

Andreas R. Günthert

Dr. med.

## **Die Regulation des Adh sionsverlustes epithelialer Zellen in der Apoptose**

Geboren am 06.03.1971 in Landau in der Pfalz

Reifeprüfung am 31.05.1990 in Landau in der Pfalz

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1991 bis SS 1997

Physikum am 24.03.1993 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Yogyakarta (Indonesien) und Heidelberg

Staatsexamen am 16.10.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Pathologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. P. M ller

Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der Ablösung epithelialer Zellen bei der CD95-vermittelten Apoptose zu klären. Weiterhin wurde untersucht, ob unterschiedliche Induktoren der Apoptose eventuell auch unterschiedliche Mechanismen hervorrufen. Hierfür wurde mit den Kolonkarzinom-Zelllinien HT-29 und COLO 205 als *in vitro*-Modelle für Kolon-Epithelien gearbeitet. So konnte gezeigt werden, daß eines der ersten während der CD95-vermittelten Apoptose auftretenden Phänomene der Verlust von CD44 von der Zelloberfläche durch einen proteolytischen Mechanismus darstellt, was als *Shedding* bezeichnet wird.

Die Ligation des Zelloberflächen-Rezeptors CD95 (APO-1/Fas) induziert in sensitiven Zellen Apoptose. Die Apoptose-Induktion durch Kreuzvernetzung des CD95 mittels des monoklonalen Antikörpers anti-APO-1 (Isotyp IgG3) der mit IFN- pr stimulierten adhärenten Zellen der Kolonkarzinom-Zelllinien HT-29 und COLO 205 resultierte in einer Ablösung dieser Zellen nach etwa einer Stunde Inkubationszeit. Dieser Adh sionsverlust wurde von einer erheblichen Reduktion der Oberflächen-Expression des multifunktionalen Adhäsionsmoleküls CD44 begleitet, was mit Hilfe der Durchflußzytometrie und der Immunzytologie dargestellt werden konnte. Diese Phänomene können als spezifische Mechanismen der CD95-vermittelten Apoptose betrachtet werden. Durch die Inhibition der

Protein-Synthese der Zellen mit Cycloheximid konnte objektiviert werden, daß diese Reduktion der CD44-Oberflächenexpression nicht allein auf eine Apoptose-begleitende eingestellte Protein-Synthese beruhen kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, daß der Verlust von CD44 nicht mit der Abgabe apoptotischer Partikel korreliert, da eine Inkubation der Zellen mit Cytochalasin B, welches die Bildung apoptotischer Partikel effektiv inhibiert, eine Aszension von Hyaluronat und bedingt auch von Fibronectin, sowie den Verlust von CD44 von der Zelloberfläche während der CD95-vermittelten Apoptose nicht beeinflussen konnte. Darüber hinaus konnten durch Zeit-Kinetiken und *ELISA* zunehmende Konzentrationen von löslichem CD44 im Überstand der mit anti-APO-1 behandelten Zellen nachgewiesen werden. In der Immunpräzipitation zeigte sich, daß dieses lösliche CD44 über ein um etwa 20 kDa geringeres Molekulargewicht verfügt, als die immunpräzipitierte zellulär gebundene Form. Folglich führt die CD95-induzierte Apoptose zur proteolytischen Abspaltung, dem sogenannten *Shedding*, des CD44-Moleküls. Da Protease-Inhibitoren nicht selektiv das *shedding* der CD44-Moleküle inhibierten, ohne dabei die apoptotische Kaskade zu beeinträchtigen, konnten die verantwortlichen Enzyme nicht genauer charakterisiert werden. *Shedding* ist demnach ein neuer Mechanismus der durch die Ligation von CD95 hervorgerufenen Apoptose. Induziertes CD44-*Shedding* könnte somit einen Beitrag für die aktive Desintegration sterbender Epithelzellen nach CD95-Ligation *in vivo* liefern.