

**Altersunterschiede in der Stressantwort auf Ethanol in
primären Rattenhepatozyten**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Kambeitz, Nicola Harriet

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Verbundprojekt OXISYS und Zielsetzung	- 10 -
2. Material und Methoden	- 13 -
2.1 Materialien	- 13 -
2.1.1 Chemikalienliste	- 13 -
2.1.2 Geräteliste	- 15 -
2.1.3 Lösungen	- 18 -
2.2 Methoden	- 22 -
2.2.1 Aufarbeitung der primären Rattenhepatozyten	- 22 -
2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Methode	- 23 -
2.2.3 Zellen ausstreuen	- 25 -
2.2.4 Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Umsatz	- 25 -
2.2.5 Etablierung des GSH-Assays und Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehalts in Zelllysaten	- 27 -
2.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry	- 30 -
2.2.7 ROS-Messung mittels DCFH-DA-Assay	- 32 -
2.2.8 SRB-Proteinbestimmung	- 34 -
2.2.9 PCR	- 36 -
2.2.9.1 RNA-Isolation mittels TriFast	- 36 -
2.2.9.2 RNA-Integritätscheck	- 38 -
2.2.9.3 cDNA-Synthese	- 39 -
2.2.9.4 PCR	- 39 -
2.2.9.5 Gelelektrophorese	- 40 -
3. Ergebnisse	- 41 -
3.1 Etablierung GSH-Assay	- 40 -

3.2 Primer-Optimierung.....	- 40 -
3.3 Basalwerte (ROS, Protein, GSH, Genexpression)	- 44 -
3.4 Auswirkung von Ethanol-induziertem Stress auf mittelalte PRH	- 47 -
3.4.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität	- 47 -
3.4.2 ROS-Gehalt im Zeitverlauf	- 48 -
3.4.3 GSH-Gehalt im Zeitverlauf	- 49 -
3.4.4 ROS-Gehalt im Zeitverlauf nach NAC-Vorbehandlung	- 50 -
3.4.5 Genexpression basal und induziert	- 51 -
3.5 Auswirkung von Ethanol-induziertem Stress auf alte PRH	- 53 -
3.5.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität	- 53 -
3.5.2 ROS-Gehalt im Zeitverlauf	- 53 -
3.5.3 GSH-Gehalt im Zeitverlauf	- 54 -
3.5.4 ROS-Gehalt im Zeitverlauf nach NAC-Vorbehandlung	- 55 -
3.5.5 Genexpression basal und induziert	- 56 -
3.6 Auswirkungen von Ethanol-induziertem Stress im Altersvergleich	- 58 -
3.6.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität	- 58 -
3.6.2 ROS-Gehalt im Zeitverlauf	- 58 -
3.6.3 GSH-Gehalt im Zeitverlauf	- 58 -
3.6.4 ROS-Gehalt im Zeitverlauf vor und nach NAC-Vorbehandlung ...	- 61 -
3.6.5 Genexpression induziert.....	- 61 -
4. Diskussion	- 63 -
4.1 Limitierungen.....	- 71 -
5. Zusammenfassung	- 74 -
Literaturverzeichnis	- 76 -
Eigenständigkeitserklärung	- 82 -
Danksagung	- 83 -

Abkürzungsverzeichnis

A

a alt

B

BSA Bovines Serum Albumin

C

cDNA komplementäre DNA

D

DCFH-DA 2`7`- Dichlorofluoresceindiacetat

ddH₂O doppelt destilliertes Wasser

DEPC Diethylpyrocarbonat

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

dT Deoxythymidin

DTNB 5-(3-Carboxy-4-nitrophenyl)disulfanyl-2-nitrobenzoesäure

E

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

EtOH Ethanol

G

GR Glutathionreduktase

GSH Glutathion

GSSG Glutathiondisulfid

H

HEPES 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

HO-1 Hämoxygenase-1

K

Kat Katalase

KPE-Puffer Kaliumphosphatpuffer

KHPO₄ Kaliumhydrogenphosphat

KCl Kaliumchlorid

KH₂PO₄ Kaliumdihydrogenphosphat

M

ma mittelalt

N

N	Anzahl der gemittelten Versuche
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid

P

(D)PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PRH	primäre Rattenhepatozyten

R

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomal Ribonukleinsäure

S

SOD-2	Superoxiddismutase-2
SOP	Standard Protokoll
SRB	Sulforhodamine B

T

T/E	Trypsin/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-diol
TNB	5-Thio-2-Nitrobenzoesäure

W

WME	Williams' medium E
-----	--------------------

y-GCL	y-Glutamylcystein-Synthetase
-------	------------------------------

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersstruktur in Deutschland zwischen 1910 und 2050	- 1 -
Abbildung 2: Zwischen- und Nebenprodukte bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser	- 2 -
Abbildung 3: Entstehung, Auswirkungen und Entgiftung von ROS.....	- 5 -
Abbildung 4: Strukturformel Glutathion.....	- 7 -
Abbildung 5: Strukturformel N-Acetylcystein	- 7 -
Abbildung 6: Adhärierte primäre Rattenhepatozyten	- 9 -
Abbildung 7: Aufbau des OXISYS-Projekts	- 11 -
Abbildung 8: Prinzip der GSH-Bestimmung.....	- 27 -
Abbildung 9: Standardkurve GSH	- 29 -
Abbildung 10: Prinzip des DCFH-DA Assay	- 32 -
Abbildung 11: Spektrum SRB.....	- 36 -
Abbildung 12: Vergleich des basalen ROS-Gehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten	- 44 -
Abbildung 13: Vergleich des basalen Gesamtproteingehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten.	- 45 -
Abbildung 14: Vergleich des basalen Glutathiongehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten.	- 45 -
Abbildung 15: Basale Genexpression antioxidativer Enzyme	- 46 -
Abbildung 16: PRH (mittelalt) Zellviabilität nach Ethanolstimulation.....	- 48 -
Abbildung 17: PRH (mittelalt) ROS-Gehalt im Zeitverlauf	- 49 -
Abbildung 18: PRH (mittelalt) Gesamtglutathion im Zeitverlauf.....	- 50 -
Abbildung 19: PRH (mittelalt) Entwicklung des ROS-Gehalts vor und nach NAC-Vorinkubation.	- 51 -
Abbildung 20: PRH (mittelalt) Genexpression antioxidativer Enzyme vor und nach Ethanolstimulation.....	- 52 -
Abbildung 21: PRH (alt) Zellviabilität nach Ethanolstimulation	- 53 -
Abbildung 22: PRH (alt) ROS-Gehalt im Zeitverlauf.....	- 54 -
Abbildung 23: PRH (alt) Gesamtglutathion im Zeitverlauf	- 55 -
Abbildung 24: PRH (alt) Entwicklung des ROS-Gehalts vor und nach NAC-Vorinkubation..	- 56 -
Abbildung 25: PRH (alt) Genexpression antioxidativer Enzyme vor und nach Ethanolstimulation.....	- 57 -
Abbildung 26: Altersvergleich: GSH-Gehalt im Zeitverlauf ROS-Gehalt im Zeitverlauf.....	- 60 -
Abbildung 27: Altersvergleich: Auswirkung einer NAC-Vorinkubation auf den ROS-Gehalt.....	- 61 -

Abbildung 28: Altersvergleich: Genexpression antioxidativer Enzyme
nach Induktion - 62 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geschätzte Halbwertszeiten ausgewählter ROS	- 3 -
Tabelle 2: Standards Lowry-Proteinbestimmung	- 31 -
Tabelle 3: Beispiel Normierung der ROS-Werte I	- 34 -
Tabelle 4: Beispiel Normierung der ROS-Werte II	- 34 -
Tabelle 5: Reagenzienmengen unterschiedlicher Primer	- 42 -
Tabelle 6: PCR-Bedingungen von β -Actin	- 42 -
Tabelle 7: PCR-Bedingungen der Katalase	- 42 -
Tabelle 8: PCR-Bedingungen der SOD-2	- 43 -
Tabelle 9: PCR-Bedingungen der γ -GCL.....	- 43 -
Tabelle 10: PCR-Bedingungen der HO-1	- 43 -

1. Einleitung

~ Jeder möchte lange leben, aber keiner möchte alt werden ~

Jonathan Swift

Der Begriff „demographischer Wandel“ ist in aller Munde. Längst ist bekannt, dass die Altersstruktur der Bundesrepublik Deutschland sich von einer Pyramide zu einer Urne gewandelt hat (Abbildung 1). Dies bedeutet, dass immer weniger Kinder geboren werden, die Menschen hingegen immer älter werden. Das birgt Probleme für die gesamte Bundesrepublik Deutschland, vor allem für die sozialen Sicherungssysteme ebenso wie für den Arbeitsmarkt, aber auch für jedes Individuum. Denn wie hat Jonathan Swift gesagt: Die Menschen möchten immer länger leben, dies aber ohne Einbußen an Lebensqualität. Deswegen ist das Thema Altern und Alterungsprozess in den Mittelpunkt des Interesses von Politik, Wirtschaft und auch der Forschung gerückt.

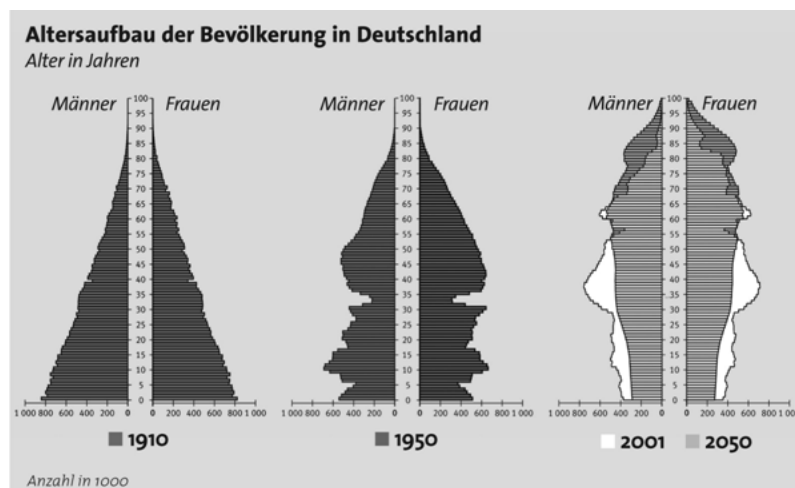


Abbildung 1: Altersstruktur in Deutschland zwischen 1910 und 2050 [1]

Es gibt viele Theorien, warum wir altern. Eine stellt die im Jahre 1956 von Dr. Harman veröffentlichte „Theorie der freien Radikale“ dar [2]. Sie besagt,

dass eine Akkumulation von freien Radikalen im Laufe des Lebens zu einer Schädigung von Biomolekülen und somit zu Pathologien der Zelle und letztendlich zur Alterung oder Erkrankung des gesamten Organismus führt. Diese Theorie wurde durch viele nachfolgende Studien belegt, aber auch kontrovers diskutiert [2-11]. So stellt zum Beispiel ein von Mikhail V. Blagosklonny publizierter Review-Artikel ganz offen seine „Tor-Theorie“ der von Dr. Harman entgegen [12]. Tor ist ein Enzym, dem in der Zelle eine wichtige Aufgabe bei Proliferation, Wachstum, der Regulation des Zellzyklus aber auch der Alterung zukommt [13]. Eine Limitation der Theorie war die Entdeckung von physiologischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Wie in der „Theorie der freien Radikale“ beschrieben, wirken ROS in destruktiver Weise auf die Zelle - zumindest in hohen Konzentrationen. Liegen sie aber in geringen Konzentrationen vor, kommen ihnen wichtige Signalfunktionen [14, 15], z.B. die Aktivierung von Mastzellen mit nachfolgender erhöhter Gefäßpermeabilität und Vasokonstriktion [16] oder Funktionen bei der Abtötung von Mikroorganismen zu [17]. Wie bereits erwähnt, bilden die freien Radikale den Kernpunkt der Theorie nach Harman. Eine Untergruppe stellen die ROS dar. Neben dem Singulett-Sauerstoff zählen vor allem die bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehenden Zwischen- und Nebenprodukte zu den ROS. Diese sind in Abbildung 2 dargestellt.

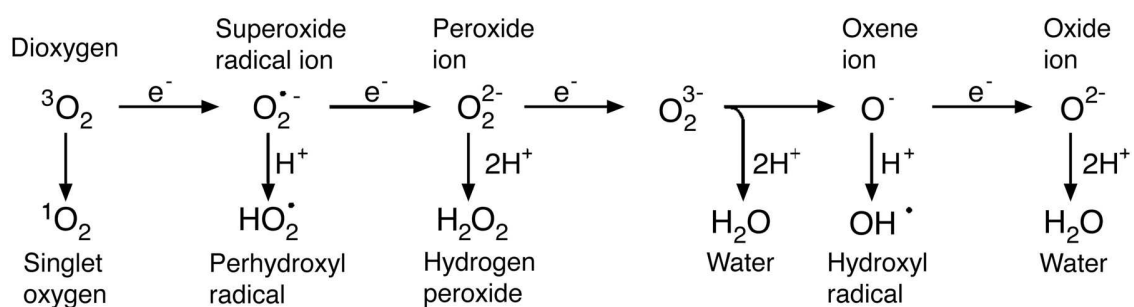


Abbildung 2: Zwischen- und Nebenprodukte bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser
[18]

ROS entstehen physiologisch unter anderem als Nebenprodukt der Atmungskette. Die Atmungskette findet an Proteinkomplexen (I, II, III, IV) statt,

die sich an der inneren Membran der Mitochondrien befinden. Der größte Teil der hier vorhandenen Sauerstoffatome wird enzymatisch, z.B. durch die Superoxiddismutase 2 (SOD-2) zu H_2O reduziert [19]. Ein kleiner Anteil hingegen diffundiert als Superoxidanion (O_2^-) über die Mitochondrienmembran und wird hier durch die Schutzmechanismen des Körpers entgiftet. Es sind aber auch exogene Ursachen bekannt, die oxidativen Stress verursachen. Zu nennen sind hier u.a. Alkohol, Abgase, Zigarettenrauch oder ionisierende Strahlung. Wie der Name ROS schon sagt, sind diese Stoffe reaktionsfreudig. Dies ist abhängig von ihren Halbwertszeiten, die für einige ausgewählte ROS in Tabelle 1 dargestellt sind. Je kürzer die Halbwertszeit, desto größer die schädigende Potenz der ROS [20].

Tabelle 1: Geschätzte Halbwertszeiten ausgewählter ROS, modifiziert nach [20]

ROS	Halbwertszeit
Hydroxylradikal	$10^{-9}s$
Alkyl-Radikal	$10^{-8}s$
Singulett-Sauerstoff	$10^{-6}s$
Alkoxy-Radikal	$10^{-6}s$
Peroxy-Radikal	7s
Superoxidanionradikal	Spontane und enzymatische Umbildung
Wasserstoffperoxid	Stabil

Chemisch betrachtet, gibt es ROS, die ein freies Elektron in ihrer Außenschale besitzen, somit instabil sind und daher mit anderen Molekülen reagieren und diese radikalisieren können. Betroffen hiervon sind vor allem die DNA, sowie Lipide mit nachfolgender Lipidperoxidation, Proteine und Kohlenhydrate (Abbildung 3). Die am stärksten schädigende Wirkung auf die Zelle besitzt also das Hydroxylradikal auf Grund seiner Halbwertszeit von $10^{-9}s$ und der Tatsache, dass es u.a. mit der DNA reagiert [20]. Es sind über 100 verschiedene Schäden bekannt, die das Hydroxylion an den Basen der DNA hervorrufen kann. Diese Schäden sind in drei Kategorien, nämlich die Hydroxylierung, die Ringöffnung

oder die Fragmentierung, einzuteilen. Neben der schädigenden Wirkung an den Basen der DNA, kann dieses Ion außerdem das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat angreifen, was letztendlich Strangbrüche zur Folge hat [19].

Die schädigende Wirkung der ROS beruht aber nicht nur auf ihrer direkten Wirkung, sondern kann sich auch indirekt über die Auswirkungen auf die Proliferation und die Signaltransduktion der Zelle auswirken [14, 21].

Diese Reaktionsmechanismen führen durch Funktionsverlust zu einer Schädigung der Zelle und zur Alterung gemäß Dr. Harmans Theorie. Daneben spielen ROS eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedenster Erkrankungen wie Arteriosklerose, der Entstehung von Krebs aber auch Erkrankungen aus dem rheumatischen und neurodegenerativen Formenkreis.

Zum anderen gibt es ROS, die durch ihre Struktur weniger reaktionsfreudig sind, wie das Hydroperoxid-Anion oder Wasserstoffperoxid. Diese Moleküle dienen der Zelle als Vermittler wichtiger Signalwege [14].

Um die bereits genannten Schäden in den Zellen zu vermeiden, besitzt unser Körper wichtige Schutzmechanismen um ROS zu entgiften, die Antioxidantien. Unter dem Begriff Antioxidans wird eine inhomogene Gruppe an Molekülen zusammengefasst, die in der Lage sind freie Radikale unschädlich zu machen. Der menschliche Körper schützt sich mit einer Kombination aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien vor oxidativen Schäden. Zwei der wichtigsten enzymatischen Antioxidantien des Körpers sind die Katalase und die SOD (Abbildung 3) [22]. Ferner sind an der Entgiftung weitere antioxidative Enzyme, beispielhaft die Glutathionperoxidase (Abbildung 3), die γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCL) oder die Glutathion-Reduktase (GR) zu nennen. Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen die Thiol-Antioxidantien. Hier sind als wichtigster Vertreter das Glutathion (GSH) (Abbildung 3) oder das Thioredoxin zu nennen. Außerdem sind zahlreiche Vitamine wie das Vitamin A, C und E, aber auch Karotinoide und Flavonoide an der Entgiftung beteiligt [23].

Die SOD kommt sowohl im Zytosol (Cu/Zn-SOD) als auch in den Mitochondrien (Mn-SOD) vor und katalysiert die Reaktion von Sauerstoffradikalen zu H_2O_2 [24]. Das u.a. in dieser Reaktion anfallende H_2O_2 wird zum einen durch die

Katalase zu Wasser und Sauerstoff entgiftet [25]. Sie kommt vor allem in den Peroxisomen von Leber und Niere vor und ist eines der Enzyme mit dem höchsten Turnover. In einer Sekunde kann sie circa 7000 Moleküle H_2O_2 entgiften [26].

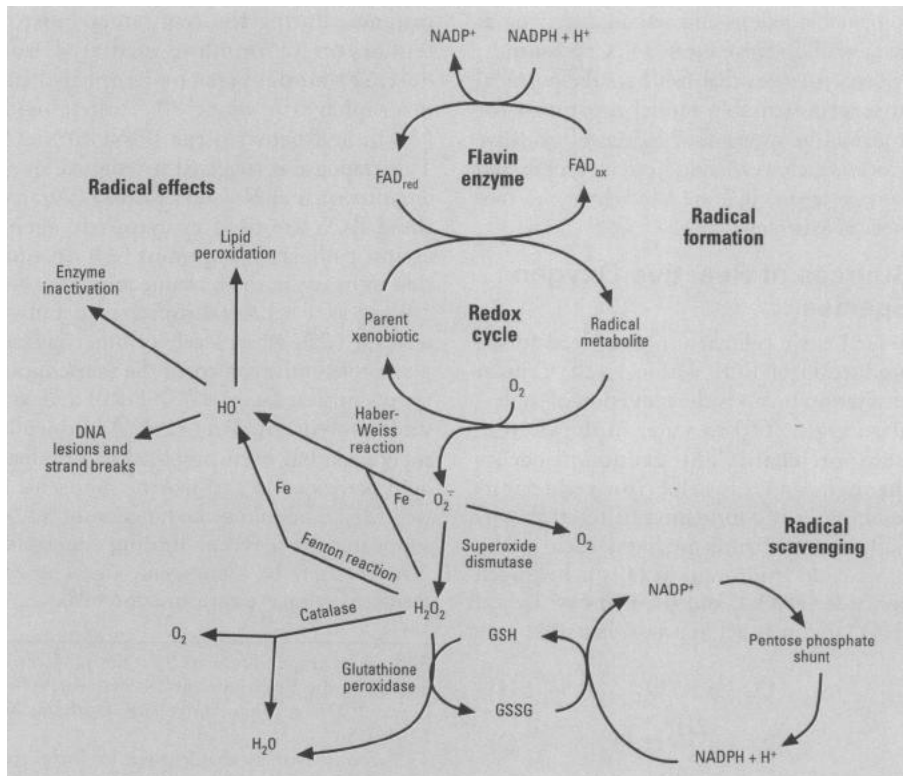
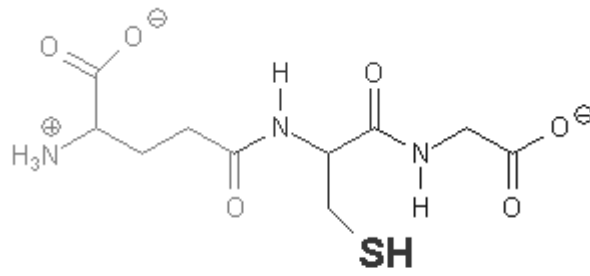


Abbildung 3: Entstehung, Auswirkungen und Entgiftung von ROS [19]

Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird H_2O_2 zum anderen durch GSH entgiftet. Dieses stellt das wichtigste lösliche Antioxidans der Zelle zum Schutz vor oxidativem Stress dar und kommt in hohen Konzentrationen im Zytosol (90 %), den Mitochondrien (10 %) und zu einem geringer Anteil im Endoplasmatischen Retikulum vor [27]. Dieses Antioxidans, das von allen Körperzellen gebildet werden kann, aber in besonders hohen Konzentrationen in der Leber vorkommt, ist ein Tripeptid, bestehend aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin (Abbildung 4). Es kommt in der Zelle in zwei Formen, als reduziertes GSH und als oxidiertes GSH-Disulfid (GSSG) vor, wobei der Anteil

der reduzierten Form in einer gesunden Zelle bei circa 99 % liegt [28]. Die GSH-Synthese besteht aus zwei enzymatisch katalysierten und ATP-abhängigen Reaktionen. In einem ersten Schritt wird aus L-Glutamat und L-Cystein mit Hilfe der γ -GCL das Zwischenprodukt γ -Glutamyl-L-Cystein gebildet. Die hier gebildete γ -Carboxylgruppe ist untypisch und verleiht dadurch diesem Zwischenprodukt und letztendlich GSH einen Schutz vor intrazellulärem Abbau, da nur die extrazellulär vorkommende γ -Glutamyltranspeptidase (GGT) diese Bindung spalten kann [29]. Der erste Schritt der GSH-Synthese gilt als der geschwindigkeitslimitierende. In einem zweiten Schritt wird nun L-Glycin, katalysiert durch die GSH-Synthetase, unter Entstehung von GSH angeknüpft. Neben seiner Funktion als Antioxidans erfüllt GSH weitere Funktionen. Es ist an der Entgiftung von elektrophilen Substanzen beteiligt, bildet ein wichtiges Reservoir für Cystein, ist in die DNA-Synthese involviert und hat immunologische Funktionen [28]. Seine antioxidative Wirkung entfaltet GSH über zwei Mechanismen: Zum einen können mittels einer freien Thiolgruppe (Abbildung 4) jeweils zwei Glutathionmoleküle unter Bildung eines GSSG ein ROS entgiften. Das Verhältnis dieser beiden Moleküle (GSH/GSSG) ist ein geeigneter Indikator um den oxidativen Stress in einer Zelle zu bestimmen [30]. Das gebildete GSSG wird durch die GR und unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH reduziert. Dieser Redoxzyklus stellt somit ein wichtiges Puffersystem dar. Zum anderen können elektrophile Moleküle spontan oder enzymatisch über die GSH-S-Transferase oder die Glutathionperoxidase vermittelt an GSH binden und werden auf diesem Weg entgiftet [28].



