

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Institut für Toxikologie

**Herstellung einer TNF- $\alpha$ -überexprimierenden Hepatomzelllinie  
zur Untersuchung zellulärer Adaptationsprozesse nach  
oxidativem Stress**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Yvonne Chovolou**

aus Krefeld

Düsseldorf 2002

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Betreuer der Arbeit:	Prof. Dr. R. Kahl	Institut für Toxikologie
	Prof. Dr. W. Kunz	Institut für Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Was sind Zytokine? .....	1
1.2 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) .....	1
1.2.1 Biologische Wirkungen .....	1
1.2.2 TNF- $\alpha$ Struktur .....	2
1.2.3 TNF-Rezeptor .....	4
1.3 TNF- $\alpha$ und oxidativer Stress .....	5
1.4 TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose .....	7
1.5 TNF- $\alpha$ und die Leber .....	9
1.6 Fragestellung .....	10
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>12</b>
2.1 Abkürzungen .....	12
2.2 Material .....	13
2.2.1 Bakterienstämme und Zelllinien .....	13
2.2.2 Plasmide .....	13
2.2.3 Medien und Antibiotika .....	13
2.2.4 Lösungen und Puffer .....	14
2.2.5 Molekulargewichtsstandards .....	16
2.2.6 Synthetische Primer .....	16
2.2.7 Antikörper .....	16
2.2.8 Enzyme .....	16
2.2.9 Radioaktivität .....	17
2.2.10 Chemikalien .....	17
2.2.11 Geräte .....	18
2.2.12 Sonstige Materialien .....	18
2.2.13 Computerhardware und -software .....	18
2.3 Methoden .....	19
2.3.1 Hepatozytenpräparation .....	19
2.3.2 Zellkultur .....	19
2.3.3 Inkubation und Schädigung der Zellen .....	20
2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	20
2.3.5 MTT-Test .....	20

2.3.6	Neutralrot-Test.....	21
2.3.7	Bestimmung der Lipidperoxidation durch MDA-Messung.....	21
2.3.8	TNF- $\alpha$ ELISA.....	21
2.3.9	TNF- $\alpha$ Bioassay.....	22
2.3.10	Transfektion.....	22
2.3.11	Luciferase Assay.....	22
2.3.12	Messung der Katalase Enzymaktivität.....	23
2.3.13	Bakterien.....	23
2.3.13.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	23
2.3.13.2	Isolation von Plasmid-DNA.....	23
2.3.14	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	24
2.3.15	Kombinierte DNA- und RNA-Isolation mit Trizol <sup>®</sup> .....	24
2.3.16	Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA.....	25
2.3.16.1	Agarosegele.....	25
2.3.16.2	Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA.....	25
2.3.17	Isolation von DNA aus Agarosegelen über Elutions-Kits.....	26
2.3.18	Transfer von RNA auf Nylon-Membran (Northern-Blot).....	26
2.3.19	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	26
2.3.20	Hybridisierung filtergebundener RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	27
2.3.21	Dehybridisierung von Membranen.....	27
2.3.22	cDNA Array.....	27
2.3.23	Autoradiographie.....	28
2.3.24	Densitometrische Auswertung von Agarosegelen und Autoradiographien.....	28
2.3.25	Sequenzierung von DNA.....	28
2.3.26	„ <i>Polymerase Chain Reaction</i> “ (PCR).....	28
2.3.27	„ <i>Reverse Transcription PCR</i> “ (RT-PCR).....	29
2.3.28	Enzymatische Reaktionen an DNA.....	29
2.3.29	Ligation von DNA.....	30
2.3.30	Transformation.....	30
2.3.31	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli.....	30
2.3.32	Coomassie BBR 250-Färbung von Polyacrylamidgelen.....	31
2.3.33	Proteinbestimmung.....	31
2.3.34	Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot).....	31
2.3.35	Farbnachweis filtergebundener Proteine.....	32
2.3.36	Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine.....	32
2.3.37	Chemilumineszenz-Detektion.....	32
2.3.38	DNA-Fragmentationsanalyse.....	32
2.3.39	Apoptosenachweis mit einem anti-Histon ELISA.....	32
2.3.40	Statistische Auswertung.....	33

---

<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>34</b>
3.1 Charakterisierung der H4IIE Zellen .....	34
3.2 Herstellung von TNF- $\alpha$ Expressionskonstrukten .....	35
3.3 Herstellung stabiler Transfektanten .....	36
3.4 Charakterisierung der Klone 2-12 und 13-44 .....	40
3.4.1 Morphologie und Wachstumskurve .....	40
3.4.2 Genomische PCR und RT-PCR .....	40
3.4.3 L929 Assay und TNF- $\alpha$ ELISA .....	41
3.4.4 RT-PCR TNF-R1 und TNF-R2 .....	43
3.4.5 Basale Expression der antioxidativen Enzyme .....	43
3.4.5.1 Basale Expression der MnSOD und der CuZnSOD .....	43
3.4.5.2 Basale Expression der Katalase und der GPx .....	45
3.5 Schädigung der Zellen mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	47
3.5.1 Viabilität .....	47
3.5.2 MDA Freisetzung .....	48
3.5.3 Expression der MnSOD nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	49
3.5.4 Expression der CuZnSOD nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	50
3.5.5 Expression der Katalase nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	51
3.5.6 Expression der GPx nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	53
3.5.7 Apoptoseinduktion nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ .....	54
3.5.8 Expression von p53, bcl-2 und bax nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$ ..	56
3.6 Schädigung der Zellen mit verschiedenen Oxidantien .....	58
3.6.1 Viabilität .....	58
3.6.2 Expression der AOE nach Schädigung mit Oxidantien .....	60
3.6.2.1 Expression der MnSOD nach Schädigung mit Oxidantien .....	60
3.6.2.2 Expression der Katalase nach Schädigung mit Oxidantien .....	63
3.6.2.3 Expression der GPx nach Schädigung mit Oxidantien .....	67
3.6.2.4 Apoptoseinduktion nach Schädigung mit Oxidantien .....	69
3.6.2.5 Expression von p53, bcl-2 und bax nach Schädigung mit Oxidantien .....	72
3.7 Analyse TNF- $\alpha$ -regulierter Gene mit Hilfe von cDNA Arrays .....	78
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>82</b>
4.1 Herstellung stabil transfizierter Zellen .....	82
4.2 Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen .....	84

---

4.2.1	Viabilität und Expression von AOE nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$ und Adriamycin .....	87
4.2.2	Viabilität und Expression von AOE nach Schädigung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Paraquat .....	91
4.2.3	Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$ und Prooxidantien .....	93
4.2.4	Regulation der Apoptose durch die Bcl-2 Familie und p53 .....	94
4.3	Array Analyse.....	97
4.4	Ausblick.....	107
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>127</b>
	ROHDATEN	
	VERÖFFENTLICHUNGEN	
	DANKSAGUNG	
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

# 1. Einleitung

## 1.1 Was sind Zytokine?

Zytokine sind regulatorisch wirkende, hormonähnliche Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von  $\leq 80$  kD. Zytokine können von verschiedenen Zelltypen produziert werden; insbesondere sind Monozyten, Lymphozyten und Neutrophile zu nennen (Tracey, 1994). Aber auch Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen wie Keratinozyten und Hepatozyten können eine Vielzahl von Zytokinen produzieren (Andus *et al.*, 1991). Die Biosynthese und Freisetzung von Zytokinen ist meist transient und wird durch äußere Faktoren oder andere Zytokine reguliert. Zytokine wirken üblicherweise in picomolaren Konzentrationen durch die Bindung an spezifische membranständige Rezeptoren. Im Gegensatz zu den klassischen Hormonen ist ihr Aktionsradius relativ klein, dabei vermitteln sie ihre Wirkung über einen autokrinen oder parakrinen Mechanismus auf sich selbst oder ihre Nachbarzellen. Ein weiteres Kennzeichen der Zytokine ist die starke Überlappung ihres Wirkungsspektrums (Balkwill *et al.*, 1989). So zeigen die Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) bemerkenswerte Ähnlichkeiten in ihrer Wirkung, obwohl sie keinerlei strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen (Le und Vilcek, 1989). Ein einzelnes Zytokin wird nicht nur durch unterschiedliche Zelltypen als Antwort auf verschiedene Stimuli produziert, sondern hat auch eine Vielzahl biologischer Wirkungen auf verschiedene Zielzellen (Andus *et al.*, 1991).

## 1.2 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ )

TNF- $\alpha$  gehört zur TNF Superfamilie von Molekülen, der unter anderem auch TNF- $\beta$  (auch Lymphotoxin LT- $\alpha$  genannt), LT- $\beta$  und Fas Ligand (Fas L) angehören. Diese Moleküle zeigen untereinander eine Homologie von 20-25 % in ihrer Aminosäuresequenz und binden an spezifische membranständige Rezeptoren, die zur TNF-Rezeptor Superfamilie gehören (Gravestain und Borst, 1998).

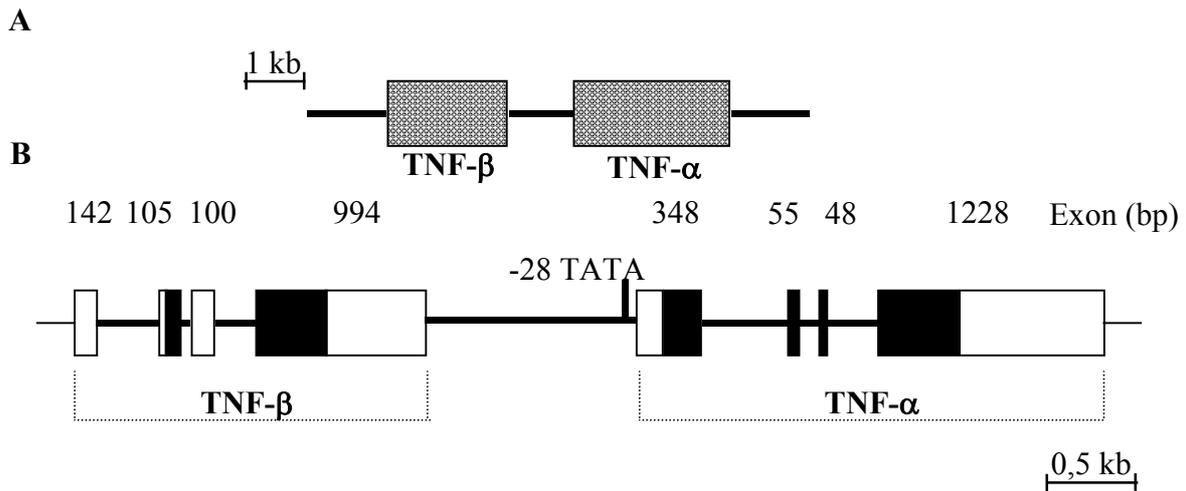
### 1.2.1 Biologische Wirkungen

TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin mit einer Vielzahl von biologischen Wirkungen. Ursprünglich wurde TNF- $\alpha$  als ein Protein charakterisiert, welches zytotoxisch oder zytostatisch

gegenüber transformierten Zelllinien ist (Sugarman *et al.*, 1987; Fransen *et al.*, 1986a,b). Später stellte sich aber heraus, dass TNF- $\alpha$  auch auf nicht transformierte Zellen zytotoxisch wirken kann (Sato *et al.*, 1986; Robaye *et al.*, 1991), während nicht alle Tumorzelllinien sensitiv gegenüber der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität sind (Watanabe *et al.*, 1989). Dabei scheint es keine Korrelation zwischen der Empfindlichkeit gegenüber TNF- $\alpha$  und der Rezeptorzahl sowie dem embryonalen und dem histologischen Ursprung der Zellen zu geben. Dagegen scheint es klar, dass es bei der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommt und dass bei diesem Prozess die Mitochondrien eine wichtige Rolle spielen (Goossens *et al.*, 1999a). *In vivo* ist die Hauptaufgabe von TNF- $\alpha$  nicht die Zytotoxizität, sondern die Induktion von Genen, die eine Rolle bei der Differenzierung, der Proliferation, der antiviralen Aktivität, der Immunmodulation und bei Entzündungsprozessen spielen (Beyaert und Fiers, 1998). So konnte gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  mitogen auf eine Reihe von Zellen (Glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Lymphozyten) wirken kann (Luster *et al.*, 1999). TNF- $\alpha$  spielt zudem eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen. Dies geschieht zum Teil durch die Regulation von Genen, die für Entzündungsmediatoren kodieren, unter anderem Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-8 (IL-8). Die meisten Gene, die für Entzündungsmediatoren kodieren, haben in ihren Promotorregionen Bindungsstellen für NF- $\kappa$ B, einen Transkriptionsfaktor, der von TNF- $\alpha$  aktiviert wird und so die Expression dieser Gene regulieren kann (Beyaert und Fiers, 1998).

### 1.2.2 TNF- $\alpha$ Struktur

In den bis jetzt untersuchten Spezies, Mensch (Nedwin *et al.*, 1985), Maus (Shirai *et al.*, 1988), Kaninchen (Ito *et al.*, 1986), Schwein (Kuhnert *et al.*, 1991) und Ratte (Kwon *et al.*, 1993a), findet man die Gene für TNF- $\beta$  und TNF- $\alpha$  in Tandem-Orientierung angeordnet (Abbildung 1A). Jedes Gen besteht aus vier Exons und drei Introns (Abbildung 1B). Die beiden Gene sind durch etwa 1,1 kb intragenetische DNA voneinander getrennt. Die Nukleotidsequenz der Ratte zeigt eine große Homologie zur Maus TNF- $\alpha$  Sequenz (86,5 %) und eine etwas geringere Homologie zur humanen TNF- $\alpha$  Sequenz (68,5 %) (Kwon *et al.*, 1993b).

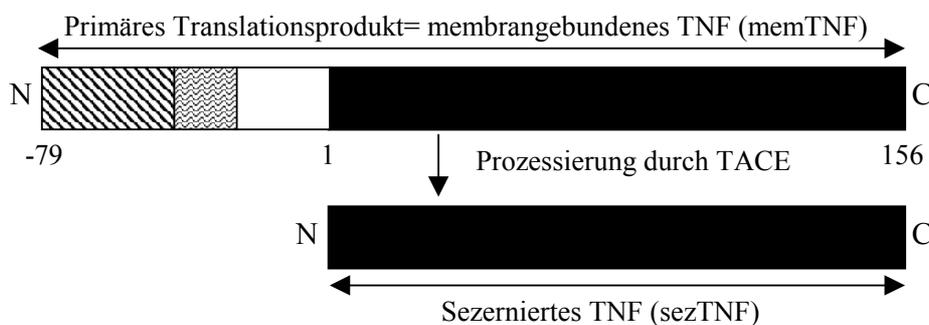


**Abb. 1: Schematische Darstellung des Ratten TNF Lokus**

A: Genomische Organisation des TNF-alpha (rTNF- $\alpha$ ) und TNF-beta (rTNF- $\beta$ ) Gens bei der Ratte.

B: Detaillierte Darstellung der rTNF- $\alpha$  und rTNF- $\beta$  Gene. Die Boxen repräsentieren die Exons, wobei die weißen Bereiche nicht translatiert werden.

Das rTNF- $\alpha$  Gen kodiert für ein 156 Aminosäuren-Polypeptid mit einer Präsequenz von 79 Aminosäuren. Das Propeptid zeigt 92 % Homologie zum Maus- und 72 % Homologie zum humanen Propeptid (Estler *et al.*, 1992). Die Präsequenz ist deutlich länger als eine klassische Signalsequenz und ist zwischen den verschiedenen Säugerspezies stark konserviert. Dies lässt vermuten, dass die Präsequenz eine essentielle Funktion hat (Fiers, 1991). TNF- $\alpha$  existiert unprozessiert als membrangebundenes 26 kD Protein (memTNF) (Kriegler *et al.*, 1988), welches durch die Abspaltung der Präsequenz in die sezernierte 17 kD Form (sezTNF) überführt wird (Abb. 2). Die Prozessierung erfolgt durch das „TNF- $\alpha$ -converting enzyme“ (TACE), ein Mitglied der Metalloprotease-Disintegrin Familie (Solomon *et al.*, 1999). Die 17 kD sezTNF Form bildet durch Aggregation ein Trimer mit einem Molekulargewicht von 52 kD, welches dann an den TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) bindet und ihn aktiviert. Auch das memTNF ist biologisch aktiv und wird als der Hauptligand angesehen, mit dem der TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) interagiert.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Prozessierung des Ratten TNF- $\alpha$  Proteins**

Der gestreifte Bereich repräsentiert den intrazellulären Teil, der gewellte Bereich den Transmembranbereich und der weiße Bereich die Signalsequenz; N= N-Terminus; C= C-Terminus.

### 1.2.3 TNF-Rezeptor

TNF- $\alpha$  vermittelt seine Wirkung über die Bindung an seine Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2, die eine strukturelle Homologie aufweisen, aber funktionell unterschiedlich sind (Goeddel, 1999). Die TNF-Rezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor Superfamilie, die eine Reihe von biologischen Funktionen reguliert, darunter auch solche wie Wachstum, Differenzierung, Regulation von inflammatorischen Reaktionen und Apoptose. Die TNFR-Familie besteht aus über 15 verschiedenen Molekülen. Die meisten sind Typ I Membranproteine mit cysteinreichen extrazellulären Motiven und einer einzelnen Transmembrandomäne. Die intrazelluläre Domäne des TNF-R1 enthält eine „*death domain*“ (DD) von etwa 70 Aminosäuren, die für die Signalweiterleitung benötigt wird. Die DD ist ein Protein-Protein Interaktionsmotiv aus sechs  $\alpha$ -Helices; sie erlaubt die Aggregation des TNF-R1. Eine ligandenunabhängige Aggregation der zytoplasmatischen Domäne des TNF-R1 wird verhindert, indem die DD durch ein 60 kD SODD („*silencer of death domains*“) Protein blockiert wird (Jiang *et al.*, 1999). Der TNF-R2 gehört zu einer Untergruppe der TNF-Rezeptor Familie. Er besitzt keine DD und interagiert direkt mit einem oder mehreren Mitgliedern der TRAF-Protein Familie („*TNF receptor associated factor*“) (Arch und Thompson, 1998). Über diesen Weg kommt es dann zur Signalweiterleitung. Abbildung 3 zeigt eine Zusammenfassung der durch TNF- $\alpha$  induzierten Signalkaskade.

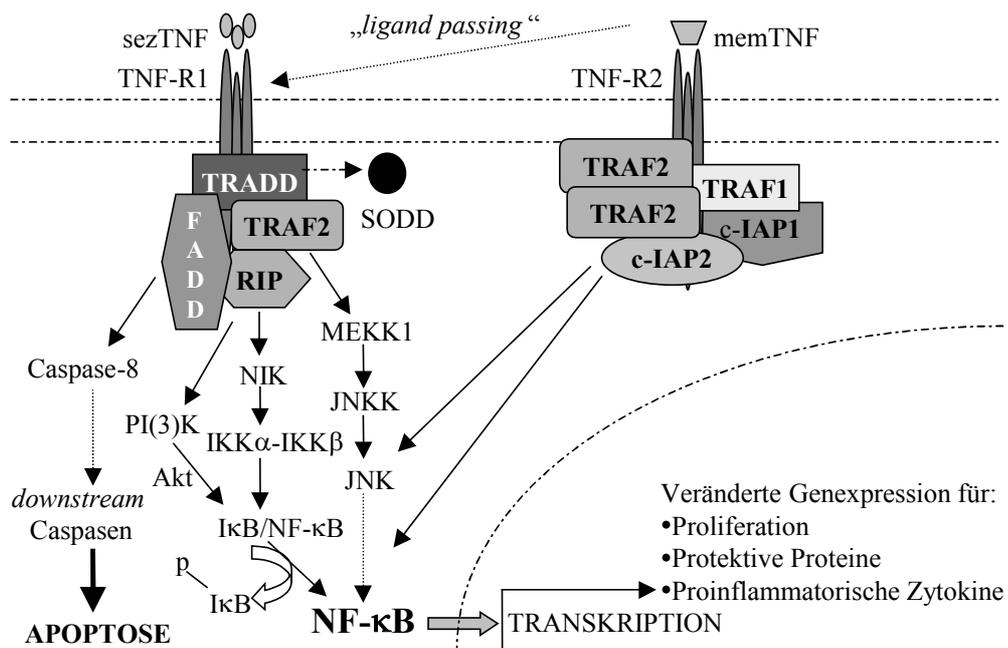


Abb. 3: Signaltransduktionsweg nach Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNF-R1 und TNF-R2 (modifiziert nach Papadakis und Targan, 2000)

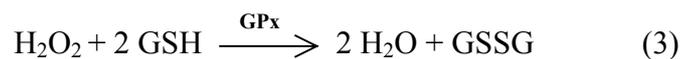
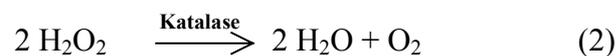
Die Bindung eines TNF- $\alpha$  Homotrimerers an den TNF-R1 führt zu einer Dissoziation des SODD-Proteins von der „*death domain*“ und ermöglicht so die Trimerisierung des Rezeptors. TRADD („*TNF-receptor associated death domain*“), ein Adaptermolekül, kann nun an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors binden (Hsu *et al.*, 1995). Drei weitere Proteine binden an TRADD, FADD („*Fas-associated death domain protein*“ (Hsu *et al.*, 1996a), TRAF2 („*TNF receptor associated factor*“) und die Serin/Threonin Kinase RIP („*receptor interacting protein*“) (Hsu *et al.*, 1996b). FADD aktiviert eine Caspase-Kaskade, welche das TNF- $\alpha$ -induzierte Todesprogramm ausführt (Boldin *et al.*, 1996; Yeh *et al.*, 1998). Der Mechanismus ist nicht genau bekannt, aber es kommt zu einem Abfallen des mitochondrialen Membranpotentials (Pastorino *et al.*, 1996) und in manchen Fällen zu einer Akkumulation von p53 (Yeung *et al.*, 1996). TRAF2 vermittelt die Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase (JNK/SAPK) (Yeh *et al.*, 1997) und RIP ist an der Aktivierung von NF- $\kappa$ B beteiligt (Kelliher *et al.*, 1998). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird als ein zytoprotektiver Effekt angesehen. Man geht davon aus, dass es zu einer Modulation von NF- $\kappa$ B responsiven Genen kommt und dass diese zu einer Resistenz gegenüber der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität führt. Zu den durch NF- $\kappa$ B regulierten Genen, die eine Rolle bei der Zytoprotektion gegenüber TNF- $\alpha$  spielen, gehört die Mangan-Superoxiddismutase (MnSOD), ein antioxidatives Enzym (Wong und Goeddel, 1988). Eine Überexpression der MnSOD löste eine Resistenz gegenüber der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität aus, während die Expression von antisense MnSOD-RNA zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TNF- $\alpha$  führte (Wong *et al.*, 1989; Manna *et al.*, 1998).

### 1.3 TNF- $\alpha$ und oxidativer Stress

Zellen produzieren ständig reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Nebenprodukt ihrer metabolischen Reaktionen (Fridovich, 1978). Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören: (i) Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), (ii) Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), (iii) Hydroxylradikale ( $\cdot OH$ ). Andere biologisch relevante freie Radikale oder ihre Äquivalente sind organische Hydroperoxide (ROOH) und Peroxylradikale ( $ROO\cdot$ ). Das Hauptmerkmal der ROS ist ihre starke Reaktivität mit anderen Molekülen und ihre relativ geringe Halbwertszeit. Hohe ROS Konzentrationen führen zu einem Zelltod durch Nekrose, während mittlere und niedrige ROS Konzentrationen an der Abwehr gegen Mikroorganismen beteiligt sind (Klebanoff *et al.*, 1986), als Signalmoleküle wirken, Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B

aktivieren können (Janssen-Heininger *et al.*, 2000), Zellproliferation und Differenzierung induzieren oder einen apoptotischen Zelltod einleiten können (Suzuki *et al.*, 1997).

Zellen sind mit umfassenden antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet, die ROS direkt abfangen und inaktivieren können. Zu den antioxidativen Enzymen zählen die Superoxiddismutasen (SOD), die Katalase und die Glutathionperoxidasen (GPx). Die Superoxiddismutasen gehören zu einer Familie von Metallenzymen. In Eukaryonten kommen eine zytosolische, kupfer- und zinkhaltige (CuZnSOD) und eine mitochondriale, manganhaltige (MnSOD) Form vor (Marklund, 1990). Superoxidanionen werden durch SODs in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt (Abbildung 4, Reaktion 1). Das entstandene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann dann durch die Katalase, ein tetrameres Hämprotein, zu Wasser und Sauerstoff abgebaut werden (Abbildung 4, Reaktion 2). Die Glutathionperoxidasen katalysieren den Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indem reduziertes Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird (Abbildung 4, Reaktion 3). Das gebildete GSSG kann durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase wieder zu GSH umgewandelt werden, so dass der Zelle wieder ausreichende Mengen an reduziertem Glutathion zur Verfügung stehen. Organische freie Radikale und elektrophile Metabolite organischer Moleküle können auch direkt mit dem Glutathion reagieren (Abbildung 4, Reaktion 4).



**Abb. 4: Reaktionen der antioxidativen Enzyme in der Zelle**

Zum Teil werden diese Reaktionen durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert. Besonders schädlich für die Zelle sind die extrem reaktiven Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ), die am Ort ihres Entstehens zelluläre Makromoleküle (Nukleinsäuren, Proteine, Lipide) oxidieren können. Sie entstehen unter anderem durch die Spaltung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch redoxaktive Übergangsmetallionen wie Fe<sup>2+</sup> (Fenton Reaktion).

Wird die Bildung von ROS nicht begrenzt, entsteht in der Zelle oxidativer Stress, der zu einer Vielzahl von Zellschädigungen führen kann. Oxidativer Stress wird unter anderem als ein wichtiger Faktor bei der Cancerogenese (Toyokuni, 1998), bei Alterungsprozessen und bei neurodegenerativen Erkrankungen angesehen (Berlett und Stadtman, 1997). Die

Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gilt als ein Mechanismus der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität (Hennet *et al.*, 1993; Yamauchi *et al.*, 1989), wobei die mitochondriale Atmungskette die Hauptquelle der durch TNF- $\alpha$  induzierten ROS zu sein scheint (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1995; Goossens *et al.*, 1999b).

## 1.4 TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose

Apoptose (auch programmierter Zelltod genannt) ist eine regulierte Form des Zelltodes. Der Begriff Apoptose wurde von Kerr und seinen Kollegen 1972 eingeführt, um einen Typ von Zelltod zu beschreiben, der sich von einem pathologischen, nekrotischen Zelltod durch bestimmte morphologische Kennzeichen unterscheidet. Apoptose ist ein physiologischer und essentieller Prozess für einen multizellulären Organismus und ist von fundamentaler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase. In einem normalen Gewebe befindet sich die Mitoserate im Gleichgewicht mit der Apoptoserate (Hall und Lane, 1994). Auch bei Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen spielt Apoptose eine wichtige Rolle, indem unerwünschte, gealterte oder geschädigte Zellen durch diesen regulierten Prozess eliminiert werden (Steller, 1995).

Die Apoptose ist charakterisiert durch die organisierte nukleäre und zelluläre Fragmentation. Die Zelle schrumpft, es kommt zur Bildung von Bläschen an der Plasmamembran („*membrane blebbing*“), zur zytoplasmatischen Vakuolisierung und zur Chromatinkondensation. In einem nächsten Schritt der Apoptose wird das kondensierte Chromatin durch die Aktivierung von Endonukleasen in hochmolekulare Fragmente (50-300 kb) und später dann in kleinere Fragmente (oligonukleosomale Fragmente) gespalten; letztere können auf Agarosegelen als „DNA-Leiter“ visualisiert werden, da ihre Größe ein Vielfaches von 180 bp beträgt. Der Verlust der Plasmamembranintegrität ist das letzte Ereignis des apoptotischen Zelltodes. Die apoptotische Zelle fragmentiert in einzelne Vesikel („*apoptotic bodies*“), die von benachbarten Zellen aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu ist der nekrotische Zelltod ein unkoordinierter Prozess, bei dem es infolge einer schweren Schädigung der Zelle zu einem Anschwellen des Zytoplasmas und der Organellen kommt. Dies führt zu einer Lyse der Zellmembran und zu einer unkontrollierten Freisetzung des Zellinhalts in die extrazelluläre Umgebung.

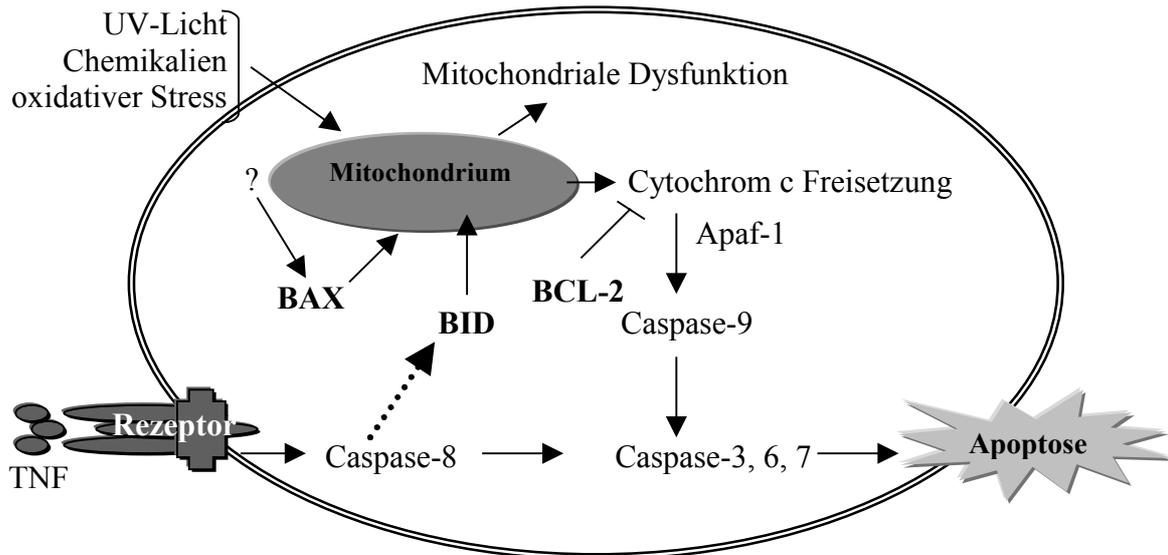
Für die Aktivierung des apoptotischen Programms benötigt die Zelle einen Stimulus. Dieser Stimulus kann eine Substanz sein, die durch die Zellmembran in die Zelle gelangt und dort die apoptotische Kaskade moduliert, ohne dass ein spezifischer

Zelloberflächenrezeptor beteiligt ist. Beispiele für die Induktion von Apoptose ohne die Beteiligung eines spezifischen Rezeptors sind oxidativer Stress (Buttke und Sandstrom, 1994), UV-Licht (Yamada und Ohyama, 1988), verschiedene Noxen sowie synthetische Peptide und Toxine (Schwalb *et al.*, 1993). Ein anderer Mechanismus für die Apoptoseinduktion benötigt die Expression spezifischer Oberflächenrezeptoren. Rezeptorvermittelte Apoptose ist für verschiedene Wachstumsfaktoren, z. B. TGF- $\beta$ , (Oberhammer *et al.*, 1992) und Zytokine, z. B. TNF- $\alpha$  (Shinagawa *et al.*, 1991), beschrieben worden. Die Bindung von TNF- $\alpha$  an den spezifischen TNF-Rezeptor führt an der C-terminalen Seite des Rezeptors zu einer Anlagerung von zytoplasmatischen Proteinen und zur Bildung einer aktiven „*death domain*“. Dies löst eine Aktivierung der Procaspase-8 und die Einleitung der intrazellulären apoptotischen Kaskade aus (Boldin *et al.*, 1996). Caspasen („*cysteine aspartate specific proteases*“) sind Cystein-Proteinasen, die substratspezifisch jeweils nach bestimmten Asparaginsäureresten schneiden (Cohen, 1997). Sie liegen als inaktive Procaspasen im Cytoplasma vor und werden durch proteolytische Spaltung aktiviert (Earnshaw *et al.*, 1999). Die aktivierte Caspase schneidet nun eine andere Caspase, so dass eine intrazelluläre proteolytische Kaskade entsteht, die zu einer Weiterleitung des apoptotischen Signals führt.

Die Mitochondrien spielen bei der Durchführung des apoptotischen Programms eine wichtige Rolle (Reed, 1997). Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass TNF- $\alpha$  Veränderungen in der mitochondrialen Ultrastruktur und Funktion induziert (Prins *et al.*, 1998; Schulze-Osthoff *et al.*, 1992). So kommt es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Zelltypen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und zur Freisetzung von Cytochrom c (Kroemer *et al.*, 1997; Reed, 1997). Schädigung mit TNF- $\alpha$  und Aktivierung der Caspase-8 löst wahrscheinlich die direkte Spaltung des zytosolischen Bid-Proteins (eines proapoptotischen Mitglieds der Bcl-2 Familie) aus. Das trunkierte Bid transloziert zu den Mitochondrien und induziert dort die Freisetzung von Cytochrom c, AIF („*apoptosis-inducing factor*“) und anderen Inter-membranproteinen. Cytochrom c bindet nun an Apaf-1, welches wiederum Caspasen aktivieren kann (Zou *et al.*, 1999; Luo *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999).

Verschiedene andere zytoplasmatische Proteine sind an der Regulation des apoptotischen Zelltodes beteiligt. Es handelt sich hauptsächlich um die Mitglieder der Bcl-2 Familie, die in zwei Gruppen unterteilt werden. Zu den antiapoptotischen Mitgliedern zählen unter

anderem Bcl-2 und Bcl-xL, während Bax, Bad und Bid zu den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie gehören (Adams *et al.*, 1998). Antiapoptotische Bcl-2 Proteine können an die Mitochondrien binden und so die Freisetzung von Cytochrom c verhindern (Kluck *et al.*, 1997) (Abbildung 5). Die genaue Funktion der Bcl-2 Familie bei der Modulation der Apoptose ist noch unklar. Bekannt ist aber, dass das Gleichgewicht zwischen den Mitgliedern der Bcl-2 Familie determiniert, ob ein apoptotischer Stimulus auch zu einem apoptotischen Zelltod führt.



**Abb. 5: Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$  und andere apoptotische Stimuli (schematische Darstellung)**

## 1.5 TNF- $\alpha$ und die Leber

Die Leber ist das zentrale Entgiftungsorgan des Körpers. Substanzen, die im Magen-Darm-Trakt resorbiert werden, gelangen über das Pfortaderblut in die Leber, werden dort zur Entgiftung in unschädliche wasserlösliche Metaboliten überführt und können dann ausgeschieden werden. Somit ist die Leber das Zielorgan vieler toxischer Substanzen.

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation hepatozellulärer Funktionen. So kann die Synthese von Akut-Phase-Proteinen (APP) in Hepatozyten durch IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  reguliert werden (Richards *et al.*, 1992; Campos *et al.*, 1993). Der hepatische Lipidmetabolismus wird u.a. durch TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-4 und IL-6 beeinflusst (Grunfeld *et al.*, 1991), während TNF- $\alpha$  und andere Zytokine auch an dem Prozess der Leberregeneration beteiligt sind (Michalopoulos und DeFrances, 1997). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Leber selbst eine Vielzahl von Zytokinen exprimiert

(Dumoulin *et al.*, 1997; Tovey *et al.*, 1991; Fukuda *et al.*, 1995). Bis vor kurzem wurden die gewebsständigen Makrophagen (Kupfferzellen) der Leber als Quelle für die meisten Zytokine angesehen und die Hepatozyten als Zielzellen für diese Zytokine. Es konnte aber demonstriert werden, dass Leberzellen selbst eine Reihe von Zytokinen, unter anderem TNF- $\alpha$ , produzieren können (Gonzalez-Amaro *et al.*, 1994; Sueoka *et al.*, 1997; El-Bahay *et al.*, 1999). Die physiologische Rolle von TNF- $\alpha$  ist wahrscheinlich die Beteiligung an Prozessen wie Gewebereparatur und Immunmodulation. Eine Überproduktion von TNF- $\alpha$  (z. B. induziert durch toxische Substanzen) kann aber zur Zellschädigung und sogar zum Zelltod führen. Dabei wird angenommen, dass TNF- $\alpha$  die Schädigung amplifiziert, indem weitere Zytokine freigesetzt und vermehrt ROS gebildet werden. Erhöhte TNF- $\alpha$  Werte wurden bei einer Vielzahl von akuten und chronischen Lebererkrankungen gefunden (Tilg, 1993). Auch nach Behandlung von Versuchstieren mit hepatotoxischen Substanzen wie Tetrachlorkohlenstoff (Bruccoleri *et al.*, 1997), Paracetamol (Blazka *et al.*, 1995), Dimethylnitrosamin (Schook *et al.*, 1992) oder Ethanol (Iimuro *et al.*, 1997) wurden erhöhte TNF- $\alpha$  Werte im Serum nachgewiesen. TNF- $\alpha$  spielt also eine zentrale Rolle bei der Potenzierung eines Leberschadens durch hepatotoxische Substanzen oder ihre Metaboliten.

## 1.6 Fragestellung

TNF- $\alpha$  ist ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin mit einer Vielzahl von biologischen Effekten. Die Effekte umfassen neben der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität auch die Aktivierung einer Reihe von zellulären Signalwegen, die zu verschiedenen biologischen Antworten führen. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies spielt bei allen TNF- $\alpha$ -vermittelten Effekten eine zentrale Rolle. Nach Bindung von TNF- $\alpha$  an seinen Rezeptor kann es:

- a.) entweder zu einer Aktivierung des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und zu einer anschließenden Transkription von protektiven Genen (z. B. MnSOD) kommen. Dies führt zu einem Überleben der Zelle,
- b.) oder die Zelle leitet das Programm für den apoptotischen Zelltod ein und die Zelle stirbt.

Hepatozyten sind Zielzellen für die von Kupfferzellen gebildeten Zytokine; sie können aber auch selbst eine Reihe von Zytokinen, unter anderem TNF- $\alpha$ , produzieren. Welche Rolle die von Hepatozyten produzierten und sezernierten Zytokine spielen, ist unklar. Ausgehend von diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Leberzellen, die selbst TNF- $\alpha$  produzieren, sich vor der zytotoxischen Wirkung des eigenen TNF- $\alpha$  schützen und dass diese Zellen auch einen besseren Schutz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und möglicherweise gegenüber anderen Substanzen haben, die oxidativen Stress verursachen. Als Modellnoxen für die Induktion von oxidativem Stress wurden verwendet:

- a.) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als direkter Mediator von oxidativem Stress
- b.) Paraquat, ein Kontaktherbizid, welches nach Aufnahme in der Zelle durch intrazelluläres Redox-cycling über die NADPH-abhängige Cytochrom P450 Reduktase Sauerstoffradikale erzeugt
- c.) Adriamycin, ein Zytostatikum, welches mit Nukleinsäuren interagiert und so zu DNA-Schäden führt. Ein weiterer Mechanismus der Zellschädigung durch Adriamycin beruht auf seine Fähigkeit, im Rahmen eines Redoxzyklus Sauerstoff zu aktivieren.

Um die oben formulierte Hypothese zu testen, wurden Rattenhepatomzellen stabil mit der TNF- $\alpha$  cDNA transfiziert. Diese Zellen wurden verwendet, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Führt eine Überexpression von TNF- $\alpha$  in Rattenhepatomzellen zu einem Schutz vor exogenem TNF- $\alpha$ ?
2. Sind TNF- $\alpha$ -exprimierende Zellen vor Substanzen geschützt, die einen oxidativen Stress vermitteln?
3. Welche Rolle spielen bei diesen Schutzvorgängen die antioxidativen Enzyme?
4. Sind die transfizierten Zellen in der Lage, das apoptotische Programm zu initiieren, und welche Rolle spielen dabei die Mitglieder der Bcl-2 Familie, bcl-2 und bax, sowie das Tumorsuppressorgen p53?

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine cDNA Array Analyse durchgeführt, um nach differentiell exprimierten Genen zwischen den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen und den nicht transfizierten Hepatomzellen zu suchen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung	min	Minute
AIF	„ <i>apoptosis inducing factor</i> “	MnSOD	Mangan Superoxiddismutase
Amp	Ampicillin	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
Apaf	„ <i>apoptosis protease activating factor</i> “	MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
APS	Ammoniumperoxidsulfat	n	Anzahl der Versuche
AS	Aminosäure(n)	NF- $\kappa$ B	„ <i>nuclear factor kappa B</i> “
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	NIK	„ <i>NF-<math>\kappa</math>B inducing kinase</i> “
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
bp	Basenpaare	Nt	Nukleotid
BSA	„ <i>bovine serum albumin</i> “	OD	optische Dichte
CuZnSOD	kupfer- und zinkhaltige Superoxiddismutase	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
D	Dalton	PBS	„ <i>phosphate-buffered saline</i> “
DD	„ <i>death domain</i> “	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat	PCR	„ <i>polymerase chain reaction</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mRNA	messenger RNA
cDNA	„ <i>complementary DNA</i> “	poly(A) <sup>+</sup> -RNA	poly-Adenosin-RNA
DTT	Dithiothreitol	RNase	Ribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RIP	„ <i>receptor interacting protein</i> “
EtBr	Ethidiumbromid	ROS	„ <i>reactive oxygen species</i> “
EtOH	Ethanol	rpm	„ <i>rotations per minute</i> “
FADD	„ <i>Fas-associated death domain</i> “	RT	Raumtemperatur
FCS	Fötales Kälberserum	s	Standardabweichung
g	Gramm, Erdbeschleunigung	SDS	Natriumdodecylsulfat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	sec	Sekunde
GPx	Glutathionperoxidase	SODD	„ <i>silencer of death domains</i> “
GSH	Glutathion	SSC	„ <i>standard saline citrate</i> “
GSSG	Glutathiondisulfid	TACE	„ <i>TNF-converting enzyme</i> “
h	Stunde	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie	TBS	Thiobarbitursäure
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF- $\kappa$ B	TE	Tris-EDTA-Puffer
IKK	I $\kappa$ B Kinase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
IL	Interleukin	TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid	TRADD	„ <i>TNF receptor associated death domain</i> “
kb	Kilobasenpaare	TRAF	„ <i>TNF receptor associated factor</i> “
kD	Kilodalton	U	Unit
lac Z	$\beta$ -Galaktosidase-Strukturgen	üN	über Nacht
LB-Medium	Luria-Broth-Medium	V	Volt
MCS	„ <i>multiple cloning site</i> “	W	Watt
MDA	Malondialdehyd	x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
		x	arithmetisches Mittel

## 2.2 Material

### 2.2.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Bakterien: DH5 $\alpha$ :

F<sup>-</sup>, endA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1,  $\lambda$ <sup>-</sup>, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (argF-lacZya)U196,  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 (Hanahan, 1983)

XL1-Blue:

endA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1,  $\lambda$ <sup>-</sup>, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ (lac), [F', ProA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>,  $\lambda$ αχI<sup>θ</sup>Z $\Delta$ M15, Tn10(tet<sup>R</sup>)] (Bullock *et al.*, 1987)

JM109:

F', (traD36proAB<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>lacZ $\Delta$ M15), endA1, recA1, hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>), supE44, thi-1, gyrA96, relA1,  $\Delta$  (lac-proAB)

Zelllinien: H4IIE:

Reuber H35 Hepatomzellen aus der Ratte (Pitot *et al.*, 1964)

L929:

Fibroblastenartige Tumorzellen aus der Maus

### 2.2.2 Plasmide

pBluescript SK<sup>-</sup> M13 [Fa. Stratagene]

pTRE [Fa. Clontech]

pBluescript KS<sup>+</sup> M13 [Fa. Stratagene]

pTetOn [Fa. Clontech]

pcDNAZeo<sup>-</sup> 3.1 [Fa. Invitrogen]

pTetOff [Fa. Clontech]

pBR322-Katalase: In die PstI-Schnittstelle wurde ein 1,13 kB Genfragment der Katalase (Ratte) kloniert. Das Konstrukt wurde von Dr. Shuichi Furuta, Institute of Biochemistry, Sinshu University, Nagano, Japan zur Verfügung gestellt (Furuta *et al.*, 1986).

pSP65-RMS: In die EcoRI-Schnittstelle wurde ein 1,4 kB Genfragment der MnSOD (Ratte) kloniert. Das Konstrukt wurde von Dr. Ye-Shih Ho, Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University, Detroit, USA zur Verfügung gestellt (Ho und Crapo, 1987a).

pUC13-RCS: In die EcoRI-Schnittstelle wurde ein 0,6 kB Genfragment der CuZnSOD (Ratte) kloniert. Das Konstrukt wurde von Dr. Ye-Shih Ho, Institute of Chemical Toxicology, Wayne State University, Detroit, USA zur Verfügung gestellt (Ho und Crapo, 1987b).

### 2.2.3 Medien und Antibiotika

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 85 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,6, 1 mM MgSO<sub>4</sub>

LB-Nährmedium: 1,8 % (w/v) Agar in LB, autoklavieren, auf 60°C abkühlen lassen und in sterile Petrischalen gießen

LB-Medienzusätze: IPTG: 0,5 mM in dH<sub>2</sub>O; x-Gal: 0,01 % in DMSO

Williams Medium E:	mit 2,2 g/l NaHCO <sub>3</sub> , ohne Phenolrot (Sigma) supplementiert mit 10 mM HEPES (Sigma), 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma), 10 % hitzeinaktiviertes FCS	
DMEM-Medium	ohne Natriumpyruvat, mit L-Glutamin (PAA Laboratories)	
High Glucose (1x):	supplementiert mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma), 10 % hitzeinaktiviertes FCS	
Antibiotika:	Ampicillin (ICN)	Hygromycin B (Calbiochem)
	Doxycyclinhydrochlorid (ICN)	Tetracyclin (ICN)
	G418 (Calbiochem)	Zeocin (Invitrogen)

## 2.2.4 Lösungen und Puffer

Acetat-Mix:	60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Essigsäure, 28,5 ml dH <sub>2</sub> O
Acrylamidlösung:	38 % Acrylamid, 2 % Bisacrylamid
Antikörper-Inkubationslg:	0,1 % Tween 20, 1 x TBS-Puffer
Antikörper-Blockierlg:	3 % Magermilchpulver in Antikörper-Inkubationslösung
Antikörper-Waschlg:	0,1 % Tween 20, 1 x TBS-Puffer
Collagenasepuffer:	3,9 g NaCl, 0,5 g KCl, 0,7 g CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 23,83 g HEPES pH 7,6 ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O. Unmittelbar vor Perfusionsbeginn 50 mg Collagenase H pro 100 ml Puffer zugeben. Puffer steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm)
50 x Denhards-Lösung:	1 % (w/v) Ficoll 400, 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 1 % (w/v) BSA Fraktion V (Serva) steril filtrieren (Porengröße 0,22 µm), Lagerung bei -20°C
Coomassie-Entfärbelösung:	10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung:	0,025 % (w/v) Serva Blue G in 10 % Essigsäure
Coomassie-Fixierer:	50 % (v/v) MeOH, 10 % (v/v) Essigsäure
dH <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> :	0,1 % Diethylpyrocarbonat in dH <sub>2</sub> O 12 h rühren, 10 min unter UV Licht, 2 x autoklavieren
DNA-Blaumarker:	0,1 % Bromphenolblau, 0,1 % p-Xylenolblau, 50 % Glycerol, in 1 x TBE-Puffer
DNA-Extraktionspuffer:	20 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1 M NaCl, 0,5 % SDS pH 8,0 kurz vor der Benutzung 10 µg/ml RNaseA zugeben
Entwickler:	GBX Developer and Replenisher nach Angaben des Herstellers mit dH <sub>2</sub> O verdünnen (Kodak, Stuttgart)
Fixierer-Autoradiographie:	600 g Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 60 g K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , ad 2000 ml dH <sub>2</sub> O
Fötale Kälberserum:	FCS 30 min bei 56°C hitzeinaktivieren, Lagerung bei -20°C
Formamid deionisiert:	50 ml Formamid, 50 g Ionenaustauscherharz für 30 min bei RT rühren, durch Faltenfilter filtrieren, Lagerung bei -20°C
Glucose-Mix:	50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8,0
Glycerin-Schock-Lösung:	30 ml 50 % (w/v) Glycerin, 50 ml 2x HBS-Lösung pH 7,12, 20 ml dH <sub>2</sub> O, steril filtrieren, Lagerung bei 4°C

10 x HBS-Transfektionslg.:	8,18 % (w/v) NaCl, 5,94 % (w/v) HEPES, 0,2 % (w/v) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , Lagerung bei 4°C. Für die Transfektion eine 2 x HBS-Lösung pH 7,12 (sehr wichtig) herstellen, steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
Heringssperma-DNA:	10 mg/ml in dH <sub>2</sub> O lösen, 5 min kochen, Lösung mehrmals durch Spritze mit Kanüle ziehen, Lagerung bei -20°C
ITS <sup>+</sup> Premix:	12,5 mg Insulin, 12,5 mg Transferrin, 12,5 µg Selensäure, 2,5 g Rinderserumalbumin, 10,7 mg Linolensäure pro 20 ml (Becton Dickinson, Essen)
10 x SDS-Laufpuffer:	144,6 g Glycin, 30 g Tris ad 1l
1 x SDS-Laufpuffer:	200 ml 10 x SDS-Laufpuffer, 20 ml 10 % SDS ad 1l
Loading-Solution (für DNA-Fragmentation):	0,02 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol in 1x TBE
MOPS:	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, 10 mM EDTA, 50 mM Natriumacetat, pH 7,0
5 x MTT-Lösung:	3,5 mg/ml MTT in 1 x PBS
NaOH-SDS-Lösung.:	0,2 M NaOH, 1 % SDS
Neutralrot-Lösung:	4 mg/ml in dH <sub>2</sub> O, lichtgeschützt, Lagerung bei 4°C
Nishimura-Puffer:	36 % (w/v) Glycerin 12 % (w/v) Polyethylenglycol-6000 12 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O in LB-Medium, sofort steril filtrieren, Lagerung bei 4°C
Northern-Hybridisierungslsg:	50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 4,5 ml 20 x SSC 1,5 ml 50 x Denhards-Lösung, 750 µl 10 % (w/v) SDS, 600 µl 10 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA
10 x PBS:	1,37 M NaCl, 27 mM KCL, 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, pH 7,2 ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O
Phenol:	Phenol, Tris/HCl gesättigt pH 7,9
Phenol / CHCl <sub>3</sub> :	Tris/HCl gesättigtes Phenol und Chloroform werden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt, Lagerung bei 4°C
Ponceau Rot S (10 x):	2 g Ponceau Rot S, 30 g Sulfosalizylsäure, 60 ml 50 % Trichloressigsäure, ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
Protein-Extraktionspuffer:	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Leupeptin, pH 7,4
RNA-Probenpuffer:	900 µl deionisiertes Formamid, 100 µl 10 x MOPS, 161 µl 37 % Formaldehyd, 20 µl 1 % Bromphenolblau, 20 µl 1 % Xylenolblau, 10 µl 10 µg/µl EtBr, Lagerung lichtgesch. 4°C
4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS pH 6,8
2 x SDS-Probenpuffer:	8 ml Glycerin, 4 ml β-Mercaptoethanol, 12 ml 20 % SDS, 16 ml Sammelgelpuffer
SSC (20 x):	3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
SSPE (20 x):	2,98 M NaCl, 0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM EDTA, pH 7,4
1 x TBE:	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA
1 x TBS:	0,8 g NaCl, 0,02 g KCl, 0,3 g Tris, pH 7,4 ad 100 ml dH <sub>2</sub> O
TE-Puffer:	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

4 x Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl, 0,4 % SDS, pH 8,8
Vorperfusionspuffer:	8,3 g NaCl, 0,5 g KCl, 2,38 g HEPES pH 7,4 ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O. Die Zugabe von 1000 I.E. Heparin pro 100 ml Puffer erfolgte unmittelbar vor Perfusionsbeginn
Western-Transferpuffer:	25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10 % MeOH, pH 8,3

### 2.2.5 Molekulargewichtsstandards

200 bp DNA-Leiter :	10000/ 8000/ 6000/ 5000/ 4000/ 3000/ 2500/ 2000/ 1500/ 1000/ 800/ 600/ 400/ 200 bp (Eurogentec)
λ (EcoRI/Hind III):	~22.000/ 5.148/ 4.973/ 4.277/ 3.530/ 2.027/ 1.904/ 1.584/ 1.330/ 983/ 831/ 564/ 128 bp (Gibco BRL)
Rainbow Protein-Marker:	45/ 30/ 20,1/14,3 /6,5/ 3,5/ 2,5 kD (Amersham)

### 2.2.6 Synthetische Primer

TNF-α 5' Primer:	5' TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C 3'
TNF-α 3' Primer:	5' CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC 3'
GAPDH 5' Primer:	5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3'
GAPDH 3' Primer:	5' TTC ACC ACC CTG TTG CTG TA 3'
bcl-2 5' Primer:	5' CAC CCC TGG CAT CTT CTC CTT C 3'
bcl-2 3' Primer:	5' CAC AAT CCT CCC CCA GTT CAC C 3'
bax 5' Primer:	5' CCA AGA AGC TGA GCG AGT GTC TC 3'
bax 3' Primer:	5' AGT TGC CGT CTG CAA ACA TGT CA 3'
p53 5' Primer:	5' GTG GCC TCT GTC ATC TTC CG 3'
p53 3' Primer:	5' CCG TCA CCA TCA GAG CAA CG 3'
MnSOD 5' Primer:	5' GGA TCC ACG TGA ACA ATC TGA ACG TCA CC 3'
MnSOD 3' Primer:	5' AAG CTT AGT AAG CGT GCT CCC ACA CAT C 3'
GPx 5' Primer:	5' ATG TCT GCT GCT CGG CTC TC 3'
GPx 3' Primer:	5' GTT GCT AGG CTG CTT GGA CAG 3'
TNF-R1 5' Primer:	5' GCT CCT GGC TCT GCT GAT 3'
TNF-R1 3' Primer:	5' AAC ATT TCT TTC CGA CAT 3'
TNF-R2 5' Primer:	5' GAT GAG AAA TCC CAG GGA TGC AGT AGG 3'
TNF-R2 3' Primer:	5' TGC TAC AGA CGT TCA CGA TGC AGG 3'
18S-Oligonukleotid:	5' GCC GTG CGT ACT TAG ACA TGC ATG 3'

Alle synthetisierten Primer stammen von folgenden Firmen: Appligene, Interactiva, MWG Biotech. Die GPx-Primer wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Abel, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf synthetisiert.

