

II. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

Regulation der Apoptose in Haupt- und Parietalzellen der Ratte

Franziska Schäfer, geb. Ernst

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Ch. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann

Die Dissertation wurde am 09.12.2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.06.2004 angenommen.

Meinem Vater gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1. Apoptose und Nekrose	7
1.2. Allgemeine Regulation der Apoptose	9
1.2.1. Der CD95-Rezeptor und der CD95-Ligand	9
1.2.2. Die Regulatorproteine Bax und Bcl-2	12
1.2.3. Die Caspase-Kaskade	15
1.3. Apoptose in den Zellen der Magenmukosa	17
1.3.1. Entwicklungsmechanismus der Zellen der Magenschleimhaut	17
1.3.2. Das Apoptoseverhalten der Zellen der Magenmukosa	19
1.4. Aufgabenstellung dieser Arbeit	24
2. METHODIK	25
2.1. Die Zellpräparation	25
2.1.1. Lösungen	25
2.1.2. Arbeitsschritte zur Zellgewinnung	28
2.2. Die Zellkultur	31
2.3. Lösen der Zellen	32
2.4. Isolierung von RNA, die reverse Transskription und die Polymerasekettenreaktion	32
2.4.1. Lösungen und Materialien	32
2.4.2. RNA-Isolierung mit Trizol	34
2.4.3. Messen und Darstellen der RNA	36
2.4.4. Der DNase-Verdau	38
2.4.5. Die reverse Transskription	38
2.4.6. Die RT- Polymerasekettenreaktion	39
2.4.7. Nachweis des PCR-Produkts	43
2.4.8. Die semiquantitative RT-PCR	43

2.5. Der Western Blot	45
2.5.1. Theoretische Grundlagen	45
2.5.2. Lösungen und Materialien	46
2.5.3. Arbeitsschritte	48
2.6. Die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie	52
2.6.1. Theoretische Grundlagen	52
2.6.2. Materialien und Geräte	56
2.6.3. Arbeitsschritte	56
2.7. Annexinfärbung in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie	60
2.7.1. Theoretische Grundlagen	60
2.7.1. Materialien und Geräte	61
2.7.2. Färbung	61
2.8. Der Cell Death Detection ELISA	62
2.8.1. Theoretische Grundlagen	62
2.8.2. Materialien und Geräte	64
2.8.3. Arbeitsschritte	64
2.9. Die TUNEL-Färbung	67
2.9.1. Theoretische Grundlagen	67
2.9.2. Materialien und Geräte	68
2.9.3. Arbeitsschritte	69
3. Ergebnisse	70
<hr/>	
3.1. Kultivierung von Haupt- und Parietalzellen	70
3.2. Spontane Apoptoserate bei Haupt- und Parietalzellen in Kultur	70
3.2.1. Spontane Apoptoserate gemessen mit der TUNEL-Färbung	71
3.2.2. Spontane Apoptoserate gemessen mit dem ELISA	71
3.2.3. Spontane Apoptoserate gemessen mit Annexinfärbung in der Durchflusszytometrie	72
3.2.4. Spontane Apoptoserate gemessen mit der Annexin-/Propidiumiodidfärbung	73
3.3. Regulation von Bax, Bcl-2 und CD95-Rezeptoren bei Haupt- und Parietalzellen in Kultur	75
3.3.1. Die Regulation von Bax, Bcl-2 und CD95-Rezeptoren in der RT-PCR	75
3.3.2. Die Regulation von Bax, Bcl-2 und CD95-Rezeptoren im Western blot	78
3.3.3. Die Regulation der CD95-Rezeptoren in der Durchflusszytometrie	80
3.4. Apoptose bei Haupt- und Parietalzellen induziert durch die Zugabe von CD95-Ligand	82
3.4.1. Nachweis von CD95-Ligand bei kultivierten Haupt- und Parietalzellen	82
3.4.2. Reaktionsgeschwindigkeit der Zellen auf eine Stimulation mit CD95-Ligand	83

3.4.3. Stimulation von Haupt- und Parietalzellen mit dem CD95-Ligand gemessen mit der TUNEL-Färbung	86
4. Diskussion	89
4.1. Die Expression des CD95-Rezeptors	89
4.2. Die Expression von Bax und Bcl-2	93
4.3. Wechselwirkungen von CD95, Bax und Bcl-2	98
4.4. Die Bedeutung der Apoptose für die Karzinogenese des Magens	99
4.5. Weitere wichtige Forschungsgebiete für Bax, Bcl-2 und CD95-Rezeptor	102
5. Zusammenfassung	105
6. Literaturverzeichnis	107
7. Abbildungsverzeichnis	133
8. Tabellenverzeichnis	138

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfate]
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Angewandte Gentechnologie Systeme
AIF	Apoptosis-inducing-Factor
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BH	Bcl-2-Homology
bidest.	bidestilliert
bp	Basen Paare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	Caspase activated DNase
Caspase	CysteinyI-aspartate-specific-proteinase
CD95L	CD95-Ligand
CD95R	CD95-Rezeptor
cDNA	Complementary Desoxyribonucleinacid
CED	Caenorhabditis elegans cell death gene
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DEPEC	Diethylprocarbonat
dGTP	Desoxy-Guanidin-Triphosphat
DMEM	Dulbeccos Mem/Nutrient Mix
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynucleosidetriphosphate
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy-Tyrosin-Triphosphat

dUTP	Desoxy-Uracil-Triphosphate
ECL-Zellen	Enterochromaffin-like Zellen
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FADD	FAS-associated Death Domain
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FLICE	FADD-homologe ICE/CED-like Protease
FSC	Forwardscatter
h	Stunden
Hepes	Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure
HRP	Horseradish-Peroxydase = Meerrettichperoxidase
ICAD	Inhibitor of Caspase activated DNase
ICE	Interleucin 1 Converting Enzym
IgG	Immunglobulin G
ITS	Insulin-Transferrine-Sodiumselenit
KM	Kulturmedium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHCII	Major Histocompatibility Complex II
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MTP	Mikrotitterplatten
NK	Negativkontrolle
OD	Optische Dichte
PARP	Poly-ADP-ribose-polymerase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PI	Propidiumiodid
PK	Positivkontrolle
PMSF	Phenyl-Methyl- Sulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polivinylden Difluorid

RM	Regular Medium
RNA	Ribonucleinacid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse-Transskriptions-PCR
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Sidewardscatter
ST	Standard
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	Tris-buffered saline + tween
TdT	Terminal Desoxyribonucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',M'-Tetramethylenetylendiamin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trpf.	Tropfen
TUNEL	Terminal Desoxynucleotide Transferase-mediated dUTP-Biotin-Nick-End-Labeling
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
vrs.	versus

1. EINLEITUNG

Das Grundprinzip eines jeden Organismus ist die kontrollierte Proliferation und das kontrollierte Absterben von Zellen. Nur so ist ein Zellverband in der Lage zu überleben ohne eine ständige Zunahme der Zellzahl und ohne eine Überalterung der Zellen. Erst 1972 wurde das kontrollierte Absterben von Zellen, die Apoptose von den Pathologen A. Wyllie und J. Kerr eingeführt (Kerr et al., 1972). Das Wort Apoptose bedeutet, frei aus dem Griechischen übersetzt, so viel wie der Blätterverlust der Bäume im Herbst oder das Verlieren der Blütenblätter von Blumen (Kerr et al., 1972). Apoptose beschreibt einen vorprogrammierten Zelltod, der als Gegenspieler zur Zellproliferation fungiert (Thompson, 1995; Hale et al., 1996; Pritchard et Watson, 1996; Que et Gores, 1996). Jede Störung des Gleichgewichtes von Proliferation und Absterben endet in unkontrolliertem Zellwachstum oder in Zellverlust, was die Grundursachen der meisten Krankheiten sind. In dieser Arbeit wurden das Apoptoseverhalten und Regulationsproteine der Apoptose von kultivierten Haupt- und Parietalzellen aus Rattenmägen untersucht.

1.1. APOPTOSE UND NEKROSE

Wyllie und Kerr beschreiben verschiedene morphologische Veränderungen von Zellen während des Zugrundegehens im Elektronenmikroskop und unterscheiden anhand dieser Beobachtungen Apoptose und Nekrose (Kerr et al., 1972; Wyllie et al., 1980b). Die Nekrose stellt den akzidentellen Zelltod dar, der nach nicht physiologischen Reizen, also chemischen oder physikalischen Noxen, oder z.B. einer Ischämie, eintritt. Betroffen ist immer eine zusammenhängende Zellgruppe, deren Zytoplasma und Mitochondrien anschwellen. Die gesamte Zellarchitektur geht dabei zugrunde und die Zelle verliert ihre Basophilie. Die Zelle zerfällt vollständig, indem der Membranzusammenhalt sich auflöst. Die Reste der Zelle werden während dem folgenden Entzündungsprozess, der durch die Freisetzung intrazellulärer Proteine

initiiert wird, phagozytiert. Im Verlauf der Nekrose verändert sich der Zellkern folgendermaßen: Eine anfängliche Pyknose geht in eine Karyorrhesis über, die schließlich zu einer Karyolyse führt (Kerr et al., 1972). Spätere Untersuchungen ergaben, dass die Homeostase und die Ionenregulation der Zelle zusammenbrechen und die DNA in einer späten Phase der Nekrose in zufällige Stücke zerlegt, bzw. verdaut wird. Insgesamt ist die Nekrose ein Prozess, der keine Energie verbraucht (Eguchi et al., 1997). Dies konnte daran gezeigt, dass er auch bei 4°C abläuft und kein ATP verbraucht wird (Eguchi et al., 1997).

Die Apoptose stellt hingegen einen physiologischen Vorgang dar. Ungewollte oder nutzlose Einzelzellen werden während der Entwicklung eliminiert (Wyllie et al., 1980b). Dadurch wird im Gewebe eine Homeostase aufrecht erhalten, bei der trotz stetiger Erneuerung der Zellen die Zellzahl nicht ansteigt. Dies ist v.a. bei Wechselgeweben mit hohem Zellumsatz von Bedeutung, also z.B. im Gastrointestinaltrakt (Hall et al., 1994). Morphologisch gesehen beginnt die Apoptose mit der Einschrumpfung des Zytoplasmas und der Kondensation des Zellkerns, an dessen Membran sich das aggregierte Chromatin anheftet. Der Halt im Zellverband wird durch Spaltung der Desmosomen aufgehoben. Die Zellorganellen wie z.B. die Mitochondrien bleiben jedoch intakt (Wyllie et al., 1980b). Auch die Integrität der Zellmembran bleibt erhalten. Es bilden sich Ausstülpungen, die als apoptotische Körperchen von der Zelle abgeschnürt werden (Kerr et al., 1972). Diese sind von einer intakten Membran umgeben und lösen keine Entzündungsreaktion aus, sondern werden von eigenständigen Phagozyten oder benachbarten Zellen phagozytiert. Ebenso können sie in das Lumen einer Drüse abgegeben werden. Sie können auch durch anschließende Nekrose zerstört werden, die wiederum mit Anschwellen der Organellen und Auflösen der Körperchen einhergeht (Wyllie et al., 1980b). Biochemisch gesehen ist die Apoptose ein Energie-verbrauchender Prozess, der auf die Aktivität von Enzymen angewiesen ist. Es werden Stoffe benötigt, die von den Mitochondrien in das Zytoplasma sezerniert werden (z.B. Cytochrom C, Apoptosis-inducing factor (AIF)). In der Zellmembran kommt es zu Veränderungen: Es findet eine Translokation von Phosphatidylserinen von der zytoplasmatischen zur extrazellulären Seite statt. Die DNA wird im Folgenden durch eine endogene Nuklease in gleich große Stücke (ca. 180 bp) gespalten (siehe auch 2.8 und 2.9.; Wyllie, 1980a; Wyllie et al., 1984). Nach den Arbeiten von Wyllie und Kerr wurden

weitere molekularbiologische Mechanismen aufgedeckt, die im Folgenden erörtert werden, soweit sie für die vorliegende Arbeit von Belang sind. Wenn eine Zelle apoptotisch wird, ist das die Antwort auf verschiedene äußere Einflüsse (Informationen von anderen Zellen, chemische Reize), oder das Alter und den Entwicklungsstand einer Zelle. Es sind Faktoren von Bedeutung, die von außen auf die Zelle einwirken und parallel dazu Vorgänge, die sich in der Zelle abspielen (Szabo et Tarnawski, 2000). Dazu ist zu erwähnen, dass nicht die Reize, die von außen auf die Zelle einwirken, die Apoptose steuern, sondern dass die Entscheidung zum Überleben oder Zugrundegehen der Zelle im Inneren der Zelle fällt (Hale et al., 1996).

1.2. ALLGEMEINE REGULATION DER APOPTOSE

Apoptose kann über Rezeptoren an der Zelloberfläche ausgelöst werden. Der CD95-Rezeptor stellt einen solchen Todesrezeptor da, über den Signale in die Zelle geleitet werden, die Apoptose auslösen können. Zur Nomenklatur ist zu sagen, dass sich herausgestellt hat, dass APO, FAS und CD95 den gleichen Rezeptor beschreiben (Moller et al., 1994).

1.2.1. DER CD95-REZEPTOR UND DER CD95-LIGAND

Der CD95-Rezeptor wurde zum ersten Mal von Yonehara 1989 als ein Oberflächenprotein erwähnt (Yonehara et al., 1989). Oehm fand den CD95-Rezeptor 1992 auf aktivierten T-Zellen und isolierte ihn (Oehm et al., 1992). Es ist ein 48 kD Glycoprotein der Zellmembran aus 335 Aminosäuren, das sehr Cystein-reich ist und wegen hoher Homologien in der DNA-Sequenz zu den Mitgliedern der TNF-Rezeptorfamilie gerechnet wird (Oehm et al., 1992). Bei den Rezeptoren der TNF-Familie handelt sich um trimere Proteine (Gruss et Dover, 1995). Ihre Aufgabe ist es, entweder Zellproliferation, Zelltod oder Zelldifferenzierung einzuleiten (Peitsch et Tschopp, 1995). Ebenso findet man in der TNF-Familie eine intrazelluläre Sequenz, die „Todesdomäne“ (siehe unten), die für die Weiterleitung des Apoptosesignals wichtig ist (Boldin et al., 1995).

Der *CD95-Ligand* (40 kD) wurde von Sud und Nagata isoliert; er löst durch die Bindung an den CD95-Rezeptor Apoptose aus (Suda et Nagata, 1994). Außerdem wurde nachgewiesen, dass Antikörper gegen den CD95-Rezeptor Apoptose-induzierend wirken (Mapara et al., 1993; Dhein et al., 1992). Der CD95-Ligand gehört zu der Gruppe der Typ II Membranproteine. Er besteht aus einem intra- und einem extrazellulären Teil, wobei der extrazelluläre Anteil aus 150 Aminosäuren aufgebaut ist. Er weist signifikante Homologien zu Mitgliedern der TNF-Familie auf, wie z.B. dem TNF α , dem Lymphotoxin, dem CD40- und dem CD30-Liganden (Nagata, 1997). Eine Metalloproteinase an der Membran trennt durch Proteinolyse den extrazellulären Bereich des CD95-Liganden ab, wodurch der lösliche CD95-Ligand entsteht (Tanaka et al., 1996; Schneider et al., 1998). Er stellt ein homotrimeres Molekül dar, das drei CD95-Rezeptoren bindet (Smith et al., 1994). Der CD95-Ligand ist hauptsächlich auf natürlichen Killerzellen und aktivierten T-Zellen, in immunprivilegiertem Gewebe (Augen und Hoden), sowie auf Tumorzellen zu finden (Griffith et al., 1995; Bellgrau et al., 1995). Deshalb wird vermutet, dass durch CD95-eingeleitete Apoptose hauptsächlich der Regulation der Lymphozytenentwicklung dient (Nagata et Golstein, 1995; Krammer et al., 1994) und zur immunologischen Bekämpfung von Viren und Bakterien wichtig ist (Bellgraue et al., 1995). In einigen Geweben wurden CD95-Rezeptor und Ligand parallel nachgewiesen. Hierzu zählen beispielsweise Thymus, Lunge, Milz, Dünndarm (Eberl et al., 1999). In all diesen Geweben findet ein hoher Zell-Umsatz statt. In diesen Wechselgeweben wird das Zellgleichgewicht u.a. durch das CD95-System aufrecht erhalten (Eberl et al., 1999). Einige Tumore (z.B. Adenokarzinome des Magens (Bennet et al., 1999)) bedienen sich auch des CD95-Liganden, um aktivierte Lymphozyten zu zerstören, damit sie selbst nicht durch die Immunantwort eliminiert werden (Hahne et al., 1996; Lee et al., 1998).

Apoptose wird über das CD95-System folgendermaßen ausgelöst: der CD95-Ligand, der ein homotrimeres Molekül darstellt, bindet an drei CD95-Rezeptoren. Über die Todesdomäne werden drei CD95-Rezeptoren aneinander gebunden. An diese Todesdomäne bindet intrazellulär ein FADD-Molekül (FAS-associated death domain) (Boldin et al., 1995), das neben dieser Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne ("death effector domain", DED) besitzt (Chinnaiyan et al., 1995). Ebenso hat die Caspase 8 solch eine Todeseffektordomäne, über die sie an

den Komplex binden kann. Dieses 55 kDa Protein weist neben der Todeseffektordomäne eine Aspartatprotease auf, mit der die Caspase 8 sich selbst durch Abspaltung aktiviert (Szabo et Tarnawski, 2000). Sie stellt das erste Glied der Caspase-Kaskade dar, die durch ihre Aktivierung gestartet wird und so die Apoptose einleitet (siehe Abb. 2). Weiterhin wird durch die Bindung des CD95-Liganden an den Rezeptor Ceramid intrazellulär frei gesetzt. Diese Ceramidfreisetzung ist aber nicht CD95-spezifisch, sondern wird ebenfalls durch Glucocorticoide oder Fehler in der DNA über eine Aktivierung von p53 eingeleitet (Kroemer et al., 1998). An diesem Punkt kann Bcl-2 wirken, das an die Mitochondrienmembran gebunden ist. Bei einem Überschuss an Bcl-2 kann die Apoptose gehemmt werden, so dass die Mitochondrien kein Signal zur Apoptoseauslösung erhalten und die Zelle überlebt (Szabo et Tarnawski, 2000). Bis zu diesem Punkt kann die Apoptose noch rückgängig gemacht werden. Mit der Sezernierung von Cytochrom C und AIF aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien bricht jedoch das Membranpotential der Mitochondrien zusammen. Damit ist die Aktivierung der Apoptose nicht mehr zu stoppen. Cytochrom C aktiviert im Cytoplasma die Caspase 3 und AIF bewirkt direkt die apoptotischen Veränderungen am Zellkern (Kroemer et al., 1998). Über weitere Caspasen beginnt die Zelle schließlich mit den degenerativen Umbauten. Durch eine sehr starke Apoptoseinduktion durch Verlust von energiereichen Phosphaten kann es in den Mitochondrien zu Verschiebungen des Redoxpotentials kommen. Somit kann die Zelle nicht länger überleben und wird nekrotisch. An diesem Vorgang wird ersichtlich, dass die Aktivierung eines Todesrezeptors nicht unweigerlich zur Apoptose führen muss (Kroemer et al., 1998). In neuen Studien wird die Apoptoseinduktion über den CD95-Rezeptor auch extrinsisches System genannt. Es stellt das Gegenstück zum instrinsischen System über Regulatorproteine dar (Rossi et Gaidano, 2003). Somit werden zwei Wegen zur Apoptoseregulation nebeneinander gestellt. Der gegenseitiger Einfluss ist nicht klar.

1.2.2. DIE REGULATORPROTEINE BAX UND BCL-2

Als erste Apoptose-regulierende Stoffe wurde die Familie der Bcl-2-Proteine entdeckt. Man unterscheidet Apoptose-induzierende (Bax, Bad, Bik) und Apoptose-hemmende (Bcl-2, Bcl-x_L) Untergruppen (Szabo et Tarnawski, 2000). Vorrangig findet man sie an intrazellulären Membranen: an der zytoplasmatischen Seite der Zellkernmembran, an der Membran des endoplasmatischen Retikulums und an der äußeren Mitochondrienmembran (Hockenbery et al., 1990). Am C-Terminus besitzen die Bcl-2 Proteine hydrophobe Aminosäuren, womit sie sich in der Membran verankern können (Krajewski et al., 1993). Sie können Dimere bilden, aber auch die einzelnen Monomere können sich gegenseitig hemmen, bzw. verstärken. Somit ist das Verhältnis von Aktivatoren zu Inhibitoren entscheidend für das Weiterführen oder die Hemmung von Apoptose (Korsmeyer, 1995). Der Einfluss der Bcl-2-Proteine kommt vor der Aktivierung der Caspase-Kaskade zum Tragen. Bcl-2-Proteine können die Aktivierung der Caspase-Kaskade hemmen (Golstein, 1997).

Bcl-2, das wohl am besten untersuchte Protein dieser Familie, kann Apoptose hemmen. Es ist an die Mitochondrienmembran gebunden und reguliert die Durchlässigkeit der Membran für Apoptose-induzierende Stoffe (z.B. Cytochrom C, AIF) und bindet diese (Reed, 1997). Bcl-2 wurde v.a. in Gewebe gefunden, das Stammzellen aufweist und/oder langlebig und/oder proliferativ ist (Hockenbery et al., 1991). Im Magen speziell kann Bcl-2 an der Spitze und v.a. am Grund, jedoch nicht im mittleren Teil der Magendrüsen nachgewiesen werden (Krajewski et al., 1994; Neu et al., 2001). In den immunhistochemischen Färbungen stellte sich heraus, dass Bcl-2 fast nur in Hauptzellen zu finden ist. Im Gegensatz dazu besagt eine These von Hockenbery, dass Bcl-2 v.a. die Aufgabe der Protektion der Stammzellen hat (Hockenbery et al., 1991). Um einen genaueren Einblick in die Wirkungsweise zu bekommen, führte Kroemer Versuche durch, bei denen die Expression von Bcl-2 gehemmt wurde (Kroemer et al., 1998). Dies geht mit schwerwiegenden Änderungen der mitochondrialen Funktion einher: Das Potential über der inneren Mitochondrienmembran bricht zusammen, die Atmungskette wird entkoppelt, Superoxidanionen werden überproduziert, die mitochondriale Biogenese wird unterbrochen, Kalzium und Glutathion treten aus und lösliche intermembranäre

Proteine werden ausgeschüttet. Dies führt entweder über die Zerstörung der Plasmamembran zur Nekrose, oder Apoptose wird ausgelöst, indem über Cytochrom C bzw. AIF, Proteine aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien, ins Zytoplasma freigesetzt werden. Somit wird die Caspase-Kaskade gestartet (Kroemer et al., 1998).

Bax hingegen scheint als Apoptose-induzierendes Protein die Membranporen der Mitochondrienmembran für proapoptische Stoffe wie Cytochrom C oder AIF zu öffnen und somit Apoptose zu forcieren (Szabo et Tarnawski, 2000). *Bcl-2* wirkt diesem Effekt entgegen und kann ihn vollständig unterdrücken (Mignotte et Vayssiere, 1998). Im Bereich der Magenschleimhaut zeigt sich *Bax* deutlicher an der Drüsenoberfläche als am Grund (Krajewski et al., 1994; Neu et al., 2001). Es findet sich sehr gering in allen Zellen der Magenschleimhaut, jedoch deutlicher in Haupt- als in Parietalzellen. Parietalzellen, in denen *Bax* nachgewiesen werden konnte, befinden sich v.a. an den oberen Drüsenanteilen (Neu et al., 2001). *Bax* wird von sechs Exons kodiert und hat verschiedene Splice-Varianten: Eine 21kD membrangebundene Form (α -Variante) und zwei zytosolische Varianten (β und γ). Allerdings ist die Funktion dieser beiden Varianten unklar. Die proapoptische Wirkung von *Bax* ist nur für *Bax* α gezeigt worden. Es besitzt weitgehende Homologien mit *Bcl-2* (21 % Aminosäurehomologien zwischen *Bax* und *Bcl-2*) (Oltavi et al., 1993).

Bax und *Bcl-2* können Dimere bilden. Das Verhältnis der beiden entscheidet über die Apoptose. Oltavi hat folgendes nachgewiesen: Sind *Bcl-2*-Monomere im Überschuss vorhanden, kann Apoptose gehemmt werden (Oltavi et al., 1993). Überwiegen jedoch *Bax*-Homodimere, wird Apoptose eingeleitet. Die Heterodimeren-Bildung der beiden ist ein Zwischenstadium. Hierbei ist unklar, ob *Bcl-2* *Bax* oder *Bax* *Bcl-2* neutralisiert (siehe Abb. 1)(Oltavi et al., 1993).

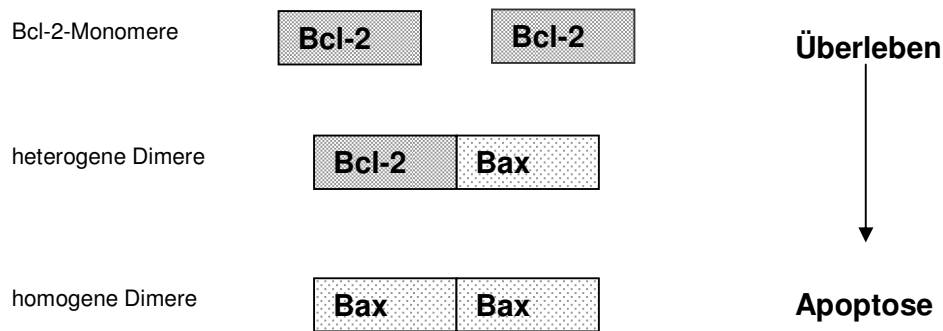


Abb. 1: Schematische Darstellung der homogenen und heterogenen Dimerenbildung von Bax und Bcl-2 und deren Wirkung auf Apoptose oder Überleben (modifiziert nach Oltavi et al., 1993, S. 616): Bei Bcl-2-Monomeren kann Apoptose gehemmt werden, d.h. die Zelle überlebt. Überwiegen Bax-Homodimere wird Apoptose eingeleitet. Im Zwischenstadium der heterogenen Dimere ist unklar, ob Bax Bcl-2 hemmt, oder umgekehrt.

Neben dem oben beschriebenen extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion über den CD95-Rezeptor wird in neueren Studien vom intrinsischen, bzw. mitochondrialen Weg gesprochen, wenn die Apoptoseinduktion über Regulatorproteine gemeint ist (Rossi et Gaidano, 2003). Der mitochondriale Weg wird durch die Apoptosehemmenden und Apoptose-stimulierenden Proteine Bax, Bcl-2, Bad, Bid, Bak u.w. reguliert. Dieser Apoptoseweg wird z.B. durch Chemotherapeutika, UV-Strahlen und Nitrogen aktiviert. Die Apoptose-regulierenden Proteine sind an der Mitochondrienmembran lokalisiert. Bcl-2 ist in der inneren Mitochondrienmembran verankert und spielt eine wichtige Rolle beim Erhalt des Membranpotentials (Gupta, 2001). Der intermembranären Spalt enthält Cytochrom C, verschiedene Procaspasen und AIF. Über diese Proteine kann Apoptose induziert werden. Ihre Freisetzung wird durch z.B. Bax, Bad und Bak initiiert, indem die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für diese Proteine erhöht wird, bzw. wie im Falle des Bax Poren gebildet werden (Gupta, 2001). Über das freigesetzte Cytochrom C wird die Caspasekaskade über die Caspase 9 gestartet (Gupta, 2001). Die erste gemeinsame Caspase der Caspasekaskade, in die sowohl der intrinsische, als auch der extrinsische Weg mündet, ist die Caspase 3 (Yoo et al., 2002).

1.2.3. DIE CASPASE-KASKADE

Zur Regulierung der Apoptose gibt es verschiedene Auslöser und verschiedene intrazelluläre Signalwege. Die gemeinsame Endstrecke der mitochondrialen Apoptoseinduktion und der Apoptoseinduktion über den CD95-Rezeptor stellt die Caspase-Kaskade dar (Szabo et Tarnawski, 2000). Caspase bedeutet *Cystinyl-aspartate-specific-proteinase* (Gupta, 2001). Es sind Cystein-Proteasen, die Proteine nach einem Aspartatsäurerest spalten. Sie werden in einer inaktiven Proform gebildet und durch Autolyse oder durch andere Proteasen aktiviert (Gupta, 2001). Insgesamt sind 11 Caspasen bekannt. Durch die Aktivierung eines CD95-Rezeptors wird die Caspase 8 durch Autolyse aktiviert, wodurch die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert werden (Muzio et al., 1998). Die Aktivierung von Procaspasen durch Caspasen wird Caspase-Kaskade genannt. Die aktivierten Effektorcaspasen spalten Substanzen aus dem Cytoplasma und dem Zellkern: z.B. poly-ADP-ribose-polymerase (PARP), ein Enzym, das für DNA-Reperaturen verantwortlich ist, die DNA-PK, die wichtig für den Zellzyklus ist, Lamin B, die Zellkernmembran und die *Inhibitor-of-caspase-activated-DNAse* (ICAD); dieser Hemmstoff der DNAse, der durch Caspasen aktiviert wurde, wird durch Spaltung zu CAD, zu *Caspase-activated-DNAse* (Schulze-Osthoff et al., 1998). Diese DNAse wandert in den Zellkern, wo sie chromosomale DNA spaltet. Die in ca. gleich große Basenpaare aufgespaltene DNA ist ein typisches Zeichen für Apoptose (Schulze-Osthoff et al., 1998). Wenn bei der Apoptoseinduktion Bax und Bcl-2 beteiligt sind, wird Cytochrom C aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien ins Zytoplasma sezerniert (siehe 1.2.2.), worauf Procaspase 9 sich im Zytoplasma anreichert und durch Autolyse in aktivierte Caspase 9 gespalten wird. Diese wiederum aktiviert die Effektorcaspase 3, wodurch die oben beschriebenen Reaktionen induziert werden (Gupta, 2001). Die Caspase ist nicht die gemeinsame Endstrecke für jede Möglichkeit der Apoptoseinduktion (Hale et al., 1996). Wenn AIF aus dem intermembranären Spalt der Mitochondrien sezerniert wird, findet direkt, ohne die Aktivierung von Caspasen, eine ATP-abhängige DNA-Fragmentation im Nukleolus statt (Gupta, 2001).

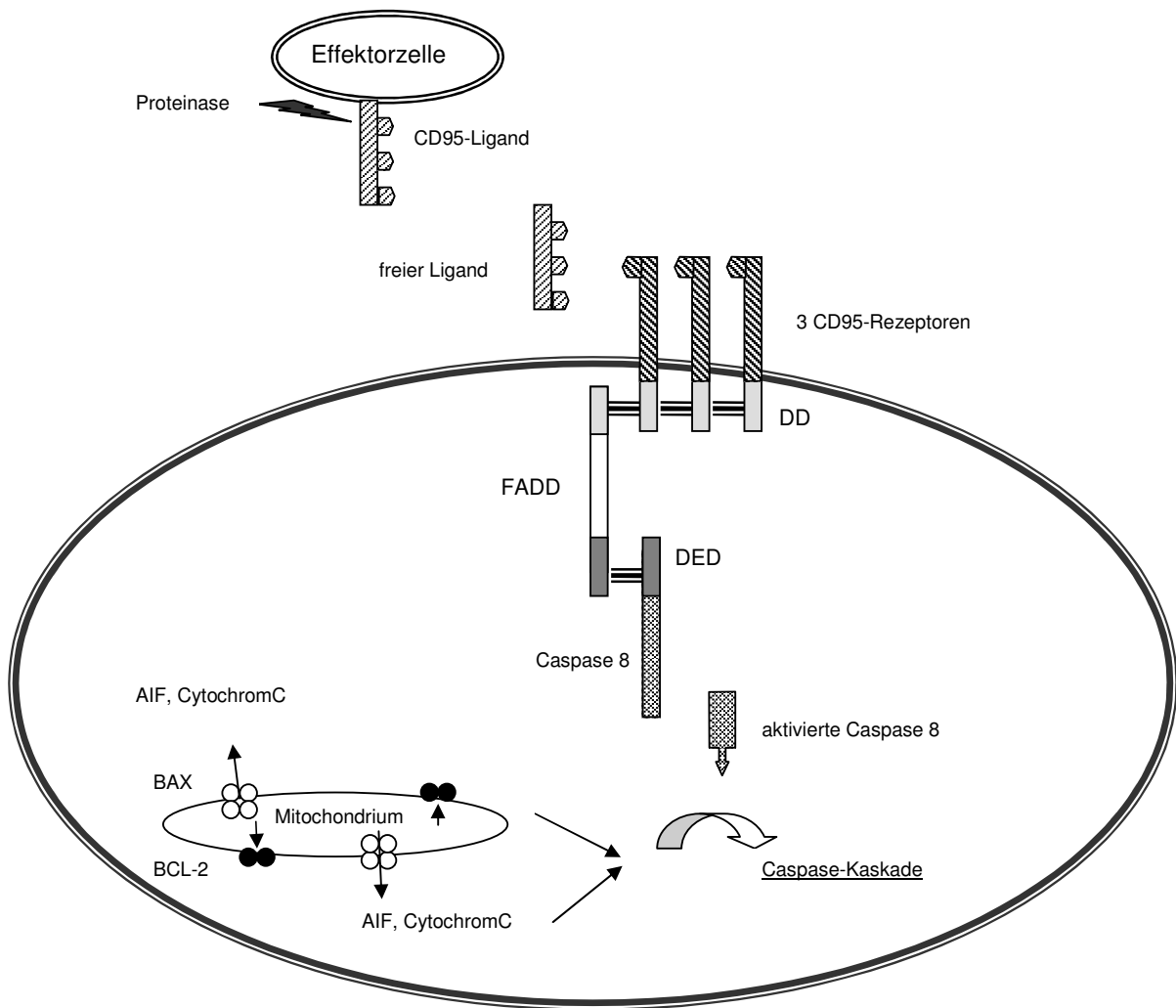


Abb. 2: Schematische Darstellung der Signalübertragung und Apoptoseauslösung über den CD95-Ligand durch Bindung an den CD95-Rezeptor (modifiziert nach Szabo et Tarnawski, 2000, S.6,7): Eine Metalloproteinase an der Membran trennt durch Proteinolyse den extrazellulären Bereich des CD95-Liganden ab, wodurch der lösliche CD95-Ligand entsteht. Er ist ein homotrimeres Molekül, der drei CD95-Rezeptoren bindet. Über die Todesdomäne werden drei CD95-Rezeptoren aneinander gebunden. An diese Todesdomäne bindet ein FADD-Molekül (FAS-associated death domain), das neben dieser Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne (Death effector domain, DED) besitzt. Ebenso hat die Caspase 8 solch eine Todeseffektordomäne, über die sie an den Komplex binden kann. Dieses 55 kDa Protein weist neben der Todeseffektordomäne eine Aspartatprotease auf, mit der die Caspase 8 sich selbst durch Abspaltung aktiviert. Sie stellt das erste Glied der Caspase-Kaskade dar, die durch ihre Aktivierung gestartet wird. Dies ist aufgrund der verschiedenen katalytischen Untereinheiten der Caspase 8 möglich, durch die das Apoptosesignal an weitere Caspasen (6,8) durch Proteolyse weitergegeben wird. Diese Kaskade führt zur Aktivierung von Nukleasen, die die DNA der Zelle fragmentieren und so die Apoptose einleiten. Bax und Bcl-2 sind in der Mitochondrienmembran verankert und können durch die Regulation der Ausschüttung von Cytochrom C und AIF Apoptose induzieren oder hemmen. DD: Death Domain; FADD: Fas-associated death domain; DED: Death effector domaine; AIF: Apoptosis inducing factor

1.3. APOPTOSE IN DEN ZELLEN DER MAGENMUKOSA

1.3.1. ENTWICKLUNGSMECHANISMUS DER ZELLEN DER MAGENSCHLEIMHAUT

In dieser Arbeit wird das Apoptoseverhalten von Magenschleimhautzellen untersucht. Die Magenschleimhaut zählt zu den Wechselgeweben, ist also durch einen hohen Zell-Umsatz gekennzeichnet. Wegen dieses hohen Zellumsatzes spielt neben der Zellproliferation und Zelldifferenzierung v.a. die Apoptose und Nekrose von Zellen eine große Rolle, damit die Zellzahl im Gleichgewicht bleibt (Li et al., 1995). Eine Magendrüse gliedert sich in vier anatomische Bereiche auf: Die Drüsenbasis, der Drüsenhals, der Isthmus der Drüse und die Drüsenspitze (Karam et Leblond, 1995). Ausgangspunkt der Zellentwicklung sind die multipotenten Stammzellen am Isthmus der Magendrüse: Es handelt sich um undifferenzierte Zellen ohne Granula, aus denen durch Teilung verschiedene Vorläuferzellen hervorgehen (Karam et Leblond, 1995). Über die Vorläuferzelle der schleimbildenden Zelle, die erst wenige schleimgefüllte Granula aufweist, differenziert sich auf dem Weg zur Drüsenspitze die Schleimzelle, die durch große Mukus-gefüllte Vesikel charakterisiert ist (Karam et Leblond, 1993b). Ca. 90 % der Schleimzellen entstehen aus den multipotenten Stammzellen, ca. 10 % durch Teilung von Vorläuferzellen (Li et al., 1995, S. 15777). Die Schleimzelle Schleim werden nach ca. 3 Tagen durch Exozytose in das Magenlumen abgegeben (Li et al., 1995). Aus den multipotenten Stammzellen entwickeln sich auch Vorläuferzellen von Drüsenhals-Zellen, die während ihrer Ausdifferenzierung viele Golgi-Vesikel bilden (Karam et Leblond, 1995). Am Drüsenhals können diese „Halszellen“ Schleim noch sezernieren. Sie sind aber noch nicht vollständig ausdifferenziert: Auf ihrer weiteren Wanderung zum Drüsengrund entstehen aus den mukösen Zellen seröse Vorläuferzellen der Hauptzellen. Ca. 60 % der Vorläuferzellen der Hauptzellen entstehen aus den multipotenten Stammzellen, die restlichen 40 % durch Mitose (Karam et Leblond, 1993c). Die Hauptzellen selber wandern immer weiter in Richtung der basalen Anteile der Drüse. In ihren Vesikeln speichern sie Pepsinogen. Das inaktive Pepsinogen wird durch den Kontakt mit Säure im Magenlumen aktiviert. Die Aktivität des Pepsins nimmt ab, je höher der pH-Wert der Magenflüssigkeit ist (Sanders et al., 1983). Die Lebensdauer der

Hauptzellen beträgt 190 Tagen (Karam und Leblond, 1993c). Sie werden durch Apoptose oder Nekrose eliminiert (Karam et Leblond, 1993c). Die Vorstufen der Vorläuferzellen von Parietalzellen gehen nicht nur aus den multipotenten Stammzellen hervor. Sie können auch zu 1–2 % aus den Vorstufen der Vorläuferzellen der Schleim- und Hauptzellen entstehen (Li et al., 1996). Die Vorstufen der Parietalzellen sind durch lange apikale Mikrovilli gekennzeichnet; im Laufe der Ausdifferenzierung nimmt die Zelle an Größe zu und weist ein deutliches kanalikuläres System und große Mitochondrien auf (Karam, 1993). Ihre Ausdifferenzierung ist bereits im Bereich des Isthmus abgeschlossen. Sie wandern als voll ausdifferenzierte Zellen sowohl nach apikal, als auch nach distal, so dass sie im gesamten Drüsenbereich zu finden sind. Parietalzellen sind für den Säuregehalt des Magens verantwortlich. Sie sezernieren mit Hilfe der H^+ - K^+ -ATPase, der Protonenpumpe, H^+ -Ionen gegen ein sehr hohes Konzentrationsgefälle in das Lumen der Magendrüse. Ihre Lebensdauer beträgt 54 Tage. Auch sie werden durch Apoptose oder Nekrose eliminiert (Karam, 1993). In der Regulation der Säureproduktion spielt Histamin eine große Rolle, das von den enterochromaffin-like-Zellen ausgeschüttet wird (Karam, 1995; Prinz et al., 2000). Diese Zellen gehen auch aus den multipotenten Stammzellen des Isthmus hervor. Sie haben nur eine sehr geringe Mitosefähigkeit. Als ausdifferenzierte Zellen wandern sie v.a. in Richtung Drüsenbasis (Karam et Leblond, 1993d). Die Verteilung der ausdifferenzierten Zellen der Magenmukosa sieht also wie folgt aus: An der Drüsenspitze überwiegen Schleimzellen, im Bereich des Isthmus findet man v.a. multipotente Stammzellen, der Drüsenhals zeigt v.a. schleimbildende Halszellen, die sich weiter zu Hauptzellen entwickelt, die dann v.a. im Bereich der Drüsenbasis angesiedelt sind. Enterochromaffin-like-Zellen sind wie Parietalzellen in allen Drüsenteilen zu finden, jedoch mit deutlicher Anreicherung an der Drüsenbasis. Die ständige Neubildung der Zellen macht ein Absterben der Zellen unumgänglich. Neben der Nekrose stellt v.a. die Apoptose einen wichtigen Regulationsmechanismus zum Erhalt des Zellgleichgewichtes dar.

