

II. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: UNIV.-PROF. DR. R. M. SCHMID)

# TNF- $\alpha$ -Wirkungen auf die Enterochromaffin-like Zellen des Magens

Christian G. Huber

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. Chr. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 30.01.2006 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 19.07.2006 angenommen.

*Meiner Familie*

*und allen, die mich zum Durchhalten  
angespornt haben*

## **Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:**

### **Originalarbeiten**

**Huber C**, Zanner R, Pohlinger A, Mahr S, Neu B, Prinz C. Tumor Necrosis Factor-Alpha Effects on Rat Gastric Enterochromaffin-Like Cells.

*Digestion* 2002; 65: 87–102

### **Abstracts**

Rad R, Lang R, Gerhard M, Schoeniger M, **Huber C**, Zanner R, Becker I, Classen M, Wagner H, Prinz C. Correlation of Helicobacter pylori Subtypes with Th-1 specific Cytokines and Receptors during Chronic Gastritis.

*Gastroenterology* 2000; 118(4 Su 2 Pt 2): A1298

Zanner R, Rad R, **Huber C**, Classen M, Prinz C. Enterochromaffin-like (ECL) Cells express Amphiphysin in Addition to Neuronal and Muscle Cells in the Rat Gastric Corpus.

*Gastroenterology* 2000; 118(4 Su 2 Pt 1): A888

**Huber C**, Zanner R, Rad R, Presecan-Siedel E, Schepp W, Classen M, Prinz C. TNF- $\alpha$  associated Apoptosis in Rat Gastric Enterochromaffin-like Cells is mediated by NF $\kappa$ B and can be antagonized by bFGF.

*Gastroenterology* 2000; 118(4 Su 2 Pt 1): A888

Prinz C, Mahr S, Presecan-Siedel E, **Huber C**, Gerhard M. Signal-transduction in Response to Proinflammatory Cytokines differs in Rat and Human ECL-cells.

*Gastroenterology* 2000; 118(4 Su 2 Pt 1): A32

Prinz C, **Huber C**, Schepp W, Classen M. TNF-Receptors and TNF- $\alpha$  Effects on Rat Gastric Enterochromaffin-like Cells.

*Gastroenterology* 1999; 116(4) Pt.2: A286

Zanner R, Rad R, **Huber C**, Mahr S, Classen M, Gratzl M, Prinz C. Expression des Endocytose-Proteins Dynamin in Enterochromaffin-like Zellen der Ratte.

*Z Gastroenterol* 1999; 37: 846, A076

**Huber C**, Presecan-Siedel E, Zanner R, Mahr S, Classen M, Prinz C. TNF-Rezeptoren und Effekte von TNF- $\alpha$  bei enterochromaffin-like Zellen des Rattenmagens.

*Z Gastroenterol* 1999; 37: 833, A022

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnisse</b>	<b>4</b>
Inhaltsverzeichnis .....	4
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	8
<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
1. Charakterisierung der Enterochromaffin-like Zellen .....	11
2. Physiologische Funktion der ECL-Zellen .....	13
3. Pathophysiologische Bedeutung: Proliferation und Apoptose .....	14
3.1 Neuroendokrine Tumoren .....	14
3.2 Chronische Helicobacter-pylori-assoziierte Gastritis .....	16
4. Bedeutung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$ .....	17
4.1 Zellspezifische Wirkung von TNF- $\alpha$ .....	18
4.2 TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B.....	18
5. Modell der isolierten ECL Zellen .....	20
6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	21
<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
1. Material .....	22
1.1 Versuchtiere .....	22
1.2 Chemikalien .....	22
1.3 Zytokine und Stimulantien.....	24
1.4 Antikörper und Seren .....	24
1.5 Molekularbiologische Substanzen.....	25
1.6 Hilfsmittel .....	26
1.7 Geräteausrüstung .....	26
1.8 Dokumentationsmaterial .....	28
1.9 Computerprogramme .....	28
2. Methoden .....	29
2.1 Isolation und Kultivierung der ECL-Zellen .....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3 Immunologische Methoden .....	40
2.4 Statistische Methoden.....	48

<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
1. Güte der Zellpräparation und Rezeptor-Nachweis .....	49
2. Nachweis von TNF-Rezeptor Subtyp 1 und TRAF2 (PCR und Western Blot).....	51
3. Apoptose-Rate von ECL-Zellen in der Gegenwart von TNF- $\alpha$ .....	53
4. Die Wirkung von Interferon- $\gamma$ auf ECL-Zellen .....	55
5. Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ .....	57
6. Die Aktivität von NF $\kappa$ B steigt nach Inkubation mit TNF- $\alpha$ .....	59
7. Proteasom-Inhibitoren und durch TNF- $\alpha$ vermittelte Apoptose .....	63
8. Hemmung der Apoptose durch NF $\kappa$ B AS-ODN und L-NMMA.....	65
9. Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose durch bFGF .....	67
<b>Diskussion</b>	<b>69</b>
1. Wirkung von TNF- $\alpha$ auf ECL-Zellen .....	69
2. Signaltransduktion des pro-apoptotischen Effektes von TNF- $\alpha$ durch NF $\kappa$ B.....	71
3. TNF- $\alpha$ induziert wie IL-1 $\beta$ Apoptose durch Erzeugung von NO .....	73
4. Die Wirkung von TNF- $\alpha$ kann durch bFGF antagonisiert werden.....	74
5. Übertragbarkeit der Befunde auf die Helicobacter-assoziierte Gastritis .....	75
<b>Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>Anhang</b>	<b>79</b>
Danksagung .....	79
Bibliographie.....	80
Curriculum Vitae .....	96

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen und Tabellen ohne separate Quellenangabe stammen vom Autor.

### Abbildungen

- Abb. 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme einer aus dem Rattenmagen isolierten ECL-Zelle  
(Originalabbildung aus [139])
- Abb. 2 Schematische Darstellung der Lage von ECL-Zellen in der Mucosa des Magenfundus (modifiziert nach [88], S. 486)
- Abb. 3 NF $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  (modifiziert nach [128])
- Abb. 4 Sprague-Dawley Ratte  
(National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, <http://www.nlac.mahidol.ac.th/>)
- Abb. 5 Schematische Darstellung der TUNEL-Reaktion  
(modifiziert nach [153])
- Abb. 6 Funktionsprinzip des „Cell death detection ELISA“  
(modifiziert nach [184])
- Abb. 7 3D-Modell von TNF- $\alpha$  [51;52] und TNF-R1 [13;121;154], erstellt mit Cn3D 4.1  
(PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>)
- Abb. 8 Lichtmikroskopische Aufnahme von auf OT kultivierten ECL-Zellen
- Abb. 9 Nachweis von Rezeptoren auf ECL-Zellen mittels Immunocytochemie (Fluoreszenzfärbung)
- Abb. 10 Nachweis von TNF-R1, IFN- $\gamma$ -R ( $\alpha$ -Kette) und TNF-R2 durch RT-PCR
- Abb. 11 Nachweis der Expression von TNF-R1, TRAF2 und DR4 im Western Blot
- Abb. 12 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Dosierungen  
(TUNEL-Reaktion)
- Abb. 13 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Dosierungen  
(Cell death detection ELISA)
- Abb. 14 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach unterschiedlichen Intervallen der Stimulation mit TNF- $\alpha$   
(TUNEL-Reaktion)
- Abb. 15 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  bzw. kombinierter Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (TUNEL-Reaktion)
- Abb. 16 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  bzw. kombinierter Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Cell death detection ELISA)
- Abb. 17 Nachweis der Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Inkubation der ECL-Zellen mit TNF- $\alpha$  im Western Blot
- Abb. 18 EMSA mit Proteinextrakten unstimulierter und mit TNF- $\alpha$  inkubierter ECL-Zellen
- Abb. 19 EMSA-Supershift-Versuch mit Antikörpern gegen die NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50, p52 und p65
- Abb. 20 EMSA mit Proteinextrakten aus ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und nach Präinkubation mit dem Proteasom-Inhibitor PSI

- Abb. 21 Bestimmung der optischen Bandendichte zur quantitativen Auswertung der EMSA-Experimente
- Abb. 22 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. vorheriger Inkubation mit PSI oder MG132 (TUNEL-Reaktion)
- Abb. 23 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. vorheriger Inkubation mit MG132 (Cell death detection ELISA)
- Abb. 24 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. nach vorheriger Inkubation mit gegen NF $\kappa$ B gerichteten AS-ODN (TUNEL-Reaktion)
- Abb. 25 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. nach gemeinsamer Inkubation mit TNF- $\alpha$  und L-NMMA (TUNEL-Reaktion)
- Abb. 26 Nachweis der Induktion der iNOS-Transkription durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  mittels semi-quantitativer RT-PCR
- Abb. 27 Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. nach gleichzeitiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  und bFGF (TUNEL)
- Abb. 28 NF $\kappa$ B-Heterodimer-DNA-Komplex  
(Biomolecules Gallery 1VKX, <http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/jouhoubank.html>)
- Abb. 29 Schematische Darstellung der nachgewiesenen Schritte, die zur pro-apoptotischen Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die ECL-Zelle führen (modifiziert nach Abb. 3)

## Tabellen

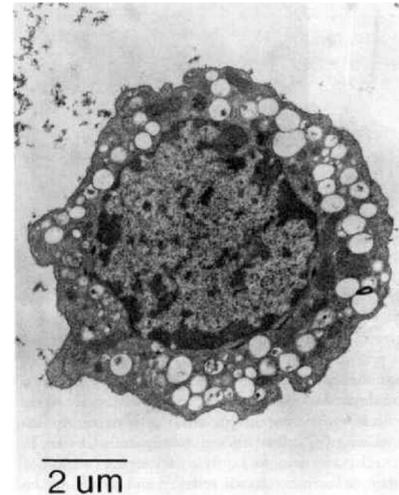
- Tab. 1 Zytokine und ihre Wirkung auf Proliferation bzw. Apoptose der ECL-Zelle
- Tab. 2 RT-PCR Parameter
- Tab. 3 Nachweis der Proteine von TNF-R1, TRAF und I $\kappa$ B $\alpha$  durch Western Blotting

## Abkürzungsverzeichnis

-L	-Ligand
-R	-Rezeptor
6-FAM	6-Carbofluorescein
AA	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
APUD	Aufnahme und Decarboxylierung von Vorläufern biogener Amine (engl. <i>amine precursor uptake and decarboxylation</i> )
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>basic fibroblast growth factor</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
bp	Basenpaar
CAG	Chronische atrophische Gastritis
CCK-B	Cholecystokinin B
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
cpm	Zerfälle pro Minute (engl. <i>counts per minute</i> )
CREB	Transkriptionsfaktor, der an das cAMP-responsive Element bindet
Cy3	Cyanat 3
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Dihydrat
DD	Todesdomäne (engl. <i>death domain</i> )
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR4	Todes-Rezeptor Typ 4 (engl. <i>death receptor 4</i> )
DTT	Dithiothreitol
EC-Zellen	Enterochromaffine Zellen
ECL	Enhanced-chemiluminescence
ECL-Zellen	Enterochromaffin-like Zellen
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	Elektrophoretischer Retardationsassay (engl. <i>electrophoretic mobility shift assay</i> )

F <sub>ab</sub>	Antigen-bindendes Fragment
FBS	Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i> )
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>fibroblast growth factor</i> )
FGF-R1	FGF-Rezeptor Typ 1
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HDC	Histidin-Decarboxylase
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich-Peroxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
ICC	Immuncytochemie
IFN- $\gamma$	Gamma-Interferon (Typ 2 Interferon)
I $\kappa$ B	Inhibitor von NF $\kappa$ B
IKK	I $\kappa$ B-spezifische Kinase
ITS	Insulin-Transferrin-Natriumselenit
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	Interleukin 1 beta
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
L-NMMA	N <sup>G</sup> -Monomethyl-L-Arginin, Monoacetat-Salz
MEN1	Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1
min	Minute(n)
mRNA	Messenger RNA
MS	Missense
NET	Neuroendokriner Tumor
NF $\kappa$ B	Kernfaktor kappa B (engl. <i>nuclear factor kappa B</i> )
NGF	Nervenwachstumsfaktor (engl. <i>nerve growth factor</i> )
NIH/3T3	Fibroblasten-Zelllinie
NIK	NF $\kappa$ B-induzierende Kinase
NLS	Kerntransport-Sequenz (engl. <i>nuclear localisation sequence</i> )
NO	Stickstoffmonoxyd
NOS	NO-Synthase
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodeoxynucleotide
OT	Objektträger
PAC1	PACAP-Rezeptor Typ 1
PACAP	Pituitary adenylate cyclase activating peptide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POD	Peroxidase
RIP	Protein, das mit dem Rezeptor interagiert (engl. <i>receptor-interacting protein</i> )
RM	Regular Medium
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions PCR
sec	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	TRIS-Azetat-Essigsäure-Puffer
TBS	TRIS buffered saline
TdT	Terminale Desoxyribonukleotid-Transferase
Temed	N,N,N',N',-Tetramethylethylethylendiamin
TGF	Tumor-Wachstums-Faktor (engl. <i>tumor growth factor</i> )
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R(1,2)	TNF-Rezeptor (Subtyp 1 bzw. 2)
TRADD	TNF-Rezeptor-assoziiertes Todesdomänen-Protein
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (engl. <i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i> )
TRAF	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TUNEL	TdT mediated dUTP nick end labeling
VMAT	Vesikulärer Monoamin-Transporter
ZES	Zollinger-Ellison Syndrom



**Abb. 1:** Elektronenmikroskopische Aufnahme einer aus dem Rattenmagen isolierten ECL-Zelle (Originalabbildung aus [139])

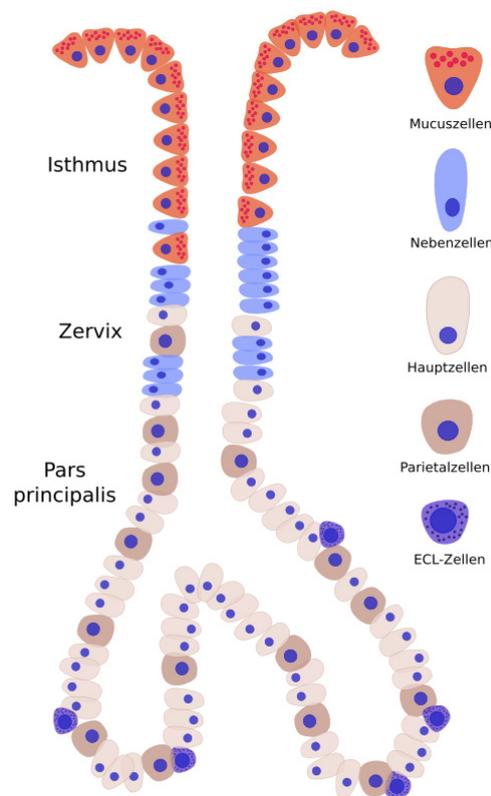
## Einleitung

### 1. Charakterisierung der Enterochromaffin-like Zellen

Bei der Suche nach histaminhaltigen Zellen in histologischen Präparaten der menschlichen Magenmucosa wurden 1967 von Hakanson und Owman die enterochromaffin-like Zellen nachgewiesen [72;73]. Den Namen „enterochromaffin-like“ erhielten sie aufgrund ihrer ultrastrukturellen Ähnlichkeit zu den bereits bekannten serotonergen enterochromaffinen (EC) Zellen, die auf ihre endokrine Funktion hindeutet (Abb. 1). Im histologischen Präparat lassen sich die ECL-Zellen im unteren Drittel der säureproduzierenden Magenmucosa in der Nähe von Haupt- und Parietalzellen lokalisieren (Abb. 2), wobei sie ausschließlich im Magenfundus zu finden sind [69;158]. Mittlerweile konnten ECL-Zellen bei vielen weiteren Spezies nachgewiesen werden, unter anderem auch bei der Ratte [30]. Ihr Anteil [69] an den endokrinen Zellen des Magens ist dabei von Art zu Art unterschiedlich, bei der Ratte machen sie 65 % der endokrinen Zellen aus [74]. Dabei stellen sie bei Säugetieren durchgängig den größten Teil der endokrinen Zellen des Magens [70;175].

Nach ihrer Entdeckung wurde eine Charakterisierung der ECL-Zellen auf ultrastruktureller, immunocytochemischer und funktioneller Ebene unternommen. In der elektronenmikroskopischen Darstellung lassen sich kleine, unregelmäßig geformte Zellen erkennen, deren Durchmesser etwa 10  $\mu\text{m}$  beträgt (Abb. 1). Sie zeichnen sich durch einen großen, exzentrisch gelegenen Nucleus aus, der etwa die Hälfte des

Zellvolumens füllt. Weiterhin weisen sie zwar wenige Zellorganellen auf, sind aber reich an sekretorischen Vesikeln. Diese lassen sich in histaminhaltige elektronendurchlässige Vesikel (mittlerer Durchmesser 180 nm) [34;139], elektronendichte Vesikel (Durchmesser 120 nm), die vermutlich das noch unbekannte Peptidhormon der ECL-Zelle enthalten, Mikrovesikel (Durchmesser 70 nm) und Vakuolen (Durchmesser  $\geq 500$  nm) unterteilen [69]. Dieser ultrastrukturelle Aufbau lässt auf eine hauptsächlich auf Proteinsynthese und -sekretion spezialisierte Zellfunktion schließen.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Lage von ECL-Zellen in der Mucosa des Magenfundus (modifiziert nach [88], S. 486)

Wie neuronale und endokrine chromaffine bzw. argyrophile Zellen lassen sich auch die ECL-Zellen durch Silbernitrat-Färbung darstellen. Weiterhin enthalten sie Chromogranin A und Chromogranin B, zwei Proteine, die für die Speicherung von biogenen Aminen von Bedeutung sind. Chromogranin A gilt dabei als Marker für neuroendokrine Zellen [38].

Auch die Synthese und Speicherung biogener Amine (Histamin) [70] durch Decarboxylierung von aufgenommenen Aminosäuren (L-Histidin) [3] zeichnet die ECL-Zellen als Teil des neuroendokrinen „amine precursor uptake and decarboxylation“

(APUD-) Systems aus. Darüber hinaus verfügen sie über weitere Charakteristika neuronaler Zellen, etwa spannungsregulierte  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Kanäle [27].

Die ECL-Zellen sind somit als neuroendokrine Zellen einzuordnen. Wie D-Zellen,  $D_1/P$ -Zellen, EC-Zellen, die gastrinproduzierenden G-Zellen und die ghrelinproduzierenden X/A-Zellen bilden sie einen Teil des endokrinen Systems des Gastrointestinaltraktes [143;158;171].

## 2. Physiologische Funktion der ECL-Zellen

Sie üben dabei eine Schlüsselrolle in der Regelung der Säuresekretion des Magens aus: Die Freisetzung von Magensäure unterliegt grundsätzlich einer zentralen (ZNS), peripheren (peripheres Nervensystem und endokrine Zellen des Magens) und zellulären (Parietalzelle) Regelung [163;164].

Durch die Nahrungsaufnahme wird der Magen gedehnt, es werden Peptide und Aminosäuren als Verdauungsprodukte freigesetzt, die Konzentration von  $Ca^{2+}$  steigt und der pH-Wert erhöht sich. Alle genannten Reize bewirken im Zuge der peripheren Regelung der Säuresekretion eine Freisetzung des Hormons Gastrin aus den G-Zellen des Magenantrums in die Blutbahn [158]. Dieses stimuliert über den CCK-B-Rezeptor der ECL-Zellen [12] und den Einstrom von  $Ca^{2+}$  die Freisetzung von Histamin als parakrines Stimulans [144;188]. Über Diffusion gelangt es zu den nahe gelegenen Parietalzellen, bei denen es an den  $H_2$ -Rezeptor bindet und die Aktivierung der  $H^+/K^+$ -ATPase und damit die Freisetzung von Magensäure bewirkt [157]. Als Rückkopplung im Regelkreis der peripheren Regelung der Säuresekretion dient die Ausschüttung von Somatostatin aus den in Magenantrum und -corpus gelegenen D-Zellen, die eine verminderte Gastrin- (G-Zellen) und Histaminfreisetzung (ECL-Zellen) zur Folge hat [141].

Zusätzlich kann auch der neuronale Transmitter PACAP (pituitary adenylyl cyclase activating peptide) über die Bindung an PAC-1 Rezeptoren der ECL-Zelle eine wirkungsvolle Induktion der Histaminausschüttung bewirken [104;138;189;190]. Das aus Nerven des Sympathikus freigesetzte Peptid ist besonders in der cephalen Phase der Magensäuresekretion von Bedeutung, so dass auch in dieser Hinsicht der ECL-Zelle eine wichtige Mittler-Position zukommt.

Etwa 3 bis 10 pg Histamin [3] werden pro Zelle mit Hilfe des Enzyms L-Histidin-Decarboxylase aus L-Histidin produziert [70]. Antikörper gegen dieses Enzym werden daher auch als zellulärer Marker für ECL-Zellen verwendet [95]. Mittels des

Transporters VMAT-2 (vesicular monoamine transporter subtype 2) wird das Histamin in sekretorischen Vesikeln gespeichert und bei Gastrin-Einwirkung innerhalb von 5 min sezerniert (akute Wirkung). Neben dieser akuten Gastrinwirkung kommt es innerhalb von 30 bis 120 Minuten zu einer erhöhten Histaminsynthese (subakute Wirkung) durch Einwirkung auf Transkription, Translation und posttranslationale Verarbeitung der Histidin-Decarboxylase [70]. Auch PACAP übt über einen unabhängigen Mechanismus eine solche Wirkung aus [116]. Nach zwei bis vier Tagen führen Gastrin [142] und PACAP [99;132] schließlich zur Proliferation der ECL-Zellen (chronische Wirkung).

Zusätzlich zur Synthese von Histamin sind als weitere Produkte der ECL-Zellen Chromogranin A, Pankreastatin [71], Calbindin [62], Regenerating-Gen-Protein [4] und Uroguanylin [45] bekannt. Über das eigentliche Peptid-Hormon der ECL-Zelle besteht dagegen noch Unklarheit, allerdings gibt es Anlass zu der Vermutung, dass das Peptidhormon die Aufnahme von Calcium in den Knochen fördert [97].

### **3. Pathophysiologische Bedeutung: Proliferation und Apoptose**

#### **3.1 Neuroendokrine Tumoren**

Durch ihre Schlüsselrolle im Regelkreis der peripheren Säuresekretion sind ECL-Zellen durch Stoffwechsellagen mit pathologisch erhöhter Gastrin-Ausschüttung besonders betroffen. Die Hypergastrinämie führt dabei durch chronische Einwirkung zur Hyperproliferation. Im Tiermodell (*Mastomys natalensis*) lassen sich durch langjährige Hypergastrinämie, etwa durch die Gabe von Protonenpumpen-Hemmern (PPI), Tumoren induzieren [118;119;129]. Nach einem von Solcia et al. vorgeschlagenen Modell [172] kommt es dabei zunächst zur reversiblen Hyperplasie mit einem linearen Anstieg der Zellzahl und der Ausbildung von ECL-Zell-Knoten, wobei eine Verdickung der Mucosa eintritt. Bei fortgesetzter Gastrin-Einwirkung tritt eine irreversible Dysplasie ein, atypische Zellen entstehen, die gebildeten Knoten fusionieren, es kommt zu Stroma-Neubildungen und Mikroinvasionen. Schließlich entstehen neoplastische Knoten (> 5 mm), die Zellen wandern in die Submucosa ein. Zusätzlich zum fortgesetzten externen Gastrineffekt wurde bei ECL-Zell-Tumoren die autokrine Expression von Gastrin [168] und der Wachstumsfaktoren TGF- $\alpha$  [177] und bFGF [19] nachgewiesen. Alle drei genannten Botenstoffe bewirken eine Proliferation der

ECL-Zellen, das Zytokin bFGF kann zusätzlich das Eintreten der Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) vermindern (Tabelle 1).

Ligand	Rezeptor	Nachweis	Proliferation	Apoptose	Referenz
Gastrin	CCK-B-R	+	▲	●	[11;142;172]
PACAP	PAC-1	+	▲	n.u.	[98]
TGF- $\alpha$	EGF-R	+	▲	●	[112]
Basic FGF	FGF-R1	+	▲	▼	[112]
NGF	NGF-R1	+	●	▼	[112]
IL-1 $\beta$	IL-R1	+	n.u.	▲	[111;140]
IL-6	IL-6 Rezeptor	+	n.u.	●	[140]
IL-8	IL-8 Rezeptor	-	n.u.	●	[140]

**Tab. 1:** Zytokine und ihre Wirkung auf Proliferation bzw. Apoptose der ECL-Zelle. +: vorhanden, -: nicht vorhanden, ▲: Steigerung, ▼: Senkung, ●: kein Effekt, n.u. = nicht untersucht

Während im Tiermodell fortgesetzte Hypergastrinämie zur Tumorinduktion genügt, konnte ein ähnlicher Mechanismus (Induktion durch PPI) beim Menschen nicht nachgewiesen werden. Neuroendokrine Tumoren (NET, „Karzinoide“) [41] beim Menschen werden jedoch ebenfalls hauptsächlich in hypergastrinämischen Stoffwechsellagen beobachtet [65]. Dabei stellen ECL-Zell-Tumoren mit 40 % den größten Teil aller NET [20;94;151;152]. Die Zahl der Tumoren mit ECL-Zell-Beteiligung könnte hierbei noch unterschätzt werden, da die Zellen im Verlauf der Transformation dedifferenzieren und teilweise nicht mehr durch die geläufigen Marker erkannt werden können [60;61]. Histopathologisch werden ECL-Zell-Tumoren in drei Typen unterteilt [16]: Der häufigste Typ 1 des NET bezeichnet den bei chronischer atrophischer Gastritis (CAG) [18;31;169] durch Achlorhydrie, mäßige Hypergastrinämie und häufig in Verbindung mit perniziöser Anämie [166] entstandenen relativ benignen ECL-Zell-Tumor (Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit 10 %). Typ 2 (5-10 % aller NET des Magens) ist mit ausgeprägter Hypergastrinämie verbunden, etwa im Rahmen eines Zollinger-Ellison-Syndromes (ZES) [28;170] oder der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1), Metastasen werden bei etwa 12 % der Fälle beobachtet. Der im normogastrinämischen Milieu spontan auftretende Typ 3 stellt 15-20 % der Magen-

NET und ist mit einer Metastasierungsrate von ca. 65 % die maligneste Form [18;26;150;151;161].

Es scheinen daher neben der Hypergastrinämie zusätzliche Faktoren von Nöten zu sein, um den normalen Teilungszyklus der ECL-Zelle von etwa 60 Tagen [180] zu verändern und das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose permanent zu verschieben. Diskutiert werden unter anderem Mutationen im CCK-B-Rezeptor [159], im Regla-Gen [81], das an der Regelung der gastrininduzierten Proliferation beteiligt ist, und der Verlust der Heterozygotität am MEN-1 Genlokus auf Chromosom 11q13 [42;46].

### **3.2 Chronische *Helicobacter-pylori*-assoziierte Gastritis**

Bei der chronischen Gastritis ist häufig die Infektion durch das gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* zu beobachten [64]. Eine insuffiziente Immunantwort führt dabei zu chronischen entzündlichen Prozessen, deren Ergebnis Destruktion und Atrophie der säurebildenden Magenmucosa sind [64;84;96].

Aufgrund der Lage der ECL-Zellen im unteren Drittel der Magendrüsen kommt es zu keinem direkten Kontakt mit dem Bakterium. Im Rahmen einer chronischen Infektion treten jedoch als Antwort des Immunsystems erhöhte Konzentrationen entzündungsfördernder Zytokine in der Magenmucosa auf, unter anderem von Tumornekrose-Faktor (TNF)  $\alpha$ , Interferon (IFN)  $\gamma$  und Interleukin (IL)  $1\beta$ . Diese Zytokine werden von Monocyten und Makrophagen in der menschlichen Magenschleimhaut sezerniert. Auch Zellen der Magenmucosa, die nicht zum Immunsystem gehören, können Zytokine wie TNF- $\alpha$  freisetzen [110]. Ihr Einfluss auf das Sekretionsverhalten und die Proliferation der ECL-Zellen ist bisher weitgehend unbekannt [111].

Bisher konnte gezeigt werden, dass das entzündungsfördernde IL- $1\beta$  die Synthese und Ausschüttung von Histamin durch die ECL-Zelle hemmt [140]. Zusätzlich zeigte sich, dass IL- $1\beta$  den programmierten Zelltod von ECL-Zellen einleitet (Tab. 1), indem es über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und des pro-apoptischen Proteins bax steigert [111].

Die IL- $1\beta$ -induzierte Apoptose könnte die Beobachtung erklären, dass *Helicobacter*-positive Patienten signifikant niedrigere Histidin-Decarboxylase-Aktivität und Histaminspiegel im Magen aufweisen als solche, bei denen keine Kolonisation mit *Helicobacter pylori* nachgewiesen werden konnte [146]. Zusätzliche Gründe, die eine

mögliche Erklärung für die beobachtete Hemmung der Magensäuresekretion durch IL-1 $\beta$  darstellen, könnten in einer direkten Hemmung der Parietalzell-Funktion [160] und einer Steigerung der Prostaglandin-Synthese [105] bestehen, die wiederum indirekt die Säuresekretion hemmt. Ein direkter Effekt von IL-1 $\beta$  auf ECL-Zellen könnte weiterhin für die Hypoazidität verantwortlich sein, die bei Patienten mit bestimmten Polymorphismen im IL-1 $\beta$ -Promotor beobachtet wurde. Bei diesen Patienten bestehen erhöhte Zytokin-Spiegel sowie erniedrigte Magensäurekonzentration und in der Folge ein signifikant erhöhtes Risiko, ein Adenocarcinom des Magens zu entwickeln [54;147].

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass ECL-Zellen ein wichtiges Ziel für pro-entzündliche Zytokine darstellen könnten. Gleichzeitig sind sie im Milieu der chronischen Gastritis auch proliferationsfördernden und anti-apoptotischen Faktoren ausgesetzt. Da neben der funktionellen Beeinträchtigung und Apoptose der ECL-Zellen bei CAG auch vermehrtes Auftreten von NET Typ 1 beobachtet wird, könnte das gleichzeitige Vorliegen von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren die Entstehung von Dysplasien und Neoplasien der ECL-Zellen fördern.

#### **4. Bedeutung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$**

Über die Bedeutung des bei chronischer Gastritis ebenfalls in hohen Konzentrationen vorhandenen Zytokins TNF- $\alpha$  für die ECL-Zellen lagen bisher keine Daten vor. Dieses Zytokin gilt als Prototyp entzündungsfördernder Mediatoren und ist ein Schlüsselbotenstoff bei Entzündungsvorgängen des menschlichen Körpers, unter anderem dem Morbus Crohn und der rheumatoiden Arthritis. Die große pathophysiologische Bedeutung bei den genannten Erkrankungen wird dadurch unterstrichen, dass bei beiden gegenwärtig chimärische Antikörper gegen TNF- $\alpha$  und lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptoren eingesetzt werden und den Erkrankungsverlauf erheblich verbessern können [44;113;120]. Auch bei einer chronischen Infektion mit *Helicobacter pylori* wird TNF- $\alpha$  in erhöhtem Maß ausgeschüttet. Dabei korreliert der TNF- $\alpha$ -Spiegel in der Magenmukosa sowohl mit der Besiedlungsdichte als auch mit den histologischen Veränderungen [186].