### 2.2.7 Antikörper

MnSOD-Antikörper, polyklonal Kaninchen (Upstate Biotechnology)  
Goat-Anti-Rabbit IgG, HRP Konjugat (Southern Biotechnology Ass.)

### 2.2.8 Enzyme

Restriktionsendonukleasen des Types II (MBI Fermentas GmbH):  
*Bam HI, Hind III, Sma I, Kpn I, Spe I, Dde I, Nsi I, Ssp I, Eco RI, Pst I, Xho I*

Polymerasen: Klenow-Polymerase (Boehringer), M-MLV-Reverse Transkriptase (Promega), Taq-Polymerase (Promega)

sonstige Enzyme: T4-Polynucleotid-Kinase und alkalische Phosphatase (Boehringer), T4 DNA-Ligase und RNase-Inhibitor (MBI Fermentas), RNase A [10 mg/ml] und Proteinase K [25 mg/ml] (Sigma), DNase I (Gibco BRL), Collagenase H [172 U/mg] (Seromed/Biochrom KG), Pronase E aus *Streptomyces griseus* (Merck)

### 2.2.9 Radioaktivität

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP spez. Aktivität 111 TBq mmol<sup>-1</sup>, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP spez. Aktivität 111 TBq mmol<sup>-1</sup>, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP Aktivität 38 MBq mmol<sup>-1</sup> (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig)

### 2.2.10 Chemikalien

Actinomycin D	(ICN)
Adriamycin 10mg/5ml	(Pharmacia)
Agarose	(Eurogentec)
Aprotinin	(Boehringer)
Bacto-Agar	(Difco/Norwald)
Bacto-Hefeextrakt	(Difco/Norwald)
Bacto-Trypton	(Difco/Norwald)
Bromphenolblau	(Merck)
Casein	(Sigma)
Collagen Typ VII (aus Rattenschwanz)	(Sigma)
Diethylpyrocarbonat	(Sigma)
DMSO	(Sigma)
ECL-Chemilumineszenz-Kit	(Boehringer)
Ethidiumbromid	(Gibco BRL)
Ficoll 400	(Merck)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	(Merck)
Heparin-Natrium 250000 IE	(Ratiopharm)
Ionenaustauscherharz AG 501-X8 Resin	(Bio-Rad)
Leupeptin	(Boehringer)
Luciferase Assay System	(Promega)
Neutralrot	(Sigma)
Paraquat	(Sigma)
Pentobarbital (Nembutal <sup>®</sup> )	(Sanofi Ceva)
Percoll	(Pharmacia)
PMSF	(Sigma)
Polyvinylpyrrolidon	(Merck)
Qiagen Plasmid Kit	(Qiagen)
Qiagen Gel Extraktionskit	(Qiagen)
Random Primed DNA Labeling Kit	(Boehringer)
Tris-Base	(Sigma)
Triton X 100	(Sigma)

Trizol <sup>®</sup> Reagent	(Gibco BRL)
Trypanblau	(Sigma)
Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (rekombinant Ratte)	(R&D Systems)
p-Xylenolblau	(Merck)

### 2.2.11 Geräte

Brutschrank	IG 150 (Jouan)
Biolumat	Berthold Multi-Biolumat LB 9505 C
ELISA-Reader	Tecan SLT
Geldokumentationsanlage	Gel-Doc 2000 (Bio-Rad)
Handmonitor	LB 1210 B (Berthold)
HPLC	HPLC 360 Autosampler, HPLC 332 Detector SFM 25 Spectrofluorometer (Kontron Instruments)
Mikroskop	Axiovert 100 (Zeiss)
Photometer	Lambda-12 UV/Vis Spectrometer (Perkin Elmer)
Szintillationszähler	Liquid Scintillation Analyzer 1600 TR (Packard)
Thermocycler	Gene Amp PCR System (Perkin Elmer) T-Personal PCR System (Biometra)

### 2.2.12 Sonstige Materialien

Braunüle	G18 (B. Braun)
Zellzählkammer	Fuchs-Rosenthal (Brand)
Gaze	fein und grob (Nytal)
HPLC-Säule	NovaPak <sup>®</sup> C <sub>18</sub> -Säule 3,9 x 150 mm (Millipore)
Hybridisierungsmembran	Hybond-N (Amersham Life Science)
Membranfilter	Porengröße 0,22 $\mu$ m und 0,45 $\mu$ m (Santorius)
Röntgenfilme	X-OMAT AR (Kodak)
Westernmembran	PVDF (Boehringer)
Proteinfilm	Hyperfilm (Amersham)
Verstärkerfolien	Appligene
Phospho-Imager-Screen	BAS-MS 2025 (Raytest)

### 2.2.13 Computerhardware und –software

Geldokumentationsanlage GelDoc 2000, Quantity One 4.1.0 (Bio-Rad)  
 PC-Clone Scientific & Educational Software, Clone 4, Clone Manager Vers. 4.0  
 Word, Excel, Powerpoint, Photo Editor (Microsoft Corporation Version 2000)  
 Image Reader 1.4E, Image Gauge 3.01, Array Analyse Software Aida (Raytest)  
 PC Integration Pack Vers. 3.92, Statistica Version 5.0, StataSoft Inc.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Hepatozytenpräparation

Die Primärhepatozyten wurden aus männlichen *Wistar*-Ratten (250 bis 300 g) nach einer modifizierten Methode von Lindl und Mitarbeitern, 1989 isoliert. Die Tiere wurden intraperitoneal mit Pentobarbital (120 mg/kg Lebendgewicht) anästhetisiert. Brust- und Bauchhöhle wurden ventral eröffnet und um die freigelegte *Vena portae* zwei lose Ligaturen gelegt. In die *Vena portae* wurde eine Braunüle mit angeschlossenem Perfusions Schlauch eingeführt. Die Ligaturen wurden zur Sicherung der Braunüle festgezogen. Die Perfusion mit Vorperfusionsspuffer wurde sofort begonnen und bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 20 ml/min für 10 min fortgesetzt. Während der gesamten Perfusionszeit wurden alle Perfusionslösungen mit Carbogen begast. Zum Abfluss der Perfusionslösung wurde die *Vena cava inferior* durchtrennt. Die Vorperfusion diente dem Entfernen des Blutes aus der Leber. Im Anschluß an die Vorperfusion wurde die Perfusion mit Collagenasepuffer bei gleicher Durchflussgeschwindigkeit fortgeführt. Die Leber wurde aus dem Tier entnommen, die Leberkapsel mechanisch zerstört und die Leberzellen in Williams Medium E suspendiert. Diese Zellsuspension wurde durch eine feine Gaze filtriert und anschließend zur Abtrennung der Hepatozyten für 5 min bei 50 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Williams Medium E resuspendiert und erneut für 3 min bei 50 x g zentrifugiert. Nach Wiederholung des letzten Schrittes wurden die lebenden von den toten Zellen über einen Percoll-Gradienten getrennt (Innes *et al.*, 1988). Dafür wurde das Zell-Pellet mit Williams Medium E auf ein Volumen von 16,5 ml eigestellt und zu einer gemischten Lösung aus 28,7 ml Percoll und 4,3 ml 10 x PBS gegeben. Die Trennung erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 1000 x g. Das Pellet mit den lebenden Zellen wurde in Williams Medium E (+ 0,5 % ITS<sup>+</sup>-Premix) aufgenommen. Die Viabilität der isolierten Hepatozyten wurde durch Färbung mit einer 0,2 %igen Trypanblau-Lösung (in PBS) überprüft. Nach der Präparation waren ca. 90-95 % der Hepatozyten viabel. Die Hepatozytensuspension wurde auf eine Konzentration von  $0,67 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellt. Die Ausbeute an Hepatozyten lag zwischen  $100 \times 10^6$  und  $200 \times 10^6$  Zellen. Es wurden  $5 \times 10^6$  Zellen pro collagenisierter Petrischale ausgesät. Die Präparation der Hepatozyten wurde von Frau Dipl.-Biol. El-Bahay durchgeführt.

### 2.3.2 Zellkultur

a) H4IIE Zellen wurden in einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Als Kulturgefäße wurden Kulturflaschen (25 und 75 cm<sup>2</sup>), 6- und 96-Well-Platten verwendet. Das verwendete Kulturmedium (DMEM High Glucose) enthielt 10 % hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Es wurde alle 4 Tage gewechselt. Dabei wurden vor jedem Mediumwechsel die Kulturen lichtmikroskopisch auf mögliche Kontaminationen untersucht. Die Kulturgefäße mit den H4IIE Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Subkultivierung der H4IIE Zellen nach Erreichen der Konfluenz erfolgte mit Trypsin-EDTA-Lösung. Die Zellen wurden einmal mit Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> freiem Phosphatpuffer gewaschen. Der Puffer wurde abgenommen und 1 ml 1 x Trypsin-EDTA-Lösung pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 3-4 min bei 37°C im Inkubator. Durch Zugabe von 10 ml DMEM-Medium mit 10 % FCS wurde die

Aktivität der Trypsin-EDTA-Lösung gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Röhrchen überführt und bei 560 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in DMEM Medium resuspendiert, die Zellzahl im Hämocytometer bestimmt und die Zellen in neue Kulturgefäße ausgesät.

b) L929 Zellen wurden in einer Dichte von  $1,25 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Als Kulturgefäße wurden Kulturflaschen (25 und 75 cm<sup>2</sup>) und 96-Well-Platten verwendet. Das Kulturmedium (DMEM High Glucose) der Zellen enthielt 10 % hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Es wurde alle 3 Tage gewechselt. Dabei wurden vor jedem Mediumwechsel die Kulturen lichtmikroskopisch auf mögliche Kontaminationen untersucht. Die Kulturgefäße mit den L929 Zellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre inkubiert. Die Subkultivierung der L929 Zellen nach Erreichen der Konfluenz erfolgte mit Trypsin-EDTA-Lösung wie oben beschrieben.

### **2.3.3 Inkubation und Schädigung der Zellen**

Das Wachstumsmedium (DMEM High Glucose) der Zellen enthielt 10 % hitzeinaktiviertes FCS, Penicillin (100 Units/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Inkubation der Zellkulturen erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre in einem Begasungsbrutschrank. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml auf 6 Wells ausplattiert. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium und Noxe ersetzt. Die Zellen wurden für weitere 24 h inkubiert und dann für die weiteren Versuche aufgearbeitet.

### **2.3.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml mit DMEM-Medium eingestellt. Jeweils 0,5 ml dieser Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen vorgelegt und mit 0,6 ml kaltem Einfriermedium (6,2 ml DMEM-Medium + 1 ml DMSO) aufgefüllt. Die Kryoröhrchen wurden erst 2 h bei -20°C und anschließend bei -80°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurde das Kryoröhrchen zwischen den Handflächen gerieben, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Dann wurde die Zellsuspension in eine T75 Kulturflasche mit 15 ml DMEM Medium überführt. Nach 24 h wurde das DMSO-haltige Medium verworfen und durch neues Medium ersetzt.

### **2.3.5 MTT-Test**

Dieser Test basiert auf der Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch mitochondriale Dehydrogenasen in ein blaues Formazan-Salz, dessen Absorptionsmaximum bei 560 nm liegt. Durch photometrische Messung bei 560 nm erhält man eine Aussage über die metabolische Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und somit indirekt auch über die Proliferation der Zellen. Der MTT-Test wurde hier als Proliferationstest nach einer modifizierten Methode von Mosmann, 1983 durchgeführt. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen 2 x mit PBS gewaschen. Anschließend wurde ausgehend von einer 5 x MTT Lösung eine MTT-Gebrauchslösung (0,7 mg/ml in DMEM-Medium

ohne FCS) hergestellt, auf die Zellen pipettiert und für 30 min im Brutschrank inkubiert. Die MTT-Lösung wurde abgesaugt, und die Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen. Das in den Zellen gebildete blaue Formazan-Salz wurde durch Isopropanol/Ameisensäure (95:5) herausgelöst. Die Farbintensität der Lösung wurde im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen.

### 2.3.6 Neutralrot-Test

Zur Bestimmung der Zellviabilität wurde der Neutralrot-Test verwendet (Borenfreund und Puerner, 1986). Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der von lebenden Zellen aufgenommen und intrazellulär angereichert wird. Zur Durchführung des Neutralrot-Tests wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch eine Neutralrot-Gebrauchslösung (50 µg/ml in DMEM-Medium) ersetzt. Nach 2-3 h Inkubation mit dem Farbstoff wurde die Neutralrot-Gebrauchslösung abgesaugt und die Zellen mit Fixierlösung (1 % Formaldehyd, 1 % CaCl<sub>2</sub> in dH<sub>2</sub>O) fixiert. Anschließend wurden die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Das in den lebenden Zellen angereicherte Neutralrot wurde durch Extraktionslösung (50 % EtOH, 1 % Essigsäure) herausgelöst. Nach 30 min wurde die Farbintensität der Lösung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

### 2.3.7 Bestimmung der Lipidperoxidation durch MDA-Messung

Als Maß für die Lipidperoxidation wurde das Abbauprodukt Malondialdehyd (MDA) im Kulturüberstand der Zellen bestimmt. MDA wurde nach einer Reaktion mit Thiobarbitursäure (TBS) als TBS-MDA-Komplex mittels HPLC und anschließender Fluoreszenzdetektion nachgewiesen (modifiziert nach Draper *et al.*, 1993). Die Zellüberstände wurden nach Behandlung mit verschiedenen Noxen für 30 min bei 4°C mit 2580 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Durchführung der MDA-Bestimmung bei -20°C gelagert. Zur Bildung des TBS-MDA-Komplexes wurden jeweils 0,5 ml Zellüberstand mit 1,05 ml einer 25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösung pH 2,7, 0,5 ml einer gesättigten Thiobarbitursäure und 20 µl einer 0,2 %igen Butylhydroxytoluol-Lösung (in Methanol) gemischt und für 30 min bei 93°C inkubiert. Die Proben wurden dann 10 min auf Eis gestellt und anschließend 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. 20 µl dieser Probe wurde mittels HPLC bei einer Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase (20 % Acetonitril, 0,6 % Tetrahydrofuran in 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,7) von 0,5 ml/min aufgetrennt. Der TBS-MDA-Komplex hatte eine Retentionszeit von 3,1-3,2 min und wurde durch einen Fluoreszenz-Detektor (Excitation 532 nm, Emission 553 nm) identifiziert und quantifiziert. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve von Tetraethoxypropan. Zur Datenaufnahme und -auswertung wurde das Computerprogramm PC Integration Pack Version 3.92 verwendet. Die Aufarbeitung der Proben und der Nachweis von MDA wurden von Frau Dr. Tran-Thi durchgeführt.

### 2.3.8 TNF-α ELISA

Das von den Zellen produzierte TNF-α wurde mit Hilfe eines Ratten TNF-α ELISA's (Endogen) quantifiziert. Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers mit Zellüberständen durchgeführt.

### 2.3.9 TNF- $\alpha$ Bioassay

Die TNF- $\alpha$  Bioaktivität wurde mit Hilfe der TNF- $\alpha$  sensitiven Maus-Fibroblasten Zelllinie L929 bestimmt (modifiziert nach Branch *et al.*, 1991). Dabei diente rekombinantes Ratten TNF- $\alpha$  als Standard. Die L929 Zellen wurden mit einer Konzentration von  $4 \times 10^4$  Zellen pro Well auf 96-Well-Platten ausgesät und für 24 h inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die zu testenden Zellüberstände und Actinomycin D [ $1 \mu\text{g/ml}$ ] auf die L929 Zellen gegeben. Es folgte eine weitere Inkubation für 24 h mit einem sich anschließenden Neutralrot-Test. Rekombinantes Ratten TNF- $\alpha$  diente als Positivkontrolle und ermöglichte die quantitative Bestimmung der TNF- $\alpha$  Konzentration in den Zellüberständen.

### 2.3.10 Transfektion

Für die stabile Transfektion der H4IIE Zellen mit TNF- $\alpha$  wurden folgende Transfektionsreagenzien benutzt: DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz (Boehringer), SuperFect Transfektionsreagenz (Qiagen), Effectene Transfektionsreagenz (Qiagen), DAC-30 Liposomales Transfektionsreagenz (Eurogentec). Für die Transfektionsexperimente wurden  $0,5\text{-}2 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt. Die Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem Transfektionsreagenz gemischt und auf die Zellen pipettiert. Je nach Transfektionsreagenz erfolgte ein Mediumwechsel nach 4 h bzw. 24 h. Die Zellen wurden nach weiteren 48 h 1:5 auf Petrischalen geteilt und mit Antibiotika behandelt, um stabil transfizierte Zellen zu selektionieren. Zusätzlich wurden Transfektionsexperimente nach der Calciumphosphat Methode durchgeführt. Dazu wurden  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well ausplattiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch 2 ml frisches Medium ersetzt.  $4 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA,  $12,4 \mu\text{l}$  2M  $\text{CaCl}_2$ ,  $96 \mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$  wurden gemischt und zu  $100 \mu\text{l}$  2 x HBS Transfektionspuffer zugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei RT wurde die präzipitierte DNA auf die Zellen pipettiert und für weitere 5 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium komplett entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und  $0,5 \text{ ml}$  Glycerin-Schock-Lösung für 2 min auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden noch einmal mit 2 ml Medium gewaschen, 2 ml frisches Medium wurde zugegeben und die Zellen wurden für weitere 24-48 h inkubiert. Die Zellen wurden danach entweder für weitere Versuche aufgearbeitet (Luciferase Assay) oder mit Antibiotika behandelt, um stabil transfizierte Zellen zu selektionieren.

### 2.3.11 Luciferase Assay

24-48 h nach Transfektion der H4IIE Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml 1 x PBS gewaschen. Es wurden  $250 \mu\text{l}$  1 x Lysis Reagenz (Promega) auf die Zellen gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Das Lysat wurde komplett abgenommen und 1 min bei  $12000 \times g$  zentrifugiert.  $100 \mu\text{l}$  Luciferase Assay Substrat (Promega) und  $20 \mu\text{l}$  Probe wurden gemischt und die Lumineszenz in einem Biolumaten für 2 min gemessen.

### 2.3.12 Messung der Katalase Enzymaktivität

Katalase ist ein antioxidatives Enzym, welches den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert. Diese Reaktion kann man mit Hilfe eines Photometers verfolgen (modifiziert nach Claiborne *et al.*, 1979). Für die Enzymmessung wurden die Zellen in einem 50 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (+ 0,5 mM PMSF) aufgenommen, 30 sec auf Eis sonifiziert und 30 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde nach Bradford, 1976 ermittelt und die Proben auf eine Konzentration von 150 µg/ml Protein eingestellt.

	Endkonzentration	Probengemisch	
Protein	150 µg/ml	X µl	
Phosphatpuffer	50 mM	Y µl	
EtOH	0,17 M	3 µl	30 min auf Eis
Triton X 100	1 %	30 µl	10 min auf Eis
<b>Summe</b>		<b>300 µl</b>	

Für die Messung wurden 920 µl Reaktionspuffer (19 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Phosphatpuffer pH 7,0) und 80 µl des Probengemisches in eine Quarzküvette pipettiert und die Extinktionsänderung bei 240 nm über 1 min gemessen. Die Werte wurden nach folgender Formel in Units/mg Protein umgerechnet:

$$\text{Units / mg} = \frac{\Delta A_{240\text{nm}} \times 1000}{43,6 \times \frac{\text{mg Protein}}{\text{ml Reaktionsmix}}}$$

wobei 43,6 dem molaren Extinktionskoeffizienten von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entspricht.

### 2.3.13 Bakterien

#### 2.3.13.1 Herstellung kompetenter Zellen

[modifiziert nach Nishimura *et al.*, 1990]

Eine Kolonie des gewünschten Bakterienstammes wird in einer 5 ml Übernacht-Kultur bei 37°C unter Schütteln angezogen. 0,5 ml dieser Vorkultur werden in 50 ml angereichertes LB-Medium (+10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 % Glucose) überführt. Die Anzucht dieser Kultur erfolgt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 erreicht ist. Die Kultur wird 10 min auf Eis gehalten und dann für 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird auf Eis vorsichtig in 500 µl kaltem (4°C) angereichertem LB-Medium resuspendiert. Anschließend werden 2,5 ml kalter (4°C) Nishimura-Puffer zugegeben und vorsichtig vermischt. Die kompetenten Zellen werden in 100 µl Aliquots bei -70°C gelagert. Wichtig ist, daß die Zellen in allen Stadien der Präparation kühl gehalten werden und vorsichtig behandelt werden.

#### 2.3.13.2 Isolation von Plasmid-DNA

a.) Alkalische Lyse

[modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979]

Übernachtskulturen von 3-5 ml werden für 5 Minuten auf Eis gehalten und dann für 5 min bei 1000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Bakterienpellet in

100 µl Glucose-Mix resuspendiert. Zu den osmotisch geschockten Zellen werden 200 µl einer frisch angesetzten NaOH-SDS-Lösung pipettiert und vorsichtig vermisch. Nach 5 Minuten Inkubation bei RT wird die Denaturierung durch Zugabe von 150 µl Acetat-Mix gestoppt. Es folgt eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Durch die Denaturierung und die schnelle Renaturierung fällt die chromosomale Bakterien-DNA als Netzwerk aus, während die kleinen Plasmide renaturieren können. Nach der Zentrifugation befindet sich die Plasmid-DNA im Überstand. Der plasmidhaltige Überstand wird mit 1 Volumen Phenol und dann mit 1 Volumen Chloroform extrahiert (Zentrifugation: 2 min, 15000 x g, RT). Die Plasmid-DNA wird mit 2,5 Volumen eiskaltem 96 % Ethanol für mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt. Die Pelletierung der DNA erfolgt durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 15000 x g und 4°C. Das DNA-Pellet wird mit 0,5 ml eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen und für 15 Minuten bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 20-50 µl TE-Puffer oder dH<sub>2</sub>O resuspendiert. Es empfiehlt sich eine Behandlung mit RNase A [Endkonzentration 100 µg/ml] für 20 Minuten bei 37°C.

#### b) Plasmid-Präparations-Kits (Qiagen)

Die Durchführung von Mini- oder Midi-Plasmid-Präparationen mit „Plasmid-Präparations-Kits“ erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die Verwendung der Säulen führt zur Gewinnung sehr reiner Plasmid-DNA.

### 2.3.14 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Messungen erfolgen in einem Lambda 12 UV/Vis Spektrometer (Perkin Elmer) in Quarzküvetten bei 260 nm. Die Konzentration wurde auf Grundlage folgender Werte ermittelt:

für DNA:	1 OD = 50 µg/ml DNA
für RNA:	1 OD = 40 µg/ml RNA
für Oligonukleotide:	1 OD = 20 µg/ml Oligonukleotide

Das Verhältnis der Absorptionen bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 280$  nm kann als Maß für die Reinheit der DNA bzw. RNA benutzt werden. Bei reiner DNA bzw. RNA liegt dieses Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0.

### 2.3.15 Kombinierte DNA und RNA Isolation mit Trizol®

Diese Methode erlaubt die gleichzeitige Isolation von DNA, RNA und Proteinen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trizol / 6 Well versetzt und durch wiederholtes Pipettieren lysiert. Die RNA-Isolation erfolgte durch Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Der Ansatz wurde 15 Sekunden kräftig geschüttelt und 3 Minuten bei RT inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei RT gefällt. Die RNA wurde durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 75 % EtOH gewaschen (5 min, 10000 rpm und 4°C) und 10 Minuten getrocknet. Die RNA wurde in 50 µl dH<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> aufgenommen und 10 Minuten bei 60°C hitzedenaturiert. Um eventuell vorhandene Kontaminationen mit genomischer DNA vollständig zu entfernen, wurde die RNA zusätzlich mit DNase I behandelt. Hierzu wurden:

1 µg RNA
1 µl 10 x DNase-Puffer
1 µl DNase I [1U/µl]
x µl dH <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
10 µl

für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die DNase I wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Für die DNA-Isolation wurde die DNA aus der unteren organischen Phase und der Interphase, die sich bei der Chloroform-Extraktion ergeben, durch Präzipitation mit 0,3 ml 96 % EtOH erhalten. Nach Inkubation für 3 Minuten bei RT wurde die DNA für 5 Minuten bei 5200 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde 30 Minuten mit 1 ml Na-Citrat 0,1 M inkubiert (5 min, 5200 rpm und 4°C). Anschließend wurde das Pellet mit 1 ml 75 % EtOH gewaschen (5 min, 5200 rpm und 4°C) und mit 50 µl 8 mM NaOH vorsichtig resuspendiert. Es folgte eine letzte Zentrifugation, um den unlösliche Zellschrott zu pelletieren (10 min, 13000 rpm, 4°C). Der pH der DNA-Lösung wurde durch Zugabe von 0,1 M HEPES (66 µl 0,1 M HEPES/ml DNA-Lösung) eingestellt.

## 2.3.16 Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

### 2.3.16.1 Agarosegele

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-2 %ige Agarosegele in 1 x TBE-Puffer unter Zusatz von Ethidiumbromid [0,5 mg/ml] in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml verwendet. Nach dem Aufkochen der Agarose-Lösung wurde sie handwarm in einen Gelschlitten gegossen. Das erstarrte Gel wurde in eine Gelkammer gelegt und mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Blaumarker versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 5 V/cm. Die Visualisierung der aufgetrennten Fragmente erfolgte auf einer UV-Leuchtplatte oder mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage.

### 2.3.16.2 Denaturierende Gele zur Auftrennung von RNA

RNA oder einzelsträngige DNA werden durch Chemikalien (z. B. NaOH, Formaldehyd) oder durch Hitze denaturiert, so dass eine korrekte Molekulargewichtsbestimmung aufgrund eines konstanten Masse:Ladungs-Verhältnisses und einer hydrodynamisch äquivalenten Konformation möglich wird. Es wurden 1,5 %ige Agarosegele mit MOPS-Puffer und Formaldehyd verwendet. Für 200 ml Agarose-Lösung wurden 146,6 ml dH<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> und 20 ml 10 x MOPS mit 3 g Agarose versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht, unter Rühren wurden 33,4 ml 37 %iges Formaldehyd zugegeben und sofort gegossen. Die Proben [5-10 µg RNA] wurden mit 2-3 Volumen RNA-Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 65°C denaturiert, sofort auf Eis gestellt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x MOPS-Puffer bei 100 V, bis die untere Front des Blaumarkers 75 % der Gelstrecke durchlaufen hat oder üN bei 20 V.

### 2.3.17 Isolation von DNA aus Agarosegelen über Elutions-Kits

Die Geelution von DNA erfolgte mit Hilfe von Elutions-Kits (Qiagen), wobei nach den Angaben der Herstellerprotokolle gearbeitet wurde. Die Kits basieren auf die Bindung der DNA an eine Säulenmatrix.

### 2.3.18 Transfer von RNA auf Nylon-Membran (Northern-Blot)

Das denaturierende Agarose-Gel mit der RNA wurde 5 Minuten in dH<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 10 Minuten in 10 x SSC geschwenkt. Es folgte ein Kapillartransfer der RNA auf eine trocken aufgelegte Nylon-Membran (Hybond N, Amersham) mit 20 x SSC als Transferpuffer. Nach einer Transferzeit von ca. 12-16 Stunden wurde die Membran mindestens 30 Minuten an der Luft getrocknet. Die RNA wurde durch 30-minütiges Backen bei 80°C oder durch 3-minütige Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) auf der Membran fixiert.

### 2.3.19 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Zur Hybridisierung der RNA auf Nylonmembran wurden DNA-Sonden und eine 18S-Oligonukleotid-Sonde verwendet. Die radioaktive Markierung dieser Sonden erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden, die im Folgenden beschrieben sind:

#### a.) Random Priming [modifiziert nach Feinberg und Vogelstein, 1983]

Bei dieser Methode wird ein radioaktiv markierter DNA-Zweitstrang mit Hilfe der Klenow-Polymerase synthetisiert. Als Synthesestartpunkt benötigt das Enzym freie 3'-OH-Enden, die von Oligonukleotid-Primern (Hexanukleotiden) geliefert werden. Die Hexanukleotide, bei denen es sich um eine Mischung von Oligonukleotiden mit zufälliger Basenfolge handelt („*random primer*“), hybridisieren an die vorgegebene denaturierte DNA und bilden somit viele Startpunkte für die Zweitstrangsynthese. Bei der Synthese werden radioaktive Nukleotide ( $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ) eingebaut, so dass ein radioaktiv markierter Zweitstrang entsteht. In der vorliegenden Arbeit wurde die radioaktive Markierung der DNA-Sonden für die mRNAs von MnSOD und Katalase mit Hilfe des Random Primed Labeling Kits (Boehringer) durchgeführt. Das zu markierende DNA-Fragment (50 ng) wurde zunächst für 10 Minuten bei 100°C denaturiert, dann sofort auf Eis gestellt und anschließend nach Angaben des Firmenprotokolls mit 50  $\mu\text{Ci}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  markiert.

#### b.) Radioaktive Markierung der 18S-Oligonukleotid-Sonde

Zur radioaktiven Markierung der 18S-Oligonukleotid-Sonde wurde auf das 5'-OH-Ende der 18S-Sonde ein radioaktiv markierter Phosphatrest übertragen. Dies geschieht mit Hilfe der T4-Polynukleotid-Kinase, die den Transfer von endständigen Phosphatgruppen auf hydroxylierte 5'-RNA oder DNA-Enden katalysiert. Dazu wurden 1  $\mu\text{l}$  18S-Oligonukleotid [23,6  $\mu\text{M}$ ], 60  $\mu\text{Ci}$  Adenosin-5'- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{triphosphat}$  und 10 U T4-Polynukleotidkinase bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Zum Abbruch der Reaktion wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt.

### 2.3.20 Hybridisierung filtergebundener RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

[modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989]

Bei der Hybridisierung filtergebundener RNA (Northern-Blot) wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden verwendet. Der Filter wurde über Nacht bei Hybridisierungstemperatur prähybridisiert, bevor die denaturierte radioaktive DNA-Sonde dazugegeben wurde. Das Volumen der Hybridisierungslösung berechnet sich aus der Größe der Filter. Es wurden 0,2 ml Lösung/cm<sup>2</sup> Filter eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte für 15-20 Stunden bei der gewünschten Hybridisierungstemperatur. Für einen Northern-Blot wurden ca. 5 ml Hybridisierungslösung mit der denaturierten DNA-Sonde (5 Minuten kochen und dann 5 Minuten auf Eis abkühlen lassen) eingesetzt. Nach der Hybridisierung kann die Hybridisierungslösung aufgefangen und bei -20°C gelagert werden. Für eine erneute Hybridisierung wurde diese Sonde 15 Minuten denaturiert und auf Eis abgekühlt. Zur Entfernung von unspezifisch gebundener DNA wurde der Filter mit etwas Waschlösung I bei RT abgespült und mit frischer Waschlösung I für 15-30 Minuten bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Anschließend wurde mit Waschlösung II für 15-30 Minuten bei Hybridisierungstemperatur inkubiert (für Northern-Blots normalerweise ausreichend). Unter fortwährender Kontrolle mit dem Geiger-Müller Zählrohr wird so lange unter zunehmender Stringenz gewaschen, bis nur noch spezifische Bindungen zu detektieren sind.

Waschlösung I: 2 x SSC; 0,1 % SDS      Waschlösung II: 1 x SSC; 0,1 % SDS

Waschlösung III: 0,5 x SSC; 0,1 % SDS      Waschlösung IV: 0,1 x SSC; 0,1 % SDS

### 2.3.21 Dehybridisierung von Membranen

Um die auf der Nylonmembran gebundene RNA erneut mit radioaktiv markierten Sonden hybridisieren zu können, wird eine bereits gebundene Sonde mit kochender 0,1 %iger SDS-Lösung unter Schütteln von der Membran abgewaschen. Die noch feuchte Membran kann dann nochmals prähybridisiert und anschließend hybridisiert werden.

### 2.3.22 cDNA Array

Für die cDNA Array Analyse wurde der Atlas Ratten Toxikologie Array II mit 450 cDNAs verwendet (Clontech Laboratories). Die radioaktive Markierung der Sonde, die Hybridisierung und die anschließenden Waschschrte wurden exakt nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Gesamt RNA wurde aus unbehandelten H4IIE und 2-12 Zellen nach der Trizol<sup>®</sup>-Methode isoliert. Nach der DNaseI Behandlung wurde die Integrität der RNA auf einem denaturierenden Formaldehyd-Gel überprüft. Für die anschließende radioaktive RT-Reaktion wurden 2 µg gesamt RNA eingesetzt. Die mit <sup>32</sup>P-ATP markierte Probe wurde über Chroma Spin-200 Säulen (Clontech) aufgereinigt. Die cDNA Array Filter wurden in ExpressHyb Lösung (Clontech) für 30 Minuten bei 68°C prähybridisiert und anschließend mit der <sup>32</sup>P-markierten cDNA-Probe üN bei 68°C hybridisiert. Für die Exposition der gewaschenen Array Filter wurden entweder Röntgenfilme unter Verwendung von „*Intensifying Screens*“ oder „*PhosphoImaging Screens*“ verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Array Analyse Software AIDA (Raytest).

### 2.3.23 Autoradiographie

Die gewaschenen Hybridisierungsfilter mit der gebundenen radioaktiven Sonde wurden feucht in Plastikfolie eingeschlagen und in Entwicklungskassetten gelegt. Die Filter wurden mit Röntgenfilmen (Kodak X-OMAT AR5) unter Verwendung von „*Intensifying Screens*“ bei  $-80^{\circ}\text{C}$  exponiert. Nach einer ausreichenden Expositionsdauer wurden die Röntgenfilme 2 Minuten in Entwickler geschwenkt und für 15 Minuten im Fixierbad fixiert. Die Filme wurden mit  $\text{H}_2\text{O}$  abgespült und getrocknet. Die Schwärzung der Banden wurden densitometrisch ausgewertet.

### 2.3.24 Densitometrische Auswertung von Agarosegelen und Autoradiographien

Die densitometrische Auswertung der Autoradiographien und der Agarosegele erfolgte mit Hilfe der Geldokumentationsanlage Gel-Doc 2000 der Firma Bio-Rad in Verbindung mit der Auswertesoftware Quantity One 4.1.0.

### 2.3.25 Sequenzierung von DNA

Die enzymatische DNA-Sequenzierung erfolgte nach Sanger *et al.*, 1977 nicht radioaktiv mittels eines automatischen Sequenzierers (ALF, Pharmacia).

### 2.3.26 „*Polymerase Chain Reaction*“ (PCR)

Die PCR ist eine zyklische Reaktion, bei deren Ablauf, ausgehend von einer denaturierten DNA-Matrize unter Bindung von Primern und Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges, spezifische DNA-Bereiche amplifiziert werden (Mullis und Faloona, 1992). Das dazu verwendete Enzym ist die Taq-Polymerase, die aus *Thermophilus aquaticus* gewonnen wird und fast ohne Funktionsverlust Denaturierungstemperaturen von  $90-95^{\circ}\text{C}$  übersteht. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller (Promega) mitgelieferte Puffer verwendet. Neben der Konzentration der  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen ist der pH-Wert, der bei Temperatursteigerung sauer wird, und die Anwesenheit von  $\text{K}^{+}$ -Ionen für die Funktion des Enzymes von Bedeutung. Die Spezifität der Primerbindung an die DNA-Matrize ist von der Temperatur, dem GC-Basengehalt und der Anzahl der Basen des Primers abhängig. Primer sollten möglichst 20 Basen lang sein und einen GC-Anteil von 50 % haben. Mit Hilfe einer „Faustformel“ kann die spezifische Annealing-Temperatur eines Primers an der DNA-Matrize abgeschätzt werden.

„Faustformel“ für die Berechnung der Primer-Annealing-Temperatur:

$$T_M (^{\circ}\text{C}) = 2 \times (\text{A} + \text{T}) + 4 \times (\text{G} + \text{C})$$

Die Neusynthese der DNA-Stränge durch die Taq-Polymerase erfolgt bei  $72^{\circ}\text{C}$ . Bei dieser Temperatur hat das Enzym seine optimale Aktivität. Ein typischer PCR-Reaktionsansatz wird nach Folgendem Schema auf Eis zusammenpipettiert:

	Stammlösungen	Endkonzentration	1 x Ansatz
10 x Puffer			2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1 µl
5'-Primer	10 µM	0,4 µM	1 µl
3'-Primer	10 µM	0,4 µM	1 µl
Template		y	1,5 µl
Taq-Polymerase	5 U/µl	1 U/25 µl	0,2 µl
dH <sub>2</sub> O			14,8 µl
<b>Summe</b>			<b>25 µl</b>

Der Ansatz wird für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, dann wird der PCR-Zyklus mit dem Denaturierungsschritt gestartet. Die Temperatur und die Dauer der einzelnen Phasen sind je nach Experiment unterschiedlich. Der Zyklus wird 24-32 mal wiederholt. Die PCR-Bedingungen wurden so gewählt, dass die Amplifikationen im linearen Bereich erfolgten.

### 2.3.27 „Reverse Transcription PCR“ (RT-PCR)

[nach Wille *et al.*, 1992]

Bei der RT-PCR handelt es sich um eine Erweiterung der oben beschriebenen PCR-Reaktion. Bei dieser Form der PCR dient RNA als Matrize und wird in einem ersten Reaktionsschritt durch das Enzym Reverse Transkriptase (Promega) in cDNA umgewandelt. Als Startpunkt für die cDNA-Synthese dient die Bindung eines Oligo(dT)<sub>16</sub>-Primers an das polyadenylierte 3'-Ende des RNA-Strangs. Der RT-PCR Reaktionsansatz wird nach folgendem Schema zusammengestellt:

	Stammlösungen	Endkonzentration	1 x Ansatz
5 x Puffer			5 µl
dNTPs	5 mM	0,2 mM	1 µl
Oligo(dT) <sub>16</sub> Primer	50 µM	2 µM	1 µl
RNase Inhibitor	25 U/µl	25 U	1 µl
Reverse Transkriptase	200 U/µl	200 U	1 µl
dH <sub>2</sub> O			X µl
RNA	1 µg		Y µl
<b>Summe</b>			<b>25 µl</b>

Die Proben wurden zunächst für 5 Minuten bei 22°C und dann für 1 h bei 42°C inkubiert. Durch Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 99°C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet. Nach der cDNA-Synthese wurde mit spezifischen Primern eine PCR-Reaktion, wie unter 2.3.26 beschrieben, angeschlossen.

### 2.3.28 Enzymatische Reaktionen an DNA

a.) Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen des Typs II

Für die Restriktion von DNA gilt, dass 1 µg DNA unter optimalen Bedingungen in 1 h von 1 Unit Enzym bei der benötigten Temperatur (in der Regel 37°C) verdaut wird. Die Restriktion von DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen in den vom Hersteller

(Fermentas) empfohlenen Puffern durchgeführt. Die erfolgreiche Restriktion der DNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Bei Bedarf wurde das DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA wie unter 2.3.17 beschrieben aus dem Gel eluiert.

#### b.) Dephosphorylierung von 5'-Enden

Für Klonierungs- oder Markierungsreaktionen ist es notwendig, die 5' terminalen Enden restringierter DNA durch alkalische Phosphatase zu dephosphorylieren. Gemäß den Angaben des Herstellers wurden 50 pmol 5' terminal phosphorylierte DNA-Fragmente bei 37°C mit 1 Unit Enzym hydrolysiert. Die Reaktion erfolgte direkt im Anschluss an die Restriktion ohne vorherige Aufreinigung, wobei 1 Unit alkalische Phosphatase [1 U/µl] für 1-5 µg Plasmid-DNA für 30 Minuten bei 37°C eingesetzt wurde. Die Reaktion kann durch Zugabe von 0,1 Volumen 0,2 M EDTA und eine Inkubation von 10 Minuten bei 65°C gestoppt werden. Anschließend kann die Aufreinigung der DNA entweder durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion oder durch gelelektrophoretische Auftrennung erfolgen.

### 2.3.29 Ligation von DNA

Bei der Ligation wird ein ausgewähltes DNA-Fragment mit Vektor-DNA verbunden. Die Vektor-DNA wird dafür mit einem Restriktionsenzym geschnitten. Außerdem werden die 5' Enden der Vektor-DNA dephosphoryliert, um während der Ligationsreaktion eine Selbst-Ligation des linearisierten Vektors zu vermeiden. Somit wird eine Phosphodiesterbindung nur zwischen den 3'Hydroxy-Enden des Vektors und dem 5'Phosphat-Ende des zu klonierenden Fragmentes erlaubt. Generell wird zwischen einer Ligation mit überstehenden Enden („*sticky-end*“) und der Ligation von glatten Enden („*blunt-end*“) unterschieden. Der Ligationsansatz enthält 1 µl 10 x Ligase-Puffer, 0,5 µl 10 mM ATP, 1 µl T4-DNA-Ligase (1 U/µl) bei „*sticky-end*“-Ligationen und 5 U/µl bei „*blunt-end*“-Ligationen, 200 ng geschnittene Vektor-DNA, 50 ng DNA-Fragment und dH<sub>2</sub>O ad 10 µl. Die Ligation erfolgt bei 4°C üN oder 4 h bei RT.

### 2.3.30 Transformation

Ein Aliquot (100 µl) kompetenter Zellen wurde auf Eis aufgetaut und sofort mit 5-10 µl des Ligationsansatzes bzw. mit 10-50 ng Plasmid-DNA vorsichtig vermischt. Die Zellen wurden 20 Minuten auf Eis inkubiert und dann für 30-90 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C unterzogen. Nach Zugabe von 900 µl LB-Medium wurden die Zellen unter Schütteln 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurden die Transformanten aus einem Aliquot kompetenter Zellen ausgezählt. Das Verhältnis der Transformanten zu der eingesetzten Plasmid-DNA (in µg) ergibt die Transformationsrate. Die Transformationsrate wird in cfu („*colony forming units*“) pro µg Plasmid-DNA angegeben und sollte bei 10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> cfu/µg liegen.

### 2.3.31 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einem diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht. Durch das diskontinuierliche Puffersystem wird eine hohe Trennschärfe erreicht. Das anionische Detergens SDS hebt die hydrophoben

Wechselwirkungen auf, wodurch eine Dissoziation der Proteine in ihre Untereinheiten stattfindet. Die Proteine erhalten durch SDS eine negative Ladung proportional zum Molekulargewicht. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden vorhandene Disulfidbrücken im Protein reduziert. Das diskontinuierliche SDS-PAGE Gel besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Die Trenngel-Konzentration beträgt 10-15 % und die Sammelgel-Konzentration 3,5-4,5 %. Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet. Die Polymerisation erfolgt bei RT für ca. 1 h. Nach der Polymerisation wird das n-Butanol abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Der „Kamm“ wird luftblasenfrei eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wird das Gel an die Elektrophoresekammer fixiert und mit SDS-Laufpuffer überschichtet. Die Proben (5-50  $\mu$ g Protein/Spur) werden mit 4 x SDS-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgt für 1-2 h bei 150 V.

	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4,5 %
Acrylamidlösung:	2 ml	3 ml	300 $\mu$ l
Trenn-/Sammelgelpuffer:	1,5 ml	1,5 ml	500 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O:	2,5 ml	1,5 ml	1,19 ml
APS 10 %:	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l	12 $\mu$ l
TEMED:	5 $\mu$ l	5 $\mu$ l	2 $\mu$ l

### 2.3.32 Coomassie BBR 250-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die Proteine im PAA-Gel können nach der Elektrophorese mit Coomassie BBR 250 sichtbar gemacht werden. Das Gel wird hierfür 1 h in Fixierer geschwenkt. Anschließend wird das Gel in einer Färbelösung 1-2 h bei RT geschwenkt. Die Entfärbung erfolgt in der Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden. Die Entfärbung dauert einige Stunden. Der Vorgang kann durch Schütteln in einem Wasserbad bei 65°C beschleunigt werden.

### 2.3.33 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Bradford, 1976. Dazu wurden 40  $\mu$ l Probe mit 2 ml Bradford-Farbreagens (1:5 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt) gemischt, 10 Minuten bei RT inkubiert und die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen reines Bradford-Farbreagens im Photometer gemessen. Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer BSA-Eichkurve im Bereich von 0,1 bis 1 mg/ml bestimmt.

### 2.3.34 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western-Blot)

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte nach der „fast semi-dry blotting“ Methode (Kyhse-Andersen, 1984). Das Polyacrylamidgel wurde sofort nach Beendigung der Elektrophorese von den Glasplatten gelöst und der für das Blotting vorgesehene Teil ausgeschnitten. 5 Lagen Blotting-Papier wurden in Western-Transferpuffer getränkt und auf die Anode der Blotting-Apparatur gelegt. Als nächstes wurde die PVDF-Membran kurz in Methanol gelegt und anschließend 2-3 Minuten in Western-Transferpuffer gewaschen. Die so vorbehandelte Membran wurde auf das

Blotting-Papier luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurde das Gel auf die Membran plaziert und weitere 5 Lagen Blotting-Papier aufgelegt. Es wurde eine konstante Stromstärke von  $1 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche für 2 h angelegt.

### **2.3.35 Farbnachweis filtergebundener Proteine**

Die Membranfilter wurden zur Kontrolle der Transfereffektivität mit Ponceau Rot S (Sigma) behandelt, wobei alle Proteine reversibel angefärbt wurden. Anschließend wurde die Membran zur Detektion der Proteinbanden in  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen.

### **2.3.36 Immunologischer Nachweis spezifischer Proteine**

Die PVDF-Membran wurde sofort nach Beendigung des Western-Blots unter leichtem Schütteln bei RT für 1 h in AK-Blockierlösung ( $0,1 \text{ ml/cm}^2$ ) inkubiert. Anschließend wurde der 1. Antikörper zugegeben und die Membran wurde  $\text{üN}$  bei  $4^\circ\text{C}$  unter langsamen Drehen inkubiert. Die Membran wurde  $3 \times 15$  Minuten mit AK-Waschlösung bei RT gewaschen und anschließend mit einem Peroxidase-gekoppelten 2. Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Es folgen 3 Waschschrte zu je 20 Minuten in AK-Waschlösung.

### **2.3.37 Chemilumineszenz-Detektion**

Die Detektion der an die Membran gebundenen Proteine erfolgt mit Hilfe des BM Chemilumineszenz-Systems von Boehringer. Das Detektionssystem beruht darauf, dass ein Peroxidase-gekoppelter 2. Antikörper in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Oxidation von Luminol katalysiert. Es bildet sich ein aktiviertes Intermediat, welches Licht emittiert. Die Detektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei  $25 \mu\text{l}$  Substratgemisch/ $\text{cm}^2$  Membran eingesetzt wurden.

### **2.3.38 DNA-Fragmentationsanalyse**

Die DNA-Fragmentationsanalyse („DNA laddering“) wurde zum Nachweis für einen apoptotischen Zelltod durchgeführt. Die Zellen ( $2 \times 10^6$  Zellen / 6 Well) wurden für 24 h mit verschiedenen Substanzen geschädigt. Anschließend wurden die Zellen mit  $1 \times$  Trypsin abgelöst und in TBS-Puffer gewaschen ( $5 \text{ min } 560 \text{ rpm}$ ). Das Zellpellet wurde in  $1 \text{ ml}$  DNA-Extraktionspuffer vorsichtig resuspendiert und für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  unter leichtem Schütteln inkubiert. Zur Abtrennung der Proteine wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion angeschlossen. Nach der Phasentrennung ( $10 \text{ min } 10000 \text{ g}$ ) wurde die obere wässrige Phase vorsichtig abgenommen und die darin enthaltene DNA mit  $1/10 \text{ Vol } 3\text{M}$  Na-Acetat und  $0,7 \text{ Vol}$  Isopropanol für 1 h bei RT gefällt. Die präzipitierte DNA wurde in  $50 \mu\text{l}$  TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen, quantifiziert und  $5\text{-}10 \mu\text{g}$  auf einem  $1,5 \%$ igen Agarosegel bei  $50 \text{ V}$  für  $3\text{-}4 \text{ h}$  aufgetrennt.

### **2.3.39 Apoptosenachweis mit einem anti-Histon ELISA**

Beim anti-Histon ELISA handelt es sich um einen photometrischen ELISA für die qualitative und quantitative Bestimmung von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten mit Hilfe eines anti-Histon-Biotin Antikörpers (Boehringer). Der ELISA wurde nach Angaben des Herstellers mit Zelllysaten durchgeführt.

### 2.3.40 Statistische Auswertung

Alle Rohdaten wurden mit dem Schnelltest nach David und Mitarbeiter (Sachs, 1993) auf Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Bei diesem statistischen Verfahren wird ein Quotient aus der Spannweite der Daten und der Standardabweichung gebildet. Liegt dieser berechnete Prüfquotient nicht innerhalb der in einer entsprechenden Tabelle angegebenen Signifikanzschranken, muss die Nullhypothese verworfen werden. Dies bedeutet, dass die Zufallsstichproben von der normalverteilten Grundgesamtheit abweichen. Für den Vergleich mehrerer Stichproben bezüglich ihrer Mittelwerte wurde eine Einfachklassifikation der Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem multiplen Vergleich der Mittelwerte durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein statistisches Verfahren, durch welches geprüft wird, ob die Mittelwerte mehrerer Stichproben aus Grundgesamtheiten gezogen wurden, die denselben Mittelwert besitzen. Für einen multiplen Vergleich von Mittelwerten wurde der Fisher's PLSD-Test angewendet.

### 3. Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist nach folgenden Punkten gegliedert: Zuerst werden die verwendeten H4IIE Zellen charakterisiert sowie die Herstellung der TNF- $\alpha$  Expressionskonstrukte und die stabile Transfektion der H4IIE Zellen beschrieben. Anschließend werden Experimente zur Charakterisierung der isolierten Transfektanten gezeigt. Es folgen Untersuchungen zur Auswirkung der TNF- $\alpha$  Überexpression auf die Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress und Apoptoseinduktion.

#### 3.1. Charakterisierung der H4IIE Zellen

Die zu transfizierenden H4IIE Zellen sind Hepatomzellen aus der Ratte. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie, die aus dem Reuber H35 Rattenhepatom von Pitot *et al.*, 1964 isoliert worden ist. H4IIE Zellen sind relativ differenziert und werden als Modellsystem anstelle von primären Hepatozyten der Ratte benutzt. Vor der Durchführung der Transfektionsexperimente sollte festgestellt werden:

- a.) Exprimieren H4IIE Zellen endogen TNF- $\alpha$ ?
- b.) Können H4IIE Zellen klonal wachsen?

Zur Beantwortung der ersten Frage wurde eine RT-PCR mit den in Abbildung 6 dargestellten äußeren TNF-Primern durchgeführt. Es konnte auch nach 35 Zyklen kein Amplifikationsprodukt detektiert werden. Eine anschließend durchgeführte „*nested PCR*“ mit den inneren TNF-Primern zeigte ebenfalls kein Amplifikationsprodukt. Auch der mit Zellüberstand und Zelllysaten durchgeführte TNF-ELISA blieb negativ. Somit lässt sich sagen, dass die H4IIE Zellen kein endogenes TNF- $\alpha$  produzieren.

Die Fähigkeit, klonal wachsen zu können, ist eine essentielle Voraussetzung für die geplanten Transfektionsexperimente. Um die „*colony-forming-efficiency*“ ermitteln zu können, wurden serielle Verdünnungen hergestellt und jeweils 100, 250, 500 oder 1000 Zellen pro 6 Well ausgesät und 12 Tage in Kultur gehalten. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Nach 12 Tagen wurden die 6-Well-Platten auf Kolonien untersucht. Man konnte in allen Verdünnungen Zellhaufen erkennen, wobei die Kolonien ausgehend von 100 Zellen deutlich kleiner waren als in den anderen Vertiefungen. Dies zeigt, dass H4IIE Zellen auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt und in sehr geringer Zelldichte proliferieren können.

## 3.2 Herstellung von TNF- $\alpha$ Expressionskonstrukten

Das Ratten TNF- $\alpha$  Gen wurde von Kwon *et al.*, 1993a charakterisiert. Es besteht aus 4 Exons und 3 Introns. Die Länge der proteinkodierenden Sequenz ergibt eine cDNA von 705 bp. Für die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in die Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE musste zuerst eine TNF- $\alpha$ -cDNA hergestellt, sequenziert und in einen geeigneten eukaryotischen Expressionsvektor kloniert werden. Die folgende Abbildung zeigt die Nukleinsäure-Sequenz der Ratten TNF- $\alpha$ -cDNA (705 bp) und die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz (235 AS).