1.3.2. DAS APOPTOSEVERHALTEN DER ZELLEN DER MAGENMUKOSA

Unter physiologischen Bedingungen findet Apoptose in der gesamten Mukosa statt. Am deutlichsten lässt sich Apoptose am Grund und an der Spitze der Magendrüsen nachweisen, da hier die älteren, ausdifferenzierten Epithelzellen zu finden sind (Hall et al., 1994). Die oberflächlichen Mukosazellen werden ca. alle 3–5 Tage erneuert (Stachura et al., 1993 S. 70). Die Erneuerungsrate nimmt in Zeiten des Fastens ab und steigt bei Nahrungsaufnahme oder einer Verletzung der Magenschleimhaut an (Szabo et Tarnawski, 2000). Der Lebenszyklus der Haupt-, Parietal- und ECL-Zellen ist deutlich länger (siehe oben). Es werden einzelne Mukosazellen apoptotisch, die eine schnelle Kondensation des Nukleolus und des Zytoplasmas aufweisen. Daraufhin fragmentiert sich die Zelle, so dass ein Haufen einzelner apoptotischer Körperchen entstehen, die entweder von einer benachbarten Zelle phagozytiert, oder ins Lumen der Magendrüse abgegeben werden (Stachura et a., 1993). Die Apoptoserate in gesunder Mukosa beträgt 2–3 % (Szabo et Tarnawski, 2000 S. 8). Es sind zwei Hauptmechanismen zur Induktion von Apoptose in der Magenschleimhaut bekannt: Zum einen die positive Induktion über Todesrezeptoren, also den CD95-Rezeptor; zum anderen kann Apoptose durch eine Verminderung von Suppressoren, z.B. Bcl-2, und somit über eine Sekretion von Cytochrom C ausgelöst werden (Szabo et Tarnawski, 2000). Über die Apoptoseinduktion der verschiedenen Magenschleimhautzelle ist jedoch wenig bekannt.

Im Weiteren stellt sich die Frage, ob das physiologische Gleichgewicht der Zelllinien isoliert nebeneinander aufrechterhalten wird, oder ob die Möglichkeit des Informationsaustausches unter den Zellen im Falle einer Störung dieses Gleichgewichtes existiert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Ausdifferenzierung der Parietalzellen nicht nur eine Abnahme der Parietalzellen zur Folge hat, sondern auch die Ausdifferenzierung der Hauptzellen vermindert ist. Im Gegenzug dazu nahm die Zahl der Vorläuferzellen im Isthmusbereich zu. Eine Zunahme von ausdifferenzierten Schleimzellen war deutlich nachzuweisen. Auch bei Vorläuferzellen nahm Apoptose zu (Li et al., 1996). In diesen Ergebnissen spiegelt sich die Vernetzung zwischen den verschiedenen Zelllinien wieder und es wird die Schlüsselrolle von Parietalzellen in diesem System deutlich. Um die Regulation

dieses Systems zu erkennen, muss man auch die Reaktion auf verschiedene pathologische Reize untersuchen.

Unter pathologischen Bedingungen kann oft eine deutlich gesteigerte Apoptoserate gemessen werden. Mit am besten untersucht ist die Infektion der Magenschleimhaut mit *Helicobacter pylori*. Es zeigt sich eine deutlich gesteigerte Apoptoserate von bis zu 16 % bei Patienten mit einem Ulcus duodeni bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* (Szabo et Tarnawski, 2000 S. 8); auf diese gesteigerte Apoptose folgt eine Atrophie (Moss et al., 1996; Lamarque et al., 2003; Houghton et al., 2000), auch eine Abnahme der Parietalzellen ist zu verzeichnen (Houghton et al., 2000). Die gesteigerte Apoptose zieht eine Steigerung der Proliferation nach sich, die in einer Neoplasie enden kann (Moss et al., 1996). Das Verhältnis zwischen Apoptose und Zellproliferation kommt bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* ins Ungleichgewicht. Wagner konnte nachweisen, dass auch die Konzentration von *Helicobacter pylori* eine Rolle spielt: Bei geringer Konzentration wird nur Apoptose induziert, die Zellen der Magenmukosa reagieren zur Kompensation mit einer steigenden DNA-Synthese; bei hoher Bakterienkonzentration wird zusätzlich zur Apoptosesteigerung von den Bakterien eine direkte Hemmung der DNA-Synthese induziert, was durch Zellverlust zur Atrophie führt (Wagner et al., 1997). Nach einer Eradikationstherapie normalisiert sich die Apoptoserate und die Proliferationsrate der Schleimhautzellen (Xia et Talley, 2001). Im gesunden Gewebe findet man wenige apoptotischen Zellen im Bereich des Drüsenhalses. Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* wandert die proliferative Zone nach distal, was eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen im Bereich des Drüsenhalses zur Folge hat (Xia et Talley, 2001). Es stellt sich die Frage, wie ein Bakterium, das nicht in die Schleimhaut eindringt, Apoptose auslösen kann.

Eine Theorie stellt das Ammonium in den Vordergrund, das durch die Urease des *Helicobacter pylori* entsteht. Für Urease konnte *in vitro* eine Apoptose-induzierende Wirkung gezeigt werden (Tsuji et al., 1995).

Fan beschreibt die Kontaktaufnahme über MHCII-Moleküle, die als Oberflächenmoleküle, Antigene binden und T-Zellen präsentieren (Fan et al., 1998). Über die Bindung von sog. Superantigenen aus dem Bakterium kann bei einer Bindung mit MHCII-Proteinen Apoptose ausgelöst werden und zusätzlich kommt es durch die Aktivierung von T-Zellen zu einer erhöhten Ausschüttung von Interferon- γ ,

was zusätzlich zu einer weiteren Apoptosezunahme führt (Fan et al., 1998). Die gesteigerte Interferon- γ -Ausschüttung von T-Zellen und somit die gesteigerte Apoptose bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* wird auch von Bamford beschrieben (Bamford et al., 1998).

In einer weiteren Theorie steht die Hypochlorhydrie des Magens bei einer chronischen Gastritis im Vordergrund, die als Folge einer verminderten Histaminausschüttung aus den ECL-Zellen und somit einer Hemmung der Parietalzellen hervorgeht (Lamarque et al., 2003). Als eine Folge des pH-Anstiegs im Magen konnte eine verzögerte Ausdifferenzierung der Schleimzellen des Magens nachgewiesen werden, mit einer folglich verringerten Anzahl von reifen Schleimzellen (Kakei et al., 1993). Weiterhin hat die Abnahme der Magensäure eine Zunahme von proinflammatorischen Cytokinen wie TNF α und Interferon 1 β zur Folge. Dadurch kommt es zu einer weiteren direkten Apoptoseinduktion und somit zu einer weiteren Abnahme der Parietalzellen (Neu et al., 2003; Rad et al., 2003; Lamarque et al., 2003). Auch andere Autoren konnten eine Zunahme von TNF α bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* nachweisen (D'Elis et al., 1997).

Ein anderer Erklärungsansatz für die gesteigerte Apoptose bei einer chronischen *Helicobacter-pylori*-Gastritis greift auf das CD95-System zurück. Bei einer chronischen Gastritis findet man in der Magenmukosa deutlich mehr T-Lymphozyten als in gesunder Schleimhaut (Bamford et al., 1998). Der CD95-Ligand kann nicht von den Mukosazellen des Magens exprimiert werden, aber v.a. Lymphozyten der T-Zelllinie produzieren ihn (Suda et al., 1995). Desweiteren kann eine deutlich höhere Expression von CD95-Rezeptor und von CD95-Ligand bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden (Houghton et al., 1999; Rudi et al., 1998). In gesunder Mukosa findet man CD95-Rezeptoren und den CD95-Ligand nur in sehr geringem Maße (Rudi et al., 1998; Wang et al., 2000a). Der CD95-Ligand konnte nur in Haupt- und Parietalzellen im Bereich des Drüsengrundes nachgewiesen werden, kein CD95 wurde am Drüsenshals und -isthmus und im Bereich der oberflächlichen Schleimzellen gefunden (Houghton et al. 2000). Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* steigt der Anteil der CD95-positiven Zellen in allen Bereichen der Drüse deutlich an, die deutlichste Expression zeigen Parietalzellen (Houghton et al., 2000). Durch die Bindung des CD95-Liganden aus den eingewanderten T-Lymphozyten bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* an die CD95-Rezeptoren der Mukosazellen wird Apoptose ausgelöst (Wang et al., 2000a). Durch das Blockieren der CD95-

Rezeptoren bleiben die beschriebenen Veränderungen durch *Helicobacter pylori* weitgehend aus (Rudi et al., 1998; Houghton et al., 2000; Wang et al., 2000a).

Es gibt auch die Möglichkeit verschiedene Theorien zu verbinden. Wang beschreibt, dass bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* die Apoptose direkt durch Interferone und TNF α ausgelöst wird (Wang et al., 2000a). Dadurch entsteht eine Entzündung, bei der die CD95-Rezeptoren gesteigert exprimiert werden. Die einwandernden T-Zellen sezernieren CD95-Ligand, was zu einer gesteigerten Apoptose führt (Wang et al., 2000a; Kim et al., 2000). Auch die CD95-Rezeptoren der Mukosazellen wurden vermehrt gebildet und konnten auch nach Zugabe von CD95-Liganden Apoptose auslösen (Jones et al., 1999). Die meisten Theorien verbindet folgendes Modell zur Erklärung wie ein Bakterium Apoptose auslösen kann: Urease bindet an MHCII-Komplexe und löst so eine Entzündung aus (Fan et al., 1998). Durch die so ausgelöste Entzündungsreaktion werden CD95-Rezeptoren vermehrt gebildet. Außerdem wandern T-Zellen ein, die Interferon- γ sezernieren und somit die Entzündung weiter vorantreiben und Apoptose induzieren. Die dadurch angezogenen T-Zellen sezernieren CD95-Ligand und steigern über die Bindung an CD95-Rezeptoren die Apoptoserate. Diese Untersuchungen zeigen die enge Verzahnung von verschiedenen Systemen bei der Auslösung von Apoptose bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori*.

Die gesteigerte Apoptose zieht eine Atrophie und somit eine gesteigerte Proliferation nach sich (siehe oben). Entwickelt sich über eine Gastritis eine Atrophie und eine Dysplasie steht die gesteigerte Apoptose im Vordergrund. Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* konnte eine gesteigerte Expression von Apoptose-induzierendem Bax und eine fallende Expression von Apoptose-hemmendem Bcl-2 gezeigt werden, im Gegensatz zu gesunder Mukosa (Konturek et al., 1999; Takagi et al., 1999). Entwickelt sich aus einer Gastritis ein Karzinom steigt die Proliferationsrate deutlich über die Apoptoserate (Xia et Talley, 2001). Parallel dazu konnte bei Magenkarzinomen vom intestinalen Typ eine steigende Expression von Bcl-2 und eine fallende Expression von Bax nachgewiesen werden (Krajewska et al. 1996). Ein Zusammenhang dieser ansteigenden, bzw. sinkenden Expression v.a. von Bcl-2 mit Malignität oder Überlebensdauer beim Magenkarzinom konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Deshalb lässt sich Bcl-2 nicht als Prognosefaktor anwenden (Lauwers et al., 1994; Müller et al., 1998).

Die Apoptose der Mukosazellen des Magens spielt eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen. Neben den Hauptzellen scheinen v.a. die Parietalzellen eine zentrale Rolle im Zellverband der Magenschleimhaut zu spielen. Deshalb ist auch eine isolierte Untersuchung dieser Zellen unerlässlich. Neben den Apoptosemediatoren Bax und Bcl-2 scheinen v.a. die CD95-Rezeptoren von besonderer Bedeutung im Bereich der Magenmukosa. In dieser Arbeit werden deshalb die wichtigen Haupt- und Parietalzellen isoliert auf ihr Apoptoseverhalten hin untersucht im Zusammenhang mit Bax- und Bcl-2. Das Vorkommen und die Stimulierbarkeit von CD95-Rezeptoren auf Haupt- und Parietalzellen steht v.a. in Bezug auf das große Interesse, mehr über den Pathomechanismus von *Helicobacter-pylori*-Infektionen zu erfahren, im Vordergrund.

1.4. AUFGABENSTELLUNG DIESER ARBEIT

1. Apoptose in der Magenmukosa stellt eine zentrale Rolle in Bezug auf Pathologien des Magens dar. Eine Veränderung der Apoptoserate konnte für Gastritiden und für Magenkarzinome gezeigt werden. Das Apoptoseverhalten von isolierten Haupt- und Parietalzellen in Kultur wurde bisher nicht untersucht und stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um Regulationsmechanismen der Apoptose an isolierten Zellen zu untersuchen. In dieser Arbeit wird die Apoptoserate bei isolierten, hoch angereicherten Haupt- und Parietalzellen in Kultur untersucht.
2. Es wurden schon viele verschiedene Zellarten nach Ihrem Apoptoseverhalten untersucht, auch die Zellen der Magenmukosa. Unterschiede in der Apoptoseregulation der verschiedenen Magenzellen sind jedoch noch nicht bekannt. In dieser Arbeit wird die Frage bearbeitet, inwiefern sich isolierte Haupt- und Parietalzellen in der Regulation von Bax und Bcl-2 in einer 48-stündigen Kultur unterscheiden. Bax und Bcl-2 wurden als wichtige Mediatoren der intrinsischen Apoptoseinduktion ausgewählt.
3. Als zweiten Weg der Apoptoseinduktion in Magenzellen ist der extrinsische Weg, also der Weg über den CD95-Rezeptoren bekannt. Auch die Regulation der CD95-Rezeptoren wurde an isolierten Haupt- und Parietalzellen untersucht. Um die Funktionalität dieser Rezeptoren zu zeigen wurde über diese Rezeptoren Apoptose ausgelöst.

2. METHODIK

2.1. DIE ZELLPRÄPARATION

2.1.1. LÖSUNGEN

Stock-Lösung I (10x)

- NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	5 mM	0,69 g/l
- NaHPO ₄ x 2H ₂ O	10 mM	1,78 g/l
- NaHCO ₃	200 mM	16,80 g/l
- NaCl	700 mM	40,91 g/l
- KCl	50 mM	3,73 g/l
- D(+)-Glucose	110 mM	21,80 g/l

Hepes (10x)

- Hepes (Merck)	500 mM	119,1 g/l
-----------------	--------	-----------

EDTA (100x)

- Titriplex III (EDTA)	200 mM	7,44 g/100 ml
------------------------	--------	---------------

Lösung IV (10x)

- CaCl ₂ (wasserfrei)	100 mM	1,11 g/100 ml
- MgCl ₂ x 6H ₂ O	150 mM	3,05 g/100 ml

Inkubationslösungen

	Lösung A	Lösung B
Stocklösung I (10x)	100 ml	100 ml
Hepes (10x)	100 ml	100 ml
EDTA (100x)	4 ml	-
Lösung IV (10x)	-	10 ml
H ₂ O dest.	785 ml	790 ml
Mit 2N KOH pH auf	7,8	7,4
BSA (Serva)	10 g	5 g

Tab. 1: Zusammensetzung der Inkubationslösungen A und B zur Zellisolation

Kulturmedium:

Die Kulturmedien müssen unter sterilen Bedingungen hergestellt werden.

	Hauptzellen 500 ml	Parietalzellen 1l
DMEM (Sigma)	7,78 g	15,57 g
Gentamycin (100 µg/ml, Sigma)	1,00 ml	2 ml
ITS (5µg/ml, Sigma)	2,50 ml	5 ml
Hydrocortison (10 µg/ml, Sigma)	50 µl	100 µl
BSA	1 g	2 g
H ₂ O	442 ml	984 ml
pH mit Tris (1 molar)	7,4	7,4
NaHCO ₃	0,3 g/100 ml	-
EGF (100 µg/2 ml H ₂ O, Sigma)	-	10 µl/10 ml
Fetal Calf Serum (FCS, GIBCO)	50 ml	-
Steril Filtrieren in einem Filter (Nalgene) mit Porengröße	0,45 µm	0,2 µm

Tab. 2: Zusammensetzung der Kulturmedien für Haupt- und Parietalzellen

PBS (20x)

- NaCl 160,0 g/l
- KCl 4,0 g/l
- Na₂HPO₄ x H₂O 28,8 g/l
- KH₂PO₄ 4,0 g/l
- den pH auf 7,4 einstellen

Regular Medium für 5 l

- NaCl 140,0 mM 40,90 g
- MgSO₄ x 7H₂O 1,2 mM 1,50 g
- CaCl₂ 1,0 mM 0,55 g
- D(+) Glucose x H₂O 11,1 mM 10,00 g
- HEPES 10,0 mM 11,90 g
- den pH mit 2 N KOH auf 7,4 einstellen
- BSA Albumin bovine Fraktion V 5,00 g
- DL-Dithiothritol 363 mg

Percoll-Gradient

Stammlösungen (4 Wochen im Kühlschrank haltbar)

Lösung B

- MgSO₄ 12 mM 2,96 g/l
- CaCl₂ 12 mM 1,96 g/l
- autoklavieren

Lösung C

- NaCl 118 mM 68,96 g/l
- HEPES 14 mM 33,36 g/l
- Tris 7 mM 8,48 g/l
- KH₂PO₄ 3 mM 4,08 g/l
- K₂HPO₄ 2 mM 4,56 g/l
- autoklavieren

Am Präparationstag wird hergestellt:

Puffer 100 ml

- Lösung B 10 ml
- Lösung C 10 ml
- H₂O dest. 80 ml
- D(+) Glucose 0,4 g
- mindestens 20 min mit Carbogen begasen
- pH mit Tris (1 mol) auf 7,4 einstellen

Gradient 60 % Percoll:

- Puffer 33,0 ml
- Lösung C 7,0 ml
- Percoll (Pharmacia) 60,0 ml
- DTT (Sigma) 0,01 g
- BSA 1,00 g

In zwei Gradientengefäße wurden jeweils 24 ml Gradient gegeben und anschließend zentrifugiert.

Trypanblau 25 g, Firma Merck

Neugebauer-Zählkammer

2.1.2. ARBEITSSCHRITTE ZUR ZELLGWINNUNG

Isolieren der Zellen aus Rattenmägen

Zur Zellgewinnung wurden fünf weibliche 6 Wochen alte Sprague Dawley CD-Ratten mit einem Gewicht von 150 bis 200 g verwendet (Schmidtler et al., 1994). Die Ratten hatten ad libidum Zugang zu Nahrung und sollten nicht länger als ein bis zwei Tage im Tierstall verbracht haben. Die Tiere wurden unter Einhaltung der Vorschriften des Tierschutzgesetzes getötet. Bei der Präparation wurden die Mägen der Ratten herausgenommen, die Mukosa nach außen gestülpt und das so entstandene Magensäckchen gut verschlossen. Anschließend wurde in das Innere

des Magensäckchens mit einer Spritze 3 ml Pronase A (Boeringer) eingespritzt, die in einer Konzentration von 1,4 mg/ml in Lösung A gelöst wurde. Pronase A besteht aus verschiedenen Endo- und Exoproteasen, die fast alle Peptidbindungen in Proteinen und Peptiden spalten. Der kalziumfreie Puffer bewirkt ein Aufbrechen der interzellulären Verbindungen (Sedar et Forte, 1964; Lewin et al., 1974). Die Zellen der Magenschleimhaut wurden so schonend von der Basalmembran gelöst. Die gefüllten Magensäckchen wurden in Lösung A 35 min inkubiert, wobei sie mit Sauerstoff begast und auf 37° C erwärmt wurden. Die Erwärmung wurde durch ein doppelwandiges Glasgefäß (Haake B3), durch das 37° C warmes Wasser floss, gewährleistet. Folgendes Inkubationsschema wurde eingehalten: Nach 35-minütiger Inkubation in Lösung A folgte eine 10-minütige Inkubation in Lösung B. Daran schlossen sich erneut 30 min in Lösung A an. Bis zu diesem Punkt erfolgten die Inkubationsschritte unter Begasung von Sauerstoff. Nach der Inkubation wurden die Lösungen jeweils verworfen. Für die Zellgewinnung wurden die Magensäckchen in ca. 50 ml Lösung B 8 min mit einem mehrkantigen Rührfisch bei 250 U/min gerührt. Danach inkubierten die Mägen 20 min ohne Sauerstoffbegasung in Lösung A. Im Folgenden wurden die Zellen noch zweimal in Lösung B gerührt; erst für weitere 8 min, dann zuletzt für 10 min. Die abgelösten Zellen wurden nach jedem Schritt bei 800 U/min 3 min abzentrifugiert, in 10 ml RM resuspendiert und in den Elutriator (JE-6B elutriator Rotor, Beckmann-Instruments) eingespritzt.

Die Elutriation und das Auftrennen der Haupt- und Parietalzellen

Das Auftrennen von Zell- oder Partikelsuspensionen durch Zentrifugation wurde von Soll und Sanders beschrieben (Soll, 1978; Sanders et Soll, 1989). Der Elutriator trennt Suspensionen von Zellen oder Partikel durch das Entgegenwirken von Flüssigkeitsstrom und Zentrifugalkraft auf (McEwen et al., 1968). Er ist aufgebaut wie eine Zentrifuge, in deren Rotor eine konusförmige Kammer eingebaut ist, durch die das Medium mit einem veränderbaren Flüssigkeitsstrom gepumpt wird. Der Zufluss zu dieser Kammer befindet sich an der Spitze der Kammer, dem Ort der größten Zentrifugalkraft, da diese Spitze am weitesten von der Rotorachse entfernt ist. Die breite Basis der Kammer ist am rotornahen Ende, wo die Suspension die Kammer wieder verlässt. So wirkt der Flüssigkeitsstrom der Zentrifugalkraft entgegen. Sind beide Kräfte gleich, verbleiben die Partikel in der Kammer und nur die Flüssigkeit

wird wieder aus der Kammer gepumpt. So können Partikel in der Kammer konzentriert werden. Will man nun Partikel aus der Kammer herauswaschen, muss die Zentrifugalkraft verkleinert oder die Flussgeschwindigkeit vergrößert werden. Dies geschieht, indem die Rotorgeschwindigkeit entweder verringert wird oder die Pumpleistung erhöht wird. Um die Flussgeschwindigkeit konstant zu halten, wurde die Pumpe vor jedem Versuchstag geeicht. Die Haupt- und Parietalzellen wurden nach folgendem Schema elutriert (Schmidtler et al., 1994):

- Einspritzen von 10 ml Zellsuspension bei 2.300 U/min und 16 ml/min
- nach 3 min auf 2.100 U/min stellen
- nach weiteren 3 min auf 2.100 U/min stellen, Pumpe auf 21 ml/min einstellen und 250 ml RM zum Waschen durch die Kammer laufen lassen
- Auffanggefäß für Hauptzellen unter den Ausgangsschlauch stellen, Pumpleistung auf 40 ml/min erhöhen und das Auffanggefäß mit 250 ml füllen
- bei gleicher Stufe mit 100 ml RM waschen
- das erste der beiden Auffanggefäße für Parietalzellen unter den Ausgangsschlauch stellen, Pumpe auf 62 ml/min stellen und 2 Gefäße füllen
- die Elutriation beenden, Rotor ausschalten und zur Säuberung der Kammer die Pumpe hoch einstellen

Die aufgetrennten Zellen wurden abzentrifugiert, in Kulturmedium gesammelt und zur weiteren Reinigung auf den Percoll-Gradienten (s.u.) aufgetragen. Dazu resuspendierte man die Zellen in 5 ml sterilem RM, überschichtete den Gradienten vorsichtig mit dieser Suspension und zentrifugierte sie bei 1.500 G 20° C 30 min. Die Hauptzellen befinden sich in der 40 ml/min Fraktion, die Parietalzellen befinden sich in der 62 ml/min-Phase, also in der Interphase zwischen Percoll und Puffer. Die Zellen wurden vom Gradienten abgenommen. Parietal- und Hauptzellen wurden in Einzelgefäße überführt und mit RM gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Neugebauer-Zählkammer gezählt. Die Anreicherung der Haupt- und Parietalzellen wurde durch Antikörperstaining bei Hauptzellen mit polyklonalem Ziege-anti-Ratte-PepsinogenII-AK (1:1.000) und bei Parietalzellen mit monoclonal Maus-anti-Ratte-H⁺/K⁺-ATPase mab 4A6 (1:2.000) nachgewiesen (Schmidtler et al., 1994). Der Anteil der Hauptzellen lag bei ca. 85 %, der der Parietalzellen bei ca. 95%.

2.2. DIE ZELLKULTUR

Zur Kultivierung der Zellen wurden diese auf 6-Well-Platten ausgebracht. Dazu wurden die einzelnen Wells beschichtet: Für Parietalzellen mit Cell-Tak (Collaborative Biochem. Products) als Beschichtungsmaterial, das 1:1 mit sterilem NaHCO_3 verdünnt wurde. Dazu wurden 30 μl des Gemischs mit einer Eppendorfpipette in einem Well so gleichmäßig wie möglich verteilt. Für die Hauptzellen wurde eine Kollagenbeschichtung verwendet. Hierbei wurde zu 30 ml sterilem PBS 100 μl Kollagen Typ I (Collaborative Biochem. Products) gegeben, gut gemischt und jeweils 1 ml in jedes Well pipettiert, wodurch man eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ erreichte. Nach dem Trocknen konnten die Zellen in 1 ml Kulturmedium suspendiert ausgebracht werden. Für die Kultivierung von Hauptzellen wurden folgende Angaben von Okayama und Sanders übernommen (Okayama et al., 1994 S. 170; Sanders et al., 1983 S. G641). Hauptzellen benötigten im Kulturmedium Bicarbonat, da sie bei 37° C unter 5 % CO_2 /95 % O_2 -Begasung kultiviert wurden. Ebenso wurde dem Medium FCS beigegeben. Das Kulturmedium der Parietalzellen und die Kulturbedingungen wurden von Chew beschrieben (Chew et al., 1989 S. G255). Dem Medium wurde EGF beigegeben und die Zellen wurden bei 37° C und 100 % O_2 in einer feuchten Box kultiviert (Chen et al., 1991). Zur Kontrolle der Überlebensraten der Zellen in Kultur wurde eine Färbung mit Trypanblau durchgeführt. Die Zellmembran vitaler Zellen ist für den Farbstoff Trypanblau nicht durchlässig. Bei nekrotische Zellen ist die Integrität der Zellmembran dagegen zerstört, wodurch Trypanblau in die Zelle aufgenommen wird. Somit färben sich die Zellen blau an, was im Lichtmikroskop überprüft wird. Es wurden 20 μl Zellsuspension mit einer Zellkonzentration zwischen 10^5 und 10^7 Zellen mit 80 μl einer 0,5 prozentigen Trypanblaulösung angefärbt und unter dem Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Die blauen Zellen entsprechen nekrotischen Zellen. Zum Auszählen wird eine Neugebauer Zählkammer verwendet

Für Färbungen von Einzelzellen, müssen diese auf Glasobjektträger anwachsen. Dafür wurden diese zweimal abgeflammt und mit 15 μl Cell-Tak- NaHCO_3 -Gemisch beschichtet. Auf die Glasobjektträger wurden 1×10^5 Parietal- und 5×10^5 Hauptzellen in Kulturmedium angesät. Die Objektträger, die zur Kultivierung

mit Kulturmedium bedeckt wurden, wurden zu den gleichen Bedingungen inkubiert wie oben beschrieben die Einzelzellsuspensionen.

2.3. LÖSEN DER ZELLEN

Da die Zellen auf den Platten anwachsen, musste eine Methode gefunden werden, um die Zellen möglichst schonend von der Platte zu lösen. Nach Versuchen mit verschiedenen Substanzen kam heraus, dass das effektivste und schonendste Vorgehen das Ablösen mit Trypsin-EDTA in 1:10 PBS war. 1 ml dieser Lösung wurde auf die Zellen gegeben und ca. 3 min belassen. Während dessen wurden mit einer Eppendorfpipettenspitze die Zellen vorsichtig von der Platte abgeschabt. Danach mussten die Zellen mit PBS gewaschen werden.

2.4. ISOLIERUNG VON RNA, DIE REVERSE TRANSSKRIPTION UND DIE POLYMERASEKETTENREAKTION

2.4.1. LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

- reines Chloroform
- Isopropylalkohol
- 75 prozentiges Ethanol in DEPEC-Wasser
RNAse-freies Wasser in RNAse-freien Flaschen. Dazu wird Diethylprocarbonat (DEPEC) bis 0,01 % zugegeben, über Nacht gerührt und autoklaviert.
- Trizol Reagent Life Technologies Gibco BRL
- 75 prozentiges Ethanol in DEPEC
- MOPS: 10x MOPS = 4-Morpholinpropansulfonsäure 1 l
 - 41,85 g MOPS
 - 4,10 g Natriumacetat
 - 3,70 g EDTA

- pH auf 7,0 mit NaOH einstellen, steril filtrieren und in einer dunklen Flasche aufbewahren
- Desoxyribonuclease (DNase) I Amplification Grade Life Technologies Gibco BRL
DNase I, Amp. Grade
10x DNase I Reaction Buffer
25 mM EDTA (pH 8,0)
 - Random Primer Quiagen
 - SuperScript II Life Technologies Gibco BRL: 5x First Strand Buffer
0,1 M DTT
SuperScript II
 - 25 mM dNTP Mix F-560 XL Finnzymes Oy
 - Mineralöl Sigma light white oil
 - Taq PCR Master Mix Qiagen
 - Primer von MWG Oligo Synthese Report
 - Agarose
 - TAE (50x): 242 g TRIS
57,1 ml 100 prozentige Essigsäure
100 ml EDTA pH 8,0 (Stock 0,5 M)
ad 1 l steriles H₂O, autoklavieren
 - Längenstandard Bioladder TM
 - Ladepuffer: 10x
0,04 % (w/v) Bromphenolblau
0,04 % (w/v) Xylencyanol FF
2,5 % (w/v) Ficoll (400)
in TAE-Puffer
 - Beckmann DU 640 Spektralphotometer
 - Eppendorf Centrifuge 5403
 - Mikro 22R Hettich Zentrifuge
 - Power Supply Consort E 425
 - Biometra Powersupply
 - UV-Kammer MWG Biotech
 - Eppendorf Mastercycler
 - Agarose Gel Electrophoresis Systems
 - Safeseal Tips verschiedene Größen (Biozym) DNase-, RNase- und Pyrogen-frei

2.4.2. RNA-ISOLIERUNG MIT TRIZOL

Theoretische Grundlagen

Trizol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die zur Isolierung der gesamten RNA aus Zellen oder Gewebeproben dient. Diese „one-step-RNA-Isolierung“ wurde von Chomczynski und Sacchi 1987 entwickelt (Chomczynski et Sacchi, 1987). Trizol bricht die Zelle und ihre Organellen auf, die RNA jedoch bleibt intakt. Nach der Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation bilden sich zwei Phasen, eine wässrige und eine organische, wobei die RNA sich ausschließlich in der wässrigen Phase befindet. In der Interphase zwischen der wässrigen und der organischen Phase ist als weißer Film die DNA der Probe gelöst, in der organischen Phase die Proteine. Die wässrige Phase mit der RNA wird abgenommen und in Isopropylalkohol wieder ausgefällt.

Diese Methode zur RNA-Isolation lässt sich sowohl bei sehr kleinen (50–100 µg), als auch sehr großen Probenmengen (> 1 g) anwenden. Ebenso ist auch eine Analyse von verschiedenen Zellzahlen (5×10^6 bis $> 10^7$) und verschiedenen Längen von RNA möglich: Kleine RNA-Fragmente (0,1 bis 0,5 kb), ribosomale RNA (2 und 4 kb) und RNA mit hohem Molekulargewicht (>5 kb) (Chomczynski, 1993 S.535).

Bei dieser von Chomczynski und Sacchi entwickelten Methode von 1987 ist aufgrund der kurzen Arbeitszeit die Gefahr der Kontamination der Probe mit RNase-haltigem Material gering, ebenso senkt sich durch die einfache und kurze Durchführung das Risiko für Fehler, z.B. beim Pipettieren. Es hat sich herausgestellt, dass die Trizol-Methode von den „single-step“-Methoden das beste Ergebnis hinsichtlich der Sensitivität und der Reproduzierbarkeit erzielte (Verhofstede et al., 1996).

Arbeitsschritte

Vorsichtsmaßnahmen

Da überall exogene RNase vorhanden ist, z.B. auf Händen, Glasgeräten und Pipetten, wurde strengstens darauf geachtet, dass immer mit Handschuhen,

mit sterilisierten Glas- und Plastikgeräten und mit separaten Pipetten gearbeitet wurde. Reaktionsgefäße und Lösungen wurden bei 121° C und 2 bar autoklaviert und danach bei 100° C 4 h getrocknet. Alle Puffer wurden mit DEPEC-Wasser hergestellt und bei 4° C gelagert. Zum Pipetieren wurden nur RNase freie Spitzen mit Filter (aerosoldicht) verwendet und alle Arbeitsschritte wurden auf Eis, bzw. in auf 4° C gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Ebenso wurden bei Arbeiten mit Trizol immer Handschuhe und ein Augenschutz getragen, der Kontakt mit der Haut und der Kleidung vermieden und unter dem Abzug gearbeitet. Oberflächen, Arbeitsplätze und Geräte wurden nach Benutzung mit 10 prozentiger Natriumhydrochloridlösung gesäubert, um Nukleinsäuren, Fremd-DNA und PCR-Produkte zu zerstören (Erlich, 1989).

