizität von Cu**

Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass aktivierte Kupffer'sche Sternzellen eine zentrale Rolle an der Leberschädigung nach Exposition gegenüber unterschiedlichen Hepatotoxinen spielen. So wurde eine Beteiligung der Kupfferschen Sternzellen und des von ihnen gebildeten TNF-alpha an der Pathogenese von Leberschäden nach Exposition gegenüber Metallen (71, 127, 128, 129), Arzneimitteln (130, 131) und organischen Substanzen (132, 133, 134, 135) sowie bei chronischem Alkoholkonsum (136, 137) nachgewiesen. Die Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen kann beispielsweise durch die Phagozytose nekrotischer Zellen ausgelöst werden und geht mit der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und zytotoxischen Mediatoren einher (75). Diese Mediatoren fördern wiederum die Einwanderung von Neutrophilen, die ihrerseits erneut Sauerstoffradikale und toxische Mediatoren freisetzen (71, 73). Die Beobachtung, dass bei den LEC Ratten mit Ikterus die Anzahl der Kupfferschen Sternzellen etwa verdoppelt war und darüber hinaus die Zellen vergrößert waren (Abbildung 6), lässt auf eine Aktivierung der Kupfferschen Sternzellen schließen (78, 137, 138). Die Kupfferschen Sternzellen der LEC Tiere zeigten darüber hinaus auch ultrastrukturelle Veränderungen ihrer Oberfläche, wie sie auch bei Endotoxin stimulierten aktivierten Kupfferschen Sternzellen beschrieben worden sind (104, 139, 140).

Die Beteiligung von Kupfferschen Sternzellen an der Schädigung der Leber wurde bei LEC Tieren untersucht, deren Lebermakrophagen selektiv durch CEL über einen längeren Zeitraum eliminiert worden waren. Das unter diesen Bedingungen beobachtete Auftreten einiger ED1-positiver Makrophagen (Abbildung 6) beruht vermutlich auf der Einwanderung peripherer Makrophagen aus dem Blut. Außerdem könnten unreife und phagozytoseinaktive Vorläuferzellen von Kupfferschen Sternzellen bereits ED1-positiv, jedoch noch nicht mit den für Kupffersche Sternzellen spezifischen ED2-Antikörpern reagieren (89, 141).

Bei den Tieren, deren Makrophagen durch die CEL-Behandlung längerfristig eliminiert worden waren kam es weder zu einer Verminderung der Leberschädigung noch zu einer Verzögerung hinsichtlich dem Auftreten der Hepatitis. Auch war bei

den Tieren mit Ikterus im Vergleich zu den Tieren ohne Befund die Expression der TNF-alpha mRNA unverändert (Abbildung 15).

Damit sind die aktivierten Kupfferschen Sternzellen als wesentliche Quelle für das zytotoxische und proapoptotische TNF-alpha nicht ursächlich an der Entwicklung der Leberschädigung bei der LEC Ratte beteiligt. Dieser nach der Literatur unerwartete Befund könnte zum einen durch den besonderen Metabolismus von Cu, zum anderen durch die chronisch verlaufende Akkumulation des Metalls bei den LEC Tieren erklärt werden.

#### **4.4. Zur Rolle der Apoptose bei der chronischen Cu-Toxizität**

Neben nekrotischen Zellen wurden in den Lebern, vor allem der erkrankten LEC Ratten, zahlreiche apoptotische Hepatozyten beobachtet, die anhand morphologischer Parameter identifiziert wurden. Der Apoptoseindex in den Lebern der LEC Ratten mit Ikterus war gegenüber dem der LEC Ratten ohne Befund um das 66-fache erhöht (Abbildung 14). Die bei Kato et al. (81) dargestellten weit höheren Zahlen apoptotischer Zellen in den Lebern kranker LEC Ratten erklären sich dadurch, dass bei der angewandten TUNEL-Methode neben apoptotischen auch nekrotische Zellen erfasst wurden (142, 143). Zudem tritt Apoptose im Gegensatz zu den Angaben von Kato et al. (81) typischerweise verstreut bei einzelnen Zellen auf und betrifft nicht Gebiete zusammenhängender Zellen (144).

Die in dieser Untersuchung quantifizierten apoptotischen Zellen wiesen die charakteristischen Veränderungen wie Chromatinkondensation, die typische Zellschrumpfung und Ablösung von den Nachbarzellen auf (Abbildung 13). Diese Veränderungen dauern normalerweise weniger als 2 Stunden (83, 105, 145), können über einen längeren Zeitraum jedoch zu einem beträchtlichen Zellverlust des Organs führen. So käme es bei einem Apoptoseindex von 0,7%, wie bei den LEC Ratten mit Ikterus, innerhalb von 24 Stunden bereits zu einem für das Krankheitsbild sicherlich relevanten Parenchymverlust durch Apoptose von etwa 8%. In der letzten Phase der Apoptose bilden sich durch weitere Kondensation des Zytoplasmas kugelförmige

---

oder ovale Apoptosekörperchen, die anschließend durch Gewebszellen oder Makrophagen aufgenommen werden (97, 146, 147). Eine große Anzahl dieser Apoptosekörperchen fiel insbesondere im Lebergewebe bei den länger mit CEL behandelten und erkrankten Ratten auf. Vermutlich wurden die Apoptosekörperchen aufgrund der zerstörten Makrophagen nicht mehr effektiv phagozytiert und abgebaut. Um eine Vergleichbarkeit der unbehandelten und der CEL-behandelten Tiere zu gewährleisten, wurde die Zahl der Apoptosekörperchen nicht mit in die Berechnung des Apoptoseindex miteinbezogen.