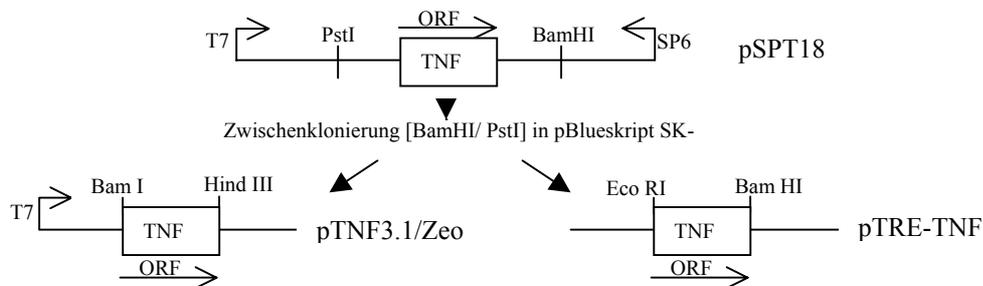
	TNF-Primer I					
1	<b>ATGAGCACAG</b>	<b>AAAGCATGAT</b>	CCGAGATGTG	GAACTGGCAG	AGGAGGCGCT	CCCCAAAAAG
	M	S	T	E	S	M
	I	R	D	V	E	L
	A	E	E	A	L	P
	K	K				
61	ATGGGGGGCC	TCCAGAACTC	CAGGCGGTGT	CTGTGCCTCA	GCCTCTTCTC	ATTCCCGCTC
	M	G	G	L	Q	N
	S	R	R	C	L	C
	L	S	L	F	S	F
	P	L				
	TNF-Primer III					
121	GTGGCGGGGG	CCACCACGCT	CTTCTGTCTA	<b>CTGAACTTCG</b>	<b>GGGTGATCGG</b>	<b>TCCAACAAG</b>
	V	A	G	A	T	T
	L	F	C	L	L	N
	F	G	V	I	G	P
	N	K				
181	GAGGAGAAGT	TCCCAAATGG	GCTCCCTCTC	ATCAGTTCCA	TGGCCAGAC	CCTCACACTC
	E	E	K	F	P	N
	G	L	P	L	I	S
	S	M	A	Q	T	L
	T	L	T	L		
241	AGATCATCTT	CTCAAACTC	GAGTGACAAG	CCCGTAGCCC	ACGTCGTAGC	AAACCACCAA
	R	S	S	S	Q	N
	S	S	D	K	P	V
	A	H	V	V	A	N
	H	Q				
301	GCAGAGGAGC	AGCTGGAGTG	GCTGAGCCAG	CGTGCCAACG	CCCTCCTGGC	CAATGGCATG
	A	E	E	Q	L	E
	W	L	S	Q	R	A
	N	A	L	L	A	N
	G	M				
361	GATCTCAAAG	ACAACCAACT	GGTGGTACCA	GCAGATGGGC	TGTACCTTAT	CTACTCCCAG
	D	L	K	D	N	Q
	L	V	V	P	A	D
	G	L	Y	L	I	Y
	S	Q				
	TNF-Primer IV					
421	<b>GTCTCTTTCA</b>	<b>AGGGACAAGG</b>	<b>CTG</b> CCCCGAC	TATGTGCTCC	TCACCCACAC	CGTCAGCCGA
	V	L	F	K	G	Q
	G	C	P	D	Y	V
	L	L	T	H	T	V
	S	R				
481	TTTGCCACTT	CATACCAGGA	GAAAGTCAGC	CTCCTCTCCG	CCATCAAGAG	CCCTTGCCCT
	F	A	T	S	Y	Q
	E	K	V	S	L	L
	S	A	I	K	S	P
	C	P				
541	AAGGACACCC	CTGAGGGAGC	TGAGCTCAAG	CCCTGGTATG	AGCCCATGTA	CCTGGGAGGA
	K	D	T	P	E	G
	A	E	L	K	P	W
	Y	E	P	M	Y	L
	G					
601	GTCTCCCAG	CTGGAGAAGGG	GGACCTGCTC	AGCGCTGAGG	TCAACCTGCC	CAAGTACTTA
	V	S	Q	L	E	K
	G	D	L	L	S	A
	E	V	N	L	P	K
	Y	L				
	TNF-Primer II					
666	GACATCAG	GAGTCCGGGCA	GGT <b>TACTTT</b>	<b>GGAGTCATTG</b>	<b>CTCTGTGA</b>	
	D	I	T	E	S	G
	Q	V	Y	F	G	V
	I	A	L	*		

**Abb. 6: Nukleinsäure- und Aminosäure-Sequenz der Ratten TNF- $\alpha$ -cDNA**

Fett hervorgehoben sind die Positionen der verwendeten TNF-Primer. Die TNF-Primer I und II werden im weiteren Verlauf äußere TNF-Primer, die TNF-Primer III und IV innere TNF-Primer genannt. \*=Stoppcodon

Ausgehend von Gesamt-RNA aus Rattenhepatozyten (von Frau Dipl.-Biol. El-Bahay zur Verfügung gestellt) wurde eine cDNA Synthese durchgeführt und anschließend mit den in

Abbildung 6 eingezeichneten spezifischen äußeren TNF-Primern eine PCR durchgeführt. Das Amplifikationsprodukt zeigte die erwartete Größe von ca. 700 bp. Es wurde aus dem Agarosegel aufgereinigt und „blunt end“ in die Hind III Schnittstelle des pSPT18 Vektors kloniert. Nach der Transformation wurden 5 zufällig ausgewählte pSPT18-TNF Klone mit Hilfe der T7 und SP6 Sequenzierungsprimer sequenziert. Sie entsprechen der in Abbildung 6 dargestellten TNF- $\alpha$  cDNA Sequenz. Für die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in die H4IIE Zellen muss die cDNA in geeignete eukaryotische Expressionsvektoren umkloniert werden. Verwendet wurden der Vektor pcDNA3.1/Zeo und pTRE. Die Klonierungsstrategie für die Umklonierung in die beiden Expressionsvektoren ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt. Nach der Transformation wurden jeweils 10 zufällig ausgewählte pTNF3.1/Zeo Klone mit einem T7 Sequenzierungsprimer und die pTRE-TNF Klone mit vektorspezifischen Primern sequenziert.



**Abb. 7: Schematische Darstellung der Strategie der Klonierung in die Expressionsvektoren**

Für die gerichtete Klonierung, in der für die Expression notwendigen Orientierung, musste das TNF-Insert aus dem pSPT18 Vektor mit Bam HI/Pst I herausgeschnitten und in den pBlueskript SK- Vektor [BamHI /Pst I] zwischenkloniert werden.

Für die im Folgenden beschriebenen Transfektionsexperimente wurden die Klone pTNF3.1/Zeo Nr. 12 und 13 und pTRE-TNF Nr. 29 und 30 verwendet.

### 3.3 Herstellung stabiler Transfektanten

Für die Herstellung stabiler Transfektanten wurden die unter 3.2 dargestellten Expressionskonstrukte verwendet. Für die Transfektionsexperimente wurden liposomale Transfektionsreagenzien verschiedener Firmen und die Calciumphosphat-Methode verwendet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Zellen wurden in drei verschiedenen Konzentrationen ( $5 \times 10^4$  Zellen,  $2 \times 10^5$  Zellen und  $4 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well) ausgesät. Am nächsten Tag wurde die zu transfizierende DNA nach Angaben der Hersteller mit dem liposomalen Reagenz gemischt und auf die Zellen gegeben. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1:5 auf Petrischalen geteilt und unter Zugabe eines

geeigneten Antibiotikums weitere 14-20 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit sollten nur noch Zellen überlebt haben, die stabil die transfizierte DNA in ihr Genom integriert haben.

a.) Transfektionsexperimente mit dem pTNF3.1/Zeo Vektor

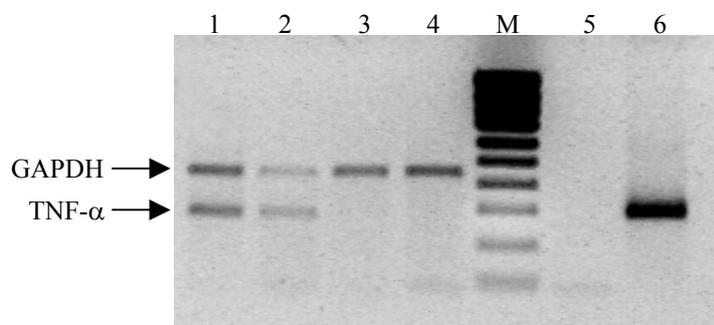
Die Transfektion der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Als Selektionsmarker diente Zeocin, ein Anthracyclin-Derivat. Es wurde in einer Konzentration von 750 µg/ml eingesetzt. Trotz mehrfacher Versuche konnten mit diesem Transfektionsansatz keine stabilen Transfektanten hergestellt werden, vermutlich, weil das Genprodukt TNF- $\alpha$  in den gebildeten Mengen toxisch für die Zellen war. 6-7 Tage nach Beginn der Zeocin-Behandlung begannen die Zellen zu sterben. Einige Tage später waren keine lebenden Zellen auf den Kulturgefäßen zu erkennen. Bei den Transfektionsexperimenten mit dem leeren pcDNA 3.1 Vektor waren bereits nach 10 Tagen Selektion deutlich 5-15 Zellhaufen pro Petrischale zu erkennen.

b.) Transfektionsexperimente mit dem pTRE-TNF Vektor

Hierbei handelt es sich um ein reguliertes Genexpressionssystem. Die TNF-cDNA wird im pTRE Vektor „*downstream*“ eines Tetracyclin-responsiven Promotors ( $P_{Tre}$ ) kloniert. Der  $P_{Tre}$  steht unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors. Dieser Transkriptionsfaktor befindet sich auf einem separaten Vektor (pTet-Off, pTet-On) unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Bei dem Tet-On System führt die Anwesenheit von Doxycyclin dazu, dass die Genexpression an dem pTRE-Vektor induziert wird, während im Tet-Off System bei Anwesenheit von Doxycyclin die Genexpression am pTRE-Vektor ausgeschaltet wird. Um ein solches System zu etablieren, müssen zwei aufeinander folgende stabile Transfektionen durchgeführt werden. Die Vorgehensweise wird im Folgenden dargestellt. Zuerst wurde eine stabile Transfektion mit dem pTet-Off bzw. pTet-On Vektor durchgeführt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben ausgesät und am nächsten Tag mit dem pTet-Off Vektor bzw. pTet-On Vektor transfiziert. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 800 µg/ml G418 über 14 Tage. Nach diesem Zeitraum konnten insgesamt 50 Klone mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert werden. Aus diesen 50 Klonen wurden diejenigen selektiert, die für die weitere Transfektion mit dem pTRE-Vektor die beste Regulation unter dem Einfluss von Doxycyclin zeigten. Dafür mussten die Tet-Off bzw. Tet-On Zellen transient mit einem pTRE-Luciferase-Plasmid transfiziert werden; nach 48 h wurden die Zellen lysiert und ein Luciferase Assay durchgeführt. Für diese transienten Transfektionen wurde die Calciumphosphat-Methode verwendet. Die Tet-On Zellen

wurden zum Anschalten der Transkription mit 10 µg/ml Doxycyclin während die Tet-Off Zellen mit 5 ng/ml Doxycyclin inkubiert wurden, um die Transkription auszuschalten. Nach dem Screening der Tet-Off bzw. Tet-On Zellen mit dem Luciferase Assay zeigten nur die Klone Tet-Off-13, Tet-Off-47 und Tet-On-2 die benötigten Eigenschaften, d.h. eine niedrige basale Luciferase Expression und eine hohe Luciferase Induktion. Diese Zellen wurden für die weiteren Transfektionsexperimente mit dem pTRE-TNF Vektor verwendet. Da der pTRE-Vektor keinen Selektionsmarker besitzt, wurde eine Kotransfektion mit dem Vektor pTK-Hyg durchgeführt. Dieser Vektor besitzt eine Hygromycin-B-Resistenz und ermöglicht nach Zugabe von 500 µg/ml Hygromycin B in das Zellmedium die Selektion der stabil transfizierten Zellen. Von mehreren Transfektionsexperimenten wurden insgesamt 150 Zellklone mit Hilfe von Klonierungszyklindern isoliert, auf 6-Well-Platten expandiert und auf die Expression von TNF-α überprüft. Dabei wurde folgende Strategie angewendet:

1. Von den Zellklonen wurde genomische DNA isoliert und anschließend eine genomische PCR mit vektorspezifischen TRE-Primern durchgeführt. So konnten echt positive Klone, die pTRE-TNF in ihr Genom integriert hatten, von falsch positiven Klonen, die nur den Selektionsvektor pTK-Hyg integriert hatten, unterschieden werden.
2. Von den positiven Klonen wurde RNA isoliert und eine RT-PCR mit den inneren TNF-Primern durchgeführt. Abbildung 8 zeigt exemplarisch einen solchen Ansatz. So konnte überprüft werden, ob es neben der Integration des Expressionsvektors auch zu einer Transkription von TNF-α in den untersuchten Klonen kommt.



**Abb. 8: Überprüfung der TNF-α mRNA Expression der Klone mit Hilfe der RT-PCR**

Von den isolierten Klonen wurde eine RT-PCR mit inneren TNF-α Primern und GAPDH Primern (interne Kontrolle) durchgeführt. Die stabil transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 exprimieren TNF-α. Die mit dem Leervektor transfizierten Zellen 2-0 und 13-0 exprimieren kein TNF-α. 1= Zellklon 2-12, 2= Zellklon 13-44, 3= Zellklon 2-0, 4= Zellklon 13-0 (Transfektion mit Leervektor), 5= Negativkontrolle, 6= Positivkontrolle cDNA primäre Rattenhepatozyten. PCR-Bedingungen: 1' 94°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 25 Zyklen GAPDH-PCR und 30 Zyklen TNF-PCR, final 7' 72°C.

3. Die nun übriggebliebenen positiven Klone wurden in einem TNF- $\alpha$  spezifischen Bioassay auf ihre Fähigkeit überprüft, biologisch aktives TNF- $\alpha$  in das Medium zu sezernieren. Zusätzlich wurde überprüft, ob die TNF- $\alpha$  Produktion durch Zugabe von Doxycyclin moduliert werden kann. Die meisten der getesteten Klone produzierten nur sehr geringe Mengen an TNF- $\alpha$ . Von den insgesamt 48 im L929 Bioassay überprüften Klonen zeigten nur 6 Klone eine Veränderung der TNF- $\alpha$  Produktion unter dem Einfluss von Doxycyclin. Nach 3 bis 4 Zellpassagen konnte dieser Effekt nicht mehr reproduziert werden. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse des L929 Assays für einige der getesteten Klone zusammengefasst. 2 Klone (2-12 und 13-44) produzierten konstitutiv große Mengen an TNF- $\alpha$ . Auch nach Zugabe von Doxycyclin konnte keine Veränderung in der sezernierten TNF- $\alpha$  Menge gefunden werden. Diese zwei TNF- $\alpha$  produzierenden Klone wurden für die weiteren Versuche in dieser Arbeit verwendet und werden im nächsten Abschnitt näher charakterisiert. Daneben wurden die Klone 2-0 und 13-0 isoliert. Es handelt sich hierbei um Zellklone, die mit dem Leervektor transfiziert worden sind und als Kontrolle dienen. In keinem der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche unterschieden sie sich von den nicht transfizierten H4IIE Zellen.

Klon	OD <sub>560</sub> (+/- Doxycyclin)	OD <sub>560</sub> (+/- Doxycyclin) nach 3-4 Passagen
H4IIE	0,89/0,92	0,85/0,89
Off-13-44	0,21/0,20	0,16/0,14
On-2-12	0,12/0,13	0,098/0,088
Off-13-26	0,75/0,26	0,83/0,85
Off-13-13	0,73/0,12	0,79/0,63
On-2-28	0,32/0,74	0,85/0,76
On-2-2	0,43/0,9	0,83/0,77

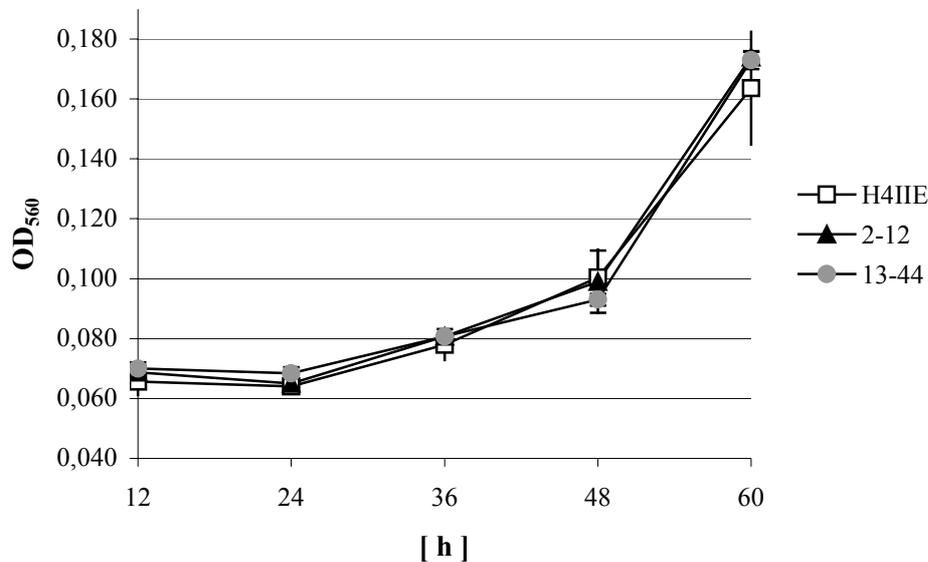
**Tab. 1: L929 Bioassay mit Zellüberständen der isolierten Klone**

Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen pro Well ausgesät. Nach 4 Tagen wurden die Zellüberstände in den L929 Bioassay eingesetzt. Im anschließenden Neutralrot-Test wurde die OD<sub>560</sub> als indirektes Maß für das biologisch aktive TNF- $\alpha$  gemessen. Je niedriger die OD<sub>560</sub>, desto höher ist die Menge an produziertem TNF- $\alpha$ . Die Klone 2-12 und 13-44 produzieren, unverändert durch Doxycyclin, TNF- $\alpha$ . Die restlichen Klone scheinen in den ersten Passagen noch durch Doxycyclin reguliert zu sein; 3-4 Passagen später ist dieser Effekt verschwunden.

## 3.4 Charakterisierung der Klone 2-12 und 13-44

### 3.4.1 Morphologie und Wachstumskurve

Wie in der Einleitung schon beschrieben, wirkt TNF- $\alpha$  auf viele Zellen proliferierend. Deshalb wurde untersucht, ob die endogene Expression von TNF- $\alpha$  einen Effekt auf die Teilungsrate der Zellen hat. Hierzu wurden die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^3$  Zellen/Well auf Mikrotiterplatten ausgesät und über einen Zeitraum von 60 h inkubiert. Zu den in der Abbildung 9 angegebenen Zeitpunkten wurde ein MTT-Test durchgeführt.



**Abb. 9: MTT-Test zur Bestimmung der Proliferationsrate**

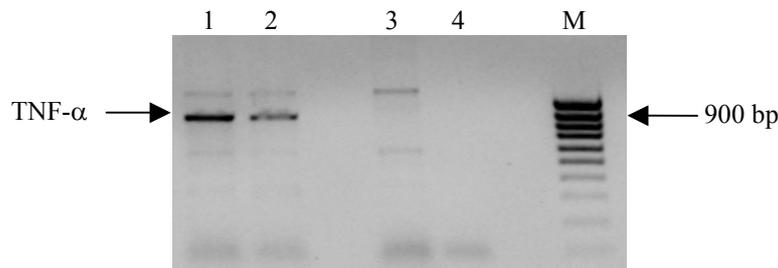
Die Wachstumskurve wurde über einen Zeitraum von 60 h aufgenommen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde ein MTT-Test durchgeführt und die OD bei 560 nm gemessen ( $x \pm s$ ,  $n=3$ ).

Die Überexpression von TNF- $\alpha$  in H4IIE Zellen beeinflusst die Teilungsrate der Zellen nicht. Es wurden auch keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellen gefunden.

### 3.4.2 Genomische PCR und RT-PCR

Nach 10 Zell-Passagen wurde von den Zellen erneut DNA und RNA isoliert. Es wurde eine genomische PCR mit vektorspezifischen TRE-Primern durchgeführt, um das Vorhandensein des pTRE-TNF-Konstruktes in den transfizierten Zellen auch nach mehreren Zellpassagen zu überprüfen. Die isolierte DNA wurde zur Kontrolle auf einem Agarosegel aufgetrennt. 1  $\mu$ g dieser DNA wurde dann für die genomische PCR eingesetzt. Erwartet wurde ein Amplifikationsprodukt von ca. 900 bp. Abbildung 10 zeigt, dass in den

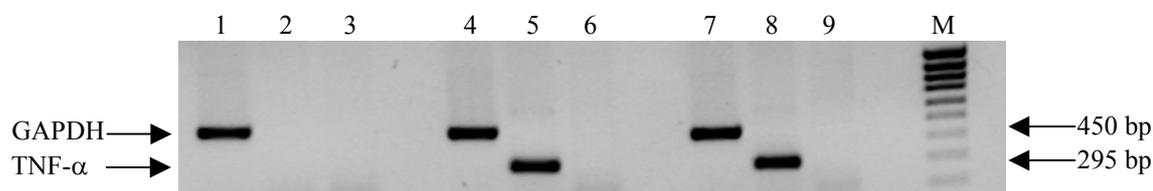
transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 eine Bande in der erwarteten Größe entsteht, während in den H4IIE Zellen, wie erwartet, kein Amplifikationsprodukt nachweisbar ist.



**Abb. 10: Genomische PCR mit vektorspezifischen TRE-Primern**

1= 2-12 Zellen, 2= 13-44 Zellen, 3= H4IIE-Zellen, 4= Negativkontrolle, Marker (M)= 100 bp Leiter. Die Banden oberhalb und unterhalb des Amplifikationsproduktes sind präparationsbedingt bei der Isolation der genomischen DNA entstanden. PCR-Bedingungen: 1' 94°C, 1' 52°C, 1' 72°C, 25 Zyklen.

Die RT-PCR wurde mit den inneren TNF-Primern durchgeführt, um zu überprüfen, ob TNF- $\alpha$  in den transfizierten Zellen auch nach mehreren Passagen transkribiert wird. Für die cDNA-Synthese wurden 2  $\mu$ g Gesamt-RNA eingesetzt. Erwartet wurde ein Amplifikationsprodukt von 295 bp. Abbildung 11 zeigt in den transfizierten Zellen das erwartete TNF- $\alpha$  Amplifikationsprodukt von 295 bp, während bei den H4IIE Zellen keine Bande zu sehen ist. Als zusätzliche interne Kontrolle wurde von der gleichen cDNA eine PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt mit einem Amplifikationsprodukt von 450 bp.



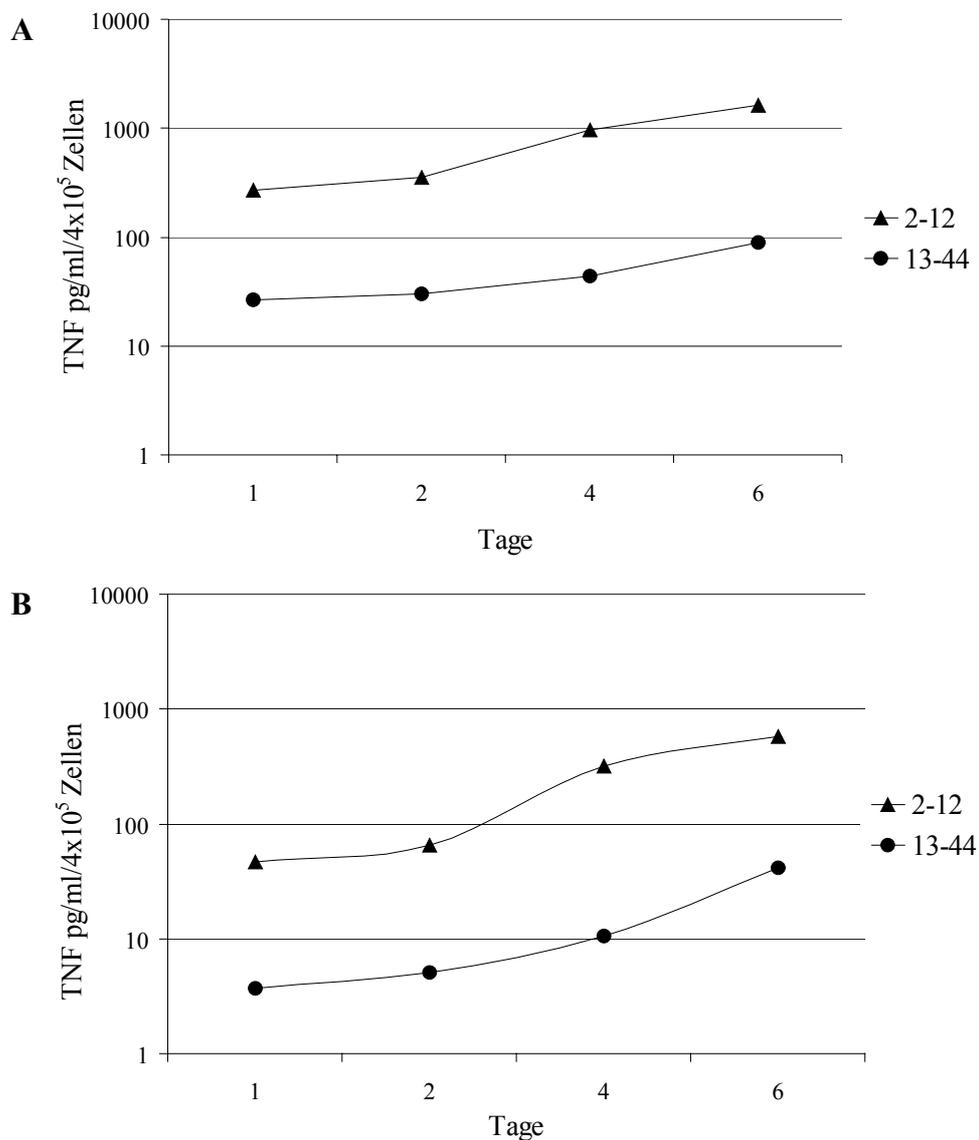
**Abb. 11: RT-PCR mit den inneren TNF-Primern zur Überprüfung der TNF- $\alpha$  Expression**

1= H4IIE GAPDH-PCR, 2= H4IIE TNF- $\alpha$ -PCR, 3 =Negativkontrolle, 4= 2-12 GAPDH-PCR, 5= 2-12 TNF- $\alpha$ -PCR, 6= Negativkontrolle, 7= 13-44 GAPDH-PCR, 8= 13-44 TNF- $\alpha$ -PCR, 9= Negativkontrolle. PCR-Bedingungen: 1' 94°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 25 Zyklen GAPDH-PCR und 30 Zyklen TNF-PCR.

### 3.4.3 L929 Assay und TNF- $\alpha$ ELISA

Die oben gezeigten Experimente bestätigen, dass die transfizierten Zellen stabil die TNF- $\alpha$  cDNA in ihr Genom integriert haben und dass sie auch TNF- $\alpha$  transkribieren. Als Nächstes sollte die von den Zellen sezernierte TNF- $\alpha$  Menge quantifiziert werden. Dazu wurden die Zellen in einer Konzentration von  $8 \times 10^5$  Zellen pro 6 Well ausgesät und für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Nach jedem Tag wurde der Zellüberstand abgenommen und bis zur Benutzung bei -80°C gelagert. Ein Teil der so gewonnenen Überstände wurde für die TNF- $\alpha$  Quantifizierung mittels eines spezifischen Ratten TNF- $\alpha$  ELISA's verwendet. Der

TNF- $\alpha$  ELISA ermöglicht eine sehr exakte Quantifizierung der TNF- $\alpha$  Menge im Überstand, sagt aber nichts über die biologisch aktive TNF- $\alpha$  Konzentration aus, da TNF- $\alpha$  erst nach Trimerisierung an den TNF-Rezeptor binden kann und so seine Wirkung auf die Zielzellen ausübt. Deshalb wurde der zweite Teil des Überstandes für die Quantifizierung des biologisch aktiven TNF- $\alpha$  mit Hilfe des L929 Bioassays verwendet. In Abbildung 12 werden die Ergebnisse zusammengefasst. Beide Methoden zeigen, dass H4IIE Zellen kein TNF- $\alpha$  sezernieren und dass die 2-12 Zellen deutlich mehr TNF- $\alpha$  sezernieren als die 13-44 Zellen.



**Abb. 12: Quantifizierung des sezernierten TNF- $\alpha$  im Zeitverlauf**

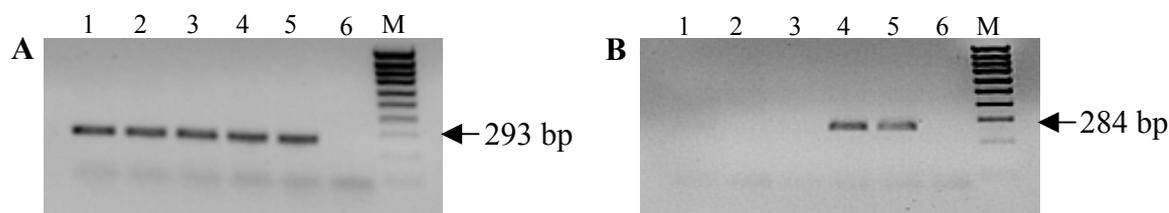
**A:** Die Quantifizierung des sezernierten TNF- $\alpha$  erfolgte mit Hilfe eines Ratten TNF- $\alpha$  ELISA's.

**B:** Die Quantifizierung des sezernierten TNF- $\alpha$  erfolgte mit Hilfe des L929 Bioassays.

Beide Assays zeigen, dass der Klon 2-12 etwa 10 mal mehr TNF- $\alpha$  sezerniert als der Klon 13-44. Die H4IIE Zellen sezernieren kein TNF- $\alpha$ .

### 3.4.4 RT-PCR TNF-R1 und TNF-R2

TNF- $\alpha$  vermittelt seine Wirkung auf die Zielzellen, indem es an membranständige TNF- $\alpha$  Rezeptoren bindet. Es existieren zwei Typen von TNF- $\alpha$  Rezeptoren, die zwar zur gleichen Familie gehören, aber strukturell unterschiedlich sind. Mit Hilfe der RT-PCR sollte deshalb überprüft werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten Zellen TNF-Rezeptoren exprimieren (Abbildung 13). Die RT-PCR wurde mit spezifischen Primern für TNF-R1 (erwartetes Amplifikationsprodukt 298 bp) und TNF-R2 (erwartetes Amplifikationsprodukt 284 bp) durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden cDNAs aus primären Rattenhepatozyten und aus Rattenlunge verwendet.



**Abb. 13: Expression der TNF-Rezeptoren**

**A: Nachweis der Expression des TNF-R1 mittels RT-PCR.** Alle untersuchten Zellen und Gewebe exprimieren den TNF-R1. PCR-Bedingungen: 1' 94°C, 1' 55°C, 1' 72°C, 30 Zyklen.

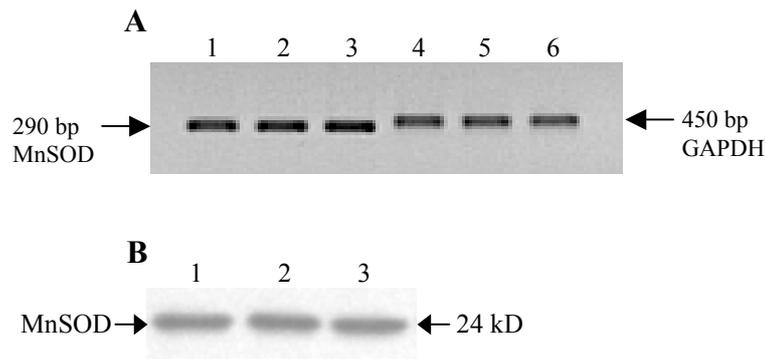
**B: Nachweis der Expression des TNF-R2 mittels RT-PCR.** Die Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE und die transfizierten Klone exprimieren den TNF-R2 nicht. Im Gegensatz dazu exprimieren primäre Rattenhepatozyten und Lungengewebe den TNF-R2. PCR-Bedingungen: 1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C, 35 Zyklen Spur 1= H4IIE, Spur 2= 2-12, Spur 3= 13-44, Spur 4= prim. Hepatozyten (Ratte), Spur 5= Lunge (Ratte), Spur 6= Negativkontrolle, M= 100 bp Leiter.

### 3.4.5 Basale Expression der antioxidativen Enzyme

Ein Mechanismus der TNF- $\alpha$  induzierten Zytotoxizität läuft über die Bildung von ROS ab. Deshalb sollte als Nächstes untersucht werden, ob es nach Transfektion von TNF- $\alpha$  in die H4IIE Zellen zu einer Veränderung der basalen Expression der antioxidativen Enzyme, MnSOD, CuZnSOD, Katalase und GPx kommt.

#### 3.4.5.1 Basale Expression der MnSOD und der CuZnSOD

Die mitochondriale manganhaltige Superoxiddismutase (MnSOD) und die zytosolische kupfer-/zinkhaltige Superoxiddismutase (CuZnSOD) wandeln Sauerstoffanionen zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff um. Es ist bekannt, dass insbesondere die MnSOD in einer Reihe von Zelllinien durch TNF- $\alpha$  induziert wird. Deshalb sollte mit Hilfe der RT-PCR und des Western-Blots überprüft werden, ob sich die H4IIE Zellen und die Klone 2-12 und 13-44 in der basalen Expression der MnSOD unterscheiden (Abbildung 14).



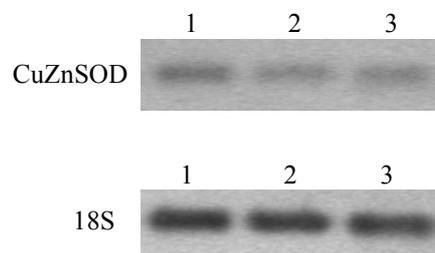
**Abb. 14: Basale Expression der MnSOD**

**A: RT-PCR:** Der Nachweis der MnSOD mRNA Expression erfolgte mit Hilfe der RT-PCR. Man erkennt, dass es keine Unterschiede in der basalen Expression zwischen H4IIE und den Klonen 2-12 und 13-44 gibt. 1= H4IIE MnSOD-PCR, 2= 2-12 MnSOD-PCR, 3= 13-44 MnSOD-PCR, 4= H4IIE GAPDH-PCR, 5= 2-12 GAPDH-PCR, 6= 13-44 GAPDH-PCR. PCR Bedingungen: 1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C, 30 Zyklen MnSOD PCR; 1' 94°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 25 Zyklen GAPDH-PCR.

**B: Western Blot:** Jeweils 5 µg Protein wurden auf einem 15 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit einem polyklonalen MnSOD Antikörper umgesetzt. Auch auf Proteinebene findet man keine Unterschiede zwischen H4IIE und den Klonen 2-12 und 13-44. 1= H4IIE, 2= 2-12, 3= 13-44.

Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene konnte ein Unterschied in der basalen Expression der MnSOD zwischen den transfizierten Klonen und den H4IIE Zellen gefunden werden.

Die basale Expression der CuZnSOD wurde mit Hilfe der Northern-Blot Analyse untersucht. Abbildung 15 zeigt einen repräsentativen CuZnSOD Northern-Blot. Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots ergibt, dass die basale CuZnSOD mRNA Expression in den transfizierten Zellen 2-12 um 27 %  $\pm$  2 und 13-44 um 35 %  $\pm$  11 niedriger ist als in den H4IIE Zellen.

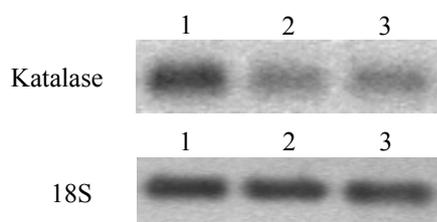


**Abb. 15: Basale Expression der CuZnSOD**

Der Nachweis der CuZnSOD erfolgte mit Hilfe der Northern-Blot Analyse. Gezeigt wird ein repräsentativer Northern-Blot. Die Expression der 18S rRNA diente als interne Kontrolle. Man erkennt, dass die H4IIE Zellen mehr CuZnSOD mRNA exprimieren als die 2-12 und 13-44 Klone. 1= H4IIE, 2= 2-12, 3= 13-44.

### 3.4.5.2 Basale Expression der Katalase und der GPx

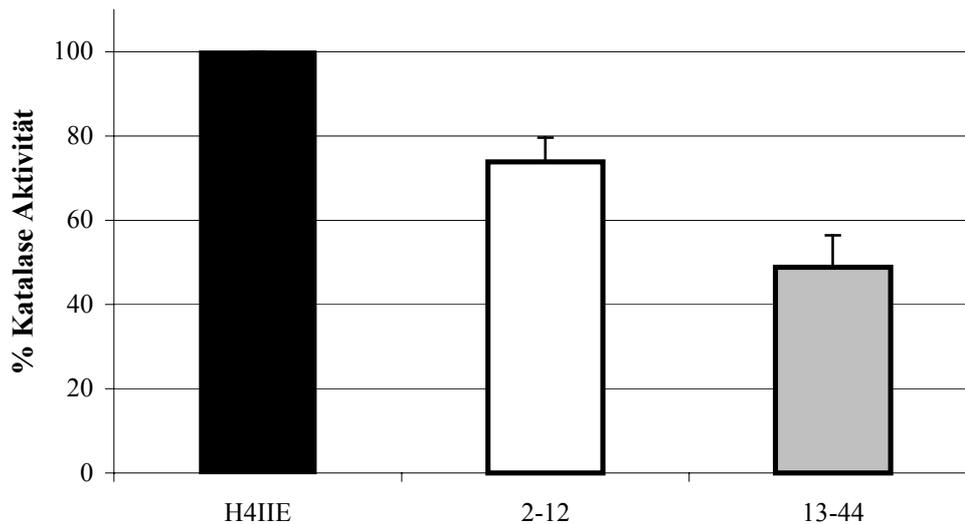
Das durch die SODs gebildete  $H_2O_2$  wird anschließend durch die Katalase und die GPx zu Sauerstoff und Wasser abgebaut. Die Katalase ist ein tetrameres Hämprotein und in den Peroxisomen lokalisiert, während die GPx in den Mitochondrien und dem Zytosol lokalisiert ist. Die basale Expression der Katalase wurde mit Hilfe der Northern-Blot Analyse und mit einem Enzymaktivitätsassay untersucht. Abbildung 16 zeigt exemplarisch einen Katalase Northern-Blot. Man erkennt deutlich, dass die transfizierten Zellen eine niedrigere basale Katalase Expression zeigen als die H4IIE Zellen. Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots ergibt, dass die Katalase mRNA in den transfizierten Zellen 2-12 um  $27\% \pm 7$  und 13-44 um  $36\% \pm 7$  niedriger exprimiert ist als in den H4IIE Zellen.



**Abb. 16: Basale Expression der Katalase mRNA**

Der Nachweis der Katalase mRNA erfolgte mit Hilfe der Northern-Blot Analyse. Die Expression der 18S rRNA diente als interne Kontrolle. Man erkennt, dass die H4IIE Zellen mehr Katalase mRNA exprimieren als die 2-12 und 13-44 Klone. 1= H4IIE, 2= 2-12, 3= 13-44.

Neben der basalen Katalase mRNA Expression wurde auch die Katalase Aktivität in den H4IIE Zellen und den transfizierten Klonen gemessen. Die Katalase Aktivität war in den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 ebenfalls niedriger als in den H4IIE Zellen. Die gemessene Katalase Aktivität in den H4IIE Zellen liegt bei  $272 \pm 26$  U/mg Protein und in den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 bei  $192 \pm 18$  U/mg Protein und  $133 \pm 21$  U/mg Protein. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Aktivitätsmessung als Prozentwerte bezogen auf die Katalase Aktivität der H4IIE Zellen. Sie sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Northern-Blot Analyse.

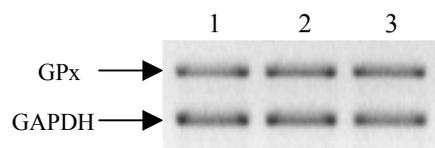


**Abb. 17: Basale Expression der Katalase Enzymaktivität**

Die Katalase Enzymaktivität wurde bestimmt, indem die Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Absorption bei 240 nm photometrisch gemessen wurde. Die Aktivitätswerte sind als %-Werte bezogen auf die Aktivität der H4IIE Zellen dargestellt ( $\bar{x} \pm s$ , n=4).

Die basale Expression der Katalase ist in den transfizierten Klonen 2-12 und 13-44 niedriger als in den H4IIE Zellen. Dies konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Enzymaktivitätsebene nachgewiesen werden.

Die basale Expression der Glutathionperoxidase wurde mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Abbildung 18 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen RT-PCR. Die transfizierten Zellen unterscheiden sich in der basalen Expression der GPx nicht von den H4IIE Zellen.



**Abb. 18: Basale Expression der GPx mRNA**

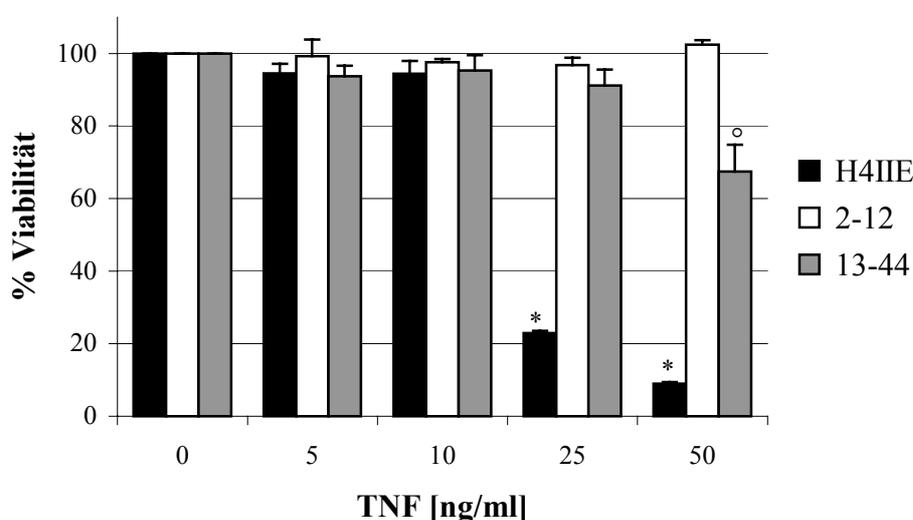
Der Nachweis der GPx mRNA Expression erfolgte mit Hilfe der RT-PCR. Man erkennt, dass es keine Unterschiede in der basalen Expression zwischen H4IIE und den Klonen 2-12 und 13-44 gibt. 1= H4IIE, 2= 2-12, 3= 13-44. PCR Bedingungen: 1' 94°C, 1' 60°C, 1' 72°C, 30 Zyklen GPx PCR; 1' 94°C, 1' 60°C, 2' 72°C, 25 Zyklen GAPDH PCR.

### 3.5 Schädigung der Zellen mit exogenem TNF- $\alpha$

Nach der in dieser Arbeit formulierten Hypothese sollten die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  geschützt sein. Deshalb wurde als Nächstes die Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$  auf die H4IIE Zellen und die transfizierten Klone untersucht.

#### 3.5.1 Viabilität

Nachdem die H4IIE Zellen und die transfizierten Klone 2-12 und 13-44 etwas genauer charakterisiert worden sind, sollte als Erstes die Frage beantwortet werden, ob die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den Klonen 2-12 und 13-44 ihre Sensitivität gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  beeinflusst. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^4$  Zellen pro 96 Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen TNF- $\alpha$  Konzentrationen für 24 h behandelt. Die Überlebensrate der Zellen wurde mit dem Neutralrot-Test bestimmt und ist in Abbildung 19 dargestellt.



**Abb. 19: Viabilität nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$  für 24 h**

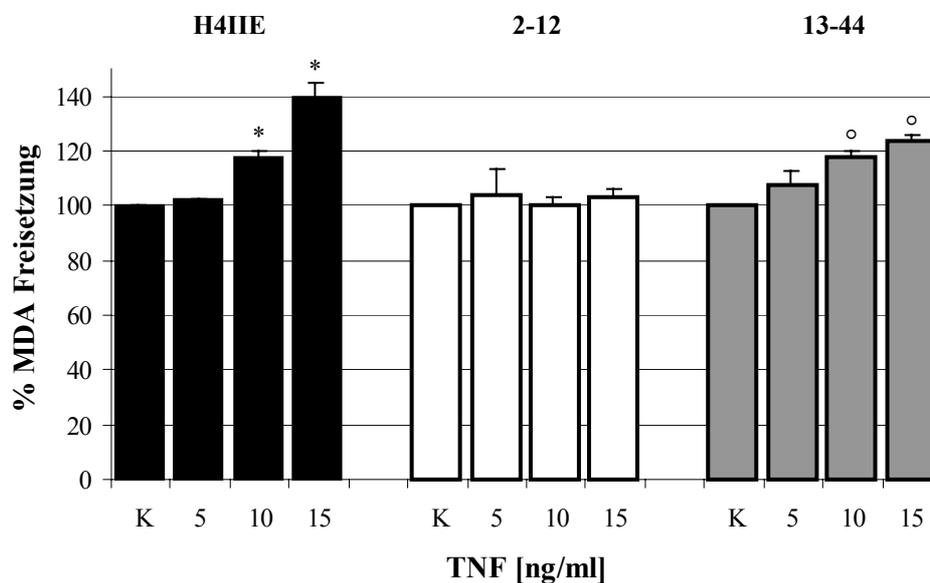
Zur Bestimmung der Viabilität wurde ein Neutralrot-Test durchgeführt. Die Werte sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, ° $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  für 24 h haben die Konzentrationen 5 ng/ml und 10 ng/ml TNF- $\alpha$  bei keiner Zelllinie einen Einfluss auf die Viabilität. Ab einer Konzentration von 25 ng/ml TNF- $\alpha$  kommt es zu einem massiven Zelltod bei den H4IIE Zellen. Die transfizierten Klone sind dagegen auch bei dieser TNF- $\alpha$  Konzentration unempfindlich gegenüber der zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$ . Bei der höchsten getesteten

Konzentration von 50 ng/ml zeigt der Klon 13-44 einen Viabilitätsverlust (67,5 % überlebende Zellen), jedoch nicht der Klon 2-12 (102 % überlebende Zellen). In Vorversuchen konnte zudem gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung von TNF- $\alpha$  sich bei den H4IIE Zellen bereits nach 8 h mit einem Viabilitätsverlust von 21 % nach Schädigung mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  manifestiert, während bis zu 500 ng/ml TNF- $\alpha$  noch keinen Effekt auf die Viabilität der 2-12 Zellen zeigen.

### 3.5.2 MDA Freisetzung

Als Maß für die Lipidperoxidation nach Behandlung der Zellen mit exogenem TNF- $\alpha$  wurde die Freisetzung von MDA ins Medium mittels HPLC gemessen. Abbildung 20 zeigt die MDA Freisetzung nach 24 h Behandlung mit TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  führte bei den H4IIE Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der MDA-Freisetzung. Nach Behandlung mit 15 ng/ml TNF- $\alpha$  war der MDA-Gehalt im Medium um das 1,4fache erhöht. Eine Tendenz zu einer konzentrationsabhängigen MDA-Freisetzung konnte auch bei den 13-44 Zellen beobachtet werden. TNF- $\alpha$  führte in den 2-12 Zellen bei keiner getesteten Konzentration zu einer Erhöhung der MDA-Freisetzung.

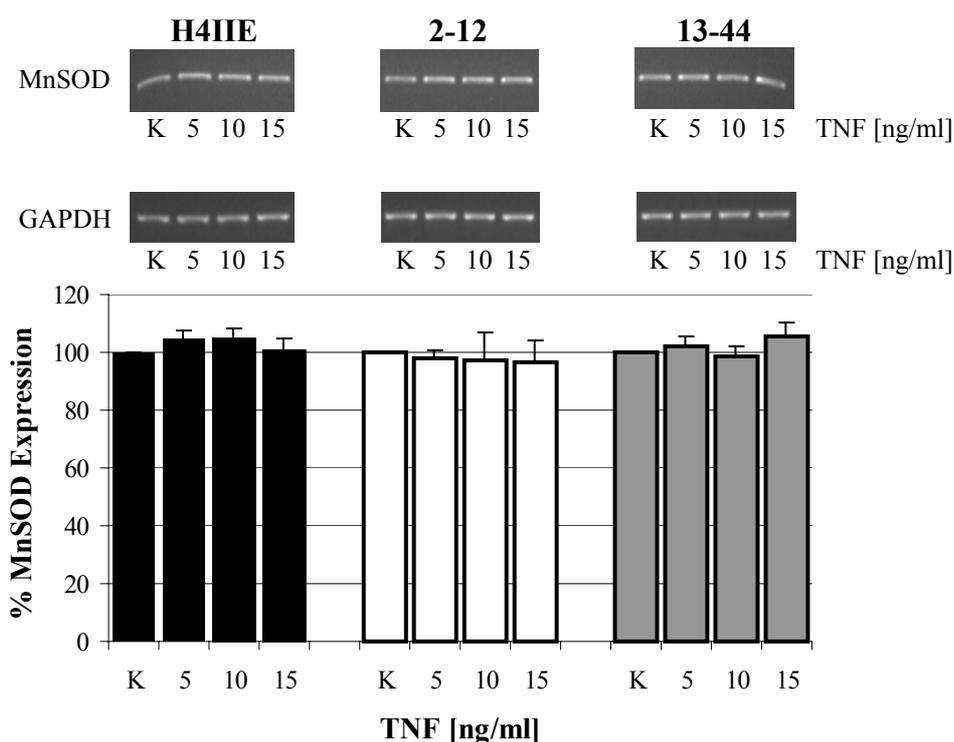


**Abb. 20: MDA-Freisetzung nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$**

TNF- $\alpha$  führt zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der MDA-Freisetzung in den H4IIE Zellen und in einem etwas geringeren Ausmaß in den 13-44 Zellen ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

### 3.5.3 Expression der MnSOD nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$

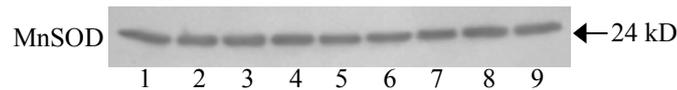
Die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in die H4IIE Zellen führte zu einer Resistenz der Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$ . Aus der Literatur war bekannt, dass es nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Zellen zu einer Induktion der MnSOD kommt (Wong *et al.*, 1989). Auch in primären Rattenhepatozyten führt eine Behandlung mit TNF- $\alpha$  zu einer Induktion der MnSOD (Antras-Ferry *et al.*, 1997; El-Bahay *et al.*, 1999). Dabei wird angenommen, dass die Induktion der MnSOD die Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$  schützt. Deshalb sollte als Nächstes die Rolle der MnSOD bei der veränderten Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber TNF- $\alpha$  überprüft werden. Die Expression der MnSOD unter der Einwirkung verschiedener TNF- $\alpha$  Konzentrationen wurde mittels RT-PCR und Western-Blot Analyse untersucht. Man erkennt in Abbildung 21, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  in keiner der verwendeten Zellen zu einer Induktion der MnSOD mRNA kommt.



**Abb. 21: Expression der MnSOD mRNA nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  zu keiner Veränderung der MnSOD Expression kommt. Die Werte sind in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

Auch auf Proteinebene findet man nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  keine Induktion der MnSOD (Abbildung 22).

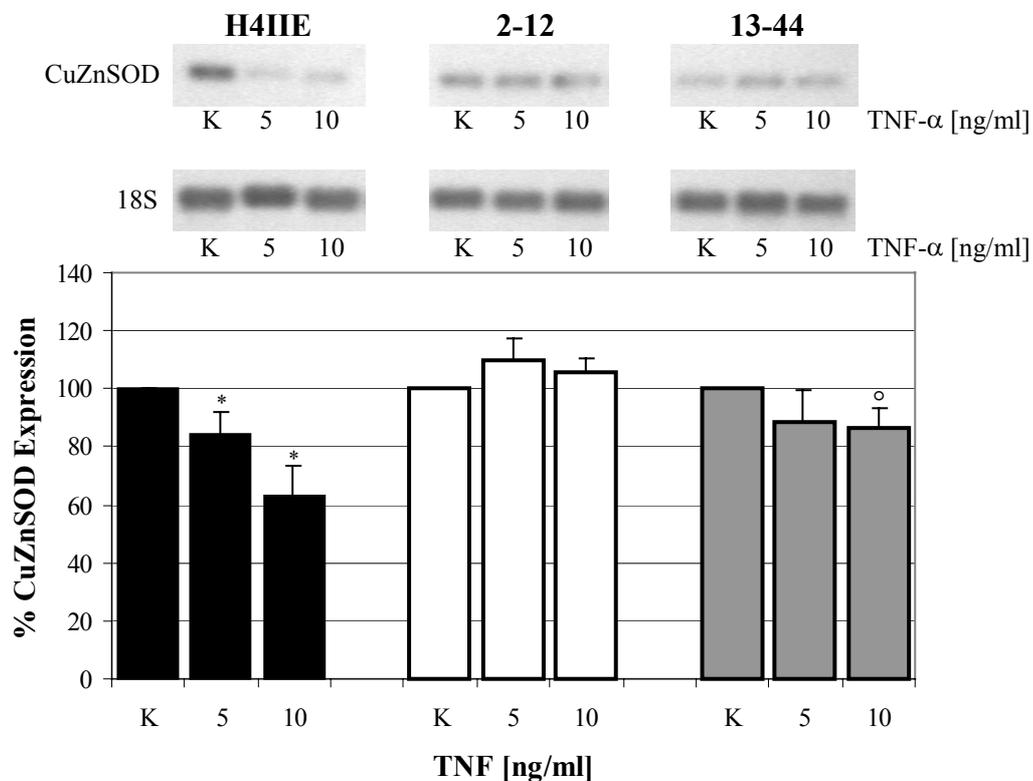


**Abb. 22: Expression des MnSOD-Proteins nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

24 h nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  wurden jeweils 5  $\mu$ g Protein auf einem 15 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Inkubation erfolgte mit einem polyklonalen MnSOD Antikörper (0,8  $\mu$ g/ml). Auch auf Proteinebene findet man keine Induktion der MnSOD. 1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 3= H4IIE 15 ng/ml TNF- $\alpha$ , 4= 2-12 Kontrolle, 5= 2-12 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 6= 2-12 15 ng/ml TNF- $\alpha$ , 7= 13-44 Kontrolle, 8= 13-44 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 9= 13-44 15 ng/ml TNF- $\alpha$ .

### 3.5.4 Expression der CuZnSOD nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$

Neben der mitochondrialen MnSOD findet man in eukaryotischen Zellen eine weitere SOD die kupfer- und zinkhaltig ist und im Zytoplasma lokalisiert ist. Die Expression der CuZnSOD unter der Einwirkung verschiedener TNF- $\alpha$  Konzentrationen wurde mittels Northern-Blot untersucht. Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  für 24 h kommt es in den H4IIE Zellen zu einer dosisabhängigen Abnahme der CuZnSOD. Auch in den 13-44 Zellen erkennt man bei 10 ng/ml TNF- $\alpha$  eine geringfügige Reduktion der CuZnSOD. Bei den 2-12 Zellen bleibt dagegen dieser Effekt aus. In Abb. 23 sind repräsentative Northern-Blots und die densitometrische Auswertung der CuZnSOD mRNA Expression dargestellt.