Homogenisierung

Der Zellrasen (Hauptzellen wurden mit ca. 0.5×10^6 und Parietalzellen mit ca. $0,35 \times 10^6$ Zellen pro Well zur RNA-Isolierung ausgesät) wurde mit 1 ml Trizol überschichtet (Chomczynski et Sacci, 1987). Für eine Probe standen 12 Wells zur Verfügung. 1 ml Trizol wurde für alle Wells einer Probe verwendet, indem dieser Milliliter Trizol von einem Well zum nächsten überführt wurde. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in 2 ml Eppendorfgefäße gefüllt und konnten bei -20° C tiefgefroren werden.

Phasentrennung

Die homogenisierten Proben wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um das vollständige Auflösen der Kernproteinkomplexe zu sichern. Danach gab man pro Milliliter Trizol 0,2 ml kaltes Chloroform auf jede Probe, schüttelte jede Probe 15 sec mit der Hand und inkubierte sie 15–30 min auf Eis, bis sich zwei Phasen bildeten. Die Proben wurden mit 15000 U/min bei 4° C 30 min zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation waren drei Phasen sichtbar: die oberste, wässrige, farblose Phase, die die RNA enthielt, die weiße Interphase, die aus DNA bestand, und die rote organische Phase mit Proteinen.

RNA-Fällung

Die wässrige Phase wurde in 2 ml-Eppendorfgefäße mit 0,5 ml kaltem Isopropanol überführt und von Hand geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 15.000 U/min bei 4° C 10 min zentrifugiert.

Waschen

Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und auf jede Probe 1 ml 75 prozentiges Ethanol gegeben, gevortext und wieder mit 15.000 U/min bei 4° C 20–30 min zentrifugiert.

Wiederauflösen der RNA

Die gewaschenen RNA wurde 5–10 min an der Luft getrocknet. Auf die RNA wurde 50–100 µl DEPEC-Wasser gegeben und gevortext. Um eine bessere Löslichkeit zu erzielen, wurde die RNA 10 min bei 55–60° C inkubiert.

2.4.3. MESSEN UND DARSTELLEN DER RNA

Photometermessung

Absorptionsmessungen wurden an einem Einstrahl-Spektralphotometer (Beckmann DU 640) durchgeführt. Das Gerät arbeitet in einem Wellenlängenbereich zwischen 190 nm und 1.100 nm. RNA wird in einem Wellenlängenbereich von 220 nm–320 nm gemessen. Das Licht aus zwei Lichtquellen tritt in einen Monochromator ein, wobei es durch ein holographisches Gitter zerlegt wird. Das austretende monochromatische Licht beleuchtet die Probe. Das Licht, das die Probe passiert (also nicht absorbiert wird), wird von einer einzelnen Detektorphotodiode gemessen. Nach jeder Messung kann ein Wellenlängen-Scan mit 1200 nm/min, d.h. mit einem Messpunkt bei jedem Nanometer, durchgeführt werden. Die Konzentration der RNA in µg/ml wird folgendermaßen errechnet:

Optische Dichte (OD) bei 260 nm x Verdünnungsfaktor x Faktor = Konzentration.

Für RNA-Messungen muss der Faktor 40 eingesetzt werden (eine OD entspricht 40 µg/ml).

Es können qualitative und quantitative Messungen durchgeführt werden. In die Mikroküvette wurden 10 µl der 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnten Proben gemessen. Als Leerwert wurde destilliertes Wasser verwendet. Das Photometer gibt die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm, den Quotienten aus beidem und die Konzentration in µg/ml an.

Die Elektrophorese

Ebenso wurde die isolierte RNA elektrophoretisch aufgetrennt, um Mengenunterschiede und die Qualität anhand der Bandenintensität und anhand der Lokalisation der Banden überprüfen zu können. Dazu wurde ein 1 prozentiges Agarose-Gel in Morpholinpropansulfonsäure (MOPS) gelöst hergestellt. Die gelöste Agarose wurde in der Mikrowelle aufgekocht und pro 50 ml Gel mit 833 µl Formaldehyd versetzt. Das Gel wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Kamm eingesteckt. Nach dem Erstarren des Gels pipettierte man in die Taschen des festen Gels 5 µl Probe mit 3 µl Ladepuffer, der Ethidiumbromid enthält. Als Laufpuffer verwendete man MOPS. Das Gel lief bei 60 V und 120 mA für 1–2 h bei 15 cm Elektrodenabstand und wurde unter UV-Licht photographiert (siehe Abb. 3). Es stellen sich die Untereinheiten der RNA (28 S, 18 S und 5 S) nach ihrer Größe aufgetrennt dar.

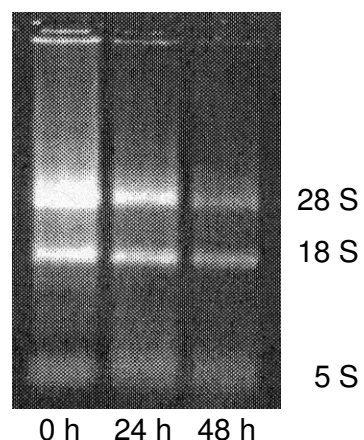


Abb. 3: Elektrophoretische Auftrennung der RNA von Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h in die 28 S, 18 S und 5 S Untereinheit.

2.4.4. DER DNASE-VERDAU

Genomische DNA kontaminiert häufig die isolierte RNA-Präparationen, weshalb der DNase-Verdau zur Entfernung dieser DNA von Sanyal entwickelt (Sanyal et al., 1997).

Desoxyribonuklease I verdaut Einzel- und Doppelstrang-DNA in Oligodesoxyribonukleotide mit einem Phosphat am 5'Ende. Die verwendete DNase von Gibco BRL wird aus bovinem Pankreas isoliert und besitzt eine spezifische Aktivität von >10,000 U/mg.

Der Kit beinhaltet

- DNase I, Amp. Grade
- 10x DNase I Reaction Buffer
- 25 mM EDTA (pH 8.0)

Für einen einfachen Ansatz wurde 1 µl 10x DNase I-Reaktions-Puffer, 1 µl DNase I Amp. Grade, 1 U/µl und RNA, bzw. DEPEC-Wasser bis 10 µl in ein 0,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Dieses Reaktionsgemisch wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurde die DNase-Aktivität durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA gestoppt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 1–2 Tropfen Mineralöl gegeben und die Proben für 10 min auf 65° C erhitzt.

2.4.5. DIE REVERSE TRANSSKRIPTION

In diesem Schritt wird die RNA, nachdem ein DNase-Verdau durchgeführt wurde, in reverse einsträngige cDNA umgeschrieben (Houts et al., 1979). Durch die Verwendung eines Random Primers beginnt der Prozess des Abschreibens an einer beliebigen Stelle der RNA. Dabei schreibt die reverse Transkriptase die RNA in cDNA um und vervielfältigt diese (Sambrook et al., 1989).

In das Reaktionsgefäß wurde nach dem DNase-Verdau unter das Öl 50–250 ng Random Primer pipettiert, gemischt und für 10 min bei 70° C inkubiert. Dabei lagerte sich der Primer an die RNA an. Zum Abbruch dieser Reaktion wurden die Reaktionsgefäße 5 min auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit pipettierte man die verschiedenen Bestandteile des SuperScript II-Kit zusammen:

- 12 µl 5x First Strand Buffer
- 6 µl 0,1M DTT (Dithiotreitol)
- 3 µl 10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP bei neutralem pH, (Sambrook et al., 1989))
- 3 µl SuperScript II

Diese 24 µl wurden unter das Öl in das Reaktionsgefäß gegeben und folgendes Inkubationsschema durchlaufen:

25° C, 10 min

42° C, 50 min

70° C, 15 min

Um später in der PCR sicher zu gehen, dass das PCR-Produkt nur von cDNA und nicht von DNA oder RNA abgeschrieben wurde, wurde eine Kontrollprobe ohne die reverse Transkriptase, also ohne SuperScript hergestellt. Anstelle des Enzyms erfolgte die Zugabe von sterilem Wasser.

2.4.6. DIE RT- POLYMERASEKETTENREAKTION

Theoretische Grundlagen

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaktion, PCR)(Saiki et al, 1985; Mullis et Faloona, 1987) ist eine in den letzten Jahren weiter entwickelte Technik, mit deren Hilfe es möglich ist, in möglichst kurzer Zeit ein einziges, definiertes DNA-Fragment aus der Gesamt-DNA einer vorliegenden Probe, in vitro experimentell zu vermehren. Somit sind Analysen an diesem Fragment möglich (Scharffetter et al., 1991). Der Zusatz RT zur PCR bedeutet, dass ursprünglich RNA untersucht wird, die durch die reverse Transkription in cDNA umgeschrieben wurde, die dann als Matrize in der PCR verwendet wird. Damit spezifische Anteile der DNA abgeschrieben und vervielfacht werden können, müssen Sequenzen bekannt sein, die diese Region flankieren. Diese synthetischen Oligonukleotide (Primer) hybridisieren mit den komplementären Strängen der Zielsequenz. Sie sind so angeordnet, dass die Synthese durch die Polymerase auf dem DNA-Abschnitt zwischen den beiden Primern verläuft. Um einen erneuten Zyklus zu starten muss zur Trennung der Primer ein Denaturierungsschritt erfolgen.

Die einzelnen Grundschrirte der PCR wiederholen sich und bestehen aus dem Aufspalten des DNA-Doppelstranges in zwei Einzelstränge durch Erhitzen (Denaturierung), Anheften des Primers (Annealing) und Verlängern des Primers durch Anheften von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase am 3'-OH-Ende des Primers; die optimale Temperatur für die Polymerase muss eingehalten werden (Synthese). Nach 20- bis 60-facher Wiederholung dieses Zykluses wird eine Amplifikation der Sequenz bis zum Faktor 10^{12} erreicht .

Da die Taq-DNA-Polymerase thermostabil ist, können am Anfang alle benötigten Reagenzien zugegen werden (Erlich, 1989). Die Zyklenzahl, die optimale Temperatur und die Magnesiummenge (1,5–2,5 mM für jeweils 0,2 mM dNTPs) muss für jedes Primerpaar ausgetestet werden, damit ein optimales PCR-Ergebnis erzielt wird (Erlich, 1989). Die Taq-DNA-Polimerase arbeitet sehr schnell und effektiv und weist nur eine sehr geringe 3'Exonuklease-Aktivität auf. Außerdem ist sie in einem sehr weiten Temperaturspektrum wirksam (Innis et al., 1988).

Arbeitsschritte

Um ein Endvolumen von 50 µl zu erhalten, wurden 25 µl Taq PCR Master Mix mit 1 µl von jedem der beiden Primer und 18 µl H₂O gut gemischt. Dazu wurden 5 µl der vorher umgeschriebenen cDNA gegeben. Darüber schichtete man ca. 2 Tropfen Mineralöl. Für die Negativkontrolle wurde an Stelle der cDNA Wasser zugegeben. Es wurde für jedes Primerpaar eine extra Negativkontrolle bei jedem Versuch mit abgeschrieben.

Die verschiedenen Temperaturschritte waren folgendermaßen eingestellt:

Denaturierung:	94° C,	5 min
Annealing:	60–62° C,	1 min
Synthese:	72° C,	1 min

Zur Amplifizierung wurden die Proben so lange auf Eis gehalten, bis der Thermocycler auf 94° C erwärmt war. Erst dann wurden die Proben in die Maschine gestellt. So konnten die unspezifische Bindung der Primer geringer gehalten werden (Erlich et al., 1991). Die Primer wurden nach den angegebenen Referenzen aus Gene Works und mit dem Programm Primer Select hergestellt. Dabei wird die Annealingtemperatur aus dem Gehalt an verschiedenen Nukleotiden nach folgender Formel errechnet: $T_m = 2^\circ \text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ \text{C} \times (\text{C}+\text{G})$ (T_m = Bindungstemperatur; C =

Cytosin; G = Guanidin; A = Adenosin; T = Tyrosin). Der C/G-Gehalt sollte ca 40–60 % betragen. Die Länge der Primerpaare sollte zwischen 18–30 Nukleotide sein. Bei der Primerwahl sollte Exon-/Intron-Aufbau der DNA berücksichtigt werden. Ein Intron sollte von den beiden Primern mindestens überspannt werden. Die konstruierten Primer wurden von der Firma MWG Oligo Synthese-Report hergestellt und in lyophilisierter Form geliefert. Im Folgenden werden die verschiedenen Primer und die für sie optimierten Bedingungen, die durch verschiedene Versuche eruiert wurden, gezeigt:

β₂-Mikroglobulin:

Sens: 5´-CAC´CCA CCG AGA CCG ATG TAT-3´

Antisense: 5´-ATG AGG GTG GGG GAT TGA ACT-3´

Länge des PCR-Produktes: 520 bp

Temperatur: 60 °C

Zyklenzahl: 25

Magnesiumkonzentration: 1,5 mMol

Referenzen: Cole et al., 1989 S. 38

Bax:

Sens: 5´-CCG GCG AAT TGG AGA TGA ACT GGA-3´

Antisense: 5´-GAT GGT GAG CGA GGC GGT GAG G-3´

Länge des PCR-Produktes: 373 bp

Temperatur: 60 °C

Zyklenzahl: 25

Magnesiumkonzentration: 1,5 mMol

Referenzen: Oltavi et al., 1993 S. 612

Die Auswahl des Bax-Primer erfolgte so, dass er Exon 3 und 6 beinhaltet, wodurch sowohl die Splice-Variante Bax α, als auch Bax β abgedeckt sind. Es konnte jedoch nur ein PCR-Produkt der Länge 373 bp nachgewiesen werden, was Bax α entspricht. Das PCR-Produkt von Bax β hätte eine Länge von 480 bp.

Bcl-2:

Sens 186: 5'-GCC GGG ACG CGA AGT GCT ATT G-3'

Antisens 946: 5'-ACC TCA CTT GTG GCC CAG GTA TGC-3'

Länge des PCR-Produktes: 446 bp

Temperatur: 62° C

Zyklenzahl: 35

Magnesiumkonzentration: 1,5 mMol

Referenzen: Sato et al., 1994 S. 191

CD 95-Rezeptor

Sens: 5'-CAA GGG ACT GAT AGC ATC TTT GAG G-3'

Antisens': 5'-GTC CTT AAC TTT TCG TTC ACC AGG-3'

Länge des PCR-Produktes: 141 bp

Temperatur: 63° C

Zyklenzahl: 30

Magnesiumkonzentration: 2,0 mMol

Referenzen: Kimura et al., 1994 S. 668

CD95-Ligand:

Sens 510: 5'-CAG AAG GA(CT) STG GCA GAA CTC CG-3'

Antisens 840: 5'-GA(CT) TGA CCC CGG AAG TAT ACT TTG G-3'

Länge des PCR-Produktes: 209 bp

Temperatur: 60° C

Zyklenzahl: 30

Magnesiumkonzentration: 1,5 mMol

Referenzen: Suda et al., 1993 S. 1170; Takahashi et al., 1994 S. 1568

Dieser Primer ist eigentlich für humane CD95-Liganden, er wurde jedoch in solche Bereiche gelegt, die bei Mensch und Ratte fast vollständig homolog sind. Die beiden Basen, die nicht homolog sind, wurden in die jeweiligen Primer abwechselnd eingebaut. Auf diese Weise konnte dieser Primer sowohl für RNA aus der Ratte, als auch für RNA aus Jurkatzellen verwendet werden.

2.4.7. NACHWEIS DES PCR-PRODUKTS

Der Nachweis des PCR-Produkts erfolgte mittels Gelelektrophorese. Dazu wurden 2 prozentige Agarosegele in TAE-Puffer mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angesetzt (Sambrook et al., 1989). Die Agarose wurde in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer (siehe 2.4.1.) aufgefüllt und in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen auf unter 55° C wurde das Ethidiumbromid zugegeben und verrührt. Das Gel wurde dann in einen Gelträger gegossen. Nach Verfestigung wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, die mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Die Proben wurden in 2 µl Ladepuffer aufgenommen, wenn nötig, mit TAE auf ein Endvolumen von mindestens 10 µl aufgefüllt und in die Taschen pipettiert. Es wurde ein Längenstandard von Bioladder verwendet, der ebenfalls in Ladepuffer aufgenommen wurde. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 6–7 V/cm mit einem Elektrodenabstand von 15 cm für 1–2 h.

Die Gele wurden im UV-Licht bei 254 nm fotografiert (Sambrook et al., 1989).

2.4.8. DIE SEMIQUANTITATIVE RT-PCR

Neben der Aussage der RT-PCR über das Vorhandensein von bestimmten Genabschnitten, lässt sich eine semiquantitative Aussage über die eingesetzten RNA machen. Für die Angabe von Quantität wird die Co-Amplifikation eines „Housekeeping“-Gens durchgeführt (Heinig et al., 1993). In diesem Falle wurde β_2 -Mikroglobulin verwendet (McKenzie et al., 2000), das in allen MHC-I exprimierenden Zellen nachgewiesen wurde (Berggard et al., 1980; Mauxion et Kress, 1987; Cole et al., 1989). Deshalb ist es als Testsystem für die Integrität und Amplifizierbarkeit der RNA aus Haupt- und Parietalzellen geeignet. Wie oben schon beschrieben wurde von einer bekannten Menge RNA cDNA umgeschrieben. Diese reverse Transskription ist eine enzymatische Synthese von cDNA nach einer RNA-Vorlage. Da ein random Primer verwendet wurde, wurde die gesamte RNA abgeschrieben. Die cDNA wird als Matrize in die PCR eingesetzt wo eine Vervielfachung um den Faktor 10^7 stattfindet. Das entstandene Produkt hängt von den eingesetzten Primern

ab, die den zu amplifizierenden cDNA-Anteil flankieren. Diese Amplifikation findet bei einer festgesetzten Temperatur statt (siehe oben); es werden 20–40 Zyklen der Amplifikation durchgeführt. Während dieser Zyklen gibt es verschiedenen Phasen: erstens die Initial-Phase, zweitens die Exponential-Phase und drittens die Plateau-Phase (Heinig et al., 1993). Um die gleiche Kinetik bei den zu vergleichenden Proben zu erzielen, muss die PCR in der exponentiellen Phase gestoppt werden (Heinig et al., 1993). Dafür muss die Zyklenzahl für jedes Primerpaar der PCR so gewählt werden, dass die Intensität der Bande in der Elektrophorese noch ansteigend ist, also die maximale Intensität der Bande noch nicht erreicht ist. Die ideale Zykluszahl wird anhand gleicher PCR-Proben eines Primerpaares mit variabler Zykluszahl ermittelt.

Um verschiedene Proben anhand der Intensität der Banden in der Elektrophorese vergleichen zu können müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

- die gleiche Menge von RNA wird in die reverse Transkription nach Photometermessung eingesetzt
- es herrschen für alle Proben die gleichen Bedingungen während der reversen Transkription
- es wird parallel zu jeder Probe ein *Housekeeping-Gen* (in diesem Fall β_2 -Mikroglobulin) abgeschrieben, deren Banden in der Elektrophorese in den zu vergleichenden Proben die gleiche Intensität zeigen
- es wird die PCR in der exponentiellen Phase gestoppt (Heinig et al., 1993).

Nachdem diese Voraussetzungen erfüllt waren konnten die Banden verglichen werden, die den RNA-Gehalt von Bax, Bcl-2, bzw. CD95-Rezeptor der Proben zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h zeigten.

2.5. DER WESTERN BLOT

2.5.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Eine Methode zur Messung von Proteinen ist der Western Blot. Er erfasst Proteine qualitativ und quantitativ (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981). Das Grundprinzip eines Western Blots ist die Auftrennung eines Proteingemisches nach Größe mit Hilfe eines SDS-Gels in einer Elektrophorese. Danach werden die aufgetrennten Polypeptide von einem Gel auf einen Feststoff durch eine erneute Elektrophorese übertragen (z.B. Nitrozellulose oder PVDF), unspezifische Bindungsstellen abgeblockt und eine Reaktion mit Antikörpern gegen eine spezifische Sequenz von Aminosäuren bzw. gegen Epitope des gesuchten Proteins durchgeführt. Somit können v.a. in Proteinmischungen einzelne Proteine auffindig gemacht (bis zu einer Menge von 1–5 ng) und gemessen werden. Das Ergebnis wird sichtbar durch einen zweiten Antikörper, der an den ersten bindet und der z.B. mit einer Meerrettich-Peroxidase markiert ist. Die Detektion des markierten Proteins erfolgt über die Emission von Licht, das bei der Oxidation von Luminol, das an den zweiten Antikörper gebunden ist, entsteht. Diese Reaktion wird durch die Peroxidase katalysiert. Das ausgestrahlte Licht wird zur Schwärzung eines Röntgenfilms verwendet, auf dem sich die detektierten Banden abzeichnen. Während der Elektrophorese denaturieren die Proteine, wodurch keine Probleme mit Löslichkeit, Aggregation oder Präzipitation entstehen. Zu beachten ist, dass nur monoklonale Antikörper für den Western Blot verwendet werden können (Sambrook et Russel, 2001).

Die Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von geladenen Makromolekülen (z.B. Proteinen) nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine müssen denaturiert und in ihre Untereinheiten zerlegt werden. Dazu werden die Proteine mit SDS und β -Mercaptoethanol gekocht. Dabei können sich SDS-Anionen an die entfalteten Polypeptide binden (etwa an jeden zweiten Aminosäurerest). Somit entsteht ein Komplex aus einem Polypeptid und SDS-Anionen mit nach außen gerichteter negativen Ladung. Die negative Ladung

dieser Komplexe ist proportional zur Größe des Polypeptids. Die ursprüngliche Ladung der Polypeptide spielt somit bei der Auftrennung in der Elektrophorese keine Rolle mehr. Das SDS-Gel wirkt wie ein Molekularsieb, dessen Porengröße durch den Anteil an Acrylamid variiert werden kann. Anhand eines Standards mit Polypeptiden verschiedener Molekulargröße, kann die Größe der unbekanntenen Proteinfraction ermittelt werden (Sambrook et Russel, 2001).

Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert in ihrer ursprünglichen Form als Mischung aus dem Isoenzym B und C den Transfer von zwei Elektronen aus dem Substrat auf Hydrogenperoxid (Shannon et al., 1964). Dabei entsteht durch Oxidation von Luminol eine angeregte Form von 3-Aminophosphat (Isaacson et Wettermark, 1974). Wenn dieses angeregte Luminol in den Ausgangszustand zurückfällt, wird blaues Licht der Wellenlänge 428 nm ausgesandt, das wiederum durch die Schwärzung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

2.5.2. LÖSUNGEN UND MATERIALIEN

- Lysispuffer: 1 mM EDTA
 0,2 % Triton X-100
 10 µg/ml Leupeptin
 1 µg/ml Aprotinin
 20 µg/ml Chymostatin
 100 µg/ml PMSF
- Proteinassay BioRad, München, Deutschland
- Laemmlis Probenpuffer
- 1 mM DTT
- Microplate Reader BioRad Modell 450
- Acrylamid: 30 % T, 2,6 % C, als fertig eingewogene Mischung Firma
 BioRad gelöst in MilliQ
- SDS: 15 prozentige bzw. 10 prozentige Lösung in Aqua dest.
- Trenngelpuffer: 1,5M Tris/HCl pH 8,8 in Aqua dest.
- Sammelgelpuffer: 1,0M Tris/HCl pH 6,6 in Aqua dest.
- APS: Ammoniumperoxidsulfat 10 % in Aqua dest.

- TEMED: N,N,N',M'-Tetramethylenethyldiamin
- 4x Probenpuffer:
 - Dithiothreitol 1,5 M
 - SDS 6 %
 - Bromphenolblau 0,1 %
 - Glycerol 40 %
 - pH mit Tris auf 6,8
- Elektrophoresepuffer: Tris 0,25 M,
SDS 1,0 %
Glycin 1,92 M
- PVDF-Membran BioRad, München, Deutschland
- Gele:

	Trenngel 15 %	Sammelgel 3 %
Aquadest.	2,3 ml	2,8 ml
30 % Acrylamid	5,0 ml	660 µl
1,5M Tris/HCl	2,5 ml	
1,0M Tris/HCl		500 µl
10 % SDS	100 µl	40 µl
10 % APS	100 µl	40 µl
TEMED	4 µl	4 µl
- Transferpuffer:
 - Tris 48 mM
 - Glycin 39 mM
 - SDS 0,037 %
 - Methanol 20 %
 - Aqua dest.
- TBS-Puffer
 - Tris 50 mmol/l (pH7,5)
 - NaCl 150 mmol/l
- TBST: wie TBS + 2 % Tween20
- Block-Lösung aus 5 % fettfreier Trockenmilch in TBST
- Mini-Protean II Elektrophorese-Einheit der Firma BioRad München
- Kaninchen-anti-Ratte Bcl-2-Antikörper, N-19, Santa Cruz Bio., x100 verdünnt
- Kaninchen-anti-Ratte Bax-Antikörper, P-19, Santa Cruz Bio., x100 verdünnt
- Kaninchen-anti-Mensch-Antikörper Fas/CD95/Apo-1, Transduction, Lexington UK, x100 verdünnt
- Esel-anti-Kaninchen IgG mit HRP konjugiert

- Schaf-anti-Maus IgG mit HRP konjugiert
- Streptavidin-HRP 1:1.500 in 5 % BSA Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- Chemilumineszenz detection reagent, Amersham, Braunschweig, Deutschland
- Standard 97–14 kDa (biotinyliert) Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
- ONE-Descan Computerprogramm, Scanalytics

2.5.3. ARBEITSSCHRITTE

Proteinisolierung

Zur Isolierung der Proteine aus den Zellen wurden frisch suspendierte Zellen oder Zellen, die von 6-Well-Platten gelöst wurden (siehe 2.3.) zuerst in PBS gewaschen und die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Es wurde eine Zellkonzentration von $3,6 \times 10^6$ Zellen/100 μ l eingestellt. Nach 5-minütiger Zentrifugation nahm man die Zellen in 50 μ l Lysispuffer auf, inkubierte sie für 30 min auf Eis, sonifizierte sie dreimal und zentrifugierte sie daraufhin bei 4° C, um die Zellkerne zu entfernen, die sich im Pellet anreichern. Im Überstand befinden sich die isolierten Proteine. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Diese Lysate konnten bei -20° C gelagert werden. Die Proteine aus dem Überstand wurden mit Aceton ausgefällt, mit Laemmli's Probenpuffer (Laemmli, 1970) und 1 mM DDT gemischt und 10 Minuten gekocht. 10–45 μ g davon wurden auf ein 15 prozentiges, bzw. 10 prozentiges SDS-Gel aufgetragen.

Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate wurde der Proteinmikroassay von BioRad Laboratories verwendet, der nach der Proteinbestimmung nach Bradford arbeitet (Bradford, 1976). Die Methode beruht darauf, dass Comassie Brilliant Blau nach einer Bindung an Protein einen Shift von 465 nm zu 595 nm erfährt. Der Test wurde nach Anleitung und mit den fertig gelieferten Lösungen aus dem Kit

durchgeführt. Zuerst wurde eine Eichkurve erstellt. Hierzu wurden die verschiedenen Proteinkonzentrationen in Verdünnung 1:1.000 in Lysispuffer eingesetzt. Die zu messenden Proben wurden ebenfalls 1:1.000 verdünnt eingesetzt. Zur Messung mit dem Microplate Reader wurden die Proben in eine Microtiterplatte gegeben und bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gemessen. Die quantitative Protein-Expression erfolgte mit dem ONE-Descan-Computerprogramm.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Herstellung der Gele wurde der Gel-Gießstad nach Anleitung zusammengebaut. In den Zwischenraum zwischen den Glasplatten wurde bis ca. 2 cm unter den oberen Rand Trenngel-Lösung gefüllt und mit Wasser überschichtet. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, wurde das Wasser abgesaugt, der Kamm für die einzelnen Kammern eingesetzt und hinter dem Kamm das Sammelgel luftblasenfrei eingefüllt. Diese Gele konnten bei 4° C befeuchtet gelagert werden. Für den Western Blot von Bax und Bcl-2 wurde ein 15 prozentiges SDS-Gel, für den von CD95 ein 10 prozentiges hergestellt (siehe 2.5.2.).

Probenvorbereitung und Elektrophorese

Die Proben wurden im Verhältnis 1:4 mit 4-fach Probenpuffer vermischt, kurz abzentrifugiert und anschließend im Heizblock zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard für 3 min gekocht. Das Gel wurde in die Elektrophoresenkammer eingespannt, die mit 1x Laufpuffer gefüllt war. Nachdem man die Proben in die Kammern des Gels pipettierte wurde eine Spannung von 150–200 V angelegt. Je nach Vernetzungsgrad des Gels und je nach der Größe des gesuchten Proteins variierte die Dauer der Elektrophorese. Als Standard wurde eine Proteinmischung mit markierten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht verwendet

- Bax: bei 150 V für 90 min
- Bcl-2: bei 150 V für 60 min
- CD95: bei 200 V für 60 min

Der Blot

Die nach Größe aufgetrennten Proteine wurden nun von dem Gel auf eine PVDF (Polyvinyliden Fluorid)-Membran übertragen. Dafür wurde die Membran 2 h in Block-Lösung eingelegt. Anschließend wurden diese Membran, sowie die Filterpapiere und die Fiber Pads 15 min in Transferpuffer eingelegt. Das Gel wurde auf die Membran luftblasenfrei gelegt. Zum Schutz in der Halterung wurde je ein Filterpapier und ein Fiber Pad auf beide Seiten gelegt. Dieses „Sandwich“ wurde in der Gelhalterung luftblasenfrei eingeklemmt. Die schwarze Seite der Gelhalterung schloss man an die Kathode und die durchsichtige Seite an die Anode an, indem der Gelhalter in das Elektromodul der Mini Trans Blot Elektrophorese Kammer eingesetzt wurde (schwarz zu schwarz). Die Elektrophorese-Kammer wurde mit Transferpuffer angefüllt, außerdem wurden ein Rührfisch und ein Kühlmodul in die Kammer gegeben. Die Bedingungen für den Transfer waren folgendermaßen:

- Bax: 135 mA, 90 min
- Bcl-2: 135 mA, 54 min
- CD-95: 200 mA, 75 min

Anschließend wurde die Membran 2 h in TBST mit 10 % Magermilch bei Raumtemperatur geschüttelt. So wurden noch offene Bindungsstellen auf der Membran geblockt. Danach wusch man die Membran 3x 20 min in TBST und gab über Nacht bei 4° C den 1. Antikörper aus dem Kaninchen gegen Bax, Bcl-2 oder CD95 zu.

1. AK:
- Bax: 1:250 in 10 % Magermilch/TBST
 - Bcl-2: 1:1000 in 10 % Magermilch/TBST
 - CD95R: 1:2500 in 10 % Magermilch/TBST

Für die Negativkontrolle wurde dieser Antikörper weggelassen. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Blots mit dem zweiten Antikörper inkubiert:

- Für Bax:
 - Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase 1:1.500,
 - Esel/Schaf-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase 1:2.000 in 5 % BSA/TBST
 - 1 h bei Raumtemperatur

- Für Bcl-2 und CD95R:

Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase 1:1.500,

Esel/Schaf-anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase 1:1.000 in 5 % BSA/TBST

1 h bei Raumtemperatur

Nach dieser Inkubation folgte ein Waschschrift. Sichtbar gemacht wurden die Banden durch Inkubation mit angereicherter „Chemiluminescence detection Reagenz“. Danach wurde die Membran 1 min, 5 min, 10 min und 15 min auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Die Röntgenfilme wurden in der Radiologie des Klinikums rechts der Isar entwickelt. Als Standard wurde eine Proteinmischung mit markierten Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht verwendet.

Die semiquantitative Protein-Expression wurde mit dem ONE-Scan-Computerprogramm durchgeführt. Hierbei werden die zu messenden Banden des eingescannten Röntgenfilmes markiert und die Intensität der einzelnen Pixel gegen den Hintergrund photometrisch gemessen. Somit ergibt sich eine höhere Intensität und somit ein höherer Wert, je dunkler sich eine Bande darstellt, also je mehr Protein nachgewiesen wurde.

2.6. DIE FLUORESZENZ-DURCHFLUSSZYTOMETRIE

2.6.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Die Arbeitsweise des Gerätes

Bei der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS) werden Zellen in einem Flüssigkeitsstrom anhand von Streulicht und Fluoreszenz differenziert. Es können Einzelzellsuspensionen untersucht werden, z.B. Blutzellen oder isolierte Zellen. Bei diesen Zellen kann man Oberflächenantigene, intrazelluläre Antigene, oder Rezeptoren identifizieren. Die Zellen werden durch einen Flüssigkeitsstrom in einer Kapillare stark beschleunigt. Dies führt zu einer hydrodynamischen Fokussierung. So trifft ein fokussierter Lichtstrahl auf die einzelne Zelle, dessen Streulicht und Fluoreszenz quantitativ detektiert wird. Als Lichtquelle wird ein Argonlaser verwendet, der gerichtetes monochromatisches Licht mit hoher Energiedichte aussendet. Das Licht besteht aus gleichphasigen Lichtwellen mit gleicher Amplitude. Da der Laser nur Licht einer Wellenlänge aussendet, können ausschließlich Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Absorptionsspektrum bei dieser Wellenlänge verwendet werden. Wenn der Laser auf eine Zelle auftrifft, entsteht Streulicht, das sich je nach Art der Zelle in Quantität und Qualität unterscheidet. Das Streulicht hängt von der Größe, der Form, der Oberfläche und der Granularität der Zelle ab, da die Streuung von Licht von der Querschnittsfläche, dem Refraktionsindex, der Membranstruktur und den intrazellulären Bestandteilen beeinflusst wird. Die Vorwärtsstreuung („*forwardscatter*“, FSC) macht den größeren Teil der Streuung aus und ist für die Querschnittsfläche, also die Größe sensitiv. Die Seitwärtsstreuung („*sidewardscatter*“, SSC) gibt Auskunft über den Refraktionsindex, somit über die Granularität.

Neben der Ablenkung von Laserstrahlen wird bei der Durchflusszytometrie mit fluoreszierenden Verbindungen gearbeitet. Diese absorbieren Licht von einer bestimmten Wellenlänge, das ihrem Absorptionsspektrum entspricht. Dabei wird ein Elektron in einen energiereicheren Zustand versetzt. Wenn dieses Elektron wieder in den Normalzustand zurückfällt, wird energieärmeres Licht ausgestrahlt, als absorbiert wurde. Dies bezeichnet man als Emissionsspektrum, das immer

energieärmer ist als das Absorptionsspektrum. Der verwendete Argonlaser sendet Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm aus. Aus diesem Grund können nur Fluorochrome verwendet werden, deren Absorptionsmaximum bei ca. 488 nm liegt. Dem entspricht das FITC mit einem Absorptionsspektrum bei 492 nm. Fluorochrome werden als Sonden eingesetzt. Z.B. werden sie an Antikörper gebunden, oder sie werden zum direkten Nachweis von Zellbestandteilen verwendet, indem sie als interkalierende Farbstoffe eingebaut werden. Es können verschiedene Fluorochrome eingesetzt werden; entweder als Mehrfarbenfluoreszenz, wobei die Absorptionsbreite der beiden Fluorochrome gleich ist, aber die Emissionsbreite unterschiedlich, oder als Tandemkonjugate, wobei die Absorptionsbreite des einen Fluorochroms in der Emissionsbreite des anderen Fluorochroms liegt.

Das Ergebnis der Durchflusszytometrie ist die Abgrenzung von Zellpopulationen, die durch unterschiedliche Werte des SSC und des FSC unterschieden werden können. Ausserdem kann in diesen Zellpopulationen der prozentuale Anteil gezeigt werden, der das gesuchte Antigen aufweist. Diese Ergebnisse kann man folgendermaßen darstellen: Es lassen sich korrelierte Zweiparameterdarstellungen erstellen. In einem Diagramm trägt man FSC gegen SSC auf, wodurch sich einzelne Populationen darstellen lassen. In einem zweiten Diagramm stellt man die Rot- gegen die Grünfluoreszenz dar. Als erstes muss man mit Hilfe der Negativkontrolle durch Ändern der Röhrenspannung die Population im FSC/SSC-Diagramm als gut abgrenzbare Wolke einstellen. Sehr kleinen Partikel, z.B. Zelltrümmer kann man mit Einstellung der „*Threshold*“, mit der die Schwelle der Größe der zu erfassenden Partikel eingestellt wird, aus der Bearbeitung entfernen. Im Weiteren stellt man die Fluoreszenz der Negativkontrolle ein. Da diese Negativkontrolle Zellen enthält, die nur mit dem Fluorochrom, ohne Antikörper gefärbt sind, also nur unspezifische Bindungen des/der Fluorochroms/e und die Eigenfluoreszenz zeigen, können die Anteile der Fluoreszenzen so eingestellt werden, dass die Negativkontrolle als Punktwolke (= „*Dot Blot*“) in der linken unteren Ecke und im Histogramm möglichst nahe an der y-Achse liegt. Misst man nun die Probe sollte sich die Punktwolke je nach Stärke der einzelnen Fluoreszenzbereiche in den grünen (entlang der x-Achse), in den rote (entlang der y-Achse) oder in den gemischten rot-grünen Bereich bewegen. Man kann die Ergebnisse als *Dot Blot* oder als Histogramm darstellen. Ebenso kann man die Probe auch nur mit einem Fluorochrom anfärben und die Fluoreszenz gegen den SSC oder den FSC oder

gegen die Eigenfluoreszenz auftragen. Dies ist bei einfachen Fragestellungen, wie z.B. nach dem Vorhandensein eines Rezeptors, angezeigt. Eine Möglichkeit das Messergebnis deutlicher darzustellen, ist die Einstellung der Kompensation. Dies ist hilfreich bei starker Eigenfluoreszenz und beim Überlappen der verschiedenen Emissionsspektren. Dabei wird von der Grün-Fluoreszenz ein bestimmter Rotanteil abgezogen und von der Rot-Fluoreszenz ein bestimmter Grünanteil, wodurch die Punktwolke besser einer Fluoreszenz zuzuordnen ist. Bei der quantitativen Auswertung kann man Eingrenzungen (= *Gates*) um bestimmte Anteile der Punktwolke legen, z.B. um den Grünanteil. Der Computer errechnet dann über die Gesamtzahl der gemessenen Zellen den Anteil der grün-fluoreszierenden Zellen. Wenn diese Grün-Fluoreszenz z.B. durch einen Antikörper gegen einen Rezeptor auf den Zellen verursacht ist, lässt sich daraus erkennen, wieviel Prozent der Zellen diesen Antikörper besitzen.