Die Gegenwart von apoptotischen Zellen in den Lebern der erkrankten LEC Ratten wirft die Frage auf, durch welchen Mediator das Signal zur Apoptose vermittelt wird. Die wichtigsten bekannten apoptoseinduzierenden Faktoren sind TNF-alpha und Fas-Ligand (148, 149, 150), beide gehören der TNF-Liganden Familie an (84). Nachdem TNF-alpha während der Entwicklung der Hepatitis konstant exprimiert wird, scheint die Apoptose bei den LEC Ratten mit Ikterus TNF-alpha unabhängig zu sein.

Wie in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden konnte, ist die Expression der Fas-Liganden mRNA in den Lebern der LEC Ratten mit Ikterus gegenüber gesunden Ratten erhöht (Abbildung 18). Nach in vitro Experimenten können erhöhte Cu-Konzentrationen im Bereich derer, wie sie in der Leber erkrankter LEC Tiere vorliegen, und auch reaktive Sauerstoffspezies, die durch Cu induziert werden können, die Expression der FAS-Liganden mRNA stimulieren (80, 151, 152, 153). Nachdem in einer kürzlich erschienenen Mitteilung der Fas-Ligand an der Pathogenese der Leberschädigung bei Morbus Wilson beteiligt ist (80), liegt die Vermutung somit nahe, dass die Apoptose bei der Cu-assoziierten Leberschädigung bei LEC Tieren mit Ikterus ebenfalls durch den Fas-Liganden vermittelt wird.

Die eigentliche Auslösung der Apoptose erfolgt nach der Wechselwirkung des Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor über eine Signalkaskade zur Aktivierung der Caspasen (154). Caspasen kommen als inaktive Pro-Enzyme konstitutiv in den Leberzellen vor (155). Sie werden auf entsprechende proapoptotische Signale hin (z.B. TNF-alpha, Fas-Ligand) proteolytisch aktiviert (156). Am Ende dieser Kaskade stehen die sogenannten Effektor-Caspasen (Caspase-3, Caspase-6 und Caspase-7),

die den apoptotischen Zelltod ausführen (154). Hierbei führt der Abbau von Zellstrukturen unter anderem zu der apoptotischen Morphologie der Zelle, die Zusammenhänge sind im einzelnen jedoch noch nicht vollständig verstanden (156, 157). Entsprechend der vermehrten Expression der Fas-Liganden mRNA wurde ausschließlich bei den LEC Ratten mit Ikterus eine erhöhte Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen festgestellt (Abbildung 16). Dies unterstützt die Annahme der Beteiligung des Fas-Liganden an der Induktion der Apoptose bei den Tieren mit Ikterus. Überdies weist die gute Korrelation ( $r=0,92$ ) zwischen den Aktivitäten der Caspase-3-ähnlichen Proteasen und dem Apoptoseindex darauf hin, dass die Apoptose der Hepatozyten bei den LEC Ratten mit Ikterus über die Effektor-Caspase-3 vermittelt wird.

Die Apoptose in den Lebern der LEC Ratten, deren Kupffersche Sternzellen durch die CEL-Behandlung länger eliminiert worden waren, unterschied sich deutlich von der der LEC Tiere mit Ikterus. Im Vergleich zu den ikterischen Tieren waren der Apoptoseindex und die Expression der Fas-Liganden mRNA unverändert, die Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen jedoch vermindert (Abbildung 16). Offensichtlich kommt es unter diesen Bedingungen nicht zu dem vorstehend beschriebenen Apoptoseweg über die Signalkaskade der Caspasen (158, 159). Ein derartiger Caspase-unabhängiger Verlauf der Apoptose wird diskutiert (160, 161). Hierbei kommt AIF, einem Apoptose-induzierenden Faktor aus dem mitochondrialen Intermembranraum der Mitochondrien eine wichtige Rolle zu (162, 163, 164). Die für die Auslösung der Apoptose erforderliche Freisetzung von AIF scheint durch Cu induzierbare reaktive Sauerstoffspezies (165, 166, 167) und oxidative Prozesse an der Mitochondrienmembran stimuliert zu werden (163, 168, 169). Die Empfindlichkeit der Mitochondrien gegenüber erhöhten Cu Konzentrationen wurde vielfach dokumentiert (170, 171, 172, 173). Damit übereinstimmend zeigten die Lebern der längerfristig mit CEL behandelten LEC Ratten deutlicher ausgeprägte Mitochondrienschäden als die LEC Ratten mit Ikterus.

---

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Verlauf der Erkrankung Cu-haltiges Material in den Lysosomen der Hepatozyten und insbesondere der Kupfferschen Sternzellen akkumuliert. Nach der Freisetzung aus den Kupfferschen Sternzellen durch CEL-Behandlung war dieses Cu-haltige Material hämolytisch und hepatotoxisch.

Die Kupfferschen Sternzellen waren bei den LEC Ratten mit Ikterus aktiviert, jedoch war die Expression des zytotoxischen TNF-alpha im Vergleich zu den Tieren ohne Befund unverändert. Damit übereinstimmend kam es bei den Tieren, deren Makrophagen durch die CEL-Behandlung längerfristig eliminiert worden waren, zu keiner Verminderung der Leberschädigung. Somit kommt den Kupfferschen Sternzellen einerseits eine Rolle bei der Speicherung von reaktivem Cu zu, andererseits sind sie vermutlich nicht ursächlich an der Schädigung der Leber beteiligt.