#### **4.1 Zellspezifische Wirkung von TNF- $\alpha$**

Bei TNF- $\alpha$  handelt es sich um pleiotropes Zytokin, das 1975 entdeckt wurde, und seinen Namen aufgrund der zytotoxischen Wirkung auf Fibrosarkom-Zellen der Maus erhielt [32]. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass TNF- $\alpha$  die Fähigkeit hatte, bei einer Reihe weiterer Zellen den programmierten Zelltod einzuleiten. Diese Art des Zelltodes war erst kurz zuvor 1971 erstmals als „Schrumpfungsnekrose“ beschrieben [90] worden. Im Gegensatz zur Nekrose handelt es sich um einen aktiven Prozess, der zur mikroskopisch beobachtbaren Zellschrumpfung, zur Chromatinkondensation und der Spaltung der DNA durch eine Endonuklease in 180 bis 200 bp lange Histon-assoziierte Fragmente führt. Schließlich entstehen aus der Zelle eine Vielzahl kleiner Vesikel, die von Zellen des Immunsystems phagozytiert werden, zu einer Beschädigung der Zellmembran bzw. zum Austreten von Zytoplasma kommt es nicht. 1972 erhielt dieser Vorgang den Namen Apoptose [91].

Menschliches TNF- $\alpha$  ist ein 17 kDa (157 AA) großes unglykosyliertes Protein, das Dimere, Trimere und Pentamere bilden kann. Neben der löslichen Form existiert auch membranständiges TNF- $\alpha$ . Für das Zytokin existieren zwei Typen von Rezeptoren, TNF-Rezeptor Subtyp 1 (TNF-R1, CD120a, p55) und TNF-Rezeptor Subtyp 2 (TNF-R2, CD120b, p75), von denen ebenfalls lösliche Formen bekannt sind. Letztere können sezerniertes TNF- $\alpha$  binden und damit seine Wirkung auf die Zielzellen verhindern. Durch Integration löslicher Rezeptoren in die Zellmembran kann TNF- $\alpha$  auch auf Zellen einwirken, die selbst TNF-R1 und TNF-R2 nicht exprimieren [2;109].

TNF- $\alpha$  steht stellvertretend für eine große Gruppe mit ihm verwandter Proteine: Mittlerweile sind 19 Liganden (z. B. TNF- $\alpha$ , Fas-Ligand, TRAIL) und über 30 Rezeptoren (z. B. TNF-R1, TNF-R2, CD95, DR4) aus der TNF-Familie bekannt [63]. Anders, als ihr Name vermuten ließe, können sie nicht nur Apoptose auslösen. Sie alle üben je nach betroffener Zelle und Vorliegen weiterer Zytokine Wirkung auf Apoptose, Proliferation, Überleben und Differenzierung aus. Diese gewebespezifischen Effekte lassen sich unter anderem durch die unterschiedliche Expression der Rezeptorformen, Unterschiede in der Signaltransduktion und unterschiedliche Wirkungen auf Transkriptionsfaktoren erklären.

#### **4.2 TNF- $\alpha$ -induzierte Aktivierung von NF $\kappa$ B**

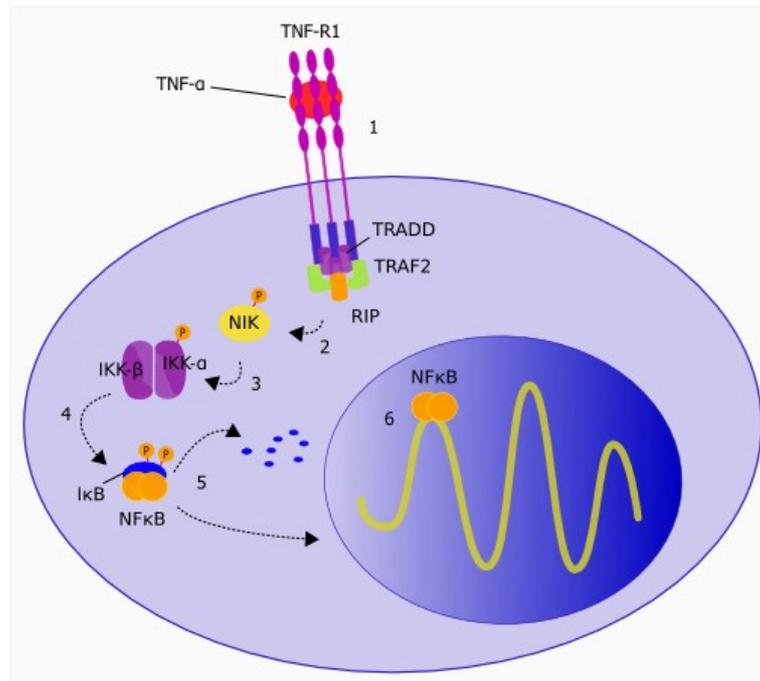
TNF- $\alpha$  führt wie alle weiteren bekannten Vertreter der TNF-Familie unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B. Seine Funktion steht exemplarisch

für die differenzierte Wirkung von TNF- $\alpha$  auf unterschiedliche Zielzellen: Bei einer Reihe von Gewebetypen und Spezies induziert er pro-apoptotische Wirkung, anti-apoptotische Wirkung oder bleibt ohne Wirkung auf Proliferation und Apoptose [1;9;63]. Bei endokrinen Zellen hat er beispielsweise die Einleitung des programmierten Zelltodes zur Folge, andere Zelltypen schützt er vor Apoptose [7;102]. Über letzteren Mechanismus kann er als Onkogen wirken und die Entstehung von Neoplasmen fördern [22]. Bei ECL-Zellen wird die durch IL-1 $\beta$  ausgelöste Apoptose über NF $\kappa$ B vermittelt [111].

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wurde erstmals 1986 bei B-Lymphocyten nachgewiesen, wo er an eine Gensequenz oberhalb der Sequenz der leichten  $\kappa$ -Kette der Immunglobuline bindet [165]. In der Folgezeit wurde klar, dass der Transkriptionsfaktor in Abhängigkeit vom Zelltyp eine großen Zahl spezifischer Aufgaben wahrnimmt, wobei er von zentraler Bedeutung für die Aktivität des menschlichen Immunsystems ist [8]. In inaktiver Form liegt er als Homo- oder Heterodimer aus bisher fünf bekannten Untereinheiten [8;35;137] im Zytoplasma vor. Dabei wird ein Cluster positiv geladener Aminosäuren, die NLS (nuclear localisation sequence) durch I $\kappa$ B abgedeckt, von dem ebenfalls mehrere Isoformen bekannt sind [7;14]. Liegt die NLS frei, ermöglicht sie die aktive Translokation durch den „nuclear pore complex“-Kanal [66] in den Zellkern und die Einwirkung von NF $\kappa$ B auf die Transkription der Zielsequenzen. Dabei bindet es an DNA mit dem Konsensus-Motiv 5' – G G G R N N Y Y C C – 3' (R = Purin, Y = Pyrimidin, N = beliebig). Da unter anderem die Expression der NF $\kappa$ B-Untereinheiten [107] und von I $\kappa$ B [174] durch NF $\kappa$ B gesteigert wird, kommt es zusätzlich zur Expression der Zielgene zum Wiederauffüllen der zytoplasmatischen NF $\kappa$ B-Speicher.

Einen schematischen Überblick über den Mechanismus der Aktivierung von NF $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$  gibt Abbildung 3: Durch Bindung von TNF- $\alpha$  an TNF-R1 bildet sich ein Komplex aus drei TNF- $\alpha$ -Molekülen und drei Rezeptor-Molekülen (1). Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren weist keine eigene Proteinkinase-Aktivität auf. Er enthält jedoch eine „death domain“ (DD), an die weitere zytoplasmatische Adapterproteine binden (TRADD, TRAF2, RIP) [10]. Über die Proteinkinase-Aktivität dieses Komplexes wird NIK (NF $\kappa$ B inducing kinase) phosphoryliert und damit aktiviert (2). Diese wiederum aktiviert über Phosphorylierung IKK [148] (3), die das Protein I $\kappa$ B $\alpha$  an zwei Aminosäuren phosphoryliert [155]. Das so markierte I $\kappa$ B $\alpha$  wird auf dem Ubiquitin-Proteasom-Weg abgebaut, so dass die NLS von NF $\kappa$ B freigesetzt wird [6;134]

(5). Nach Translokation in den Nucleus bindet NFκB an seine Zielsequenzen und aktiviert ihre Transkription [187] (6).



**Abb. 3:** NFκB-Aktivierung durch TNF-α (modifiziert nach [128]). Arabische Ziffern beziehen sich auf die Erläuterung im Text.

## 5. Modell der isolierten ECL Zellen

Um das Apoptose-Verhalten von ECL-Zellen zu untersuchen, existieren zahlreiche experimentelle Ansätze. Daten über die Verhältnisse *in vivo* wurden beispielsweise durch Arbeiten am isolierten und perfundierten Magen, an isolierten Magendrüsen und an Mucosa-Streifen gewonnen [33]. Obwohl diese Methoden eine Beobachtung der Verhältnisse *in vivo* ermöglichen, bringen sie einige methodische Probleme mit sich: Bei jeder geschilderten Vorgehensweise sind die ECL-Zellen im Präparat den Auswirkungen zahlreicher neuronaler (z.B. sympathisches Nervensystem, PACAP), endokriner (z.B. Gastrin) und parakriner (z.B. Somatostatin aus D-Zellen) Reize ausgesetzt. Dabei liegen auch im unstimulierten Zustand bestimmte Spiegel von Hormonen, Zytokinen und anderen Botenstoffen vor, so dass eine Untersuchung des Ruhezustandes nicht durchgeführt werden kann. Hinzu kommt, dass aufgrund des geringen Anteils der ECL-Zellen im Präparat nur eingeschränkt generalisierbare Aussagen gewonnen werden können.

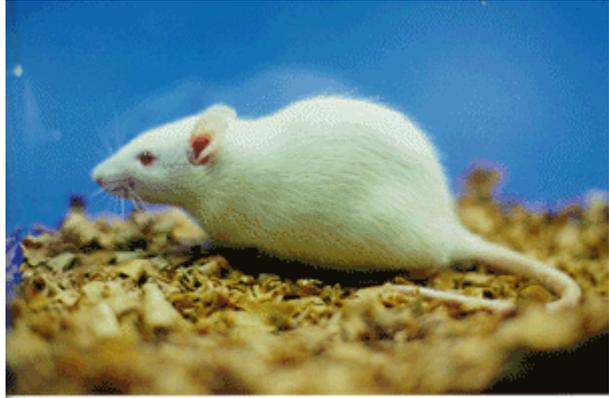
Gegen den Einsatz von Zelllinien im Kontext einer Studie über verändertes Apoptose-Verhalten im Hinblick auf die Aufklärung dysplasie- und neoplasie-induzierender Mechanismen spricht die Tatsache, dass als Zelllinie kultivierte Zellen die zu untersuchende Transformation bereits durchlaufen haben.

Die genannten Probleme können durch Anreicherung der ECL-Zellen in Primärkultur umgangen werden. Diese Methode wird unter anderem am Tiermodell der Ratte durchgeführt, weil der Anteil der ECL-Zellen am Magenvolumen bei dieser Spezies sehr hoch ist und im Rattenmagen keine anderen histaminhaltigen Zellen, etwa Mastzellen, zu finden sind [70;175]. Zusätzlich ähnelt die Verteilung der ECL-Zellen im Rattenmagen der im menschlichen Magen. Erste Versuche, ECL-Zellen der Ratte *in vitro* anzureichern, erreichten zunächst eine Erhöhung des Anteils auf maximal 16 % [24]. Durch die Kombination von Gegenstrom-Elutration und Dichtegradientenzentrifugation konnte 1993 durch Prinz et al. ein Anteil der ECL-Zellen von 65 % erreicht werden [139], durch Kurzzeitkultur gelang eine weitere Anreicherung auf über 90 % [142]. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode zur Gewinnung hoch angereicherter ECL-Zell-Präparationen aus dem Rattenmagen genutzt (siehe auch Material und Methoden, 2.1). So konnten die zu charakterisierenden Zellen in einem unstimulierten Zustand in hoher Reinheit untersucht werden.

## **6. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Im folgenden sollte untersucht werden, ob ECL-Zellen funktional bedeutsame Rezeptoren für die Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  exprimieren. Weiterhin sollten die Effekte von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  auf die Apoptose von ECL-Zellen geklärt und die ihnen zugrunde liegenden zellulären Mechanismen aufgedeckt werden. Alle Experimente wurden dabei am *in vitro* Modell der isolierten ECL-Zellen durchgeführt. Die gewonnenen Ergebnisse wurden in Hinblick auf ihre Relevanz für die Pathophysiologie der Helicobacter-assoziierten chronischen Gastritis und der Entstehung neuroendokriner Tumoren diskutiert.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass TNF- $\alpha$ , nicht aber IFN- $\gamma$  einen direkten Effekt auf ECL-Zellen des Magens ausübt, indem es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und so zur Induktion des programmierten Zelltodes führt. Dabei kommt es zur Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase, die von funktioneller Bedeutung für den pro-apoptotischen Effekt von TNF- $\alpha$  ist. Dieser kann durch bFGF antagonisiert werden.



**Abb. 4:** Sprague-Dawley Ratte  
National Laboratory Animal Centre, Mahidol University

## Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1 Versuchstiere

Für die Präparationen wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten (Abb. 4) mit einem Gewicht zwischen 150 g und 200 g der Firma Charles River, Sulzfeld, verwendet.

#### 1.2 Chemikalien

ABC-Kit	Vector Laboratories, Camon, Wiesbaden
Accudenz	Accurate Chemicals, New York, NY, USA
Acridine Orange Base	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid	Bio-Rad, München
Albumine Bovine Fraction V (BSA)	Sigma, Deisenhofen und Serva, Heidelberg
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma, Deisenhofen
APS	Bio-Rad, München
(N,N,-Methylene-)Bisacrylamid	Bio-Rad, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bouin-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Cell-Tak	Becton-Dickinson, Heidelberg
Cell death detection ELISA	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue	Bio-Rad, München

DAB substrate kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DMEM/F12	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Sigma, Deisenhofen und Bio-Rad, München
ECL-Kit	Amersham, Braunschweig
EDTA	Sigma, Deisenhofen und Merck, Darmstadt
Elektroden-Referenzlösung (4 M KCl, gesättigt mit AgCl)	Beckman Instruments, München
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Eggenstein
Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig
Entwickler	Kodak, Chalon-Sur-Saône, Frankreich
Fixierungslösung	Tetenal, Norderstedt
3,7 % Formalin in 1 % Phosphat-Puffer	Silbermann Analytics, Gablingen
37 % Formaldehyd (mit 10 % Methanol and Calciumcarbonat)	Merck, Darmstadt
Gentamycinsulfat-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Glutaraldehyd 25 %	Serva, Heidelberg
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Glycydether	Merck, Darmstadt
Hepes	Serva, Heidelberg
Hydrocortison	Sigma, Deisenhofen
<i>In situ</i> cell death detection kit (POD)	Roche, Mannheim
ITS	Sigma, Deisenhofen
Kaisers Glycerin-Gelatine	Dako, Hamburg
Magermilchpulver	Rapilait, Sulgen, Schweiz
Matrigel	Becton-Dickinson, Heidelberg
$\beta$ -Mercaptoethanol	Bio-Rad, Hamburg
N1-Supplement	Sigma, Deisenhofen
PhosphoPlus <sup>®</sup> biotinylierter Protein-Standard	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Pronase E (aus <i>Streptomyces griseus</i> )	Boehringer-Mannheim, Mannheim

Protein microassay	Bio-Rad, München
SDS	Bio-Rad, München
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin, HRP-markiert	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Temed	Bio-Rad, München
Triton-X-100	Bio-Rad, München
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Sigma, Deisenhofen
TRIS	AppliChem, Darmstadt
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate)	Sigma, Deisenhofen

Alle nicht genannten Chemikalien waren Substanzen hohen Reinheitsgrades und wurden von den Firmen Boehringer-Mannheim (Mannheim) bzw. Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### **1.3 Zytokine und Stimulantien**

Basic FGF (human)	R&D Systems, Wiesbaden
Gastrin I	Sigma, Deisenhofen
IFN- $\gamma$ (Ratte)	R&D Systems, Wiesbaden
L-NMMA	Calbiochem, Darmstadt
MG132 (Z-Leu-Leu-L-leucinal)	Bachem AG, Heidelberg
PSI (N-CBZ-Ile-Glu(o-t-butyl)-Ala-leucinal)	Sigma, Deisenhofen
TNF- $\alpha$ (human)	R&D Systems, Wiesbaden

### **1.4 Antikörper und Seren**

#### **Primärantikörper:**

Kaninchen anti HDC, polyklonal	Euro Diagnostica, Malmö, Schweden
Kaninchen anti IFN- $\gamma$ -R $\alpha$ -Kette	Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA
Kaninchen anti IFN- $\gamma$ -R $\beta$ -Kette	Research Diagnostics, Flanders, NJ, USA
Kaninchen anti I $\kappa$ B $\alpha$	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Kaninchen anti TNF-R1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Maus anti CD95	Transduction Laboratories, Hamburg
Maus anti TRAF2	Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA

### **Sekundärantikörper:**

Esel anti Kaninchen, Cy3-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Esel anti Kaninchen, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Esel anti Maus, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Esel anti Ziege, FITC-gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti Kaninchen F <sub>ab</sub> - Fragmente, FITC-gekoppelt	Jackson Immuno Research, Westgrove, PA, USA

Anti Biotin, HRP-gekoppelt	New England Biolabs, Beverly, MA, USA
Anti Kaninchen, HRP-gekoppelt	New England Biolabs, Beverly, MA, USA

### **Normalseren:**

Ziegenserum	Sigma, Deisenhofen
Eselserum	Dianova, Hamburg

### **1.5 Molekularbiologische Substanzen**

BioLadder™ 100	AGS, Heidelberg
CREB-Konsensussequenz	Stratagene, Cambridge, United Kingdom
Deoxynucleotid-Mix	Biometra, Göttingen
Gelshift assay kit	Stratagene, Cambridge, United Kingdom
HIV-NFκB-Konsensussequenz	Stratagene, Cambridge, United Kingdom
γ <sup>32</sup> P-ATP	Amersham Life Sciences, United Kingdom
Random Primer	Boehringer-Mannheim, Mannheim
5x Reaktionspuffer für Superscript	Gibco BRL, Grand Island, NY, USA
Superscript™ II	Gibco BRL, Grand Island, NY, USA
T4-Polynucleotidkinase	Roche, Mannheim
Taq-MasterMix Kit	Quiagen, Hilden
TRIZOL-Reagenz	Gibco BRL, Grand Island, NY, USA

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden alle verwendeten Oligonucleotide von MWG-Biotech, Ebersberg, synthetisiert.

### **1.6 Hilfsmittel**

Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
<i>Filter (Celluloseacetat-Membran)</i>	
Bottle Top Filter (Porengröße 0,22 µm)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Hamilton-Spritze (25 mL)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz
6-Loch-Kulturplatten	Becton-Dickinson, Heidelberg
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Nitrocellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonfilter (Porengröße 60 µm)	Nytal, München
Objektträger (Glas, Ø 24 mm)	Assistent, Schultheiß, München
Marker für Objektträger (PAP-Pen)	Science Services, München

### **1.7 Geräteausrüstung**

#### *Densitometrische Berechnung*

Videokamera (Zoom Lens S6X11-II 11, 5-69 m; 1-1,4)	MWG-Biotech, Japan Rainbow TV, Japan
---	---

#### *Elutriator*

J 2-21 M/E-Zentrifuge	Beckman Instruments, München
Elutriationsrotor JE 6 B	Beckman Instruments, Glenrothes, United Kingdom
Elutriationskammer (Standardkammer)	Beckman Instruments, München
Masterflex-Pumpe (Typ 7521 mit einem 7014 Pumpenkopf)	Cole Parmer Instruments Co., Chicago, Illinois, USA
ELISA-Reader	Bio-Rad, München
Gamma Counter 1470 Wizard	Wallac, Turku, Finnland

#### *Gelelektrophorese und Western Blot*

Mini-Protean II Kammer	Bio-Rad, München
Mini-Trans-Blot Kammer	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power PAC 300	Bio-Rad, München

Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Heizplatte	Medax Nagel, Kiel

### *Mikroskope*

Phasenkontrastmikroskop ID 03	Zeiss, Oberkochen
Lichtmikroskop Ortholux II mit NPL Fluotar Objektiven und Photoautomat MPS 55	Leica, Bensheim Leitz, Wetzlar Wild, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Axioplan mit Plan-Neofluar Objektiven und Filterset 09 und 15	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle M690	Miele, Gütersloh
pH-Meter (pH 537)	WTW, Weilheim
Refraktometer	Zeiss, Oberkochen
Schüttler Duomax 2030	Heidolph, Kelheim
Spektralphotometer (Modell 24)	Beckman Instruments, Irvine, CA, USA
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen

### *Ultraschall*

Branson Sonifier 250	Branson Schallkraft, Heusenstamm
Ultraschallprozessor UP 50H	Dr. Hielscher, Stahnsdorf, Berlin

### *Waagen*

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Laborwaage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Haake, Karlsruhe

### *Zentrifugen*

IEC 6000 B Zentrifuge	Nunc, Wiesbaden
Eppendorf Kühlzentrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Rotania AP	Hettich, Tuttlingen

Alle nicht aufgeführten Geräte waren Standardausrüstung und stammten von verschiedenen Herstellern.

## **1.8 Dokumentationsmaterial**

### *Autoradiographie*

ECL-Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Phosphor Screen	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA

### *Fluoreszenz*

Ektachrome 320 T	Kodak Comp., Rochester, NY, USA
Fujichrome 64 T	Fujii Photo Film, Düsseldorf

### *Lichtmikroskopie*

Fujichrome 64 T	Fujii Photo Film, Düsseldorf
-----------------	------------------------------

## **1.9 Computerprogramme**

### *Molekularbiologische Software*

Geneworks v2.3	GeneWorks, Intelligenetics, Inc., Mountain View, CA, USA
----------------	---

### *3D-Darstellung von Proteinstrukturen*

Cn3D v4.1	National Center of Biotechnology Information, USA; online unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml</a>
-----------	---

### *Auswertung der Experimente*

ImageQuaNT 4.2a	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Microplate Manager 2.0.2	Bio-Rad, München
ONE-Dscan v1.2	Scanalytics, Billerica, MA, USA

### *Statistikprogramme*

Sigma Plot 2.01	Jandel Scientific Software, Erkrath
SPSS 8.0	SPSS, Inc., Chicago, IL, USA

### *Graphische Verarbeitung*

Inkscape 0.42	<a href="http://www.inkscape.org">http://www.inkscape.org</a>
The Gimp 2.2.8	<a href="http://www.gimp.org">http://www.gimp.org</a>

*Datenbanken (WWW)*

PubMed Genomdatenbank	National Center of Biotechnology Information, USA; online unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>
PubMed Literaturdatenbank	National Center of Biotechnology Information, USA; online unter <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez</a>

*Bibliographie*

Reference Manager 8.01	ISI ResearchSoft, Carlsbad, CA, USA
------------------------	-------------------------------------

**2. Methoden*****2.1 Isolation und Kultivierung der ECL-Zellen******2.1.1 Lösungen***

Lösung A: 0,8 mM EDTA, 11 mM D(+)-Glucose, 5 mM KCl, 70 mM NaCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 % (w/v) BSA, 50 mM Hepes, pH (2 N KOH) 7,8

Lösung B: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM D(+)-Glucose, 5 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 70 mM NaCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0,5 % (w/v) BSA, 50 mM Hepes, pH (2 N KOH) 7,4

Regular Medium: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 11,1 mM D(+)-Glucose, 0,5 mM DTT, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 140 mM NaCl, 0,1 % (w/v) BSA, 10 mM Hepes, pH (2 N KOH) 7,4

Pronase-Lösung: 1,3 mg/mL Pronase in Lösung A

Nycodenz Stock: Accudenz mit 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % (w/v) BSA, 10 mM Hepes, pH (2N KOH) 7,4

RM mit hohem Albumingehalt: RM mit weiteren 3,6 g BSA

- 1:1 Solution      Nycodenz Stock und RM mit hohem Albumingehalt im Verhältnis 1:1 (Dichte 1,078 g/mL); Sterilfiltration mit Cellulose-Acetat-Filter (Porengröße 0,2 µm), danach Dichtemessung und -einstellung mit sterilen Stocklösungen
- 1:2 Solution      Nycodenz Stock und RM mit hohem Albumingehalt im Verhältnis 1:2 (Dichte 1,052 g/mL); Sterilfiltration mit Cellulose-Acetat-Filter (Porengröße 0,2 µm), danach Dichtemessung und -einstellung mit sterilen Stocklösungen

Formel zur Dichtebestimmung:

$$\rho = \text{optischer Index} \times 3,289 - 3,383$$

- KM mit FBS:      1,56 % (w/v) DMEM/F12, 5 % (v/v) FBS, 0,2 % (w/v) BSA, 5 mg/L Insulin, 5 mg/L Transferrin, 5 µg/L Sodium Selenite, 10 nM Hydrocortison, 1 pM Gastrin, 50 mg/L Gentamycin Sulfate Solution; pH (2 N KOH) 7,38
- KM mit N1-Supplement:      1,56 % (w/v) DMEM/F12, 0,2 % (w/v) BSA, 1 % (v/v) N1-Supplement (100x), 10 nM Hydrocortison, 1 pM Gastrin, 50 mg/L Gentamycinsulfat-Lösung; pH (2 N KOH) 7,38

### 2.1.2 Gewinnung der unfraktionierten Zellsuspension

Bis zum Abschluss der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 120 Präparationen durchgeführt, wobei pro Präparation fünf weibliche, nicht-nüchterne Sprague-Dawley Ratten im Alter von etwa 6 Wochen (150 – 200 g) verwendet wurden. Nach Anästhesie mittels CO<sub>2</sub>-Begasung erfolgte die Opferung der Tiere durch Genickbruch. Wie gesetzlich vorgeschrieben, waren die Tiertötungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei der Regierung von Oberbayern, München, angemeldet. Alle Tötungen wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt.

Das Abdomen der Ratten wurde in der Medianlinie eröffnet, Ösophagus und Antrum ligiert. Die Präparation der Mägen erfolgte nach der "everted-sack method" [140;142]: Der entnommene Magen wurde im Fornixbereich eröffnet und mit Hilfe einer Pipette so umgestülpt, dass die Magenmucosa nach außen zu liegen kam. Die

folgende Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung diente dazu, Reste des Mageninhalts zu entfernen. Durch anschließendes Abbinden an der Corpus-Fornix-Grenze entstand ein invertierter Magensack. In jeden Magen wurden 3 mL Pronase-Lösung eingespritzt, die zur enzymatischen Andauung der Magenserosa diente. Bei 37 °C und Begasung mit Sauerstoff folgten 35 min Inkubation in Lösung A, 10 min Inkubation in Lösung B und weitere 30 min in Lösung A. Das in Lösung A enthaltene EDTA diente als Chelator für vorhandene  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und trug so zur Auflösung von interzellulären Verbindungen bei.

Zur Gewinnung einer unfraktionierten Zellsuspension wurden die Mägen in etwa 60 mL der Lösung B aufgenommen. Nach 8 min mechanischem Rühren wurde die Lösung durch ein Nylonnetz (Porengröße 60  $\mu\text{m}$ ) filtriert, um grobe Gewebestücke zu entfernen. Die Zellsuspension wurde mit RM auf 100 mL aufgefüllt, 3 min bei 175 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 mL RM resuspendiert. Um die Zellausbeute zu erhöhen, wurden die Mägen ohne Begasung weitere 20 min bei RT inkubiert. Beim dritten Mal wurden die Mägen 10 min mechanisch gerührt, ansonsten erfolgte die Gewinnung der Zellen wie beschrieben.

### *2.1.3 Anreicherung der ECL-Zellen*

Die erhaltene unfraktionierte Suspension aus Mucosazellen (Fraktion 0, F0) wurde durch Gegenstromzentrifugation [115] in einem Elutriator ihrer Größe nach in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Dabei wird eine im Rotor integrierte kegelförmige Elutriationskammer entgegen der Zentrifugalkraft beständig von Elutriationsmedium (RM) durchflossen. Durch schrittweise Verlangsamung der Rotation bei gleichzeitiger Steigerung der Flussgeschwindigkeit werden Fraktionen von Zellen mit immer höherer Größe ausgeschwemmt. Die Elutriationskammer wurde bei 2.300 rpm und einer Flussgeschwindigkeit von 16 mL/min mit jeweils 10 mL F0 (ca.  $1 - 2 \times 10^8$  Zellen) beladen. Erythrocyten, Zellfragmente und sehr kleine Mucosazellen werden schon bei dieser Flussrate ausgeschwemmt. Anschließend wurden bei 2.000 rpm insgesamt fünf unterschiedliche Fraktionen (F1 bis F5) gesammelt. F1 (20 mL/min) und F2 enthielten vor allem D- und ECL-Zellen, F3 (29 mL/min) Schleim- und Parietalzellen. F4 und F5 (40 mL/min und 62 mL/min) enthielten neben Schleimzellen einen zunehmenden Anteil Parietalzellen. Für die Primärzellkultur wurden ECL-Zellen aus F2 verwendet. Diese wurden nach Sicht bei Flussgeschwindigkeiten zwischen 22 und 25 mL/min abhängig vom Füllungszustand der Elutriationskammer und der Trübung

der gewonnenen Lösung gesammelt. Die Zellen wurden für 3 min bei 175 g mit RM gewaschen und in sterilem KM resuspendiert.

Nach einer mindestens einstündigen Ruhezeit bei RT wurden die Zellen 5 min bei 114 g zentrifugiert und das Pellet in 7 mL sterilem RM aufgenommen. In ein steriles Reaktionsgefäß wurden auf 6 mL 1:1 Solution langsam 7 mL 1:2 Solution pipettiert, so dass sich zwei klar getrennte Phasen bildeten. Als dritte Phase wurden genau so langsam die 7 mL Zellsuspension hinzupipettiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 209 g konnten die angereicherten ECL-Zellen mit einer sterilen Mikropipette aus der Zone zwischen RM und 1:2 Solution abgenommen werden. Nach nochmaligem Waschen in sterilem Kulturmedium (5 min bei 114 g, Anlauf- und Bremszeit jeweils 3 min) wurde das Pellet in 1 mL sterilem KM aufgenommen. Es folgte die lichtmikroskopische Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen von 4 x 4 Quadraten einer Neubauer-Zählkammer.

Um die Anreicherung der ECL-Zellen an den frisch isolierten Zellen zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit 10 µM Acridin-Orange in KM inkubiert. Acridin-Orange ist ein pH-sensitiver Fluoreszenzfarbstoff, der sich in den saueren histaminhaltigen Granula der ECL-Zellen anreichert [59;139], wobei ein Farbumschlag nach grün zu beobachten ist. Fluoreszenzmikroskopisch (Anregungsfilter bei 480 nm, Emissionsfilter bei 520 nm) konnte das charakteristische Aussehen der ECL-Zellen in jedem Versuch bei 80 % bis 90 % der Zellen festgestellt werden. Eine weitere Überprüfung der ECL-Zell-Anreicherung erfolgte nach 24 h Kultur bei 37 °C mittels Anfärbung des Markerenzym HDC [95]. Der Anteil der ECL-Zellen nach 24 h betrug in jedem Experiment mindestens 90 %.

#### *2.1.4 Kultivierung der ECL-Zellen*

Für alle Versuche wurde KM mit FBS verwendet. Lediglich bei Experimenten zu bFGF wurden die Zellen in KM mit N1-Supplement kultiviert, um einen Einfluss des im FBS enthaltenen bFGF auszuschließen. Alle benötigten 6-Loch-Platten und OT wurden an jedem Präparationstag frisch vorbereitet.

Die Beschichtung der 6-Loch-Platten erfolgte steril mit je 35 µL Matrigel (1:5 verdünnt mit sterilem H<sub>2</sub>O) auf Eis. Vor der Verwendung konnten die Platten für mindestens 1 h bei RT trocknen. Nach der Zellzählung wurde je 1 mL der auf eine Konzentration von 2 – 3 x 10<sup>4</sup> Zellen/mL eingestellten Zellsuspension in jede Vertiefung gegeben.