Als Zellkonzentration wird 10^5 Zellen/10 μ l angegeben, da pro Messung 10^5 Zellen erfasst werden. Hat man eine niedrigere Zellkonzentration, kann man auch nur 5.000 –10.000 Zellen messen. Die Antikörperkonzentration sollte so gewählt werden, dass man sich am Anfang der Plateauphase der Sättigungskurve befindet. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, sollte man möglichst eine Einstellung für jede Zellart und für jede Färbung beibehalten. Da aber die isolierten Zellfraktionen nicht immer aus identischen Einzelzellen besteht, sind bei jeder neuen Messung geringe Änderungen in der Einstellung vorzunehmen, bis die Zellen optimal dargestellt sind. Gerade bei stimulierten apoptotischen Zellen ist bekannt, dass sie, im Gegensatz zu nicht apoptotischen Zellen, einen Anstieg im SSC und einen Abfall im FSC aufweisen (Frey, 1997; Koopman et al., 1994).

Annexin V

Wie schon in der Einleitung (siehe 1.1) erwähnt, unterliegt die Zellmembran Veränderungen in einer sehr frühen Phase der Apoptose. Unter anderem verändert sich die Verteilung der Phosphatidylipide in der Membran. In nicht apoptotischen Zellen findet man nur in der inneren Schicht der Doppelmembran anionische Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylserin, in der äußere Schicht findet man dagegen nur neutrale Phospholipide: Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin. In apoptotischen Zellen dagegen enthält auch die äußere Schicht der Zellmembran

Phosphatidylserin, das vom extrazellulären Raum aus erreichbar ist (Vermes et al., 1995; Frey, 1997). Dies ist dafür verantwortlich, dass Makrophagen apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren und so eine Entzündungsreaktion vermieden wird (Fadok et al., 1992). Annexin V bindet Kalzium-abhängig an Phospholipide, v.a. an Phosphatidylserin (Raynal et al., 1994), nicht aber an Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin (Vermes et al., 1995). An intakte, lebende Zellen kann es nicht binden, weil kein Phosphatidylserin von außen zugänglich ist. Erst wenn die Zelle apoptotisch wird und Phosphatidylserin auch in der Außenseite der Plasmamembran zu finden ist, kann Annexin V binden. So erkennt Annexin V apoptotische Zellen (Frey, 1997). Nach einigen vergleichenden Versuchen ist gezeigt worden, dass Annexin V einen zuverlässigen Marker für frühe Apoptose darstellt (Homburg et al., 1995). Wenn die Zellen durch Nekrose zerstört werden, gelangt Annexin V durch Löcher in der Plasmamembran in die Zelle und bindet von innen an die Phosphatidylserine (Koopman et al., 1994). Dies kann ebenso in einem späten Apoptosestadium geschehen (Darzynkiewicz et al., 1992). Somit muss man bei Färbungen mit Annexin V immer zusätzlich mit einem Farbstoff färben, der eindeutig nekrotische Zelle, bzw. Zellen, deren Plasmamembran nicht mehr intakt ist, identifiziert (Vermes et al., 1995). Hierzu wurde Propidiumiodid verwendet, das durch Löcher in der Plasmamembran in die Zelle eindringt und an DNA bindet (Janssen et al., 1991). Wenn eine Zelle Annexin V und Propidiumiodid positiv ist, kann man keine Aussage mehr treffen, ob die Zelle durch Nekrose oder Apoptose zu Grunde gegangen ist (Koopman et al., 1994; Yoshihide, 1997). Somit lassen sich intakte (Annexin V und PI negative), apoptotische (Annexin V positive und PI negative) und tote (Annexin V und PI positive) Zellen nachweisen. (Vermes et al., 1995).

2.6.2. MATERIALIEN UND GERÄTE

- Annexin V-FITC von Pharmingen
- Propidium Iodid von Sigma 5 µg/ml
- Annexinprobenpuffer
 - 10 mM Hepes/NaOH pH 7,4 0,238 g
 - 140 mM NaCl 0,818 g
 - 2,5 mM CaCl₂ 0,028 gin 100 ml bidest. Wasser lösen
bei 2–8° C aufbewahren
- FACS-Röhrchen von Falcon 12 x 75 mm, steril
- Eppendorf Centrifuge 5415
- Flow Cytometer FACS SCAN Becton Dickinson
- CD95 AK von Transduction Laboratories: 45 kD IgG1 aus der Maus, 250 µg/ml, bindet an N-terminales Ende
- für Stimulationsversuche :
CD95 Ligand von Alexis Corporation
Staurosporin
- Normal goat serum 10 prozentig in PBS von DAKO
- FITC Ziege-anti-Maus-AK , Dianova
- Immunglobuline vom nichtimmunogenen Kaninchen von DAKO
- Kaninchen-anti-Ratte Bcl-2-Antikörper, N-19, Santa Cruz Bio., x100 verdünnt
- Kaninchen-anti-Ratte Bax-Antikörper, P-19, Santa Cruz Bio., x100 verdünnt
- Esel-anti-Kaninchen-Antikörper mit FITC markiert, für Durchflusszytometrie, Pharmingen, x100 verdünnt

2.6.3. ARBEITSSCHRITTE

In dieser Arbeit wurden Haupt- und Parietalzellen gefacst, an denen einmal Annexin V und Propidiumiodid und außerdem CD95-Rezeptoren angefärbt wurden. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin inkubiert bzw. Jurkatzellen mitgefärbt (Cotter et al., 1996).

Die Annexinfärbung

Das verwendete Annexin V von Pharmingen ist an FITC (Fluoreszein Isothiocyanat) gebunden, was jedoch nichts an seiner Bindungskapazität zu Phosphatidylserin ändert (Vermes et al., 1995). Es wurde für jede Probe 5 µl des Annexin V verwendet. In dieser Konzentration kann das gebundene Annexin V bei der Durchflusszytometrie erkannt und quantitativ gemessen werden. Es wurden pro gefärbte Probe mindestens $1,5 \times 10^6$ Zellen benötigt. Dies entspricht ca. 3 Wells einer 6-Well-Platte. Die Zellen wurden wie beschrieben mit Trypsin-EDTA vorsichtig von der Platte gelöst. Danach wurden sie je nach Versuch entweder gleich in Annexin-Probenpuffer (für Annexin/PI-Färbungen) oder in PBS aufgenommen. Da die meisten FACS-Protokolle für Blutzellen geschrieben sind, gibt es einige Änderungen auf Grund der Zellart. Die Versuche erfolgten nach folgendem optimierten Protokoll. Die Zellen wurden direkt in 100 µl Annexin-Probenpuffer in einem FACS-Reaktionsgefäß aufgenommen. Dazu wurde bei den Hauptzellen 5 µl und bei den Parietalzellen 7,5 µl Annexin V-FITC gegeben. Zu jeder Probe wurden 5 µl Propidiumiodid (PI) pipettiert. In Dunkelheit inkubierte der Reaktionsansatz 15 min bei Raumtemperatur. Danach füllte man die Probe 300 µl Annexin-Probenpuffer auf und führte so bald wie möglich die Messung durch. Es war darauf zu achten, dass die gefärbten Proben unverzüglich gemessen wurden, weil Annexin V bei längerer Inkubation zytotoxisch wirkt und so das Ergebnis verfälscht wird. Die gefärbten Proben müssen vor Licht geschützt werden, weil durch Lichteinfall das Fluorochrom FITC zersetzt wird.

Im ersten Versuch wurden Zellen auf ihre Annexin-Bindungskapazität untersucht, die frisch isoliert bzw. 24 h und 48 h kultiviert waren. Als Negativkontrolle wurde zu jeder Annexin/PI-gefärbten Probe eine Probe gemessen, bei der die Zellen nur in Annexin-Probenpuffer aufgenommen wurden.

Die Färbung des CD95-Rezeptors

Eine weitere Färbung erfolgte mit einem Antikörper gegen CD95-Rezeptoren (Iwai et al., 1994). Dazu wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und bei 5000 U/min 5 min abzentrifugiert. Daraufhin wurden die unspezifischen Bindungsstellen für 15 min mit 100 µl 10 prozentigem Normal Goat Serum geblockt (Naish et al., 1983). Der CD95-AK (Transduction Laboratories) wurde 1:25 in 10 prozentigem Normal Goat Serum verdünnt. 100 µl davon wurden auf die erneut abzentrifugierten Zellen

gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde auf jede Probe 600 µl PBS zum Waschen gegeben und abzentrifugiert. Dieser Waschschrift entfernte den primären Antikörper. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper auf die Zellen gegeben, der eine Bindungsstelle für den primären Antikörper hatte und an FITC gebunden war, wodurch er im FACS erkannt werden konnte. In diesem Fall musste ein in PBS 1:25 verdünnter FITC-Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet werden, da der CD95-Antikörper aus der Maus stammte. Die Inkubationsdauer betrug 30 min in Dunkelheit. Der überschüssige zweite Antikörper wurde entfernt, indem auf jede Probe 600 µl PBS gegeben und zentrifugiert wurde. Danach wurden die gefärbten Zellen in 400 µl PBS resuspendiert und unverzüglich die Messung durchgeführt. Auch diese Proben mussten vor Licht geschützt werden.

Nach diesem Protokoll wurden Haupt- und Parietalzellen gefärbt und gemessen, die einerseits frisch isoliert, andererseits über 24 h, bzw. 48 h kultiviert wurden. Auch hier musste zu jeder Probe eine Negativkontrolle präpariert werden, bei der der primäre Antikörper fehlte und an Stelle dessen Kaninchen-Immunglobuline vom nicht immunogenen Kaninchen 15 min zugegeben wurden, die 1:25 in Normal Goat Serum verdünnt waren (Naish et al., 1983). Als Positivkontrolle wurden wieder Jurkatzellen verwendet (Miyawaki, 1992; Hsieh et al., 1997).

Färbung von Bax und Bcl-2

Da Bax und Bcl-2 intrazelluläre Proteine sind, mussten die Haupt- und Parietalzellen zuerst fixiert und permeabilisiert werden. Dafür wurden ca. 1 Million Zellen 15 min in 100 prozentigem Methanol bei -20° C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurde zu den Zellen 0,1 % Triton für 3 min auf Eis zugegeben (Boersma et al., 1997). Durch einen Waschschrift mit PBS wurde auch dieses wieder entfernt. Der erste Antikörper (Kaninchen-anti-Ratte Bcl-2-Antikörper; Kaninchen-anti-Ratte Bax-Antikörper) wurde in 0,1 % Triton und 15 % Magenmilch in der Konzentration 1:500 gelöst und die Zellen 1 h bei Raumtemperatur damit inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der zweite Antikörper 30 min bei Raumtemperatur zugegeben. Es ist auf eine Inkubation im Dunkeln zu achten, da FITC lichtempfindlich ist. Die Zellen wurden danach in 400 µl PBS aufgenommen und auf Eis bis zur möglichst raschen Messung gehalten. Da kein Signal für Bax und Bcl-2 gefunden werden konnte (siehe 3.3.3.), wurden die AK-Konzentrationen von 1:1000, über 1:250, über 1:100 bis 1:50 variiert.

In der Durchflusszytometrie wurden die Zellen zuerst nach Größe und Granularität, also im FSC und im SSC überprüft und so eingestellt, dass man eine gut abgrenzbare Population erreichte. Die Darstellung der mit Annexin V und PI gefärbten Zellen erfolgte, indem die Grün-Fluoreszenz gegen die Rot-Fluoreszenz aufgetragen wurde. (Annexin V-FITC fluoresziert grün und PI rot.) Die Proben, die mit CD-95-Antikörper gefärbt wurden, an welchen mit Hilfe eines sekundären Antikörpers FITC gebunden wurde, wurden durch Auftragen der Grün-Fluoreszenz gegen den FSC oder den SSC dargestellt. Es wurden in jedem Versuch 5.000 Zellen gemessen.

2.7. ANNEXINFÄRBUNG IN DER IMMUNFLUORESCENZ- MIKROSKOPIE

2.7.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Neben dem FACS kann man mit Hilfe von Annexin V-FITC apoptotische von nekrotischen Zellen auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie differenzieren. Dabei werden die Zellen direkt mit Annexin V-FITC und PI gefärbt. Für diese Färbung gilt das gleiche wie für die Durchflusszytometrie, nämlich dass nur nachweislich intakte Annexin V positive Zellen, also gleichzeitig PI negative Zellen, der Apoptose zugeordnet werden können. Ebenso muss man auf eine ausreichende Kalziumkonzentration achten, da sonst das Annexin V nicht binden kann. Deshalb wird das Annexin V und PI im Annexinprobenpuffer, der auch beim FACS verwendet wird, verdünnt. Die gefärbten Zellen wurden unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Dazu wurden erst die Zellen eines Gesichtsfeldes ohne Filter erfasst, also ohne dass die Färbung zu erkennen war, dann wurde der FITC-Filter zugeschaltet, wodurch die Annexin V-positiven und die PI-positiven Zellen sichtbar wurden. Die Annexin V positiven Zellen stellen sich durch die grün gefärbte Zellmembran dar. Bei PI positive Zellen dagegen färbt sich der Zellkern rot (siehe Abb. 5). Man zählte die Annexin V-FITC positiven und die PI positiven Zellen des gleichen Gesichtsfeldes aus. Insgesamt zählte man 100–200 Zellen aus. Auch hier galt wieder, wie auch oben schon erwähnt, dass nur einfach Annexin V-FITC positive Zellen apoptotisch sind. Sobald zusätzlich der Kern PI positiv war, kann man keine Aussage darüber treffen, ob die Zelle apoptotisch oder nekrotisch war (Cotter et Martin, 1997).

2.7.1. MATERIALIEN UND GERÄTE

- Annexin V-FITC von Pharmingen Stock: Das Annexin V wird mit Annexin-Probenpuffer auf eine Konzentration von 1 µg/ml verdünnt.
- PI von Sigma
- Immunfluoreszenz-Mikroskop:
Zeiss Axiovert 135 TV, Altofluor Ratio Vision mit FITC-Filter für 488 nm
- Zeiss Immersionsöl 518 C
- Staurosporin
- Soluble CD95-Ligand von Alexis Corporation

2.7.2. FÄRBUNG

5×10^5 Hauptzellen, bzw. 3×10^5 Parietalzellen wurden wie oben beschrieben (siehe 2.2) auf jeden Glasobjektträger ausgesät. Auf den Objektträger, der aus dem Kulturmedium genommen wurde, wurden 100 µl Annexin-Probenpuffer gegeben, in die 7,5 µl Annexin V-FITC und 5 µl PI gemischt wurden. Diese Mischung wirkte 15 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur auf die Zellen ein. Danach kippte man die Färbelösung ab und legte die Objektträger mit der von Zellen bedeckten Seite nach unten auf einen weiteren Objektträger. Man wählte zum Auszählen ein 40-fache Vergrößerung, wofür man einen Tropfen Immersionsöl benötigt. Da die Zellen nach dem Färben nicht gewaschen wurde, verblieb ein Rest Annexin V-FITC und PI auf den Zellen. Da Annexin V zytotoxisch ist und somit PI in die Zelle eindringen lässt, musste man nach dem Färben die Zellen unverzüglich auszählen. Deshalb wurden auch nicht mehr als 4–6 Objektträger auf einmal gefärbt, da somit die Einwirkungszeit des Annexins nicht zu lange war. Nach dem gleichen Prinzip wurde ein Zeitverlauf gemessen, bei dem die Zellen mit CD95/CD95-Ligand (100 ng/ml) 3 h stimuliert wurden. Hierbei wurde bei 0 h, bei 30 min, bei 60 min, bei 90 min, bei 120 min und bei 3 h gemessen. Die Positivkontrolle mit Staurosporin (100 µmolar) wurde nur bei 3 h mitgemessen.

2.8. CELL DEATH DETECTION ELISA

2.8.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Der hier verwendete enzymatische Immunoassay Cell-Death-Detection-ELISA weist *in vitro* qualitativ und quantitativ zytoplasmatische Histon-assoziierte-DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen) nach induziertem Zelltod nach.

Wie schon erwähnt, wird bei der Apoptose eine kalzium- und magnesium-abhängige Endonuklease aktiviert, die den DNA-Doppelstrang in den leicht zugänglichen Linker-Regionen zwischen den Nukleosomen spaltet. Somit entstehen Mono- und Oligonukleosomen. Die DNA in den Nukleosomen hingegen ist eng mit den Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4 assoziiert. Dies schützt sie vor der Spaltung durch die Endonuklease (Stach et al., 1997). Die durch Endonuklease gespaltenen Mono- und Oligonukleosomen weisen alle eine Länge von 180 bp oder dem Vielfachen davon auf (Wyllie et al., 1980a). Die Plasmamembran bleibt in diesem Stadium der Apoptose noch intakt. Aus diesem Grund reichern sich die DNA-Fragmente intrazellulär an.

Der verwendete Ein-Stufen-Sandwich-ELISA ermittelt das Ergebnis kalorimetrisch. Apoptose kann quantifiziert und von Nekrose unterschieden werden. Als Proben können Zellsate von Zelllinien, Zellen *ex vivo* oder Gewebehomogenate verwendet werden (Leist et al., 1994). Nachdem die Zellen lysiert wurden, können die DNA-Fragmente, die an Histone gebunden sind, immunhistochemisch identifiziert werden. Es werden Mono- und Oligonukleosomen erkannt. Da die Antikörper gegen DNA (siehe unten) in diesem ELISA nicht speziesspezifisch sind, ist er auch für Rattenzellen verwendbar.

Der Sandwich-Immunoassay arbeitet mit zwei monoklonalen Mausantikörpern gegen Einzel- und Doppelstrang-DNA und gegen die Histone H1, H2A, H2B, H3 und H4 verschiedener Spezies. Dies ermöglicht einen spezifischen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen, da Antikörper gegen beide Bestandteile (DNA und Histone)

verwendet werden. Im ersten Inkubationsschritt wird der Histonantikörper adsorptiv an die Wand der Mikrotitermodule angeheftet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, werden diese Bindungsstellen mit Blockierlösung (Inkubationspuffer) abgesättigt. Im Folgenden gibt man die vorbereitete Probe mit den isolierten Nucleosomen in die Mikrotitermodule, wobei sich die Nucleosomen an die fixierten Histonantikörper binden. Im nächsten Inkubationsschritt binden sich die DNA-Peroxidase-Antikörper an den freien DNA-Anteil der gebundenen Nucleosomen. Nach Auswaschen des überschüssigen DNA-Peroxidase-Antikörpers wird die in den Immunkomplexen gebundene Peroxidase mit ABTS angefärbt (2,2-Azino-di-[3]-ethylbenzthiazolin-sulfonat) und photometrisch bestimmt (Scanlon et al., 1989).

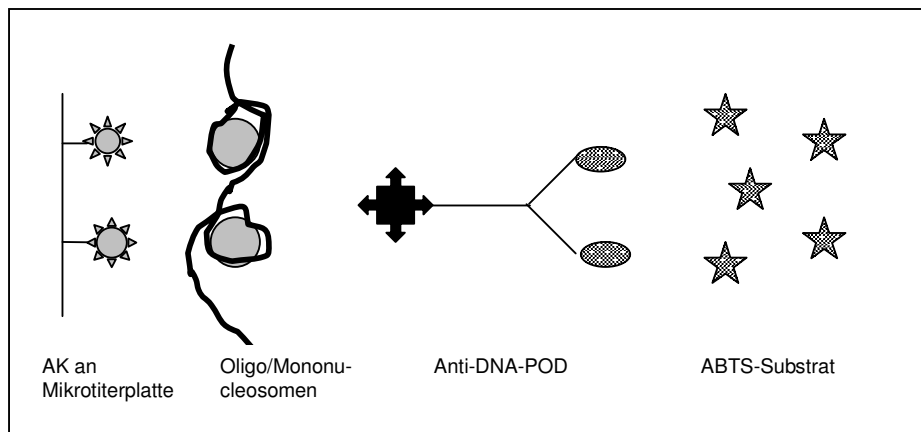


Abb. 4: Prinzip des Sandwich-Immunoassay (ELISA) (modifiziert aus Bedienungsanleitung Cell-Death-Detection-ELISA von Boehringer-Mannheim):

Ein Anti-Histon Antikörper wird an die Mikrotiterplatte gebunden, die Proben mit den darin enthaltenen Mono- und Oligonucleosomen hinzugefügt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Peroxidase markierten Antikörper, der gegen DNA gerichtet ist. Die Bindungen werden durch ABTS, welches durch die Peroxidase gespalten wird sichtbar gemacht.

2.8.2. MATERIALIEN UND GERÄTE

- Cell-Death-Detection-ELISA von Boehringer-Mannheim
 - Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon H1 1–4); lyophilisiert und stabilisiert;
 - Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Klon MCA 33) konjugiert mit Peroxidase; lyophilisiert und stabilisiert;
 - 2 ml 10x konzentrierter Beschichtungspuffer;
 - 40 ml 10x konzentrierter Waschpuffer;
 - 100 ml Inkubationslösung;
 - 15 ml Lysispuffer
 - 15 ml Substratpuffer;
 - 3 ABTS Substratabletten;
 - 12 Mikrotiterplattenmodule mit je 8 Wells mit Rahmen;
 - selbstklebende Abdeckfolie;
- Bidestilliertes Wasser
- Microplate Reader BioRad Modell 450
- Filter für 405 nm von Biorad
- Absaugpumpe von F. Schultheiss
- Schüttler Heidolph Polymax 1040
- Undurchsichtige Folie
- Eppendorfzentrifuge 5403

2.8.3. ARBEITSSCHRITTE

Herstellen der Lösungen

- Antihiston- und Anti-DNA-POD:
Die Lyophilisate wurden jeweils in 1 ml bidestilliertem Wasser 10 min gelöst und gut gemischt.
- Beschichtungslösung

Zunächst wurde 1 ml Beschichtungspufferkonzentrat in 9 ml bidestilliertem Wasser vorverdünnt. Kurz vor Gebrauch wurde 1 ml Anti-Histon in 9ml Beschichtungspuffer weiterverdünnt.

- Waschlösung
40 ml Waschpufferkonzentrat wurde bei Raumtemperatur mit 360 ml bidest. Wasser verdünnt und gut gemischt.
- Konjugatlösung
1 ml Anti-DNA-POD wurden wiederum in 9 ml Inkubationspuffer verdünnt.
- Substratlösung
1 ABTS-Substrattablette wurde in 5 ml Substratpuffer gelöst.
- Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 U/min und bei 4° C durchgeführt.

Probenaufbereitung

In einer 6-Well-Platte wurden ca. $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Well inkubiert. Dies war nach eigenen Untersuchungen die optimale Zellzahl für diesen ELISA im Fall der Haupt- und Parietalzellen. Aus jedem Well wurde eine Probe hergestellt. Für die Positivkontrolle wurde Apoptose-induzierendes Camptothecin (4 µg/ml in DMSO gelöst) – ein Topoisomerase I-Inhibitor – (Del Bino et al., 1991) oder Staurosporin (100 µmol), eine Proteinkinase (Jacobson et al., 1993; Weil et al., 1996; Sung et al., 1997; Hsu et al., 1997) für 3 h hinzugefügt. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand der Zellen abpipettiert und der Lysispuffer direkt auf die Zellen in der Kultivierungsplatte zugeben. Die Zellen und der abzentrifugierte Überstand wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, noch einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml Inkubationslösung bei 4° C für 30 min inkubiert. Daraufhin zentrifugierte man die Reaktionsgemische und überführte jeweils 400 µl des Überstandes, welcher der zytoplasmatischen Fraktion entsprach, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß. In diesem Zustand konnten die Proben bei -20° C gelagert werden.

Die Färbung

Für die Beschichtung der MTP-Module wurden 100 µl Beschichtungslösung in jede Vertiefung pipettiert, die Platte wurde mit einer Folie dicht abgeklebt und für 1 h bei

Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach gründlichem Absaugen und Ausklopfen wurden in jedes Well 200 µl Inkubationslösung zugegeben. Wieder wurde die Platte abgedeckt und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Der folgende Waschschrift wurde im Verlauf des Versuches mehrmals wiederholt und lief immer gleich ab: dreimal wurde 250–300 µl Waschlösung in die Wells pipettiert und sorgfältig wieder entfernt. Nun wurden je 100 µl der vorbereiteten Proben zupipettiert (jede Probe wurde zweimal aufgetragen). Für die Hintergrundmessung wurden zwei Vertiefungen mit 100 µl Inkubationslösung gefüllt. Nach dem Abdichten verblieben die Proben für 90 min bei Raumtemperatur auf der Platte. Der Waschschrift erfolgte wie oben beschrieben. Für die Inkubation mit der Konjugatlösung wurden außer für den Leerwert 100 µl in jedes Well pipettiert. Auch die Konjugatlösung verblieb 90 min in der abgedeckten Platte. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl Substratlösung in jede Vertiefung gegeben, die Platte abgedeckt und lichtgeschützt eingewickelt, damit kein Licht die lichtempfindliche Substratlösung zersetzen konnte. Auf einem Schüttler wurde bei 250 U/min 10–20 min die Farbentwicklung abgewartet, die dann bei 405 nm gegen Substratlösung als Leerwert gemessen wurde.

Auswertung

Das Model 405 Microplate Reader ist ein 12-Kanal *vertical pathlength* Photometer, das die Absorption des Inhaltes von 96-Microwell-Platten bei 405 nm misst. Es ermittelt diese über das Lambert Beer'sche Gesetz:

$$\text{Absorption} = \text{Log } 10 (I_0/I)$$

Wobei I_0 die Intensität des ausgesendeten Lichtes und I die Intensität des abgeschwächten Lichtstrahls nach der Probe bezeichnet. Der Microplate Reader misst zuerst Basal/Leerwerte für alle 12 Kanäle. Dann erst werden die einzelnen Proben gemessen. Aus diesen Werten wird daraufhin nach der oben angegebenen Formel die Absorption errechnet.

Das Endergebnis errechnet sich aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen minus dem Mittelwert der Hintergrundwerte.

2.9. DIE TUNEL-FÄRBUNG

„*Terminal desoxynucleotide transferase-mediated dUTP- biotin nick-end-labeling*“

2.9.1. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

Während der Apoptose kommt es zu einem Zellkernkollaps, der fast immer zu DNA-Verkürzungen und Fragmentationen führt. Eine kalziumabhängige endogene Endonuklease bewirkt die Entstehung von Doppel- und Einzelstrangfragmenten (Gavrieli et al., 1992; Cohen et al., 1992). Die Bruchstellen können erkennbar gemacht werden, indem an die 3'-OH-Enden der Bruchstellen modifizierte Nukleotide (z.B. mit Biotin oder Fluoreszein markierte Nukleotide) gebunden werden. Die dazu nötigen Enzyme sind die DNA-Polymerase und die terminale Desoxyribonucleotidyltransferase (= TdT) (Gavrieli et al., 1992). Die DNA-Polymerase I bindet Nukleotide an Einzelstrangbrüche, die aber nicht nur bei der Apoptose entstehen, sondern auch bei der unkoordinierten DNA-Fragmentation der Nekrose (Weller et al., 1994; Gold et al., 1994). Die terminale Transferase bindet Nukleotide an DNA-Doppelstrangbrüche. Die Verwendung von beiden Enzymen gleichzeitig lässt eine bessere Differenzierung von Doppelstrang-DNA-Fragmentationen durch Apoptose und den zufälligen, meist Einzel-DNA-Strangbrüchen der Nekrose zu. Diese zufälligen DNA-Strangbrüche der Nekrose treten später, nämlich ca. 4 h nach den apoptotischen DNA-Strangbrüchen auf (Gold et al., 1994). Die Identifizierung von apoptotischen Zellen mittels der beiden Enzyme wurde als TUNEL bezeichnet: TdT-mediated X-dUTP nick end labeling (X = Biotin, Fluoreszein) (Gavrieli et al., 1992). Damit die Enzyme ihren Wirkungsort erreichen, werden die Zellen permeabilisiert. Die DNA-Fragmente werden zuvor mit der Fixierlösung Bouin fixiert, wodurch die DNA-Fragmente an andere Zellbestandteile gebunden wurden (Strbenc et Bavdek 2001; Oldereid et al., 2001; Labat-Moleur et al., 1998). So können sie nicht mehr aus der permeabilisierten Zelle austreten. Nach der Bindung mit Nukleotiden, die an den freien 3` Enden mit Biotin markiert wurden (Biotin/fluoreszein-dUTP), kann an diese wiederum in einem weiteren Inkubationsschritt Streptavidin binden. Dieser Immunkomplex wird durch Konjugation mit einem „Reporter-Molekül“ (Fluoreszein, Meerrettichperoxidase (= POD) sichtbar gemacht.

In diesem Fall wurden Fluoreszein-markierte dUTPs verwendet, die durch die TdT an die freien 3' OH-Enden der Doppelstrangbrüche gebunden wurden. Sichtbar gemacht werden die angehängten Nukleotide durch einen Antifluoreszenz-Antikörper POD. Diese Antikörper können z.B. mit 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) gefärbt werden. Dadurch ist das Ergebnis ebenso im Lichtmikroskop beurteilbar (Ishida et al., 1996). Mit dieser Methode wird eine frühe Form der Apoptose gemessen, wodurch bei später Messung ein falsch negatives Ergebnis erzielt werden kann (Gavrieli et al., 1992). Es können falsch negatives Ergebnisse durch sterische Behinderung der TdT durch Teile der extrazellulären Matrix hervorgerufen werden. Da in seltenen Fällen Apoptose ohne DNA-Degeneration auftritt (Cohen et al., 1992), muss neben der TUNEL-Färbung immer noch eine weitere Methode zur Bestätigung der Apoptose durchgeführt werden (Gavrieli et al., 1992; Gold et al., 1994). Falsch positive Ergebnisse können im Widerspruch zur Aussage von Gavrieli durch sehr starke DNA-Fragmentation in einer sehr späten Apoptosephase entstehen (Gold et al., 1994).

2.9.2. MATERIALIEN UND GERÄTE

- Fixierungslösung: Bouin´Solution Accustain von Sigma mit 100 % Eisessig im Verhältnis 1:20
- Blocking Lösung: 0,3 % H₂O₂ in Methanol
- DAB, Metal Enhanced Substrate Set
- Permeabilisierungslösung: 0,1 % Triton X-100 (in 0,1 % Natriumzitat)
100 µl Label Solution werden für die Negativkontrolle abgenommen;
die gesamte Enzymlösung (50 µl) wird zur restlichen Label Solution (450 µl) gegeben und gut gemischt. Somit erhält man 500 µl TUNEL-Reaktionslösung.
Die Mischung der einzelnen Lösungen darf erst kurz vor Gebrauch erfolgen, weil sie auch auf Eis nur sehr kurz haltbar ist.
- Entwicklungslösung: POD ist zum Gebrauch fertig und bei 4° C 6 Monate haltbar.
- Kaisers Gelatine von Merck
- Lichtmikroskop von Zeiss

2.9.3. ARBEITSSCHRITTE

- Fixierung: Objektträger mit angewachsenen Zellen einmal vorsichtig mit PBS waschen und anschließend 15 min mit Fixierungslösung inkubieren. Daraufhin waschen der Objektträger dreimal für 3 min in PBS, wobei die Objektträger nach dem ersten Waschschrift in eine neue Sixwell-Platte umgesetzt wurden.
- Blocken: Die Objektträger für 30 min in der Blocking-Lösung inkubieren und erneut waschen.
- Permeabilisieren: Die Permeabilisierungslösung für 2 min auf die Zellen geben, die auf Eis gekühlt wurden; danach die Objektträger wieder waschen.
- Reaktion: 30 µl TUNEL-Reaktionslösung auf jedes Slide geben und mit einem Stück Parafilm luftblasenfrei bedecken. So wurde eine gleichmäßige Verteilung der Reaktionslösung und ein Schutz vor Verdunstung erreicht. Auf die Negativkontrolle 30 µl der zurückbehaltenen Label Lösung geben und ebenfalls luftblasenfrei mit Parafilm bedecken. Die Zellen verblieben für 60 min bei 37° C in einer feuchten Kammer.
- Entwicklung: Nach erneutem Waschen auf jedes Slide, auch auf die Negativkontrolle, 30 µl Entwicklungslösung geben, mit Parafilm abdecken und für 30 min in einer feuchten Kammer inkubieren.
- Färbung:
5 ml destilliertes Wasser zu 2 Trpf. Puffer-Stocklösung zugeben und gut mischen; dazu 4 Trpf. DAB-Stocklösung und 2 Trpf. Hydrogen Peroxidlösung mischen; mit 1 ml dieser Mischung jedes Slide genau 6 min inkubieren.
- Nach erneutem Waschen die Objektträger vorsichtig trocknen und in einem Tropfen Gelatine, die durch Aufkochen in der Mikrowelle verflüssigt wurde, luftblasenfrei einbetten. So waren die Zellen bei Raumtemperatur stabil.
- Unter dem Lichtmikroskop konnte man Zellen mit grau-schwarz gefärbtem Kern von Zellen ohne gefärbten Kern unterscheiden.
- Als Positivkontrolle wurden Zellen mit DNase behandelt, so dass Doppelstrangbrüche provoziert wurden (Akira et al., 1996) oder es wurde den Zellen ein Apoptose-induzierendes Reagenz zugeben (z.B. 100 µmolar Staurosporin, siehe 2.8.).

Die gefärbten Zellen wurden unter einem Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung ausgezählt (Protokoll: Sgonc et al., 1994).

3. ERGEBNISSE

3.1. KULTIVIERUNG VON HAUPT- UND PARIETALZELLEN

Frisch isolierte Haupt- und Parietalzellen der Ratte konnten nach den in der Literatur angegebenen Bedingungen (siehe 2.2.) über 48 bis 72 Stunden kultiviert werden. Durch streng steriles Arbeiten konnte das anfängliche Problem der Kontaminierung mit Pilzen und Bakterien gering gehalten werden. Da Haupt- und Parietalzellen hoch ausdifferenzierte Zellen sind, ist eine Zellteilung in Kultur nicht möglich. Zusammen mit der natürlich begrenzten Lebenserwartung dieser Zellen und der fehlenden Proliferation ergibt sich eine Verringerung der Zellzahl in Kultur um ca. 10 % pro Tag (Chew et al., 1989). In diesem Versuch stieg zwischen 48 h und 72 h die Zahl der nekrotischen Zellen deutlich an, so dass die Versuchsreihen nur bis zu einem Kultivierungszeitraum von 48 Stunden durchgeführt wurden. Die nekrotischen, frei schwimmenden Zellen wurden mittels einer einfachen Färbung mit Trypanblau indentifiziert. Der Prozentsatz der toten Zellen betrug bei Parietalzellen nach 48 h ca. 35 %, nach 72 h ca. 50 %. Hauptzellen waren schwieriger in Kultur zu halten, was bei der Trypanblau-Färbung gezeigt werden konnte. Im Durchschnitt waren nach 48 h 45 % der Zellen tot, nach 72 h 70 %.

3.2. SPONTANE APOPTOSERATE BEI HAUPT- UND PARIETALZELLEN IN KULTUR

Nachdem Haupt- und Parietalzellen isoliert worden waren, wurde das Auftreten von Apoptose in Kultur über 48 Stunden mit verschiedenen Methoden gemessen. Es wurden verschiedene Methoden gewählt, damit einerseits methodenbedingte Fehler möglichst gering gehalten wurden. Andererseits muss nicht jede Zelle, die apoptotisch wird, jede Phase der Apoptose durchlaufen. Somit ist es wichtig, dass verschiedene Apoptosemarker untersucht werden.

3.2.1. SPONTANE APOPTOSERATE GEMESSEN MIT DER TUNEL-FÄRBUNG

Auf Objektträger angewachsene Haupt- und Parietalzellen wurden sofort nach dem Anwachsen der Zellen, nach 24 h und 48 h Kultivierung auf die Apoptoserate hin mit der TUNEL-Färbung untersucht (siehe 2.9.). Als Positivkontrolle wurden die Zellen zu jedem Messzeitpunkt 3 h mit 4 mg/ml Camptothecin (Del Bino et al., 1991) stimuliert. Es konnte gezeigt werden, dass die spontane Apoptoserate über 48 Stunden Kultivierung nicht signifikant ansteigt oder abfällt (siehe Tab. 3). Mit Camptothecin stimulierte Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg der Apoptose.