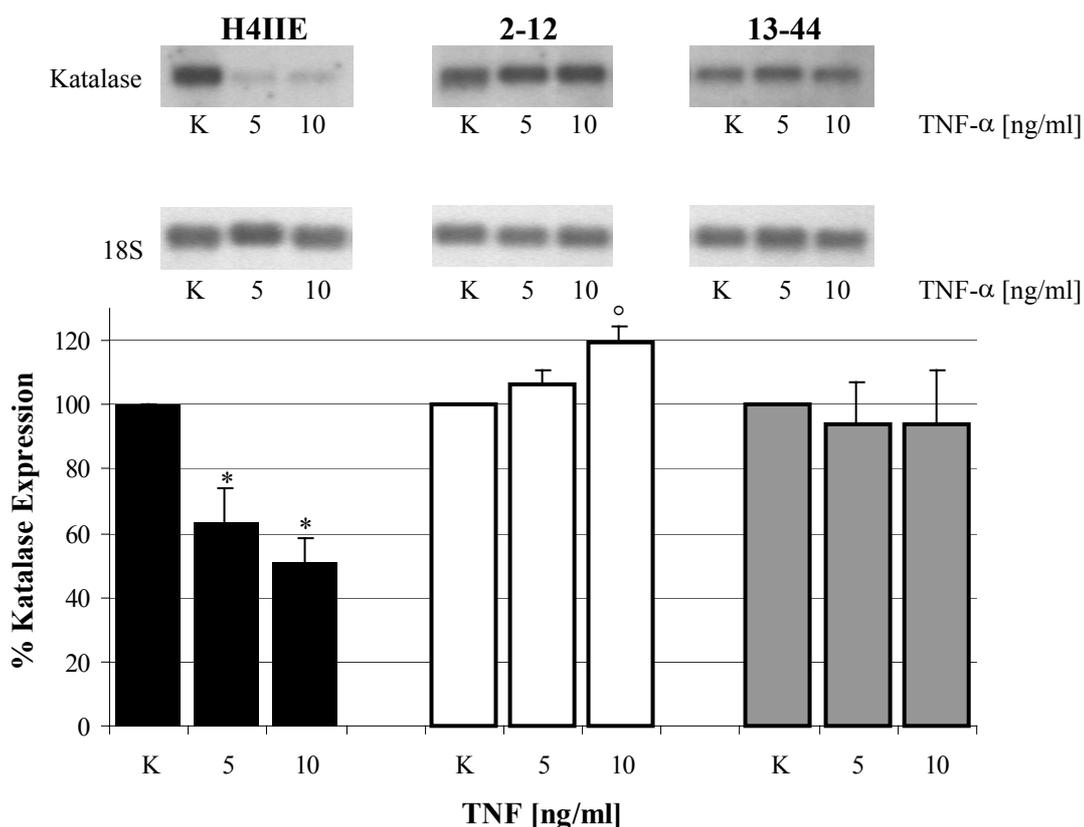


**Abb. 23: Expression der CuZnSOD mRNA nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots zeigt, dass die CuZnSOD mRNA Expression in den H4IIE Zellen und etwas geringer in den 13-44 Zellen abnimmt. Die Werte sind in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

### 3.5.5 Expression der Katalase nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$

Das von der MnSOD und der CuZnSOD gebildete Wasserstoffperoxid wird in der Zelle durch die Katalase und die Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff abgebaut. In den Abschnitten 3.5.3 und 3.5.4 wurde gezeigt, dass es nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen und den stabilen Transfektanten 2-12 und 13-44 zu keiner Induktion der MnSOD kommt. Die Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  führt dagegen zu einer Abnahme der CuZnSOD Expression in den H4IIE Zellen. Als Nächstes wurde die Expression der Katalase, eines weiteren antioxidativen Enzyms, unter der Einwirkung verschiedener TNF- $\alpha$  Konzentrationen untersucht. Auf Transkriptebene wurde die Katalase Expression mittels Northern-Blot Analyse und auf Proteinebene mittels eines Katalase Enzymassays untersucht. Abbildung 24 zeigt die densitometrische Auswertung der Katalase Expression nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ .

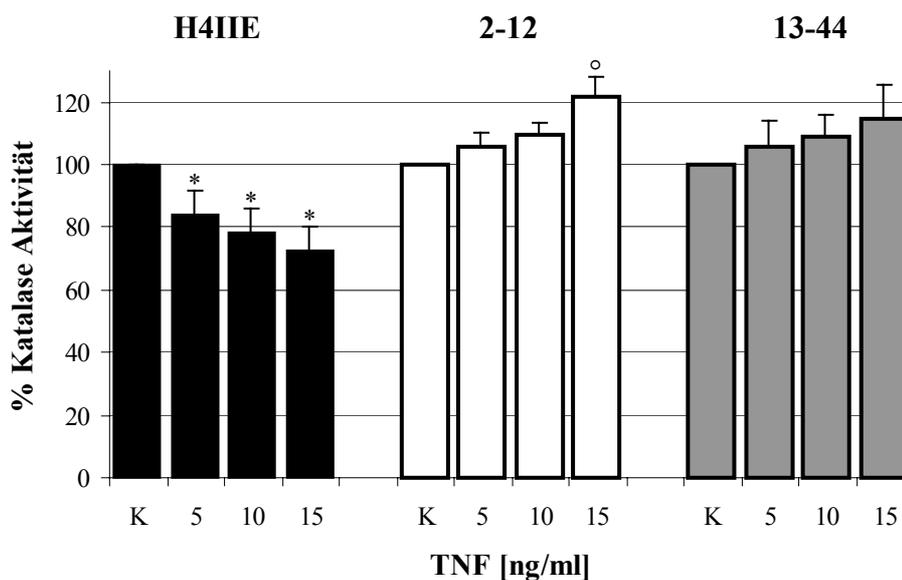


**Abb. 24: Expression der Katalase mRNA nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots zeigt, dass die Katalase-mRNA in H4IIE Zellen durch TNF- $\alpha$  deutlich abnimmt, während es unter dem Einfluss von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  bei den 2-12 Zellen zu einer leichten Zunahme der Katalase mRNA kommt. Bei den 13-44 Zellen ist die Katalase nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  nicht signifikant verändert. Die Werte sind in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt. Gezeigt werden repräsentative Northern-Blots ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, ° $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12).

Es ist zu erkennen, dass es in den H4IIE Zellen zu einem deutlichen Abfall in der Katalase Expression kommt. Bereits nach Schädigung mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  zeigen die H4IIE Zellen eine Reduktion der Katalase mRNA Expression auf 63 %. Bei den transfizierten Klonen findet man dagegen nach Schädigung mit 5 ng/ml TNF- $\alpha$  keine Veränderung der Katalase Expression. Im Gegensatz dazu kommt es nach Schädigung mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  in den 2-12 Zellen zu einer geringfügigen Induktion der Katalase mRNA.

Auch auf Enzymaktivitätsebene findet man nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  eine dosisabhängige Abnahme der Katalase Aktivität in den H4IIE Zellen. Allerdings nimmt die Katalase Aktivität nicht so stark ab wie die Katalase mRNA Expression. In den 2-12 Zellen kommt es ab einer Konzentration von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  zu einer Zunahme der Katalase Aktivität, während man in den 13-44 Zellen eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der Katalase Aktivität beobachtet. In Abbildung 25 sind die Aktivitätsmessungen nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  zusammengefasst.

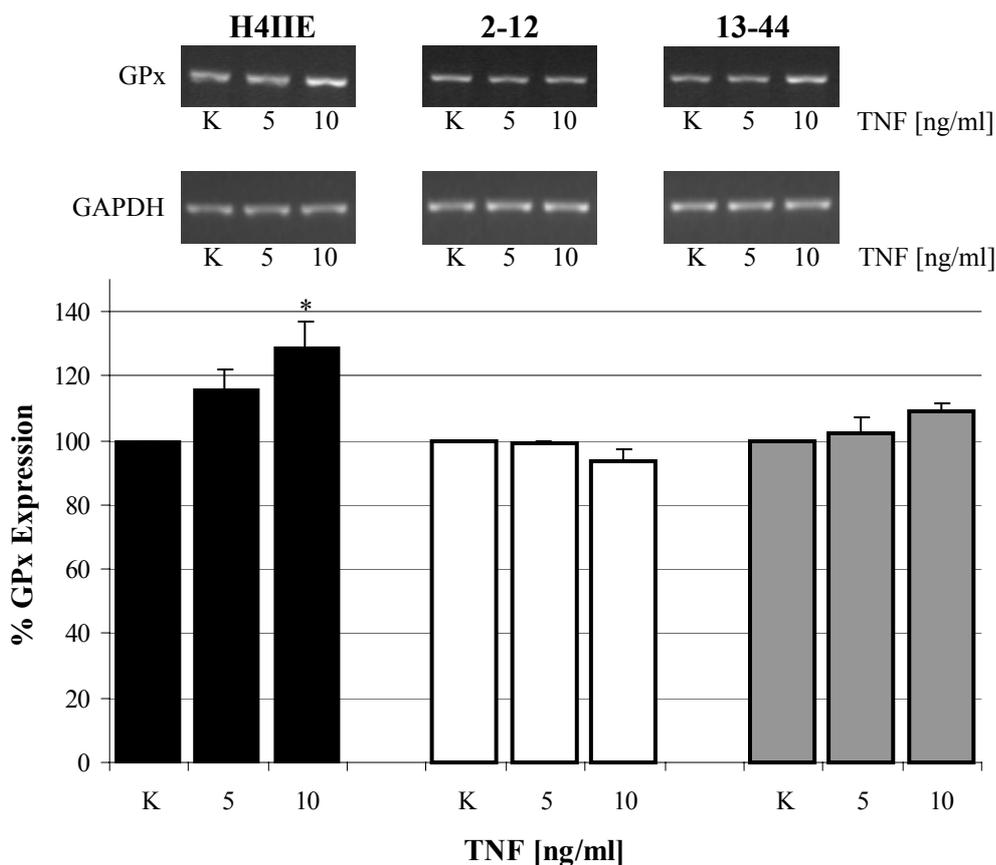


**Abb. 25: Katalase Enzymaktivität nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  kommt es bei den H4IIE Zellen zu einem Abfall in der Katalase Enzymaktivität von  $257 \pm 12$  U/mg Protein in der Kontrolle auf  $187 \pm 11$  U/mg Protein nach Behandlung mit 15 ng/ml TNF- $\alpha$ . Bei den 2-12 Zellen beobachtet man dagegen eine Zunahme der Katalase Aktivität von  $182 \pm 9$  U/mg Protein in der Kontrolle auf  $224 \pm 6$  U/mg Protein nach TNF- $\alpha$  Behandlung. Bei den 13-44 Zellen findet man nur eine nicht signifikante Zunahme der Katalase Aktivität von  $118 \pm 3$  U/mg Protein in der Kontrolle auf  $135 \pm 14$  U/mg Protein nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ . Die Werte sind in % der jeweiligen Kontrolle dargestellt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12).

### 3.5.6 Expression der GPx nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$

Wasserstoffperoxid wird in der Zelle außer durch die Katalase auch von Glutathionperoxidasen abgebaut. Da die Katalase Expression und Aktivität unter dem Einfluss von TNF- $\alpha$  abnimmt, wurde als Nächstes die Expression der Glutathionperoxidase mittels RT-PCR untersucht. In Abbildung 26 sind repräsentative RT-PCRs und die dazugehörige densitometrische Analyse dargestellt.



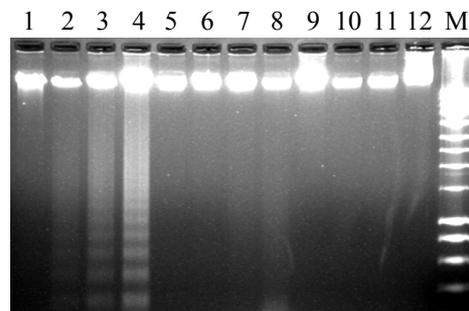
**Abb. 26: Expression der GPx mRNA nach Behandlung mit TNF- $\alpha$**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  zu einer Erhöhung der GPx mRNA Expression bei den H4IIE Zellen kommt ( $x \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE).

Nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  für 24 h kommt es nur bei den H4IIE Zellen zu einer dosisabhängigen Zunahme der GPx mRNA Expression. Bei den transfizierten Klonen 2-12 und 13-44 findet man nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  keine signifikante Veränderung der GPx mRNA Expression.

### 3.5.7 Apoptoseinduktion nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$

Wie in der Einleitung schon beschrieben, ist TNF- $\alpha$  in verschiedenen Zellsystemen zytotoxisch und kann einen apoptotischen Zelltod auslösen. Es sollte nun überprüft werden, ob TNF- $\alpha$  auch in den hier verwendeten Zellen Apoptose auslösen kann. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 6 Well ausgesät und für 24 h mit verschiedenen TNF- $\alpha$  Konzentrationen behandelt. Apoptose wurde mittels DNA-Fragmentationsanalyse, einem anti-Histon ELISA und durch lichtmikroskopische Beobachtung der Zellen nach Neutralrot-Färbung untersucht. Bei einer Vielzahl von Zellen kommt es nach Einleitung des apoptotischen Programms zu einer charakteristischen Fragmentation der DNA, die auf Agarosegelen als „DNA-Leiter“ visualisiert werden kann. In Abbildung 27 ist exemplarisch ein solches Agarosegel dargestellt.

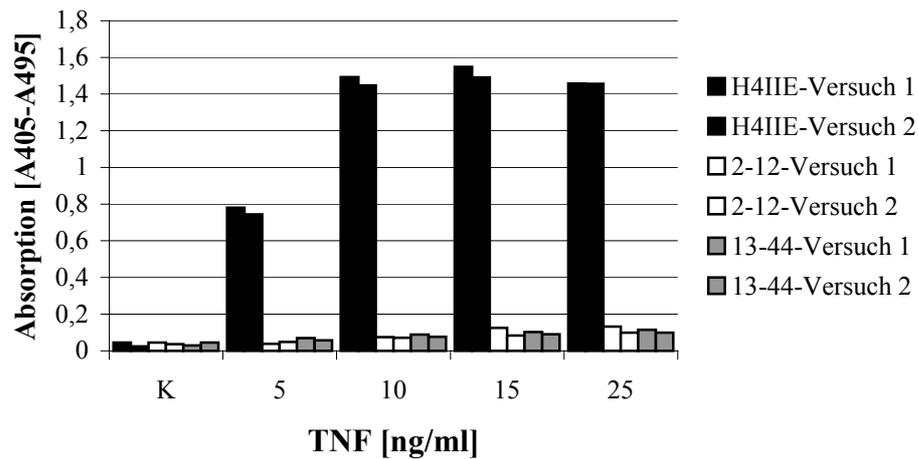


**Abb. 27: DNA-Fragmentationsanalyse nach Behandlung für 24 h mit TNF- $\alpha$**

Jeweils 5  $\mu$ g genomische DNA werden auf einem 0,7 %igen Agarosegel aufgetrennt. 1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 3= H4IIE 15 ng/ml TNF- $\alpha$ , 4= H4IIE 25 ng/ml TNF- $\alpha$ , 5= 2-12 Kontrolle, 6= 2-12 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 7= 2-12 15 ng/ml TNF- $\alpha$ , 8= 2-12 25 ng/ml TNF- $\alpha$ , 9= 13-44 Kontrolle, 10= 13-44 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 11= 13-44 15 ng/ml TNF- $\alpha$ , 12= 13-44 25 ng/ml TNF- $\alpha$ , M= 1kb Marker. Nur bei den H4IIE Zellen ist nach Behandlung die charakteristische DNA-Leiter zu sehen.

Es zeigt sich, dass TNF- $\alpha$  ab einer Konzentration von 10 ng/ml in den H4IIE Zellen zu einer Fragmentation der zellulären DNA führt, die als deutliches DNA-Leitermuster im Agarosegel detektiert werden kann. Bei den 2-12 und 13-44 Zellen ist bei keiner Konzentration eine DNA-Fragmentation erkennbar.

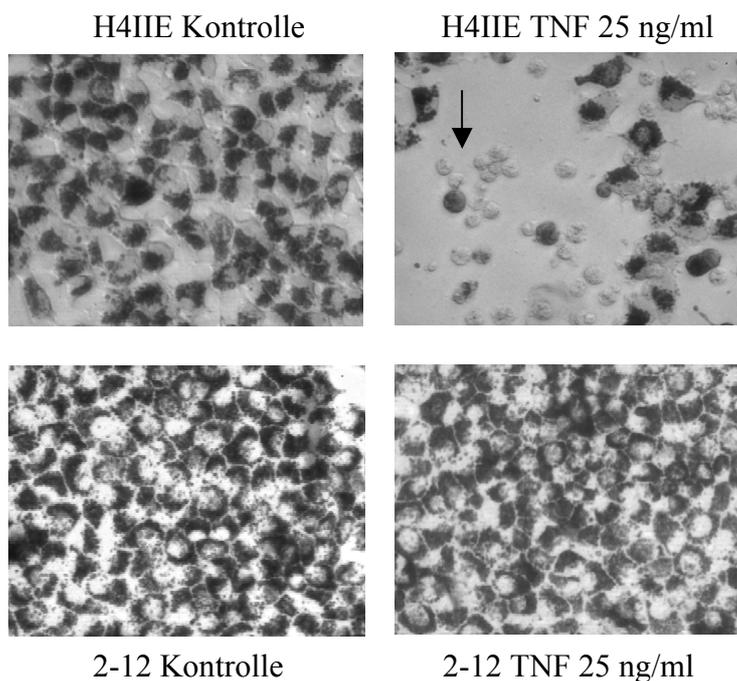
Der anti-Histon ELISA bestätigte die Ergebnisse der DNA-Fragmentationsanalyse. Da der ELISA wesentlich empfindlicher ist als die DNA-Fragmentationsanalyse, konnte mit dieser Methode eine deutliche Apoptoseinduktion schon bei Zugabe von 5 ng/ml TNF- $\alpha$  zu den H4IIE Zellen gemessen werden. Auch mit dieser Methode konnte bei den 2-12 und 13-44 Zellen keine Apoptoseinduktion nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. In Abbildung 28 sind die Ergebnisse des anti-Histon ELISA's zusammengefasst.



**Abb. 28: Apoptoserate nach Behandlung mit TNF-α**

Die Bestimmung der Apoptoserate wurde mit einem anti-Histon ELISA durchgeführt. TNF-α induziert in den H4IIE Zellen schon ab einer Konzentration von 5 ng/ml deutlich Apoptose. Bei den 2-12 und 13-44 Zellen findet man auch bei der höchsten getesteten Konzentration von 25 ng/ml keine Veränderung. Die Daten im Säulendiagramm sind Werte von Duplikaten von zwei unabhängigen Versuchen.

Neben der DNA-Fragmentation und dem anti-Histon ELISA wurden die Zellen auch unter dem Lichtmikroskop untersucht. Nach Behandlung mit TNF-α für 24 h wurden die Zellen 1 h mit Neutralrot gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Abb. 29 zeigt repräsentative Photos von H4IIE Zellen und 2-12 Zellen vor und nach Behandlung mit TNF-α. Der von den Zellen aufgenommene Neutralrot-Farbstoff erscheint auf den Bildern als dunkle Stellen. Man erkennt deutlich die zytotoxische Wirkung von TNF-α auf die H4IIE Zellen, während TNF-α keinen Einfluss auf die Morphologie der 2-12 Zellen hat.

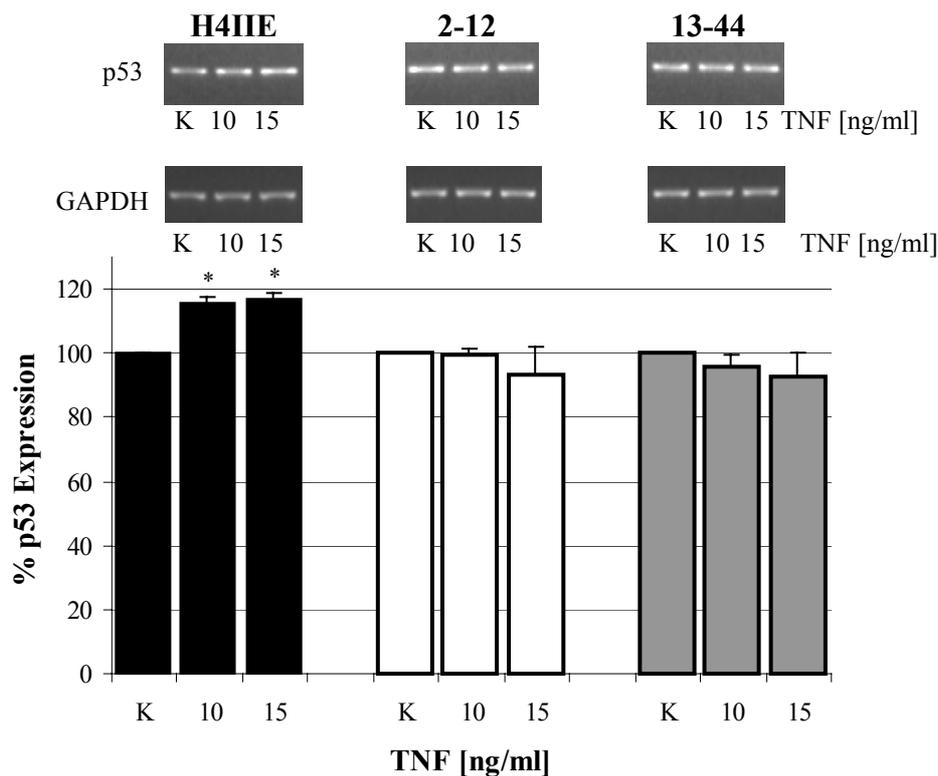


**Abb. 29: Lichtmikroskopische Aufnahmen von H4IIE und 2-12 Zellen nach Behandlung mit TNF-α**

Die Zellen wurden für 24 h in DMEM-Medium ohne bzw. mit 25 ng/ml TNF-α inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 1 h mit Neutralrot gefärbt; dadurch sind die Zellen und die Zellschäden besser zu erkennen. Nach der TNF-α Behandlung sind die H4IIE Zellen deutlich geschrumpft; der Pfeil markiert eine apoptotische Zelle mit dem für Apoptose charakteristischen „membrane blebbing“. Vergrößerung: 100x.

### 3.5.8 Expression von p53, bcl-2 und bax nach Behandlung mit TNF- $\alpha$

Die vorherigen Experimente zeigten, dass die transfizierten Zellen vor der zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$  partiell oder komplett geschützt sind. Um den molekularen Mechanismus dieser Protektion genauer zu beschreiben, wurde die Expression von p53, bcl-2 und bax untersucht. Bei allen drei Genen handelt es sich um Schlüsselgene, die an pro- bzw. antiapoptotischen Prozessen beteiligt sind. p53 bindet an spezifische DNA-Sequenzen und fungiert so als Transkriptionsaktivator. p53 reguliert eine Reihe von Genen, die an der zellulären Antwort auf oxidativen Stress beteiligt sind. Die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli wird auch durch die Expression der verschiedenen Mitglieder der Bcl-2 Familie beeinflusst. Dabei wird angenommen, dass das intrazelluläre Verhältnis von Bcl-2/Bax entscheidend für das Überleben oder den Tod einer Zelle ist. In Abbildung 30 sind die Ergebnisse zur p53 mRNA Expression nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  zusammengefasst.



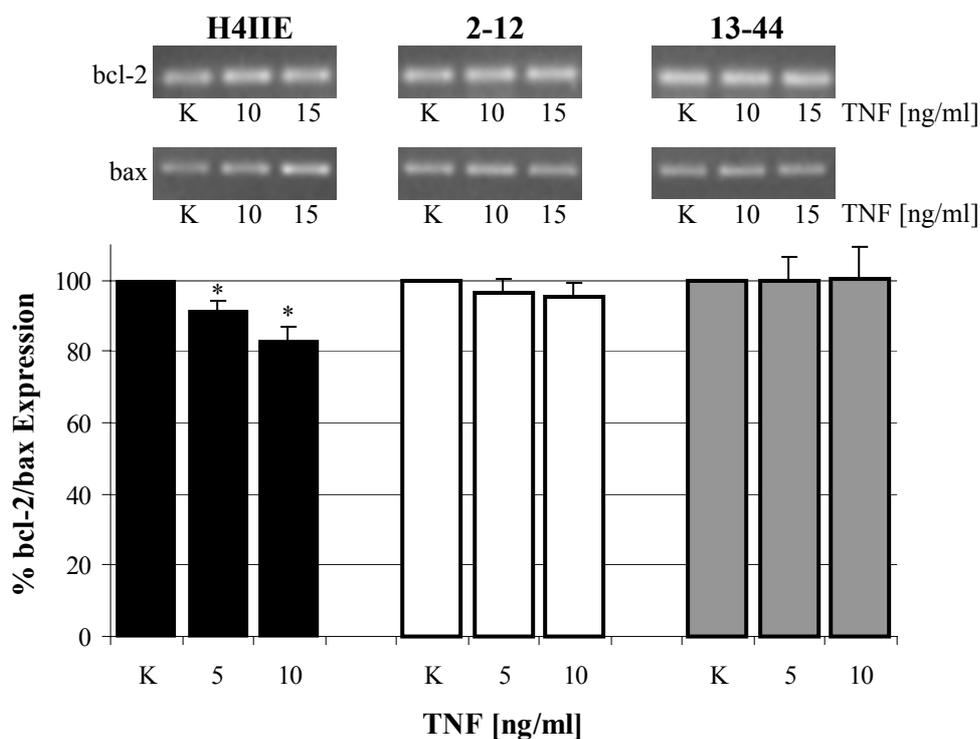
**Abb. 30: p53 mRNA Expression nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$  für 24 h**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  nur in den H4IIE Zellen zu einer Zunahme der p53 mRNA kommt ( $x \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE).

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  nur in den H4IIE Zellen zu einer leichten Erhöhung der p53 mRNA kommt. Im Gegensatz

dazu zeigen die transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 keine Veränderung der p53 mRNA Expression.

Die Expression der pro- und antiapoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl-2 Familie bei der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose und ihre mögliche Beteiligung an der Protektion der transfizierten Zellen gegenüber TNF- $\alpha$  wurde mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Die densitometrische Auswertung der RT-PCRs ist in Abbildung 31 als Verhältnis von bcl-2/bax mRNA Expression dargestellt. Nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  kommt es in den H4IIE Zellen zu einer dosisabhängigen Zunahme der bax mRNA Expression, während die bcl-2 mRNA Expression sich nicht verändert. Das bedeutet, dass sich das intrazelluläre Verhältnis von bcl-2 zu bax in Richtung Apoptose verschiebt. Bei den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 findet man nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  weder in der bcl-2 noch in der bax mRNA Expression eine Veränderung.



**Abb. 31: Verhältnis der bcl-2 und bax Expression nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$  für 24 h**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in den H4IIE Zellen nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  zu einer Verschiebung des bcl-2/bax Verhältnisses in Richtung Apoptose kommt. In den transfizierten Zellen findet man keine Veränderung ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle H4IIE).

## 3.6 Schädigung mit verschiedenen Oxidantien

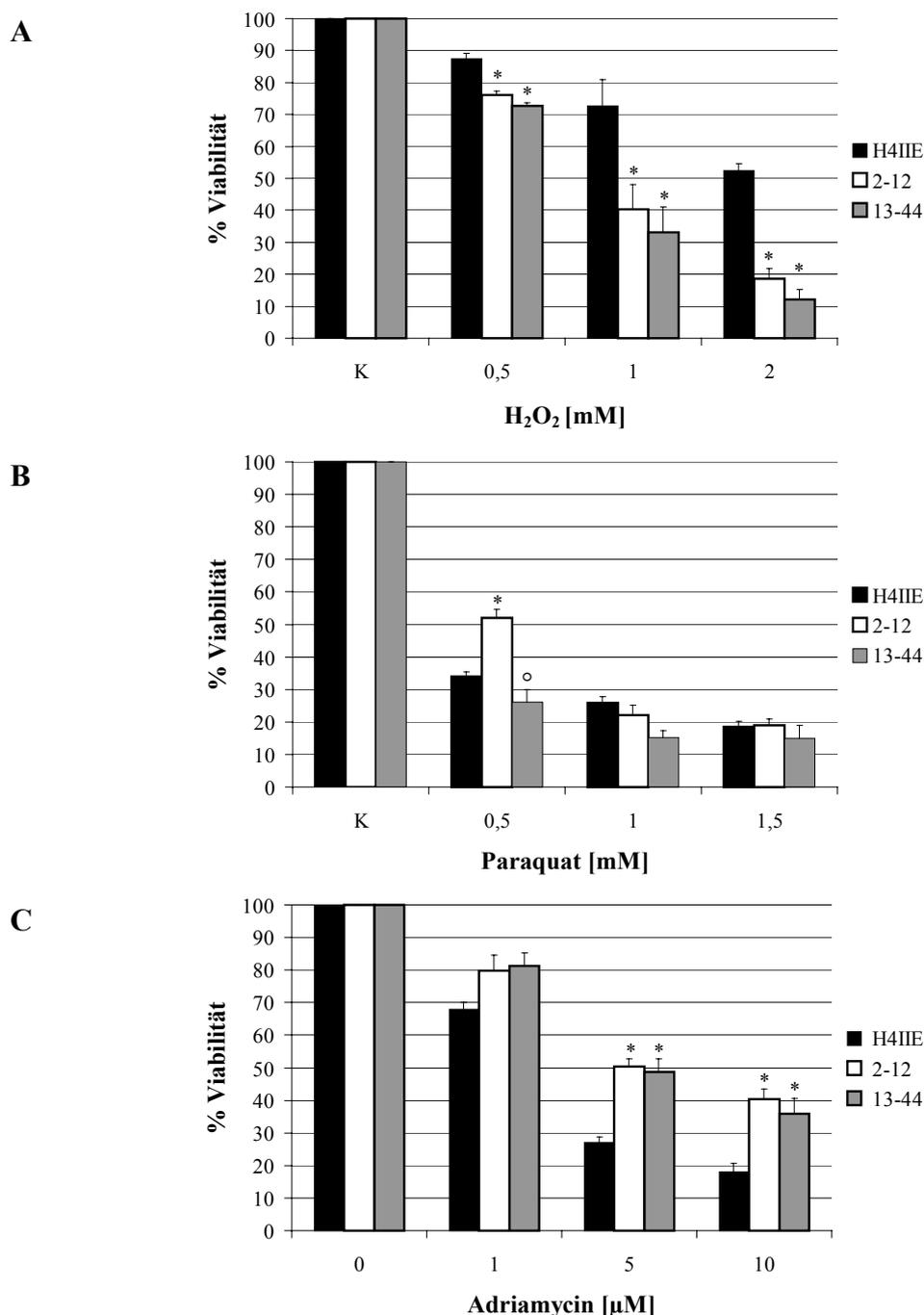
Die Überexpression von TNF- $\alpha$  in H4IIE Zellen führte zu einem Schutz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$ . Da die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle bei der TNF- $\alpha$  vermittelten Zytotoxizität spielt, wurde als Nächstes untersucht, inwiefern die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen 2-12 und 13-44 vor der zytotoxischen Wirkung anderer ROS induzierender Substanzen geschützt sind. Als Modellnoxen für die Induktion von oxidativem Stress wurden drei verschiedene Substanzen verwendet, zum einen Wasserstoffperoxid als direkter Mediator von oxidativem Stress, zum anderen Paraquat und Adriamycin, die im Rahmen eines Redoxzyklus Sauerstoffradikale erzeugen können.

### 3.6.1 Viabilität

Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den Klonen 2-12 und 13-44 ihre Sensitivität gegenüber den oben genannten Oxidantien beeinflusst. Dafür wurden die Zellen in einer Konzentration von  $4 \times 10^4$  Zellen pro 96 Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen Oxidantien Konzentrationen für 24 h behandelt. Die Überlebensrate der Zellen wurde mit dem Neutralrot-Test bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 zusammengefasst. Die Klone 2-12 und 13-44 zeigten eine differenzierte Reaktion auf die verschiedenen Oxidantien.

Nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h waren die Klone 2-12 und 13-44 in allen getesteten Konzentrationen empfindlicher gegenüber der zytotoxischen Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als die nicht transfizierten H4IIE Zellen. Bei der maximal eingesetzten Konzentration von 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sind 53 % der H4IIE Zellen viabel, während die Viabilität der Klone bei 19 % (2-12) und 12 % (13-44) liegt. Etwas komplexer ist die Situation nach Schädigung mit Paraquat für 24 h. Die Dosis-Wirkungskurve ist hier sehr steil. Durch Vorversuche konnte gezeigt werden, dass 0,25 mM Paraquat keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Bei einer Konzentration von 0,5 mM Paraquat ist der Klon 2-12 (Viabilität 52 %) deutlich unempfindlicher gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Paraquat als der Klon 13-44 (Viabilität 26 %) und die nicht transfizierten H4IIE Zellen (Viabilität 34 %). Als dritte Noxe wurde Adriamycin eingesetzt. Nach Schädigung mit Adriamycin für 24 h waren die transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 weniger empfindlich gegenüber Adriamycin als die

nicht transfizierten H4IIE Zellen. Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  Adriamycin lag die Viabilität für die transfizierten Zellen bei 50 % gegenüber 27 % bei den H4IIE Zellen.



**Abb. 32: Neutralrot-Test nach Behandlung mit verschiedenen Oxidantien für 24 h**

**A:** Viabilität nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h. Die transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 sind in allen getesteten Konzentrationen empfindlicher gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als die H4IIE Zellen. **B:** Viabilität nach Behandlung mit Paraquat für 24 h. Die 2-12 Zellen sind deutlich weniger empfindlich gegenüber 0,5 mM Paraquat als die H4IIE Zellen und die 13-44 Zellen. **C:** Viabilität nach Behandlung mit Adriamycin. Die Klone 2-12 und 13-44 sind in allen Konzentrationen deutlich besser gegenüber Adriamycin geschützt als die H4IIE Zellen. Die Werte sind in % der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt ( $\bar{x} \pm s$ , n=4-6, \*p<0,05 vs. Kontrolle H4IIE, °p<0,05 vs. Kontrolle 2-12).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen ihre Sensitivität gegenüber ROS induzierenden Substanzen verändert. Entgegen den Erwartungen zeigen sie aber kein einheitliches Verhalten gegenüber den verwendeten Noxen. Die transfizierten Zellen sind empfindlicher gegenüber Wasserstoffperoxid, aber weniger empfindlich gegenüber Adriamycin. Sie unterscheiden sich nicht in ihrer Sensitivität gegenüber Paraquat, mit Ausnahme der 2-12 Zellen, die in der niedrigsten getesteten Konzentration weniger empfindlich auf Paraquat reagieren als die H4IIE und 13-44 Zellen.

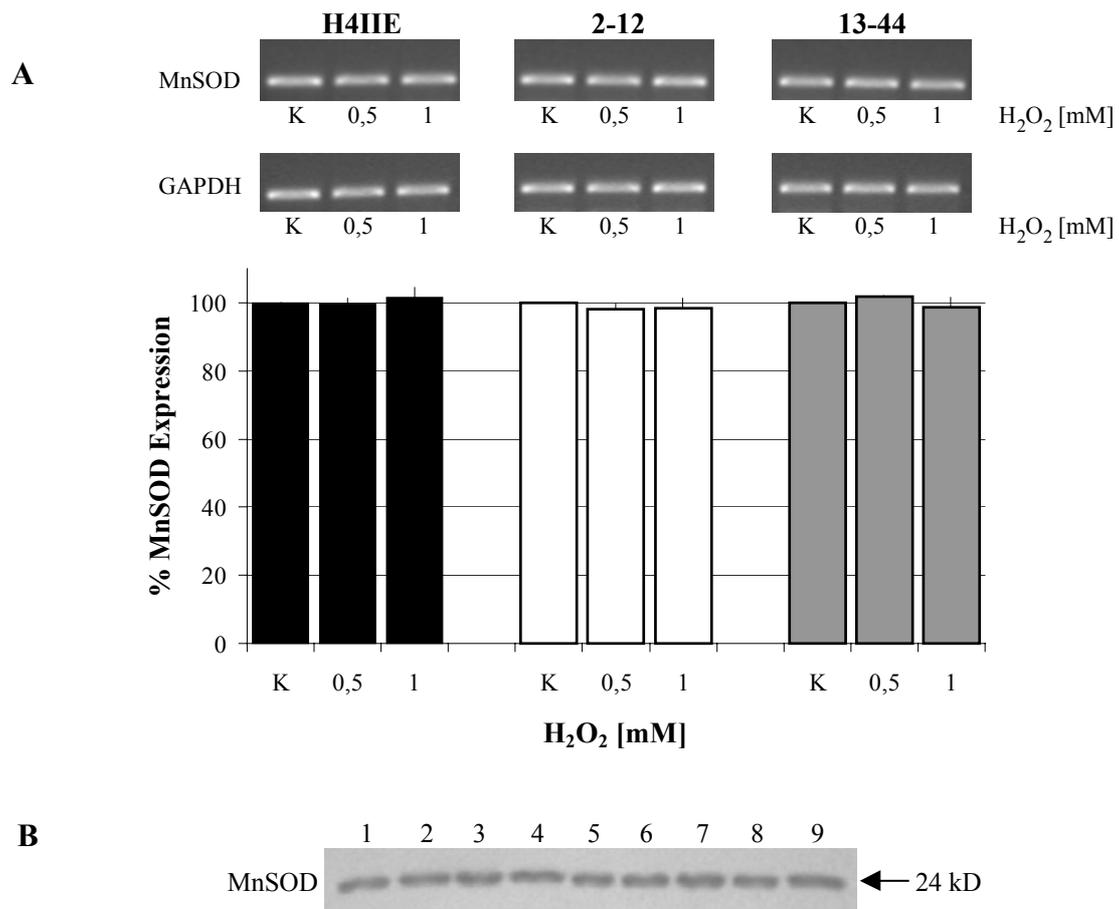
### **3.6.2 Expression der AOE nach Schädigung mit Oxidantien**

Im Abschnitt 3.6.1 wurde gezeigt, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den Ratten-Hepatomzellen H4IIE zu einer Veränderung der Sensitivität gegenüber Oxidantien führt. Die transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 sind im Vergleich zu den H4IIE Zellen empfindlicher gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aber weniger empfindlich gegenüber Adriamycin. Die Überexpression von TNF- $\alpha$  führt nur bei den 2-12 Zellen in der niedrigsten getesteten Paraquat-Konzentration zu einem Schutz.

Zellen sind mit antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet, die ROS abfangen und inaktivieren können. Dazu gehören unter anderem die antioxidativen Enzyme MnSOD, Katalase und Glutathionperoxidase. Deshalb wurde als Nächstes untersucht, welche Rolle die oben genannten antioxidativen Enzyme bei der veränderten Sensitivität der transfizierten Zellen spielen.

#### **3.6.2.1 Expression der MnSOD nach Schädigung mit Oxidantien**

Die mitochondriale MnSOD katalysiert die Umwandlung des Superoxidanionradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Um die veränderte Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber den oben genannten Oxidantien genauer zu untersuchen, wurde die Expression der MnSOD mittels RT-PCR und Western-Blot untersucht. Abbildung 33 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse nach Schädigung mit verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentrationen für 24 h. Es ist zu erkennen, dass es unabhängig von der eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration in keiner Zelllinie zu einer Veränderung der MnSOD mRNA Expression kommt. Wie die Western-Blot Analyse zeigt, findet man auch auf Proteinebene keine Veränderung der MnSOD.



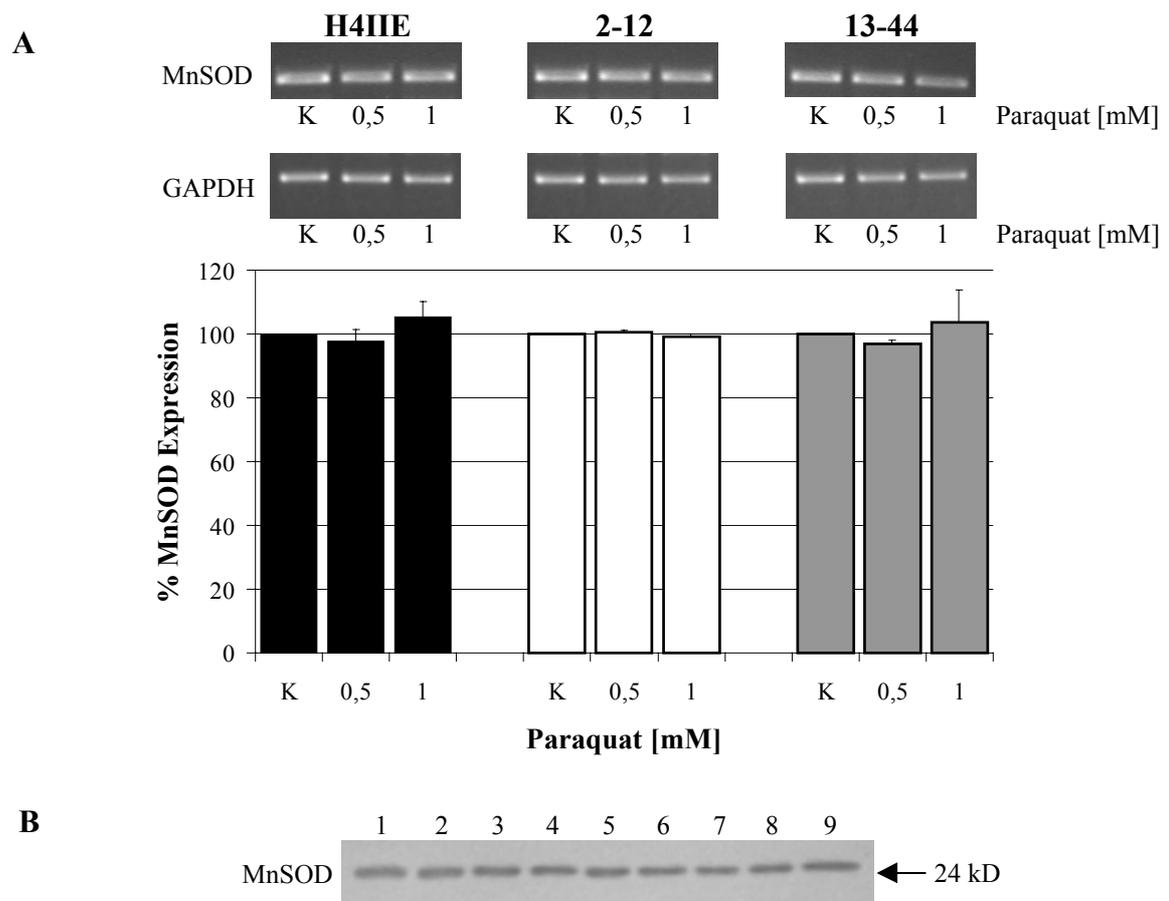
**Abb. 33: Expression der MnSOD nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**A:** Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu keiner Veränderung der MnSOD Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ , n=4).

**B:** MnSOD Western-Blot: Auch auf Proteinebene findet man keine Veränderung der MnSOD.

1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3= H4IIE 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4= 2-12 Kontrolle, 5= 2-12 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 6= 2-12 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7= 13-44 Kontrolle, 8= 13-44 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 9= 13-44 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Nach Schädigung mit verschiedenen Paraquat-Konzentrationen wurde die MnSOD Expression mittels RT-PCR und Western-Blot Analyse untersucht. Abbildung 34 fasst die Ergebnisse zusammen. Auch hier findet man keine Veränderung der MnSOD mRNA Expression und auch keine Veränderung der MnSOD auf Proteinebene.



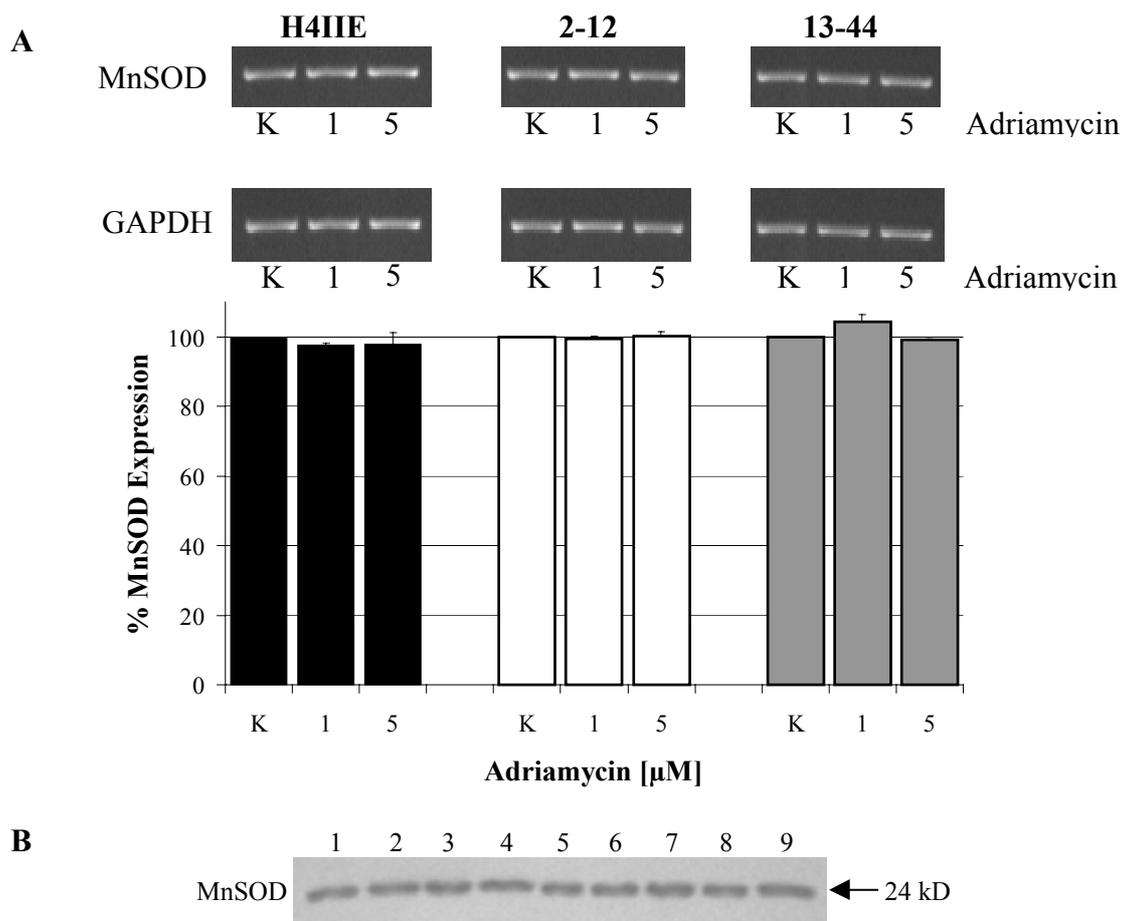
**Abb. 34: Expression der MnSOD nach Behandlung mit Paraquat**

**A:** Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit Paraquat zu keiner Veränderung der MnSOD Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

**B:** MnSOD Western-Blot: Auch auf Proteinebene findet man keine Veränderung der MnSOD.

1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 0,5 mM Paraquat, 3= H4IIE 1 mM Paraquat, 4= 2-12 Kontrolle, 5= 2-12 0,5 mM Paraquat, 6= 2-12 1 mM Paraquat, 7= 13-44 Kontrolle, 8= 13-44 0,5 mM Paraquat, 9= 13-44 1 mM Paraquat.

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse nach Schädigung mit Adriamycin zusammengefasst. Man erkennt, dass auch nach Schädigung mit verschiedenen Adriamycin-Konzentrationen keine Veränderung der MnSOD Expression detektiert werden konnte. Die Expression der MnSOD wurde auf mRNA Ebene mittels RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot Analyse untersucht.



**Abb. 35: Expression der MnSOD nach Behandlung mit Adriamycin**

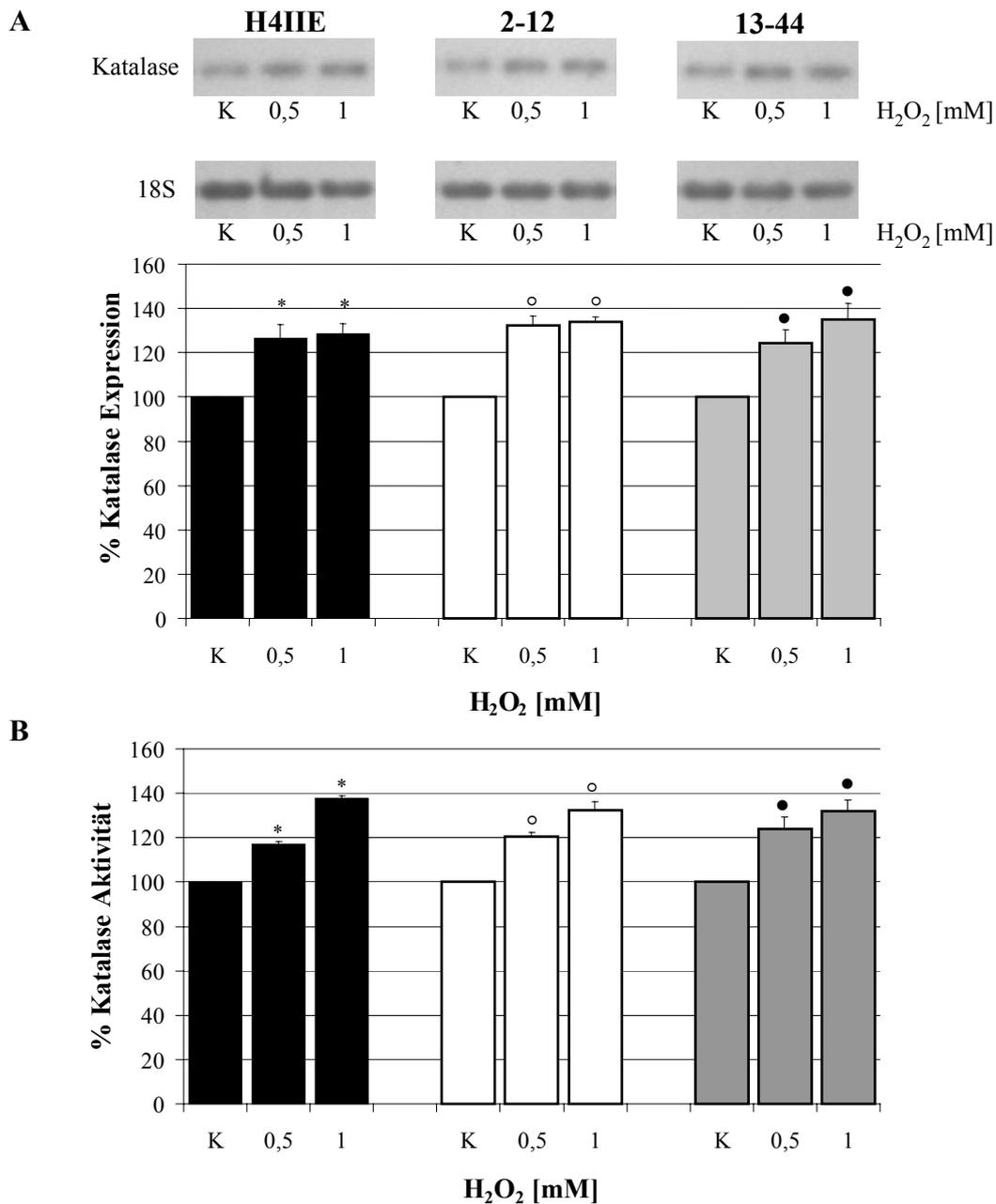
**A:** Die densitometrische Auswertung zeigt, dass es nach Schädigung mit Adriamycin zu keiner Veränderung der MnSOD Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ). **B:** MnSOD Western-Blot: Auch auf Proteinebene findet man keine Veränderung der MnSOD. 1=H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 1  $\mu$ M Adriamycin, 3= H4IIE 5  $\mu$ M Adriamycin, 4= 2-12 Kontrolle, 5= 2-12 1  $\mu$ M Adriamycin, 6= 2-12 5  $\mu$ M Adriamycin, 7= 13-44 Kontrolle, 8= 13-44 1  $\mu$ M Adriamycin, 9= 13-44 5  $\mu$ M Adriamycin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es unabhängig von der verwendeten Noxe und der verwendeten Konzentration zu keiner messbaren Veränderung der MnSOD Expression in den H4IIE, 2-12 und 13-44 Zellen kommt.