Die so beschickten Platten wurden in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

Für Immunocytochemie und TUNEL-Tests mussten die ECL-Zellen auf OT anwachsen. Diese wurden durch zweimaliges Eintauchen in 96 % Ethanol und anschließendes Abflammen sterilisiert, in sterile 6-Loch-Platten gelegt und mit je 15 µL Cell-Tak (1:2 verdünnt mit 0,5 M NaHCO<sub>3</sub>) beschichtet. Danach konnten die OT mindestens 1 h bei RT trocknen. Je 1 mL Zellsuspension mit 4 – 5 x 10<sup>4</sup> ECL-Zellen wurde pro OT eingesetzt, die Kultivierung der 6-Loch-Platten erfolgte wie beschrieben.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### *2.2.1 Gewinnung von cDNA*

Für RT-PCR mit RNA aus unstimulierten ECL-Zellen stand aus früheren Arbeiten eine cDNA-Bibliothek zur Verfügung. Sie war wie beschrieben [141] aus der RNA von 2 x 10<sup>7</sup> ECL-Zellen aus insgesamt 20 Präparationen hergestellt worden. Für alle anderen Experimente wurde die RNA mit Hilfe der TRIZOL-Methode frisch gewonnen und in cDNA umgeschrieben.

#### 2.2.1.1 Lösungen

5x Reaktionspuffer 250 mM Tris, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,3

DTT 0,1 M DTT

Deoxynucleotid-Mix 10 mM dATP, 10 mM dTTP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP

Random Primer 0,02 A<sub>260</sub> Einheiten/µL Random Primer (dN)<sub>6</sub>

Reverse Transkriptase 200 Einheiten/µL Superscript™ II

50x TAE-Puffer 2,0 M Tris, 1,0 M Eisessig, 0,1 M EDTA, H<sub>2</sub>O ad 1L, pH 8,5

6x Probenauftragspuffer 25 % Ficoll 400, 50 mM EDTA, 0,25 % Bromphenolblau,  
0,25 % Xylencyanol

Ethidiumbromid 10 mg/mL Ethidiumbromid

#### 2.2.1.2 RNA-Isolation

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation dienten Gewebeproben oder in 6-Loch-Platten kultivierte ECL-Zellen. Gewebeproben wurden sofort nach der Entnahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren, in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 mL

TRIZOL aufgenommen. Die Zellen wurden mit je 1 mL TRIZOL pro Loch von der Platte gelöst. Nach der Aufnahme in TRIZOL konnte das Material bis zur weiteren Verwertung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zur Weiterverarbeitung wurde das Material kurz abzentrifugiert, in 1 mL TRIZOL resuspendiert und in ein 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  eisgekühlten Chloroforms wurde das Reaktionsgefäß etwa 15 sec mit der Hand geschüttelt und für 15 – 30 min auf Eis gestellt, bis sich zwei Phasen gebildet hatten. Die Proben wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 15.000 rpm abzentrifugiert. Vorsichtig wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zusammen mit 500  $\mu\text{L}$  Isopropylalkohol für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 45 – 60 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 15.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet zweimal mit je 1 mL 75 % Ethanol resuspendiert und 30 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 15.000 rpm zentrifugiert. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet luftgetrocknet und in 15  $\mu\text{L}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Bis zur weiteren Verwendung konnte die RNA bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Zur Bestimmung der RNA-Ausbeute wurde ein Aliquot von 1  $\mu\text{L}$  1:10 verdünnt und mit dem Spektralphotometer vermessen. Dabei errechnet sich die Konzentration wie folgt aus der optischen Dichte bei  $\lambda = 260\text{ nm}$ :

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260\text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Ausgleichsfaktor.}$$

Bei der Vermessung von RNA-Konzentrationen musste ein Ausgleichsfaktor von 40 verwendet werden.

### 2.2.1.3 Reverse Transkription

Um eine PCR durchführen zu können, muss die gewonnene RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dazu wurde die reverse Transkriptase AMV verwendet. Ausgehend von einem Random Primer mit unspezifischer Sequenz, der sich an der RNA anlagert, synthetisiert sie einen komplementären DNA-Strang. Danach wird der verbliebene RNA-Strang ebenfalls durch DNA ersetzt.

Zur Durchführung der reversen Transkription wurden 11  $\mu\text{L}$  RNA mit 1  $\mu\text{L}$  Random Primer in 1:4-Verdünnung versetzt. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurde ein Tropfen Mineralöl zugegeben. Es folgten 10 min Inkubation bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , anschließend wurde der Ansatz bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Während der Inkubation bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde ein zweiter Ansatz mit 4  $\mu\text{L}$  5x Reaktionspuffer, 2  $\mu\text{L}$  0,1 M DTT,

1 µL 10 mM dNTP-Mix und 1 µL Superscript™ II hergestellt. Dieser wurde unter die Ölschicht zum ersten Reaktionsgemisch pipettiert.

Die eigentliche reverse Transkription fand im Thermocycler statt: Dort wurde das Reaktionsgemisch 10 min bei 25 °C, 50 min bei 42 °C und 15 min bei 70 °C gehalten und anschließend auf 4 °C gekühlt. Die so gewonnene cDNA konnte bei – 20 °C mehrere Monate gelagert werden.

## 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

### 2.2.2.1 Funktionsprinzip der (RT-)PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion dient zur starken Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Abschnittes mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Ausgangsmaterial ist doppelsträngige (c)DNA. Sie wird bei 94 °C denaturiert, um die einzelnen Stränge zugänglich zu machen. Als Startpunkt der Amplifikation dienen Primer (ODN), die sich bei einer definierten, vom G/C-Anteil des ODN abhängigen Temperatur gezielt am 5'-Ende des gewünschten DNA-Fragmentes bzw. am 3'-Ende des Komplementärstranges anlagern (Annealing). Ausgehend von den Primern erfolgt in 5'-3'-Richtung die DNA-Synthese (Extension). Dieser Prozess lässt sich mehrmals wiederholen und führt unter optimalen Bedingungen zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten DNA-Sequenz.

### 2.2.2.2 Konstruktion der Primer

Die für das jeweilige PCR-Produkt passenden Primer wurden mit Hilfe der Datenbank des NCBI sowie der Software „Geneworks“ konstruiert. Die Primer für den Nachweis von TNF-R2 [5], CD95 [92], IFN-γ-R α-Kette [127] und GAPDH [112] wurden den zitierten Publikationen entnommen. In jedem Fall waren die Primer so gewählt, dass die amplifizierte Sequenz mindestens ein Intron überspannte. So war es möglich, über die unterschiedliche Produktgröße eine eventuelle Amplifikation von genomischer DNA zu erkennen. Soweit die Annealing-Temperaturen nicht den entsprechenden Publikationen entnommen werden konnten, wurde für jeden Primer eine passende Temperatur  $T_M$  nach folgender Formel bestimmt:

$$T_M = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\text{GC-Gehalt in \%}) - (650 / \text{Primerlänge})$$

Anschließend wurden eine den Temperaturen beider Primer möglichst nahe gelegene Annealingtemperatur gewählt und die PCR-Bedingungen optimiert. Die für die jeweilige PCR verwendeten Werte lassen sich Tabelle 2 entnehmen.

Produkt	Primer-Sequenz (sense/antisense)	Position	Temp.	Größe
TNF-R1	5'– aac ccc ggc ttc aac ccc act ctg –3'	1.069 – 1.092	63 °C	467 bp
	5'– caa agc acg cgg ccc act acg –3'	1.535 – 1.515		
TNF-R2	5'– gat gag aaa tcc cag gat gca gta gg –3'	1 – 26	60 °C	256 bp
	5'– tgc tac aga cgt tca cga tgc agg –3'	256 – 234		
CD95	5'– caa ggg act gat agc atc ttt gag g –3'	119 – 143	63 °C	141 bp
	5'– gtc ctt aac ttt tcg ttc acc agg –3'	259 – 236		
IFN- $\gamma$ -R $\alpha$ -Kette	5'– ggt tgg aca aaa aga atc tga cta tgc –3'	434 – 460	60 °C	570 bp
	5'– gca ctt ttt acc aca gag agc aag gac –3'	1.003 – 977		
GAPDH	5'– tga agg tcg gtg tca acg gat ttg gc –3'	35 – 60	56 °C	983 bp
	5'– cat gta ggc cat gag gtc cac cac –3'	1.017 – 994		
iNOS	5'– gaa aga act cgg gca tac ct –3'	1.848 – 1.867	56 °C	555 bp
	5'– ggc gaa gaa caa tcc aca ac –3'	2.383 – 2.402		

**Tab. 2:** RT-PCR Parameter. Die angegebenen Positionswerte der Primer beziehen sich auf die GenBank-Sequenzen NM\_013091 (TNF-R1), U55849 (TNF-R2), D26112 (CD95), NM\_010511 (IFN- $\gamma$ -R  $\alpha$ -Kette), NM\_017008 (GAPDH) und NM\_012611 (iNOS).

### 2.2.2.3 Durchführung

Zur Amplifikation wurde das Taq-MasterMix Kit von Quiagen verwendet. 12,5  $\mu$ L MasterMix, 9,0  $\mu$ L steriles H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ L Sense-Primer (20 pM), 0,5  $\mu$ L Antisense-Primer (20 pM) und 2,5  $\mu$ L cDNA wurden auf Eis in ein 0,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Bei der CD95-PCR kam ein modifizierter Ansatz mit 12,5  $\mu$ L MasterMix, 8,5  $\mu$ L sterilem H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ L Sense-Primer (20 pM), 0,5  $\mu$ L Antisense-Primer (20 pM), 2,5  $\mu$ L cDNA und zusätzlichen 0,5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM) zum Einsatz. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler.

Dieser wurde auf eine Temperatur von 94 °C erhitzt, bevor die Reaktionsgefäße direkt vom Eis in den Thermoblock gestellt wurden ("hot start"-Verfahren). Danach kam folgendes Programm zum Einsatz: Der erste Zyklus bestand aus 5 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing und 1 min Extension bei 72 °C. Danach folgten 30 (bei der iNOS-PCR 27) Zyklen mit jeweils 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing und 1 min Extension bei 72 °C. Zuletzt folgte ein Zyklus, der aus 1 min Denaturierung bei 94 °C, 1 min Annealing und 7 min Extension bei 72 °C bestand. Die längere Extensionsdauer sollte sicherstellen, dass alle begonnenen PCR-Produkte fertig amplifiziert werden konnten. Das Annealing fand bei der in Tabelle 2 angegebenen Temperatur statt. Abschließend wurde der Thermoblock auf 4 °C gekühlt.

Um auch bei RT-PCRs, bei denen kein Produkt im Ansatz nachgewiesen werden konnte, die Funktionalität der cDNA sicherzustellen, wurde parallel zum eigentlichen Ansatz immer auch das "housekeeping gene" GAPDH amplifiziert.

#### 2.2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung und Auswertung

Zur Auftrennung der PCR-Produkte kam eine Gelelektrophorese mit 2-prozentigen Agarose-Gelen zum Einsatz. Die optimale Agarosekonzentration ist dabei direkt von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente abhängig. Die verwendete Konzentration von 2 % ist für Fragmente von 200 bp – 1.000 bp geeignet. 2 g Agarose pro 100 mL 1x TAE-Puffer wurden in der Mikrowelle aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Das Gemisch wurde auf 40 °C gekühlt und mit 2,5 µL Ethidiumbromid pro 100 mL Gesamtvolumen versetzt. Alle folgenden Schritte fanden in Sicherheitswanen statt, um Verunreinigung der Arbeitsplätze mit Ethidiumbromid zu verhindern. Rühren auf einem Magnetrührer diente dazu, störende Luftblasen zu entfernen. Anschließend wurden in einem Gießstand die Gele hergestellt. Der eingesetzte Kamm diente dazu, Taschen zum Auftragen der Proben auszusparen.

Die Elektrophorese fand in einem horizontalen Elektrophorese-System der Firma Bio-Rad statt. Dieses wurde mit 1x TAE-Puffer befüllt und das verfestigte Gel eingesetzt. Anschließend wurden die Proben etwa im Verhältnis 1:6 mit 6x Probenauftragspuffer vermischt, und das Gel mit ihnen geladen. Zusätzlich wurde der Längenstandard BioLadder™ aufgetragen, der Fragmente von 100 bp – 1.000 bp in Schritten von 100 bp enthält. Die Elektrophorese fand bei 50 – 70 V statt, bis die Auftrennung der Proben genügend stark war. Der Fortschritt der Elektrophorese konnte dabei durch die Farbmarker im Probenauftragspuffer direkt verfolgt werden.

Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert mit DNA-Molekülen und leuchtet unter UV-Bestrahlung ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ). Unter einem Transilluminator war so die Detektion und Fotodokumentation der DNA-Banden möglich. Eine Größenbestimmung der Fragmente war mit Hilfe einer Eichkurve möglich. Da die Laufgeschwindigkeit der aufgetragenen Proben direkt proportional dem dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts ist, ließ sich dieses aus den Banden des aufgetragenen Längenstandards bestimmen.

### 2.2.3 EMSA

Direkt nach der Präparation wurden die ECL-Zellen für 1 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert und danach einer weitere Stunde dem Stimulans ausgesetzt. Pro Stimulans wurden mindestens  $7 \times 10^5$  Zellen eingesetzt. Während der Inkubation in 6-Loch-Platten waren sie von Krebs-Ringer-Lösung bedeckt und wurden destilliertem Wasser, dem für PSI verwendeten Lösungsmittel Methanol (Endverdünnung 1:100) oder dem spezifischen NF $\kappa$ B-Hemmstoff PSI (6 mM) ausgesetzt. Die Stimulation wurde mit Wasser (Kontrollprobe) oder 25 ng/mL hTNF- $\alpha$  ausgeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  vollzogen. Die Zellen wurden 10 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und in 50  $\mu\text{L}$  Bindungspuffer (10x konzentrierter Bindungspuffer enthielt 250 mM HEPES, 5 mM EDTA, 20 mM DTT, 40 % (v/v) Glycin and 1 M NaCl) resuspendiert. Mittels Schallwellenertrümmerung wurden Zell-Lysate hergestellt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Ein Aliquot von 5  $\mu\text{L}$  diente zur Proteinbestimmung (siehe auch 2.3.2.2).

Zur Durchführung des EMSA wurden 10  $\mu\text{g}$  Zellprotein in  $\text{H}_2\text{O}$  (ad 20  $\mu\text{L}$ ) und 1x konzentrierter Bindungspuffer 5 min bei RT mit 4  $\mu\text{g}$  poly[dl:dC] inkubiert. Ein Probengefäß ohne Protein wurde zusammen mit den Proben verarbeitet und diente als Negativkontrolle. 25 ng kalte (nicht radioaktiv markierte) ODN mit der CREB-Konsensussequenz bzw. der HIV-NF $\kappa$ B-Konsensussequenz wurden zugegeben und 20 min mit den Zell-Lysaten inkubiert (competition assay). Dabei liegen die nicht radioaktiv markierten Sequenzen in 50- bis 100-fachem Überschuss vor und verdrängen die radioaktiv markierten ODN, falls sie an den Transkriptionsfaktor binden können. Bei spezifischer Bindung gelingt dies nur bei Zugabe kalter ODN mit der Zielsequenz (HIV-NF $\kappa$ B-Konsensussequenz), im Falle einer unspezifischen Bindung auch bei Zugabe einer beliebigen anderen Sequenz (z. B. CREB-Konsensussequenz). Schließlich wurden jeder Probe 2  $\mu\text{L}$  mit  $^{32}\text{P}$ -markierten ODN (ca. 100.000 cpm, ra-

radioaktive Markierung mittels T4 Polynucleotid-Kinase) für weitere 20 min hinzugefügt. Die Proben wurden auf Eis gestellt, mit 2,2 µL Ladepuffer gemischt (10x konzentrierter Ladepuffer: 20 % Ficoll 400, 0,25 % Bromphenol-Blau) und auf ein 7-prozentiges Acrylamid-Gel (s. a. 2.3.2.3) geladen, das in 0,25 % Laufpuffer schwamm. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte fünf bis sieben Stunden bei RT. Nach Vervollendung des Gellaufes wurde das Acrylamid-Gel gewaschen, getrocknet und entweder zusammen mit einem Röntgenfilm (−70 °C, zwei bis fünf Tage) oder einem Phosphor-Schirm (−70 °C, etwa 24 h) inkubiert.

#### *2.2.4 Transfektion mit ODN*

Die Transfektion der ECL-Zellen wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt [149]. Antisense (AS) Oligodeoxynucleotide (ODN), die in ihrer Sequenz das Translations-Initiierungs-Codon enthielten, wurden nach den bekannten Sequenzdaten für die p65-Untereinheit des Transkriptionsfaktors NFκB [156], GenBank-Sequenz M62399, konstruiert (5′– ggg gaa cag ttc gtc cat ggc –3′). Missense (MS-) ODN enthielten die gleiche Menge der im AS-Konstrukt verwendeten Deoxynucleotide in zufälliger Reihenfolge (5′– ggg gcg atg agg cct act atc –3′) und dienten als Negativkontrolle. Die ODN wurden in einer mit Phosphothioat modifizierten Form durch die Firma MWG Biotech synthetisiert.

Für die Transfektions-Experimente wurden die ODN am 5′-Ende mit 6-FAM (6-Carbofluorescein) markiert. Nach der Zellpräparation wuchsen die ECL-Zellen wie beschrieben auf mit Cell-Tak beschichteten OT an ( $10^5$  Zellen/OT, 24 h bei 37 °C). Danach wurden die Zellen 5 h bei 37 °C mit KM inkubiert, das 10 µM der FAM-markierten AS- bzw. MS-ODN enthielt. Die Effizienz der Transfektion wurde mittels Fluoreszenz-Mikroskopie kontrolliert, wobei konstant mehr als 88 % der Zellen im Bereich des Nucleus die erwartete grüne Fluoreszenz-Färbung aufwiesen.

## **2.3 Immunologische Methoden**

### **2.3.1 Immunocytochemie**

#### **2.3.1.1 Lösungen**

Citratpuffer            0,1 M Citrat, 0,1 M Trinatriumdihydrat, H<sub>2</sub>O ad 200 mL

PBS                    0,386 g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, 1,282 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O, 8,776 g/L NaCl, pH (HCl) 7,4

Fixierungslösung DAB    9,5 mL Bouin-Lösung, 0,5 mL Eisessig

Blockierlösung A    10 % Methanol, 0,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS

#### **2.3.1.2 Färbungen für Lichtmikroskopie (DAB)**

Auf OT kultivierte Zellen (siehe auch 2.1.4) wurden für 15 min mit Bouin-Eisessig-Lösung fixiert und anschließend dreimal 5 min mit PBS gewaschen. Nach 30 min Inkubation mit 5 % fetalem Kälberserum (FBS) und dreimaligem Waschen mit PBS (3 min) erfolgte die Blockierung endogener Peroxidase-Aktivität durch 10-minütige Zugabe von Blockierlösung A. Daraufhin wurden die OT wieder dreimal für 3 min mit PBS gewaschen und 5 min mit 0,1 % Triton-X-100 permeabilisiert. Nach erneutem Waschen erfolgte ein zweiter Blockierungsschritt gemäß den Herstellerempfehlungen des „Avidin Blocking Kit“ (30 min 5 % Normalserum der Spezies des sekundären Antikörpers, Waschen in PBS, 30 min Avidin, Waschen in PBS, 30 min Biotin, Waschen in PBS). Danach wurden die OT über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die gewünschte Antikörper-Konzentration wurde durch Verdünnung in 2 % Normalserum der Spezies des sekundären Antikörpers erreicht. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte für 1 h die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Anschließend wurden die OT für 30 min bei RT nach Herstelleranweisung mit ABC-Komplex (Vecstatin Elite Kit) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe von 3,3-Diamino-Benzidin, das als Substrat für die Peroxidase diente. Die Farbreaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt und bei genügend starker Braunfärbung durch Zugabe von PBS gestoppt.

#### **2.3.1.3 Fluoreszenz-Färbungen**

Fluoreszenz-Färbungen wurden soweit möglich als Doppelfärbungen durchgeführt, wobei zusätzlich zu einem für das Zielprotein spezifischen Antikörper ein Antikörper gegen HDC (1:1.000) verwendet wurde.

Zur Verwendung kamen wie bei der DAB-Färbung auf OT kultivierte Zellen. Das Kulturmedium wurde entfernt und die Zellen mit einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton 10 min bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nachdem die Zellmembranen durch 5-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton-X-100 lysiert worden waren, wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert, indem für 1 h 10-prozentiges Normalserum zugegeben wurde, das von Tieren der selben Spezies gewonnen worden war, die auch die Sekundärantikörper lieferte. Die OT wurden daraufhin über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit einer Mischung der Primärantikörper inkubiert, danach für 1 h bei RT mit dem ersten Sekundärantikörper (Nachweis des für das jeweilige Protein spezifischen Antikörpers) und ebenfalls für 1 h mit dem zweiten Sekundärantikörper (Nachweis des HDC-Antikörpers, CY3-konjugierter Antikörper gegen Hasen-Antikörper, Donorspezies: Esel, 1:500). Alle Antikörper wurden mit 2 % Normalserum auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Für die Färbung mit Primärantikörpern, die aus Hasen gewonnen worden waren, wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet. In diesem Fall wurden die OT nach der Zugabe des ersten Primärantikörpers eine Stunde lang mit FITC-markierten  $F_{ab}$ -Fragmenten inkubiert. Danach folgten ein Blockierungsschritt (10 % Normalserum, 1 h bei RT), die Inkubation mit anti-HDC-Antikörpern bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht und schließlich wie beschrieben die Markierung mit CY3-Sekundärantikörpern.

Antikörper für die Immunocytochemie kamen in folgenden Konzentrationen zum Einsatz: TNF-Rezeptor Typ 1 (1:25), CD95 (1:100), IFN- $\gamma$ -R  $\alpha$ -Kette (1:20), IFN- $\gamma$ -R  $\beta$ -Kette (1:20). Alle FITC-markierten Sekundärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:50 verwendet.

### *2.3.2 SDS-PAGE und Western Blotting*

Der spezifische Nachweis von Proteinen wie TNF-R1, TRAF2 und I $\kappa$ B $\alpha$  gelang mit Hilfe von Western Blotting. Proteinproben werden dabei zuerst einer denaturierenden Elektrophorese auf Polyacrylamid-Gel unterworfen, die sie entsprechend ihrer Ladung und ihrem Molekulargewicht auftrennt. Anschließend werden sie an PVDF-Membranen adsorbiert und mit Primärantikörpern gegen das zu bestimmende Protein inkubiert. Nach der Zugabe von mit Biotin markierten Sekundärantikörpern und HRP-konjugierten Antikörpern gegen Biotin erfolgt die Detektion in einer „enhanced chemiluminescence“-Reaktion.

### 2.3.2.1 Lösungen

L-CAM Puffer Stammlösung: 5 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 M CaCl<sub>2</sub>, 1 M Hepes in H<sub>2</sub>O, pH 7,4

1 x L-CAM Puffer: 1 mL Stammlösung, 100 µL Triton-X-100, 100 µL PMSF (0,5 mM), 8,8 mL H<sub>2</sub>O

Acrylamid: 30 % T, 2,6 % C als fertig eingewogene Mischung, gelöst in MilliQ

SDS: 10-prozentige Lösung in Aqua dest.

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) in Aqua dest.

Sammelgelpuffer: 1,0 M Tris/HCl (pH 6,6) in Aqua dest.

APS: Ammoniumpersulfat 10 % in Aqua dest.

4x Probenpuffer: 1,5 M Dithiothreitol, 6 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (w/v) Glycerol, pH (Tris) 6,8

Elektrophoresepuffer: 0,25 M Tris, 10 % (w/v) SDS, 1,92 M Glycin, ohne pH-Einstellung (pH ca. 8,8)

Transferpuffer (hochmolekulare Proteine): 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % Methanol, 0,037 % SDS, Aqua dest.

Transferpuffer (niedermolekulare Proteine): 25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 % Methanol, Aqua dest.

TBS-Puffer: 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl

TBST-Puffer: 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 % Tween 20

Blocking-Reagenz: TBST-Puffer + 5 % Magermilchpulver

Trenngel-Lösung 4,85 mL H<sub>2</sub>O dest., 2,5 mL 1,5 M Tris (pH 8,8), 2,5 mL Acrylamid, 100 µL SDS, 50 µL Ammonium-Peroxysulfat, 5 µL TEMED (7,5 % Polyacrylamid-Gel)

Sammelgel-Lösung 2,8 mL H<sub>2</sub>O dest., 500 µL 1,0 M Tris (pH 6,8), 660 µL Acrylamid, 40 µL SDS, 40 µL Ammonium-Peroxysulfat, 4 µL TEMED (3 % Polyacrylamid-Gel)

Coomassie-Färbelösung: 1,5 g Coomassie Brilliant Blue, 455 mL Methanol, 80 mL Eisessig, Aqua dest. ad 1L

Entfärbelösung: 250 mL Methanol, 350 mL Eisessig, Aqua dest. ad 5 L

### 2.3.2.2 Proteingewinnung und Probenvorbereitung

Die Zellpräparation wurde bis zur Separation mittels Dichtegradienten wie beschrieben durchgeführt. Danach wurden die isolierten ECL-Zellen in Kulturmedium mit FBS-Supplement aufgenommen und gewaschen. Für 5 bzw. 10 min wurden die Zellen danach mit H<sub>2</sub>O oder 25 ng/mL TNF- $\alpha$  stimuliert und danach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Proteinextrakte der ganzen Zellen hergestellt. Dazu wurden sie nochmals in PBS gewaschen, gezählt und danach 10 min lang bei 4 °C und 14.000 rpm zentrifugiert. Die Resuspension erfolgte in 40  $\mu$ L L-CAM Puffer. Die so lysierten Zellen wurden 1 h auf Eis gestellt und dann mittels Schallstößen aufgeschlossen. Bis zur Weiterverarbeitung konnten die so gewonnenen Extrakte bei -20 °C aufbewahrt werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Assay (BioRad Laboratories), der auf einer von Bradford et al. entwickelten Methode beruht [23]. Dabei macht man sich zu Nutze, dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue bei Proteinbindung von  $\lambda = 465$  nm zu  $\lambda = 595$  nm verschiebt. Aus mitgeliefertem Proteinstandard wurde in 1:100 Lysispuffer eine Verdünnungsreihe hergestellt, mit deren Hilfe eine Eichkurve erstellt werden konnte. Die Proben wurden in eine Microtiterplatte pipettiert und mit Hilfe eines Lesegerätes (Microplate Reader) bei  $\lambda = 595$  nm vermessen. Aus 10<sup>6</sup> Zellen ließen sich etwa 200  $\mu$ g Protein gewinnen.

### 2.3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurde die Mini-Protean II Elektrophoreseeinheit der Firma BioRad eingesetzt. Zunächst wurde entsprechend der Herstelleranleitung der Gießstand zusammengesetzt. Der freie Raum zwischen den Glasplatten, die als Begrenzung für das Gel dienten, wurde sodann bis etwa 2 cm unterhalb der oberen Begrenzung mit Trenngel-Lösung aufgefüllt. Um einen horizontalen und glatten oberen Gelrand sicherzustellen, wurde die Lösung bis zum Auspolymerisieren mit 70 % Ethanol überschichtet. Danach wurde der Alkohol abgegossen, der freigebiebene Raum zwischen den Glasplatten mit Sammelgel-Lösung befüllt und ein Kunststoffkamm für die Probenfächer eingesetzt. Die so vorbereiteten SDS-Gele wurden feucht gehalten und bis zur Weiterverwendung bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde die Elektrophorese-Kammer montiert und mit 1x Elektrophorese-Puffer gefüllt. Nach Entfernung des Kunststoff-

kammes wurden Luftblasen aus den Probenaschen entfernt und diese nochmals mit Elektrophoresepuffer gespült. Je 20 bis 40 µg Protein pro Probe wurden pro Gellauf verarbeitet. Dabei wurde von jeder Probe die gleiche Menge Protein mit Probenauftragungspuffer versetzt, abzentrifugiert und im Heizblock 3 min gekocht. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurden die Proben zusammen mit einem vorgefärbten Standard zum Ablesen des Molekulargewichts in die einzelnen Geltaschen gefüllt.

Protein	SDS-Gel	Blotting	Primärantikörper	Sekundärantikörper
TNF-R1	10 %	1,5 h bei 200 mA	1:800	1:1.500
TRAF2	12 %	0,75 h bei 200 mA	1:1.000	1:1.500
IκBα	12 %	1 h bei 200 mA	1:500	1:2.000

**Tab. 3:** Nachweis der Proteine von TNF-R1, TRAF und IκBα durch Western Blotting. Für jedes Protein sind der für das Trenngel verwendete SDS-Anteil, Blotting-Bedingungen und die Antikörperkonzentrationen angegeben.

An die Apparatur wurde eine Spannung von 150 V bis 200 V angelegt und der Gellauf bei den in Tabelle 3 angegebenen Bedingungen durchgeführt, bis die durch Bromphenolblau markierte Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war.

#### 2.3.2.4 Western Blotting

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamid-Gel aus der Apparatur entfernt und kurz in Methanol geschwenkt, anschließend wurde es wie die PVDF-Membran und die für das Blotting benötigten Filterpapiere und Fiberpads 15 min in Transferpuffer aufbewahrt. Sodann wurde die Gelhalterung montiert: Dabei wurden von der Anodenseite her gesehen je einmal Fiberpad, Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, Filterpapier und Fiberpad übereinander gelagert. Gelhalterung, Elektrodenmodul und eine Kühleinheit wurden anleitungsgemäß in den Elektrophorese-Tank eingesetzt und dieser mit Transferpuffer befüllt. Für das Blotting verwendete Dauer und Stromstärke sind in Tabelle 3 angegeben.

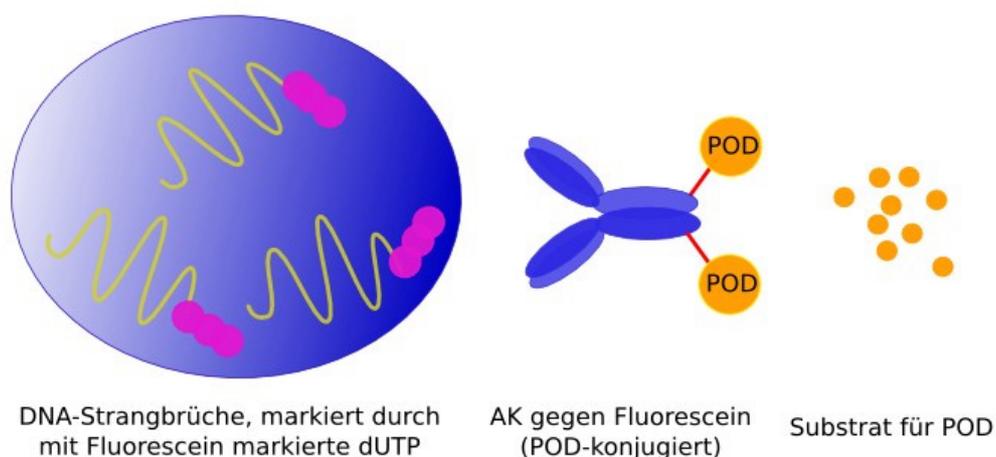
Um die Vollständigkeit des Blottens zu überprüfen, wurde nach Abschluss des Vorgangs das Polyacrylamid-Gel auf einem Schüttler mit Coomassie-Färbelösung inkubiert. Beim anschließenden Auswaschen des Farbstoffes mit Hilfe der Entfärb-

lösung blieb nicht geblottetes Protein als blau gefärbte Bande im Gel sichtbar. Bei unvollständiger Übertragung der Proteine war hinsichtlich der betroffenen Proben keine Auswertung möglich.