γ -Glutamylcysteinylglycin

Abbildung 4: Strukturformel Glutathion [31]

Eine antioxidative Wirkung wird auch N-Acetylcystein (NAC), einem rein synthetisch-hergestellten Antioxidans, zugeschrieben. Es ist Gegenstand der Forschung, ob diese Substanz einen Schutzeffekt auf die Zelle hat und so eine Verlangsamung des Alterns herbeiführen könnte. Bisher ist NAC vor allem als Wirkstoff in ACC® akut von Hexal bekannt. Die Packungsbeilage besagt, dass es sekretolytisch und sekretomotorisch wirkt. Acetylcystein besitzt eine freie SH-Gruppe (Abbildung 5), die Disulfidgruppen von Mukopolysacchariden und Glykoproteinen des Bronchialschleims reduzieren, was die Viskosität des Bronchialsekrets herabsetzen und so zu einer Verflüssigung und einer Reduktion des Schleims führen soll. Diese Wirkung ist derzeit nicht ausreichend mit Studien nachgewiesen.

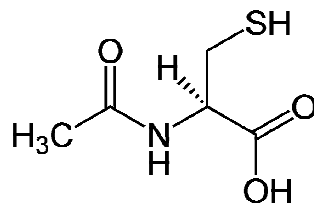


Abbildung 5: Strukturformel N-Acetylcystein [32]

Durch Studien belegt ist hingegen der Einsatz von Acetylcystein als Antidot, z.B. bei einer Paracetamol-Vergiftung [33, 34]. Die Wirkung wird zum einen über seine vorhandene Thiol-Gruppe, vor allem aber als Aminosäurenlieferant für die GSH-Synthese erreicht. Diese Tatsache rückte eine eventuelle antioxidative

Wirkung des NACs in den Fokus des Interesses. Viele Studien unter verschiedensten Fragestellungen und mit unterschiedlichen Zellen und Lebewesen haben diese Wirkung bestätigt [35-38].

Wie bereits erwähnt kommen GSH und die antioxidativen Enzyme in besonders hohen Konzentrationen in der Leber vor. Dies ist einfach zu begründen, da dieses Organ einerseits an der Synthese vieler Stoffe beteiligt, andererseits für den Abbau und die Entgiftung zuständig ist. Die Leber synthetisiert und speichert Glykogen, das bei Energiemangel zur sofortigen Energiegewinnung bereitsteht. Sie bildet Gallenflüssigkeit, ist die größte Drüse des menschlichen Körpers, ist am Stoffwechsel von Lipoproteinen beteiligt, reguliert den Spurenelemente- und Vitaminstoffwechsel und ist wichtig für die Regulation des Säure-Base-Haushalts. Die Leber ist mit einem komplexen Enzymsystem ausgestattet, bildet einen großen Aminosäurepool und ist somit an der Proteinproduktion beteiligt. Zu nennen sind hier Albumin, Gerinnungsfaktoren, Transferrin, Akut-Phase-Proteine und Hormone. Neben der Speicherung von Aminosäuren stellt die Leber den Speicherort für Eisen, Kupfer und Vitamine wie Vitamin A dar. Essentiell ist die Leber beim Abbau von für den Körper giftigen Substanzen sowohl endogener als auch exogener Natur. Fremdstoffe werden in der Leber über den Phase I, II und III-Metabolismus zu wasserlöslichen Substanzen entgiftet und ausgeschleust. Zusätzlich ist die Leber an der Phagozytose von Bakterien beteiligt [39].

Wie der gesamte Organismus so ist auch die Leber von Alterungsprozessen betroffen. Es stellt sich die Frage, ob und welche Rolle hierbei die „Theorie der freien Radikale“ und somit das antioxidative System spielen. Zwar scheinen die Veränderungen hier im Vergleich zu anderen Organen gering zu sein, besitzen aber durch die mannigfaltigen Funktionen der Leber weitreichende Konsequenzen für den Gesamtorganismus. Die im Folgenden aufgeführten Veränderungen sind mehrfach beschrieben, wobei die Mechanismen, die dazu führen, noch weitgehend ungeklärt sind. Die Leber schrumpft im Laufe des Lebens geschlechterspezifisch um 20-40 %. Außerdem wurde gezeigt, dass nach Hepatektomie die Regeneration der gealterten Leber deutlich vermindert ist [40, 41], was u.a. auf die Tatsache zurückgeführt wird, dass von den alten

Rattenhepatozyten nur ein Drittel der Leberzellen wieder den Zellzyklus durchläuft. Bei jungen Hepatozyten sind dies hingegen quasi alle [41]. Des Weiteren vergrößern sich die Hepatozyten im Alter, werden polyploid und die Anzahl an Mitochondrien nimmt ab (Abbildung 6) [42, 43]. Ebenfalls ist ein Rückgang des glatten Endoplasmatischen Retikulums, ein verminderter Gehalt an Mikrosomen, ein reduzierter oxidativer Metabolismus und eine geringere Enzymaktivität zum Beispiel des Glukose-6-Phosphatwegs zu beobachten [43].

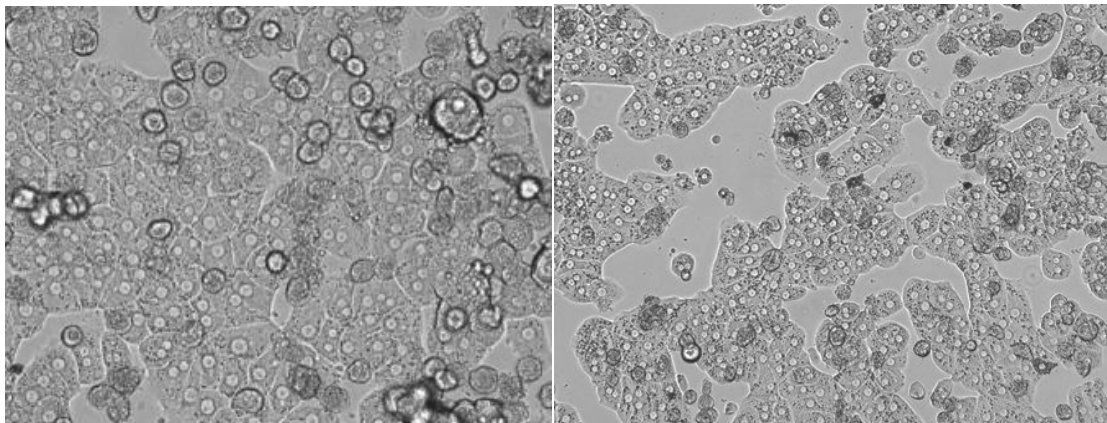


Abbildung 6: Adhärierte primäre Rattenhepatozyten (PRH), mittelalte PRH (links), alte PRH (rechts). Im Alter vergrößern sich die Hepatozyten und werden polyploid.

Zusätzlich sind vermehrte Einlagerungen bestimmter Substanzen zu beobachten. Hier ist zum einen Lipofuszin zu nennen, ein quervernetztes unlösliches und funktionsloses Protein, dessen Ablagerung zum Bild der braunen Atrophie führt. Lipofuszin soll mit Signalwegen interferieren, die zu erhöhter ROS-Bildung und so zu erhöhtem oxidativem Stress führen. Außerdem scheint ein Zusammenhang zwischen Lipofuszinablagerungen und einem verminderten Abbau von beschädigten Proteinen zu bestehen. Zum anderen kommt es im Alter zu einer erhöhten Akkumulation von Vitamin A und somit zu einer Abnahme des Vitamin-A-Spiegels im Plasma, was zu einem verminderten Gehalt an Antioxidantien führt [43]. Eine Abnahme der Aktivität der Phase-I-Enzyme führt zu einer weiteren altersabhängigen Veränderung nämlich der Abnahme der metabolischen Aktivität der Leber. So kann sie Medikamente

schlechter verstoffwechseln, die Anfälligkeit gegenüber Toxinen und die nachteiligen Medikamenteninteraktionen nehmen zu. Hierzu trägt zusätzlich der bereits erwähnte verminderte Gehalt an glattem Endoplasmatischem Retikulum, aber auch der reduzierte hepatische Blutfluss und die Veränderungen der Lebersinus im Sinne einer Pseudokapilisierung bei. Dies bedeutet, dass die Endothelzellen verdickt und geringer fenestriert sind, was zu einer geringeren Filtration des Blutes in Bezug auf Lipoproteine führt. Auch die Synthesefunktion der Leber nimmt mit dem Alter ab. So finden sich eine verminderte Albuminproduktion und Gallensäuresekretion, was einen erhöhten Cholesteringehalt zur Folge hat. Die immunologischen Funktionen der Leber sind im Alter eingeschränkt und somit nehmen Lebererkrankungen im Alter zu. Studien haben gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit nach einer HCV-Infektion eine Leberfibrose zu entwickeln im Alter unter 20 Jahren niedrig und sich am höchsten im Alter über 50 Jahren ist. Auch hier sind genaue Mechanismen noch unbekannt, vermutet werden aber Telomerverkürzungen oder die Erhöhung von Entzündungsmarkern wie Zytokinen und Chemokinen. Es scheint heute bestätigt zu sein, dass die altersbedingte Abnahme der Leberfunktion durch eine Fehlfunktion der Hepatozyten und nicht durch einen vermehrten Zelluntergang zu Stande kommt [44, 45].

Viele der Mechanismen im Zusammenhang mit der Alterung der Leber sind noch ungeklärt. Vor allem die altersabhängigen Veränderungen in Bezug auf das oxidative System der Leber sind noch weitgehend unverstanden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, erste Erkenntnisse über eine eventuelle altersabhängige Dysregulation in der Stressantwort zu erhalten. Untersucht wurde dies an Rattenhepatozyten mittelalten (6-8 Monate alt) und alten (23-25 Monate alt) Ratten.

1.1 Verbundprojekt OXISYS und Zielsetzung

Diese Arbeit stellt einen Teil des Oxisys-Projekts dar (Abbildung 7). Dieses Projekt ist eine Kooperation zwischen zwei industriellen Partnern (Pharmacelsus GmbH, Saarbrücken und Insilico Biotechnology AG, Stuttgart)

und vier akademischen Instituten (der Charité, Berlin, der Universität Tübingen, der Universität des Saarlands und der Universität Jena).

Im Mittelpunkt des Interesses stehen die Signalwege und Reaktionsketten, die ROS in der Leber auslösen und/oder verursachen. Ziele des Projekts sind die Ableitung von Biomarkern, mit denen im klinischen Alltag Alterungsprozesse, die durch ROS ausgelöst werden, diagnostiziert werden, sowie die Identifikation von Zielstrukturen für Medikamente, die diese Alterungsprozesse verlangsamen oder sogar ganz aufhalten können [46]. Dieses durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderte Projekt gliedert sich wie folgt: zunächst werden ROS-bedingte Prozesse an Rattenzellen (in vitro und in vivo) untersucht und in einem zweiten Schritt auf ein 3D Leberzellkulturmodell (in vitro) übertragen. Aus den erhaltenen Daten werden experimentell basierte mathematische in silico Modelle entwickelt, die die hepatischen Auswirkungen von oxidativem Stress und die spezifischen Einflussfaktoren zeigen sollen. In einem weiteren Schritt sollen diese Modelle verwendet werden, um Biomarker für ROS-induzierten Stress zu identifizieren und mögliche Zielstrukturen zu finden, an denen Medikamente ansetzen können. Zuletzt wird experimentell evaluiert, ob diese Biomarker und Zielstrukturen den gewünschten Effekt auf den Menschen haben und es möglich ist, sie in den klinischen Alltag zu integrieren.

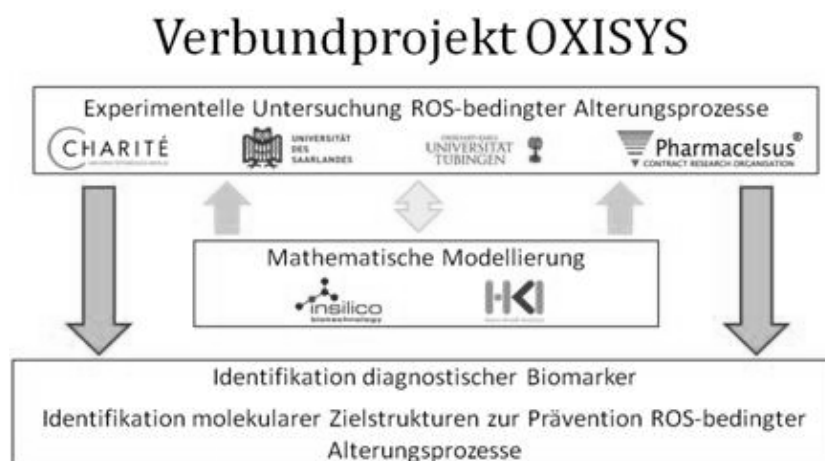


Abbildung 7: Aufbau des OXISYS-Projekts [47]

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zellantwort auf Ethanol-induzierten oxidativen Stress an kultivierten primären Rattenhepatozyten (PRH) untersucht. Um Rückschlüsse auf Alterungsprozesse und Veränderungen in Signalwegen im Alter ziehen zu können, wurden zwei Altersgruppen zum Vergleich herangezogen. Die mittelalten PRH stammten aus 6-8 Monate alten, die alten PRH aus 23-25 Monate alten Ratten. Die Ausgangsthese stellte sich wie folgt dar: Durch altersspezifische Veränderungen der dem oxidativen Stress entgegenwirkenden Mechanismen war anzunehmen, dass alternde Hepatozyten schlechter an einwirkenden Stress adaptieren können als mittelalte. Das Hauptaugenmerk lag auf den Veränderungen von ROS und GSH nach Ethanol-induziertem oxidativem Stress. Außerdem stand eine Inkubation mit NAC unter der Fragestellung, ob dieses Antioxidans die Potenz besitzt die Entstehung von ROS in der Zelle zu vermindern, im Fokus des Interesses. Des Weiteren wurde die Expression verschiedener Gene untersucht, die am ROS-Stoffwechsel beteiligt sind. Auch dies geschah an unstimulierten und mit Ethanol-gestressten Zellen im Altersvergleich.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalienliste

A

Actin Eurofins MWG Operon
Agarose Standard Carl Roth

B

Bovines Serum Albumin Carl Roth
Bromphenolblau Carl Roth

C

CuSO₄ Carl Roth
Chloroform Carl Roth

D

DMEM (10x) Kulturmedium Sigma-Aldrich
DEPC Carl Roth
Dichlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO) Carl Roth
Dikaliumphosphat Carl Roth
dNTP Mix (10mM) Axon
DTNB Carl Roth
Dulbeccos's PBS PAA

E

Easycoll Separating Lösung Biochrom
Essigsäure Carl Roth
Ethanol Carl Roth

F

FBS Invitrogen
First Strand cDNA Synthesis Kit Thermo Scientific
Fluitest LDH-L Analyticon
Folin & Ciocalteu's phenol Sigma-Aldrich

G

Glutathion oxidiert AppliChem
Glutathion reduziert Carl Roth
Glutathionreduktase Sigma-Aldrich

Glycerol
Glycin

Carl Roth
Carl Roth

H

Hämoxygenase-1
HEPES Buffer Solution (1 M)
Hydrocortison
Hyper Ladder II

Eurofins MWG Operon
PAA
Pfizer
Sigma-Aldrich

I

Insulin
Isopropanol

UKT-Apotheke
VWR

K

Katalase

Eurofins MWG Operon

L

L-Glutamin

PAA

M

Magnesiumchlorid (25 mM)
Metaphosphorsäure
Methanol

Axon
Sigma-Aldrich
Carl Roth

N

Na₂CO₃
NADPH-Tetrasodiumsalz
Natrium-Kalium-Tartrat
NaOH

Sigma-Aldrich
Carl Roth
Sigma-Aldrich
Carl Roth

P

Penicillin/Streptomycin
peqGOLD TriFast
Potassiumchlorid
Potassiumdihydrogenorthosphat
Potassiumsodiumtartrattetrahydrat
pUC19
Pufferlösung

PAA
peqlab
Carl Roth
Carl Roth
Sigma-Aldrich
Carl Roth
Axon

R

Resazurin

Sigma

S

Sodiumcarbonat
Sodiumchlorid

Carl Roth
VWR International

Sodiumhydroxid
Sterilium classic
Sulforhodamin B Natriumsalz
Superoxiddismutase-2

Carl Roth
Bode Chemie
Sigma
Eurofins MWG Operon

T

Taq-Polymerase
TRIS
Tris ultrarein
Trypan Blau 0.5 %
Trypsin/EDTA

Axon
Carl Roth
AppliChem
Carl Roth
PAA

W

Wasserstoffperoxid
Williams' Medium E

Carl Roth
PAA

γ -Glutamylcystein-Synthetase

Eurofins MWG Operon

2.1.2 Geräteliste

A

Absaugpumpe
Abzug
Arktik Thermal Cycler
Autoclave VX-65

KNF lab
SecuFlow
Thermo Scientific
Systec

B

Becherglas 600 ml

Duran

C

Cellstar Tube 15 ml
Cellstar Tube 50 ml

Greiner Bio-One
Greiner Bio-One

D

Drucker

Intas

E

Eis
Eismaschine
Elektrophoresegerät
Elektrophoresekammer
Eppendorfgefäßständer

Scotsman
Bio-Rad
Bio-Rad

F

Falcons 15 ml

Greiner Bio-One

Falcons 50 ml

Greiner Bio-One

H

Handschuhe Peha-soft nitril
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge
Heratherm Oven

Hartmann
Thermo Scientific
Thermo Scientific

I

Improved Neubauer Zählkammer
Inkubator

Superior Marienfeld
Binder

K

Kühlschrank +4 °C
Kühlschrank -20 °C
Kühlschrank -80 °C

Liebherr
Liebherr
Thermo Scientific

L

Lambda Plus Pipetten
Lambda Plus Multipipetten
LSE Vortex Mixer

Corning
Corning
Corning

M

Megafuge 40 R
Mikroskop Primo Vert
Mikrowelle 700 Watt

Thermo Scientific
Zeiss
Severin

P

Pipettenspitzen 10 µl farblos
Pipettenspitzen 200 µl gelb
Pipettenspitzen 200-1000 µl blau
Pipettierwannen
Platereader FLUOstar

Biozym Scientific
Sarsted
Ratiolab
Camlas Trifill
Omega

S

Shaker
Skalpel
Spritzen 2 ml
Spritzen 20 ml
Sterilfilter
Sterile Bench Safe 2020

Elmi Skyline
Feather
BBraun
BBraun
Millex
Thermo Scientific

V

Verti 96 Well Thermocycler

Applied Biosystems

W

Waage (fein)
Waage (groß)

Kern
Kern

Wasserbad

Lauda Aqualine

Z

Zellkratzer

Costar

5 ml Stripetten

Costar

10 ml Stripetten

Costar

25 ml Stripetten

Costar

50 ml Stripetten

Costar

6 Well Zellkulturplatten

Greiner Bio-One

96 Well Zellkulturplatten

Greiner Bio-One

2.1.3 Hergestellte Lösungen

Die im nachfolgenden aufgeführten Lösungen wurden nach den am Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung geltenden Standard Operating Procedures (SOPs) hergestellt.

1. Aufarbeitung der primären Rattenhepatozyten

WME II-Kulturmedium

Herstellung: Zu 500 ml Williams Medium E (WME), 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 µl Hydrocortison, 7,5 ml HEPES, 160 µl Insulin und 50 ml FCS hinzufügen

2. Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Methode

Trypanblau-Arbeitslösung

Herstellung: 0,75 ml Trypanblau (0,5 %) in 2,25 ml DPBS lösen

3. Zellen ausstreuen

Kollagen-Lösung

Herstellung: 1 ml Kollagen-Stock in 40 ml DPBS lösen (Kollagen-Konzentration ca. 50 µg/ml)

4. Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Umsatz

Resazurin-Lösung

Herstellung: 5 mg Resazurin in 20 ml DPBS lösen

5. Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehalts in Zelllysaten

Lösung A2

Herstellung: 6,8 g KH_2PO_4 in 500 ml dH_2O lösen

Lösung B2

Herstellung: 8,5 g K_2HPO_4 in 500 ml dH_2O lösen

KPE-Puffer

Herstellung: 16 ml Lösung A2 zu 84 ml Lösung B2 pipettieren

GSH Standards

Stock-Lösung (1 mg/ml) (Aufbewahrung bei -20 °C)

Herstellung: 1 mg GSH in 1 ml KPE-Puffer lösen

Arbeitslösung (10 µg/ml)

Herstellung: 10 µl Stock-Lösung zu 1000 µl KPE-Puffer
pipettieren

Metaphosphorsäure (3 % w/v in Wasser) (Aufbewahrung bei +4 °C)

Herstellung: 3 g meta-Phosphorsäure in 100 ml KPE-Puffer
lösen

DTNB-Lösung (immer frisch ansetzen, kühlen und vor Licht schützen!)

Herstellung: 2 mg DTNB in 3 ml KPE-Puffer lösen

NADPH-Lösung (immer frisch ansetzen, kühlen und vor Licht schützen!)

Herstellung: 2 mg NADPH in 3 ml KPE lösen

GR-Lösung (immer frisch ansetzen, kühlen und vor Licht schützen!)

Herstellung: 33 µl einer 205 units/ml GR-Lösung in 3 ml
KPE-Puffer lösen

6. Proteinbestimmung nach Lowry

Bovines Serum Albumin (BSA), 10 µg/µl

Herstellung: 50 mg BSA in 5 ml dd H₂O lösen

Kupersulfat Stock-Lösung

Herstellung: 1 g CuSO₂*6 H₂O 1 % in 100 ml ddH₂O lösen

Natriumcarbonat Stock-Lösung

Herstellung: 20 g Na₂CO₃ 2 % in 900 ml ddH₂O lösen und
100 ml 1 M NaOH-Lösung zugeben

Natrium-Kalium-Tartrat Stock-Lösung

Herstellung: 2 g N-K-Tartrat (2 %ig) in 100ml ddH₂O lösen

Lösung A1 (Pro Well werden 150 µl benötigt; die Lösung muss vor Gebrauch
immer frisch angesetzt werden)

Herstellung: 20 µl Na-K-Tartrat Stock-Lösung mit 20 µl CuSO₄ Stock-Lösung und 1,96 ml Na₂CO₃ Stock Solution mischen

Lösung B1 (Pro Well werden 30 µl benötigt; die Lösung muss vor Gebrauch frisch angesetzt werden)

Herstellung: 500 µl Folin Reagent (1 mg/dl) mit 1000 µl ddH₂O mischen

7. ROS-Messung mittels DCFH-DA-Assay

DCFH-DA Stock-Lösung (Vorsicht lichtempfindlich!)

Herstellung: 100 mg DCFH-DA 20 mM in 10,26 ml DMSO lösen

DCFH-DA Arbeitslösung (Vorsicht lichtempfindlich; immer frisch ansetzen!)