### 3.6.2.2 Expression der Katalase nach Schädigung mit Oxidantien

Die zelluläre Funktion der Katalase ist der Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Im Abschnitt 3.5.5 wurde gezeigt, dass die Schädigung der H4IIE Zellen mit TNF- $\alpha$  zu einem Abfall sowohl der Katalase mRNA als auch der Katalase Enzymaktivität führt. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der transfizierten Zellen 2-12 mit TNF- $\alpha$  zu einer leichten Erhöhung der Katalase Enzymaktivität. Deshalb sollte als Nächstes die Expression der Katalase und ihre mögliche Beteiligung bei der veränderten Sensitivität der

transfizierten Zellen gegenüber verschiedenen Oxidantien untersucht werden. Die Expression der Katalase unter der Einwirkung verschiedener  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen wurde mittels Northern-Blot Analyse und eines Katalase Aktivitätsassays untersucht. Abbildung 36 zeigt die densitometrische Auswertung der Katalase Northern-Blots und die Zusammenfassung der Katalase Aktivitätsassays nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

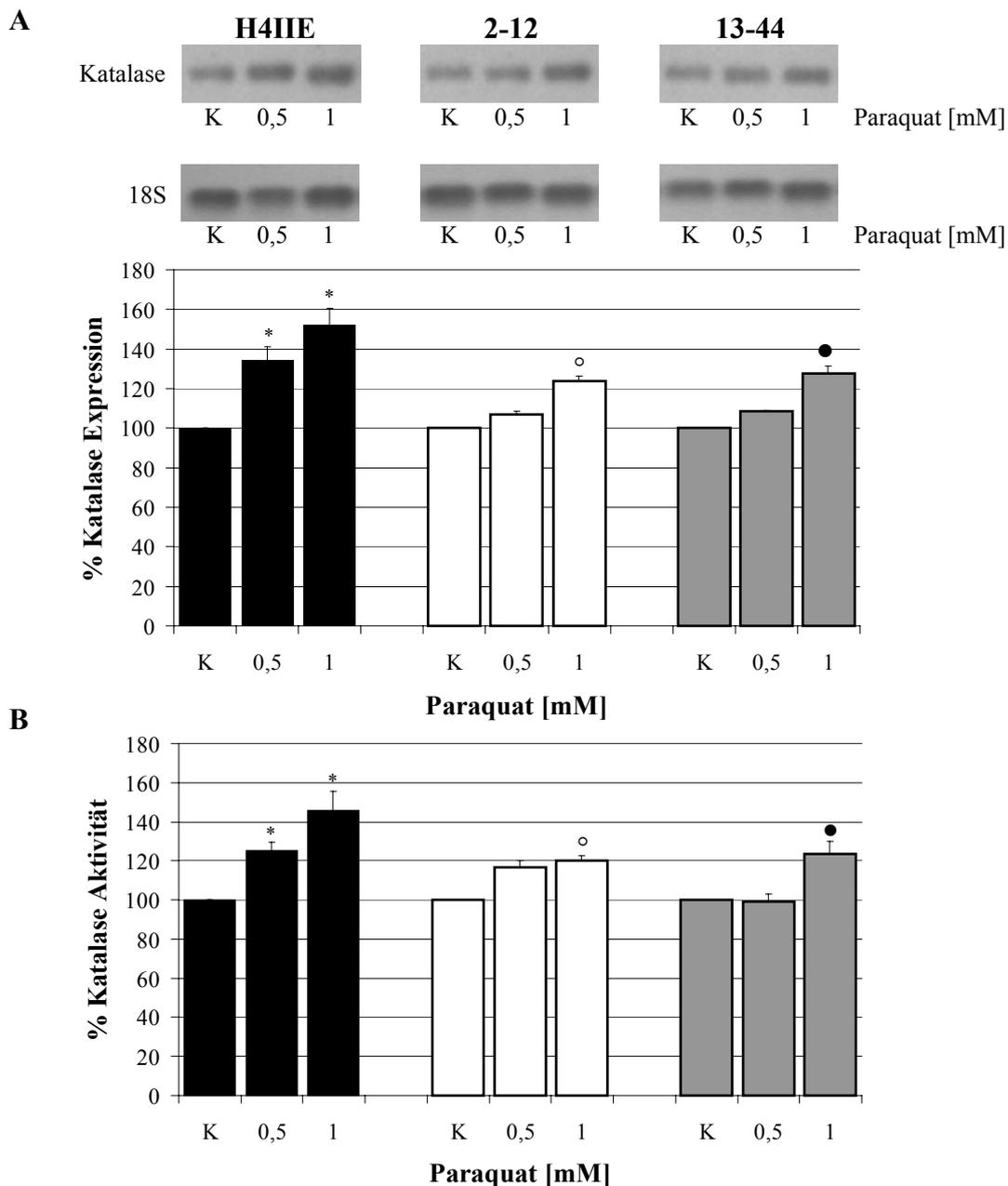


**Abb. 36: Expression der Katalase nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  kommt es bei allen Zellen zu einer Zunahme der Katalase mRNA Expression (A) und der Enzymaktivität (B). ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3-4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12, <sup>•</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Man erkennt, dass es in allen Zellen zu einem vergleichbaren Anstieg der Katalase mRNA Expression und der Katalase Aktivität kommt.

Als zweite Noxe wurde Paraquat verwendet. Die Expression der Katalase unter der Einwirkung verschiedener Paraquat-Konzentrationen wurde mittels Northern-Blot Analyse und eines Katalase Enzymassays untersucht. Abb. 37 zeigt die Zusammenfassung der Ergebnisse nach Behandlung mit Paraquat für 24 h.



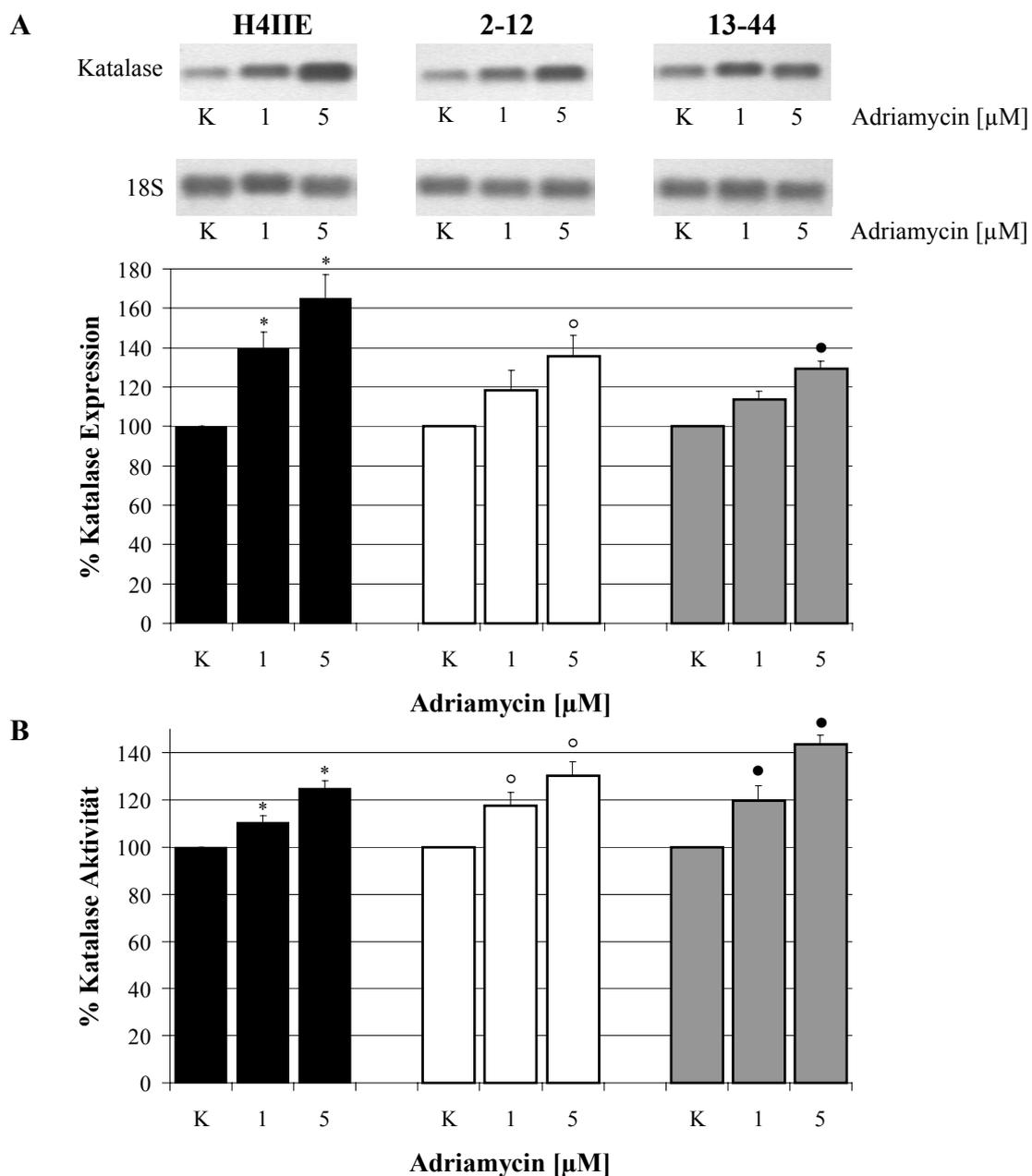
**Abb. 37: Expression der Katalase nach Behandlung mit Paraquat**

**A:** Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots zeigt, dass es in den H4IIE Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Katalase mRNA kommt. Bei den transfizierten Zellen ist erst in der höchsten Paraquat-Konzentration eine Zunahme zu erkennen. **B:** Der Katalase Aktivitätsassay zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der Katalase Aktivität in den H4IIE Zellen. Bei den transfizierten Zellen findet man eine signifikante Zunahme nur in der höchsten Paraquat-Konzentration ( $x \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE,  $^{\circ}p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12,  $^{\bullet}p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Man erkennt, dass es in den H4IIE Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg sowohl der Katalase mRNA als auch der Katalase Enzymaktivität kommt. Erst die höchste

getestete Paraquat-Konzentration von 1 mM führt in den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 zu einer Induktion der Katalase. Allerdings ist die Induktion deutlich stärker bei den H4IIE Zellen als bei den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 ausgeprägt.

Die Wirkung verschiedener Adriamycin-Konzentrationen auf die Katalase Expression wurde mittels Northern-Blot Analyse und eines Katalase Enzymassays untersucht. Abbildung 38 zeigt die densitometrische Auswertung der Katalase mRNA Expression und den Enzymaktivitätsassay nach Behandlung mit Adriamycin für 24 h.



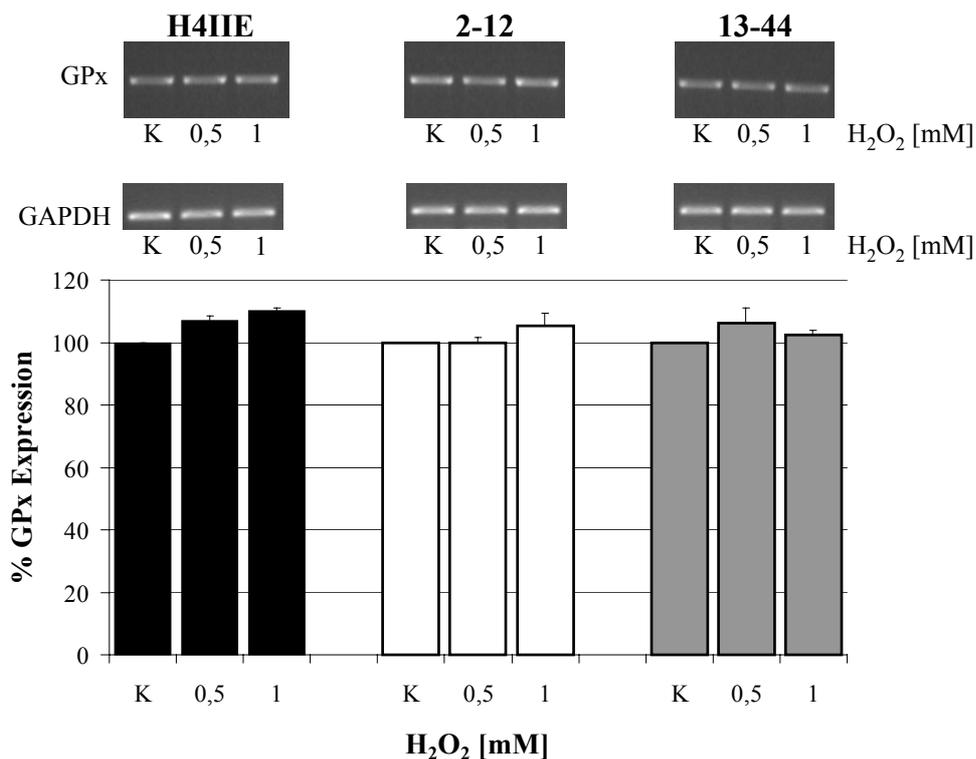
**Abb. 38: Expression der Katalase nach Behandlung mit Adriamycin**

**A:** Die densitometrische Auswertung der Northern-Blots zeigt, dass es unter dem Einfluss von Adriamycin in allen Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Katalase-mRNA kommt. **B:** Adriamycin führt bei allen Zellen zu einer dosisabhängigen Zunahme der Katalase Enzymaktivität. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, <sup>o</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12, <sup>•</sup> $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Man erkennt, dass es in allen Zellen zu einer Induktion der Katalase mRNA Expression kommt. Auch hier findet man aber eine stärkere Katalase mRNA Induktion in den H4IIE Zellen als in den transfizierten Zellen. Auf Enzymaktivitätsebene findet man nach Behandlung mit Adriamycin ebenfalls eine Zunahme der Katalase Aktivität. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle verwendeten Noxen zu einer Induktion der Katalase sowohl auf mRNA als auch auf Aktivitätsebene führten.

### 3.6.2.3 Expression der GPx nach Schädigung mit Oxidantien

Wasserstoffperoxid wird in den Zellen außer durch die Katalase auch durch ein weiteres antioxidatives Enzym abgebaut, die Glutathionperoxidase. Die Expression der Glutathionperoxidase unter der Einwirkung verschiedener Oxidantien wurde mittels RT-PCR untersucht. Abbildung 39 fasst die Ergebnisse nach Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zusammen.

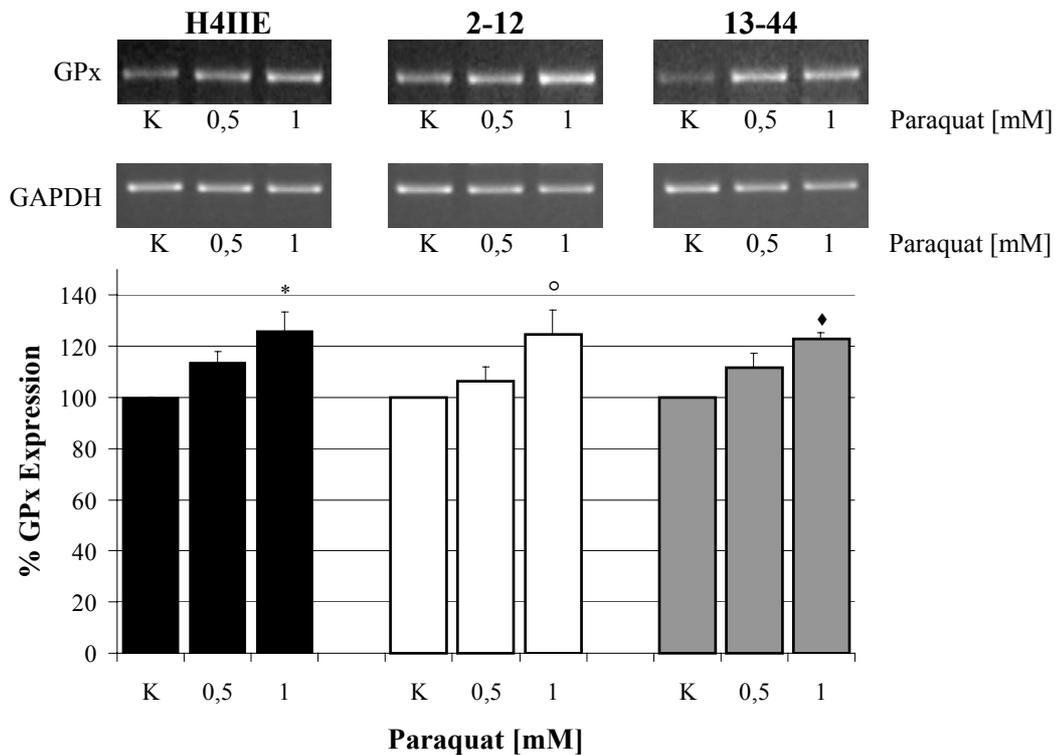


**Abb. 39: Expression der GPx nach Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu keiner Veränderung der GPx mRNA Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

Nach Schädigung mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen für 24 h findet man weder in den H4IIE Zellen noch in 2-12 und 13-44 Zellen eine Veränderung der GPx mRNA Expression.

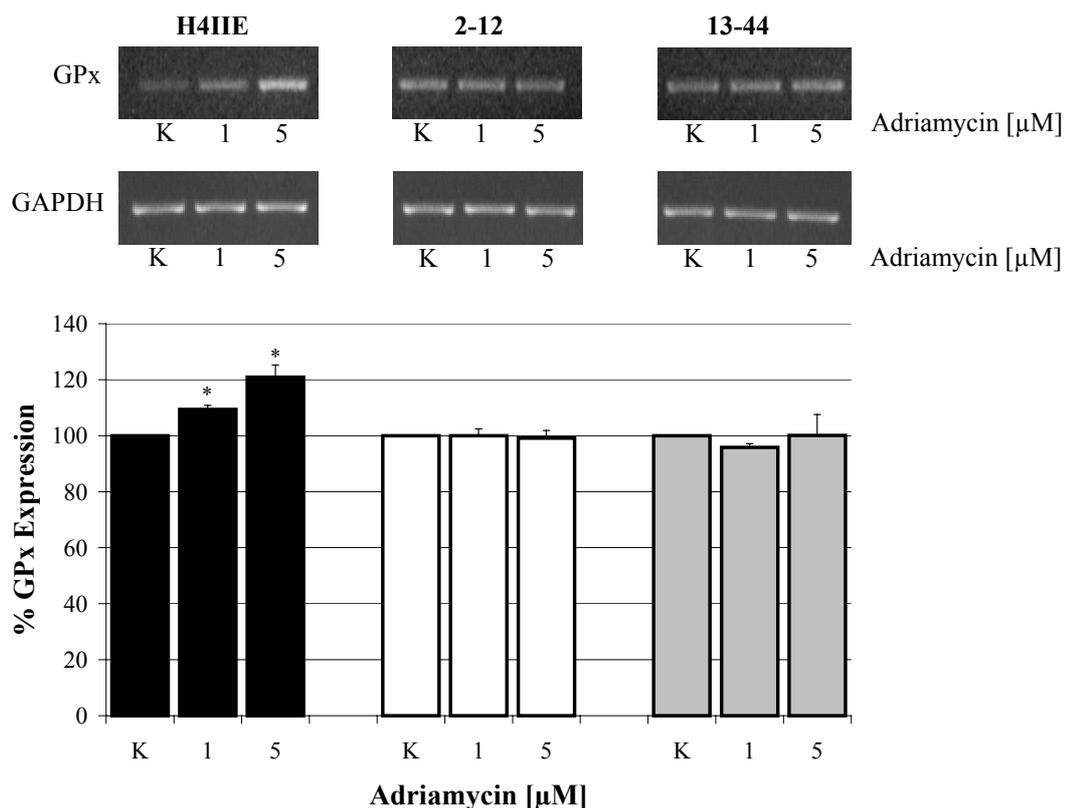
Anders sieht es dagegen nach Schädigung der Zellen mit verschiedenen Paraquat-Konzentrationen aus. In Abbildung 40 ist zu erkennen, dass es bei allen Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der GPx mRNA Expression kommt. Die höchste Induktion der GPx mRNA Expression findet man bei allen Zellen nach Schädigung mit 1 mM Paraquat für 24 h.



**Abb. 40: Expression der GPx nach Behandlung mit Paraquat**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit Paraquat zu einer Erhöhung der GPx mRNA Expression bei allen Zellen kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, ° $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12, ♦ $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Als dritte Noxe wurde Adriamycin verwendet. Die densitometrische Auswertung der RT-PCR ist in Abbildung 41 gezeigt. Man erkennt, dass es nach Schädigung mit Adriamycin nur in den H4IIE Zellen zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der GPx mRNA Expression kommt. Bei den transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 führt eine Behandlung mit Adriamycin für 24 h zu keiner Veränderung der GPx mRNA Expression.



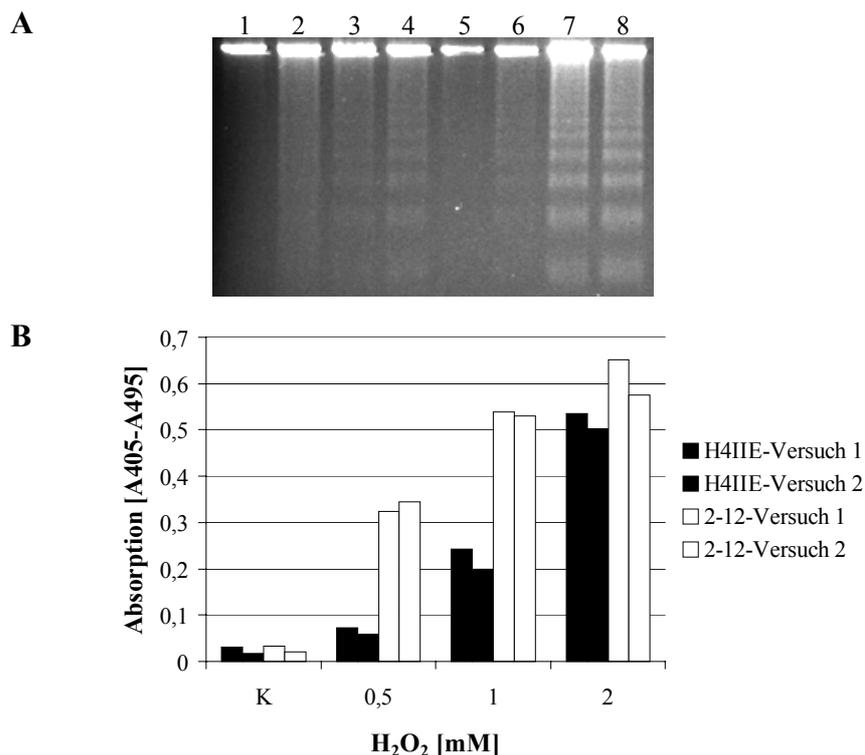
**Abb. 41: Expression der GPx nach Behandlung mit Adriamycin**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit Adriamycin zu einer Erhöhung der GPx mRNA Expression bei den H4IIE Zellen kommt. Bei den Klonen 2-12 und 13-44 wurde keine Veränderung festgestellt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es im Gegensatz zur MnSOD nach Schädigung mit verschiedenen Oxidantien zu Veränderungen in der GPx Expression kommt.  $H_2O_2$  führte in allen Zellen zu keiner Induktion der GPx mRNA. Paraquat induzierte in allen Zellen und im gleichen Ausmaß die GPx mRNA Expression, während Adriamycin nur in den nicht transfizierten H4IIE Zellen zu einer Induktion führte.

### 3.6.2.4 Apoptoseinduktion nach Schädigung mit Oxidantien

Die Ergebnisse des Neutralrot-Tests zeigten, dass Oxidantien zytotoxisch auf die hier verwendeten Zellen wirken. Um zu ermitteln, ob die zytotoxische Wirkung der Oxidantien mit der Induktion von Apoptose korreliert, wurde die DNA-Fragmentation als ein Endpunkt der Apoptose untersucht. Dafür wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Oxidantien Konzentrationen behandelt. Apoptose wurde mittels DNA-Fragmentationsanalyse und einem anti-Histon ELISA untersucht. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse nach Schädigung mit verschiedenen  $H_2O_2$  Konzentrationen zusammengefasst.

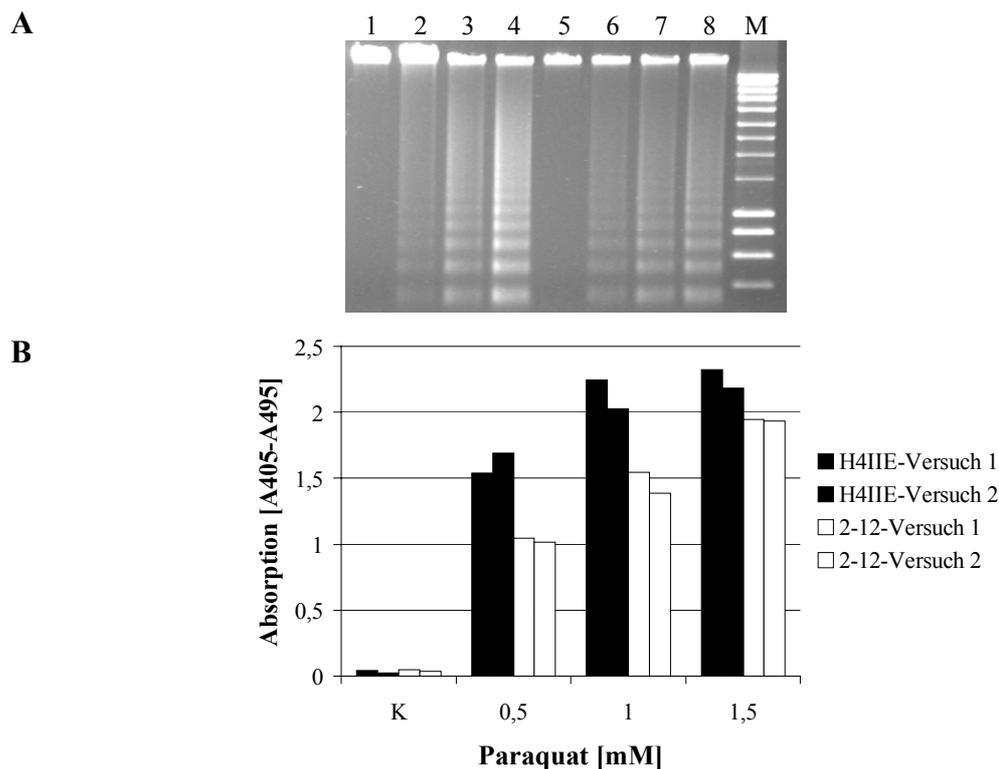


**Abb. 42: Apoptoseinduktion nach Behandlung für 24 h mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

**A: DNA-Fragmentation nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h.** Jeweils 5 µg genomische DNA wurden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. 1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3= H4IIE 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 4= H4IIE 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5= 2-12 Kontrolle, 6= 2-12 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7= 2-12 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 8= 2-12 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Fragmentation der Kern-DNA in intranukleosomale Fragmente zeigt sich in Form eines charakteristischen Leitermusters. **B: anti-Histone ELISA nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Bei den 2-12 Zellen kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Apoptoserate schon bei einer Konzentration von 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Daten im Säulendiagramm sind Werte von Duplikaten zweier unabhängiger Versuche.

Man erkennt sowohl in den H4IIE Zellen als auch in den 2-12 Zellen ab einer Konzentration von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das für Apoptose charakteristische „DNA-Leiter“ Muster. Der wesentlich sensitivere anti-Histone ELISA zeigt, dass es in den 2-12 Zellen schon ab einer Konzentration von 0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Zunahme der DNA-Fragmentation im Vergleich zu den H4IIE Zellen kommt.

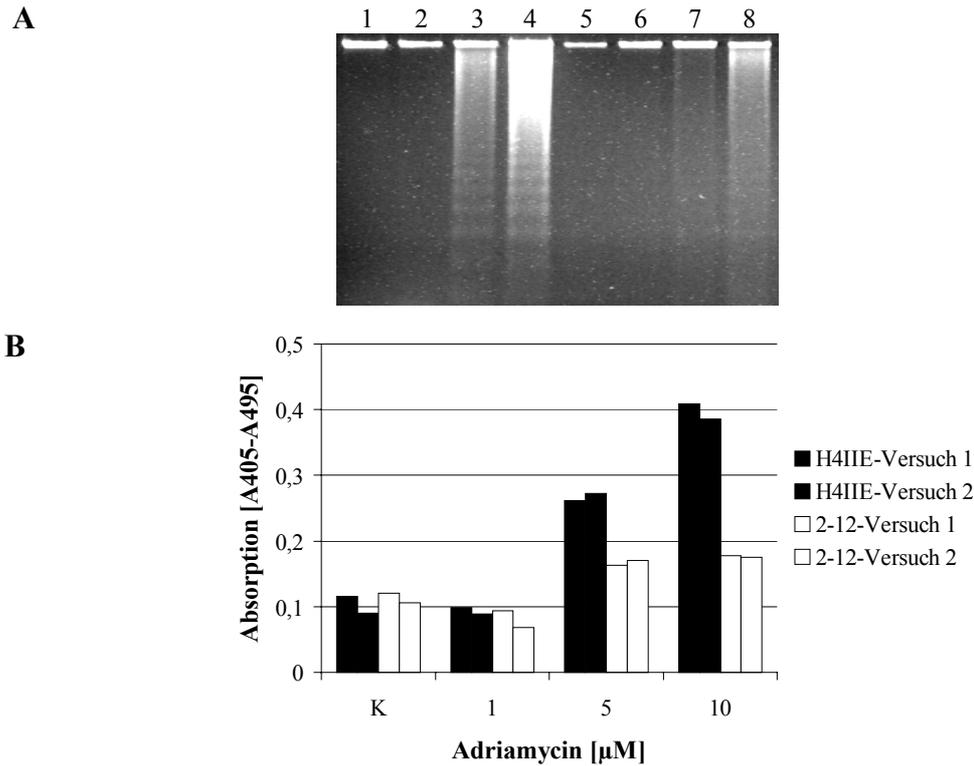
Abbildung 43 fasst die Ergebnisse nach Schädigung mit Paraquat zusammen. Nach Schädigung mit Paraquat für 24 h erkennt man in allen Zellen das für Apoptose charakteristische „DNA-Leiter“ Muster. Im Gegensatz zur Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigt sich hier eine stärkere Apoptoseinduktion in den H4IIE Zellen. Der anti-Histone ELISA bestätigte die Ergebnisse der DNA-Fragmentationsanalyse. In den H4IIE Zellen kommt es nach Schädigung mit 0,5 und 1 mM Paraquat zu einer etwas stärkeren Apoptoseinduktion als in den 2-12 Zellen.



**Abb. 43: Apoptoseinduktion nach Behandlung für 24 h mit Paraquat**

**A: DNA-Fragmentation nach Schädigung mit Paraquat für 24 h.** Jeweils 5 µg genomische DNA werden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. 1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 0,5 mM Paraquat, 3= H4IIE 1 mM Paraquat, 4= H4IIE 1,5 mM Paraquat, 5= 2-12 Kontrolle, 6= 2-12 0,5 mM Paraquat, 7= 2-12 1 mM Paraquat, 8= 2-12 1,5 mM Paraquat. Die Fragmentation der Kern-DNA in intranukleosomale Fragmente zeigt sich in Form eines charakteristischen Leitermusters. **B: anti-Histon ELISA nach Behandlung mit Paraquat.** Nach Behandlung mit Paraquat ist bei allen Zellen die charakteristische DNA-Leiter zu sehen. Allerdings ist dieser Effekt bei den H4IIE Zellen etwas deutlicher ausgeprägt als bei den 2-12 Zellen.

Als dritte Noxe wurde Adriamycin eingesetzt, um zu untersuchen, ob sie in den hier verwendeten Zellen Apoptose auslösen kann. Dafür wurden die Zellen für 24 h mit verschiedenen Adriamycin-Konzentrationen behandelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 zusammengefasst. Bei einer Konzentration von 5 µM Adriamycin erkennt man nur in den H4IIE Zellen das für Apoptose charakteristische „DNA-Leiter“ Muster. In den 2-12 Zellen sieht man erst ab einer Konzentration von 10 µM eine schwache DNA-Fragmentation. Der anti-Histon ELISA bestätigt die Ergebnisse der DNA-Fragmentationsanalyse. Nach Schädigung mit 5 µM und 10 µM Adriamycin liegt die Apoptoserate bei den H4IIE Zellen höher als bei den 2-12 Zellen. 1 µM Adriamycin führt in keiner Zelle zu einer messbaren Apoptoseinduktion.



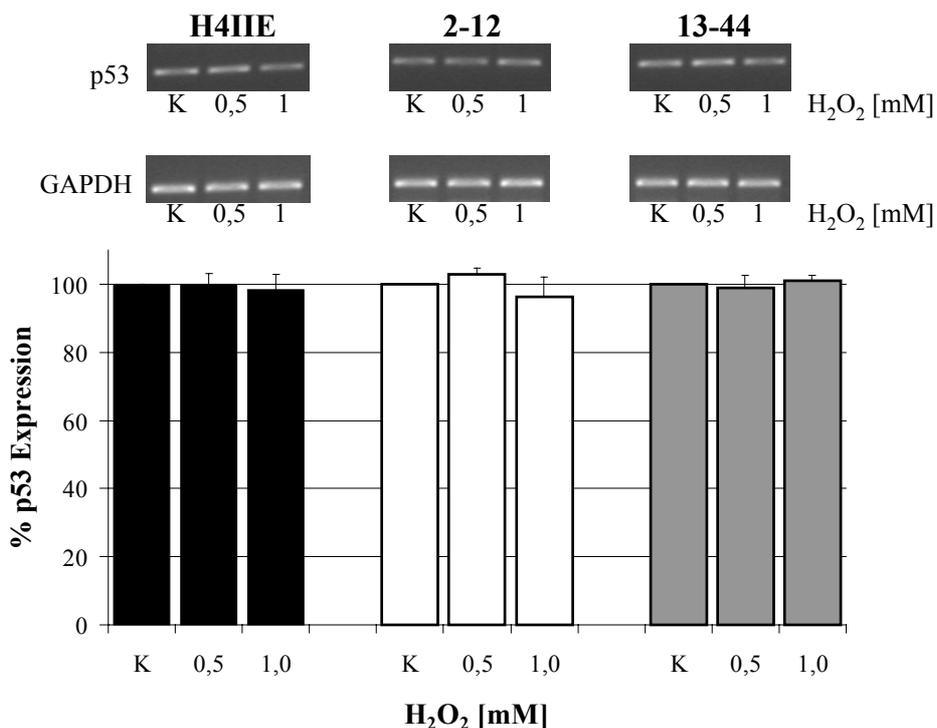
**Abb. 44: Apoptoseinduktion nach Behandlung für 24 h mit Adriamycin**

**A: DNA-Fragmentation nach Schädigung mit Adriamycin für 24 h.** Jeweils 5 μg genomische DNA werden auf einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt. 1= H4IIE Kontrolle, 2= H4IIE 1 μM Adriamycin, 3= H4IIE 5 μM Adriamycin, 4= H4IIE 10 μM Adriamycin, 5= 2-12 Kontrolle, 6= 2-12 1 μM Adriamycin, 7= 2-12 5 μM Adriamycin, 8= 2-12 10 μM Adriamycin. Die Fragmentation der Kern-DNA zeigt sich in Form eines charakteristischen Leitermusters bei den H4IIE Zellen ab 5 μM Adriamycin. Bei den 2-12 Zellen kann man erst bei der höchsten Konzentration einen leichten „DNA-Schmier“ erkennen. **B: anti-Histon ELISA nach Behandlung mit Adriamycin.** Bei den H4IIE Zellen kommt es ab 5 μM Adriamycin zu einer Zunahme der Apoptoserate. Die Klone 2-12 zeigen bei den getesteten Konzentrationen keine Erhöhung der Apoptoserate. Die Daten im Säulendiagramm sind Werte von Duplikaten von zwei unabhängigen Versuchen.

### 3.6.2.5 Expression von p53, bcl-2 und bax nach Schädigung mit Oxidantien

Im Abschnitt 3.6.2.4 wurde gezeigt, dass die Oxidantien Wasserstoffperoxid, Paraquat und Adriamycin in unterschiedlichem Ausmaß in den getesteten Zellen Apoptose induzieren können. Wird das antioxidative Schutzsystem der Zelle überlastet, kann es in Folge von oxidativem Stress zur Induktion von Apoptose kommen. Die Einleitung des apoptotischen Programms wird unter anderem durch die Mitglieder der Bcl-2 Familie und p53 reguliert. Zur Bcl-2 Familie gehören das antiapoptotisch wirkende bcl-2 mit postulierter antioxidativer Wirkung und das proapoptotisch wirkende bax. Relevant für das Überleben der Zelle ist in diesem Zusammenhang das intrazelluläre Verhältnis von bcl-2 zu bax. p53

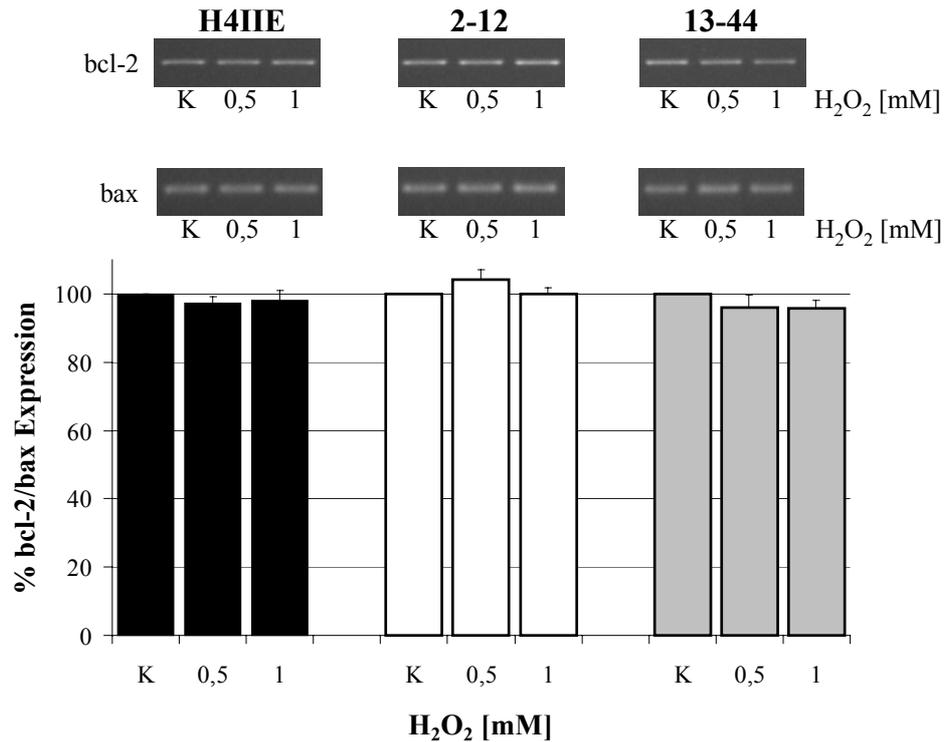
ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe von Zielgenen moduliert, die den Zellzyklus-Arrest, Apoptose und Genomstabilität regulieren. Im Folgenden wurde die Expression von bcl-2, bax und p53 nach Schädigung mit den oben genannten Prooxidantien mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Nach Schädigung der Zellen mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen konnte keine Veränderung der p53 Expression gefunden werden (Abbildung 45).



**Abb. 45: p53 mRNA Expression nach Behandlung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 24 h**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in allen Zellen zu keiner Veränderung der p53 mRNA kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

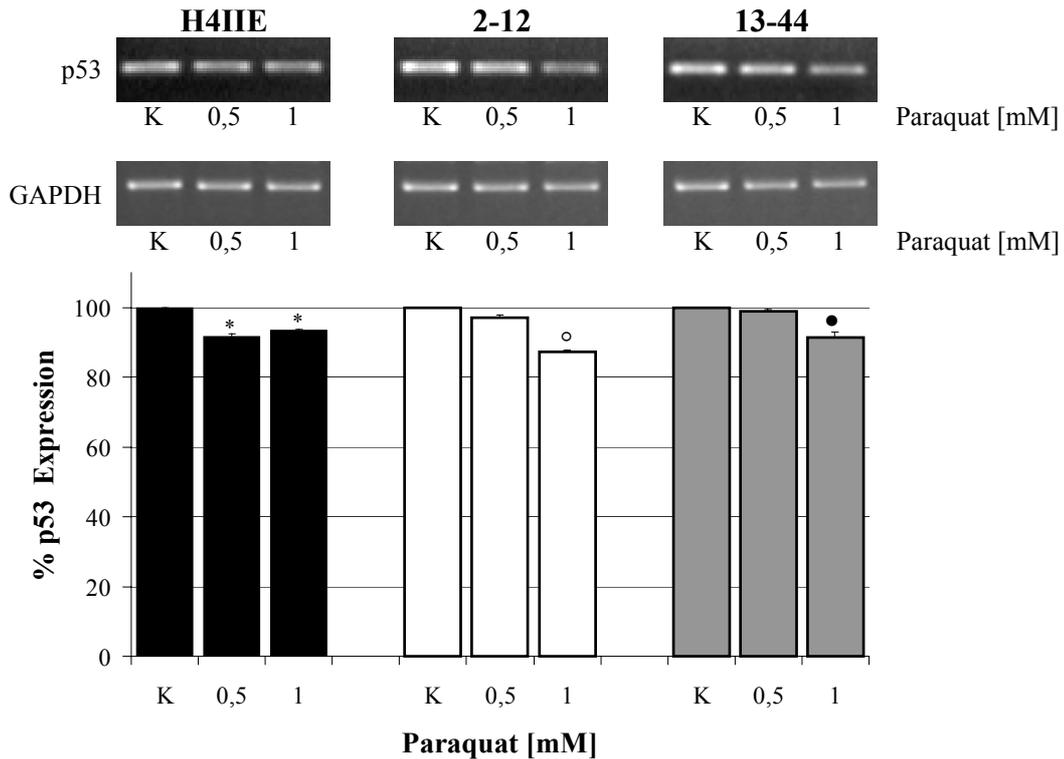
Auch die Expression von bcl-2 und bax ist nach Schädigung mit verschiedenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  Konzentrationen nicht beeinflusst. Die in Abbildung 46 dargestellte densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es auch zu keiner Veränderung des Verhältnisses von bcl-2 zu bax kommt.



**Abb. 46: Verhältnis der bcl-2/bax Expression nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 24 h**

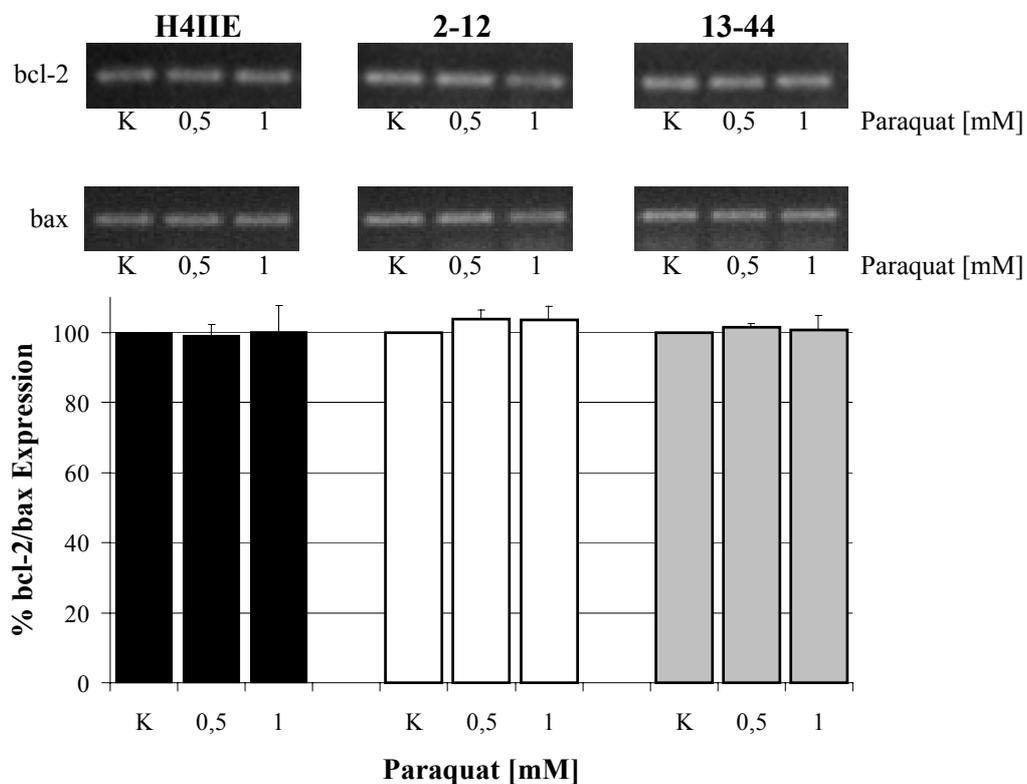
Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in allen Zellen nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu keiner Veränderung der bcl-2/bax mRNA Expression kommt ( $x \pm s$ ,  $n=4$ ).

Als Nächstes wurden verschiedene Paraquat-Konzentrationen eingesetzt und die mRNA Expression von p53, bcl-2 und bax untersucht. Nach Schädigung mit 1 mM Paraquat für 24 h kommt es in allen Zellen zu einer Reduktion der p53 Expression. In den H4IIE Zellen führten schon 0,5 mM Paraquat zu einem Abfall der p53 Expression. Im Gegensatz dazu kommt es nach Schädigung mit Paraquat zu keiner Veränderung der bcl-2 und der bax Expression. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 47 und 48 zusammengefasst.



**Abb. 47: p53 mRNA Expression nach Behandlung mit Paraquat für 24 h**

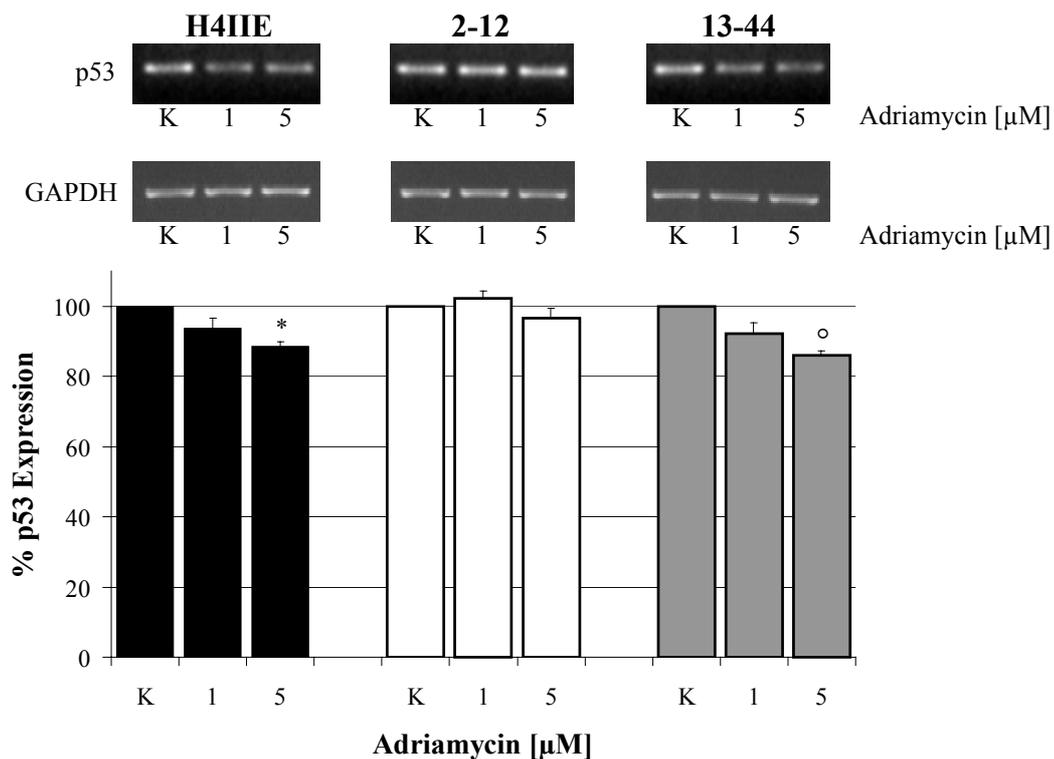
Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in allen Zellen zu einer leichten Abnahme der p53 mRNA kommt. ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ , \* $p < 0,05$  vs. Kontrolle H4IIE, ° $p < 0,05$  vs. Kontrolle 2-12, • $p < 0,05$  vs. Kontrolle 13-44).



**Abb. 48: Verhältnis der bcl-2/bax Expression nach Behandlung mit Paraquat für 24 h.**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in allen Zellen nach Schädigung mit Paraquat zu keiner Veränderung der bcl-2/bax mRNA Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

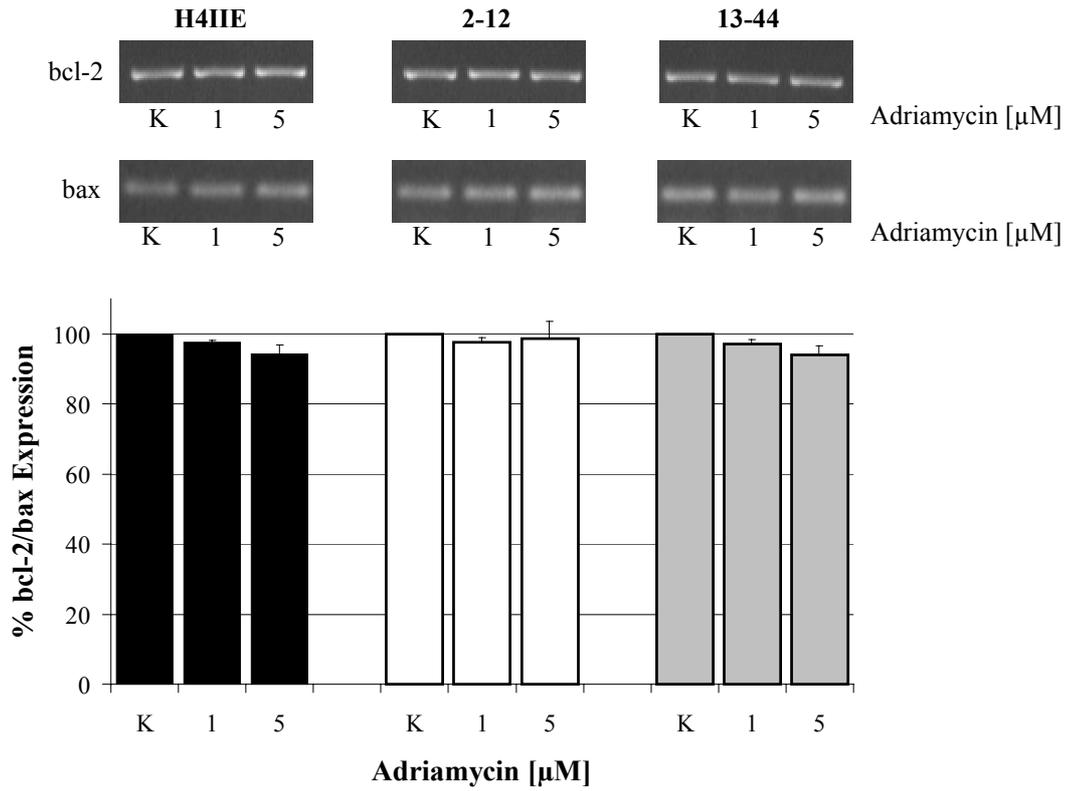
Als dritte Noxe wurde Adriamycin eingesetzt. Die densitometrische Auswertung der p53 RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit Adriamycin in den H4IIE und 13-44 Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der p53 mRNA Expression kommt. Allerdings ist dieser Effekt erst in der höchsten Adriamycin-Konzentration signifikant. Im Gegensatz dazu kommt es nach Schädigung mit Adriamycin in den 2-12 Zellen zu keiner Veränderung der p53 mRNA Expression (Abbildung 49).



**Abb. 49: p53 mRNA Expression nach Behandlung mit Adriamycin für 24 h**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es in der höchsten Adriamycin-Konzentration bei den H4IIE und den 13-44 Zellen zu einer Abnahme der p53 mRNA Expression kommt. Keine Veränderung der p53 Expression findet man dagegen in den 2-12 Zellen ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ,  $*p<0,05$  vs. Kontrolle H4IIE,  $^{\circ}p<0,05$  vs. Kontrolle 13-44).

Im Gegensatz zur p53 mRNA Expression kommt es nach Schädigung durch Adriamycin zu keiner Veränderung der bcl-2 und bax mRNA Expression. In Abbildung 50 wird die densitometrische Analyse der RT-PCR Experimente gezeigt und als Verhältnis der bcl-2/bax mRNA Expression dargestellt. Die leichte Verschiebung des bcl-2/bax Verhältnisses in den H4IIE und 13-44 Zellen in Richtung Apoptose ist nicht signifikant.



**Abb. 50 : Verhältnis der bcl-2/bax Expression nach Behandlung mit Adriamycin für 24 h**

Die densitometrische Auswertung der RT-PCR zeigt, dass es nach Schädigung mit Adriamycin zu keiner Veränderung der bcl-2/bax mRNA Expression kommt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ ).

### 3.7 Analyse TNF- $\alpha$ regulierter Gene mit Hilfe von cDNA Arrays

Die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen führte zu einer Resistenz dieser Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und zu einer veränderten Sensitivität gegenüber prooxidativ wirkenden Substanzen. Durch Einsatz der cDNA Array Technologie sollten Gene, die spezifisch durch TNF- $\alpha$  reguliert werden und die für die oben beschriebenen Veränderungen verantwortlich sein können, bestimmt werden. Der verwendete Ratten cDNA Array enthielt zwei identische Filter mit jeweils 450 Genen, die in 7 funktionelle Gruppen unterteilt werden können: a.) Onkogene, Tumorsuppressorgene, Gene zur Zellzyklus-Kontrolle, b.) Gene, die in Verbindung zu oxidativem Stress stehen, c.) Gene zur Steuerung der DNA-Reparatur, der DNA-Rekombination und der Apoptose, d.) Transkriptionsfaktoren und DNA-Bindungsproteine, e.) Rezeptoren und Zell-Adhäsionsmoleküle, f.) Gene, die in die Zell-Zell-Kommunikation involviert sind und g.) Gene, die für Enzyme kodieren, die am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind. Weiterhin waren 12 Gene ohne bekannte Funktion und 9 „housekeeping“ Gene pro Filter enthalten. Um die Genexpression zwischen den zwei Filtern vergleichen zu können, wurde das GAPDH Gen als interne Hybridisierungskontrolle zur Normierung der Filter verwendet. Von diesem Gen war durch vorherige Versuche bekannt, dass es in den H4IIE Zellen und den transfizierten 2-12 Zellen unverändert exprimiert wird. Verglichen wurde die Genexpression von H4IIE Zellen mit der Genexpression der TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen 2-12. In den Tabellen 2 und 3 werden die Ergebnisse zusammengefasst. Insgesamt werden in den 2-12 Zellen 8 Gene hochreguliert (2 bis 21fach) und 31 Gene herunterreguliert (2 bis 5fach).

Genbank #	Genname	Funktion	2-12/H4IIE*
S58528	Integrin alpha v Untereinheit	Matrix-Adhäsionsrezeptor	2,5 $\uparrow$
AF097593	N-Cadherin	Zell-Zell-Adhäsionsrezeptor	2 $\uparrow$
M81855	MDR-1	Drug-Resistance Protein	2 $\uparrow$
X66539	TNF-alpha	Zytokin	21 $\uparrow$
M61177	MAPK1	Intrazelluläre Kinase	2 $\uparrow$
M62388	“ubiquitin-conjugating enzyme”	Proteinabbau	2 $\uparrow$
D00753	Serin-Protease-Inhibitor 3	Proteaseinhibitor	2,5 $\uparrow$
AJ006070	“V(D)J recombination activating protein”	DNA-Rekombinationsprotein	2 $\uparrow$

**Tab. 2: Hochregulierte Gene in TNF- $\alpha$  überexprimierenden 2-12 Zellen**

Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Array Hybridisierungen. Werte unterhalb einer zweifachen Induktion wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. \*Mittelwert der Verhältnisse (2-12/H4IIE) von zwei unabhängigen Array Hybridisierungen.