Bei vollständigem Blotting wurden die PVDF-Membran weiter verarbeitet. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 2 h in 10 % Magermilchpulver, das in TRIS-gepufferter Salzlösung mit 0,5 % (v/v) Tween 20 (TBST) gelöst war. Danach wurden die Membranen bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1 h bei RT, die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 3 angegeben). Mittels des ECL- („enhanced chemiluminescence“) Systems wurden schließlich die mit Antikörpern markierten Banden detektiert. Dabei katalysiert Meerrettich-Peroxidase die Oxidation von Luminol, bei der Licht emittiert wird. Dieses schwärzt Röntgenfilme, die für 15 Sekunden, eine, drei und fünf Minuten auf die Membran aufgelegt und anschließend entwickelt wurden.

### 2.3.3 *In situ cell death detection kit (POD)*

Zur Detektion der Apoptose-Rate der ECL-Zellen wurde als einer von zwei Tests der „*in situ cell death detection kit*“ der Firma Roche verwendet, dessen Nachweismethode auf der TUNEL-Reaktion basiert. Dabei werden DNA-Strangbrüche detektiert, die im Zuge der Apoptose auftreten (Abbildung 5):



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der TUNEL-Reaktion (modifiziert nach [153])

Mittels eines Enzyms, der terminalen Deoxynucleotid-Transferase (TdT) werden mit Fluorescein markierte dUTP-Moleküle an die 3'-Enden der DNA gebunden. Dieser Vorgang, das „TdT-mediated dUTP nick end labeling“ (durch TdT vermitteltes Markieren freier DNA-Enden mit dUTP-Molekülen) wurde zum Namensgeber der TUNEL-Reaktion. Um die Sensitivität des Nachweisverfahrens zu erhöhen, wurden nicht die Fluorescein-markierten Zellen ausgezählt, sondern weitere Verarbeitungsschritte angeschlossen. Mit Meerrettich-Peroxidase konjugierte Antikörper gegen Fluorescein wurden zugegeben und katalysierten die Umwandlung eines löslichen Substrates in unlöslichen Farbstoff. So können unter dem Lichtmikroskop Zellen mit DNA-Strangbrüchen identifiziert werden.

#### 2.3.3.1 Lösungen

Blockierungslösung: 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 49,5 mL Methanol

Lysierungslösung: 0,1 g Natriumcitrat, 0,1 mL Triton-X-100, H<sub>2</sub>O ad 100 mL

Tris-Puffer            1,21 g Tris, 0,58 g NaCl, H<sub>2</sub>O ad 100 mL; pH 7,5 mit konzentrierter HCl, 1 g Magermilchpulver

Fixierungslösung: 9,5 mL Bouin-Lösung, 0,5 mL Eisessig

#### 2.3.3.2 Probenvorbereitung

Nach der Präparation wurden die Zellen wie beschrieben für 24 h auf mit KM bedeckten OT im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das KM gegen neues, mit dem jeweiligen Stimulans bzw. H<sub>2</sub>O supplementiertes KM ausgetauscht und die Zellen weitere 24, 48 oder 72 h im Brutschrank aufbewahrt. In den Inhibitions-Experimenten mit den spezifischen NFκB-Hemmstoffen PSI (6 mM) und MG132 (5 mM) wurden die ECL-Zellen für eine Stunde mit H<sub>2</sub>O, Methanol (1:100) oder dem jeweiligen Hemmstoff vorbehandelt und anschließend das Zytokin zugegeben. Die Stimulation wurde in allen Fällen durch 15-minütige Fixierung in Bouin-Lösung beendet.

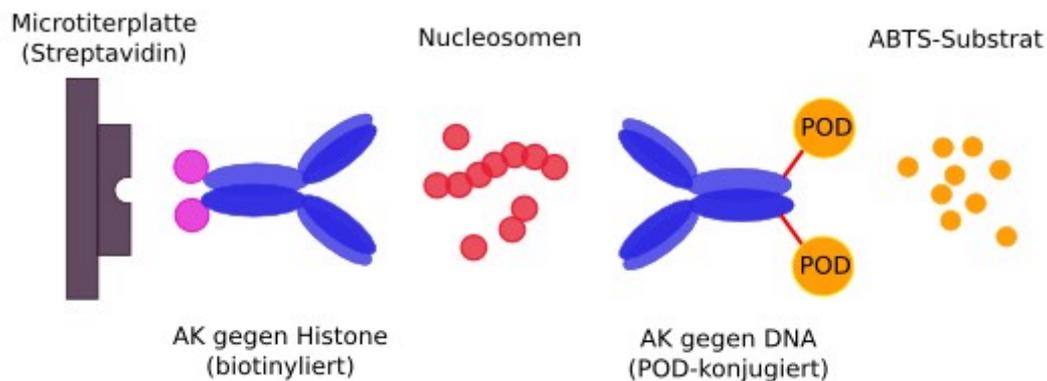
#### 2.3.3.3 Durchführung und Auswertung

Die Zellen wurden wie vom Hersteller empfohlen lysiert und weiterverarbeitet, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und endogene Peroxidase-Aktivität zu unterdrücken. Anschließend wurden die Proben mit biotinylierten Deoxynucleotiden inkubiert, so dass die durch Apoptose hervorgerufenen Brüche der DNA-Doppelhelix mittels der terminalen Transferase markiert werden konnten. Eine Peroxidase-

Reaktion diente zur Färbung der mit Biotin markierten Brüche, um anschließend eine quantitative Auswertung mittels Lichtmikroskopie durchführen zu können. Dafür wurden Gesichtsfelder mit mehr als 100 Zellen ausgezählt und der Prozentsatz apoptotischer Zellen durch Division der positiv gefärbten Zellen durch die Gesamtzellzahl errechnet.

### 2.3.4 Cell death detection ELISA

Als zweiter Apoptose-Test wurde ein ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) der Firma Roche verwendet. Im Zuge der Apoptose entstehen durch die DNA-Fragmentierung Mono- und Oligonucleosomen. Diese bestehen aus DNA-Bruchstücken, die an Histon-Moleküle gebunden sind.



**Abb. 6:** Funktionsprinzip des „Cell death detection ELISA“ (modifiziert nach [184])

Die für den „Cell death detection ELISA“ verwendete Microtiterplatte ist mit Streptavidin vorbeschichtet (vgl. Abb. 6). Ein erster Antikörper, der gegen Histon-Moleküle gerichtet und mit Biotin-Molekülen verbunden ist, wird zugegeben und aufgrund der starken Streptavidin-Biotin-Bindung fest auf der Microtiterplatte verankert. Nach Zugabe der Probe bindet er an die Histon-Moleküle der enthaltenen Mono- und Oligonucleosomen. Mittels eines zweiten Antikörpers, der gegen DNA gerichtet und an den das Enzym Meerrettich-Peroxidase gebunden ist, werden die an die Microtiterplatte gebundenen Nucleosomen markiert. Zuletzt wird ein Substrat hinzugefügt, das durch die Peroxidase in einen Farbstoff umgewandelt wird, dessen Absorption sich im Photometer bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  quantitativ bestimmen lässt. Die gemessene Ab-

sorption entspricht dabei dem Nucleosomen-Gehalt und damit dem Anteil apoptotischer Zellen in der Probe.

#### 2.3.4.1 Lösungen

Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die benötigten Lösungen (PBS, EDTA-Lösung) wurden bereits an anderer Stelle erwähnt.

#### 2.3.4.2 Probenvorbereitung

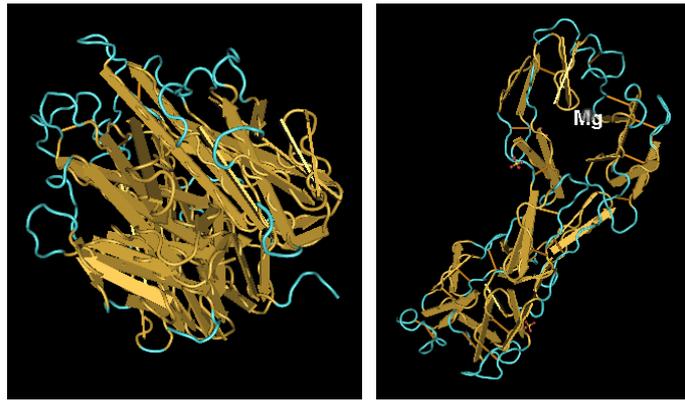
Die Zellen wurden für diesen Versuch auf Matrigel-beschichteten 6-Loch-Platten angezchtet, die Stimulation wurde wie unter 2.3.3.2 beschrieben durchgeführt. Zur Beendigung der Stimulation wurde das Medium durch PBS ersetzt, die Zellen mittels Trypsin und mechanischer Ablösung von der Platte gelöst, in PBS aufgenommen und anschließend lysiert.

#### 2.3.4.3 Durchführung und Auswertung

Die Durchführung des Tests fand wie von der Firma Roche empfohlen statt. Der Grad der Antikörper-Bindung wurde durch eine Peroxidase-Reaktion visualisiert und mit Hilfe eines ELISA-Lesegerätes (Microplate Reader) bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  quantifiziert. Alle Messungen wurden an zwei identisch verarbeiteten Aliquots einer Probe durchgeführt. Die Apoptose-Rate wurde als prozentualer Anstieg bzw. Abfall in Bezug auf die Referenzprobe (Basalwert) bestimmt, deren Apoptose-Rate auf 100 % festgesetzt wurde.

### **2.4 Statistische Methoden**

Bei den Ergebnissen aller quantitativen Messungen wird das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student-Newman-Keuls Test,  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet. Der Test für homogene Varianzen von Levene wurde verwendet, um sicherzustellen, dass Gruppen für die ANOVA-Analyse aus Populationen mit gleichen Varianzen stammten.

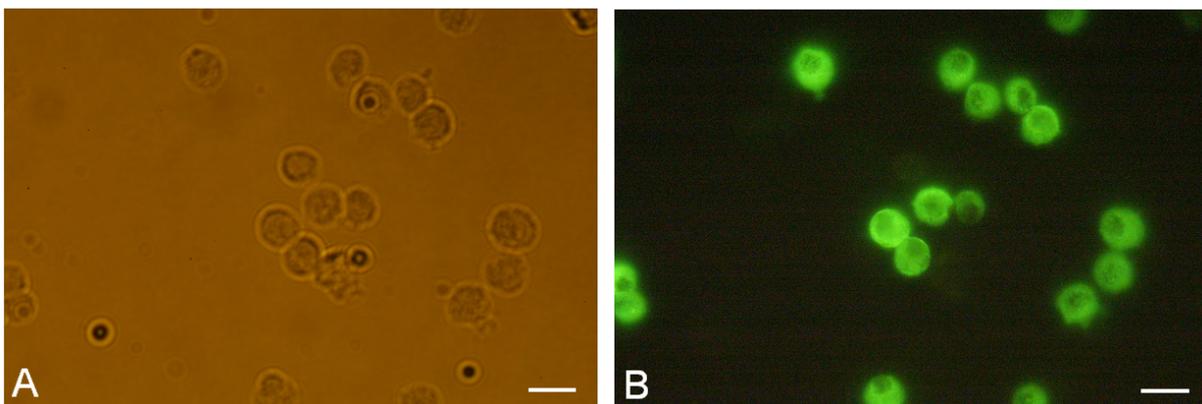


**Abb. 7:** 3D-Modell von TNF- $\alpha$  [51;52] und TNF-R1 [13;121;154], erstellt mit Cn3D 4.1

## Ergebnisse

### 1. Güte der Zellpräparation und Rezeptor-Nachweis

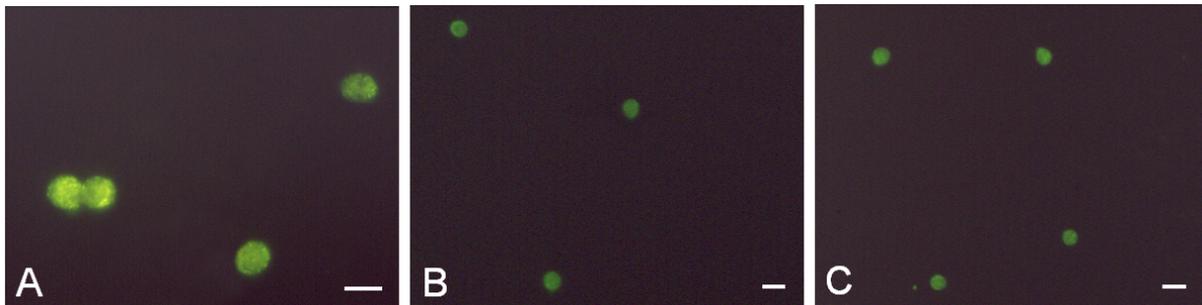
Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Anreicherung von ECL-Zellen in der Primärzell-Präparation. Abbildung 8A zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme angereicherter ECL-Zellen (insgesamt 18 Zellen). Für die Herstellung von Abbildung 8B wurden diese Zellen mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Marker-Enzym HDC inkubiert:



**Abb. 8:** Lichtmikroskopische Aufnahme von auf OT kultivierten ECL-Zellen (100x). 8A: Nativpräparat 8B: Darstellung des Marker-Enzyms HDC mittels Fluoreszenzfärbung (FITC) im selben Präparat. Die Balken in beiden Abbildungen entsprechen einer Länge von 10  $\mu\text{m}$ .

In der Färbung zeigten 17 von 18 Zellen einen positiven Nachweis von HDC. Die insgesamt mehr als 450 Zellen, bei denen der HDC-positive Prozentsatz bestimmt wur-

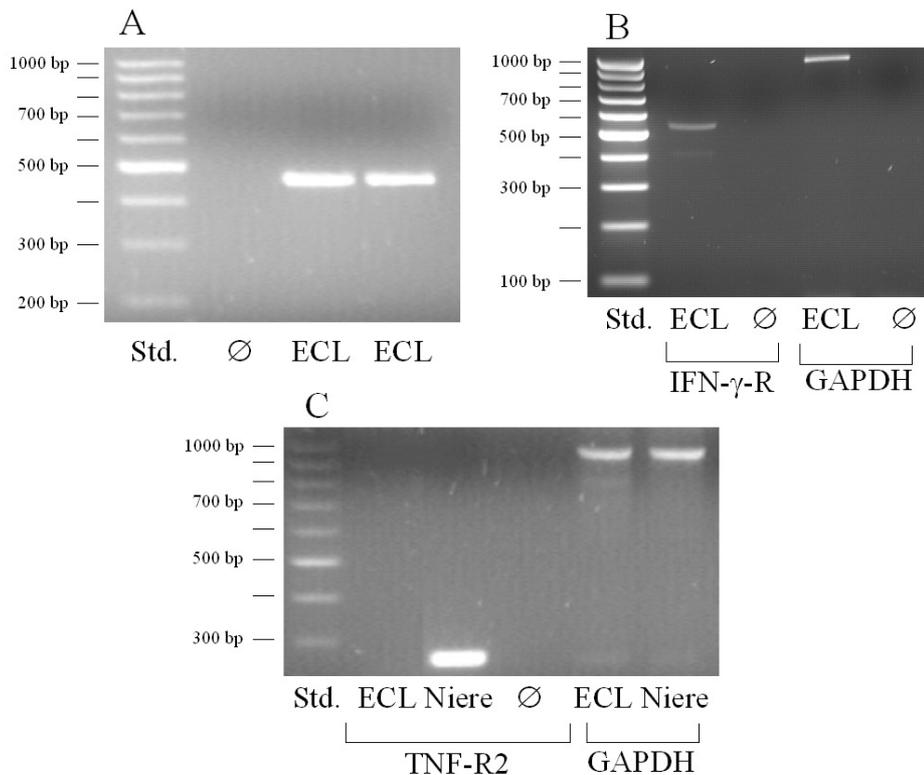
de, zeigten eine durchschnittliche Anreicherung von  $94 \pm 2 \%$ . Bei den wenigen anderen Zellen, die nach der Anreicherung als Kontamination verblieben, handelte es sich um Parietalzellen (1 – 2 %), Hauptzellen (1 – 2 %) und endokrine Zellen wie Gastrin- und Somatostatin-Zellen (1 – 2 %). Der Gesamtanteil der kontaminierenden Zellen war damit sehr gering. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem früherer Studien der Arbeitsgruppe [112;142]. In den Negativkontrollen (OT, bei denen lediglich die Inkubation mit dem Primärantikörper gegen HDC unterlassen wurde) konnte keine Färbung beobachtet werden.



**Abb. 9:** Nachweis von Rezeptoren auf ECL-Zellen mittels Immunocytochemie (Fluoreszenzfärbung, FITC). Die Primärantikörper waren gegen Epitope von TNF-R1 (9A, 100x), IFN- $\gamma$ -R  $\alpha$ -Kette (9B, 37x) und IFN- $\gamma$ -R  $\beta$ -Kette (9C, 37x) gerichtet. Die Balken entsprechen einer Länge von 10  $\mu$ m.

Mittels Immunocytochemie konnte weiterhin die Anwesenheit von TNF-Rezeptor Subtyp 1 sowie der  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -Rezeptors auf den ECL-Zellen nachgewiesen werden. Alle Experimente wurden mindestens drei Mal durchgeführt, sowie eine Positivkontrolle zum Nachweis der Antikörperfunktion mitverarbeitet. Abbildungen 9A bis 9C zeigen exemplarische Ergebnisse für die auf ECL-Zellen nachgewiesenen Rezeptoren. Positive Färbung konnte mit Antikörpern beobachtet werden, die für TNF-R1 spezifisch waren (Abb. 9A). Mit spezifischen Antikörpern gegen TNF-R2 konnte nur eine Färbung der Positivkontrolle, nicht aber eine Färbung der ECL-Zellen beobachtet werden. Dieser Rezeptor-Subtyp wurde daher auf den untersuchten ECL-Zellen nicht exprimiert. Ebenfalls konnte mittels Immunocytochemie kein positiver Nachweis für CD95 (Fas-Rezeptor, APO-1) geführt werden. Im Gegensatz dazu konnte die Expression der  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette des IFN- $\gamma$ -Rezeptors nachgewiesen werden (Abb. 9B und 9C). Die Versuche wurden mit hoch angereicherten Populationen von ECL-Zellen durchgeführt und zeigten über alle Zellen eine gleich-

mäßige Farbreaktion. Bei jeder Färbung, mittels derer ein Rezeptortyp nachgewiesen werden konnte, zeigten mehr als 90 % der Zellen ein positives Ergebnis. Insgesamt wurden z. B. für TNF-R1 218 Zellen ausgezählt, von denen mehr als 200 einen positiven Rezeptornachweis zeigten. Doppelfärbungen mit HDC-Antikörpern und den Primärantikörpern gegen TNF-R1, IFN- $\gamma$ -R ( $\alpha$ -Kette) und IFN- $\gamma$ -R ( $\beta$ -Kette) gelangen nicht, jedoch konnte der morphologische Nachweis geführt werden, dass alle positiv angefärbten Zellen die typischen Charakteristika von ECL-Zellen aufwiesen: Alle waren ca. 10  $\mu$ m im Durchmesser groß, hatten einen großen Nukleus und verfügten über zahlreiche sekretorische Vesikel.



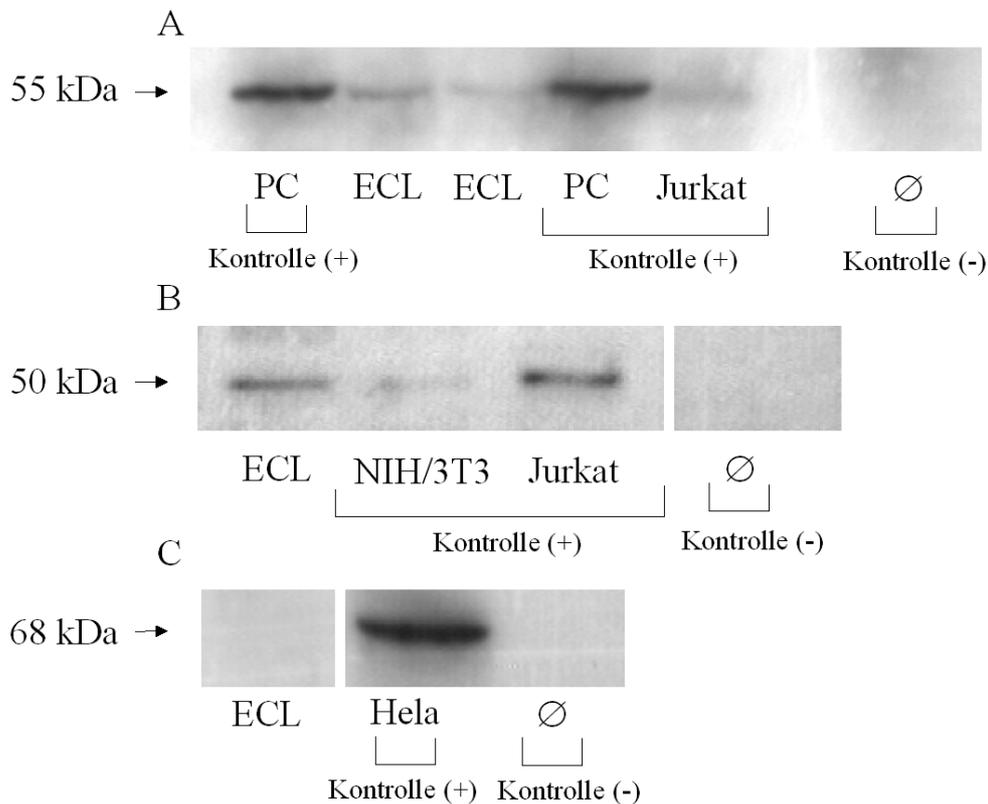
**Abb. 10:** Nachweis von TNF-R1 (10A), IFN- $\gamma$ -R ( $\alpha$ -Kette, 10B) und TNF-R2 (10C) durch RT-PCR. ECL: ECL-Zellen, Ø: Negativkontrolle, Std.: Gewichtsstandard (Banden entsprechen Schritten von 100 bp), Niere: Produkte aus cDNA der Rattenniere

## 2. Nachweis von TNF-Rezeptor Subtyp 1 und TRAF2 (PCR und Western Blot)

RT-PCR wurde mittels einer bereits vorhandenen cDNA-Bibliothek (siehe auch Material und Methoden, 2.2.1) und frisch aus ECL-Zellen gewonnener RNA durchgeführt (Abbildung 10A-C). Alle Experimente wurden mindestens zweimal repliziert und zeig-

ten identische Ergebnisse. In Übereinstimmung mit den durch ICC erhaltenen Befunden ergab der Nachweis mittels PCR jeweils ein Produkt der erwarteten Größe für TNF-R1 (Abb. 10A) und die  $\alpha$ -Kette des IFN- $\gamma$ -R (Abb. 10B), mit Primern für TNF-R2 (Abb. 10C) und CD95 konnte kein Produkt amplifiziert werden.

Um die Expression von TNF-R1 und TRAF2, eines wichtigen Adapter-Moleküles für den NF $\kappa$ B-Pathway, auf Proteinebene nachzuweisen, wurden mit Extrakten aus hochangereicherten ECL-Zell-Kulturen Western Blots durchgeführt. Dabei kamen spezifische Primärantikörper gegen TNF-R1 und TRAF2 zum Einsatz, Parietalzellen (TNF-R1), Jurkat-Zellen (TNF-R1, TRAF2) und NIH/3T3-Zellen (TRAF2) dienten als Positivkontrolle. Abbildung 11A zeigt einen exemplarischen Western Blot zum Nachweis von TNF-R1:



**Abb. 11:** Nachweis der Expression von TNF-R1 (11A), TRAF2 (11B) und DR4 (11C) im Western Blot. PC: Protein aus Parietalzellen, ECL: Protein aus ECL-Zellen, Jurkat: Protein aus Jurkat-Zellen, NIH/3T3: Protein aus NIH/3T3-Zellen, Hela: Protein aus Hela-Zellen, Ø: Negativkontrolle. Die angegebenen Werte entsprechen dem Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins.

Starke Signale ließen sich für die Positivkontrollen nachweisen (PC, schwächerer Nachweis bei Jurkat-Zellen), eine Bande identischer Größe war auch in der Probe aus ECL-Zell-Proteinextrakt nachzuweisen. Parietalzell-Extrakt, das ohne Primärantikörper inkubiert worden war (Negativ-Kontrolle), zeigte kein Signal.

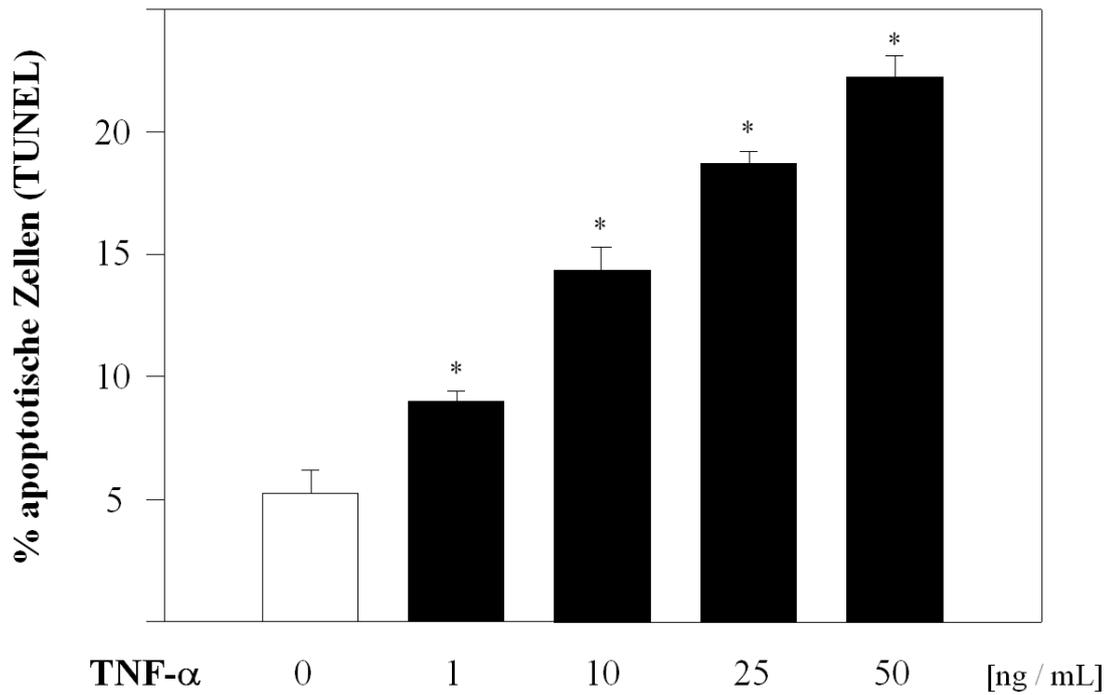
Abbildung 11B zeigt einen Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen TRAF2. Die Anwesenheit dieses Proteins konnte bei ECL-Zellen, Jurkat-Zellen und NIH/3T3-Zellen (Positivkontrollen) als einzelne Bande (ca. 50 kDa) nachgewiesen werden. Keine Bande zeigte sich bei der Negativkontrolle.

Mit Primärantikörper gegen den Rezeptor DR4 aus der TNF-Familie (Ligand: TRAIL) wurden ebenfalls Western Blots durchgeführt (Abb. 11C), ohne dass jedoch DR4-Protein in den ECL-Zell-Extrakten nachgewiesen werden konnte. Alle Western Blots wurden mindestens zweimal repliziert und ergaben identische Resultate.

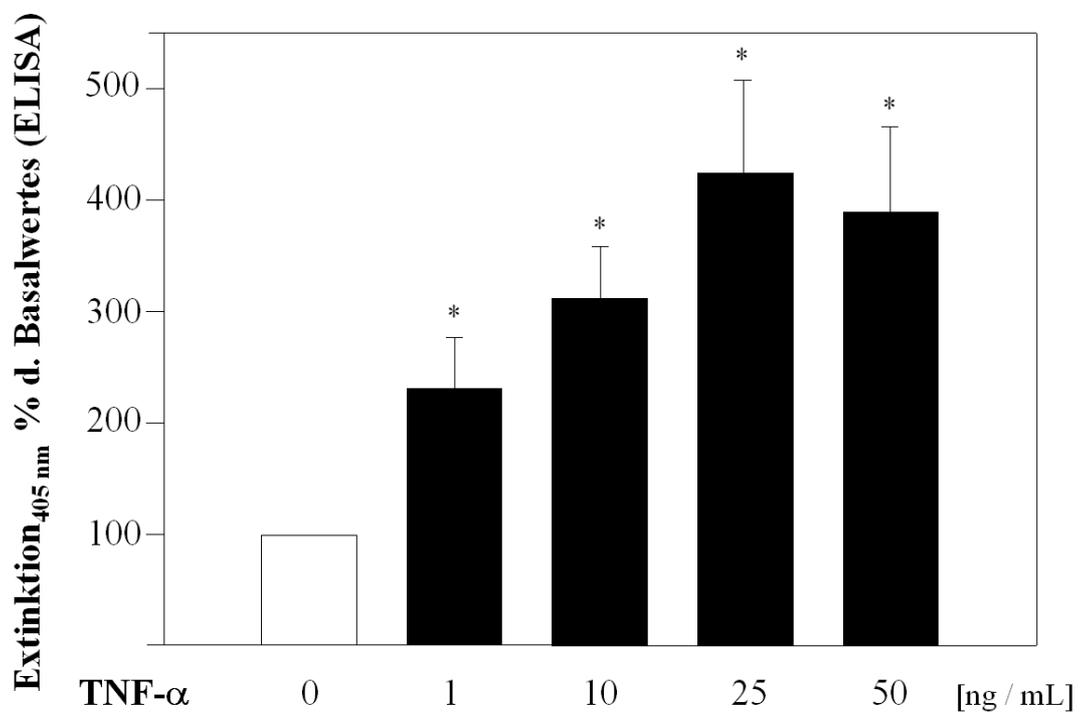
### **3. Apoptose-Rate von ECL-Zellen in der Gegenwart von TNF- $\alpha$**

Das Auftreten von programmiertem Zelltod bei ECL-Zellen wurde unter Ruhebedingungen und nach Stimulation mit verschiedenen Dosierungen von TNF- $\alpha$  untersucht. Als quantitative Bestimmungsmethode diente dabei neben der TUNEL-Reaktion (Abb. 12), bei der durch den Experimentator der Anteil apoptotischer Zellen gezählt werden musste, ein ELISA zur Bestimmung der DNA-Fragmentation (Abb. 13). Seine Auswertung erfolgte automatisiert mittels Microplate Reader und diente zur Kontrolle der TUNEL-Befunde mittels eines objektiv auswertbaren und auf einer zweiten Nachweismethode beruhenden Verfahrens. Mittels ELISA ließen sich dabei zusätzlich auch apoptotische Zellen nachweisen, die sich von den OT gelöst hatten und im KM schwammen. Alle Experimente wurden mindestens dreifach repliziert.

Anfangs wurden die ECL-Zellen für 24 h unterschiedlichen Konzentrationen von TNF- $\alpha$  ausgesetzt (Abb. 12). Nach einem Tag ließ sich in der Probe ohne Stimulans eine basale Apoptose-Rate von 4-6 % nachweisen. 50 ng/mL TNF- $\alpha$  erhöhten den Prozentsatz apoptotischer Zellen auf 22-24 %. Bei allen untersuchten Konzentrationen von TNF- $\alpha$  waren die Unterschiede im Vergleiche zur basalen Apoptose-Rate signifikant ( $n = 4$ ,  $p < 0,005$ ).