Herstellung: 5 µl DCFH-DA Stock-Lösung (100 µM) in 1 ml WME II lösen

8. Sulforhodamin B (SRB) Proteinbestimmung

1 % Essigsäure-Lösung (Waschlösung)

Herstellung: 500 µl Essigsäurelösung (1 %) in 44,5 ml ddH₂O lösen

SRB-Lösung

Herstellung: 0,2 g SRB in 50 ml 1 % Essigsäurelösung lösen

10 mM nicht gepufferte TRIS-Lösung (pH = 10 – 10.5)

Herstellung: 0,606 g TRIS (10 mM) in 500 ml ddH₂O lösen

9. RNA-Isolation mittels TriFast

DEPC-Wasser

Herstellung: Zu 1 l ddH₂O 1 ml DEPC geben. Vor Gebrauch autoklavieren und abkühlen lassen

Waschlösung

Herstellung: Zu 35 ml Ethanol (99 %) 15 ml DEPC-Wasser

geben

10. RNA-Integritätscheck

TBE-Lösung (zehnfach)

Herstellung: 540 g TRIS, 275 g Borsäure und 37,3 g EDTA
in 5 l ddH₂O lösen und den pH-Wert auf 8,3 einstellen

Ladepuffer (fünffach)

Herstellung: 25 mg Bromphenolblau in 5 ml 10-fach TBE und
5 ml Glycerol lösen

2.2 Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten und im Nachfolgenden beschriebenen Methoden wurden nach den am Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung geltenden SOPs durchgeführt. War keine SOP vorhanden (z.B. für die Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehalts), wurde anhand eines Nature Protocols ein entsprechendes Dokument verfasst.

2.2.1 Aufarbeitung der primären Rattenhepatozyten [48]

Die Versuche dieser Arbeit wurden an PRH durchgeführt. Diese wurden von der Pharmacelsus GmbH (Saarbrücken) isoliert und über Nacht in Suspension (Suspensionsmedium: Cold Storage Lösung, Hepacult (Regensburg)) nach Tübingen transportiert. Bevor die Zellen für die Versuche kultiviert werden konnten, mussten sie wie folgt aufbereitet werden:

Materialien

- DPBS
- Easycoll Separation Lösung
- WME

Lösung

- WME II-Lösung

Durchführung

Vor Beginn der Aufarbeitung musste die Easycoll-Lösung auf Zimmertemperatur erwärmt und die Zentrifuge auf 4 °C gekühlt werden. Um die Zellen zu waschen wurden sie je nach Zellzahl in 15-30 ml DPBS resuspendiert, in 50 ml Falcons überführt (in jedem Falcon sollten 100-200 Millionen Zellen enthalten sein) und bei 100 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 12-15ml WME II resuspendiert. Nun wurde die Zellzahl wie unten beschrieben bestimmt und die Viabilität berechnet. Lag diese über 70 %, wurden die Zellen drei Mal wie oben beschrieben mit DPBS gewaschen und zuletzt in WME II resuspendiert und erneut die Zellzahl bestimmt. Lag die Viabilität unter 70 %, wurde eine Aufreinigung mit Percoll

durchgeführt um die toten von den lebenden Zellen zu separieren. Hierfür wurde ein von der Pharmacelsus GmbH zur Verfügung gestelltes Protokoll verwendet: 16,6 ml Easycoll Separation Lösung wurden in 50 ml Falcons vorgelegt und die Zellsuspension so aufgeteilt, dass die Zellkonzentration drei Millionen viable Zellen/ml WME II nicht überstieg und hinzu pipettiert. Nun wurden die Falcons mit WME II auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und ohne Beschleunigung und Bremse bei 200 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die lebenden Zellen befanden sich nun als Pellet am Boden des Falcons, wohingegen die toten Zellen in der Schicht darüber lokalisiert waren. Der Überstand samt der toten Zellen wurde abgesaugt, das Pellet zum Waschen erneut in 50 ml DPBS gelöst und bei 100 g und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde ein letztes Mal in 20-30 ml WME II (je nach Größe des Pellets) resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen wie unten beschrieben ausplattiert.

2.2.2 Zellzahlbestimmung mittels der Trypanblau-Methode [49]

Um Zellen in einer bestimmten Dichte ausstreuen zu können, muss zuvor die in einer Lösung vorhandene Zellzahl bestimmt werden. Hierfür eignet sich die Trypanblau-Methode. Trypanblau ist ein anionischer Farbstoff, der an Proteine bindet [50]. Mittels dieser Eigenschaft kann man viable von toten Zellen unterscheiden. Während viable Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen und somit unangefärbt bleiben (hell erscheinen), kann Trypanblau die Membran toter oder perforierter Zellen passieren. In der Folge werden diese blau angefärbt. Da Trypanblau als zytotoxisch einzustufen ist, muss eine Auszählung der Zellen umgehend vorgenommen werden um Verfälschungen des Ergebnis zu vermeiden.

Materialien

- DPBS
- Ethanol
- Neubauer-Zählkammer
- Trypanblau 0,5 % 100 ml

Lösung

- Trypanblau-Arbeitslösung

Durchführung

Auf der zuvor mit Ethanol gereinigten Neubauer-Zählkammer wurde ein Deckgläschen aufgebracht. In einem Eppendorfgefäß wurden 10 µl der Zelllösung mit 10 µl Trypanblaulösung gemischt und schließlich 10 µl dieser Lösung in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Mikroskop wurden bei 10-40-facher Vergrößerung in vier Quadraten der Zählkammer die viablen und toten Zellen unabhängig voneinander ausgezählt.

Berechnung

$$\text{Gesamtzellzahl} = n * \text{VF} * V * 10^4$$

$$\text{Anzahl an lebenden Zellen} = m * \text{VF} * V * 10^4$$

$$\text{Viabilität} = \text{Anzahl an lebenden Zellen} / \text{Gesamtzellzahl}$$

n = Durchschnitt der in den Quadraten ausgezählten lebenden und toten Zellen

m = Durchschnitt der in den Quadraten ausgezählten lebenden Zellen

VF = Verdünnungsfaktor

V = Gesamtvolumen der Zellsuspension

10^4 = Faktor der Zählkammer

Beispiel

Zellsuspension 10 ml

Verdünnungsfaktor 2

Mittelwert lebende Zellen 68

Mittelwert tote Zellen 20

$$\text{Gesamtzellzahl} = (68 + 20) \text{ Zellen} * 2 * 10 \text{ ml} * 10^4 = 17,6 \text{ Mio Zellen}$$

$$\text{Lebende Zellen} = 68 * 2 * 10 \text{ ml} * 10^4 = 13,6 \text{ Mio Zellen}$$

Viabilität = $13,6 \text{ Mio Zellen} / 17,6 \text{ Mio Zellen} * 100 = 77 \% \text{ Viabilität}$

2.2.3 Zellen ausstreuen [51, 52]

Die Versuche dieser Arbeit wurden an adhärennten PRH vorgenommen. Hierfür mussten die Zellen in mit Kollagen beschichteten Well-Platten verschiedener Größe ausgestreut werden.

Materialien

- DPBS
- Kollagen
- WME

Lösung

- Kollagen-Lösung
- WME II-Lösung

Durchführung

Zur Kultivierung der, wie oben beschrieben, aufbereiteten Rattenhepatozyten mussten zunächst die 6-Well bzw. 96-Well-Platten mit einer Kollagenschicht überzogen werden, da hierauf die Zellen besser als auf reinem Plastik anwachsen konnten. Für eine 6-Well-Platte benötigte man 2 ml, für eine 96-Well-Platte 100 µl der Kollagen-Lösung pro Well. Nachdem diese hinzu pipettiert wurde, konnte der Überstand nach 30 Minuten wieder abgenommen werden. Nun wurden die Zellen, die in WME II-Lösung vorlagen, in die Wells pipettiert. Für eine 6-Well-Platte verwendete man pro Well eine Millionen Zellen in zwei ml WME II, für eine 96-Well-Platte 25.000 Zelle in 100 µl WME II. Im Brutschrank wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach vier bis sechs Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem vorsichtig der Überstand samt der toten bzw. nicht adhärennten Zellen aspiriert und danach auf 37 °C vorgewärmtes WME II hinzugefügt wurde.

2.2.4 Zellviabilitätsmessung mittels Resazurin-Umsatz [53]

Der Resazurin-Umsatz dient dazu die Zellviabilität beziehungsweise die Zytotoxizität nachzuweisen. Resazurin ist ein blauer, nicht toxischer Farbstoff, der von Zellen aufgenommen wird und in den Mitochondrien je nach Viabilität der Zelle zu Resorufin, einem pinkfarbenen und fluoreszierenden Farbstoff, reduziert wird. Ist die metabolische Aktivität oder das Redoxpotential der Zelle z.B. durch toxische Substanzen erniedrigt, findet dieser Umsatz verlangsamt statt oder kommt komplett zum Erliegen. Der Farbumschwung kann spektrophotometrisch gemessen werden [53].

Materialien

- Resazurin
- DPBS

Lösung

- Resazurin-Lösung

Durchführung

Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte kultiviert und mit Ethanol-Konzentrationen zwischen 150 mM und 900 mM behandelt, als Positivkontrolle für die Zytotoxizität wurde 10 % DMSO eingesetzt. Bei diesem Versuch wurde in Triplikaten gemessen. Pro Well wurden 100 µl der Resazurin-Lösung hinzugefügt und sofort sowie nach einer Stunde die Fluoreszenz bei 530 nm (Anregungswellenlänge) und 560 nm (Emissionswellenlänge) mit dem Platerader gemessen. Die gemessene Fluoreszenz war proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

Berechnung

Für die Kalkulation wurden die Messwerte nach einer Stunde herangezogen. Zunächst wurden aus den Triplikaten Mittelwerte gebildet, diese durch den Mittelwert der unbehandelten Zellen geteilt und mit 100 multipliziert. Hierdurch erhielt man die Viabilität in % der unbehandelten Zellen.

2.2.5 Etablierung des GSH-Assays und Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehalts in Zelllysaten [54]

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann GSH in seiner Funktion als Antioxidans unter Entstehung von GSSG oxidiert werden. Dabei bilden jeweils zwei GSH-Moleküle ein GSSG-Molekül. Zum Schutz der Zelle ist es wichtig, dass etwa 90 % des GSHs in reduzierter Form vorliegen und das GSSG-Dimer mit Hilfe der GR und unter NADPH-Verbrauch wieder zu GSH recycled wird.

Der hier verwendete Assay stellt ein Verfahren dar um den Gesamt-GSH-Gehalt (GSH und GSSG) einer Probe nachzuweisen. Dieser wird photometrisch bestimmt. Grundlegend ist folgende Reaktion: Das in der Probe vorhandene GSH bzw. durch die GR und NADPH in GSH überführte GSSG reagiert mit dem zugegebene 5-(3-Carboxy-4-Nitrophenyldisulfanyl-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) unter Freisetzung von 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure (TNB) zu GS-TNB. TNB kann photometrisch mittels Platerader bestimmt werden. Abbildung 8 verdeutlicht das Prinzip des Assays.

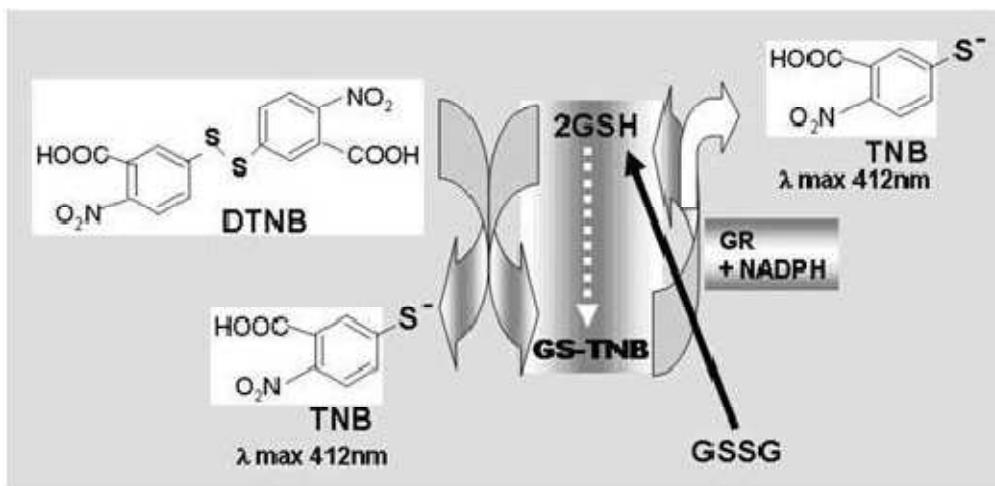


Abbildung 8: Prinzip der GSH-Bestimmung [54]

Da für die GSH-Bestimmung noch keine SOP vorhanden war, musste dieses Verfahren zunächst etabliert werden. Die Grundlage bildete das Nature Protocol nach Irfan Rahman [54]. Durch Austesten unterschiedlicher Substanzen,

Mengen und Verhältnissen wurde dieses Protokoll so angepasst, dass die besten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Materialien

- Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)
- DTNB
- DPBS
- GR
- GSH
- Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
- Metaphosphorsäure
- NADPH

Lösungen

- Lösung A2
- Lösung B2
- KPE-Puffer
- GSH Standards (Stock- und Arbeitslösung)
- Metaphosphorsäure-Lösung
- DTNB-Lösung
- NADPH-Lösung
- GR-Lösung

Durchführung

Die Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, mit Ethanol (150 mM, 300 mM und 450 mM) für 15 Minuten, 30 Minuten, eine, zwei, vier und sechs Stunden stimuliert und anschließend mit je 1 ml DPBS gewaschen. Nun wurden sie unter Zuhilfenahme eines Zellschabers abgekratzt, in 1 ml kaltem DPBS aufgenommen und in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt. Im ersten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen bei 1000 g 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das im Eppendorfgefäß verbleibende Zellpellet wurde in 100 µl meta-Phosphorsäure gelöst (wichtig bei diesem Schritt war es auf gutes Vortexen zu achten),

eingefroren, aufgetaut und im zweiten Zentrifugationsschritt bei 3000 g bei 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Nun erhielt man erneut einen Überstand und ein Pellet. Der Überstand wurde für die GSH-Bestimmung, das Pellet für die Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt. Beides konnte getrennt voneinander eingefroren und bis zur Messung aufbewahrt werden: der Überstand bei -80 °C, das Zellpellet bei -20 °C.

Zur späteren Berechnung der GSH-Konzentrationen der Proben wurde eine Standardkurve benötigt (Abbildung 9). Hierfür wurde zuerst eine Arbeitslösung hergestellt, indem zu 1000 µl KPE-Puffer 10 µl der eingefrorenen GSH-Standard-Stock-Lösung pipettiert wurde. Danach wurden 800 µl dieser Arbeitslösung in 200 µl KPE-Puffer gelöst. So erhielt man die höchste Standardkonzentration (26,4 nmol/ml). Als Nächstes wurde eine Verdünnungsreihe erstellt bis die niedrigste Konzentration (0,103 nmol/ml) erreicht wurde.

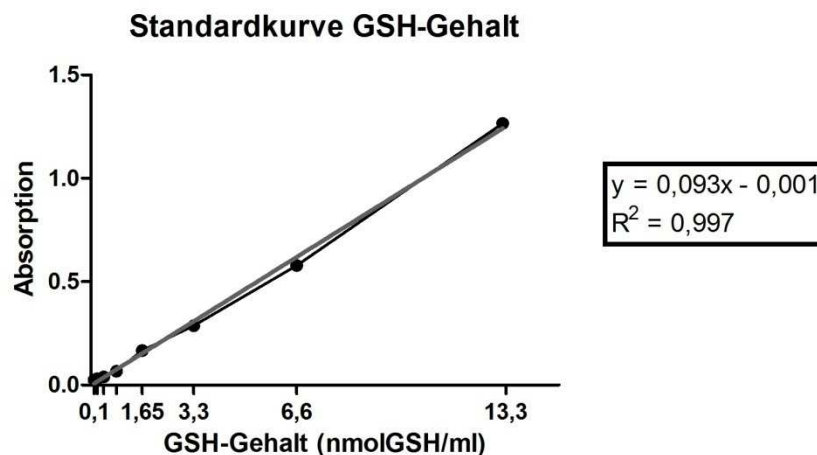


Abbildung 9: Standardkurve GSH (PRH (alt), 02.08.2013)

Für die GSH-Messung wurden jeweils 20 µl jedes Standards und jeder zu messenden Probe (jeweils Triplikate) in eine 96-well-Platte pipettiert. Wichtig war es einen Leerwert mitzuführen der reinen KPE-Puffer enthielt. Nun wurden gleiche Volumina an DTNB und GR gemischt und pro Well 120 µl dieser Mischung hinzu pipettiert. Nach 30 Sekunden fügte man 60 µl NADPH-Lösung

pro Well hinzu und maß sofort die Absorption bei 412 nm in einem Platerader (fünf Zyklen alle 30 Sekunden).

Auswertung

Für die Auswertung wurden die Werte aus Zyklus Nummer fünf (nach zwei Minuten) benötigt. Dabei wurde auf Linearität der Produktbildung geprüft.

Nach Abzug des Leerwerts wurden die Konzentrationen der Standardproben gegen die Absorption aufgetragen. Die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung wurde nach x aufgelöst. Für y wurden nun die für die Proben gemessenen Absorptionen jeweils abzüglich des Leerwerts eingesetzt und man erhielt den GSH-Gehalt (in nmol GSH/ml). Nach der durchgeführten Proteinbestimmung nach Lowry ließ sich der GSH-Gehalt pro Protein (nmol/mg) angeben.

2.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry [55]

Die Proteinbestimmung nach Lowry ist ein Anfang der 50er Jahre publiziertes Verfahren zur Bestimmung des Proteingehalts einer Probe. Grundlage sind zwei Reaktionen: Zuerst findet eine Biuret-Reaktion statt. Dies bedeutet, dass eine Komplexbildung zwischen der Peptidbindung des Proteins und dem Kupfer stattfindet. Im zweiten Schritt wird das gelbe Folin-Reagenz durch den Protein-Kupfer-Komplex reduziert, wodurch sich diese blau färbt. Dies kann photometrisch gemessen werden kann.

Materialien

- Bovines Serum Albumin (BSA)
- Na-K-Tartrat
- Kupfersulfat (Cu_2SO_4)
- Natriumcarbonat (Na_2CO_3)
- Natriumhydroxid (NaOH)
- Folin-Reagenz

Lösungen

- Na-K-Tartrat-Stock-Lösung
- Cu_2SO_4 -Stock-Lösung
- Na_2CO_3 -Stock-Lösung
- Lösung A1
- Lösung B1

Durchführung

In eine 96-Well-Messplatte wurden je 2 μl der Standards (Tabelle 2) und der zu bestimmenden Proben in Tripikaten pipettiert und anschließen je Well 150 μl der Lösung A1 hinzu pipettiert. Nachdem die Platte bei Raumtemperatur zehn Minuten auf dem Schwenkinkubator inkubiert wurde, wurden 30 μl Lösung B1 hinzugegeben. Nach 90-120 Minuten auf dem Schwenkinkubator konnte bei 750 nm die Absorption mittels des Platereaders gemessen werden.

Zu spätere Berechnung des Proteingehalts der Proben wurden folgende Standards benötigt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Standards Lowry-Proteinbestimmung

Standard	dd H₂O [μ]	BSA Stock-Lösung [μ]	BSA-Konzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{l}$]
1 = Leerwert	1000	0	0
2	900	100	1
3	600	200	2
4	400	400	4
5	200	600	6
6	100	800	8
7	0	1000	10

Auswertung

Nach Abzug des Leerwerts und Mittelung der Duplikate wurden die Konzentrationen der Standardproben gegen die Absorption aufgetragen. Die durch lineare Regression erhaltene Geradengleichung wurde nach x aufgelöst (vgl. Abbildung 9). Für y wurden nun die für die Proben gemessenen und gemittelten Absorptionen jeweils abzüglich des Leerwerts eingesetzt und man erhielt die Proteinkonzentration der Probe in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.2.7 ROS-Messung mittels DCFH-DA-Assay [56]

Wie einleitend beschrieben, sind ROS reaktionsfreudige Formen des Sauerstoffs, denen unter anderem schädliche Wirkungen auf den Organismus wie die Proteinoxidation und Lipidperoxidation zugeschrieben werden. Der DCFH-DA-Assay dient dazu ROS zu detektieren und zu quantifizieren.

Zum Einsatz kommt hier Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (DCFH-DA), ein sensitiver wenn auch unspezifischer Marker um ROS nachzuweisen [57]. Auf Grund der doppelt vorhandenen Acetatgruppen dieses Stoffes kann er die Zellmembran gut überwinden. In der Zelle wirken Deacetylasen auf das DCFH-DA ein, wodurch DCF-H entsteht, das hydrophiler ist und somit nicht wieder aus der Zelle hinaus diffundieren kann. Durch vorhandene ROS findet eine Oxidation statt und es entsteht 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF), dessen Fluoreszenz bei $\text{ex/em} = 485/520 \text{ nm}$ messbar ist (Abbildung 10).

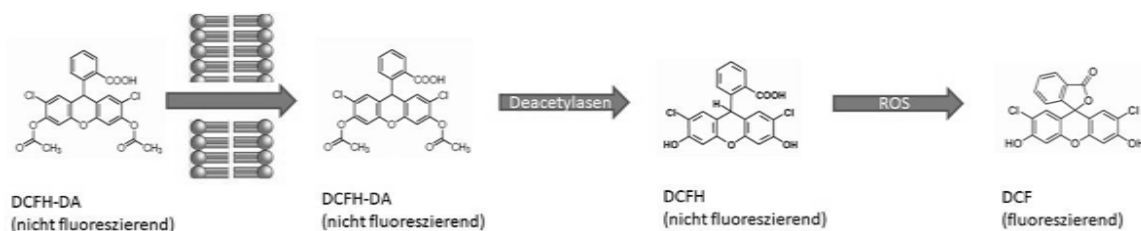


Abbildung 10: Prinzip DCFH-DA Assay, modifiziert nach [58, 59]

Materialien

- DCFH-DA Stock-Lösung
- DCFH-DA Arbeitslösung

- DPBS
- WME

Lösungen

- DCFH-DA Stock-Lösung
- DCFH-DA Arbeitslösung

Durchführung

Für die ROS-Messung wurden in einer 96-Well-Platte 25.000 Zellen in je 100 µl Kulturmedium pro Well kultiviert und mit Ethanol (150 mM, 300 mM und 450 mM) für 15 Minuten, 30 Minuten, eine, zwei, vier und sechs Stunden stimuliert. Pro Versuchsbedingung wurden Quadruplikate gewählt. Nachdem das gewählte Versuchssetup beendet war, wurden 10 µl DCFH-DA-Arbeitslösung pro Well zu pipettiert. Wichtig war die 96-Well-Platte nun vor Licht zu schützen, da DCFH-DA lichtempfindlich ist, was zu eventuellen Messfehlern in diesem Versuch führen kann. Schließlich wurde die Platte für 30 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Zellen rasch mit DPBS gewaschen und 100 µl WME pro Well hinzu pipettiert und umgehend am Platerreader die Fluoreszenz bei ex/em = 485/520 nm über eine Stunde hinweg gemessen. Zu beachten war, den Waschvorgang zügig vorzunehmen um ein erhöhtes Hintergrundsignal zu vermeiden. Nach der Messung wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen mit 99,9 %-igem Ethanol fixiert und somit für die SRB-Färbung vorbereitet.