	Parietalzellen	Hauptzellen
0 h	23,0 % ± 2,0	33,4 % ± 2,1
24 h	20,2 % ± 1,3	33,5 % ± 1,8
48 h	22,9 % ± 1,8	31,3 % ± 1,7
+ Camptothecin	49,0 % ± 2,9	54,3 % ± 1,3

Tab. 3: TUNEL-Färbung von isolierten, kultivierten Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 12), Positivkontrolle 3 h Inkubation der Zellen mit Camptothecin (4 mg/ml) bei 0 h, 24 h und 48 h: Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Haupt- und Parietalzellen bei Kultivierung über 48 h nach dem paired student's t-test.

Signifikanter Anstieg bei Stimulation mit 4 mg/ml Camptothecin über 3 h bei 0h, 24h und 48h

Parietalzellen: 0 h vrs. Camptothecin p = 0,002; 24 h vrs. Camptothecin p = 0,001; 48 h vrs. Camptothecin p = 0,002

Hauptzellen: 0 h vrs. Camptothecin p = 0,005; 24 h vrs. Camptothecin p = 0,002; 48 h vrs. Camptothecin p = 0,003

3.2.2. SPONTANE APOPTOSERATE GEMESSEN MIT DEM ELISA

Die Apoptoserate bei kultivierten Haupt- und Parietalzellen wurde quantitativ mit Hilfe eines Immunoassay (siehe 2.8.) gemessen. Mit dem Elisa wurden DNA-Fragmente, die an Histone gebunden sind, photometrisch quantifiziert. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die für 3 h mit 4 mg/ml Camptothecin inkubiert worden

sind. Auch mit dieser Methode konnte kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate bei 48-stündiger Kultivierung gemessen werden; die mit Camptothecin behandelten Zellen zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg der DNA-Fragmentation (siehe Tab. 4).

	Parietalzellen	Hauptzellen
0 h	0,97 ± 0,08	1,10 ± 0,07
24 h	1,36 ± 0,31	1,30 ± 0,30
48 h	1,04 ± 0,17	1,13 ± 0,28
+ Camptothecin	4,37 ± 0,46	6,52 ± 1,06

Tab. 4: ELISA von isolierten, kultivierten Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 7), Positivkontrolle 3 h Inkubation der Zellen mit Camptothecin (4 mg/ml) bei 0 h, 24 h und 48 h:

Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Haupt- und Parietalzellen bei Kultivierung über 48 h nach dem paired student's t-test.

Signifikanter Anstieg nach Stimulation mit 4 mg/ml Camptothecin über 3 h bei 0h, 24h und 48h:

Parietalzellen: 0 h vs. Camptothecin p = 0,003; 24 h vs. Camptothecin p = 0,015; 48 h vs. Camptothecin p = 0,004

Hauptzellen: 0 h vs. Camptothecin p = 0,009; 24 h vs. Camptothecin p = 0,012; 48 h vs. Camptothecin p = 0,02

3.2.3. SPONTANE APOPTOSERATE GEMESSEN MIT ANNEXINFÄRBUNG IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Wie oben beschrieben wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt (siehe 2.6.) und mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantitativ erfasst. Damit nur sicher apoptotische Zellen in die Zählung mit eingingen, wurden nur Annexin V positive Zellen, nicht Annexin V und Propidiumiodid positive Zellen gezählt. Bei zweifach positiven Zellen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob der Verlust der Membranintegrität (was zu einer Färbung mit Propidiumiodid führt) durch Nekrose oder ein spätes Stadium der Apoptose verursacht wurde (Koopman et al., 1994; Yoshihide, 1997). Auch hier konnte kein Anstieg der Apoptoserate über 48 h Kultivierung gezeigt werden (siehe Tab. 5). Als Positivkontrolle wurden Jurkatzellen

verwendet (Martin et al., 1995), die für 3 h mit 4 mg/ml Camptothecin inkubiert worden sind. Bei diesen wurde eine hohe Apoptoserate gemessen.

	Parietalzellen	Hauptzellen
0 h	4,4 % ± 1,5	9,9 % ± 2,8
24 h	4,8 % ± 4,6	15,5 % ± 6,2
48 h	4,9 % ± 3,1	14,1 % ± 2,0
Jurkatzellen + Camptothecin	47,7 % ± 7,92	

Tab. 5: Annexin V positive kultivierten und isolierte Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h in der Durchflusszytometrie (n = 5):

Kein Anstieg bei 48-stündiger Kultivierung. Bei Inkubation von Jurkatzellen mit Camptothecin (4 mg/ml) für 3 h deutlicher Anstieg der Apoptoserate.

3.2.4. SPONTANE APOPTOSERATE GEMESSEN MIT DER ANNEXIN-/PROPIDIUMIODIDFÄRBUNG

Nach dem gleichen Prinzip wie die Annexin/Propidiumiodid-Färbung für das FACS wurden Zellen auf Objektträgern mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt und unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgezählt (siehe 2.7.) (siehe Abb. 5). Bei Kultivierung über 48 h ergab sich dabei ebenfalls kein Anstieg der Apoptoserate bei Haupt- und Parietalzellen. Als Positivkontrolle wurden die Zellen zu jedem Messzeitpunkt mit 1 mol Staurosporin 3 h inkubiert (Jacobson et al., 1993; Weil et al., 1996; Sung et al., 1997; Hsu et al., 1997). Dies führte nach dem paired student's t-test zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate (siehe Tab. 6).

	Parietalzellen	Hauptzellen
0 h	4,54 % ± 2,65	7,20 % ± 2,1
24 h	4,72 % ± 2,26	7,10 % ± 3,65
48 h	5,86 % ± 4,33	5,25 % ± 1,43
+ Staurosporin	9,57 % ± 1,78	32,35 % ± 8,9

Tab. 6: Annexin V positive, isolierte Haupt- und Parietalzellen nach 0 h, 24 h und 48 h (n = 6) Kultur im Lichtmikroskop ausgezählt. Positivkontrolle Inkubation mit 1 mol Staurosporin über 3 h
Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Kultivierung von Haupt- und Parietalzellen über 48 h nach dem paired student´s t-test.

Signifikanter Anstieg nach Stimulation mit 1 mol Staurosporin über 3 h:

Parietalzellen: + Staurosporin vrs. 0 h, 24 h, 48 h p < 0,05

Hauptzellen: + Staurosporin vrs. 0 h, 24 h, 48 h p < 0,01

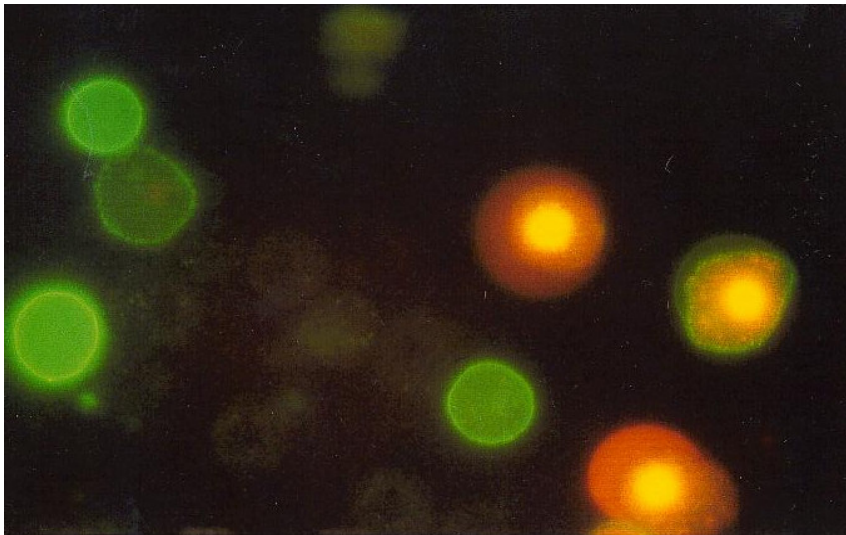


Abb. 5: Beispiel für Annexin und Propidiumiodid gefärbte Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie (Beliebig gewähltes Gesichtsfeld, mikroskopisches Bild der Zellen ohne FITC-Filter nicht gezeigt) :

- nur grün gefärbte Zellen: einfach Annexin positive Zellen => apoptotische Zellen
- nur rot gefärbte Zellen: einfach Propidiumiodid positive Zellen => nekrotische Zellen
- grün und rot gefärbte Zellen: doppelt positive Zellen => spät apoptotische oder nekrotische Zellen

Anhand von vier verschiedenen Methoden konnte gezeigt werden, dass unter den angewandten Kulturbedingungen die Apoptoserate der Haupt- und Parietalzellen über 48 h nicht ansteigt. Dies bestätigt, dass für beide Zellarten Kulturbedingungen vorliegen, unter denen Apoptose z.B. nach Stimulationen untersucht werden kann.

3.3. REGULATION VON BAX, BCL-2 UND CD95-REZEPTOREN BEI HAUPT- UND PARIETALZELLEN IN KULTUR

Nachdem keine spontane Apoptose während der 48-stündigen Kultivierung von Haupt- und Parietalzellen nachgewiesen werden konnte, wurde die Regulation von Apoptose induzierendem Bax, Apoptose-hemmendem Bcl-2 und dem CD95-Rezeptor in der RT-PCR und im Westernblot untersucht.

3.3.1. DIE REGULATION VON BAX, BCL-2 UND CD95-REZEPTOREN IN DER RT-PCR

Wie im Methodenteil beschrieben (siehe 2.4.) wurde aus den frisch isolierten und kultivierten Zelle RNA gewonnen und zu cDNA umgeschrieben. Mit dieser wurde die Polymerasekettenreaktion durchgeführt, um die Veränderung der RNA-Menge von Bax, Bcl-2 und CD95 zu bestimmen. Zur Kontrolle der aufgetragenen Menge wurde das Housekeeping-gen β_2 -Mikroglobulin koamplifiziert (siehe 2.4.8.).

Abbildung 6a zeigt die PCR von Bcl-2 in Parietalzellen. Das PCR-Produkt von Bcl-2, das eine kalkulierte Größe von 442 bp aufweist, stellt sich als eine deutliche Bande bei 0 h dar, die bei 24 h und 48 h abfällt. Die Hauptzellen zeigen einen Verlauf der RNA von Bcl-2, der bis 24 h ansteigt und bei 48 h deutlich abfällt (siehe Abb.7a). Die Primer für das PCR-Produkt von Bax wurden aus Exon 3 und 6 so gewählt, dass sowohl die Splice-Variante Bax α , als auch Bax β im PCR-Produkt enthalten sein sollten. Es fand sich jedoch nur eine Bande bei 373 bp. Dies entspricht der Splice-Variante Bax α . Bax β (erwartete Bandengröße: 480 bp) konnte weder in Haupt-, noch in Parietalzellen nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass Bax α für die Apoptose induzierende Wirkung verantwortlich ist; über die Funktion von Bax β ist nichts

genauer bekannt (Oltavi et al., 1993). Die Haupt- und Parietalzellen zeigen einen stetigen Anstieg der RNA von Bax von 0 bis 48 h (siehe Abb. 6b und 7b). Die RNA des CD95-Rezeptor im Zeitverlauf über 48 h wurde gleichfalls mit Hilfe der PCR gemessen. Auch hier findet man die kalkulierte Größe von 141 bp. Es konnte sowohl bei den Haupt-, als auch den Parietalzellen ein ansteigender Verlauf von 0 h bis 48 h gezeigt werden (siehe Abb. 6c und 7c). Die Menge des aufgetragenen PCR-Produktes wurde so gewählt, dass die Banden des parallel abbeschriebenen β_2 -Mikroglobulin sich in der gleichen Intensität darstellten (siehe 2.4.8.). Die Banden entsprachen der kalkulierten Größe von 520 bp (siehe Abb. 6d und 7d). Die Negativkontrollen waren immer negativ, d.h. es konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden, ebenso wie die Proben, die ohne reverse Transkriptase durchgeführt worden sind (nicht gezeigt). Die Ergebnisse wurden mindestens dreimal reproduziert.

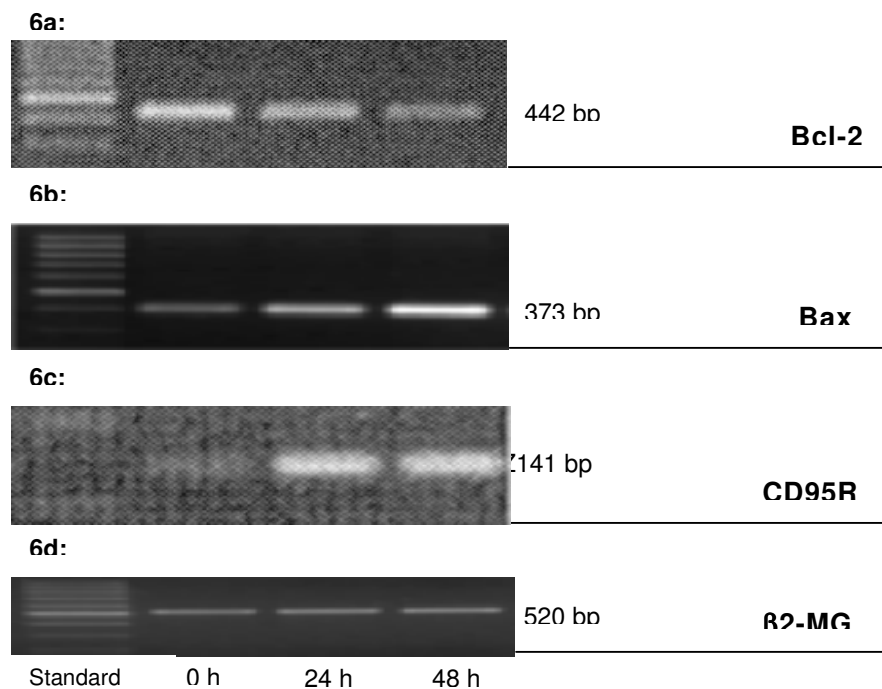


Abb. 6: RT-PCR von Parietalzellen (n = 3). Das PCR-Produkt von Bcl-2 stellt sich mit 442 bp dar, das von Bax mit 373 bp (entspr. Bax α), das des CD95-Rezeptors mit 141 bp und das des β_2 -Mikroglobulin mit 520 bp.

6a: RT-PCR von Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6b: RT-PCR von Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6c: RT-PCR von CD95-Rezeptoren als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6d: RT-PCR von β_2 -Mikroglobulin als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

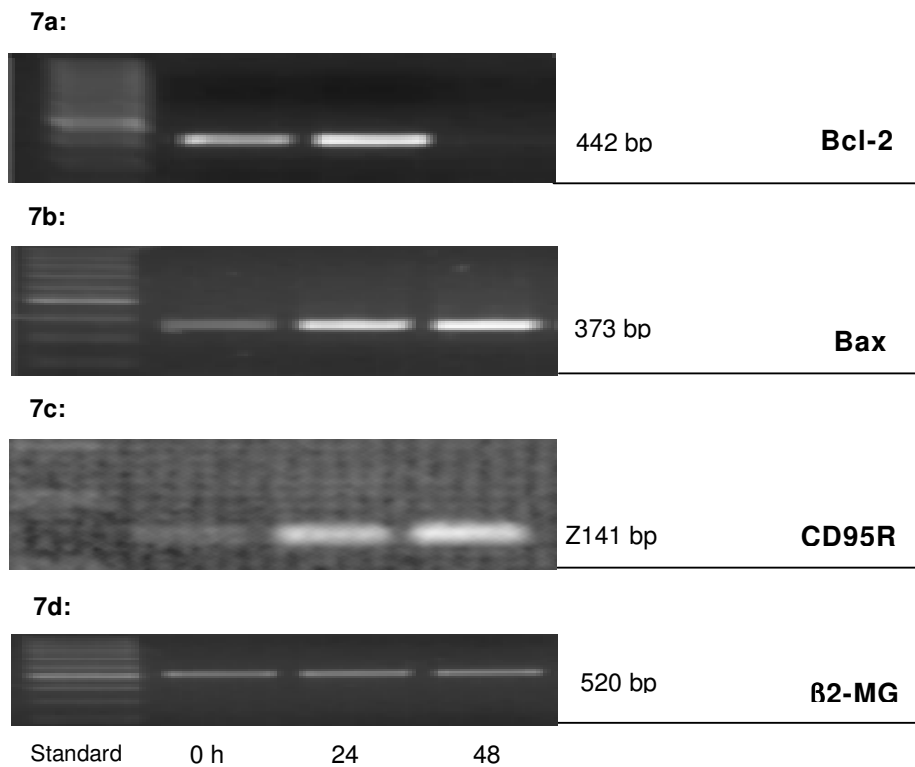


Abb. 7: RT-PCR von Hauptzellen (n = 3). Das PCR-Produkt von Bcl-2 stellt sich mit 442 bp dar, das von Bax mit 373 bp (entspr. Bax a), das des CD95-Rezeptors mit 141 bp und das des β 2-Mikroglobulin mit 520 bp.

7a: RT-PCR von Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

7b: RT-PCR von Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

7c: RT-PCR von CD95-Rezeptor als Zeitverlauf (CD95R) bei 0 h, 24 h und 48 h

7d: RT-PCR von β 2-Mikroglobulin als Zeitverlauf (β 2-MG) bei 0 h, 24 h und 48 h

3.3.2. DIE REGULATION VON BAX, BCL-2 UND CD95-REZEPTOREN IM WESTERN BLOT

Mit dem Western Blot wurde die Proteinmenge von Bax, Bcl-2 und CD95-Rezeptoren zu den unterschiedlichen Zeitpunkten ermittelt. Untersucht wurden Proteinextrakte aus angereicherten Haupt- und Parietalzellen, die mit Antikörper gegen Bcl-2, Bax und CD95-Rezeptoren inkubiert wurden. Wiederum wurde ein Zeitverlauf von 0 bis 48 h gemessen (siehe 2.5.). Bcl-2 ist ein Protein der Größe 25 kD. Bei den Parietalzellen konnte ein Abfall des Proteins ab 24 h (siehe Abb. 8a), bei den Hauptzellen ab 48 h gezeigt werden (siehe Abb. 9a). Die Expression des Bax-Proteins mit einer Größe von 21 kD stieg bei den Haupt- und Parietalzellen von 0 bis 48 h an (siehe Abb. 8b und 9b)

Im Weiteren wurde durch photometrische Messungen das Verhältnis der isolierten Proteine zur Gesamtmenge der aufgetragenen Proteine bestimmt. Es zeigt sich eine 1,5- bis 3-fach höhere Expression von Bcl-2 und eine 6- bis 12-fach höhere Expression von Bax in Hauptzellen im Vergleich zu Parietalzellen. Um vergleichbare Banden zu erreichen, musste bei Parietalzellen im Vergleich zu Hauptzellen zwei- bis zehnmal mehr isoliertes Protein der Parietalzellen in den Versuch eingesetzt werden. Das Verhältnis Bcl-2 zu Bax weist durchgehend von 0 bis 48 h einen größeren Wert bei Parietal-, als bei Hauptzellen auf:

Parietalzellen, Verhältnis von Bcl-2:Bax:	0 h	11,0
	24 h	8,6
	48 h	0,8
Hauptzellen, Verhältnis von Bcl-2:Bax:	0 h	3,3
	24 h	2,1
	48 h	0,2

Der CD95-Rezeptor (45 kD-Protein) zeigt eine geringe Intensität bei Parietalzellen zum Zeitpunkt 0 h. Die Proteinmenge steigt jedoch bis 48 h an (siehe Abb. 8c). Der Verlauf des CD95-Rezeptors bei den Hauptzellen stellt sich als genau entgegengesetzt dar, mit einer starken Expression bei 0 h und einer abfallenden Intensität bis 48 h (siehe Abb. 9c).

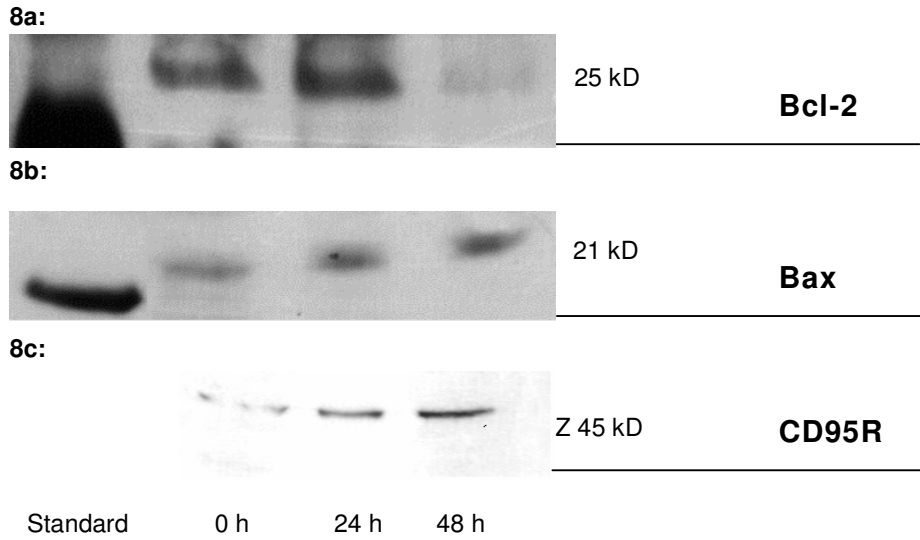


Abb. 8: Western Blot der Parietalzellen (n = 5)

8a: Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (25 kD)

8b: Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (21 kD)

8c: CD95-Rezeptor als Zeitverlauf (CD95R) bei 0 h, 24 h und 48 h (45 kD)

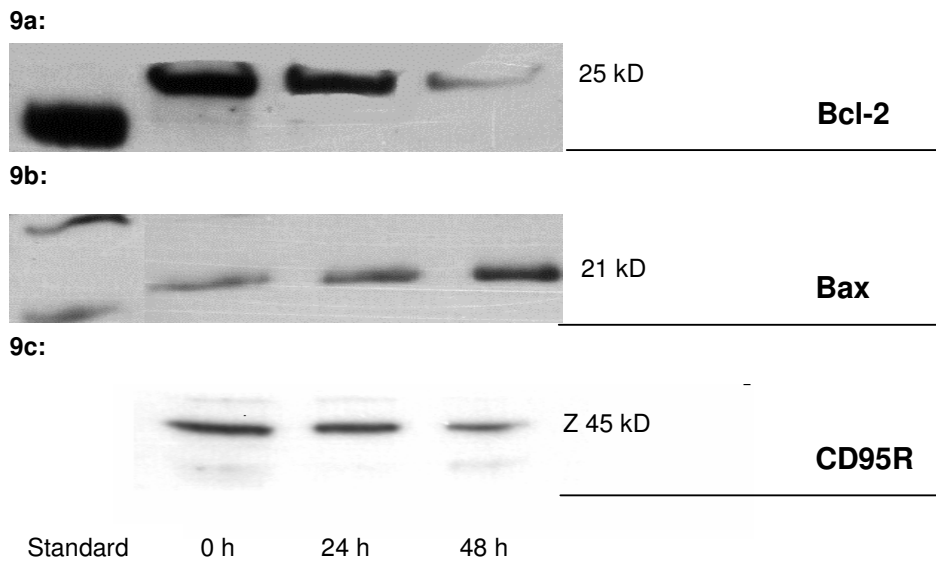


Abb. 9: Western Blot der Hauptzellen (n = 5)

9a: Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (25 kD)

9b: Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (21 kD)

9c: CD95-Rezeptor als Zeitverlauf (CD95R) bei 0 h, 24 h und 48 h (45 kD)

3.3.3. DIE REGULATION DER CD95-REZEPTOREN IN DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Der CD95-Rezeptor

Zur Messung des CD95-Rezeptors in der Durchflusszytometrie wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den CD95-Rezeptor verwendet. Dieser Antikörper wurde mittels eines zweiten Antikörpers detektiert, der mit FITC markiert wurde. Die Messungen wurden durch Anlegen eines *Gates* um die entsprechende Punktvolke ausgewertet. Es wurden Haupt- und Parietalzellen zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h und 48 h untersucht. Bei den Parietalzellen wurden bei frisch isolierten Zellen 31 % ($31,3 \pm 8,3$ %) CD95-Rezeptor-positive Zellen gemessen. Nach 24 h und 48 h stieg die Fraktion der Zellen, die den CD95-Rezeptor exprimieren weiter auf 42 % und 57 % ($41,9 \pm 13,7$ %; $56,5 \pm 20$ %) an. Bei den Hauptzellen zeigt sich wie im Western Blot ein entgegengesetztes Verhalten: bei 0 h sind 61 % ($61,4 \pm 17,6$ %) der Zellen positiv für den CD95-Rezeptor, bei 24 h und 48 h nur noch 23 % und 39 % ($23,2 \pm 13,3$ %; $38,7 \pm 20,2$ %). Signifikante Unterschiede konnten bei den Parietalzellen zwischen 0 h und 48 h und zwischen 24 h und 48 h gemessen werden, nicht zwischen 0h und 24h. Bei den Hauptzellen sind die Unterschiede zwischen allen drei Zeitstufen signifikant. Somit zeigt sich, dass bei Parietalzellen die Expression der CD95-Rezeptoren über einen Kultivierungszeitraum von 48 h ansteigt, bei Hauptzellen dagegen abfällt.

Bax und Bcl-2

Es wurde ebenso der Versuch unternommen das Vorhandensein von Bax und Bcl-2 mit Hilfe der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie zu bestimmen. Trotz ansteigenden AK-Konzentrationen konnten keine Zellen angefärbt werden. Dies ist wegen der intrazellulären Lage der beiden Proteine schwierig (Hockenbery et al., 1990; Krajewski et al., 1993). Möglicherweise kann es darauf zurückgeführt werden, dass durch die Lysierung der Zellmembran die Zelle gänzlich zerstört wird oder die intrazellulären Proteine zu stark geschädigt werden, so dass eine Erkennung durch einen Antikörper nicht mehr möglich ist. Es ist in der Literatur keine Arbeit bekannt, in der bei isolierten Epithelzellen intrazelluläre Proteine in der Durchflusszytometrie gemessen wurden. Eine Untersuchung von Bax und Bcl-2 mittels FACS ist bei Karzinomzellen aus Zelllinien oder Lymphozyten in der Literatur beschrieben (Koshiji et al., 1998; Sudeepta et Gupta, 1998).

Abb. 10a: CD95-Rezeptoren bei Parietalzellen imFACS

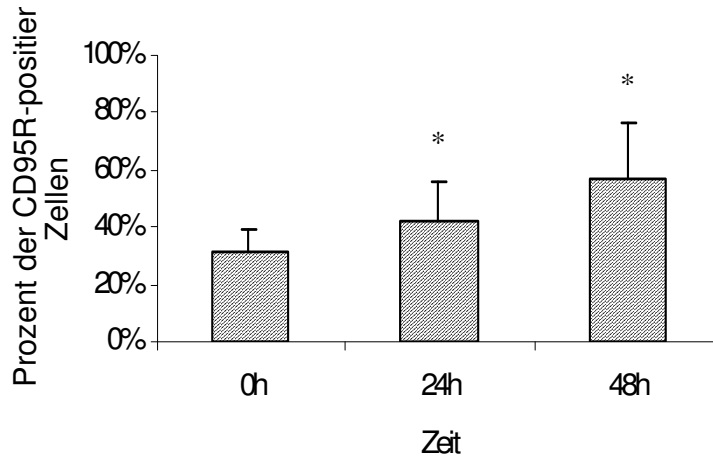


Abb. 10b: CD95-Rezeptoren bei Hauptzellen imFACS

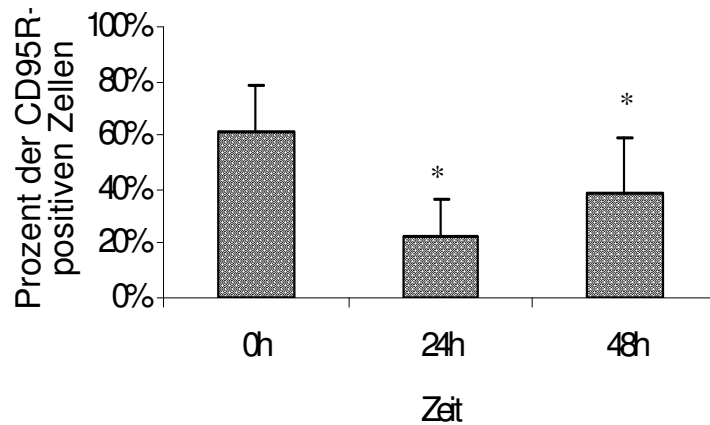


Abb. 10: Nachweis von CD95-Rezeptoren mit einem FITC-markierten sekundären AK markiert von isolierte, kultivierte Haupt- und Parietalzellen in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 10).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

Abb. 10a: Parietalzellen: 0 h vs. 24 h p = 0,0555
0 h vs. 48 h p = 0,0017

Abb. 10b: Hauptzellen: 0 h vs. 24 h p = 0,00005
0 h vs. 48 h p = 0,0035

3.4. APOPTOSE BEI HAUPT- UND PARIETALZELLEN INDUZIERT DURCH DIE ZUGABE VON CD95-LIGAND

Da mit Hilfe von verschiedenen Methoden (PCR; Western Blot, FACS) CD95-Rezeptoren an Haupt- und Parietalzellen nachgewiesen werden konnten, wurde die funktionelle Relevanz des CD95-Rezeptor durch Zugabe von CD95-Ligand getestet. Davor wurde untersucht, ob Haupt- und Parietalzellen CD95-Ligand in Kultur produzieren, um eine Eigenstimulation auszuschließen.

3.4.1. NACHWEIS VON CD95-LIGAND BEI KULTIVIERTEN HAUPT- UND PARIETALZELLEN

Mit Hilfe der PCR konnte in akut isolierten und kultivierten Haupt- und Parietalzellen keine RNA des CD95-Liganden nachgewiesen werden. In der Positivkontrolle mit Jurkatzellen (Martin et al., 1995) wurde eine Bande bei 209 bp deutlich. Die Negativkontrolle, sowie die Probe ohne reverse Transkriptase waren negativ (siehe Abb. 11)

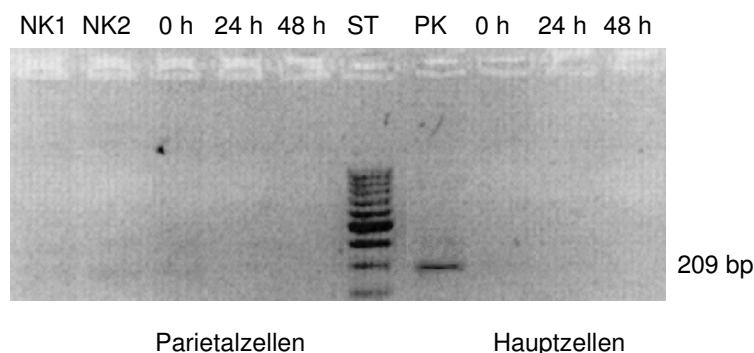


Abb. 11: RT-PCR des CD95-Ligand bei Parietal- und Hauptzellen: Die positive Bande des PCR-Produktes vom CD95-Liganden stellt sich mit 209 bp nur in der Positivkontrolle dar (n = 3).

Bahn 1 NK1: Negativkontrolle 1 ohne cDNA

Bahn 2 NK2: Negativkontrolle 2 ohne reverse Transkriptase

Bahn 3, 4, 5: RT-PCR aus RNA von Parietalzellen bei 0h, 24h, 48h

Bahn 6 ST: Standard

Bahn 7 PK: Positivkontrolle (Jurkatzellen)

Bahn 8, 9, 10: RT-PCR aus RNA von Hauptzellen bei 0h, 24h, 48h

3.4.2. REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT DER ZELLEN AUF EINE STIMULATION MIT CD95-LIGAND

Um das Zeitfenster zu eruieren, in dem man Apoptose bei Zellen nachweisen kann, die mit CD95-Ligand stimuliert wurden, wurden zwei Vorversuche durchgeführt. Es wurde die Apoptoserate der Zellen in verschiedene Zeitabläufe mit der Annexin-Propidiumiodid-Färbung und mit der TUNEL-Färbung gemessen.

Zeitabhängigkeit der CD95-induzierten Apoptose in der Annexin-Färbung

Akut isolierte Hauptzellen und 24 h kultivierte Parietalzellen auf Objektträgern (zu diesen Zeitpunkten sind die meisten CD95-Rezeptoren auf den Zellen nachgewiesen worden, siehe 3.3.3.) wurden mit 100 ng/ml CD95-Ligand 30 min, 60 min, 90 min, 120 min und 180 min stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen 3 h mit 1 mmol Staurosporin inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumiodid angefärbt und unter dem Mikroskop ausgezählt (siehe 2.7.). Als apoptotische Zellen wurden nur Zellen gewertet, die einfach Annexin V positiv waren. Für Parietalzellen konnte ein deutlicher Anstieg der Annexin V positiven Fraktion bei 120 min gezeigt werden (basal $2,0 \pm 1,6$ %, stimuliert $11,7 \pm 2,7$ %); danach nimmt die Anzahl der positiven Zellen wieder ab (siehe Abb. 12a). Die Positivkontrolle mit Staurosporin zeigt ebenso einen deutlichen Apoptoseanstieg (basal $2,4 \pm 2,4$ %, stimuliert $9,6 \pm 1,8$ %). Auch bei Hauptzellen konnte dieser maximale Anstieg bis 120 min (basal $9,0 \pm 1,2$ %, stimuliert $32,3 \pm 7,5$ %) und ein darauffolgender Abfall der apoptotischen Hauptzellen nachgewiesen werden. Auch bei den Hauptzellen kann man nach Stimulation mit Staurosporin einen Apoptoseanstieg messen (basal $12,9 \pm 3,0$ %, stimuliert $32,4 \pm 8,9$ %). Der früheste Zeitpunkt, um mit dieser Methode Apoptose messen zu können liegt also für Haupt- und Parietalzellen bei 120 min. Da das Annexinbindungsverhalten ein früher Apoptosemarker ist, sollte man für andere Methoden, die Apoptose nachweisen, eher einen späteren Messpunkt wählen. Die DNA-Aufspaltung, die in der TUNEL-Färbung nachgewiesen wird, findet z.B. in einer späteren Apoptosephase statt. Diese Werte sind auch aus der Literatur bekannt (Thome et al., 1997). Wegen ihrer schnellen Durchführbarkeit wurde die Methode zur ersten Orientierung verwendet, um v.a. in kurzen Intervallen (30 min) Apoptose messen zu können.

Abb. 12a: Zeitverlauf von Parietalzellen mit CD95-Ligand stimuliert in der Annexin-Färbung

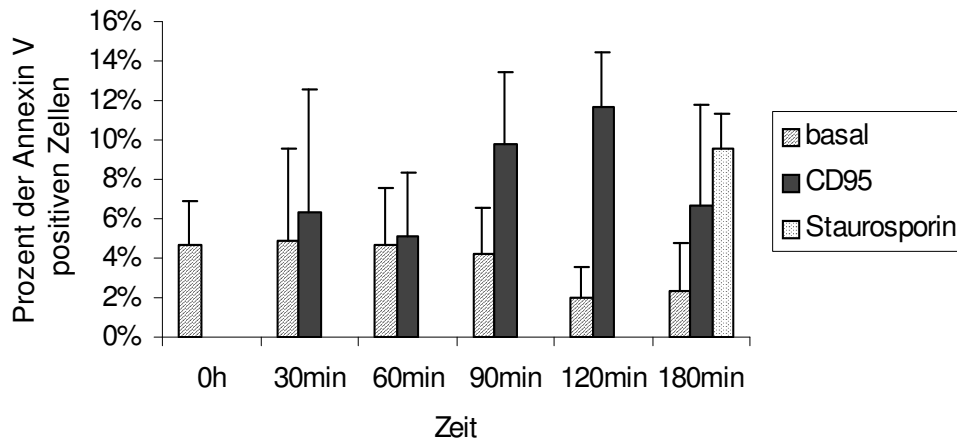


Abb. 12b: Zeitverlauf von Hauptzellen mit CD95-Ligand stimuliert in der Annexin-Färbung

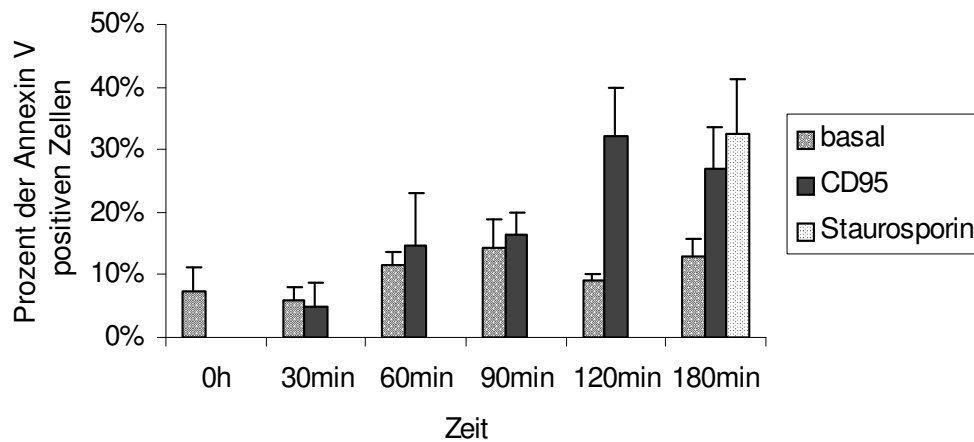


Abb. 12: Mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimulierte Parietalzellen (Abb. 12a) und Hauptzellen (Abb. 12b) in der Annexin/Propidiumiodid-Färbung über einen Zeitverlauf von 0–180 min im Lichtmikroskop ausgezählt. Positivkontrolle Parietal/Hauptzellen 120 min mit 1 mol Staurosporin inkubiert (n =3). Nur einfach Annexin-positive Zellen wurden als apoptotisch gewertet.