Bei den LEC Ratten wurden neben nekrotischen Zellen auch apoptotische Zellen festgestellt. Wie erstmalig gezeigt werden konnte waren in den Lebern der erkrankten LEC Tiere sowohl die Expression der Fas-Liganden mRNA als auch und damit übereinstimmend die Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen erhöht. Die Apoptose bei diesen Tieren wird damit offensichtlich durch das Fas/Fas-Liganden System vermittelt.

Bei LEC Tieren, deren Kupffersche Sternzellen längerfristig eliminiert worden waren, kam es zu einem Caspase-unabhängigen Verlauf der Apoptose.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Long-Evans Cinnamon (LEC) Ratte akkumuliert aufgrund eines genetischen Defektes, der dem des Morbus Wilson beim Menschen homolog ist, Cu in der Leber und entwickelt eine Hepatitis. Bezüglich der molekularen Mechanismen der Leberschädigung durch Cu bestehen noch erhebliche Kenntnislücken. In der vorliegenden Arbeit wurde an der LEC Ratte die Bedeutung des in Lysosomen der Leber gespeicherten Cu für die Toxizität untersucht. Es wurde überprüft, ob und inwieweit die Aktivierung Kupfferscher Sternzellen und damit eine Freisetzung von zytotoxischen Mediatoren ursächlich an der Leberschädigung beteiligt ist. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob der Cu-assoziierte Leberschaden bei der LEC Ratte über die Apoptose verläuft.

Bis zum Auftreten der Hepatitis der LEC Ratten nahmen die Cu-Gehalte in der Leber kontinuierlich zu. Im Verlauf der Erkrankung kam es zu einer Umverteilung von Cu aus dem Zytosol der Hepatozyten in die Lysosomen der Hepatozyten und vor allem in die der Kupfferschen Sternzellen. In letzteren lag Cu ganz überwiegend als unlösliches Material vor. Die massive Anreicherung dieses Cu-haltigen Materials ist vermutlich die Folge der Phagozytose von geschädigten Hepatozyten durch die Kupfferschen Sternzellen. Durch die selektive Zerstörung der Kupfferschen Sternzellen gelang es erstmals, eine toxische Wirkung des Cu-haltigen Materials über seine hämolytische Wirkung und Hepatotoxizität nachzuweisen.

Die Kupfferschen Sternzellen waren bei den LEC Ratten mit Ikterus aktiviert, jedoch war die Expression des zytotoxischen TNF-alpha im Vergleich zu den Tieren ohne Befund unverändert. Damit übereinstimmend kam es bei den Tieren, deren Makrophagen durch die CEL-Behandlung längerfristig eliminiert worden waren, zu keiner Verminderung der Leberschädigung. Somit kommt den Kupfferschen Sternzellen einerseits eine Rolle bei der Speicherung von reaktivem Cu zu, andererseits sind sie vermutlich nicht ursächlich an der Schädigung der Leber beteiligt.

Neben nekrotischen Zellen fanden sich in den Lebern vor allem der erkrankten Tiere zahlreiche anhand morphologischer Parameter identifizierte apoptotische Hepatozyten. Die Anzahl der apoptotischen Zellen läßt, insbesondere unter Berücksichtigung der Dauer der Erkrankung, auf einen für den Krankheitsverlauf relevanter Parenchymverlust schließen. In den Lebern der erkrankten LEC Tiere war, wie erstmalig gezeigt werden konnte, sowohl die Expression der Fas-Liganden mRNA als auch und damit übereinstimmend die Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen erhöht. Die Apoptose bei diesen Tieren wird damit offensichtlich durch das Fas/Fas-Liganden System vermittelt.

Die Apoptose in den Lebern der LEC Tiere, deren Kupffersche Sternzellen länger durch die CEL-Behandlung eliminiert worden waren, unterschied sich von der der LEC Ratten mit Ikterus. Im Vergleich zu den ikterischen Tieren waren der Apoptoseindex und die Expression des Fas-Liganden zwar unverändert, die Aktivität der Caspase-3-ähnlichen Proteasen jedoch vermindert. Offensichtlich kommt es unter diesen Bedingungen zu einem Caspase-unabhängigen Verlauf der Apoptose.

Bezüglich der eingangs formulierten Fragestellungen lassen sich demnach folgende Aussagen treffen:

1. Cu-haltiges Material akkumuliert in den Lysosomen der Hepatozyten und insbesondere in den Lysosomen der Kupfferschen Sternzellen. Die Reaktivität dieses Cu-haltigen Materials wurde über seine hämolytische Wirkung und seine Hepatotoxizität nachgewiesen.
2. Den Kupfferschen Sternzellen kommt einerseits eine Rolle bei der Speicherung von reaktivem Cu zu, andererseits sind sie vermutlich nicht ursächlich an der Schädigung der Leber beteiligt.
3. Bei der Leberschädigung der LEC Ratte kommt es zu einer beträchtlichen Apoptose, die offensichtlich durch das Fas/Fas-Liganden Systems vermittelt wird. Bei eliminierten Kupfferschen Sternzellen kann die Apoptose allerdings auch über einen Caspase-unabhängigen Mechanismus verlaufen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Barceloux DG (1999). Copper. *J Toxicol Clin Toxicol.* 37, 217-230
- 2) Vulpe CD, Packman S (1995). Cellular copper transport. *Annu Rev Nutr* 15, 293-322
- 3) Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF (1999). Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 225-232
- 4) Peisach J, Aisen P, Blumberg WE, Hrsg. (1966). *The biochemistry of copper.* Academic Press, New York
- 5) Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N (1998). Copper transport. *Am J Clin Nutr* 67, 965-971
- 6) National Research Council (1989). *Recommended dietary allowances.* Auflage 10, National Academy Press, Washington
- 7) Linder MC, Hazegh-Azam M (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 63, 797-811
- 8) WHO. *Environmental health criteria for copper. Summary, evaluation, conclusions and recommendations of IPCS task group (June 1996).*
- 9) Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT (2000). Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 25, 29-32
- 10) Mercer JF (2001). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends Mol Med* 7, 64-69
- 11) Zhou B, Gitschier J (1997). hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7481-7486
- 12) Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J (1989). The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J Biol Chem* 264, 5598-5605
- 13) Dijkstra M, Vonk RJ, Kuipers F (1996). How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport. *J Hepatol* 24, 109-120
- 14) Ciriolo MR, Desideri A, Paci M, Rotilio G (1990). Reconstitution of Cu, Zn superoxid dismutase by the Cu(I)-glutathione complex. *J Biol Chem* 265, 11030-11034
- 15) Da Costa Ferreira AM, Ciriolo MR, Marcocci L, Rotilio G (1993). Copper(I) transfer into metallothionein mediated by glutathione. *Biochem J* 292, 673-676
- 16) Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272, 23469-23472

- 17) Cartwright GE (1978). Diagnosis of treatable Wilson's disease. *N Engl J Med* 298, 1347-1350
- 18) DiSilvestro RA, Cousins RJ (1983). Physiological ligands for copper and zinc. *Annu Rev Nutr* 261-288
- 19) Turnlund JR, Keyes WR, Pfeiffer GL (1995). Copper absorption and retention from diets low and adequate in copper. *Am J Clin Nutr* 61, 908
- 20) Harada M, Sakisaka S, Yoshitake M, Shakadoh S, Gondoh K, Sata M, Tanikawa K (1993). Biliary copper excretion in acutely and chronically copper-loaded rats. *Hepatology* 17, 111-117
- 21) Gross JB Jr, Myers BM, Kost LJ, Kuntz SM, LaRusso NF (1989). Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat. Major excretory pathway in experimental copper overload. *J Clin Invest* 83, 30-39
- 22) Sternlieb I (1980). Copper and the liver. *Gastroenterology* 78, 1615-1628
- 23) Schaefer M, Hopkins RG, Failla ML, Gitlin JD (1999). Hepatocyte-specific localization and copper-dependent trafficking of the Wilson's disease protein in the liver. *Am J Physiol* 276, 639-646
- 24) Yelin G, Taff ML, Sadowski GE (1987). Copper toxicity following massive ingestion of coins. *Am J Forensic Med Pathol* 8, 78-85
- 25) Dameron C, Howe PD (1998). Environmental health criteria 200. Copper. World Health Organization, Geneva
- 26) Hunt HA, Parr RM, Taylor DM, Trott NG (1963). Relation between cirrhosis and trace metal content of liver with special reference to primary biliar cirrhosis and copper. *Br Med J* 2, 1498-1501
- 27) Tanner MS (1998). Role of copper in Indian childhood cirrhosis. *Am J Clin Nutr* 67, 1074-1081
- 28) Walshe JM (1988). Diagnosis and treatment of presymptomatic Wilson's disease. *Lancet* 2, 435-437
- 29) Sternlieb I (1968). Mitochondrial and fatty changes in hepatocytes of patients with Wilson's disease. *Gastroenterology* 55, 354-367
- 30) Stremmel W (1992). Pathogenese des Morbus Wilson. *Z Gastroenterol* 30, 199-201
- 31) Yarze JC, Martin P, Munoz SJ, Friedman LS (1992). Wilson's disease: current status. *Am J Med* 92, 643-654
- 32) Goldfischer S, Popper H, Sternlieb I (1980). The significance of variations in the distribution of copper in liver disease. *Am J Pathol* 99, 715-730
- 33) Goldfischer S, Sternlieb I (1968). Changes in the distribution of hepatic copper in relation to the progression of Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Am J Pathol* 53, 883-901
- 34) Britton RS (1996). Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis* 16, 3-12
- 35) Sternlieb I (1990). Perspectives on Wilson's disease. *Hepatology* 12, 1234-1239