Auswertung

Zur Auswertung war einerseits die Fluoreszenzmessung des DCFH-DA-Assays andererseits die Proteinbestimmung des SRB-Assays nötig. Die gemessene Fluoreszenz waren direkt proportional zu der im Well enthaltenen Menge an ROS. Die Werte aus dem SRB-Staining wurden benötigt um die ROS-Werte auf die genaue Zellanzahl zu beziehen. Von den gemessenen SRB-Werten wurde zunächst der höchste ausgewählt und angenommen, dass dieser für die am

Anfang ausgestreuten 25.000 Zellen stand. Im nächsten Schritt wurden alle Werte auf 25.000 Zellen normiert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Beispiel Normierung der ROS-Werte I (Messwerte: SRB-Staining, PRH (alt) 02.08.2012)

Messwerte	Normierung auf 25.000 Zellen	
2,633	1,128	Beispiel: $2,971/2,633 = 1,128$
2,971	1	
2,695	1,102	
2,659	1,117	

Nun wurden die Messwerte der DCFH-DA Messung mit den in Tabelle 3 gezeigten Werten multipliziert und so auf 25.000 Zellen normiert (Tabelle 4).

Tabelle 4: Beispiel Normierung der ROS-Werte II (Messwerte DCFH-DA-Assay, PRH (alt) 02.08.2012)

Messwerte	Normierung auf 25.000 Zellen	
976	1101,3	Beispiel: $976 * 1,12837078 = 1101,3$
833	833	
770	848,6	
697	778,9	

Zur Darstellung wurden die verschiedenen Bedingungen auf die Kontrolle bezogen und die Mittelwerte der Quadruplikate gebildet.

2.2.8 SRB-Proteinbestimmung [60]

Die SRB-Färbemethode ist ein Verfahren, mit dem der Gesamtproteingehalt einer Probe bestimmt werden kann. Die Grundlage bildet die Tatsache, dass

der Farbstoff SRB in saurem Milieu an die Oberflächenproteine der Zellen bindet. Je nach Anzahl der Zellen bindet unterschiedlich viel SRB, was letztendlich in Form von unterschiedlichen Absorptionen detektierbar ist.

Materialien

- Essigsäure
- Ethanol 99 %
- SRB
- TRIS

Lösungen

- 1 % Essigsäure-Lösung (Waschlösung)
- SRB-Lösung
- 10 mM nicht gepufferte TRIS-Lösung

Durchführung

Die zu färbenden Zellen wurden zunächst in einer 96-Well-Platte kultiviert. Zum Fixieren wurde das Kulturmedium entfernt und pro Well 100 µl Ethanol für 30 Minuten auf die Zellen gegeben. Nach Entfernen des Ethanols wurden 50 µl SRB-Lösung pro Well hinzu pipettiert und für 30 Minuten im Dunkeln auf dem Schwenkinkubator inkubiert. Die SRB-Lösung wurde wieder entfernt und die Zellen vier Mal mit einprozentiger Essigsäure-Lösung gewaschen. Es galt darauf zu achten die gesamte SRB-Lösung zu entfernen, damit nur noch das gebundene SRB im Well verblieb und somit Verfälschungen der Messwerte zu vermeiden. Für die Quantifizierung wurde das gebundene SRB mit Hilfe der zehn mM nicht gepufferten TRIS-Lösung gelöst. TRIS bewirkt eine Verschiebung des sauren pHs hin zu einem basischen wodurch der SRB-Farbstoff ausgelöst wird. Pro Well wurden 100 µl TRIS hinzugegeben und im Dunkeln für zehn Minuten inkubiert. Danach konnte die Absorption im Platerreader bei 565 nm (Absorptionsmaximum SRB, Abbildung 11) und 690 nm (Kratzer etc.) gemessen und die Werte voneinander abgezogen werden.

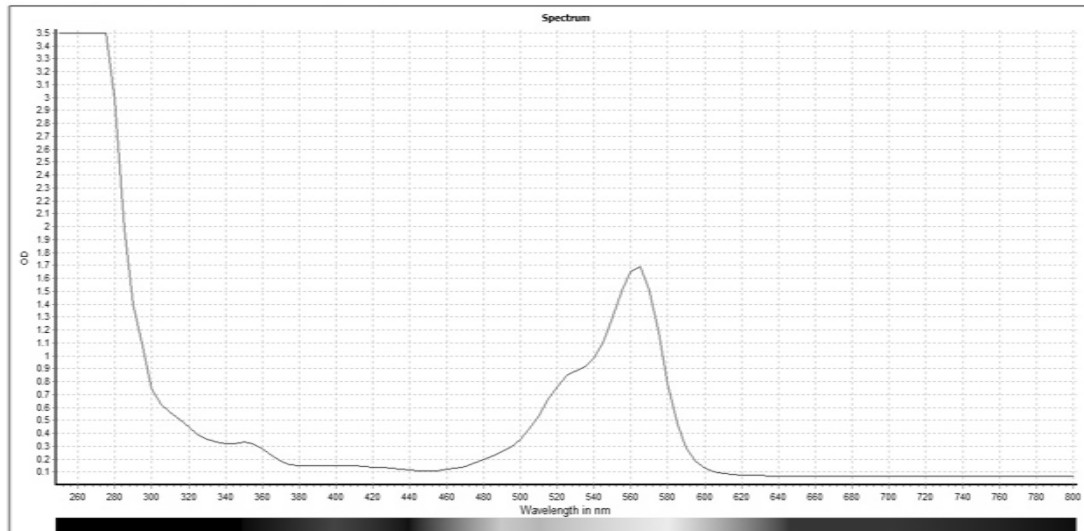


Abbildung 11: Spektrum SRB

2.2.9 PCR

In einem weiteren Schritt wurde die Expression verschiedener am antioxidativen Stoffwechsel beteiligter Enzyme (Katalase, SOD-2, γ -GCL, Hämoxygenase-1 (HO-1)) untersucht. Hierzu wurde zunächst die in der Zelle enthaltene RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR quantifiziert.

2.2.9.1 RNA-Isolation mittels TriFast [61]

Die RNA ist aus Nukleotiden (Ribose plus organische Base plus Phosphat) aufgebaut. Ihr werden unterschiedliche Funktionen wie die Übertragung genetischer Informationen oder die Übersetzung dieser Information in Proteine zugeschrieben.

Die RNA-Proben wurden entweder direkt nach dem Aufarbeiten der Rattenhepatozyten genommen oder teilweise für zwei Stunden mit 150 mM Ethanol stimuliert, in 500 μ l peqGold TriFast lysiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. PeqGold TriFast ist eine gebrauchsfertige Lösung um in einer Probe RNA von DNA und Protein zu trennen. Durch Zentrifugieren bilden sich drei Phasen: die obere, wässrige Phase enthält die RNA, die mittlere milchige Phase die DNA und die untere rötliche Phase Protein.

Materialien

- Chloroform
- DEPC
- Ethanol
- Glycerol
- Isopropanol
- peqGold TriFast
- TRIS

Lösungen

- DEPC-Wasser
- Waschlösung

Durchführung

Die Proben wurden aufgetaut und je Probe 100 µl Chloroform zugeben, 15 Sekunden gevortext, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und bei 14.000 g und 4 °C zehn Minuten zentrifugiert. Währenddessen wurde pro Probe 250 µl Isopropanol in ein neues RNase-freies Eppendorfgefäß vorgelegt und nach Beendigung der Zentrifugationszeit die oberste wässrige Phase, die die RNA enthielt, abgenommen und zum Isopropanol hinzugefügt. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine erneute zehnminütige Inkubationszeit; hierfür wurde die Probe auf Eis gestellt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 14.000 g und 4 °C von zehn Minuten. Nachdem sich nun am Boden des Eppendorfgefäßes ein RNA-Pellet gebildet hatte, konnte der Überstand vorsichtig abgenommen werden und das Pellet zweimal wie folgt gewaschen werden: 1 ml Waschlösung wurde hinzugefügt, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das Eppendorfgefäß für einige Minuten offen gelassen, damit der gesamte Ethanol verdunsten konnte. Zuletzt wurde das Pellet in 30 µl DEPC resuspendiert, zum RNA-Integritätscheck verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

2.2.9.2 RNA-Integritätscheck [62]

Um sicherzustellen, dass die isolierte RNA rein und nicht kontaminiert war, wurde sie auf ein Agarosegel geladen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach diesem Schritt sollte auf dem Gel die 28S und 18S rRNA sichtbar sein und sich klar und deutlich darstellen.

Materialien

- Agarose
- Bromphenolblau
- EDTA
- Ethidiumbromid
- Glycerol
- Ladepuffer (fünffach)
- pUC-19-Marker
- TRIS

Lösungen

- TBE-Lösung
- Ladepuffer

Durchführung

Zunächst wurde ein Agarosegel aus 1,8 g Agarose, 100 ml zehnfach TBE-Puffer und 7 μ l Ethidiumbromid hergestellt und 45 Minuten polymerisieren gelassen. Danach wurde die RNA so mit DEPC verdünnt, dass eine Probe mit einer Konzentration von 500 ng/ μ l entstand. Zu 10 μ l dieser Lösung wurden 2,5 μ l Ladepuffer hinzugegeben und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. In die erste Tasche des Gels wurden drei μ l des Markers pUC-19 pipettiert und an das Gel für 45 Minuten eine Spannung von 90 Volt angelegt. Die auf dem Gel erhaltenen Banden wurden mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

2.2.9.3 cDNA-Synthese [63]

Die cDNA wird mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase (RT), hergestellt und ist komplementär zur RNA. Sie wird später mittels PCR vervielfältigt um Rückschlüsse auf die Expressionsrate der zugrundeliegenden RNA ziehen zu können.

Für die cDNA-Synthese wurden 3.000 ng RNA, 1 µl (dT)18 Oligo- und 1 µl (dT)18 Randomprimer eingesetzt und die Probe mit DEPC auf ein Endvolumen von 11 µl gebracht. Fünf Minuten nach Starten des Thermocyclers wurden je Probe 9 µl des Mastermix bestehend aus 4 µl Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock, 2 µl dNTP Mix und 2 µl M-MuLV hinzu pipettiert und der Thermocycler erneut gestartet. Nach Beendigung des Programms lag im Eppendorf die produzierte cDNA vor. Diese konnte bei -20 °C gelagert werden.

2.2.9.4 PCR [64]

Die PCR ist ein 1983 von Kary Mullis erfundenes Verfahren. Es dient dazu die cDNA zu vervielfältigen und besteht aus drei Schritten, nämlich der Denaturierung, dem Annealing und der Elongation. Im ersten Schritt wird die DNA erhitzt um die Doppelstränge der DNA zu trennen, als Zweites kommt es zur Anlagerung der spezifischen Primer und im dritten Schritt zur Vervollständigung des neu zu synthetisierenden Strangs mit Hilfe der DNA-Polymerase.

Benötigt wurden der spezifische Forward- und Reverse Primer (je 1 µl), der Kappa-Mastermix (je 10 µl), DEPC und die cDNA-Probe. Die jeweiligen Bedingungen und Reagenzienmengen mussten zunächst für jeden Primer einzeln optimiert werden, da je nach dessen Länge, Sequenz und Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase unterschiedliche Bedingungen notwendig sind, um einen korrekten Ablauf dieses sensiblen Verfahrens zu garantieren. Je Primer wurden PCRs mit 35 und 40 Zyklen durchgeführt, Temperaturen von 54 °C bis 64 °C durchgetestet sowie Probenmengen von zwei µl bis sechs µl eingesetzt. Die Bedingungen, die die besten Ergebnisse erzielten, wurden zukünftig verwendet.

2.2.9.5 Gelelektrophorese [62]

Die Gelelektrophorese dient dazu die entstandenen DNA-Fragmente aufzutrennen. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie nach Anlegen von Strom vom negativen zum positiven Pol. Diese Wanderung wird vom Agarose-Gel behindert. Je nach Länge können die Fragmente schneller (kleine Fragmente) oder langsamer (große Fragmente) wandern und werden so der Länge nach aufgetrennt.

Zunächst wurde ein Agarosegel wie unter Punkt Methoden 2.2.9.2 RNA-Integritätscheck beschrieben hergestellt und in jede Tasche eine Probe pipettiert. In die erste Tasche wurden drei μl des Primers (pUC 19) gegeben und an das Gel für 45 Minuten eine Spannung von 90 Volt angelegt. Die auf dem Gel erhaltenen Banden wurden mittels Ethidiumbromid-Fluoreszenz sichtbar gemacht.

Die Auswertung erfolgte mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ, das vom National Institute of Health, USA entwickelt wurde. In einem letzten Schritt wurden die einzelnen Ergebnisse auf das Housekeeping-Gen (β -Actin) bezogen.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die altersabhängigen Auswirkungen von Ethanol-induziertem oxidativen Stress in PRH zu untersuchen. Hierzu wurden primäre Hepatozyten von mittelalten (6-8 Monate) und alten (23 Monate) Ratten verwendet. Im Fokus stand neben der direkten Detektion von ROS die zeitabhängige Entwicklung des GSH-Gehalts. Inwieweit antioxidative Substanzen einen Einfluss auf die Ethanol-induzierte ROS-Bildung haben, wurde durch Vorbehandlung der Hepatozytenkultur mit NAC untersucht. Abschließend wurden altersabhängige Unterschiede in der basalen Expression sowie in der Induzierbarkeit antioxidativer Enzyme wie der Katalase, der SOD-2, der γ -GCL und der HO-1 herausgearbeitet.

3.1 Etablierung GSH-Assay

Vor Beginn der Versuche wurde der GSH-Assay anhand eines Nature Protocols etabliert und angepasst und eine SOP erstellt. Die Ergebnisse dieses Prozesses stellen sich wie folgt dar: Das zur Zellyse eingesetzte Triton X wurde durch Metaphosphorsäure ersetzt. Die beste und zuverlässigste Lyse ließ sich mit dreiprozentiger Metaphosphorsäure erzielen. Zusätzlich wurden die Zellen danach für zwei Stunden eingefroren. Die GSH-Standards wurden angepasst und nur Konzentrationen zwischen 13,2 nM/ml und 0,103 nM/ml verwendet.

3.2 Primer-Optimierung

Da die PCR ein sehr sensibles Verfahren darstellt, mussten die Primer vor ihrer Verwendung hinsichtlich eingesetztem Volumen, Temperaturoptimum und Zyklenanzahl optimiert werden. Die Ergebnisse zeigen die Tabelle 5 bis Tabelle 10.

Tabelle 5: Reagenzienmengen unterschiedlicher Primer

Primer	Probenvolumen	DEPC (μ l)
β -Actin	2	6
Katalase	2	6
Superoxiddismutase-2 (SOD-2)	2	6
γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -GCL)	2	6
Hämoygenase-1 (HO-1)	2	6

Tabelle 6: PCR-Bedingungen von β -Actin

PCR-Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung 1	95	300	1
Denaturierung 2	95	40	35
Annealing	58	40	35
Elongation	72	40	35
Final Extension	72	300	1
Storage	4	∞	1

Tabelle 7: PCR-Bedingungen der Katalase

PCR-Schritt	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung 1	95	300	1
Denaturierung 2	95	40	40
Annealing	58	40	40
Elongation	72	40	40
Final Extension	72	300	1
Storage	4	∞	1

Tabelle 8: PCR-Bedingungen der SOD-2

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung 1	95	300	1
Denaturierung 2	95	40	40
Annealing	62	40	40
Elongation	72	40	40
Final Extension	72	300	1
Storage	4	∞	1

Tabelle 9: PCR-Bedingungen der γ -GCL

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung 1	95	300	1
Denaturierung 2	95	40	40
Annealing	58	40	40
Elongation	72	40	40
Final Extension	72	300	1
Storage	4	∞	1

Tabelle 10: PCR-Bedingungen der HO-1

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklen
Denaturierung 1	95	300	1
Denaturierung 2	95	40	40
Annealing	85	40	40
Elongation	72	40	40
Final Extension	72	300	1
Storage	4	∞	1

3.3 Vergleich der Basalwerte (ROS, Protein, GSH, Genexpression) mittelalter und alter PRH

Um die Mechanismen, die in der Leber nach Ethanolstimulation ablaufen, auf zellulärer Ebene darstellen zu können, wurde zunächst eine Grundcharakterisierung der unbehandelten Hepatozyten in Bezug auf ROS-, Protein- und GSH-Gehalt sowie die Genexpression erstellt. Hieraus lassen sich erste Rückschlüsse auf die metabolische Aktivität der Zelle und ihre Stoffwechsellage ziehen.

Betrachtet man den ROS-Gehalt unbehandelter Hepatozyten, so liegt dieser in den mittelalten Rattenhepatozyten in etwa 30 % über dem der alten PRH, was keinen signifikanten Unterschied darstellt. Verdeutlicht wird dies in Abbildung 12.

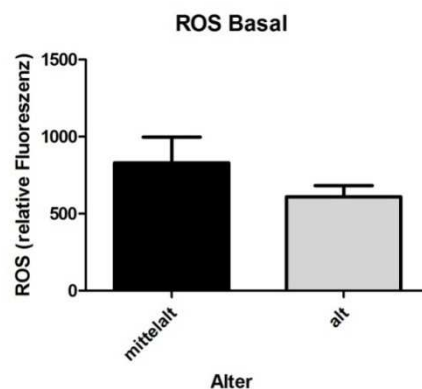


Abbildung 12: Vergleich des basalen ROS-Gehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten. Es wurden die Ergebnisse aus neun (mittelalt, N = 9) bzw. acht (alt, N = 8) Versuchen mit jeweils vier Replikaten pro Alter (n = 4) gemittelt.

Abbildung 13 stellt den Gesamtproteingehalt von einer Million PRH in mg/ml dar. Vergleicht man die mittelalten und alten Rattenhepatozyten zeigt sich ein signifikant erhöhter Proteingehalt in den mittelalten Zellen. Der Proteingehalt wurde außerdem genutzt um die GSH-Werte zu normieren.

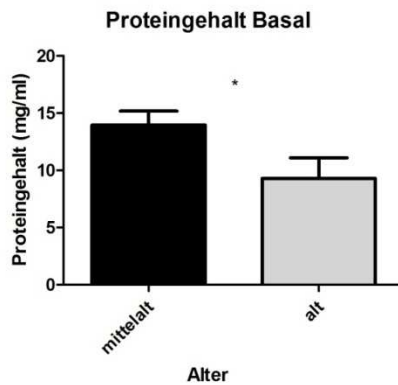


Abbildung 13: Vergleich des basalen Gesamtproteingehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten. Der Unterschied zwischen den Altersgruppen stellt sich mit $P = 0,0102$ signifikant dar (gepaarter T-Test). Die dargestellten Ergebnisse wurden aus neun (mittelalt, $N = 9$) bzw. sechs Messungen (alt, $N = 6$) mit drei Replikaten pro Alter ($n = 3$) gemittelt.

Der GSH-Gehalt der untersuchten Altersgruppen ist in Abbildung 14 dargestellt. Dieser weist keinen Unterschied im Vergleich der beiden Altersgruppen auf. Trotz signifikant unterschiedlichem Proteingehalt liegt der GSH-Gehalt sowohl in den mittelalten als auch in den alten Hepatozyten bei etwa 4,5 nmol GSH/mg Protein.

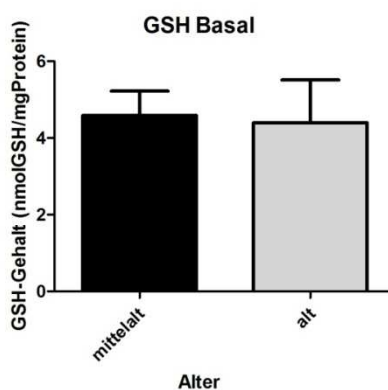


Abbildung 14: Vergleich des basalen Glutathiongehalts zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten. Die GSH-Werte sind auf den Proteingehalt normiert und zeigen keine Signifikanz. Gemittelt wurden die Ergebnisse aus sieben (mittelalt, $N = 7$) bzw. acht (alt, $N = 8$) Versuchen mit drei Replikaten ($n = 3$) pro Alter.

Die Genexpression der PRH wurde mittels PCR bestimmt und stellt sich bezogen auf das „Housekeeping“-Gen β -Actin dar. Es wurden je Altersgruppe drei verschiedene Proben untersucht und zwei unabhängige PCRs durchgeführt. Der Vergleich der beiden Altersgruppen ist in Abbildung 15 dargestellt. Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind für alle untersuchten Gene augenscheinlich, wenn auch verschieden stark ausgeprägt. Allgemein ist festzustellen, dass die Genexpression aller analysierten Gene in den mittelalten gegenüber den alten Zellen erhöht ist. Signifikant ausgeprägt ist dieser Unterschied bei Betrachtung der SOD-2 und der γ -GCL. Zieht man die Expressionslevel der Katalase oder HO-1 zum Vergleich heran, ist tendenziell der gleiche Trend sichtbar.

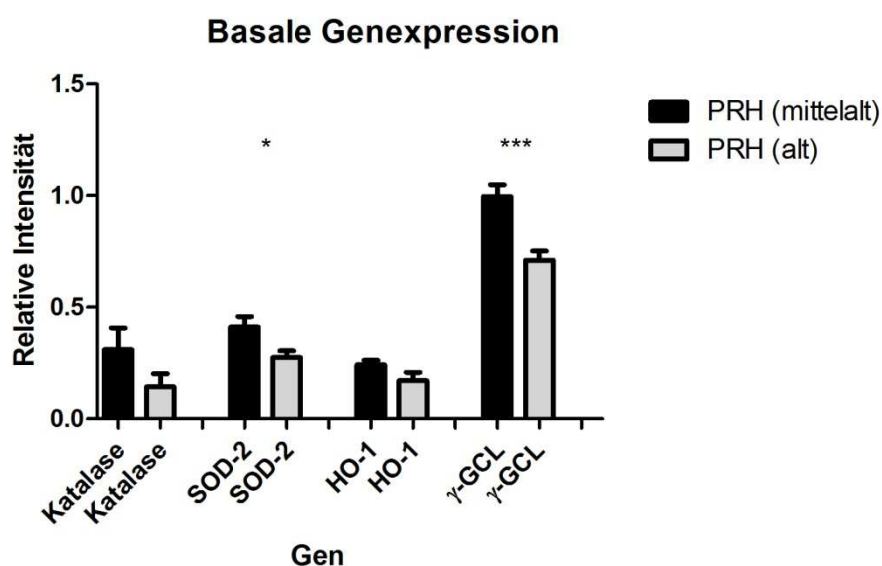


Abbildung 15: Basale Genexpression antioxidativer Enzyme. SOD-2 = Superoxiddismutase-2, HO-1 = Hämoygenase-1, γ -GCL = γ -Glutamylcystein-Synthetase. Ein signifikanter Unterschied im Altersvergleich zeigt sich für die SOD-2 mit einem P-Wert von 0,0218 und für die γ -GCL mit P = 0,001 (ungepaarter T-Test). Pro Altersgruppe wurden drei Proben (N = 3) mittels zweier unabhängiger PCRs untersucht.

3.4 Auswirkung von Ethanol-induziertem Stress auf mittelalte PRH

Nach Erhebung der Basalwerte wurden die PRH mit Ethanol (150 mM, 300 mM, 450 mM) über einen Zeitraum von sechs Stunden stimuliert und erneut der GSH-, ROS- und Protein-Gehalt bestimmt. Des Weiteren wurden die ROS nach einer Vorbehandlung mit NAC gemessen und die Expression verschiedener am antioxidativen Stoffwechsel beteiligter Gene (Katalase, SOD2, HO-1 und γ -GCL) untersucht.