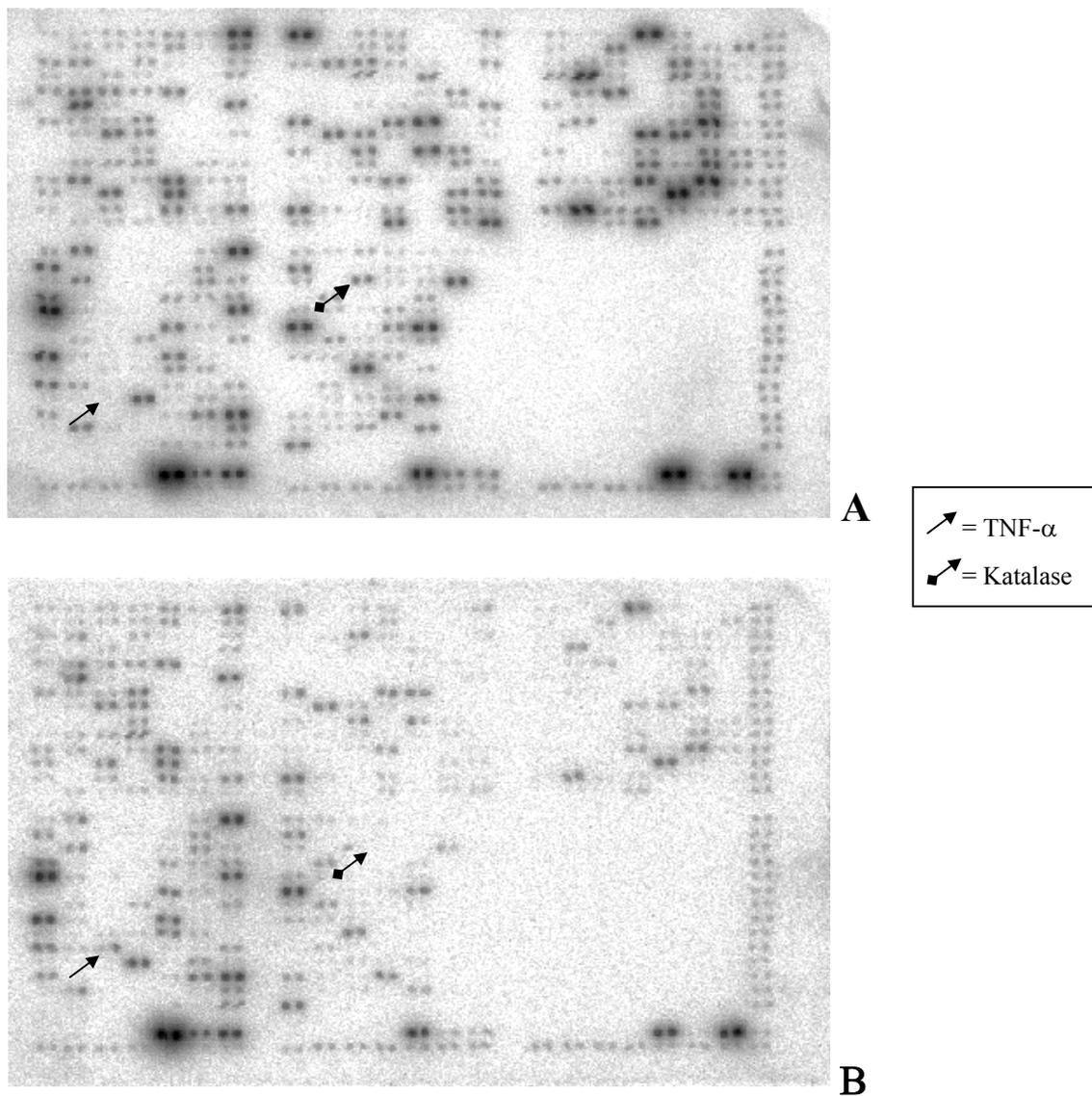
Genbank #	Genname	Funktion	H4IIE/2-12 *
J03752	Glutathion-S-Transferase (GST-12)	Fremdstoffmetabolismus	3 ↓
J02592	Glutathion-S-Transferase (GST mü)	Fremdstoffmetabolismus	4 ↓
X02904	Glutathion-S-Transferase (GST pi )	Fremdstoffmetabolismus	4 ↓
X07467	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase	Fremdstoffmetabolismus	2,5 ↓
J05181	Gamma-Glutamylcystein Synthase	Fremdstoffmetabolismus	3 ↓
U06273	UDP-Glucuronosyltransferase 2B	Fremdstoffmetabolismus	3 ↓
M18340	Tyrosin-Aminotransferase	Metabolismus	3 ↓
J03867	NADH-Cytochrom b5 Reduktase	Fremdstoffmetabolismus	2,5 ↓
X15958	mitoch. Enoyl-CoA-Hydratase	Metabolismus	3 ↓
M10161	CuZnSOD	Antioxidatives Enzym	2 ↓
M11670	Katalase	Antioxidatives Enzym	2,5 ↓
U73525	Thioredoxin-2	Antioxidatives Enzym	2,5 ↓
J00750	Metallothionein 1	Antioxidatives Protein	5 ↓
X02918	Protein-Disulfid-Isomerase	Stress Response Protein	3 ↓
M86870	„ <i>calcium-binding protein 2</i> “	Posttranslationales Modifikationsprotein	2,5 ↓
S45392	hsp90-beta	„ <i>heat-shock</i> “ Protein	2,5 ↓
A71429	hsp10	„ <i>heat-shock</i> “ Protein	3 ↓
U83843	TCPI-eta	Chaperon	3 ↓
D90345	TCPI-alpha	Chaperon	2,5 ↓
U72350	bcl-x	Antiapopt. Protein der Bcl-2 Familie	2,5 ↓
AF003523	bad	Proapopt. Protein der Bcl-2 Familie	3 ↓
U94340	PARP	Protein modifizierendes Enzym	2,5 ↓
D10554	„ <i>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i> “	Transkriptionsfaktor	2 ↓
AF090306	„ <i>retinoblastoma binding protein</i> “	Transkriptionsprotein	2,5 ↓
U65007	c-met Protooncongense	Rezeptor	2,5 ↓
J00734	Fibrinogen gamma	Akut-Phase Protein	5 ↓
D17711	„ <i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein K</i> “	RNA Prozessierungsprotein	2 ↓
X51707	RPS 19	ribosomales Protein	3 ↓
X58465	RPS 5	ribosomales Protein	5 ↓
X66370	RPS 9	ribosomales Protein	2,5 ↓
X87107	60S ribosomales Protein L6	ribosomales Protein	3 ↓

**Tab. 3: Herunterregulierte Gene in TNF- $\alpha$  überexprimierenden 2-12 Zellen.**

Die Ergebnisse sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Array Hybridisierungen. Werte unterhalb einer zweifachen Reduktion wurden nicht in die Tabelle aufgenommen. \* Mittelwert der Verhältnisse (H4IIE/2-12) von zwei unabhängigen Array Hybridisierungen.

Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Durchführung der Array Hybridisierung diente die Expression von TNF- $\alpha$ . Wie erwartet, wurde TNF- $\alpha$  in den 2-12 Zellen 21fach stärker exprimiert als in den H4IIE Zellen. Das ist gleichzeitig auch die deutlichste Veränderung,

die in diesen Experimenten gefunden wurde. Zusätzlich befanden sich auf der Array-Membran die in dieser Arbeit bereits untersuchten antioxidativen Enzyme MnSOD, CuZnSOD, Katalase und Glutathionperoxidase. Die Auswertung des cDNA Arrays bestätigte die unter 3.4.5 beschriebenen Ergebnisse. Es wurde auch hier kein Unterschied in der MnSOD und der Glutathionperoxidase Expression zwischen H4IIE und 2-12 Zellen gefunden. Zudem konnte bestätigt werden, dass in den 2-12 Zellen sowohl die Katalase als auch die CuZnSOD niedriger exprimiert wird als in den H4IIE Zellen. Tabelle 2 und 3 enthalten insgesamt 39 differentiell regulierte Gene. Es fällt auf, dass die Array Analyse eine asymmetrische Verteilung von induzierten zu reprimierten Genen ergab. So waren in den stabil transfizierten 2-12 Zellen im Vergleich zu den H4IIE Zellen nur 8 Gene induziert, aber 31 Gene herunterreguliert. Tabelle 2 und 3 enthalten eine Reihe von Genen, deren Beteiligung an der TNF- $\alpha$  Signaltransduktionskaskade bekannt ist. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem *bcl-x* und *bad* (Mitglieder der Bcl-2 Familie), das „*heat-shock*“ Protein HSP90, PARP und Thioredoxin. Auf der anderen Seite sind in den Tabellen 2 und 3 auch differentiell regulierte Gene zu finden, für die bis jetzt noch keine Verbindung zur TNF- $\alpha$  Signaltransduktionskaskade bekannt ist. Dazu gehören unter anderem das „*retinoblastoma binding protein*“, die vier ribosomalen Proteine oder das Fibrinogen gamma. Auffällig ist außerdem, dass eine Reihe von Genen differentiell reguliert werden, die eine Rolle im Fremdstoffmetabolismus spielen. Zu dieser Gruppe gehören drei verschiedene Glutathion-S-Transferasen, die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, die UDP-Glucuronosyltransferase 2B, die Gamma-Glutamylcystein Synthase und die NADH-Cytochrom b5 Reduktase. Alle diese Gene sind in den 2-12 Zellen niedriger exprimiert als in den H4IIE Zellen. In der Liste der 39 differentiell exprimierten Genen befinden sich nur zwei Transkriptionsfaktoren, der „*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*“ und das „*retinoblastom binding protein*“. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und sein Inhibitor I $\kappa$ B, die eine zentrale Rolle in der TNF- $\alpha$  Signaltransduktionskaskade spielen, waren nicht auf den Array Filtern enthalten. In Abbildung 51 werden repräsentative Bilder der Ratten cDNA-Arrays gezeigt. Durch Pfeile markiert sind die Gene für TNF- $\alpha$  und Katalase.



**Abb. 51: Repräsentative Bilder der Ratten cDNA-Arrays**

Die cDNA Array-Filter wurden mit jeweils 5  $\mu\text{g}$   $^{32}\text{P}$ -markierter Probe hybridisiert. Nach  $\approx 1\text{h}$  Inkubation bei  $68^\circ\text{C}$  und mehreren Waschschriften folgte die Exposition auf Röntgenfilmen. Zwei differentiell exprimierte Gene (TNF- $\alpha$  und Katalase) sind durch Pfeile an den entsprechenden Positionen der beiden Filter markiert. **A:** Hybridisierung mit Gesamt-mRNA aus H4IIE Zellen. **B:** Hybridisierung mit Gesamt-mRNA aus 2-12 Zellen.

## 4. Diskussion

### 4.1 Herstellung stabil transfizierter Zellen

Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  gehört zu einer wachsenden Familie von Liganden, die ihre Wirkung über die Bindung spezifischer Oberflächenrezeptoren vermitteln. Nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor kommt es zu einer Rekrutierung von Adaptermolekülen, die Caspasen und andere proapoptotische Signale aktivieren und zum Zelltod führen können. TNF- $\alpha$  kann aber auch über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor, eine Vielzahl von Genen regulieren. Viele dieser Gene wirken der proapoptotischen Wirkung von TNF- $\alpha$  entgegen und führen zu einem Schutz der Zelle gegenüber der zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$ . Ein durch TNF- $\alpha$  induziertes Gen ist die manganhaltige Superoxiddismutase (MnSOD) (Wong *et al.*, 1989). Die MnSOD, die zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen der Zelle gehört, ist in den Mitochondrien lokalisiert und wandelt Sauerstoffanionen zu Wasserstoffperoxid um. Die in vielen Zellen beobachtete Induktion der MnSOD durch TNF- $\alpha$  (Perera *et al.*, 1995; Warner *et al.*, 1996; El-Bahay *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000) und eine Reihe von weiteren Hinweisen deuten darauf hin, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als ein Mechanismus der TNF- $\alpha$  vermittelten Zytotoxizität angesehen werden kann (Schulze-Osthoff *et al.*, 1992; Goossens *et al.*, 1999b). Entzündungsmediatoren, einschließlich Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies, werden mit einer Reihe von chronischen Lebererkrankungen in Verbindung gebracht (Koziel, 1999). Hepatozyten selbst wurden dabei lange Zeit als Zielzellen und nicht als Produzenten dieser Mediatoren angesehen. Es konnte aber gezeigt werden, dass Hepatozyten eine Reihe von verschiedenen Zytokinen, unter anderem auch TNF- $\alpha$ , selbst produzieren können (Gonzales-Amaro *et al.*, 1994; Sueoka *et al.*, 1997; El-Bahay *et al.*, 1999). Da Hepatozyten in Kultur nicht oder sehr wenig proliferieren, wurde die Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE als Modellsystem für die Experimente dieser Arbeit verwendet. Es sollte die Rolle von endogen produziertem TNF- $\alpha$  in Leberzellen untersucht werden. Nach der von uns formulierten Arbeitshypothese sollten Leberzellen, die selbst TNF- $\alpha$  produzieren, sowohl gegenüber exogenem TNF- $\alpha$ , als auch gegenüber anderen oxidativ wirkenden Substanzen geschützt sein. Aus der Literatur war bekannt, dass Zellen, die TNF- $\alpha$  exprimieren, nicht nur resistent gegenüber TNF- $\alpha$  sind, sondern auch gegenüber Adriamycin, einem Zytostatikum, welches im

Rahmen eines Redoxzyklus reaktive Sauerstoffspezies in den Zellen bildet (Maeda *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1996). Um unsere Hypothese zu überprüfen, wurden die Ratten-Hepatomazellen H4IIE stabil mit Ratten TNF- $\alpha$  cDNA transfiziert. Die ersten Transfektionsversuche, in denen die TNF- $\alpha$  cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert wurde, der einen konstitutiven Promotor und eine Zeocin-Resistenz als Selektionsmarker enthielt, führten nicht zu dem gewünschten Ergebnis. Für das Scheitern dieser Experimente können zwei Gründe angeführt werden. Zum einen kommt es unter dem Einfluss des konstitutiven Promotors wahrscheinlich bereits kurz nach der Transfektion zu einer massiven Produktion von TNF- $\alpha$  in den Zellen, die unter der zytotoxischen Wirkung des produzierten TNF- $\alpha$  absterben, bevor sie Adaptationsmechanismen in Gang setzen können. Ein weiterer Grund könnte die Verwendung von Zeocin als Selektionsmarker sein. Die Wirkung des Antibiotikums Zeocin beruht, ähnlich wie die der Anthracyclin-Derivate, auf der Interkalation in die DNA und auf der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Insgesamt muss deshalb die Kombination der Antibiotikaselektion mit Zeocin und der Expression des zytotoxisch wirkenden TNF- $\alpha$  als kritisch betrachtet werden.

Um die H4IIE Zellen stabil mit TNF- $\alpha$  zu transfizieren, musste deshalb ein anderes Expressionssystem eingesetzt werden. Es wurde ein reguliertes Genexpressionssystem verwendet, das von Gossen und Bujard, 1992 entwickelt worden ist. Dabei wurde die TNF- $\alpha$  cDNA „*downstream*“ eines Tetracyclin-responsiven Promotors kloniert. Dieser Promotor steht unter der Kontrolle eines Transkriptionsfaktors, der sich auf einem separaten Vektor (pTet-Off bzw. pTet-On) befindet und dessen Expression durch An- oder Abwesenheit von Doxycyclin reguliert wird. Dadurch kann man die Expression des zytotoxischen Produktes auf dem pTRE Vektor durch Zugabe von Doxycyclin in das Kulturmedium regulieren. Allerdings müssen zwei aufeinanderfolgende stabile Transfektionen durchgeführt werden, so dass dieses System mit erheblich größerem Aufwand etabliert werden muss. Die mit diesem regulierten Genexpressionssystem durchgeführten Transfektionsexperimente führten nach mehreren Selektionsschritten zu 48 stabil mit TNF- $\alpha$  transfizierten Zellklonen. Bei sechs dieser Klone konnte die TNF- $\alpha$  Produktion zunächst durch Doxycyclin reguliert werden. Nach 3-4 Zellpassagen hörten diese Zellklone auf, TNF- $\alpha$  zu produzieren. Denkbare Erklärungen wären zum einen, dass diese Zellklone den Expressionsvektor mit der Sequenz für das toxische Genprodukt aus ihrem Genom heraus schneiden und so verlieren, zum anderen, dass es zu einer

Inaktivierung des Expressionsvektors kommt. Diese Klone wurden aber nicht weiter untersucht, so dass eine experimentelle Verifizierung dieser Vermutungen nicht möglich ist. Zwei Klone (2-12 und 13-44) produzierten konstitutiv TNF- $\alpha$ , wobei die sezernierte TNF- $\alpha$  Menge nicht durch Doxycyclin verändert werden konnte. Vermutlich kam es in diesen beiden Fällen zu einer Integration des Expressionsvektors in räumlicher Nähe zu einem starken Enhancer-Element, so dass die Expression von TNF- $\alpha$  durch dieses Enhancer-Element und nicht durch das Regulatorplasmid (pTet-Off bzw. pTet-On) erfolgt. Die Tatsache, dass insgesamt nur zwei Klone isoliert werden konnten, die TNF- $\alpha$  exprimieren, zeigt, dass es sehr schwierig ist, stabil transfizierte Zellen zu isolieren, die ein Produkt mit einer hohen zytotoxischen Potenz wie die von TNF- $\alpha$  exprimieren sollen.

## 4.2 Charakterisierung der stabil transfizierten Zellen

Ein Ziel diese Arbeit war es, die Wirkung von endogenem TNF- $\alpha$  auf die Sensitivität von Leberzellen gegenüber prooxidativ wirkenden Substanzen zu untersuchen. Als Modellsystem wurden die Hepatomzellen H4IIE verwendet. H4IIE Zellen sind relativ gut differenziert und zeigen eine Reihe von Ähnlichkeiten mit Hepatozyten. Es existieren aber in der Literatur keine Informationen über die Expression von TNF- $\alpha$  in dieser Zelllinie. Die hier durchgeführten Experimente zeigen, dass H4IIE Zellen kein TNF- $\alpha$  exprimieren; dies wurde auf mRNA Ebene mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Auch mit Hilfe eines L929 Bioassays und eines TNF ELISA's konnte bei den H4IIE Zellen keine TNF- $\alpha$  Expression gefunden werden. Wie erwartet, sezernieren dagegen die beiden isolierten Klone TNF- $\alpha$ . Die Quantifizierung der sezernierten TNF- $\alpha$  Menge mit einem TNF ELISA ergab höhere TNF- $\alpha$  Konzentrationen als mit dem L929 Bioassay. Beide Methoden zeigen aber, dass die 2-12 Zellen um den Faktor 10 mehr TNF- $\alpha$  sezernieren als die 13-44 Zellen. Die Unterschiede in den mit den beiden Methoden bestimmten Konzentrationen ergeben sich dadurch, dass der ELISA das gesamte sezernierte TNF- $\alpha$  erfasst, während man mit dem L929 Bioassay nur das biologisch aktive TNF- $\alpha$  bestimmt; denn TNF- $\alpha$  kann erst nach Trimerisierung an den TNF-Rezeptor binden und seine Wirkung auf die Zielzellen ausüben.

Wie bereits erwähnt, vermittelt TNF- $\alpha$  seine Wirkung auf die Zielzellen, indem es an membranständige Rezeptoren bindet. Es existieren zwei TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2), die eine strukturelle Homologie aufweisen, aber funktionell unterschiedlich sind

(Goeddel, 1999). Der membranständige TNF-R1 ist ein 55 kD Protein mit einer zytoplasmatischen „*death domain*“. Nach Bindung von TNF- $\alpha$  an den Rezeptor kommt es zu einer Anlagerung von Adaptermolekülen an die „*death domain*“ und so zur Aktivierung einer Signalkaskade, die entweder zur Zellproliferation, zur Zytoprotektion oder zur Apoptoseinduktion führen kann (Schumann und Tiegs, 1999). Der TNF-R2 gehört auch zur TNF-Rezeptor Familie und ist ein 75 kD membranständiges Protein. Im Gegensatz zum TNF-R1 besitzt der TNF-R2 keine zytoplasmatische „*death domain*“ und seine genaue Funktion ist unklar. Nach dem „*ligand passing*“ Modell dient der TNF-R2 zur Akkumulation von TNF- $\alpha$ , um dann das TNF- $\alpha$  an den TNF-R1 weiterzuleiten (Tartaglia *et al.*, 1993). Ein anderes Konzept („*cooperative signaling*“) geht davon aus, dass der TNF-R2 den durch den TNF-R1 eingeleiteten Prozess der Zytotoxizität weiter potenziert (Grell *et al.*, 1995a,b). Nach diesem Modell führt die Bindung von TNF- $\alpha$  an den TNF-R2 auch hier zu einer Anlagerung von Adaptermolekülen u.a. von TRAF2. TRAF2 wird nach Anlagerung an den TNF-R2 degradiert und steht nicht mehr ausreichend zur Verfügung, um sich an der zytoprotektiven Signalkaskade von TNF-R1 zu beteiligen. Folglich kommt es zu einer Umleitung der Signaltransduktion in Richtung Zelltod (Weiss *et al.*, 1998; Duckett and Thompson, 1997). Da die TNF-Rezeptoren eine essentielle Rolle bei der Vermittlung der biologischen Wirkung von TNF- $\alpha$  spielen, wurde die Expression dieser Rezeptoren in den hier verwendeten Zellen mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Es stellte sich heraus, dass die H4IIE Zellen und die Klone 2-12 und 13-44 den TNF-R1 exprimieren, aber nicht den TNF-R2. Im Gegensatz dazu besitzen primäre Rattenhepatozyten beide TNF-Rezeptoren. In der Literatur wird beschrieben, dass der TNF-R1 konstitutiv in den meisten Zellen exprimiert wird (Magnusson und Vaux, 1999; Luster *et al.*, 1999), während der TNF-R2 oft in Endothel- und hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Helms *et al.*, 2001). Die durch stabile Transfektion erreichte Überexpression von TNF- $\alpha$  beeinflusste in unseren Untersuchungen die Expression der TNF-Rezeptoren nicht.

TNF- $\alpha$  ist ein proinflammatorisches Zytokin mit einer Vielzahl von biologischen Wirkungen. Neben seiner zytotoxischen Wirkung kann TNF- $\alpha$  unter anderem auch eine Reihe von Genen induzieren, die eine Rolle bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen spielen (Beyaert und Fiers, 1998). Es wurde deshalb untersucht, ob sich die transfizierten Klone 2-12 und 13-44, die TNF- $\alpha$  exprimieren, von den H4IIE Zellen in ihrem Proliferationsverhalten unterscheiden. Es stellte sich heraus, dass die Expression von

TNF- $\alpha$  keine Veränderung der Proliferation in den untersuchten Zellen verursacht. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur. So führte auch die Transfektion von Lymphozyten (Tashiro *et al.*, 1993) und die Transfektion von Melanomzellen (Yanneli *et al.*, 1993) mit TNF- $\alpha$  zu keiner Veränderung des Zellwachstums.

Die Ergebnisse einer Vielzahl von Untersuchungen legen nahe, dass oxidativer Stress an der TNF- $\alpha$  vermittelten Zytotoxizität beteiligt ist. So wurde gezeigt, dass Schädigung von Zellen mit TNF- $\alpha$  zu einer Induktion von ROS führt (Yamauchi *et al.*, 1989; Hennet *et al.*, 1993) und dass die TNF- $\alpha$  induzierte Zytotoxizität durch Antioxidantien oder anaerobe Bedingungen inhibiert werden kann (Matthews *et al.*, 1987). Zellen sind mit umfassenden antioxidativen Schutzmechanismen ausgestattet, die ROS direkt abfangen und inaktivieren können. Zu diesen gehören auch die antioxidativen Enzyme MnSOD, CuZnSOD, Katalase und Glutathionperoxidasen. Die MnSOD ist in den Mitochondrien lokalisiert und wandelt Sauerstoffanionen zu Wasserstoffperoxid um. Eine Reihe von Untersuchungen zeigten, dass TNF- $\alpha$  die MnSOD induziert und dass eine Überexpression der MnSOD zu einem Schutz vor der zytotoxischen Wirkung von TNF- $\alpha$  führt (Wong und Goeddel, 1988; Wong *et al.*, 1989; Hirose *et al.*, 1993). Ausgehend von diesen Informationen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Leberzellen, die selbst TNF- $\alpha$  produzieren, sich vor der zytotoxischen Wirkung des eigenen TNF- $\alpha$  durch Induktion der MnSOD schützen und dass diese Zellen auch einen besseren Schutz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und möglicherweise gegenüber anderen Substanzen haben, die oxidativen Stress verursachen. Aus diesem Grund wurde die basale Expression der MnSOD in den H4IIE Zellen und den transfizierten Klonen 2-12 und 13-44 mit Hilfe der RT-PCR und der Western-Blot Analyse untersucht. Es wurden keine Unterschiede in der basalen Expression der MnSOD, weder auf mRNA Ebene noch auf Proteinebene zwischen den untersuchten Zellen gefunden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen an anderen Zelltypen von Watanabe und Mitarbeitern, 1996. Diese berichteten, dass die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in Pankreaszellen zu einer Zunahme der basalen MnSOD Enzymaktivität in den transfizierten Zellen führt. Die gleiche Gruppe konnte zeigen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in Fibroblasten und in HeLa-Zellen zu einer Induktion der basalen MnSOD Aktivität führt (Maeda *et al.*, 1994).

In Zusammenhang mit TNF- $\alpha$  konzentriert sich in der Literatur das Interesse auf die Expression der MnSOD, so dass es kaum Untersuchungen über Veränderungen bei anderen antioxidativen Enzymen gibt. Da die Wirkung des TNF- $\alpha$  mit der Produktion von

ROS einhergeht, könnte man auch bei diesen Enzymen bei Überexpression von TNF- $\alpha$  im Sinne einer Adaptation eine Induktion erwarten. Auch hier wurde jedoch diese Erwartung nicht erfüllt. Die transfizierten Klone 2-12 und 13-44 haben im Vergleich zu den H4IIE Zellen sogar eine niedrigere basale Expression der CuZnSOD und der Katalase. Sie unterscheiden sich aber nicht in der Expression der Glutathionperoxidase.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in den Ratten Hepatomzellen zur Herunterregulierung der basalen Expression der Katalase und der CuZnSOD geführt hat, während die Expression der MnSOD und der Glutathionperoxidase nicht verändert ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Haupthypothese zur TNF- $\alpha$  Resistenz, nämlich die Induktion der MnSOD durch TNF- $\alpha$  so nicht stimmen kann. Zumindest in diesem Zellmodell müssen noch weitere Faktoren zur Resistenz gegenüber der TNF- $\alpha$  vermittelten Zytotoxizität beitragen. Die Rolle der Katalase bei der Resistenz gegenüber TNF- $\alpha$  muss noch genauer untersucht werden.

#### **4.2.1 Viabilität und Expression von AOE nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$ und Adriamycin**

Nach der in dieser Arbeit formulierten Hypothese sollten TNF- $\alpha$  überexprimierende Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und prooxidativ wirkenden Substanzen geschützt sein. Neben TNF- $\alpha$  wurden im Rahmen dieser Arbeit drei weitere prooxidativ wirkende Substanzen untersucht. Auf der einen Seite wurde Wasserstoffperoxid als direkter Mediator von oxidativem Stress verwendet. Auf der anderen Seite wurden Paraquat, ein Kontaktherbizid, und Adriamycin, ein Zytostatikum, eingesetzt, die beide im Rahmen eines intrazellulären Redoxzyklus Sauerstoffradikale erzeugen. Die Sensitivität der transfizierten Zellen und der nicht transfizierten H4IIE Zellen gegenüber prooxidativ wirkenden Substanzen wurde mit dem Neutralrot-Test untersucht.

Wie erwartet, stellte sich heraus, dass die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen weniger sensitiv gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$  sind als die nicht transfizierten H4IIE Zellen. Nach Schädigung mit 25 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 h kommt es in den H4IIE Zellen zu einem massiven Zelltod, während die transfizierten Zellen komplett geschützt sind. Nach Schädigung mit 50 ng/ml TNF- $\alpha$  kann man erste Zytotoxizitätseffekte bei Klon 13-44 beobachten, jedoch nicht bei Klon 2-12. Dies bedeutet, dass die Zellen, die selbst am meisten TNF- $\alpha$  produzieren, auch am besten

gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$  geschützt sind. Auch gegenüber Adriamycin sind die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen weniger empfindlich als die nicht transfizierten H4IIE Zellen. Im Gegensatz zur kompletten Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  verursacht aber die Überexpression von TNF- $\alpha$  nur eine partielle Resistenz gegenüber Adriamycin. Diese Ergebnisse bestätigen unsere Hypothese und vorherige Beobachtungen an anderen Zelltypen, dass endogenes TNF- $\alpha$  sowohl eine Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  (Niitsu *et al.*, 1988; Himeno *et al.*, 1990; Okamoto *et al.*, 1992) als auch gegenüber Adriamycin (Maeda *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1996; Zyad *et al.*, 1994) induzieren kann.

Bei den mechanistischen Erklärungen, die in der Literatur für diese Resistenz diskutiert werden, spielt die MnSOD eine zentrale Rolle. Man geht davon aus, dass es eine Korrelation zwischen Adriamycin-Sensitivität, endogener TNF- $\alpha$  Expression und MnSOD Aktivität gibt. Die dahinterstehende Vorstellung ist, dass das endogen produzierte TNF- $\alpha$  eine Induktion der MnSOD bewirkt und dass diese dann die durch Adriamycin oder exogenes TNF- $\alpha$  gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies abfängt (Watanabe *et al.*, 1998). Tatsächlich führte die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in den oben zitierten Untersuchungen zu einer Induktion der basalen MnSOD Expression. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Zellen zeigen aber keine Veränderung der basalen MnSOD Expression nach Transfektion mit TNF- $\alpha$ . Bei der Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und gegenüber Adriamycin müssen demnach noch weitere Faktoren neben der MnSOD wirksam sein. Aus diesem Grund wurde als Nächstes die Expression der antioxidativen Enzyme nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin untersucht. Es stellte sich heraus, dass es weder in den H4IIE Zellen noch in den transfizierten Zellen nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  und nach Schädigung mit Adriamycin zu einer Veränderung der MnSOD Expression kommt. Dies ist insbesondere für TNF- $\alpha$  sehr erstaunlich, da es eine Vielzahl von Untersuchungen gibt, die zeigen, dass TNF- $\alpha$  eine Induktion der MnSOD mRNA und auch der MnSOD Aktivität auslöst (Wong und Goeddel, 1988; Himeno *et al.*, 1990; Siemankowski *et al.*, 1999). Auch Untersuchungen im eigenen Labor an primären Rattenhepatozyten zeigten eine Induktion der MnSOD mRNA nach Behandlung mit TNF- $\alpha$  (El Bahay *et al.*, 1999). Nach Schädigung von primären Rattenhepatozyten mit Adriamycin fanden Roehrdanz *et al.*, 2000 eine Abnahme der MnSOD mRNA Expression, die allerdings mit einer starken Transkriptionshemmung durch Adriamycin einhergeht. Der Mechanismus der MnSOD Induktion durch TNF- $\alpha$  ist

nicht vollständig aufgeklärt. Man geht davon aus, dass TNF- $\alpha$  die MnSOD Transkription über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B steuert (Antras-Ferry *et al.*, 1997). Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ros *et al.*, 2001 konnten aber nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B in H4IIE Zellen zeigen. Auch Michalke *et al.*, 2000 beobachteten in einem anderen Zusammenhang, dass in den H4IIE Zellen NF- $\kappa$ B durch Hypoosmolarität induziert werden kann. Diese Ergebnisse aus der Literatur lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass in unserem Zellsystem der NF- $\kappa$ B Signalweg gestört ist. Eine andere mögliche Erklärung wären Veränderungen im Promotorbereich des MnSOD Gens. Es ist bekannt, dass in Tumorzellen deutlich weniger MnSOD Protein bzw. Aktivität zu finden ist als in den vergleichbaren normalen Zellen, möglicherweise durch Defekte in der MnSOD Genexpression (Borrello *et al.*, 1993) oder durch Mutationen im Promotorbereich (Wan *et al.*, 1994). Huang *et al.*, 1997 postulieren, dass DNA-Methylierung im 5' Bereich des MnSOD Gens eine Rolle bei der Genexpression der MnSOD spielen könnte. Paradox erscheint aber, dass eine MnSOD Defizienz in normalen Zellen zum Zelltod führt, während viele Tumorzellen konstitutiv weniger MnSOD als normale Zellen exprimieren und trotzdem überleben (MacMillan-Crow und Cruthirds, 2001). Untersuchungen zum MnSOD Promotor in den Ratten-Hepatomzellen H4IIE gibt es bisher noch nicht.

Neben der mitochondrialen MnSOD besitzen Zellen eine weitere SOD, die kupfer- und zinkhaltig ist und im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  kam es in den H4IIE Zellen zu einer dosisabhängigen Abnahme der CuZnSOD mRNA Expression. In den 13-44 Zellen wurde nur in der höchsten Konzentration eine leichte Abnahme der CuZnSOD mRNA gefunden. Die CuZnSOD Expression in den 2-12 Zellen blieb unverändert. Über die Expression der CuZnSOD nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  ist nicht viel bekannt. In den meisten Untersuchungen findet man keine Veränderung der CuZnSOD. Cho *et al.*, 1997 konnten zeigen, dass es nach Behandlung mit Mitomycin C zu einer Abnahme der CuZnSOD auf Transkriptionsebene in humanen Hepatomzellen (HepG2) kommt. Sie und andere (Rothstein *et al.*, 1994; Troy und Shelanski, 1994) postulieren, dass die Hemmung der CuZnSOD Expression mit der Apoptoseinduktion assoziiert sein könnte.

Das durch die SOD produzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird von zwei weiteren antioxidativen Enzymen, der Katalase und der Glutathionperoxidase, in Wasser und Sauerstoff umgewandelt. Nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  kam es in den H4IIE Zellen zu einer dosisabhängigen

Abnahme sowohl der Katalase mRNA Expression als auch der Katalase Aktivität. Während in den 2-12 Zellen die Katalase Expression unter exogenem TNF- $\alpha$  leicht ansteigt, zeigen die 13-44 Zellen keine signifikante Veränderung. Im Gegensatz dazu führt die Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  zu einer dosisabhängigen Induktion der Glutathionperoxidase in den H4IIE Zellen. In den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen findet man dagegen keine Veränderung der Expression. Die durch TNF- $\alpha$  induzierte ROS Bildung ist in den Mitochondrien lokalisiert. Von den hier untersuchten AOE ist die MnSOD ausschließlich in den Mitochondrien lokalisiert (Guan *et al.*, 1998). Die Katalase ist ein peroxisomales Enzym und kommt in den Mitochondrien nicht vor (Matès, 2000), während das Glutathionperoxidase System sowohl in den Mitochondrien als auch im Zytoplasma lokalisiert ist (Asayama *et al.*, 1994; Esworthy *et al.*, 1997). Somit könnte die Induktion der GPx in den H4IIE Zellen eine Reaktion auf die lokal erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration in den Mitochondrien sein. In den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen scheint es dagegen zu keiner Erhöhung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration in den Mitochondrien zu kommen, so dass die GPx Induktion ausbleibt. Die Abnahme der Katalase Expression nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen ist dagegen schwieriger zu erklären. Von Yasmineh *et al.*, 1991 und anderen ist beschrieben worden, dass es auch nach i.p. Injektion von TNF- $\alpha$  in Ratten zu einer Abnahme der Katalase Aktivität in der Leber kommt. Beier *et al.*, 1997 konnten ebenfalls eine Reduktion der Katalase mRNA Expression nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  zeigen. Die Überexpression der Katalase in humanen Hepatomzellen (HepG2) führt erwartungsgemäß zu einem Schutz dieser Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sie zeigen aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF- $\alpha$  (Bai und Cederbaum, 2000). Das ist ein Spiegelbild des Effektes, der in unserem Zellsystem beobachtet wurde. Hier führte die Überexpression von TNF- $\alpha$  zu einer Abnahme der Katalase Expression einhergehend mit einer Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und einer erhöhten Sensitivität gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Neno *et al.*, 2001 zeigen, dass nach Schädigung von humanen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-resistenten Leukämie-Zellen (HP100) mit Röntgenstrahlen ebenfalls eine Abnahme der Katalase Expression nachweisbar ist. Sie postulieren, dass die primäre Rolle der Katalase in multizellulären Organismen nicht der Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist, sondern die Regulation der Apoptose über die intrazelluläre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration.

Nach Schädigung mit Adriamycin findet man im Gegensatz zur Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  in allen Zellen eine deutliche dosisabhängige Induktion sowohl der Katalase mRNA Expression als auch der Katalase Aktivität. Eine Induktion der Katalase durch

Schädigung mit Adriamycin wird auch in primären Rattenhepatozyten (Roehrdanz *et al.*, 2000) ausgelöst. Die Glutathionperoxidase Expression wird nur in den H4IIE Zellen nach Schädigung mit Adriamycin geringfügig induziert, während man keine Veränderung ihrer Expression in den transfizierten Zellen findet.

#### **4.2.2 Viabilität und Expression von AOE nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Paraquat**

Entgegen der ursprünglichen Annahme waren die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen deutlich empfindlicher gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Wasserstoffperoxid. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist die um ca. 30 % niedrigere basale Expression der Katalase in diesen Zellen. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass das endogen produzierte TNF- $\alpha$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synergistisch wirken. Ginis *et al.*, 2000 zeigten an Astrozyten, dass die Koinkubation der Zellen mit TNF- $\alpha$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einer Potenzierung der Zytotoxizität führt und dass bei einer Koinkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  das Wasserstoffperoxid die Translokation der p65 Untereinheit von NF- $\kappa$ B vom Zytoplasma in den Kern inhibiert. Im Gegensatz dazu konnte für andere Zellsysteme gezeigt werden, dass NF- $\kappa$ B direkt durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert werden kann (Schreck *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1995).

Nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> findet man, wie erwartet, in allen Zellen eine Induktion der Katalase mRNA und der Katalase Aktivität. Eine Erhöhung der Katalase Expression nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in primären Ratten Hepatozyten und in H4IIE Zellen wird auch von Roehrdanz und Kahl, 1998 beschrieben. Im Gegensatz zur Katalase findet man nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weder eine Veränderung der Glutathionperoxidase mRNA Expression noch eine Veränderung der MnSOD Expression.

Die Reaktion der Zellen auf Paraquat nimmt in diesen Untersuchungen eine Sonderposition ein. Nach Schädigung mit Paraquat findet man nur in den 2-12 Zellen und nur bei der niedrigsten getesteten Konzentration eine verringerte Sensitivität im Vergleich zu den H4IIE Zellen. Bei allen anderen Konzentrationen gibt es zwischen den getesteten Zellen keine Unterschiede in der Viabilität. Dieses Ergebnis war unerwartet, da die transfizierten Zellen gegenüber Adriamycin, welches ebenso wie Paraquat über einen intrazellulären Redoxzyklus ROS induziert, geschützt sind. Ebenso wie Adriamycin führt auch Paraquat zu keiner Veränderung der MnSOD Expression, aber zu einer dosisabhängigen Induktion der Katalase mRNA und der Katalase Aktivität. Die

transfizierten Zellen 2-12 und 13-44 unterscheiden sich allerdings nicht untereinander in ihrer Katalase Expression, so dass die erhöhte Viabilität der 2-12 Zellen nach Schädigung mit 0,5 mM Paraquat nicht durch Unterschiede in der Katalase Expression erklärt werden kann. Nach Schädigung mit Paraquat findet man zudem eine dosisabhängige Induktion der Glutathionperoxidase mRNA Expression in allen Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den Ratten-Hepatomzellen H4IIE zu einer veränderten Sensitivität dieser Zellen gegenüber verschiedenen prooxidativ wirkenden Substanzen geführt hat. Wie erwartet, sind die transfizierten Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin ganz oder partiell geschützt. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von TNF- $\alpha$  unerwarteter Weise zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid. Gegenüber Paraquat waren nur die 2-12 Zellen bei der niedrigsten Konzentration geschützt. Die Expression der antioxidativen Enzyme nach Schädigung mit den verschiedenen Prooxidantien sind in folgender Tabelle zusammengefasst:

MnSOD	exogenes TNF- $\alpha$	Adriamycin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Paraquat
H4IIE	↔	↔	↔	↔
2-12	↔	↔	↔	↔
13-44	↔	↔	↔	↔

Katalase	exogenes TNF- $\alpha$	Adriamycin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Paraquat
H4IIE	↓	↑	↑	↑
2-12	↑	↑	↑	↑
13-44	↔	↑	↑	↑

GPx	exogenes TNF- $\alpha$	Adriamycin	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Paraquat
H4IIE	↑	↑	↔	↑
2-12	↔	↔	↔	↑
13-44	↔	↔	↔	↑

**Tab. 4: Expression der AOE in den verschiedenen Zellen nach Schädigung mit prooxidativ wirkenden Substanzen** ↔: keine Veränderung, ↑: Erhöhung, ↑: leichte Erhöhung, ↓: Erniedrigung

Keine der getesteten Substanzen führte zu einer Induktion der MnSOD. Mit Ausnahme von exogenem TNF- $\alpha$  führte die Schädigung mit allen anderen prooxidativ wirkenden Substanzen in allen Zellen zu einer Induktion der Katalase. Exogenes TNF- $\alpha$  führte in den H4IIE Zellen zu einer Abnahme der Katalase Expression, in den 13-44 Zellen zu keiner

Veränderung der Katalase und in den 2-12 Zellen zu einer leichten Erhöhung der Katalase Expression. Noch differenzierter ist das Bild der GPx Expression. Mit Ausnahme von  $H_2O_2$  können alle anderen Substanzen eine Erhöhung der GPx in den H4IIE Zellen auslösen. Im Gegensatz dazu führte nur Paraquat zu einer Induktion der GPx in den transfizierten Zellen. Die Expression der CuZnSOD wurde nur nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  untersucht. Hier kam es in den H4IIE Zellen zu einer deutlichen Abnahme und in den 13-44 Zellen zu einer leichten Abnahme der CuZnSOD Expression. In den 2-12 Zellen wurde keine Veränderung festgestellt. Es stellte sich heraus, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen nicht nur zu einer veränderten Sensitivität der Zellen gegenüber prooxidativ wirkende Substanzen führte, sondern auch zu einer deutlich unterschiedlichen Expression der untersuchten antioxidativen Enzyme. Die ursprüngliche Annahme, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  zu einem generellen Schutz vor oxidativem Stress führt, konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigt sich eine differentielle Reaktion der Zellen auf die verschiedenen oxidativen Stimuli. Dies spiegelt sich auch auf der Ebene der antioxidativen Enzyme wider.

### **4.2.3 Apoptoseinduktion durch TNF- $\alpha$ und Prooxidantien**

In der Literatur finden sich eine Reihe von Untersuchungen, die zeigen, dass sowohl TNF- $\alpha$  als auch prooxidativ wirkende Substanzen in verschiedenen Zellen Apoptose auslösen können. Es wurde deshalb untersucht, ob die Überexpression von TNF- $\alpha$  die Fähigkeit, das apoptotische Todesprogramm nach Einwirkung von TNF- $\alpha$  und Prooxidantien auszuführen, beeinflusst. Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurde die Induktion der Apoptose mit Hilfe der DNA-Fragmentationsanalyse und eines anti-Histon ELISA's demonstriert.

Als Erstes wurde die Auslösung der Apoptose nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin untersucht. Es stellte sich heraus, dass TNF- $\alpha$  ab einer Konzentration von 5 ng/ml zur Apoptose in den H4IIE Zellen führt, während man in Konzentrationen bis zu 25 ng/ml keine Apoptoseinduktion in den 2-12 Zellen finden konnte. Auch nach Schädigung mit Adriamycin konnte eine dosisabhängige Zunahme der DNA-Fragmentation in den H4IIE Zellen beobachtet werden; eine leichte Erhöhung der Apoptoserate in den 2-12 Zellen ist aber erst in der höchsten getesteten Adriamycin Konzentration (10  $\mu$ M) erkennbar gewesen. Diese Ergebnisse korrelieren mit den

Ergebnissen des Neutralrot-Tests und bestätigen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  zu einer Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin führt. Umgekehrt findet man nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in den 2-12 Zellen eine deutlich stärkere DNA-Fragmentation als in den H4IIE Zellen, während nach Schädigung mit Paraquat in allen Zellen eine DNA-Fragmentation nachweisbar ist. Auch diese Ergebnisse passen zu den Ergebnissen des Neutralrot-Tests.

#### 4.2.4 Regulation der Apoptose durch die Bcl-2 Familie und p53

Die Durchführung und Regulation des apoptotischen Programms ist durch eine Reihe von spezifischen und komplexen biochemischen Ereignissen gekennzeichnet. Dabei spielen die pro- bzw. antiapoptotisch wirkenden Mitgliedern der Bcl-2 Familie eine wichtige Rolle. Bcl-2 ist ein potentes, evolutionär konserviertes, antiapoptotisches Protein, welches ursprünglich als humanes Lymphoma Oncogen identifiziert wurde und nun Namensgeber für eine ständig wachsende Familie von Proteinen ist, die Apoptose und Zelltod kontrollieren (Reed, 1998). Bcl-2 ist unter anderem in der Mitochondrienmembran lokalisiert und blockiert über einen nicht genau verstandenen Mechanismus die Apoptose. Einige Untersuchungen postulieren, dass Bcl-2 antioxidativ wirkt und über die Hemmung der ROS Bildung die Auslösung des apoptotischen Programms verhindert (Chandra *et al.*, 2000; Voehringer *et al.*, 2000a,b). Ein Gegenspieler von Bcl-2 ist Bax, ein proapoptotisch wirkendes Protein, das ebenfalls zur Bcl-2 Familie gehört. Nach Initiierung der Apoptose transloziert Bax vom Zytosol zu den Mitochondrien und führt dort zur Bildung einer großen Pore in der äußeren Mitochondrienmembran, die eine Freisetzung von Cytochrom c ermöglicht (Reed, 1998). Ein besonderes Kennzeichen der Proteine der Bcl-2 Familie ist ihre Fähigkeit, Heterodimere zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen zu bilden. Von entscheidender Bedeutung hinsichtlich der Induktion der Apoptose ist das intrazelluläre Verhältnis von antiapoptotischen zu proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Tsujimoto und Shimizu, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von bcl-2 und bax untersucht, um ihre Rolle bei der veränderten Sensitivität der TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen gegenüber Apoptose induzierenden Stimuli aufzuklären. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass die Induktion der Apoptose durch exogenes TNF- $\alpha$  bei den H4IIE Zellen mit einer Zunahme der bax mRNA einhergeht. Die Expression der bcl-2 mRNA bleibt dagegen unverändert. Bei den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen bleibt bei Exposition gegenüber exogenem

TNF- $\alpha$  der Anstieg der bax mRNA Expression aus. Nach Schädigung mit Adriamycin, Wasserstoffperoxid und Paraquat findet man keine signifikante Veränderung der bcl-2 und bax mRNA Expression. Wie bereits beschrieben, vermitteln die Mitglieder der Bcl-2 Familie ihre proapoptotische bzw. ihre antiapoptotische Wirkung in erster Linie über die Regulation der Cytochrom c Freisetzung aus dem Intermembranraum der Mitochondrien. Die verstärkte Expression von bax bei einer gleichbleibenden bcl-2 Expression in den TNF- $\alpha$  geschädigten H4IIE Zellen würde über bislang nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen die Freisetzung von Cytochrom c und damit die Aktivierung der Caspase 9 stimulieren. Auf diesem Weg kann es folglich zur Initiierung eines apoptotischen Zelltods kommen. Die Ergebnisse der RT-PCR können aber nur erste Hinweise für die Beteiligung der Bcl-2 Familie an der verringerten Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  liefern. Für eine abschließende Bewertung müsste die Expression von bcl-2 und bax auch auf Proteinebene untersucht werden.

Neben den Proteinen der Bcl-2 Familie spielt das Tumorsuppressor Gen p53 eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Genomintegrität. Als Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren kann p53 aktiviert bzw. stabilisiert werden. Die Aktivierung von p53 erfolgt meistens durch posttranslationale Ereignisse wie Acetylierung oder Phosphorylierung (May und May, 1999). Die Stabilisierung von p53 geht mit einer Erhöhung der Halbwertszeit nach posttranslationalen Modifikationen einher, die sich aber von denen bei der p53 Aktivierung unterscheiden (Chernov *et al.*, 1998). Eine Akkumulation von p53 kann auch durch Induktion der p53 Transkription, insbesondere durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B erfolgen (Hellin *et al.*, 1998). Als Reaktion auf genotoxischen Stress und abhängig vom untersuchten Zelltyp kann p53 entweder einen Zellzyklusarrest oder einen programmierten Zelltod einleiten. Diese Funktionen werden von p53 zumindest teilweise in seiner Funktion als Transkriptionsaktivator kontrolliert. Nach Stabilisierung transloziert p53 in den Kern und moduliert dort die Expression p53-induzierbarer Gene durch Bindung an spezifische DNA Sequenzen (Gottlieb und Oren, 1996). Zu den durch p53 induzierten Genen gehören unter anderem bax (Miyashita and Reed, 1995) sowie Gene, die in Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen (Polyak *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite gibt es auch Beobachtungen, dass p53 die Expression von einigen Genen über Einwirkung auf die Transkriptionsinitiierung (Farmer *et al.*, 1996; Wang und Beck, 1998) oder die Bindung an p53-responsiven Elementen (Ori *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999a) hemmt. Da oxidativer Stress, induziert durch TNF- $\alpha$  oder andere prooxidativ wirkende

Substanzen, p53 induzieren kann (Yin *et al.*, 1998), wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von p53 mittels RT-PCR untersucht. Es stellte sich heraus, dass es nach Schädigung mit exogenem TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen zu einer Zunahme der p53 mRNA Expression kommt, während man keine Veränderung der p53 Expression in den transfizierten Zellen finden kann. Ros *et al.*, 2001 konnten ebenfalls an H4IIE Zellen zeigen, dass TNF- $\alpha$  über den NF- $\kappa$ B Signalweg die Expression der p53 mRNA induziert. Weiterhin konnten Ameyar *et al.*, 1999 zeigen, dass die Transfektion von Wildtyp p53 in TNF- $\alpha$  resistente MCF-7 Zellen zu einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber TNF- $\alpha$  führt. Diese Interaktion zwischen p53 und TNF- $\alpha$ -vermittelter Zytotoxizität ist aber in ihrem System unabhängig von Bax. Man könnte also annehmen, dass die TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose in den H4IIE Zellen über eine Induktion von p53 und Bax erfolgt. Um diese Annahme zu bestätigen, müsste die p53 Expression ebenso wie die Bax Expression auch auf Proteinebene untersucht werden.

Nach Schädigung mit Adriamycin kam es in den H4IIE und 13-44 Zellen zu einem Abfall der p53 mRNA Expression, während die p53 Expression in den 2-12 Zellen nicht verändert war. Der Schutz gegen die durch Adriamycin ausgelöste Apoptose in den 2-12 Zellen, verglichen mit den H4IIE Zellen, könnte mit dem Erhalt der p53-Expressionshöhe in Zusammenhang gebracht werden. Die erhöhte Empfindlichkeit der 2-12 Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spiegelt sich dagegen in den Daten zur p53-Expression, die in allen drei Zelltypen unverändert ist, nicht wider. Ebenso wenig korreliert die p53-Expression nach Schädigung mit Paraquat, die in den drei Zelltypen absinkt, mit der Sensitivität gegen die Paraquat-vermittelte Apoptose, die in den H4IIE Zellen am höchsten ist.

Wie bereits beschrieben, spielen bei der Aktivierung und Stabilisierung von p53 posttranslationale Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung eine zentrale Rolle. Um die Rolle von p53 in der durch Adriamycin, Paraquat oder Wasserstoffperoxid induzierten Apoptose besser zu charakterisieren, müsste die p53 Expression auch auf Proteinebene untersucht werden. Dennoch gibt es eine Reihe von Hinweisen, die zeigen, dass auch die p53 Transkription und Translation eine wichtige Rolle bei der p53 Regulation spielen (Lakin und Jackson, 1999). Interessant ist auch die Beobachtung von Drane *et al.*, 2001, die eine Verknüpfung zwischen der p53 und der MnSOD Expression in MCF-7 Zellen zeigen konnten. Sie fanden heraus, dass p53 die Expression der MnSOD hemmt und dass die Überexpression der MnSOD in den MCF-7 Zellen zu einer Hemmung der p53 Expression führt. Diese Interaktion zwischen p53 und MnSOD ist von besonderem Interesse, da in unserem Zellsystem die MnSOD konstitutiv exprimiert wird, aber nicht

induziert werden kann. Eine weitere Schwierigkeit bei der Interpretation der p53 RT-PCR Ergebnisse liegt darin, dass die H4IIE Zellen hinsichtlich ihres p53 Status nicht charakterisiert sind und möglicherweise nicht über ein funktionell aktives p53 verfügen.

### 4.3 Array Analyse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in Ratten-Hepatomzellen zu Veränderungen in der Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Stress führt. Insbesondere kommt es zu einer Resistenz der transfizierten Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$ . Um die molekularen Ursachen für die in dieser Arbeit beschriebenen Veränderungen genauer zu charakterisieren, wurde eine cDNA Array Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode wurden die Unterschiede in der Expression von 450 Ratten cDNAs zwischen H4IIE und den transfizierten Zellen 2-12 untersucht. Die Auswertung von zwei unabhängigen Versuchen zeigte, dass in den transfizierten Zellen 8 Gene hochreguliert und 31 Gene herunterreguliert waren. Unter den 450 analysierten cDNAs waren auch die cDNAs für die antioxidativen Enzyme MnSOD, CuZnSOD und Katalase und die cDNA für TNF- $\alpha$ , so dass die Array Analyse die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche nochmals bestätigte. Die Expression der MnSOD war unverändert in beiden Zellen, während die Expression der CuZnSOD und der Katalase in den 2-12 Zellen um den Faktor 2 bzw. 2,5 niedriger war. Die deutlichste Veränderung betraf, wie erwartet, die Expression von TNF- $\alpha$ . Die Array Analyse zeigte eine um Faktor 21 höhere TNF- $\alpha$  Expression in den 2-12 Zellen. Diese Ergebnisse der Array Analyse sprechen für die Validität der Auswertung.