- 36) Dobyns WB, Goldstein NP, Gordon H (1979). Clinical spectrum of Wilson's disease (hepatolenticular degeneration). *Mayo Clin Proc* 54, 35-42
- 37) Herrmann S, Hofmann W, Theilmann L (1995). Akutes Leberversagen als Erstmanifestation bei Morbus Wilson. *Med Klin* 90, 456-461
- 38) Sternlieb I (1976). Die Wilsonsche Krankheit. *Internist* 17, 342-347
- 39) Cuthbert JA (1995). Wilson's disease: A new gene and an animal model for an old disease. *J Investig Med* 43, 323-336
- 40) Hill GM, Brewer GJ, Prasad AS, Hydrick CR, Hartmann DE (1987). Treatment of Wilson's disease with zinc. *Hepatology* 7, 522-528
- 41) Brewer GJ, Hill GM, Prasad AS, Cossack ZT, Rabbani P (1983). Oral zinc therapy for Wilson's disease. *Ann Intern Med* 99, 314-319
- 42) Li Y, Togashi Y, Sato S, Emoto T, Kang JH, Takeichi N, Kobayashi H, Kojima Y, Une Y, Uchino J (1991). Spontaneous hepatic copper accumulation in Long-Evans Cinnamon rats with hereditary hepatitis. A model of Wilson's disease. *J Clin Invest* 87, 1858-1861
- 43) Ferenci P, Gilliam TC, Gitlin JD, Packman S, Schilsky ML, Sokol RJ, Sternlieb I (1996). An international symposium on Wilson's and Menkes' diseases. *Hepatology* 24, 952-958
- 44) Cox DW (1996). Molecular advances in Wilson disease. *Prog Liver Dis* 14, 245-264
- 45) Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW (1994). The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat Genet* 7, 541-545
- 46) Mori M, Yoshida MC, Takeichi N, Taniguchi N (1991). *The LEC rat*. Springer Verlag, Tokyo.
- 47) Schilsky ML (1997). Ironic insult added to copper injury. *Hepatology* 25, 776-778
- 48) Suzuki M, Aoki T (1994). Impaired hepatic copper homeostasis in Long-Evans Cinnamon rats: reduced biliary excretion of copper. *Pediatr Res* 35, 598-601
- 49) Mori M, Hattori A, Sawaki M, Tsuzuki N, Sawada N, Oyamada M, Sugawara N, Enomoto K (1994). The LEC rat: a model for human hepatitis, liver cancer, and much more. *Am J Pathol* 144, 200-204
- 50) Nakayama N, Kashiwazaki H, Kobayashi N, Hamada J, Matsumoto K, Nakamura T, Takeichi N (1995). Differing distribution of hepatocyte growth factor-positive cells in the liver of LEC rats with acute hepatitis, chronic hepatitis and hepatoma. *Jpn J Cancer Res* 86, 5-9
- 51) Terada K, Kawarada Y, Miura N, Yasui O, Koyama K, Sugiyama T (1995). Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. *Biochim Biophys Acta* 1270, 58-62
- 52) Gitlin JD, Schroeder JJ, Lee-Ambrose LM, Cousins RJ (1992). Mechanisms of caeruloplasmin biosynthesis in normal and copper-deficient rats. *Biochem J* 282, 835-839

- 53) Sugawara N, Sugawara C, Katakura M, Takahashi H, Mori M (1991). Harmful effect of administration of copper on LEC rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 73, 289-297
- 54) Jong-Hon K, Togashi Y, Kasai H, Hosokawa M, Takeichi N (1993). Prevention of spontaneous hepatocellular carcinoma in Long-Evans cinnamon rats with hereditary hepatitis by the administration of D-penicillamine. *Hepatology* 18, 614-620
- 55) Sone H, Maeda M, Wakabayashi K, Takeichi N, Mori M, Sugimura T, Nagao M (1996). Inhibition of hereditary hepatitis and liver tumor development in Long-Evans cinnamon rats by the copper-chelating agent trientine dihydrochloride. *Hepatology* 23, 764-770
- 56) Sugawara N, Sugawara C (1994). A copper deficient diet prevents hepatic copper accumulation and dysfunction in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats with an abnormal copper metabolism and hereditary hepatitis. *Arch Toxicol* 69, 137-140
- 57) Kasai N, Osanai T, Miyoshi I, Kamimura E, Yoshida MC, Dempo K (1990). Clinico-pathological studies of LEC rats with hereditary hepatitis and hepatoma in the acute phase of hepatitis. *Lab Anim Sci* 40, 502-505
- 58) Kawano K, Hirashima T, Mori S, Bando S, Yonemoto K, Abe F, Goto H, Natori T (1991). Pathological and laboratory findings in LEC/Otk rats that spontaneously develop hepatic injury. *J Gastroenterol Hepatol* 6, 377-382
- 59) Sternlieb I, Quintana N, Volenberg I, Schilsky ML (1995). An array of mitochondrial alterations in the hepatocytes of Long-Evans Cinnamon rats. *Hepatology* 22, 1782-1787
- 60) Klein D, Lichtmannegger J, Heinzmann U, Muller-Hocker J, Michaelsen S, Summer KH (1998). Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur J Clin Invest* 28, 302-310
- 61) Boulard M, Blume KG, Beutler E (1972). The effect of copper on red cell enzyme activities. *J Clin Invest* 51, 459-461
- 62) Nakamura M, Yamazaki I (1972). One-electron transfer reactions in biochemical systems. VI. Changes in electron transfer mechanism of lipoamide dehydrogenase by modification of sulfhydryl groups. *Biochim Biophys Acta* 267, 249-257
- 63) Kumar KS, Rowse C, Hochstein P (1978). Copper-induced generation of superoxide in human red cell membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 83, 587-592
- 64) Samuni A, Chevion M, Czapski G (1981). Unusual copper-induced sensitization of the biological damage due to superoxide radicals. *J Biol Chem* 256, 12632-12635
- 65) Stacey NH, Klaassen CD (1981). Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *J Toxicol Environ Health* 7, 139-147