3.4.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität

In einem ersten Schritt sollte nachgewiesen werden, dass die eingesetzten Ethanolkonzentrationen keinen toxischen Effekt auf die Zellen haben. Dies konnte mit Hilfe des Resazurin-Umsatzes gezeigt werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Verglichen mit der Negativkontrolle (unbehandelte Zellen) zeigt sich ein leichter Rückgang der Viabilität in den mit DMSO 10 % behandelten Zellen (hier im Sinne einer Positivkontrolle mitgeführt), wohingegen die Ethanolkonzentrationen von 150 mM bis 900 mM dies nicht zeigen. Die Ethanolstimulation wurde über einen Zeitraum von 30 Minuten und über zwei Stunden durchgeführt, um Rückschlüsse auf eine eventuelle zeitliche Komponente ziehen zu können. Zu beiden Zeitpunkten ist keine Abnahme der Viabilität und somit auch keine Toxizität des Ethanols zu beobachten.

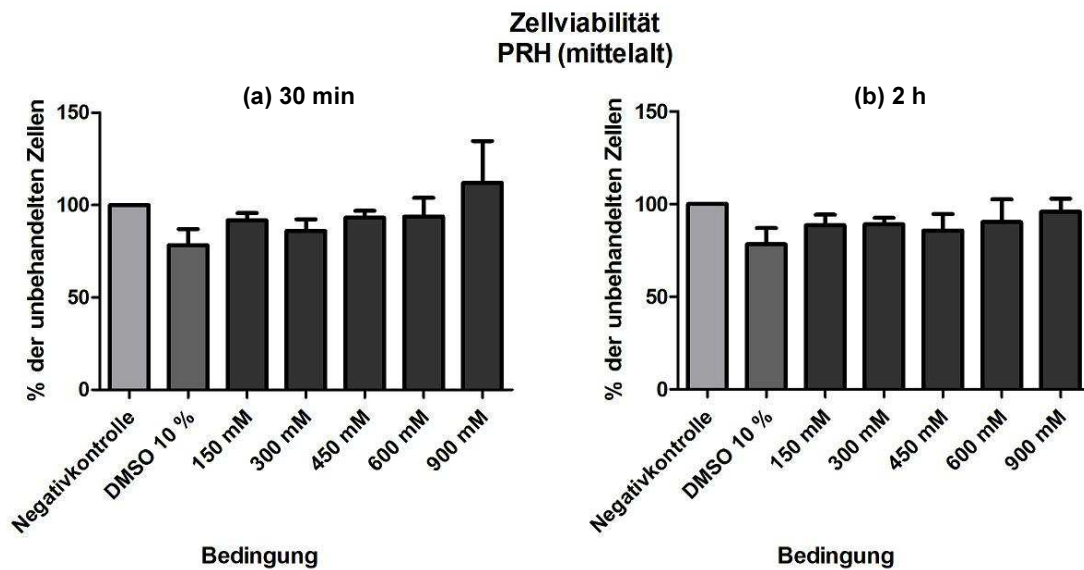


Abbildung 16: Zellviabilität nach Ethanolstimulation. Die Zellviabilität wurde nach 30-minütiger (a) und zweistündiger Ethanolstimulation (b) gemessen. DMSO 10 % wurde hier im Sinne einer Positivkontrolle mitgeführt. Es wurden jeweils die Ergebnisse aus fünf Messungen (N = 5) mit drei Replikaten pro Bedingung (n = 3) gemittelt.

Ziel der im Folgenden beschriebenen Versuche war, die Veränderungen der ROS- und GSH-Konzentrationen über einen Zeitraum von sechs Stunden und in verschiedenen Ethanol-Konzentrationen (150 mM, 300 mM, 450 mM) darzustellen.

3.4.2 Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf

Um zu zeigen, welchen Einfluss Ethanol-induzierter oxidativer Stress auf den GSH-Gehalt hat, wurde zuerst die ROS-Entwicklung im Zeitverlauf untersucht. Dargestellt ist diese in Abbildung 17. Hier zeigt sich in den drei verschiedenen Ethanolkonzentrationen das gleiche Bild. Wird der Hepatozyt nur für 15 Minuten, 30 Minuten oder einer Stunde mit Ethanol-induziertem Stress konfrontiert, ist ein gleichbleibender bis geringfügig rückläufiger ROS-Gehalt beobachtbar. Hält der oxidative Stress hingegen länger als eine Stunde an, so

sind erhöhte ROS-Werte messbar. Auffallend ist der sprunghafte Anstieg nach zweistündiger Ethanolstimulation von 150 mM.

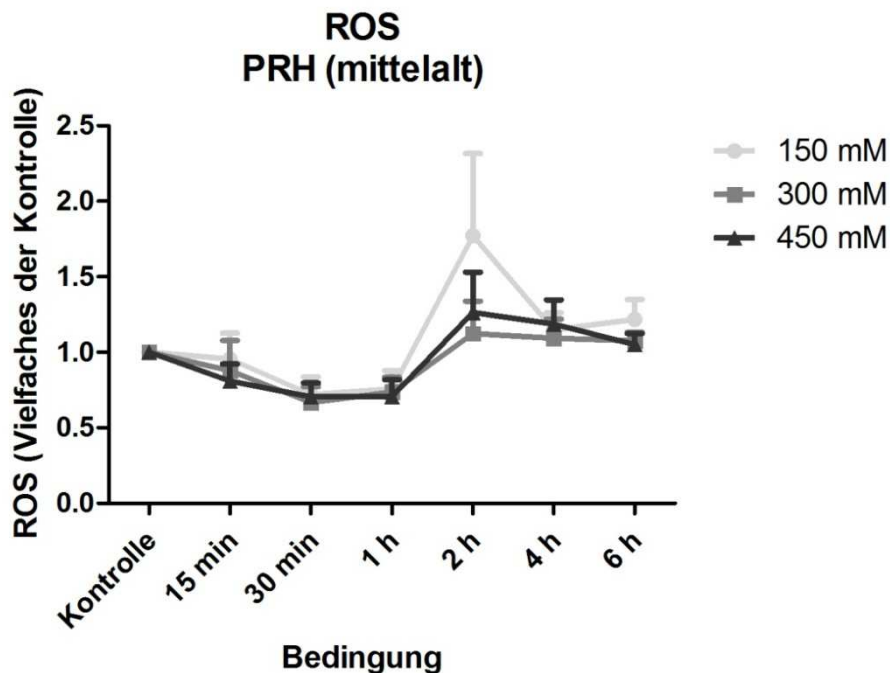


Abbildung 17: ROS-Gehalt im Zeitverlauf. Die Bestimmung des ROS-Gehalts wurde an Hepatozyten von fünf verschiedenen Ratten (N = 5) und vier Replikaten pro Bedingung (n = 4) durchgeführt.

3.4.3 Entwicklung des GSH-Gehalts im Zeitverlauf

GSH ist das wichtigste Antioxidans des Körpers und lässt daher eine indirekte Beurteilung über den in der Zelle vorherrschenden oxidativen Stress zu. Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Messungen des Gesamt-GSH-Gehalts der Hepatozyten. Betrachtet man diese Graphik, wird deutlich, dass sich in allen untersuchten Konzentrationen der gleiche Trend abzeichnet: Sichtbar ist ein GSH-Abfall während der kurzen Stimulationszeitpunkte (15 Minuten bis eine Stunde), der nach einstündiger Ethanolstimulation seinen Tiefpunkt findet. Bei längerer Ethanolinkubation auf den mittelalten Hepatozyt steigt hingegen der

GSH-Gehalt auf das Niveau der unbehandelten Hepatozyten an und gipfelt sogar in einer kompensatorischen GSH-Überproduktion.

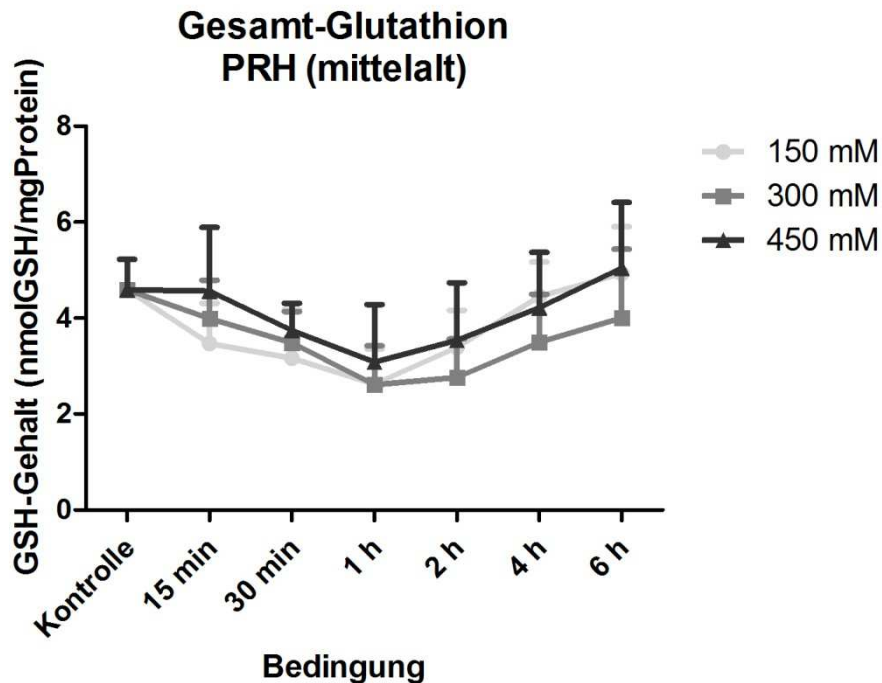


Abbildung 18: Gesamtglutathion im Zeitverlauf. Die Ergebnisse stellen eine Mittelung aus Versuchen mit vier verschiedenen Tieren (N = 4) und drei Replikaten pro Bedingung (n = 3) dar.

3.4.4 Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf nach NAC-Vorbehandlung

Ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit beleuchtet wird, ist die Untersuchung der Wirkung von exogen zugeführten Antioxidantien auf Ethanol-induzierten oxidativen Stress. Hierfür wurde eine Vorbehandlung mit einer nicht-toxischen NAC-Konzentration (0,5 mM für 30 Minuten) durchgeführt. Auch hier wurden Inkubationszeiten für Ethanol von 15 Minuten bis sechs Stunden und zwei verschiedene Konzentrationen (150 mM und 450 mM) gewählt. Bei beiden Ethanolkonzentrationen zeigt sich tendenziell ein Anstieg der ROS, vor allem nach 15 Minuten und nach 30 Minuten, der sich nach zwei und sechs Stunden wieder dem Niveau der Kontrolle annähert (Abbildung 19).

Antioxidantien sind Radikalfänger, wodurch ihnen eine wichtige Funktion bei der Entgiftung u.a. von ROS zukommt. In seiner Funktion als Antioxidans sollte nach einer NAC-Vorbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen ein verminderter ROS-Gehalt messbar sein. Stellt man diesen Vergleich wie in Abbildung 19 zu sehen ist an, lässt sich erkennen, dass der ROS-Gehalt der mit NAC vorbehandelten PRH anfangs über dem und in den längeren Stimulationszeiten gleichauf mit dem der unstimulierten Zellen liegt. Verglichen mit den nicht-vorbehandelten Hepatozyten zeigen sich die gemessenen ROS-Werte nach NAC-Vorbehandlung bei Ethanolstimulation mit 150 mM nach 15 Minuten und 30 Minuten signifikant erhöht.

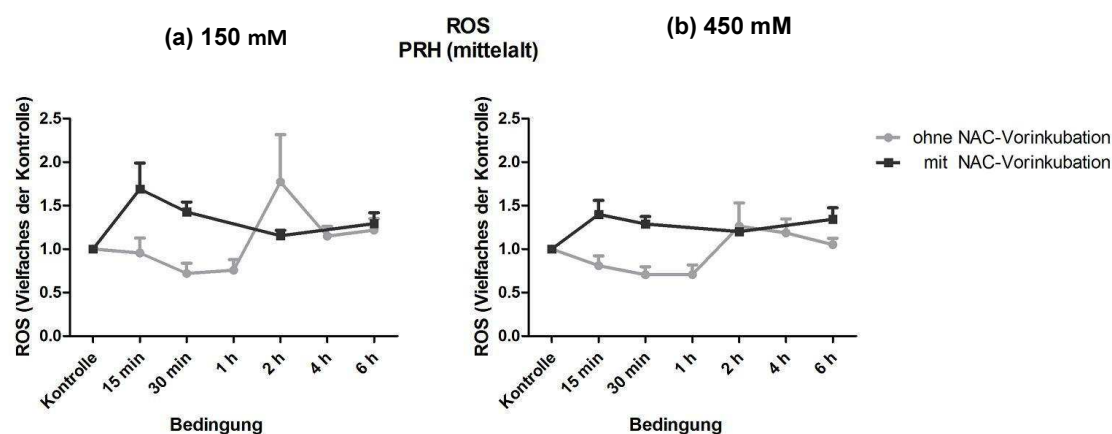


Abbildung 19: Entwicklung des ROS-Gehalts vor und nach NAC-Vorinkubation. NAC = N-Acetylcystein. Vor Stressinduktion mittels Ethanol ((a) 150 mM, (b) 450 mM) wurden Teile der Zellen für 30 Minuten mit 0,5 mM NAC vorinkubiert. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus Versuchen mit Hepatozyten von jeweils vier unterschiedlichen Ratten (N = 4) und vier Replikaten pro Bedingung (n = 4) dar.

3.4.5 Genexpression von Katalase, SOD-2, HO-1 und γ -GCL im Vergleich basal und induziert

Um zu verdeutlichen, was in der Zelle durch oxidativen Stress auf Genexpressionsebene geschieht, wurde in Abbildung 20 die Expression der

untersuchten Gene vor und nach Ethanolstimulation aufgetragen. Auffallend ist, dass sich das Expressionsniveau der γ -GCL nach Ethanolstimulation nur gering vermehrt darstellt. Die Katalase sowie die SOD-2 werden bei oxidativem Stress um das Vierfache vermehrt exprimiert, die HO-1 sogar um das Achtfache, was einer signifikanten Erhöhung entspricht. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Expression der vier untersuchten Gene nach Ethanolstimulation vermehrt stattfindet, dies aber in unterschiedlichem Maße geschieht.

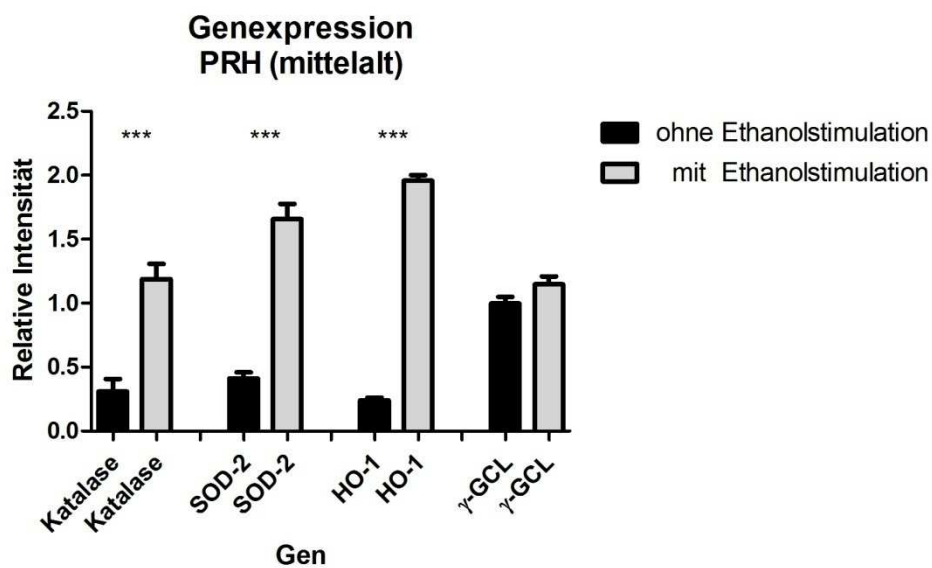


Abbildung 20: Genexpression antioxidativer Enzyme in Hepatozyten mittelalter Ratten vor und nach Ethanolstimulation. SOD-2 = Superoxiddismutase-2, HO-1 = Hämoygenase-1, γ -GCL = Glutamylcystein-Synthetase Vor Bestimmung den Genexpression wurden ein Teil der Hepatozyten für zwei Stunden mit 150 mM Ethanol stimuliert. Die Genexpression stellt sich im Vergleich vor und nach Ethanolstimulation für die Katalase ($P = < 0,001$), die SOD-2 ($P = < 0,001$) und für die HO-1 ($P = < 0,001$) signifikant dar (ungepaarter T-Test).

3.5 Auswirkung von Ethanol-induziertem Stress auf alte PRH

Um letztendlich Aussagen über altersabhängige Unterschiede treffen zu können, wurde das Versuchs-Setup, wie bei den mittelalten Rattenhepatozyten beschrieben auch bei den Hepatozyten der alten Ratten, beibehalten.

3.5.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität

Auch für die alten Rattenhepatozyten wurde zunächst die fehlende Toxizität der eingesetzten Ethanol-Konzentrationen mittels des Resazurin-Umsatzes nachgewiesen. Abbildung 21 zeigt dies. Man sieht den Viabilitätsabfall der Positivkontrolle (DMSO 10 %), nach Ethanolstimulation hingegen eine Zellviabilität, die der unbehandelten Negativkontrolle entspricht oder diese sogar übersteigt.

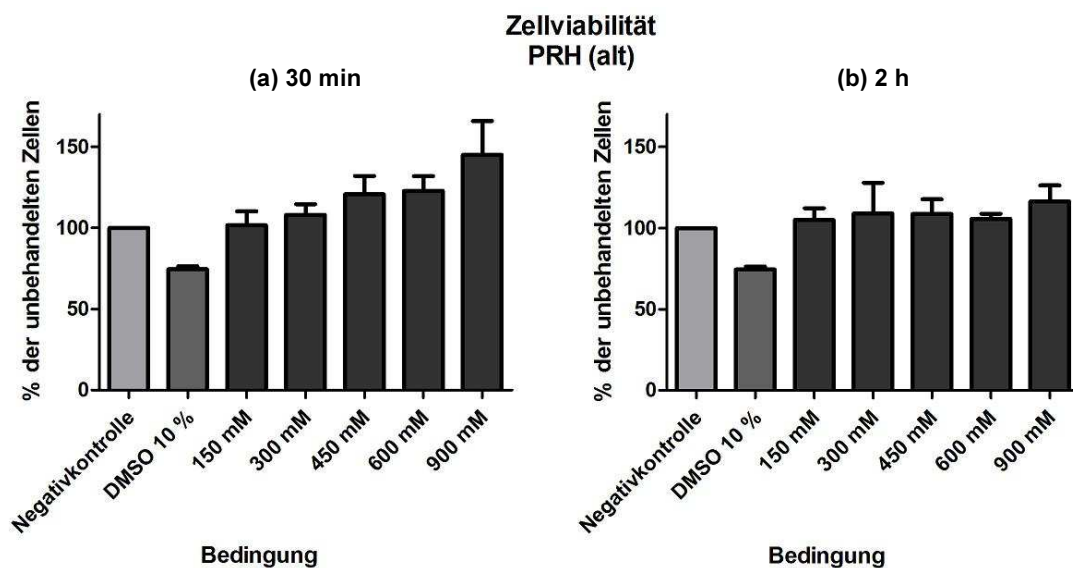


Abbildung 21: Zellviabilität nach Ethanolstimulation. Die Zellviabilität wurde nach 30-minütiger (a) und zweistündiger Ethanolstimulation (b) gemessen. DMSO 10 % wurde hier im Sinne einer Positivkontrolle mitgeführt. Es wurden jeweils die Ergebnisse aus drei Messungen (N = 3) und drei Replikaten pro Bedingung (n = 3) gemittelt.

3.5.2 Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf

Wie bei den mittelalten PRH wurde auch bei den alten Hepatozyten der ROS-Gehalt nach Ethanolstimulation gemessen. Die Resultate der ROS-Messungen

verdeutlicht Abbildung 22. Auch hier ist in allen drei eingesetzten Ethanol-Konzentrationen dieselbe Entwicklung des ROS-Gehalts der Zelle zu beobachten. Wird der Hepatozyt kurzfristig mit Ethanol stimuliert, so wird ein ROS-Anstieg sichtbar. Bleibt der oxidative Stress hingegen länger bestehen, scheinen die Entgiftungsmechanismen der Zelle zu greifen und es kommt zu einem Rückgang des ROS-Gehalts auf das Ausgangsniveau.

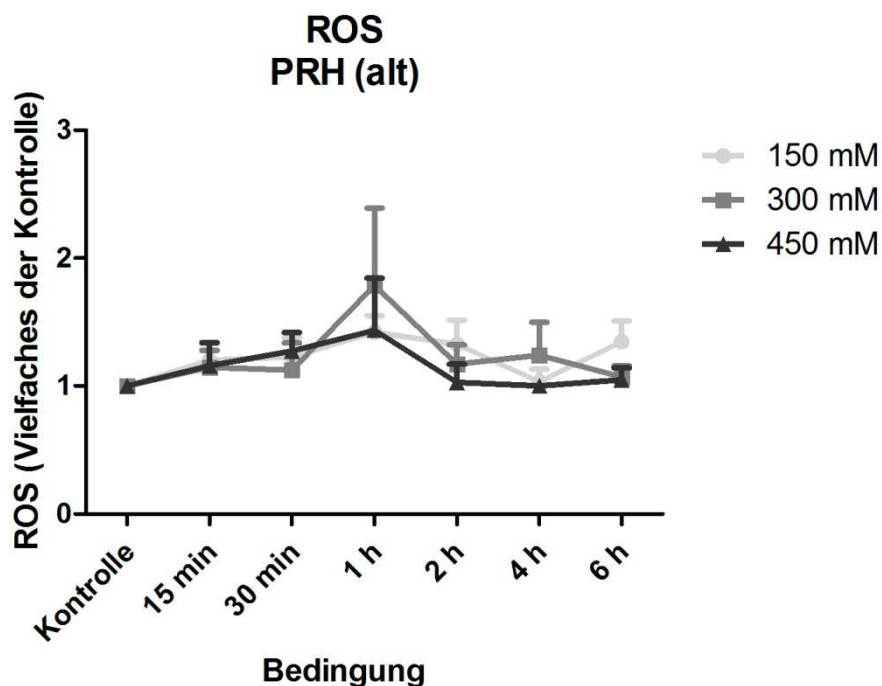


Abbildung 22: ROS-Gehalt im Zeitverlauf. Die Bestimmung des ROS-Gehalts wurde an Hepatozyten von fünf verschiedenen Tieren (N = 5) und vier Replikaten pro Bedingung (n = 4) durchgeführt.

3.5.3 Entwicklung des GSH-Gehalts im Zeitverlauf

Nachdem die alten Rattenhepatozyten für 15 Minuten, 30 Minuten, eine, zwei, vier sowie sechs Stunden mit Ethanol stimuliert wurden, wurde auch hier der Gesamt-GSH-Gehalt betrachtet (Abbildung 23). Sichtbar ist ein deutlicher GSH-Abfall, sobald die Zelle mit oxidativem Stress konfrontiert wird (15 Minuten, 30 Minuten, eine Stunde). Bleibt dieser Zustand über einen längeren Zeitraum (zwei, vier, sechs Stunden) erhalten, kann die Zelle ihre Produktion anpassen

und es kommt zu einem GSH-Anstieg mit Überproduktion. In allen drei verwendeten Konzentrationen (150 mM, 300 mM und 450 mM) ist dieser Trend erkennbar.