Zeitabhängigkeit der CD95-induzierten Apoptose in der TUNEL-Färbung

Zur Überprüfung der Ergebnisse aus der Färbung mit Annexin V und Propidiumiodid wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. Jedem Slide wurden 100 ng/ml CD95-Ligand in Medium gelöst zugegeben. Anfangs wurde ein Zeitverlauf erstellt, wobei die Zellen 0 h, 1 h, 2 h, 3 h und 5 h stimuliert wurden. Als Positivkontrolle wurde 1 mol Staurosporin verwendet, mit dem die Zellen 3 h inkubiert wurden. In der TUNEL-Färbung zeigte sich ein Anstieg der Apoptoserate bei Parietalzellen bis 5 h (1 h: $29,3 \pm 9,6$ %; 2 h: $38 \pm 11,9$ %; 3 h: $53,9 \pm 7,4$ %; 5 h: $61,2 \pm 11$ %). Der Basalwert der unstimulierten Zellen lag bei 25 % ($25,2 \pm 3,9$ %). Die CD95-induzierte Apoptose war nur bei 3 h und 5 h signifikant gegenüber dem Basalwert. Die Positivkontrolle bei 3 h mit Staurosporin zeigte einen signifikanten Apoptoseanstieg bis 46 % ($46,4 \pm 10,8$ %). Bei den Hauptzellen steigt die Rate der apoptotischen Zellen bis 3 h an (1 h: $50,5 \pm 20,8$ %; 2 h: $55,9 \pm 20,7$ %; 3 h: $55,1 \pm 5,7$ %). Nur bei 3 h ist die Apoptoserate signifikant gegenüber dem Basalwert. Im Gegensatz zu den Parietalzellen fällt die Apoptoserate bei 5 h deutlich ab ($33,7 \pm 15$ %) (siehe Abb. 13b). Die unstimulierten Zellen hatten eine basale Apoptose von 31 % ($31,4 \pm 7,8$ %). Die Positivkontrolle bei 3 h mit Staurosporin war signifikant gegenüber dem Basalwert ($70,4 \pm 3,9$ %).

Abb. 13a: Zeitverlauf von Parietalzellen nach Stimulation mit CD95-Ligand in der TUNEL-Färbung

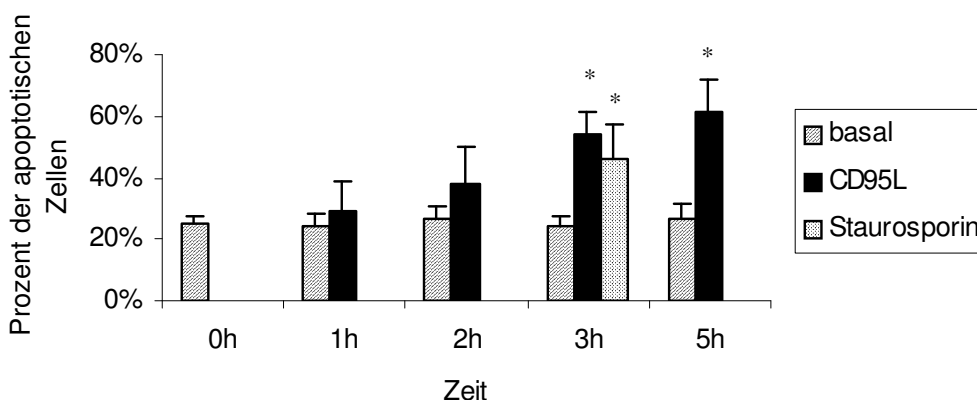


Abb. 13a : TUNEL-Färbung von einem Zeitverlauf (0–5 h) von Parietalzellen, die mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimuliert wurden. Positivkontrolle: 3 h Inkubation mit 1 mol Staurosporin (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

3 h basal vrs. 3 h + CD95L p = 0,00077

3 h basal vrs. 3 h + Staurosporin p = 0,0097

5 h basal vrs. 5 h + CD95L p = 0,0088

Abb. 13b: Zeitverlauf von Hauptzellen nach Stimulation mit CD95-Ligand in der TUNEL-Färbung

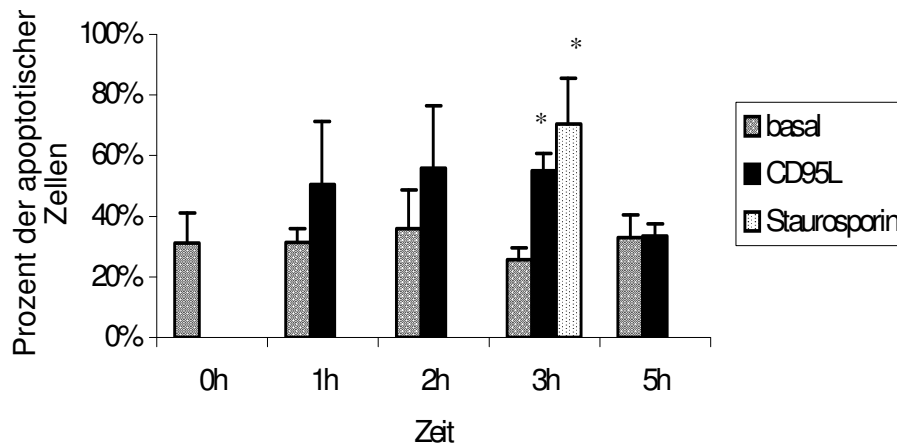


Abb. 13b: TUNEL-Färbung von einem Zeitverlauf (0–5 h) von Hauptzellen, die mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimuliert wurden. Positivkontrolle: 3 h Inkubation mit 1 mol Staurosporin (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

3 h basal vs. 3 h + CD95L p = 0,0016

3 h basal vs. 3 h + Staurosporin p = 0,0013

Die beiden Zeitverläufe zeigen bei Stimulation mit CD95-Ligand ein Apoptosemaximum für Parietalzellen zwischen 2 h (in der Annexinfärbung) und 5 h (in der TUNEL-Färbung). Für Hauptzellen konnte dieses Maximum in der Annexinfärbung bei 2 h in der TUNEL-Färbung bei 3 h aufgezeigt werden. Unsere Ergebnisse bestätigen somit Thome et al. (Thome et al., 1997), der Jurkatzellen 3 h mit CD95-Ligand stimulierte. Auch in anderen Studien findet man als optimale Stimulationsdauer zur Apoptoseinduktion 3–4 Stunden (Sträter et al., 1997; Li et al., 1997). Somit wurden in den folgenden Versuchen die Zellen 3 h mit CD95-Ligand stimuliert.

3.4.3. STIMULATION VON HAUPT- UND PARIETALZELLEN MIT DEM CD95-LIGAND GEMESSEN MIT DER TUNEL-FÄRBUNG

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD95-Rezeptoren in Parietalzellen über den Kultivierungszeitraum von 48 h ansteigen, bei Hauptzellen dagegen

abfallen (siehe 3.3.3.). Um diese Regulation der CD95-Rezeptoren und deren Funktionalität über den Kultivierungszeitraum von 48 nachzuweisen wurde folgender Versuch durchgeführt: Es wurden Haupt- und Parietalzellen nach 0 h, 24 h und 48 h Kultivierung mit 100 ng/ml CD95-Ligand 3 h stimuliert. Danach wurden sie mit der TUNEL-Methode (siehe 2.9.) gefärbt.

Bei den Parietalzellen zeigte sich ein Anstieg der Apoptoserate von 25 % über 39 % bis 66 % ($24,8 \pm 5,9$ %; $38,7 \pm 5,4$ %; $65,7 \pm 14,5$ %) im Zeitraum von 0 bis 48 Stunden. Bei der Negativkontrolle ohne Stimulation mit CD95-Ligand blieb die Apoptoserate konstant etwa bei 23 % ($23,4 \pm 2,6$ %) (siehe Abb. 13a). Die konstant bleibende Apoptoserate ohne Stimulation wurde wie auch schon zu Anfang dieser Arbeit nachgewiesen (siehe 3.2.). Der Unterschied zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen ist bei 24 h und 48 h Kultivierung signifikant) Es konnte also gezeigt werden, dass die nachgewiesenen CD95-Rezeptoren, die über den Kultivierungszeitraum von 48 h ansteigen, stimuliert werden können und Apoptose ausgelöst wird.

Abb. 14a: Parietalzellen stimuliert mit CD95-Ligand in der TUNEL-Färbung über 48 h Kultur

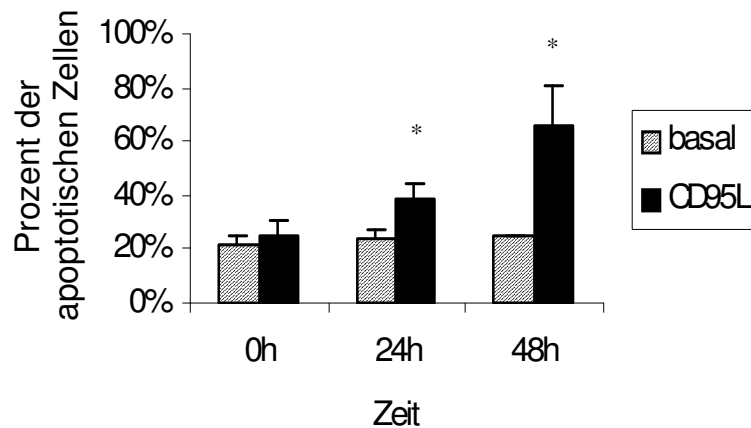


Abb. 14a: Stimulation von Parietalzellen mit CD95-Ligand (100 ng/ml) über 3 h zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h nach der TUNEL-Methode gefärbt (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

24 h basal vrs. 24 h + CD95L p = 0,034

48 h basal vrs. 48 h + CD95L p = 0,011

Im Vergleich dazu waren bei 0 h Kultivierung 66 % (65,5±8,4 %) der Hauptzellen apoptotisch, bei 24 h und 48 h Kultivierung dagegen nur noch 27 % und 25 % (26,7±3,6 %; 24,9±4,6 %). Die nicht stimulierten Zellen dagegen blieben wie auch schon oben gezeigt (siehe 3.2.) konstant bei einer Apoptoserate von 23 % (23±4,6 %) (siehe Abb. 13b). Bei den Hauptzellen war der Unterschied zwischen stimulierten und nicht stimulierten Zellen bei 0 h signifikant. Auch bei den Hauptzellen konnte somit die Stimulierbarkeit der CD95-Rezeptoren gemäß deren Expression gezeigt werden. Sie reagierten mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate zum Zeitpunkt 0h.

Abb. 14b: Hauptzellen mit CD95-Ligand stimuliert in der TUNEL-Färbung über 48 h Kultur

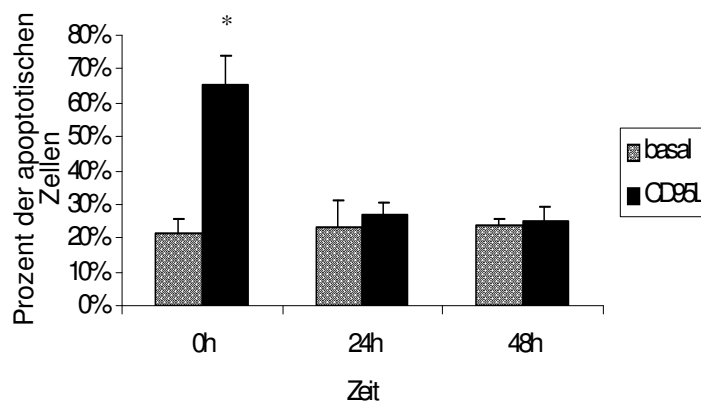


Abb. 14b: Stimulation von Hauptzellen mit CD95-Ligand (100 ng/ml) über 3 h zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h nach der TUNEL- Methode gefärbt (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

0 h basal vrs. 0 h + CD95L p = 0,017

4. DISKUSSION

4.1. DIE EXPRESSION DES CD95-REZEPTORS

Apoptose ist in der Magenschleimhaut für die Aufrechterhaltung des Zellgleichgewichts verantwortlich (Li et al., 1995). Sie stellt den Gegenspieler zur Proliferation dar. Unter physiologischen Bedingungen wird eine basale Apoptoserate von 2–3 % gemessen (Szabo et Tarnawski, 2000 S. 8). Unter pathologischen Bedingungen, z.B. im Rahmen einer Infektion mit *Helicobacter pylori*, steigt die Apoptoserate auf bis zu 16 % an (Szabo et Tarnawski, 2000 S.8). Schon dies zeigt die zentrale Rolle der Apoptose bei Pathologien im Bereich der Magenschleimhaut. Wie schon in der Einleitung erörtert, existieren verschiedene Theorien zur Regulation der Apoptose im Bereich der Magenschleimhaut. Einerseits wird der Achlorhydrie, TNF α und Interleukin 1 β eine zentrale Rolle zugeschrieben (Neu et al., 2003; Rad et al., 2003; Lamarque et al., 2003). Andere stellen die Regulation der Apoptose über CD95-Rezeptoren in den Vordergrund (Rudi et al., 1998; Wang et al., 2000a). In dieser Arbeit stellt sich *in vitro* die zentrale Rolle der CD95-Rezeptoren dar: Über den Kultivierungszeitraum von 48 Stunden konnte keine Veränderung der Apoptoserate bei Haupt- und Parietalzellen gemessen werden. Dagegen wurde aber bei Parietalzellen eine deutliche Zunahme der Expression von CD95-Rezeptoren gezeigt, bei Hauptzellen eine deutliche Abnahme. Bei Zugabe des CD95-Liganden konnte sowohl bei Parietal-, als auch bei Hauptzellen Apoptose ausgelöst werden, entsprechend der Expression der CD95-Rezeptoren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Ergebnisse von Rudi et al., nämlich die zentrale Rolle der CD95-Rezeptoren bei der Apoptose von Magenschleimhautzellen, auch *in vitro* auf isolierten Zellen übertragen werden können (Rudi et al., 1998): Die zentrale Induktion der Apoptose läuft über CD95-Rezeptoren, deren Aktivierung allerdings von außen erfolgt.

In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass bei isolierten Haupt- und Parietalzellen kein CD95-Ligand nachgewiesen werden kann. Auch Suda et al. zeigten dies; sie konnten die Produktion des CD95-Liganden nicht bei den Magenzellen, sondern nur bei eingewanderten T-Lymphozyten nachweisen (Suda et al., 1995). Nach der Theorie von Wang et al. wird durch die Ausschüttung von CD95-Ligand von diesen T-Lymphozyten, die bei einer Infektion der Magenschleimhaut einwandern, Apoptose an den Magenschleimhautzellen über die CD95-Rezeptoren ausgelöst (Wang et al., 2000a). Diese Theorie konnte *in vitro* bei isolierten Zellen nachgewiesen werden. Da es sich um isolierte Zellen handelt, waren keine T-Lymphozyten in der Kultur. Somit musste der CD95-Ligand von außen zugegeben werden, um Apoptose auszulösen.

An diesem Punkt werden die Wechselwirkungen zwischen den Zellen in der Magenmukosa deutlich. Es handelt sich um ein komplexes System, das nur im Gesamten funktioniert. So konnte z.B. bei Prinz et al. gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* die ECL-Zellen über die Drosselung der Histaminausschüttung die Säureproduktion der Parietalzellen hemmen und so einen pH-Anstieg im Magen verursachen; diese Achlorhydrie wiederum löst über TNF α und Interleukin 1 β Apoptose aus (Prinz et al., 1997; Mahr et al., 2000; Huber et al., 2002; Neu et al., 2003).

Ein fehlender Stimulus von anderen Zellen wird als Erklärungsansatz verfolgt, wenn Apoptoseregulatoren in ihrer Expression verändert werden, ohne dass Apoptose induziert wird. In einem Zellverband wie z.B. der Magenmukosa dient Apoptose dazu, Zellen, die nicht mehr im Verband gebraucht werden können, weil sie zu alt oder verändert sind, zu eliminieren. Wann dies geschieht, hängt u.a. von Einflüssen, bzw. von Signalen der benachbarten Zellen ab, die Apoptose in ihrer Nachbarschaft entweder unterdrücken oder induzieren können (Raff, 1992). Der Verlust der interzellulären Kontakte kann Apoptose verursachen und wird als Anoikis bezeichnet (Weyant et al., 2000). Im Falle dieser Arbeit würde man einen Anstieg der Apoptose in Kultur erwarten, da die Zellen völlig aus dem Verband gelöst wurden. Einige Autoren konnten dies für andere Zellen zeigen: z.B. werden bei einem entzündlichen Geschehen der Magenschleimhaut die Zellkontakte geschädigt und daraufhin wird Apoptose ausgelöst (Abreu et al., 2000); bzw. es wird Apoptose in

kultivierten duktaalen Nieren-Zellen ausgelöst, wenn die interzellulären Kontakte aufgelöst werden (Park et al., 1999). In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhalt der Mukosazellen in der Kolonschleimhaut untersucht. Dieser hängt von der Kalziumkonzentration im Kulturmedium ab. Fehlt Kalzium resultiert eine Einzelzellsuspension. Um die Zellen dauerhaft als Einzelzellen zu erhalten wurde zur Zellkultur ein Antikörper gegen Integrin zugegeben. In dieser Einzelzellsuspension stieg die Apoptoserate signifikant gegenüber den Epithelzellen im Verband an, ohne dass weitere Apoptoseinduktoren zugegeben wurden (Bates et al., 1994). Diese Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zellen können in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden, da es sich um Einzelzellsuspensionen handelt.

Auffallend ist die gegensinnige Regulation der CD95-Rezeptoren bei Haupt- und Parietalzellen: Bei Hauptzellen nehmen über den Kultivierungszeitraum von 48 h die CD95-Rezeptoren ab, bei Parietalzellen zu. Bei Hauptzellen ist die stärkste Expression der CD95-Rezeptoren kurz nach der Isolierung gemessen worden. Parallel dazu läßt sich auch durch Zugabe des CD95-Liganden Apoptose auslösen. Die Isolation der Zellen, also der Verlust der Zellkontakte könnte die Ursache sein, weshalb bei Hauptzellen nach der Isolierung der Zellen vermehrt CD95-Rezeptoren exprimiert werden, also vermehrt Zellen apoptotisch werden. In der Zellkultur ist eine starke Abnahme der Zellzahl bei Hauptzellen aufgefallen. Bei 48h waren 48 % der Zellen abgestorben. Da keine Apoptose in Kultur nachgewiesen werden konnte sind die Zellen wohl nekrotisch geworden. Für die überlebenden Zellen waren die Kultivierungsbedingungen gut, so dass sie nicht versuchten über die Bildung von CD95-Rezeptoren apoptotisch zu werden. Parietalzellen waren einfacher in Kultur zu halten. Sie scheinen den Verlust der Zellkontakte nicht mit einer gesteigerten Apoptose zu beantworten. Die Zunahme der CD95-Rezeptoren über die Zeit kann etwas mit dem Alter der Zellen oder mit den auf Dauer nicht optimalen Kultivierungsbedingungen zu tun haben.

Ein weiterer hypothetischer Erklärungsansatz wäre, dass die Zelloberfläche durch die Isolationsschritte geschädigt wird und somit keine Signale von anderen Zellen mehr empfangen werden können, so dass Signale von außen nicht umgesetzt werden können. Einige Artikel gehen neben den Zellkontakten auch auf die extrazelluläre Matrix ein: Bei Frisch und Francis wird sowohl eine

Apoptosesteigerung nach Lösen von Epithelzellen aus dem Verband, als auch nach Veränderung der extrazellulären Matrix nachgewiesen (Frisch et Francis, 1994). Neben der Apoptosesteigerung kann es auch zu einer Abnahme der Apoptose durch Veränderung der extrazellulären Matrix kommen: Eine geringere Apoptoserate konnte beispielsweise nachgewiesen werden, wenn Epithelzellen auf bestimmten Medien (z.B. Kollagen IV) angewachsen sind und nicht in freier Suspension kultiviert wurden (Merio et al., 1997). Auch aus diesen Veröffentlichungen ergibt sich, dass Stimuli für die Apoptose von außen oder von anderen Zellen im Verband kommen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die unterschiedliche Regulation von CD95-Rezeptoren bei Haupt- und Parietalzellen kann in den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen gesehen werden. Parietalzellen werden auf Cell Tak, Hauptzellen dagegen auf Kollagen Typ 1 angezüchtet. Bei Cell Tak handelt es sich um ein polyphenolisches Protein, das aus Meeresmuscheln (*Mytilus edulis*) extrahiert wird. Es wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass nicht lösliche extrazelluläre Matrix CD95-mRNA und CD95-Proteinexpression bei Lungeneithelien ansteigen lässt. Die CD95-vermittelte Apoptose stieg beispielsweise bei Epithelien, die auf Typ IV-Kollagen kultiviert wurden deutlich an im Vergleich zu Zellen, die auf Polylysin gezüchtet wurden (Fine et al., 1998). Dies könnte auch bei Haupt- und Parietalzellen einen Einfluss auf die gemessenen CD95-Rezeptoren genommen haben.

In dieser Arbeit überrascht die starke Expression von CD95-Rezeptoren auf Haupt- und Parietalzellen. Bisher gelang ein Nachweis von CD95-Rezeptoren nur vereinzelt auf Epithelzellen der oberflächlichen Magenmukosa (Rudi et al., 1998). Die überraschend starke Expression des CD95-Rezeptors auf isolierten Zellen kann auf die Isolationsmethode zurückgeführt werden, bei der das Epitop des CD95-Rezeptors durch die Protease freigelegt werden könnte. Eine ähnliche Beobachtung machte auch Nishio: Er stellte einen deutlichen Unterschied in der Expressionsstärke von CD95-Rezeptoren von Parietalzellen fest (Nishio et al., 1996). Bei gefrorenen Schnitten von Mukosa von Mäusen mit einer Autoimmungastritis konnten nur wenige Parietalzellen als CD95R-positiv angefärbt werden. In einer Zellsuspension von Parietalzellen waren diese stark CD95R-positiv (Nishio et al., 1996).

4.2. DIE EXPRESSION VON BAX UND BCL-2

Nachdem die Schlüsselrolle des CD95-Systems bei der Apoptoseauslösung bei Magenschleimhautzellen gezeigt wurde, stellt sich nun die Frage, weshalb die Regulatorproteine Bax und Bcl-2 in ihrer Expression verändert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Haupt- und Parietalzellen über den Kultivierungszeitraum von 48 h die Expression von Bax ansteigt, die von Bcl-2 abfällt. Dieses Ergebnis konnte bei kultivierten Lymphozyten ebenfalls nachgewiesen werden. Mit Immunoblots von isolierten Lymphozyten wurde ein mit der Zeit abfallender Proteinspiegel von Bcl-2 und ein ansteigender Proteinspiegel von Bax bei einer Kultivierung über 15 Tage festgestellt (Ohta et al., 1995). Auch bei T-Zellen von jungen und alten Menschen konnte ein signifikanter Unterschied der RNA und der Proteine von Bax und Bcl-2 gezeigt werden. Im Alter nimmt im Vergleich zu jungen Menschen der Bcl-2-Spiegel bei T-Zellen ab und steigt der Bax-Spiegel an (Sudeepta et Sudir, 1998). Der ansteigende Bax- und abfallende Bcl-2-Spiegel lässt sich in der Theorie folgendermaßen erklären: Beim Altern der Zelle und mit andauernder Kultivierung steigt die Bereitschaft zur Apoptose und deshalb das Apoptose-induzierende Bax an, das Apoptose-hemmende Bcl-2 fällt ab. Auch bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* konnte eine gesteigerte Expression von Bax und eine sinkende Expression von Bcl-2 gezeigt werden (Yang et al., 2003). Damit zeigt sich auch auf mitochondrialem Niveau die Apoptoseinduktion von *Helicobacter pylori*. Welche zentrale Rolle Bax und Bcl-2 v.a. in der Karzinogenese des Magens spielen wird unten ausgeführt (siehe 4.4.). Dies zeigt, dass auch bei der zentralen Rolle des CD95-Systems Bax und Bcl-2 als mitochondriale Regulatorproteine für Apoptose im Magen wichtig sind.

Im Westernblot konnte gezeigt werden, dass über den 48-stündigen Kultivierungszeitraum hin das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax abfällt. Es erreicht bei beiden Zellarten bei 48 Stunden sogar einen Wert unter 1. Dies bedeutet, es wird mehr Bax-Protein nachgewiesen, als Bcl-2. Ein Apoptoseanstieg wäre zu erwarten. Jedoch konnte, wie oben beschrieben, keine Zunahme der Apoptose gemessen werden. Dazu gibt es verschiedene Erklärungsansätze: Oltavi und Yang konnten zeigen, dass Bax und Bcl-2 homogene oder heterogene Dimere bilden und so ihre Wirkung gegenseitig abschwächen, oder ihre eigene Wirkung verstärken können

(siehe 1.2.). Es konnte nur gezeigt werden, dass Bcl-2 Monomere oder homogene Dimere Apoptose hemmen und homogene Bax-Dimere Apoptose induzieren. Ob in den heterogenen Dimeren, die aus Bax und Bcl-2 bestehen Bax Bcl-2 hemmt oder Bcl-2 Bax ist nicht bekannt (Oltavi et al., 1993; Yang et al., 1995). Dazu gibt es allerdings einige z.T. widersprüchliche Forschungsergebnisse:

Die Dimerenbildung von Bax und Bcl-2 findet an zwei Domänen statt, der BH1 und BH2 (bcl-2-homology) Domäne, welche zwei Bereichen mit Bcl-2-Homologien bei Bax entsprechen. Wenn diese Bereiche im Versuch in ihrer Aminosäuresequenz verändert werden, können sich keine Heterodimere mehr bilden, sondern nur noch Bcl-2-Homodimere, wodurch keine Apoptose mehr stattfindet. Daraus schließt der Autor, dass Bcl-2 seine Wirkung durch Heterodimerenbildung mit Bax „abschaltet“ und somit Bax Bcl-2 hemmt (Yin et al., 1994). Otter et al. konnten nachweisen, dass nicht Bax/Bcl-2-Dimere Apoptose verhindern können, also nicht Bcl-2 Bax hemmt, sondern dass dafür die nicht an Bax gebundenen Bcl-2-Proteine verantwortlich sind (Otter et al., 1998). Dagegen stellte sich bei Rosse et al. heraus, dass Bcl-2 Bax hemmt. Er hat nach Überexpression von Bax und Bcl-2 keine Apoptose messen können, obwohl der Cytochrom C-Gehalt im Zytoplasma deutlich anstieg. Er folgerte daraus, dass Bcl-2 mit Bax in Wechselwirkung tritt und Apoptose hemmt, unabhängig vom Cytochrom C-Gehalt (Rosse et al., 1998). Auch in einer Studie von Yang wurde gezeigt, dass Bcl-2 Bax hemmt, da keine Apoptose mehr stattfindet, wenn die Hälfte des vorhandenen Bax mit Bcl-2 Heterodimere bildet (Yang et al., 1997).

Die Theorie der Dimerenbildung wird noch weiter erschwert, da nicht nur Bax und Bcl-2 Dimere bilden können, sondern auch Bad und Bcl-x_L, weitere Apoptose-Regulatorproteine, die die BH1- und BH2-Domäne besitzen. Somit können auch diese Proteine in die Regulation der Apoptose durch Bax und Bcl-2 eingreifen, weil Bad mit Bcl-2 und Bcl-x_L Dimere bilden kann. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass Apoptose gänzlich ohne Beteiligung von Bax und Bcl-2 ablaufen kann: Jiang zeigte, dass eine Apoptoseinduktion mit verschiedensten Reagenzien keinerlei Effekt auf den Bcl-2- oder Bax- Proteinspiegel bei Hepatoblastomzellen hatte. Es konnte dabei ein deutlicher Apoptoseanstieg gemessen werden. Bei diesen Zellen standen andere Regulatorproteine zur Apoptoseregulation im Vordergrund (Jiang et al., 1996). Auch Lopez konnte bei Zellen aus dem Kleinhirn die Unabhängigkeit der Apoptose von Bax und Bcl-2 auf Protein- und RNA-Ebene zeigen. Auch hier wurde

Apoptose induziert, ohne dass sich die Bax- oder Bcl-2-Expression änderte (Lopez et al., 1999). Aus diesen verschiedenen Studien geht hervor, dass die Wechselwirkungen von Bax und Bcl-2 noch unklar sind und es durchaus möglich ist, dass es bei einer Veränderung von Bax und Bcl-2 nicht zu einer Veränderung der Apoptoserate kommen muss. Da in dieser Arbeit nichts über die homogene oder heterogene Dimerenbildung gesagt werden kann, bzw. keine weiteren möglichen Bindungspartner untersucht wurden, ist die Aussage, dass bei einem Verhältnis von Bax zu Bcl-2 größer 1 Apoptose induziert wird, sehr spekulativ.

Eine wegweisende Theorie, warum Bax und Bcl-2 in ihrer Expression verändert werden, ohne eine Veränderung des Apoptoseverhaltens zu bewirken, stellte Oltavi auf: Er zeigt in einer Studie, dass die Dimerenbildung von Bax und Bcl-2 eine Grundrichtung angeben, die entweder Apoptose fördert oder hemmt; der ausschlaggebende Stimulus kommt jedoch von außen (Oltavi et al., 1993). Die Veränderung von Bax und Bcl-2 bewirkt also keine Veränderung der spontanen Apoptose. Sie kann nur die Bereitschaft der Zelle zur Apoptose steigern oder vermindern, je nachdem ob Bax oder Bcl-2 überwiegt. Dies entspricht dem Modell des intrinsischen Weges der Apoptoseinduktion. Dieser besagt, dass die mitochondrialen Proteine, darunter Bax und Bcl-2, die Stabilität der Zelle gegenüber einer Apoptoseinduktion von außen, beeinflussen (Rossi et Gaidano, 2003). Der extrinsische Weg dagegen läuft über die Todesrezeptoren ab (Rossi et Gaidano, 2003). Jäckel et al. hat Bax, Bcl-2 und Apoptose bei Larynxkarzinom-Zellen untersucht und geht sogar soweit, dass er den direkten Zusammenhang zwischen Bax, Bcl-2 und Apoptose bei Larynxkarzinomen in Frage stellt, da, wie auch in dieser Arbeit, das Apoptoseverhalten der Zellen sich nicht ändert, obwohl Bax und Bcl-2 in ihrer Expression verändert werden (Jäckel et al., 1999). Auch bei Colitis ulcerosa hat sich in den Schleimhautzellen des Kolons gezeigt, dass das Bcl-2-Protein und CD95-Rezeptoren unverändert blieben, Bax abfiel und eine gesteigerte Apoptose gemessen werden konnte. Daraufhin wurde auch auf eine von Bax, Bcl-2 und CD95 unabhängige Apoptose geschlossen (Iimura et al., 2000). Im Weiteren sind auch Zellen bekannt, die nur Bax, aber kein Bcl-2 exprimieren (z.B. Hepatozyten, im exokrinen Pankreas) (Krajewski et al., 1994). Somit können die Proteine auch einzeln wirken. Diese Zellen zeigen aber keine erhöhte Apoptoserate, was bei einer alleinigen Expression von Bax zu erwarten wäre. Somit wurde in dieser Arbeit ähnlich

wie bei Oltavi gezeigt (siehe 3.2.), dass Bax alleine keine Apoptose induzieren kann, sondern immer einen zusätzlichen Stimulus von außen braucht.

Zusammenfassend scheint Bax und Bcl-2 im Magen nur eine untergeordnete Rolle neben dem CD95-System zu spielen. Es kann aber auch sein, dass die Rolle von Bax und Bcl-2 unterschätzt wird, weil keine weiteren Bindungspartner untersucht wurden. Die einzelnen Zellen zeigen zwar Veränderungen, die auf eine baldige Apoptose hinweisen (steigende Bax-Spiegel und fallende Bcl-2-Spiegel), aber es fehlt der Stimulus von den physiologisch benachbarten Zellen, damit Apoptose ausgelöst wird. Es konnte kein natürliches Zusammenspiel zwischen den Zellen stattfinden. Somit konnte diese Möglichkeit der Apoptose-Regulierung nicht untersucht werden.

Interessanterweise gibt es deutliche Unterschiede bei Haupt- und Parietalzellen, was Bax und Bcl-2 betrifft. Im Western Blot wurde festgestellt, dass in Hauptzellen Bax und Bcl-2 zwei- bis zehnmal stärker exprimiert werden. Der Unterschied in der Expression zwischen Bax und Bcl-2 bei Haupt- gegenüber Parietalzellen kann mit der unterschiedlichen Lebensdauer der beiden Zellarten zusammenhängen. Parietalzellen sterben nach ca. 54 Tagen ab, nachdem sie an die Drüsenspitze und an den Drüsengrund gewandert sind. Bei Hauptzellen dagegen dauert die endgültige Ausdifferenzierung 30 Tage. Während dieser Zeit erreichen sie den Drüsengrund der Magendrüsenspitzen; insgesamt beträgt ihre Lebensdauer ca. 190 Tage (Karam et Leblond, 1993c; Karam, 1993). In dieser viermal längeren Überlebenszeit muss ein stabileres Gleichgewicht zwischen Apoptose induzierenden und Apoptose hemmenden Einflüssen gewährleistet werden. Aus diesem Grund könnten Apoptose regulierende Proteine von größerer Bedeutung sein. Die stärkere Expression von Bax und Bcl-2 in Haupt- als in Parietalzellen konnte auch in immunhistochemischen Färbungen von Schnitten durch die Magenmukosa gezeigt werden (Neu et al., 2001). In den genannten Färbungen war dieser Unterschied noch deutlicher, als bei den isolierten Zellen. Dieser Umstand kann darauf zurückgeführt werden, dass bei der Färbung intakte Mukosa verwendet wurde, in der alle Zellen in allen Differenzierungsstufen vorliegen. Beim Ablösen der Zellen aus der Mukosa mit Pronase werden Zellen vom Drüsengrund schlechter abgelöst als Zellen an den Drüsenspitzen, da sie schlechter zugänglich sind. Bax- und Bcl-2-positive

Parietalzellen befinden sich v.a. in den oberflächlicheren Schleimhautanteilen (Neu et al., 2001). Somit wird das Verhältnis von Bax- und Bcl-2-positiven zu Bax- und Bcl-2-negativen Parietalzellen in Richtung der positiven Zellen verschoben. Damit stellt sich das Überwiegen des Bax und Bcl-2 in Hauptzellen gegenüber den Parietalzellen nicht mehr so deutlich dar.

Ein weiterer Unterschied zwischen Haupt- und Parietalzellen ist das Verhältnis Bcl-2:Bax. Es ist in Parietalzellen größer als in Hauptzellen (siehe 3.3.2.). Es befindet sich demnach in Parietalzellen im Vergleich zu Hauptzellen mehr Apoptose-inhibierendes Bcl-2, als Apoptose-stimulierendes Bax. Dies könnte darauf hindeuten, dass Parietalzellen im Gegensatz zu Hauptzellen widerstandsfähiger sind, weil mehr Apoptose-inhibierendes Bcl-2 vorhanden ist als Apoptose-induzierendes Bax. Im Sinne des intrinsischen Weges der Apoptoseinduktion würde das für ein geringeres Ansprechen auf Reize bedeuten, die Apoptose induzieren. In der Kultivierung zeigte sich wie oben schon erwähnt eine größere Empfindlichkeit der Hauptzellen, im Gegensatz zu den Parietalzellen. Auch in der Literatur findet man Beispiele, in denen Hauptzellen auf Apoptose-induzierende Stimuli mit Apoptose reagieren, Parietalzellen dagegen nicht (Ito et al., 2000; Li et al., 1997). Diese stärkere Apoptoseneigung von Hauptzellen passt auch zu der starken Expression von CD95-Rezeptoren bei 0 h. Die Isolierung der Zellen und das Lösen der Hauptzellen aus dem Verband scheint für Hauptzellen eine stärkere Apoptoseinduktion zu sein, als für Parietalzellen. Deshalb reagieren sie darauf mit einer Produktion von CD95-Rezeptoren. Außerdem wird deutlich mehr Bax exprimiert, so dass das Verhältnis Bcl-2/Bax sinkt. Somit sind die Zellen sensibler für Apoptose.