- 66) Schwabe U, Friedrich K (1990). Significance of the iron and copper content of the liver for the differential diagnosis of chronic liver diseases. *Z Gastroenterol* 28, 353-357
- 67) Abe S, Yamazaki K, Takikawa S, Suzuki K (1994). Impaired biliary excretion of copper and lysosomal enzymes in Long-Evans cinnamon. *Tohoku J Exp Med* 172, 355-367
- 68) Myers BM, Prendergast FG, Holman R, Kuntz SM, LaRusso NF (1993). Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology* 105, 1814-1823
- 69) Klein D, Lichtmanegger J, Heinzmann U, Summer KH (2000). Dissolution of copper-rich granules in hepatic lysosomes by D-penicillamine prevents the development of fulminant hepatitis in Long-Evans cinnamon rats. *J Hepatol* 32, 193-201
- 70) Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, Thurman RG (1993). The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 119, 275-279
- 71) Sauer JM, Waalkes MP, Hooser SB, Kuester RK, McQueen CA, Sipes IG (1997). Suppression of Kupffer cell function prevents cadmium induced hepatocellular necrosis in the male Sprague-Dawley rat. *Toxicology* 121, 155-164
- 72) Luster MI, Simeonova PP, Gallucci R, Matheson J (1999). Tumor necrosis factor alpha and toxicology. *Crit Rev Toxicol* 29, 491-511
- 73) Laskin DL, Pendino KJ (1995). Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35, 655-677
- 74) Szatmary Z (1999). Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. *Neoplasma* 46, 257-266
- 75) Decker K (1990). Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 11, 245-261
- 76) Jimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG (1997). Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 26, 1530-1537
- 77) Czaja MJ, Xu J, Alt E (1995). Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology* 108, 1849-1854
- 78) Leist M, Ganter F, Bohlinger I, Germann PG, Tiegs G, Wendel A (1994). Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J Immunol* 153, 1778-1788
- 79) Feldmann G, Lambole C, Moreau A, Bringuier A (1998). Fas-mediated apoptosis of hepatic cells. *Biomed Pharmacother* 52, 378-385
- 80) Strand S, Hofmann WJ, Grambihler A, Hug H, Volkmann M, Otto G, Wesch H, Mariani SM, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat Med* 4, 588-593

- 81) Kato J, Kobune M, Kohgo Y, Sugawara N, Hisai H, Nakamura T, Sakamaki S, Sawada N, Niitsu Y (1996). Hepatic iron deprivation prevents spontaneous development of fulminant hepatitis and liver cancer in Long-Evans Cinnamon rats. *J Clin Invest* 98, 923-929
- 82) Deng DX, Ono S, Koropatnik J, Cherian MG (1998). Metallothionein and apoptosis in the toxic milk mutant mouse. *Lab Invest* 78, 175-183
- 83) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257
- 84) Neuman MG (2001). Apoptosis in diseases of the liver. *Crit Rev Clin Lab Sci* 38, 109-166
- 85) Van Rooijen N, Sanders A (1994). Liposome mediates depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Meth* 174, 83-93
- 86) Van Rooijen N, Sanders A (1997). Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J Leukoc Biol* 62, 702-709
- 87) Naito M, Nagai H, Kawano S, Umezu H, Zhu H, Moriyama H, Yamamoto T, Takatsuka H, Takei Y (1996). Liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate induces macrophage apoptosis in vivo and in vitro. *J Leukoc Biol* 60, 337-344
- 88) Van Rooijen N, Sanders A, Van den Berg T (1996). Apoptosis of macrophages induced by liposome-mediated intracellular delivery of clodronate and propamide. *J Immunol Meth* 193, 93-99
- 89) Van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD (1990). Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 260, 215-222
- 90) Yamamoto T, Naito M, Moriyama H, Umezu H, Matsuo H, Kiwada H, Arakawa M (1996). Repopulation of murine Kupffer cells after intravenous administration of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Am J Pathol* 149, 1271-1286
- 91) Bouwens L, Baekeland M, Wisse E (1986). Cytokinetic analysis of the expanding Kupffer-cell population in rat liver. *Cell Tissue Kinet* 19, 217-226
- 92) Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, Solorzano CC, Norman J, Denham W, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL (1998). Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 160, 4082-4089
- 93) Sies H, Summer KH (1975). Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur J Biochem* 57, 503-512
- 94) ten Hagen TL, van Vianen W, Bakker-Woudenberg IA (1996). Isolation and characterization of murine Kupffer cells and splenic macrophages. *J Immunol Methods* 193, 81-91

- 95) Janousek J, Strmen E, Gervais F (1993). Purification of murine Kupffer cells by centrifugal elutriation. *J Immunol Methods* 164, 109-117
- 96) Hardonk MJ, Dijkhuis FW, Hulstaert CE, Koudstaal J (1992). Heterogeneity of rat liver and spleen macrophages in gadolinium chloride-induced elimination and repopulation. *J Leukoc Biol* 52, 296-302
- 97) Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306
- 98) Bradford MM (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
- 99) Graham JM, Ford T, Rickwood D (1990). Isolation of the major subcellular organelles from mouse liver using Nycodenz gradients without the use of an ultracentrifuge. *Anal Biochem* 187, 318-323
- 100) Tiegs G, Kusters S, Kunstle G, Hentze H, Kiemer AK, Wendel A (1998). Ebselen protects mice against T cell-dependent, TNF-mediated apoptotic liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 287, 1098-1104
- 101) Plunkett JA, Yu CG, Easton JM, Bethea JR, Yeziarski RP (2001). Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* 168, 144-154
- 102) Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem* 270, 41-49
- 103) Depre C, Young ME, Ying J, Ahuja HS, Han Q, Garza N, Davies PJ, Taegtmeier H (2000). Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 32, 985-996
- 104) Wake K, Decker K, Kirn A, Knook DL, McCuskey RS, Bouwens L, Wisse E (1989). Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 118, 173-229
- 105) Goldsworthy TL, Fransson-Steen R, Maronpot RR (1996). Importance of and approaches to quantification of hepatocyte apoptosis. *Toxicol Pathol* 24, 24-35
- 106) Galle PR (1997). Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 27, 405-412
- 107) Fujii Y, Shimizu K, Satoh M, Fujita M, Fujioka Y, Li Y, Togashi Y, Takeichi N, Nagashima K (1993). Histochemical demonstration of copper in LEC rat liver. *Histochemistry* 100, 249-256
- 108) Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Mori M (1993). Copper metabolism at two stages in the onset of spontaneous hepatitis in new mutant Long-Evans Cinnamon (LEC) rats: induction of hepatic copper metallothionein and its leakage from hepatocytes. *J Trace Elem Exp Med* 6, 15-21