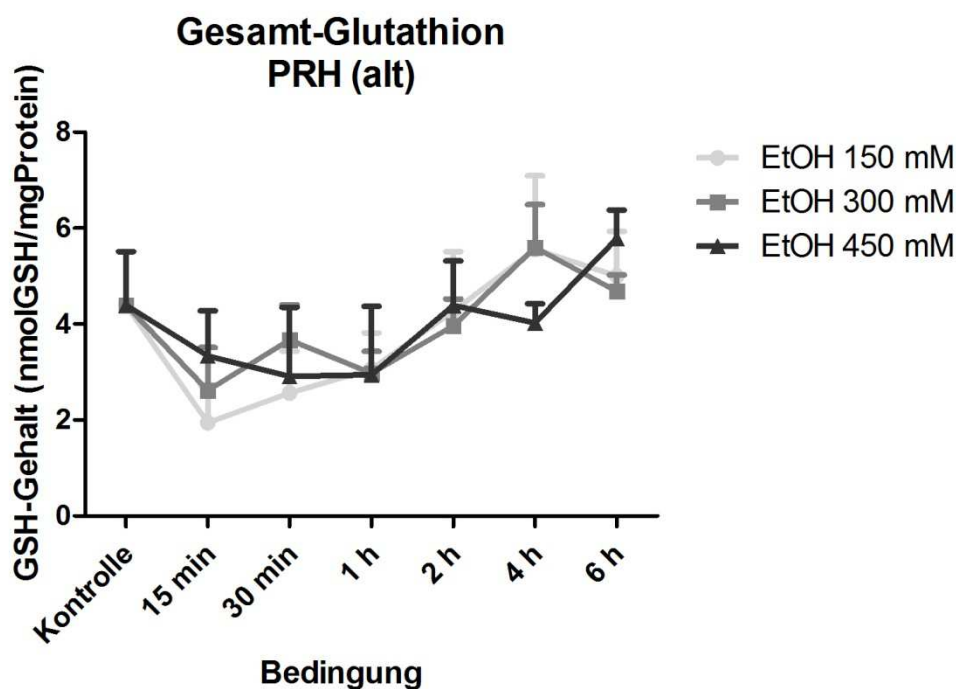


Abbildung 23: Gesamtglutathion im Zeitverlauf. Die gemessenen Glutathionwerte wurden auf den Proteingehalt bezogen. Die Mittelung der Ergebnisse ergab sich aus fünf (150 mM, 300 mM, N = 5) bzw. vier (450 mM, N = 4) verschiedenen Versuchen mit drei Replikaten pro Bedingung (n = 3).

3.5.4 Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf nach NAC-Vorbehandlung

Nun wurden auch die alten Rattenhepatozyten mit dem Antioxidans NAC vorinkubiert. Abbildung 24 stellt den zeitlichen Verlauf des ROS-Gehalts in Rattenhepatozyten über einen Zeitraum von sechs Stunden dar. Nach Vorbehandlung und Ethanolstimulation befindet sich der messbare ROS-Gehalt der Hepatozyten auf einem gleichbleibenden Niveau, das dem der nur mit NAC vorbehandelten, unstimulierten Kontrolle entspricht. Dies zeigt sich sowohl bei

einer Ethanolstimulation von 150 mM als auch bei 450 mM und in den vier Mal durchgeführten Versuchen zeigt sich keine große Varianz. Für die Ergebnisse aus Abbildung 24 wurden vier Versuchsergebnisse gemittelt. Vergleicht man den ROS-Gehalt der Zelle nach Ethanolstimulation ohne und mit durchgeführter Vorbehandlung mit NAC (Abbildung 24), so ist durchweg dasselbe Bild zu beobachten: Nach vorausgegangener Antioxidansbehandlung ist in allen Konzentrationen und im Zeitverlauf ein verminderter ROS-Gehalt messbar.

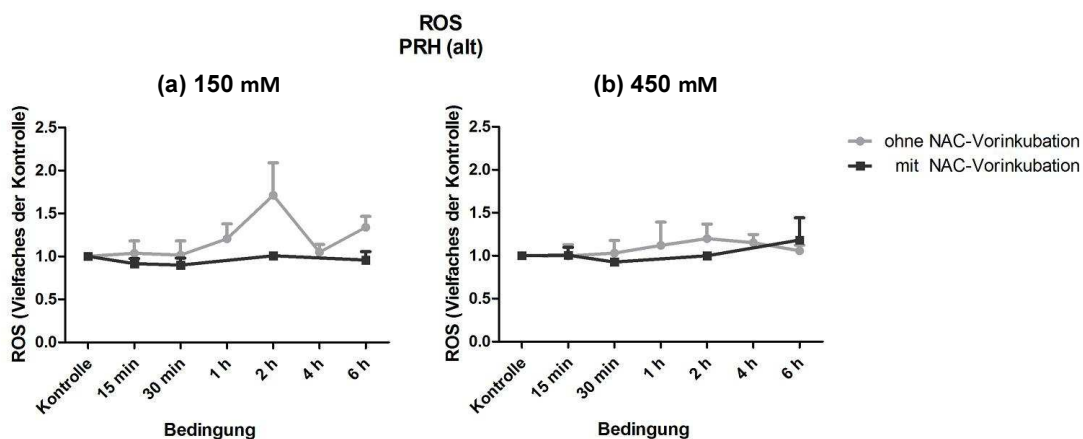


Abbildung 24: Entwicklung des ROS-Gehalts vor und nach NAC-Vorinkubation. NAC = N-Acetylcystein. Vor Stressinduktion mittels Ethanol ((a) 150 mM, (b) 450 mM) wurden Teile der Zellen für 30 Minuten mit 0,5 mM NAC vorinkubiert. Die Ergebnisse stellen den Mittelwert aus Versuchen mit Zellen von jeweils vier unterschiedlichen Ratten (N = 4) und vier Replikaten pro Bedingung (n = 4) dar.

3.5.5 Genexpression von Katalase, SOD-2, HO-1 und γ -GCL im Vergleich basal und induziert

Um die Auswirkungen des durch Ethanol verursachten Stresses genauer beurteilen zu können, stellt Abbildung 25 den direkten Vergleich der untersuchten Gene vor und nach Ethanolstimulation dar. Während die γ -GCL nach Ethanoleinfluss nur in sehr geringem Maße vermehrt exprimiert wird, bewirkt Ethanol einen Anstieg um das Fünffache der SOD-2, um das Sechsfache der Katalase und sogar um das Neunfache der Expression der HO-1. Dies bedeutet für alle Gene eine signifikante Erhöhung der Expression.

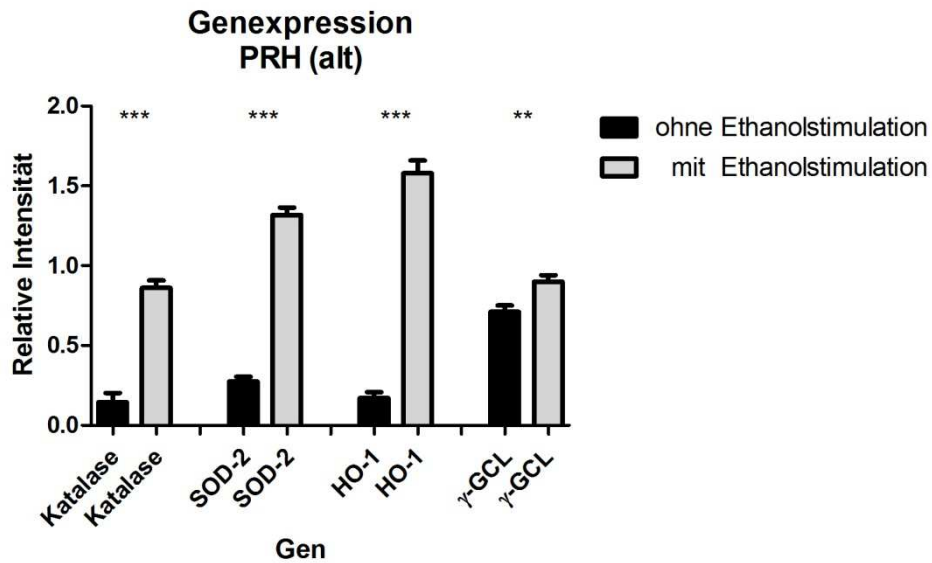


Abbildung 25: Genexpression antioxidativer Enzyme in Hepatozyten alter Ratten vor und nach Ethanolstimulation. SOD-2 = Superoxiddismutase-2, HO-1 = Hämoxygenase, γ-GCL = γ-Glutamylcystein-Synthetase. Teile der Hepatozyten wurden vor Bestimmung des Genexpression für zwei Stunden mit 150 mM Ethanol stimuliert. Die Altersunterschiede stellen sich im Vergleich vor und nach Ethanolstimulation für alle vier Gene signifikant dar (Katalase, SOD-2 und HO-1: $P = < 0,001$, γ-GCL: $P = 0,0045$ ungepaarter T-Test). Untersucht wurden drei Proben ohne ($N = 3$) bzw. zwei mit Ethanol ($N = 2$). Es wurden jeweils zwei unabhängige PCRs durchgeführt.

3.6 Vergleich der Auswirkungen von Ethanol-induziertem Stress von mittelalten und alten PRH

Nachdem die benötigten Messdaten erhoben wurden, konnten sie im Altersvergleich betrachtet und altersabhängige Unterschiede oder Gemeinsamkeiten herausgearbeitet werden.

3.6.1 Toxizität von Ethanol und Zellviabilität

Die Zellviabilität nahm durch die Ethanolstimulation in beiden Altersgruppen nicht ab und auch die Toxizität von Ethanol in den Konzentrationen von 150 mM bis 900 mM weist in den zu vergleichenden Altersgruppen keine Unterschiede auf. Ethanol kann daher in beiden Altersgruppen hinsichtlich der gewählten Inkubationszeiten als nicht toxisch angesehen werden.

3.6.2 Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf

Unterschiede zwischen mittelalten und alten Rattenhepatozyten werden augenscheinlich, wenn man, wie in Abbildung 26 geschehen, die ROS-Verläufe nebeneinander darstellt. Bei den mittelalten Zellen ist zu verfolgen, wie bis eine Stunde nach Ethanol-Stimulation ein ROS-Anstieg mit anschließendem Rückgang auf das Niveau der unbehandelten Zellen stattfindet. Unterschiedlich zeigt sich dies bei den alten Zellen. Hier findet schon nach kurzem oxidativem Stress ein ROS-Anstieg statt, der sich nach vier bis sechs Stunden wieder dem Ausgangsniveau angleicht. Unterschiede sind vor allem in den kurzen Stimulationszeiten signifikant (bei 300 mM nach einer Stunde, 450 mM nach 30 Minuten und einer Stunde).

3.6.3 Entwicklung des GSH-Gehalts im Zeitverlauf

Unterschiede finden sich hingegen in Abbildung 26. Hier wird der Vergleich mittelalter gegenüber alter Hepatozyten in Bezug auf den GSH-Gehalt gezeigt. Deutlich werden hier zwei unterschiedliche Reaktionsverläufe der zwei Altersgruppen. Bei den mittelalten Rattenhepatozyten ist als Antwort auf die Ethanolstimulation ein langsamer GSH-Abfall und auch eine langsame Erholung des GSH-Gehalts zu beobachten. Bei den Hepatozyten der alten

Ratten hingegen folgt auf einen starken Abfall des GSH-Gehalts bei kurzfristigem Stress eine schnelle Regeneration. In beiden Altersklassen ist eine GSH-Überproduktion zu beobachten, die aber bei den alten Zellen tendenziell deutlicher ausfällt.

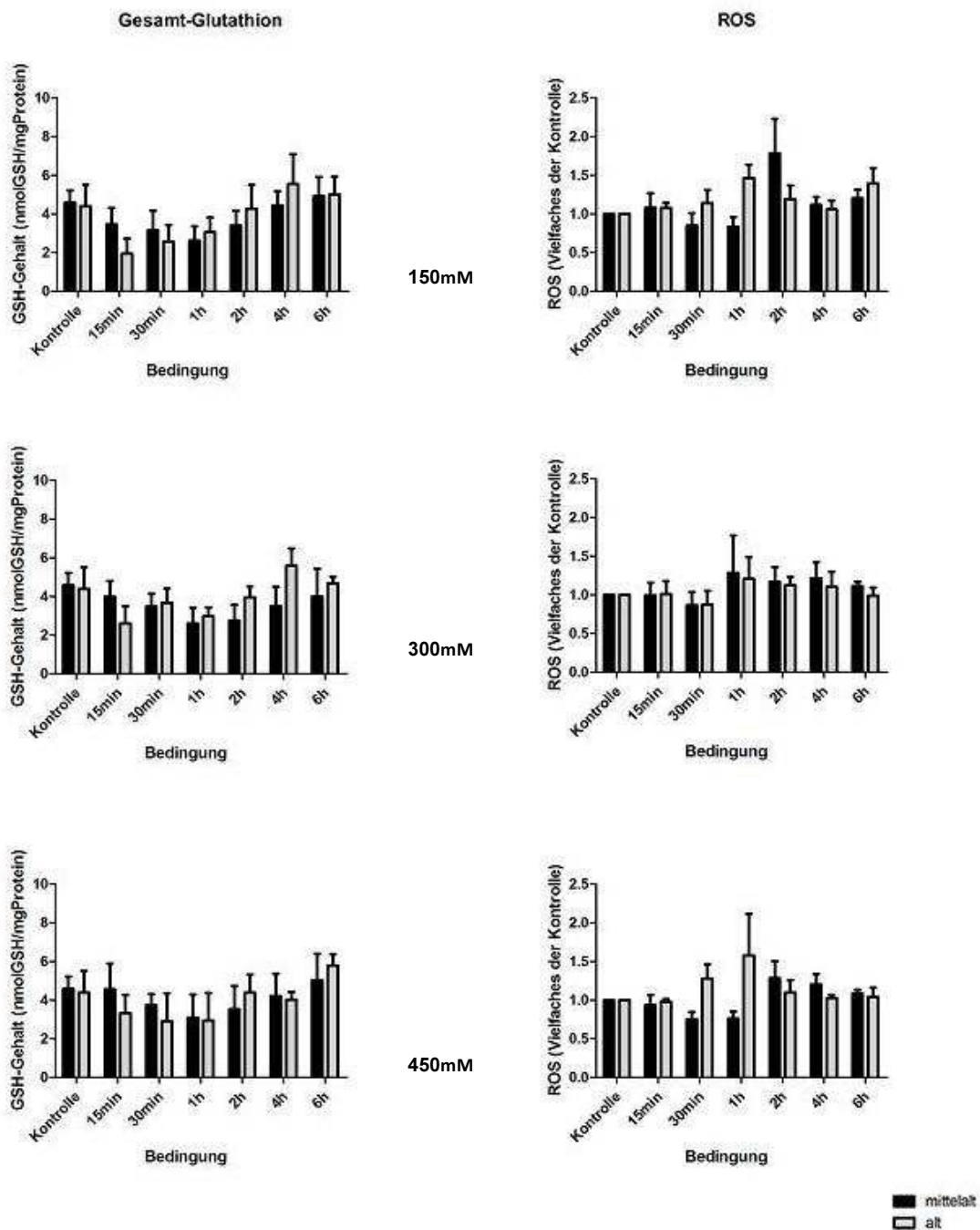


Abbildung 26: GSH-Gehalt im Zeitverlauf (links) (N (mittelalt) = 4, N (alt) = 5, n = 3), ROS-Gehalt im Zeitverlauf (rechts) (N = 5, n = 4).

3.6.4 Vergleich der Entwicklung des ROS-Gehalts im Zeitverlauf vor und nach NAC-Vorbehandlung

Abbildung 27 zeigt den Vergleich des ROS-Gehalts nach NAC-Vorbehandlung von mittelalten und alten Rattenhepatozyten. Während in den Versuchen mit mittelalten Rattenhepatozyten der ROS-Gehalt in den Zellen trotz NAC-Vorbehandlung verglichen mit der Kontrolle erhöht zu messen war, zeigte sich in den alten Rattenhepatozyten ein ROS-Abfall nach Vorbehandlung mit dem eingesetzten Antioxidans.

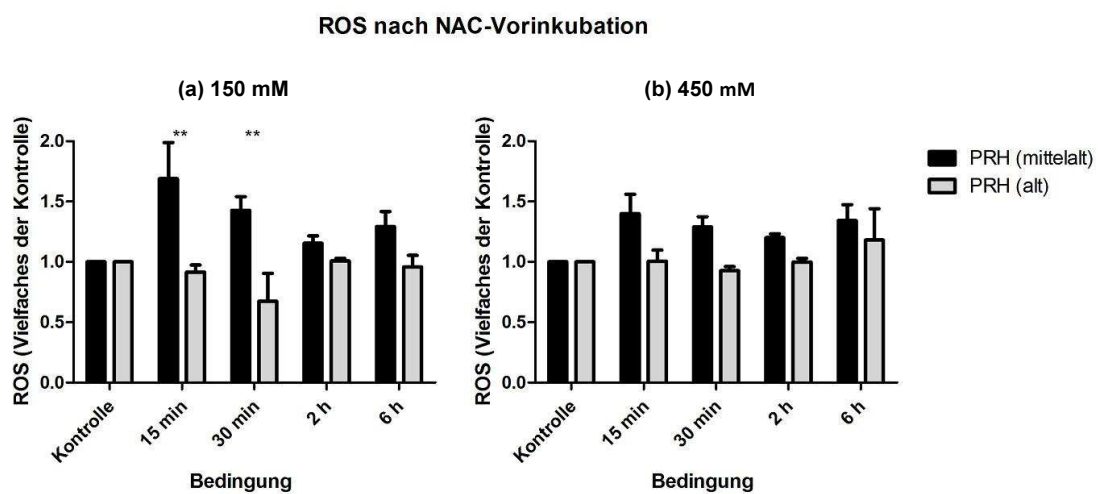


Abbildung 27: Auswirkung einer NAC-Vorinkubation auf den ROS-Gehalt primärer Rattenhepatozyten im Altersvergleich. NAC = N-Acetylcystein. Vor Stressinduktion mittels Ethanol wurden die Zellen für 30 Minuten mit 0,5 mM NAC vorinkubiert. (N = 4, n = 4).

3.6.5 Genexpression von Katalase, SOD-2, HO-1 und γ -GCL nach Induktion

Betrachtet man die Genexpression der Katalase, der SOD-2, der γ -GCL und der HO-1 nach zweistündiger Ethanolstimulation zeigen sich für alle vier Gene signifikante Unterschiede. Die Genexpression stellt sich bei den Hepatozyten der mittelalten Ratten im Altersvergleich signifikant erhöht dar (Abbildung 28).

Genexpression nach Ethanol-Stimulation

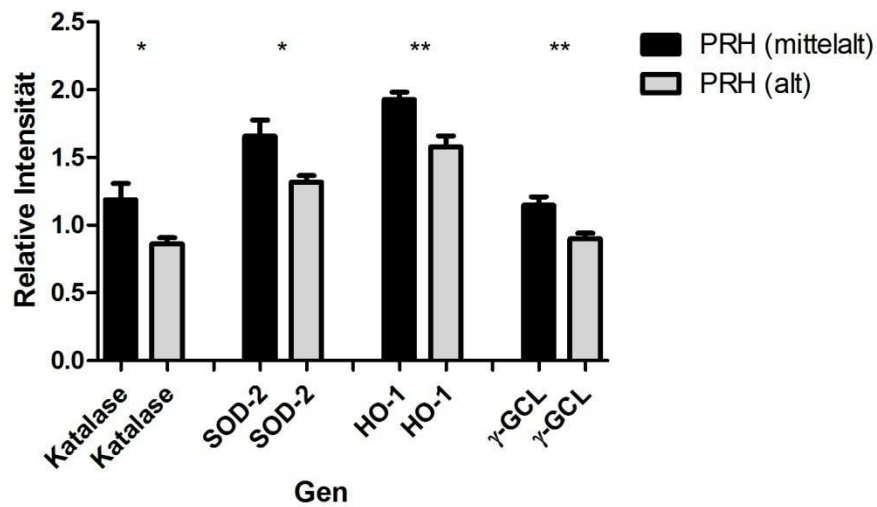


Abbildung 28: Genexpression antioxidativer Enzyme nach Induktion im Altersvergleich.

SOD-2 = Superoxiddismutase-2, HO-1 = Hämoygenase-1, γ-GCL = γ-Glutamylcystein-Synthetase. Die Hepatozyten wurden vor Bestimmung der Genexpression für zwei Stunden mit 150 mM Ethanol stimuliert. Die Altersunterschiede stellen sich für alle vier Gene signifikant dar (Katalase $P = 0,0165$, SOD-2 $P = 0,0143$, HO-1 $P = 0,0033$, γ-GCL $P = 0,0030$, ungepaarter T-Test). Untersucht wurden zwei verschiedene Proben ($N = 2$) in jeweils zwei unabhängigen PCRs.

4. Diskussion

Unsere überalternde Gesellschaft stellt uns bereits und wird uns in Zukunft vor neue Herausforderungen stellen. Daher rückt das Altern und die damit verbundenen Veränderungen in den Mittelpunkt des Interesses. Vom Alterungsprozess des menschlichen Körpers sind natürlich auch die inneren Organe betroffen - so auch die Leber. Ob und inwiefern mit der Alterung der Leber auch Veränderungen in ihrem antioxidativen System einhergehen und welche Auswirkungen das auf die Reaktion auf oxidativen Stress hat, ist noch nicht hinreichend erforscht. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten sollen einen ersten Einblick in die altersabhängige Antwort auf oxidativen Stress in PRH liefern und werden nachfolgend diskutiert.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildete die Hypothese, alte Rattenhepatozyten seien im Vergleich zu mittelalten anfälliger gegenüber oxidativem Stress. Um diese These zu untersuchen, wurden PRH von mittelalten und alten Ratten kultiviert und zur Induktion von oxidativem Stress über einen Zeitraum von sechs Stunden mit Ethanol stimuliert. Altersunterschiede wurden im Hinblick auf den ROS-Gehalt und das wichtigste endogene Antioxidans der Zelle GSH untersucht. Die ROS-Induktion wurde mittels DCFH-DA-Assay über einen Zeitverlauf von sechs Stunden nachgewiesen und der zelluläre GSH-Gehalt der Zelle ebenfalls im Zeitverlauf dargestellt [65]. Des Weiteren sollte das als antioxidativ geltende NAC der Zelle exogen zugeführt werden und der Einfluss auf die Entwicklung der ROS im Zeitverlauf und Altersvergleich dargestellt werden. Auch die Genexpression ausgewählter antioxidativer und GSH-assoziiierter Enzyme wie der Katalase, der SOD-2, der HO-1 und der γ -GCL wurde vor und nach Induktion von oxidativem Stress unter diesem Gesichtspunkt untersucht.

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Grundcharakteristik der PRH erstellt um die durch oxidativen Stress hervorgerufenen Veränderungen erfassen zu können. Bestimmt wurden der ROS-, Protein- und GSH-Gehalt der kultivierten, unbehandelten Zellen. Ziel war es, Aussagen über das in der Zelle vorliegende Stressniveau im Altersvergleich treffen zu können.