Dies wurde schon in einer früheren Studie gezeigt: Hagen hat isolierte Magenzellen mit Ammonium behandelt, woraufhin Parietalzellen nekrotisch wurden, Hauptzellen dagegen apoptotisch. Außerdem wurde in dieser Studie gezeigt, dass trotz der Hemmung der Proteinbiosynthese die Art des Zelltodes nicht beeinflusst werden konnte. Daraus wurde geschlossen, dass die Apoptose-regulierenden Proteine schon vor dem Stimulus, der zum Zelltod führt, in der Zelle vorhanden sind (Hagen et al., 1997). Bax- und Bcl-2 könnten zu diesen Proteinen gehören.

4.3. WECHSELWIRKUNGEN VON CD95, BAX UND BCL-2

Im Rahmen in dieser Arbeit wurde verdeutlicht, dass bei Parietalzellen die RNA und Proteine des CD95-Rezeptors über den Kultivierungszeitraum ansteigen, die RNA und Proteine des Bcl-2 dagegen abfallen (siehe 3.3.). Es ist bekannt, dass Bcl-2 Apoptose hemmt und über den CD95-Rezeptor Apoptose induziert werden kann. Bei abnehmendem Bcl-2 und ansteigenden CD95-Rezeptoren ist nach Stimulation der Rezeptoren Apoptose zu erwarten, was für die Parietalzellen gezeigt werden konnte. In einer Studie von M. Mapara et al. wurde beschrieben, dass ein fallender RNA-Spiegel von Bcl-2 bei B-Lymphozyten die Zellen sensibilisiert auf eine Apoptose, die durch CD95-Antikörper induziert wurde (Mapara et al., 1993).

Bei den Hauptzellen fällt Bcl-2 im Westernblot und in der PCR ab, der CD95-Rezeptor fällt jedoch auf Proteinebene auch ab (siehe 3.3.). Somit konnten bei 0 h ein hoher Bcl-2- und ein hoher CD95-Spiegel nachgewiesen werden. Bei Stimulation mit dem CD95-Ligand wurde trotz der Apoptose-hemmenden Wirkung von Bcl-2 Apoptose ausgelöst. Somit scheint Bcl-2 nicht in der Lage zu sein, Apoptose zu hemmen, die über den CD95-Rezeptor ausgelöst wurde. Auch Kuwana et al. kam auf das Ergebnis, dass Bcl-2 Apoptose nicht effizient hemmen kann, wenn diese durch das CD95-System ausgelöst wurde (Kuwana et al., 1998). Er führte dies darauf zurück, dass bei Apoptose, die durch das CD95-System ausgelöst wurde, direkt Caspase 8 aktiviert wurde und so die Caspase-Kaskade gestartet werden konnte. Bcl-2 konnte die Apoptose nur bei sehr geringer Caspase 8-Aktivität hemmen (Kuwana et al., 1998). Es gibt auch noch weitere Studien, die keine Korrelation zwischen Bcl-2 und dem CD95-Rezeptor z.B. bei Kolonkarzinomen gezeigt haben. Hier konnte ebenfalls Bcl-2 Apoptose nicht hemmen, die durch CD95 ausgelöst worden war (Owen-Schaub et al., 1994; Itoh et al., 1993). Die Wechselwirkungen zwischen dem mitochondrialen Weg der Apoptoseinduktion und dem Weg über die Todesrezeptoren sind unklar.

Es scheint im Falle der Epithelzellen im Gastrointestinaltrakt das CD95-System dem mitochondrialen System mit Bax und Bcl-2 überlegen zu sein. Es existiert eine weitere Studie von Liu et al., die die Mukosazellen des Magens durch Wasserentzug stimulierten, woraufhin Apoptose signifikant zunahm (Liu et al., 2003).

Die untersuchten CD95-Rezeptoren wurden in Ihrer Expression kaum verändert; es konnte nur ein leichter Anstieg der CD95-Rezeptoren und des CD95-Liganden gezeigt werden (Liu et al., 2003). Dagegen konnte eine Zunahme des Bax-Proteins und eine Abnahme des Bcl-2-Proteins gemessen werden. Deshalb schließen die Autoren in diesem Fall auf eine CD95-unabhängige Apoptoseinduktion (Liu et al., 2003). Somit stellt sich die Frage, ob die Mukosazellen, je nach Ursache auf eine Apoptoseinduktion unterschiedlich reagieren. Im Falle einer Infektion mit *Helicobacter pylori* wird die Apoptose über CD95-Rezeptoren induziert, im Falle des Wasserentzugs über den intrinsischen, mitochondrialen Weg, also über Bax und Bcl-2. Für diese Theorie spricht auch, dass z.B. bei Magenkarzinome die Expression von CD95-Rezeptoren differiert, je nach Karzinomtyp: Beim intestinalen Karzinom konnten kaum CD95-Rezeptoren nachgewiesen werden, dagegen war beim diffusen Typ die Expression sehr hoch (Vollmers et al., 1997).

4.4. DIE BEDEUTUNG DER APOPTOSE FÜR DIE KARZINOGENESE DES MAGENS

Wie schon in der Einleitung beschrieben führt eine Infektion mit *Helicobacter pylori* u.a. über eine Steigerung der Apoptose zu einer chronisch atrophischen Gastritis. Eine solche chronische Entzündung der Magenschleimhaut kann auch der erste Schritt zur Entwicklung eines intestinalen Magenkarzinoms sein (Hahm et al., 2003). Der Entwicklung eines Karzinoms geht in den meisten Fällen ein chronisches Ungleichgewicht zwischen Apoptose und Proliferation voraus (Nardone, 2003). Da eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* Apoptose beeinflusst, ist der Weg zu einer malignen Entartung möglich. Eine Atrophie der Magenschleimhaut, die durch eine gesteigerte Apoptose entsteht, kann zu weiteren Veränderungen der Magenschleimhaut führen: Zum einen kann eine intestinale Metaplasie daraus hervorgehen, wobei bei einer inkompletten Metaplasie eine deutlich höhere Apoptoserate zu messen ist, als bei einer kompletten (Xia et Talley, 2002). Die Entstehung eines Magenkarzinoms ist aus einer inkompletten Metaplasie wahrscheinlicher, als aus einer kompletten (Xia et Talley, 2002).

Eine direkte Folge der Atrophie der Magenschleimhaut stellt wegen der verminderten Anzahl der Parietalzellen eine Hypochlorhydrie dar, die eine

Hypergastrinämie zur Folge hat (Wang et al., 2000). Diese vermehrte Ausschüttung von Gastrin bewirkt eine Zellproliferation, woraus ein Magenkarzinom entstehen kann (Fox et al., 2003). Es werden v.a. Vorläuferzellen der Parietalzellen vermehrt gebildet (Frane et al., 2001). Bei transgenen Mäusen, die eine Überexpression von Gastrin zeigen, entwickeln sich spontan Magenkarzinome; dies kann durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* noch verstärkt werden (Wang et al., 2000). Es wurde im Weiteren die These aufgestellt, dass durch den geringen Säuregehalt des Magens es zu Infektionen mit anderen Bakterien kommen kann, die Nitride in Nitrosamine und Nitrosamide umbauen, die wiederum starke Karzinogene darstellen (Seery, 1991).

Eine weitere Möglichkeit zur Karzinogenese durch *Helicobacter pylori* bezieht sich auf Monochloramine, die als Stoffwechselprodukt im Magen aus der Urease entstehen können, die *Helicobacter pylori* im Magen freisetzt (Xia et Talley, 2001). Diese Monochloramine sind dafür bekannt, dass sie DNA-Degenerationen verursachen können, was zur malignen Entartung von Magen­zellen führen kann (Xia et Talley, 2001). Auch eine vermehrte Ausschüttung von Interleukin-1 β konnte bei Patienten mit Helicobacter-Infektion gezeigt werden. Dadurch wird die Apoptose weiter gesteigert und eine Atrophie verursacht (Zhan et al., 2003).

Bei der Entstehung eines intestinalen Magenkarzinoms spielt wie oben erwähnt die Veränderung der normalen Apoptose eine große Rolle: Von der chronischen Gastritis über die Atrophie zur Dysplasie steigt die Zahl der apoptotischen Zellen deutlich an (Ishida et al., 1996). Dadurch wird verhindert, dass veränderte Zellen überleben. Im Gegenzug wird durch die gesteigerte Apoptose eine gesteigerte Proliferation induziert. Bei der Atrophie ist die Apoptose im Übergewicht, beim invasiven Karzinom überwiegt die Proliferation (Xia et Talley, 2001). Es findet eine Veränderung der Magen­zellen von apoptotisch zu antiapoptotisch statt (van der Woude et al., 2002). Eine reine Proliferation würde jedoch nicht automatisch eine maligne Entartung der Zellen bewirken. Die Ursache dafür ist in einer DNA-Instabilität zu suchen: Chromosomale Veränderungen, Reparations- und Replikationsfehler der DNA führen zu Aktivierungen von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Nardone, 2003). In intestinalen Karzinomen sind Veränderungen von Apoptoseregulatoren wie z.B. Bcl-2 und p53 nachgewiesen worden (Nardone, 2003). Somit ist die Imbalance zwischen Apoptose und Proliferation gestört und genetisch veränderte Zellen können sich ungehemmt verbreiten. Genau hier sucht

man auch Ansatzpunkte für eine Therapie des intestinalen Magenkarzinoms: Durch Gabe eines Antikörpers gegen einen Apoptoserezeptor, wird Apoptose in den veränderten Zellen ausgelöst die Proliferation gehemmt (Vollmers et al., 1998).

Bax und Bcl-2 spielen in der Karzinogenese des Magens eine große Rolle: Es konnte gezeigt werden, dass in der normalen Magenschleimhaut Bcl-2 fast ausschließlich in den proliferativen Zellen am Drüsenhals zu finden ist (Xia et Talley, 2003). In dieser Region sind in der gesunden Magenschleimhaut keine apoptotischen Zellen zu finden. Bei einer Infektion mit *Helicobacter pylori* fällt der Bcl-2-Spiegel in den Zellen und der Bax-Spiegel steigt an, die Apoptose steigt und es kommt zu einer Atrophie (Zhan et al., 2003). Auf zellulärer Ebene zeigt sich eine Verschiebung der proliferative Zone nach distal, d.h. Apoptose, die normalerweise nur an den Drüsenspitzen nachzuweisen ist, kann auch tief in den Magendrüsen gefunden werden (Xia et al., 2002; Tseng et al., 2003). In der weiteren Veränderung der Magen Zellen zur Dysplasie steigt Bcl-2 an (Xia et Talley, 2003). Somit können veränderte dysplastische Zellen nicht durch Apoptose eliminiert werden; die Möglichkeit der Entartung dieser Zellen wird größer (Xia et Talley, 2003). Für Bcl-2 konnte ein verstärkte Expression bei Magenkarzinomen vom intestinalen Typ gezeigt werden (Liu et al., 1998). Karzinome vom diffusen Typ waren Bcl-2-negativ (Müller et al., 1998). Es können jedoch von der Expressionsstärke von Bcl-2 keine Rückschlüsse auf die Malignität, die Tumorgöße oder das Tumorstadium gezogen werden (Liu et al., 1998; Koshida et al., 1997; Komatsu et al., 1996; Lauwers et al., 1995). Inada et al. versuchen eine Korrelation herzustellen zwischen einem hohen Bcl-2-Spiegel und einer besseren Prognose (Inada et al., 1998). Bcl-2 ist für die Entstehung eines intestinalen Karzinoms wichtig, aber unabhängig vom weiteren Verlauf (Liu et al., 1998).

Es stellt sich die Frage, weshalb die Infektion mit *Helicobacter pylori* sehr verbreitet ist, jedoch nur wenige Infizierte ein Magenkarzinom entwickeln. Peek et al. zeigte, dass bestimmte Stämme des *Helicobacter pylori*, nämlich die Cag positiven (Kidd et al., 2000), Mutagene von z.B. Bcl-2 verursachen (Komatsu et al., 1996; Eskelinen et Haglund, 1999). Dadurch wird Bcl-2 vermehrt exprimiert, was zu einer verminderten Apoptose führt; daneben findet eine gesteigerte Proliferation statt (Peek, 2002). Dadurch leben mutierte Zellen länger und es kann ein Karzinom entstehen (Peek et Blaser, 2002). Ein weiterer Grund, weshalb nur wenige

Infektionen mit *Helicobacter pylori* zu Karzinomen führen wird z.B. in der Ernährung (Salzgehalt, Vitaminmangel, Nitrataufnahm) gesucht; auch Rauchen und der Einfluss von Sexualhormonen scheinen eine Rolle zu spielen (Sipponen et al., 1998).

Insgesamt ist neben vielen Unklarheiten zur Entstehung eines Magenkarzinomes der Einfluss einer Infektion mit *Helicobacter pylori* unumstritten. Deshalb wurde 1994 die Infektion mit *Helicobacter pylori* zu einem Karzinogen Klasse I ernannt (Xia et Talley, 2003). Im Magenkarzinom selbst kann nur sehr selten *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden (Xia et Talley, 2003). Eine rechtzeitige Eradikationstherapie kann die Entwicklung eines Magenkarzinomes verhindern. Deshalb nimmt die Infektionsrate mit *Helicobacter pylori* ab. Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass Krankheiten wie gastroösophagealer Reflux, der Barrett-Ösophagus und das Adenokarzinom des Ösophagus deutlich zunahmen (Blaser, 1999).

4.5. WEITERE WICHTIGE FORSCHUNGSGEBIETE FÜR BAX, BCL-2 UND CD95-REZEPTOR

In verschiedenen Tumoren konnte eine verstärkte Expression von CD95-Ligand gemessen werden: z.B. in Kolon-, Bronchial- und Nierenkarzinomen. Wahrscheinlich bedienen sich die Tumorzellen des CD95-Liganden, um sich ungehindert im gesunden Gewebe ausbreiten zu können, indem sie aktivierte Lymphozyten, die die Tumorzellen eliminieren sollen, zerstören (Schulze-Osthoff et al., 1998). Auch bei kolorektalen Adenokarzinomen wurde nachgewiesen, dass eine Verminderung des physiologischen Bcl-2-Spiegels entlang der Krypten mit einem Wachstum von präneoplastischen Polypen einhergeht. Es wird versucht, Bcl-2 als Frühindikator für diese Veränderungen zu nutzen (Bronner et al., 1995). Für Mamma- und Bronchialkarzinome konnte eine Korrelation zwischen einem erhöhten Bcl-2-Spiegel und einer besseren Prognose gezeigt werden (Müller et al., 1998). Beim Magen-, Colon- und Endometriumkarzinom konnte eine Mutation von Bax nachgewiesen werden, die wohl eine große Rolle bei der Karzinogenese spielt (Ouyang et al., 1998).

Auch bei entzündlichen Erkrankungen spielt das CD95-System eine wichtige Rolle: Im Colon bei Colitis ulcerosa wird die Apoptose durch erhöhte Freisetzung von CD95-Ligand gesteigert, dadurch wird die Schleimhautbarriere zerstört und eine

Invasion von Bakterien kann nicht mehr verhindert werden (Sträter et al., 1997). Dadurch werden über gesteigerte Apoptose Dysplasien verursacht. Es entstehen Adenome. Über die Adenom-Karzinom-Sequenz können durch Mutationen an Tumorsuppressor-Genen und Onkogenen invasive Karzinome entstehen (Baba, 1997). Diese Adenom-Karzinom-Sequenz unterscheidet sich deutlich von der Karzinogenese des Magens. Im Magen steht nicht die Veränderung der Schleimhaut über Adenome zu Karzinomen im Vordergrund, sondern die Labilität der DNA, die über eine Störung des Gleichgewichtes zwischen Proliferation und Apoptose zu einer Vermehrung von genetisch veränderten Zellen und somit zur Entstehung eines Karzinomes führt (siehe oben) (Xia et Talley, 2003).

Bei Veränderungen im Ösophagus von einer Metaplasie des Epithels über eine Dysplasie bis zum invasiven Karzinom verändern die Zellen wie auch bei der Entwicklung eines Magenkarzinoms ihren Status in einen antiapoptotischen (van der Woude et al., 2002). Bax fällt und Bcl-xl steigt an; dabei kann der CD95-Rezeptor als Marker für die Differenzierung des Ösophagusepithel verwendet werden (van der Woude et al., 2002). Es sind jedoch nur geringe Bestandteile dieses komplexen noch nicht vollständig verstandenen Regulationssystems erforscht.

Ein weiteres wichtiges Gebiet in der Apoptoseforschung sind Resistenzen gegen Chemotherapeutika. Es wurde festgestellt, dass eine Erhöhung des Bcl-2-Spiegels eine neue Art der Resistenz zur Folge hat: Es wird nicht verhindert, dass die Chemotherapeutika in die Zelle eindringen, oder dass DNA-Schäden, die durch die Chemotherapeutika entstehen, repariert werden. Es wird die Translation gehemmt, so dass die Effektorproteine zur Entstehung von DNA-Schäden, nicht gebildet werden können. So ist ein längeres Überleben der Zelle gewährleistet, auch wenn die Zelle schon leicht geschädigt ist. Somit ist mehr Zeit gegeben, in der in der Zelle genetische oder biochemische Veränderungen stattfinden können, die zu einer bekannten Resistenz führen, oder in der sich die Zelle erholen und weiterleben und eventuell zu einem Rezidiv führen kann (Reed, 1995).

Im Gegenzug dazu kann jedoch eine Verminderung des Bcl-2-Spiegels eine erhöhte Sensibilität für Chemotherapeutika erzielen (Kitada et al., 1994; Campos et al., 1994). Beispielsweise konnte beim Mammakarzinom für das Antiöstrogen

Tamoxifen gezeigt werden, dass es den Bcl-2-Spiegel reduziert und somit die Tumorzellen sensibler für eine Therapie mit Doxorubizin macht (Teixeira et al., 1995). Die unterschiedliche Sensitivität von Zellen gegenüber einer Bestrahlung mit γ -Strahlen hängt mit Bax zusammen: Bei einer Bestrahlung des Intestinums konnte eine starke Zunahme von Bax und somit von Apoptose in lymphatischem Gewebe und in den intestinalen Krypten nachgewiesen werden (Kitada et al., 1996). In Zellen des Herzens, der Skelettmuskeln, des Gehirns, der Niere... konnte keine Steigerung der Expression von Bax oder eine Zunahme der Apoptose gemessen werden (Kitada et al., 1996).

Apoptose wird auch bei der medikamentösen Therapie von Karzinomen zu Hilfe genommen: Camptothecin, ein Topoisomerasehemmer, der Apoptose induziert wurde bei Mäusen zur Therapie von Magenkarzinomen eingesetzt (Litvak et al., 1999): Dabei zeigte sich ein deutliches Ansteigen des Bax-Spiegels und ein Abfall des Bcl-2-Spiegels mit einer darauf folgenden Zunahme der Apoptose; die Tumormgröße ging unter dieser Therapie zurück (Litvak et al., 1999).

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Epithelzellen der Magenschleimhaut werden wegen ihrer ständigen Zellerneuerung zu den Wechselgeweben gezählt. Zur Aufrechterhaltung der Zellzahl steht als Gegenspieler zur Zellproliferation die Apoptose im Vordergrund. Unter physiologischen Bedingungen kann Apoptose nur vereinzelt nachgewiesen werden, was sich unter pathologischen Bedingungen deutlich ändert. Eine Steigerung der Apoptoserate konnte bei einer chronischen Gastritis durch *Helicobacter pylori* verursacht gezeigt werden. Solch eine gesteigerte Apoptose kann durch den Zellverlust zu einem Ulkus führen; wenn eine gesteigerte Proliferation als Gegenregulation einsetzt, kann diese auch in einem Karzinom enden. Man sieht also die zentrale Rolle der Apoptose im Bereich der Magenmukosa. In dieser Arbeit wurde Apoptose an isolierten und kultivierten Haupt- und Parietalzellen gemessen. Es konnte die zentrale Rolle der Apoptoseinduktion über CD95-Rezeptoren nachgewiesen werden. Da es sich jedoch um isolierte Zellen handelt, musste der CD95-Ligand zum Auslösen der Apoptose von außen zugegeben werden. Zuvor wurde nachgewiesen, dass Haupt- und Parietalzellen keinen CD95-Liganden produzieren können. In diesem Experiment zeigt sich die Bedeutung des Zellverbandes der Magenschleimhaut. Ohne die benachbarten Zellen, bzw. ohne die eingewanderten T-Lymphozyten kann die Zelle selbst keine Apoptose über die CD95-Rezeptoren auslösen.

Bei Hauptzellen zeigt sich eine starke Expression der CD95-Rezeptoren kurz nach der Isolierung der Zellen, die dann abfällt. Bei Parietalzellen konnte eine Zunahme der CD95-Rezeptoren über die Zeit nachgewiesen werden. Daran erkennt man die unterschiedliche Reaktion auf verschiedene Apoptoseinduktionen dieser beiden Zellarten. Für Hauptzellen scheint die Isolation, also das Lösen der Zellen aus dem Verband, ein starker Apoptosestimulus zu sein, da sie mit einer starken CD95-Rezeptor-Expression darauf reagieren. In der weiteren Kultivierungszeit geht die Expression zurück. Bei den Parietalzellen scheint die Dauer der Kultur, also das Altern der Zelle eine wichtige Rolle zu spielen, da die Rezeptoren mit der Zeit der Kultivierung ansteigen.

Eine weitere Möglichkeit der Apoptoseinduktion läuft über den intrinsischen, mitochondriellen Weg, also über Bax und Bcl-2. Für diese beiden Proteine, die Apoptose-stimulierend, bzw. Apoptose-hemmend wirken, konnte in dieser Arbeit für Bax eine Zunahme über den Kultivierungszeitraum, für Bcl-2 eine Abnahme nachgewiesen werden. Da jedoch über den gesamten Kultivierungszeitraum keine Zu- oder Abnahme der Apoptose gemessen werden konnte, kann darauf geschlossen werden, dass Bax und Bcl-2 in diesem Fall alleine keine Apoptose induzieren können. Sie scheinen die Zellen dahingehend zu beeinflussen, dass eine Apoptoseinduktion erleichtert oder erschwert ist, also eine Grundrichtung anzugeben. Einer Apoptoseinduktion über das CD95-System können sie nicht entgegenwirken. Hier scheint das extrinsische System dem intrinsischen überlegen zu sein. Eine wichtige Rolle spielen Bax und Bcl-2 bei der Entstehung eines Magenkarzinoms. V.a. wenn eine chronische Gastritis durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* vorangeht, kann eine Veränderung der Zellen von einem hohen Bax- und niedrigem Bcl-2-Spiegel zum genauen Gegenteil, nämlich einem niedrigen Bax und einem hohen Bcl-2-Spiegel nachgewiesen werden. Die Zellen verändern ihren Status von apoptotisch zu antiapoptotisch, was die Mutationsrate erhöht und die Ausbreitung der Tumorzellen erleichtert.

Wegen der zentralen Rolle der Apoptose im Bereich der Magenmukosa unter pathologischen Bedingungen ist eine genaue Kenntnis der Regulationsmechanismen unter physiologischen Bedingungen von großer Bedeutung.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Abreu M.T., Palladino A.A., Arnold E.T., Kwon R.S., McRoberts J.A. Modulation of barrier function during Fas-mediated apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 119 (2000) 1524 – 1536

Akira I., Hironobu S., Noritaka Y., Katsuaki K., Shuichi O., Shigeru A., Takayoshi T., Hiroshi N. In situ analysis of tissue dynamics and p53 expression in human gastric mucosa. *J. of Pathol.* 179 (1996) 39 – 42

Baba S. Recent advances in molecular genetics of colorectal cancer. *World J. Surg.* 21 (1997) 678 – 687

Bamford K.B., Fan X., Crowe S.E., Leary J.F., Gourley W.K., Luthra G.K., Brooks E.G., Graham D.Y., Reyes V.E., Ernst P.B. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114 (1998) 482 – 492

Bates R.S., Buret A., van Helden D.F., Horton M.A., Burns G.F. Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact. *J. Cell Biol.* 125 (1994) 403 – 415

Bellgraue D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377 (1995) 630 – 632

Bennet M.W., O'Connell J., O'Sullivan G.C., Roche D., Brady C., Kelly J., Collins J.K. Expression of Fas ligand by human gastric adenocarcinomas: A potential mechanism of immune escape in stomach cancer. *Gut* 44 (1999) 156 – 162

Berggard B., Björck L., Cigèn R., Lögdberg L. β_2 -Microglobulin. *Scan. J. clin. Lab. Invest.* 154 (1980) 13 – 25

Blaser M.J. In a world of black and white, *Helicobacter pylori* is gray. *Ann intern med* 130 (1999) 695 – 697

Boersma A.W.M., Nooter K., Burger H., Kortland C.J., Stoter G. Bax upregulation is an early event in Cisplatin-induced apoptosis in human testicular germ-cell tumor cell line NT2, as quantitated by Flow Cytometry. *Cytometry* 27 (1997) 275 – 282

Boldin M.P., Varfolomeev E.E., Pancer Z., Mett I.L., Camonis J.H., Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of FAS/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 7795 – 7798

Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248 – 254

Bronner M.P., Culin C., Reed J.C., Furth E.E. The Bcl-2 proto-oncogene and the gastrointestinal epithelial tumor progression model. *Am. J. Pathol.* 146 (1995) 20 – 26

Burnette W.N. Western Blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195 – 203

Campos L., Sabido O., Rouault J.-P., Guyotat D. Effect of Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides on in vitro proliferation and survival of normal marrow progenitors and leucemic cells. *Blood* 84 (1994) 595 – 600

Chen M.C., Lee A.T., Soll A.H. Mitogenetic response of Canine fundic epithelial cells in short-term culture to transforming growth factor α and insulinlike growth factor I. *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1716 – 1723

Chew C.S., Ljungström M., Smolka A., Brown M.R. Primary culture of secretagogue-responsive parietal cells from rabbit gastric mucosa. *Am. J. Physiol.* 256 (1989) G254 – G263

Chinnaiyan A.M., O'Rourke K., Tewari M., Dixit V.M. FADD a novel death domain-containing protein interacts with the death domain of FAS and initiates apoptosis. *Cell* 81 (1995) 505 – 512

Chomczynski P., Sacci N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 161 (1987) 156 – 159

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Bio Techniques* 15, (1993) 532 – 535

Cohen G.M., Sun X.M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter N. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem. J.* 286 (1992) 331 – 334.

Cole T., Dickson P.W., Esnard F., Averill S., Risbridger G.P., Gauthier F., Schreiber G. The cDNA structure and expression analysis of the genes for the cysteine proteinase inhibitor cystein C and for β_2 -microglobulin in rat brain. *Eur. J. Biochem.* 186 (1989) 35 – 42

Cotter T.G., Martin S.J. *Techniques in Apoptosis – a users guide.* 1996 Portland Press Ltd., reprinted 1997 British Library Cataloguing, 116 – 118

Darzynkiewicz Z., Bruno S., Del Bino G., Gorczyca W., Hotz M.A., Lassota P., Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13 (1992) 795 – 808

Del Bino G., Lassota P., Darzynkiewicz Z. The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp. Cell research* 193 (1991) 27 – 35

D'Elíos M.M., Manghetti M., De Carli M., Costa F., Baldari C.T., Burróni D., Telford J.L., Romagnani S., Del Prete G. T helper 1 effector cells specific for *Helicobacter pylori* in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J. Immunol* 15 (1997) 962 – 967

Dhein J., Daniel P.T., Trauth B.C., Oehm A., Möller P., Krammer P.H. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. *J. Immunol.* 149 (1992) 3166 – 3173

Eberl L.P., Guillou L., Saraga E., Schröter M., French L.E., Tschopp J., Juillerat-Jeanneret L. Fas and Fas Ligand expression in tumor cells and in vascular smooth-muscle cells of colonic and renal carcinomas. *Int. J. Cancer* 81 (1999) 772 – 778

Eguchi Y., Shimizu S., Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer. Res.* 57 (1997) 1835 – 1840

Erlich H.A. Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Immun.* 9 (1989) 437 – 447

Erlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *J. Clin. Immun.* 21 (1991) 1643 – 1651

Eskelinen M.J., Hagelund U.H. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: Review of clinical and histopathological variables and possible uses of a new molecular methods. *Eur. J. Surg.* 165 (1999) 292 – 306

Fadok V.A., Voelker D.R., Cambell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148 (1992) 2207 – 2216

Fine A., Miranda K., Farmer S.R., Anderson S.L. Effect of insoluble extracellular matrix molecules on Fas expression in epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 174 (1998) 285 – 292

Fox J.G., Wang T.C., Rogers A.B., Poutahidis T., Ge Z., Taylor N., Dangler C.A., Israel D.A., Krishna U., Gaus K., Peek R.M. Host and microbial constituents influence *Helicobacter pylori*-induced cancer in a murine model of hypergastrinemia. *Gastroenterology* 124 (2003) 1879 - 1890

Franie T.V., Judd L.M., Robinson D., Barrett S.P., Scarff K.L., Gleeson P.A., Samuelson L.C., van Driel I.R. Regulation of gastric epithelial cell development revealed in H⁺/K⁺-ATPase β -subunit- and gastrin-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281 (2001) G1502 – G1511

Frey T. Correlated flow cytometric analysis of terminal events in apoptosis reveals the absence of some changes in some model systems. *Cytometry* 28 (1997) 253 – 263

Frisch S.M., Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124 (1994) 619 – 626

Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (1992) 493 – 501

Gold R., Schmied M., Giegerich G., Breitschopf H., Hartung H.P., Toyka K.V., Lassmann H. Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of In situ tailing and nick translation techniques. *Lab. Invest.* 71 (1994) 219

Golstein P. Controlling cell death. *Science* 275 (1997) 1081 – 1082

Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S. Fas ligand induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270 (1995) 1189 – 1192

Gruss H.J., Dower S.K. Tumor Necrosis Factor Ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85 (1995) 3378 – 3404

Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathway of apoptosis. Life Sciences 6 (2001) 2957 – 2964

Hagen S.J., Takahashi S., Jansons R. Role of vaculation in the death of epithelial cells. Am. J. Physiol. 272 (1997) C48 – C58

Hahm K.B., Kim D.H., Lee K.M., Lee J.S., Surh Y.J., Kim Y.B., Yoo B.M., Kim J.H., Joo H.J., Cho Y.K., Nam K.T., Cho S.W. Effect of long-term administration of rebamipide on *Helicobacter pylori* infection in mice. Aliment. Pharmacol. Ther. 18 (2003) 24 – 38

Hahne M., Rimoldi D., Schroter M., Romero P., Schreier M., French L.E., Schneider P., Bornand T., Fontana A., Lienard D., Cerottini J., Tschopp J. Melanoma cell expression of FAS(APO1/CD95) ligand: Implication of tumor immun escape. Science 274 (1996) 1363 – 1366

Hale A.J., Smith C.A., Sutherland L.C., Stoneman V.E.A., Longthorne V.L., Culhane A.C., Williams G.T. Apoptosis: Molecular regulation of cell death. Eur. J. Biochem. 236 (1996) 1 – 26

Hall P.A., Coates P.J., Ansari B., Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: The importance of apoptosis. J. Cell. Sci. 107 (1994) 3569 – 77

Heinig J., Wilhelm S., Bittorf T., Muller H., Brock J., Briese V. Semiquantitative determination of IL-1 alpha, TNF-alpha, PDGF-A, PDGF-B, and PDGF-receptor in term human placenta using polymerase chain reaction (PCR). Zentralbl. Gynakol. 115 (1993) 317 – 322

Hockenbery D.M., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D., Korsmeyer S.J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature 348 (1990) 334 – 336

Hockenbery D.M., Zutter M., Hickey W., Nahm M., Korsmeyer S.J. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 6961 – 6965

Homburg C.H.E., de Haas M., von dem Borne A.E.G.K., Verhoeven A.J., Reutelingsperger C.P.M., Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. Blood 85 (1995) 532 – 540

Houghton J.M., Karah R.M., Condon M.R., Kim K.H. Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway. Dig. Dis. Sci. 44 (1999) 465 – 478

Houghton J.M., Bloch L.M., Goldstein M., von Hagen S., Korah R.M. In vivo disruption of the fas pathway abrogates gastric growth alterations secondary to helicobacter infection. J. Infectious Diseases 182 (2000) 856 – 864

Houts G.E., Miyagi M., Ellis C., Beard D., Beard J.W. Reverse transcriptase from Avian Myeloblastosis Virus. J. Virol. 29 (1979) 517 – 522

Hsieh S.C., Huang M.H., Tsai C.Y., Tsai Y.Y., Tsai S.T., Sun K.S., Yu H.S., Han S.H., Yu C.L. The expression of genes modulating programmed cell death in normal human polymorphonuclear neutrophils. Biochem. Biophys. Res. Comm. 233 (1997) 700 – 706

Hsu Y.Z., Wolter K.G., Youle R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-xl during apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 3668 – 3672

Huber C., Zanner R., Pohlinger A., Mahr S., Neu B., Prinz C. Tumor necrosis factor-alpha effects on rat gastric enterochromaffin-like cells. Digestion 65 (2002) 87 – 102

Iimura M., Nakamura T., Shinozaki S., Iizuka B., Inoue Y, Suzuki S., Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 47 (2000) 228 – 235

Inada T., Kikuyama S., Ichikawa A., Igarashi S., Ogata Y. Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. *Anticancer research* 18 (1998) 2003 – 2010

Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brow M.A.D. DNA-sequencing with thermus aquaticus DNA-polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 9436 – 9440

Isaacson U., Wettermark G. Chemiluminescence in analytical chemistry. *Anal. Chem. Acat.* 68 (1974) 339 – 362

Ishida M., Gomyo Y., Tatebe S., Ohfuji, Ito H. Apoptosis in human gastric mucosa, chronic gastritis, dysplasia and carcinoma: analysis by terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling. *Virchows Arch.* 428 (1996) 229 – 235

Itoh N., Tsujimoto Y., Nagata S. Effect of Bcl-2 on Fas-antigen mediated cell death. *J. Immunol.* 151 (1993) 621 – 627

Ito K., Ishida K., Shishido T., Tabata H., Miura H., Okamiya H., Hanada T. Acute parietal and chief cell changes induced by lethal dose of lipopolysaccharide in mouse stomach before thrombus formation. *Toxicol. Pathol.* 28 (2000) 304 – 309

Iwai K., Miyawaki T., Takizawa T., Konno A., Ohta K., Yachie A., Seki H., Taniguchi N. Differential Expression of Bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes and neutrophils. *Blood* 84 (1994) 1201 – 1208

Jacobson M.D., Burne J.F., King M.P., Miyashita T., Reed J.C., Raff M.C. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361 (1993) 365 – 369

Jäckel M.C., Dorudian M.A., Marx D., Brinck U., Schauer A., Steiner W. Spontaneous Apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma is independent of Bcl-2 and Bax protein expression. *Cancer* 85 (1999) 591 – 599

Janssen O., Wesselborg S., Heckl-Östreicher B., Pechhold K., Bender A., Schondelmaier S., Moldenhauer G, Kabelitz D. T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor + T cells *J. Immunol.* 146 (1991) 35 – 39

Jiang M.C., Yang-Yen H.F., Lin J.K., Yen J.J.Y. Differential regulation of p53, c-Myc, Bcl-2 and Bax protein expression during apoptosis induced by widely divergent stimuli in human hepatoblastoma cells. *Oncogene* 13 (1996) 609 – 616

Kakei N., Ichinose M., Tsukada S., Tatematsu M., Tezuka N., Furihata C., Yahagi N., Matsushima M., Miki K., Kurokawa K. Effects of omeprazole on gastric mucosal growth and differentiation in developing rat. *Biochem. Biophys res. Commun.* 30 (1993) 310 – 318

Karam S.M., Leblond C.P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach I. Identification of proliferative cell types and pinpointing of the stem cell. *Anat. Rec.* 236 (1993a) 259 – 279

Karam S.M., Leblond C.P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach II. Outward migration of pit cells. *Anat. Rec.* 236 (1993b) 280 – 296

Karam S.M., Leblond C.P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach III. Inward migration of neck cells followed by progressive transformation into zymogenic cells. *Anat. Rec.* 236 (1993c) 297 – 313

Karam S.M., Leblond C.P. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach V. Behavior of entero-endocrine and caveolated cells: General conclusion on cell kinetics in the oxyntic epithelium. *Anat. Rec.* 236 (1993d) 333 – 340

Karam S.M., Leblond C.P. Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach. *Microsc. Res. Tech.* 15 (1995) 193 – 214

Karam S.M. Dynamics of epithelial cells in the corpus of the mouse stomach IV. Bidirectional migration of parietal cells ending in their gradual degeneration and loss. *Anat. Rec.* 236 (1993) 314 – 332

Karam S.M. New insights into the stem cells and the precursors of the gastric epithelium. *Nutrition* 11(1995) 607 – 613

Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon on with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26 (1972) 239 – 257

Kidd M., Tang L.H., Modlin I.M., Zhang T., Chin K., Holt P.R., Moss S.F. Gastrin-mediated alterations in gastric epithelial apoptosis and proliferation in a mastomys rodent model of gastric neoplasia. *Digestion* 62 (2000) 143 – 151

Kim J.M., Kim J.S., Junc H.C., Song I.S., Kim C.Y. Apoptosis of human gastric epithelial cells via Caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: Possible involvement of neutrophils through Tumor Necrosis Factor α and soluble Fas ligands. *Scand. J. Gastroenterol.* 1 (2000) 40 – 48

Kimura K., Wakatsuki T., Yamamoto M. A variant mRNA species encoding a truncated form of Fas antigen in the rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198 (1994) 666 – 674