- 109) Okayasu T, Tochimaru H, Hyuga T, Takahashi T, Takekoshi Y, Li Y, Togashi Y, Takeichi N, Kasai N, Arashima S (1992). Inherited copper toxicity in Long-Evans cinnamon rats exhibiting spontaneous hepatitis: a model of Wilson's disease. *Pediatr Res* 31, 253-257
- 110) Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Takahashi H, Mori M (1992). Excessive accumulation of hepatic copper in LEC rats aged 80 days without hepatitis and 130 days with hepatitis. *Pharmacol Toxicol* 71, 321-324
- 111) Sternlieb I, Goldfischer S (1976). Heavy metals and lysosomes. *Front Biol* 45, 185-200
- 112) Bremner I (1998). Manifestations of copper excess. *Am J Clin Nutr* 67, 1069-1073
- 113) Klein D, Michaelsen S, Sato S, Luz A, Stampfl A, Summer KH (1997). Binding of Cu to metallothionein in tissues of the LEC rat with inherited abnormal copper accumulation. *Arch Toxicol* 71, 340-343
- 114) Kumaratilake JS, Howell JMcC (1989). Lysosomes in the pathogenesis of liver injury in chronic copper poisoned sheep: An ultrastructural and morphometric study. *J Comp Pathol* 100, 381-390
- 115) Lindquist RR (1968). Studies on the pathogenesis of hepatolenticular degeneration. 3. The effect of copper on rat liver lysosomes. *Am J Pathol* 53, 903-927
- 116) Goldfischer S, Moskal J (1966). Electron probe microanalysis of liver in Wilson's disease. Simultaneous assay for copper and for lead deposited by acid phosphatase activity in lysosomes. *Am J Pathol* 48, 305-315
- 117) Helman RG, Adams LG, Pierce KR, Bridges CH, Bailey EM (1983). The role of lysosomes in the pathogenesis of copper-induced hepatotoxicity. II. Intracellular distribution of copper in hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 67, 238-45
- 118) Nakamura M, Nakayama K, Shishido N, Yumino K, Ohyama T (1997). Metal-induced hydroxyl radical generation by Cu(+)-metallothioneins from LEC rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 549-552
- 119) Halliwell B, Gutteridge JM (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219, 1-14
- 120) Pederson TC, Aust SD (1975). The mechanism of liver microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*, 385, 232-241
- 121) Twedt DC, Sternlieb I, Stockert RJ, Morell AG, Grushoff P, Johnson GF, Goldfischer S, Gilbertson S, Scheinberg IH (1977). The role of hepatocellular lysosomes in liver injury in the hepatic copper toxicosis of Bedlington terriers. *Gastroenterology* 73, 1251
- 122) Kagedal K, Johansson U, Ollinger K (2001). The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 15, 1592-1594
- 123) Bursch W (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8, 569-581

- 124) Gooneratne SR, Howell JM, Gawthorne J (1979). Intracellular distribution of copper in the liver of normal and copper loaded sheep. *Res Vet Sci* 27, 30-37
- 125) Iyengar B, Gupta DN (1973). Hemolysis produced by copper sulphate. I. Extravascular hemolysis produced by heavy metal poisoning. *Indian J Med Res* 61, 195-198
- 126) Nishikawa T, Lee IS, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M (1997). Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J Biol Chem* 272, 23037-23041
- 127) Yamano T, DeCicco LA, Rikans LE (2000). Attenuation of cadmium-induced liver injury in senescent male fischer 344 rats: role of Kupffer cells and inflammatory cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 162, 68-75
- 128) Kayama F, Yoshida T, Elwell MR, Luster MI (1995). Role of tumor necrosis factor-alpha in cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 131, 224-234
- 129) Rikans LE, Yamano T (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J Biochem Mol Toxicol* 14, 110-117
- 130) Goldin RD, Ratnayaka ID, Breach CS, Brown IN, Wickramasinghe SN (1996). Role of macrophages in acetaminophen (paracetamol)-induced hepatotoxicity. *J Pathol* 179, 432-435
- 131) Blazka ME, Wilmer JL, Holladay SD, Wilson RE, Luster MI (1995). Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 133, 43-52
- 132) Lautenschlager I, Vaananen H, Kulonea H (1982). Quantitative study on the Kupffer cells in the liver of ethanol- and carbon tetrachloride-treated rats. *Acta Pathol, Microbiol, Immunol Scand* 90, 347-351
- 133) Shiratori Y, Kawase T, Shiina S, Sugimoto T (1982). Modulation of hepatotoxicity by Kupffer cells. In: *Cells of the hepatic sinusoid*. (Hrsg: Wisse E, Knook DL, Decker K). Kupffer Cell Foundation, Rijswijk. Vol 2, 313-318
- 134) Czaja MJ, Flanders KC, Biempica L, Klein C, Zern MA, Weiner FR (1989). Expression of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 in acute liver injury. *Growth Factors* 1, 219-226
- 135) Takei Y, Kawano S, Okumura S, Nagano K, Tsuji S, Nagai H, Omae A, Enomoto N, Makino Y (1997). Transition from apoptosis to massive necrosis during the course of acute hepatic failure: The role of Kupffer cells. In: *Cells of hepatic sinusoid* (Hrsg: Wisse E, Knook DL, Balabaud C). Kupffer Cell Foundation, CE Leiden Netherlands, vol 6, S. 259-261
- 136) Goldin RD, Ratnayaka ID, Brown IN, Wickramasinghe SN (1995). The effect of Kupffer cell elimination on ethanol-induced liver damage in mice. *Int J Exp Pathol* 76, 353-359
- 137) Yamate J, Kumagai D, Tsujino K, Nakatsuji S, Kuwamura M, Kotani T, Sakuma S, LaMarre J (1999). Macrophage populations and apoptotic cells in liver before spontaneous hepatitis in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. *J Comp Path* 120, 333-346