Der Proteingehalt der mittelalten liegt signifikant über dem der alten Hepatozyten. Solch eine Abnahme des Proteingehalts, z.B. durch einen verminderten metabolischen Umsatz des Hepatozyten, ist auch in anderen Studien belegt [66, 67]. Unterstützt wird diese Annahme außerdem durch die Ergebnisse der Genexpression. Alle quantifizierten Gene sind in den mittelalten PRH im Verhältnis zum Housekeeping Gen vermehrt exprimiert. Zur Annahme einer metabolisch-aktiveren Zelle passt auch der in mittelalten Rattenhepatozyten erhöhte ROS-Gehalt. Dieser könnte durch eine erhöhte Zellatmung und somit erhöhte metabolische Aktivität im Vergleich zu den alten Hepatozyten zu Stande kommen. Frühere Versuche unseres Labors, die die Genexpression der Glutathionperoxidase (Entgiftung von ROS unter Verbrauch von zwei GSH-Molekülen und Bildung von GSSG) im Altersvergleich untersucht haben, zeigen eine in mittelalten PRH tendenziell erhöhte Glutathionperoxidase-Expression [68], was durch einen erhöhten Bedarf an entgiftenden Reaktionen als Folge gesteigerter ROS-Produktion bedingt sein könnte. Passend hierzu zeigt sich der ROS-Gehalt in mittelalten PRH tatsächlich erhöht. Folge dieses erhöhten Stresses ist ein erhöhter Bedarf an antioxidativen Substanzen wie z.B. GSH. Dies lässt sich mit der in mittelalten Rattenhepatozyten erhöht exprimierten γ -GCL in Einklang bringen, die den ersten Schritt der GSH-Synthese katalysiert und eine tragende Rolle in der Aufrechterhaltung der GSH-Homöostase spielt. Diese erhöhte Genexpression war ebenfalls in anderen Studien nachweisbar [69].

Nach der Hypothese, dass die alternde Zelle oxidativen Stress schlechter kompensieren kann, stellen sich diese Ergebnisse anders als erwartet dar, wäre doch dann ein in alten Rattenhepatozyten gesteigert messbarer ROS-Gehalt zu erwarten gewesen [70-72]. Dies wird durch andere Studien ebenfalls belegt [73-75]. Eine Erklärung könnte man darin sehen, dass chronisch bestehender Stress zu einer Hochregulation des oxidativen Systems in der Zelle führt, was in dem hier messbaren verminderten Gehalt an ROS sichtbar wird. Auch die später diskutierten Auswirkungen einer NAC-Vorbehandlung unterstützen diese These.

Widersprüchlich stellt sich die Studienlage bezüglich der Entwicklung des GSHs im Alter dar. Einerseits ist am Menschen aber auch an Mäusen eine Abnahme des GSH-Gehalts gezeigt worden, was sich durch ein erhöhtes Niveau an oxidativem Stress erklären ließe [76, 77]. Andererseits haben Versuche an Ratten und Mäusen die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt [78, 79]. Auch diese zeigen keine Unterschiede des basalen GSH-Gehalts im Altersvergleich. Es gilt aber zu beachten, dass in der vorliegenden Arbeit nur der Gesamt-GSH-Gehalt gemessen und nicht die GSH/GSSG-Ratio bestimmt wurde. Wirkt nämlich oxidativer Stress auf die Rattenhepatozyten ein, wird GSH zu GSSG oxidiert. Wie frühere Versuche aus unserem Labor gezeigt haben, ist die Glutathionreduktase in alten Rattenhepatozyten im Vergleich zu mittelalten vermindert exprimiert [68]. Dies bedeutet, dass anfallendes GSSG verzögert zu GSH recycelt werden kann und die Konzentration an reduziertem GSH sinkt. Dieser prooxidative Shift mit erhöhten GSSG-Konzentrationen wurde auch in Studien mit Mäusen bestätigt [79]. Da in den vorliegenden Versuchen bisher nur das Gesamt-GSH gemessen wurde, müsste diese Theorie durch die Messung der GSSG-Konzentrationen in mittelalten und alten Rattenhepatozyten bestätigt werden.

Zusammenfassend zeichnet sich im Vergleich der beiden Altersgruppen ein metabolisch aktiverer mittelalter Rattenhepatozyt ab.

In einem weiteren Schritt wurden die Unterschiede zwischen Hepatozyten mittelalter und alter Ratten in Bezug auf Ethanol-induzierten oxidativen Stress untersucht. Hierfür wurden nach Zugabe von Ethanol erneut der ROS- und GSH-Gehalt bestimmt. Des Weiteren wurde eine Vorinkubation mit NAC durchgeführt um den Einfluss dieser als antioxidativ geltenden Substanz zu untersuchen.

Um Aussagen über die Toxizität von Ethanol treffen zu können, wurde die Viabilität der PRH gemessen. Festzustellen ist, dass Ethanol in den Konzentrationen zwischen 150 mM und 900 mM bei kurzen Inkubationszeiten keinen toxischen Effekt besitzt, was die Aussage zulässt, dass die Hepatozyten suffiziente Mechanismen zur Entgiftung und zum Schutz vor oxidativem Stress besitzen. Diese scheinen in beiden Altersgruppen ähnlich gut zu greifen, da

sowohl bei den mittelalten als auch bei den alten PRH kein Viabilitätsabfall zu beobachten ist.

Mittels des DCFH-DA-Assays wurde der in den PRH vorliegende oxidative Stress evaluiert. Hierbei zeigten sich die Zeitverläufe des ROS-Gehalts im Altersvergleich wie folgt: Wirkt kurzfristig oxidativer Stress auf die Hepatozyten einer mittelalten Ratte ein, kommt es initial tendenziell zu einem Abfall der ROS gefolgt von einem Anstieg nach circa zwei Stunden bis hin zur Normalisierung auf das Ausgangsniveau der nicht exogen gestressten Zelle. Wie auch die nur in geringem Maße stattfindende GSH-Reduktion nahelegt, zeigt der Verlauf der ROS, dass der mittelalte Hepatozyt den entstehenden Stress gut kompensieren und die entstandenen ROS suffizient entgiften kann. Gestützt wird diese These durch die im Verlauf stattfindende GSH- und ROS-Normalisierung. Induziert man in Hepatozyten alter Ratten oxidativen Stress, stellt sich der ROS-Verlauf grundlegend anders dar. Zu Beginn der Ethanolstimulation ist ein ROS-Anstieg zu verzeichnen, der nach zweistündiger Stimulation sein Maximum findet. Nachfolgend ist eine Normalisierung auf das Ausgangsniveau zu beobachten. Auch hier zeigt die GSH-Entwicklung den passenden Verlauf. Der deutliche GSH-Abfall zeigt eine höhere Empfindlichkeit der alten Ratten gegenüber Ethanol-induziertem Stress, was sich auch im ansteigenden ROS-Gehalt widerspiegelt. Diese erhöhte Anfälligkeit der gealterten Zellen ist auch in anderen Studien gezeigt worden [80-83]. Eine weitere Erklärung für den im Alter extremer ausfallenden GSH-Verlauf bieten die kinetischen Veränderungen, die die γ -GCL im alternden Organismus zeigt. Während V_{max} unverändert bleibt, ist die K_m erhöht [79]. Auch dies führt zu einer niedrigeren Produktionsgeschwindigkeit von GSH. Im Altersvergleich zeigen sich zwischen den Hepatozyten der mittelalten und alten Ratte also zwei unterschiedliche Verläufe: Während die mittelalten PRH die induzierten ROS entgiften können, was sich in einem ROS-Abfall widerspiegelt, sind die alten PRH anfälliger und es findet als Antwort auf das Ethanol ein ROS-Anstieg statt. Dies passt zu der bereits oben diskutierten Vermutung, dass der alte Hepatozyt empfindlicher und langsamer auf oxidativen Stress reagiert.

Neben den körpereigenen Antioxidantien existieren auch exogene Antioxidantien so zum Beispiel NAC. Dieses entfaltet seine antioxidative Wirkung über zwei Mechanismen: Zum einen kann NAC über seine reaktive SH-Gruppe direkt ROS entgiften, zum anderen stellt es durch Bereitstellung von Cystein eine Prodrug für das GSH-System dar und induziert die de-novo-Synthese von GSH. Im klinisch medizinischen Alltag wird NAC bereits seit über 35 Jahren bei Paracetamolintoxikation angewendet [84]. Seitdem haben sich dessen mögliche Anwendungsgebiete ausgeweitet. Diese reichen nun vom Einsatz bei Erkältung, über psychiatrische Erkrankungen wie Abhängigkeiten, Zwangsstörungen, Schizophrenie oder bipolare Störungen [37] bis hin zum Einsatz bei Lebertransplantationen. Hier scheint NAC die Mikrozirkulation im Organ zu verbessern, durch eine erhöhte oxidative Kapazität der Lebernekrose entgegenzuwirken und die Lipidperoxidation zu verringern [85]. Um die Auswirkung dieses Antioxidans untersuchen zu können, wurden die Rattenhepatozyten vor Ethanolinkubation für 30 Minuten mit 0,5 mM NAC vorbehandelt. Die gleiche Vorinkubationszeit wurde schon in Versuchen mit Leukämiezellen oder Alveolarepithel gewählt und zeigte den erwarteten antioxidativen Effekt [86, 87]. Die NAC-Konzentrationen in diesen Versuchen reichen von ein mM bis fünf mM.

In den Hepatozyten alter Ratten zeigt sich das Bild wie erwartet. In der Kontrolle und in den mit NAC vorbehandelten Zellen lässt sich ein äquivalenter ROS-Gehalt nachweisen. In den mit Ethanol behandelten PRH zeigt sich in den mit NAC vorinkubierten Zellen ein erniedrigter ROS-Gehalt verglichen mit den Zellen, die nicht mit NAC vorbehandelt wurden. Interessant zu sehen war, dass durch die NAC-Vorbehandlung der alten PRH ein identischer Kurvenverlauf wie bei den mittelalten NAC-unbehandelten Rattenhepatozyten erreicht werden kann. Eine NAC-Supplementation könnte also die altersabhängig vermehrte Entstehung von ROS abpuffern und eventuell rückgängig machen. Ein unerwartetes Ergebnis zeigt sich bei den mittelalten Zellen. Im Vergleich zur nur mit NAC vorbehandelten Kontrolle findet sich nach Ethanolstimulation der antioxidativ vorbehandelten Zellen ein Anstieg des ROS-Gehalts. Vergleicht man die nicht mit NAC vorbehandelte Zellen nach Ethanolstimulation mit den

NAC-vorbehandelten Zellen nach Ethanolstimulation, lässt sich trotz der zugegebenen als antioxidativ geltenden Substanz ein erhöhter ROS-Gehalt nach NAC-Vorbehandlung nachweisen. Dieses Ergebnis scheint unerwartet, ist doch die antioxidative Wirkung von NAC in anderen Studien belegt [36, 38, 88]. In den meisten Studien ist diese Wirkung aber nicht für eine Vorinkubation gezeigt, sondern tritt ein, wenn bereits eine Exposition mit einem oxidativ-wirkenden Agens stattgefunden hat oder zeitgleich stattfindet. Studien mit einer Vorinkubation belegen, dass die antioxidative Wirkung ausbleibt, solange kein erhöhter GSH-Bedarf besteht [89]. Diese Tatsache stützt die These, dass in den Zellen der alten Ratte ein erhöhter oxidativer Stress herrscht und somit ein erhöhter GSH-Bedarf besteht.

Zusammenfassend zeigen diese Versuche eine antioxidative Wirkung einer NAC-Vorinkubation auf alte PRH, die aber in den mittelalten PRH nicht nachzuweisen war. Für eine mögliche Anwendung bedeuten diese Ergebnisse, dass eine Supplementation von NAC im alten Organismus einen großen Vorteil verspricht, bei einem mittelalten hingegen nur unter erhöhtem GSH-Bedarf zum Einsatz kommen sollte. Dies stellt sich passend zu der Datenlage in anderen Studien dar, in denen sich eine nahrungsbedingt erhöhte Zufuhr an Antioxidantien im alternden Organismus bewährt hat [90, 91].

Um die Zelle vor oxidativem Stress zu schützen spielen Antioxidantien, vor allem das GSH, eine wichtige Rolle. Daher wurde die Entwicklung des GSH-Gehalts im Zeitverlauf untersucht. Die Hypothese war, dass in alten Rattenhepatozyten ein erhöhter oxidativer Stress nachweisbar ist, da die Entgiftungsmechanismen der Zelle schlechter greifen. Dies wäre durch einen im Vergleich zu mittelalten PRH erniedrigten GSH-Gehalt, einen deutlicheren GSH-Abfall unter extern einwirkendem Stress und eine langsamere GSH-Regeneration zu belegen. Die Zellen wurden mit drei unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen nämlich 150 mM, 300 mM und 450 mM stimuliert. Ein konzentrationsabhängiger Effekt konnte nicht gezeigt werden. Auch in anderen Studien, in denen lebende Ratten verwendet wurden, konnte keine direkte Korrelation zwischen steigender Ethanolkonzentration und Veränderung von GSH dargestellt werden. Wie auch in den vorliegenden Ergebnissen war eine

GSH-Abfall zu beobachten, der aber nicht konzentrationsabhängig ausgeprägt war [92]. Im Zeitverlauf stellt sich der GSH-Gehalt wie folgt dar: In den mittelalten PRH findet sich ein langsamer GSH-Abfall zwischen 15 Minuten und einer Stunde, gefolgt von einer langsamen Annäherung an die GSH-Basalwerte mit einer gering ausgeprägten Überproduktion. Bei den Hepatozyten der alten Ratten findet sich derselbe Trend nur in extremerer Ausprägung: Der anfängliche GSH-Abfall ist deutlicher. Somit löst dieselbe Ethanolstimulation vermehrten oxidativen Stress im Hepatozyt der alten Ratte aus. Gleiche Ergebnisse wurden an lebenden Ratten erzielt, denen Ethanol über die Jugularvenen injiziert wurde [78]. Auch hier wurde geschlussfolgert, dass die Leber des alternden Organismus anfälliger für oxidativen Stress ist. Ersichtlich ist aber auch, dass eine GSH-Normalisierung in den Hepatozyten der alten Ratten schneller stattfindet und die GSH-Überproduktion tendenziell verstärkt ausgeprägt ist. In beiden Altersgruppen wird sichtbar, dass anfänglich der GSH-Bedarf die GSH-Produktion der Zelle übersteigt, was zu einem GSH-Verbrauch und -Abfall führt. Ein GSH-Abfall nach Einwirkung von oxidativem Stress auf die Zelle ist mehrfach in der Literatur beschrieben [28, 93, 94]. Hier gilt es aber zu beachten, dass meist das reduzierte GSH gemessen wurde, wohingegen bei der hier vorliegenden Arbeit nur das Gesamt-GSH gemessen wurde. Gründe für einen anfänglichen Abfall des Gesamt-GSH-Gehalts können in der direkten Reaktion von Glutathion mit Acetaldehyd (dem reaktiven Intermediat der Ethanol-Oxidation) liegen [66]. Eine weitere Erklärung findet sich in der Tatsache, dass in-vivo permanent GSH aus der Zelle ins Plasma abgegeben wird. Jeffrey L. Pierson und Mack C. Mitchell konnten zeigen, dass dieser Efflux durch Ethanolstimulation gesteigert wird [95]. Nach zweistündiger Einwirkung von oxidativem Stress schafft es die Zelle ausreichende Mengen an GSH zu produzieren, um sowohl den Verbrauch zu decken, als auch eine Regeneration des GSH-Gehalts zu erreichen. In Studien wurde gezeigt, dass die Ethanolkonzentration nach 30 bis 90 Minuten ihre Maximalkonzentration in der Zelle erreicht [96, 97]. Dies zeigt sich in den vorliegenden Ergebnissen durch einen maximalen GSH-Abfall in diesem Zeitraum und eine anschließende Normalisierung. Die Regeneration des GSH-Gehalts ist durch mehrere

Mechanismen zu erklären: Es wäre möglich, dass die Zelle ihre Glutathionproduktion stark erhöht um den oxidativen Stress abzufangen und die Speicher wieder aufzufüllen, oder dass bei länger einwirkendem oxidativem Stress andere antioxidative Mechanismen zur Entgiftung zum Einsatz kommen. Zieht man die Ergebnisse der PCRs heran, die die Genexpression von vier am antioxidativen Stoffwechsel beteiligten Genen vor und nach zweistündiger Ethanolstimulation darstellen, stützen diese die Theorie, dass durch länger vorherrschenden Stress andere Entgiftungsmechanismen in den Vordergrund rücken. Während die γ -GCL, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der GSH-Synthese, nach zweistündiger Ethanolstimulation nur in geringem Maße vermehrt exprimiert wird, stellen sich die anderen untersuchten Gene (Katalase, SOD-2, HO-1) bis zu achtfach erhöht exprimiert dar. Frühere Studien bestätigen dies. Hier ist eine Stunde nach Ethanolstimulation die Aktivität der Katalase gleichbleibend. Das Stressniveau der Zelle hat also noch keinen Wert erreicht, an dem eine Entgiftung notwendig wäre. Ihre Aktivität ebenso die der SOD ist erst nach längerer Zeit gesteigert messbar [96].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich der GSH-Verlauf der beiden Altersgruppen gleich darstellt, die alten PRH aber die stärkere Ausprägung der Reaktion zeigen. GSH scheint vor allem an der kurzfristigen Antwort auf oxidativen Stress beteiligt zu sein, wohingegen bei länger anhaltendem Stress andere Mechanismen im Vordergrund stehen.

Vergleicht man die Genexpressionen der vier untersuchten Gene vor und nach zweistündiger Ethanolstimulation fallen die Ergebnisse in beiden Altersgruppen wie erwartet und bereits in der Literatur für die HO-1 [98, 99], die SOD-2, die Katalase [100] und die γ -GCL vorbeschrieben aus. Nach der Induktion von oxidativem Stress sind die Gene vermehrt exprimiert. Im Altersvergleich zeigt sich nach Ethanolinkubation auch hier eine erhöhte Genexpression in mittelalten PRH. Auch dieses Ergebnis passt zum bereits diskutierten nicht über das Kontrollniveau ansteigenden ROS-Gehalt. Durch ausgeprägt stimulierte Genexpression antioxidativ-wirkender Enzyme scheint es der Hepatozyt zu schaffen, die anfallenden ROS zu entgiften und die Zelle somit vor oxidativen Schäden zu schützen.

4.1 Limitierungen

Um die gewonnenen Ergebnisse korrekt interpretieren zu können, muss man sich der Limitierungen des verwendeten Modells bewusst sein. Primärkulturen von Hepatozyten stellen das am häufigsten verwendete in-vitro Design dar um den Transport, den Metabolismus und die Toxizität von Stoffen zu evaluieren [101, 102]. Mit in-vitro Versuchen ist es möglich unter standardisierten Bedingungen zeitgleich mehrere Versuchsssetups zu testen, die direkt verglichen werden können. Die Reproduzierbarkeit ist hier außerdem gegeben. Nachteile liegen vor allem in der funktionellen Variabilität, die zwischen Zellen verschiedener Spender zu beobachten ist. So reagieren z.B. Rattenhepatozyten nicht so sensibel auf Ethanolstimulation wie humane Hepatozyten [103]. Weitere Limitationen liegen in der nur begrenzten Lebensdauer der Hepatozyten und der Veränderung des Phänotyps während der Kultivierungszeit [104]. Vergleich gezogen zwischen primären Rattenhepatozyten und menschlichen Hepatozyten zeigen sich folgende Unterschiede: In Rattenhepatozyten erfolgt während der Kultivierung vor allem eine Herabregulation der mRNA-Expression, eine Verminderung der Enzyme, die an der Entgiftung beteiligt sind, sowie eine Reduktion des Proteingehalts (z.B. Albumin). Diese Effekte sind in humanen Hepatozyten milder ausgeprägt [105]. Im Vergleich zu Rattenhepatozyten stellt sich aber die Isolation primärer humaner Hepatozyten komplizierter und kostspieliger dar [105]. Des Weiteren ist die Qualität der Zellen stark vom Lebensstil des Spenders abhängig. Dieser Faktor lässt sich bei Rattenhepatozyten einfacher beeinflussen als bei menschlichen Spendern. Dies und die in der Bevölkerung zurückhaltende Bereitschaft zu spenden führt zu einer geringeren Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten, verglichen mit primären Rattenhepatozyten. Ein neuer Ansatz bilden sogenannte NeoHepatozyten, die peripheren Monozyten entstammen. Vorteile sind die einfache Gewinnung und somit die Verfügbarkeit. Erste Versuche zeigten außerdem vergleichbare Ergebnisse zwischen NeoHepatozyten und humanen Hepatozyten, was sie sicherlich sehr interessant für in-vitro Testverfahren aber auch für die personalisierte Medizin macht [106]. Diese Verfahren bilden die Wirklichkeit aber nur zu einem geringen

Teil ab, da die hochkomplexen Vorgänge der Leber nicht nur auf den Hepatozyten beschränkt ablaufen, sondern durch die Interaktion dieser Zellen mit anderen Zellen wie den Kupferzellen oder den Zellen der extrazellulären Matrix beeinflusst werden. Daher wurden Co-Modelle z.B. aus Hepatozyten und Makrophagen entwickelt und sogenannte Sandwichverfahren erprobt um die Polarität der Hepatozyten beizubehalten. Schwierig gestaltet sich hier das Schaffen eines für alle Zellen optimalen Umfelds. Im menschlichen Körper ist die Leber aber dreidimensional aufgebaut. Daher bieten dreidimensionale Modelle eine höhere Aussagekraft als zweidimensionale Zellkulturen, da die Polarität der Zellen, ihre Zell-Zell-Kontakte und ihre Funktionalität erhalten bleiben [105, 107]. Wie in vielen anderen Bereichen liegen auch embryonale Stammzellen im Fokus des Interesses der Forschung. Es ist bereits gelungen diese zu Hepatozyten-ähnlichen Stammzellen zu differenzieren. Derzeit gibt es aber keinen klinischen oder experimentellen Einsatz hinsichtlich einer Toxizitätstestung. Einen interessanten Ansatzpunkt bieten humane adulte Leberstammzellen, die in den kleinsten Ästen der intrahepatischen Gallenwege vorhanden sind [108]. Diese sind bis zu 30 Passagen kultivierbar und scheinen den Hepatozyten bezogen auf ihre Enzymausstattung zu ähneln. Sowohl embryonale als auch adulte Stammzellen sind Gegenstand der intensiven Forschung und könnten sogar zelltherapeutische Optionen anstelle einer Lebertransplantation darstellen [109].

Trotz dieser neuen Fortschritte ist noch allen Modellen gemein, dass sie die in-vivo-Situation nicht exakt nachbilden können. Dennoch sind primäre Zellkulturen noch immer unersetzlich um kosteneffektiv und reproduzierbar neue Grunderkenntnisse zu gewinnen.

Wichtig zu beachten ist, dass die für die Versuche genutzten PRH hinsichtlich ihrer Viabilität große Unterschiede von Lieferung zu Lieferung aufwiesen. Entscheidend für die Qualität der Zellen war das Gelingen der in-situ-Perfusion, die erheblichen Schwankungen unterlag. Des Weiteren stellen der Transport der PRH über Nacht in Cold Storage Lösung und der nach Ankunft der Zellen in unserem Labor durchgeführte Aufreinigungsprozess kritische Schritte dar. Um eine exaktere Aussage über den oxidativen Zustand der Zelle treffen zu

können, wäre die Bestimmung der GSH/GSSG-Ratio der des Gesamt-GSH-Gehalts der Zelle überlegen. Der Assay um GSSG zu messen entspricht dem der GSH-Messung. Zuvor muss aber das reduzierte GSH mittels 2-Vinylpyridin maskiert werden um somit nicht in die Messung einzugehen. Da die Maskierung von GSH nicht suffizient erreicht werden konnte, war es nicht möglich GSSG zuverlässig zu messen und es musste auf diese Ratio verzichtet werden.