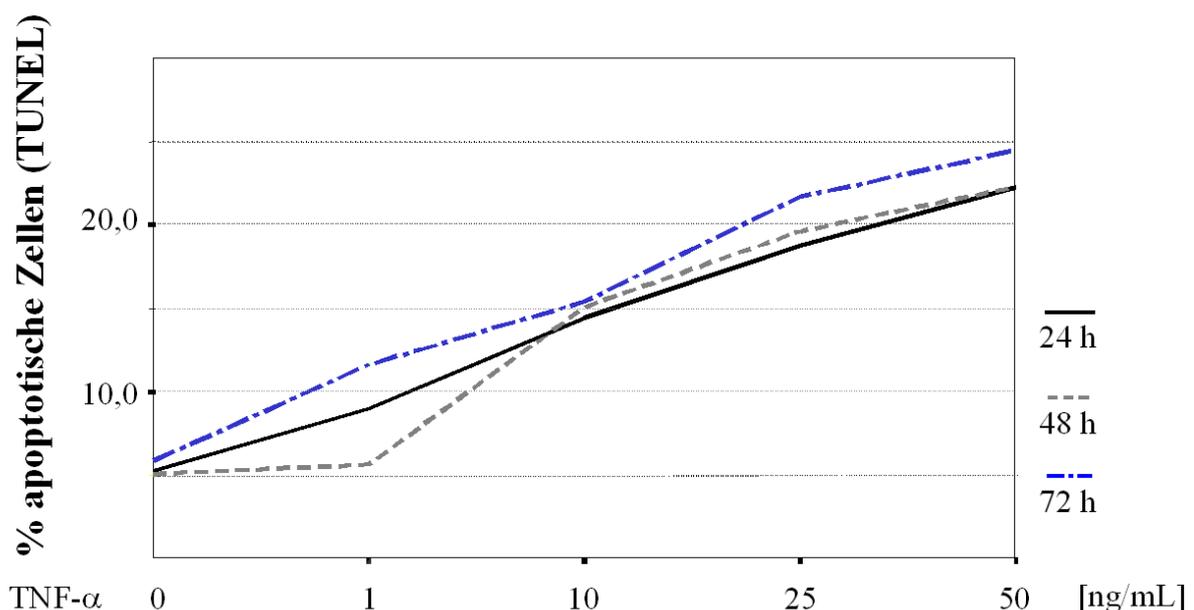
**Abb. 12:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Dosierungen (TUNEL-Reaktion). \*: signifikant,  $p < 0,005$ , n.s.: nicht signifikant



**Abb. 13:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  in verschiedenen Dosierungen (Cell death detection ELISA). \*: signifikant,  $p < 0,05$ , n.s.: nicht signifikant

Der gleiche Effekt ließ sich mit der objektiv auswertbaren ELISA-Technik beobachten: TNF- $\alpha$  erhöhte in Konzentrationen von 1, 10, 25 und 50 ng/mL signifikant die Apoptose-Rate der ECL-Zellen (Abb. 13). Dabei wurde die stärkste Apoptose-Induktion bei den Konzentrationen 25 ng/mL (mittlerer Anstieg auf 400 % der basalen Rate) und 50 ng/mL (mittlerer Anstieg auf 390 %) beobachtet. Alle weiteren Experimente wurden daher mit einer Konzentration von 25 ng/mL TNF- $\alpha$  durchgeführt.

Mittels der TUNEL-Reaktion wurde weiterhin die Auswirkung unterschiedlich langer Zeiten der Inkubation mit TNF- $\alpha$  untersucht (Abb. 14). Die basale Apoptose-Rate stieg dabei bei einer Inkubationszeit von 48 h und 72 h nicht signifikant gegenüber 24 h an. In allen untersuchten Zeitintervallen zeigte sich eine dosisabhängige apoptose-induzierende Wirkung von TNF- $\alpha$ . Beim Vergleich der drei Zeiträume ließen sich jedoch gegenüber der Apoptose bei 24 h keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Daher wurde für die Folgeexperimente eine Inkubationszeit von 24 h gewählt.

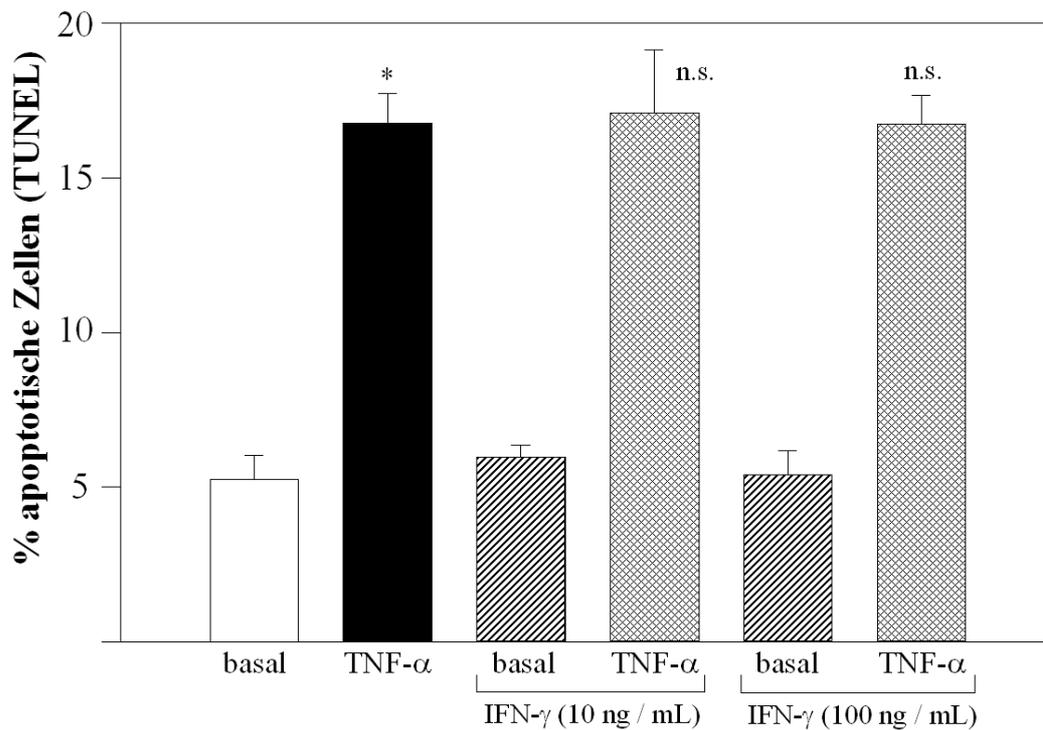


**Abb. 14:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach unterschiedlichen Intervallen der Stimulation mit TNF- $\alpha$  (TUNEL-Reaktion).

#### 4. Die Wirkung von Interferon- $\gamma$ auf ECL-Zellen

Abbildungen 15 und 16 zeigen die Auswirkungen der Stimulation mit IFN- $\gamma$  auf die Induktion von programmiertem Zelltod bei ECL-Zellen (TUNEL bzw. ELISA). 24 h nach der Zellpräparation wurden dem ausgetauschten KM H<sub>2</sub>O, 10 bzw. 100 ng/mL IFN- $\gamma$  hinzugefügt. Die beobachtete basale Apoptose-Rate bewegte sich wiederum

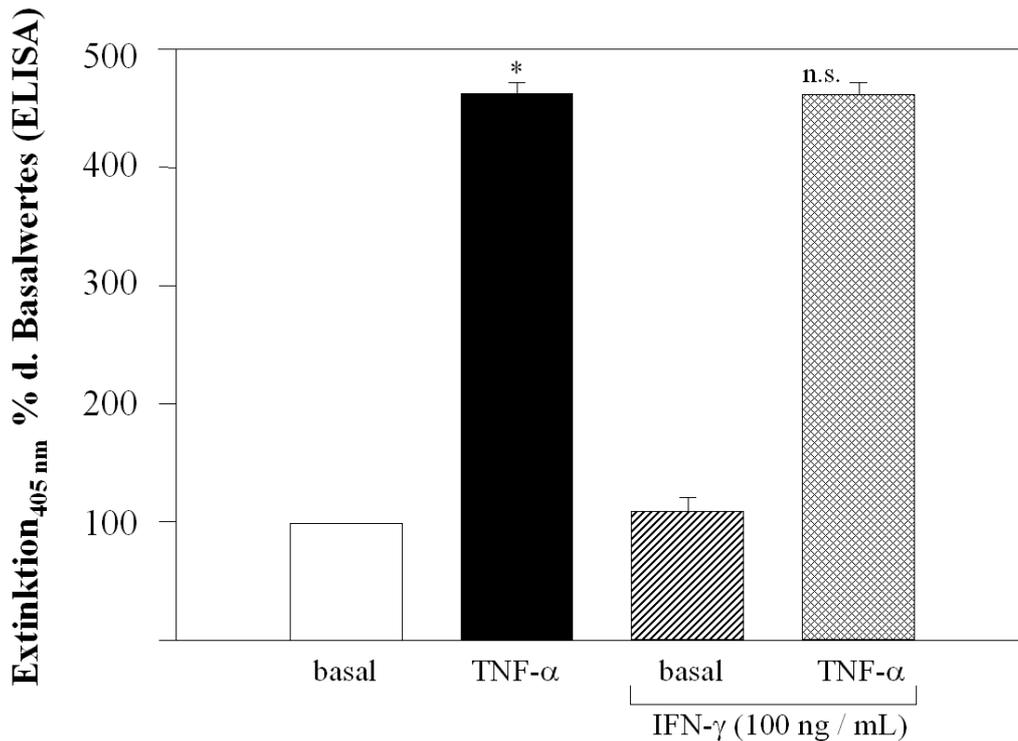
auf dem Niveau von 5-6 %. IFN- $\gamma$  führte in keiner der verwendeten Konzentrationen zu einem signifikanten Anstieg dieses Prozentsatzes (Abb. 15, 16).



**Abb. 15:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  bzw. kombinierter Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (TUNEL-Reaktion). \*: signifikant,  $p < 0,05$ , n.s.: nicht signifikant vs. TNF- $\alpha$

ECL-Zellen wurden zusätzlich für 24 h mit einer Kombination aus TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) und IFN- $\gamma$  (10 und 100 ng/mL) inkubiert. TNF- $\alpha$  alleine führte zu einer Apoptose-Rate von ca. 16-18 %, IFN- $\gamma$  alleine zeigte wiederum keinen signifikanten Effekt auf die basale Rate des programmierten Zelltodes. Des weiteren konnte durch die zusätzliche Stimulation mit IFN- $\gamma$  keine Potenzierung der TNF- $\alpha$ -Wirkung gezeigt werden. Weder 10 ng/mL noch 100 ng/mL IFN- $\gamma$  änderten den Prozentsatz der durch TNF- $\alpha$  induzierten Apoptose signifikant (Abb. 15, 16).

Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben beim Einsatz beider Apoptose-Bestimmungsverfahren identische Resultate. Insgesamt wurden 20 Experimente durchgeführt.



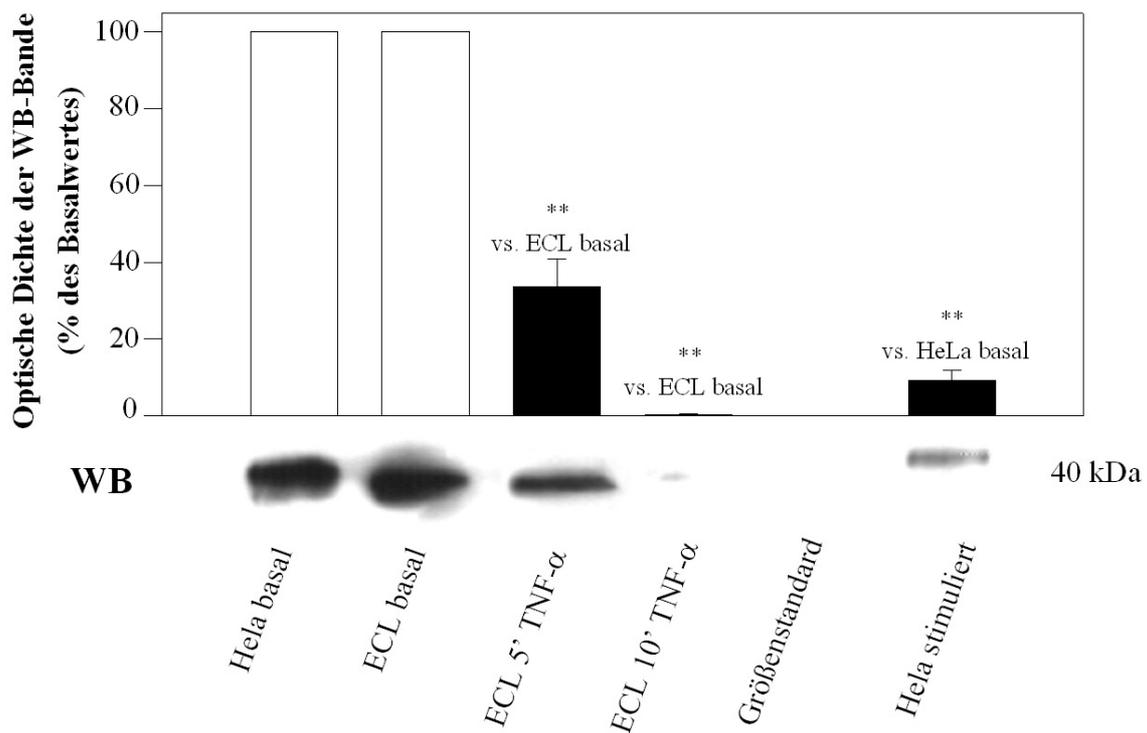
**Abb. 16:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  bzw. kombinierter Stimulation mit TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Cell death detection ELISA). \*: signifikant,  $p < 0,05$ , n.s.: nicht signifikant vs. TNF- $\alpha$

## 5. Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ nach Stimulation mit TNF- $\alpha$

Es ist bekannt, dass die Stimulation mit TNF- $\alpha$  innerhalb weniger Minuten zur Phosphorylierung und in der Folge zum Abbau von zytoplasmatischem I $\kappa$ B $\alpha$  durch Ubiquitinierung und das Proteasom-System führt [48;182].

Um die Auslösung dieses Prozesses in unserem System zu verfolgen, wurden ECL-Zellen mit TNF- $\alpha$  inkubiert und mit den gewonnenen Proteinextrakten Western Blots durchgeführt.

Durch den Einsatz eines spezifisch gegen unphosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$  gerichteten Primärantikörpers gelang dabei der semiquantitative Nachweis der Menge von vorhandenem unphosphoryliertem I $\kappa$ B $\alpha$ . Die Intensität der im Western Blot detektierbaren Banden bei 40 kDa wurde densitometrisch vermessen und über drei Messwiederholungen gemittelt.



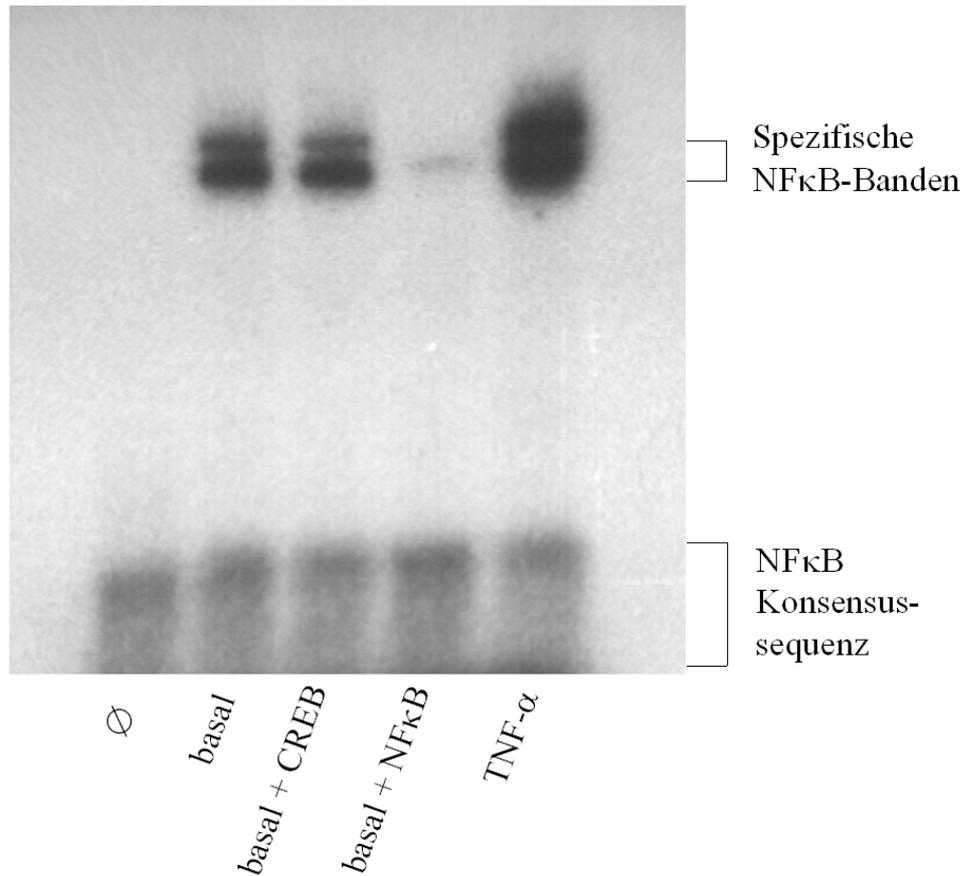
**Abb. 17:** Nachweis der Phosphorylierung von IκBα nach Inkubation der ECL-Zellen mit TNF-α im Western Blot (WB). Der angegebene Wert entspricht dem Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins. Die optische Dichte der Einzelbanden wurde mit Hilfe der Software ONE-Dscan vermessen (Darstellung im Boxplot), so dass die Ergebnisse von drei repräsentativen Experimenten semiquantitativ analysiert werden konnten. HeLa: Proteinextrakt aus HeLa-Zellen. \*\*: signifikant,  $p < 0,01$

Abbildung 17 zeigt im unteren Teil das Ergebnis eines repräsentativen Experiments, bei dem durch den Primärantikörper eine Bande bei 40 kDa nachgewiesen werden konnte. Im oberen Teil ist die mittlere Bandenintensität aus drei Experimenten als Balkendiagramm dargestellt, wobei die Bandenintensität der Probe ohne Stimulans (Basalwert) als Wert von 100 % interpretiert wurde, auf den sich alle weiteren Angaben beziehen. TNF-α führte zu einer signifikanten Reduktion der Bandenintensität ( $p < 0,01$ , ANOVA). Bahn 1 enthielt Protein unstimulierter HeLa-Zellen, die als Positivkontrolle für den Nachweis von unphosphoryliertem IκBα dienten. Auf Bahn 6 wurde Protein von TNF-α-stimulierten HeLa-Zellen aufgetragen, die aufgrund der Aktivierung des TNF-α-NFκB-Pathways eine höhere Konzentration von phosphoryliertem IκBα und seiner Abbauprodukte und infolge dessen eine geringere Konzentration des

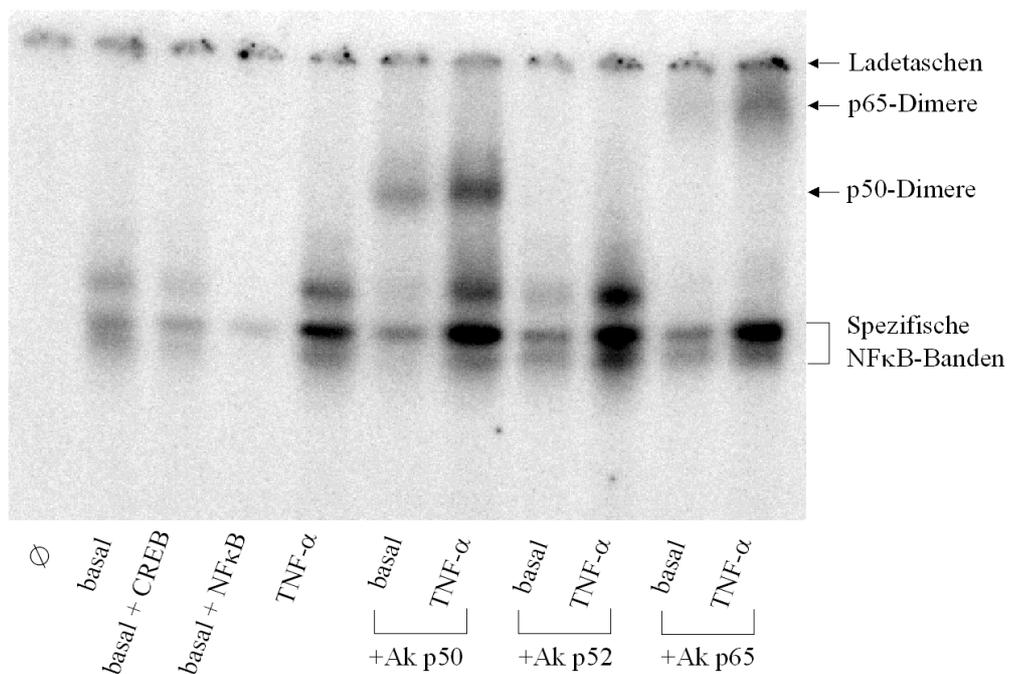
unphosphorylierten I $\kappa$ B $\alpha$  enthielten (Positivkontrolle zum Nachweis der I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung und -degradation). Die ECL-Zellen wurden für 0, 5 und 10 Minuten mit TNF- $\alpha$  (25 ng/mL) inkubiert und die verarbeiteten Proteinextrakte in die Taschen 2, 3 und 4 geladen. Vergleichbar mit der Situation bei unstimulierten Hela-Zellen zeigten die ECL-Zellen zu  $t = 0$  min eine starke Bande für unphosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$ . Nach 5 min Inkubation mit TNF- $\alpha$  war ein Rückgang des Signals zu beobachten, nach 10 min Stimulation war die Menge an unphosphoryliertem I $\kappa$ B $\alpha$  unter die Nachweisgrenze gesunken, es konnte kein Signal mehr detektiert werden. TNF- $\alpha$  führte also binnen 10 min zur raschen Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  in den ECL-Zellen.

## **6. Die Aktivität von NF $\kappa$ B steigt nach Inkubation mit TNF- $\alpha$**

Abbildung 18 zeigt einen mit Protein-Extrakten der ECL-Zellen durchgeführten EMSA für NF $\kappa$ B. Die Zell-Lysate wurden wie beschrieben mit radioaktiv markierten ODN inkubiert, die nach der NF $\kappa$ B-Konsensussequenz synthetisiert worden waren. Eine Probe ohne Protein (Bahn 1) diente als Negativkontrolle. Alle Versuche wurden mindestens dreimal repliziert. Zum Nachweis der Spezifität der NF $\kappa$ B-Bindung diente ein Kompetitions-Versuch mit kalten (nicht radioaktiv markierten) ODN, die nach der CREB-Konsensussequenz (Bahn 3) bzw. der NF $\kappa$ B-Konsensussequenz (Bahn 4) hergestellt worden waren. Zugabe der CREB-ODN führte zu einem Signal gleicher Intensität wie die Verarbeitung einer Probe unstimulierter ECL-Zellen ohne kalte ODN (unspezifische Kompetition, Bahn 2). Die Zugabe nicht radioaktiv markierter NF $\kappa$ B-ODN führte zu einer starken Verminderung der Signalintensität (spezifische Kompetition), so dass die Spezifität der NF $\kappa$ B-Sequenz-Interaktion für die Bandenintensität nachgewiesen werden konnte. Die Signalintensität mit TNF- $\alpha$  stimulierter ECL-Zellen ( $t = 1$  h, 25 ng/mL, Bahn 5) war gegenüber dem Basalwert (Bahn 2) erheblich gesteigert. Bei ECL-Zellen ist also infolge der TNF- $\alpha$ -Stimulation eine erhöhte Bindung von NF $\kappa$ B an ODN mit der entsprechenden Konsensussequenz zu beobachten.



**Abb. 18:** EMSA mit Proteinextrakten unstimulierter und mit TNF- $\alpha$  inkubierter ECL-Zellen. CREB/NFκB: Nicht radioaktiv markierte DNA mit CREB- bzw. NFκB-Konsensussequenz.

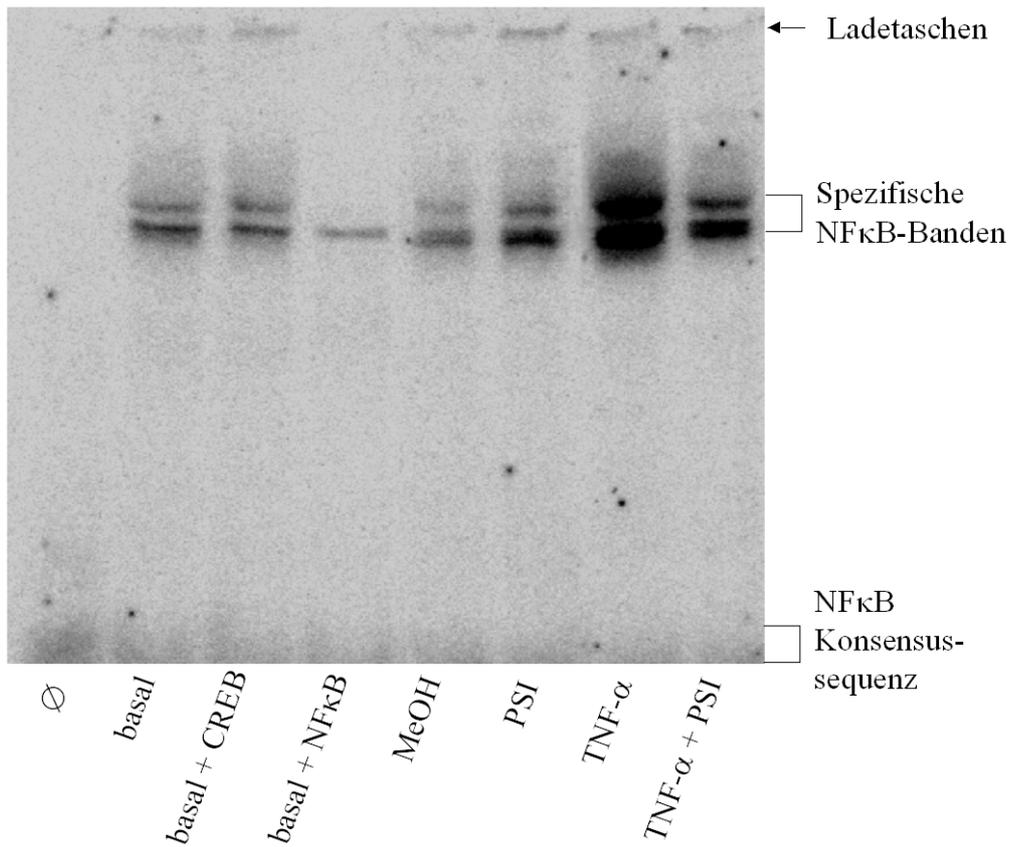


**Abb. 19:** EMSA-Supershift-Versuch mit Antikörpern (Ak) gegen die NFκB-Untereinheiten p50, p52 und p65.

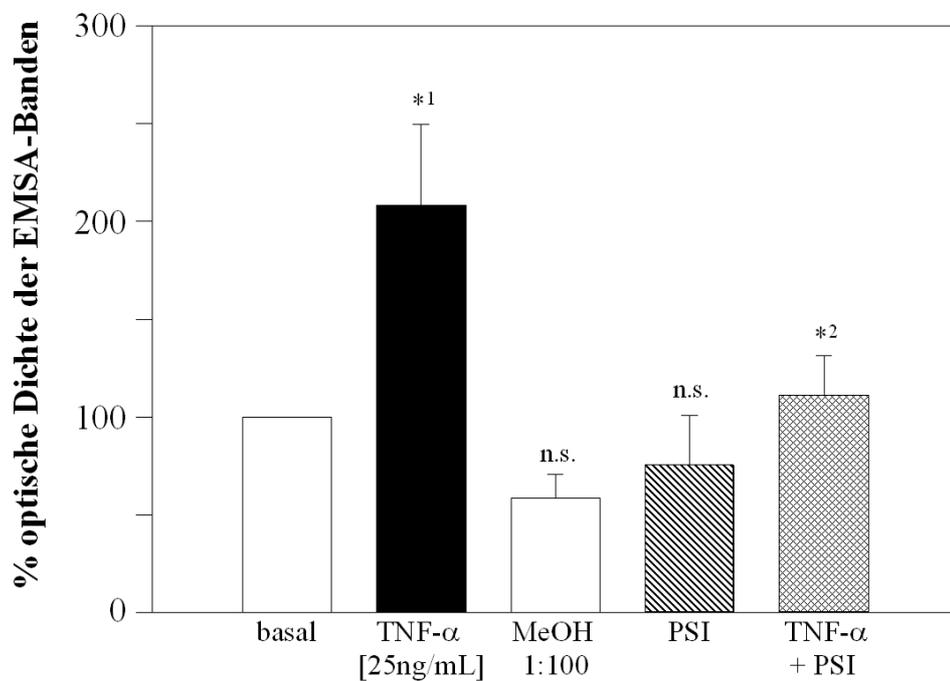
Um zu untersuchen, welche NFκB-Untereinheiten bei ECL-Zellen von Bedeutung sind, wurde ein EMSA-Supershift-Versuch durchgeführt (Abb. 19). Proben von unstimulierten (Bahnen 6, 8 und 10) und stimulierten (Bahnen 7, 9 und 11) ECL-Zellen wurden aufgetragen. Den Proben wurden spezifische Antikörper gegen die NFκB-Untereinheiten p50 (Bahnen 6 und 7), p52 (Bahnen 8 und 9) und p65 (Bahnen 10 und 11) zugegeben. Eine Verschiebung der Bandenposition durch die langsame Wanderung des Komplexes aus Antikörper, NFκB und ODN verglichen mit an ODN gebundenem NFκB alleine konnte nur in den Bahnen 6/7 und 10/11 beobachtet werden. Es kann also geschlossen werden, dass sowohl das in Ruhe vorhandene wie auch das durch TNF-α zusätzlich aktivierte NFκB in ECL-Zellen die Untereinheiten p50 und p65 enthält. Die obere der erkennbaren NFκB-spezifischen Banden ist dabei p65-Homodimeren zuzuordnen (vollständiges Verschwinden bei Inkubation mit p65-Antikörpern), die folgenden p50/p65-Heterodimeren und p50-Homodimeren.

Proteasom-Inhibitoren hemmen unter anderem den Abbau des phosphorylierten IκBα und damit die Aktivierung von NFκB. In Abbildung 20 ist der Einfluss des Proteasom-Inhibitors PSI (6 mM) auf die Aktivierung von NFκB dargestellt. Bahn 1 enthielt die Negativkontrolle, Bahn 2 Extrakte unstimulierter ECL-Zellen und Bahn 7 diejenigen stimulierter ECL-Zellen. Bahnen 3 und 4 wurden für einen Wettbewerbs-Assay analog zu Abb. 18 verwendet. Auf Bahnen 5 bis 8 wurden Zellextrakte aufgetragen, die in aufsteigender Reihenfolge aus Stimulationsversuchen mit Methanol, PSI, TNF-α und PSI zusammen mit TNF-α stammten. Methanol und PSI alleine zeigten keine erkennbare Aktivierung von NFκB, während PSI in der Lage war, den bekannten TNF-α-Effekt signifikant zu reduzieren und damit Hinweis auf eine geringere NFκB-Aktivierung zu geben. Dabei führte die unter PSI und TNF-α beobachtete NFκB-Aktivierung zu einem schwächeren Signal als TNF-α.

Insgesamt wurde das Experiment dreimal unabhängig repliziert und die Ergebnisse durch Analyse der optischen Bandendichte verglichen (Abb. 21). In der quantitativen Auswertung war eine leichte Verminderung der NFκB-Aktivität durch Zugabe von Methanol und PSI zu bemerken, die jedoch nicht signifikant war (one-way ANOVA).



**Abb. 20:** EMSA mit Proteinextrakten aus ECL-Zellen nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und nach Präinkubation mit dem Proteasom-Inhibitor PSI.

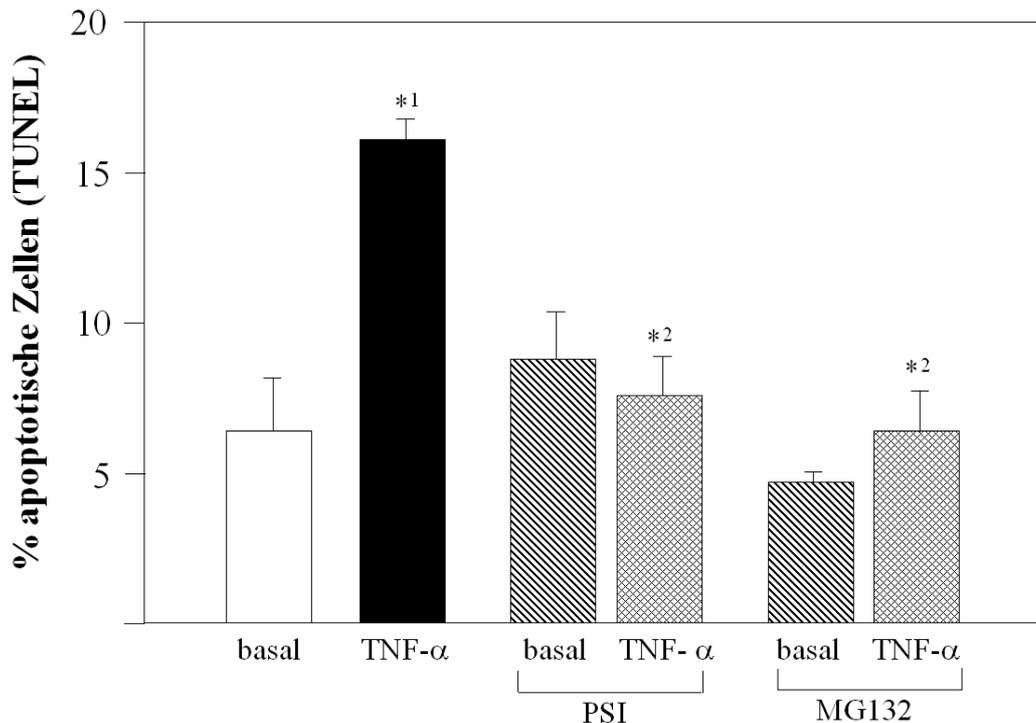


**Abb. 21:** Bestimmung der optischen Bandendichte zur quantitativen Auswertung der EMSA-Experimente (vgl. Abb. 20). n.s.: nicht signifikant vs. basal, \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,05$ , \*2: signifikant vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,05$

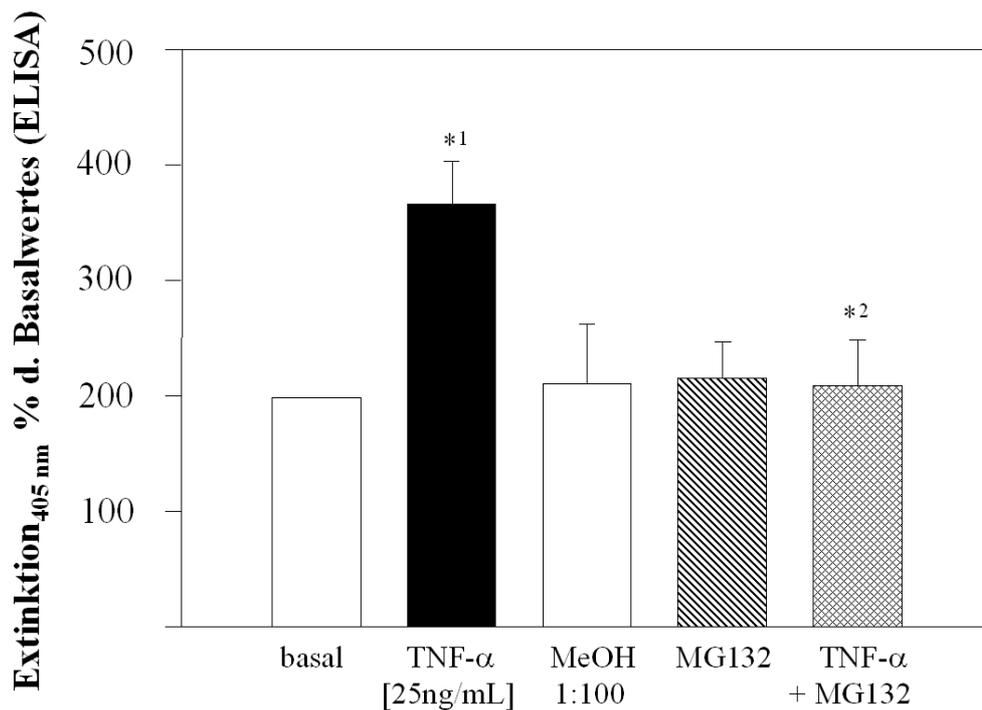
## 7. Proteasom-Inhibitoren und durch TNF- $\alpha$ vermittelte Apoptose

Um zu untersuchen, inwiefern die beobachtete NF $\kappa$ B-Aktivierung von funktionaler Bedeutung für die Apoptose der ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  ist, wurde ein TUNEL-Experiment durchgeführt, bei dem die Zellen mit zwei unterschiedlichen Proteasom-Inhibitoren inkubiert wurden. Bei dem Proteasom-Inhibitor I (PSI) handelt es sich um einen zellpermeablen Inhibitor eines multikatalytischen Proteinase-Komplexes, der nach Gabe von TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  durch Inhibition der I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradation die Aktivierung von NF $\kappa$ B und so die Induktion des Enzyms iNOS verhindert [68]. Es ist bekannt, dass MG132 auf ähnliche Weise die Degradation durch Proteasome inhibiert [85].

Die Wirkung der beiden genannten Hemmstoffe auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose ist in Abbildungen 22 (TUNEL) und 23 (ELISA) gezeigt.



**Abb. 22:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. vorheriger Inkubation mit PSI (6 mM) oder MG132 (5 mM, TUNEL-Reaktion). \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,05$ , \*2: signifikant vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,05$



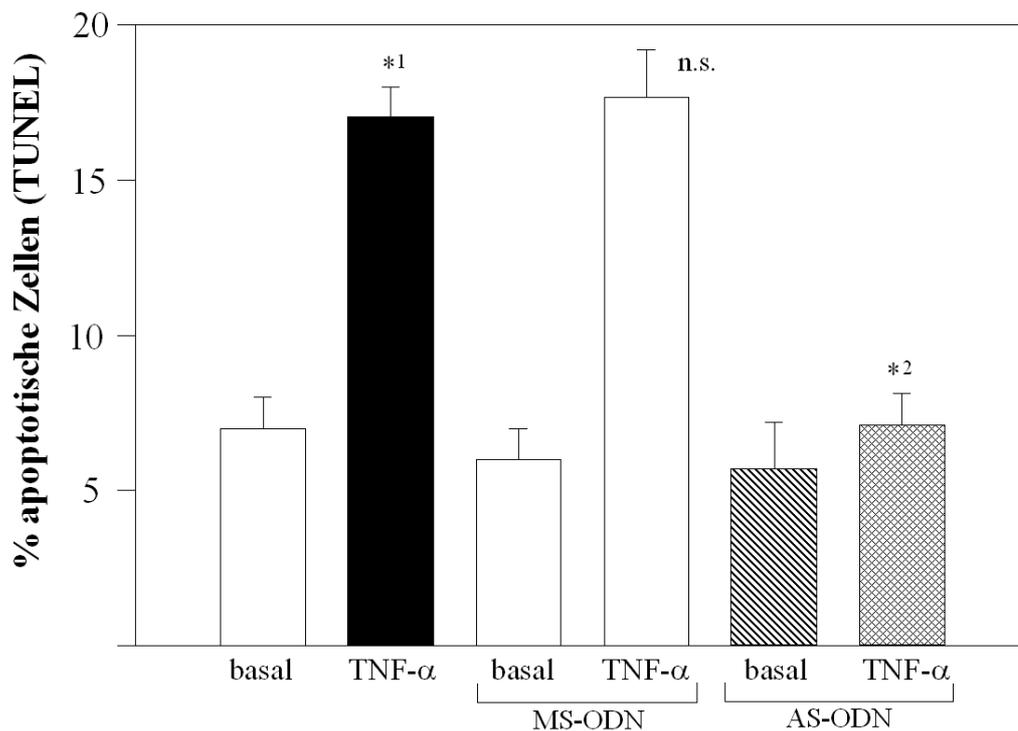
**Abb. 23:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. vorheriger Inkubation mit MG132 (5 mM, Cell death detection ELISA). \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,01$ , \*2: signifikant vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,05$

1 % Methanol diente als Lösungsmittel für beide Inhibitoren, hatte aber keinen Effekt auf die Apoptose-Rate. Die ECL-Zellen wurden mit H<sub>2</sub>O, TNF- $\alpha$  alleine, PSI, MG132, oder TNF- $\alpha$  in Kombination mit einem der Inhibitoren inkubiert. Die basale Apoptose-Rate lag bei 7 %, und TNF- $\alpha$  verursachte einen Anstieg auf 16-18 %. PSI und MG132 alleine hatten keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose. Beide Inhibitoren waren jedoch in der Lage, den Prozentsatz apoptotischer Zellen bei TNF- $\alpha$ -Stimulation auf 5-8 % zu senken (TUNEL, Abb. 22) und somit die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf den programmierten Zelltod komplett zu inhibieren ( $n = 3$ ,  $p < 0,01$ ).

Ähnliche Ergebnisse wurden durch die objektive quantitative Bestimmung mittels ELISA geliefert: TNF- $\alpha$  konnte Apoptose bei den ECL-Zellen induzieren, und MG132 inhibierte diese Wirkung vollständig (Abb. 23).

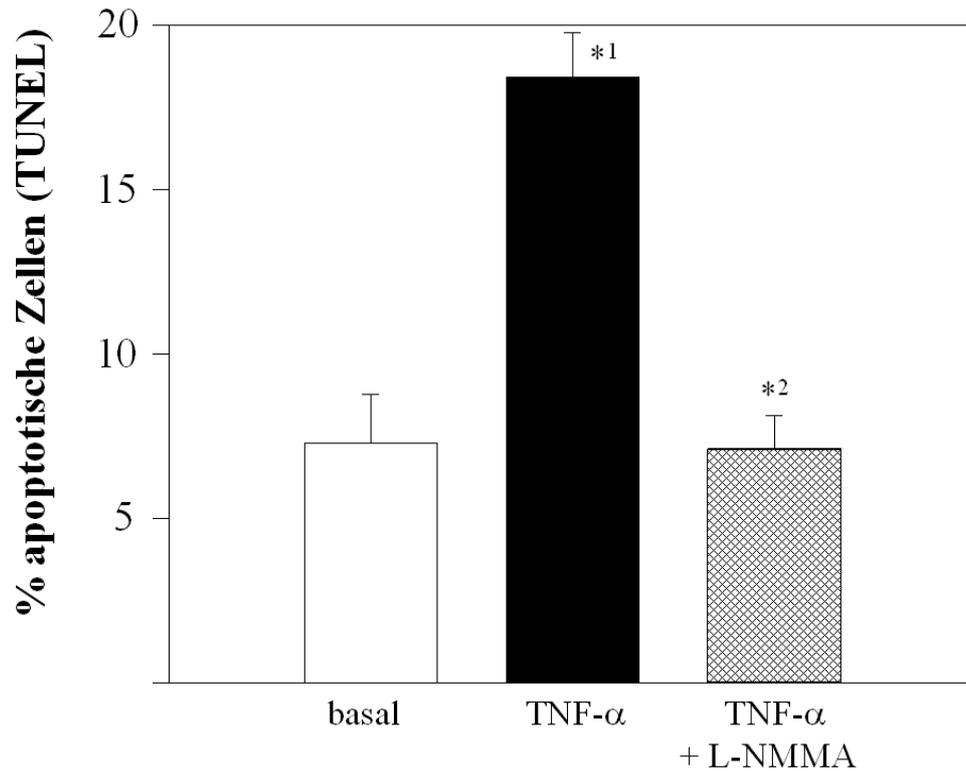
## 8. Hemmung der Apoptose durch NFκB AS-ODN und L-NMMA

Um die pro-apoptotische Wirkung von NFκB bei ECL-Zellen weiter zu charakterisieren und Anhaltspunkte für die nachgeschalteten Schritte in der Signaltransduktion zu erhalten, wurden die Auswirkungen von p65 AS-/MS-ODN und L-NMMA auf das Apoptose-Verhalten von ECL-Zellen in Gegenwart von TNF-α untersucht. Die AS-ODN waren spezifisch gegen die im EMSA-Supershift in starkem Maß nachweisbare p65-Untereinheit von NFκB gerichtet.



**Abb. 24:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF-α bzw. nach vorheriger Inkubation mit gegen NFκB gerichteten AS-ODN [149;156] (TUNEL-Reaktion). n.s.: nicht signifikant vs. TNF-α, \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,05$ , \*2: signifikant vs. TNF-α,  $p < 0,005$

Unbehandelte ECL-Zellen und mit AS-/MS-ODN transfizierte Zellen wurden wie beschrieben für 24 h mit H<sub>2</sub>O bzw. TNF-α (25 ng/mL) stimuliert und die Apoptose mittels TUNEL quantifiziert (Abb. 23). AS- und MS-ODN hatten alleine keinen signifikanten Effekt auf die Apoptose der ECL-Zellen. Durch Transfektion mit AS-, nicht aber mit MS-ODN, konnte die pro-apoptotische Wirkung von TNF-α komplett aufgehoben werden ( $n = 3$ ,  $p < 0,005$ ). Das Ausbleiben dieses Effektes bei Präinkubation mit MS-ODN zeigte dabei, dass das Abnehmen der Apoptose-Rate als direkter Effekt der NFκB-Blockade zu interpretieren war.

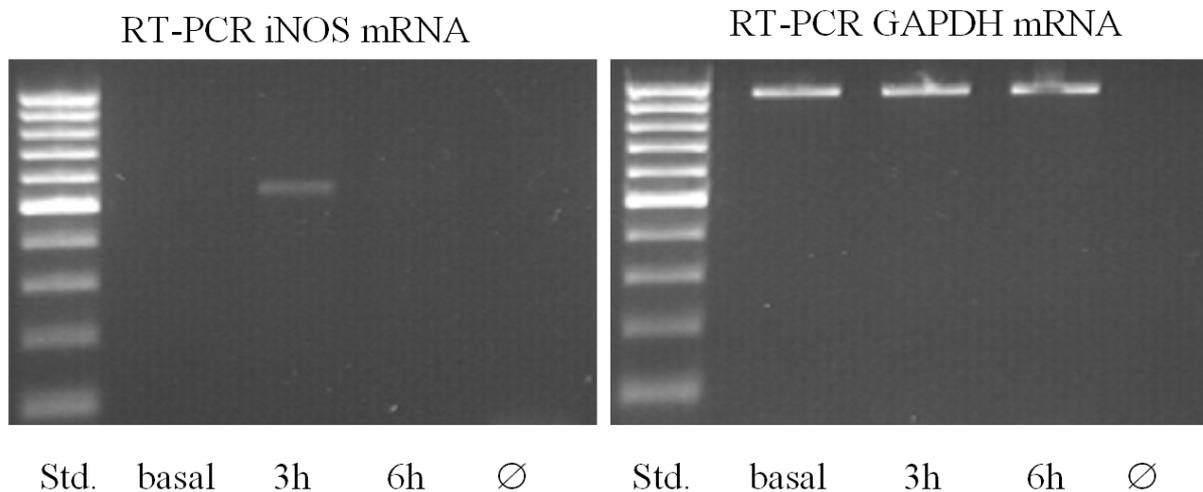


**Abb. 25:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. nach gemeinsamer Inkubation mit TNF- $\alpha$  und L-NMMA (TUNEL-Reaktion). \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,05$ , \*2: signifikant vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,001$

Um herauszufinden, ob der NF $\kappa$ B-Effekt über die Erzeugung von NO vermittelt sein könnte, wurde der obige Versuch mit einem spezifischen Hemmstoff der NO-Synthase wiederholt. Von der Substanz L-NMMA ist bekannt, dass sie die Produktion von NO durch alle NOS-Isoformen verhindert. ECL-Zellen wurden mit TNF- $\alpha$  und L-NMMA ( $10^{-4}$  M, 24 h) inkubiert. Während die basale und die durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose den Vorexperimenten entsprachen (Abb. 25), konnte bei gemeinsamer Inkubation mit TNF- $\alpha$  und L-NMMA wiederum eine komplette Inhibition der proapoptotischen Wirkung beobachtet werden ( $n = 3$ ,  $p < 0,001$ ). Wie aus früheren Studien bekannt, zeigte L-NMMA alleine keine Wirkung auf den Prozentsatz apoptotischer Zellen [111].

Um die Bedeutung des Enzyms iNOS hinsichtlich dieser Befunde zu klären, wurde seine Induktion durch TNF- $\alpha$  auf der Transkriptions-Ebene untersucht (Abb. 26). RNA aus unstimulierten Zellen sowie aus Zellen, die für 3 h und 6 h TNF- $\alpha$  in einer Konzentration von 25 ng/mL ausgesetzt waren, wurde amplifiziert. Alle Experi-

mente wurden dreimal repliziert und die Identität des Genproduktes durch Sequenzierung überprüft.



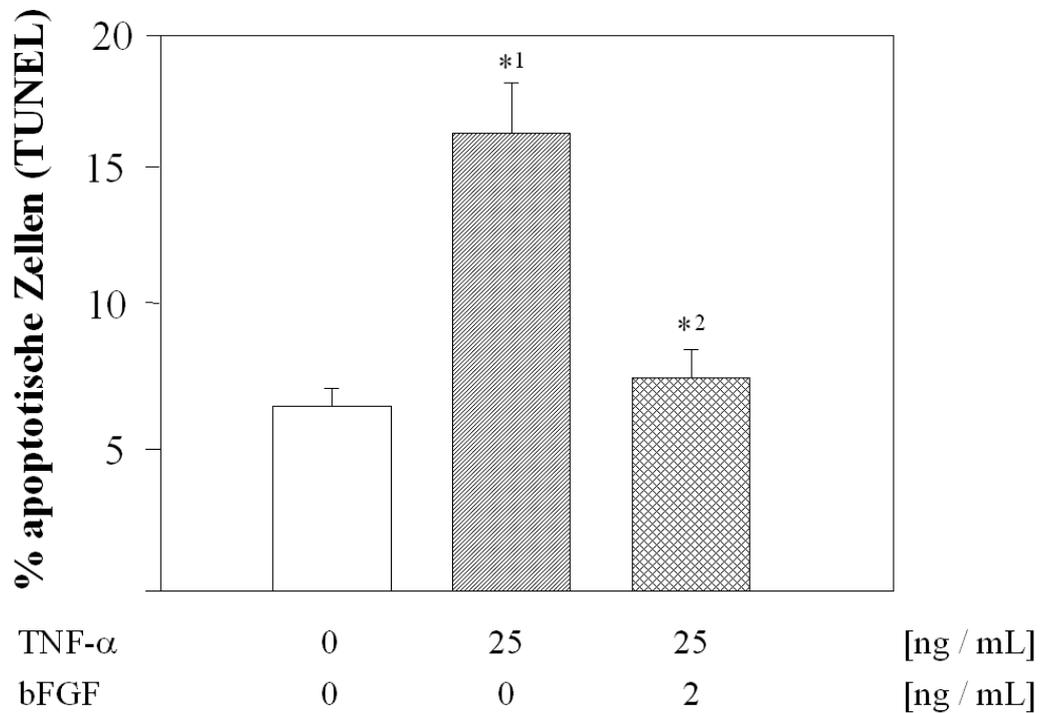
**Abb. 26:** Nachweis der Induktion der iNOS-Transkription durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  mittels semiquantitativer RT-PCR. Std.: Gewichtsstandard; Fragmente von 100 bp (unterste Bande) bis 1000 bp (oberste Bande) in Schritten von 100 bp, Ø: Negativkontrolle, Stundenangaben entsprechen der Einwirkungsdauer von TNF- $\alpha$ .

RT-PCR des Housekeeping-Gens GAPDH ergab nach 27 Amplifikationszyklen für alle Proben Banden identischer Intensität, so dass sichergestellt war, dass gleiche Mengen RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt worden waren. Bei der RT-PCR mit iNOS-spezifischen Primern konnte unter Ruhebedingungen kein Signal nachgewiesen werden. Nach 3 h TNF- $\alpha$ -Stimulation zeigte sich eine iNOS-Bande mit einer Größe von 555 bp. Aus der RNA der 6 h inkubierten ECL-Zellen konnte dagegen kein iNOS-Signal mehr nachgewiesen werden. TNF- $\alpha$  führte daher nach 3 h zu einer raschen Induktion der iNOS-Transkription.

### 9. Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose durch bFGF

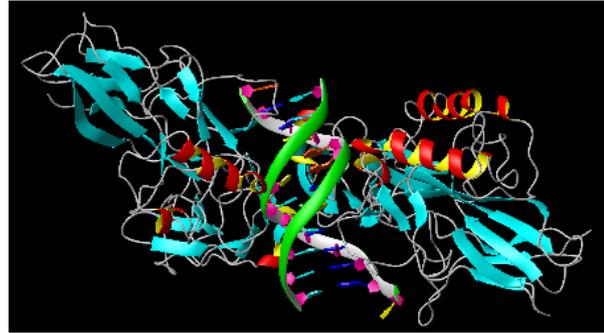
Hinsichtlich der Interpretierbarkeit der beobachteten Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die Apoptose der ECL-Zellen auf dem Hintergrund pathophysiologischer Verhältnisse in vivo war die Untersuchung des Zusammenspiels mit weiteren Zytokinen von Bedeutung. Vom Wachstumsfaktor bFGF ist bekannt, dass er auf ECL-Zellen proliferationsfördernd wirkt und IL-1 $\beta$ -induzierter Apoptose durch Hemmung der iNOS-Induktion entgegenwirken kann [111;112].

ECL-Zellen wurden daher für 24 h mit TNF- $\alpha$  und mit TNF- $\alpha$  in Kombination mit bFGF inkubiert (Abb. 27):



**Abb. 27:** Apoptose-Rate von ECL-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  bzw. nach gleichzeitiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  und bFGF (TUNEL). \*1: signifikant vs. basal,  $p < 0,05$ , \*2: signifikant vs. TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,05$

Dabei entsprachen die Apoptose-Rate unter Ruhebedingungen und unter TNF- $\alpha$ -Stimulation den beobachteten Werten. Der Wachstumsfaktor bFGF war in der physiologischen Konzentration 2 ng/mL in der Lage, die durch TNF- $\alpha$  verursachte Apoptose signifikant auf das basale Niveau zu reduzieren.



**Abb. 28:** NFκB-Heterodimer-DNA-Komplex  
Biomolecules Gallery, 1VKX

## Diskussion

Chronische Infektion mit *H. pylori* ist mit einer verminderten gastralen Säuresekretion verbunden, die durch pro-inflammatorische Zytokine verursacht sein könnte, die im Rahmen der Infektion sezerniert werden. Frühere Studien konnten keinen direkten Effekt von TNF- $\alpha$  auf Parietalzellen zeigen [178], neuere am Modell des perfundierten Rattenmagens und der isolierten Parietalzellen in vitro gewonnene Ergebnisse sprechen jedoch für eine direkte Inhibition der Säuresekretion [131] und einen pro-apoptotischen Effekt auf die Parietalzellen [125]. Zusätzlich ist eine indirekte Wirkung auf die Säuresekretion der Parietalzellen durch TNF- $\alpha$  wahrscheinlich, indem die Histamin-Sekretion der ECL-Zellen vermindert wird und so die Histamin-Ausschüttung im Magen sinkt, was zu erniedrigter Säuresekretion und Mukosa-Atrophie führt. Dieser Wirkmechanismus wird durch die Erkenntnis gestützt, dass TNF- $\alpha$  die Funktion von anderen neuroendokrinen Zellen inhibiert und ihren programmierten Zelltod induziert, wie es etwa für Schilddrüsenzellen [136] oder die  $\beta$ -Zellen des Pankreas [185] nachgewiesen wurde.

### 1. Wirkung von TNF- $\alpha$ auf ECL-Zellen

Die vorgestellten Daten zeigen klar, dass ECL-Zellen TNF-R1 exprimieren, wohingegen TNF-R2 nicht nachgewiesen werden konnte. Weiterhin konnte die Gegenwart von CD95 (Fas-Rezeptor, RT-PCR und ICC) und DR4 (Western Blot) auf ECL-Zellen ausgeschlossen werden. Die Abwesenheit anderer pro-apoptotischer Signaltransduktionswege bei ECL-Zellen unterstreicht die Bedeutung von TNF- $\alpha$  und TNF-R1 bei der chronischen Entzündung durch *H. pylori*-Infektion. Der Nachweis der Expression von TNF-R1 alleine erlaubt jedoch keinen Schluss auf die Existenz einer anti- oder

pro-apoptotischen Wirkung von TNF- $\alpha$  [173]. Bei TNF-R1 handelt es sich um einen transmembranären Rezeptor ohne eigene Kinase-Domäne. Er übt seine Wirkung auf die Zielzelle mittels der sogenannten „death domain“ (Todes-Domäne, DD) aus. Zytoplasmatische Adapter-Proteine, die ebenfalls eine DD tragen, binden an den aktivierten Rezeptor und induzieren unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden [47;179;183]. Eines der Adapter-Proteine, das am Anfang eines pro-apoptotischen Signalweges steht, ist TRAF2. Dieses Protein ist bei der durch TNF- $\alpha$  angestoßenen Aktivierung von NF $\kappa$ B von besonderer Bedeutung [82;86;100]. Mittels Western Blotting konnte in der vorliegenden Arbeit TRAF2-Protein in ECL-Zellen und somit die Möglichkeit nachgewiesen werden, dass eine Vermittlung der TNF- $\alpha$ -Wirkungen über den TRAF2-assoziierten Signalweg zu einer NF $\kappa$ B-Aktivierung führen kann.

Die Inkubation isolierter ECL-Zellen mit TNF- $\alpha$  führte binnen 24 h zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose. Wegen des Fehlens von TNF-R2 konnte bei den Versuchen humanes rekombinantes TNF- $\alpha$  verwendet werden, von dem bekannt ist, dass es bei Ratten nur an TNF-R1 bindet [49]. Der pro-apoptotische Effekt von TNF- $\alpha$  war konzentrationsabhängig, wobei bei einer Dosis von 25 ng/mL TNF- $\alpha$  eine zwei- bis dreifache Erhöhung der Apoptose-Rate beobachtet wurde. Dabei ergaben die etablierte Bestimmung mittels TUNEL und die objektiv auswertbare ELISA-Methode identische Resultate. Da letztere Methode auch abgeschwommene apoptotische Zellen im KM-Überstand mit erfasst, konnte eine falsch-niedrige Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen aufgrund dieses Faktors ausgeschlossen werden. Zeitrahmen und Konzentration, die eine optimale TNF- $\alpha$ -Wirkung zur Folge hatten, sind dabei in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten, die TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose bei Tumorzellen des Pankreas [162] und Magenepithelzellen [167;176] untersucht hatten. Der überprüfte Dosisbereich von TNF- $\alpha$  entspricht Werten, wie sie unter den pathophysiologischen Bedingungen einer chronischen Gastritis beobachtet werden [57;78;130].

Auch wenn nur eine Subgruppe von ECL-Zellen (25 %) nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  den programmierten Zelltod einleitete, kann dieser Effekt den physiologischen Bedingungen im Magen entsprechen. Zunächst beziehen sich alle vorgestellten Ergebnisse auf *in vitro* gewonnene Daten, so dass eine stärkere Ausprägung der Befunde *in vivo* im Zuge einer lebenslangen Infektion mit *Helicobacter pylori* vorstellbar ist. Eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass nur ein Teil der Zellen apoptotisch

wird, könnte eine unterschiedliche Suszeptibilität während des Lebenszyklus der ECL-Zelle darstellen, der ca. 60 Tage dauert [180].

Die Induktion von Apoptose durch TNF- $\alpha$  war weiterhin signifikant stärker als die in früheren Studien mit IL-1 $\beta$  (100 pg/mL, 24 h) beobachtete [111]. Die große physiologische Bedeutung des letzteren Zytokins konnte bereits gezeigt werden, da es imstande ist, die Histamin-Ausschüttung der ECL-Zellen komplett zu inhibieren [140]. Weiterhin weisen Patienten mit Polymorphismen im IL-1 $\beta$ -Promotor ein erhöhtes Risiko auf, am Adenocarcinom des Magens zu erkranken [54]. Da TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  im Zuge der chronischen Gastritis freigesetzt werden, ist eine wichtige Rolle beider Zytokine bei der Entstehung der hypoaziden Verhältnisse wahrscheinlich.

Zusätzlich wurden die Auswirkungen von IFN- $\gamma$  auf die ECL-Zell-Funktion untersucht. In früheren Studien konnte eine Potenzierungswirkung von IFN- $\gamma$  hinsichtlich TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose beobachtet werden [79;135;162]. ECL-Zellen wurden daher in der vorliegenden Arbeit mit IFN- $\gamma$  in unterschiedlichen physiologischen Konzentrationen oder eine Kombination von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  inkubiert. Obwohl beide Untereinheiten des IFN- $\gamma$ -R auf der ECL-Zelle nachgewiesen werden konnten, induzierte der Ligand weder alleine Apoptose noch war eine Potenzierung der TNF- $\alpha$ -Wirkung festzustellen. Möglicherweise sind diese Beobachtungen dadurch zu erklären, dass der auf Transkriptions- und Proteinebene nachgewiesene IFN- $\gamma$ -R der ECL-Zelle nicht funktional ist. Als alternative Erklärung könnte eine fehlende Interaktion zwischen dem in der ECL-Zelle von IFN- $\gamma$  und dem von TNF- $\alpha$  genutzten Signaltransduktionsweg dienen. Dieser wurde daher im weiteren Verlauf der Arbeit genauer untersucht.

## **2. Signaltransduktion des pro-apoptischen Effektes von TNF- $\alpha$ durch NF $\kappa$ B**

Für TNF- $\alpha$  sind aus der Literatur mehrere voneinander getrennte Signaltransduktionswege bekannt, unter anderem die Aktivierung von Effektor-Caspasen, die Produktion von Ceramid oder die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den anti- und pro-apoptischen Proteinen bcl-2 und bax [37;93;108]. Weiterhin kann TNF- $\alpha$  eine Aktivierung von NF $\kappa$ B bewirken. Dieser Transkriptionsfaktor ist sowohl in die Regulation der Sequenzen von Genprodukten involviert, die bei entzündlichen Vorgängen vermehrt gebildet werden, als auch in die Regulation von Überlebensgenen. In den vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der ECL-Zellen mittels TNF- $\alpha$  zur Aktivierung von NF $\kappa$ B führt.