- 138) Di Luzio NR, Pisano JC, Saba TM (1970). Evaluation of the mechanism of glucan-induced stimulation of the reticuloendothelial system. *J Reticuloendothel Soc* 7, 731-742
- 139) Boler RK, Bibighaus AJ (1967). Ultrastructural alterations of dog livers during endotoxin shock. *Lab Invest* 17, 537-561
- 140) Frenzel H, Kremer B, Hucker H (1977). In: Kupffer cells and other sinusoidal cells. (Hrsg: Wisse E, Knook DL) 213. Elsevier, Amsterdam.
- 141) Westermann J, Ronneberg S, Fritz FJ, Pabst R (1989). Proliferation of macrophage subpopulations in the adult rat: comparison of various lymphoid organs. *J Leukoc Biol* 46, 263-269
- 142) Lawson JA, Fisher MA, Simmons CA, Farhood A, Jaeschke H (1999). Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 156, 179-186
- 143) Grasl-Kraup B, Ruttkay-Nedeky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R (1995). In situ detection of fragmented DNA (TUNNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 21, 1465-1468
- 144) Kaplowitz N (2000). Mechanisms of liver cell injury. *J Hepatol* 32, 39-47
- 145) Sanderson CJ (1976). The mechanism of T cell mediated cytotoxicity. II. Morphological studies of cell death by time-lapse microcinematography. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 192, 241-255
- 146) White E (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10, 1-15
- 147) Hart SP, Haslett C, Dransfield I (1996). Recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Experientia* 52, 950-956
- 148) Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C (2000). Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 119, 446-460
- 149) Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, Schaller H, Otto G, Stremmel W, Krammer PH, Runkel L (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J Exp Med* 182, 1223-1230
- 150) Nagata S (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365
- 151) Bauer MK, Vogt M, Los M, Siegel J, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K (1998). Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem* 273, 8048-8055
- 152) Hug H, Strand S, Grambihler A, Galle J, Hack V, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR (1997). Reactive oxygen intermediates are involved in the induction of CD95 ligand mRNA expression by cytostatic drugs in hepatoma cells. *J Biol Chem* 272, 28191-28193
- 153) Pinkoski MJ, Brunner T, Green DR, Lin T (2000). Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G354-366

- 154) Cain K, Freathy C (2001). Liver toxicity and apoptosis: role of TGF-beta1, cytochrome c and the apoptosome. *Toxicol Lett* 120, 307-315
- 155) Green DR (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4
- 156) Thornberry NA, Lazebnik Y (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316
- 157) Enari M, Sakahira H, Yokohama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998). A caspase-activated Dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50
- 158) Sharma K, Wang RX, Zhang LY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF (2000). Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 88, 333-347
- 159) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17, 331-367
- 160) Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000). Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14, 729-739
- 161) Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410, 549-554
- 162) Green D, Kroemer G (1998). The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 8, 267-271
- 163) Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P (1999). More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719-7730
- 164) Loeffler M, Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Metivier D, Nieminen AL, Brothers G, Penninger JM, Kroemer G (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 15, 758-767
- 165) Yamada T, Sogawa K, Suzuki Y, Izumi K, Agui T, Matsumoto K (1992). Elevation of the level of lipid peroxidation associated with hepatic injury in LEC mutant rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 77, 121-124
- 166) Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE (1985). Role of metals in oxygen radical reactions. *J Free Radic Biol Med* 1, 3-25
- 167) Stohs SJ, Bagchi D (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18, 321-336
- 168) Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-1312

- 
- 169) Antunes F, Cadenas E, Brunk UT (2001). Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem J* 356, 549-555
- 170) Sokol RJ, Devereaux M, Mierau GW, Hambidge KM, Shikes RH (1990). Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. Modification by vitamin E deficiency. *Gastroenterology* 99, 1061-1071
- 171) McKim JM, Devereaux MW, Peterson DR, Hambidge KM, Ruyle SZ, Schilsky ML, Sternlieb I et al. (1994). Mitochondrial oxidant injury in Long-Evans Cinnamon (LEC) rat liver containing high copper. *Gastroenterology* 106, 941A
- 172) Sokol RJ, Twedt D, McKim JM Jr, Devereaux MW, Karrer FM, Kam I, von Steigman G, Narkewicz MR, Bacon BR, Britton RS, et al. (1994). Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology* 107, 1788-1798
- 173) Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP (1993). Abnormal hepatic mitochondrial respiration and Cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology* 105, 178-187

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1998 bis Dezember 2001 am Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH, Neuherberg, unter Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Greim durchgeführt, bei dem ich mich recht herzlich für die Überlassung des Themas bedanke.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Prof. Dr. Summer für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen Anregungen, sowie allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern seines Arbeitskreises, die für das hervorragende Arbeitsklima mitverantwortlich waren, das mir meine Arbeit wesentlich erleichterte.