Unter den 8 hochregulierten Genen befinden sich neben TNF- $\alpha$  zwei Gene, die an dem Prozess der Zelladhäsion beteiligt sind. Es handelt sich hierbei um das N-Cadherin und die Integrin- $\alpha_v$  Untereinheit. Integrine wurden als Zelloberflächenrezeptoren beschrieben, die eine zelluläre Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine oder an andere Zellen vermitteln. Später stellte sich heraus, dass die Integrin-vermittelte Adhäsion mehr als eine einfache physikalische Verbindung von Zellen mit extrazellulären Matrixproteinen oder mit anderen Zellen darstellt. Integrin-vermittelte Signale sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, wie Zellteilung, Entzündung, Angiogenese und programmierter Zelltod (Howe *et al.*, 1998). Integrinrezeptoren bestehen aus zwei nicht kovalent assoziierten  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten, die heterodimere Rezeptorkomplexe bilden. Die  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten bestehen

aus einer langen extrazellulären Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne variabler Länge. Die extrazelluläre Domäne der beiden  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten bilden die Ligandenbindungsdomäne. In Säugern findet man 17  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten, die heterodimerisieren und 22 verschiedene Integrinrezeptoren bilden können (Kumar, 1998). Integrinrezeptoren sind an drei großen Signalwegen beteiligt. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Organisation des Zytoskeletts, indem sie die extrazelluläre Matrix über besondere Strukturen mit intrazellulären Zytoskelettkomplexen verbinden. Integrine sind aber auch an Signalwegen beteiligt, die Zellproliferation und programmierten Zelltod regulieren. Dabei kommt es unter anderem zur Aktivierung von ERK über den Ras/Raf Signalweg (Schlaepfer und Hunter, 1997). Nejjari *et al.*, 1999 konnten an humanen Hepatomzellen (HepG2 und Hep3B) zeigen, dass eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen, darunter auch TNF- $\alpha$ , die Expression von Integrinen induzieren können. An der Zelladhäsion sind auch Cadherine beteiligt, eine Familie von  $\text{Ca}^{2+}$  abhängigen Transmembran-Adhäsionsrezeptoren, die an der Kontrolle der Zellarchitektur beteiligt sind (Gumbiner, 1996). Zu der Cadherin Familie gehören die Glycoproteine E-Cadherin, N-Cadherin und P-Cadherin. Sie bilden homophile Interaktionen mit ähnlichen Rezeptoren auf benachbarten Zellen aus, während die zytoplasmatische Domäne mit dem Zytoskelett interagiert (Takeichi, 1995). In Epithelzellen des Endometriums führte TNF- $\alpha$  zur Zelldissoziation und zu einer veränderten Expression von Cadherin (Tabibzadeh *et al.*, 2002). In Bronchialzellen führte eine Behandlung mit TNF- $\alpha$  zu einer Abnahme der E-Cadherin Expression und zu einer fragileren Morphologie der Zellen (Carayol *et al.*, 2002). Weitere Zelladhäsionsmoleküle die durch TNF- $\alpha$  induziert werden können sind ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin (Wolf *et al.*, 2001; Khatib *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 1996).

Mdr-1 („*multidrug resistance transporter*“) oder P-Glykoprotein gehört zur Superfamilie der „*ATP-binding cassette*“-Membrantransporter. Es handelt sich hierbei um große membranständige Proteine, die für den Transport von Fremdstoffen aus der Zelle sorgen. Dabei wird angenommen, dass diese Transporter eine Art Detoxifizierungsmechanismus für die Zellen darstellen (Litman *et al.*, 2001). Die Überexpression von mdr-1 in Tumorzellen führt zur Resistenz der Zellen gegenüber verschiedenen Zytostatika wie z. B. Anthracyclinen. In Leberzellen führt eine Reihe von exogenen Substanzen zu einer Induktion der mdr-1 mRNA. Zu diesen Substanzen gehören Karzinogene wie 3-Methylcholanthren oder N-Hydroxy-2-Acetylaminofluoren (Gant *et al.*, 1991; Schrenk *et al.*, 1994; Hill *et al.*, 1996), Wachstumsfaktoren wie EGF („*epidermal growth factor*“)

und IGF-1 („*insulin-like growth factor*“) (Hirsch-Ernst *et al.*, 1995), aber auch TNF- $\alpha$  (Hirsch-Ernst *et al.*, 1998). Ros *et al.*, 2001 konnten ebenfalls an Hepatozyten, aber auch an H4IIE Zellen zeigen, dass exogenes TNF- $\alpha$  über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B zu einer Induktion von *mdr-1* führt. Eine erhöhte *mdr-1* Expression in den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen würde auch zur Erklärung der Resistenz der 2-12 Zellen gegenüber Adriamycin beitragen. Allerdings fanden Stein *et al.*, 1996 nach stabiler Transfektion von Adriamycin-resistenten Kolonkarzinomzellen mit TNF- $\alpha$  eine Reduktion der *mdr-1* mRNA Expression und eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Adriamycin.

Ein weiteres hochreguliertes Gen in den transfizierten Zellen ist die MAPK1/ERK1 („*mitogen-activated protein kinase 1*“), eine Serin/Threonin Kinase. MAP Kinasen sind unter anderem an der Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Cross *et al.*, 2000). Zu der Familie der MAP Kinasen gehören neben den „*extracellular signal-related kinases*“ (ERK1 und ERK2), oft nur als MAPK bezeichnet, auch die „*c-Jun N-terminal protein kinase*“ (JNK) / „*stress-activated protein kinase*“ (SARK) und die p38 MAP Kinase (Ichijo, 1999). Dabei wird angenommen, dass die Aktivierung der ERK Kinase zu einer Inhibition der Apoptose führt. So konnte Erhardt *et al.*, 1999 zeigen, dass ERK die Aktivierung der Caspase 9 nach Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien hemmt. Ein weiteres Zielmolekül der ERK ist Bad, ein proapoptotisches Mitglied der Bcl-2 Familie, welches die Membranintegrität der Mitochondrien und die Freisetzung von Cytochrom c beeinflusst. Die Phosphorylierung von Bad an Serin 112 und 136 führt dazu, dass Bad im Zytosol zurückgehalten wird und nicht an die Mitochondrien gelangen kann (Pastorino *et al.*, 1999)

Das 14 kD „*ubiquitin-conjugating enzyme*“ spielt eine zentrale Rolle im Ubiquitin System, einem System zur selektiven Degradation von Proteinen in eukaryotischen Zellen. Ubiquitin selbst ist ein hochkonserviertes Protein und in allen eukaryotischen Zellen vorhanden. Die Konjugation von Ubiquitin an ein Protein ist ein mehrstufiger enzymatischer Prozess, an dem das „*ubiquitin-activating enzyme*“, das „*ubiquitin-conjugating enzyme*“ und die Ubiquitin-Ligase beteiligt sind. Das an das Zielprotein kovalent gebundene Ubiquitin wird wiederum ubiquitinyliert, so dass eine Multiubiquitin-Kette entsteht, die von einem 26S Proteasom erkannt wird und zu einer Degradation des Proteins führt. Das Ubiquitin System spielt eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl von zellulären Funktionen, wie Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle, Signaltransduktion und

nukleären Transportprozessen (Yamao, 1999). Auch bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, einem durch TNF- $\alpha$  induzierbaren Transkriptionsfaktor, spielt die Ubiquitinylierung eine wichtige Rolle. NF- $\kappa$ B liegt normalerweise in inaktiver Form als I $\kappa$ B-NF- $\kappa$ B Komplex im Zytoplasma vor. Nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  kommt es zu einer Phosphorylierung und anschließend zur Ubiquitinylierung von I $\kappa$ B. Das ubiquitinylierte I $\kappa$ B wird dann von einem 26S Proteasom erkannt und degradiert. So wird das nukleäre Lokalisationssignal von NF- $\kappa$ B demaskiert, und NF- $\kappa$ B kann vom Zytoplasma in den Kern translozieren (Suzuki *et al.*, 1999a,b). Denkbar wäre daher, dass in den transfizierten Zellen die erhöhte Expression des „*ubiquitin-conjugating enzyme*“ auch zu einer erhöhten Aktivität von NF- $\kappa$ B führt und somit zu einem Schutz vor der TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose.

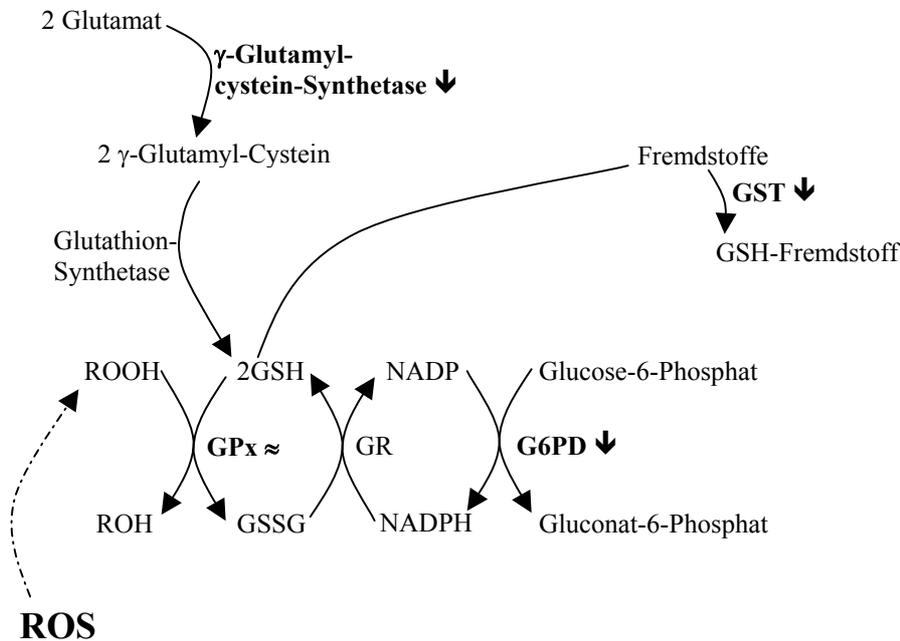
Neben dem „*ubiquitin-conjugating enzyme*“ ergab die Array Analyse, dass ein weiteres Gen, welches an der Regulation der Proteolyse beteiligt ist, in den transfizierten Zellen hochreguliert wird. Es handelt sich hierbei um den Serin Protease Inhibitor 3 (SPI-3). SPI-3 gehört zur Serin Protease Inhibitor Familie. In der Rattenleber werden neben SPI-3 zwei weitere SPI exprimiert, SPI-1 und SPI-2. Die Aminosäure Sequenz von SPI-3 zeigt eine 70 %ige Homologie zu der Sequenz von SPI-1 und SPI-2 (Ohkubo *et al.*, 1991). Trotz der Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz haben die drei Serin Protease Inhibitoren ein unterschiedliches Wirkungsspektrum und eine unterschiedliche Expression. Während SPI-1 und SPI-2 in der normalen Leber konstitutiv exprimiert werden, wird SPI-3 transient bei akuten Entzündungsprozessen in der Leber exprimiert und kann auch durch IL-6 induziert werden (Kordula *et al.*, 1996a,b). Serin Protease Inhibitoren kontrollieren aktivierte Proteasen, und einige sind auch an der Regulation des programmierten Zelltods beteiligt. So konnte gezeigt werden, dass SPI-2 die Aktivierung von Caspasen hemmt und so die Induktion der Apoptose durch TNF- $\alpha$  inhibiert (Bird, 1998).

Das „*V(D)J recombination activating enzyme*“, auch RAG1 genannt, ist an einem Prozess beteiligt, der als V(D)J Rekombination bekannt ist und für die Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren verantwortlich ist. Zusammen mit RAG2 bildet es eine Nuklease, die die DNA an bestimmte Signalsequenzen schneidet, so dass es zu einer Zunahme der Variabilität in den entstandenen Genen kommt (Sadofsky, 2001). Eine Verbindung zu den in dieser Arbeit untersuchten Aspekten konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Neben den acht hochregulierten Genen ergab die Array Analyse, dass in den transfizierten Zellen 31 Gene niedriger exprimiert werden als in den H4IIE Zellen. Diese Gene können in 6 Gruppen unterteilt werden.

Zu der größten Gruppe der in den transfizierten Zellen niedriger exprimierten Gene gehören Enzyme, die im weitesten Sinne am Fremdstoffmetabolismus beteiligt sind. Dazu zählen die mikrosomale Glutathion-S-Transferase, Glutathion-S-Transferase mü, Glutathion-S-Transferase pi, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase,  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase, UDP-Glucuronosyl-Transferase 2B, die NADH-Cytochrom b5 Reduktase. Die ersten fünf der oben genannten Enzyme sind an der Glutathionsynthese oder am Glutathion Redox System beteiligt. Glutathion ist ein ubiquitäres intrazelluläres Thiol. Es wird in der Zelle aus den Aminosäuren  $\gamma$ -Glutaminsäure, Cystein und Glycin unter ATP Verbrauch synthetisiert. Die Synthese erfolgt in zwei Schritten. Der erste geschwindigkeitsbestimmende Syntheseschritt wird dabei durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase katalysiert, der zweite durch die Glutathion-Synthetase. Limitierend für die Biosynthese von Glutathion ist die Verfügbarkeit von Cystein (Rahman und MacNee, 2000). Eine der Glutathion Funktionen ist die Detoxifizierung elektrophiler Substanzen und ihrer reaktiven Metaboliten. Die enzymatische Konjugation des Glutathions an diese Substanzen erfolgt durch die zytosolischen Glutathion-S-Transferasen. Es handelt sich hierbei um Schlüsselenzyme des Phase II Metabolismus. Neben ihrer Funktion als Detoxifizierungsenzyme besitzen sie auch eine Peroxidase- und eine Isomerase-Aktivität und können Jun N-terminale Kinasen inhibieren (Sheehan *et al.*, 2001). Die Glutathionperoxidase ist ein weiteres Enzym des Glutathion Redox Systems. Sie reduziert toxische Peroxide zu den entsprechenden weniger toxischen Hydroxyverbindungen, dabei wird Glutathion zu GSSG oxidiert. GSSG wird wiederum durch die Glutathionreduktase in einem NADPH abhängigen Prozess zu GSH reduziert. Für die Bereitstellung von NADPH wird nun aber die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase gebraucht. Die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase ist das erste und reaktionsbestimmende Enzym im Pentosephosphatweg und erzeugt reduzierende Äquivalente in Form von NADPH (Lee *et al.*, 1999b). Auch im Phase I Fremdstoffmetabolismus spielt NADPH eine wichtige Rolle. Abbildung 52 zeigt eine schematische Darstellung des hier beschriebenen Glutathion Redoxzyklus. Von diesen fünf aufgeführten Genen gibt es in der Literatur nur für die  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase und die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Hinweise auf einen Zusammenhang mit TNF- $\alpha$ . So führte die Überexpression der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase in H4IIE Zellen zu einer Hemmung der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität (Manna *et al.*, 1999), während die Behandlung von primären Rattenhepatozyten und HepG2 Zellen mit TNF- $\alpha$  zu einer Induktion der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase Expression

fürte (Morales *et al.*, 1997). Spolarics und Wu, 1997 konnten zeigen, dass TNF- $\alpha$  zu einer Induktion der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Expression in primären Rattenhepatozyten und in Kupfferzellen führt.



**Abb. 52: Glutathion Synthese und Glutathionredoxzyklus**

GST= Glutathion-S-Transferase, GPx= Glutathionperoxidase, GR= Glutathionreduktase, G6PD = Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, ROOH= Lipidhydroperoxide. Die Expression der fett-gedruckten Enzyme ist untersucht worden. ↓ = niedrige Expression in den transfizierten Zellen, ≈ keine Unterschiede in der Expression.

Die NADH-Cytochrom b5 Reduktase ist ein integrales, am P450-Zyklus beteiligtes Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums und der äußeren Mitochondrienmembran. Daneben findet man auch eine lösliche Form in den Erythrozyten (Pietrini *et al.*, 1988). In Vertebraten erfolgt die Glucuronidierung kleiner lipophiler Substanzen durch die UDP-Glucuronosyltransferasen. Die Konjugation mit Glucuronsäure führt zur Bildung wasserlöslicher Metaboliten, die leichter ausgeschieden werden können. Tyrosin-Aminotransferasen sind in der Leber lokalisiert und am Abbau von Tyrosin beteiligt, indem sie den Transfer der  $\alpha$ -Aminogruppe des Tyrosins auf eine Ketosäure katalysieren. Ihre Expression wird durch Glukokortikoide und durch den cAMP Signalweg reguliert (Dietrich, 1992). Einen Zusammenhang dieser drei Gene mit den in dieser Arbeit untersuchten Aspekten konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Die zweite Gruppe der in den transfizierten Zellen differentiell exprimierten Gene beinhaltet eine Reihe von antioxidativen Enzymen, die in den stabil transfizierten Zellen niedriger exprimiert werden als in den H4IIE Zellen. Die niedrigere Expression der CuZnSOD und der Katalase in den transfizierten Zellen wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit gefunden und durch die Array Analyse bestätigt. Daneben waren drei weitere Gene differentiell exprimiert, die für Proteine mit antioxidativen Eigenschaften kodieren. Es handelt sich hierbei um Thioredoxin-2, die Protein-Disulfid-Isomerase und das Metallothionein-1.

Thioredoxin ist ein kleines ubiquitär vorhandenes Protein mit Oxidoreduktase-Aktivität. Zusammen mit einem weiteren Enzym, der NADPH-abhängigen Thioredoxinreduktase bilden sie das Thioredoxin-System. In Säugern wurden bis jetzt drei verschiedene Thioredoxine gefunden. Das am besten untersuchte ist das klassische 12-kD Thioredoxin (Trx-1). In der Array Analyse war die Expression von Trx-2 in den transfizierten Zellen reduziert. Das Trx-2 Isoenzym ist in den Mitochondrien lokalisiert und besitzt am N-Terminus ein mitochondriales Translokationssignal (Spyrou *et al.*, 1997). Die dritte Thioredoxin Variante wird in Spermatozoen exprimiert (Miranda-Vizuete *et al.*, 2001). Alle drei Thioredoxine besitzen ein stark konserviertes aktives Zentrum mit einer potenten Proteindisulfid-Oxidoreduktaseaktivität (Nordberg und Arnér, 2001). Spezifische Zielproteine für die Reduktion durch Thioredoxin sind z. B. die Protein-Disulfid-Isomerase (Lundstrom und Holmgren, 1990) sowie Disulfid-haltige Proteine und eine Reihe von Transkriptionsfaktoren wie p53, NF- $\kappa$ B und AP-1 (Nordberg und Arnér, 2001). Die Expression von Thioredoxin wird durch oxidativen Stress induziert, vermutlich unter Beteiligung des „*antioxidant responsive element*“ im Thioredoxin-Promotor (Kim *et al.*, 2001). Die Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) gehört zur Thioredoxin Superfamilie. Diese Proteine sind charakterisiert durch eine oder mehrere Domänen mit einer hohen Homologie zu dem zytoplasmatischen Protein Thioredoxin. Die Protein-Disulfid-Isomerase ist im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und an der Prozessierung sekretorischer Proteine beteiligt. Sie katalysiert die Bildung, Isomerisierung und Reduktion von Disulfid-Bindungen. Auch das „*calcium-binding protein-2*“ oder Erp72 gehört zur Familie der PDI-ähnlichen Proteine (Ferrari und Soling, 1999). Metallothioneine sind kleine cysteinreiche metallbindende Proteine. Die spezifische biologische Funktion der Metallothioneine ist nicht bekannt. Sie spielen aber eine wichtige Rolle bei der Bindung und Verteilung von Metallionen (insbesondere Kupfer und Zink). Sie regulieren die Biosynthese und Aktivität von Metalloenzymen sowie von Transkriptionsfaktoren und

wirken als Radikalfänger (Nath *et al.*, 2000). Die Regulation der Metallothioneine erfolgt hauptsächlich auf Transkriptionsebene durch cis- oder transwirkende Elemente (Ebadi *et al.*, 1995). Die Expression der Metallothioneine kann durch eine Reihe von Substanzen induziert werden. Dazu gehören Metallionen (z. B. Cadmium), aber auch Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-6) und prooxidativ wirkende Substanzen (z. B. Paraquat) (Nath *et al.*, 2000).

Die dritte Gruppe niedriger exprimierter Gene in den transfizierten Zellen beinhaltet die Heat-Shock Proteine/Chaperone hsp90, hsp10, TCP-1 eta, TCP-1 alpha. Chaperone sind Proteine, die an andere Proteine binden und so ihre korrekte Faltung und Stabilisierung ermöglichen. Chaperone bestimmen nicht die Tertiär-Struktur des zu faltenden Proteins, sondern helfen ihm, seine korrekte Struktur effizienter zu finden (Hartl, 1996). Heat-Shock Proteine sind eine Gruppe von Chaperonproteinen, die durch Stress induziert werden. Chaperone werden durch ihr Molekulargewicht klassifiziert. Neben der hsp90 und der hsp70 Familie gibt es unter anderem auch die Chaperonine (Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 60 kD) und die Tcp-1A und Tcp-1B Familie („*t-complex polypeptide I*“), die an der Faltung von Zytoskelettproteinen (z. B. Tubulin) beteiligt sind (Liang und MacRae, 1997). Hsp90 ist ein essentielles und stark abundantes Hitze-Schock-Protein, welches eine Vielzahl von Tyrosinkinasen und anderen Signaltransduktionsproteinen stabilisiert (Csermely *et al.*, 1998). Interessant ist hierbei, dass in U937 Zellen eine reduzierte hsp90 Expression zu einem Schutz vor der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose führte (Galea-Lauri *et al.*, 1996).

Die Array Analyse ergab in den transfizierten Zellen eine verminderte Expression dreier Gene, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind. Bei der Regulation des programmierten Zelltods spielen die Mitglieder der Bcl-2 Familie eine zentrale Rolle. Zu der Bcl-2 Familie gehören das proapoptotisch wirkende bad und das antiapoptotisch wirkende bcl-x. Pastorino *et al.*, 1999 beschrieben in ihrem Modell, dass es nach Schädigung mit TNF- $\alpha$  zu einer Phosphorylierung von Bad kommt. Dies führt dazu, dass Bad nicht mit Bcl-x oder Bcl-2 interagieren kann. Folglich kann statt dessen Bax an Bcl-2 oder Bcl-x binden. Überleben oder Zelltod hängt nach diesem Modell von der relativen Menge an phosphoryliertem Bad und somit von der freien Menge an Bcl-2 und Bcl-x ab, die Bax binden und seine Translokation in die Mitochondrien verhindern können. Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) ist ein nukleäres Enzym mit zwei Zinkfinger-Motiven. Es bindet an DNA-Strangbrüchen und katalysiert die kovalente Modifikation von

Akzeptorproteinen (Histone, Topoisomerasen und anderen chromosomalen Proteinen) mit poly(ADP-Ribose). PARP ist an der Aufrechterhaltung der Genomstabilität beteiligt, beeinflusst die Chromatinstruktur, die DNA-Reparatur und die Regulation des Zellzyklus (Beneke *et al.*, 2000).

Transkriptionsfaktoren sind regulatorische Proteine mit einer DNA Bindungsdomäne, die spezifisch eine kurze DNA Sequenz erkennen, und einer Aktivierungsdomäne zur Modulation der Transkription. Der HNF4 $\alpha$  („*hepatocyte nuclear factor 4 alpha*“) ist ein nukleärer Rezeptor und gehört zur Familie der Zinkfinger-Proteine. HNF4 $\alpha$  besteht aus einer N-terminalen Aktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne mit zwei Zinkfingern, einer Liganden-Bindungsdomäne und einer F-Domäne. Ein spezifischer Ligand ist bis jetzt noch nicht identifiziert, so dass HNF4 $\alpha$  zu der Gruppe der „*orphan receptors*“ gezählt werden muss. HNF4 $\alpha$  reguliert die Genexpression auf Transkriptionsebene durch Bindung an HNF4 $\alpha$  Elemente im Promotor. HNF4 $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung, der Regulation des Glucosemetabolismus und der Insulinsekretion sowie bei der Regulation der Apolipoproteine und einiger Koagulationsfaktoren (Ryffel, 2001). In einem anderen Zusammenhang konnten De Fabiani *et al.*, 2001 in HepG2 Zellen zeigen, dass TNF- $\alpha$  das Transaktivierungspotential von HNF4 $\alpha$  hemmt. Das Retinoblastoma Gen ist eins der am intensivsten untersuchten Tumorsuppressorgene und spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Zellproliferation. Das Retinoblastoma Protein und andere verwandte Proteine besitzen eine konservierte „*pocket*“ Domäne, mit der sie die Transkriptionsaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors E2F maskieren. Die „*pocket*“ Domäne des Retinoblastomaproteins kann aber gleichzeitig weitere Proteine binden, die sogenannten „*retinoblastoma binding proteins*“. Es handelt sich hierbei um große nukleäre Phosphoproteine, die als Transkriptionsrepressoren wirken (Lai *et al.*, 1999). Die Überexpression von Bog, einem Mitglied der „*retinoblastoma binding protein*“ Familie, führte im Leberepithelzellen zu einer Resistenz gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung von TGF- $\beta$ 1 (Woitach *et al.*, 1998). Eine Beteiligung des „*retinoblastoma binding protein*“ an TNF- $\alpha$  Signalwegen konnte in der Literatur nicht gefunden werden.

Das Produkt des c-met Protooncogens kodiert für eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase und ist der Zelloberflächen-Rezeptor des HGF („*hepatocyte growth factors*“). Das reife Met-Protein ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit. Die

N-terminale  $\alpha$ -Kette ist außerhalb der Zellmembran lokalisiert, während die C-terminale  $\beta$ -Kette eine Extramembransequenz, eine einzelne Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Protein-Kinase-Domäne enthält. Nach Bindung des Liganden HGF vermittelt Met eine Reihe von biologischen Antworten wie Proliferation, Mitogenese oder Morphogenese, aber auch Zytotoxizität. Unter physiologischen Bedingungen wird Met von Epithelzellen gebildet, während HGF von Fibroblasten oder Mesenchymzellen sezerniert wird. HGF und Met bilden so ein parakrines Signalsystem, welches eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration, der Organogenese und der Gewebereparatur spielt (Stuart *et al.*, 2000). Die Bindung von HGF an seinen Rezeptor führt zu einer Stimulierung der Tyrosin-Kinase Aktivität des Met-Rezeptors, welche wiederum zu einer Phosphorylierung und Aktivierung weiterer Signaltransduktionsmoleküle führt (Birchmeier und Gherardi, 1998). Chen *et al.*, 1997 konnten zeigen, dass c-met nicht nur durch HGF, sondern auch durch andere Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  in HepG2 und Hep1-6 Zellen induziert wird. Sie postulieren, dass durch dieses Zytokin-Netzwerk die Expression von c-Met reguliert wird.

Fibrinogen gehört zu den hepatischen Akut-Phase-Proteinen und besteht aus drei Polypeptidketten ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  und  $\gamma$ ), die Dimere ausbilden können. Die Transkription der Fibrinogen-Gene kann durch IL-6 und Glukokortikoide induziert werden. Im Promotor des Fibrinogen-gamma Gens finden sich neben einer Sp1 Bindungsstelle ein „CAAT-enhancing binding element“ (C/EBP) und drei IL-6 responsive Elemente, an die der durch IL-6 aktivierte Transkriptionsfaktor STAT3 bindet. Interessanterweise befindet sich in unmittelbarer räumlicher Nähe zu der STAT3 Bindungsstelle ein NF- $\kappa$ B Bindungselement. Dabei wird angenommen, dass NF- $\kappa$ B als Inhibitor bei der STAT3 vermittelten Fibrinogen-gamma Transkription wirkt, indem die STAT3 Bindungsstelle blockiert wird (Fuller und Zhang, 2001).

Als letzte Gruppe differentiell exprimierter Gene können die ribosomalen Proteine RSP 19, RPS 5, ribosomales Protein S9, ribosomales Protein L6 zusammengefasst werden.

Die Ergebnisse der Array Analyse geben einen guten Überblick über mögliche differentiell exprimierte Gene zwischen den H4IIE Zellen und den TNF- $\alpha$  überexprimierenden 2-12 Zellen. Sie liefern eine Reihe von interessanten Hinweisen für weitere Untersuchungen zur Wirkung von TNF- $\alpha$  auf Leberzellen. Die tatsächliche differentielle Expression dieser

Gene muss aber durch andere unabhängige Methoden auf mRNA-Ebene durch Northern-Blot oder RT-PCR und auf Proteinebene durch Western-Blot Analysen bestätigt werden.

#### 4.4 Ausblick

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Dissertation ergeben sich verschiedene Aspekte, die für zukünftige Projekte zur weiteren Charakterisierung der TNF- $\alpha$  Wirkung auf Leberzellen von Interesse sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den Hepatomzellen H4IIE zu einer Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin führt. Bei den mechanistischen Erklärungen die in der Literatur für diese Resistenz diskutiert werden, spielt die MnSOD eine zentrale Rolle. Bisherige Untersuchungen an anderen Zelltypen haben gezeigt, dass endogen produziertes TNF- $\alpha$  eine Induktion der MnSOD bewirkt, und dass diese dann die durch TNF- $\alpha$  gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies abfängt. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Beteiligung der MnSOD an der Resistenz gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  und Adriamycin gefunden werden. Als zukünftiges Projekt wäre es deshalb interessant, das MnSOD Gen und insbesondere den MnSOD Promotor in diesem Zellsystem genauer zu charakterisieren.

Auch die Rolle von NF- $\kappa$ B, einem durch TNF- $\alpha$  induzierbaren Transkriptionsfaktor, der auch an der Regulation der MnSOD beteiligt ist, müsste in diesem Zellsystem untersucht werden. Denkbar wären NF- $\kappa$ B Bindungsstudien mit Hilfe von Gelshiftassays und Reporterassays.

Die Überexpression von TNF- $\alpha$  in den H4IIE Zellen führte zu einer Verminderung der basalen Expression der antioxidativen Enzyme, Katalase und CuZnSOD und zu einer erhöhten Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die transfizierten Zellen verfügen somit über ein schlechteres antioxidatives Schutzsystem als die H4IIE Zellen. Mit Hilfe von Fluoreszenzsonden wie H<sub>2</sub>DCF könnte die Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies nachgewiesen werden und mögliche Unterschiede in der basalen intrazellulären ROS Konzentration zwischen den verschiedenen Zellen quantifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die Katalase eine wichtige Rolle in diesem Zellsystem spielt. Neben der niedrigeren basalen Katalase Expression in den transfizierten Zellen führte exogenes TNF- $\alpha$  zu einem Abfall der Katalase Expression in

den H4IIE Zellen. Da die Katalase spezifisch  $H_2O_2$  abbaut, könnte über die Rolle von  $H_2O_2$  als Mediator im TNF- $\alpha$  Signaltransduktionsweg spekuliert werden.

Die Glutathionperoxidase gehört zu dem Glutathion Redox System der Zelle und reduziert toxische Peroxide zu den weniger toxischen Hydroxyverbindungen, dabei wird Glutathion zu GSSG oxidiert. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Expression der Glutathionperoxidase untersucht. Es wäre aber interessant, den Glutathionstatus der transfizierten Zellen im Vergleich zu den H4IIE Zellen zu untersuchen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  eine transiente Glutathion-Depletion und eine Erhöhung des GSSG Niveaus verursachen. Das Überleben der Zellen und die Aktivierung von redoxsensitiven Transkriptionfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 ist somit abhängig von dem mitochondrialen GSH Pool. Aus den Ergebnissen der cDNA Array Analyse ergeben sich weitere Hinweise für die Beteiligung des Glutathion Redox Systems an der TNF- $\alpha$  Resistenz in den transfizierten Zellen. Erste Ergebnisse zeigen eine differentielle Expression der  $\gamma$ -Glutamylcystein Synthetase und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, die aber noch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden müssen.

TNF- $\alpha$  vermittelt seine Wirkung über zwei verschiedene Rezeptoren, den TNF-Rezeptor-1 und den TNF-Rezeptor-2. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass H4IIE Zellen und die Transfektanten nur den TNF-Rezeptor-1 exprimieren, aber nicht den TNF-Rezeptor-2. Im Gegensatz dazu exprimieren primäre Rattenhepatozyten beide TNF-Rezeptoren. Die Aktivierung des TNF-R1 stimuliert Signalkaskaden, deren biologische Antworten Entzündung und Infektionsabwehr, Zytoprotektion, Zellproliferation sowie auch Zytotoxizität und Apoptoseinduktion sind. Die Rolle des TNF-R2 ist weniger gut verstanden. Nach einer Hypothese dient der TNF-R2 zur Akkumulation von TNF- $\alpha$ , um dann den Liganden an den TNF-R1 weiterzuleiten. Ein anderes Modell geht davon aus, dass der TNF-R2 den durch TNF-R1 eingeleiteten Prozess der Zytotoxizität weiter potenziert. In unserem Zellsystem ist die Expression des TNF-R1 ausreichend, um eine TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose in den H4IIE Zellen auszulösen. Es wäre aber interessant zu überprüfen, ob die Expression von beiden Rezeptoren zu einer Potenzierung der TNF- $\alpha$  Zytotoxizität führt und ob möglicherweise beide Rezeptoren benötigt werden, um eine Induktion der MnSOD hervorzurufen. Dafür müssten eine Reihe von weiteren Transfektionsexperimenten durchgeführt werden.

Die Durchführung der cDNA Array Analyse ergab die differentielle Expression einer Reihe von Genen zwischen den H4IIE Zellen und den TNF- $\alpha$  überexprimierenden 2-12 Zellen. Für einige dieser Gene gibt es in der Literatur Hinweise auf eine Beteiligung an der TNF- $\alpha$  Signalkaskade. Weiterführende Experimente zur Untersuchung dieser differentiell exprimierten Gene und ihre Rolle in den TNF- $\alpha$ -vermittelten Signalwegen werden benötigt.

## 5. Zusammenfassung

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) ist ein pleiotropes, proinflammatorisches Zytokin mit einer Vielzahl von biologischen Effekten. Die Effekte umfassen neben der TNF- $\alpha$ -vermittelten Zytotoxizität auch die Aktivierung von zellulären Signalwegen, die der proapoptotischen Wirkung von TNF- $\alpha$  entgegenwirken. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies spielt bei allen TNF- $\alpha$ -vermittelten Effekten eine wichtige Rolle. Es wird angenommen, dass TNF- $\alpha$  eine zentrale Rolle bei der Potenzierung eines Leberschadens durch hepatotoxische Substanzen oder ihre Metaboliten spielt. Nach der in dieser Arbeit aufgestellten Hypothese sind Leberzellen, die selbst TNF- $\alpha$  produzieren, vor der zytotoxischen Wirkung des eigenen TNF- $\alpha$  geschützt und haben auch einen besseren Schutz gegenüber anderen Substanzen, die oxidativen Stress verursachen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Rattenhepatomzellen stabil mit einer TNF- $\alpha$  cDNA transfiziert und anschließend mit den prooxidativ wirkenden Substanzen TNF- $\alpha$ , Adriamycin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Paraquat behandelt. Die TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen zeigen eine komplette Resistenz gegenüber der zytotoxischen Wirkung von exogenem TNF- $\alpha$  und eine partielle Resistenz gegenüber dem Zytostatikum Adriamycin. Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von TNF- $\alpha$  zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, einem direkten Mediator für oxidativen Stress. Um die Ursachen für die veränderte Sensitivität der transfizierten Zellen gegenüber oxidativem Stress zu identifizieren, wurde die Expression der antioxidativen Enzyme manganhaltige Superoxiddismutase (MnSOD), kupfer- und zinkhaltige Superoxiddismutase (CuZnSOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPx) untersucht. Die stabile Transfektion von TNF- $\alpha$  in den Rattenhepatomzellen führte, entgegen den Erwartungen, zur Herunterregulierung der basalen Expression der Katalase und der CuZnSOD, während die Expression der MnSOD und der GPx nicht verändert wurde. Weder in transfizierten noch in H4IIE Zellen war die MnSOD durch die verwendeten Oxidantien induzierbar. Exogenes TNF- $\alpha$  führte in den H4IIE Zellen zu einer Abnahme der CuZnSOD und der Katalase Expression. Alle anderen prooxidativ wirkenden Substanzen konnten in allen untersuchten Zellen die Katalase induzieren. TNF- $\alpha$  und Adriamycin lösten nur in den H4IIE Zellen, aber nicht in den transfizierten Zellen eine Erhöhung der GPx Expression aus. Paraquat führte zu einer Induktion der GPx Expression in den H4IIE Zellen und in den transfizierten Zellen, während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die GPx Expression in keiner Zelllinie induzieren konnte. Untersucht wurde

weiterhin, ob die Überexpression von TNF- $\alpha$  die Apoptoseinduktion durch prooxidativ wirkende Substanzen beeinflusst. Nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$  wurde nur in den H4IIE Zellen, aber nicht in den transfizierten Zellen eine apoptotische DNA-Fragmentierung gefunden. Adriamycin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Paraquat induzierten in unterschiedlichem Ausmaß in allen untersuchten Zellen eine DNA-Fragmentierung. Darüber hinaus wurde die Expression von bax und bcl-2, zwei Mitgliedern der Bcl-2 Familie, sowie die Expression des Tumorsuppressor Gens p53 untersucht. Exogenes TNF- $\alpha$  verursachte nur in den H4IIE Zellen eine Induktion der bax und p53 mRNA, während die Expression von bcl-2 nicht beeinflusst wurde. Adriamycin, Wasserstoffperoxid und Paraquat führten in keiner Zelllinie zu einer signifikanten Veränderung der bcl-2 und bax mRNA Expression, während die p53 mRNA Expression abnahm. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  in Rattenhepatomzellen zu einer Resistenz der transfizierten Zellen gegenüber exogenem TNF- $\alpha$  führt. Die Hypothese, dass eine Überexpression von TNF- $\alpha$  in Hepatomzellen einen generellen Schutz gegenüber oxidativem Stress bietet, wurde nicht bestätigt. Auch die in der Literatur diskutierte Vorstellung, dass die TNF- $\alpha$  Resistenz mit einer Induktion der MnSOD korreliert ist, konnte in diesem Zellmodell nicht bestätigt werden. Dagegen zeigen die Ergebnisse, dass die Überexpression von TNF- $\alpha$  die Expression der Katalase und anderer antioxidativer Enzyme vermindert und dass diese Veränderungen die Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Oxidantien wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhöht. Die Auswertung einer cDNA Array Analyse zeigt, dass in den TNF- $\alpha$  überexprimierenden Zellen von den 450 analysierten Genen 8 Gene hochreguliert und 31 Gene herunterreguliert sind. Die cDNA Array Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, dass die TNF- $\alpha$  Überexpression mit einer Herunterregulation antioxidativer Proteine einhergeht, und liefert Hinweise für weiterführende Untersuchungen zur Auswirkung einer TNF- $\alpha$  Überexpression auf Leberzellen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adams,J.M. & Cory,S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
- Ameyar,M., Shatrov,V., Bouquet,C., Capoulade,C., Cai,Z., Stancou,R., Badie,C., Haddada,H., and Chouaib,S. Adenovirus-mediated transfer of wild-type p53 gene sensitizes TNF resistant MCF7 derivatives to the cytotoxic effect of this cytokine: relationship with c-myc and Rb. *Oncogene* **18**, 5464-5472 (1999).
- Andus,T., Bauer,J. & Gerok,W. Effects of cytokines on the liver. *Hepatology* **13**, 364-375 (1991).
- Antras-Ferry,J., Maheo,K., Morel,F., Guillouzo,A., Cillard,P. & Cillard,J. Dexamethasone differently modulates TNF- $\alpha$ . *FEBS Lett.* **403**, 100-104 (1997).
- Asayama,K., Yokota,S., Dobashi,K., Hayashibe,H., Kawaoi,A. & Nakazawa,S. Purification and immunoelectron microscopic localization of cellular glutathione peroxidase in rat hepatocytes: quantitative analysis by postembedding method. *Histochemistry* **102**, 213-219 (1994).
- Arch,R.H. & Thompson,C.B. 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. *Mol. Cell Biol.* **18**, 558-565 (1998).
- Bai,J. & Cederbaum,A.I. Overexpression of catalase in the mitochondrial or cytosolic compartment increases sensitivity of HepG2 cells to tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 19241-19249 (2000).
- Balkwill,F.R. & Burke,F. The cytokine network [see comments]. *Immunol. Today* **10**, 299-304 (1989).
- Beier,K., Volk,A. & Fahimi,H.D. TNF-alpha downregulates the peroxisome proliferator activated receptor-alpha and the mRNAs encoding peroxisomal proteins in rat liver. *FEBS Lett.* **412**, 385-387 (1997).
- Beneke,R., Geisen,C., Zevnik,B., Bauch,T., Muller,W.U., Kupper,J.H. & Moroy,T. DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to PolyADP-ribosylation but have different requirements for p53. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6695-6703 (2000).
- Berlett,B.S. & Stadtman,E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **272**, 20313-20316 (1997).
- Beyaert,R. & Fiers,W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cytokines*, edited by Mire-Sluis,A. & Thorpe,R., Academic Press (1998).
- Birchmeier,C. & Gherardi,E. Developmental roles of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* **8**, 404-410 (1998).
- Bird,P.I. Serpins and regulation of cell death. *Results Probl. Cell Differ.* **24**, 63-89 (1998).
- Birnboim,H.C. & Doly,J. A rapide alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* **7**, 1513-1523 (1979).
- Blazka,M.E., Wilmer,J.L., Holladay,S.D., Wilson,R.E. & Luster,M.I. Role of pro-inflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**, 43-52 (1995).

- Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815 (1996).
- Borenfreund, E. & Puerner, J.A. Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed *in vitro*. *Toxicology* **39**, 121-134 (1986).
- Borrello, S., De Leo, M.E. & Galeotti, T. Defective gene expression of MnSOD in cancer cells. *Mol. Aspects Med.* **14**, 253-258 (1993).
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
- Branch, D.R., Shah, A., Guilbert, L.J. A specific and reliable bioassay for the detection of femtomolar levels of human and murine tumor necrosis factors. *J. Immunol. Methods* **143**, 251-261 (1991).
- Brucoleri, A., Gallucci, R., Germolec, D.R., Blackshear, P., Simeonova, P., Thurman, R.G., & Luster, M.I. Induction of early-immediate genes by tumor necrosis factor alpha contribute to liver repair following chemical-induced hepatotoxicity. *Hepatology* **25**, 133-141 (1997).
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. & Short, J.M. XL1-Blue: A high efficiency transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-380 (1987).
- Buttke, T.M. & Sandstrom, P.A. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today* **15**, 7-10 (1994).
- Campos, S.P., Wang, Y., Koj, A. & Baumann, H. Divergent transforming growth factor-beta effects on IL-6 regulation of acute phase plasma proteins in rat hepatoma cells. *J. Immunol.* **151**, 7128-7137 (1993).
- Carayol, N., Campbell, A., Vachier, I., Mainprice, I., Bousquet, J., Godard, P. & Chanez, P. Modulation of cadherin and catenin expression by tumor necrosis factor- $\alpha$  and dexamethason in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **26**, 341-347 (2002).
- Chandra, J., Samali, A. & Orrenius, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 323-333 (2000).
- Chen, Q., Seol, D.W., Carr, B. & Zarnegar, R. Co-expression and regulation of Met and Ron proto-oncogenes in human hepatocellular carcinoma tissues and cell lines. *Hepatology* **26**, 59-66 (1997).
- Chernov, M.V., Ramana, C.V., Adler, V.V. & Stark, G.R. Stabilization and activation of p53 are regulated independently by different phosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**, 2284-2289 (1998).
- Cho, G., Kang, S., Seo, S.J., Kim, Y. & Jung, G. The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase (sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C (MMC). *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 949-956 (1997).
- Claiborne, A., Malinowski, D. & Fridovich, I. Purification and characterization of hydroperoxidase II of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 11664 (1979).
- Cohen, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* **326**, 1-16 (1997).

- Cross,M.J., Hodgkin,M.N., Roberts,S., Landgren,E., Wakelam,M.J. & Claesson-Welsh,L. Tyrosine 766 in the fibroblast growth factor receptor-1 is required for FGF-stimulation of phospholipase C, phospholipase D, phospholipase A(2), phosphoinositide 3-kinase and cytoskeletal reorganisation in porcine aortic endothelial cells. *J. Cell Sci.* **113**, 643-651 (2000).
- Csermely,P., Schnaider,T., Soti,C., Prohaszka,Z. & Nardai,G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* **79**, 129-168 (1998).
- De Fabiani,E., Mitro,N., Anzulovich,A.C., Pinelli,A., Galli,G. & Crestani,M. The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor-alpha on the transcription of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4: a novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 30708-30716 (2001).
- Dietrich,J.B. Tyrosine aminotransferase: a transaminase among others? *Cell. Mol. Biol.* **38**, 95-114 (1992).
- Drane,P., Bravard,A., Bouvard,V. & May,E. Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression-implication in p53 mediated apoptosis. *Oncogene* **20**, 430-439 (2001).
- Draper,H.H., Squires,E.J., Mahmoodi,H., Wu,J., Agarwal,S. & Hadley,M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free. Radic. Biol. Med.* **15**, 353-363 (1993).
- Duckett,C.S. & Thompson,C.B. The control and execution of programmed cell death: an update. *Biochim. Biophys. Acta* **1332**, R45-R47 (1997).
- Dumoulin,F.L., Bach,A., Leifeld,L., El Bakri,M., Fischer,H.P., Sauerbruch,T. & Spengler,U. Semiquantitative analysis of intrahepatic cytokine mRNAs in chronic hepatitis C. *J. Infect. Dis.* **175**, 681-685 (1997).
- Earnshaw,W.C., Martins,L.M. & Kaufmann,S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424 (1999).
- Ebadi,M., Iversen,P.L., Hao,R., Cerutis,D.R., Rojas,P., Happe,H.K., Murrin,L.C. & Pfeiffer,R.F. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochem. Int.* **27**, 1-22 (1995).
- El-Bahay,C., Gerber,E., Horbach,M., Tran-Thi,Q.H., Rohrdanz,E. & Kahl,R. Influence of tumor necrosis factor-alpha and silibin on the cytotoxic action of alpha-amanitin in rat hepatocyte culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **158**, 253-260 (1999).
- Erhardt,P., Schremser,E.J. & Cooper,G.M. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol. Cell Biol.* **19**, 5308-5315 (1999).
- Estler,H.C., Grewe,M., Gaussling,R., Pavlovic,M. & Decker,K. Rat tumor necrosis factor-alpha. Transcription in rat Kupffer cells and *in vitro* posttranslational processing based on a PCR-derived cDNA. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **373**, 271-281 (1992).
- Esworthy,R.S., Ho,Y.S. & Hu,F.F. The Gpx1 gene encodes mitochondrial glutathione peroxidase in the mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **340**, 59-63 (1997).
- Farmer,G., Friedlander,P., Colgan,J., Manley,J.L. & Prives,C. Transcriptional repression by p53 involves molecular interactions distinct from those with the TATA box binding protein. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4281-4288 (1996).

- Feinberg, A.P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13 (1983).
- Ferrari, D.M. & Soling, H.D. The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem. J.* **339**, 1-10 (1999).
- Fiers, W. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. *FEBS Lett.* **285**, 199-212 (1991).
- Fransen, L., Ruyschaert, M.R., Van der Heyden, J. & Fiers, W. Recombinant tumor necrosis factor: species specificity for a variety of human and murine transformed cell lines. *Cell Immunol.* **100**, 260-267 (1986a).
- Fransen, L., Van der Heyden, J., Ruyschaert, R. & Fiers, W. Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon-gamma on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **22**, 419-426 (1986b).
- Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880 (1978).
- Fukuda, R., Satoh, S., Nguyen, X.T., Uchida, Y., Kohge, N., Akagi, S., Ikeda, S., Watanabe, M. & Fukumoto, S. Expression rate of cytokine mRNA in the liver of chronic hepatitis C: comparison with chronic hepatitis B. *J. Gastroenterol.* **30**, 41-47 (1995).
- Fuller, G.M. & Zhang, Z. Transcriptional control mechanism of fibrinogen gene expression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 469-479 (2001).
- Furuta, S., Hayashi, H., Hijikata, M., Miyazawa, S., Osumi, T. & Hashimoto, T. Complete nucleotide sequence of cDNA and deduced amino acid sequence of rat liver catalase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **83**, 313-317 (1986).
- Galea-Lauri, J., Richardson, A.J., Latchman, D.S. & Katz, D.R. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J. Immunol.* **157**, 4109-4118 (1996).
- Gant, T.W., Silverman, J.A., Bisgaard, H.C., Burt, R.K., Marino, P.A. & Thorgeirsson, S.S. Regulation of 2-acetylaminofluorene- and 3-methylcholanthrene-mediated induction of multidrug resistance and cytochrome P450IA gene family expression in primary hepatocyte cultures and rat liver. *Mol. Carcinog.* **4**, 499-509 (1991).
- Ginis, I., Hallenbeck, J.M., Liu, J., Spatz, M., Jaiswal, R. & Shohami, E. Tumor necrosis factor and reactive oxygen species cooperative cytotoxicity is mediated via inhibition of NF-kappaB. *Mol. Med.* **6**, 1028-1041 (2000).
- Goeddel, D.V. Signal transduction by tumor necrosis factor: the Parker B. Francis Lectureship *Chest.* **116**, 69S-73S (1999).
- Gonzalez-Amaro, R., Garcia-Monzon, C., Garcia-Buey, L., Moreno-Otero, R., Alonso, J.L., Yague, E., Pivel, J.P., Lopez-Cabrera, M., Fernandez-Ruiz, E. & Sanchez-Madrid, F. Induction of tumor necrosis factor alpha production by human hepatocytes in chronic viral hepatitis. *J. Exp. Med.* **179**, 841-848 (1994).
- Goossens, V., Stange, G., Moens, K., Pipeleers, D. & Grooten, J. Regulation of tumor necrosis factor-induced, mitochondria- and reactive oxygen species-dependent cell death by the electron flux through the electron transport chain complex I. *Antioxid. Redox. Signal.* **1**, 285-295 (1999a).
- Goossens, V., De Vos, K., Verammen, D., Steemans, M., Vancompernelle, K., Fiers, W., Vandenabeele, P. & Grooten, J. Redox regulation of TNF signaling. *Biofactors* **10**, 145-156 (1999b).

- Gossen, M. & Bujard, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 5547-5551 (1992).
- Gottlieb, T.M. & Oren, M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 77-102 (1996).
- Gravestien, L.A. & Borst, J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin. Immunol.* **10**, 423-434 (1998).
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G. & Pfizenmaier, K. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802 (1995a).
- Grell, M. Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J. Inflamm.* **47**, 8-17 (1995b).
- Grunfeld, C., Soued, M., Adi, S., Moser, A.H., Fiers, W., Dinarello, C.A. & Feingold, K.R. Interleukin 4 inhibits stimulation of hepatic lipogenesis by tumor necrosis factor, interleukin 1, and interleukin 6 but not by interferon- alpha. *Cancer Res.* **51**, 2803-2807 (1991).
- Guan, Y., Hickey, M.J., Borgstahl, G.E., Hallewell, R.A., Lepock, J.R., O'Connor, D., Hsieh, Y., Nick, H.S., Silverman, D.N. & Tainer, J.A. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry* **37**, 4722-4730 (1998).
- Gumbiner, B.M. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357 (1996).
- Hall, P.A. & Lane, D.P. Genetics of growth arrest and cell death: key determinants of tissue homeostasis. *Eur. J. Cancer* **30A**, 2001-12 (1994).
- Hanahan, D. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).
- Hartl, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-579 (1996).
- Hellin, A.C., Calmant, P., Gielen, J., Bours, V. & Merville, M.P. Nuclear factor-kappaB-dependent regulation of p53 gene expression induced by daunomycin genotoxic drug. *Oncogene* **16**, 1187-1195 (1998).
- Helms, M.J., Mohamed, A.A., MacEwan, D.J. Modulated kinase activities in cells undergoing tumour necrosis factor-induced apoptotic cell death. *FEBS Lett* **505**, 68-74 (2001).
- Hennet, T., Richter, C. & Peterhans, E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem. J.* **289**, 587-592 (1993).
- Higuchi, M., Singh, S. & Aggarwal, B.B. Characterization of the apoptotic effects of human tumor necrosis factor: development of highly rapid and specific bioassay for human tumor necrosis factor and lymphotoxin using human target cells. *J. Immunol. Methods* **178**, 173-181 (1995).
- Hill, B.A., Brown, P.C., Preisegger, K.H. & Silverman, J.A. Regulation of *mdr1b* gene expression in Fischer, Wistar and Sprague-Dawley rats *in vivo* and *in vitro*. *Carcinogenesis* **17**, 451-457 (1996).
- Himeno, T., Watanabe, N., Yamauchi, N., Maeda, M., Tsuji, Y., Okamoto, T., Neda, H. & Niitsu, Y. Expression of endogenous tumor necrosis factor as a protective protein against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **50**, 4941-4945 (1990).

