



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Expression und Regulation des proapoptotischen Proteins Bad in intestinalen Epithelzellen und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Autor: Andrea Bettina Berghofen
Institut / Klinik: II. Medizinische Klinik
Doktorvater: Prof. Dr. U. Böcker

Einleitung: Die genaue Ätiologie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Unter anderem wird jedoch ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Cytokinen angenommen. Eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheint Interferon- γ zu spielen. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zur Interferon- γ Wirkung konnte im Rahmen von Untersuchungen zu Apoptosemechanismen als Zufallsbefund eine Bad-Induktion in HT-29 Zellen gezeigt werden. Dieser Zufallsbefund sollte nun im Rahmen dieser Dissertation weiter analysiert werden.

Ziel: Untersuchung der Interferon- γ Wirkung (100 ng/ml) auf die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bad in etablierten Zelllinien HT-29, HT-29/MTX, CACO-2 und T-84 Zellen. Nachweis einer vermehrten Bad und Caspase-3 Expression in humanen intestinalen Gewebeproben von Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung im Vergleich zu gesunden Kontrollgewebeproben, sowie in hochentzündeten Arealen im Vergleich zu weniger entzündeten Arealen und eines Unterschiedes im Expressionsmuster der beiden Krankheitsentitäten an sich. Nachweis der Induktion des Zelltodes nach Interferon- γ Stimulation allgemein und Nachweis neuer therapeutischer Ansatzpunkte bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen zur Hemmung der Entzündungssituation.

Methodik: Zellkultur der oben genannten Zellen und anschließende Stimulation mit Interferon- γ (100 ng/ml). Etablierung einer RT-PCR zur Untersuchung einer zeitabhängigen Bad-Expression auf m-RNS Ebene nach Interferon- γ Stimulation in den oben genannten Zellen. Weiterführende Analyse der Bad-Expression nach Interferon- γ Stimulation auf Proteinebene mittels Western Blot Analyse. Immunhistochemische Untersuchung der Bad-Expression in humanen intestinalen Paraffingewebeproben bei Patienten mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung und Kontrollproben. Weiterführend folgte eine immunhistochemische Analyse des Apoptosemarkers Caspase-3. Durchflusszytometrische Analyse des Zelltodes mittels Propidiumiodid/ Annexin V-Färbung nach Interferon- γ Stimulation in den oben genannten Zellkulturlinien.

Ergebnisse: Eine Induktion des pro-apoptotischen Proteins Bad nach Interferon- γ Stimulation konnte in den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Zellen nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich sowohl auf Ebene der mRNS, als auch auf Proteinebene eine konsekutive Expression von Bad. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine unspezifische Bindung im Bereich des Gastrointestinaltraktes, so dass die oben genannten Fragen im Rahmen dieser Dissertation nicht abschließend geklärt werden konnten. Anhand der durchflusszytometrischen Analysen konnte eine Induktion des Zelltodes nach Interferon- γ Stimulation in HT-29 Zellen bereits nach 48 Stunden gezeigt werden. In den anderen Zelllinien konnte der Nachweis des Zelltodes nach Interferon- γ Stimulation erst zu späteren Zeitpunkten bestätigt werden. In HT-29 Zellen konnte mittels Western Blot Analyse anhand des Nachweises der aktivierten Caspase-3 und von PARP Spaltprodukten der Zelltod als Apoptose näher beschrieben werden.

Schlussfolgerungen: Interferon- γ scheint unterschiedliche Wirkungen in Abhängigkeit von der Zielzelle zu vermitteln. In den im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Zellen vermittelte Interferon- γ eine zeitabhängige Induktion des Zelltodes. In HT-29 Zellen konnte der Zelltod über den

Nachweis einer Induktion von Apoptosemarkern näher analysiert werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass HT-29 Zellen besonders sensibel auf eine Stimulation mit Interferon- γ reagieren. Die Vermittlung des Zelltodes nach Interferon- γ Stimulation scheint jedoch nicht über eine gesteigerte Expression des pro-apoptischen Proteins Bad vermittelt zu sein. Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten lassen den Schluss zu, dass eine Hemmung des pro-apoptischen Proteins Bad zu keiner erfolgsversprechenden Unterdrückung der Entzündungssituation bei Patienten mit einer chronischen entzündlichen Darmerkrankung führt.