Nach der Bindung von TRAF2 an TNF-R1 wird auf dem in der Aktivierung von NFκB resultierenden Signalweg eine Kinasen-Kaskade angestoßen, die in der Phosphorylierung von IκB, seiner raschen Ubiquitinierung und Degradation endet. Beide am Anfang dieses Pathways stehenden Proteine konnten bei den ECL-Zellen nachgewiesen werden. In semiquantitativen Western Blots konnte weiter die rasche Abnahme der Menge von unphosphoryliertem IκBα bereits 10 min nach Zugabe von TNF-α demonstriert werden, was auf den Abbau von IκBα und die nachfolgende Aktivierung von NFκB hindeutet. Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Studien überein, die eine schnelle Phosphorylierung von IκB an Ser32 und Ser36 und die auf den Abbau von IκBα folgende Translokation von NFκB in den Nucleus zeigen konnten [25;182]. Die Freisetzung von NFκB aus dem inaktivierenden IκB/NFκB-Komplex konnte weiterhin mittels EMSA-Experimenten direkt gezeigt werden. Wegen der geringen aus dem Probenvolumen zu gewinnenden Proteinmengen wurden dabei wie in mehreren Vorarbeiten die Proteinextrakte ganzer Zellen verwendet [21;77]. Bei unstimulierten ECL-Zellen war eine Grundaktivität von NFκB zu beobachten, die als konstitutionelle Aktivierung oder als Reaktion auf den durch die Zellpräparation verursachten Stress gewertet werden kann. Für letztere Sichtweise spricht, dass bei unstimulierten Zellen in Übereinstimmung mit der NFκB-Aktivität eine basale Apoptose-Rate beobachtet werden konnte. Innerhalb der ersten Stunde nach der Stimulation mit TNF-α stieg die Aktivität von NFκB signifikant an. Die NFκB-Dimere bestanden dabei sowohl im Ruhezustand wie im TNF-α-aktivierten Zustand aus den Untereinheiten p50 und p65, nicht aber aus der Untereinheit p52. Aufgrund fehlender Antikörper für die weiteren bekannten Untereinheiten konnte zwar nicht ausgeschlossen werden, dass auch diese zu einem Teil an NFκB-Komplexen in ECL-Zellen beteiligt sind. Diese Möglichkeit erscheint aber wegen der hohen Signalintensität in den p50- und p65-Supershift-Versuchen von untergeordneter Bedeutung zu sein.

In Folgeexperimenten wurden die Auswirkungen von Proteasom-Inhibitoren untersucht, die geeignet sind, die Aktivierung von NFκB im Verlauf der ECL-Zell-Apoptose zu hemmen. Bei den Stoffen MG132 und PSI handelt es sich um spezifische Inhibitoren der Chymotrypsin-verwandten Aktivität des 20S- und 26S-Proteasoms, die als etablierte Prüfsubstanzen für die funktionale Bedeutung von NFκB eingesetzt werden [58;85]. Beide verhindern den Abbau des phosphorylierten und ubiquitinierten IκBα und so die Freisetzung von NFκB und seine Translokation in den Nucleus. Dabei sind sie allerdings nicht spezifisch für IκB, sondern verhindern

den Abbau aller durch das Ubiquitin-Proteasom-System degradierten Proteine. Im Stimulationsversuch konnte mit Hilfe von MG132 und PSI die pro-apoptotische Wirkung von TNF- $\alpha$  vollständig aufgehoben werden (TUNEL, ELISA). PSI verminderte weiterhin die NF $\kappa$ B-Bindung an seine Zielsequenz, wie im EMSA gezeigt werden konnte. In Transfektions-Experimenten, bei denen durch Zugabe von spezifischen AS-ODN die Translation und Expression der p65-Untereinheit des NF $\kappa$ B-Komplexes verhindert wurde, konnte die TNF- $\alpha$ -Wirkung auf die Apoptose der ECL-Zellen vollständig aufgehoben werden (TUNEL). Die p65-Untereinheit, die in einem hohen Prozentsatz der NF $\kappa$ B-Dimere – p50/p65-Heterodimere gelten als klassische Form von NF $\kappa$ B – vorhanden ist [7], scheint somit auch bei ECL-Zellen von besonderer funktionaler Bedeutung zu sein. Insgesamt deuten alle genannten Daten auf eine pro-apoptotische Rolle von NF $\kappa$ B bei der TNF- $\alpha$ -induzierten Apoptose der ECL-Zellen hin.

### **3. TNF- $\alpha$ induziert wie IL-1 $\beta$ Apoptose durch Erzeugung von NO**

Befunde aus Vorarbeiten zeigen, dass NF $\kappa$ B abhängig vom Zelltyp und den Versuchsbedingungen unterschiedliche Wirkungen ausübt. In Bezug auf die Apoptose kann es beispielsweise den programmierten Zelltod fördern oder aber Zellen vor der Apoptose retten [89]. Sogar bei einem einzigen Zelltyp kann NF $\kappa$ B je nach eingesetzten Versuchsbedingungen unterschiedliche Funktionen ausüben [102]. Von NF $\kappa$ B ist bekannt, dass es in verschiedenen Geweben anti-apoptotisch wirkt [7;15;100;108;181]. ODN, die an NF $\kappa$ B-Bindungsstellen auf der Zell-DNA binden und so dessen Wirkung aufheben konnten, verminderten die Apoptose-Rate einer Zelllinie aus Prostata-Krebszellen [103] und die virus-induzierte Apoptose menschlicher Hepatom-Zellen [114].

Auch der zytokin-induzierte pro-apoptotische Effekt konnte für eine Reihe von Zellarten gezeigt werden [67;80;87;122;145]. Die durch TNF- $\alpha$  hervorgerufene Apoptose in Zelllinien aus dem Knochenmark [83] und in MC3T3-E1-Zellen, die aus Osteoblasten gewonnen worden waren [93], war nachweislich von einer Aktivierung von NF $\kappa$ B begleitet. In der letztgenannten Arbeit konnten 5 min nach erfolgter Behandlung mit TNF- $\alpha$  eine Aktivierung von NF $\kappa$ B in der perinukleären Gegend und innerhalb von 15 min eine Translokation von NF $\kappa$ B in den Nucleus beobachtet werden. Claudio *et al.* [36] zeigten die funktionale Verbindung von NF $\kappa$ B mit der TNF- $\alpha$ -abhängigen Apoptose. Diese Arbeitsgruppe beobachtete, dass WEHI 164-Zellen bis

zu 6 h nach TNF- $\alpha$ -Stimulation vor der Apoptose gerettet werden konnten, wenn NF $\kappa$ B wieder in inaktivierter Form in das Zytoplasma transportiert wurde. Ohne diese Maßnahme genügten 15 min TNF- $\alpha$ -Stimulation, um die Apoptose zu induzieren. Die genannten Arbeiten stützen die Bedeutung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B für TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose, wie sie durch die vorliegenden Daten gezeigt wurde. Die Rolle von NF $\kappa$ B in den ECL-Zellen des Magens ähnelt dabei der bei anderen endokrinen Zellen, etwa den  $\beta$ -Zellen des Pankreas.

Einer der durch NF $\kappa$ B angestoßenen Stoffwechselwege, die letztendlich zur Apoptose der Zellen führen, könnte die Erzeugung von NO sein. IL-1 $\beta$  führt über einen IRAK- und TRAF6-abhängigen Transduktionsweg zur Aktivierung von NIK und damit wie in unseren Ergebnissen für TNF- $\alpha$  beobachtet zu einer Aktivierung von NF $\kappa$ B. Bei ECL-Zellen und pankreatischen  $\beta$ -Zellen unterbleibt die nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  beobachtete Apoptose, wenn die Generierung von NO durch den NO-Synthase-Hemmer L-NMMA spezifisch gehemmt wird [53;111]. Auch in unseren Versuchen konnte durch Inkubation mit L-NMMA die TNF- $\alpha$ -Wirkung vollständig inhibiert werden, was für eine kausale Bedeutung der NO-Synthese für den pro-apoptischen Effekt spricht.

Von TNF- $\alpha$  ist bekannt, dass es in der Magenmucosa die Expression von iNOS induziert [133], die für diesen Vorgang verantwortlichen Zellen waren aber bisher nicht bekannt. Bei  $\beta$ -Zellen ist die pro-apoptische Wirkung der NF $\kappa$ B-Aktivierung offenbar durch die Induktion von iNOS und die Erzeugung von NO vermittelt [50]. Die Promotor-Region des iNOS-Genes der Ratte (GenBank Zugriffsnummer D84101) enthält die NF $\kappa$ B-Konsensus-Sequenz (5' – G G R N N Y Y C C – 3') vier Mal an den Positionen 71-79, 134-142, 888-896 and 930-938. Dies unterstreicht die funktionale Bedeutung von NF $\kappa$ B für die iNOS-Transkription. Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass iNOS bereits 3 h nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  durch die ECL-Zellen exprimiert wird und daher eines der Schlüsselenzyme für den durch das Zytokin vermittelten programmierten Zelltod darstellt. Damit könnte die beobachtete Apoptose auf die Erzeugung von NO zurückgeführt werden.

#### **4. Die Wirkung von TNF- $\alpha$ kann durch bFGF antagonisiert werden**

Im pathophysiologischen Milieu der chronischen Gastritis sind ECL-Zellen in vivo einer Vielzahl von Zytokinen ausgesetzt, deren Wirkung mit der von TNF- $\alpha$  interagieren kann. Aufgrund der erhöhten Spiegel von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bei chronischer Heli-

cobacter-Infektion [130;140;186] wäre in Anbetracht der in vitro gewonnenen Daten zu erwarten, dass bei einem Großteil der ECL-Zellen Apoptose auftritt. Dennoch liegt bei CAG in vivo eine Hyperplasie der ECL-Zellen vor.

Diese Beobachtung lässt sich durch das gleichzeitige Einwirken anti-apoptotischer Zytokine wie des Wachstumsfaktors bFGF erklären. Von ihm ist bekannt, dass er bei ECL-Zellen die Proliferation steigern kann und in ECL-Zell-Mikroclustern als autokriner Wachstumsfaktor wirkt [19]. Nach Inkubation mit bFGF ist zudem eine gesteigerte Expression des Faktors bcl-2 durch ECL-Zellen zu beobachten, der pro-apoptotische Effekte antagonisieren kann [112]. So ist bFGF in physiologischer Konzentration in der Lage, durch IL-1 $\beta$  induzierte Apoptose bei ECL-Zellen zu verhindern [111]. Unsere Daten zeigen, dass dies auch für TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose gilt. 2 ng/mL bFGF genügte, um die pro-apoptotische Wirkung von TNF- $\alpha$  signifikant zu senken und auf das basale Niveau zu reduzieren.

Aufgrund der in vivo beobachteten Hypertrophie ist daher davon auszugehen, dass die pro-apoptotische Wirkung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  durch anti-apoptotische Faktoren wie bFGF aufgehoben wird. Die erniedrigte Histaminkonzentration ist somit nicht durch Apoptose der ECL-Zellen verursacht, sondern kann durch eine funktionelle Beeinträchtigung der Histamin-Ausschüttung in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  und des durch die ECL-Zellen selbst vermehrt produzierten Prostaglandin E2 erklärt werden [106;111;140]. Zusätzlich wird die verminderte Säuresekretion durch direkte Wirkung von *Helicobacter pylori*, der sezernierten Bakterienprodukte und der pro-inflammatorischen Zytokine auf die Parietalzellen erklärt [125;126].

## **5. Übertragbarkeit der Befunde auf die *Helicobacter*-assoziierte Gastritis**

Die Besiedelung der Magenmukosa durch *H. pylori* führt zu einer chronischen Entzündung, die Einfluss auf die sekretorische und proliferative Aktivität epithelialer und endokriner Zellen ausübt [29]. In der gesunden menschlichen Magenmukosa ist normalerweise kein TNF- $\alpha$  zu finden. In Folge einer chronischen *Helicobacter*-Infektion steigt seine lokale Expression signifikant an [17;39;40], zusätzlich liegt das Zytokin in signifikant erhöhter Konzentration in Magenflüssigkeit und Serum vor [117]. Diese Befunde konnten im Tiermodell, etwa bei Primaten [75], aber auch beim Menschen bestätigt werden [43]. Die Produktion von TNF- $\alpha$  findet dabei direkt im betroffenen Magengewebe statt [101] und korreliert eng mit dem Grad der Kolonisierung und der histologischen Veränderungen [186].

Die klinische Bedeutung der pro-inflammatorischen Zytokine wird weiter dadurch unterstrichen, dass im Zusammenspiel mit den Virulenzfaktoren der Bakterienstämme genetische Faktoren des Wirtsorganismus von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Immunantwort und damit für das Outcome der Infektion sind [43;147]. Zusätzlich zu IL-1 $\beta$ -Polymorphismen [54;55] konnten auch TNF- $\alpha$ -Polymorphismen als wichtiger Risikofaktor identifiziert werden [56]. Weitere Befunde für eine wichtige Rolle von TNF- $\alpha$  hinsichtlich der Pathogenese einer chronischen Gastritis liefern Experimente mit TNF- $\alpha$ -Knockout-Mäusen [76].

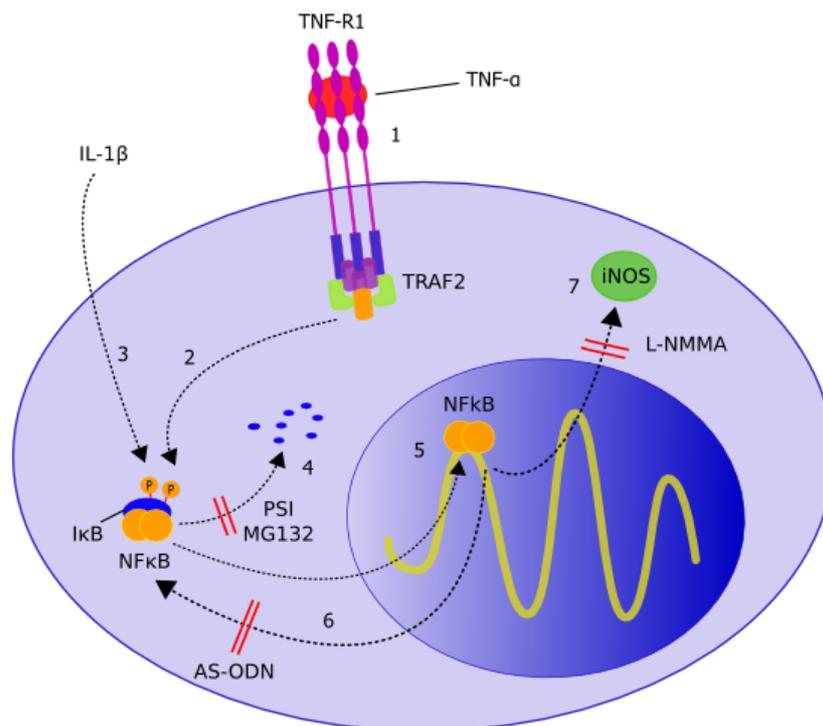
TNF- $\alpha$ , das grundsätzlich abhängig von Kontext und Zielzellen pro- oder anti-apoptotische Effekte haben und auch ganz ohne Wirkung auf die Apoptose bleiben kann, wirkt im von uns untersuchten Modell der isolierten ECL-Zellen pro-apoptotisch. Für eine Übertragbarkeit dieses Ergebnisses auf die Verhältnisse in vivo sprechen neben der grundsätzlichen pathophysiologischen Bedeutung von TNF- $\alpha$  auch Befunde bei Parietalzellen: Die NF $\kappa$ B-vermittelte pro-apoptotische TNF- $\alpha$ -Wirkung auf Primärzellkulturen entspricht hier derjenigen am Modell des perfundierten Rattenmagens [125]. Obwohl der experimentelle Ansatz der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Relevanz für die Situation im menschlichen Organismus prinzipiell nicht vollständig beantworten kann, machen die vorgestellten Befunde die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse also plausibel.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass ECL-Zellen in vivo im Milieu der chronischen Helicobacter-assoziierten Gastritis gleichzeitig pro- und anti-apoptotischen Faktoren ausgesetzt sind, wie es als Risikofaktor für die Ausbildung von NET des Magens diskutiert wird. Die pro-apoptotische Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die ECL-Zellen stellt damit einen Baustein im pathophysiologischen Modell der Helicobacter-assoziierten Gastritis dar. Obwohl hinsichtlich der Rolle der ECL-Zelle in diesem Milieu noch keine endgültige Aussage getroffen werden kann, stehen die gewonnenen Informationen im Kontext einer gut gesicherten Datenlage, die zeigt, dass die Infektion mit *Helicobacter pylori* – in Abhängigkeit von Pathogenitätsfaktoren des Bakteriums und genetischen Faktoren des Wirtsorganismus – zu Metaplasie, Atrophie und Carcinogenese führt. Dabei handelt es sich um keine statischen Befunde, sondern eine Indikation zur Helicobacter-Eradikation: Durch sie kann ein Sistieren der Progression [191] bzw. eine Umkehr der genannten Prozesse [123;124] erreicht werden.

The digestive processes and their reaction upon the nervous system sap our strength and colour our minds. Men go happy or miserable as they have healthy or unhealthy livers, or sound gastric glands.  
H.G. Wells, "The War of the Worlds"

## Zusammenfassung

Insgesamt erlauben die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse den Schluss, dass TNF- $\alpha$  direkte Wirkung auf die ECL-Zellen des Magens ausübt und bei diesen zum programmierten Zelltod führt. Eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  bewirkte innerhalb von 24 h dosisabhängig eine Apoptose von etwa 25 % der ECL-Zellen. IFN- $\gamma$  hatte trotz des Vorliegens beider Rezeptorketten keinen Effekt auf diese proapoptotische Wirkung, Rezeptoren für Fas-Ligand (CD95) und TRAIL (DR4) konnten nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 29:** Schematische Darstellung der nachgewiesenen Schritte, die zur pro-apoptotischen Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die ECL-Zelle führen.

Durch Bindung von TNF- $\alpha$  an TNF-R1 (1) wurde TRAF2-abhängig innerhalb von 10 min die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  bewirkt (2). Wie für IL-1 $\beta$  bekannt (3) führt damit auch TNF- $\alpha$  innerhalb einer Stunde zu einer starken Steigerung der NF $\kappa$ B-Aktivität, wobei vornehmlich die NF $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 von Bedeutung

waren (5). Innerhalb von 3 h war eine Steigerung der iNOS-Expression nachzuweisen (7). Sowohl das Vorliegen von NF $\kappa$ B-Untereinheit p65 (6), die Degradation von I $\kappa$ B $\alpha$  (4) und die Bildung von NO durch iNOS (7) waren von kausaler Bedeutung für die Auslösung der Apoptose – wurden diese Schritte unterbunden, blieb die Apoptose-Rate der ECL-Zellen auf dem basalen Niveau.

Diese Erkenntnisse unterstreichen die Tatsache, dass ECL-Zellen ein Ziel entzündungsfördernder Zytokine darstellen und damit eine Schlüsselrolle bei der Genese der verminderten Magensäure-Sekretion innehaben. Damit sind sie auch bei der Entstehung der atrophischen Gastritis und der Entwicklung von Magentumoren von Bedeutung.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Christian Prinz für die großzügige Überlassung des Themas sowie für seine Diskussionsbereitschaft und seine in jeder Hinsicht hilfreiche Unterstützung, die entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. DDr. h. c. Meinhard Classen, II. Medizinische Klinik, Klinikum Rechts der Isar, München, für die Möglichkeit, die Experimente mit den Mitteln und in den Räumen seiner Klinik durchzuführen, und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Roland Schmid dafür, die Arbeit an seiner Klinik vollenden zu dürfen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für die Förderung der Arbeit gedankt.

Zu danken habe ich außerdem der Laborgemeinschaft (Dr. F. Ernst, Dr. M. Gerhard, H. Herrmuth, Dr. S. Mahr, Dr. B. Neu, N. Neumayer, Dr. A. Pohlinger, Dr. E. Presecan-Siedel, Dr. R. Rad und Dr. R. Zanner) für Kritik, Diskussionen und Hilfestellung bei technischen Fragen. Besonderer Dank gebührt Dr. S. Mahr für die Einarbeitung in die experimentellen Methoden, sowie Dr. F. Ernst, Dr. R. Rad und Dr. R. Zanner für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Stimmung.

Mein Dank gebührt auch den Kollegen und Freunden an meiner neuen Arbeitsstätte im UKE Hamburg und besonders Frau P. Danch und Frau U. Haupt, die mich auf den letzten Metern angefeuert haben.

Mein Bruder Johannes Huber hat mir während der ganzen Zeit in wissenschaftlichen wie menschlichen Fragen geholfen und ist es nie müde geworden, mich immer wieder neu zu motivieren.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern für die Ermöglichung meines Studiums und dafür, dass sie meine Pläne immer unterstützt haben. Sie, mein Bruder und meine Freunde haben mir immer beigestanden und mich zum Durchhalten bewogen.

## Bibliographie

1. Aggarwal,B.B. Apoptosis and nuclear factor-kappa B: a tale of association and dissociation. *Biochem. Pharmacol.* 60 (2000) 1033-1039.
2. Aggarwal,B.B., Shishodia,S., Ashikawa,K., Bharti,A.C. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* 1 (2002) 327-341.
3. Andersson,K., Hakanson,R., Mattsson,H., Ryberg,B., Sundler,F. Hyperplasia of histamine-depleted enterochromaffinlike cells in rat stomach using omeprazole and alpha-fluoromethylhistidine. *Gastroenterology.* 103 (1992) 897-904.
4. Asahara,M., Mushiake,S., Shimada,S., Fukui,H., Kinoshita,Y., Kawanami,C., Watanabe,T., Tanaka,S., Ichikawa,A., Uchiyama,Y., Narushima,Y., Takasawa,S., Okamoto,H., Tohyama,M., Chiba,T. Reg gene expression is increased in rat gastric enterochromaffin-like cells following water immersion stress. *Gastroenterology.* 111 (1996) 45-55.
5. Bader,T., Nettesheim,P. Tumor necrosis factor-alpha modulates the expression of its p60 receptor and several cytokines in rat tracheal epithelial cells. *J. Immunol.* 157 (1996) 3089-3096.
6. Baeuerle,P.A., Baltimore,D. I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science.* 242 (1988) 540-546.
7. Baeuerle,P.A., Baltimore,D. NF-kappa B: ten years after. *Cell.* 87 (1996) 13-20.
8. Baeuerle,P.A., Henkel,T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994) 141-179.
9. Baichwal,V.R., Baeuerle,P.A. Activate NF-kappa B or die? *Curr. Biol.* 7 (1997) R94-R96.
10. Baker,S.J., Reddy,E.P. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 17 (1998) 3261-3270.
11. Bakke,I., Qvigstad,G., Brenna,E., Sandvik,A.K., Waldum,H.L. Gastrin has a specific proliferative effect on the rat enterochromaffin-like cell, but not on the parietal cell: a study by elutriation centrifugation. *Acta Physiol. Scand.* 169 (2000) 29-37.
12. Bakke,I., Qvigstad,G., Sandvik,A.K., Waldum,H.L. The CCK-2 receptor is located on the ECL cell, but not on the parietal cell. *Scand. J. Gastroenterol.* 36 (2001) 1128-1133.
13. Banner,D.W., D'Arcy,A., Janes,W., Gentz,R., Schoenfeld,H.J., Broger,C., Loetscher,H., Lesslauer,W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF

- receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*. 73 (1993) 431-445.
14. Beg,A.A., Baldwin,A.S., Jr. The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev*. 7 (1993) 2064-2070.
  15. Beg,A.A., Baltimore,D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science*. 274 (1996) 782-784.
  16. Bektas,H., Langer,F., Piso,P., Werner,U., Musholt,T.J., Lehner,F., Becker,T., Klemphauer,J. Neuroendocrine tumors of the stomach. Surgery therapy and prognosis. *Chirurg*. 73 (2002) 331-335.
  17. Bodger,K., Crabtree,J.E. Helicobacter pylori and gastric inflammation. *Br. Med. Bull*. 54 (1998) 139-150.
  18. Borch,K., Renvall,H., Liedberg,G. Gastric endocrine cell hyperplasia and carcinoid tumors in pernicious anemia. *Gastroenterology*. 88 (1985) 638-648.
  19. Bordi,C., Falchetti,A., Buffa,R., Azzoni,C., D'Adda,T., Caruana,P., Rindi,G., Brandi,M.L. Production of basic fibroblast growth factor by gastric carcinoid tumors and their putative cells of origin. *Hum. Pathol*. 25 (1994) 175-180.
  20. Bordi,C., Yu,J.Y., Baggi,M.T., Davoli,C., Pilato,F.P., Baruzzi,G., Gardini,G., Zamboni,G., Franzin,G., Papotti,M. Gastric carcinoids and their precursor lesions. A histologic and immunohistochemical study of 23 cases. *Cancer*. 67 (1991) 663-672.
  21. Bork,P.M., Schmitz,M.L., Kuhnt,M., Escher,C., Heinrich,M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett*. 402 (1997) 85-90.
  22. Bours,V., Dejardin,E., Goujon-Letawe,F., Merville,M.P., Castronovo,V. The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines. *Biochem. Pharmacol*. 47 (1994) 145-149.
  23. 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.
  24. Brenna,E., Waldum,H.L. Studies of isolated parietal and enterochromaffin-like cells from the rat. *Scand. J. Gastroenterol*. 26 (1991) 1295-1306.
  25. Brown,K., Gerstberger,S., Carlson,L., Franzoso,G., Siebenlist,U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 267 (1995) 1485-1488.
  26. Brundler,R., Gebbers,J.O., Criblez,D. Gastric carcinoid--pathogenesis and treatment. *Schweiz. Med. Wochenschr*. 129 (1999) 945-950.

27. Bufler,J., Choi,G.C., Franke,C., Schepp,W., Prinz,C. Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> currents in rat gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* 274 (1998) C424-C429.
28. Cadiot,G., Laurent-Puig,P., Thuille,B., Lehy,T., Mignon,M., Olschwang,S. Is the multiple endocrine neoplasia type 1 gene a suppressor for fundic argyrophil tumors in the Zollinger-Ellison syndrome? *Gastroenterology.* 105 (1993) 579-582.
29. Calam,J., Gibbons,A., Healey,Z.V., Bliss,P., Arebi,N. How does Helicobacter pylori cause mucosal damage? Its effect on acid and gastrin physiology. *Gastroenterology.* 113 (1997) S43-S49.
30. Capella,C., Vassallo,G., Solcia,E. Light and electron microscopic identification of the histamine-storing argyrophil (ECL) cell in murine stomach and of its equivalent in other mammals. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 118 (1971) 68-84.
31. Carney,J.A., Go,V.L., Fairbanks,V.F., Moore,S.B., Alport,E.C., Nora,F.E. The syndrome of gastric argyrophil carcinoid tumors and nonantral gastric atrophy. *Ann. Intern. Med.* 99 (1983) 761-766.
32. Carswell,E.A., Old,L.J., Kassel,R.L., Green,S., Fiore,N., Williamson,B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72 (1975) 3666-3670.
33. Chan,C.B., Soll,A.H. Role of the cholinergic nervous system in acid secretion. *Pharmacology.* 37 Suppl 1:17-21. (1988) 17-21.
34. Chen,D., Monstein,H.J., Nylander,A.G., Zhao,C.M., Sundler,F., Hakanson,R. Acute responses of rat stomach enterochromaffinlike cells to gastrin: secretory activation and adaptation. *Gastroenterology.* 107 (1994) 18-27.
35. Chen,F.E., Ghosh,G. Regulation of DNA binding by Rel/NF-kappaB transcription factors: structural views. *Oncogene.* 18 (1999) 6845-6852.
36. Claudio,E., Segade,F., Wrobel,K., Ramos,S., Bravo,R., Lazo,P.S. Molecular mechanisms of TNFalpha cytotoxicity: activation of NF-kappaB nuclear translocation. *Exp. Cell Res.* 224 (1996) 63-71.
37. Cohen,M.C., Cohen,S. Cytokine function: a study in biologic diversity. *Am. J. Clin. Pathol.* 105 (1996) 589-598.
38. Cohn,D.V., Elting,J.J., Frick,M., Elde,R. Selective localization of the parathyroid secretory protein-I/adrenal medulla chromogranin A protein family in a wide variety of endocrine cells of the rat. *Endocrinology.* 114 (1984) 1963-1974.
39. Crabtree,J.E. Gastric mucosal inflammatory responses to Helicobacter pylori. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1:29-37. (1996) 29-37.
40. Crabtree,J.E., Shallcross,T.M., Heatley,R.V., Wyatt,J.I. Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with Helicobacter pylori associated gastritis. *Gut.* 32 (1991) 1473-1477.

41. Creutzfeldt,W. Carcinoid tumors: development of our knowledge. *World J. Surg.* 20 (1996) 126-131.
42. D'Adda,T., Keller,G., Bordi,C., Hofler,H. Loss of heterozygosity in 11q13-14 regions in gastric neuroendocrine tumors not associated with multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *Lab Invest.* 79 (1999) 671-677.
43. D'Ellos,M.M., Amedei,A., Benagiano,M., Azzurri,A., Del Prete,G. Helicobacter pylori, T cells and cytokines: the "dangerous liaisons". *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 44 (2005) 113-119.
44. D'haens,G., Van Deventer,S., Van Hogezaand,R., Chalmers,D., Kothe,C., Baert,F., Braakman,T., Schaible,T., Geboes,K., Rutgeerts,P. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumor necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European multicenter trial. *Gastroenterology.* 116 (1999) 1029-1034.
45. Date,Y., Nakazato,M., Yamaguchi,H., Kangawa,K., Kinoshita,Y., Chiba,T., Ueta,Y., Yamashita,H., Matsukura,S. Enterochromaffin-like cells, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. *Endocrinology.* 140 (1999) 2398-2404.
46. Debelenko,L.V., Emmert-Buck,M.R., Zhuang,Z., Epshteyn,E., Moskaluk,C.A., Jensen,R.T., Liotta,L.A., Lubensky,I.A. The multiple endocrine neoplasia type I gene locus is involved in the pathogenesis of type II gastric carcinoids. *Gastroenterology.* 113 (1997) 773-781.
47. Declercq,W., Denecker,G., Fiers,W., Vandenabeele,P. Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J. Immunol.* 161 (1998) 390-399.
48. Ding,G.J., Fischer,P.A., Boltz,R.C., Schmidt,J.A., Colaianne,J.J., Gough,A., Rubin,R.A., Miller,D.K. Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28897-28905.
49. Dopp,J.M., Mackenzie-Graham,A., Otero,G.C., Merrill,J.E. Differential expression, cytokine modulation, and specific functions of type-1 and type-2 tumor necrosis factor receptors in rat glia. *J. Neuroimmunol.* 75 (1997) 104-112.
50. Dupraz,P., Cottet,S., Hamburger,F., Dolci,W., Felley-Bosco,E., Thorens,B. Dominant negative MyD88 proteins inhibit interleukin-1beta/Interferon-gamma-mediated induction of nuclear factor kappa B-dependent nitrite production and apoptosis in beta cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 37672-37678.
51. Eck,M.J., Beutler,B., Kuo,G., Merryweather,J.P., Sprang,S.R. Crystallization of trimeric recombinant human tumor necrosis factor (cachectin). *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12816-12819.

