

Sophie Domhan  
Dr. med.

## **Induktion von Apoptose durch Acetylsalicylsäure und *Helicobacter pylori* in Magenkarzinomzelllinien und die Bedeutung des CD95-Rezeptor/Liganden-Systems**

Geboren am 30.06.1976 in Schwäbisch Hall  
Reifeprüfung am 21.06.1995  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1996 bis WS 2002/03  
Physikum am 23.03.1998  
Klinisches Studium in Heidelberg/Montreal  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 20.05.2003 an der Universität Heidelberg

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

Die Infektion mit *Helicobacter pylori* stellt die häufigste bakterielle Infektion überhaupt dar. Sie kann zu einer Reihe von gastroduodenalen Erkrankungen führen, zu denen mittlerweile bestimmte Gastritisformen, das Ulcus ventriculi und duodeni, das Magenkarzinom und das MALT-Lymphom gezählt werden. Bei einigen Patienten kommt zu der *H. pylori*-Infektion noch ein weiterer schädigender Faktor für den Magen hinzu: sie nehmen Acetylsalicylsäure ein. ASS hemmt die Cyclooxygenase, ein Enzym, das für die Synthese von Prostaglandinen wichtig ist. Dies gilt als Ursache für die meisten unerwünschten Wirkungen von ASS. Die Infektion des Magens mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* und die Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika bzw. von ASS stellen die zwei wesentlichen Ursachen der peptischen Ulkuskrankheit in Magen und Duodenum dar. Man nimmt bisher an, dass sich die Pathophysiologie der Schädigungsmuster dabei grundsätzlich unterscheidet.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Zusammenhänge und Auswirkungen von *Helicobacter pylori* und ASS auf verschiedene Magenkarzinom-Zelllinien im Rahmen der durchgeführten Experimente genauer zu untersuchen. Dabei sollte geklärt werden, welche Bedeutung der programmierte Zelltod bei der Schädigung von Magenkarzinomzellen durch beide Agentien hat. Apoptose stellt einen physiologischen Mechanismus zur Beseitigung überschüssiger Zellen dar und wird deshalb auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Die Zelltod läuft nach einem vorhersagbaren Muster ab, das durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert wird. Das CD95-Rezeptor/Liganden-System ist dabei sehr häufig involviert. Um die Apoptoseinduktion durch ASS und *H. pylori*-Überstände des Stammes 60190 festzustellen, wurden durchflusszytometrische Analysen und DAPI-Fluoreszenzfärbungen durchgeführt. Für alle untersuchten Zelllinien ergaben die durchflusszytometrischen Analysen und die DAPI-Färbungen, dass die Inkubation mit ASS und *H. pylori* zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Steigerung der Apoptoserate führte. Die gleichzeitige Inkubation der verschiedenen Magenkarzinomzelllinien mit Acetylsalicylsäure und *H. pylori* hatte additive Wirkung. Die durchflusszytometrischen Analysen der CD95-Rezeptordichte zeigten nach Inkubation mit *H. pylori*- Überstand und Acetylsalicylsäure im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine 4-bis 9-fache Erhöhung. Diese war umso stärker, je höher die *H. pylori*-Überstands- bzw. Acetylsalicylsäure-Konzentrationen waren. Wurden die verschiedenen Zelllinien mit Acetylsalicylsäure und *H. pylori*-Überstand gemeinsam inkubiert, ergaben sich stärkere Zunahmen der Rezeptordichte als bei der Inkubation mit nur einem der beiden Elemente. Für den Nachweis des CD95-Liganden auf transkriptioneller Ebene wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR gewählt. Der Nachweis von CD95-Liganden-m-

RNA gelang, wenn die Magenkarzinomzellen mit *H. pylori*-Überstand, nicht jedoch mit Acetylsalicylsäure inkubiert worden waren. Dieses Ergebnis zeigte, dass nur *H. pylori*-Überstand in der Lage war, das CD95-Liganden-Gen zu aktivieren. In einem weiteren Versuch wurden Jurkat<sup>S</sup> (CD95 Ligand-sensibel) und Jurkat<sup>R</sup> (CD95 Ligand-resistent) Zellen mit verschiedenen ASS-Konzentrationen inkubiert, wobei ein Teil zuvor mit AGS-Zellen inkubiert worden war. Im Falle einer Induktion des CD95-Liganden durch Acetylsalicylsäure in AGS-Zellen, müsste sich dieser dann in ihrem Zellmedium befinden. In diesem Fall sollte die folgende Inkubation der Jurkat<sup>S</sup> Zellen mit diesem zellfreien Medium im Vergleich zu der direkten Inkubation mit ASS durch eine höhere Apoptoserate beantwortet werden. Es zeigte sich, dass die Apoptoserate nur unwesentlich erhöht war, wenn ASS zuvor auf AGS-Zellen gegeben worden war. Außerdem war kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen Jurkat<sup>S</sup> und Jurkat<sup>R</sup> Zellen zu erkennen. Um die Bedeutung der CD95 Hochregulation, die durch die Inkubation der Zellen mit ASS und *H. pylori*-Überstand auftrat, zu klären, wurde der CD95-Rezeptor mit anti-APO-1 blockiert. Es zeigte sich, dass die Apoptoserate drastisch sank, wenn die verschiedenen Magenkarzinomzelllinien vor der Inkubation mit *H. pylori*-Überstand mit diesem Antikörper behandelt wurden. Wurden die Zellen jedoch nach Inkubation mit dem Fab-Antikörper mit Acetylsalicylsäure behandelt zeigte sich kaum eine Änderung der Apoptoserate.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass der programmierte Zelltod eine wichtige Rolle bei der *H. pylori*-Infektion und der Einnahme von ASS spielt. Es konnte damit ein gemeinsamer Schädigungsmechanismus identifiziert werden und gezeigt werden, dass sich *H. pylori* und Acetylsalicylsäure dabei in ihrer apoptose-induzierenden Wirkung verstärken. Dem CD95-Rezeptor/Liganden-System kommt dabei entscheidende Bedeutung bei der durch *H. pylori*- induzierten Apoptose zu. Acetylsalicylsäure hingegen scheint den programmierten Zelltod zum großen Teil unabhängig vom CD95-Rezeptor/Liganden-System zu vermitteln. Die dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Einnahme von ASS bei bestehender *H. pylori*-Infektion als Risikofaktor für die Entwicklung von Ulcera im oberen Gastrointestinaltrakt zu beurteilen ist.