Um weitere Aussagen über die Wirkung von NAC treffen zu können, wäre zum einen der Einfluss auf den GSH-Gehalt zu untersuchen, zum anderen ein Vergleich einer NAC-Vorinkubation mit einer gleichzeitigen NAC- und Ethanol-Exposition anzustellen. Derzeit befinden sich weitere Antioxidantien im Fokus des Interesses, so z.B. das in der *Curcuma longa* vorkommende Curcumin. Dieses wird in der traditionellen chinesischen Medizin schon lange aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen eingesetzt. Gezeigt wurde, dass eine Curcumin-Behandlung Schutz vor chronischen alkoholinduzierten Lebererkrankungen bietet, die in Zusammenhang mit dem Eingriff in den oxidativen Haushalt der Zelle stehen [110]. Auch der Naturstoff Quercetin soll Ähnliches vermögen. Dies lässt sich sowohl an Ratten als auch an menschlichen Zellen nachweisen [111, 112]. Zum Verständnis, welche Entgiftungsmechanismen in der Zelle zu welchem Zeitpunkt der Stressantwort ablaufen, würde die Quantifizierung der Genexpression der vier untersuchten Gene nach einer Ethanolstimulation von 30 Minuten beitragen. Ist die Genexpression der γ -GCL tatsächlich bei kurzeinwirkendem Stress erhöht und dafür die anderen antioxidativ-wirkenden Enzyme erniedrigt? Diese Frage gilt es in zukünftigen Arbeiten zu beantworten.

5. Zusammenfassung

Für Politik, Wirtschaft und Forschung ist die Veränderung der Bevölkerungsstruktur in Deutschland im Sinne rückläufiger Geburtenzahlen und immer älter werdender Menschen von großer Bedeutung. Von diesem Alterungsprozess ist der Gesamtorganismus so auch die inneren Organe z.B. die Leber, der eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen zu kommen, betroffen. Viele der Mechanismen im Zusammenhang mit der Alterung der Leber sind noch immer unverstanden. Daher befasst sich die vorliegende Arbeit mit Altersunterschieden in der Reaktion auf Ethanol-induzierten oxidativen Stress. Den Ausgangspunkt bildete die Hypothese, dass kultivierte Hepatozyten von Ratten im höheren Alter (23 Monate) im Vergleich zu denen mittleren Alters (6-8 Monate) anfälliger gegenüber oxidativem Stress seien. Nach einer basalen Charakterisierung der Hepatozyten fand eine Inkubation mit drei verschiedenen Ethanolkonzentrationen statt und es wurde ein Zeitverlauf über sechs Stunden hinsichtlich des ROS- und GSH-Gehalts erstellt um das oxidative Niveau der Zelle zu erfassen. Altersabhängige Unterschiede in der basalen Expression wurden ebenso wie die Induzierbarkeit antioxidativer Enzyme (Katalase, SOD-2, γ -GCL und HO-1) quantifiziert. Des Weiteren wurden die Altersunterschiede in der antioxidativen Wirkung von NAC durch eine Vorinkubation auf den ROS-Gehalt der Zelle untersucht.

In der basalen Charakterisierung der Zelle präsentiert sich literaturrentsprechend ein metabolisch aktiverer mittelalter PRH mit einem im Altersvergleich erhöhten Protein- und ROS-Gehalt, sowie vermehrt exprimierten antioxidativen Enzymen. Der basale GSH-Gehalt zeigt sich in beiden Altersgruppen vergleichbar. Dies wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Zu beachten gilt, dass in den vorliegenden Versuchen nur GSH und nicht die GSH:GSSG-Ratio bestimmt wurde. Der ROS-Zeitverlauf lässt die Schlussfolgerung eines anpassungsfähigeren mittelalten PRH zu, der den induzierten Stress gut entgiften kann, was sich durch einen nicht zu verzeichnenden ROS-Anstieg trotz Ethanol-Stimulation zeigt. Im Gegensatz findet sich in den Hepatozyten der alten Ratten initial ein ROS-Anstieg als Zeichen einer insuffizienten

Stressantwort. Verlauf und Altersunterschiede sind mit der Literatur zu vereinbaren, ebenso die Induzierbarkeit der quantifizierten Enzyme. Nach Ethanol-Stimulation sind Katalase, SOD-2, γ -GCL und HO-1 in beiden Altersgruppen verstärkt exprimiert. Diese Gegenregulation läuft im Altersvergleich in den PRH der mittelalten Ratten ausgeprägter ab. Die Entwicklung des GSH-Gehalts zeigt sich in beiden Altersgruppen vergleichbar. Literaturkonform findet unter oxidativem Stress ein anfänglicher GSH-Verbrauch statt. Diesem folgt eine GSH-Regeneration und es kommt sogar zu einer Überproduktion über das basale Niveau hinaus. Es ist zu beobachten, dass der Abfall und die Überproduktion bei den PRH der alten Ratte ausgeprägter ablaufen als in den Hepatozyten der mittelalten Ratte. Ursächlich könnte man eine Hochregulation des antioxidativen Systems durch ein generell erhöhtes Stressniveau im Alter ansehen. Passend hierzu zeigen sich die Ergebnisse einer NAC-Vorbehandlung. Eine antioxidative Wirkung kann in den alten PRH gezeigt werden - hier kann ein ROS-Verlauf erreicht werden, der mit dem der mittelalten NAC-unbehandelten PRH vergleichbar ist. In den mittelalten PRH hingegen zeigt sich dieser Effekt nicht. Andere Studien legen nahe, dass NAC seine antioxidative Wirkung vor allem nach Exposition mit einem oxidativ-wirkenden Agens und somit unter erhöhtem GSH-Bedarf der Zelle entfalten kann.

Die zu Beginn aufgestellte Hypothese lässt sich durch die Ergebnisse des ROS-Verlaufs und die Genexpression im Altersvergleich, sowie die antioxidative Wirkung von NAC in den Hepatozyten der älteren Ratten belegen. Auch die Resultate der GSH-Messungen sind mit ihr in Einklang zu bringen, müssten allerdings durch die Bestimmung der GSH:GSSG-Ratio ergänzt werden. Weitere Versuche hinsichtlich einer Wirkung von antioxidativen Substanzen vor allem auf Hepatozyten mittleren Alters wären erkenntnisbringend. Obwohl Primärzellmodelle das am Häufigsten eingesetzte Versuchs-Setup darstellen um neue Erkenntnisse über den Transport, Metabolismus und die Toxizität von Stoffen zu erlangen, gilt es bei der Verwendung der Ergebnisse zu beachten, dass diese die Auswirkungen auf den menschlichen Körper nur bedingt abbilden können.

Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt [Zugriff: 07.09.2013].
2. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
3. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *Relationship between antioxidants, prooxidants, and the aging process*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **663**: p. 74-84.
4. Hasty, P., *The impact energy metabolism and genome maintenance have on longevity and senescence: lessons from yeast to mammals*. Mech Ageing Dev, 2001. **122**(15): p. 1651-62.
5. Koizumi, A., R. Weindruch, and R.L. Walford, *Influences of dietary restriction and age on liver enzyme activities and lipid peroxidation in mice*. J Nutr, 1987. **117**(2): p. 361-7.
6. Sohal, R.S. and A. Dubey, *Mitochondrial oxidative damage, hydrogen peroxide release, and aging*. Free Radic Biol Med, 1994. **16**(5): p. 621-6.
7. Agarwal, S. and R.S. Sohal, *Aging and protein oxidative damage*. Mech Ageing Dev, 1994. **75**(1): p. 11-9.
8. Sohal, R.S., *The free radical hypothesis of aging: an appraisal of the current status*. Aging (Milano), 1993. **5**(1): p. 3-17.
9. Sohal, R.S. and W.C. Orr, *The redox stress hypothesis of aging*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(3): p. 539-55.
10. Sohal, R.S., *Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process*. Free Radic Biol Med, 2002. **33**(1): p. 37-44.
11. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. Nature, 2000. **408**(6809): p. 239-47.
12. Blagosklonny, M.V., *Aging: ROS or TOR*. Cell Cycle, 2008. **7**(21): p. 3344-54.
13. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, *TOR signaling in growth and metabolism*. Cell, 2006. **124**(3): p. 471-84.
14. Valko, M., et al., *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. Chem Biol Interact, 2006. **160**(1): p. 1-40.
15. Brink, T.C., et al., *Age-related transcriptional changes in gene expression in different organs of mice support the metabolic stability theory of aging*. Biogerontology, 2009. **10**(5): p. 549-64.
16. Swindle, E.J. and D.D. Metcalfe, *The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes*. Immunol Rev, 2007. **217**: p. 186-205.
17. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
18. Redman, R.R.a.R., *Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species*. 2005.
19. Kelly, K.A., et al., *Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems*. Environ Health Perspect, 1998. **106**(7): p. 375-84.
20. Sies, H., *Strategies of antioxidant defense*. Eur J Biochem, 1993. **215**(2): p. 213-9.

21. Loft, S. and H.E. Poulsen, *Cancer risk and oxidative DNA damage in man*. J Mol Med (Berl), 1996. **74**(6): p. 297-312.
22. Cornejo-Garcia, J.A., et al., *Anti-oxidant enzyme activities and expression and oxidative damage in patients with non-immediate reactions to drugs*. Clin Exp Immunol, 2006. **145**(2): p. 287-95.
23. McCall, M.R. and B. Frei, *Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans?* Free Radic Biol Med, 1999. **26**(7-8): p. 1034-53.
24. Mari, M., et al., *Redox control of liver function in health and disease*. Antioxid Redox Signal, 2010. **12**(11): p. 1295-331.
25. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge*. Free Radic Biol Med, 1992. **12**(1): p. 93-5.
26. Obinger, C., et al., *Purification and characterization of a homodimeric catalase-peroxidase from the cyanobacterium Anacystis nidulans*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(3): p. 545-52.
27. Meredith, M.J. and D.J. Reed, *Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte*. J Biol Chem, 1982. **257**(7): p. 3747-53.
28. Lu, S.C., *Regulation of glutathione synthesis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 42-59.
29. Meister, A. and M.E. Anderson, *Glutathione*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 711-60.
30. Droge, W., *Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants*. Exp Gerontol, 2002. **37**(12): p. 1333-45.
31. *chemgapedia.de* [Zugriff: 07.09.2013].
32. *arzneistoffe.net* [Zugriff: 07.09.2013].
33. Massey, T.E. and W.J. Racz, *Effects of N-acetylcysteine on metabolism, covalent binding, and toxicity of acetaminophen in isolated mouse hepatocytes*. Toxicol Appl Pharmacol, 1981. **60**(2): p. 220-8.
34. Lauterburg, B.H., G.B. Corcoran, and J.R. Mitchell, *Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo*. J Clin Invest, 1983. **71**(4): p. 980-91.
35. Pias, E.K. and T.Y. Aw, *Early redox imbalance mediates hydroperoxide-induced apoptosis in mitotic competent undifferentiated PC-12 cells*. Cell Death Differ, 2002. **9**(9): p. 1007-16.
36. Cotgreave, I.A., et al., *N-acetylcysteine and glutathione-dependent protective effect of PZ51 (Ebselen) against diquat-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes*. Biochem Pharmacol, 1987. **36**(18): p. 2899-904.
37. Dean, O., F. Giorlando, and M. Berk, *N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action*. J Psychiatry Neurosci, 2011. **36**(2): p. 78-86.
38. Odewumi, C.O., et al., *Protective effects of N-acetylcysteine against cadmium-induced damage in cultured rat normal liver cells*. Int J Mol Med, 2011. **27**(2): p. 243-8.
39. LeCluyse, E.L., et al., *Organotypic liver culture models: meeting current challenges in toxicity testing*. Crit Rev Toxicol, 2012. **42**(6): p. 501-48.

40. Popper, H., *Aging and the liver*. Prog Liver Dis, 1986. **8**: p. 659-83.
41. Stocker, E. and W.D. Heine, *Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions*. Beitr Pathol, 1971. **144**(4): p. 400-8.
42. Premoli, A., et al., *Characteristics of liver diseases in the elderly: a review*. Minerva Gastroenterol Dietol, 2009. **55**(1): p. 71-8.
43. Schmucker, D.L., *Aging and the liver: an update*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 1998. **53**(5): p. B315-20.
44. Gregg, S.Q., et al., *A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair*. Hepatology, 2012. **55**(2): p. 609-21.
45. Grizzi, F., et al., *Mast cells and the liver aging process*. Immun Ageing, 2013. **10**(1): p. 9.
46. *insilico-biotechnology.com* [Zugriff: 14.07.2013].
47. Beatrice Kraft, E.-K.U.T., Klinik für Unfallchirurgie, BG Traumaklinik, Siegfried-Weller-Institut, Tübingen (modifiziert).
48. Knobloch, D., et al., *Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures*. Methods Mol Biol, 2012. **806**: p. 99-120.
49. Strober, W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, 2001. **Appendix 3**: p. Appendix 3B.
50. *applichem.com*.
51. Nussler, A.K., et al., *Isolation and characterization of a human hepatic epithelial-like cell line (AKN-1) from a normal liver*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(4): p. 190-7.
52. Damm G, B.B., Schelcher C, Thasler W, Nussler AK, *Human hepatocyte isolation, culture and transport as well as their limitations and pitfalls*. Submitted to Archives of Toxicology., 2012.
53. O'Brien, J., et al., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, 2000. **267**(17): p. 5421-6.
54. Rahman, I., A. Kode, and S.K. Biswas, *Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 3159-65.
55. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
56. Aranda, A., et al., *Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells*. Toxicol In Vitro, 2013. **27**(2): p. 954-63.
57. Tarpey, M.M., D.A. Wink, and M.B. Grisham, *Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **286**(3): p. R431-44.
58. *cellbiolabs.com* [Zugriff: 14.07.2013].
59. *u-helmich.de* [Zugriff: 14.07.2014].
60. Skehan, P., et al., *New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening*. J Natl Cancer Inst, 1990. **82**(13): p. 1107-12.
61. *peqlab peqGOLD TriFast data sheet* [Zugriff: 18.12.2013].
62. Russel, S.a., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Ed*. 2001.
63. Krug, M.S. and S.L. Berger, *First-strand cDNA synthesis primed with oligo(dT)*. Methods Enzymol, 1987. **152**: p. 316-25.

64. Lorenz, T.C., *Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies*. J Vis Exp, 2012(63): p. e3998.
65. Wang, H. and J.A. Joseph, *Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader*. Free Radic Biol Med, 1999. **27**(5-6): p. 612-6.
66. Hou, W.Y., et al., *Age- and sex-related differences of organic anion-transporting polypeptide gene expression in livers of rats*. Toxicol Appl Pharmacol, 2014.
67. Fu, Z.D., I.L. Csanaky, and C.D. Klaassen, *Effects of aging on mRNA profiles for drug-metabolizing enzymes and transporters in livers of male and female mice*. Drug Metab Dispos, 2012. **40**(6): p. 1216-25.
68. Will, A., *Age dependency of mitochondrial and cytosolic GSH in rat hepatocytes and rat liver tissue*. 2013.
69. Wang, H., H. Liu, and R.M. Liu, *Gender difference in glutathione metabolism during aging in mice*. Exp Gerontol, 2003. **38**(5): p. 507-17.
70. Hall, D.M., et al., *Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress*. J Appl Physiol, 2000. **89**(2): p. 749-59.
71. Johnson, F.B., D.A. Sinclair, and L. Guarente, *Molecular biology of aging*. Cell, 1999. **96**(2): p. 291-302.
72. Papaconstantinou, J., *Unifying model of the programmed (intrinsic) and stochastic (extrinsic) theories of aging. The stress response genes, signal transduction-redox pathways and aging*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **719**: p. 195-211.
73. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7915-22.
74. Sohal, R.S. and R. Weindruch, *Oxidative stress, caloric restriction, and aging*. Science, 1996. **273**(5271): p. 59-63.
75. Zhang, H.J., et al., *Heat-induced liver injury in old rats is associated with exaggerated oxidative stress and altered transcription factor activation*. Faseb j, 2003. **17**(15): p. 2293-5.
76. Adel A. Alhamdan, A.A.A., *The Nutritional, Glutathione and Oxidant Status of Elderly Subjects Admitted to a University Hospital*. 2010.
77. Vogt, B.L. and J.P. Richie, Jr., *Glutathione depletion and recovery after acute ethanol administration in the aging mouse*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(10): p. 1613-21.
78. Kim, Y.C., S.Y. Kim, and Y.R. Sohn, *Effect of age increase on metabolism and toxicity of ethanol in female rats*. Life Sci, 2003. **74**(4): p. 509-19.
79. Toroser, D. and R.S. Sohal, *Age-associated perturbations in glutathione synthesis in mouse liver*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 583-9.
80. Sabaretnam, T., et al., *The effect of aging on the response of isolated hepatocytes to hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(1): p. 123-8.
81. Jain, A. and S.J. Flora, *Dose related effects of nicotine on oxidative injury in young, adult and old rats*. J Environ Biol, 2012. **33**(2): p. 233-8.

82. Jain, A., et al., *Influence of age on arsenic-induced oxidative stress in rat*. Biol Trace Elem Res, 2012. **149**(3): p. 382-90.
83. Mallikarjuna, K., K. Nishanth, and K.S. Reddy, *Hepatic glutathione mediated antioxidant system in ethanol treated rats: Decline with age*. Pathophysiology, 2007. **14**(1): p. 17-21.
84. Scalley, R.D. and C.S. Conner, *Acetaminophen poisoning: a case report of the use of acetylcysteine*. Am J Hosp Pharm, 1978. **35**(8): p. 964-7.
85. Srinivasan, P.K., et al., *Impact of oxygen free radicals in rat partial liver transplantation*. J Surg Res, 2014.
86. Corcoran, G.B., et al., *Effects of N-acetylcysteine on acetaminophen covalent binding and hepatic necrosis in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 1985. **232**(3): p. 864-72.
87. Noda, T., et al., *Induction of mild intracellular redox imbalance inhibits proliferation of CaCo-2 cells*. Faseb j, 2001. **15**(12): p. 2131-9.
88. Parnell, S.E., et al., *Reduction of ethanol-induced ocular abnormalities in mice through dietary administration of N-acetylcysteine*. Alcohol, 2010. **44**(7-8): p. 699-705.
89. Burgunder, J.M., A. Varriale, and B.H. Lauterburg, *Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration*. Eur J Clin Pharmacol, 1989. **36**(2): p. 127-31.
90. Meydani, M., *Nutrition interventions in aging and age-associated disease*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **928**: p. 226-35.
91. Anlasik, T., et al., *Dietary habits are major determinants of the plasma antioxidant status in healthy elderly subjects*. Br J Nutr, 2005. **94**(5): p. 639-42.
92. Flora, S.J., P. Gautam, and N. Dwivedi, *Dose-dependent effects of ethanol on lead-induced oxidative stress in rats*. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2012. **31**(1): p. 61-73.
93. Rouach, H., et al., *Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology*. Hepatology, 1997. **25**(2): p. 351-5.
94. Jewell, S.A., et al., *Decreased hepatic glutathione in chronic alcoholic patients*. J Hepatol, 1986. **3**(1): p. 1-6.
95. Pierson, J.L. and M.C. Mitchell, *Increased hepatic efflux of glutathione after chronic ethanol feeding*. Biochem Pharmacol, 1986. **35**(9): p. 1533-7.
96. Schlorff, E.C., K. Husain, and S.M. Somani, *Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat*. Alcohol, 1999. **17**(2): p. 97-105.
97. Salonen, I. and C.J. Eriksson, *Penetration of ethanol into the male reproductive tract*. Alcohol Clin Exp Res, 1989. **13**(6): p. 746-51.
98. Willis, D., A.R. Moore, and D.A. Willoughby, *Heme oxygenase isoform expression in cellular and antibody-mediated models of acute inflammation in the rat*. J Pathol, 2000. **190**(5): p. 627-34.
99. Yao, P., et al., *The protective role of HO-1 and its generated products (CO, bilirubin, and Fe) in ethanol-induced human hepatocyte damage*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **296**(6): p. G1318-23.

100. Rahman, K., *Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors*. Clin Interv Aging, 2007. **2**(2): p. 219-36.
101. Gomez-Lechon, M.J., J.V. Castell, and M.T. Donato, *The use of hepatocytes to investigate drug toxicity*. Methods Mol Biol, 2010. **640**: p. 389-415.
102. Hewitt, N.J., E.L. Lecluyse, and S.S. Ferguson, *Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations*. Xenobiotica, 2007. **37**(10-11): p. 1196-224.
103. Wönne, E.C., et al., *Comparison of the response of primary rat and human hepatocytes to ethanol exposition in a miniaturized three-dimensional (3D) multi-compartment bioreactor system*. Z Gastroenterol, 2014. **52**(01): p. P_3_06.
104. Dickins, M. and R.E. Peterson, *Effects of a hormone-supplemented medium on cytochrome P-450 content and mono-oxygenase activities of rat hepatocytes in primary culture*. Biochem Pharmacol, 1980. **29**(9): p. 1231-8.
105. Godoy, P., et al., *Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME*. Arch Toxicol, 2013. **87**(8): p. 1315-530.
106. Ehnert, S., et al., *Further characterization of autologous NeoHepatocytes for in vitro toxicity testing*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(6): p. 1203-8.
107. Schyschka, L., et al., *Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity*. Arch Toxicol, 2013. **87**(8): p. 1581-93.
108. Fausto, N., *Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1477-87.
109. Nussler, A.K., et al., *Cell therapeutic options in liver diseases: cell types, medical devices and regulatory issues*. J Mater Sci Mater Med, 2011. **22**(5): p. 1087-99.
110. Rong, S., et al., *Curcumin prevents chronic alcohol-induced liver disease involving decreasing ROS generation and enhancing antioxidative capacity*. Phytomedicine, 2012. **19**(6): p. 545-50.
111. Liu, S., et al., *Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes*. Toxicol In Vitro, 2010. **24**(2): p. 516-22.
112. Braun, K.F., et al., *Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1*. ScientificWorldJournal, 2011. **11**: p. 2348-57.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ich versichere die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten an der Eberhard-Karls-Universität beachtet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die hier vorliegende Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Tübingen, den _____

Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Nüssler für die Möglichkeit bedanken, die Dissertation in seinem Labor anzufertigen. Auch gilt ihm mein Dank für die vielen Anregungen, aber auch für die Freiheiten, die mir ermöglichten das Thema zu meinem eigenen zu machen.

Danke Dr. Britta Burkhardt für die Betreuung, für die schnellen Antworten auf meine Fragen und dein immer offenes Ohr.

Ich möchte mich beim ganzen Team des Siegfried Weller Instituts für Unfallmedizinische Forschung für die Unterstützung bedanken vor allem bei Nicole Hebel. So manche Stunde im Labor wurde durch dich soviel kurzweiliger und manch zäher Assay ging soviel leichter von der Hand. Danke auch an Sigrid Arnold, mit der ich mich immer austauschen konnte und mit der die Studienzeit wie im Flug verging.

Danke an Marcus Mall für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Nicht zu vergessen: Danke, für Deine Freundschaft.

Simon Alperowitz – nach arbeitsreichen Zeiten freue ich mich auf neue Herausforderungen, Ziele und Momente mit dir. Es ist wundervoll zu wissen, dass du an meiner Seite bist!

Doch der wichtigste Dank gilt meiner Familie: Danke Mum und Dad, Danke Manuel & Olga! Danke dafür, dass ihr mich mein ganzes Leben lang bei allem unterstützt habt, was ich in Angriff nehmen wollte und hinter mir standet, wo auch immer der Weg hinführte. Ihr seid der Fels in meinem Leben, die Menschen, auf die ich immer bauen kann, die Familie, die sich jeder nur wünschen kann.