Kitada S., Takayama S., DeRiel K., Tanaka S., Reed J.C. Reversal of chemoresistance of lymphoma cells by antisense-mediated reduction of Bcl-2 gene expression. *Antisense Res. Dev.* 4 (1994) 71 – 79

Kitada S., Krajewski S., Miyashita T., Krajewska M., Reed J.C. Gamma-radiation induces upregulation of Bax protein and apoptosis in radiosensitive cells in vivo. *Oncogene* 4 (1996) 187 – 192

Komatsu K., Suzuki S., Ohara S., Asaki S., Toyota T., Suzuki H. Expression of Bcl-2 and Bax in human gastric cancer tissue. *Nippon Rinsho*. 54 (1996) 1929 – 1934

Konturek P.C., Pierzchalski P., Konturek S.J., Meixner H., Faller G., Kirchner T., Hahn E.G. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of Bax expression in humans. *Scand. J. Gastroenterol.* 34 (1999) 375 – 383

Koopman G., Reutelingsperger C.P.M., Kuijten G.A.M., Keehnen R.M.J., Pals S.T., van Oers M.H.J. Annexin V for Flow Cytometric Detection of Phosphatidylserin expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84 (1994) 1415 – 1420

Korsmeyer S.J. Regulators of cell death . *Trends in Genet.* 11 (1995) 101 – 105

Koshida Y., Saegusa M., Okayasu I. Apoptosis, cellproliferation and expression of Bcl-2 and Bax in gastric carcinomas: Immunohistochemical and clinopathological study. *Br. J. Cancer* 75 (1997) 367 – 373

Koshiji S., Adachi Y., Sogo S., Taketani S., Oyaizu N., Than S., Inaba M., Phawa S., Hioki T., Ikehara S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO 201) by tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and/or interferon-gamma (INF γ), resulting from down-modulation of Bcl-2 expression. *Exp. Immunol.* 111 (1998) 211 – 218

Krajewska M., Fenoglio-Preiser C.M., Krajewski S., Song K., MacDonald J.S., Stemmerman G., Reed J.C. Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 1449 – 1457

Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Miyashita T., Wang H.G., Reed J.C. Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.* 145 (1994) 1323 – 1336

Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W., Reed J.C. Investigation of the subcellular distribution of the Bcl-2 oncoprotein: Residence in the nuclear envelope, endoplasmatic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53 (1993) 4701 – 4714

Krammer P.H., Behrmann I., Daniel P.T., Dhein J., Debatin K.M. Regulation of apoptosis in the immunsystem. *Curr. Opin. Immunol.* 6 (1994) 279 – 289

Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60 (1998) 619 – 642

Kuwana T., Smith J.J., Muzio M., Dixit V., Newmeyer D.D., Kornbluth S. Apoptosis induction by caspase 8 amplified through the mitochondrial release of cytochrom C. *J. Biol. Chem.* 26 (1998) 16589 – 16594

Labat-Moleur F., Guillermet C., Lorimier P., Robert C., Lantuejoul S., Brambilla E., Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: Critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.* 46 (1998) 327 – 334

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophages T. *Nature* 15 (1970) 680 – 685

Lamarque D, Tran van Hhieu J, Breban M. What are the gastric modifications induced by acute and chronic *Helicobacter pylori* infection? *Gastroenterol. Clin. Biol.* 27 (2003) 391 – 400

Lauwers G.Y., Scott G.V., Hendricks J. Immunohistochemical evidence of aberrant Bcl-2 protein expression in gastric epithelial dysplasia. *Cancer* 73 (1994) 2900 – 2912

Lauwers G.Y., Scott G.V., Karpeh M.S. Immunohistochemical evaluation of Bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. *Cancer* 75 (1995) 2209 – 2213

Lee S.H., Kim S.Y., Lee J.Y., Shin M.S., Dong S.M., Na E.Y., Park W.S., Kim. K.M., Kim C.S., Kim S.H., Yoo N.J. Detection of soluble FAS mRNA using in situ reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 78 (1998) 453 – 459

Leist M., Ganter F., Bohlinger I., Germann P.G., Tiegs G., Wendel A. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF α requires transcriptional arrest. *J. Immunol.* 153 (1994) 1778 – 1788

Lewin M., Cheret A.M., Soumarmon A., Girodet J. Methode pour l'isolement et le tri des cellules de la muqueuse fundique de rat. *Biol. Gastro-Enterol.* 7 (1974) 139 – 144

Li J., Shimizu T., Miyoshi N., Yasuda N. Rapid apoptotic changes in the gastric glandular epithelium of rats administered intraperitoneally with fusarenon-X. *J. Vet. Med. Sci.* 59 (1997) 17 – 22

Li Q., Karam S., Gordon J. Simian virus 40 T antigen-induced amplification of preparietal cells in transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 26 (1995) 15777 – 15788

Li Q., Karam S., Gordon J. Diphtheria toxin-mediated ablation of parietal cells in the stomach of transgenic mice. *JBC* 271(1996) 3671 – 3676

Liu H.F., Liu W.W., Fang D.C., Men R.P. Expression of Bcl-2 protein in gastric carcinoma and its significance. *World J. Gastroenterol.* 4 (1998) 228 – 230

Liu J., Li Z.S., Wan X.J., Wang W. Expression and function of apoptosis-related genes Bcl-2/Bax and Fas/Fas L in the course of stress ulcer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 25 (2003) 504 – 509

Litvak D.A., Papaconstantinou H.T., Hwang K.O., Kim M., Evers B.M., Townsend C.M. Inhibition of gastric cancer by camptothecin involves apoptosis and multiple cellular pathways. *Surgery* 125 (1999) 223 – 230

Lopez E., Pozas E., Rivera R., Ferrer I. Bcl-2 and Bax expression following methylazoxymethanol acetat-induced apoptosis in the external granule cell layer of the developing rat cerebellum. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 11 (1999) 149 – 153

Mahr S., Neumayer N., Gerhard M., Classen M., Prinz C. Il-1 β -induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kB, and Bax-protein. *Gastroenterology* 118 (2000) 514 – 524

Mapara M., Bargou R., Zugck C., Döhner H., Ustaoglu F., Krammer P.H., Dörken B. Apo-1 mediated apoptosis or proliferation in human chronic B lymphocytic leucemia: Correlation with Bcl-2 oncogene expression. *Europ. L. Immunol.* 23 (1993) 702 – 708

Martin S.J., Reuteligsperger C.P.M., McGahon A.J., Rader J.A., van Schie R.C.A.A., LaFace D.M., Green D.R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl *J. Exp. Med.* 182 (1995) 1545 – 1556

Mauxion F., Kress M. Nucleotide sequence of rat β_2 -microglobulin cDNA. *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 7638

McEwen C.R., Stallard R.W., Juhos E.T. Seperation of biological particles by centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 23 (1968) 369 – 377

McKenzie R.W., Jumblatt J.E., Jumblatt M.M. Quantification of MUC2 and MUC5AC transcripts in human conjunctiva. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41 (2000) 703 – 708

Merio G.R., Cella N., Hynes N.E. Apoptosis is accompanied by changes in Bcl-2 and Bax expression, induced by loss of attachment, and inhibition by specific extracellular matrix proteins in mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 8 (1997) 251 – 260

Mignotte B., Vayssiere J.L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252 (1998) 1 – 15

Miyawaki T., Uehara T., Nibu R., Tsuji T., Yachie A., Yonehara S., Taniguchi N. Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocyte subpopulations in human peripheral blood *J. Immunol.* 149 (1992) 3753 – 3758

Moller P., Koretz K., Leithauser F., Bruderlein S., Henne C., Quentmeier A., Krammer P.H. Expression of APO1 (CD95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int. J. Cancer* 57 (1994) 371 – 377

Moss S.F., Calam J., Agarwal B., Wang S., Holt P.R. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38 (1996) 498 – 501

Müller W., Schneiders A., Hommel G., Gabbert H. Prognostic value of Bcl-2 expression in gastric cancer. *Anticancer Research* 18 (1998) 4699 – 4704

Mullis K.B., Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155 (1987) 335 – 350

Muzio M., Stockwell B.R., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Dixit V.M. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 2926 – 2930

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (1997) 355 – 365

Nagata S., Golstein P. The FASdeath factor. *Science* 267 (1995) 1449 – 1456

Naish S.J., Beiträge von Boenisch T., Farmilo A., Stead R.H. Übersetzer Mally M., Stankic E. *Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden* (1983) DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg 28 – 31

Nardone G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. *Aliment Pharmacol Ther* 17 (2003) 75 - 81

Neu B., Herrmuth H., Ernst F., Vaupel W., Reindl W., Hutzler P., Atkinson M.J., Classen M., Schepp W. Differential expression of CD95, Bcl-2, and Bax in rat gastric chief and parietal cells. *Microsc. Res. Tech.* 53 (2001) 377 – 88

Neu B., Puschmann A.J., Mayerhofer A., Hutzler P., Grossmann J., Lippl F., Schepp W., Prinz C. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem. Pharmacol.* 15 (2003) 1755 – 1760

Nishio A., Katakai T., Oshima C., Kasakura S., Sakai M., Yonehara S., Suda T., Nagata S., Masuda T. A possible involvement of Fas-Fas ligand signalling in the pathogenesis of murine autoimmune gastritis. *Gastroenterology* 111 (1996) 959 – 967

Oehm A., Behrmann I., Falk W., Pawlita M., Maier G., Klas C., Li Weber M., Richards S., Dhein J., Trauth B.C., Pansting I.K., Krammer P.H. Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the FASantigen. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10709 – 10715

Ohta K., Iwai K., Kasahara Y., Taniguchi N., Krajewski S., Reed J.C., Mijawaki T. Immunoblot analysis of cellular expression of Bcl-2 family proteins, Bcl-2, Bax, Bcl-x and Mcl-1, in human peripheral blood and lymphoid tissues. *Int. Immunol.* 7 (1995) 1817 – 1825

Okayama N., Itoh M., Joh T., Miyamoto T., Takeuchi T., Kato T. Nicotine stimulates pepsinogen secretion from guinea pig gastric chief cells in monolayer culture. *Life Sciences* 56 (1995) 169 – 177

Oldereid N.B., Angelis P.D., Wiger R., Clausen O.P. Expression of Bcl-2 family proteins and spontaneous apoptosis in normal human testis. *Mol. Hum. Reprod.* 75 (2001) 403 – 408

Oltavi Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74 (1993) 609 – 619

Otter I., Conus S., Ravn U., Rager M., Olivier R., Monney L., Fabbro D., Borner C. The binding properties and biological activities of Bcl-2 and Bax in cells exposed to apoptotic stimuli. *J. Biol. Chem.* 13 (1998) 6110 – 6120

Ouyang H., Furukawa T., Abe T., Kato Y., Horii A. The Bax gene, the promotor of the apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach and endometrium. *Clin. Can. Res.* (1998) 1071 – 1075

Owen-Schaub L., Radinsky R., Kruzel E., Berry K., Yonehara S. Anti-Fas on non-hematopoietic tumors: Levels of Fas/Apo-1 and Bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res.* 54 (1994) 1580 – 1586

Park M.Y., Lee R.H., Lee S.H., Jung J.S. Apoptosis induced by inhibition of contact with extracellular matrix in mouse collecting duct cells. *Nephron* 83 (1999) 341 – 351

Peitsch M.C., Tschopp J. Comparative molecular modelling of the FAS-ligand and other members of the TNF family. *Mol. Immunol.* 32 (1995) 761 – 772

Peek R.M., Blaser M.J. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev. Cancer* 2 (2002) 28 – 37

Prinz C., Neumayer N., Mahr S., Classen M., Schepp W. Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 β . *Gastroenterology* 112 (1997) 364 – 375

Prinz C., Zanner R., Gerhard M., Mahr S., Neumayer N., Hohne-Zell B., Gratzl M. The mechanism of histamine secretion from gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* 277 (1999) C845 – 855

Pritchard D.M., Watson A.J. Apoptosis and gastrointestinal pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 72 (1996) 149 – 169

Que F.G., Gores G.J. Cell death by apoptosis: basic concepts and disease relevance for the gastroenterologist. *Gastroenterology* 110 (1996) 1238 – 1243

Rad R., Prinz C., Neu B., Neuhofer M., Zeitner M., Volland P., Becker I., Schepp W., Gerhard M. Synergistic effect of *Helicobacter pylori* virulence factors and interleucin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *Infect. Dis.* 15 (2003) 272 – 281

Raff M.C. Social controls of cell survival and cell death. *Nature* 365 (1992) 397 – 400

Raynal P., Pollard H.B. Annexin: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1197 (1994) 63 – 93

Reed J.C. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Current Op. Oncol.* 7 (1995) 541 – 546

Reed J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387 (1997) 773 – 776

Rosse T., Olivier R., Monney L., Rager M., Conus S., Fellay I., Jansen B., Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of Cytochrom C. *Nature* 391 (1998) 496 – 499

Rossi D., Gaidano G. Messengers of cell death: Apoptotic signalling in health and disease. *Haematologica* 88 (2003) 212 – 218

Rudi J., Kuck D., Strand S., von Herbay A., Mariani S.M., Krammer P.H., Galle P.R., Stremmel W. Involvement of the CD95 (Apo-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis. *J. Cli. Invest.* 102 (1998) 1506 – 1514

Saiki R., Scharf S., Faloona F., Mulklis K., Horn G., Erlich H.A., Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (1985) 1350 – 1354

Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001 A8, A9

Sanders M.J., Amirian D.A., Ayalon A., Soll A.H. Regulation of pepsinogen release from canine chief cells in primary monolayer culture. *Am. J. Physiol.* 245 (1983) G641 – G646

Sanders M.J., Soll A.H. Cell separation by elutriation: Major and minor cell types from complex tissues. *Methods Enzymol.* 171 (1989) 482 – 497

Sano T., Kobori O., Kuroki S., Nagawa H., Muto T.J.J. Effect of experimental hypochlorhydria on the histological differentiation of adenocarcinomas in the canine stomach. *Cancer Res.* 84 (1993) 494 – 500

Sanyal A., O'Driscoll S.W., Bolander M.E., Sarkar G. An effective method of completely removing contaminating genomic DNA from an RNA sample to be used for PCR. *Mol. Biotechnol.* 8 (1997) 135 – 137

Sato T., Irie S., Krajewski S., Reed J.C. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl-2 protein. *Gene* 140 (1994) 291 – 292

Scanlon M., Laster S.M., Wood J.G., Gooding L.R. Cytolysis by tumor necrosis factor is preceded by a rapid and specific dissolution of microfilaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 182 – 186

Scharffetter K., Volkenand M., Sorg R., Wlaschke M., Eckes B. Die Polymerasekettenreaktion – Prinzip und Anwendung in der Medizin. *Der Hautarzt* 42 (1991) 477 – 483

Schmidtler J., Dehne K., Allescher H.D., Schusdziarra V., Classen M., Holst J.J., Polack A., Schepp W. Rat parietal cell receptors for GLP-1-(7-36) amide: Northern blot, cross linking, and radioligand binding. *Am. J. Physiol.* 267 (1994) G423 – G432

Schneider P., Holler N., Bodmer J.-L., Hahne M., Frei K., Fontana A., Tschopp J. Conversion of membran-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1205 – 1213

Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S., Peter M. E. Apoptosis signalling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254 (1998) 439 – 459

Sedar A.W., Forte J.G. Effects of calcium depletion on the junctional complex between oxyntic cells of gastric glands. *J. Cell. Biol.* 22 (1964) 173 – 188

Seery J.P. Achlorhydria and gastric carcinogenesis. *Lancet* 338 (1991) 1508 - 1509

Sgonc R., Boeck G., Dietrich H., Gruber J., Recheis H., Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends in Genetics* 10 (1994) 41 – 42

Shannon L.M., Kay E., Lew J.Y. Peroxidase isozymes from horseradish roots I. Isolation and physical properties. *J. Biol. Chem.* 241 (1964) 2166 – 2172

Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell* 76 (1994) 959 – 62

Soll A.H. The action of secretagogues on oxygen uptake by isolated mamalian parietal cells. *J. Clin. Invest.* 61 (1978) 370 – 380

Stach R.W., Garian N., Olender E.J. Biological activity of the β nerve growth factor: The effects of various added proteins. *J. Neurochem.* 33 (1997) 257 – 261

Stachura J., Tarnawski A., Dabros W. Apoptosis: Genetically programmed physiologic cell loss in normal gastric oxyntic mucosa and in mucosa of grossly healed gastric ulcer. *J. Clin. Gastroenterol.* 17 (Suppl. 1) (1993) 570 – 577

Stolte M., Meining A. *Helicobacter pylori* and gastric cancer. *Oncology* 3 (1998) 124 – 128

Sträter J., Wellisch I., Riedl S., Walczak H., Koretz K., Tandara A., Krammer P.H., Möller P. CD95 (Apo-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: A possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 113 (1997) 160 – 167

Strbenc M., Bavdek S.V. Apoptosis and proliferation in the testes of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the influence of photoperiod. *Pflugers Arch.* 442 (2001) R161 – 162

Suda T., Okazaki T., Naito Y., Yokota T., Arai N., Ozaki S., Nakao K., Nagata S. Expression of the Fas ligand in cells of the T cell lineage. *J. Immunol.* 15 (1995) 3806 – 3813

Suda T., Nagata S. Purification and characterisation of the Fas ligand that induces apoptosis. *J. Exp. Med.* 179 (1994) 873 – 879

Suda T., Takahashi T., Golstein P., Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 (1993) 1169 – 1178

Sudepta A., Gupta S. Increased Apoptosis of T cell subsets in aging humans: Altered expression of Fas (CD95), Fas-ligand, Bcl-2 and Bax. *J. Immunol.* 160 (1998) 1627 – 16379

Sung K.J., Paik E.M., Jang K.A., Suh H.S., Choi J.H. Apoptosis is induced by anti-Fas antibody alone in cultured human keratinocytes. *J. Dermatol.* 24 (1997) 427 – 434

Szabo I., Tarnawski A.S. Apoptosis in the gastric mucosa: Molecular mechanisms, basic and clinical implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 51 (2000) 3 – 15

Takagi A., Watanabe S., Igarashi M., Koike J., Miwa T. *Helicobacter pylori* induced cell death is associated with expression of Bcl-xs in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 116 (1999) A 326

Takahashi T., Tanaka M., Inazawa J., Abe T., Suda T., Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificities. *Int. Immunol.* 6 (1994) 1567 – 1574

Tanaka M., Suda T., Haze K., Nakamura N., Sato K., Kimura F., Motoyoshi K., Mizuki M., Tagawa S., Ohga S., Hatake K., Drummond A.H., Nagata S. FAS-ligand in human serum. *Nat. Med.* 2 (1996) 317 – 322

Teixeira C., Reed J.C., Pratt M.A.C. Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 protooncogen expression in human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55 (1995) 3902 – 3907

Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meinel E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J.L., Schröter M., Scaffidi C., Krammer P., Peter M.E., Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386 (1997) 517 – 521

Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267 (1995) 1456 – 1462

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 (1979) 4350 – 4354

Troost E., Hold G.L., Smith M.G., Chow W.H., Rabkin C.S., McColl K.E., El-Omar E.M. The role of interleucine-1beta and other potential genetic markers as indicators of gastric cancer risk. *Can. J. Gastroenterol.* 17 (2003) 8B – 12B

Tseng H.H., Hsu P.I., Chen H.C., Lai H.K.H., Lo G.H., Lo C.C., Chou N.H., Mok K.T., Chen I.S., Chou N.H., Yang H.B., Liu L., Hsu P.N. Compartment theory in *Helicobacter pylori*-associated gastric carcinogenesis. *Anticancer Res.* 23 (2003) 3223 – 3229

Tsuji S., Kawano S., Takei Y., Tsuji M., Kobayashi I., Nagano K. Ammonia induces gastric cell apoptosis: possible implication to *Helicobacter*-related gastric mucosal atrophy. *Gastroenterology* 108 (1995) A254

Van der Woude C.J., Jansen P.L., Tiebosch A.T., Beuving A., Homan M., Kleibeuker J.H., Moshage H. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett's metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: A switch to a more resistant phenotype. *Hum. Pathol.* 33 (2002) 686 – 692

Verhofstede C., Fransen K., Marissens D., Verhelst R., van der Groen G., Lauwers S., Zissis G., Plum J. Isolation of HIV-1 RNA from plasma: Evaluation of eight different extraction methods. *J. Virol. Methods* 60 (1996) 155 – 159

Vermes I., Haanen C., Steffens-Nakken H., Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Meth.* 184 (1995) 39 – 51

Vollmers H.P., Dammrich J., Hensel F., Ribbert H., Meyer-Bahlburg A., Ufken-Gaul T., von Korff M., Muller-Hermelink H.K. Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 79 (1997) 433 – 440

Vollmers H.P., Zimmermann U., Krenn V. Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human mononucleal antibody SC-1: First clinical and histopathological results. *Oncol. Rep* 5 (1998) 549 – 552

Wagner S., Beil W., Westermann J., Logan R.P.H., Bck C.T., Trautwein C., Bleck J.S., Manns M.P. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: Evidence for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 113 (1997) 1836 – 1847

Wang J., Fan X., Lindholm C., Bennett M., O'Connell J., Shanahan F., Brooks E.G., Reyes V.E., Ernst P.B. *Helicobacter pylori* modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions. *Infection and Immun.* 7 (2000a) 4303 – 4311

Wang T.C., Dangler C.A., Chen D., Goldenring J.R., Koh T., Raychowdhury R., Coffey R.J., Ito S., Varro A., Dockray G.J., Fox J.G. Synergistic interaction between hypergastrinemia and *Helicobacter* infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* 118 (2000b) 36 – 47

Weil M., Jacobson M.D., Coles H.S.R., Davies T.J., Gardner R.L., Raff K.D., Raff M.C. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J. Cell. Biol.* 133 (1996) 1053 – 1059

Weller M., Constam D.B., Malipiero U., Fontana A. Transforming growth factor b2 induces apoptosis of murine T cell clones without down-regulating Bcl-2 mRNA expression. *Eur. J. Immunol.* 24 (1994) 1293 – 1300

Weyant M.J., Carothers A.M., Bertagnolli M.E., Bertagnolli M.M. Colon cancer chemopreventive drugs modulate integrin-mediated signaling pathways. *Clin. Cancer Res.* 6 (2000) 946 – 956

Wyllie A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284 (1980a) 555 – 556

Wyllie A.H., Kerr J.F.R., Currie A.R. Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68 (1980b) 251 – 306

Wyllie A. H., Morris R.G., Smith A.L., Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: Association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.* 142 (1984) 67 – 77

Xia H.H., Talley N.J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: Implication in gastric carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 16 – 26

Xia H.H., Zhang G.S., Talley N.J., Wong B.C., Yang Y., Henwood C., Wyatt J.M., Adams S., Cheung K., Xia B., Zhu Y.Q., Lam S.K. Topographic association of gastric epithelial expression of Ki-67, Bax and Bcl-2 with antralisation in the gastric incisura, body and fundus. *Am. J. Gastroenterol* 97 (2002) 3023 – 3031

Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thomson C.B., Korsmeyer S.J. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xl and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80 (1995) 285 – 291

Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C. N., Ibrado A.M., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. Prevent apoptosis by Bcl-2: Release of Cytochrom C from mitochondries blocked. *Science* 275 (1997) 1129 – 1132

Yang Y., Deng C.S., Peng J.Z., Wong B.C., Lam S.K., Xia H.H. Effect of *Helicobacter pylori* on apoptosis related genes in gastric cancer cells. *Mol. Pathol.* 56 (2003) 19 – 24

Yin X.M., Oltavi Z.N., Korsmeyer S.J. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369 (1994) 321 – 323

Yonehara S., Ishii A., Yonehara M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-FAS) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 169 (1989) 1747 – 1756

Yoo N.J., Kim H.S., Kim S.Y., Park W.S., Kim S.H., Lee J.Y., Lee S.H. Stomach cancer highly expresses both initiator and effector caspases: An immunohistochemical study APMIS 110 (2002) 825 – 832

Yoshihide T. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determination for cell death modes. Cell Death and Diff. 4 (1997) 429 – 434

Yuasa Y. Control of gut differentiation and intestinal-type gastric carcinogenesis. Nat. Rev. Cancer 3 (2003) 592 – 600

Zhan N., Xiong Y.Y., Lan J., Wang B.C., Tian S.F., Yu S.P. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expression of c-myc, Bcl-2 and Bax protein in different gastric mucosa lesions. Ai. Zheng. 22 (2003) 1034 – 1037

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: S. 14

Schematische Darstellung der homogenen und heterogenen Dimerenbildung von Bax und Bcl-2 und deren Wirkung auf Apoptose oder Überleben (modifiziert nach Oltavi et al., 1993, S. 616):

Bei Bcl-2-Monomeren kann Apoptose gehemmt werden, d.h. die Zelle überlebt. Überwiegen Bax-Homodimere wird Apoptose eingeleitet. Im Zwischenstadium der heterogenen Dimere ist unklar, ob Bax Bcl-2 hemmt, oder umgekehrt.

Abb. 2: S. 16

Schematische Darstellung der Signalübertragung und Apoptoseauslösung über den CD95-Ligand durch Bindung an den CD95-Rezeptor (modifiziert nach Szabo et Tarnawski, 2000, S.6,7): Eine Metalloproteinase an der Membran trennt durch Proteinolyse den extrazellulären Bereich des CD95-Liganden ab, wodurch der lösliche CD95-Ligand entsteht. Er ist ein homotrimeres Molekül, der drei CD95-Rezeptoren bindet. Über die Todesdomäne werden drei CD95-Rezeptoren aneinander gebunden. An diese Todesdomäne bindet ein FADD-Molekül (FAS-associated death domain), das neben dieser Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne (Death effector domain, DED) besitzt. Ebenso hat die Caspase 8 solch eine Todeseffektordomäne, über die sie an den Komplex binden kann. Dieses 55 kDa Protein weist neben der Todeseffektordomäne eine Aspartatprotease auf, mit der die Caspase 8 sich selbst durch Abspaltung aktiviert. Sie stellt das erste Glied der Caspase-Kaskade dar, die durch ihre Aktivierung gestartet wird. Dies ist aufgrund der verschiedenen katalytischen Untereinheiten der Caspase 8 möglich, durch die das Apoptosesignal an weitere Caspasen (6,8) durch Proteolyse weitergegeben wird. Diese Kaskade führt zur Aktivierung von Nukleasen, die die DNA der Zelle sofort fragmentieren und so die Apoptose einleiten.

Bax und Bcl-2 sind in der Mitochondrienmembran verankert und können durch die Regulation von CytochromC und AIF Apoptose induzieren oder hemmen.

DD: Death Domain; FADD: Fas-associated death domain; DED: Death effector domain; AIF: Apoptose inducing factor

Abb. 3: S. 37

RNA von Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h, als Elektrophorese, dabei Auftrennung in die 28 S, 18 S und 5 S Untereinheit.

Abb. 4: S. 63

Prinzip des Sandwich-Immunoassay (ELISA):

Ein Anti-Histon Antikörper wird an die Mikrotiterplatte gebunden, die Proben mit den darin enthaltenen Mono- und Oligonukleosomen hinzugefügt. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Peroxidase markierten Antikörper, der gegen DNA gerichtet ist. Die Bindungen werden durch ABTS, welches durch die Peroxidase gespalten wird sichtbar gemacht.

Abb. 5: S. 74

Annexin und Propidiumiodid gefärbte Zellen in der Immunfluoreszenzmikroskopie:

- nur grün gefärbte Zellen: einfach Annexin positive Zellen => apoptotische Zellen
- nur rot gefärbte Zellen: einfach Propidiumiodid positive Zellen => nekrotische Zellen
- grün und rot gefärbte Zellen: doppelt positive Zellen => entweder spät-apoptotische oder nekrotische Zellen

Abb. 6: S. 76

RT-PCR von Parietalzellen (n = 3). Das PCR-Produkt von Bcl-2 stellt sich mit 442 bp dar, das von Bax mit 373 bp (entspr. Bax α), das des CD95-Rezeptors mit 141 bp und das des β 2-Mikroglobulin mit 520 bp.

6a: RT-PCR von Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6b: RT-PCR von Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6c: RT-PCR von CD95-Rezeptoren als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

6d: RT-PCR von β 2-Mikroglobulin als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

Abb. 7: S. 77

RT-PCR von Hauptzellen (n = 3). Das PCR-Produkt von Bcl-2 stellt sich mit 442 bp dar, das von Bax mit 373 bp (entspr. Bax a), das des CD95-Rezeptors mit 141 bp und das des β 2-Mikroglobulin mit 520 bp.

7a: RT-PCR von Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

7b: RT-PCR von Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

7c: RT-PCR von CD95-Rezeptor als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

7d: RT-PCR von β 2-Mikroglobulin als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h

Abb. 8: S. 79

Western Blot der Parietalzellen (n = 5)

8a: Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (25 kD)

8b: Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (21 kD)

8c: CD95-Rezeptor als Zeitverlauf (CD95R) bei 0 h, 24 h und 48 h (45 kD)

Abb. 9: S. 79

Western Blot der Hauptzellen (n = 5)

9a: Bcl-2 als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (25 kD)

9b: Bax als Zeitverlauf bei 0 h, 24 h und 48 h (21 kD)

9c: CD95-Rezeptor als Zeitverlauf (CD95R) bei 0 h, 24 h und 48 h (45 kD)

Abb. 10: S. 81

Nachweis von CD95-Rezeptoren mit einem FITC-markierten sekundären AK markiert von isolierte, kultivierten Haupt- und Parietalzellen in der Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 10).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

Abb. 10a: Parietalzellen: 0 h vrs. 24 h p = 0,0555

0 h vrs. 48 h p = 0,0017

Abb. 10b: Hauptzellen: 0 h vrs. 24 h p = 0,00005

0 h vrs. 48 h p = 0,0035

Abb. 11: S. 82

RT-PCR des CD95-Ligand bei Parietal- und Hauptzellen: Die positive Bande des PCR-Produktes vom CD95-Liganden stellt sich mit 209 bp nur in der Positivkontrolle dar (n = 3).

Bahn 1 NK1: Negativkontrolle 1 ohne cDNA

Bahn 2 NK2: Negativkontrolle 2 ohne reverse Transkriptase

Bahn 3, 4, 5: RT-PCR aus RNA von Parietalzellen bei 0h, 24h, 48h

Bahn 6 ST: Standard

Bahn 7 PK: Positivkontrolle (Jurkatzellen)

Bahn 8, 9, 10: RT-PCR aus RNA von Hauptzellen bei 0h, 24h, 48h

Abb. 12: S. 84

Mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimulierte Parietalzellen (Abb. 12a) und Hauptzellen (Abb. 12b) in der Annexin/Propidiumiodid-Färbung über einen Zeitverlauf von 0–180 min im Lichtmikroskop ausgezählt. Positivkontrolle Parietal/Hauptzellen 120 min mit 1 mol Staurosporin inkubiert (n =3). Nur einfach Annexin-positive Zellen wurden als apoptotisch gewertet.

Abb. 13a: S. 85

TUNEL-Färbung von einem Zeitverlauf (0–5 h) von Parietalzellen, die mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimuliert wurden. Positivkontrolle: 3 h Inkubation mit 1 mol Staurosporin (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student´s t-test:

3 h basal vrs. 3 h + CD95L p = 0,00077

3 h basal vrs. 3 h + Staurosporin p = 0,0097

5 h basal vrs. 5 h + CD95L p = 0,0088

Abb. 13b: S.86

TUNEL-Färbung von einem Zeitverlauf (0–5 h) von Hauptzellen, die mit CD95-Ligand (100 ng/ml) stimuliert wurden. Positivkontrolle: 3 h Inkubation mit 1 mol Staurosporin (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student´s t-test:

3 h basal vrs. 3 h + CD95L p = 0,0016

3 h basal vrs. 3 h + Staurosporin p = 0,0013

Abb. 14a: S. 87

Stimulation von Parietalzellen mit CD95-Ligand (100 ng/ml) über 3 h zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h nach der TUNEL-Methode gefärbt (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

24 h basal vrs. 24 h + CD95L p = 0,034

48 h basal vrs. 48 h + CD95L p = 0,011

Abb. 14b: S. 88

Stimulation von Hauptzellen mit CD95-Ligand (100 ng/ml) über 3 h zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h nach der TUNEL- Methode gefärbt (n = 4).

Signifikanz nach dem paired student's t-test:

0 h basal vrs. 0 h + CD95L p = 0,017

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tab.1: S. 26

Zusammensetzung der Inkubationslösungen (Lösung A und B) zur Zellisolation

Tab. 2: S. 26

Zusammensetzung der Kulturmedien für Haupt- und Parietalzellen

Tab. 3: S. 71

TUNEL-Färbung von isolierten, kultivierten Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 12), Positivkontrolle 3 h Inkubation der Zellen mit Camptothecin (4 mg/ml) bei 0 h, 24 h und 48 h:

Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Haupt- und Parietalzellen bei Kultivierung über 48 h nach dem paired student's t-test.

Signifikanter Anstieg bei Stimulation mit 4 mg/ml Camptothecin über 3 h bei 0h, 24h und 48h

Parietalzellen: 0 h vrs. Camptothecin p = 0,002; 24 h vrs. Camptothecin p = 0,001; 48 h vrs. Camptothecin p = 0,002

Hauptzellen: 0 h vrs. Camptothecin p = 0,005; 24 h vrs. Camptothecin p = 0,002; 48 h vrs. Camptothecin p = 0,003

Tab. 4: S. 72

ELISA von isolierten, kultivierten Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h (n = 7), Positivkontrolle 3 h Inkubation der Zellen mit Camptothecin (4 mg/ml) bei 0 h, 24 h und 48 h:

Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Haupt- und Parietalzellen bei Kultivierung über 48 h nach dem paired student's t-test.

Signifikanter Anstieg nach Stimulation mit 4 mg/ml Camptothecin über 3 h bei 0h, 24h und 48h:

Parietalzellen: 0 h vrs. Camptothecin $p = 0,003$; 24 h vrs. Camptothecin $p = 0,015$; 48 h vrs. Camptothecin $p = 0,004$
Hauptzellen: 0 h vrs. Camptothecin $p = 0,009$; 24 h vrs. Camptothecin $p = 0,012$; 48 h vrs. Camptothecin $p = 0,02$

Tab. 5: S. 73

Annexin V positive kultivierten und isolierte Haupt- und Parietalzellen bei 0 h, 24 h und 48 h in der Durchflusszytometrie ($n = 5$):

Kein Anstieg bei 48-stündiger Kultivierung. Bei Inkubation von Jurkatzellen mit Camptothecin (4 mg/ml) für 3 h deutlicher Anstieg der Apoptoserate.

Tab. 6: S. 74

Annexin V positive, isolierte Haupt- und Parietalzellen nach 0 h, 24 h und 48 h ($n = 6$) Kultur im Lichtmikroskop ausgezählt. Positivkontrolle Inkubation mit 1 mol Staurosporin über 3 h

Kein signifikanter Anstieg der Apoptose bei Kultivierung von Haupt- und Parietalzellen über 48 h nach dem paired student's t-test.

Signifikanter Anstieg nach Stimulation mit 1 mol Staurosporin über 3 h:

Parietalzellen: + Staurosporin vrs. 0 h, 24 h, 48 h $p < 0,05$

Hauptzellen: + Staurosporin vrs. 0 h, 24 h, 48 h $p < 0,01$

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. C. Prinz danke ich für die Überlassung dieser Promotionsarbeit und die Möglichkeit in seinem Labor wissenschaftlich zu arbeiten. Außerdem möchte ich mich bei ihm für die intensive Betreuung bei der schriftlichen Ausarbeitung bedanken, ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein ganz besonderer Dank richtet sich an Fr. Herrmuth, die mich mit viel Geduld in die verschiedenen Arbeitstechniken eingewiesen hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herrn Dr. B. Neu danke ich für die Unterstützung bei der Planung und die Betreuung bei dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Laborteam bedanken: Es hat sich v.a. bei technischen Problemen jederzeit eine Hilfe gefunden, und das kollegiale Arbeitsklima haben die Zeit im Labor sehr angenehm gemacht. Herrn W. Reindl danke ich im Speziellen für die Einarbeitung bei der Durchflusszytometrie.

Schließlich möchte ich mich bei meinem Mann Fabian Schäfer und bei meiner Freundin Tatjana Pittack bedanken, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben und die gesamte Arbeit Korrektur gelesen haben.

CURRICULUM VITAE

Name: Franziska Ernst
Geburtstag: 26.08.1973
Geburtsort: München
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1979–1983 St. Martin Grundschule, München
1983–1992 Gymnasium Max Josef-Stift, München
Juli 1992 Abitur

Hochschulbildung

1992–1994 Studium der Biologie an der Technischen Universität München
Nov. 1994 Vordiplom im Fach Biologie
1994–1996 Vorklinisches Studium an der Universität Regensburg
März 1996 Physikum
1996–1999 Klinisches Studium an der Technischen Universität München
März 1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Nov. 1999 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Okt. 1999–Sept. 2000 Praktisches Jahr
Nov. 2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztin im Praktikum

Mai 2001–Okt. 2002 Ärztin im Praktikum am städtischen Krankenhaus München-Harlaching, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe

Weiterbildung

seit Feb. 2003 Assistenzärztin am städtischen Krankenhaus München-Harlaching, Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe