

Dirk Kuck
Dr. sc. hum.

Charakterisierung der *Helicobacter pylori*-induzierten Apoptose und Isolierung eines Apoptose-induzierenden bakteriellen Pathogenitätsfaktors

Geboren am 01.04.1969 in Mannheim
Reifprüfung am 19.05.1988 in Neckarbischofsheim
Studiengang der Fachrichtung Biologie von WS 90/91 bis WS 94/95
Vordiplom am 05.10.1992 an der Universität Heidelberg
Diplom am 04.08.1995 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med Jochen Rudi

Weltweit ist die *H. pylori* Infektion die häufigste bakterielle Infektionserkrankung. In den Entwicklungsländern findet man Infektionsraten von 70-90 %, in den westlichen Industrieländern zwischen 30-50%. Der Infektionsweg von *H. pylori* ist noch unbekannt. Es gibt Hinweise, daß die Übertragung Mensch zu Mensch entweder oral-oral oder fäkal-oral erfolgen kann. Alle mit *H. pylori*-infizierten Personen entwickeln eine entzündliche Reaktion der Magenschleimhaut (chronische Typ-B-Gastritis), auf dessen Boden später nach dem gängigen Modell Ulcus, Karzinom und MALT-Lymphom entstehen können. 70 % aller Ulcera sind Folge einer *H. pylori* Infektion und bei über 90 % aller MALT-Lymphome läßt sich eine Infektion mit *H. pylori* nachweisen. Genetische Untersuchungen der *H. pylori* Stämme führten zur Entdeckung einer besonderen Sequenz von Genen, der Pathogenitätsinsel, die einigen Stämmen fehlte. Bei Patienten mit einem Ulcus oder Adenokarzinom werden fast ausschließlich solche *H. pylori* Stämme gefunden, bei denen diese Gene vorhanden sind. Andere Untersuchungen charakterisierten ein Gen, dessen Genprodukt, das Zytotoxin VacA, *in vitro* in Epithelzellen eine intensive Vakuolisierung induziert. Klinische Untersuchungen zeigten eine Korrelation zwischen der Anwesenheit von Zytotoxin und dem Auftreten eines peptischen Ulcus. Zudem gab es vermehrt Hinweise, daß bei der Pathogenese von *H. pylori* der apoptotische Zelltod eine Rolle spielt. Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes und Bestandteil unseres Lebenszyklus. Dabei begeht eine Zelle nach einem vorhersagbaren Muster Selbstmord. Die Identifizierung von Todesfaktoren und Rezeptoren, die die Apoptose regulieren, zeigten auf, daß Apoptose auch von externen Faktoren induziert werden kann. Ein weit verbreitetes System ist das CD95-Rezeptor/ Liganden-System. Bei Aktivierung des CD95-Rezeptors formiert sich in der Zelle ein aus mehreren Proteinen bestehender Signalkomplex, der durch eine proteolytische Kaskade das Apoptose-Signal vermittelt. Genetische Defekte des *CD95*-Gens findet man auch bei Kindern. Die Patienten zeigen ein autoimmun lymphoproliferatives Syndrom mit defekter Lymphozyten-Apoptose.

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, aufzuklären, welchen Einfluss *H. pylori* auf die Viabilität der Magenkarzinomzellen nehmen kann. Weiterhin sollten die für die Induktion der Apoptose benötigten zellulären Reaktionswege und bakteriellen Faktoren identifiziert und charakterisiert werden. Dazu wurden Kulturüberstände von einem zytotoxischem (*H. p.* 60190) und einem nicht zytotoxischem (Tx30a) Referenzstamm verwendet sowie vier Magenkarzinomzelllinien. Der biologische Nachweis des Zytotoxins im Überstand bestätigte, daß nur der zytotoxische Stamm *H. p.* 60190 die Vakuolenbildung in den Zellen induziert. Dabei zeigte sich, daß die Behandlung mit zytotoxisch aktivem Überstand des *H. p.* 60190 den Zelltod zur Folge hatte. Es fand sich eine dosisabhängige, drastische Abnahme der Überlebensrate der

Zellen. Im Gegensatz dazu schien der Tx30a Überstand keinen Einfluss auf die Zellviabilität zu nehmen. FACScan-Analysen, TUNEL- und DAPI-Färbungen ergaben in allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen nur nach Behandlung mit *H.p.* 60190 Überstand. Die Rezeptor-FACScan-Analysen ergaben nach Inkubation mit dem Überstand des zytotoxischen Stamm *H. p.* 60190 und dem Zytostatikum Bleomycin eine deutliche Zunahme der CD95-Rezeptordichte auf den verschiedenen Magenkarzinomzelllinien. Wiederum konnte der Tx30a Überstand keinen messbaren Einfluss auf die Expression des CD95-Rezeptors nehmen. Die Analyse der CD95-Rezeptor und -Liganden-Expression auf transkriptioneller Ebene zeigte, daß nur eine Behandlung mit dem zytotoxischen Überstand zu einer Aktivierung der Transkription des *CD95-Rezeptor*-Gens führt. Die Transkription des *CD95-Liganden*-Gens zeigte ebenfalls eine erhöhte Aktivierung nach Behandlung mit dem *H. p.* 60190 Überstand und eine schwache Aktivierung nach Inkubation mit dem Tx30a Überstand. Die Aktivierung des CD95-Rezeptors läßt sich durch die Spaltung der Caspase-8 nachweisen, sowie durch deren spezifische Hemmung und die damit verbundene Reduzierung des apoptotischen Einflusses des zytotoxischen Überstandes. Eine Behandlung Rezeptor-stimulierter Zellen mit CD95-aktivierendem Antikörper führte zu einer Zunahme der apoptotischen Zellen. Die Blockierung des CD95-Rezeptors durch Anti-CD95- F(ab)₂ Fragment oder die Inkubation mit Caspase-8-Inhibitor konnte den apoptotischen Einfluss des *H. p.* 60190 Überstandes senken. Zur Isolierung des beteiligten bakteriellen Faktors wurde VacA aus dem Überstand entfernt, was dessen Apoptose-induzierenden Einfluß verringerte. Allerdings führte eine Behandlung mit einem rekombinanten VacA zu keiner erkennbaren Vakuolisierung in Zellen. Interessanterweise aber konnte das rekombinante VacA Apoptose induzieren.

Die Ergebnisse lassen die Schlußfolgerungen zu, daß der zytotoxische Stamm *H. p.* 60190 in Magenkarzinomzellen Apoptose induziert. In der Vermittlung der Apoptose ist das CD95-Rezeptor/Liganden-System involviert. Das Zytotoxin VacA scheint ein bakterieller Faktor zu sein, der Apoptose in den Magenkarzinomzellen induzieren kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß der apoptotische Zelltod bei der durch *H. pylori*-induzierten chronischen Gastritis bzw. in Magenkarzinomzellen von Bedeutung ist. Die Expression von CD95-Rezeptor und -Ligand auf einer Zelle und die Identifizierung eines bakteriellen, Apoptose-induzierenden Faktors, stellt einen neuen und wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der *H. pylori*-induzierten Gastritis dar. Die Bedeutung der Zytotoxins nimmt durch die erbrachten Ergebnisse an Gewicht zu.