52. Eck,M.J., Sprang,S.R. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 17595-17605.
53. Eizirik,D.L., Bjorklund,A., Welsh,N. Interleukin-1-induced expression of nitric oxide synthase in insulin-producing cells is preceded by c-fos induction and depends on gene transcription and protein synthesis. *FEBS Lett.* 317 (1993) 62-66.
54. El-Olmar,E.M., Carrington,M., Chow,W.H., McColl,K.E., Bream,J.H., Young,H.A., Herrera,J., Lissowska,J., Yuan,C.C., Rothman,N., Lanyon,G., Martin,M., Fraumeni,J.F., Jr., Rabkin,C.S. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature.* 404 (2000) 398-402.
55. El Omar,E.M., Carrington,M., Chow,W.H., McColl,K.E., Bream,J.H., Young,H.A., Herrera,J., Lissowska,J., Yuan,C.C., Rothman,N., Lanyon,G., Martin,M., Fraumeni,J.F., Jr., Rabkin,C.S. The role of interleukin-1 polymorphisms in the pathogenesis of gastric cancer. *Nature.* 412 (2001) 99.
56. El Omar,E.M., Rabkin,C.S., Gammon,M.D., Vaughan,T.L., Risch,H.A., Schoenberg,J.B., Stanford,J.L., Mayne,S.T., Goedert,J., Blot,W.J., Fraumeni,J.F., Jr., Chow,W.H. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology.* 124 (2003) 1193-1201.
57. Fan,X.G., Chua,A., Fan,X.J., Keeling,P.W. Increased gastric production of interleukin-8 and tumour necrosis factor in patients with Helicobacter pylori infection. *J. Clin. Pathol.* 48 (1995) 133-136.
58. Figueiredo-Pereira,M.E., Berg,K.A., Wilk,S. A new inhibitor of the chymotrypsin-like activity of the multicatalytic proteinase complex (20S proteasome) induces accumulation of ubiquitin-protein conjugates in a neuronal cell. *J. Neurochem.* 63 (1994) 1578-1581.
59. Forgac,M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev.* 69 (1989) 765-796.
60. Fossmark,R., Martinsen,T.C., Qvigstad,G., Bendheim,M.O., Kopstad,G., Kashima,K., Waldum,H.L. Ultrastructure and chromogranin A immunogold labelling of ECL cell carcinoids. *APMIS.* 113 (2005) 506-512.
61. Fossmark,R., Zhao,C.M., Martinsen,T.C., Kawase,S., Chen,D., Waldum,H.L. Dedifferentiation of enterochromaffin-like cells in gastric cancer of hypergastrinemic cotton rats. *APMIS.* 113 (2005) 436-449.
62. Furness,J.B., Padbury,R.T., Baimbridge,K.G., Skinner,J.M., Lawson,D.E. Calbindin immunoreactivity is a characteristic of enterochromaffin-like cells (ECL cells) of the human stomach. *Histochemistry.* 92 (1989) 449-451.
63. Gaur,U., Aggarwal,B.B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 1403-1408.

64. Gerhard,M., Rad,R., Prinz,C., Naumann,M. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 7 Suppl 1:17-23. (2002) 17-23.
65. Gilligan,C.J., Lawton,G.P., Tang,L.H., West,A.B., Modlin,I.M. Gastric carcinoid tumors: the biology and therapy of an enigmatic and controversial lesion. *Am. J. Gastroenterol.* 90 (1995) 338-352.
66. Grimm,S., Baeuerle,P.A. The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem. J.* 290 (1993) 297-308.
67. Grimm,S., Bauer,M.K., Baeuerle,P.A., Schulze-Osthoff,K. Bcl-2 down-regulates the activity of transcription factor NF-kappaB induced upon apoptosis. *J. Cell Biol.* 134 (1996) 13-23.
68. Griscavage,J.M., Wilk,S., Ignarro,L.J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 3308-3312.
69. Hakanson,R., Bottcher,G., Ekblad,E., Panula,P., Simonsson,M., Dohlsten,M., Hallberg,T., Sundler,F. Histamine in endocrine cells in the stomach. A survey of several species using a panel of histamine antibodies. *Histochemistry*. 86 (1986) 5-17.
70. Hakanson,R., Bottcher,G., Ekblad,E., Panula,P., Simonsson,M., Dohlsten,M., Hallberg,T., Sundler,F. The ECL cells. in "Physiology of the gastrointestinal tract." Alpers,DH, Christensen,J, Jacobsen,ED, Walsh,JH (Eds.), Raven Press Ltd., New York, 1994, pp. 1171-1184.
71. Hakanson,R., Ding,X.Q., Norlen,P., Chen,D. Circulating pancreastatin is a marker for the enterochromaffin-like cells of the rat stomach. *Gastroenterology*. 108 (1995) 1445-1452.
72. Hakanson,R., Lilja,B., Owman,C. Cellular localization of histamine and monoamines in the gastric mucosa of man. *Histochemie*. 18 (1969) 74-86.
73. Hakanson,R., Owman,C. Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromaffin-like cells of gastric mucosa. *Life Sci.* 6 (1967) 759-766.
74. Hakanson,R., Owman,C., Sporrang,B., Sundler,F. Electron microscopic identification of the histamine-storing argyrophil (enterochromaffin-like) cells in the rat stomach. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 122 (1971) 460-466.
75. Harris,P.R., Smythies,L.E., Smith,P.D., Dubois,A. Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent Helicobacter pylori infection in nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 783-786.
76. Hasegawa,S., Nishikawa,S., Miura,T., Saito,Y., Madarame,H., Sekikawa,K., Tagawa,Y., Iwakura,Y., Nakane,A. Tumor necrosis factor-alpha is required for gastritis induced by Helicobacter felis infection in mice. *Microb. Pathog.* 37 (2004) 119-124.

77. Hehner,S.P., Heinrich,M., Bork,P.M., Vogt,M., Ratter,F., Lehmann,V., Schulze-Osthoff,K., Droge,W., Schmitz,M.L. Sesquiterpene lactones specifically inhibit activation of NF-kappa B by preventing the degradation of I kappa B-alpha and I kappa B-beta. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 1288-1297.
78. Heller,R.A., Kronke,M. Tumor necrosis factor receptor-mediated signaling pathways. *J. Cell Biol.* 126 (1994) 5-9.
79. Helseth,E., Torp,S., Dalen,A., Unsgaard,G. Effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on clonogenic growth of cell lines and primary cultures from human gliomas and brain metastases. *APMIS.* 97 (1989) 569-574.
80. Hettmann,T., DiDonato,J., Karin,M., Leiden,J.M. An essential role for nuclear factor kappaB in promoting double positive thymocyte apoptosis. *J. Exp. Med.* 189 (1999) 145-158.
81. Higham,A.D., Bishop,L.A., Dimaline,R., Blackmore,C.G., Dobbins,A.C., Varro,A., Thompson,D.G., Dockray,G.J. Mutations of RegIalpha are associated with enterochromaffin-like cell tumor development in patients with hypergastrinemia. *Gastroenterology.* 116 (1999) 1310-1318.
82. Hsu,H., Shu,H.B., Pan,M.G., Goeddel,D.V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell.* 84 (1996) 299-308.
83. Hu,X., Tang,M., Fisher,A.B., Olashaw,N., Zuckerman,K.S. TNF-alpha-induced growth suppression of CD34+ myeloid leukemic cell lines signals through TNF receptor type I and is associated with NF-kappa B activation. *J. Immunol.* 163 (1999) 3106-3115.
84. Hunt,R.H. The role of Helicobacter pylori in pathogenesis: the spectrum of clinical outcomes. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 220 (1996) 3-9.
85. Jensen,T.J., Loo,M.A., Pind,S., Williams,D.B., Goldberg,A.L., Riordan,J.R. Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing. *Cell.* 83 (1995) 129-135.
86. Jobin,C., Holt,L., Bradham,C.A., Streetz,K., Brenner,D.A., Sartor,R.B. TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J. Immunol.* 162 (1999) 4447-4454.
87. Jung,M., Zhang,Y., Lee,S., Ditschilo,A. Correction of radiation sensitivity in ataxia telangiectasia cells by a truncated I kappa B-alpha. *Science.* 268 (1995) 1619-1621.
88. Junqueira,L.C., Carneiro,J. "Histologie." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, <sup>4</sup>1996.
89. Kaltschmidt,B., Kaltschmidt,C., Hofmann,T.G., Hehner,S.P., Droge,W., Schmitz,M.L. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined

- by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3828-3835.
90. Kerr, J.F. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J. Pathol.* 105 (1971) 13-20.
  91. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26 (1972) 239-257.
  92. 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.
  93. Kitajima, I., Soejima, Y., Takasaki, I., Beppu, H., Tokioka, T., Maruyama, I. Ceramide-induced nuclear translocation of NF-kappa B is a potential mediator of the apoptotic response to TNF-alpha in murine clonal osteoblasts. *Bone.* 19 (1996) 263-270.
  94. Kolby, L., Wangberg, B., Ahlman, H., Jansson, S., Forssell-Aronsson, E., Erickson, J.D., Nilsson, O. Gastric carcinoid with histamine production, histamine transporter and expression of somatostatin receptors. *Digestion.* 59 (1998) 160-166.
  95. Kubota, H., Taguchi, Y., Tohyama, M., Matsuura, N., Shiosaka, S., Ishihara, T., Watanabe, T., Shiotani, Y., Wada, H. Electron microscopic identification of histidine decarboxylase-containing endocrine cells of the rat gastric mucosa. An immunohistochemical analysis. *Gastroenterology.* 87 (1984) 496-502.
  96. Kuipers, E.J., Klinkenberg-Knol, E.C., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B.J., Schenk, B.E., Meuwissen, S.G. Role of *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of atrophic gastritis. *Scand. J. Gastroenterol. Suppl.* 223:28-34. (1997) 28-34.
  97. Larsson, B., Norlen, P., Lindstrom, E., Zhao, D., Hakanson, R., Linde, A. Effects of ECL cell extracts and granule/vesicle-enriched fractions from rat oxyntic mucosa on cAMP and IP(3) in rat osteoblast-like cells. *Regul. Pept.* 106 (2002) 13-18.
  98. Lauffer, J.M., Modlin, I.M., Hinoue, T., Kidd, M., Zhang, T., Schmid, S.W., Tang, L.H. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide modulates gastric enterochromaffin-like cell proliferation in rats. *Gastroenterology.* 116 (1999) 623-635.
  99. Lauffer, J.M., Tang, L.H., Zhang, T., Hinoue, T., Rahbar, S., Odo, M., Modlin, I.M., Kidd, M. PACAP mediates the neural proliferative pathway of Mastomys enterochromaffin-like cell transformation. *Regul. Pept.* 102 (2001) 157-164.
  100. Lee, S.Y., Kaufman, D.R., Mora, A.L., Santana, A., Boothby, M., Choi, Y. Stimulus-dependent synergism of the antiapoptotic tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 (TRAF2) and nuclear factor kappaB pathways. *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1381-1384.

101. Lehmann,F.S., Terracciano,L., Carena,I., Baeriswyl,C., Drewe,J., Tornillo,L., De Libero,G., Beglinger,C. In situ correlation of cytokine secretion and apoptosis in Helicobacter pylori-associated gastritis. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (2002) G481-G488.
102. Lin,K.I., DiDonato,J.A., Hoffmann,A., Hardwick,J.M., Ratan,R.R. Suppression of steady-state, but not stimulus-induced NF-kappaB activity inhibits alphavirus-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 141 (1998) 1479-1487.
103. Lin,K.I., Lee,S.H., Narayanan,R., Baraban,J.M., Hardwick,J.M., Ratan,R.R. Thiol agents and Bcl-2 identify an alphavirus-induced apoptotic pathway that requires activation of the transcription factor NF-kappa B. *J. Cell Biol.* 131 (1995) 1149-1161.
104. Lindstrom,E., Bjorkqvist,M., Boketoft,A., Chen,D., Zhao,C.M., Kimura,K., Hakanson,R. Neurohormonal regulation of histamine and pancreastatin secretion from isolated rat stomach ECL cells. *Regul. Pept.* 71 (1997) 73-86.
105. Lindstrom,E., Hakanson,R. Prostaglandins inhibit secretion of histamine and pancreastatin from isolated rat stomach ECL cells. *Br. J. Pharmacol.* 124 (1998) 1307-1313.
106. Lindstrom,E., Lerner,U.H., Hakanson,R. Isolated rat stomach ECL cells generate prostaglandin E(2) in response to interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and bradykinin. *Eur. J. Pharmacol.* 416 (2001) 255-263.
107. Liptay,S., Schmid,R.M., Nabel,E.G., Nabel,G.J. Transcriptional regulation of NF-kappa B2: evidence for kappa B-mediated positive and negative autoregulation. *Mol. Cell Biol.* 14 (1994) 7695-7703.
108. Liu,Z.G., Hsu,H., Goeddel,D.V., Karin,M. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell.* 87 (1996) 565-576.
109. Locksley,R.M., Killeen,N., Lenardo,M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 104 (2001) 487-501.
110. Maekawa,T., Kinoshita,Y., Matsushima,Y., Okada,A., Fukui,H., Waki,S., Kishi,K., Kawanami,C., Nakata,H., Hassan,S., Wakatsuki,Y., Ota,H., Amano,K., Nakao,M., Chiba,T. Helicobacter pylori induces proinflammatory cytokines and major histocompatibility complex class II antigen in mouse gastric epithelial cells. *J. Lab. Clin. Med.* 130 (1997) 442-449.
111. Mahr,S., Neumayer,N., Gerhard,M., Classen,M., Prinz,C. IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein. *Gastroenterology.* 118 (2000) 515-524.
112. Mahr,S., Neumayer,N., Kolb,H.J., Schepp,W., Classen,M., Prinz,C. Growth factor effects on apoptosis of rat gastric enterochromaffin-like cells. *Endocrinology.* 139 (1998) 4380-4390.
113. Maini,R., St Clair,E.W., Breedveld,F., Furst,D., Kalden,J., Weisman,M., Smolen,J., Emery,P., Harriman,G., Feldmann,M., Lipsky,P. Infliximab

- (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet*. 354 (1999) 1932-1939.
114. Marianneau,P., Cardona,A., Edelman,L., Deubel,V., Despres,P. Dengue virus replication in human hepatoma cells activates NF-kappaB which in turn induces apoptotic cell death. *J. Virol.* 71 (1997) 3244-3249.
  115. McEwen,C.R., Stallard,R.W., Juhos,E.T. Separation of biological particles by centrifugal elutriation. *Anal. Biochem.* 23 (1968) 369-377.
  116. McLaughlin,J.T., Ai,W., Sinclair,N.F., Colucci,R., Raychowdhury,R., Koh,T.J., Wang,T.C. PACAP and gastrin regulate the histidine decarboxylase promoter via distinct mechanisms. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 286 (2004) G51-G59.
  117. Mehmet,N., Refik,M., Harputluoglu,M., Ersoy,Y., Aydin,N.E., Yildirim,B. Serum and gastric fluid levels of cytokines and nitrates in gastric diseases infected with Helicobacter pylori. *New Microbiol.* 27 (2004) 139-148.
  118. Modlin,I.M., Lawton,G.P., Miu,K., Kidd,M., Luque,E.A., Sandor,A., Tang,L.H. Pathophysiology of the fundic enterochromaffin-like (ECL) cell and gastric carcinoid tumours. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 78 (1996) 133-138.
  119. Modlin,I.M., Lawton,G.P., Tang,L.H., Geibel,J., Abraham,R., Darr,U. The mastomys gastric carcinoid: aspects of enterochromaffin-like cell function. *Digestion.* 55 Suppl 3:31-7. (1994) 31-37.
  120. Mouser,J.F., Hyams,J.S. Infliximab: a novel chimeric monoclonal antibody for the treatment of Crohn's disease. *Clin. Ther.* 21 (1999) 932-942.
  121. Naismith,J.H., Devine,T.Q., Brandhuber,B.J., Sprang,S.R. Crystallographic evidence for dimerization of unliganded tumor necrosis factor receptor. *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 13303-13307.
  122. Nakai,M., Qin,Z.H., Wang,Y., Chase,T.N. Free radical scavenger OPC-14117 attenuates quinolinic acid-induced NF-kappaB activation and apoptosis in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64 (1999) 59-68.
  123. Nardone,G., Rocco,A., Malfertheiner,P. Review article: helicobacter pylori and molecular events in precancerous gastric lesions. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 20 (2004) 261-270.
  124. Nardone,G., Staibano,S., Rocco,A., Mezza,E., D'armiento,F.P., Insabato,L., Coppola,A., Salvatore,G., Lucariello,A., Figura,N., De Rosa,G., Budillon,G. Effect of Helicobacter pylori infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut.* 44 (1999) 789-799.
  125. 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.* 65 (2003) 1755-1760.

126. Neu,B., Randlkofer,P., Neuhofer,M., Volland,P., Mayerhofer,A., Gerhard,M., Schepp,W., Prinz,C. Helicobacter pylori induces apoptosis of rat gastric parietal cells. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 283 (2002) G309-G318.
127. Neumann,H., Schmidt,H., Cavalie,A., Jenne,D., Wekerle,H. Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J. Exp. Med.* 185 (1997) 305-316.
128. Neurath,M.F., Becker,C., Barbulescu,K. Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut.* 43 (1998) 856-860.
129. Nilsson,O., Wangberg,B., Johansson,L., Modlin,I.M., Ahlman,H. *Praomys (Mastomys) natalensis*: a model for gastric carcinoid formation. *Yale J. Biol. Med.* 65 (1992) 741-751.
130. Noach,L.A., Bosma,N.B., Jansen,J., Hoek,F.J., van Deventer,S.J., Tytgat,G.N. Mucosal tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8 production in patients with Helicobacter pylori infection. *Scand. J. Gastroenterol.* 29 (1994) 425-429.
131. Nompleggi,D.J., Beinborn,M., Roy,A., Wolfe,M.M. The effect of recombinant cytokines on [14C]-aminopyrine accumulation by isolated canine parietal cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270 (1994) 440-445.
132. Oh,D.S., Lieu,S.N., Yamaguchi,D.J., Tachiki,K., Lambrecht,N., Ohning,G.V., Sachs,G., Germano,P.M., Pisegna,J.R. PACAP Regulation of Secretion and Proliferation of Pure Populations of Gastric ECL Cells. *J. Mol. Neurosci.* 26 (2005) 85-98.
133. Ohta,M., Tarnawski,A.S., Itani,R., Pai,R., Tomikawa,M., Sugimachi,K., Sarfeh,I.J. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology.* 27 (1998) 906-913.
134. Palombella,V.J., Rando,O.J., Goldberg,A.L., Maniatis,T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 78 (1994) 773-785.
135. Pandita,R., Pocsik,E., Aggarwal,B.B. Interferon-gamma induces cell surface expression for both types of tumor necrosis factor receptors. *FEBS Lett.* 312 (1992) 87-90.
136. Pang,X.P., Yoshimura,M., Hershman,J.M. Suppression of rat thyrotroph and thyroid cell function by tumor necrosis factor-alpha. *Thyroid.* 3 (1993) 325-330.
137. Perkins,N.D. Achieving transcriptional specificity with NF-kappa B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1997) 1433-1448.
138. Pisegna,J.R., Ohning,G.V., Athmann,C., Zeng,N., Walsh,J.H., Sachs,G. Role of PACAP1 receptor in regulation of ECL cells and gastric acid secretion by

- pituitary adenylate cyclase activating peptide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 921:233-41. (2000) 233-241.
139. Prinz,C., Kajimura,M., Scott,D.R., Mercier,F., Helander,H.F., Sachs,G. Histamine secretion from rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology.* 105 (1993) 449-461.
  140. Prinz,C., Neumayer,N., Mahr,S., Classen,M., Schepp,W. Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 beta. *Gastroenterology.* 112 (1997) 364-375.
  141. Prinz,C., Sachs,G., Walsh,J.H., Coy,D.H., Wu,S.V. The somatostatin receptor subtype on rat enterochromaffinlike cells. *Gastroenterology.* 107 (1994) 1067-1074.
  142. Prinz,C., Scott,D.R., Hurwitz,D., Helander,H.F., Sachs,G. Gastrin effects on isolated rat enterochromaffin-like cells in primary culture. *Am. J. Physiol.* 267 (1994) G663-G675.
  143. 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-C855.
  144. Prinz,C., Zanner,R., Gratzl,M. Physiology of gastric enterochromaffin-like cells. *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 371-382.
  145. Qin,Z.H., Chen,R.W., Wang,Y., Nakai,M., Chuang,D.M., Chase,T.N. Nuclear factor kappaB nuclear translocation upregulates c-Myc and p53 expression during NMDA receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J. Neurosci.* 19 (1999) 4023-4033.
  146. Queiroz,D.M., Mendes,E.N., Rocha,G.A., Cunha-Melo,J.R., Barbosa,A.J., Lima,G.F.J., Oliveira,C.A. Helicobacter pylori and gastric histamine concentrations. *J. Clin. Pathol.* 44 (1991) 612-613.
  147. 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 interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa. *J. Infect. Dis.* 188 (2003) 272-281.
  148. Regnier,C.H., Song,H.Y., Gao,X., Goeddel,D.V., Cao,Z., Rothe,M. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell.* 90 (1997) 373-383.
  149. Reuning,U., Wilhelm,O., Nishiguchi,T., Guerrini,L., Blasi,F., Graeff,H., Schmitt,M. Inhibition of NF-kappa B-Rel A expression by antisense oligodeoxynucleotides suppresses synthesis of urokinase-type plasminogen activator (uPA) but not its inhibitor PAI-1. *Nucleic. Acids. Res.* 23 (1995) 3887-3893.
  150. Rindi,G., Azzoni,C., La Rosa,S., Klersy,C., Paolotti,D., Rappel,S., Stolte,M., Capella,C., Bordi,C., Solcia,E. ECL cell tumor and poorly differentiated

- endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis. *Gastroenterology*. 116 (1999) 532-542.
151. Rindi,G., Luinetti,O., Cornaggia,M., Capella,C., Solcia,E. Three subtypes of gastric argyrophil carcinoid and the gastric neuroendocrine carcinoma: a clinicopathologic study. *Gastroenterology*. 104 (1993) 994-1006.
  152. Rindi,G., Paolotti,D., Fiocca,R., Wiedenmann,B., Henry,J.P., Solcia,E. Vesicular monoamine transporter 2 as a marker of gastric enterochromaffin-like cell tumors. *Virchows Arch*. 436 (2000) 217-223.
  153. Roche Diagnostics GmbH. "In Situ Cell Death Detection Kit, POD. Instruction Manual." Mannheim, 1999.
  154. Rodseth,L.E., Brandhuber,B., Devine,T.Q., Eck,M.J., Hale,K., Naismith,J.H., Sprang,S.R. Two crystal forms of the extracellular domain of type I tumor necrosis factor receptor. *J. Mol. Biol.* 239 (1994) 332-335.
  155. Roff,M., Thompson,J., Rodriguez,M.S., Jacque,J.M., Baleux,F., Arenzana-Seisdedos,F., Hay,R.T. Role of I $\kappa$ B ubiquitination in signal-induced activation of NF $\kappa$ B in vivo. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7844-7850.
  156. Ruben,S.M., Dillon,P.J., Schreck,R., Henkel,T., Chen,C.H., Maher,M., Baeuerle,P.A., Rosen,C.A. Isolation of a rel-related human cDNA that potentially encodes the 65-kD subunit of NF-kappa B. *Science*. 251 (1991) 1490-1493.
  157. Sachs,G., Prinz,C., Loo,D., Bamberg,K., Besancon,M., Shin,J.M. Gastric acid secretion: activation and inhibition. *Yale J. Biol. Med.* 67 (1994) 81-95.
  158. Sachs,G., Zeng,N., Prinz,C. Physiology of isolated gastric endocrine cells. *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997) 243-256.
  159. Schaffer,K., McBride,E.W., Beinborn,M., Kopin,A.S. Interspecies polymorphisms confer constitutive activity to the *Mastomys* cholecystokinin-B/gastrin receptor. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 28779-28784.
  160. Schepp,W., Dehne,K., Herrmuth,H., Pfeffer,K., Prinz,C. Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells. *Am. J. Physiol.* 275 (1998) G1094-G1105.
  161. Schindl,M., Kaserer,K., Niederle,B. Treatment of gastric neuroendocrine tumors: the necessity of a type-adapted treatment. *Arch. Surg.* 136 (2001) 49-54.
  162. Schmiegel,W.H., Caesar,J., Kalthoff,H., Greten,H., Schreiber,H.W., Thiele,H.G. Antiproliferative effects exerted by recombinant human tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interferon-gamma (IFN-gamma) on human pancreatic tumor cell lines. *Pancreas*. 3 (1988) 180-188.
  163. Schubert,M.L. Gastric secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 19 (2003) 519-525.

164. Schubert,M.L. Gastric secretion. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 20 (2004) 519-525.
165. Sen,R., Baltimore,D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46 (1986) 705-716.
166. Sjoblom,S.M., Sipponen,P., Miettinen,M., Karonen,S.L., Jrvinen,H.J. Gastroscopic screening for gastric carcinoids and carcinoma in pernicious anemia. *Endoscopy.* 20 (1988) 52-56.
167. Slomiany,B.L., Piotrowski,J., Slomiany,A. Induction of tumor necrosis factor-alpha and apoptosis in gastric mucosal injury by indomethacin: effect of omeprazole and ebrotidine. *Scand. J. Gastroenterol.* 32 (1997) 638-642.
168. Smith,A.M., Watson,S.A., Caplin,M., Clarke,P., Griffin,N., Varro,A., Hardcastle,J.D. Gastric carcinoid expresses the gastrin autocrine pathway. *Br. J. Surg.* 85 (1998) 1285-1289.
169. Solcia,E., Bordi,C., Creutzfeldt,W., Dayal,Y., Dayan,A.D., Falkmer,S., Grimelius,L., Havu,N. Histopathological classification of nonantral gastric endocrine growths in man. *Digestion.* 41 (1988) 185-200.
170. Solcia,E., Capella,C., Fiocca,R., Rindi,G., Rosai,J. Gastric argyrophil carcinoidosis in patients with Zollinger-Ellison syndrome due to type 1 multiple endocrine neoplasia. A newly recognized association. *Am. J. Surg. Pathol.* 14 (1990) 503-513.
171. Solcia,E., Rindi,G., Buffa,R., Fiocca,R., Capella,C. Gastric endocrine cells: types, function and growth. *Regul. Pept.* 93 (2000) 31-35.
172. Solcia,E., Rindi,G., Silini,E., Villani,L. Enterochromaffin-like (ECL) cells and their growths: relationships to gastrin, reduced acid secretion and gastritis. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 7 (1993) 149-165.
173. Sugarman,B.J., Aggarwal,B.B., Hass,P.E., Figari,I.S., Palladino,M.A., Jr., Shepard,H.M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science.* 230 (1985) 943-945.
174. Sun,S.C., Ganchi,P.A., Ballard,D.W., Greene,W.C. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science.* 259 (1993) 1912-1915.
175. Sundler,F., Hakanson,R. Gastric endocrine cell typing at the light microscopic level.  
*in* "The stomach as an endocrine organ." Hakanson,R, Sundler,F (Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1991, pp. 9-26.
176. Takagi,A., Watanabe,S., Igarashi,M., Koike,J., Hasumi,K., Deguchi,R., Koga,Y., Miwa,T. The effect of *Helicobacter pylori* on cell proliferation and apoptosis in gastric epithelial cell lines. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 14 (2000) 188-192.

177. Tang,L.H., Modlin,I.M., Lawton,G.P., Kidd,M., Chinery,R. The role of transforming growth factor alpha in the enterochromaffin-like cell tumor autonomy in an African rodent mastomys. *Gastroenterology*. 111 (1996) 1212-1223.
178. Tani,N., Watanabe,Y., Suzuki,T., Muramatsu,S., Miyazawa,M., Kimura,N., Miwa,T. Effects of inflammatory cytokines induced by Helicobacter pylori infection on aminopyrine accumulation in parietal cells isolated from guinea pigs. *Dig. Dis. Sci.* 44 (1999) 686-690.
179. Tartaglia,L.A., Weber,R.F., Figari,I.S., Reynolds,C., Palladino,M.A., Jr., Goeddel,D.V. The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 9292-9296.
180. Tielemans,Y., Axelson,J., Sundler,F., Willems,G., Hakanson,R. Serum gastrin concentration affects the self replication rate of the enterochromaffin like cells in the rat stomach. *Gut*. 31 (1990) 274-278.
181. Van Antwerp,D.J., Martin,S.J., Kafri,T., Green,D.R., Verma,I.M. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science*. 274 (1996) 787-789.
182. Wang,D., Baldwin,A.S., Jr. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 29411-29416.
183. Weiss,T., Grell,M., Hessabi,B., Bourteele,S., Muller,G., Scheurich,P., Wajant,H. Enhancement of TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80: requirement of the TNF receptor-associated factor-2 binding site. *J. Immunol.* 158 (1997) 2398-2404.
184. Wyllie,A., Donahue,V., Fischer,B., Hill,D., Keesey,J., Manzow,S. "Apoptosis and Cell Proliferation." Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim, <sup>2</sup>1998.
185. Yamada,K., Takane,N., Otabe,S., Inada,C., Inoue,M., Nonaka,K. Pancreatic beta-cell-selective production of tumor necrosis factor-alpha induced by interleukin-1. *Diabetes*. 42 (1993) 1026-1031.
186. Yamaoka,Y., Kita,M., Kodama,T., Sawai,N., Kashima,K., Imanishi,J. Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by cagA gene positive Helicobacter pylori strains. *Gut*. 41 (1997) 442-451.
187. Zabel,U., Schreck,R., Baeuerle,P.A. DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn<sup>2+</sup> dependence, and differential half-site recognition. *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 252-260.
188. Zanner,R., Hapfelmeier,G., Gratzl,M., Prinz,C. Intracellular signal transduction during gastrin-induced histamine secretion in rat gastric ECL cells. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 282 (2002) C374-C382.

189. Zeng,N., Athmann,C., Kang,T., Lyu,R.M., Walsh,J.H., Ohning,G.V., Sachs,G., Pisegna,J.R. PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J. Clin. Invest.* 104 (1999) 1383-1391.
190. Zeng,N., Athmann,C., Kang,T., Walsh,J.H., Sachs,G. Role of neuropeptide-sensitive L-type Ca(2+) channels in histamine release in gastric enterochromaffin-like cells. *Am. J. Physiol.* 277 (1999) G1268-G1280.
191. Zhou,L., Sung,J.J., Lin,S., Jin,Z., Ding,S., Huang,X., Xia,Z., Guo,H., Liu,J., Chao,W. A five-year follow-up study on the pathological changes of gastric mucosa after H. pylori eradication. *Chin Med. J. (Engl. )*. 116 (2003) 11-14.

## **Curriculum Vitae**

### ***Persönliche Daten***

Name Christian G. Huber  
 Geboren 31.08.1976 in Schwetzingen  
 Eltern Dr. Georg Huber (Facharzt für Innere Medizin, Rheumatologie)  
 Dr. Renate Huber (Fachärztin für Allgemeinmedizin)  
 Geschwister Johannes Huber, geb. 21.05.1980

### ***Schulische Ausbildung***

1982–1986 Grundschule St. Jakob, Straubing  
 1986–1995 Johannes-Turmair-Gymnasium, Straubing  
 1995 Allgemeine Hochschulreife (Durchschnittsnote 1,0)

### ***Stipendien***

1995 Stipendiat des Freistaates Bayern (Hochbegabtenförderung)

### ***Studium der Humanmedizin***

1995–1997 Vorklinischer Studienabschnitt Medizin, Universität Regensburg  
 09/1998 Erstes Staatsexamen  
 1997–2003 Klinischer Studienabschnitt Medizin, Technische Universität München  
 03/2002 Zweites Staatsexamen  
 05/2003 Drittes Staatsexamen (Durchschnittsnote 2,16)

### ***Studium der Philosophie***

2000–2001 Grundstudium, Hochschule für Philosophie S.J., München  
 2001 Bakkalaureat (Durchschnittsnote 1,39)  
 2001–2003 Hauptstudium, Hochschule für Philosophie S.J., München  
 2003– Promotionsstudium, Hochschule für Philosophie S.J., München

***Praktisches Jahr und berufliche Tätigkeit***

- 04/2002 Tertian im Fach Chirurgie (Krankenhaus Barmherzige Brüder, München)
- 08/2002 Tertian im Fach Neurologie (Klinikum Rechts der Isar, München)
- 12/2002 Tertian im Fach Innere Medizin (Kantonsspital Baden, Schweiz)
- 06/2003 AiP (Klinik für Psychiatrie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf)
- 10/2004 Assistenzarzt an der Klinik für Psychiatrie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

***Wissenschaftliche Tätigkeit***

- 1998–2002 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. C. Prinz, II. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München
- 2003– Doktorand bei Prof. C. Kummer, Hochschule für Philosophie S.J., München
- 2003– Mitarbeiter des Arbeitsbereichs Bildgebung, Prof. D. F. Braus, Klinik für Psychiatrie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf