

**Bedeutung der Rezeptor-vermittelten Apoptose und
Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade in
Helicobacter pylori-induzierten, humanen
Magenepithelzellen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität

Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biol. Susanne Ledig

geboren am 12.03.1974, in Neustadt a. Rbge.

2003

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. W. Beil

Tag der Promotion: 4. August 2003

Abstract

Im Magenepithel *H. pylori*-infizierter Personen läßt sich eine erhöhte Apoptoserate feststellen. Diese steht im Zusammenhang mit der Pathogenese von Gastriden, peptischen Ulzera und Magenkarzinomen. In der vorliegenden Studie sollte daher die *H. pylori*-induzierte Apoptose anhand eines *in vitro*-Systems näher untersucht werden.

H. pylori verursacht in epithelialen Magenkarzinomzellen *in vitro* eine Erhöhung der Fas- und DR4-Expression, während sich die Proteinkonzentrationen an FasL, DR5 und TRAIL unter Einfluß von *H. pylori* nicht verändert. Es zeigte sich, daß in *H. pylori*-infizierten Magenkarzinomzellen eine Aktivierung der Mitochondrien in Form eines Cytochrom *c*- und Smac-Ausstroms stattfindet. Die *H. pylori*-induzierte Apoptose wird durch Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, CrmA und dnFADD bzw. durch eine Reduktion der DR5-Expression in Magenepithelzellen *in vitro* signifikant vermindert. Eine geminderte DR4-Expression hat hingegen keinen Effekt auf die *H. pylori*-initiierte Apoptose. Aus diesen Daten ergibt sich, daß die *H. pylori*-vermittelte Apoptose von einer Aktivierung der Mitochondrien abhängig ist (Typ-II-Signaltransduktion). Zudem ist anzunehmen, daß Todesrezeptoren wie DR5 sowie eine sich anschließende Induktion früher Caspasen wie Caspase-8 auf Höhe des DISC eine entscheidende Rolle spielen. Zusätzlich konnte demonstriert werden, daß der bakterielle Pathogenitätsfaktor VacA an der Apoptoseinduktion in Magenepithelzellen *in vitro* beteiligt ist, seine apoptotische Aktivität aber nicht über Modulation der TNF-Familienmitglieder Fas, FasL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 und TRAIL vermittelt wird. Weiterhin wurde festgestellt, daß *H. pylori* wie in Magenkarzinomzellen auch in primär isolierten Magenepithelzellen (PHME) Apoptose induziert. Im Gegensatz zu Magenkarzinomzellen sind PHME trotz Expression der TRAIL-spezifischen Rezeptoren jedoch TRAIL-resistent. Die Signaltransduktion ist in den PHME auf Höhe von Caspase-8 gehemmt. Eine Koinkubation mit *H. pylori* hebt durch Regulation eines nicht identifizierten Faktors diese Inhibition auf.

Schlagwörter: *Helicobacter pylori*, Apoptose, Todes-Rezeptoren

Abstract

The enhanced gastric epithelial cell apoptosis observed during infection with *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) has been suggested to be of significance in the etiology of gastritis, peptic ulcers, and gastric cancer. Therefore the aim of this study was to analyse the *H. pylori*-induced apoptosis in gastric epithelial cells *in vitro*.

H. pylori increases protein-expression of Fas and DR4 and induces a leakage of mitochondrial cytochrome *c* and Smac, while expression of FasL, TRAIL, and DR5 is unaffected. Transduction of Bcl-2, CrmA, dnFADD and DR5-antisense diminishes *H. pylori* induced apoptosis in gastric epithelial carcinoma cells, while an decreased expression of DR4 shows no effect. These observations suggest a strong dependence on mitochondrial pathway for *H. pylori*-induced apoptosis, indicating a type-II-signaling. Furthermore this data reveal that death-receptors like DR5 and following induction of early caspases like caspase-8 at the DISC play a central role in *H. pylori*-induced cell death. Additionally were demonstrated that the bacterial pathogenic factor VacA is involved in *H. pylori*-initiated apoptosis in gastric epithelial cells *in vitro*, however not by modulating TNF-Family members Fas, FasL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, and TRAIL. *H. pylori* induces gastric epithelial cell death in primary isolated human gastric epithelial cells also. In contrast to human gastric carcinoma cell-line AGS TRAIL failes to induce apoptosis in primary gastric epithelial cells despite expression of TRAIL-specific receptors. The pathway is suppressed at level of caspase-8 and this effect is abolished by *H. pylori* regulating an unidentified factor.

Key-words: *Helicobacter pylori*, apoptosis, death-receptors

1 Inhaltsverzeichnis

1	<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	1
2	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	4
3	<u>EINLEITUNG</u>	8
3.1	<i>HELICOBACTER PYLORI</i>	8
3.1.1	GESCHICHTE UND MORPHOLOGIE	8
3.1.2	EPIDEMIOLOGIE	8
3.1.3	<i>H. PYLORI</i> -ASSOZIIERTE ERKRANKUNGEN	9
3.1.4	DIAGNOSE UND THERAPIE	10
3.1.5	PATHOGENESE	11
3.1.5.1	<i>Motilität, Urease und Adhärenz</i>	11
3.1.5.2	<i>Vakuolisierendes Cytotoxin VacA</i>	11
3.1.5.3	<i>Die cag-Pathogenitätsinsel (cag-PAI)</i>	12
3.1.6	ENTZÜNDUNGSANTWORT DES WIRTS AUF EINE <i>H. PYLORI</i> -INFEKTION	13
3.2	APOPTOSE	14
3.2.1	GRUNDLAGEN DER APOPTOSE	14
3.2.2	APOPTOSEREGULATION	16
3.2.3	REZEPTOR-VERMITTELTE APOPTOSE	17
3.2.3.1	<i>FasL-vermittelte Apoptose</i>	18
3.2.3.2	<i>TRAIL-vermittelte Apoptose</i>	21
3.3	BEDEUTUNG DER <i>H. PYLORI</i>-INDUZIERTEN APOPTOSE FÜR DIE KRANKHEITS-PATHOGENESE	23
4	<u>ZIELSETZUNG</u>	25
5	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	26
5.1	MATERIALIEN	26
5.1.1	EUKARYONTISCHE PERMANENTE ZELLINIEN	26
5.1.2	BAKTERIENSTÄMME	27
5.1.3	RETROVIRALE PLASMIDE	28
5.1.4	MOLEKULARGEWICHTSSTANDARDS	29
5.1.5	ENZYME	30
5.1.6	ANTIKÖRPER	30
5.1.7	REKOMBINANTE PROTEINE	31
5.1.8	PRIMER	32
5.1.9	KITS	33
5.1.10	CHEMIKALIEN	33
5.1.11	SONSTIGE MATERIALIEN UND GERÄTE	35
5.2	KULTIVIERUNG VON <i>H. PYLORI</i>	37
5.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	37
5.3.1	KULTIVIERUNG PERMANENTER ZELLINIEN	37
5.3.2	HERSTELLUNG STABILER ZELLINIEN MITTELS RETROVIREN	38
5.3.2.1	<i>Transfektionsmethoden</i>	38
5.3.2.1.1	Transfektion der Verpackungs-Zelllinie GP-293	39
5.3.2.1.2	Transfektion der Verpackungs-Zelllinie Phoenix	40
5.3.2.2	<i>Transduktion</i>	40

Inhaltsverzeichnis

5.3.3	ISOLIERUNG UND KULTIVIERUNG PRIMÄRER HUMANER MAGEN-EPITHELZELLEN (PHME) AUS MAGENBIOPSIEN	41
5.3.4	KOKULTIVIERUNG VON MAGENEPITHELZELLEN MIT <i>H. PYLORI</i> UND REKOMBINANTEN PROTEINEN	43
5.3.5	METHODEN ZUR QUANTIFIZIERUNG DER APOPTOSE	44
5.3.5.1	<i>Quantifizierung der Apoptose in AGS-Zellen mittels Histon-ELISA</i>	44
5.3.5.2	<i>Quantifizierung der Apoptose in PHME durch TUNEL</i>	46
5.3.6	IMMUNHISTOLOGIE	47
5.3.7	HÄMALAUN-FÄRBUNG	48
5.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	48
5.4.1	GEWINNUNG VON GESAMTZELLEXTRAKTEN	48
5.4.2	ISOLIERUNG MITOCHONDRIALER UND CYTOSOLISCHER EXTRAKTE	49
5.4.3	MESSUNG DER PROTEINKONZENTRATION	50
5.4.4	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	51
5.4.5	WESTERN BLOT	52
5.4.6	IMMUNDETEKTION DER PROTEINE	52
5.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	54
5.5.1	PHOTOMETRISCHE KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	54
5.5.2	SEQUENZSPEZIFISCHE SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN	54
5.5.3	AGAROSEGELELEKTROPHORESE	54
5.5.4	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	55
5.5.4.1	<i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	55
5.5.4.2	<i>Transformation chemisch kompetenter Zellen</i>	56
5.5.4.3	<i>Vermehrung transformierter Bakterien</i>	56
5.5.5	PLASMID-PRÄPERATIONEN	57
5.5.5.1	<i>Plasmid-Minipräparation</i>	57
5.5.5.2	<i>Plasmid-Maxipräparation</i>	57
5.5.6	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA AUS PRIMÄRKULTUR	58
5.5.7	REVERSE TRANSKRIPTION (cDNA-SYNTHESE)	59
5.5.8	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	59
5.6	STATISTISCHE ANALYSE	61
6	ERGEBNISSE	62
6.1	ROLLE DES FAS/FAS-LIGAND-SYSTEMS BEI DER <i>H. PYLORI</i>-ASSOZIIERTEN APOPTOSE	62
6.1.1	FAS-LIGAND HATTE EINEN SYNERGETISCHEN EFFEKT AUF DIE <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTEN APOPTOSE IN AGS-ZELLEN	62
6.1.2	<i>H. PYLORI</i> ERHÖHTE ZEITABHÄNGIG DIE PROTEINEXPRESSION VON FAS IN AGS-ZELLEN	63
6.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR INTRAZELLULÄREN SIGNALWEITERLEITUNG DER <i>H. PYLORI</i>-ASSOZIIERTEN APOPTOSE	65
6.2.1	<i>H. PYLORI</i> INDUZIERT BEI AGS-ZELLEN EINE FREISETZUNG VON CYTOCHROM C UND SMAC AUS DEN MITOCHONDRIEN	65
6.2.2	HERSTELLUNG STABIL BCL-2-ÜBEREXPRIMIERENDER AGS-ZELLEN (AGSBCL-2)	67
6.2.3	HERSTELLUNG STABIL CRMA-ÜBEREXPRIMIERENDER AGS-ZELLEN (AGSCRMA)	69
6.2.4	HERSTELLUNG STABIL DOMINANT NEGATIVES FADD (DNFADD)-ÜBEREXPRIMIERENDER AGS-ZELLEN (AGSDNFADD)	70
6.2.5	DAS WACHSTUMSVERHALTEN VON AGS-ZELLEN WURDE DURCH ÜBEREXPRESSION VON BCL-2, CRMA UND DNFADD NICHT BEEINFLUßT	72
6.2.6	FASL-INDUZIERTEN APOPTOSE WURDE DURCH ÜBEREXPRESSION VON BCL-2, CRMA UND DNFADD IN AGS-ZELLEN SIGNIFIKANT REDUZIERT	73
6.2.7	<i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTEN APOPTOSE WURDE DURCH ÜBEREXPRESSION VON BCL-2, CRMA UND DNFADD IN AGS-ZELLEN SIGNIFIKANT REDUZIERT	75
6.3	ROLLE DES PROAPOPTOTISCHEN LIGANDEN TRAIL UND DIE SEINER PROAPOPTOTISCHEN REZEPTOREN DR4 UND DR5 BEI DER <i>H. PYLORI</i>-ASSOZIIERTEN APOPTOSE IN AGS-ZELLEN	76
6.3.1	TRAIL ERHÖHTE SYNERGETISCH DIE <i>H. PYLORI</i> INDUZIERTEN APOPTOSE IN AGS-ZELLEN	77
6.3.2	<i>H. PYLORI</i> ERHÖHTE ZEITABHÄNGIG DIE PROTEINEXPRESSION VON DR4 IN AGS-ZELLEN	78
6.3.3	DURCH RETROVIRALE TRANSDUKTION EINES DR4- BZW. DR5-ANTISENSE-KONSTRUKTS WURDE DIE PROTEINEXPRESSION DES KORRESPONDIERENDEN PROTEINS PERMANENT IN AGS-ZELLEN VERRINGERT	80

Inhaltsverzeichnis

6.3.4	DAS WACHSTUMSVERHALTEN TRANSDUZIERTER AGS-ZELLEN WURDE DURCH EINE VERRINGERTE DR4- BZW. DR5-EXPRESSION NICHT VERÄNDERT	82
6.3.5	TRAIL-INDUZIERTE APOPTOSE WURDE DURCH EINE VERMINDERTE DR4- BZW. DR5-EXPRESSION IN AGS-ZELLEN SIGNIFIKANT REDUZIERT	83
6.3.6	<i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTE APOPTOSE WURDE DURCH VERRINGERUNG DER DR5-EXPRESSION IN AGS-ZELLEN SIGNIFIKANT REDUZIERT	84
6.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE DER PATHOGENITÄTSFAKTOREN BEI DER –<i>H. PYLORI</i> INDUZIERTEN APOPTOSE	86
6.4.1	EINE <i>VACA</i> -NEGATIVE ISOGENE <i>H. PYLORI</i> -MUTANTE INDUZIERTE WENIGER APOPTOSE IN MAGENEPITHELZELLEN <i>IN VITRO</i> ALS DER WILD-TYP	86
6.4.2	KEINE UNTERSCHIEDE IN DEN EXPRESSIONSMUSTERN VON FAS, DR4, DR5, DcR1, DcR2, FASL UND TRAIL ZWISCHEN <i>H. PYLORI</i> P12- UND <i>H. PYLORI</i> P12 ^{<i>VACA</i>-} -INDUZIERTEN AGS-ZELLEN	88
6.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR <i>H. PYLORI</i>-INDUZIERTEN APOPTOSE IN PRIMÄRKULTUR	90
6.5.1	CHARAKTERISIERUNG DER PRIMÄREN HUMANEN MAGENEPITHELZELLEN (PHME) MITTELS CYTOKERATIN 18	90
6.5.2	<i>H. PYLORI</i> INDUZIERTE IN PHME KONZENTRATIONSABHÄNGIG APOPTOSE	91
6.5.3	PHME WAREN GEGENÜBER TRAIL-VERMITTELTEN APOPTOSE RESISTENT	92
6.5.4	PHME EXPRIMIERTEN DR4, DR5, DcR1 UND DcR2	93
6.5.5	<i>H. PYLORI</i> BEWIRKTE EINE SENSIBILISIERUNG VON PHME GEGENÜBER TRAIL-INDUZIERTER APOPTOSE	94
6.5.6	UNTERSUCHUNGEN ZUR TRAIL-RESISTENZ VON PHME	95
6.5.6.1	<i>H. pylori</i> hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von DR4, DR5, DcR1 und DcR2 in PHME	96
6.5.6.2	TRAIL bewirkte in PHME im Gegensatz zu <i>H. pylori</i> keine Aktivierung der Procaspase-8	97
6.5.6.3	<i>H. pylori</i> zeigte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von FLIP	98
7	<u>DISKUSSION</u>	100
7.1	<i>H. PYLORI</i> INDUZIERTER APOPTOSEWEG	100
7.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VERSCHIEDENER PATHOGENITÄTS-FAKTOREN BEI DER <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTEN APOPTOSE	115
7.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR <i>H. PYLORI</i> -INDUZIERTEN APOPTOSE IN PRIMÄRKULTUR	117
8	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	121
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	124
10	<u>LEBENS-LAUF</u>	149
11	<u>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS</u>	150
12	<u>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</u>	152

2 Abkürzungsverzeichnis

µg	=	Mikrogramm
µl	=	Mikroliter
°C	=	Grad Celsius
Apaf-1	=	Apoptotic Protease Activating Factor-1
APS	=	Ammoniumpersulfat
as	=	antisense
ATCC	=	American Tissue Culture Company
ATP	=	Adenosintriphosphat
BabA	=	Blood Group B Antigen Binding Adhesin
Bcl-2	=	B-Cell Lymphoma gene 2
BHI	=	Brain Heart Infusion
BSA	=	Bovines Serumalbumin
bzw.	=	beziehungsweise
C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O	=	tri-Natriumcitrat·Dihydrat
CaCl ₂	=	Calciumchlorid
CagA	=	Cytotoxin-associated gene A
cDNA	=	copy Desoxyribonucleicacid
CFU	=	Colony Forming Units
CO ₂	=	Kohlenstoffdioxid
CrmA	=	Cytokine Response Modifier A
DcR1	=	Decoy-Receptor 1
DcR2	=	Decoy-Receptor 2
DD	=	Death Domain
DED	=	Death Effector Domain
Diablo	=	Direct IAP-Binding Protein with low pI
DISC	=	Death-Inducing Signaling Complex
DMEM	=	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	=	Dimethylsulfoxid
DNA	=	Desoxyribonucleicacid
dnFADD	=	dominant negatives FADD

Abkürzungsverzeichnis

dNTP	=	Desoxynukleotidtriphosphat
DR4	=	Death Receptor 4
DR4as	=	Death Receptor 4 antisense
DR5	=	Death Receptor 5
DR5as	=	Death Receptor 5 antisense
DTT	=	Dithiothreitol
EDTA	=	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
EGTA	=	Ethylenglykol-bis (β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
ELISA	=	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	=	Extracellular Signal-Regulated Kinases
FADD	=	Fas-associated Death Domain Protein
FasL	=	Fas Ligand
FCS	=	Fetal Calf Serum
FLIP	=	FLICE-Inhibitory-Protein
g	=	Gramm
h	=	Stunde
<i>H. pylori</i>	=	<i>Helicobacter pylori</i>
H.p.	=	<i>Helicobacter pylori</i>
HCl	=	Salzsäure
HEPES	=	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IAP	=	Inhibitor of Apoptosis
IL	=	Interleukin
kb	=	Kilobase
KCl	=	Kaliumchlorid
kDa	=	Kilodalton
LB	=	Luria Broth
L-Glu	=	L-Glutamin
LPS	=	Lipopolysaccharide
M	=	Molar
MALT	=	Mucosa associated lymphoid tissue
mg	=	Milligramm
MgCl ₂	=	Magnesiumchlorid
MHC	=	Major-Histocompatibility-Complex

Abkürzungsverzeichnis

min	=	Minute
MoMuLV	=	Moloney Maus Leukämie Virus
mM	=	Millimolar
mRNA	=	messenger Ribonucleicacid
N ₂	=	Stickstoff
Na ₂ HPO ₄	=	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	=	Natriumchlorid
NaHCO ₃	=	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	=	Natriumhydroxid
NF-κB	=	Nuclear Factor kappa B
ng	=	Nanogramm
NK-Zellen	=	Natürliche Killerzellen
O ₂	=	Sauerstoff
OD	=	optische Dichte
OPG	=	Osteoprotegerin
PAGE	=	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI	=	Pathogenitätsinsel
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
Pen	=	Penicillin
pH	=	Wasserstoffexponent
PHME	=	primäre humane Magenepithelzellen
POD	=	Peroxidase
RNA	=	Ribonucleicacid
rpm	=	(rounds per minute) Umdrehungen pro Minute
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
rRNA	=	ribosomale RNA
RT	=	Reverse Transkriptase
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
Smac	=	Second Mitochondrial-Derived Activator Caspase
Strep	=	Streptomycin
TAE	=	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	=	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Abkürzungsverzeichnis

TNF	=	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	=	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	=	TdT-mediated dUTP nick labeling
U	=	Units
v/v	=	Volumen/Volumen
VacA	=	Vacuolating Cytotoxin
vs.	=	versus
w/v	=	Masse/Volumen
WT	=	Wildtyp

3 Einleitung

3.1 *Helicobacter pylori*

3.1.1 Geschichte und Morphologie

Helicobacter pylori (*H. pylori*) ist ein gram-negatives, mikroaerophiles Bakterium mit spiraliger Morphologie und lophotricher Begeißelung, welches die menschliche Magenschleimhaut besiedelt. Obwohl die Existenz spiralförmiger Bakterien im Magen bereits seit mehr als hundert Jahren bekannt ist (Bizzozero, 1893; Krienitz, 1906), gelang eine erstmalige Kultivierung *Helicobacters* erst im Jahre 1982 durch Warren und Marshall (Marshall *et al.*, 1984). Der isolierte Keim wurde auf Grund seiner der Gattung *Campylobacter* ähnelnden Morphologie zunächst als *Campylobacter pyloridis* bezeichnet, jedoch später mittels 16S rRNA-Analysen als eigene Gattung erkannt.

3.1.2 Epidemiologie

Mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit *H. pylori* durchseucht, wobei Entwicklungsländer eine höhere Prävalenzrate aufweisen als industrialisierte Staaten (Logan *et al.*, 1996). Jedoch variiert die Prävalenz auch innerhalb eines Landes stark. So besteht bei einigen geographischen Populationen und ethnischen Gruppen, aber auch bei Personen mit niedrigem sozio-ökonomischen Status ein erhöhtes Infektionsrisiko. Häufig findet eine Infektion mit dem Keim während der Kindheit und innerhalb der Familie statt. In industrialisierten Ländern wird das Bakterium hauptsächlich direkt (oral-oral oder fäkal-oral) übertragen, während in Entwicklungsländern Wasser als Übertragungsweg immer mehr an Bedeutung gewinnt. Obwohl *H. pylori* aus

Schafen und anderen Tieren isoliert werden konnte, dient der humane Magen als Hauptreservoir (zur Übersicht: Go, 2002; Mitchell *et al.*, 2002).

3.1.3 *H. pylori*-assoziierte Erkrankungen

Eine bakterielle Infektion durch *H. pylori* ist die Ursache von 80-90% der Gastriden, nahezu aller Zwölffingerdarmgeschwüre und etwa 80% aller Magengeschwüre (Dooley *et al.*, 1989; Stolte *et al.*, 1998). Epidemiologische Studien weisen auf eine zusätzliche Rolle der *H. pylori*-Infektion bei der Pathogenese des sogenannten MALT (Mucosa associated lymphoid tissue)-Lymphoms und des Magenkarzinoms hin (Parsonnet *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1994). Dennoch bleibt die Mehrzahl der mit *H. pylori* infizierten Personen asymptomatisch. Während ca. 15% der Infizierten einen Ulkus im Magen oder im Duodenum entwickeln, erkrankt nur eine Minderheit von unter 1% an Magenkrebs. Eine Eradikation des Keims verringert eine Karzinom- und Ulkusrezidive und bewirkt eine Rückbildung von Lymphomen (Marshall *et al.*, 1988; Bayerdörffer *et al.*, 1995; Uemera *et al.*, 1997).

H. pylori ist mit zwei Subtypen von Adenokarzinomen des Magens assoziiert. Bei Entstehung eines Adenokarzinoms des intestinalen Typus werden verschiedene Stadien durchlaufen. Aus einer chronischen Gastritis entwickeln sich zunächst eine Atrophie des Magengewebes und eine intestinale Metaplasie, aus denen im weiteren Verlauf eine Dysplasie und eventuell ein Adenokarzinom entstehen (Correa, 1992). Bei dem ebenfalls durch *H. pylori* ausgelösten diffusen Typ des Magenkarzinoms ist der Verlauf hingegen fließender. Eine Einteilung in abgrenzbare Stadien ist nicht möglich.

Obwohl die genauen Mechanismen der *H. pylori* assoziierten-Karzinogenese bis heute noch nicht bekannt sind, wurde *H. pylori* im Jahre 1994 von der World Health Organization (WHO) in die Gruppe I der Kanzerogene eingestuft (International Agency for Research on Cancer, 1994). Da ca. eine Person von 1000 mit *H. pylori*-Infizierten im Laufe ihres Lebens ein Magenkarzinom entwickelt, muß von einer multifaktoriellen Onkogenese ausgegangen

werden. Neben Umweltfaktoren wie ein durch Ernährung bedingter Mangel an Vitaminen spielen auch Keimfaktoren wie Expression des *Helicobacter*-Cytotoxins, welches das Oberflächenepithel schädigt, eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese. Zusätzlich muß davon ausgegangen werden, daß auch die genetische Prädisposition des Wirtes von erheblicher Bedeutung ist. So konnte festgestellt werden, daß ein mit einer erhöhten Expression des IL-1 β -Proteins assoziierter Polymorphismus der Promotoregion dieses Gens mit einem erhöhten Magenkrebs-Risiko bei *H. pylori*-Infizierten korreliert ist (El-Omar *et al.*, 2000). Dieses Cytokin, dessen Produktion durch Mikroorganismen und mikrobielle Produkte induziert wird, wirkt zum einen inflammatorisch, zum anderen inhibiert es die Säuresekretion im Magen. Eine Verminderung der Säureproduktion führte in *H. pylori*-infizierten Mäusen wiederum zu einer verstärkten Entzündungsreaktion des Magens (Takashima *et al.*, 2001).

3.1.4 Diagnose und Therapie

Eine *H. pylori*-Infektion kann mittels nichtinvasiver Methoden wie Harnstoff-Atemtest, serologischen Tests und Antigennachweis im Stuhl oder durch die endoskopische Entnahme einer Biopsie der Magenmukosa mit sich anschließendem direkten Erregernachweis diagnostiziert werden (Mitchell *et al.*, 2002).

Zur Eradikation von *H. pylori* hat sich eine Kombination von Antibiotika in Verbindung mit einem Protonenpumpeninhibitor (PPI) etabliert. Bei der sogenannten „1st-line“-Therapie wird das Makrolid-Antibiotikum Clarithromycin mit dem Penicillin Amoxicillin und dem PPI Omeprazol eingesetzt. Der Eradikationserfolg liegt nach einer einwöchigen Therapie bei über 90%. Bei nicht erfolgreicher Keimbeseitigung kommen entsprechende Reserveschemata zum Einsatz.

3.1.5 Pathogenese

H. pylori kolonisiert den Magen hauptsächlich im Bereich des Antrums, aber auch Korpus und Fundus sind betroffen. Das Bakterium ist nicht invasiv und besiedelt den Bereich zwischen Mukus und Magenepithel (Hazell *et al.*, 1986). Um sich seinem unwirtlichen Lebensraum anzupassen, hat *H. pylori* eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren ausgebildet. Bis heute konnten die Genome zweier *Helicobacter*-Stämme komplett sequenziert werden. Ihr Vergleich wies auf eine bei Bakterien vorher noch nie gefundene genetische Diversität hin (Alm *et al.*, 1999).

3.1.5.1 Motilität, Urease und Adhärenz

Um die bakterizide Aktivität des Mageninhalts zu umgehen, muß der Keim nach seiner Aufnahme schnell in den schützenden Mukus gelangen. Essentiell für diese ersten Schritte der Kolonisierung sind die für die Motilität des Bakteriums zuständigen Flagellen und das Enzym Urease (Josenhans *et al.*, 2001; Mobley, 2001). Diese hydrolysiert Harnstoff zu Kohlenstoffdioxid und Ammonium (Marshall *et al.*, 1986). Durch das entstehende Mikromilieu kann der Keim im sauren pH des Magens überleben.

Verschiedene bakterielle Oberflächen-Komponenten vermitteln die Anlagerung des Bakteriums an epitheliale Zellen. Innerhalb der Adhäsine ist das 78 kDa große outer membrane Protein BabA (Blood Group B Antigen Binding Adhesin), das an fucosyliertes Lewis B-Blutgruppen-Antigen bindet, am besten charakterisiert (Ilver *et al.*, 1998).

3.1.5.2 Vakuolisierendes Cytotoxin VacA

Alle *H. pylori*-Stämme besitzen das *vacA* (Vacuolating Cytotoxin)-Gen, aber nur von 50% der Stämme wird das 95 kDa große Cytotoxin VacA auch exprimiert, welches bei eukaryontischen Zellen die Bildung von Vakuolen induziert (Cover, 1996). Das *vacA*-Gen kodiert eine 140 kDa große Toxinvorstufe, die in drei Bereiche unterteilt werden kann. Das N-terminale Ende enthält ein kurzes Signalpeptid, das beim Export des Proteins durch

die Zytoplasma-Membran abgespalten wird, während das C-terminale Ende in der äußeren Membran des Bakteriums eine Pore formt. Durch diese wird der verbleibende mittlere Bereich des Toxins frei (Tombola *et al.*, 2000). Nach seiner Sezernierung insertiert das Exotoxin in die epitheliale Zellmembran und bildet einen hexameren, anionenselektiven und spannungsabhängigen Kanal (Szabo *et al.*, 1999). Durch diesen können Bicarbonat und organische Anionen freigesetzt werden, welche eventuell zu der Versorgung des adhären Keims beitragen.

Welche Rolle VacA in der Pathogenese von *H. pylori* spielt, ist noch nicht geklärt. Erschwert wird dieses durch die extreme Variabilität des *vacA*-Gens, das einen mosaikartigen Aufbau, bestehend aus der s-Region (kodiert das Signalpeptid) und der m-Region (kodiert den mittleren Proteinbereich), aufweist. Von beiden Regionen existieren verschiedene Allele und Subtypen (Atherton *et al.*, 1995; van Doorn *et al.*, 1999). Deren Kombination entscheidet über die Menge des produzierten Cytotoxins und korreliert daher mit der Pathogenität des Bakteriums. Die höchste cytotoxische Aktivität zeigen s1/m1-Stämme, während s2/m2-Stämme kein oder nur wenig Cytotoxin bilden (Atherton *et al.*, 1995). So erklärt sich, warum in westlichen Ländern bestimmte *vacA*-Genotypen häufiger mit dem Auftreten schwerer Krankheiten assoziiert sind (Atherton *et al.*, 1997).

3.1.5.3 Die *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI)

Zusätzlich zum *vacA*-Gen besitzen viele *H. pylori*-Stämme die ca. 40 kb große Pathogenitätsinsel *cag* (Cytotoxin-associated gene)-PAI. Einige der auf *cag*-PAI liegenden 27-31 Gene kodieren für ein Typ-IV-Sezernierung-System, mit dessen Hilfe das ebenfalls auf der Pathogenitätsinsel kodierte 120 kDa CagA (Cytotoxin-associated gene A)-Protein in die epitheliale Wirtszelle transloziert wird (Censini *et al.*, 1996; Odenbreit *et al.*, 2000). An der inneren Plasmamembran wird das Protein durch zelluläre Tyrosin-Kinasen phosphoryliert (Stein *et al.*, 2002). Gleichzeitig kommt es zu einer Dephosphorylierung von Wirtszell-Proteinen und zu morphologischen Änderungen der Wirtszelle, die auch als „hummingbird“ beschrieben werden (Backert *et*

al., 2001; Puls *et al.*, 2002). Dieser Phänotyp ist durch eine Verlängerung der Zelle charakterisiert.

Die Rolle der Pathogenitätsinsel in der *H. pylori*-vermittelten Pathogenese wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Es wird angenommen, daß *cagA*⁺ *H. pylori*-Stämme virulenter sind als Stämme, denen das *cagA*-Gen fehlt (Covacci *et al.*, 1999). Epidemiologische Studien zeigen, daß Infektionen mit einem *cagA*-positiven *H. pylori* das Risiko für Magenkarzinome signifikant erhöhen (Blaser *et al.*, 1995).

3.1.6 Entzündungsantwort des Wirts auf eine *H. pylori*-Infektion

Einer der wichtigsten Kofaktoren bei der Entstehung *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen ist die durch den Keim hervorgerufene Entzündungsantwort des Wirts, welche ihrerseits zur Mucosaschädigung beiträgt. Zunächst wird eine akute unspezifische Entzündungsantwort durch Freisetzung von Interleukin-8 (IL-8) aus den Magenepithelzellen in Gang gesetzt (Yamaoka *et al.*, 1996). Als Folge kommt es zu einem massiven Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Magenschleimhaut. Die Chemotaxis auf Neutrophile und Makrophagen wird durch bakterielle Faktoren wie Lipopolysaccharide verstärkt. Von aktivierten Neutrophilen freigesetzte reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale schädigen das Gewebe (Mannick *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1996).

Durch bakterielle Antigene und Gewebsmediatoren werden in einer spezifischen Immunantwort T- und B-Lymphozyten aktiviert. Diese tragen durch Induktion weiterer proinflammatorischer Cytokine wie IL-1 β , IL-2, IL-6 und TNF- α zur Schädigung der gastralen Schleimhaut bei (Crabtree *et al.*, 1991; Yamaoka *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 1997).

3.2 Apoptose

3.2.1 Grundlagen der Apoptose

Der Zelltod durch Apoptose ist ein hoch konservierter Prozeß, der einer strengen Kontrolle unterliegt. Er dient der Abtötung alter und geschädigter, aber auch scheinbar intakter, eventuell überflüssiger Zellen eines Organismus und spielt im Rahmen der Embryonalentwicklung, der Gewebshomöostase, der Immunabwehr und der Eliminierung von Krebszellen eine essentielle Rolle (zur Übersicht: Raff, 1998; Strasser *et al.*, 2000). Verschiedene Krankheitsbilder wie systemischer Lupus erythematosus, AIDS, Alzheimersche und Parkinsonsche Krankheit werden mit Störungen der Apoptoseregulation in Verbindung gebracht (zur Übersicht: Thompson, 1995).

Apoptose ist durch stereotype morphologische Merkmale wie Schrumpfen der Zelle, Bildung von Oberflächenblasen sowie Kondensation und Fragmentierung des nukleären Chromatins charakterisiert (Kerr *et al.*, 1972; Wolf *et al.*, 1999). Abschließend werden von der Zelle intakte, membran-gebundene Bläschen abgeschnürt, die sogenannten apoptotischen Körper (Wyllie *et al.*, 1980). Diese werden *in vivo* entweder von angrenzenden Zellen oder durch mononukleäre Zellen phagozytiert. Der apoptotische Prozeß ist nach ca. zwei bis vier Stunden abgeschlossen und daher in Geweben schwer nachweisbar. Da die apoptotischen Vesikel eine intakte Plasmamembran aufweisen und ihre Phagozytose schnell erfolgt, werden in den extrazellulären Raum keine intrazellulären Bestandteile frei. Im Gegensatz zur Nekrose wird daher keine inflammatorische Antwort ausgelöst.

Die Zelle erfährt während der Apoptose verschiedene biochemische Veränderungen wie Orientierungsänderung der Plasmamembran-Phospholipide, Induktion von Proteasen und Endonukleasen, intrazelluläre Bildung

von Ceramid durch Sphingomyelinasen und Aktivierung von Transglutaminasen (Fraser *et al.*, 1996; Patel *et al.*, 1996; Vaux *et al.*, 1996).

Phosphatidylserin wird während der frühen Apoptose von der cytoplasmatischen auf die äußere Seite der Plasmamembran transloziert, wo es durch phagozytotische Zellen erkannt wird (Fadok *et al.*, 1992).

Verschiedene Proteasen wie Calpaine, Cathepsine und Proteasomen sind an der Apoptose beteiligt (Patel *et al.*, 1996). Die für die Apoptose wichtigste Protease-Familie stellen aber die Cystein Aspartat Proteasen, kurz Caspasen, dar. Ihr Name leitet sich zum einen von einem Cysteinrest in ihrem aktiven Zentrum ab, zum anderen erhielten sie diese Bezeichnung, da sie ihr Substrat an einem spezifischem Aspartatrest spalten und selbst durch Spaltung an einem Aspartatrest ihrer N-terminalen Prodomäne in die aktive Form überführt werden (Song *et al.*, 1999). Caspasen liegen als inaktive Vorstufen (Procaspasen) im Cytosol vor. Erreicht ein apoptotischer Reiz die Zelle wird eine sich selbst verstärkende Caspase-Kaskade ausgelöst. An deren Anfang stehen die sogenannten Initiator-Caspasen, welche wiederum die sogenannten Effektor-Caspasen aktivieren (Wolf *et al.*, 1999). Diese spalten nach ihrer Aktivierung zelluläre Proteine wie Aktin, die an der Reparatur zellulärer DNA beteiligte Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP) (Kaufmann *et al.*, 1993), den Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) (Wyllie, 1998), nukleäres Lamin und Proteinkinase C. Die gezielte Spaltung dieser Proteine führt neben der DNA-Degradierung zu einem gesteuerten Abbau der Zelle und zur Entstehung der apoptotischen Körper.

Während der Apoptose werden verschiedene Endonukleasen aktiviert, welche die zelluläre DNA zunächst in 300 kb und/oder 50 kb große Fragmente spalten (Oberhammer *et al.*, 1993). Es folgt eine internukleosomale Spaltung der Fragmente in 180-200 bp große Fragmente durch die Endonuclease CAD (Caspase-activated DNase) (Liu *et al.*, 1997). Diese Mehrfachspaltung wird im Gel als DNA-Leiter sichtbar und dient als Apoptose-nachweis.

Transglutaminasen katalysieren eine Quervernetzung von Membranproteinen und gewährleisten so, daß die apoptotischen Körper während des Zell-Abbaus intakt bleiben und es zu keiner Freisetzung des Cytoplasmas kommt.

3.2.2 Apoptoseregulation

Die Apoptose wird streng reguliert, insbesondere durch Mitglieder der Bcl-2 (B-cell Lymphoma gene 2)-Familie. Bei diesen Proteinen handelt es sich in der Regel um integrale Membranproteine, die hauptsächlich in der nukleären Membran, im Endoplasmatischen Reticulum und in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Einige Mitglieder dieser Familie haben eine antiapoptotische Funktion wie Bcl-2 und Bcl-x_L (White,1996), während andere Mitglieder proapoptotisch wirken. Zu diesen zählen Bid (Schendel *et al.*,1999a), Bad (Downward,1999) und Bax (Yin *et al.*,1997). Wie diese Proteine den apoptotischen Prozeß beeinflussen ist im Detail noch nicht geklärt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, daß sich Mitglieder der Bcl-2-Familie untereinander durch Bildung von Homo- oder Heterodimeren induzieren oder inhibieren. Zusätzlich zeigte sich in dreidimensionalen Strukturuntersuchungen, daß Bcl-x_L, Bcl-2, Bax und Bid dem Ionen-Kanal-bildenden Bereich von bakteriellem Colicin oder Diphtherie-Toxin ähneln (Schendel *et al.*,1999b). In der Tat können alle vier Proteine in synthetischen Lipidmembranen Ionen-Kanäle bilden (Schendel *et al.*, 1999b).

Des weiteren ist eine direkte Kontrolle der Caspaseaktivität essentiell. Caspase-3, -7 und -9 werden von der sogenannten Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Familie durch Bindung inhibiert. Zu den Mitgliedern dieser Familie zählen cIAP-1, cIAP-2, XIAP und Survivin (Deveraux *et al.*, 1998; Deveraux *et al.*,1999). Deren Aktivität wird wiederum durch das mitochondriale Protein Smac/Diablo (Second Mitochondrial-derived Activator Caspase/Direct IAP-Binding protein with low pI) beeinflusst. Wird dieses aufgrund apoptotischer Signale aus den

Mitochondrien frei, bindet es spezifisch an IAPs und ermöglicht so eine Caspase-Aktivierung (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000).

Weitere an der Apoptosekontrolle beteiligte Proteine sind der ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) und der Onkosuppressor p53. NF- κ B aktiviert transkriptionell ein breites Genspektrum von Wachstumsfaktoren, Interleukinen und MHC-Molekülen (zur Übersicht: Foo *et al.*, 1999) bis zu direkt antiapoptotisch wirkenden Proteinen wie Bcl-2, cIAP-1 und -2 (Baldwin, 1996; Wang *et al.*, 1998; Zong *et al.*, 1999). p53 koordiniert die zelluläre Antwort auf Zellschäden, Hypoxie, onkogene Transformation und Entzug von Wachstumsfaktoren. Aktiviertes p53 induziert unter anderem die Transkription Apoptose-assoziiierter Gene wie Bax, Fas, DcR1 und DR5 (White, 1996; Wu *et al.*, 1997; Sheikh *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999).

3.2.3 Rezeptor-vermittelte Apoptose

Apoptose kann durch eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Faktoren ausgelöst werden. Dazu gehören Hitze, Strahlung, Chemotherapeutika, Steroide, Ischämie sowie parakrine Signale oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Zusätzlich zu dieser Rezeptor-unabhängigen Apoptose haben Metazoen eine Rezeptor-vermittelte Weiterleitung der Apoptose entwickelt.

Im Mittelpunkt der Rezeptor-vermittelten Apoptose stehen die Wechselwirkungen der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Rezeptorfamilie mit der TNF-Ligandenfamilie. Die Rezeptoren dieser Superfamilie sind durch eine Transmembrantopolgie des Typs I und eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne charakterisiert. Eine Subfamilie der TNF-Rezeptorfamilie bilden die sogenannten Todesrezeptoren, welche in ihrem intrazellulären Anteil eine sogenannte Todesdomäne (DD=Death Domain) enthalten. Diese ist für die Weiterleitung des apoptotischen Signals essentiell. Weiterhin sind drei sogenannte Decoy-Rezeptoren (DcR1-3) bekannt, die keine oder nur eine

verkürzte DD besitzen. Diese Rezeptoren können zwar den Liganden binden, aber das apoptotische Signal nicht übermitteln. Zu den am genauesten untersuchten Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie gehören die proapoptischen Rezeptoren Fas (auch CD95 oder Apo-1), TNF-R1 (TNF-Rezeptor 1), TNF-R2 (TNF-Rezeptor 2), DR4 (Death Receptor 4, auch TRAIL-R1) und DR5 (Death Receptor 5, auch TRAIL-R2, TRICK2 oder KILLER), die antiapoptischen Rezeptoren DcR1 (Decoy Receptor 1, auch TRAIL-R3, LIT oder TRID) und DcR2 (Decoy Receptor 2, auch TRAIL-R4 oder TRUND) und der lösliche Rezeptor Osteoprotegerin (OPG). Bei den Liganden der TNF-Familie handelt es sich um Transmembranproteine des Typs II. Ihre extrazelluläre Domäne kann durch Proteasen abgetrennt werden, so daß der Ligand in löslicher Form vorliegt (Mariani *et al.*, 1998). Als Hauptbeteiligte bei der Apoptoseinduktion sind TNF- α , FasL (Fas Ligand, auch CD95L oder Apo-1L) und TRAIL-(TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, auch Apo-2L) identifiziert worden. TNF- α überträgt das apoptotische Signal über TNF-R1 und unter bestimmten Bedingungen über TNF-R2. Ähnlich verläuft die Apoptoseinduktion durch FasL und Fas, während TRAIL Apoptose über DR4 und DR5 vermittelt (zur Übersicht: Nagata, 1997; Ashkenazi *et al.*, 1998; Degli-Esposti, 1999).

Todesliganden bilden in der Regel Trimere. Bei Bindung quervernetzen und aktivieren diese den Rezeptor (Golstein, 2000).

3.2.3.1 FasL-vermittelte Apoptose

Fas wird ubiquitär, insbesondere aber in Thymus, Leber, Herz und Nieren exprimiert (Itoh *et al.*, 1991; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Der Ligand wird hingegen nur von aktivierten T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie von immunprivilegierten Geweben wie Auge und Hoden gebildet (Suda *et al.*, 1993). Wichtige Funktionen der FasL-vermittelten Apoptose sind periphere Deletion aktivierter, reifer T-Zellen am Ende einer Immunantwort (Watanabe *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1994) sowie Abtötung von Krebs- oder virusinfizierten Zellen durch cytotoxische

T-Zellen oder NK-Zellen (Zamai *et al.*, 1998; Nagata *et al.*, 1995). Zudem werden über den Fas/FasL-Weg inflammatorische Zellen in immunsprivilegierten Geweben eliminiert (Bellgrau *et al.*, 1995; Griffith *et al.*, 1995).

Das Fas/FasL-Paar stellt das bis heute am besten charakterisierte Apoptose-Modell dar und wird im folgenden kurz beschrieben. Durch Stimulation aggregieren die intrazellulären Death Domains (DD) des Rezeptors. Erst jetzt ist eine Bindung des Adapterproteins FADD (Fas-associated Death Domain Protein, auch MORT-1) über seine eigene DD an den aktivierten Rezeptor möglich (Boldin *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1995). Im freien N-terminalen Bereich von FADD befindet sich des weiteren eine sogenannte Death Effector Domain (DED), über die Procaspase-8 oder -10 an den sogenannten DISC (Death-Inducing Signaling Complex) rekrutiert werden (Vincenz *et al.*, 1997). Durch die im DISC vorherrschende Nähe erfolgt eine autokatalytische Aktivierung der Procaspasen (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995; Krammer, 2000).

Bei Typ-I-Zellen ist die Konzentration der aus dem DISC frei werdenden Caspase-8 ausreichend, um in einer Kaskade mehrere Effektorcaspasen (Caspase-3, -6, -7) direkt aktivieren zu können. Diese führen letztlich zur Degradierung der Zelle. Im Gegensatz dazu wird bei Typ-II-Zellen nicht genügend aktive Caspase-8 aus dem DISC frei, so daß die Mitochondrien als Verstärkersignal benötigt werden (zur Übersicht: Scaffidi *et al.*, 1998; Krammer, 2000). Es erfolgt zunächst eine durch Caspase-8 induzierte Spaltung und Aktivierung von Bid, einem proapoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie (Li *et al.*, 1998). Proteolytisch modifiziertes Bid insertiert wiederum in die mitochondriale Membran und löst eine Oligomerisierung von Bax und eine Freisetzung von Cytochrom *c* aus (Green *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Dieses assoziiert in Anwesenheit von ATP/dATP mit Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1) und Procaspase-9 zum sogenannten Apoptosom. Caspase-9 erfährt im Apoptosom eine autokatalytische Aktivierung (Zou *et al.*, 1999). Prozessierte Caspase-9 rekrutiert Procaspase-3, welche wiederum sich außerhalb des DISCs befindende Procaspase-8 aktiviert (Krammer, 2000).

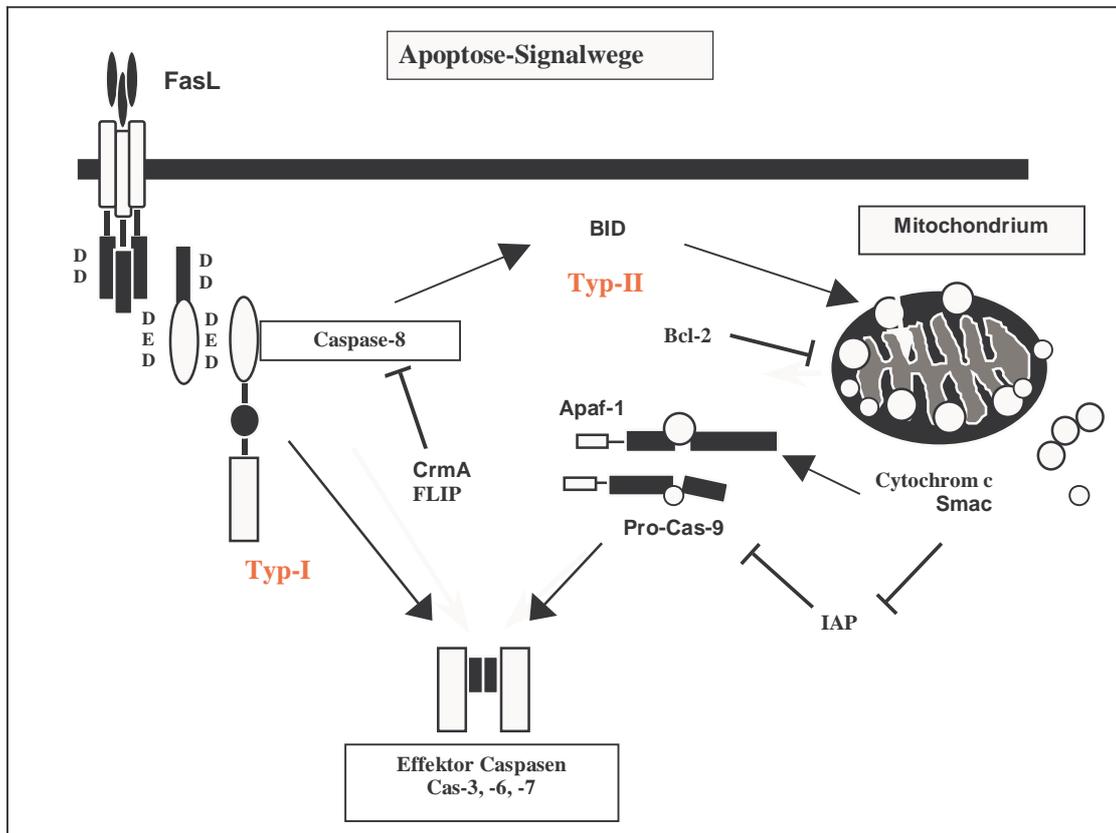


Abb. 1: Schematische Darstellung der FasL-vermittelten Apoptose sowie der Typ-I bzw. Typ-II-Signalkaskade. DD= Death Domain, DED= Death Effector Domain.

Eine Überexpression von antiapoptotischen Bcl-2 verhindert eine Freisetzung von Cytochrom c und Smac aus den Mitochondrien (Vaux *et al.*, 1992; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Tsujimoto *et al.*, 2002), eventuell durch Heterodimerisierung mit Bax und Schließung Spannungs-abhängiger Anionen-Kanäle VDAC (voltage-dependent anion channel) in der äußeren Mitochondrienmembran (Tsujimoto *et al.*, 2002). Obwohl es bei Typ-I-Zellen zu einem ebenso starken Ausstrom von Cytochrom c kommt, kann eine Überexpression von Bcl-2 nur die in Typ-II-Zellen aktivierte Apoptose hemmen (Scaffidi *et al.*, 1998). Zusätzlich kann Fas-vermittelte Apoptose durch verschiedene Faktoren wie FLIP (FLICE-Inhibitory-Protein) auf Höhe von Caspase-8 gehemmt werden. Zelluläres FLIP liegt in der Zelle in verschiedenen Isoformen vor, die zwar strukturell Procaspase-8 ähneln, aber keine oder nur eine eingeschränkte enzymatische Aktivität aufweisen. FLIP hemmt also durch Konkurrenz eine Aktivierung von Procaspase-8 und

Freisetzung aktiver Caspase-8 auf Höhe des DISC (Krueger *et al.*, 2001a; Thome *et al.*, 2001). Ein weiterer Inhibitor der Caspase-8-Aktivität, aber auch von Caspase-1, ist CrmA (Cytokine response Modifier A), ein Protein des Kuhpockenvirus (Tewari *et al.*, 1995; Budihardjo *et al.*, 1999; Ekert *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1996).

3.2.3.2 TRAIL-vermittelte Apoptose

Der proapoptotische Ligand TRAIL wurde aufgrund seiner Homologie zu TNF von zwei Forschungsgruppen entdeckt. TRAIL wird von vielen menschlichen Organen, insbesondere aber in Milz, Prostata, und Lunge, konstitutiv exprimiert (zur Übersicht: Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996). Die mRNA der beiden proapoptotischen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 und des antiapoptotischen TRAIL-Rezeptors DcR2 liegt in den meisten menschlichen Geweben vor (Degli-Eposti *et al.*, 1997a; Degli-Eposti *et al.*, 1997b; MacFarlane *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997b; Wu *et al.*, 1997). Hingegen ist das zell- und gewebstypische Expressionsmuster des zweiten TRAIL-Decoy-Rezeptors DcR1 etwas eingeschränkter als das der anderen TRAIL-bindenden Rezeptoren. Seine Transkripte konnten nur in Milz und peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen werden (Degli-Eposti *et al.*, 1997a; Schneider *et al.*, 1997a; Pan *et al.*, 1997b; Sheridan *et al.*, 1997).

TRAIL spielt eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr und Immunregulation (Mariani *et al.*, 1998; Zamai *et al.*, 1998; Griffith *et al.*, 1999b; Jeremias *et al.*, 1998) sowie bei der Apoptose virusinfizierter Zellen (Sedger *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000). Aufgrund der Tatsache, daß TRAIL bei vielen Tumorzellen, nicht aber bei gesunden Zellen Apoptose auslöst, ist der Ligand zudem für eine potentielle Tumorthherapie von herausragendem Interesse (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1998a; Degli-Eposti *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Allerdings werden zunehmend Tumorzelllinien entdeckt, die TRAIL-resistent sind (Griffith *et al.*, 1999a).

Das momentan postulierte Modell der TRAIL-vermittelten Apoptose ähnelt dem des Fas/FasL-Paar sehr. Beide proapoptische TRAIL-Rezeptoren besitzen eine DD, durch die nach Aggregation eine Interaktion mit FADD und eine anschließende Einleitung der Caspase-Kaskade über Caspase-8 möglich ist (Bodmer *et al.*, 2000; Kuang *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000). Letzteres führt zu einer Aktivierung von Effektorcaspase-3 (Griffith *et al.*, 1998b; Sprick *et al.*, 2000). Allerdings wurde auch eine FADD-unabhängige Induktion TRAIL-assoziiierter Apoptose beschrieben (Pan *et al.*, 1997a; Yeh *et al.*, 1998). Ebenso wie für FasL wurde auch für TRAIL, je nach untersuchter Zellart, eine Mitochondrien-abhängige oder -unabhängige Apoptoseinduktion beschrieben (Suliman *et al.*, 2001; Keogh *et al.*, 2000). Erstere ist durch Überexpression von Bcl-2 inhibierbar (Sun *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zu DR4 und DR5 besitzen die beiden antiapoptischen TRAIL-Rezeptoren DcR1 und DcR2 keine bzw. eine nicht funktionelle intrazelluläre Domäne. Somit ist eine Apoptoseinduktion über diese Rezeptoren nicht möglich (Degli-Eposti *et al.*, 1997a; Degli-Eposti *et al.*, 1997b; Sheridan *et al.*, 1997; Mongkolsapaya *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 1998).

Eine Ausnahme bildet OPG (Osteoprotegerin), das im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren keine Transmembrandomäne besitzt. Obwohl das antiapoptische OPG TRAIL bindet, wird vermutet, daß seine physiologische Funktion bei der Knochenresorption über einen anderen Liganden vermittelt wird (Simonet *et al.*, 1997; Emery *et al.*, 1998).

Anfänglich wurde angenommen, daß das Verhältnis Decoy-Rezeptoren/Todesrezeptoren über die TRAIL-Sensibilität einer Zelle entscheidet. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, daß Decoy-Rezeptoren auch von Tumorzellen exprimiert werden. Somit sind wahrscheinlich komplexere intrazelluläre Mechanismen wie die Expression von FLIP für die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose verantwortlich (Griffith *et al.*, 1998a; Keane *et al.*, 1999; Leverkus *et al.*, 2000a).

3.3 Bedeutung der *H. pylori*-induzierten Apoptose für die Krankheitspathogenese

Im gesunden Magen finden Apoptose und Proliferation nur in geringem Ausmaß statt. Um sowohl eine Homöostase des Gewebes als auch einen kontrollierten Zellumsatz zu erhalten, unterliegen beide Prozesse einer strengen Kontrolle. Während Apoptose hauptsächlich im Bereich der Magengrübchen und -drüsen stattfindet, ist die Proliferation auf die sogenannte Halsregion der Magenschleimhaut begrenzt.

In der *H. pylori*-infizierten Magenmukosa hingegen ist das empfindliche Gleichgewicht, welches zwischen Proliferation und Apoptose besteht, gestört. So konnte eine Induktion der Apoptoserate durch *H. pylori* sowohl in Patienten, die an peptischer Ulzera litten (Moss *et al.*, 1996; Konturek *et al.*, 1999), als auch bei Gastritis-Patienten (Mannick *et al.*, 1996; Steininger *et al.*, 1998) nachgewiesen werden. Des weiteren wurde mit Hilfe von *in vitro* Studien gezeigt, daß *H. pylori* direkt Apoptose bei Magenepithelzellen auslösen kann (Chen *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1998). Neben einer direkten Schädigung der Magenschleimhaut scheint die *H. pylori*-induzierte Apoptose jedoch auch für die Karzinogenese von Bedeutung zu sein (Xia *et al.*, 2001).

Als Antwort auf die bei einer Gastritis auftretenden Apoptosesteigerung nimmt die Proliferation der Magenschleimhaut zu. So kann zunächst eine Homöostase des Gewebes auf Kosten eines gesteigerten Zellumsatzes erhalten bleiben. Im weiteren Krankheitsverlauf fällt die Apoptoserate wieder ab, es kommt aber zu keiner der Situation angepaßten Verminderung der Proliferation. Im Gegenteil, die Proliferationszone expandiert und breitet sich bis in den Bereich der Drüsen aus. Eine immer weiter ansteigende Zellzahl erhöht das Risiko genetischer Defekte und fördert somit die Entstehung maligner Transformationen.

Die *H. pylori*-induzierte Apoptose ist demnach zum einen direkt durch eine Gewebsschädigung, zum anderen indirekt durch Induktion einer kompetitiven Hyperproliferation an der Pathogenese *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen beteiligt. Daher ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die an der von *H. pylori* vermittelten Apoptose beteiligt sind, für die Entwicklung therapeutischer Strategien essentiell.

4 Zielsetzung

Die der *H. pylori*-induzierten Apoptose zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind bis heute im Detail nicht verstanden. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

1. Welche Rolle spielt das Fas/FasL-System bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose in Magenepithelzellen ?
 - Findet eine Modulation von Fas oder FasL durch den Keim statt ?
2. Aufklärung der von *H. pylori* in Magenkarzinomzellen induzierten intrazellulären Signalkaskade.
 - Induziert das Pathogen den mitochondrialen Apoptoseweg und wenn ja, welche Bedeutung kommt ihm bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose zu (Typ-I-oder Typ-II-Signaling) ?
 - Welche Rolle spielen die Rezeptor-assoziierten Ereignisse wie DISC-Bildung und Caspase-8-Aktivierung während der *H. pylori*-induzierten Apoptose ?
3. Welche Bedeutung haben TRAIL und seine proapoptotischen Rezeptoren DR4 und DR5 für die von *H. pylori* in Magenepithelzellen ausgelöste Apoptose ?
 - werden diese Proteine im Zuge der *H. pylori*-induzierten Apoptose in Magenepithelzellen *in vitro* reguliert ?
 - sind DR4 und DR5 an der Transduktion des von *H. pylori*-initiierten apoptotischen Signals direkt involviert ?
4. Welche Rolle spielen die bakteriellen Pathogenitätsfaktoren VacA, CagA und cag-PAI bei der Vermittlung des apoptotischen Zelltods *in vitro* ?
5. Verhalten sich primäre humane Magenepithelzellen und Magenkarzinomzellen bezüglich der *H. pylori*- und TRAIL-medierten Apoptose unterschiedlich, wenn ja, woraus resultieren diese Differenzen ?

5 Material und Methoden

5.1 *Materialien*

5.1.1 Eukaryontische permanente Zelllinien

AGS	adhärente Adenokarzinom-Zelllinie, die aus humanem Magenepithel (ATCC CRL-1739) gewonnen wurde.
Phoenixzellen	modifizierte 293-Zellen (humane, embryonale Nieren-Zelllinie); amphotrophe Packungszelllinie für Retroviren, exprimiert die <i>gag</i> , <i>pol</i> und <i>env</i> Genprodukte des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV) (freundlich überlassen von G.P. Nolan, Stanford University, USA).
GP-293	modifizierte 293-Zellen (humane, embryonale Nieren-Zelllinie); retrovirale Packungs-Zelllinie, exprimiert die <i>gag</i> und <i>pol</i> Genprodukte des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMuLV), bei Kotransfektion mit pVSV-G pantrophes System (Fa. Clontech, Heidelberg).

Alle eingesetzten Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmenbefall untersucht (mikrobiologische Abteilung, MH-Hannover).

5.1.2 Bakterienstämme

Helicobacter pylori P12
(*H. pylori* P12)

Cytotoxin VacA bildender *cagA*-positiver *Helicobacter pylori*-Stamm. Diente als WT-Kontrolle für die isogenen Mutanten *Helicobacter pylori* P12*cagA*⁻, *Helicobacter pylori* P12*vacA*⁻ und *Helicobacter pylori* P12PAI⁻ (freundlich überlassen von R. Haas, München).

Helicobacter pylori P12*cagA*⁻
(*H. pylori* P12*cagA*⁻)

Isogene Mutante von *H. pylori* P12, der das *cagA*-Gen auf Grund einer Deletion fehlt (freundlich überlassen von R. Haas, München).

Helicobacter pylori P12*vacA*⁻
(*H. pylori* P12*vacA*⁻)

Isogene Mutante von *H. pylori* P12, die das *vacA*-Gen durch Transposonmutagenese verloren hat (freundlich überlassen von R. Haas, München).

Helicobacter pylori P12PAI⁻
(*H. pylori* P12PAI⁻)

Isogene Mutante von *H. pylori* P12, bei der die gesamte *cag*-Pathogenitätsinsel deletiert wurde (freundlich überlassen von R. Haas, München).

Escherichia coli JM109
(*E. coli* JM109)

Modifizierter *E. coli* Stamm, der zur stabilen Replikation von Plasmiden in hoher Kopienzahl entwickelt wurde. Dieser Stamm wurde chemisch kompetent eingesetzt. Genotyp: F' {*traD36 proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15} *endA1 bsdR17* (*r_k*⁻; *m_k*⁺) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1* Δ(*lac-proAB*) (Life Technologies, Karlsruhe).

5.1.3 Retrovirale Plasmide

- pLXIN** Bicistronischer, retroviraler low copy Vektor; entstanden aus dem Moloney Maus Leukämie Virus. Der Vektor enthält zur Selektion in *E. coli* ein Ampicillin-Resistenzgen und als Selektionsmarker in eukaryontischen Zellen ein Neomycin-Resistenzgen. Mit Hilfe dieses Vektors können in den entsprechenden Packungszellen infektiöse und replikationsinkompetente Retroviren produziert werden. Da dem Vektor die Gene für Virusbildung und -replikation fehlen, ist er außerhalb entsprechender Verpackungszellen, die diese Gene stabil exprimieren, nicht vermehrungsfähig. pLXIN-transduzierte Zellen dienten als Kontrolle gegenüber pLXINBcl-2-, pLXINCrmA- und pLXIN-dnFADD-transduzierten Zellen (Fa. Clontech, Heidelberg).
- pLXIN-Bcl-2** Dieses Plasmid wurde zur Generierung rekombinanter Retroviren verwendet. Es enthält die Gesamtlängen-cDNA für murines Bcl-2 in sense-Orientierung (freundlich überlassen von S. Bortlik, MH-Hannover).
- pLXIN-CrmA** Dieses Plasmid wurde zur Generierung rekombinanter Retroviren verwendet. Es enthält die Gesamtlängen-cDNA für virales CrmA aus dem Kuhpockenvirus in sense-Orientierung (freundlich überlassen von S. Bortlik, MH-Hannover).
- pLXIN-dnFADD** Dieses Plasmid wurde zur Generierung rekombinanter Retroviren verwendet. Es enthält die cDNA für murines FADD, bei dem der die Death Effector Domain (DED) kodierende Bereich deletiert und durch ein Flag-tag (GAC-TAC-AAG-GAC-GAT-GAC-AAG-A) ersetzt worden ist (freundlich überlassen von S. Bortlik, MH-Hannover).

pLXRN	Aus dem Moloney Maus Leukämie Virus entstandenes, retrovirales, low copy Plasmid. Der Vektor enthält zur Selektion in <i>E. coli</i> ein Ampicillin-Resistenzgen und zur Selektion in eukaryontischen Zellen ein Neomycin-Resistenzgen. Dem Plasmid fehlen die strukturellen Gene zur viralen Partikelbildung und -replikation. Mit Hilfe dieses Vektors können in den entsprechenden Packungszellen infektiöse, aber replikationsinkompetente Retroviren produziert werden. Zellen, die mit diesem Vektor transduziert wurden, dienten als Kontrolle gegenüber pLXRN-DR4as-, bzw. pLXRN-DR5as-transduzierten Zellen (Fa. Clontech, Heidelberg).
pLXRN-DR4as	Dieses Plasmid wurde zur Generierung rekombinanter Retroviren verwendet. Es enthält die cDNA für humanes DR4 in antisense Orientierung (freundlich überlassen von B. Mundt, MH-Hannover).
pLXRN-DR5as	Dieses Plasmid wurde zur Generierung rekombinanter Retroviren verwendet. Als Insert enthält es die cDNA für humanes DR5 in antisense-Orientierung (freundlich überlassen von B. Mundt, MH-Hannover).

5.1.4 Molekulargewichtsstandards

1 kb-DNA-Leiter	Life Technologies, Karlsruhe
Prestained SDS-Page standard low range	Biorad, München
Full Range Rainbow Marker	Amersham, Freiburg

5.1.5 Enzyme

Collagenase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Dispase	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Mannheim
Restriktionsendonukleasen <i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI, <i>Nae</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Xho</i> I	New England Biolabs, Schwalbach
RNase, DNase frei	Boehringer Mannheim, Mannheim
Superscript II RNase H Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq-Polymerase	Invitrogen, Carlsbad, USA

5.1.6 Antikörper

Donkey anti-goat IgG-HRP mouse human adsorbed	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Donkey anti-rabbit IgG-HRP	Dianova, Hamburg
Goat polyclonal IgG anti-human Actin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Mouse monoclonal IgG ₁ anti-human/mouse/rat Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Mouse monoclonal IgG ₁ anti-human Caspase-8	Oncogene, San Diego, USA
Mouse monoclonal IgG ₁ anti-CrmA	PharMingen, San Diego, USA
Mouse monoclonal IgG anti-human Cytochrome <i>c</i>	R&D, Wiesbaden
Mouse monoclonal IgG anti-human Cytokeratin peptide 18	Sigma, Deisenhofen
Goat polyclonal IgG anti-human DcR1	Alexis Biochemicals, Grünberg (Western Blot)

Rabbit polyclonal IgG anti-human DcR2	ProSci Incorporated, USA (Western Blot und Immunhistologie)
Rabbit polyclonal IgG anti-human DR4	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (Western Blot und Immunhistologie)
Rabbit polyclonal IgG anti-human Fas	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit polyclonal IgG anti-human FasL	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Mouse monoclonal IgG ₁ anti-FLAG [®] M2	Sigma, Deisenhofen
Goat Polyclonal IgG anti-human Smac	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit polyclonal IgG anti-human TRAIL	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Rabbit polyclonal IgG anti-human/mouse TRAIL R2/DR5	R&D, Wiesbaden (Western Blot und Immunhistologie)
Goat polyclonal IgG anti-human TRAIL-R3	R&D, Wiesbaden (Immunhistologie)

5.1.7 Rekombinante Proteine

rhsTRAIL	lösliches, rekombinantes, humanes TRAIL; reagiert mit den TRAIL-Rezeptoren von Maus und Mensch; enthält einen Enhancer zur Verstärkung der TRAIL-Aktivität; rhs-TRAIL wurde in Konzentrationen von 10-1000 ng eingesetzt (Fa. Alexis Biochemicals, Grünberg).
FasL	lösliches, rekombinantes, humanes Fas Ligand (FasL), reagiert mit dem Fas-Rezeptor von Mensch, Maus und Ratte; enthält einen Enhancer zur Verstärkung der Aktivität von FasL; wurde in einer Konzentration von 500 ng eingesetzt (Fa. Alexis Biochemicals, Grünberg).

5.1.8 Primer

DR4

sense 5'- TGA GCA ACG CAG ACT CGC TGT CCA C-3'
antisense 5'- TCC AAG GAC ACG GCA GAG CCT GTG CCA T-3'
Produkt: 506 bp (bp 898-1403)
Annealing-Temperatur: 63°C

DR5

sense 5'-GCC TCA TGG ACA ATG AGA TAA AGG TGG CT-3'
antisense 5'- CCA AAT CTC AAA GTA CGC ACA AAC GG-3'
Produkt: 478 bp (bp 1229-1706)
Annealing-Temperatur: 60°C

DcR1

sense 5'-GAA GAA TTT GGT GCC AAT GCC ACT G-3'
antisense 5'- CTC TTG GAC TTG GCT GGG AGA TGT G-3'
Produkt: 612 bp (bp 638-1249)
Annealing-Temperatur: 60°C

DcR2

sense 5'- CTT TTC CGG CGG CGT TCA TGT CCT TC-3'
antisense 5'- GTT TCT TCC AGG CTG CTT CCC TTT GTA G-3'
Produkt: 464 bp (bp 854-1317)
Annealing-Temperatur: 62°C

FLIP

sense 5'- TCT AGC AGG GAA GCC AAA GA-3'
antisense 5'- GGC AGA AAC TCT GCT GTT CC-3'
Produkt: 337 bp (bp 1423-1759)
Annealing-Temperatur: 55°C

β-Actin als Housekeeping-Gen:

sense 5'- GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3'
antisense 5'- AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3'
Produkt: 202 bp (bp 655-856)
Annealing-Temperatur: 60°C

5.1.9 Kits

Cell Death Detection ELISA ^{PLUS}	Boehringer Mannheim, Mannheim
Histostain TM -Plus-Kit	Zymed Laboratories INC., San Francisco, USA
In Situ Cell Death Detection, POD	Roche, Mannheim
Qiagen Endofree Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiashredder	Qiagen, Hilden
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

5.1.10 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose (Electrophoresis grade)	Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniak (25%)	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Amphotericin B	PAA, Cölbe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Ampuwa TM für Spülzwecke	Fresenius, Bad Homburg
Bactotrypton	Life Technologies, Karlsruhe
Brain Heart Infusion (BHI)	Oxoid, England
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
Butanol	J.T. Baker, Griesheim
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
Chloroquin	Sigma, Deisenhofen
DAB, metal enhanced substrate set	Roche, Mannheim
Dextrose	ICN, Eschwege
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies, Karlsruhe
dNTP's	Promega, Madison, USA
DPX (Distyrene, Plasticizer, Xylene) Mountant for Microscopy)	Polysciences Inc., Eppelheim
N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglykol-bis (β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (EGTA)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	J.T. Baker, Griesheim

Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Farbreagenz für Proteinmessung	BioRad, München
FCS (fetal calf serum)	Life Technologies, Karlsruhe
Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose	Sigma, Deisenhofen
L-Glutamin	Life Technologies, Karlsruhe
Glycerin	Sigma, Deisenhofen
Glycin	AppliChem, Darmstadt
Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Life Technologies, Karlsruhe
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	ICN, Eschwege
Isopropanol	J.T. Baker, Griesheim
Kaisers Glyceringelantine	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
LipofectAmine™	Life Technologies, Karlsruhe
Lysozym	Applichem, Darmstadt
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Life Technologies, Karlsruhe
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat·Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Neomycin (G418)	Calbiochem, Schwalbach
Nonidet™ P-40	Sigma, Deisenhofen
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	Invitrogen, Carlsbad, USA)
OptiMEM	Life Technologies, Karlsruhe
10 x PCR-Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phosphate buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Karlsruhe
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
RNase Out	Invitrogen, Carlsbad, USA)

RNasin®	Promega, Madison, USA
RPMI 1640	Life Technologies, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween™ 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylol	J.T. Baker, Griesheim

5.1.11 Sonstige Materialien und Geräte

Aufsatzkamera Progressive 3CCD	Sony, Köln
Bakterienbrutschrank 2737	Köttermann, Uetze
Cell Scraper	Sarstedt, Nümbrecht
Complete™ Mini-Proteasen-Inhibitoren Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Columbia Agarplatten mit 5% Schafsblut	Becton Dickinson, Heidelberg
ECL-Detektions Kit™	NEN, Brüssel, Belgien
Einmalpipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (steril)	Greiner, Nürtingen
Elektrophoresekammer, horizontal	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer, vertikal	Biometra, Göttingen
Fastblot/Semi-Dry-Blot B33	Biometra, Göttingen
Feinwaage Mettler H20T	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Filmkassette mit Verstärkerfolie	Amersham, Freiburg
Fotofilm Ektachrom 400 und 100	Kodak, Rochester, USA
Kühlzentrifuge 2 K 15	Sigma, Deisenhofen
Kühlzentrifuge GS-6G	Beckman, München
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührgerät	Jürgens-Omnilab, Hannover
Mikroskop BX60	Olympus, Hamburg
3MM Filterpapier	Whatman, Göttingen
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main

Material und Methoden

Nunc-Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
PCR-Maschine	Biometra, Göttingen
Phasenkontrastmikroskop	Hund, Wetzlar
pH-Meter MP220	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Photometerplatten zur DNA-Bestimmung	Corning Costar, Bodenheim
Plastikküvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polypropylenröhrchen (Reagiergefäß, 15 ml, 50 ml)	Greiner, Nürtingen
Potter-Homogenisator	Braun, Melsungen
PVDF-Membran (Immobilon-P)	Millipore, Eschborn
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (HyperfilmMP™)	Amersham, Freiburg
Schüttler für Bakterienkulturen	Edmund Bühler, Tübingen
Schwenkgerät (Red Rocker)	Amersham, Freiburg
Spannungsgerät	Life Technologies, Karlsruhe
Sterilarbeitsbank HERA safe	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
UV-Crosslinker Stratalinker	Stratagene, Heidelberg
Variopipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Vortex	Jürgens-Omnilab, Hannover
Waage Sartorius MC1	Sartorius, Göttingen
Wasserstrahlpumpe Plastibrand PP	Jürgens-Omnilab, Hannover
Zellkulturbrutschrank	Heraeus, Hanau
Zellkulturflaschen 5 ml mit Filter	Nunc Life Technolgies, Karlsruhe
Zellkulturflaschen, -platten und -schalen	Greiner, Nürtingen

5.2 Kultivierung von *H. pylori*

H. pylori wurde auf Columbia-Agarplatten mit 5% Schafsblut unter mikroaerophilen Bedingungen (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) und in einem leicht feuchtem Milieu bei 37°C angezüchtet. Nach zwei Tagen hatte sich ein geschlossener Bakterienrasen gebildet, der für weiterführende Experimente verwendet werden konnte. Für die vorliegende Arbeit wurden von *H. pylori* P12 und den entsprechenden isogenen Mutanten die Passagen 5-8 eingesetzt.

Zur Stammerhaltung wurden die Bakterien in Brain Heart and Infusion-Glycerin-Stocks (20% BHI; 10% FCS; 10% Glycerin) bei -80°C gelagert.

5.3 Zellbiologische Methoden

5.3.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Die adhärent wachsende humane Magenepithelzelllinie AGS wurde in 250 ml-Gewebekulturflaschen mit 12,5 ml RPMI 1640 (supplementiert mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin) bei 37°C und 5% CO₂ im Begasungsbrutschrank kultiviert. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen mit PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen und mit einer 0,13%igen Trypsinlösung für eine Minute im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend verworfen und die Zellen im Verhältnis 1:8 in frischem Medium resuspendiert und erneut ausgesät.

Die Kultivierung der beiden adhärent wachsenden Zelllinien Phoenix und Gp-293 erfolgte in 250 ml-Gewebekulturflaschen in 12,5 ml DMEM + Glutamax (supplementiert mit 10% FCS und 1% Pen/Strep) bei 37°C und

5% CO₂. Eine Trypsinierung der Zellen erfolgte wie oben für AGS-Zellen beschrieben.

Trypsinlösung (0,13%)

PBS

130 mM NaCl
30 mM NaHCO₃
6 mM KCl

Citratlösung

1 M NaCl
0,07 M KCl
0,3 M C₆H₅Na₃O₇·2H₂O

Gebrauchslösung

In 90 ml PBS, versetzt mit 10 ml Citratlösung und 10 ml einer 1%igen Glucose-Lösung (w/v) werden 0,14 g Trypsin gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

5.3.2 Herstellung stabiler Zelllinien mittels Retroviren

Bei der Herstellung einer stabilen Zelllinie mittels Retroviren wird zunächst eine spezifische eukaryontische Verpackungszelllinie, die Gene für die Produktion von Retroviren (*gag*, *pol* und *env*) enthält, mit einem retroviralen Plasmid transfiziert. Eine Replikation der gebildeten Retroviren ist außerhalb der Verpackungs-Zelllinien nicht möglich.

Die Ziel-Zelllinie wird nach mehrfacher Transduktion durch die gebildeten replikationsinkompetenten Retroviren einem Selektionsdruck ausgesetzt. Diesen können nur Zellen überleben, die das retrovirale Genom einschließlich des entsprechenden Selektionsmarkers über Reverse Transkription stabil in ihr Genom integriert haben. Durch klonale Selektion erhält man genetisch einheitliche Zelllinien.

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden Plasmide verwendet, die endotoxinfrei isoliert wurden (Abschnitt 5.5.5.2).

5.3.2.1 Transfektionsmethoden

Unter einer Transfektion versteht man das Einschleusen von Fremd-DNA in Zellen.

5.3.2.1.1 Transfektion der Verpackungs-Zelllinie GP-293

Um retrovirale Plasmide in die Verpackungs-Zelllinie GP-293 einzuschleusen, wurde eine transiente Transfektion mittels LipofectAmine™ durchgeführt. Bei LipofectAmine™ handelt es sich um ein Liposomenreagenz aus polykationischen und neutralen Lipiden im Verhältnis 1:3. Kationische Lipidmoleküle bilden nach Ultraschallbehandlung in wässriger Lösung positiv geladene Liposomen. Diese umschließen die in der Lösung vorliegende DNA, und der so gebildete nach außen hin weiterhin positiv geladene Liposomen/DNA-Komplex fusioniert mit der Zellmembran. Die DNA wird frei und gelangt in den Zellkern. Der Einsatz einer zu großen Menge an LipofectAmine™ wirkt toxisch.

Die Verpackungs-Zelllinie GP-293 exprimiert stabil die für die Replikation von Retroviren essentiellen *gag*- und *pol*-Genprodukte des Moloney Maus Leukämie Virus (MoMLV). Um jedoch infektiöse Viren bilden zu können, müssen GP-293-Zellen zusätzlich zum retroviralen Vektor mit dem Plasmid pVSV-G kotransfiziert werden. Dieses Plasmid kodiert für das Hüll-Glykoprotein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G). Im Gegensatz zu anderen viralen Glykoproteinen ermöglicht VSV-G einen viralen Eintritt in die Zelle über Lipidbindung und Plasmamembranfusion.

GP-293-Zellen wurden in 6 cm-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ungefähr 60-80% bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Abschnitt 5.3.1). Eine Stunde vor Transfektion wurde zu jedem Ansatz Chloroquin bis zu einer Endkonzentration von 0,25 µM zugegeben. In der Zwischenzeit wurden pro 6 cm-Zellkulturschale 10 µg Plasmid-DNA und 5 µg pVSV-G in 500 µl OptiMem verdünnt. Zu dieser Lösung wurden 10 µl LipofectAmine™ versetzt mit weiteren 500 µl OptiMem gegeben. Diese Lösung wurde vorsichtig durchmischt und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem DNA/Liposomen-Gemisch wurden weitere 1,5 ml OptiMem hinzugefügt und der Transfektionsansatz auf die zuvor zweimal mit PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschenen Verpackungszellen gegeben. Nach 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM.

5.3.2.1.2 Transfektion der Verpackungs-Zelllinie Phoenix

Die Transfektion der Verpackungs-Zelllinie Phoenix mit retroviralen Plasmiden erfolgte mittels Calciumphosphatpräzipitation. DNA wird bei dieser Methode mit Calcium und einem Phosphatpuffer vermischt. Es bilden sich feine Calciumphosphat/DNA-Partikel, die über Endocytose von der Zelle aufgenommen werden.

Phoenix-Zellen wurden einen Tag vor Transfektion mit einer Konfluenz von 60-80% in 6 cm-Schalen ausgesät (Abschnitt 5.3.1). Zu jeder Schale wurde am nächsten Tag Chloroquin 25 μ molar hinzugefügt und für eine Stunde mit den Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für jede Zellkulturschale wurden 10 μ l Plasmid-DNA (1 μ g/ μ l) mit 62 μ l Calciumchlorid (2 M) und 428 μ l dH₂O vermischt. Anschließend wurden unter Mischen 500 μ l 2 x HBS-Puffer (50 mM HEPES pH 7,05; 10 mM KCl; 12 mM Dextrose; 280 mM NaCl; 1,5 mM Na₂HPO₄) zu dieser Suspension gegeben und der Transfektionsansatz sofort vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Nach 5-stündiger Inkubation folgte ein Wechsel des Mediums auf DMEM.

5.3.2.2 Transduktion

Für ihre Transduktion wurden AGS-Zellen in 6 cm-Schalen bis zu einer Konfluenz von ca. 60% angezogen (Abschnitt 5.3.1) und am zweiten, dritten und vierten Tag nach Transfektion der Verpackungs-Zelllinie (Abschnitt 5.3.2.1) retroviral transduziert.

Zur Transduktion der Zielzellen wurde der infektiöse Retroviren enthaltende Überstand von den Verpackungs-Zellen abgenommen und bei 1.000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die Verpackungs-Zelllinien mit frischem Medium versorgt und bis zur nächsten Transduktion bei 37°C und 5% CO₂ weiter inkubiert. Für die Transduktion wurden 1,5 ml des Zentrifugats mit 1,5 ml frischem Medium sowie 12 μ g Polybren versetzt und auf die Zielzellen gegeben. Dieser Vorgang wurde nach vier Stunden wiederholt. An den beiden darauffolgenden Tagen wurden die Zielzellen zur Steigerung der Transduktionseffizienz nach dem

oben beschriebenen Zeitschema noch weitere vier Mal transduziert. Über Nacht erfolgte eine Regeneration der Zielzellen in RPMI 1640 (+10% FCS + 1% L-Glu) bei 37°C und 5% CO₂.

Nach einer zweiwöchigen Selektion der transduzierten AGS-Zellen in Neomycin erfolgte eine Vereinzellung der noch lebenden Zellen in 96 well-Platten. Von den isolierten Klonen wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (Abschnitt 5.4.1) und auf Proteinebene der Erfolg der jeweiligen Transduktion überprüft (Abschnitte 5.4.4-5.4.6).

5.3.3 Isolierung und Kultivierung primärer humaner Magen-epithelzellen (PHME) aus Magenbiopsien

Die Isolierung primärer humaner Magenepithelzellen (PHME) aus Magenbiopsien wurde nach Modifikation eines Protokolls von Smoot (Smoot *et al.*, 2000) durchgeführt. Bei dieser Methodik werden epitheliale Magenzellen nach einer mechanischen Zerkleinerung des Gewebes enzymatisch isoliert. Dabei ist zu beachten, daß der Verdau nur partiell durchgeführt wird, so daß keine Einzelzellen vorliegen. Anstelle dessen sollten die Drüsen nach Verdau soweit intakt bleiben, daß ein Auswachsen epithelialer Zellen auf die Zellkulturschale möglich ist.

Die verwendeten Biopsien stammen aus Gastroskopien, die zur Abklärung gastrointestinaler Beschwerden in der Gastroenterologischen Abteilung der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt wurden. Eine Genehmigung der Ethikkommission der MHH lag vor, die Patienten wurden in einem präoperativen Gespräch um ihre Einwilligung gebeten.

Für die Isolierung primärer humaner epithelialer Zellen des Magens wurden drei frisch aus dem Antrum oder Corpus entnommene Biopsien (Größe ca. 8-10 mm³) in 4°C kaltem Transportmedium (RPMI 1640 + 0,1% Pen/Strep + 0,1% Amphotericin B) aufgenommen. Alle weiteren Aufreinigungsschritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Nach Verwerfen des Mediums wurden die Biopsien in einer 6 cm-Zellkultur-Schale

in Gegenwart von 700 µl Enzymlösung (20.000 U Dispase; 120 U Collagenase Typ II; 0,125% BSA) mit Hilfe eines Skalpells in ca. ein Millimeter große Stücke zerkleinert. Die erhaltene Zellsuspension wurde anschließend in ein 50 ml-Reagiergefäß überführt und bei 37°C unter leichtem Rühren inkubiert. Nach 20 Minuten wurde der Rührer gestoppt, und die Zellen konnten sich langsam am Boden des Gefäßes sammeln. Dabei sedimentierten die relativ großen Biopsiestücke schnell, während sich im Überstand hauptsächlich die kleineren Blutzellen und Fibroblasten befanden. Der Überstand wurde verworfen und die Biopsien in weiteren 700 µl Enzymlösung (20.000 U Dispase; 120 U Collagenase Typ II; 0,125% BSA) bei 37°C unter Rühren verdaut. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei jedesmal der Blutzellen- und Fibroblasten-haltige Überstand verworfen wurde. Nach ca. 80 Minuten Inkubation in Enzymlösung befanden sich im Überstand jedoch die gewünschten U-förmigen Drüsenstücke, welche sich durch den vorangegangenen enzymatischen Verdau aus den Biopsien gelöst hatten. Dieser Überstand wurde vorsichtig in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 800 x rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Zellkulturmedium (RPMI 1640 + 10% FCS + 0,1% Pen/Strep + 0,1% Amphotericin B) resuspendiert und vorsichtig mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf sterile Deckgläschen gegeben, die sich in einer 6 cm-Zellkulturschale befanden. Währenddessen fand der Verdau der Biopsien unter den schon oben beschriebenen Bedingungen bis zu ihrer vollständigen Auflösung statt. Ca. alle 20 Minuten wurde von dem Verdau der Überstand abgenommen, sedimentiert und anschließend auf das Deckgläschen gegeben. Erst nachdem alle isolierten Zellen abgesunken waren, wurde Zellkulturmedium (RPMI 1640 +10% FCS + 1% Pen/Strep + 0,1% Amphotericin B) vorsichtig auf die Deckgläschen aufgetropft. Nach einer Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht fand ein erster Mediumwechsel statt. Bei der weiterführenden Kultivierung wurde alle zwei bis drei Tage das Medium gewechselt. Nach zwei Tagen Kultivierung erschienen erste Kolonien epithelialer Zellen, in deren Mitte häufig Gewebsreste zu finden waren. Diese waren aber nach weiteren 48 bis

72 Stunden Inkubation nicht mehr sichtbar. Die isolierten PHME konnten bis zu drei Wochen kultiviert werden. In dieser Zeit vergrößerten sich die Zellkolonien. Versuche konnten schon nach einer Woche Adaption an das Medium durchgeführt werden.

5.3.4 Kokultivierung von Magenepithelzellen mit *H. pylori* und rekombinanten Proteinen

Für eine Kokultivierung von Magenepithelzellen mit *H. pylori* wurden AGS-Zellen je nach weiterführender Fragestellung mit unterschiedlichen Zelldichten und in verschiedenen Kulturvolumina in 96 well- oder 24 well-Platten bzw. in 6 cm-Schalen oder 250 ml-Gewebekulturflaschen passagiert (s. Tabelle 1). Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Pen/Strep verwendet.

Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ wurde der innerhalb von zwei Tagen auf Blutagarplatten gewachsene *H. pylori*-Bakterienrasen (Abschnitt 5.2.) abgeerntet und in RPMI 1640 (+10% FCS + 1% L-Glu) resuspendiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspension wurde im Photometer gemessen und anschließend mit RPMI 1640 (+10% FCS + 1% L-Glu) auf eine optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,25 bzw. 0,5 eingestellt. In der Zwischenzeit wurden die Zellen zur Entfernung von Antibiotika-Resten zweimal mit PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen. Ein dem verwendeten Zellkulturgefäß entsprechendes Volumen (s. Tabelle 1) der eingestellten *H. pylori*-Suspension wurde zu den Zellen gegeben. Die Koinkubation von Zellen und Keimen erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ von 15 Minuten bis zu 24 Stunden. Zellen, die in reinem RPMI 1640 (+10% FCS + 1% L-Glu) kultiviert wurden, dienten als Kontrollen.

PHME-Zellen wurden in 6 cm-Schalen mit einer auf eine OD₆₀₀=0,1-0,5, je nach entsprechender Fragestellung, eingestellten *H. pylori*-Suspension in RPMI 1640 supplementiert mit 10% FCS und 1% L-Glutamin für 24 Stunden

koinkubiert. Da sich PHME-Zellen nicht passagieren lassen, konnte die verwendete Zelldichte nicht bestimmt werden. Unstimulierte PHME dienten als Kontrolle.

Kulturgefäß	Zellzahl/well [Zellen/well]	Kulturvolumen/well [ml/well]
96 well-Platte	1×10^4	0,2
24 well-Platte	5×10^4	1
6 cm-Schale	$2,5 \times 10^5$	3
250 ml-Gewebekultur flasche	7×10^5	10

Tabelle 1: Zur Kokultur verwendete Kulturgefäße sowie die entsprechenden Zellzahlen und Kulturvolumina

Eine Kokultivierung von Magenepithelzellen mit rekombinanten Proteinen erfolgte für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ je nach Fragestellung in den in Tabelle 1 beschriebenen Zellkulturgefäßen und Kulturvolumina. Unstimulierte Magenepithelzellen dienten als Kontrolle.

5.3.5 Methoden zur Quantifizierung der Apoptose

Die Fragmentierung der DNA wird als ein biochemisches Schlüsselereignis der Apoptose angesehen und kann experimentell verschiedentlich nachgewiesen werden.

5.3.5.1 **Quantifizierung der Apoptose in AGS-Zellen mittels Histone-ELISA**

Während der Apoptose werden in den Zellen unter anderem endogene Endonukleasen aktiviert, die DNA an den ihnen zugänglichen internukleosomalen Linker-Regionen spalten. Im Gegensatz dazu ist DNA, die sich im Bereich der Nukleosomen befindet, durch ihre enge Bindung an die Kernhistone vor Endonukleasen geschützt. So entstehen bei der Apoptose 180 bp große Mono- und Oligonukleosomen, die mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA Kits nachgewiesen werden können. Dieser Assay

beruht auf dem sogenannten Sandwich-Prinzip. Ein Biotin-gekoppelter anti-Histon-Antikörper bindet die Mono- und Oligonukleosomen über seinen Biotin-Anteil an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Der spezifische Nachweis der Oligonukleosomen erfolgt mittels eines Peroxidase-gekoppelten anti-DNA-Antikörpers. Die Peroxidase-Aktivität wird mit ABTS[®] (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat (6)]) als Substrat bei 405 nm gemessen.

AGS-Zellen wurden gemäß Abschnitt 5.3.4 in 96 well- oder 24 well-Platten ausgesät und der Fragestellung entsprechend weiterführend kultiviert und stimuliert. Nach Beendigung der jeweiligen Inkubation wurden die Zellen in 200 µl (96 well-Platte) oder 1 ml (24 well-Platte) des Lysepuffers 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 800 x g, RT) der Lysate, wurden je 20 µl des Überstandes in ein well einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte überführt, in das schon 80 µl Immunomix (4 µl anti-Histon-Antikörper; 4 µl anti-DNA-Antikörper; 72 µl Inkubationspuffer) vorgelegt wurden. Für jede Probe wurden Dreifachmessungen durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 37°C für zwei Stunden bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Während dieser Zeit bindet der anti-Histon-Antikörper an die Histon-Bereiche der im Lysat befindlichen Nukleosomen. Zum anderen wird über den Biotin-Anteil dieses Antikörpers der entstandene Immunkomplex an den Streptavidin-beschichteten Boden der Mikrotiterplatte gebunden. Zusätzlich bindet der Peroxidase-gekoppelte anti-DNA-Antikörper an die DNA-Komponente der Nukleosomen.

Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde jedes well dreimal mit 250 µl Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden pro well 100 µl ABTS als Peroxidase-Substrat zugegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde der Substratumsatz durch Messung der Extinktion im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Die ermittelte Absorption ist hierbei direkt proportional zur Menge gebundener Nukleosomen und liefert einen relativen Wert für die Apoptoserate im Vergleich zu einer unbehandelten Probe.

5.3.5.2 Quantifizierung der Apoptose in PHME durch TUNEL

Die während des apoptotischen Zellabbaus auftretenden DNA-Strangbrüche können experimentell dargestellt werden, indem die frei liegenden 3'-OH-Enden in einer enzymatischen Reaktion mit modifizierten Nukleotiden markiert werden. Beim TUNEL (TdT-mediated dUTP nick labeling)-Assay markiert die terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) die durch Strangbrüche freien 3'-OH-Enden mit Fluorescein-markierten Nukleotiden. Inkorporiertes Fluorescein wird durch einen anti-Fluorescein-Antikörper detektiert, der Peroxidase-gekoppelt ist. Nach einer Substrat-Reaktion können die bräunlich-rot angefärbten, apoptotischen Zellen im Lichtmikroskop ausgezählt werden. Für die immunhistologische Detektion und Quantifizierung des programmierten Zelltods in PHME wurde ein kommerziell erhältliches Kit (In Situ Cell Death Detection, POD) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

Eine Fixierung der auf Glasplättchen angewachsenen PHME (Abschnitt 5.3.3) erfolgte für 30 Minuten in 95%igen Ethanol und 5% Essigsäure. Nach zweimaligen Waschen in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) wurden die Zellen zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten in 0,3% Wasserstoffperoxid, gelöst in Methanol, inkubiert und anschließend erneut in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) gewaschen. Es schloß sich eine zweiminütige Inkubation auf Eis in einer Permeabilisierungslösung (0,1% Triton-X; 0,1% Natriumcitrat) an. Auf den nächsten Waschvorgang mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) folgte die Zugabe des im Kit vorhandenen TUNEL-Mixes. Es schloß sich eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde in einer feuchten Kammer an. Nach zweimaligem Waschen mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) wurden die Zellen mit der vom Hersteller mitgelieferten CONVERTER-POD-Lösung für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Danach wurden die PHME erneut zweimal mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwicklung der Reaktion mit Hilfe der DAB-Substrat-Solution für 30 Sekunden bis zu einer

Minute. Zum Abschluß wurden die Zellen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-80-96-99% Ethanol in Xylol) fixiert und mit DPX-Medium eingedeckt.

5.3.6 Immunhistologie

Mittels immunhistochemischer Verfahren können Proteine in situ mit Hilfe spezifischer Antikörper und einer sich anschließenden Farbkomplexreaktion sichtbar gemacht werden. Für immunhistologische Färbungen wurde ein kommerzielles Kit (HistostainTM-Plus) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

Die auf Deckgläschen angezüchteten PHME-Zellen (Abschnitt 5.3.3) wurden in 95% Ethanol und 5% Essigsäure 20 Minuten fixiert und anschließend dreimal in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität folgte eine 10-minütige Inkubation in 0,3% Wasserstoffperoxid, gelöst in Methanol, an die sich ein weiterer Waschvorgang in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) anschloß. Um den unspezifischen Hintergrund zu reduzieren, wurden die Deckgläschen für 20 Minuten in der mitgelieferten Lösung A blockiert. Es folgte eine Inkubation mit dem in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) 1:50 verdünnten primären Antikörper bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen erneut dreimal in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) gewaschen und anschließend mit dem unverdünnten biotinylierten Sekundärantikörper des HistostainTM-plus Kits für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach neuerlichem Waschen der PHME-Zellen mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) folgte die Zugabe der im Kit vorhandenen Streptavidin-Peroxidaselösung, an die der Sekundärantikörper während einer 15-minütigen Inkubationszeit binden konnte. Es folgte ein weiterer Waschschrift in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6), an den sich eine dreiminütige Inkubation in der mitgelieferten Substratlösung AEC anschloß. Erfolgte eine

Umsetzung des Substrats durch die Peroxidase, wurden Proteine, die mit dem spezifischen Erstantikörper reagieren konnten, bräunlich-rot angefärbt. Die Enzymreaktion wurde mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,1% Tween; pH 7,6) abgestoppt und die Zellen mit Hämalaun (Abschnitt 5.3.7) gegengefärbt.

5.3.7 Hämalaun-Färbung

Bei der Hämalaun-Färbung handelt es sich um eine klassische Färbemethode, durch die Zellkerne blau angefärbt werden.

Für die Färbung wurde Mayers' Hämalaunlösung verwendet. Die Deckgläschen wurden für 5 Sekunden in die Fertiglösung getaucht und die Reaktion mit Ammoniakwasser (1 Tropfen 25%iger Ammoniak in 100 ml dH₂O) wieder gestoppt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Kaisers' Glycerin-Gelantine versehen und auf einen Objektträger luftblasenfrei aufgebracht.

5.4 Proteinbiochemische Methoden

5.4.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

250.000 AGS-Zellen wurden für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ in 6 cm-Schalen angezogen und entsprechend der jeweiligen Versuchsanordnung weiterführend behandelt (Abschnitte 5.3.1 und 5.3.4). Für die Gewinnung von Gesamtzellextrakten aus PHME wurden eine Woche zuvor isolierte PHME (Abschnitt 5.3.3) in unbekannter Zellzahl verwendet.

Zur Isolierung von Gesamtzellextrakten wurden die verschiedenen Versuchsansätze zweimal mit kaltem PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4;

150 mM NaCl) gewaschen und danach für 20 Minuten bei 4°C mit 300 µl Lyse-Puffer (50 mM HEPES pH 7,4; 10 mM KCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 0,5% Nonidet-P40; in 20 ml dieser Lösung wurde eine Tablette Complete™ Mini-Protease-Inhibitoren Cocktail aufgelöst) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Plattenboden gelöst und in ein vorgekühltes 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Zur Entfernung größerer Zellbruchstücke folgte eine Zentrifugation des Lysats für vier Minuten bei 4000 x g und 4°C. Danach wurde der proteinhaltige Überstand in frische Eppendorfgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.4.2 Isolierung mitochondrialer und cytosolischer Extrakte

Mitochondriale und cytosolische Extrakte wurden nach einem modifizierten Protokoll nach Han aus Zellkulturen isoliert (Han *et al.*, 1999). Hierbei werden die behandelten Zellen nach Anschwellung mit einem Teflon-Potter mechanisch homogenisiert. Um einen Verlust mitochondrialer Proteine zu verhindern, werden die durch die Homogenisierung frei gewordenen Mitochondrien mittels Zugabe von Saccharose stabilisiert. Es folgt eine differentielle Zentrifugation. In einem ersten Zentrifugationsschritt bei niedriger Geschwindigkeit werden größere Bestandteile wie intakte und zerstörte Zellen sowie Zellkerne und Kern- und Membranfragmente aus dem Lysat entfernt. Es schließt sich eine höhertourige Zentrifugation an, durch die eine Sedimentierung der Mitochondrien erfolgt. Der daraus resultierende Überstand enthält die cytosolischen Anteile der Extrakte.

Zur Isolierung mitochondrialer und cytosolischer Extrakte aus Kokultur-Experimenten mit *H. pylori* wurden 7×10^5 AGS-Zellen in 250 ml-Zellkulturflaschen ausgesät und mit *H. pylori* für eine Stunde bis zu 24 Stunden analog zu Abschnitt 5.3.4 inkubiert. Für jeden Zeitwert wurden Dreifachansätze kultiviert.

Die adhärennten AGS-Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst. Nach dreimaligem Waschen der Zellen (800 rpm, 5 min, 4°C) mit eiskaltem PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) wurde das Zellpellet in einem Milliliter Lyse-Puffer (10 mM HEPES pH 7,5; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT; in 20 ml wurde eine Tablette Complete™ Mini-Proteasen-Inhibitoren Cocktail gelöst) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde Saccharose 0,25-molar zugegeben und die Zellen mit Hilfe eines Teflon-Potters homogenisiert. Das entstandene Homogenat wurde bei 500 x g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, während das Mitochondrien-haltige Pellet in 100 µl dH₂O aufgenommen wurde. Die Proben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

5.4.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinproben wurde mittels des Bradford-Tests (Bradford, 1976) bestimmt. Dieser Assay beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm auf 595 nm bei dessen Bindung an Proteine.

Für den Bradford-Test wurden 2 µl Proteinextrakt mit 798 µl dH₂O und 200 µl Farbstoffkonzentrat (BioRad) verdünnt, gut durchmischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wurde bei 595 nm photometrisch bestimmt und die Proteinkonzentration durch Vergleich mit einer BSA-Eichreihe ermittelt.

5.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts wurde eine Gelelektrophorese nach Laemmli (diskontinuierliches System) (Laemmli, 1970) durchgeführt. Das im Probenpuffer enthaltene anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten Proteine. Dabei ist die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so daß im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist. Die Ladung der Aminosäurereste der Polypeptide kann aufgrund der starken negativen Ladung des SDS vernachlässigt werden. Die Molekulargewichtsbestimmung der Proteine erfolgt durch Vergleich der Laufstrecke mit einem definierten Molekulargewichtsstandard.

Für die SDS-Page wurden 5 bis 20 µg Proteinlösung bzw. 7 µl eines Molekulargewichtsstandards mit dH₂O auf ein einheitliches Volumen eingestellt, mit 5 x LSB-Puffer (0,125 M Tris-HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerin; 0,25% Bromphenolblau; 5% 2-Mercaptoethanol) verdünnt und anschließend bei 95°C 10 Minuten aufgekocht. In der Zwischenzeit wurden die Polyacrylamid-Gele gegossen (s. Tabelle 2) und nach ihrer Auspolymerisierung in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins wurden Trenngele von 12,5% bis 15% Acrylamid verwendet.

	12,5% Trenngel (10 ml)	15% Trenngel (10 ml)	3% Sammelgel (5 ml)
dH ₂ O	3,3ml	2,5 ml	3,1 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5ml	2,5 ml	---
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	---	---	1,25 ml
30% Acrylamid /0,8% Bisacrylamid	4 ml	4,9 ml	0,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	50 µl
10% APS	50 µl	50 µl	25 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl	3,75 µl

Tabelle 2: Trenn- und Sammelgelansatz für zwei Polyacrylamid-Gele

Nach dem Aufkochen wurden die Proben kurz anzentrifugiert, auf das 3%ige Sammelgel aufgetragen und einer konstanten Spannung von 130 V in 1 x SDS-Laufpuffer (250 mM Tris-Base; 1,92 M Glycin; 1% SDS; pH 8,0) ausgesetzt. Die Spannung wurde nach Eintritt der Bromphenolblau-Lauffront in das Trenngel auf 200 V erhöht. Wenn die Farbstoff-Bande die untere Gelkante erreicht hatte, wurde die Auftrennung im Gel beendet. Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Polypeptide durch Western Blotting auf eine Membran übertragen.

5.4.5 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine, die zuvor elektrophoretisch aufgetrennt wurden, mittels Anlegen einer elektrischen Spannung aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Membran transferiert werden. Dieser Schritt ist notwendig, um Proteine z.B. für Immunfärbungen zugänglich zu machen.

Die durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Polypeptide wurden mittels der Semidry-Methode auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran übertragen. Diese wurde vor Zusammenbau des Blots für jeweils zwei Minuten in Methanol, dH₂O und anschließend zusammen mit 8 Lagen 3MM-Filterpapier in Transferpuffer (39 mM Glycin; 48 mM Tris-Base; 0,037% SDS; 20% Methanol; pH 8,3) äquilibriert. Ausgehend von der Anode der Blotting-Apparatur wurden zuerst 4 Lagen 3MM-Blottingpapier, die Membran, das Gel und zum Abschluß weitere 4 Lagen 3MM-Filterpapier übereinander gelegt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 30 V für 15 bis 30 Minuten je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins.

5.4.6 Immundetektion der Proteine

Nach Transfer eines elektrophoretisch aufgetrennten Proteingemischs auf eine Membran kann ein einzelnes Protein mittels der Immundetektion

spezifisch detektiert werden. Hierzu wird die Membran mit einem für das Polypeptid spezifischen Primär-Antikörper inkubiert. Dieser wiederum wird von einem für ihn spezifischen Peroxidase-gekoppelten Zweit-Antikörper gebunden. Durch eine Licht-emittierende Reaktion der Peroxidase (Chemilumineszenz) können spezifische Proteinbanden auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Um den Anteil unspezifischer Bindungen zu verringern, wurde die Membran nach dem Blotten für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockingpuffer (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,3% Tween; pH 7,6 + 5% Magermilchpulver) inkubiert und anschließend kurz in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,3% Tween; pH 7,6) gewaschen. Die Inkubation des Erst-Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C, wobei der Antikörper je nach Affinität zwischen 1:30 bis 1:1000 mit TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,3% Tween; pH 7,6) + 0,5% Magermilchpulver verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,3% Tween; pH 7,6) gewaschen und danach für eine Stunde mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 bis zu 1:20000 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt von dreimal 10 Minuten wurde der Blot mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (ECL) nach Herstellerangaben entwickelt. Die durch die Reaktion der Peroxidase mit dem im ECL enthaltenen Luminol entstandenen Lichtsignale wurden auf Röntgenfilm aufgefangen.

Die PVDF-Membran wurde nach erfolgter Proteindetektion nochmals für zwei Stunden in TBS-Tween (20 mM Tris; 137 mM NaCl; 0,3% Tween; pH 7,6) + 10% Magermilchpulver abgeblockt und der oben beschriebene Vorgang mit einem anti- β -Aktin-Antikörper und dem entsprechenden anti-goat-Zweit-Antikörper auf derselben Membran wiederholt. Diese zweite Immundetektion wurde durchgeführt, um die Konzentrationen der aufgetragenen Proteine abgleichen zu können.

5.5 Molekularbiologische Methoden

5.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten Plasmid-DNA (Abschnitt 5.5.5.2) erfolgte im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entspricht hierbei einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml. Der Grad der Proteinverunreinigung einer Nukleinsäurelösung wurde durch den Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm ermittelt. Gering kontaminierte Proben sollten hierbei einen Wert zwischen 1,7 und 1,9 haben.

5.5.2 Sequenzspezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsspaltungen wurden zur Analyse von Plasmid-Mini- bzw. Maxipräparation (Abschnitte 5.5.5.1 und 5.5.5.2) angewendet.

Restriktionsenzyme und entsprechende Puffersysteme wurden von der Fa. NEB bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt. Pro µg DNA wurden 1 bis 10 U Enzym in 1 x Enzympuffer eingesetzt und für ein bis drei Stunden bei 37°C inkubiert. Bei der sequenzspezifischen Spaltung von DNA aus einer Plasmid-Minipräparation wurden dem Ansatz noch 0,7 µg/µl Rnase A zum Abbau störender RNA zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 5.5.3).

5.5.3 Agarosegelelektrophorese

Mittels der Agarosegelelektrophorese werden Nukleinsäurefragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend visualisiert. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegen sich DNA-Fragmente im elektrischen Feld gerichtet und werden durch die Molekularsiebfunktion der Agarose ihrer Größe nach aufgetrennt. Nukleinsäuren können durch

Behandlung mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm oder 366 nm) im Gel sichtbar gemacht werden.

Für die analytische Auftrennung von PCR-Produkten bzw. gespaltener Plasmid-DNA wurden 1%ige Gele in 1 x TAE (1 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Tris-Base; 0,114% Eisessig) mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Auftrennung der mit 10 x DNA-Ladepuffer verdünnten Proben (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerin) erfolgte in 1 x TAE (1 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Tris-Base; 0,114% Eisessig) bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm².

5.5.4 Transformation von *E. coli*

Die retroviralen Konstrukte pLXIN-Bcl-2, pLXIN-Crma und pLXIN-dnFADD lagen als reine Plasmid-DNA und nur in geringen Konzentrationen vor. Zu ihrer Vermehrung wurden die oben genannten Konstrukte mittels Transformation in den *E. coli*-Stamm JM109 eingeschleust. Anschließend wurde mittels Plasmid-Minipräparation (Abschnitt 5.5.5.1) und Restriktionsanalysen (Abschnitt 5.5.2) der gewünschte Klon ermittelt.

5.5.4.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 25 ml LB-Medium (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5) mit *E. coli* JM109 beimpft und bei 37°C und 225 rpm über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Über-Nacht-Kultur 1:100 in 250 ml frischem LB-Medium (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5) verdünnt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,55 bei 37°C und 225 rpm hochgezogen. Die Kultur wurde für zwei Stunden auf Eis abgekühlt und anschließend 20 Minuten bei 3.800 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien wurden weitere 45 Minuten auf Eis inkubiert, resuspendiert in 500 ml eiskaltem Titrationspuffer (100 mM CaCl₂; 70 mM MgCl₂; 40 mM Natriumacetat pH 5,5). Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 3.200 rpm, 4°C)

wurden die Coli-Bakterien in 50 ml Titrationspuffer (100 mM CaCl₂; 70 mM MgCl₂; 40 mM Natriumacetat pH 5,5) aufgenommen. Unter Rühren wurde Glycerin 15%ig zugefügt. Die Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

5.5.4.2 Transformation chemisch kompetenter Zellen

Ein Aliquot (100 µl) chemisch kompetenter Zellen wurde mit 10 ng Plasmid-DNA gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem Hitzeschock (42°C) für 90 Sekunden ausgesetzt und danach für zwei Minuten auf Eis regeneriert. Der Transformationsansatz wurde zusammen mit einem Milliliter vorgewärmten LB-Medium (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5) für eine Stunde bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 150 µl dieser Bakteriensuspension wurden auf einer Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Platte (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Agar; pH 7,5) ausgestrichen, während der restliche Ansatz abzentrifugiert und der Überstand bis auf 150 µl verworfen wurde. Das Pellet wurde im restlichen LB-Medium (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5) gelöst und auf einer weiteren Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Platte (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; 1,5% Agar; pH 7,5) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.5.4.3 Vermehrung transformierter Bakterien

Für eine Vermehrung plasmidtragender *E. coli*-Klone wurde zunächst eine Vorkultur in 5 ml Ampicillin-haltigen LB-Medium (1% Bactotrypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5 + 100 µg/ml Ampicillin) bei 37°C über Nacht inkubiert. Diese konnte entweder direkt für eine Plasmid-Minipräparation (Abschnitt 5.5.5.1) verwendet werden oder diente als Animpfkultur für eine Plasmid-Maxipräparation (Abschnitt 5.5.5.2).

5.5.5 Plasmid-Präparationen

5.5.5.1 *Plasmid-Minipräparation*

Die Methode der DNA-Minipräparation ermöglicht eine schnelle Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien. Mit dieser Methode isolierte DNA ist jedoch nur von mäßiger Reinheit, kann aber für Restriktionsenzymanalysen (Abschnitt 5.5.2) verwendet werden.

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden in ein Eppendorfgesäß überführt und zwei Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend bis auf einen kleinen Rest verworfen und das Pellet in diesem gelöst. Zusätzlich wurden 300 µl Lyse-Puffer (8% Saccharose; 0,5% Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl pH 8,0) und 10 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml) auf das Pellet gegeben und der Ansatz für 90 Sekunden bei 95°C erhitzt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 10.000 x g und 4°C befand sich die Plasmid-DNA im Überstand und wurde mit 400 µl Isopropanol über 10 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 10.000 x g, 4°C) pelletiert und anschließend mit 70%igen Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wurde der Überstand verworfen, die DNA luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen. Die Lagerung der erhaltenen DNA erfolgte bei -20°C.

5.5.5.2 *Plasmid-Maxipräparation*

Zur Präparation großer Mengen reiner, endotoxinfreier Plasmid-DNA wurde der Plasmid Endofree Maxi Kit der Fa. Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Durch Nutzung endotoxinfreier Plasmid-DNA läßt sich die Effizienz von Transfektionen (Abschnitt 5.3.2.1) erheblich erhöhen.

Nach ihrer Pelletierung werden Bakterien unter alkalischen Bedingungen lysiert (alkalische Lyse). Es folgt eine Denaturierung von DNA und Proteinen, an die sich eine Renaturierung der Plasmid-DNA anschließt. Die nach Zentrifugation gewonnene Plasmid-DNA wird auf eine Anionenaustauschersäule

gegeben und durch Waschen mit einem Mediumsalzpuffer von Verunreinigungen wie RNA und Proteinen befreit. Die fest an die Säule gebundene Plasmid-DNA wird durch einen Hochsalzpuffer effizient eluiert und anschließend mit Isopropanol gefällt. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit 70%igen Ethanol wird die Plasmid-DNA luftgetrocknet, in dem mitgelieferten TE-Puffer (endofree) aufgenommen und bei -20°C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

5.5.6 Isolierung von Gesamt-RNA aus Primärkultur

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Primärkulturen wurde ein QiaShredder und ein Rneasy MiniKit[™] verwendet.

Primärkulturen wurden analog zu Abschnitt 5.3.3 kultiviert und anschließend wie in Abschnitt 5.3.4 beschrieben mit *H. pylori* und/oder TRAIL für 24 Stunden kokultiviert. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurden die Zellen einmal mit PBS (10 mM Natriumphosphat pH 7,4; 150 mM NaCl) gewaschen und anschließend in 350 μl des Guanidinisothiocyanat, 10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 2-Mercaptoethanol, 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ DTT und 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ RNasin[®] enthaltenden Lysepuffers für drei Minuten lysiert. Nach Homogenisierung der Zellen mittels QiaShredder folgte eine Zugabe von 70%igem Ethanol, wodurch geeignete Bedingungen zur Bindung der RNA an die Silica-Gel-Membran der Zentrifugationssäule geschaffen wurden. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit unterschiedlichen Waschpuffern zur Entfernung von Verunreinigungen wurde die Gesamt-RNA mit 30 μl RNase-freiem Wasser eluiert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde anschließend mit Glykogen gefällt. Zum Eluat wurden 100 μl 99%iger Ethanol versetzt mit 2 μl Glykogen gegeben und der Ansatz für zwei Stunden bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA durch Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4°C für 10 Minuten sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes und Verdunstung des restlichen Ethanols wurde das die Gesamt-RNA enthaltende Pellet in dem unter Abschnitt 5.5.7 beschriebenen RT-Ansatz resuspendiert.

5.5.7 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die RT-PCR (RT = Reverse Transkription) dient der Umschreibung der sehr instabilen mRNA in die stabilere Form der cDNA (complementary DNA). Dieses geschieht mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, welches nur bei RNA-Viren vorkommt.

Die Synthese des ersten cDNA-Stranges erfolgt über das sogenannte Oligo(dT)-Priming. Hierbei entsteht durch Reaktion von Oligo(dT) mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA ein kurzer, doppelsträngiger Nukleinsäurebereich, den die Reverse Transkriptase als Primer benötigt. Die isolierte cDNA kann anschließend in der Polymerase-Kettenreaktion als Template eingesetzt werden (Abschnitt 5.5.8).

Für die RT-PCR wurde ein Mastermix bestehend aus 10 µl dH₂O, 4 µl 1st strand buffer, 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer, 2 µl DTT, 1 µl (40 mM) Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's), 1 µl RNase out und 1 µl Superscript hergestellt. Die in Abschnitt 5.5.6 sedimentierte Gesamt-RNA wurde komplett in dem vorbereiteten Ansatz gelöst. Dieser wurde zunächst für eine Stunde bei 42°C und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Die cDNA wurde bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

5.5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine sehr sensitive *in vitro*-Methode, bei der eine annähernd exponentielle Amplifikation eines definierten DNA-Bereichs mit Hilfe eines Primerpaars und des Enzyms Polymerase in einer sich mehrfach wiederholenden Reaktion erreicht wird. Ein Reaktionszyklus besteht (1.) aus einem Denaturierungsschritt, bei dem die beiden Stränge der Template-DNA durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C getrennt werden. Es folgt (2.) ein Annealingschritt, bei dem sich die im

Überschuß vorhandenen Primer an die einzelsträngige DNA anlagern. Die für diesen Schritt verwendete Temperatur ist Primer-spezifisch. In dem letzten Schritt (3.), der Primer-Extension, werden die Einzelstränge durch die Polymerase zum Doppelstrang aufgefüllt. Diese Reaktion findet bei 72°C statt, dem Temperaturoptimum der aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* stammenden Taq-Polymerase. Ein solcher Zyklus wird 30 bis 40 Mal wiederholt.

Eingesetzte Menge	Reagenz	Endkonzentration
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	1 x final
0,75 µl	50 mM MgCl ₂	1,5 mM final
0,5 µl	40 mM dNTPs	0,8 mM final
0,5 µl	20 µM Primer sense	0,4 µM final
0,5 µl	20 µM Primer antisense	0,4 µM final
0,25 µl	Taq-Polymerase	2,5 U final
2,0 µl	Template cDNA	---
18 µl	dH ₂ O	---

Tabelle 3: Zusammensetzung des Mastermix für einen PCR-Ansatz a` 25 µl

Allgemeines PCR-Programm:

Vorzyklus (1 x)	95°C	120 sec
Hauptzyklus (40 x)	95°C	30 sec
	Primer-spezifische Annealing-Temperatur	30 sec
	72°C	45 sec
Endzyklus (1 x)	72°C	120 sec

Tabelle 4: Allgemeingültiges PCR-Programm. Die für ein bestimmtes Primerpaar verwendeten Annealing-Temperaturen sind zusammen mit den Sequenzen im Abschnitt Materialien aufgeführt.

Die unter Abschnitt 5.5.7 isolierte cDNA wurde als Template wie in Tabelle 3 und 4 beschrieben in PCRs mit spezifischen Primern eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden analog zu Abschnitt 5.5.3 in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

5.6 Statistische Analyse

Alle Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Mit Hilfe des gepaarten t-Tests wurden die ermittelten Werte auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Werte, die $p < 0,05$ aufwiesen, wurden als statistisch signifikant gewertet.

6 Ergebnisse

6.1 Rolle des Fas/Fas-Ligand-Systems bei der *H. pylori*-assozierten Apoptose

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung des Fas/FasL-Systems für die *H. pylori*-induzierte Apoptose untersucht werden. Daher wurde sowohl der direkte Einfluß von FasL auf die *H. pylori*-assozierte Apoptose als auch die Expressionsmuster von Fas und seinem Liganden in *Helicobacter*-induzierten AGS-Zellen analysiert.

6.1.1 Fas-Ligand hatte einen synergetischen Effekt auf die *H. pylori*-induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Die Auswirkungen von FasL auf die *H. pylori*-assozierte Apoptose wurden mit Hilfe des in Abschnitt 5.3.5.1 beschriebenen Histon-ELISAs untersucht.

Nach einer 24-stündigen Kultivierung in RPMI 1640 Normalmedium (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) wurden AGS-Zellen für weitere 24 Stunden mit 500 ng FasL und/oder *H. pylori* P12 (OD₆₀₀=0,25) inkubiert (Abschnitt 5.3.4). Als Kontrolle dienten unstimulierte AGS-Zellen. Die Extinktionsmessung der isolierten Zelllysate erfolgte bei 405 nm.

In Abbildung 2 wird die Apoptoserate von AGS-Zellen bei Koinkubation mit *Helicobacter*, FasL und *H. pylori*/FasL in Relation zu AGS-Zellen, die in RPMI kultiviert wurden, dargestellt. Für die endogene Apoptose unstimulierter AGS-Zellen wurde ein Wert von 100% festgelegt. Die Meßergebnisse der induzierten Zellen wurden diesem Wert prozentual angeglichen. Unter Einfluß von *H. pylori* erhöhte sich die Apoptoserate um den Faktor 4,3 (432,7% ± 43,7%). Eine ähnliche Steigerung der Apoptose induzierte auch FasL. Der Faktor lag hier bei 4,6 (457,45% ± 70,81%). Jedoch verursachte

die gemeinsame Inkubation von *H. pylori* und FasL im Vergleich mit den Kontrollzellen eine ca. 30-fache Erhöhung der Apoptoserate ($3065,97\% \pm 299,6\%$). Somit hatten *H. pylori* und FasL einen synergetischen Effekt auf die Apoptose von Magenepithelzellen *in vitro*.

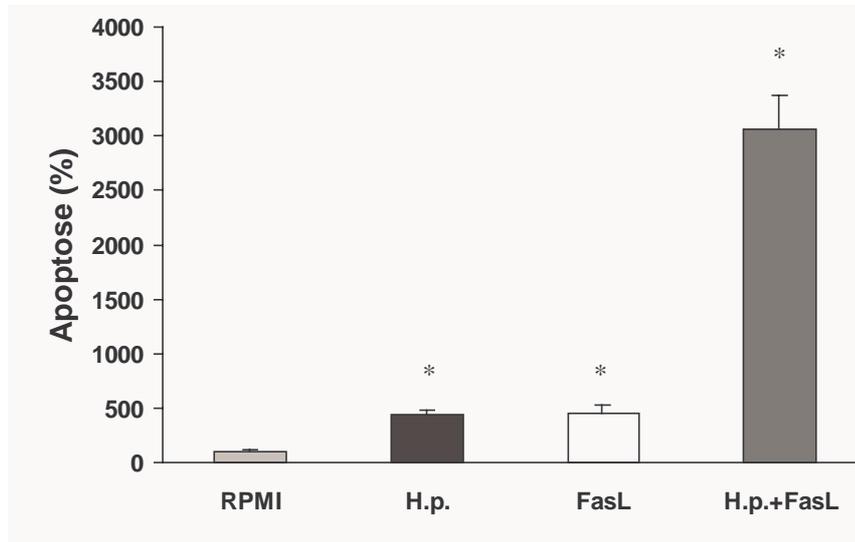


Abb. 2:

Effekt von *H. pylori* P12 und FasL auf die Apoptoserate von AGS-Zellen, dargestellt als relative Werte (in %) bezogen auf die Apoptose von AGS-Zellen, die in RPMI kultiviert wurden. Die Apoptose wurde nach 24 h im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen. Säule 1: AGS-Zellen, kultiviert in RPMI; Säule 2: AGS-Zellen, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Säule 3: AGS-Zellen, inkubiert mit FasL (500 ng); Säule 4: AGS-Zellen, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und FasL (500 ng).

p* vs. AGS/RPMI

6.1.2 *H. pylori* erhöhte zeitabhängig die Proteinexpression von Fas in AGS-Zellen

Im Folgenden wurde evaluiert, ob *H. pylori* die Expression von Fas und FasL in Magenepithelzellen direkt beeinflussen kann.

AGS-Zellen wurden für 24 Stunden in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) inkubiert. Anschließend wurde eine zuvor eingestellte *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) auf die Zellen gegeben (Abschnitt 5.3.4). Ein Abbruch der Koinkubation fand nach 15 Minuten, einer Stunde und zwei, vier, sechs, acht und vierundzwanzig Stunden statt. Als Kontrolle dienten AGS-Zellen, die in RPMI inkubiert wurden. Nach Isolierung

der Gesamtzellextrakte (Abschnitt 5.4.1) und der Protein-Konzentrationsbestimmung analog zu Abschnitt 5.4.3, erfolgte die Bestimmung der Fas- bzw. FasL-Proteinexpression mittels Western Blot-Analysen (Abschnitte 5.4.4-5.4.6). Die Signalintensität von Fas und FasL wurde jeweils durch Vergleich mit der β -Aktin Expression validiert.

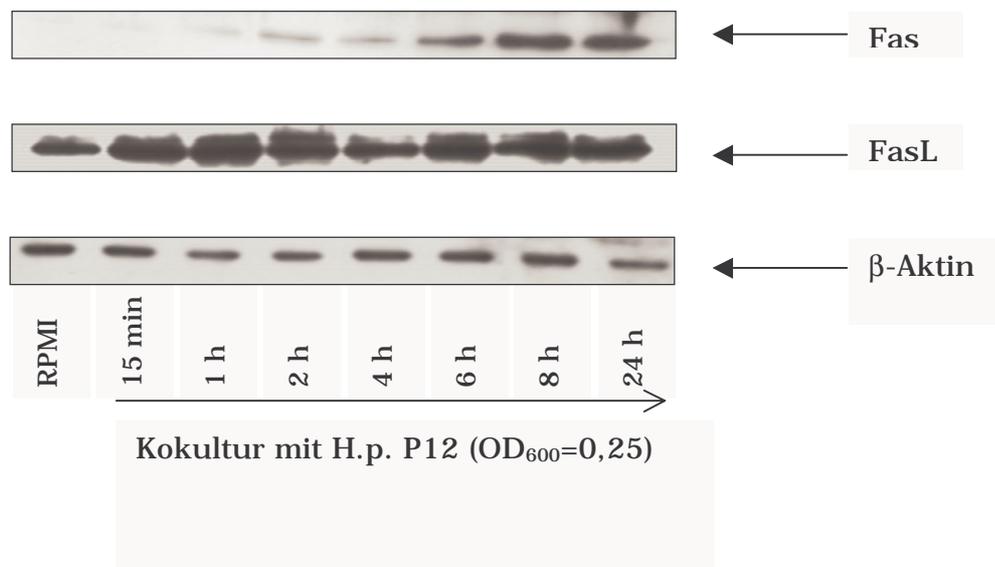


Abb. 3:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Proteinexpression von Fas und FasL in Abhängigkeit von der Zeit, dargestellt mittels Western Blot-Technik. AGS-Zellen wurden für 0-24 h mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) koinkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt. Von jedem Zeitwert wurden 10 μ g Protein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fas-, FasL- und β -Aktin-Proteinexpression wurde nach SDS-Page, Western Blot und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abbildung 3 veranschaulicht den Einfluß von *H. pylori* P12 auf die Expression von Fas und FasL bei AGS-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Fas-Proteinexpression stieg zeitabhängig unter Einfluß von *H. pylori* an. Eine erste Erhöhung der Fas-Expression war nach einer Stunde Koinkubation mit *H. pylori* erkennbar. Das Maximum wurde nach acht Stunden erreicht.

Zusätzlich zeigt Abbildung 3, daß *H. pylori* keinen Effekt auf die Expression von FasL hatte.

6.2 Untersuchungen zur intrazellulären Signalweiterleitung der *H. pylori*-assoziierten Apoptose

Es stellte sich die Frage, welche intrazellulären Signaltransduktionswege an der Weiterleitung des von *H. pylori* ausgelösten apoptotischen Signals beteiligt sind. Bei der Fas-vermittelten Apoptose wird zwischen einer Typ-I- bzw. einer Typ-II-Apoptosetransduktion unterschieden. Während die Konzentration der initial am DISC aktivierten Caspase-8 bei Typ-I-Zellen ausreicht, um direkt die Effektorcaspase-3 zu induzieren, wird bei Typ-II-Zellen nur wenig Procaspase-8 im DISC gespalten. Für die Weiterleitung des apoptotischen Signals ist in diesem Fall eine Aktivierung der Mitochondrien und die damit verbundene Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom *c* und Smac unerlässlich. Dieser Schritt ist durch Bcl-2 hemmbar.

Bevor der von *H. pylori* in Magenepithelzellen *in vitro* induzierte Signaltransduktionstyp näher untersucht wurde, mußte geklärt werden, ob eine Beteiligung des mitochondrialen Weges bei der *H. pylori*-assoziierten Apoptose vorlag. Anschließend sollte die intrazelluläre Apoptosemaschinerie durch Überexpression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, CrmA und einer dominant negativen Mutante von FADD (dnFADD) an verschiedenen Stellen gehemmt werden. Koinkubationsexperimente der transduzierten AGS-Zellen mit *H. pylori* sollten weitere Einblicke in die von dem Pathogen aktivierte Signalkaskade ermöglichen.

6.2.1 *H. pylori* induzierte bei AGS-Zellen eine Freisetzung von Cytochrom *c* und Smac aus den Mitochondrien

Im Folgenden wurde evaluiert, ob bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose in Magenepithelzellen eine Beteiligung des mitochondrialen Weges vorliegt. Dieser ist gekennzeichnet durch die Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom *c* und Smac in das Cytosol, wo diese eine Aktivierung von Caspasen und somit eine Verstärkung des apoptotischen Signals induzieren.

Mittels Western Blot-Analysen wurde daher geklärt, ob während der *H. pylori*-vermittelten Apoptose die proapoptotischen Proteine Cytochrom *c* und Smac aus den Mitochondrien in das Cytosol entlassen werden.

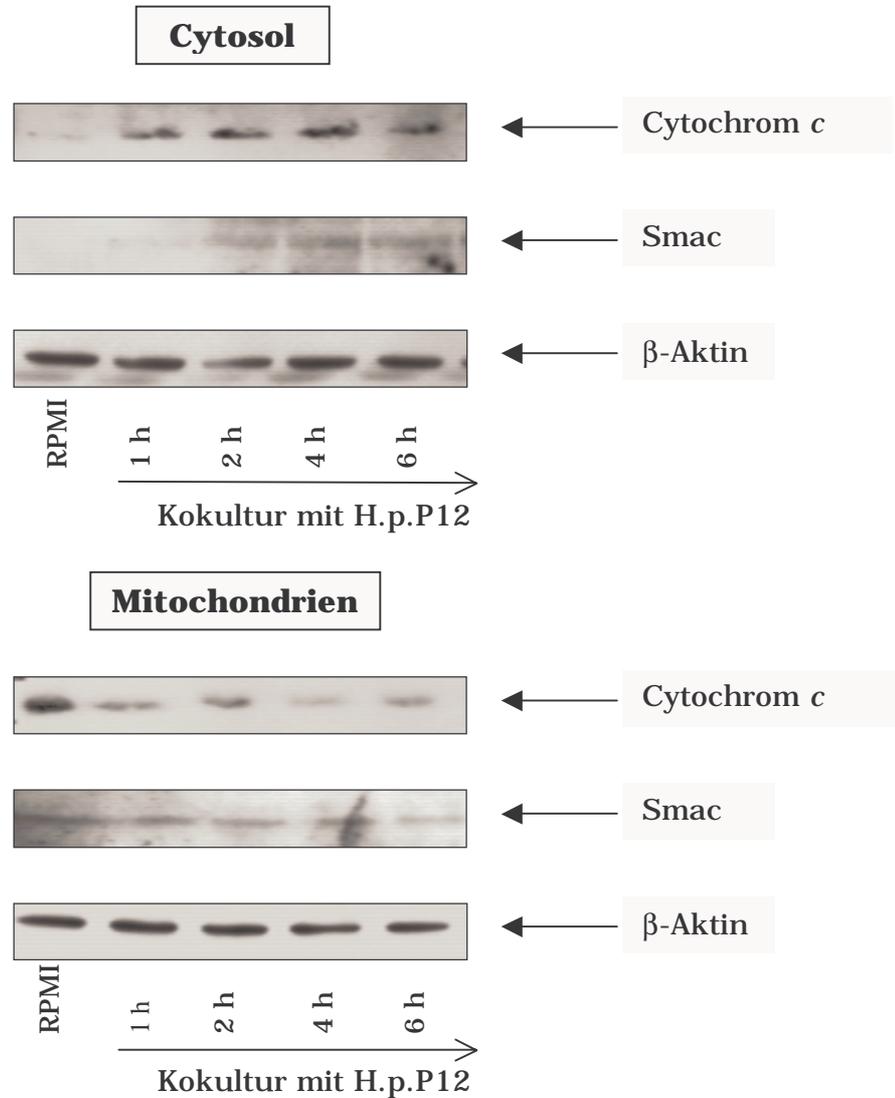


Abb. 4:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Konzentration von Cytochrom *c* und Smac im Cytosol bzw. in den Mitochondrien *H. pylori* P12-stimulierter AGS-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit; dargestellt im Western Blot. AGS-Zellen wurden für 1-6 h mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,5$) kokultiert. Anschließend wurden cytosolische und mitochondriale Extrakte gewonnen, von denen 20 μ g bzw. 10 μ g in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinkonzentration an Cytochrom *c*, Smac und β -Aktin wurden nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

AGS-Zellen wurden nach einer 24-stündigen Kultivierung in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) für eine, zwei, vier bzw. sechs Stunden mit einer eingestellten *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,5$) kokultiert

(Abschnitt 5.3.4). Anschließend wurden cytosolische und mitochondriale Extrakte gemäß Abschnitt 5.4.2 isoliert. Von den mitochondrialen Extrakten wurden 10 µg Gesamtprotein, von den cytosolischen Extrakten 20 µg Gesamtprotein auf ein 15%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert (Abschnitte 5.4.3-5.4.6). Der Nachweis von Cytochrom *c* und Smac fand mittels spezifischer Antikörper statt. Zum Abgleich der Proteinkonzentrationen wurden die Membranen zusätzlich mit einem β -Aktin Antikörper inkubiert.

Abbildung 4 verdeutlicht die Konzentrationsänderungen von Cytochrom *c* und Smac im Cytosol bzw. in den Mitochondrien *H. pylori*-induzierter AGS-Zellen.

Während es im Cytosol zu einer zeitabhängigen Zunahme von Cytochrom *c* und Smac kam, nahm die Konzentration der beiden Proteine in den Mitochondrien mit zunehmender Koinkubationsdauer ab. Schon nach einstündiger Inkubation mit *H. pylori* stieg im Cytosol die Konzentration an Cytochrom *c* und Smac im Vergleich mit den Kontrollzellen, die in RPMI inkubiert wurden, sichtbar an. Umgekehrt war innerhalb dieses zeitlichen Rahmens eine deutliche Abnahme an Cytochrom *c* und Smac in den Mitochondrien, verglichen mit der Kontrolle, zu erkennen.

6.2.2 Herstellung stabil Bcl-2-überexprimierender AGS-Zellen (AGSBcl-2)

Um weitere Aussagen über die von *H. pylori* induzierte Apoptose treffen zu können, sollte die Apoptosekaskade auf Höhe der Mitochondrien gehemmt werden. Daher wurden mittels retroviraler Transduktion AGS-Zellen generiert, die stabil Bcl-2 überexprimierten (AGSBcl-2). Bcl-2 ist ein antiapoptotisches Mitglied der sogenannten Bcl-2-Familie, das die Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom *c* und Smac aus den Mitochondrien verhindert. Somit kann eine Überexpression von Bcl-2 nur

die Typ-II-vermittelte Apoptose beeinflussen, da sie im Gegensatz zur Typ-I-Apoptose von einer Aktivierung der Mitochondrien abhängig ist.

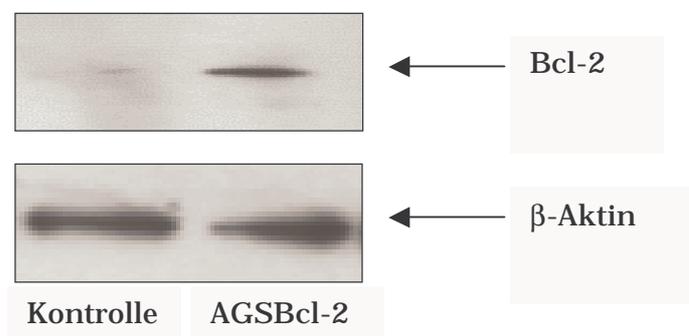


Abb. 5:

Bcl-2-Expression der stabil Bcl-2-überexprimierenden AGS-Zelllinie AGSBcl-2 im Vergleich mit AGS-Zellen, die mit dem retroviralen Kontrollvirus pLXIN transduziert wurden (Kontrolle), dargestellt im Western Blot. Aus beiden Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, von denen je 20 µg in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinexpression von Bcl-2 und β-Aktin wurde nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Zur Herstellung einer stabil Bcl-2-überexprimierenden AGS-Zelllinie wurde zunächst die retrovirale Verpackungs-Zelllinie GP-293 entsprechend Abschnitt 5.3.2.1.1 pro Zellkulturschale mit 10 µg pLXIN-Bcl-2 und 2,5 µg pVSV-G in Gegenwart von 10 µl LipofectAmine™ transfiziert. An den drei darauffolgenden Tagen wurden zuvor in 6 cm-Schalen ausgesäte AGS-Zellen mit dem Retroviren enthaltenden Überstand der GP-293-Zellen transduziert (Abschnitt 5.3.2.2). Es schloß sich eine zweiwöchige Selektion der transduzierten Zellen in Neomycin-haltigem Medium an. Die Transduktionseffizienz war gering und lag bei etwa 3%. Die Kolonien wurden anschließend vereinzelt und bis zum Erreichen einer höheren Kulturdichte in Normalmedium kultiviert. Um den Erfolg der retroviralen Transduktion überprüfen zu können, wurden die aus den transduzierten AGS-Zellen gemäß Abschnitt 5.4.1 isolierten Gesamtzellextrakte in Western Blot-Analysen untersucht (Abschnitte 5.4.3-5.4.6). Als Kontrolle wurden AGS-Zellen verwendet, die mit dem Ausgangsvirus pLXIN transduziert wurden (AGSpLXIN). Mit Hilfe eines anti-β-Aktin Antikörpers wurde die Proteinkonzentration der Zellextrakte verglichen.

Aus Abbildung 5 ist ersichtlich, daß die Bcl-2-Proteinexpression in den Bcl-2-transduzierten Zellen im Vergleich mit der Kontrolle deutlich erhöht war. Somit war die Herstellung einer AGS-Zelllinie, die stabil Bcl-2 überexprimiert, erfolgreich.

6.2.3 Herstellung stabil CrmA-überexprimierender AGS-Zellen (AGSCrmA)

Bei CrmA handelt es sich um ein Protein des Kuhpockenvirus, das sowohl Caspase-8 als auch Caspase-1 hemmt. Mit Hilfe einer CrmA-überexprimierenden Zelllinie können somit die frühen Ereignisse der apoptotischen Caspase-Kaskade untersucht werden. Daher wurde mittels retroviraler Transduktion eine AGS-Zelllinie generiert, die stabil CrmA überexprimiert (AGSCrmA).

Die Transfektion der retroviralen Verpackungs-Zelllinie GP-293 mit dem retroviralen Plasmid pLXIN-CrmA und pVSV-G in Gegenwart von LipofectAmine™ sowie die retrovirale Transduktion der AGS-Zellen und deren anschließende Selektion in Neomycin-haltigem Medium erfolgte wie vorher für AGSBcl-2 beschrieben (Abschnitte 5.3.2.1.1 und 5.3.2.2). Auch hier war die Transduktionseffizienz sehr gering und lag bei ca. 5%. Nachdem die Zellen eine höhere Kulturdichte erreicht hatten, wurde die Transduktion auf Proteinebene überprüft. Aus den transduzierten Zellen wurden analog zu Abschnitt 5.4.1 Gesamtzellextrakte isoliert und in Western Blot-Analysen (Abschnitte 5.4.3-5.4.6) untersucht. Als Kontrolle dienten AGS-Zellen, die mit dem Ausgangsvirus pLXIN transduziert wurden (AGSpLXIN). Ein Abgleich der CrmA-Signalintensität fand mittels β -Aktin statt.

Aus Abbildung 6 wird ersichtlich, daß mit Hilfe retroviraler Transduktion eine AGS-Zelllinie hergestellt werden konnte, die stabil CrmA überexprimiert. Die CrmA-Konzentration der beiden auf Spur 2 und 3 aufgetragenen AGSCrmA-Klone war im Vergleich mit der Kontrolle (Spur 1) erhöht. Eine deutliche Steigerung der CrmA-Proteinexpression war jedoch nur im Fall des

auf Spur 3 aufgetragenen AGSCrmA-Klons erkennbar. Daher wurde dieser für alle weiterführenden Experimente verwendet.

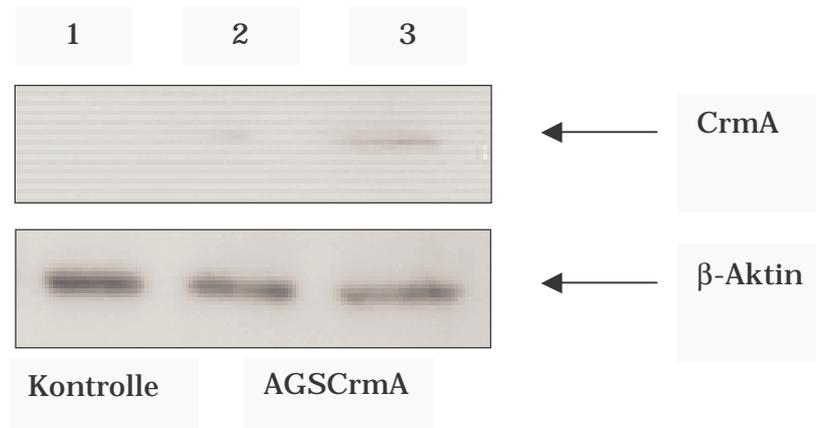


Abb. 6:

CrmA-Expression zweier stabil CrmA-überexprimierender AGS-Zellklone (AGSCrmA; Spur 2 und 3) im Vergleich mit AGS-Zellen, die mit dem retroviralen Kontrollvirus pLXIN transduziert wurden (Kontrolle, Spur 1), dargestellt im Western Blot. Aus allen Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, von denen je 20 μ g in einem 15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinexpression von CrmA und β -Aktin wurde nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

6.2.4 Herstellung stabil dominant negatives FADD (dnFADD)-überexprimierender AGS-Zellen (AGSdnFADD)

Im Folgenden wird beschrieben, wie mit Hilfe retroviraler Transduktion eine AGS-Zelllinie generiert wurde, die stabil eine dominant negative Mutante von FADD (dnFADD) überexprimiert. Wildtyp-FADD (WT-FADD) ist ein 23 kDa großes Fas-assoziiertes Adapterprotein. Eine Bindung von WT-FADD an die Todes-Domäne des Fas-Rezeptors löst in Zellen Apoptose aus. Die dominant negative Variante von FADD (dnFADD) unterscheidet sich vom Wildtyp jedoch durch Deletion der für die Signalweiterleitung verantwortlichen Domäne (Δ 1-79). Daher ist in Zellen, die stabil dnFADD überexprimieren, die Apoptosekaskade ab dem DISC unterbrochen. Zur Unterscheidung vom endogen in der Zelle vorliegenden WT-FADD enthält dnFADD N-terminal ein Flag-tag.

Die Herstellung von stabil dnFADD-überexprimierenden AGS-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 5.3.2.1.1 und 5.3.2.2 beschrieben mittels retroviraler Transduktion. Für die Transfektion der Verpackungs-Zellen GP-293 mit pLXIN-dnFADD und pVSV-G wurde LipofectAmine™ verwendet. Nach einer insgesamt sechsfachen Transduktion von AGS-Zellen mit Virus-haltigen Überständen und anschließender zweiwöchiger Selektion dnFADD-überexprimierender Zellen in Neomycin wurden aus den transduzierten Zellen analog zu Abschnitt 5.4.1 Gesamtzellextrakte isoliert. Die Expressionsstärke des dnFADD-Proteins wurde mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers in den dnFADD-transduzierten AGS-Zellen in Western Blot-Analysen (Abschnitte 5.4.3-5.4.6) untersucht. Als Kontrolle diente die Zelllinie AGSpLXIN. Die Signalintensität von dnFADD wurde durch Vergleich mit der β -Aktin-Expression der Proben validiert.

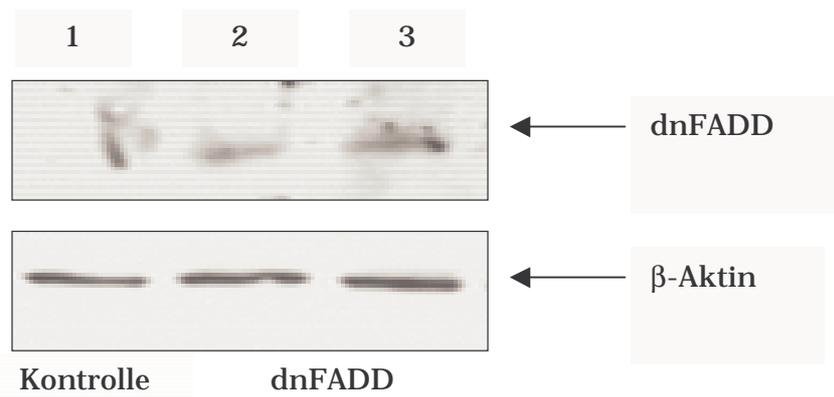


Abb. 7:

dnFADD-Expression zweier stabil dnFADD-überexprimierender AGS-Zellklone (AGSdnFADD; Spur 2 und 3) im Vergleich mit AGS-Zellen, die mit dem retroviralen Kontrollvirus pLXIN transduziert wurden (Kontrolle; Spur 1), dargestellt im Western Blot. Aus allen Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, von denen je 20 μ g in einem 15%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinexpression von dnFADD und β -Aktin wurde nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abbildung 7 zeigt, daß die stabile Transduktion von dnFADD in AGS-Zellen erfolgreich war. Im Fall der Kontroll-Zelllinie AGSpLXIN war im Western keine Bande erkennbar (Spur 1), während bei den dnFADD-transduzierten AGS-Zellen (Spur 2 und 3) eine deutliche Steigerung der dnFADD-Proteinexpression sichtbar wurde. In allen weiterführenden Experimenten wurde der in Spur 3 dargestellte AGSdnFADD-Klon eingesetzt.

6.2.5 Das Wachstumsverhalten von AGS-Zellen wurde durch Überexpression von Bcl-2, CrmA und dnFADD nicht beeinflusst

Mit Hilfe der unter Punkt 6.2.2, 6.2.3 und 6.2.4 beschriebenen Zelllinien sollte die *H. pylori*-induzierte Apoptose näher untersucht werden. Daher mußte vorab in einem Zellzählversuch geklärt werden, ob die Transduktion von Bcl-2, CrmA und dnFADD das Wachstum der AGS-Zellen verändert hatte.

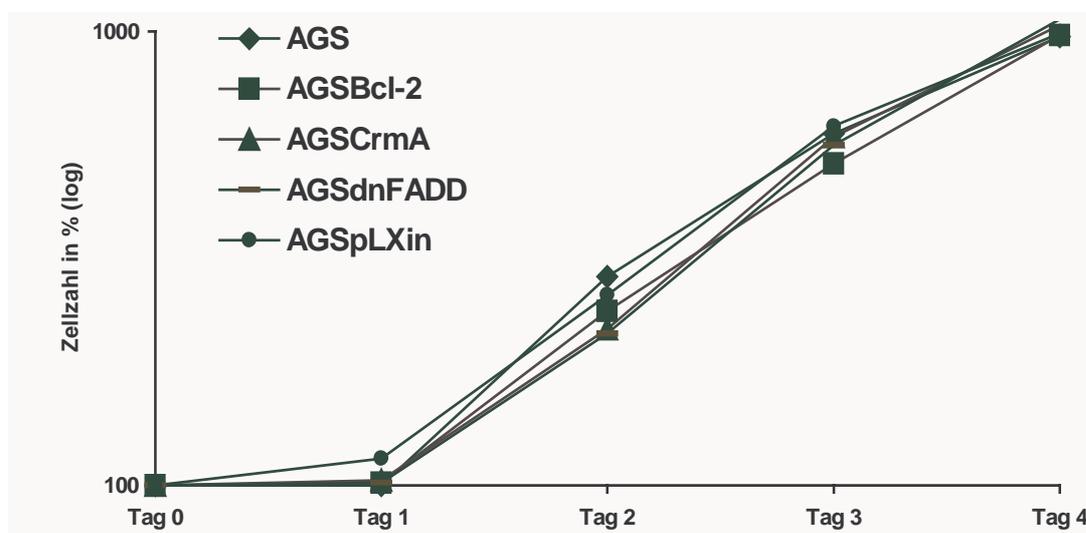


Abb. 8:

Wachstumskurven der Zelllinien AGS, AGSBcl-2, AGSCrmA, AGSdnFADD und AGSpLXIN, logarithmisch dargestellt. Von allen Zelllinien wurden äquivalente Zellzahlen ausgesät und für 4 Tage in RPMI 1640 inkubiert. Jeden Tag wurden die isolierten Zellsuspensionen nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Dabei wurde die für jede Zelllinie an Tag 0 ermittelte Zellzahl auf 100% festgelegt. Alle an den folgenden Tagen erhaltenen Zellzahlen stehen in Relation zu diesem Wert.

Die verschiedenen Zelllinien wurden mit einer ungefähren Zellzahl von 5×10^4 Zellen/ml in 24 well-Platten ausgesät und für weitere vier Tage in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) kultiviert (Abschnitt 5.3.1). Als Kontrolle dienten unbehandelte AGS-Zellen und AGS-Zellen, die mit dem Ausgangsvirus pLXIN transduziert wurden (AGSpLXIN). Täglich wurden von jeder Zelllinie drei „wells“ geerntet und die Zellzahl in einer Neubauer-Kammer bestimmt. Damit lebende von toten Zellen unterschieden werden konnten, wurden die isolierten Zellsuspensionen mit Trypanblau, einem Farbstoff der nur tote Zellen anfärbt, versetzt.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abbildung 8 zusammengefaßt. Um die 5 verschiedenen Zelllinien in ihrem Wachstumsverhalten vergleichen zu können, wurde die für jede Zelllinie an Tag 0 festgestellte Zellzahl mit dem Wert 100% belegt. Alle in den folgenden Tagen ermittelten Zellzahlen stehen in Relation zu diesem Wert.

Die 5 untersuchten Zelllinien zeigten dasselbe Wachstumsverhalten: Einen Tag nach Aussaat war keine oder nur eine minimale Veränderung der Zellzahl erkennbar, während sich die Zellen an den folgenden Tagen exponentiell vermehrten. Somit hatte die Transduktion das Wachstum der AGS-Zellen nicht verändert.

6.2.6 FasL-induzierte Apoptose wurde durch Überexpression von Bcl-2, CrmA und dnFADD in AGS-Zellen signifikant reduziert

Im Folgenden wurde überprüft, ob die FasL-induzierte Apoptose in AGS-Zellen durch Überexpression von Bcl-2, CrmA bzw. dnFADD funktionell gehemmt war.

Die Zelllinien AGSBcl-2, AGSCrmA, AGSdnFADD und AGSpLXIN (Kontrolle) wurden für 24 Stunden in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) kultiviert. Am nächsten Tag wurde die eine Hälfte der Kulturen mit 500 ng FasL versetzt, während die andere Hälfte für die Bestimmung der endogenen Apoptoserate unstimuliert blieb (Abschnitt 5.3.4). Die Apoptoserate der nach weiteren 24 Stunden gewonnenen Zellsate wurde im Histon-ELISA (Abschnitt 5.3.5.1) bei einer Extinktion von 405 nm bestimmt.

Abbildung 9 veranschaulicht die Apoptoseraten der drei retroviral transduzierten Zelllinien AGSBcl-2, AGSCrmA und AGSdnFADD im Vergleich mit der Kontrollzelllinie AGSpLXIN. Die endogene Apoptoserate der in RPMI kultivierten Zellen wurde auf 100% gesetzt, während die Apoptoseraten der mit FasL stimulierten Zellen prozentual diesem Wert angeglichen wurden.

Ergebnisse

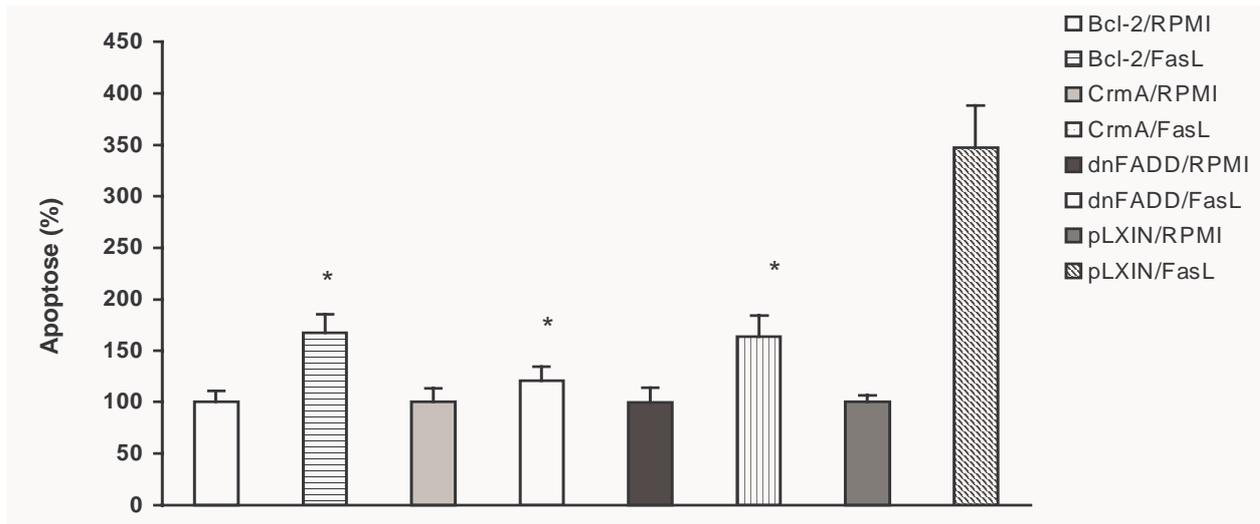


Abb. 9:

Effekt von FasL auf die Apoptose Bcl-2-, CrmA- bzw. dnFADD-überexprimierender AGS-Zellen im Vergleich mit der Apoptoserate FasL-induzierter AGSpLXIN-Zellen (Kontrolle). Dargestellt als relative Werte (in %), bezogen auf die Apoptose der in RPMI kultivierten AGSBcl-2-, AGSCrmA-, AGSdnFADD- bzw. AGSpLXIN-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit FasL (500 ng) bzw. in RPMI 1640 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen. p* vs. AGSpLXIN/FasL

So führte eine Stimulation durch FasL in den Kontrollzellen AGSpLXIN zu einer 3,5-fachen Steigerung der Apoptoserate ($346,93\% \pm 40,9\%$) im Vergleich mit den in RPMI kultivierten AGSpLXIN-Zellen. Hingegen lag die durch FasL induzierte Apoptoserate bei den Bcl-2- und dnFADD-überexprimierenden Zellen bei $167,7\% \pm 18\%$ bzw. bei $120,7\% \pm 14\%$. Im Vergleich mit der Apoptoserate der FasL-induzierten Kontrollzelllinie AGSpLXIN entsprach dieses im Fall von AGSBcl-2 einer signifikanten Hemmung der FasL-assoziierten Apoptose um 51,7% ($p=0,01$) bzw. im Fall von AGSdnFADD um 52,9% ($p=0,02$). Am potentesten wurde die FasL-vermittelte Apoptose jedoch durch die Zelllinie AGSCrmA verringert. FasL induzierte in AGSCrmA-Zellen nur eine 1,2-fache Steigerung der Apoptoserate ($120,7\% \pm 14\%$) im Vergleich mit unstimulierten AGSCrmA-Zellen. Somit wurde die FasL-assoziierte Apoptose durch Überexpression von CrmA signifikant um 65,2% ($p=0,004$) reduziert.

6.2.7 *H. pylori*-induzierte Apoptose wurde durch Überexpression von Bcl-2, CrmA und dnFADD in AGS-Zellen signifikant reduziert

Der Effekt von *H. pylori* auf die Apoptoseraten der Bcl-2-, CrmA- bzw. dnFADD-überexprimierenden AGS-Zellen wurde im Histon-ELISA (Abschnitt 5.3.5.1) untersucht. Als Kontrolle diente die mit dem retroviralen Ausgangsvirus transduzierte, permanente Zelllinie AGSpLXIN.

Nach einer 24-stündigen Inkubation der Zelllinien AGSBcl-2, AGSCrmA, AGSdnFADD und AGSpLXIN in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) wurde die eine Hälfte der Zellen für weitere 24 Stunden mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,5$) koinkubiert, während die andere Hälfte weiterhin in RPMI kultiviert wurde (Abschnitt 5.3.4). Mit Hilfe der anschließend isolierten Zellysate wurden die Apoptoseraten der Zellen im Histon-ELISA bei 405 nm bestimmt. Abbildung 10 veranschaulicht die Ergebnisse dieser Untersuchung. Um die Apoptoseraten der *H. pylori*-stimulierten Zelllinien miteinander vergleichen zu können, wurde für die in Medium ermittelte endogene Apoptoserate der jeweiligen Zelllinie ein Wert von 100% festgelegt. Die Raten der *H. pylori*-induzierten Zellen wurden prozentual an diesem Wert angeglichen.

H. pylori verursachte bei der Kontrollzelllinie AGSpLXIN eine 6,7-fache Steigerung der Apoptose ($670,6\% \pm 65,9\%$) versus der für diese Zelllinie ermittelten endogenen Apoptoserate. Die Apoptose der Zelllinien AGSBcl-2, AGSCrmA und AGSdnFADD stieg unter *H. pylori* von jeweils 100% in RPMI auf $378,1\% \pm 96,5\%$, $356\% \pm 71,4\%$ bzw. $500,1\% \pm 25,4\%$. Bezogen auf die Apoptoserate der stimulierten Kontrolle wurde die *H. pylori*-assoziierte Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 somit signifikant um 43,6% ($p=0,016$) verringert, während sie in CrmA-transduzierten Zellen signifikant um 46,9% ($p=0,006$) gemindert wurde. Den geringsten Effekt auf die *H. pylori*-induzierte Apoptose zeigten die dnFADD-überexprimierenden AGS-Zellen mit einer signifikanten Abnahme der Apoptoserate um 25,4% ($p=0,004$).

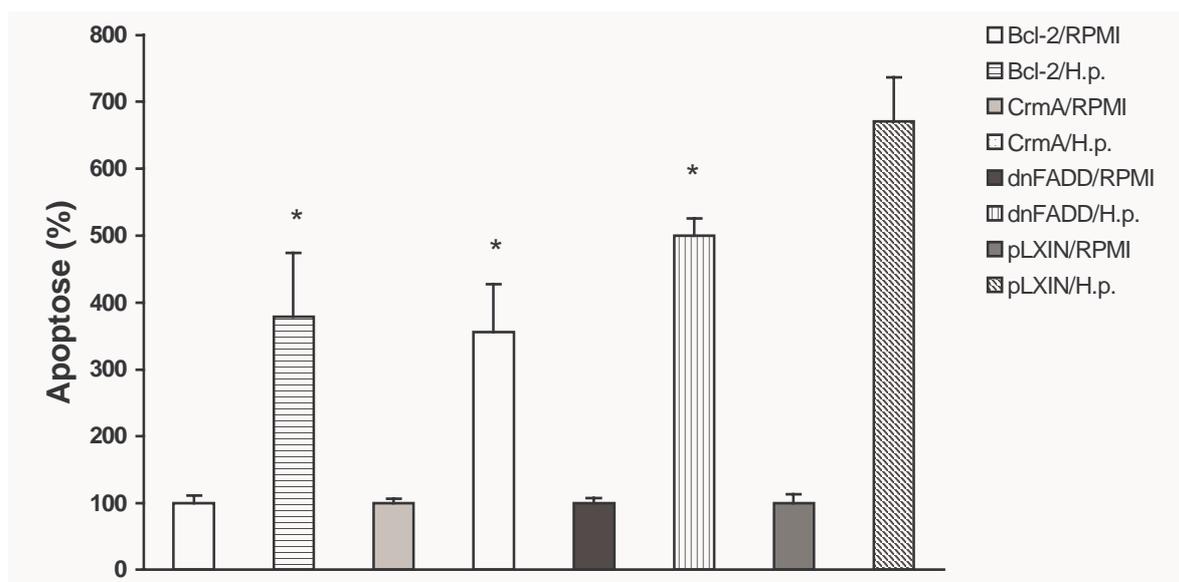


Abb. 10:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Apoptose Bcl-2-, CrmA- bzw. dnFADD-überexprimierender AGS-Zellen im Vergleich mit der Apoptoserate *H. pylori* P12-induzierter AGSpLXIN-Zellen (Kontrolle). Dargestellt als relative Werte (in %), bezogen auf die Apoptose der in RPMI kultivierten AGSBcl-2-, AGSCrmA-, AGSdnFADD- bzw. AGSpLXIN-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,5$) bzw. in RPMI 1640 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen.

p* vs. AGSpLXIN/H.p.

6.3 Rolle des proapoptotischen Liganden TRAIL und die seiner proapoptotischen Rezeptoren DR4 und DR5 bei der *H. pylori*-assoziierten Apoptose in AGS-Zellen

In den letzten Jahren haben neben dem Fas/FasL-System der proapoptotische Ligand TRAIL und seine 5 Rezeptoren DR4, DR5, DcR1, DcR2 und OPG in der Apoptoseforschung an Bedeutung gewonnen.

Daher wurde im Folgenden zum einen die Rolle der TRAIL-induzierten Apoptosekaskade bei der *H. pylori*-stimulierten Apoptose evaluiert. Zum anderen wurde untersucht, ob die Proteinexpression von TRAIL und die seiner proapoptotischen Rezeptoren DR4 und DR5 in AGS-Zellen durch *H. pylori* beeinflusst wird. Mit Hilfe von AGS-Zellen, die durch retrovirale Transduktion spezifischer antisense-RNAs eine verminderte DR4- bzw. DR5-

Expression aufwies, wurde die Rolle dieser Rezeptoren bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose näher betrachtet.

6.3.1 TRAIL erhöhte synergetisch die *H. pylori* induzierte Apoptose in AGS-Zellen

Es wurde geprüft, ob TRAIL ebenso wie FasL eine synergetische Steigerung der *H. pylori*-induzierten Apoptose in AGS-Zellen bewirkt.

AGS-Zellen wurden nach 24-stündiger Kultivierung in RPMI-Medium (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) für weitere 24 Stunden mit 10 ng TRAIL und/oder einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) koinkubiert (Abschnitt 5.3.4). Um die Effekte der TRAIL- und FasL-induzierten Apoptosekaskade auf die *H. pylori*-assoziierte Apoptose miteinander vergleichen zu können, wurden AGS-Zellen zusätzlich mit 500 ng FasL allein oder zusammen mit *H. pylori* ($OD_{600}=0,25$) und/oder TRAIL (10 ng) kultiviert (Abschnitt 5.3.4). Als Kontrolle dienten unstimulierte AGS-Zellen, deren endogene Apoptoserate auf 100% festgelegt wurde. Die Meßwerte der stimulierten Zellen wurden prozentual in Relation zu diesem Wert gestellt.

Abbildung 11 faßt die Ergebnisse dieses Versuchs zusammen. *Helicobacter* und FasL erhöhten die Apoptoserate der AGS-Zellen ungefähr um den Faktor 4 (Säule 2 und 3), während TRAIL nur eine 3-fache ($304,3\% \pm 19,6\%$) Apoptosesteigerung induzierte. Wurden AGS-Zellen gleichzeitig mit 500 ng FasL und 10 ng TRAIL inkubiert, erhöhte sich die Apoptoserate additiv von 100% in unstimulierten Zellen auf $711,2\% \pm 57,4\%$. Zusätzlich wird aus Abbildung 11 erkennbar, daß nicht nur FasL, sondern auch TRAIL einen synergetischen Effekt auf die *H. pylori*-induzierte Apoptose hatte (Säule 6 und 7). Die Apoptose wurde in beiden Fällen signifikant um den Faktor 30 erhöht. Dieser synergetische Effekt konnte jedoch nicht durch eine gleichzeitige Inkubation von FasL (500 ng), TRAIL (10 ng) und *H. pylori* ($OD_{600}=0,25$) verstärkt werden (Säule 8, Abb. 11).

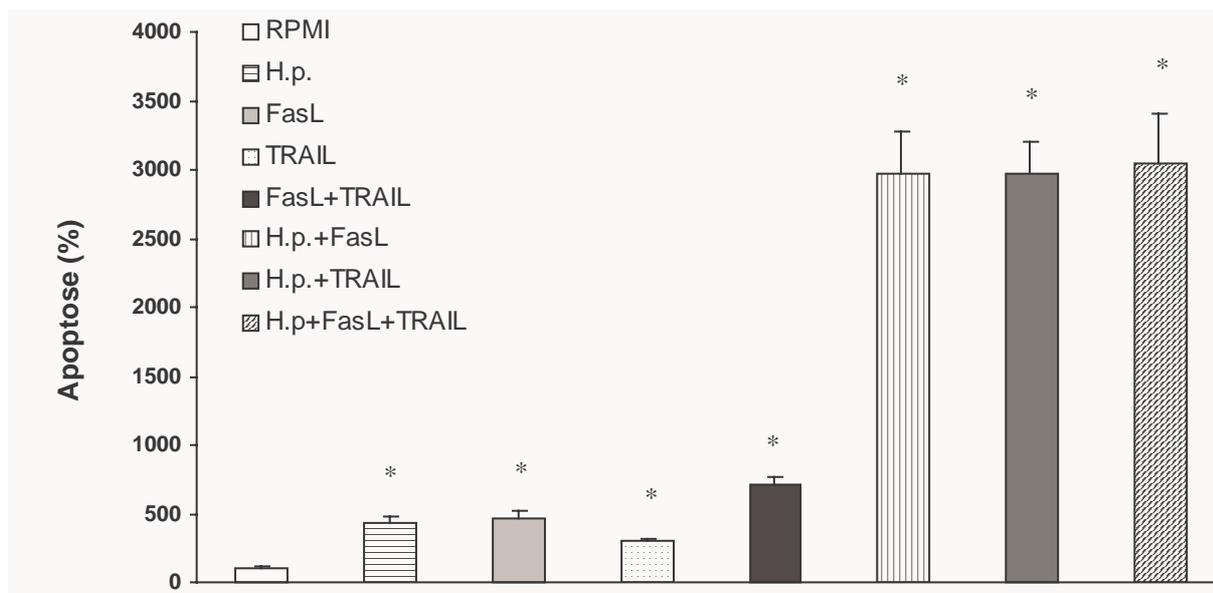


Abb. 11:

Effekt von *H. pylori* P12, FasL und TRAIL auf die Apoptoserate von AGS-Zellen, dargestellt als relative Werte (in %) bezogen auf die Apoptose von AGS-Zellen, die in Normalmedium kultiviert wurden. Die Apoptose wurde nach 24 h im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen. Säule 1: AGS-Zellen, kultiviert in RPMI; Säule 2: AGS-Zellen, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Säule 3: AGS-Zellen, inkubiert mit FasL (500 ng); Säule 4: AGS-Zellen, inkubiert mit TRAIL (10 ng) Säule 5: AGS-Zellen, koinkubiert mit FasL (500 ng) und TRAIL (10 ng); Säule 6: AGS-Zellen, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und FasL (500 ng); Säule 7: AGS-Zellen, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (10 ng); Säule 8: AGS-Zellen, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$), FasL (500 ng) und TRAIL (10 ng).

p* vs. AGS/RPMI

6.3.2 *H. pylori* erhöhte zeitabhängig die Proteinexpression von DR4 in AGS-Zellen

In Western Blot-Analysen wurde geprüft, ob eine Koinkubation von AGS-Zellen mit *H. pylori* Auswirkungen auf die Proteinexpression von TRAIL und der Rezeptoren DR4 und DR5 hat.

Auf zuvor in Normalmedium kultivierte AGS-Zellen wurde eine *H. pylori* P12-Suspension, die eine $OD_{600}=0,25$ hatte, gegeben und für 15 Minuten, 30 Minuten, eine Stunde und zwei, vier, sechs, acht und vierundzwanzig Stunden mit den Zellen koinkubiert (Abschnitt 5.3.4). Die anschließend aus den Zellen isolierten Gesamtzellextrakte wurden in Western Blot-Analysen auf die Expression der oben genannten Proteine untersucht (Abschnitte 5.4.1, 5.4.3-5.4.6). Als Kontrollen dienten Extrakte, die aus in

RPMI 1640 kultivierten AGS-Zellen gewonnen wurden. Um einen gleichmäßigen Auftrag der Proteinproben gewährleisten zu können, wurde zusätzlich die β -Aktin-Expression der Extrakte evaluiert.

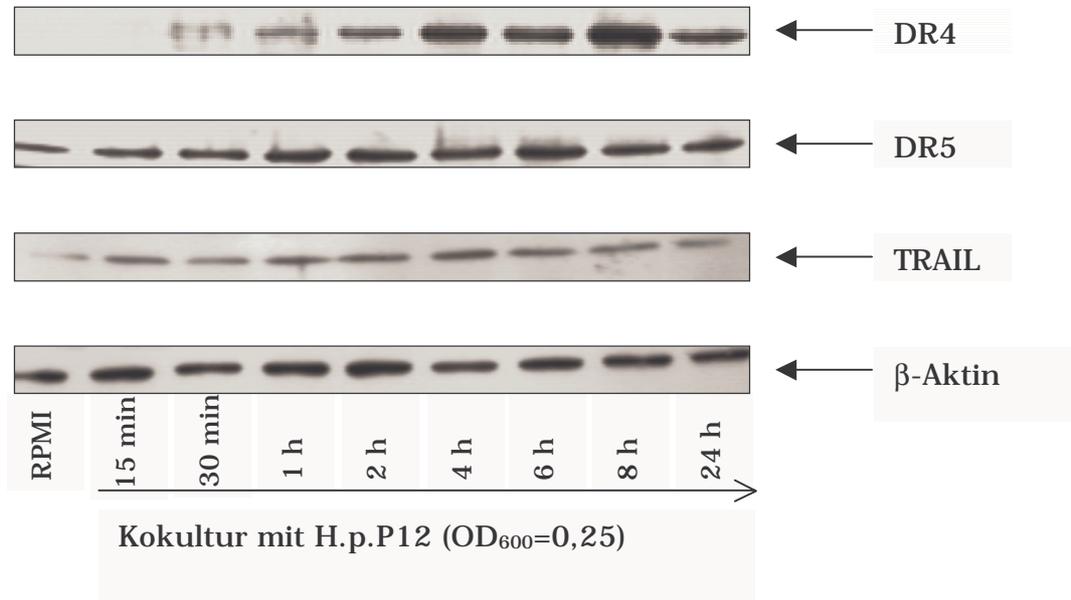


Abb. 12:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Proteinexpression von DR4, DR5 und TRAIL in Abhängigkeit von der Zeit, dargestellt mittels Western Blot-Technik. AGS-Zellen wurden für 0-24 h mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) koinkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt. Von jedem Zeitwert wurden 10 μ g Protein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinexpression von DR4, DR5, TRAIL und β -Aktin wurde nach SDS-Page, Western Blot und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abbildung 12 zeigt die Proteinexpression von DR4, DR5 und TRAIL in *H. pylori*-stimulierten AGS-Zellen in Abhängigkeit von der Koinkubationsdauer.

H. pylori induzierte in AGS-Zellen eine deutliche Steigerung der DR4-Expression in Abhängigkeit von der Zeit. Schon nach 30-minütiger Koinkubation war die DR4-Expression verglichen mit der Kontrolle erhöht. Das Maximum wurde nach 8 Stunden erreicht.

Hingegen zeigten *H. pylori*-stimulierte AGS-Zellen nur eine minimale Zunahme der DR5- und TRAIL-Expression mit Verlängerung der Koinkubationsdauer.

Auffällig war jedoch, daß unstimulierte AGS-Zellen eine höhere basale DR5- und TRAIL-Expression als DR4-Proteinkonzentration aufwiesen.

6.3.3 Durch retrovirale Transduktion eines DR4- bzw. DR5-antisense-Konstrukts wurde die Proteinexpression des korrespondierenden Proteins permanent in AGS-Zellen verringert

Um die Rolle der beiden proapoptotischen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose evaluieren zu können, wurden im Folgenden AGS-Zellen generiert, die eine verminderte DR4- bzw. DR5-Expression aufwiesen (AGSDR4as und AGSDR5as). Dazu wurden AGS-Zellen mit Retroviren transduziert, die nach Integration ins Wirtsgenom spezifische antisense-RNAs (DR4as und DR5as) produzierten. Anschließend wurde der Erfolg der Transduktion mittels Western Blot-Analysen untersucht.

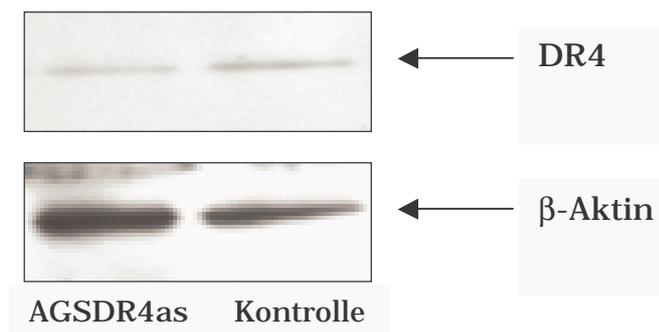


Abb. 13:

DR4-Expression eines mit einem DR4-antisense-Konstrukt transduzierten AGS-Klons (AGSDR4as) im Vergleich mit AGS-Zellen, die mit dem retroviralen Kontrollvirus pLXRN transduziert wurden (Kontrolle), dargestellt im Western Blot. Aus den Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, von denen je 20 µg in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinexpression von DR4 und β-Aktin wurde nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Da die Transduktionseffizienz des mit der Verpackungs-Zelllinie GP-293 gebildeten Virustiters gering war, wurde für die folgende Herstellung replikationsinkompetenter Retroviren die Zelllinie Phoenix verwendet, die höhere Virustiter produzieren kann. Zudem erfolgte die Transfektion der Verpackungszellen nach der schonenderen Calciumphosphat-Methode (Abschnitt 5.3.2.1.2).

Phoenix-Zellen wurden mit 10 µg pLXRN-DR4as bzw. pLXRN-DR5as in Gegenwart einer 2M Calciumchlorid-Lösung und HBS-Puffer transfiziert. An den folgenden drei Tagen erfolgte die Transduktion der AGS-Zellen mit den Retrovirus-haltigen Überständen der Verpackungszelllinie (Abschnitt 5.3.2.2). Zur Kontrolle wurden AGS-Zellen mit dem Ausgangs-Retrovirus pLXRN transduziert (AGSpLXRN). Die Selektion positiver Klone erfolgte in Neomycin-haltigem RPMI-Medium. Die Transduktionseffizienz lag in allen drei Fällen bei ca. 20%. Nachdem die einzelnen Klone eine höhere Kulturdichte erreicht hatten, wurden nach Abschnitt 5.4.1 Gesamtzellextrakte isoliert. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurde in Western Blot-Analysen überprüft (Abschnitte 5.4.3-5.4.6), ob durch Transduktion der antisense-Konstrukte die Expression der korrespondierenden Proteine permanent vermindert war (Abb. 13 und 14). Als Kontrolle dienten AGSpLXRN-Zellen. Ein Abgleich der Proben-Konzentrationen fand mittels β -Aktin statt.

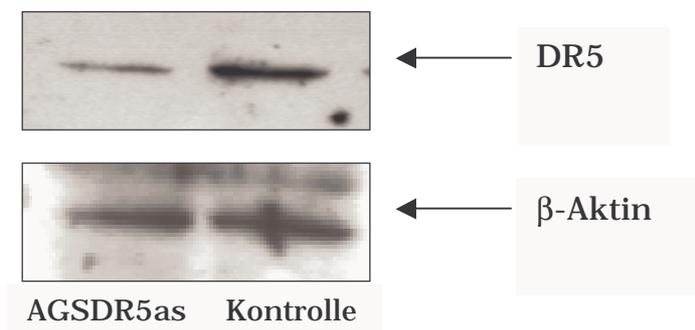


Abb. 14:

DR5-Expression eines mit einem DR5-antisense-Konstrukt transduzierten AGS-Klons (AGSDR5as) im Vergleich mit AGS-Zellen, die mit dem retroviralen Kontrollvirus pLXRN transduziert wurden (Kontrolle), dargestellt im Western Blot. Aus den beiden Zelllinien wurden Gesamtzellextrakte gewonnen, von denen je 20 µg in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinexpression von DR5 und β -Aktin wurde nach Western Blotting und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Aus Abbildung 13 und 14 wird deutlich, daß durch retrovirale Transduktion der AGS-Zellen mit den spezifischen antisense-Konstrukten DR4as und DR5as die Expression des entsprechenden Proteins stabil vermindert war.

6.3.4 Das Wachstumsverhalten transduzierter AGS-Zellen wurde durch eine verringerte DR4- bzw. DR5-Expression nicht verändert

Mittels Zellzählversuchen wurde geklärt, ob sich die unter Punkt 6.3.3 generierten Zelllinien AGSDR4as und AGSDR5as in ihrem Wachstumsverhalten von der Ausgangs-Zelllinie AGS und der Kontrollzelllinie AGSpLXRN unterschieden.

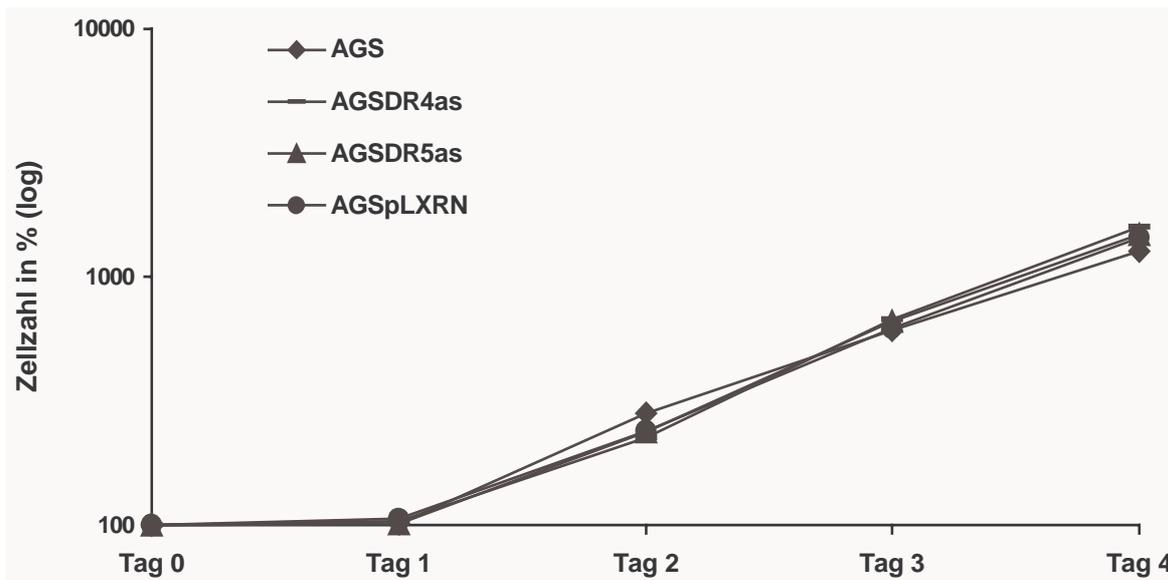


Abb. 15:

Wachstumskurven der Zelllinien AGS, AGSDR4as, AGSDR5as und AGSpLXRN, logarithmisch dargestellt. Von allen Zelllinien wurden äquivalente Zellzahlen ausgesät und für 4 Tage in RPMI 1640 inkubiert. Jeden Tag wurden die isolierten Zellsuspensionen nach Trypanblaufärbung in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Dabei wurde die für jede Zelllinie an Tag 0 ermittelte Zellzahl auf 100% festgelegt. Alle an den folgenden Tagen erhaltenen Zellzahlen stehen in Relation zu diesem Wert.

Die Zelllinien AGS, AGSDR4as, AGSDR5as und AGSpLXRN wurden in ähnlicher Konzentration in 24 well-Platten ausgesät und für insgesamt vier Tage in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) kultiviert (Abschnitt 5.3.1). Mittels Trypanblaufärbung wurde die Anzahl viabler Zellen für jede der Zellkulturen bestimmt. Die an Tag 0 ermittelte Zellzahl wurde für jede Zelllinie auf 100% gesetzt. Die an den nächsten Tagen für jede Zelllinie bestimmten Zellzahlen wurden prozentual an diesen Wert angeglichen.

Abbildung 15 macht deutlich, daß alle vier untersuchten Zelllinien das gleiche Wachstumsverhalten aufwiesen. Somit wurde ausgeschlossen, daß die in späteren Versuchen ermittelten Apoptoseraten auf einer Veränderung der Wachstumsrate der transduzierten Zelllinie beruhten.

6.3.5 TRAIL-induzierte Apoptose wurde durch eine verminderte DR4- bzw. DR5-Expression in AGS-Zellen signifikant reduziert

Im Folgenden wurde evaluiert, ob durch Transduktion der antisense-Konstrukte DR4as und DR5as die TRAIL-induzierte Apoptose in AGS-Zellen funktionell gehemmt war.

Die Zelllinien AGSDR4as, AGSDR5as und AGSpLXRN (Kontrolle) wurden in gleicher Zellzahl in 24 well-Platten ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung in RPMI wurde die eine Hälfte der Zellen mit 20 ng TRAIL stimuliert, während die andere Hälfte unbehandelt blieb (Abschnitt 5.3.4). Die Inkubation dauerte weitere 24 Stunden an. Anschließend wurden die Apoptoseraten der verschiedenen Zellkulturen im Histon-ELISA bestimmt (Abschnitt 5.3.5.1). Um die verschiedenen Zelllinien auf ein vergleichbares Maß bringen zu können, wurden für jede Zelllinie die Meßwerte der unstimulierten Zellen auf 100% gesetzt und die Werte der induzierten Zellen der gleichen Zelllinie prozentual an diesen Wert angeglichen.

Die Inkubation der Kontrollzelllinie AGSpLXRN mit TRAIL induzierte einen 8-fachen Anstieg der Apoptoserate von 100% bei in RPMI gewachsenen AGSpLXRN-Zellen auf $802\% \pm 112\%$. Hingegen nahm die Anzahl der apoptotischen Zellen bei den DR4as-transduzierten Zellen unter Einfluß von TRAIL nur um das 4,4-fache ($442,1\% \pm 49,5\%$) zu, während bei AGSDR5as-Zellen die Apoptoserate um den Faktor 4,1 ($409,5\% \pm 63,3\%$) gegenüber der für diese Zelllinie ermittelten endogenen Apoptoserate erhöht wurde. Somit wurde die TRAIL-induzierte Apoptose durch Verminderung der DR4-Proteinexpression im Vergleich mit der für TRAIL-stimulierte AGSpLXRN-Zellen festgestellten Apoptoserate signifikant um 44,9% ($p=0,001$) verringert

(Abb. 16). Die Hemmung der DR5-Expression in AGS-Zellen führte im Vergleich mit der Kontrollzelle zu einer signifikanten Verminderung der TRAIL-assoziierten Apoptose um 48,9% ($p=0,004$) (Abb. 16).

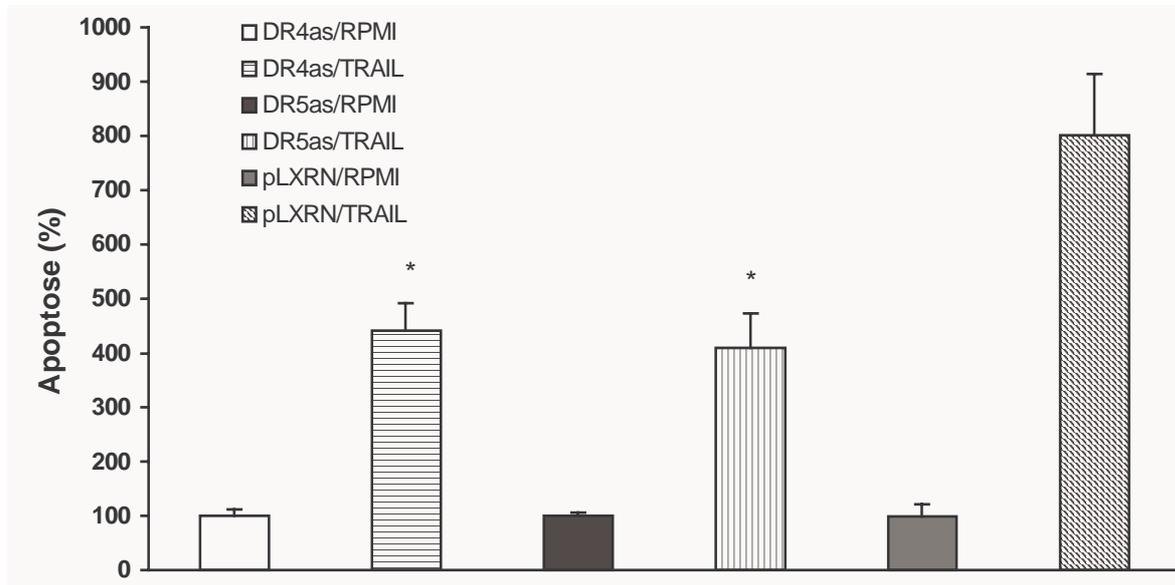


Abb. 16:

Effekt von TRAIL auf die Apoptose von AGS-Zellen mit verminderter DR4- bzw. DR5-Expression im Vergleich mit der Apoptoserate TRAIL-induzierter AGSpLXRN-Zellen (Kontrolle). Dargestellt als relative Werte (in %), bezogen auf die Apoptose der in RPMI kultivierten AGSDR4as-, AGSDR5as- bzw. AGSpLXRN-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit TRAIL (20 ng) bzw. in RPMI 1640 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen.

p* vs. AGSpLXRN/TRAIL

6.3.6 *H. pylori*-induzierte Apoptose wurde durch Verringerung der DR5-Expression in AGS-Zellen signifikant reduziert

Die Bedeutung des DR4- und DR5-Rezeptors für die *H. pylori*-induzierte Apoptose wurde anhand der unter Punkt 6.3.3 generierten Zellen im Histon-ELISA ermittelt (Abschnitt 5.3.5.1).

Am Vortag in RPMI-Medium (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) ausgesäte AGSDR4as-, AGSDR5as- und AGSpLXRN-Zellen (Kontrolle) wurden zur Hälfte mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,5$) für 24 Stunden inkubiert (Abschnitt 5.3.4). Der andere Teil der Zellen blieb unstimuliert. Die Apoptoseraten der unbehandelten Zellen wurden, um die verschiedenen

Zelllinien miteinander vergleichen zu können, auf 100% gesetzt. Die für die stimulierten Zellen ermittelten Meßdaten wurden diesem Wert prozentual in Relation gestellt.

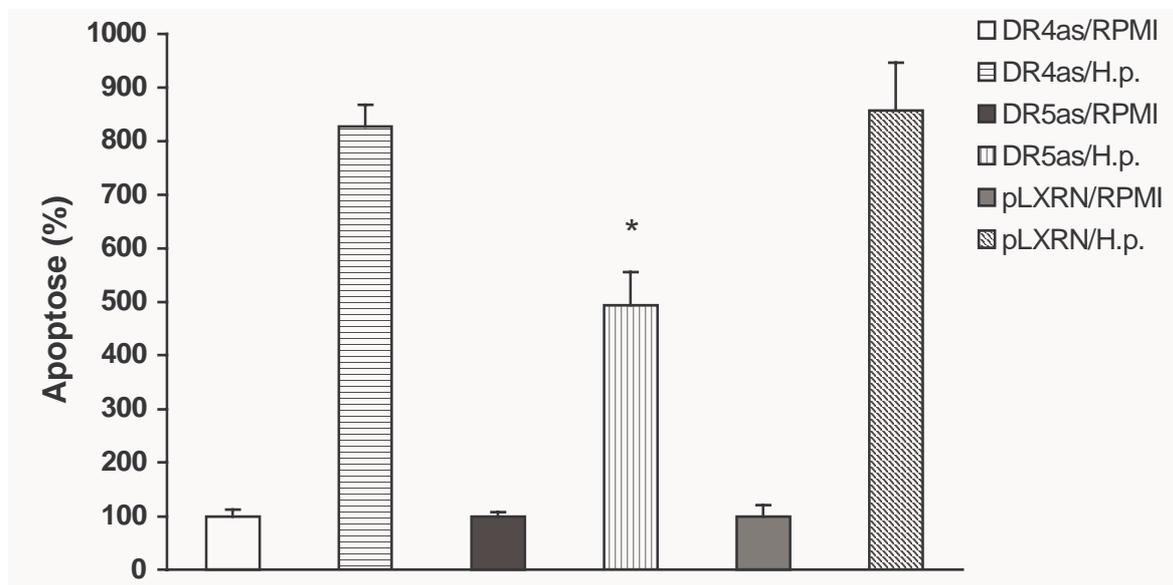


Abb. 17:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Apoptose von AGS-Zellen mit verminderter DR4- bzw. DR5-Expression im Vergleich mit der Apoptoserate *H. pylori* P12-induzierter AGSpLXRN-Zellen (Kontrolle). Dargestellt als relative Werte (in %), bezogen auf die Apoptose der in RPMI kultivierten AGSDR4as-, AGSDR5as- bzw. AGSpLXRN-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,5$) bzw. in RPMI 1640 inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen.

p* vs. AGSpLXRN/H.p.

Aus Abbildung 17 wird ersichtlich, daß eine Koinkubation der Zelllinie AGSDR4as mit *H. pylori* eine 8,3-fache ($827,1\% \pm 41\%$) Zunahme der Apoptose im Vergleich mit der endogenen Apoptoserate dieser Zelllinie induzierte. Ähnlich verhielt sich die Kontrollzelllinie AGSpLXRN. Hier bewirkte *H. pylori* eine Steigerung der Apoptose von 100% in unstimulierten AGSpLXRN-Zellen auf $856,3\% \pm 89,8\%$. Hingegen zeigten DR5as-transduzierte AGS-Zellen unter Einfluß von *H. pylori* eine Erhöhung der Apoptoserate um den Faktor 4,9.

Somit hatte die Verminderung der DR4-Expression keinen Einfluß auf die *H. pylori*-vermittelte Apoptose, während eine Reduktion der DR5-Expression die *H. pylori*-induzierte Apoptose signifikant um 42,5% ($p=0,004$) verringerte, im Vergleich mit den für die stimulierte Kontrollzelllinie ermittelten Werten.

6.4 Untersuchungen zur Rolle der Pathogenitätsfaktoren bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose

Bis heute konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob die Pathogenitätsfaktoren VacA, CagA bzw. die gesamte *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose eine Rolle spielen.

Einblick sollten daher zunächst Kokultivierungsexperimente von AGS-Zellen mit isogenen *H. pylori*-Mutanten *H. pylori* P12*cagA*⁻, *H. pylori* P12*vacA*⁻, und *H. pylori* P12PAI⁻ in die Bedeutung dieser Pathogenitätsfaktoren gewähren. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse sollte anschließend geprüft werden, ob zwischen den verschieden stimulierten Zellen Unterschiede in den Expressionsmustern der proapoptotischen Rezeptoren Fas, DR4 und DR5, den Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 und den entsprechenden Liganden FasL und TRAIL auftreten.

6.4.1 Eine VacA-negative isogene *H. pylori*-Mutante induzierte weniger Apoptose in Magenepithelzellen *in vitro* als der Wildtyp

Nach 24-stündiger Inkubation in Normalmedium wurden AGS-Zellen mit Bakteriensuspensionen der isogenen Mutanten *H. pylori* P12*cagA*⁻, *H. pylori* P12*vacA*⁻, und *H. pylori* P12PAI⁻ (OD₆₀₀=0,5) für weitere 24 Stunden induziert (Abschnitt 5.3.4). Als Kontrolle dienten AGS-Zellen, die mit dem Wildtyp-Stamm *H. pylori* P12 für den gleichen Zeitraum kultiviert wurden. Anschließend wurde die Anzahl apoptotischer Zellen im Histon-ELISA ermittelt (Abschnitt 5.3.5.1). Um das Ausmaß der Apoptosesteigerung für jeden Bakterienstamm bestimmen zu können, wurde die endogene Apoptoserate in RPMI kultivierter AGS-Zellen ermittelt. Dieses Meßergebnis

wurde auf 100% gesetzt und die Apoptoseraten der stimulierten Zellen diesem Wert prozentual angeglichen.

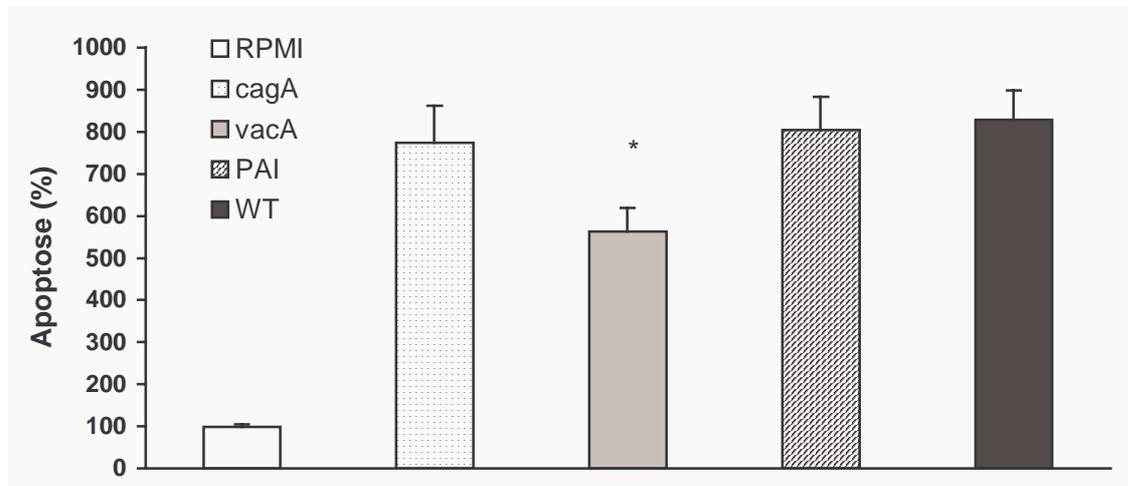


Abb. 18:

Effekt von *H. pylori* P12 (WT), *H. pylori* P12*cagA*⁻ (*cagA*), *H. pylori* P12*vacA*⁻ (*vacA*) und *H. pylori* P12PAI⁻ (PAI) auf die Apoptoserate von AGS-Zellen, dargestellt als relative Werte (in %) bezogen auf die Apoptose von AGS-Zellen, die in Normalmedium inkubiert wurden. Die Apoptose wurde im Histon-ELISA bei 405 nm gemessen. Säule 1: AGS-Zellen, inkubiert in RPMI; Säule 2: AGS-Zellen, inkubiert mit *H. pylori* P12*cagA*⁻ (OD₆₀₀=0,5); Säule 3: AGS-Zellen, inkubiert mit *H. pylori* P12*vacA*⁻ (OD₆₀₀=0,5); Säule 4: AGS-Zellen, inkubiert mit *H. pylori* P12PAI⁻ (OD₆₀₀=0,5); Säule 5: AGS-Zellen, kokultiviert mit *H. pylori* P12 (OD₆₀₀=0,5).

p* vs. AGS/WT

Abbildung 18 veranschaulicht die Ergebnisse dieses Versuchs. Der Wildtyp *H. pylori* P12 induzierte im Vergleich mit unstimulierten AGS-Zellen eine 8,3-fache Steigerung der Apoptoserate. Ähnliche Werte wurden für *H. pylori* P12*cagA*⁻ bzw. *H. pylori* P12PAI⁻ gefunden. So lag bei *H. pylori* P12*cagA*⁻-induzierten AGS-Zellen eine Erhöhung der Apoptoserate von 100% in unstimulierten AGS-Zellen auf 774,6% ± 87,6% vor, während die Anzahl apoptotischer Zellen im Fall einer *H. pylori* P12PAI⁻-Inkubation auf 804,8% ± 77,6% zunahm. Allerdings lag die Apoptoserate *H. pylori* P12*vacA*⁻-kokultivierter Zellen mit 562,7% ± 55,8% um 31,4% unter der Apoptoserate der Wildtyp-stimulierten Zellen (p<0,0001).

Das vakuolisierende Cytotoxin VacA ist somit für die *H. pylori*-induzierte Apoptose von Bedeutung.

6.4.2 Keine Unterschiede in den Expressionsmustern von Fas, DR4, DR5, DcR1, DcR2, FasL und TRAIL zwischen *H. pylori* P12- und *H. pylori* P12*vacA*-induzierten AGS-Zellen

Im Folgenden wurde überprüft, ob die Pathogenitätsfaktoren VacA, CagA und *cag*-PAI die *H. pylori*-induzierte Apoptose durch Konzentrationssteigerung proapoptotischer Proteine wie Fas, DR4, DR5, FasL und TRAIL oder durch Verminderung der Expression antiapoptotischer Proteine wie DcR1 und DcR2 vermitteln.

Daher wurden AGS-Zellen, die zuvor in RPMI 1640 (+10% FCS, 1% Pen/Strep, 1% L-Glu) hochgezogen wurden, mit Suspensionen der Bakterien-Stämme *H. pylori* P12, *H. pylori* P12*cagA*⁻, *H. pylori* P12*vacA*⁻ und *H. pylori* P12PAI⁻ (OD₆₀₀=0,25) für 30 Minuten, 1½ Stunden, 3 Stunden und 8 Stunden koinkubiert (Abschnitt 5.3.4). Anschließend wurden aus den stimulierten Zellen analog zu Abschnitt 5.4.1 Gesamtzellextrakte isoliert und in Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern die Expressionsmuster der Proteine Fas, FasL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 und TRAIL untersucht (Abschnitte 5.4.3-5.4.6). Die Signalintensität der analysierten Proteine wurde jeweils durch Vergleich mit der β-Aktin-Expression validiert.

Aus Abbildung 19 wird deutlich, daß keine Unterschiede zwischen den von *H. pylori* P12 in AGS-Zellen hervorgerufenen Expressionsmustern pro- und antiapoptotischer Proteine und den von *H. pylori* P12*vacA*⁻ verursachten Expressionsmustern derselben Proteine bestanden. Dieses wies darauf hin, daß die durch das Cytotoxin VacA induzierte Apoptose weder durch eine Erhöhung der Expression proapoptotischer Rezeptoren oder Liganden wie Fas, DR4, DR5, FasL und TRAIL noch durch Reduktion der Proteinexpression der Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 vermittelt wurde.

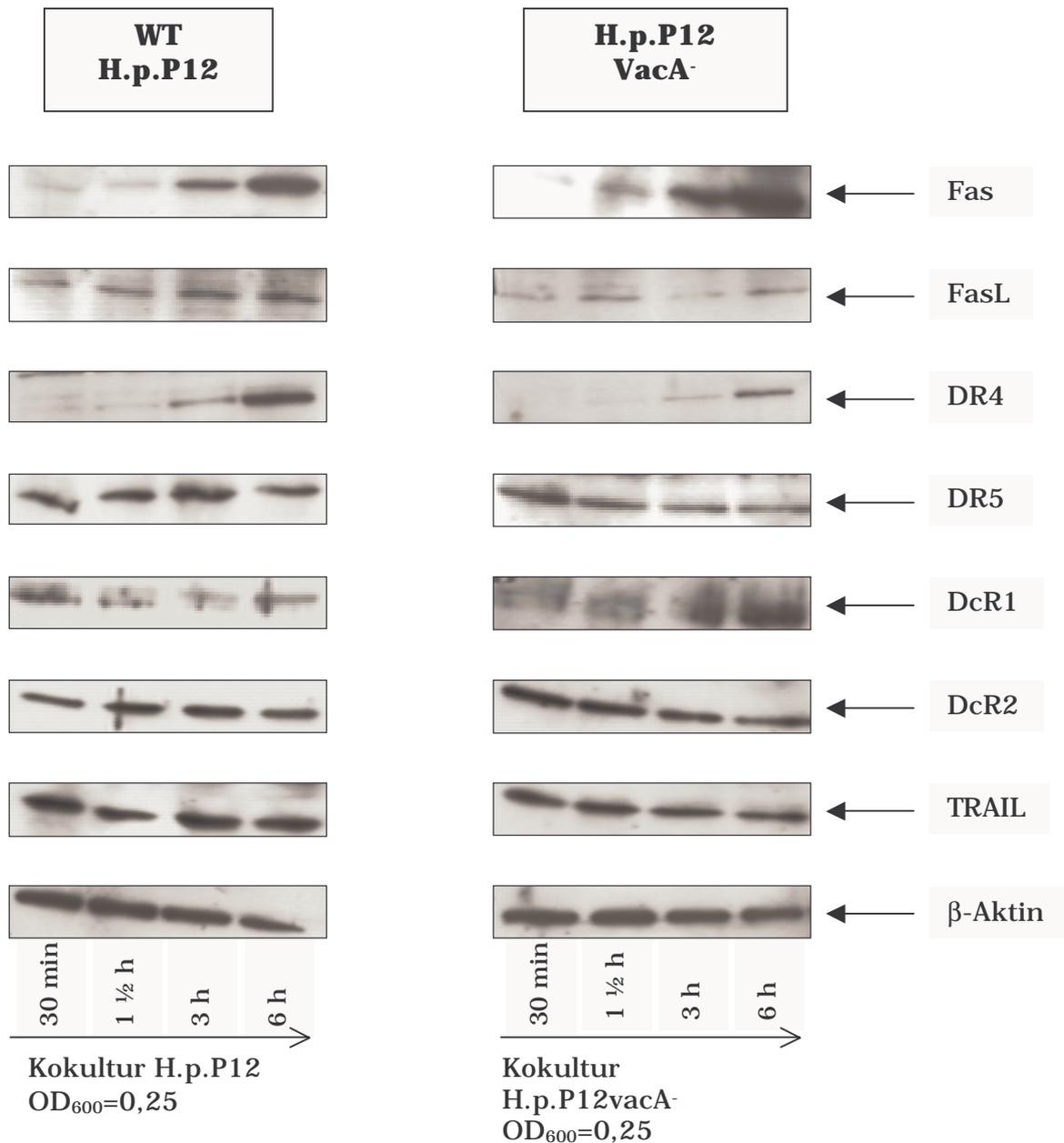


Abb. 19:

Effekt von *H. pylori* P12 und *H. pylori* P12vacA⁻ auf die Proteinexpression von Fas, FasL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 und TRAIL in Abhängigkeit von der Zeit, dargestellt mittels Western Blot-Technik. AGS-Zellen wurden für 1/2 - 8 h mit den Bakterienstämmen *H. pylori* P12 und *H. pylori* P12vacA⁻ (OD₆₀₀=0,25) kokultiviert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte isoliert und die Proteinkonzentration bestimmt. Von jedem Zeitwert wurden 10 µg Protein in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Expression des jeweiligen Proteins wurde nach SDS-Page, Western Blot und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Ebenso konnten keine Abweichungen in der Expression der oben genannten Proteine zwischen AGS-Zellen, die mit dem Wildtyp kultiviert wurden, und *H. pylori* P12cagA⁻ bzw. *H. pylori* P12PAI⁻-induzierten Magenepithelzellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Mitglieder der TNF-Familie werden anscheinend durch andere bakterielle Faktoren bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose moduliert.

Zusätzlich wird jedoch aus Abbildung 19 ersichtlich, daß die Expression der antiapoptotisch wirkenden Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 in AGS-Zellen durch *H. pylori* nicht beeinflußt wurde.

6.5 Untersuchungen zur *H. pylori*-induzierten Apoptose in Primärkultur

Primäre humane Magenepithel (PHME)-Zellen wurden analog zu Abschnitt 5.3.3 aus Biopsien isoliert. Bevor sie in Kokultivierungs-Experimenten mit *H. pylori* eingesetzt werden konnten, mußten sie näher charakterisiert werden. Anschließend wurden die Effekte von *H. pylori* und TRAIL auf PHME untersucht und die erhaltenen Ergebnisse in weiterführenden Experimenten validiert.

6.5.1 Charakterisierung der primären humanen Magenepithelzellen (PHME) mittels Cytokeratin 18

Zur Charakterisierung der isolierten PHME wurden diese immunhistochemisch auf die Expression des epithelialen Markers Cytokeratin 18 untersucht (Abschnitt 5.3.6 und 5.3.7) und wie erwartet positiv getestet (Abb. 20). Die Negativkontrolle wurde nur mit dem Sekundär-Antikörper angefärbt.

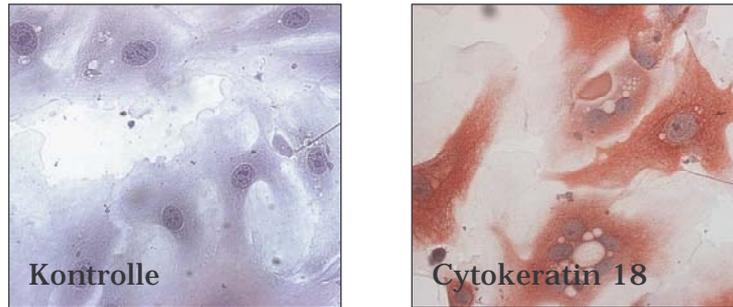


Abb. 20:

Immunhistochemischer Nachweis von Cytokeratin 18 auf primären humanen Mageneithelzellen (PHME). Die Negativkontrolle wurde nur mit dem Zweit-Antikörper gefärbt. Die Kerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

6.5.2 *H. pylori* induzierte in PHME konzentrationsabhängig Apoptose

Mittels TUNEL-Färbungen (Abschnitt 5.3.5.2) wurde der apoptotische Effekt von *H. pylori* auf PHME untersucht.

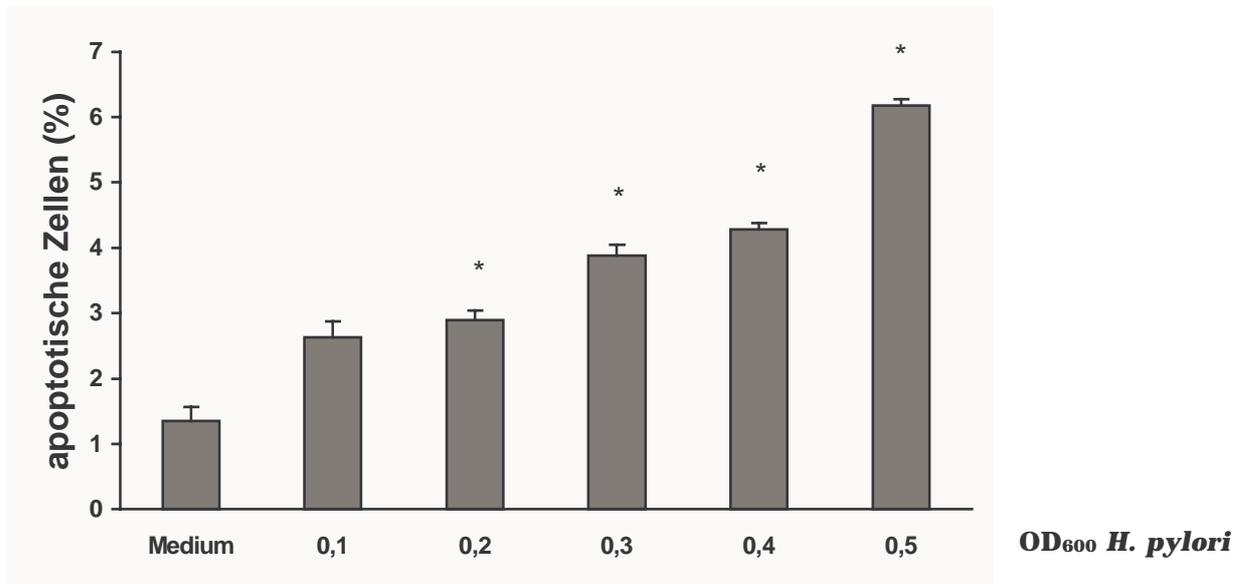


Abb. 21:

Effekt von *H. pylori* P12 auf die Apoptose von PHME in Abhängigkeit von der optischen Dichte (OD₆₀₀) der eingesetzten *H. pylori* P12-Suspension. PHME wurden für 24 h mit verschiedenen konzentrierten *H. pylori* P12-Suspensionen (OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,5) kokkubiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen (dargestellt in %) mittels TUNEL-Färbung ermittelt.

p* vs. PHME/Medium

Isolierte PHME wurden mit *H. pylori* P12-Suspensionen, die auf verschiedene optische Dichten eingestellt wurden, kokkubiert (Abschnitt 5.3.4). Als Kontrolle dienten PHME, die unstimuliert blieben. Nach 24 Stunden wurden

die Zellen TUNEL-gefärbt und der Prozentsatz apoptotischer Zellen im Lichtmikroskop bestimmt.

In Abbildung 21 wird verdeutlicht, daß die Anzahl apoptotischer PHME-Zellen mit steigender *H. pylori* P12-Konzentration signifikant zunahm.

6.5.3 PHME waren gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose resistent

Um den Effekt von TRAIL auf die PHME zu untersuchen, wurden PHME mit verschiedenen TRAIL-Konzentrationen für 24 Stunden koinkubiert (Abschnitt 5.3.4). PHME-Zellen, die in Normalmedium inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Die apoptotischen Zellen wurden durch TUNEL-Färbung sichtbar gemacht und anschließend im Lichtmikroskop ausgezählt (Abschnitt 5.3.5.2).

TRAIL konnte in keiner der gewählten Konzentrationen in PHME Apoptose induzieren (Abb. 22). PHME erwiesen sich somit gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose als resistent.

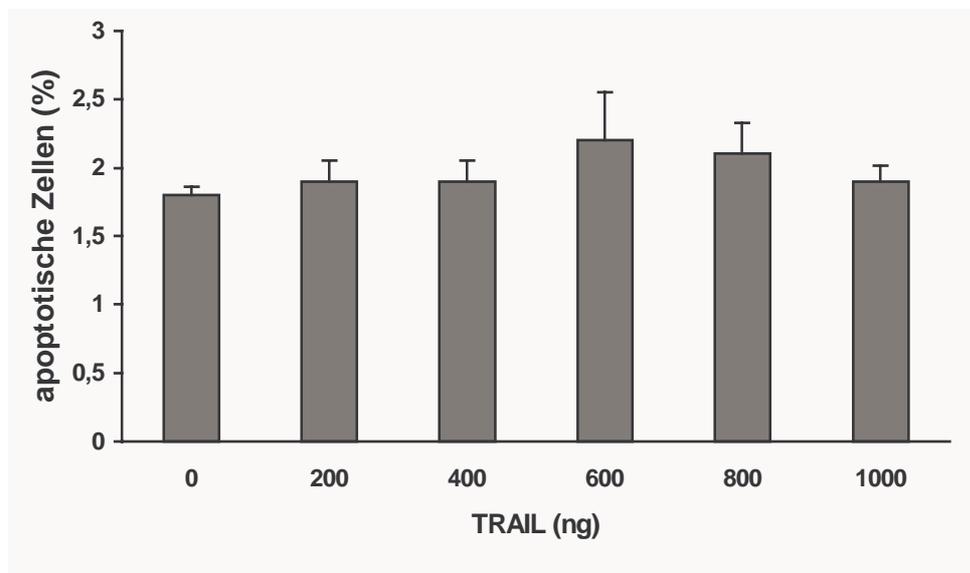


Abb. 22:

Effekt von TRAIL auf die Apoptose von PHME in Abhängigkeit von der TRAIL-Konzentration. PHME wurden für 24 h mit verschiedenen TRAIL-Konzentrationen koinkubiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen (dargestellt in %) mittels TUNEL-Färbung ermittelt.

6.5.4 PHME exprimierten DR4, DR5, DcR1 und DcR2

Um ausschließen zu können, daß die unter Punkt 6.5.3 festgestellte Resistenz der primären Magenepithelzellen gegenüber TRAIL nicht auf einer fehlenden Expression der TRAIL-spezifischen Rezeptoren DR4, DR5, DcR1 und DcR2 beruhte, wurden PHME immunhistochemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper auf die Proteinexpression dieser Rezeptoren überprüft (Abschnitte 5.3.6 und 5.3.7). Als Negativkontrollen dienten PHME, die mit dem Sekundär-Antikörper gefärbt wurden.

Abbildung 23 zeigt, daß die isolierten PHMEs alle vier TRAIL-spezifischen Rezeptoren DR4, DR5, DcR1 und DcR2 exprimierten.

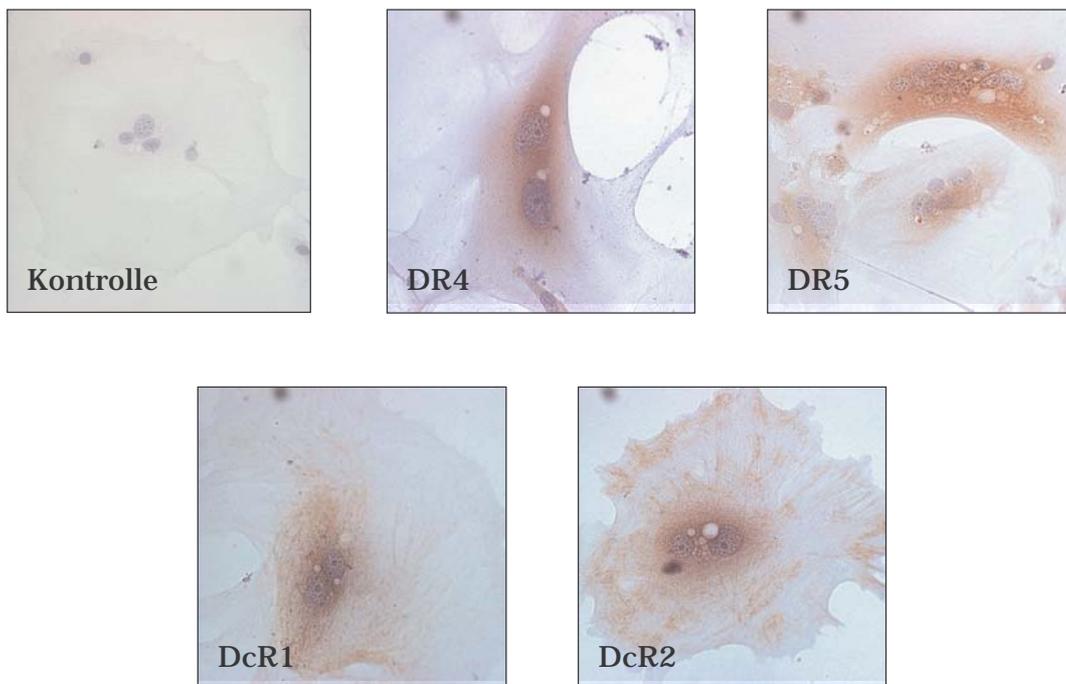


Abb. 23:

Immunhistochemischer Nachweis von DR4, DR5, DcR1 und DcR2 auf primären humanen Magenepithelzellen (PHME). Die Negativkontrolle wurde nur mit dem Zweit-Antikörper gefärbt. Die Kerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt.

6.5.5 *H. pylori* bewirkte eine Sensibilisierung von PHME gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose

Des weiteren wurde geprüft, ob die in Abschnitt 6.5.3 nachgewiesene Resistenz der PHME gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose durch *H. pylori* aufgehoben werden konnte.

Zuvor in Normalmedium kultivierte PHME wurden mit 500 ng TRAIL und/oder einer *H. pylori* P12-Suspension, die eine $OD_{600}=0,25$ hatte, für 24 Stunden koinkubiert (Abschnitt 5.3.4). Anschließend wurden die apoptotischen Zellen im TUNEL-Assay angefärbt und der Prozentsatz apoptotischer Zellen durch Auszählen positiv gefärbter Zellen im Lichtmikroskop ermittelt (Abschnitt 5.3.5.2). Als Kontrolle wurden PHME eingesetzt, die in Normalmedium inkubiert wurden.

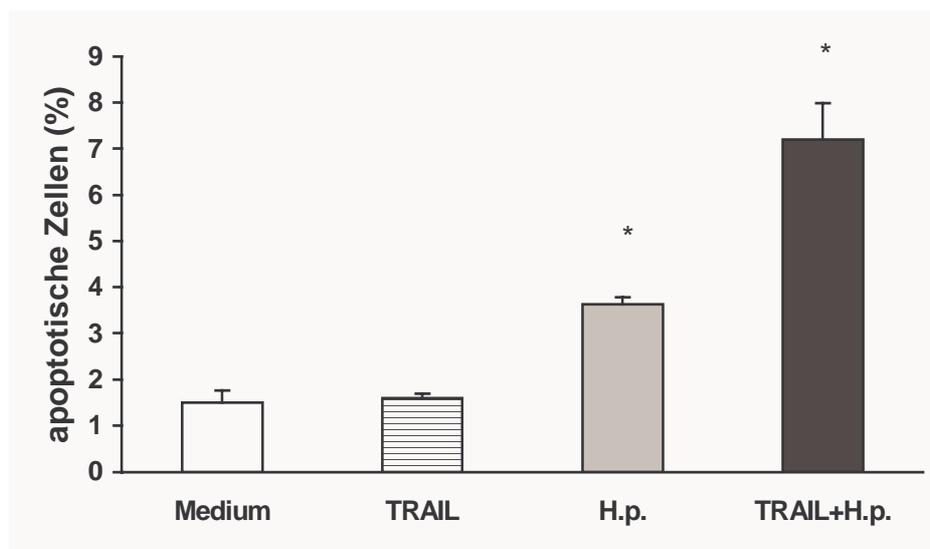


Abb. 24:

Effekt von *H. pylori* P12 und TRAIL auf die Apoptose von PHME. PHME wurden für 24 h mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und/oder 500 ng TRAIL koinkubiert und die Anzahl der apoptotischen Zellen (dargestellt in %) mittels TUNEL-Färbung ermittelt. Säule 1: PHME, kultiviert in Normalmedium; Säule 2: PHME, inkubiert mit TRAIL (500 ng); Säule 3: PHME, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Säule 4: PHME, koinkubiert mit TRAIL (500 ng) und *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$).

p* vs. PHME/Medium

Abbildung 24 faßt das Ergebnis dieses Versuchs zusammen. Die Zahl der apoptotischen PHME nahm durch *H. pylori* signifikant von 1,5% in Normalmedium auf 3,6% ($p=0,003$) zu, während durch TRAIL keine

Steigerung der Apoptose induziert wurde. Hingegen stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen bei Koinkubation der PHME mit *H. pylori* und TRAIL signifikant auf 7,2% ($p=0,002$). In Bezug auf die allein durch *H. pylori* induzierte Apoptoserate entsprach dieses einer Zunahme der apoptotischen Zellen um 100%.

Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, daß PHME erst durch Koinkubation mit *H. pylori* gegenüber der apoptotischen Wirkung von TRAIL sensibilisiert wurden. Es wurde daher angenommen, daß durch *H. pylori* ein Faktor reguliert wurde, der entweder induktiv oder inhibitorisch auf die TRAIL-vermittelte Apoptose in PHME wirkte.

6.5.6 Untersuchungen zur TRAIL-Resistenz von PHME

In nachfolgenden Untersuchungen wurde überprüft, ob *H. pylori* durch Hoch- bzw. Runterregulation pro- bzw. antiapoptotischer Faktoren PHME gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose sensibilisierte. Daher wurde untersucht, ob *H. pylori* in PHME die Expression der Rezeptoren DR4 und DR5 erhöhte bzw. der Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 verminderte. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von Procaspase-8 und die mRNA-Expression des antiapoptotischen Proteins FLIP unter Einfluß von *H. pylori* in PHME evaluiert.

Um diesen Zusammenhang experimentell darzustellen wurden PHME mit *H. pylori* und/oder verschiedenen TRAIL-Konzentrationen (500 ng und 1000 ng) für 24 Stunden koinkubiert, während ein anderer Teil der PHME als Kontrollgruppe unstimuliert blieb (Abschnitt 5.3.4). Anschließend wurden parallel aus den Zellen Gesamtzellextrakte und Gesamt-RNA isoliert (Abschnitte 5.4.1 und 5.5.6). Die Gesamt-RNA wurde analog zu Abschnitt 5.5.7 mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

6.5.6.1 *H. pylori* hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von DR4, DR5, DcR1 und DcR2 in PHME

Im Folgenden wurde untersucht, ob in PHME die Expression der TRAIL-Rezeptoren durch *H. pylori* moduliert wurde.

Die unter Punkt 6.5.6 isolierte cDNA wurde in PCRs mit spezifischen Primern (DR4, DR5, DcR1, DcR2) eingesetzt (Abschnitt 5.5.8). Die PCR-Produkte wurden in einer sich anschließenden Agarose-Gel-Elektrophorese (Abschnitt 5.5.3) durch Ethidiumbromideinbau unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die DR4-, DR5-, DcR1- bzw. DcR2-Signalintensität wurde durch Vergleich mit der β -Aktin-Expression validiert.

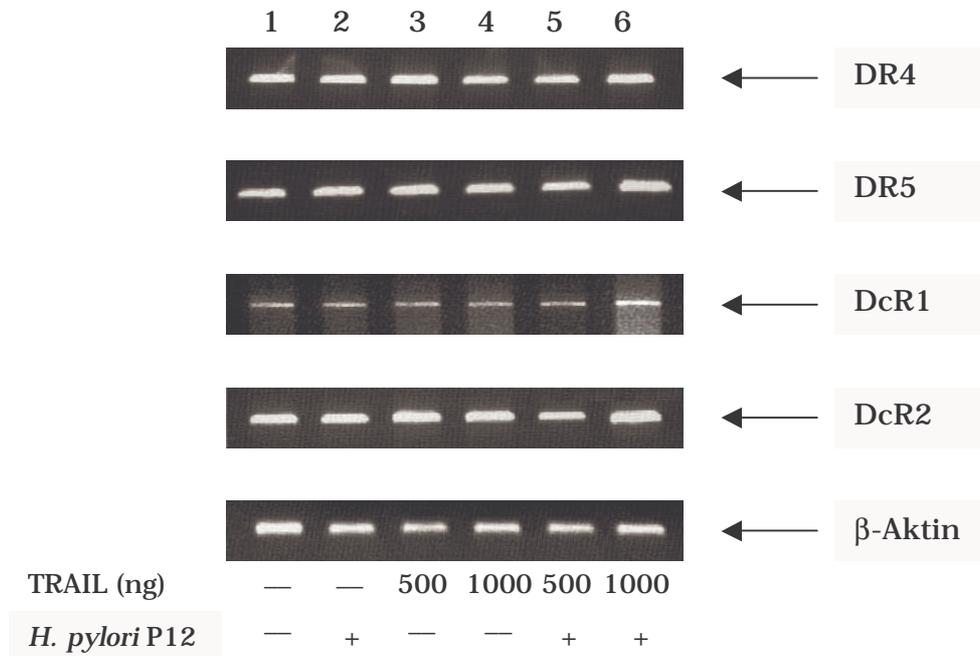


Abb. 25:

Effekt von *H. pylori* und TRAIL auf die mRNA Expression von DR4, DR5, DcR1 und DcR2 in PHME, dargestellt im Agarosegel nach Ethidiumbromid-Behandlung unter UV. PHME wurden für 24 h mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) und/oder TRAIL (500 ng oder 1000 ng) koinkubiert. Die anschließend isolierte Gesamt-RNA wurde durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in PCRs mit spezifischen Primern auf die Expression von β -Aktin, DR4, DR5, DcR1 und DcR2 untersucht. Die PCR-Produkte wurden in Gegenwart von Ethidiumbromid im 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Spur 1: PHME, kultiviert in Normalmedium; Spur 2: PHME, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Spur 3: PHME, inkubiert mit TRAIL (500 ng); Spur 4: PHME, inkubiert mit TRAIL (1000 ng); Spur 5: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (500 ng); Spur 6: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (1000 ng).

Aus Abbildung 25 ist ersichtlich, daß *H. pylori* in PHME die Expression der TRAIL-Rezeptoren auf mRNA-Ebene nicht veränderte. Somit wurde die Sensibilität von PHME gegenüber TRAIL weder durch Erhöhung der DR4- oder DR5-Expression noch durch Abnahme der DcR1- oder DcR2-Expression vermittelt.

6.5.6.2 *TRAIL bewirkte in PHME im Gegensatz zu H. pylori keine Aktivierung der Procaspase-8*

Um zu analysieren, ob die TRAIL-Resistenz der PHME auf einer frühen Suppression der Apoptosekaskade beruhte, wurde die Proteinexpression von Procaspase-8 in TRAIL- und/oder *H. pylori*-stimulierten PHME verglichen.

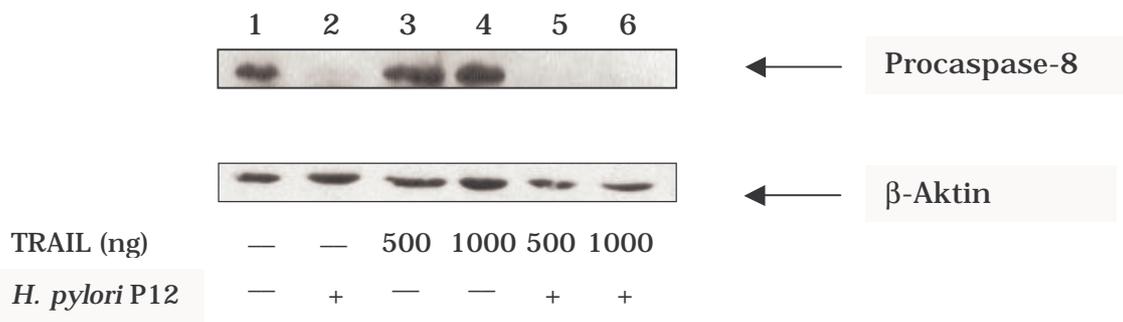


Abb. 26:

Effekt von *H. pylori* und TRAIL auf die Proteinexpression von Procaspase-8 in PHME, dargestellt mittels Western Blot-Technik. PHME wurden für 24 h mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$), und/oder TRAIL (500 ng oder 1000 ng) koinkubiert. Anschließend wurden Gesamtzellextrakte isoliert und die Proben in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinexpression von Procaspase-8 und β -Aktin wurde nach SDS-Page, Western Blot und Immundetektion mittels spezifischer Antikörper durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Spur 1: PHME, kultiviert in Normalmedium; Spur 2: PHME, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Spur 3: PHME, inkubiert mit TRAIL (500 ng); Spur 4: PHME, inkubiert mit TRAIL (1000 ng); Spur 5: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (500 ng); Spur 6: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (1000 ng).

Die unter Abschnitt 6.5.6 aus den *H. pylori* und/oder TRAIL-stimulierten PHME gewonnen Gesamtzellextrakte wurden in Western Blot-Analysen mittels eines spezifischen Antikörpers auf die Proteinexpression von Procaspase-8 untersucht (Abschnitte 5.4.4-5.4.6). Zum Abgleich der Signalintensität wurden die Extrakte zusätzlich mit einem anti- β -Aktin-Antikörper behandelt.

Aus Abbildung 26 wird deutlich, daß die Expression von Procaspase-8 in PHME durch *H. pylori* verringert wurde (Spur 2, 5 und 6), was auf eine Aktivierung der Caspase hinwies. Hingegen nahm die Konzentration an Procaspase-8 in TRAIL-induzierten Zellen nicht ab. Somit wiesen PHME eine Blockade der Apoptosekaskade auf Höhe von Procaspase-8 auf, die durch *H. pylori* aufgehoben wurde, während TRAIL keinen Effekt hatte.

6.5.6.3 *H. pylori* zeigte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von FLIP

Die oben beschriebene Hemmung der Procaspase-8-Aktivierung in TRAIL-induzierten PHME warf die Frage auf, welche Mediatoren diesen Effekt vermitteln. Ein möglicher Kandidat war FLIP, das für eine Inhibierung der Procaspase-8-Spaltung auf Höhe des DISC bekannt ist. Daher wurde analysiert, ob die mRNA-Konzentration von FLIP in PHME durch Koinkubation mit *H. pylori* moduliert wurde.

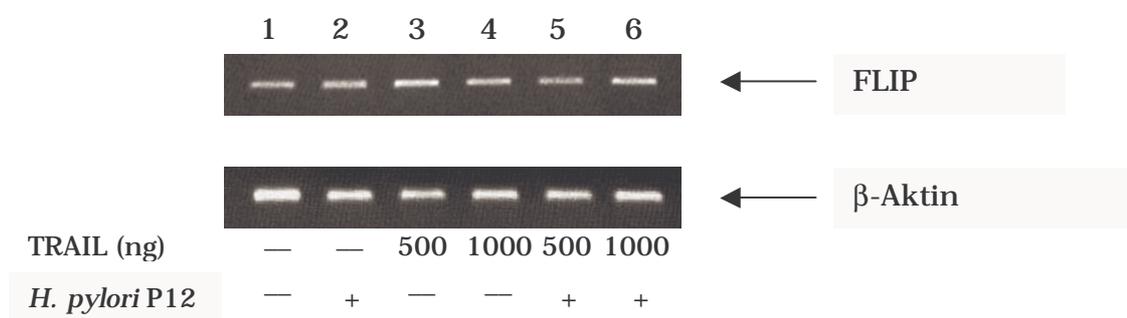


Abb. 27:

Effekt von *H. pylori* und TRAIL auf die mRNA Expression von FLIP in PHME, dargestellt im Agarosegel nach Ethidiumbromid-Behandlung unter UV. PHME wurden für 24 h mit einer *H. pylori* P12-Suspension ($OD_{600}=0,25$) und/oder TRAIL (500 ng oder 1000 ng) koinkubiert. Die anschließend isolierte Gesamt-RNA wurde durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und in PCRs mit spezifischen Primern auf die Expression von β -Aktin und FLIP untersucht. Die PCR-Produkte wurden in Gegenwart von Ethidiumbromid im 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Spur 1: PHME, kultiviert in Normalmedium; Spur 2: PHME, inkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$); Spur 3: PHME, inkubiert mit TRAIL (500 ng); Spur 4: PHME, inkubiert mit TRAIL (1000 ng); Spur 5: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (500 ng); Spur 6: PHME, koinkubiert mit *H. pylori* P12 ($OD_{600}=0,25$) und TRAIL (1000 ng).

Die unter Punkt 6.5.6 aus TRAIL- und/oder *H. pylori*-stimulierten PHME isolierte cDNA wurde in eine PCR mit FLIP-spezifischen Primern eingesetzt (Abschnitt 5.5.8). Zur Validierung der Probenintensität wurde mit denselben

Proben eine β -Aktin-spezifische PCR durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte in Gegenwart von Ethidiumbromid in einem 1%igen Agarosegel (Abschnitt 5.5.3). Die Banden wurden durch UV-Strahlung sichtbar gemacht.

Aus Abbildung 27 wird ersichtlich, daß keine Unterschiede in der FLIP-mRNA-Expression zwischen TRAIL- (Spur 3 und 4), *H. pylori*- (Spur 2) und TRAIL/*H. pylori*-induzierten PHME (Spur 5 und 6) bestanden. Eine Regulation der von *H. pylori* in PHME induzierten Apoptosekaskade auf Höhe der FLIP-mRNA-Expression ist somit unwahrscheinlich.

7 Diskussion

Infektionen mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) verursachen Gastritis und peptische Ulzera (Dooley *et al.*, 1989; NIH, 1994). Zusätzlich konnte in Tiermodellen und in epidemiologischen Studien gezeigt werden, daß der Keim mit der Entstehung von Magenkarzinomen assoziiert ist (Nomura *et al.*, 1991; Parsonnet *et al.*, 1991; Correa, 1996; Honda *et al.*, 1998; Watanabe *et al.*, 1998; Eslick *et al.*, 1999; Uemura *et al.*, 2001). Obwohl *H. pylori* schon im Jahre 1994 von der Weltgesundheitsorganisation WHO als Typ I Karzinogen deklariert wurde (International Agency for Research on Cancer, 1994), sind die detaillierten Mechanismen der Karzinogenese bis heute noch ungeklärt. Es wird jedoch angenommen, daß die von *H. pylori* induzierte Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von Gastriden, peptischen Ulzera und auch Magenkarzinomen spielt (Mannick *et al.*, 1996; Ernst *et al.*, 1997; Steininger *et al.*, 1998; Xia *et al.*, 2001). Apoptose oder der programmierte Zelltod ist im gesunden adulten Magengewebe für die Erhaltung der Gewebshomöostase essentiell (Hall *et al.*, 1994). In der von *H. pylori* infizierten Magenmukosa wurde jedoch sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Erhöhung der Apoptoserate nachgewiesen (Mannick *et al.*, 1996; Moss *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1998; Steininger *et al.*, 1998; Konturek *et al.*, 1999). Es wird vermutet, daß die Steigerung der Apoptose eine kompensatorische Hyperproliferation des Magengewebes induziert, die im Falle einer chronischen *H. pylori*-Infektion zu preneoplastischen Veränderungen führt (Moss *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1997).

7.1 *H. pylori* induzierter Apoptoseweg

Die molekularen Mechanismen der *H. pylori*-assoziierten Apoptose sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Eine wichtige Rolle spielt jedoch

nachweislich das Fas/FasL-System. So zeigen Fas-defiziente Mäuse, die mit dem Maus-pathogenen Stamm *Helicobacter felis* (*H. felis*) infiziert wurden, im Vergleich zu ebenfalls inokulierten Wildtyp-Mäusen eine verringerte Apoptoserate (Houghton *et al.*, 2000). Zwei voneinander unabhängige Studien wiesen gegenüber nicht infizierten Kontrollen eine Erhöhung der Fas- und FasL-Expression bei Magenepithelzellen und mukosalen T-Lymphozyten nach, die aus *H. pylori*-infizierten Personen isoliert wurden (Koyama, 2000; Wang *et al.*, 2000).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines Zellkultursystems geklärt, ob *H. pylori* einen direkten Einfluß auf die Expression von Fas und FasL bei Magenepithelzellen hat. Als *in vitro* System wurde die epitheliale Magenkarzinomzelllinie AGS verwendet, die im Gegensatz zu anderen Magenkarzinomzelllinien bei einer Infektion mit *H. pylori* mit Apoptose und nicht mit nekrotischem Zelltod antwortet und somit der *in vivo* Situation entspricht (Chen *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1999).

Eine Inkubation von AGS-Zellen mit *H. pylori* oder FasL verursachte jeweils eine signifikante Steigerung der Apoptoserate um den Faktor 4,3 bzw. 4,6. Wurde jedoch der Keim mit dem Liganden koinkubiert, erhöhte sich die Apoptoserate der Magenepithelzellen signifikant um das 30-fache. FasL wirkte somit synergetisch auf die von *H. pylori* induzierte Apoptose *in vitro*. Dieser Effekt läßt sich durch eine von *H. pylori* direkt induzierte Steigerung der Fas- und/oder FasL-Expression erklären. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß *H. pylori* und FasL in AGS-Zellen ihre Wirkung innerhalb des Signaltransduktionswegs potenzieren.

Um Ersteres zu überprüfen, wurde die Expression von Fas und FasL in *H. pylori*-koinkubierten AGS-Zellen untersucht. Während die Proteinkonzentration des Rezeptors mit der Inkubationsdauer zunahm, veränderte sich die FasL-Expression der infizierten Zellen *in vitro* nicht. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß *H. pylori* die Expression des Fas-Rezeptors direkt und unabhängig von anderen Zelltypen wie Immunzellen beeinflussen kann. Ähnliche Ergebnisse lassen sich für unterschiedliche Zellsysteme und

H. pylori-Stämme in der Literatur finden (Rudi *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999). Aber auch über andere pathogene Mikroorganismen ist berichtet worden, daß sie in die Apoptose ihres Wirtes direkt eingreifen können. So verursacht *Shigella dysenteriae* Typ I bei Zellen, die aus rektalem Gewebe isoliert wurden, eine Erhöhung der Fas-Expression (Raqib *et al.*, 2002). Hingegen konnten Maeda *et al.* nach Koinkubation mit *H. pylori* bei der Magenkarzinomzelllinie MKN45 keine Veränderung in der Fas-Proteinexpression feststellen (Maeda *et al.*, 2002). Allerdings wurden die in dieser Studie verwendeten MKN45-Zellen 24 Stunden vor ihrer Infektion durch *H. pylori* mit IFN- γ behandelt, welches bei Magenepithelzellen stimulatv auf die Fas-Expression wirkt (Rudi *et al.*, 1998; Houghton *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Möglicherweise war auf diese Weise die Konzentration an Fas schon vor Zugabe des Keims so stark erhöht, daß der von *H. pylori* verursachte Effekt nicht mehr nachweisbar war. Dafür würde sprechen, daß in der Studie von Maeda auch in uninfizierten Zellen die Fas-Proteinexpression sehr hoch war, während in der vorliegenden Arbeit bei den in Normalmedium kultivierten Kontrollzellen der Fas-Rezeptor in Western Blot Analysen nicht nachweisbar war. Zum anderen könnten aber auch zellspezifische Unterschiede zu den kontroversen Ergebnissen geführt haben.

Im Gegensatz zu Fas wurde die Proteinexpression von FasL jedoch in Magenepithelzellen *in vitro* durch *H. pylori* nicht verändert, so daß für die *in vivo* beschriebene Erhöhung des Liganden andere Zelltypen verantwortlich sein müssen wie z.B. im Zuge der Immunantwort des Wirts aktivierte T-Lymphozyten und die von ihnen sezernierten Cytokine. Es ist weiterhin anzunehmen, daß auch die Proteinexpression von Fas *in vivo* zusätzlich durch weitere Faktoren verstärkt wird. So sind in der Literatur verschiedene Hinweise dafür zu finden, daß die Expression von Fas und FasL auf mRNA-Ebene in Magenzellen und Dünndarmzellen durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-2 (IL-2), Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF- α) und Gamma-Interferon (IFN- γ) reguliert werden (Houghton *et al.*, 1999).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die bei Kokultivierung von *H. pylori* und FasL aufgetretene Synergie der Apoptose unter anderem auf eine von dem Pathogen direkt verursachte Steigerung der Fas-Proteinexpression zurückzuführen ist. Daher ist denkbar, daß die während einer Infektion mit *H. pylori* auftretende Schädigung des Magenepithels nicht allein durch FasL-exprimierende Lymphozyten (Wang *et al.*, 2000), sondern auch direkt durch homotypische Interaktionen von Fas- und FasL-exprimierenden Magenepithelzellen hervorgerufen wird.

Wie ausgeführt könnte die synergetische Wirkung von FasL auf die *H. pylori*-induzierte Apoptose auch ein Hinweis auf die Induktion ähnlicher Signaltransduktionswege sein. Daher wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die von *H. pylori* intrazellulär induzierte Signaltransduktionskaskade in Bezug auf die für die Fas-assoziierte Apoptose bekannten Mechanismen näher untersucht.

Bei T-Lymphozyten wurden für das Fas/FasL-System zwei verschiedene Signaltransduktionsarten beschrieben: die sogenannten Typ-I- und Typ-II-Zellen (Scaffidi *et al.*, 1998). Beide Zelltypen unterscheiden sich hauptsächlich in der Konzentration der am DISC aktivierten Caspase-8 (Scaffidi *et al.*, 1998; Kramer, 2000). Auf eine Stimulation/Trimerisierung des Fas-Rezeptors antworten Typ-I-Zellen mit einer starken Aktivierung von Procaspase-8. Die Konzentration der aus dem DISC (Death-Inducing Signaling Complex) frei werdenden Caspase-8 reicht aus, um direkt Effektorcaspase-3 durch Spaltung zu induzieren, die anschließend zusammen mit anderen Effektorcaspasen den für die Apoptose charakteristischen Abbau der Zelle verursacht. Im Gegensatz dazu bilden Typ-II-Zellen nach Bindung des Liganden an Fas nur wenig DISC (Scaffidi *et al.*, 1998). Die geringe Konzentration der im DISC gespaltenen Procaspase-8 ist für eine direkte Stimulation von Procaspase-3 nicht ausreichend. Daher ist in diesem Fall die Weiterleitung des apoptotischen Signals von einer Aktivierung der Mitochondrien abhängig. Als Verbindungsglied zwischen der Rezeptor-vermittelten Apoptose und des mitochondrialen Weges fungiert das Bcl-2-Familienmitglied Bid (Green *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). Caspase-8

kann auch in geringen Konzentrationen eine Proteolyse von Bid bewirken. Die entstandene verkürzte Form von Bid (truncated Bid oder t-Bid) inseriert in die äußere Mitochondrienmembran und induziert dort eine Oligomerisierung des proapoptotischen Proteins Bid und über einen bis heute noch ungeklärten Mechanismus die Freisetzung von Cytochrom *c* (Green *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998). Neben Cytochrom *c* wird auch Smac/DIABLO (Second Mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP Binding Protein with low pI) aus den Mitochondrien frei (Du *et al.*, 2000; Verhagen *et al.*, 2000). Cytosolisches Cytochrom *c* bindet an Apaf-1 und bildet in der Gegenwart von dATP oder ATP einen oligomeren Apaf-1/Cytochrom *c*-Komplex (Zou *et al.*, 1999). Dieser auch als Apoptosom bezeichnete Komplex rekrutiert und induziert die Autoaktivierung von Procaspase-9 (Zou *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000). Caspase-9 aktiviert anschließend wiederum die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 (Li *et al.*, 1997; Srinivasula *et al.*, 1998). Caspase-3 induziert zusätzlich bei Typ-II-Zellen eine Spaltung außerhalb des DISC liegender Procaspase-8 in einem sogenannten „feedback-loop“ (Krammer, 2000), wodurch die Caspase-Kaskade eine weitere Verstärkung erfährt.

Es ist jedoch hervorzuheben, daß die für Typ-II-Zellen beschriebene Aktivierung des mitochondrialen Weges im gleichen Ausmaß auch in Typ-I-Zellen stattfindet. Diese sind aber im Gegensatz zu Typ-II-Zellen nicht von der Verstärkerfunktion der Mitochondrien bei der Weiterleitung des apoptotischen Signals abhängig, so daß eine Hemmung des mitochondrialen Weges eine Aktivierung von Caspase-3 und Caspase-8 nur in Typ-II-Zellen inhibiert (Scaffidi *et al.*, 1998).

Im Verlauf dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen mitochondrialer und cytosolischer Extrakte, die aus mit *H. pylori* koinkubierten AGS-Zellen isoliert wurden, ergaben, daß *H. pylori* in Magenepithelzellen *in vitro* eine Freisetzung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien in Abhängigkeit von der Zeit induziert. Auch Maeda *et al.* demonstrierten anhand von Western Blot-Analysen, daß bei Koinkubation der Magenepithelzelllinie MKN45 mit

H. pylori die Konzentration an cytosolischem Cytochrom *c* zunimmt (Maeda *et al.*, 2002).

Mehrere Studien befassen sich mit dem bakteriellen Faktor, der für den Cytochrom *c*-Ausstrom verantwortlich ist. Galmiche *et al.* konnten in Koinkubationsexperimenten mit isolierten Mitochondrien nachweisen, daß das *H. pylori*-Cytotoxin VacA sowie sein N-terminales 34 kDa Fragment in die Mitochondrien translozieren. Eine transiente Transfektion von HeLa-Zellen mit GFP (Green Fluorescent Protein)-gekoppelten DNAs, die entweder Gesamtlängen-VacA oder nur das 34 kDa-Fragment des Cytotoxins kodieren, induziert in den Zielzellen einen Ausstrom von mitochondrialen Cytochrom *c* (Galmiche *et al.*, 2000). In derselben Arbeit wurde aber auch gezeigt, daß eine externe Inkubation mit aufgereinigtem und mit Säure aktiviertem VacA bei HeLa-Zellen die Konzentration an cytosolischem Cytochrom *c* steigert. Hingegen wiesen Kawahara *et al.* anhand von primär isolierten Magenmukosazellen des Meerschweinchens nach, daß *H. pylori*-Lipopolysaccharide für den Cytochrom *c*-Ausstrom verantwortlich sind (Kawahara *et al.*, 2001). Weiterhin verursacht eine Inkubation von murinen Mukuszellen des Magens mit Ammonium in Konzentrationen, die denen im Magen von *H. pylori*-infizierten Personen entsprechen, ebenfalls eine Freisetzung von Cytochrom *c*, so daß eventuell die Aktivität der *H. pylori*-Urease für diesen Effekt zuständig ist (Suzuki *et al.*, 2002).

Aufgrund dieser Daten ist anzunehmen, daß ein Zusammenspiel verschiedener bakterieller Pathogenitätsfaktoren für den von *H. pylori* induzierten Cytochrom *c*-Ausstrom in Magenepithelzellen verantwortlich ist.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der aus *H. pylori*-stimulierten AGS-Zellen gewonnenen cytosolischen und mitochondrialen Extrakte die Verteilung von Smac untersucht. Ebenso wie Cytochrom *c* wurde Smac nach Stimulation durch *H. pylori* in Abhängigkeit von der Zeit aus den Mitochondrien frei. Cytosolisches Smac reagiert mit den sogenannten Inhibitors of Apoptosis (IAPs), die eine Aktivierung von Caspasen wie Procaspase-9 und Procaspase-3 durch Bindung hemmen

(Deveraux *et al.*, 1998). IAPs können sich aber auch an aktive Caspasen anlagern und diese inhibieren (Deveraux *et al.*, 1998). Bindung und Hemmung der Caspasen wird über die sogenannten BIR (Baculovirus IAP repeats)-Domänen der IAPs vermittelt (Yang *et al.*, 2000). Smac antagonisiert die inhibitorische Funktion der IAPs, indem es mit deren BIR-Domänen interagiert (Green, 2000). Srinivasula *et al.* berichten, daß Smac/DIABLO eine wichtige Rolle bei der Neutralisierung der IAP-Inhibition der Effektor-Caspasen bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose in Typ-II-Zellen spielt (Srinivasula *et al.*, 2000). In Bezug auf die *H. pylori*-assoziierte Apoptose findet sich in der Literatur ein Hinweis, daß in *H. pylori*-infizierten Magenepithelzellen ein Anstieg der cIAP-1- bzw. der cIAP-2-Expression stattfindet (Maeda *et al.*, 2002). Du *et al.* postulieren, daß nur in den Mitochondrien prozessiertes Smac, nicht aber das Vorläufer-Protein, Caspase-aktivierende Funktion aufweist (Du *et al.*, 2000).

Auf Grund dieser Beobachtung und dem in dieser Arbeit erbrachten Nachweis, daß eine Koinkubation von *H. pylori* einen Smac-Ausstrom aus den Mitochondrien induziert, ist anzunehmen, daß der von *H. pylori*-induzierte Zelltod in Magenepithelzellen stark von der Aktivierung des mitochondrialen Weges abhängig ist und es sich somit um eine Typ-II-Weiterleitung des apoptotischen Signals handelt.

Für eine detaillierte Untersuchung des von *H. pylori* in Magenepithelzellen *in vitro* induzierten Signalwegs wurde die Apoptose durch retrovirale Transduktion antiapoptotischer Proteine an verschiedenen Stellen gehemmt. Der Vorteil des retroviralen Gentransfers liegt in der stabilen Integration der klonierten Fremdgene, die bei Teilungen an Tochterzellen weitergegeben werden. Dieses steht im Gegensatz zu adenoviralen Systemen, mit denen nur eine transiente Transfektion der Zielzellen erreicht wird. Nachteilig ist jedoch die den Retroviren eigene unspezifische Integration an beliebigen Stellen des Wirtsgenoms (Morgenstern *et al.*, 1990; Pear *et al.*, 1993).

Unter anderem wurde eine AGS-Zelllinie generiert, die das antiapoptotische Protein Bcl-2 überexprimiert. Eine Überexpression von Bcl-2 hemmt die

Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom *c* und Smac (Vaux *et al.*, 1992; Kluck *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Tsujimoto *et al.*, 2002). Mit Hilfe einer Bcl-2-überexprimierenden Zelllinie sollte geklärt werden, ob der von *H. pylori* ausgelöste apoptotische Reiz in seiner intrazellulären Weiterleitung allein von der mitochondrialen Cytochrom *c*-Freisetzung abhängig ist und ob das Pathogen somit eine Typ-I- oder eine Typ-II-Signalkaskade (Scaffidi *et al.*, 1998) in Magenepithelzellen *in vitro* induziert.

Verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien konnten zeigen, daß Caspase-3, Caspase-6, Caspase-8 und Caspase-9 im Zuge der *H. pylori*-induzierten Apoptose in humanem und tierischem Magengewebe aktiviert werden (Kim *et al.*, 2000; Shibayama *et al.*, 2001; Ashktorab *et al.*, 2002; Potthoff *et al.*, 2002). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit als zweite Zelllinie eine AGS-Zelllinie generiert, die CrmA (Cytokine Response Modifier A) überexprimiert. Bei CrmA handelt es sich um ein 38 kDa großes Serpin des Kuhpockenvirus, das während der Virusinfektion die Apoptose seiner Wirtszellen durch Bindung an verschiedene Caspasen hemmt (Turner *et al.*, 1999). CrmA hemmt am effektivsten Caspase-1 und Caspase-8, und inhibiert mit abnehmender Effektivität weitere Caspasen wie Caspase-10, -6, -3 und -7 (Zhou *et al.*, 2000). Im allgemeinen schützt CrmA Zellen hauptsächlich vor apoptotischen Signalen, die von Todesrezeptoren vermittelt werden oder vor anderen Mechanismen, bei denen Caspase-8 oder -10 als apikale Caspasen fungieren (Bertin *et al.*, 1997). Im Gegensatz dazu hat CrmA wenig oder gar keinen Effekt auf apoptotische Stimuli, die direkt die Mitochondrien aktivieren. Daher sind apoptotische Reize, die Caspase-9 als initiale Protease induzieren, immun gegenüber CrmA. Anhand einer CrmA-überexprimierenden Zelllinie sollte im Hinblick auf diese Informationen die Bedeutung der frühen Caspasekaskade sowie indirekt die der Todesrezeptoren für die *H. pylori*-induzierte Apoptose analysiert werden.

Drittens wurden AGS-Zellen mit einer dominant negativen Mutante des Adapterproteins FADD (Fas-associated Death Domain Protein) retroviral transduziert. FADD bildet nach Trimerisierung des Fas-Rezeptors zusammen mit diesem und Procaspase-8 den DISC, in dem es durch die

vorherrschende Nähe zu einer Autokatalyse und somit Aktivierung der Procaspase-8 kommt (Chinnaiyan *et al.*, 1995; Kischkel *et al.*, 1995; Vincenz *et al.*, 1997; Kramer; 2000). Die in dieser Arbeit verwendete dominant negative FADD-Mutante besitzt eine Deletion in ihrer N-terminalen DED (Death Effector-Domain) (Δ 1-79), so daß eine Rekrutierung von Procaspase-8 an den DISC nicht mehr möglich ist. Mit Hilfe dieser Zelllinie sollte geklärt werden, ob FADD und somit der DISC und die Rezeptor-vermittelte Apoptose eine entscheidende Rolle bei dem *H. pylori*-assoziierten Zelltod spielt.

Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern zeigten, daß die Transduktion in allen drei Fällen erfolgreich war und die gewünschten Proteine von den AGS-Zellen stabil überexprimiert wurden.

Da aus der Literatur hervorgeht, daß Bcl-2, CrmA bzw. dnFADD die FasL-vermittelte Apoptose in verschiedenen Zelllinien inhibieren (Jäättelä *et al.*, 1995; Tewari *et al.*, 1995; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Enari *et al.*, 1996; Mandal *et al.*, 1996; Marsters *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1996; Luo *et al.*, 1998; Werner *et al.*, 2002; Schuchmann *et al.*, 2003), wurde in Koinkubations-experimenten mit FasL die Funktionalität der Überexpression von Bcl-2, CrmA und der dominant negativen FADD Mutante in den transduzierten AGS-Zellen überprüft.

Im Vergleich mit der Kontrollzelllinie AGSpLXIN wurde die FasL-assoziierte Apoptose in AGS-Zellen durch Überexpression von Bcl-2 und CrmA um 51,7% bzw. um 65,2% signifikant gemindert. AGSdnFADD-Zellen hemmten die FasL-assoziierte Apoptose im Vergleich mit der Kontrollzelllinie AGSpLXIN signifikant um 52,9%. In allen drei Fällen hatte die retrovirale Transduktion zu keiner kompletten Inhibition der FasL-vermittelten Apoptose geführt. Dieses ist erklärbar durch Entstehung von Revertanten, bei denen die Promotoraktivität des Provirus eingeschränkt oder komplett inhibiert ist (Isaka *et al.*, 1992), so daß Mischkulturen aus AGS-Zellen, die das transgene Protein überexprimierten und AGS-Zellen, die dieses nicht mehr produzierten, vorlagen. Auch ist es möglich, daß die Konzentration der

transgenen Proteine für eine vollständige Inhibition der FasL-induzierten Apoptose nicht ausreichte. Dennoch konnte davon ausgegangen werden, daß die Stärke der Überexpression ausreichen würde, um die Bedeutung der Mitochondrien, der Caspasen und des Adapterproteins FADD für die *H. pylori*-induzierte Apoptose ermitteln zu können.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Koinkubationsexperimente der transduzierten AGS-Zellen mit *H. pylori* zeigten, daß im Vergleich mit der von *H. pylori* in der Kontrollzelle AGSpLXIN induzierten Apoptoserate AGSCrmA-Zellen eine signifikante Verminderung dieser um 46,9% aufwies. Aus diesem Ergebnis läßt sich schlußfolgern, daß Caspase-8 als initial aktivierte Caspase eine essentielle Rolle bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose spielt. Zusätzlich kann ausgeschlossen werden, daß *H. pylori* mittels einer direkten Aktivierung der Mitochondrien in Magenepithelzellen Apoptose auslöst.

Ähnliche Daten finden sich auch in der Literatur. So konnte in zwei voneinander unabhängigen Studien gezeigt werden, daß eine Hemmung der Caspasen-3, -8 und -9 mittels spezifischer Caspase-Inhibitoren die von *H. pylori* in der Magenepithelzelllinie AGS induzierte Apoptose vermindert (Shibayama *et al.*, 2001; Potthoff *et al.*, 2002). Jedoch wurde in der einen Studie berichtet, daß die Verwendung eines Caspase-8-Inhibitors die *H. pylori*-induzierte Apoptose vollständig hemmt (Shibayama *et al.*, 2001), während in der anderen Arbeit die Hemmung der Caspasen-3 und -9 die *H. pylori*-assoziierte Apoptose in Magenepithelzellen fast komplett inhibierte, eine Koinkubation mit einem Caspase-8 spezifischen Inhibitor die *H. pylori*-vermittelte Apoptose jedoch nur um 50% verringerte (Potthoff *et al.*, 2002). Zusätzlich berichteten Shibayama *et al.*, daß eine Inhibition der Caspase-8 die folgende Aktivierung von Caspase-9 und -3 und *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen supprimiert (Shibayama *et al.*, 2001). Hingegen zeigten Maeda *et al.*, daß, obwohl in *H. pylori*-koinkubierten MKN45-Zellen Caspase-8 aktiviert wird, die Hemmung dieser keinen inhibitorischen Effekt auf die *H. pylori*-induzierte Apoptose hat (Maeda *et al.*, 2002). Es ist zu überprüfen, ob diese teilweise sehr unterschiedlichen Daten aus zellspezifischen Unterschieden,

der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an Caspase-Inhibitoren oder unterschiedlichen Bakterienstämmen und -dichten resultieren. Zusätzlich wäre es möglich, daß diese differierenden Ergebnisse auf verschiedene Untersuchungsmethoden bezüglich der Apoptose zurückzuführen sind.

Nachdem wie schon erwähnt in dieser wie auch in verschiedenen anderen Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß *H. pylori* in Mageneithelzellen eine Zunahme an cytosolischem Cytochrom *c* induziert, jedoch nie geklärt wurde, ob dieser Effekt für eine Signalweiterleitung essentiell ist, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Bedeutung des mitochondrialen Weges für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose näher untersucht. Die Überexpression von Bcl-2 verringerte die *H. pylori*-assoziierte Apoptose in AGS-Zellen um 43,6%. Somit ist die *H. pylori*-induzierte Apoptose von der Verstärkerfunktion der Mitochondrien stark abhängig, wie auch der Nachweis eines Smac-Ausstroms aus den Mitochondrien *H. pylori*-induzierter Mageneithelzellen schon vermuten ließ. *H. pylori* aktiviert in Mageneithelzellen demnach eine Typ-II-Signalkaskade, die durch Aktivierung geringer Konzentrationen an Caspase-8 auf Höhe des DISC charakterisiert ist.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit evaluiert, ob eine Induktion von Caspase-8 auf Höhe des DISC für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist. Die Überexpression einer dominant negativen FADD-Mutante, bei der die DED deletiert war, führte zu einer signifikanten Reduktion der *H. pylori*-induzierten Apoptose in AGS-Zellen von 25,4%. Somit ist anzunehmen, daß die von *H. pylori* ausgelöste Apoptosekaskade auf Höhe des DISC induziert wird und somit die Rezeptoren der Tumornekrose-Familie stark involviert sind. So finden sich in der Literatur Angaben, daß eine Hemmung des Fas-Rezeptors durch antagonistische Antikörper die von *H. pylori* induzierte Apoptose in epithelialen Zellen des Magens oder des Darms um bis zu 70% mindert (Rudi *et al.*, 1998; Le'Negrate *et al.*, 2001). Hingegen zeigten Hasumi *et al.* anhand von primär aus *H. pylori*-infizierten Ulkus-Patienten isolierten humanen Magen-

epithelzellen, daß neben Fas- und TNF-R1-exprimierenden Zellen auch Fas- und TNFR-1-negative Zellen apoptotisch sind (Hasumi *et al.*, 2002). Dieses könnte ein Hinweis dafür sein, daß weitere Rezeptoren der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Familie in die *H. pylori*-induzierte Apoptose involviert sind. Interessanterweise war der inhibitorische Effekt des dnFADD auf die *H. pylori*-vermittelte Apoptose geringer als der von Bcl-2 oder CrmA, so daß vermutet werden kann, daß auch weitere Adapterproteine beteiligt sind.

In den letzten Jahren wurden mit dem proapoptotischen Liganden TRAIL und seinen Rezeptoren DR4, DR5, DcR1, DcR2 und OPG sechs weitere Mitglieder der TNF-Familie entdeckt. Die TRAIL-induzierte, intrazelluläre Apoptosekaskade ähnelt der Fas/FasL-initiierten Apoptose insofern, daß der intrazelluläre Anteil der aktivierten Rezeptoren zusammen mit FADD und Procaspase-8 einen DISC bildet, aus dem aktivierte Caspase-8 frei wird, die wiederum Caspase-3 spaltet (Griffith *et al.*, 1998b; Bodmer *et al.*, 2000; Kuang *et al.*, 2000; Kischkel *et al.*, 2000; Sprick *et al.*, 2000). Zusätzlich ist aber auch eine FADD-unabhängige Signaltransduktion des von TRAIL ausgelösten apoptotischen Signals beschrieben worden sowie eine Beteiligung weiterer Adapterproteine wie TRADD und RIP (Marsters *et al.*, 1996; Chaudhary *et al.*, 1997; Pan *et al.*, 1997a; Schneider *et al.*, 1997b; Yeh *et al.*, 1998). Wie bei der FasL-assoziierten Apoptose wird aber auch bei der TRAIL-induzierten Apoptose zwischen einer Typ-I- und Typ-II-Signaltransduktion unterschieden (Suliman *et al.*, 2001; Keogh *et al.*, 2000).

Erst kürzlich konnte in primär isolierten humanen Magenkarzinomzellen die Expression von TRAIL, DR4, DR5 und DcR2 nachgewiesen werden (Koyama *et al.*, 2001). Zudem finden sich in der Literatur Hinweise, daß Infektionen mit pathogenen Mikroorganismen eine Erhöhung der TRAIL- bzw. der DR4- und DR5- Expression in den infizierten Wirtszellen induzieren (Sedger *et al.*, 1999; Alexander *et al.*, 2001; Clarke *et al.*, 2000; Mundt *et al.*, 2003).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Koinkubationsexperimenten mit TRAIL und *H. pylori* überprüft, ob diese Rezeptoren auch

bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose eine Rolle spielen. Zur Kontrolle wurden AGS-Zellen mit FasL kultiviert und die Apoptose im Histon-ELISA bestimmt. Wurden AGS-Zellen mit TRAIL, FasL oder *H. pylori* inkubiert, erhöhte sich im Vergleich mit den in Normalmedium kultivierten Kontrollen die Apoptoserate um das 3- bis 4-fache. Interessanterweise erhöhte sich die Apoptoserate bei gleichzeitiger Stimulation der AGS-Zellen durch FasL und TRAIL nur additiv, was eventuell auf die Induktion partiell unterschiedlicher intrazellulärer Signalkaskaden durch die beiden Liganden hinweisen könnte. So wurde von Werner *et al.*, eine unterschiedliche Regulation der Apoptosekaskade durch FasL und TRAIL nach erfolgter Spaltung von Bid beschrieben (Werner *et al.*, 2002).

Hingegen wurde der apoptotische Zelltod bei einer Koinkubation von TRAIL und *H. pylori*, ebenso wie bei einer Koinkubation von FasL und *H. pylori* um den Faktor 30 gesteigert. Demnach hatte TRAIL wie FasL einen synergetischen Effekt auf die *H. pylori*-vermittelte Apoptose. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt wie bei FasL aus einer durch *H. pylori* verstärkten Expression der proapoptotischen TRAIL-Rezeptoren DR4 und DR5 resultierte, wurden Extrakte aus AGS-Zellen, die mit *H. pylori* kokultiviert wurden, auf die Expression dieser beiden Rezeptoren und des Liganden untersucht.

H. pylori erhöhte zeitabhängig die Expression von DR4 in Magenepithelzellen, während DR5 konstitutiv in hohen Konzentrationen exprimiert wurde. Auch die TRAIL-Konzentration wurde durch den Keim nur wenig verändert. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die beiden TRAIL-Rezeptoren sowie der Ligand selbst an der Vermittlung der von *H. pylori* in Magenepithelzellen *in vitro* induzierten Apoptose beteiligt sind.

Die Bedeutung der proapoptotischen Rezeptoren DR4 und DR5 für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit mittels retroviraler Transduktion von antisense-Konstrukten ermittelt, welche die Expression von DR4 bzw. DR5 auf mRNA-Ebene supprimieren (Flanagan *et al.*, 1997).

Eine Überprüfung der so generierten Zelllinien AGSDR4as und AGSDR5as im Western Blot ergab, daß sie eine verringerte DR4- bzw. DR5-Expression im Vergleich mit den Kontrollzellen AGSpLXRN aufwiesen und somit die Transduktionen erfolgreich waren.

Die Kokultivierung von AGSDR4as und AGSDR5as mit TRAIL zeigte, daß die TRAIL-vermittelte Apoptose durch eine reduzierte DR4- bzw. DR5-Expression um 44,9% bzw. um 48,9% funktionell gehemmt war, im Vergleich mit der in TRAIL-kultivierten AGSpLXRN-Zellen gemessenen Apoptoserate. Eine komplette Inhibition der TRAIL-induzierten Apoptose war in den DR4as- bzw. DR5as-transduzierten AGS-Zellen jedoch nicht zu erwarten, da in beiden Zelllinien die Proteinkonzentration nur eines proapoptotischen Rezeptors vermindert wurde und so jeweils ein Rezeptor in normalen Konzentrationen vorlag. Zudem binden DR4 und DR5 TRAIL mit derselben Affinität (Degli-Eposti, 1997a und b).

Dieser Versuch machte deutlich, daß die TRAIL-induzierte Apoptose durch Expression der retroviralen antisense-Konstrukte stark genug vermindert war, um in Kokultivierungsexperimenten die Bedeutung der supprimierten Rezeptoren für den *H. pylori*-assoziierten Zelltod ermitteln zu können.

Die *H. pylori*-vermittelte Apoptose wurde durch Reduktion der DR5-Expression um 42,5% verringert, während die retrovirale Transduktion eines DR4as-Konstruktes keinen Effekt auf den von *H. pylori* in Magenepithelzellen ausgelösten apoptotischen Zelltod hatte.

Somit konnte erstmals gezeigt werden, daß der proapoptotische TRAIL-Rezeptor DR5 für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist. Dennoch ist nicht auszuschließen, daß bei einem verlängerten Koinkubationszeitraum auch DR4 bei der *H. pylori*-vermittelten Apoptose eine Rolle spielt. Eventuell ist die Konzentration von DR4 nach 24 Stunden durch den Keim noch nicht genügend erhöht, um eine apoptotische Signalkaskade auslösen zu können, während DR5 konstitutiv in hohen Konzentrationen in Magenepithelzellen vorliegt. Fraglich bleibt jedoch wie in diesem Falle die Regulation aussieht, da sowohl TRAIL als auch DR5 durch

den Keim nicht in ihrer Expression verändert wurden. Eine mögliche Erklärung findet sich in einer Arbeit von Zhang *et al.*, in der gezeigt wurde, daß ein Teil der TRAIL-Rezeptoren in den Endosomen oder im Nukleus lokalisiert ist und erst nach Stimulation durch TRAIL ein Transport der Rezeptoren ins Cytoplasma oder an die Cytoplasmamembran stattfindet (Zhang *et al.*, 2000). Eine ähnliche Wirkung könnte auch der Keim haben. Eine andere Möglichkeit wäre, daß die Aktivität der proapoptotischen Rezeptoren durch die sogenannten Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 reguliert wird. Spätere Untersuchungen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zeigten jedoch, daß sich die Expression dieser in Magenepithelzellen durch *H. pylori* nicht verändert. Zusätzlich ist berichtet worden, daß DR4, DR5 und DcR2 den NF- κ B Weg aktivieren können, der mit der Aktivierung antiapoptotisch wirkender Proteine assoziiert ist (Chaudhary *et al.*, 1997; Degli-Eposti *et al.*, 1997b; Schneider *et al.*, 1997b), so daß eine Modulation der TRAIL-induzierten Apoptose über Induktion dieses Weges denkbar wäre. Eine Regulation des *H. pylori*-vermittelten Zelltods auf intrazellulärer Ebene ist daher wahrscheinlich. So konnte gezeigt werden, daß *H. pylori* neben proapoptotischen Molekülen wie Bak, Bax und Bid (Chen *et al.*, 1997; Konturek *et al.*, 1999; Shibayama *et al.*, 2001) auch die Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 steigert, obwohl auf mRNA-Ebene die Bcl-2-Expression vermindert ist (Choi *et al.*, 2003). Neben Fas und TRAIL werden auch antiapoptisch wirkende Signaltransduktionswege wie atypische PKC (Proteinkinase C) λ , ERK1/2 und NF- κ B durch den Keim aktiviert (Maeda *et al.*, 2002; Obst *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2003). Eine Inhibition des ERK1/2-Signalwegs sensibilisiert verschiedene Zelllinien gegenüber Fas- und TRAIL-vermittelter Apoptose (Tran *et al.*, 2001). Erst kürzlich berichteten Choi *et al.*, daß eine Inhibition der ERK1/2-Aktivierung die *H. pylori* vermittelte Apoptose in AGS-Zellen verstärkt (Choi *et al.*, 2003). Ebenso führt eine Hemmung von NF- κ B und von Proteinkinase C zu einer Erhöhung der *H. pylori*-induzierten Apoptose in Magenepithelzellen (Maeda *et al.*, 2002; Obst *et al.*, 2002).

Es scheint demnach, daß die Summe aller Reize, proapoptotischer und antiapoptotischer Natur, darüber entscheidet, ob eine *H. pylori*-infizierte Zelle in die Apoptose geht.

7.2 Untersuchungen zur Rolle verschiedener Pathogenitätsfaktoren bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose

Cytotoxische *H. pylori*-Stämme produzieren das Vakuolen-induzierende Cytotoxin VacA in hohen Konzentrationen (Cover *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 1996; Smoot *et al.*, 1996). Diese Stämme sind virulenter und treten häufig im Zusammenhang mit schweren Erkrankungen wie peptischen Ulzera auf (Cover *et al.*, 1993; Atherton *et al.*, 1995). Auch von *cagA*⁺ *H. pylori*-Stämmen wird angenommen, daß sie virulenter sind als *cagA*-negative Stämme (Covacci *et al.*, 1999). Infektionen mit *cagA*-positiven *Helicobacter*-Stämmen erhöhen signifikant das Risiko für Magenkarzinome (Blaser *et al.*, 1995). Zudem induzieren *cagA*-positive Stämme in der Magenmukosa sowie in Magenepithelzelllinien eine erhöhte Cytokin-Produktion (Peek *et al.*, 1995; Tummuru *et al.*, 1995; Censini *et al.*, 1996; Yamaoka *et al.*, 1996). Diese könnten eventuell für die Regulation des Fas und TRAIL-Systems verantwortlich sein. Zudem wurde berichtet, daß isogene Mutanten verschiedener Regionen der *cag*-PAI (*cag*-Pathogenitätsinsel) mit einer reduzierten NF- κ B- und IL-8-Transkription assoziiert sind (Censini *et al.*, 1996; Glocker *et al.*, 1998; Sharma *et al.*, 1998). NF- κ B reguliert neben antiapoptotisch wirkenden Proteinen auch die Transkription proapoptotischer Proteine wie Fas, DR5 und TRAIL (Kuhnel *et al.*, 2000; Spalding *et al.*, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die *H. pylori*-assoziierten Pathogenitätsfaktoren VacA, CagA bzw. die gesamte *cag*-PAI die *H. pylori*-vermittelte Apoptose beeinflussen. Um dieses experimentell dar-

zustellen, wurden AGS-Zellen mit isogenen *H. pylori*-Mutanten der oben genannten Faktoren sowie mit dem Wildtyp (WT)-Stamm koinkubiert. Eine anschließende Bestimmung der Apoptoseraten ergab, daß die isogene *vacA*-*H. pylori*-Mutante im Vergleich mit dem WT-Bakterium eine signifikant geringere Apoptoserate in Magenepithelzellen *in vitro* induzierte. Somit scheint das Cytotoxin VacA eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseinduktion in Magenepithelzellen *in vitro* zu spielen. Auch andere Studien wiesen darauf hin, daß isogene *vacA*-negative *H. pylori*-Mutanten mit einem geringeren Ausmaß an Apoptose in AGS-Zellen korreliert sind als der WT-Stamm (Peek *et al.*, 1999; Kuck *et al.*, 2001; Cover *et al.*, 2003).

Hingegen konnten keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen WT und den beiden anderen Stämmen, bei denen das *cagA*-Gen bzw. die gesamte *cag*-PAI deletiert worden war, festgestellt werden. In der Literatur finden sich kontroverse Daten bezüglich der apoptotischen Wirkung von CagA und der *cag*-PAI. Da das *cagA*-Gen als genetischer Marker für die *cag*-PAI gilt, wurde zudem aus vielen Berichten nicht deutlich, ob es sich bei *cagA*-negativen Stämmen, um Stämme handelt, denen die gesamte PAI fehlt oder nur das *cagA*-Gen. In einigen Studien konnte keine Korrelation zwischen *cagA*-positiven Stämmen und einer erhöhten Apoptoserate festgestellt werden (Chen *et al.*; 1997; Wagner *et al.*, 1997; Rokkas *et al.*, 1999; Shirin *et al.*, 1999), während andere Gruppen berichteten, daß die Apoptoserate bei einer Infektion mit *cagA*-positiven Stämmen gesteigert ist (Rudi *et al.*, 1998; Peek *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2003). Eventuell können diese Differenzen auf genetisch unterschiedliche Bakterienstämme oder zell-spezifische Unterschiede zurückgeführt werden.

Zusätzlich wurde mittels der isogenen *vacA*-Mutante *H. pylori* P12*vacA* überprüft, ob die apoptotische Aktivität von VacA durch Regulation der Rezeptoren und Liganden der TNF-Familie vermittelt wird. Jedoch konnten im Vergleich mit dem vom Wildtyp *H. pylori* P12 verursachten Expressionsmustern der untersuchten Proteine Fas, FasL, DR4, DR5, DcR1, DcR2 und TRAIL keine Unterschiede festgestellt werden. Ebenso zeigten auch *H. pylori* P12*cagA* und *H. pylori* P12PAI keinen Unterschied (Daten

nicht gezeigt). Es muß demnach davon ausgegangen werden, daß VacA, obwohl es für die Apoptoseinduktion in Magenepithelzellen von Bedeutung ist, ebenso wie CagA bzw. die von der *cag*-PAI kodierten Genprodukte nicht an der Regulation der Proteinexpression der Rezeptoren und Liganden der TNF-Familie beteiligt ist und diese durch andere bakterielle Faktoren beeinflusst werden. Für die Entwicklung präventiver Maßnahmen gegenüber *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen ist es essentiell, diese bakteriellen Faktoren, die an der Regulation des Wirtszelltod beteiligt sind, zu identifizieren.

Zudem konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der beiden TRAIL-spezifischen Decoy-Rezeptoren DcR1 und DcR2 in Magenepithelzellen *in vitro* durch *H. pylori* nicht beeinflusst wird.

7.3 Untersuchungen zur *H. pylori*-induzierten Apoptose in Primärkultur

Die *H. pylori*-induzierte Apoptose wurde neben Magenkarzinomzellen auch anhand von primär aus Magenbiopsien isolierten humanen Magenepithelzellen (PHME) untersucht, an denen sich die *in vivo*-Situation besser nachempfinden läßt. Nach ihrer Isolierung konnten die PHME mittels Cytokeratin 18-Expression als epitheliale Zellen identifiziert werden (Rafiee *et al.*, 1992). Die Koinkubation der PHME mit *H. pylori* löste in den Zellen konzentrationsabhängig Apoptose aus, allerdings in etwas geringerem Ausmaß als bei AGS-Zellen. Dennoch ist hiermit gezeigt, daß AGS-Zellen ein gutes System zur Untersuchung der *H. pylori*-induzierten Apoptose darstellen. Abweichend verhielten sich PHME jedoch in Bezug auf die TRAIL-Sensibilität. Selbst sehr hohe Konzentrationen an rekombinanten TRAIL vermochten in PHME im Gegensatz zu AGS-Zellen keine Apoptose auszulösen. Über dieses unterschiedliche Verhalten von Karzinomzellen und

gesunden Zellen gegenüber TRAIL ist in der Literatur häufig berichtet worden, weshalb TRAIL auch als potentielles Antitumormittel gilt (Wiley *et al.*, 1995; Pitti *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1998a; Degli-Eposti *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Um ausschließen zu können, daß die TRAIL-Resistenz der PHME nicht auf einer fehlenden Expression der TRAIL-Rezeptoren beruhte bzw. die PHME die Rezeptoren nicht durch die für ihre Isolation notwendige Enzymbehandlung sekundär verloren hatten, wurde die Expression von DR4, DR5, DcR1 und DcR2 in immunhistologischen Untersuchungen überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, daß PHME alle vier Rezeptoren exprimierten. Die TRAIL-Resistenz der PHME mußte daher andere Gründe haben.

Wurden PHME jedoch mit TRAIL und *H. pylori* kokultiviert, steigerte TRAIL die *H. pylori*-induzierte Apoptose von 3,6% auf 7,2%. Die TRAIL-Resistenz der PHME wurde demnach durch *H. pylori* aufgehoben. Mittels RT-PCR wurde überprüft, ob dieses auf einer durch *H. pylori* verursachten erhöhten Expression der proapoptotischen TRAIL-Rezeptoren bzw. einer verminderten Expression der antiapoptotischen TRAIL-Rezeptoren DcR1 und DcR2 beruhte. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Expression dieser Rezeptoren auf mRNA-Ebene in *H. pylori*-koinkubierten PHME festgestellt werden. Allerdings ist es möglich, daß mRNA- und Proteinexpression differieren. Eine Überprüfung der Rezeptoren auf Proteinebene war jedoch nicht möglich, da nur sehr wenig Gesamt-Protein aus den PHME isoliert werden konnte, für den Nachweis der TRAIL-Rezeptoren im Western Blot aber Gesamtproteinkonzentrationen von mindestens 10 µg notwendig waren.

Eher weist die komplette Resistenz der PHME gegenüber TRAIL, obwohl die Rezeptoren exprimiert werden, auf eine sehr frühe Inhibition der intrazellulären Apoptosekaskade hin. So konnte dann auch nachgewiesen werden, daß in TRAIL-stimulierten Zellen keine Aktivierung der Procaspase-8 stattfindet, während in mit *H. pylori* und *H. pylori*/TRAIL kokultivierten Zellen die Konzentration an Procaspase-8 abnahm. Es ist daher anzunehmen, daß der Keim die Hemmung gegenüber TRAIL an dieser Stelle oder oberhalb auf Höhe des DISC oder der Todes-Rezeptoren aufhebt.

Erwert *et al.* berichteten kürzlich, daß Endothelzellen gegenüber LPS-vermittelter Apoptose durch eine Shiga-like Toxin 1-induzierte Verminderung der FLIP-Expression zugänglich wurden (Erwert *et al.*, 2002). FLIP liegt in verschiedenen Splice-Varianten in der Zelle vor, die strukturell Procaspase-8 gleichen und eine Aktivierung dieser im DISC durch Kompetition hemmen (Irmeler *et al.*, 1997; Rasper *et al.*, 1998, Krueger *et al.*, 2001b; Burns *et al.*, 2001; Thome *et al.* 2001). Während FLIP_S (FLIP short) die Aktivierung von Procaspase-8 im DISC vollständig verhindert, erfolgt in Gegenwart von FLIP_L (FLIP long) noch die erste Spaltung der Procaspase-8, jedoch wird die zweite aktivierende Spaltung verhindert und die Procaspase-8 verbleibt im DISC (Krueger *et al.*, 2001a). Eine Überprüfung der FLIP-mRNA-Expression in TRAIL-, *H. pylori*- und TRAIL/*H. pylori*-induzierten PHME ergab jedoch, daß *H. pylori* die FLIP-Expression auf mRNA-Ebene nicht veränderte. In der Literatur finden sich Hinweise, daß FLIP posttranslational durch Proteasomenabbau reguliert wird (Fukazawa *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Daher ist es notwendig, weitere Untersuchungen bezüglich der FLIP-Proteinexpression anhand von primären Magenepithelzellen zu unternehmen, um die Bedeutung dieses Proteins für die *H. pylori*-induzierte Apoptose ermitteln zu können. Sollte sich auf Proteinebene eine Regulation von FLIP durch *H. pylori* ergeben, wäre damit ein wichtiger Regulator der *H. pylori*-induzierten Apoptose identifiziert. Zusätzlich sollte analysiert werden, ob sich Magenkarzinomzellen und PHME in ihrer FLIP-Konzentration unterscheiden, worüber sich ihre unterschiedliche Sensibilität gegenüber TRAIL erklären lassen würde.

Dennoch bleibt zu diskutieren, ob sich die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Ergebnisse zur *H. pylori*-induzierten Apoptose von einem *in vitro* auf ein *in vivo* System übertragen lassen, zumal Unterschiede zwischen der verwendeten Magenkarzinomzelllinie AGS und den primär isolierten humanen Magenepithelzellen aufgetreten sind. Der Vorteil bei der Verwendung eines abgeschlossenen *in vitro* Systems besteht darin, daß sich verschiedene Aspekte des von *H. pylori*-medierten Zelltods in

Magenepithelzellen durch Ausblendung störender Prozesse fokussieren lassen. Einen ebensolchen Vorteil bieten auch isogene *H. pylori*-Mutanten bei der Ermittlung der Bedeutung verschiedener bakterieller Faktoren für die *H. pylori*-assoziierte Apoptose. Bei einer Übertragung der Ergebnisse in ein *in vivo* System muß daher bedacht werden, daß hierbei eine Vielzahl von Faktoren hinzukommt, die regulierend auf die Modulation der *H. pylori*-vermittelten Apoptose einwirken, die in einem wie hier verwendeten *in vitro* System in ihrer Komplexität nicht simuliert werden können. Zusätzlich ist zu beachten, daß sich mit Hilfe der Zellkultur niemals die Effekte einer chronischen *H. pylori*-Infektion und die damit verbundenen Erkrankungen wie Ulzera und Adenokarzinome darstellen lassen, sondern nur die frühen Aspekte der *H. pylori*-Infektion wiedergespiegelt werden.

Dennoch bieten die hier vorgestellten *in vitro*-Ergebnisse neue Einblicke in die von *H. pylori* in Magenepithelzellen ausgelöste Apoptose und sollten daher zur Entwicklung therapeutischer Strategien, insbesondere in Hinblick auf die Verwendbarkeit von TRAIL zur Behandlung von Magenkarzinomen, in *in vivo* Studien weiterführend untersucht werden.

8 Zusammenfassung

Obwohl bekannt ist, daß die von *H. pylori* (*Helicobacter pylori*) in Magenepithelzellen ausgelöste Apoptose an der Pathogenese von Krankheiten wie Gastriden, peptischen Ulzera und Magenkarzinomen involviert ist, sind die ihr zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen bis heute nur wenig verstanden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit anhand eines *in vitro*-Systems die *H. pylori*-vermittelte apoptotische Signalkaskade in der Magenkarzinomzelllinie AGS näher untersucht. Um die Bedeutung der Mitochondrien, der frühen Caspasen, des Adapterproteins FADD (Fas-associated Death Domain Protein) und der proapoptotischen TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)-Rezeptoren DR4 (Death Receptor 4) und DR5 (Death Receptor 5) für die *H. pylori*-medierte Apoptose näher untersuchen zu können, wurden mittels retroviraler Transduktion AGS-Zelllinien generiert, welche die proapoptotischen Proteine Bcl-2 (B-Cell Lymphoma gene 2), CrmA (Cytokine Response Modifier A) und dnFADD (dominant negatives FADD) überexprimierten (AGSBcl-2, AGSCrmA und AGSdnFADD) bzw. im Fall von DR4 und DR5 eine reduzierte Expression der Rezeptoren aufwiesen (AGSDR4as und AGSDR5as). Zusätzlich wurde geprüft, inwiefern eine Regulation der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Familienmitglieder Fas, FasL (Fas-Ligand), TRAIL, DR4 und DR5 durch *H. pylori* in Magenepithelzellen stattfindet und ob generell eine Aktivierung der Mitochondrien in *H. pylori*-infizierten Magenkarzinomzellen erfolgt. Weiterhin wurde mittels isogener *H. pylori*-Mutanten analysiert, ob die bakteriellen Pathogenitätsfaktoren VacA (Vacuolating Cytotoxin), CagA (Cytotoxin-associated gene A) und die gesamte *cag*-PAI (*cag*-Pathogenitätsinsel) eine Rolle bei der *H. pylori*-induzierten Apoptose spielen und inwieweit eine Regulation der oben genannten TNF-Mitglieder in diesem Zusammenhang stattfindet. Neben Magenkarzinomzelllinien wurde die *H. pylori*- und

TRAIL-vermittelte Apoptose auch anhand von PHME (primär isolierten humanen Magenepithelzellen) untersucht.

Bei Untersuchungen des Fas/FasL-Systems ergab sich folgendes: FasL zeigte einen synergetischen Effekt auf die *H. pylori*-vermittelte Apoptose. Dieser Effekt korrelierte mit einer Induktion der Fas-Expression durch den Keim in Magenepithelzellen, während FasL durch *H. pylori* nicht reguliert wurde. Eine Schädigung des Magenepithels durch homotypische Interaktionen von Fas- und FasL-exprimierenden Magenepithelzellen ist daher denkbar. Der Keim induzierte in AGS-Zellen einen Ausstrom der mitochondrialen Proteine Cytochrom *c* und Smac (Second Mitochondrial-Derived Activator Caspase). Die *H. pylori*-vermittelte Apoptose ist von dieser Aktivierung des mitochondrialen Weges in ihrer Weiterleitung abhängig, da das Pathogen in Bcl-2-überexprimierenden AGS-Zellen weniger Apoptose auslöste als in den Kontrollen. Dieses spricht für eine sogenannte Typ-II-, Mitochondrien-abhängige Signalkaskade. Da auch eine Überexpression von CrmA und dnFADD die *H. pylori*-vermittelte Apoptose in AGS-Zellen signifikant hemmte, läßt sich schlußfolgern, daß eine Aktivierung der frühen Caspasen wie Caspase-8 auf Höhe des DISC eine bedeutende Rolle für die *H. pylori*-induzierte Apoptose spielt. Eine Initiation der Apoptose durch *H. pylori* auf Höhe der Mitochondrien kann somit ausgeschlossen werden.

TRAIL erhöhte die *H. pylori*-medierte Apoptose in AGS-Zellen synergetisch. Die Expression des Liganden wurde jedoch ebenso wie die Expression von DR5 durch das Pathogen nicht verändert, während die Konzentration an DR4 unter Einfluß des Keims anstieg. Aus Koinkubationsexperimenten mit den Zelllinien AGSDR4as und AGSDR5as ergab sich jedoch eine bedeutende Rolle des DR5-Rezeptors für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose, da eine Reduktion der DR5-Expression den *H. pylori*-initiierten Zelltod signifikant verringerte. Eine verminderte DR4-Konzentration hingegen zeigte in diesem Zusammenhang keinen Effekt.

In dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, daß der bakterielle Pathogenitätsfaktor VacA für die *H. pylori*-vermittelte Apoptose von Bedeutung ist, da eine isogene Mutante dieses Faktors weniger Apoptose in

Magenepithelzellen induzierte als der Wildtyp (WT). Jedoch wurde der apoptotische Effekt von VacA nicht über Modulation von TRAIL und FasL bzw. der entsprechenden Rezeptoren Fas, DR4, DR5, DcR1 und DcR2 vermittelt, da der WT und die VacA-negative *H. pylori*-Mutante dieselben Expressionsmuster der oben genannten Proteine in AGS-Zellen induzierten. Für CagA und die gesamte PAI konnte keine Bedeutung für die *H. pylori*-medierte Apoptose festgestellt werden.

PHME erwiesen sich gegenüber dem *H. pylori*-induzierten Zelltod als sensibel, waren aber trotz Expression der entsprechenden TRAIL-spezifischen Rezeptoren TRAIL-resistent. Die TRAIL-vermittelte Apoptose war auf Höhe der Caspase-8 gehemmt. *H. pylori* hob die Resistenz von PHME gegenüber TRAIL auf, indem ein unbekannter Faktor reguliert wurde. Als mögliches Target wurde FLIP (FLICE-Inhibitory-Protein) untersucht. Jedoch konnte keine Modulation von FLIP durch *H. pylori* auf mRNA-Ebene festgestellt werden.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten bieten neue Einsichten in die von *H. pylori* in Magenepithelzellen *in vitro* induzierte Apoptose und sollten bei Entwicklung therapeutischer Ansätze Beachtung finden.

9 Literaturverzeichnis

Alexander, E.H., J.L. Bento, F.M. Hughes Jr., I. Marriott, M.C. Hudson, und K.L. Bost (2001)

Staphylococcus aureus and *Salmonella enterica* serovar Dublin induce Tumor Necrosis Factor-related apoptosis-inducing ligand expression by normal mouse and human osteoblasts.

Infect Immun 69:1581-6

Alm, R.A., L.S. Ling, D.T. Moir, B.L. King, E.D. Brown, P.C. Doig, D.D. Smith, B. Noonan, B.C. Guild, B.L. deJonge, G. Carmel, P.J. Tummino, A. Caruso, M. Uria-Nickelsen, D.M. Mills, C. Ives, R. Gibson, D. Merberg, S.D. Mills, Q. Jiang, D.E. Taylor, G.F. Vovis, und T.J. Trust (1999)

Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*.

Nature 397:176-80

Ashkenazi, A., und V.M. Dixit (1998)

Death receptors: signaling and modulation.

Science 281:1305-7

Ashktorab, H., M. Neapolitano, C. Bomma, C. Allen, A. Ahmed, A. Dubois, T. Naab, und D.T. Smoot (2002)

In vivo and *in vitro* activation of caspase-8 and -3 associated with *Helicobacter pylori* infection.

Microbes Infect 4:713-22

Atherton, J.C., P. Cao, R.M. Peek Jr, M.K. Tummuru, M.J. Blaser, und T.L. Cover (1995)

Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*: Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration.

J Biol Chem 270:17771-7

Atherton, J.C., R.M. Peek Jr, K.T. Tham, T.L. Cover, und M.J. Blaser (1997)

Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin, gene of *Helicobacter pylori*.

Gastroenterology 112:92-9

Backert, S., S. Moese, M. Selbach, V. Brinkmann, und T.F. Meyer (2001)

Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells.

Mol Microbiol 42:631-44

Baldwin Jr., A.S. (1996)

The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights.

Annu Rev Immunol 14:649-81

Bayerdörffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, und M. Stolte (1995)

Regression of primary gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection.
Lancet 345:1591-4

Bellgrau, D., D. Gold, H. Selawry, J. Moore, A. Franzusoff, und R. Duke (1995)

A role of CD95 ligand in preventing graft rejection.
Nature 377:630-2

Bertin, J., R.C. Armstrong, S. Otililie, D.A. Martin, Y. Wang, S. Banks, G.H. Wang, T.G. Senkevich, E.S. Alnemri, B.Moss, M.J. Lenardo, K.J. Tomaselli, und J.I. Cohen (1997)

Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis.
Proc Natl Acad Sci USA 94:1172-6

Bizzozero, G. (1893)

Ueber die schlauchförmigen Druesen des Magendarmkanals und die Beziehungen ihres Epithels zu dem Oberflächenepithel der Schleimhaut.
Arch Birc Anat 42:82-94

Blaser, M.J., G.I. Perez-Perez, H. Kleanthous, T.L. Cover, R.M. Peek, P.H. Chyou, G.N. Stemmermann, und A. Nomura (1995)

Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach.
Cancer Res 55:2111-5

Bodmer, J.L., N. Holler, S. Reynard, P. Vinciguerra, P. Schneider, P. Juo, J. Blenis, und J. Tschopp (2000)

TRAIL-receptor-2 signals apoptosis through FADD and caspase-8.
Nat Cell Biol 2:241-3

Boldin, M.P., E.E. Varfolomeev, Z. Pancer, I.L. Mett, J.H. Camonis, und D. Wallach (1995)

A novel protein that interacts with the death domain of Fas/Apo-1-and TNF contains a sequence motif related to the death domain.
J Biol Chem 270:7795-8

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72:248-54

Budihardjo, I., H. Oliver, M. Lutter, X. Luo, und X. Wang (1999)

Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.
Annu Rev Cell Dev 15:269-90

Burns, T.F., und W.S. El-Deiry (2001)

Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach.
J Biol Chem 276:37879-86

Cain, K., S.B. Bratton, C. Langlais, G. Walker, D.G. Brown, X.M. Sun, und G.M. Cohen (2000)

Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactivate approximately 1.4-MDa apoptosome complexes.
J Biol Chem 275:6067-70

Censini, S., C. Lange, Z. Xiang, J.E. Crabtree, P. Ghiara, M. Borodovsky, R. Rappuoli, und A. Covacci (1996)

cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors.
Proc Natl Acad Sci USA 93:14648-53

Chaudhary, P.M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, und L. Hood (1997)

Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway.
Immunity 7:821-30

Chen, G., E.M. Sordillo, W.G. Ramey, J. Reidy, P.R. Holt, S. Krajewski, J.C. Reed, M.J. Blaser, und S.F. Moss (1997)

Apoptosis in gastric epithelial cells is induced by *Helicobacter pylori* and accompanied by increased expression of BAK.
Biochem Biophys Res Commun 239:626-32

Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari, und V.M. Dixit (1995)

FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.
Cell 81:505-12

Chinnaiyan, A.M., C.G. Tepper, M.F. Seldin, K. O'Rourke, F.C. Kischkel, S. Hellbardt, P.H. Krammer, M.E. Peter, und V.M. Dixit (1996)

FADD/MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis.
J Biol Chem 271:4961-5

Choi, I.J., J.S. Kim, J.M. Kim, H.C. Jung, und I.S. Song (2003)

Effect of Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 pathway on apoptosis and *bcl-2* expression in *Helicobacter pylori*-infected AGS cells.
Infect Immun 71:830-7

Clarke, P., S.M. Meintzer, S. Gibson, C. Widmann, T.P. Garrington, G.L. Johnson, und K.L. Tyler (2000)

Reovirus-induced apoptosis is mediated by TRAIL.
J Virol 74:8135-9

Correa, P. (1992)

Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process.
Cancer Res 52:6735-40

Correa, P. (1996)

Helicobacter pylori and gastric cancer: state of the art.
Cancer Epidemiol Biomark Prev 5:477-81

Covacci, A., J.L. Telford, G.D. Del Giudice, J. Parsonnet, und R. Rappuoli (1999)

Helicobacter pylori virulence and genetic geography.
Science 284:1328-33

Cover, T.L., C.P. Dooley, und M.J. Blaser (1990)

Characterization of and human serologic response to proteins in
Helicobacter pylori broth culture supernatans with vacuolizing cytotoxin
activity.
Infect Immun 58:603-10

Cover, T.L., P. Cao, C.D. Lind, K.T. Tham, und M.J. Blaser (1993)

Correlation between vacuolating cytotoxin production by *Helicobacter pylori*
isolates *in vitro* and *in vivo*.
Infect Immun 61:5008-12

Cover, T.L. (1996)

The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*.
Mol Microbiol 20:241-6

Cover, T.L., U.S. Krishna, D.A. Israel, und R.M. Peek Jr. (2003)

Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori*
vacuolating cytotoxin.
Cancer Res 63:951-7

Crabtree, J.E., T.M. Shallcross, R.V. Heatly, und J.L. Wyatt (1991)

Mucosal tumour necrosis factor alpha and interleukin-6 in patients with
Helicobacter pylori associated gastritis.
Gut 32:1473-7

**Degli-Eposti, M.A., P.J. Smolak, H.G. Walczak, J. Waugh, C.P. Huang,
R.F. DuBose, R.G. Goodwin, und C.A. Smith (1997a)**

Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging
TRAIL receptor family.
J Exp Med 186:1165-70

**Degli-Eposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, Y. Waugh Jr, C.A. Smith,
und R.G. Goodwin (1997b)**

The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kB and protects against TRAIL-
mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain.
Immunity 7:813-20

Degli-Eposti, M. (1999)

To die or not to die-the quest of the TRAIL receptors.
J Leukoc Biol 65:535-42

Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvesen, und J.C. Reed (1998)

IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.
EMBO J 17:2215-23

Deveraux, Q.L., und J.C. Reed (1999)

IAP family proteins: suppressors of apoptosis.
Genes Dev 13:239-52

Dooley, C.P., H. Cohen, P.L. Fitzgibbons, M. Bauer, M. Appleman, G.I. Perez-Perez, und M.J. Blaser (1989)

Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons.
N Engl J Med 321:1562-6

Downward, J. (1999)

How BAD phosphorylation is good for survival.
Nat Cell Biol 1:E33-5

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, und X. Wang (2000)

Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrom c-dependent caspase-activation by eliminating IAP-inhibition.
Cell 102:33-42

Ekert, P.G., J. Silke, und D.L. Vaux (1999)

Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing CrmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors.
EMBO J 18:330-8

El-Omar, E.M., M. Carrington, W.H. Chow, K.E. McColl, J.H. Bream, H.A. Young, J. Herrera, J. Lissowska, C.C. Yuan, N. Rothman, O. Lanyon, M. Martin, J.F. Fraumeni Jr., und C.S. Rabkin (2000)

Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.
Nature 404:398-402

Emery, J.G., P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, und P.R. Young (1998)

Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.
J Biol Chem 273:14363-7

Enari, M., H. Hug, M. Hayakawa, F. Ito, Y. Nishimura, und S. Nagata (1996)

Different apoptotic pathways mediated by Fas and the tumor-necrosis-factor receptor. Cytosolic phospholipase A2 is not involved in Fas-mediated apoptosis.
Eur J Biochem 236:533-8

Ernst, P.B., S.E. Crowe, und V.E. Reyes (1997)

How does *Helicobacter pylori* cause mucosal damage? The inflammatory response.
Gastroenterology 113:35-42

Erwert, R.D., R.K. Winn, J.M. Harlan, und D.B. Bannermann (2002)

Shiga-like toxin inhibition of FLIP expression sensitizes endothelial cells to bacterial lipopolysaccharide-induced apoptosis.
J Biol Chem 277:40567-74

Eslick, G.D., L.L. Lim, J.E. Byles, H.H. Xia, und N.J. Talley (1999)

Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: a metaanalysis.
Am J Gastroenterol 94:2373-9

Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, und P.M. Henson (1992)

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by makrophages.
J Immunol 148:2207-16

Flanagan, W.M., und R.W. Wagner (1997)

Potent and selective gene inhibition using antisense oligodesoxynucleotides.
Mol Cell Biochem 172:213-25

Foo, S.Y., und G.P. Nolan (1999)

NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis, and cellular transformation.
Trends Genet 15:229-35

Fraser, A., und G. Evan (1996)

A license to kill.
Cell 85:781-4

Fukazawa, T., T. Fujiwara, F. Uno, F. Teraishi, Y. Kadowaki, T. Itoshima, Y. Takata, S. Kagawa, J.A. Roth, J. Tschopp, und N. Tanaka (2001)

Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells.
Oncogene 20:5225-31

Galmiche, A., J. Rassow, A. Doye, S. Cagnol, J.C. Chambard, S. Contamin, V. de Thillot, I. Just, V. Ricci, E. Solcia, E. Van Obberghen, und P. Boquet (2000)

The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.
EMBO J 19:6361-70

Glocker, E., C. Lange, A. Covacci, S. Bereswill, M. Kist, und H.L. Pahl (1998)

Proteins encoded by the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* are required for NF-kB activation.
Infect Immun 66:2346-8

Go, M.F. (2002)

Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.
Aliment Pharmacol Ther 16:3-15

Golstein, P. (2000)

FasL binds preassembled Fas.
Science 288:2328-9

Goodwin, C.S., und J.A. Armstrong (1990)

Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*).
Eur J Clin Microbial Infect Dis 9:1-13

Green, D.R., und J.C. Reed (1998)

Mitochondria and apoptosis.
Science 281:1309-12

Green, D.R. (2000)

Apoptotic pathways: paper wraps stone blunt scissors.
Cell 102:1-4

Griffith, T.S., T. Brunner, S.M. Fletcher, D.R. Green, und T.A. Ferguson (1995)

Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege.
Science 270:1189-92

Griffith, T.S., und D.H. Lynch (1998a)

TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms.
Curr Opin Immunol 10:559-63

Griffith, T.S., W.A. Chin, G.C. Jackson, D.H. Lynch, und M.Z. Kubin (1998b)

Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells.
J Immunol 161:2833-40

Griffith, T.S., C.T. Rauch, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, D.H. Lynch, C.A. Smith, R.G. Goodwin, und M.Z. Kubin (1999a)

Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies.
J Immunol 162:2597-605

Griffith, T.S., S.R. Wiley, M.Z. Kubin, L.M. Sedger, C.R. Maliszewski, und N.A. Fanger (1999b)

Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine TRAIL.
J Exp Med 189:1343-53

Hall, P.A., P.J. Coates, B. Ansari, und D. Hopwood (1994)

Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis.
J Cell Sci 107:3569-77

- Han, Z., K. Bhalla, P. Pantazis, E.A. Hendrickson, and J.H. Wyche (1999)**
Cif (cytochrome efflux-inducing factor) activity is regulated by Bcl-2 and caspases and correlates with the activation of Bid.
Mol Cell Biol 19:1381-9
- Harris, R.P., T.L. Cover, D.R. Crowe, J.M. Orenstein, M.F. Graham, M.J. Blaser, and P.D. Smith (1996)**
Helicobacter pylori cytotoxin induces vacuolation of primary mucosal epithelial cells.
Infect Immun 64:4867-71
- Hasumi, K., K. Tanaka, S. Saitoh, A. Takagi, T. Miwa, T. Mine, and Y. Koga (2002)**
Roles of tumor necrosis factor- α -receptor type 1 and Fas in the *Helicobacter pylori*-induced apoptosis of gastric epithelial cells.
J Gastroenterol Hepatol 17:651-8
- Hazell, S.L., A. Lee, L. Brady, and W. Hennessy (1986)**
Campylobacter pyloridis and gastritis: association with intracellular spaces and adaption to an environment of mucus as important factors in colonization of the gastric epithelium.
J Infect Dis 153:658-63
- Honda, S., T. Fujioka, M. Tokieda, R. Satoh, A. Nishizono, and M. Nasu (1998)**
Development of *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils.
Cancer Res 58:4255-9
- Houghton, J., R.M. Korah, M.R. Condon, and K.H. Kim (1999)**
Apoptosis in *Helicobacter pylori*-associated gastric and duodenal ulcer disease is mediated via the Fas antigen pathway.
Digest Dis Sci 44:465-478
- Houghton, J., L.S. Macera-Bloch, L. Harrison, K.H. Kim, and R.M. Korah (2000)**
Tumor Necrosis Factor alpha and Interleukin 1 β up-regulate gastric mucosal Fas antigen expression in *Helicobacter pylori* infection.
Infect Immun 68:1189-95
- International Agency for Research on Cancer (1994)**
Evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*.
IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 61:1-241
- Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I.M. Frick, D. Kersulyte, E.T. Incecik, D.E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren (1998)**
Helicobacter pylori adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging.
Science 279:373-7
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schröter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp (1997)**
Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.
Nature 388:190-5

Isaka, M., H. Inoue, T. Tsukiyama, O. Niwa, und A. Hakura (1992)

Rat cellular mutants for expression of mRNA from the long terminal repeat of murine retrovirus.

Virology 189:141-9

Itoh, N., S. Yonehara, A. Ishii, M. Yonehara, S.I. Mizushima, M. Sameshima, A. Hase, Y. Seto, und S. Nagata (1991)

The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis.

Cell 66:233-43

Jäättelä, M., M. Benedict, M. Tewari, J.A. Shayman, und V.M. Dixit (1995)

Bcl-x and Bcl-2 inhibit TNF and Fas-induced apoptosis and activation of phospholipase A2 in breast carcinoma cells.

Oncogene 10:2297-305

Jeremias, I., I. Herr, T. Boehler, und K.M. Debatin (1998)

TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells.

Eur J Immunol 28:143-52

Jones, N.L., P.T. Shannon, E. Cutz, H. Yeger, und P.M. Sherman (1997)

Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the history of *Helicobacter pylori* infection.

Am J Pathol 151:1695-1703

Jones, N.L., A.S. Day, H.A. Jennings, und P.M. Sherman (1999)

Helicobacter pylori induces gastric epithelial cell apoptosis in association with increased Fas receptor expression.

Infect Immun 67:4237-42

Josenhans, C., und S. Suerbaum (2001)

Helicobacter motility and chemotaxis. In: Achtman, M., und S. Suerbaum eds. *Helicobacter pylori*: molecular and cellular biology.

Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press:171-84

Kaufmann, S.H., S. Desnoyers, Y. Ottaviano, N.E. Davidson, und G.G. Poirier (1993)

Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.

Cancer Res 53:3976-85

Kawahara, T., S. Teshima, Y. Kuwano, A. Oka, K. Kishi, und K. Rokutan (2001)

Helicobacter pylori lipopolysaccharide induces apoptosis of cultured guinea pig gastric mucosal cells.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 281:G726-34

Keane, M.M., S.A. Ettenberg, M.M. Nau, E.K. Russell, und S. Lipkowitz (1999)

Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell lines.

Cancer Res 59:734-41

Keogh, S.A., H. Walczak, L. Bouchier-Hayes, und S.J. Martin (2000)

Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis.
FEBS Lett 471:93-8

Kerr, J.F., A.H. Wyllie, und A.R. Currie (1972)

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br J Cancer 26:239-57

Kim, J.M., J.S. Kim, H.C. Jung, I.S. Song, und C.Y. Kim (2000)

Apoptosis of human gastric epithelial cells via caspase-3 activation in response to *Helicobacter pylori* infection: possible involvement of neutrophils through tumor necrosis factor α and soluble Fas ligands.
Scand J Gastroenterol 35:40-8

Kim, Y., N. Suh, M. Sporn, und J.C. Reed (2002)

An inducible pathway for degradation of FLIP protein sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis.
J Biol Chem 277:22320-9

Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, und M.E. Peter (1995)

Cytotoxicity-dependent Apo-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor.
EMBO J 14:5579-88

Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K.J. Kim, und A. Ashkenazi (2000)

Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5.
Immunity 12:611-20

Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, und A. Ashkenazi (2001)

Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8.
J Biol Chem 276:46639-46

Kluck, R.M., E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, und D.D. Newmeyer (1997)

The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis.
Science 275:1132-6

Konturek, P.C., P. Pierzchalski, S.J. Konturek, H. Meixner, G. Faller, T. Kirchner, und E.G. Hahn (1999)

Helicobacter pylori induces apoptosis in gastric mucosa through an upregulation of bax expression in humans.
Scand J Gastroenterol 4:375-83

Koyama, S. (2000)

Apoptotic depletion of infiltrating mucosal lymphocytes associated with Fas ligand expression by *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosal epithelium: human glandular stomach as a site of immune privilege.
Dig Dis Sci 45:773-80

Koyama, S., N. Koike, und S. Adachi (2001)

Expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptors in gastric carcinoma and tumor-infiltrating lymphocytes: a possible mechanism of immun evasion of the tumor.
J Cancer Res Clin Oncol 128:73-9

Krammer, P.H. (2000)

CD95's deadly mission in the immune system.
Nature 407:789-95

Krienitz, W. (1906)

Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form im Mageninhalt bei Carcinoma ventriculi.
Deut Med Wochenzeitschrift 28:872-90

Krueger, A., I. Schmitz, S. Baumann, P.H. Krammer, und S. Kirchhoff (2001a)

Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death inducing signaling complex.
J Biol Chem 276:20633-40

Krueger, A., S. Baumann, P.H. Krammer, und S. Kirchhoff (2001b)

FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis.
Mol Cell Biol 21:8247-54

Kuang, A.A., G.E. Diehl, J. Zhang, und A. Winoto (2000)

FADD is required for DR4- and DR5-mediated apoptosis. Lack of TRAIL-induced apoptosis in FADD-deficient mouse embryonic fibroblasts.
J Biol Chem 275:25065-8

Kuck, D., B. Kolmerer, C. Iking-Konert, P.H. Krammer, W. Stremmel, und J. Rudi (2001)

Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS.
Infect Immun 69: 5080-7

Kuhnel, F., L. Zender, Y. Paul, M.K. Tietze, C. Trautwein, M. Manns, und S. Kubicka (2000)

NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation in adenoviral hepatitis.
J Biol Chem 275:6421-7

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227:680-5

- Le'Negrate, G., V. Ricci, V. Hofman, B. Mograbi, P. Hofman, und B. Rossi (2001)**
Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the *cag* pathogenicity island phenotype.
Infect Immun 69:5001-9
- Leverkus, M., H. Walczak, A. McLellan, H.W. Fries, G. Terbeck, E.B. Bröcker, und E. Kämpgen (2000)**
Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death-ligand-mediated apoptosis.
Blood 96:2628-31
- Logan, R.P.H., und A.M. Hirschl (1996)**
Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection.
Curr Opin Gastroenterol 12:1
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, und X. Wang (1997)**
Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.
Cell 91:479-89
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, und J. Yuan (1998)**
Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.
Cell 94:491-501
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, und X. Wang (1997)**
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA-fragmentation.
Cell 89:175-84
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, und X. Wang (1998)**
Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor.
Cell 94:481-90
- Mac Farlane, M., M. Ahmad, S.M. Srinivasula, T. Fernandes-Alnemri, G.M. Cohen, und E.S. Alnemri (1997)**
Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL.
J Biol Chem 272:25417-20
- Maeda, S., H. Yoshida, Y. Mitsuno, Y. Hirata, K. Ogura, Y. Shiratori, und M. Omata (2002)**
Analysis of apoptotic and antiapoptotic signalling pathways induced by *Helicobacter pylori*.
Gut 50:771-8

Mandal, M., S.B. Maggirwar, N. Sharma, S.H. Kaufmann, S.C. Sun, and R. Kumar (1996)

Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF- κ B signaling pathway.
J Biol Chem 271:30354-9

Mannick, E.E., L.E. Bravo, G. Zarama, J.L. Realpe, X.J. Zhang, B. Ruiz, E.T. Fontham, R. Mera, M.J. Miller, and P. Correa (1996)

Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants.
Cancer Res 56:3238-43

Mariani, S.M., and P.H. Krammer (1998)

Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage.
Eur J Immunol 28:973-82

Marshall, B.J., and J.R. Warren (1984)

Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration.
Lancet 1:1311-5

Marshall, B., and S. Langton (1986)

Urea hydrolysis in patients with *Campylobacter pylori* infection.
Lancet 1:965-6

Marshall, B.J., C.S. Goodwin, J.R. Warren, R. Murray, E.D. Blincow, S.J. Blackbourn, M. Phillips, T.E. Waters, and C.R. Sanderson (1988)

Prospective double-blind trial of duodenal relapse after eradication of *Campylobacter pylori*.
Lancet 2:1437-42

Marsters, S.A., R.M. Pitti, C.J. Donahue, S. Ruppert, K.D. Bauer, and A. Ashkenaza (1996)

Activation of apoptosis by Apo-2 ligand is independent of FADD but blocked by CrmA.
Curr Biol 6:750-2

Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi (1997)

A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain.
Curr Biol 7:1003-6

Megraud, F. (1995)

Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection: where are we in 1995 ?
Eur J Gastroenterol Hepatol 7:292-5

Mitchell, H., and F. Megraud (2002)

Epidemiology and diagnosis of *Helicobacter pylori* infection.
Helicobacter 7:8-16

Mobley, H.L.T. (2001)

Helicobacter pylori urease. In: Achtman, M., und S. Suerbaum eds. *Helicobacter pylori: molecular and cellular biology*. Wymondham, United Kingdom: Horizon Scientific Press:155-70

Mongkolsapaya, J., A.E. Cowper, X.N. Xu, G. Morris, A.J. McMichael, J.I. Bell, und G.R. Screaton (1998)

Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol* 160:3-6

Morgenstern, J.P., und H. Land (1990)

Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucl Acid Res* 18:3587-96

Moss, S.F., J. Calam, B. Agarwal, S. Wang, und P.R. Holt (1996)

Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 38:498-501

Moss, S.F., E.M. Sordillo, A.M. Abdalla, V. Makarov, Z. Hanzely, G.I. Perez-Perez, M.J. Blaser, und P.R. Holt (2001)

Increased gastric epithelial cell apoptosis associated with colonization with *cagA+* *Helicobacter pylori* strains. *Cancer Res* 61:1406-11

Mundt, B., F. Kuhnel, L. Zender, Y. Paul, H. Tillmann, C. Trautwein, M.P. Manns, und S. Kubicka (2003)

Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis. *FASEB J* 17:94-6

Nagata, S., und P. Golstein (1995)

The Fas death factor. *Science* 267:1449-55

Nagata, S. (1997)

Apoptosis by death receptor. *Cell* 88:355-65

NIH Consensus Development Panel (1994)

Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. *JAMA* 272:65-9

Nomura, A., G.N. Stemmermann, P.H. Chyou, I. Kato, G.I. Perez-Perez, und M.J. Blaser (1991)

Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 325:1132-6

Oberhammer, F., J.W. Wilson, C. Dive, I.D. Morris, J.A. Hickman, A.E. Wakeling, P.R. Walker, und M. Sikorska (1993)

Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or to 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation.
EMBO J 12:3679-84

Obst, B., S. Schütz, S. Ledig, S. Wagner, und W. Beil (2002)

Helicobacter pylori-induced apoptosis in gastric epithelial cells is blocked by protein kinase C activation.
Microb Pathog 33:167-75

Odenbreit, S., J. Puls, B. Sedlmaier, E. Gerland, W. Fischer, und R. Haas (2000)

Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion.
Science 287:1497-500

Pan, G., K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, und V.M. Dixit (1997a)

The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL.
Science 276:111-3

Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, und V.M. Dixit (1997b)

An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL.
Science 277:815-8

Pan, G., J. Ni, G. Yu, Y.F. Wei, und V.M. Dixit (1998)

TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signaling.
FEBS Lett 424:41-5

Parsonnet, J., G.D. Friedman, D.P. Vandersteen, Y. Chang, J.H. Vogelman, N. Orentreich, und R.K. Sibley (1991)

Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma.
N. Engl J Med 325:1127-31

Parsonnet, J., S. Hansen, L. Rodriguez, A. Gelb, R.A. Warnke, E. Jellum, N. Orentreich, J.H. Vogelman, und G.D. Friedman (1994)

Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma.
N Engl J Med 330:1267-71

Patel, T., G.J. Gores, und S.H. Kaufmann (1996)

The role of proteases during apoptosis.
FASEB J 10:587-97

Pear, W.S., G.P. Nolan, M.L. Scott, und D. Baltimore (1993)

Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.
Proc Natl Acad Sci 90:8392-96

Peek, R.M., G.G. Miller, K.T. Tham, G.I. Perez-Perez, X. Zhao, J.C. Atherton, und M.J. Blaser (1995)

Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*+ *Helicobacter pylori* strains.

Lab Invest 71:760-70

Peek Jr., R.M., M.J. Blaser, D.J. Mays, M.H. Forsyth, T.L. Cover, S.Y. Song, U. Krishna, und J.A. Pietenpol (1999)

Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle.

Cancer Res 59:6124-31

Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, und A. Ashkenazi (1996)

Induction of apoptosis by Apo-2 Ligand, a new member of the tumor necrosis factor receptor family.

J Biol Chem 271:12687-90

Potthoff, A., S. Ledig, J. Martin, O. Jandl, M. Cornberg, B. Obst, W. Beil, M.P. Manns, und S. Wagner (2002)

Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis.

Helicobacter 7:367-77

Puls, J., W. Fischer, und R. Haas (2002)

Activation of *Helicobacter pylori* CagA by tyrosine phosphorylation is essential for dephosphorylation of host cell proteins in gastric epithelial cells.

Mol Microbiol 43:961-9

Raff, M. (1998)

Cell suicide for beginners.

Nature 369:119-22

Rafiee, P., S.B. Ho, R.S. Bresalier, E.J. Bloom, J.H. Kim, und Y.S. Kim (1992)

Characterization of the cytokeratins of human colonic, pancreatic, and gastric adenocarcinoma cell lines.

Pancreas 7:123-31

Raqib, R., C. Ekberg, P. Sharkar, P.K. Bardhan, A. Zychlinsky, P.J. Sansonetti, und J. Andersson (2002)

Apoptosis in acute shigellosis is associated with increased production of Fas/Fas ligand, perforin, caspase-1, and caspase-3 but reduced production of Bcl-2 and interleukin-2.

Infect Immun 70:3199-207

Rasper, D.M., J.P. Vaillancourt, S. Hadano, V.M. Houtzager, I. Seiden, S.L.C. Keen, P. Tawa, S. Xanthoudakis, J. Nasir, D. Martindale, B.F. Koop, E.P. Peterson, N.A. Thornberry, J.Q. Huang, D.P. MacPherson, S.C. Black, F. Hornung, M.J. Lenardo, M.R. Hayden, S. Roy, und D.W. Nicholson (1998)

Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex.

Cell Death Differ 5:271-88

Rokkas, T., S. Ladas, C. Liatsos, E. Petridou, G. Papatheodorou, S. Theocharis, A. Karameris, und S. Raptis (1999)

Relationship of *Helicobacter pylori* *cagA* status to gastric epithelial cell proliferation and apoptosis.

Dig Dis sci 44:487-93

Rudi, J., D. Kuck, S. Strand, A. von Herbay, S.M. Mariani, P.H. Krammer, P.R. Galle, und W. Stremmel (1998)

Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand system in *Helicobacter pylori*-induced gastric epithelial apoptosis.

J Clin Investig 102:1506-14

Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.D. Debatin, P.H. Krammer, und M.E. Peter (1998)

Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways.

EMBO J 17:1675-87

Scaffidi, C., I. Schmitz, P.H. Krammer, und M.E. Peter (1999)

The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis.

J Biol Chem 274:1541-8

Schendel, S.L., R. Azimov, K. Pawlowski, A. Godzik, B.L. Kagan, und J.C. Reed (1999a)

Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID.

J Biol Chem 274:21932-6

Schendel, S.L., M. Montal, und J.C. Reed (1999b)

Bcl-2 family proteins as ion-channels.

Cell death Diff 5:372-80

Schneider, P., J.L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler, und J. Tschopp (1997a)

Characterization of two receptors for TRAIL.

FEBS Lett 416:329-34

Schneider, P., M. Thome, K. Burns, J.L. Bodmer, K. Hofman, T. Kataoka, N. Holler, und J. Tschopp (1997b)

TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB.

Immunity 7:831-6

Schuchmann, M., E.E. Varfolomeev, F. Hermann, F. Rueckert, D. Strand, H. Koehler, S. Strand, A.W. Lohse, D. Wallach, und P.R. Galle (2003)

Dominant negative MORT1/FADD rescues mice from CD95- and TNF-induced liver failure.

Hepatology 37:129-35

Sedger, L.M., D.M. Shows, R.A. Blanton, J.J. Peschon, R.G. Goodwin, D. Cosman, und S.R. Wiley (1999)

IFN- γ mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression.

J Immunol 163:920-6

Sharma, S.A., M.K. Tummuru, G.G. Miller, und M.J. Blaser (1995)

Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to *Helicobacter pylori* stimulation *in vitro*.

Infect Immun 63:1681-7

Sharma, S.A., M.K. Tummuru, M.J. Blaser, und L.D. Kerr (1998)

Activation of IL-8 gene expression by *Helicobacter pylori* is regulated by transcription factor nuclear factor-kappa B in gastric epithelial cells.

J Immunol 160:2401-7

Sheikh, M.S., Y. Huang, E.A. Fernandez-Salas, W.S. El-Deiry, H. Friess, S. Amundson, J. Yin, S.J. Meltzer, N.J. Holbrook, und A.J. Fornace Jr. (1999)

The antiapoptotic decoy receptor TRID/TRAIL-R3 is a p53-regulated DNA damage inducible gene that is overexpressed in primary tumors of the gastrointestinal tract.

Oncogene 18:4153-9

Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, und A. Ashkenazi (1997)

Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors.

Science 277:818-21

Shibayama, K., Y. Doi, N. Shibata, T. Yagi, T. Nada, Y. Iinuma, und Y. Arakawa (2001)

Apoptotic signaling pathway activated by *Helicobacter pylori* infection and increase of apoptosis-inducing activity under serum-starved conditions.

Infect Immun 69:3181-9

Shirin, H., E.M. Sordillo, S.H. Oh, H. Yamamoto, T. Delohery, I.B. Weinstein, und S.F. Moss (1999)

Helicobacter pylori inhibits the G₁ to S transition in AGS gastric epithelial cells.

Cancer Res 59:2277-81

Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, und W.J. Boyle (1997)

Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density.

Cell 1997:89:309-19

Smith, K.G.C., A. Strasser, und D.L. Vaux (1996)

CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy of autoimmune disease. EMBO J 15:5167-76

Smoot, D.T., J.H. Resau, M.H. Earlington, M. Simpson, und T.L. Cover (1996)

Effects of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin on primary cultures of human gastric epithelial cells. Gut 39:795-9

Smoot, D.T., J. Sewchand, K. Young, B.C. Desbordes, C.R. Allen, und T. Naab (2000)

A method for establishing primary cultures of human gastric epithelial cells. Methods Cell Science 22:133-6

Song, Z., und H. Steller (1999)

Death by design: mechanism and control of apoptosis. Trends Cell Biol 9:M49-52

Spalding, A.C., R.M. Jotte, R.I. Scheinmann, M.W. Geraci, P. Clarke, K.L. Tyler, und G.L. Johnson (2002)

TRAIL and inhibitors of apoptosis are opposing determinants for NF-kappaB-dependent, genotoxin-induced apoptosis of cancer cells. Oncogene 21:260-71

Sprick, M.R., M.A. Weigand, E. Rieser, C.T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P.H. Krammer, und H. Walczak (2000)

FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. Immunity 12:599-609

Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, und E.S. Alnemri (1998)

Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. Mol Cell 1:949-57

Srinivasula, S.M., P. Datta, X.J. Fan, T. Fernandes-Alnemri, Z. Huang, und E.S. Alnemri (2000)

Molecular determinants of the caspase-promoting activity of Smac/Diablo and its role in death receptor pathway. J Biol Chem 275:36152-7

Stein, M., F. Bagnoli, R. Halenbeck, R. Rappuoli, W.J. Fantl, und A. Covacci (2002)

c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosin phosphorylation of the EPIYA motifs. Mol Microbiol 43:971-80

Steininger, H., G. Faller, E. Dewald, T. Brabletz, A. Jung, und T. Kirchner (1998)

Apoptosis in chronic gastritis and its correlation with antigastric autoantibodies. Virchows Arch 433:13-8

Stolte, M., und A. Meining (1998)

Helicobacter '98- Epidemiologie und Bedeutung in der Cancerogenese.
Chirurg 69:234-238

Strasser, A., L. O'Connor, und V.M. Dixit (2000)

Apoptosis Signaling.
Annu Rev Biochem 69:217-45

Suda, T., T. Takahashi, P. Golstein, und S. Nagata (1993)

Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the Tumor Necrosis Factor family.
Cell 75:1169-78

Suliman, A., A. Lam, R. Datta, und R.K. Srivastava (2001)

Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways.
Oncogene 20:2122-33

Sun, S.Y., P. Yue, J.Y. Zhou, Y. Wang, H.R. Choi Kim, R. Lotan, und G.S. Wu (2001)

Overexpression of BCL2 blocks TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in human lung cancer cells.
Biochem Biophys Res Commun 280:788-97

Suzuki, H., A. Yanaka, T. Shibahara, H. Matsui, A. Nakahara, N. Tanaka, H. Muto, T. Momoi, und Y. Uchiyama (2002)

Ammonia-induced apoptosis is accelerated at higher pH in gastric surface mucous cells.
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 238:G986-95

Szabo, I., S. Brutsche, F. Tombola, M. Moschioni, B. Satin, J.L. Telford, R. Rappuoli, C. Montecucco, E. Papini, und M. Zoratti (1999)

Formation of anion-selective channels in the cell plasma membran by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity.
EMBO J 18:5517-27

Takahashi, T., M. Tanaka, C.I. Brannan, N.A. Jenkins, N.G. Copeland, T. Suda, und S. Nagata (1994)

Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand.
Cell 76:969-76

Takashima, M., T. Furuta, H. Hanai, H. Sugimura, und E. Kaneko (2001)

Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils.
Gut 48:765-73

Thome, M., und J. Tschopp (2001)

Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP.
Nat Rev Immunol 1:50-8

Thompson, C.B. (1995)

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 267:1456-62

Tewari, M., und V.M. Dixit (1995)

Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product.
J Biol Chem 270:3255-60

Tombola, F., G. Del Giudice, E. Papini, und M. Zoratti (2000)

Blockers of Vac A provide insights into the structure of the pore.
Biophys J 79:863-73

Tran, S.E., T.H. Holmstrom, M. Ahonen, V.M. Kahhari, und J.E. Eriksson (2001)

MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF and TRAIL receptors.
J Biol Chem 276:16484-90

Tsujimoto, Y., and S. Shimizu (2002)

The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis.
Biochimie 84:187-93

Tummuru, M.K., S.A. Sharma, und M.J. Blaser (1995)

Helicobacter pylori picB, a homologue of the *Bordetella pertussis* toxin secretion protein, is required for induction of IL-8 in gastric epithelial cells.
Mol Microbiol 18:867-76

Turner, S., B. Kenshole, und J. Ruby (1999)

Viral modulation of the host response via crmA/SPI-2 expression.
Immunol Cell Biol 77:236-41

Uemura, N., T. Mukai, S. Okamoto, S. Yamaguchi, H. Mashiba, K. Taniyam, N. Sasaki, K. Haruma, K. Sumii, and G. Kajiyama (1997)

Effect of *Helicobacter pylori* eradication on subsequent development of cancer after endoscopic resection of early gastric cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 6:639-42

Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki, und R. Schlemper (2001)

Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer.
N Engl J Med 345:784-9

Van Doorn, L.J., C. Figueiredo, R. Sanna, M.J. Blaser, und T.L. Cover (1999)

Distinct variants of *Helicobacter pylori* cagA are associated with vacA subtypes.
J Clin Microbiol 37:2306-11

Vaux, D.L., I.L. Weissman, und S.K. Kim (1992)

Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human Bcl-2.
Science 258:1955-7

Vaux, D.L., und A. Strasser (1996)

The molecular biology of apoptosis.
Proc Natl Acad Sci USA 93:2239-44

Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R. Moritz, R.J. Simpson, und D.L. Vaux (2000)

Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.
Cell 102:43-53

Vincenz, C., und V.M. Dixit (1997)

Fas-associated death domain protein Interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/Ced-3 homologue, is proximally involved in CD95- and p55-mediated death signaling.
J Biol Chem 272:6578-83

Wagner, S., W. Beil, J. Westermann, R.P. Logan, C.T. Bock, C. Trautwein, J.S. Bleck, und M.P. Manns (1997)

Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: evidence for a major role of apoptosis.
Gastroenterology 113:1836-47

Wang, C.Y., M.W. Mayo, R.G. Korneluk, D.V. Goeddel, und A.S. Baldwin Jr. (1998)

NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.
Science 281:1680-3

Wang, J., X. Fan, C. Lindholm, M. Bennett, J. O'Connell, F. Shanahan, E.G. Brooks, V.E. Reyes, und P.B. Ernst (2000)

Helicobacter pylori modulates lymphoepithelial cell interactions leading to epithelial cell damage through Fas/Fas ligand interactions.
Infect Immun 68:4303-11

Watanabe, F.R., C.I. Brannan, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, und S. Nagata (1992)

Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.
Nature 356:314-7

Watanabe-Fukunaga, R., C.I. Brannan, N. Itoh, S. Yonehara, N.G. Copeland, N. Jenkins, und S. Nagata (1992)

The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen.
J Immunol 148:1274-9

Watanabe, T., M. Tada, H. Nagai, S. Sasaki, und M. Nakao (1998)

Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in Mongolian gerbils.
Gastroenterology 115:642-8

Werner, A.B., E. de Vries, S.W. Tait, I. Bontjer, und J. Borst (2002)
TRAIL receptor and CD95 signal to mitochondria via FADD, caspase-8/10, Bid, and Bax but differentially regulate events downstream from truncated Bid.
J Biol Chem 277:40760-7

White, E. (1996)
Life, death, and the pursuit of apoptosis.
Genes Dev 10:1-15

Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, C.A. Smith, und R.G. Goodwin (1995)
Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis.
Immunity 3:673-82

Wolf, B.B., und D.R. Green (1999)
Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.
J Biol Chem 274:20049-52

Wu, G.S., T.F. Bums, E.R. McDonald III, W. Jiang, R. Meng, I.D. Krantz, G. Kao, D.D. Gan, J.Y. Zhou, R. Muschel, S.R. Hamilton, N.B. Spinner, G.W. Markowitz, und W. El-Deiry (1997)
KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene.
Nat Gen 17:141-3

Wyllie, A.H., J.F. Kerr, und A.R. Currie (1980)
Cell death: the significance of apoptosis.
Int Rev Cytol 68:251-306

Wyllie, A. (1998)
An endonuclease at last.
Nature 391:20-1

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

Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, und J. Imanishi (1996)
Helicobacter pylori cagA gene and expression of cytokine messenger RNA of gastric mucosa.
Gastroenterology 110:1744-52

Yamaoka, Y., M. Kita, T. Kodama, N. Sawai, K. Kashima, und J. Imanishi (1997)
Induction of various cytokines and development of severe mucosal inflammation by *cagA* gene positive *Helicobacter pylori* strains.
Gut 41:442-51

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones, und X. Wang (1997)

Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked.
Science 275:1129-32

Yang, Y., S. Fang, J.P. Jensen, A.M. Weissman, und J.D. Ashwell (2000)

Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli.
Science 288:874-7

Yeh, W.C., J.L. de la Pompa, M.E. McCurrach, H.B. Shu, A.J. Elia, A. Shahinian, M. Ng, A. Wakeham, W. Khoo, K. Mitchell, W.S. El-Deiry, S.W. Lowe, D.V. Goeddel, und T.W. Mak (1998)

FADD: essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis.
Science 279:1954-8

Yin, C., C.M. Knudson, S.J. Korsmeyer, und T. Van Dyke (1997)

Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis *in vivo*.
Nature 385:637-40

Yu, J., L. Zhang, P.M. Hwang, C. Rago, K.W. Kinzler, und B. Vogelstein (1999)

Identification and classification of p53-regulated genes.
Proc Natl Acad Sci 96:14517-22

Zamai, L., M. Ahmad, I.M. Bennett, L. Azzoni, E.S. Alnemri, und B. Perussia (1998)

Natural Killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells.
J Exp Med 188:2375-2380

Zhang, Q.B., I.M. Nakashabendi, M.S. Mokhashi, J.B. Dawodu, C.G. Gemmell, und R.I. Russell (1996)

Association of cytotoxin production and neutrophil activation by strains of *Helicobacter pylori* isolated from patients with peptic ulceration and chronic gastritis.
Gut 38:841-5

Zhang, X.D., A. Franco, K. Myers, C. Gray, T. Nguyen, und P. Hersey (1999)

Relation of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor and FLICE-inhibitory protein expression to TRAIL-induced apoptosis of melanoma.
Cancer Res 59:2747-53

Zhang, X.D., A.V. Franco, T. Nguyen, C.P. Gray, und P. Hersey (2000)

Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells.
J Immunol 164:3961-70

Zhou, Q., und G.S. Salvesen (2000)

Viral caspase inhibitors CrmA and p53.
Methods Enzymol 322:143-54

Zong, W.X., L.C. Edelstein, C. Chen, J. Bash, und C. Gelinas (1999)

The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis.
Genes & Dev. 13:382-7

Zou, H., Y. Li, X. Liu, und X. Wang (1999)

An apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.
J Biol Chem 274:11549-56

10 Lebenslauf

Susanne Ledig

geboren am 12. März 1974 in Neustadt am Rübenberge

Schulische Laufbahn

- | | |
|-----------|--------------------------------|
| 1980-1984 | Grundschule in Wunstorf |
| 1984-1986 | Orientierungsstufe in Wunstorf |
| 1986-1993 | Hölty-Gymnasium in Wunstorf |

Studium

- | | |
|-----------|--|
| 1993-1999 | Studiengang „Diplombiologie“ an der Universität Hannover |
| 1998 | Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie |
| 1999 | Abschluß und Erwerb des Diploms mit der Arbeit:
„Konstruktion und Charakterisierung einer EHEC-
Hämolysin negativen Mutante eines
enterohämorrhagischen <i>E.coli</i> der Serogruppe O157:H7“ |
| seit 1999 | Studiengang „Promotion Biologie“ |

Berufliche Laufbahn

- | | |
|-----------|---|
| seit 2000 | Anstellung in der Abteilung Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover als wissenschaftliche Mitarbeiterin |
|-----------|---|

11 Publikationsverzeichnis

Ledig, S., I. Sobek-Klocke, S. Kubicka, W. Beil, J.H. Martin, G.I. Kirchner, M.P. Manns, B. Obst, und S. Wagner (2001)

The role of Bcl-2 and FADD in *Helicobacter pylori* induced apoptosis of human gastric epithelial cells.

Gastroenterology 120:A81

Martin, J.H., A. Potthoff, M. Cornberg, I. Sobek-Klocke, S. Ledig, O. Jandl, W. Beil, B. Mundt, M.P. Manns, M. Goeke, T. Gebhardt, und S. Wagner (2001)

Effect of *H. pylori* on the expression of TRAIL receptor subtypes and apoptosis in human gastric epithelial cells.

Gastroenterology 120:A81

Martin, J.H., M. Cornberg, S. Ledig, W. Beil, B. Mundt, M. Manns, und S. Wagner (2001)

Expressionsmuster der TRAIL-Rezeptorsubtypen und deren Bedeutung für die Apoptose in humanen Magenepithelzellen: Einfluß von *H. pylori*.

Z Gastroenterol 39:610

Ledig, S., A. Potthoff, J.H. Martin, B. Mundt, B. Obst, T. Wedhorn, M.P. Manns, S. Kubicka, W. Beil, und S. Wagner (2002)

Role of TRAIL receptors in *H. pylori* induced apoptosis in gastric epithelial cells.

Gastroenterology 122:A223

Ledig, S., J.H. Martin, B. Mundt, C. Athmann, S. Kubicka, T. Wedhorn, W. Beil, M.P. Manns, und S. Wagner (2002)

Rolle der TRAIL-Rezeptoren bei *Helicobacter pylori*-induzierter Apoptose in Magenepithelzellen.

Z Gastroenterol 8:634

Wedhorn, T., K. Felgenhauer, S. Ledig, J. Martin, P. Flemming, C. Athmann, M. Manns, S. Wagner, und M. Göke (2002)

Bedeutung gastraler Myofibroblasten für die Regeneration des Magenepithels.

Z Gastroenterol 8:635

Potthoff, A., S. Ledig, J. Martin, O. Jandl, M. Cornberg, B. Obst, W. Beil, M.P. Manns, und S. Wagner (2002)

Significance of the caspase family in *Helicobacter pylori* induced gastric epithelial apoptosis.

Helicobacter 7:367-77

Obst, B., S. Schütz, S. Ledig, S. Wagner, und W. Beil (2002)

Helicobacter pylori-induced apoptosis in gastric epithelial cells is blocked by protein kinase C activation.

Microb Pathog 33:167-75

Martin, J.H., A. Potthoff, S. Ledig, M. Cornberg, O. Jandl, M.P. Manns, S. Kubicka, P. Flemming, C. Athmann, W. Beil, und S. Wagner (2003)

Role of *H. pylori* in TNF related apoptosis inducing ligand and FasL mediated apoptosis in human gastric epithelial cells.

eingereicht bei Gut

12 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung der Rezeptor-vermittelten Apoptose und Aufklärung der intrazellulären Signalkaskade in *Helicobacter pylori*-induzierten, humanen Magenepithelzellen

an der Medizinischen Hochschule Hannover

unter Anleitung von Prof. Dr. W. Müller

selbständig verfaßt und keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die Arbeit wurde finanziert aus Mitteln des Sonderforschungsbereichs „Gastrointestinale Barriere“. Die vorliegende Dissertation ist von mir nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden.

Susanne Ledig