- Hirose,K., Longo,D.L., Oppenheim,J.J. & Matsushima,K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J.* **7**, 361-368 (1993).
- Hirsch-Ernst,K.I., Ziemann,C., Schmitz-Salue,C., Foth,H. & Kahl,G.F. Modulation of P-glycoprotein and *mdr1b* mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **215**, 179-185 (1995).
- Hirsch-Ernst,K.I., Ziemann,C., Foth,H., Kozian,D., Schmitz-Salue,C. & Kahl,G.F. Induction of *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein expression by tumor necrosis factor alpha in primary rat hepatocyte cultures. *J. Cell Physiol.* **176**, 506-515 (1998).
- Ho,Y.S. & Crapo,J.D. Nucleotide sequences of cDNAs coding for manganese-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acid. Res.* **15**, 10070 (1987a).
- Ho,Y.S. & Crapo,J.D. cDNAs and deduced amino acid sequence of rat copper-zinc-containing superoxide dismutase. *Nucleic Acid. Res.* **15**, 6746 (1987b).
- Howe,A., Aplin,A.E., Alahari,S.K. & Juliano,R.L. Integrin signaling and cell growth control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 220-231 (1998).
- Hsu,H., Xiong,J. & Goeddel,D.V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* **81**, 495-504 (1995).
- Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G. & Goeddel,D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308 (1996a).
- Hsu,H., Huang,J., Shu,H.B., Baichwal,V. & Goeddel,D.V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity* **4**, 387-396 (1996b).
- Huang,Y., Peng,J., Oberley,L.W. & Domann,F.E. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic. Biol. & Med.* **23**, 314-320 (1997).
- Ichijo,H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**, 6087-6093 (1999).
- Iimuro,Y., Gallucci,R.M., Luster,M.I., Kono,H. & Thurman,R.G. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* **26**, 1530-1537 (1997).
- Innes,G.K., Fuller,B.J. & Hobbs,K.E.F. Functional testing of hepatocytes following their recovery from cryopreservation. *Cryobiol.* **25**, 23-30 (1988).
- Ito,H., Shirai,T., Yamamoto,S., Akira,M., Kawahara,S., Todd,C.W. & Wallace,R.B. Molecular cloning of the gene encoding rabbit tumor necrosis factor. *DNA* **5**, 157-165 (1986).
- Janssen-Heininger,Y.M., Poynter,M.E. & Baeuerle,P.A. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1317-1327 (2000).
- Jiang,Y., Woronicz,J.D., Liu,W. & Goeddel,D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* **283**, 543-546 (1999).
- Kelliher,M.A., Grimm,S., Ishida,Y., Kuo,F., Stanger,B.Z. & Leder,P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* **8**, 297-303 (1998).

- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
- Khatib, A.M., Kontogianna, M., Fallavollita, L., Jamison, B., Meterissian, S. & Brodt, P. Rapid induction of cytokine and E-selectin expression in the liver in response to metastatic tumor cells. *Cancer Res.* **59**, 1356-1361 (1999).
- Kim, Y.C., Masutani, H., Yamaguchi, Y., Itoh, K., Yamamoto, M. & Yodoi, J. Hemin-induced activation of the thioredoxin gene by Nrf2. A differential regulation of the antioxidant responsive element by a switch of its binding factors. *J. Biol. Chem.* **276**, 18399-18406 (2001).
- Klebanoff, S.J., Vadas, M.A. & Harlan, J.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **136**, 4220-4225 (1986).
- Kluck, R.M., Bossy-Wetzel, E., Green, D.R. & Newmeyer, D.D. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136 (1997).
- Kordula, T., Ripperger, J., Morella, K.M., Travis, J. & Baumann, H. Two separate signal transducer and activator of transcription proteins regulate transcription of the serine proteinase inhibitor-3 gene in hepatic cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 6752-6757 (1996a).
- Kordula, T. & Travis, J. The role of Stat and C/EBP transcription factors in the synergistic activation of rat serine protease inhibitor-3 gene by interleukin-6 and dexamethasone. *Biochem. J.* **313**, 1019-1027 (1996b).
- Koziel, M.J. Cytokine in viral hepatitis. *Semin. Liver Dis.* **19**, 157-169 (1999).
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. & Lu, S.D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* **53**, 45-53 (1988).
- Kroemer, G., Zamzami, N. & Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**, 44-51 (1997).
- Kuhnert, P., Wuthrich, C., Peterhans, E. & Pauli, U. The porcine tumor necrosis factor-encoding genes: sequence and comparative analysis. *J. Biol. Chem.* **102**, 171-178 (1991).
- Kumar, C.C. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* **17**, 1365-1373 (1998).
- Kwon, J., Lee, S.J., Benveniste, E.N. & Chung, I.Y. A 3' cis-acting element is involved in tumor necrosis factor-alpha gene expression in astrocytes Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *J. Biol. Chem.* **132**, 227-236 (1993a).
- Kwon, J., Chung, I.Y. & Benveniste, E.N. Cloning and sequence analysis of the rat tumor necrosis factor-encoding genes. *J. Biol. Chem.* **132**, 227-236 (1993b).
- Kyhse-Andersen, J. Electrophoretic transfer of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209 (1984).
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- Lai, A., Marcellus, R.C., Corbeil, H.B. & Branton, P.E. RBP1 induces growth arrest by repression of E2F-dependent transcription. *Oncogene* **18**, 2091-2100 (1999).
- Lakin, N.D. & Jackson, S.P. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene* **18**, 7644-7655 (1999).
- Le, J. & Vilcek, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* **61**, 588-602 (1989)

- Lee,F.Y., Li,Y., Zhu,H., Yang,S., Lin,H.Z., Trush,M. & Diehl,A.M. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology* **29**, 677-687 (1999a).
- Lee,K., Berthiaume,F., Stephanopoulos,G.N., Yarmush,D.M. & Yarmush,M.L. Metabolic flux analysis of postburn hepatic hypermetabolism. *Metab. Eng.* **2**, 312-327 (1999b).
- Liang,P. & MacRae,T.H. Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110**, 1431-1440 (1997).
- Lindl,T. & Bauer,J. *Zell- und Gewebekultur* 2. Auflage Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1989).
- Litman,T., Druley,T.E., Stein,W.D. & Bates,S.E. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 931-959 (2001).
- Liu,R., Buettner,G.R. & Oberley,L.W. Oxygen free radicals mediate the induction of manganese superoxide dismutase gene expression by TNF-alpha. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1197-11205 (2000).
- Lundstrom,J. & Holmgren,A. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 9114-9120 (1990).
- Luo,X., Budihardjo,I., Zou,H., Slaughter,C. & Wang,X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
- Luster,M.I., Simeonova,P.P., Gallucci,R. & Matheson,J. Tumor necrosis factor alpha and toxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* **29**, 491-511 (1999).
- MacMillan-Crow,L.A. & Cruthirds,D.L. Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic. Res.* **34**, 325-336 (2001).
- Maeda,M., Watanabe,N., Okamoto,T., Tsuji,N. & Niitsu,Y. Endogenous tumor necrosis factor functions as a resistant factor against adriamycin. *Int. J. Cancer* **58**, 376-379 (1994).
- Magnusson,C. & Vaux,D.L. Signalling by CD95 and TNF receptors: not only life and death. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 41-46 (1999).
- Manna,S.K., Zhang,H.J., Yan,T., Oberley,L.W. & Aggarwal,B.B. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J. Biol. Chem.* **273**, 13245-13254 (1998).
- Manna,S.K., Kuo,M.T. & Aggarwal,B.B. Overexpression of gamma-glutamylcysteine synthetase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappa B and activator protein-1. *Oncogene* **18**, 4371-4382 (1999).
- Marklund,S.L. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem. J.* **266**, 213-219 (1990).
- Matthews,N., Neale,M.L., Jackson,S.K. & Stark,J.M. Tumor cell killing by tumor necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* **62**, 153-155 (1987).
- Matés,J.M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83-104 (2000).

- May,P. & May,E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* **18**, 7621-7636 (1999).
- Meyer,M., Schrek,R. & Baeuerle,P.A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor. *EMBO J.* **12**, 2005-2015 (1993).
- Michalke,M., Cariers,A., Schliess,F. & Haussinger,D. Hypoosmolarity influences the activity of transcription factor NF-kappaB in rat H4IIE hepatoma cells. *FEBS Lett.* **465**, 64-68 (2000).
- Michalopoulos,G.K. & DeFrances,M.C. Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66 (1997).
- Miranda-Vizuete,A., Ljung,J., Damdimopoulos,A.E., Gustafsson,J.A., Oko,R., Pelto-Huikko,M. & Spyrou,G. Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J. Biol. Chem.* **276**, 31567-74 (2001).
- Miyashita,T. & Reed,J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299 (1995).
- Morales,A., Garcia-Ruiz,C., Miranda,M., Mari,M., Colell,A., Ardite,E. & Fernandez-Checa,J.C. Tumor necrosis factor increases hepatocellular glutathione by transcriptional regulation of the heavy subunit chain of gamma-glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **272**, 30371-30379 (1997).
- Mosmann,T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55-63 (1983).
- Mullis,K.B. & Faloona,F.A. Synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Enzymology* **155**, F335-F350 (1992).
- Nath,R., Kumar,D., Li,T. & Singal,P.K. Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular system. *Toxicology* **155**, 17-26 (2000).
- Nedwin,G.E., Svedersky,L.P., Bringman,T.S., Palladino,M.A., Jr. & Goeddel,D.V. Effect of interleukin 2, interferon-gamma, and mitogens on the production of tumor necrosis factors alpha and beta. *J. Immunol.* **135**, 2492-2497 (1985).
- Nejjari,M., Hafdi,Z., Dumortier,J., Bringuier,A.F., Feldmann,G. & Scoazec,J.Y.  $\alpha\beta 1$  integrin expression in hepatocarcinoma cells: regulation and role in cell adhesion and migration. *Int. J. Cancer* **83**, 518-525 (1999).
- Nenoi,M., Ichimura,S., Mita,K., Yukawa,O. & Cartwright,I.L. Regulation of the catalase gene promoter by Sp1, CCAAT-recognizing factors, and a WT1/Egr-related factor in hydrogen peroxide-resistant HP100 cells. *Cancer Res.* **61**, 5885-5894 (2001).
- Neumann,B., Machleidt,T., Lifka,A., Pfeffer,K., Vestweber,D., Mak,T.W., Holzmann,B. & Krönke,M. Crucial role of 55-kilodalton TNF receptor in TNF-induced adhesion molecule expression and leukocyte organ infiltration. *J. Immunol.* **156**, 1587-1593 (1996).
- Niitsu,Y., Watanabe,N., Neda,H., Yamauchi,N., Maeda,M., Sone,H. & Kuriyama,H. Induction of synthesis of tumor necrosis factor in human and murine cell lines by exogenous recombinant human tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **48**, 5407-5410 (1988).
- Nishimura,A., Morita,M., Nishimura,Y. & Sugino,Y. A rapid and high efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucl. Acids. Res.* **18**, 6169 (1990).
- Nordberg,J. & Arnér,E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1287-1312 (2001).

- Oberhammer, F.A., Pavelka, M., Sharma, S., Tiefenbacher, R., Purchio, A.F., Bursch, W. & Schulte-Hermann, R. Induction of apoptosis in cultured hepatocytes and in regressing liver by transforming growth factor beta 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 5408-5412 (1992).
- Ohkubo, K., Ogata, S., Misumi, Y., Takami, N., Sinohara, H. & Ikehara, Y. Cloning, structure and expression of cDNA for mouse contrapsin and a related protein. *Biochem. J.* **276**, 337-342 (1991).
- Okamoto, T., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, Y., Tsuji, N., Itoh, Y., Neda, H. & Niitsu, Y. Endogenous tumor necrosis factor exerts its protective function intracellularly against the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor. *Cancer Res.* **52**, 5278-5281 (1992).
- Ori, A., Zauberman, A., Doitsh, G., Paran, N., Oren, M. & Shaul, Y. p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53. *EMBO J.* **17**, 544-553 (1998).
- Papadakis, K.A. & Targan, S.R. Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. *Gastroenterology* **119**, 1148-57 (2000).
- Pastorino, J.G., Simbula, G., Yamamoto, K., Glascott, P.A., Jr., Rothman, R.J. & Farber, J.L. The cytotoxicity of tumor necrosis factor depends on induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **271**, 29792-29798 (1996).
- Pastorino, J.G., Tafani, M. & Farber, J.L. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositide-3-OH kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **274**, 19411-19416 (1999).
- Perera, C.S., St Clair, D.K. & McClain, C.J. Differential regulation of manganese superoxide dismutase activity by alcohol and TNF in human hepatoma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **10**, 471-476 (1995).
- Pietrini, G., Carrera, P. & Borgese, N. Two transcripts encode rat cytochrome b5 reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 7246-7250 (1988).
- Pitot, H.C., Peraino, C., Morse, P.A. & Potter, V.A. Hepatomas in tissue culture compared with adapting liver *in vivo*. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* **13**, 229-242 (1964).
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-305 (1997).
- Prins, J.B., Ledgerwood, E.C., Ameloot, P., Vandenabeele, P., Faraco, P.R., Bright, N.A., O'Rahilly, S. & Bradley, J.R. Tumor necrosis factor-induced cytotoxicity is not related to rates of mitochondrial morphological abnormalities or autophagy-changes that can be mediated by TNFR-I or TNFR-II. *Biosci. Rep.* **18**, 329-340 (1998).
- Rahman, I. & MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* **16**, 534-554 (2000).
- Reed, J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin. Hematol.* **34**, 9-19 (1997).
- Reed, J.C. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**, 3225-3236 (1998).
- Richards, C.D., Brown, T.J., Shoyab, M., Baumann, H. & Gauldie, J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes *in vitro*. *J. Immunol.* **148**, 1731-1736 (1992).
- Robaye, B., Mosselmans, R., Fiers, W., Dumont, J.E. & Galand, P. Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **138**, 447-453 (1991).

- Roehrdanz,E. & Kahl,R. Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 27-38 (1998).
- Roehrdanz,E., Obertriffter,B., Ohler,S., Tran-Thi,Q.H. & Kahl,R. Influence of Adriamycin and paraquat on antioxidant enzyme expression in primary rat hepatocytes. *Arch. Toxicol.* **74**, 231-7 (2000).
- Ros,J.E., Schuetz,J.D., Geuken,M., Streetz,K., Moshage,H., Kuipers,F., Manns,M.P., Jansen,P.L., Trautwein,C. & Muller,M. Induction of Mdr1b expression by tumor necrosis factor-alpha in rat liver cells is independent of p53 but requires NF-kappaB signaling. *Hepatology* **33**, 1425-1431 (2001).
- Rothstein,J.D., Bristol,L.A., Hosler,B., Brown,R.H., Jr. & Kuncl,R.W. Chronic inhibition of superoxide dismutase produces apoptotic death of spinal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 4155-4159 (1994).
- Ryffel,G.U. Mutations in the human genes encoding the transcription factors of the hepatocyte nuclear factor (HNF)1 and HNF4 families: functional and pathological consequences. *J. Mol. Endocrinol.* **27**, 11-29 (2001).
- Sachs,L. Statistische Methoden: Planung und Auswertung. 7. Auflage, Springer Verlag,Berlin/Heidelberg/NewYork (1993)
- Sadofsky,M.J. The RAG proteins in V(D)J recombination: more than just a nuclease. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1399-1409 (2001).
- Sambrook,J., Fritsch,E.F. & Maniatis,T. *Molecular Cloning I-III*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
- Sanger,F., Micklen,S. & Coulson,A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **74**, 5463-5467 (1977).
- Sato,N., Goto,T. & Haranaka,K. Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 1113-1121 (1986).
- Schlaepfer,D.D. & Hunter,T. Focal adhesion kinase overexpression enhances ras-dependent integrin signaling to ERK2/mitogen-activated protein kinase through interactions with and activation of c-Src. *J. Biol. Chem.* **272**, 13189-13195 (1997).
- Schmidt,K.N., Amstad,P., Cerutti,P. & Baeuerle,P.A. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messenger in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem. Biol.* **2**, 13-22 (1995).
- Schook,L.B., Lockwood,J.F., Yang, S.D. & Myers,M.J. Dimethylnitrosamine (DMN)-induced IL-1 beta, TNF-alpha, and IL-6 inflammatory cytokine expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **116**, 110-6 (1992).
- Schreck,R., Riber,P. & Baeuerle,P.A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258 (1991).
- Schrenk,D., Gant,T.W., Michalke,A., Orzechowski,A., Silverman,J.A., Battula,N. & Thorgeirsson,S.S. Metabolic activation of 2-acetylaminofluorene is required for induction of multidrug resistance gene expression in rat liver cells. *Carcinogenesis* **15**, 2541-2546 (1994).
- Schulze-Osthoff,K., Bakker,A.C., Vanhaesebroeck,B., Beyaert,R., Jacob,W.A. & Fiers,W. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* **267**, 5317-5323 (1992).

- Schumann,J. & Tiegs,G. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins. *Toxicology* **138**, 103-126 (1999).
- Schwalb,D.M., Han,H.M., Marino,M. Identification of a new receptor subtype for tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **268**, 9949-9954 (1993).
- Sheehan,D., Meade,G., Foley,V.M. & Dowd,C.A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* **360**, 1-16 (2001).
- Shinagawa,T., Yoshioka,K., Kakumu,S., Wakita,T., Ishikawa,T., Itoh,Y. & Takayanagi,M. Apoptosis in cultured rat hepatocytes: the effects of tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J. Pathol.* **165**, 247-253 (1991).
- Shirai,T., Shimizu,N., Shiojiri,S., Horiguchi,S. & Ito,H. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for mouse tumor necrosis factor. *DNA* **7**, 193-201 (1988).
- Siemankowski,L.M., Morreale,J., Briehl,M.M. Antioxidant defenses in the TNF-treated MCF-7 cells: selective increase in MnSOD. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 919-24 (1999).
- Solomon,K.A., Pesti,N., Wu,G. & Newton,R.C. Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J. Immunol.* **163**, 4105-4108 (1999).
- Spolarics,Z. & Wu,J.X. Tumor necrosis factor alpha augments the expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Life Sci.* **60**, 565-571 (1997).
- Spyrou,G., Enmark,E., Miranda-Vizuetes,A. & Gustafsson,J. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**, 2936-2941 (1997).
- Stein,U., Walther,W. & Shoemaker,R.H. Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance. *Br. J. Cancer* **74**, 1384-1391 (1996).
- Steller,H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).
- Stuart,K.A., Riordan,S.M., Lidder,S., Crostella,L., Williams,R. & Skouteris,G.G. Hepatocyte growth factor/scatter factor-induced intracellular signalling. *Int. J. Exp. Pathol.* **81**, 17-30 (2000).
- Sueoka,E., Sueoka,N., Okabe,S., Koza,T., Komori,A., Ohta,T., Suganuma,M., Kim,S.J., Lim,I.K. & Fujiki, H. Expression of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene and early response genes by nodularin, a liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **123**, 419-419 (1997).
- Sugarman,B.J., Lewis,G.D., Eessalu,T.E., Aggarwal,B.B. & Shepard,H.M. Effects of growth factors on the antiproliferative activity of tumor necrosis factors. *Cancer Res.* **47**, 780-786 (1987).
- Susin,S.A., Lorenzo,H.K., Zamzami,N., Marzo,I., Brenner,C., Larochette,N., Prevost,M.C., Alzari,P.M. & Kroemer,G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J. Exp. Med.* **189**, 381-394 (1999).

- Suzuki,K., Nakamura,M., Hatanaka, Y., Kayanoki, Y., Tatsumi, H. & Taniguchi, N. Induction of apoptotic cell death in human endothelial cells treated with snake venom: implication of intracellular reactive oxygen species and protective effects of glutathione and superoxide dismutases. *J. Biochemistry* **122**, 1260-1264 (1997).
- Suzuki,H., Chiba,T., Kobayashi,M., Takeuchi,M., Suzuki,T., Ichiyama,A., Ikenoue,T., Omata,M., Furuichi,K. & Tanaka,K. IkappaBalph ubiquitination is catalyzed by an SCF-like complex containing Skp1, cullin-1, and two F-box/WD40-repeat proteins, betaTrCP1 and betaTrCP2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 127-132 (1999a).
- Suzuki,H., Chiba,T., Kobayashi,M., Takeuchi,M., Furuichi,K. & Tanaka,K. *In vivo* and *in vitro* recruitment of an IkappaBalph-ubiquitin ligase to IkappaBalph phosphorylated by IKK, leading to ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **256**, 121-126 (1999b).
- Tabibzadeh,S.,Kong,Q.F.,Kapur,S.,Satyaswaroop,P.G. & Aktories,K. Tumor necrosis factor-alpha-mediated dyscohesion of epithelial cells is associated with disordered expression of cadherin/beta-catenin and disassembly of actin filaments. *Hum. Reprod.* **10**, 994-1004 (2002).
- Takeichi,M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 619-627 (1995).
- Tartaglia,L.A., Pennica,D. & Goeddel,D.V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18542-18548 (1993).
- Tashiro,T., Yoshida,J., Mizuno,M. & Sugita,K. Reinforced cytotoxicity of lymphokine-activated killer cells toward glioma cells by transfection with the tumor necrosis factor-alpha gene. *J. Neurosurg.* **78**, 252-256 (1993).
- Tilg,H. The role of cytokines in the pathophysiology of chronic liver diseases. *Int. J. Clin. Lab Res.* **23**, 179-185 (1993).
- Tovey,M.G., Gugenheim,J., Guymarho,J., Blanchard,B., Vanden Broecke,C., Gresser,I., Bismuth,H. & Reynes,M. Genes for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor are expressed at markedly reduced levels in the livers of patients with severe liver disease. *Autoimmunity* **10**, 297-310 (1991).
- Toyokuni,S. Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation. *Biotherapy* **11**, 147-154 (1998).
- Tracey,K.J. Tumor necrosis factor-alpha. *The Cytokine Handbook 2<sup>nd</sup> Edition*, edited by Thompson, Academic Press (1994).
- Troy,C.M. & Shelanski,M.L. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **91**, 6384-6387 (1994).
- Tsujimoto,Y. & Shimizu,S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* **466**, 6-10 (2000).
- Vilcek,J. & Le,J. Immunology of cytokines: an introduction. *The Cytokine Handbook 2<sup>nd</sup> Edition*, edited by Thomson,A., Academic Press (1994).
- Voehringer,D.W. & Meyn,R.E. Redox aspects of Bcl-2 function. *Antioxid. Redox. Signal.* **2**, 537-550 (2000a).
- Voehringer,D.W., Hirschberg,D.L., Xiao,J., Lu,Q., Roederer,M., Lock,C.B., Herzenberg,L.A., Steinman,L. & Herzenberg,L.A. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **97**, 2680-2685 (2000b).

- Wan,X.S., Devalaraja,M.N. & St Clair,D.K. Molecular structure and organization of the human manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biol.* **13**, 1127-1136 (1994).
- Wang,Q. & Beck,W.T. Transcriptional suppression of multidrug resistance-associated protein (MRP) gene expression by wild-type p53. *Cancer Res.* **58**, 5762-5769 (1998).
- Watanabe,N., Neda,H., Ohtusuka,Y., Sone,H., Yamauchi,N., Maeda,M., Kuriyama,H. & Niitsu,Y. Signalling pathway of tumor necrosis factor in normal and tumor cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **28**, 157-163 (1989).
- Watanabe,N., Tsuji,N., Tsuji,Y., Sasaki,H., Okamoto,T., Akiyama,S., Kobayashi,D., Sato,T., Yamauchi,N. & Niitsu,Y. Endogenous tumor necrosis factor inhibits the cytotoxicity of exogenous tumor necrosis factor and adriamycin in pancreatic carcinoma cells. *Pancreas* **13**, 395-400 (1996).
- Watanabe,N., Nakada,K. & Kobayashi,Y. Processing and release of tumor necrosis factor alpha. *Eur. J. Biochem.* **253**, 576-582 (1998).
- Warner,B.B., Stuart,L., Gebb,S. & Wispe,J.R. Redox regulation of manganese superoxide dismutase. *Am. J. Physiol.* **271**, L150-158 (1996).
- Weiss,T., Grell,M., Siemienski,K., Muhlenbeck,F., Durkop,H., Pfizenmaier,K., Scheurich,P. & Wajant,H. TNFR80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. *J. Immunol.* **161**, 3136-3142 (1998).
- Wille,W., Cremer,H., Barthels,D. & Goldowitz,D. Hybridization analyses of nervous system gene expression. *Elsevier Science Publishers B.V.* (1992).
- Woitach,J.T., Zhang,M., Niu,C.H. & Thorgeirsson,S.S. A retinoblastoma-binding protein that affects cell-cycle control and confers transforming ability. *Nat. Genet.* **19**, 371-374 (1998).
- Wolf,D., Hallmann,R., Sass,G., Sixt,M., Küsters,S., Fregien,B., Trautwein,C. & Tiegs,G. TNF- $\alpha$ -induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1-Relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J. Immunol.* **166**, 1300-1307 (2001).
- Wong,G.H. & Goeddel,D.V. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**, 941-944 (1988).
- Wong,G.H., Elwell,J.H., Oberley,L.W. & Goeddel,D.V. Manganese superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**, 923-931 (1989).
- Yamada,T. & Ohyama,H. Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* **53**, 65-75 (1988).
- Yamao,F. Ubiquitin system: selectivity and timing of protein destruction. *J. Biochem. (Tokyo)* **125**, 223-229 (1999).
- Yamauchi,N., Kuriyama,H., Watanabe,N., Neda,H., Maeda,M., Niitsu,Y. Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells *in vitro*. *Cancer Res.* **49**, 1671-1675 (1989).
- Yannelli,J.R., Hyatt,C., Johnson,S., Hwu,P. & Rosenberg,S.A. Characterization of human tumor cell lines transduced with the cDNA encoding either tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) or interleukin-2 (IL-2). *J. Immunol. Methods* **161**, 77-90 (1993).
- Yasmineh,W.G., Parkin,J.L., Caspers,J.I. & Theologides,A. Tumor necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Res.* **51**, 3990-3995 (1991).

- Yeh, W.C., Shahinian, A., Speiser, D., Kraunus, J., Billia, F., Wakeham, A., de la Pompa, J.L., Ferrick, D., Hum, B., Iscove, N., Ohashi, P., Rothe, M., Goeddel, D.V. & Mak, T.W. Early lethality, functional NF-kappaB activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* **7**, 715-25 (1997).
- Yeh, W.C., Pompa, J.L., McCurrach, M.E., Shu, H.B., Elia, A.J., Shahinian, A., Ng, M., Wakeham, A., Khoo, W., Mitchell, K., El Deiry, W.S., Lowe, S.W., Goeddel, D.V. & Mak, T.W. FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* **279**, 1954-1958 (1998).
- Yeung, M.C., Liu, J. & Lau, A.S. An essential role for the interferon-inducible, double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in the tumor necrosis factor-induced apoptosis in U937 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **93**, 12451-12455 (1996).
- Yin, Y., Terauchi, Y., Solomon, G.G., Aizawa, S., Rangarajan, P.N., Yazaki, Y., Kadowaki, T. & Barrett, J.C. Involvement of p85 in p53-dependent apoptotic response to oxidative stress. *Nature* **391**, 707-710 (1998).
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549-56 (1999).
- Zyad, A., Benard, J., Tursz, T., Clarke, R. & Chouaib, S. Resistance to TNF-alpha and adriamycin in the human breast cancer MCF-7 cell line: relationship to MDR1, MnSOD, and TNF gene expression. *Cancer Res.* **54**, 825-831 (1994).

## 7. Anhang

### Tabellen der Originaldaten der Ergebnisse

**Tab. A: Viabilität nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$**

<b>Versuch 1</b>						
Konz.[ng/ml]	OD H4IIE	% Viab. H4IIE	OD 2-12	% Viab. 2-12	OD 13-44	% Viab. 13-44
0	0,693	100	0,427	100	0,594	100
5	0,674	97	0,418	97	0,555	93
10	0,215	23	0,423	99	0,536	89
25	0,129	9	0,432	101	0,432	69
<b>Versuch 2</b>						
Konz.[ng/ml]	OD H4IIE	% Viab. H4IIE	OD 2-12	% Viab. 2-12	OD 13-44	% Viab. 13-44
0	0,701	100	0,438	100	0,578	100
5	0,671	95	0,426	97	0,572	99
10	0,209	22	0,419	95	0,548	94
25	0,128	9	0,444	102	0,421	69
<b>Versuch 3</b>						
Konz.[ng/ml]	OD H4IIE	% Viab. H4IIE	OD 2-12	% Viab. 2-12	OD 13-44	% Viab. 13-44
0	0,713	100	0,42	100	0,605	100
5	0,644	89	0,416	99	0,556	91
10	0,219	23	0,414	98	0,531	86
25	0,125	9	0,429	103	0,376	57
<b>Versuch 4</b>						
Konz.[ng/ml]	OD H4IIE	% Viab. H4IIE	OD 2-12	% Viab. 2-12	OD 13-44	% Viab. 13-44
0	0,695	100	0,435	100	0,57	100
5	0,672	96	0,425	97	0,565	99
10	0,216	23	0,418	95	0,548	96
25	0,125	9	0,45	104	0,443	75

**Tab. B: MDA Freisetzung nach Behandlung mit exogenem TNF- $\alpha$**

<b>Versuch 1</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE	% H4IIE	2-12	% 2-12	13-44	% 13-44
0	31,98	100	33,37	100	37,26	100
5	27,48	85,93	31,05	93,05	29,49	79,15
10	27,38	85,62	27,63	82,8	35,71	95,84
15	52,78	165,04	31,05	93,05	42,54	114,17
<b>Versuch 2</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE	% H4IIE	2-12	% 2-12	13-44	% 13-44
0	32,6	100	34,15	100	30,43	100
5	33,38	102,39	29,49	86,35	35,7	117,32
10	39,89	122,36	32,6	95,46	37,26	122,44
15	46,57	142,85	35,71	104,57	38,81	127,54
<b>Versuch 3</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE	% H4IIE	2-12	% 2-12	13-44	% 13-44
0	33,53	100	34,16	100	32,91	100
5	34,46	102,77	36,32	106,32	34,31	104,25
10	39,27	117,12	33,22	97,25	38,5	116,99
15	43,16	128,72	33,38	97,72	40,06	121,73
<b>Versuch 4</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE	% H4IIE	2-12	% 2-12	13-44	% 13-44
0	37,26	100	30,74	100	32,75	100
5	38,03	102,07	36,64	119,19	32,89	100,43
10	42,54	114,17	32,91	107,06	37,41	114,23
15	54,8	147,07	33,06	107,55	40,05	122,29

**Tab. C: Expression der CuZnSOD nach Behandlung mit TNF- $\alpha$** 

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus CuZnSOD-Intensität und 18S-rRNA-Intensität

<b>Versuch 1</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE CuZnSOD/18S	% H4IIE	2-12 CuZnSOD/18S	% 2-12	13-44 CuZnSOD/18S	% 13-44
0	0,6673	100,00	0,5966	100,00	0,4278	100,00
5	0,4989	74,76	0,6883	115,38	0,3854	90,09
10	0,3688	55,27	0,6319	105,92	0,3770	88,14
<b>Versuch 2</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE CuZnSOD/18S	% H4IIE	2-12 CuZnSOD/18S	% 2-12	13-44 CuZnSOD/18S	% 13-44
0	1,4994	100,00	0,8380	100,00	0,9721	100,00
5	1,2386	82,61	0,9736	116,18	0,8798	90,51
10	0,9505	63,39	0,9280	110,73	0,8030	82,61
<b>Versuch 3</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE CuZnSOD/18S	% H4IIE	2-12 CuZnSOD/18S	% 2-12	13-44 CuZnSOD/18S	% 13-44
0	0,7681	100,00	0,6829	100,00	0,7261	100,00
5	0,7200	93,74	0,7333	107,38	0,5331	73,42
10	0,5926	77,16	0,7293	106,80	0,5801	79,89
<b>Versuch 4</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE CuZnSOD/18S	% H4IIE	2-12 CuZnSOD/18S	% 2-12	13-44 CuZnSOD/18S	% 13-44
0	1,8250	100,00	1,1055	100,00	1,0722	100,00
5	1,5560	85,26	1,1132	100,69	1,0662	99,44
10	1,0477	57,41	1,0907	98,65	1,0240	95,51

**Tab. D: Expression der Katalase nach Behandlung mit TNF- $\alpha$** 

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus MnSOD-Intensität und 18S-rRNA-Intensität

<b>Versuch 1</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,9107	100,00	1,1521	100,00	1,0104	100,00
5	0,4558	50,05	1,2574	109,14	0,8015	79,33
10	0,3911	42,94	1,3651	118,50	0,8216	81,31
<b>Versuch 2</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	1,3632	100,00	1,6752	100,00	1,6449	100,00
5	0,7667	56,24	1,8772	112,06	1,5494	94,20
10	0,6061	44,46	2,1187	126,47	1,3265	80,64
<b>Versuch 3</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,7316	100,00	0,6268	100,00	0,5237	100,00
5	0,5115	69,92	0,6294	100,42	0,4530	86,50
10	0,4281	58,51	0,7568	120,74	0,4847	92,55
<b>Versuch 4</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,7243	100,00	0,4186	100,00	0,3622	100,00
5	0,5562	76,80	0,4323	103,28	0,4152	114,63
10	0,4232	58,43	0,4661	111,34	0,4413	121,84

**Tab. E: Katalase Aktivität nach Behandlung mit TNF- $\alpha$** 

Angegeben sind die Units pro mg Protein

<b>Versuch 1</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	271,00	100	195,24	100	118,40	100
5	200,00	74	198,60	102	114,59	97
10	185,00	68	214,54	110	133,63	113
15	172,00	63	231,87	119	147,15	124
<b>Versuch 2</b>						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	256,00	100	174,47	100	120,59	100
5	221,00	86	191,08	110	123,75	103
10	203,00	79	195,73	112	127,27	106
15	184,00	72	198,34	114	143,68	119

Fortsetzung Tab. E

Versuch 3						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	261,00	100	181,14	100	113,34	100
5	229,00	88	184,84	102	122,81	108
10	214,00	82	189,85	105	131,57	116
15	193,00	74	225,70	125	131,87	116
Versuch 4						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	241,95	100	137,79	100	108,00	100
5	217,29	90	151,01	110	125,14	116
10	205,00	85	154,86	112	109,31	101
15	197,44	82	177,79	129	106,81	99

Tab. F: Expression der Glutathionperoxidase (GPx) nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ 

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus GPx-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	1,0879	100	1,8940	100	0,9114	100
5	1,4646	135	1,9085	101	1,0695	117
10	1,6711	154	1,5713	83	1,0599	116
15	1,5350	141	1,4759	78	1,2538	138
Versuch 2						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	1,1685	100	1,3861	100	1,1386	100
5	1,2891	110	1,3656	99	1,1026	97
10	1,4206	122	1,3491	97	1,2110	106
15	1,3328	114	1,2819	92	1,1271	99
Versuch 3						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	1,1699	100	1,3700	100	1,1426	100
5	1,2770	109	1,3536	99	1,1123	97
10	1,3981	120	1,3337	97	1,2086	106
15	1,3149	112	1,2797	93	1,1354	99
Versuch 4						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	1,1763	100	1,3916	100	1,1320	100
5	1,2989	110	1,3778	99	1,1045	98
10	1,4296	122	1,3518	97	1,2136	107
15	1,3310	113	1,2888	93	1,1307	100

Tab. G: Expression von p53 nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ 

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus p53-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8588	100	0,9029	100	1,0167	100
5	1,0121	118	0,9260	103	0,9210	91
10	0,9765	114	0,8891	98	0,8372	82
15	1,1179	130	0,9520	105	0,8926	88
Versuch 2						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,7591	100	0,7407	100	0,7250	100
5	0,8783	115,713	0,7251	98	0,7113	98
10	0,8896	117,195	0,7587	102	0,7109	98
15	0,8228	108,401	0,7603	103	0,7217	100
Versuch 3						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8442	100	0,8438	100	0,8263	100
5	0,9688	115	0,8330	99	0,8063	98
10	0,9917	117	0,7293	86	0,7916	96
15	0,8024	95	0,8518	101	0,8049	97

Fortsetzung Tab. G

Versuch 4						
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8211	100	0,8189	100	0,8024	100
5	0,9487	116	0,8090	99	0,7773	97
10	0,9752	119	0,6935	85	0,7644	95
15	0,8712	106	0,8328	102	0,7758	97

Tab. H: Expression von bcl-2 und bax nach Behandlung mit TNF- $\alpha$ 

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus bcl-2/bax-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1							
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE bcl-2/bax/GAPDH	% H4IIE	2-12 bcl-2/bax/GAPDH	% 2-12	13-44 bcl-2/bax/GAPDH	% 13-44	
0	6,91158E-14	100	6,66513E-14	100	6,57651E-14	100	
5	6,8519E-14	99	7,12E-14	107	6,21309E-14	94	
10	6,46554E-14	94	6,65683E-14	100	5,92543E-14	90	
15	6,03567E-14	87	6,59108E-14	99	5,80919E-14	88	
Versuch 2							
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE bcl-2/bax/GAPDH	% H4IIE	2-12 bcl-2/bax/GAPDH	% 2-12	13-44 bcl-2/bax/GAPDH	% 13-44	
0	4,05793E-14	100	3,46E-14	100	3,01212E-14	100	
5	4,0188E-14	99	3,17444E-14	92	3,01388E-14	100	
10	3,62114E-14	89	3,2066E-14	93	3,14253E-14	104	
15	3,30197E-14	81	3,15789E-14	91	3,22045E-14	107	
Versuch 3							
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE bcl-2/bax/GAPDH	% H4IIE	2-12 bcl-2/bax/GAPDH	% 2-12	13-44 bcl-2/bax/GAPDH	% 13-44	
0	5,62066E-14	100	5,23E-14	100	4,63619E-14	100	
5	5,73867E-14	102	5,04948E-14	97	4,68099E-14	101	
10	5,27578E-14	94	5,07641E-14	97	4,75095E-14	102	
15	4,78963E-14	85	5,02115E-14	96	4,71009E-14	102	
Versuch 4							
TNF- $\alpha$ [ng/ml]	H4IIE bcl-2/bax/GAPDH	% H4IIE	2-12 bcl-2/bax/GAPDH	% 2-12	13-44 bcl-2/bax/GAPDH	% 13-44	
0	3,99998E-14	100	3,42E-14	100	2,99704E-14	100	
5	3,95688E-14	99	3,13648E-14	92	2,99418E-14	100	
10	3,57561E-14	89	3,01594E-14	88	3,09725E-14	103	
15	3,13636E-14	78	3,06009E-14	89	3,16923E-14	106	

Tab. I: Viabilität nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Versuch 1						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,836	100	0,595	100	0,846	100
0,5	0,731	86	4,70E-01	76	0,634	73
1	0,616	71	0,244	33	0,277	27
2	0,439	48	0,158	17	0,142	9
Versuch 2						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,817	100	5,98E-01	100	0,814	100
0,5	0,718	87	0,473	76	0,617	74
1	0,611	72	0,247	34	0,265	26
2	0,425	48	0,161	17	0,142	10
Versuch 3						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,757	100	5,75E-01	100	0,876	100
0,5	0,699	92	0,463	78	0,661	73
1	0,608	78	0,322	50	0,386	39
2	0,466	58	0,175	21	0,187	15
Versuch 4						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,764	100	5,98E-01	100	0,862	100
0,5	0,662	85	0,46	74	0,632	71
1	0,548	69	0,305	45	0,392	41
2	0,464	57	0,176	20	0,189	15

**Tab. J: Viabilität nach Behandlung mit Adriamycin**

<b>Versuch 1</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,941	100	0,432	100	0,821	100
1	0,595	60	3,94E-01	90	0,495	57
5	0,246	20	0,242	48	0,253	24
10	0,156	10	0,203	37	0,151	11
<b>Versuch 2</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,952	100	4,70E-01	100	0,920	100
1	0,584	58	0,431	90	0,535	55
5	0,269	23	0,224	39	0,234	19
10	0,127	6	0,214	36	0,189	14
<b>Versuch 3</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,911	100	4,78E-01	100	0,854	100
1	0,572	60	0,44	91	0,529	59
5	0,274	24	0,229	39	0,249	23
10	0,136	8	0,215	36	0,144	9
<b>Versuch 4</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,928	100	4,01E-01	100	0,765	100
1	0,531	54	0,335	80	0,467	57
5	0,245	20	0,233	49	0,218	21
10	0,145	9	0,221	46	0,202	19

**Tab. K: Viabilität nach Behandlung mit Paraquat**

<b>Versuch 1</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,586	100	0,851	100	0,816	100
0,5	0,238	33	4,29E-01	46	0,334	35
1	0,237	32	0,223	20	0,177	14
1,5	0,204	26	0,175	13	0,172	14
<b>Versuch 2</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,626	100	8,62E-01	100	0,818	100
0,5	0,253	33	0,439	47	0,251	24
1	0,2	23	0,262	24	0,194	17
1,5	0,204	24	0,251	23	0,161	12
<b>Versuch 3</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,698	100	9,64E-01	100	0,821	100
0,5	0,263	31	0,498	48	0,186	15
1	0,235	26	0,34	30	0,148	10
1,5	0,187	19	0,278	23	0,138	9
<b>Versuch 4</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,699	100	8,88E-01	100	0,792	100
0,5	0,287	34	0,485	51	0,236	23
1	0,194	20	0,325	31	0,147	11
1,5	0,157	14	0,219	18	0,132	9
<b>Versuch 5</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,306	137	0,486	133	0,285	148
0,5	0,161	89	0,33	101	0,153	102
1	0,146	84	0,13	60	0,124	92
1,5	0,127	78	0,165	67	0,145	99
<b>Versuch 6</b>						
Paraquat [mM]	OD H4IIE	% H4IIE	OD 2-12	% 2-12	OD 13-44	% 13-44
0	0,406	100	7,93E-01	100	0,501	100
0,5	0,179	32	0,488	58	0,159	21
1	0,154	25	0,16	12	0,13	14
1,5	0,129	18	0,165	13	0,119	11

**Tab. L: Expression der Katalase nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus Katalase-Intensität und 18S-rRNA-Intensität

<b>Versuch 1</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,608091621	100	0,387124675	100	0,345029281	100
0,5	0,745891474	123	4,93E-01	127	0,470586292	136
1	0,75639679	124	0,513069476	133	0,514939369	149
<b>Versuch 2</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,713554157	100	5,73E-01	100	0,489	100
0,5	0,987735467	138	0,741	129	0,583	119
1	0,984125591	138	0,748	131	0,617	126
<b>Versuch 3</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,747601777	100	4,88E-01	100	0,502785622	100
0,5	0,886182229	119	0,68787807	141	0,592126853	118
1	0,918936423	123	0,676404069	139	0,65514993	130

**Tab. M: Katalase Aktivität nach Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Angegeben sind die Units pro mg Protein

<b>Versuch 1</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	240,76	100	184,10	100	141,79	100
0,5	278,72	116	225,74	123	197,72	139
1	326,83	136	249,58	136	207,26	146
<b>Versuch 2</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	235,18	100	180,63	100	160,63	100
0,5	275,53	117	223,68	124	190,56	119
1	326,17	139	247,83	137	201,53	125
<b>Versuch 3</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	235,42	100	183,24	100	158,94	100
0,5	279,22	119	219,59	120	181,46	114
1	327,55	139	249,90	136	198,35	125
<b>Versuch 4</b>						
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0			176,10	100	143,34	100
0,5			202,84	115	176,24	123
1			211,09	120	188,39	131

**Tab. N: Expression der Katalase nach Behandlung mit Adriamycin**

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus Katalase-Intensität und 18S-rRNA-Intensität

<b>Versuch 1</b>						
Adriamycin [µM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,4272	100	0,6038	100	0,5943	100
1	0,5980	140	0,6769	112	0,6512	110
5	0,6657	156	0,7862	130	0,7236	122
<b>Versuch 2</b>						
Adriamycin [µM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,4869	100	0,5497	100	0,7050	100
1	0,6969	143	0,8402	153	0,9074	129
5	0,9140	188	0,9411	171	0,9517	135
<b>Versuch 3</b>						
Adriamycin [µM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,7221	100	0,6556	100	0,6779	100
1	0,8393	116	0,6843	104	0,7322	108
5	0,9405	130	0,7899	120	0,8309	123
<b>Versuch 4</b>						
Adriamycin [µM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,4052	100	0,4478	100	0,3618	100
1	0,6516	161	0,4639	104	0,3903	108
5	0,7557	187	0,5426	121	0,5007	138

**Tab. O: Katalase Aktivität nach Behandlung mit Adriamycin**

Angegeben sind die Units pro mg Protein

<b>Versuch 1</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	283,58	100	237,74	100	142,73	100
1	331,03	117	275,59	116	183,79	129
5	371,90	131	292,96	123	210,50	147
10	368,55	130	357,66	150	262,17	184
<b>Versuch 2</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	253,73	100	180,24	100	98,93	100
1	298,24	118	193,58	107	122,39	124
5	306,34	121	200,31	111	130,07	131
10	317,46	125	238,69	132	129,71	131
<b>Versuch 3</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	277,28	100	208,33	100	112,62	100
1	290,23	105	289,24	139	152,73	136
5	334,62	121	254,27	122	162,56	144
10	324,48	117	250,69	120	144,57	128
<b>Versuch 4</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	278,61	100	194,55	100	125,98	100
1	292,85	105	210,25	108	140,02	111
5	372,67	134	220,33	113	193,68	154
10	416,65	150	221,37	114	223,46	177
<b>Versuch 5</b>						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	240,34	100	218,29	100	88,64	100
1	260,83	109	257,34	118	88,42	100
5	286,72	119			125,95	142
10	328,59	137	291,70	134	147,29	166

**Tab. P: Expression der Katalase nach Behandlung mit Paraquat**

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus Katalase-Intensität und 18S-rRNA-Intensität

<b>Versuch 1</b>						
Paraquat [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,4272	100	0,6038	100	0,5943	100
0,5	0,5980	140	0,6769	112	0,6512	110
1	0,6657	156	0,7862	130	0,7236	122
<b>Versuch 2</b>						
Paraquat [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,7221	100	0,6556	100	0,6779	100
0,5	0,8393	116	0,6843	104	0,7322	108
1	0,9405	130	0,7899	120	0,8309	123
<b>Versuch 3</b>						
Paraquat [mM]	H4IIE Katalase/18S	% H4IIE	2-12 Katalase/18S	% 2-12	13-44 Katalase/18S	% 13-44
0	0,4426	100	0,4478	100	0,3618	100
0,5	0,6516	147	0,4639	104	0,3903	108
1	0,7557	171	0,5426	121	0,5007	138

**Tab. Q: Katalase Aktivität nach Behandlung mit Adriamycin**

Angegeben sind die Units pro mg Protein

<b>Versuch 1</b>						
Paraquat [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	319,35	100	220,79	100	141,73	100
0,5	429,21	134	253,33	115	127,96	90
1	507,08	159	267,84	121	173,78	123
<b>Versuch 2</b>						
Paraquat [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	288,90	100	233,54	100	143,90	100
0,5	364,75	126	289,24	124	157,32	109
1	477,81	165	293,89	126	200,18	139

Fortsetzung Tab. Q

Versuch 3						
Paraquat [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	318,73	100	285,75	100	157,00	100
0,5	402,42	126	342,31	120	155,00	99
1	423,68	133	345,35	121	169,00	108
Versuch 4						
Paraquat [mM]	H4IIE U/mg	% H4IIE	2-12 U/mg	% 2-12	13-44 U/mg	% 13-44
0	316,78	100	245,00	100	162,00	100
0,5	363,48	115	265,00	108	159,00	98
1	400,36	126	274,00	112	201,40	124

Tab. R: Expression der Glutathionperoxidase (GPx) nach Behandlung mit Paraquat

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus GPx-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
Paraquat [mM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,7244	100	0,6768	100	0,6282	100
0,5	0,7904	109	0,8180	121	0,7013	112
1	0,8882	123	1,0548	156	0,7274	116
Versuch 2						
Paraquat [mM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,6912	100	0,8575	100	0,7714	100
0,5	0,8917	129	0,7719	90	0,7114	92
1	1,0433	151	0,8734	102	1,0038	130
Versuch 3						
Paraquat [mM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,7031	100	0,7446	100	0,6989	100
0,5	0,7622	108	0,8021	108	0,8507	122
1	0,8115	115	0,8989	121	0,8626	123
Versuch 4						
Paraquat [mM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,7156	100	0,7560	100	0,7133	100
0,5	0,7728	108	0,8108	107	0,8581	120
1	0,8204	115	0,9049	120	0,8682	122

Tab. S: Expression der Glutathionperoxidase (GPx) nach Behandlung mit Adriamycin

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus GPx-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
Adriamycin [µM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,5826	100	0,7564	100	0,6630	100
1	0,6554	112	0,7691	102	0,6422	97
5	0,7566	130	0,7286	96	0,5950	90
Versuch 2						
Adriamycin [µM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,6662	100	0,6124	100	0,6073	100
1	0,7230	109	0,6359	104	0,5640	93
5	0,7514	113	0,5862	96	0,7122	117
Versuch 3						
Adriamycin [µM]	H4IIE GPx/GAPDH	% H4IIE	2-12 GPx/GAPDH	% 2-12	13-44 GPx/GAPDH	% 13-44
0	0,6913	100	0,8266	100	0,7747	100
1	0,7418	107	0,7801	94	0,7576	98
5	0,8301	120	0,8714	105	0,7219	93

Tab. T: Expression von p53 nach Behandlung mit Paraquat.

Angegeben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus p53-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
Paraquat [mM]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,9797	100	0,9366	100	0,8440	100
0,5	0,8285	85	0,9114	97	0,7929	94
1	1,1278	115	0,8159	87	0,9634	114

Fortsetzung Tab. T

Versuch 2						
Paraquat [mM]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8182	100	0,8423	100	0,8330	100
0,5	0,7432	91	0,8210	97	0,8262	99
1	0,7628	93	0,7286	87	0,7503	90
Versuch 3						
Paraquat [mM]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,7923	100	0,8223	100	0,7888	100
0,5	0,7343	93	0,7904	96	0,7824	99
1	0,7415	94	0,7193	87	0,7374	93
Versuch 4						
Paraquat [mM]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8373	100	0,8605	100	0,8582	100
0,5	0,7657	91	0,8416	98	0,8449	98
1	0,7848	94	0,7555	88	0,7809	91

Tab. U: Expression von p53 nach Behandlung mit Adriamycin.

Angaben sind die densitometrischen Werte als Quotient aus p53-Intensität und GAPDH-Intensität

Versuch 1						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	1,0855	100	1,0776	100	1,0829	100
1	1,0702	99	1,0557	98	0,9595	89
5	1,0031	92	0,9961	92	0,9187	85
Versuch 2						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	1,0960	100	1,0909	100	1,1261	100
1	1,0828	99	1,1123	102	0,9770	87
5	0,9660	88	1,0117	93	0,9661	86
Versuch 3						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,8464	100	0,7773	100	0,9099	100
1	0,7607	90	0,8317	107	0,8973	99
5	0,7251	86	0,8105	104	0,8155	90
Versuch 4						
Adriamycin [ $\mu$ M]	H4IIE p53/GAPDH	% H4IIE	2-12 p53/GAPDH	% 2-12	13-44 p53/GAPDH	% 13-44
0	0,7459	100	0,6862	100	0,8180	100
1	0,6510	87	0,7167	104	0,7715	94
5	0,6570	88	0,6971	102	0,6884	84

## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden an folgenden Stellen veröffentlicht oder präsentiert:

**Chovolou, Y., Röhrdanz, E., Kahl, R. (2000)**

Transfection of TNF- $\alpha$  into H4IIE cells alters sensitivity to hepatotoxic compounds. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Vol 361, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

**Chovolou, Y., Kahl, R. (2000)**

Overexpression of TNF- $\alpha$  alters the response of rat hepatoma cells to exogenous TNF- $\alpha$  and antioxidants. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Vol 362, Herbsttagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

**Chovolou, Y., Kahl, R. (2001)**

Expression of antioxidant enzymes, bcl-2 and bax in tumor necrosis factor- $\alpha$  overexpressing H4IIE cells after treatment with prooxidative compounds. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Vol 363, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

**Chovolou, Y., Wätjen, W., Kampkötter, A., Kahl, R. (2002)**

Genes regulated in rat hepatoma cells overexpressing tumor necrosis factor alpha. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, Supplement to Vol 365, Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz

**Chovolou, Y., Wätjen, W., Kampkötter, A. and Kahl, R. (2002)**

Overexpression of TNF-alpha alters the response of rat hepatoma cells to exogenous TNF-alpha and oxidants. Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (Paris, France, July 16-20, 2002)

**Chovolou, Y., Wätjen, W., Kampkötter, A. and Kahl, R. (2002)** Altered sensitivity of TNF-alpha overexpressing rat hepatoma cells against exogenous TNF-alpha and oxidants. Abstractband, Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie, Halle (Saale)

**Chovolou, Y., Wätjen, W., Kampkötter and Kahl, R. (2002)**

Resistance to TNF- $\alpha$  induced apoptosis in rat hepatoma cells expressing TNF- $\alpha$  is linked to low antioxidant expression. submitted to J.Biol.Chem.

## Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Regine Kahl bedanken, die es mir ermöglicht hat in ihrem Institut zu promovieren. Ich danke ihr für ihre Diskussionsbereitschaft, das Vertrauen und die großen Freiräume, die sie mir bei der Bearbeitung des Themas gewährt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Werner Kunz bedanken, der sich bereiterklärt hat, nach meiner Diplomarbeit auch meine Promotion zu betreuen.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie für ihre Kollegialität, das angenehme Arbeitsklima und ihre Unterstützung bei den vielen kleineren und größeren Herausforderungen während des Laboralltags.

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Marcus Quack und Dr. Karin Schulze für die zahlreichen Gespräche während unserer „Mittwoch-12.00-Uhr-Ausflüge in die Mensa“, die tatkräftige Hilfe und ihre unendliche Geduld bei Themen wie „...es ist schon wieder keine gute Mondphase für molekularbiologische Experimente oder Zellkultur oder...!“ bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium und die anschließende Promotion ermöglicht haben. Meine Schwester hat neben meiner Diplomarbeit auch diese Arbeit lesen müssen. Elenitsa, für das intensive Korrekturlesen, die konstruktive Kritik, die Wochenenden und Abende, die du mir geopfert hast, kann ich dir nicht genug danken. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann für seine persönliche Anteilnahme, seine Rücksichtnahme und seine „fast“ unerschöpfliche Geduld während dieser Promotion.

### Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel wurden verwandt. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Düsseldorf, Juni 2002