

**Expression und Modulation Apoptose-induzierender Rezeptoren  
in intestinalen Epithelzellen**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

Daniela Carstens  
aus Schwerin / Mecklenburg

2007

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. F. Ruemmele
2. Gutachter: Prof. Dr. U. Spengler

Tag der Mündlichen Prüfung: 18. Januar 2007

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Michael J. Lentze

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	
1.1. Physiologische und pathologische Regulation der intestinalen Epithelzellentwicklung....	7
1.2. Rolle von Cytokinen und Wachstumsfaktoren bei der Regulation des Enterocytengewachstums.....	10
1.3. Mechanismus der Apoptose.....	14
1.4. Apoptose-auslösende Rezeptoren und ihre Liganden.....	17
1.5. Hypothesen und Ziele.....	22
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	
2.1. Modelle.....	23
2.1.1. Gewebe.....	23
2.1.2. HIEC-Zellkultur.....	23
2.2. Untersuchungsmethoden.....	24
2.2.1. Immunhistochemie.....	24
2.2.1.1. Gewebefixierung.....	24
2.2.1.2. Kryostatschnitte.....	25
2.2.1.3. Immunperoxidase-Färbemethode (Avidin-Biotin-Technik).....	26
2.2.1.4. Immunfluoreszenz-Markierung.....	29
2.2.2. FACS-Analyse.....	29
2.3. Material.....	31
2.3.1. Antikörper.....	31
2.3.2. Chemikalien.....	33
2.3.3. Rezepturen.....	34
2.3.3.1. Immunperoxidase-Markierung (Avidin-Biotin-Technik).....	35
2.3.3.2. Immunfluoreszenz-Markierung der Gefrierschnitte.....	36
2.3.3.3. Immunfluoreszenz-Markierung der HIEC-Zellen.....	37
2.3.4. Geräte.....	38

### **3. ERGEBNISSE**

3.1. Konstitutive Expression der Todesrezeptoren und ihrer Liganden unter physiologischen, nicht-entzündlichen Bedingungen.....	<b>39</b>
3.1.1. FAS-Rezeptor und FAS-Ligand.....	<b>39</b>
3.1.2. TRAIL-Rezeptoren 1-4.....	<b>43</b>
3.1.3. TRAIL.....	<b>48</b>
3.1.4. TNF-Rezeptoren p55-TNF-R1 und p75-TNF-R2.....	<b>49</b>
3.2. Expressionsmuster der TRAIL-Rezeptoren nach Stimulation durch proinflammatorische Cytokine.....	<b>51</b>
3.2.1. Stimulation mit TNF $\alpha$ .....	<b>51</b>
3.2.1.1. TRAIL-Rezeptor 1.....	<b>51</b>
3.2.1.2. TRAIL-Rezeptor 2.....	<b>54</b>
3.2.1.3. TRAIL-Rezeptor 3.....	<b>56</b>
3.2.1.4. TRAIL-Rezeptor 4.....	<b>58</b>
3.2.2. Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$ .....	<b>60</b>
<b>4. DISKUSSION.....</b>	<b>62</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>68</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>70</b>
<b>7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>8. DANKSAGUNG.....</b>	<b>83</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethyl-carbazol
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AIF	apoptose-induzierender Faktor
Apaf	Apoptose-Protease-aktivierender Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
bak	bcl-2 homologous antagonist / killer
bax	bcl-2 associated x protein
bcl	B-cell lymphomal leucemia
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
CMF-PBS	calcium-magnesium-free PBS
DAB	3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
Dabco	1,4-Diazobicyclooctan
DcR	decoy receptor
DD	death domain
DED	death effector domain
DISC	death inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	deoxyribonucleic acid
DR	death receptor
EGF	epidermal-growth-factor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FADD	FAS-associated death domain
FAS	fibroblast-associated
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICE	FADD-like ICE
FSC	forward light scatter
GALT	gut-associated-lymphoid-tissue
HIEC	human intestinal epithelial cell

HRP	horse radish peroxidase
ICE	Interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme
IL-1 $\beta$	Interleukin-1
mRNA	messenger-ribonucleic acid
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NGF	nerve-growth-factor
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PS	Phosphatidylserin
PVP	Poly-Vinyl-Pyrrolidon
RT-PCR	reverse-transcriptase-polymerase chain reaction
SSC	side scatter
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGF	transforming-growth-factor
TRADD	TNF-receptor-associated death domain
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
UV	ultraviolett

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Physiologische und pathologische Regulation der intestinalen Epithelzellentwicklung

Das intestinale Epithel stellt eine sehr hochdynamische Zellpopulation dar. Unter physiologischen Bedingungen kommt es innerhalb von 48 bis 96 Stunden zu einer vollständigen Erneuerung des Darmepithels (Potten et al., 1992). In der Tiefe der Krypten sind unreife, undifferenzierte Stammzellen mit einer hohen Mitosekapazität lokalisiert. Verschiedene Studien, welche insbesondere die Eigenschaften der Stammzellpopulation innerhalb der intestinalen Krypten untersuchten, belegen, dass pro Krypte eine Population ihren Ausgang von einer bis zu vier Stammzellen nimmt (Bjerknes und Cheng, 1981; Gordon, 1989; Inoue et al., 1988; Podolsky et al., 1993). Stammzellen zeichnen sich generell durch eine asymmetrische Zellteilung aus, wobei eine Tochterzelle die ursprüngliche Stammzelle ersetzt, und die andere in den Reifungsprozess und die terminale Differenzierung übergeht. Die Tochterzellen differenzieren auf ihrer Wanderung zur Zottenspitze schrittweise zu einem der vier verschiedenen Zelltypen des Darmepithels: Enterocyt, Becherzelle, enteroendokrine Zelle und Paneth-Körnerzelle.

Bei Erreichen der Zottenspitze gehen die hochdifferenzierten, postmitotischen Zellen schließlich durch Apoptose, einem programmierten, physiologischen Zelltod, zugrunde und werden in das Darmlumen abgeschilfert (Hall et al., 1994; Iwanaga et al., 1993; Potten et al., 1992; Sträter et al., 1995). Auf diese Weise werden täglich etwa 250 g Epithelzellen abgesondert (Junqueira und Carneiro, 1996). Der normale Lebenslauf einer intestinalen Epithelzelle ist somit durch die Sequenz Proliferation-Differenzierung-Apoptose während der Migration entlang der Krypten-Zotten-Achse charakterisiert.

Eine regelrechte Morphologie und eine normale Funktion des Darmes werden durch ein ausgewogenes Gleichgewicht der Zelltypen sowie der zahlenmäßigen Zusammensetzung aus unreifen, proliferierenden Kryptenzellen und hochdifferenzierten, absorbierenden Enterocyten bestimmt (Ruemmele und Seidman, 1998). Es ist daher eine exakte Balance zwischen Proliferation, Enterocytendifferenzierung und -maturation sowie Zelltod durch Apoptose notwendig.

Übermäßiger oder beschleunigter Zelluntergang führt über einen Mangel reifer, absorbierender Enterocyten zu einer Zottenatrophie mit Krankheitszeichen der Malabsorption. Dagegen mündet eine unkontrollierte Proliferation von Kryptenzellen in eine Entwicklung pathologischer Kryptenhyperplasien. Diese kann zu einer verstärkten Sekretion und Diarrhoe führen, wie auch auf lange Sicht das Risiko einer malignen Entartung erhöhen (Cross und Dexter, 1991).

Ein rascher Zellumsatz einerseits durch eine hohe mitotische Aktivität mit anschließender Differenzierung der Zellen und andererseits einer systemischen Elimination durch Apoptose bewahrt vor einer Anhäufung mutierter, möglicherweise zu malignen Veränderungen der Darmschleimhaut führenden Zellen (Podolsky et al., 1993). Die permanente Exposition des Darmepithels mit verschiedenen Mutagenen aus dem Darmlumen kann potentiell zur Tumorgenese beitragen. Somit ist es unabdingbar, dass der Darm potente Schutzmechanismen entwickelt hat. Um ein hinreichend funktionelles Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Maturation der Enterocyten sowie deren Zelltod durch Apoptose zu schaffen, muss ein wirksames und sehr engmaschig reguliertes Kontrollsystem existieren.

Der streng regulierte Ablauf von Proliferation, Differenzierung und Apoptose entlang der Krypten-Zotten-Achse kann, wie unter verschiedenen pathologischen Bedingungen beobachtet wird, auf unterschiedlichen Ebenen gestört sein (Leichtner et al., 1996a, b; McCullen et al., 1997; Moss et al., 1996). Bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, deren Pathophysiologie bislang nicht vollständig bekannt ist, besteht beispielsweise eine signifikante Dysregulation des intestinalen Zellumsatzes.

Die beiden bekanntesten Subtypen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, sind durch eine entzündliche Destruktion der Darmschleimhaut charakterisiert. Während bei Colitis ulcerosa der Entzündungsprozess kontinuierlich vom Rektum aus aufsteigend verläuft und auf das Colon beschränkt bleibt, kann bei Morbus Crohn jeder Abschnitt des Verdauungstraktes, vom Mund bis zum Anus, betroffen sein. Beide Formen entzündlicher Darmerkrankungen können mit zahlreichen extraintestinalen Manifestationen an Haut (Erythema nodosum, Pyoderma gangraenosum), Gelenken und Augen (Conjunctivitis, Iritis) einhergehen. Bei Crohn-Patienten ist bevorzugt die Ileozökalregion durch den chronisch-granulomatösen Entzündungsprozess betroffen. Dieser führt oft zu charakteristischen und komplikationsträchtigen Stenosisierungen der entsprechenden Darmabschnitte. Die bei Morbus Crohn vorliegende, transmural unterschiedlich tiefe Penetration der Darmwand, die u. U. auch zu Komplikationen in

Form von Darmfisteln und -perforationen führt, steht der Ulzeration lediglich von Mucosa und Submucosa und somit im Vordergrund stehenden Blutungen bei Colitis ulcerosa gegenüber.

Morphologisch fallen eine enorm gesteigerte Anzahl untergehender Darmepithelzellen sowie bedeutende entzündliche Infiltrate der Lamina propria in Form aktivierter Lymphocyten, Neutrophiler und Monocyten im Gebiet der akuten Entzündung auf. Weiterhin sind häufig im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen die Krypten elongiert, was auf eine kompensatorische Hyperproliferation hinweist.

Andere Analysen zeigen, dass der Untergang der Darmepithelzellen bei diesen immunvermittelten Darmerkrankungen vorzugsweise durch Apoptose eingeleitet wird. Während unter physiologischen Umständen sich apoptotische Zellen lediglich an der Zottenspitze bzw. der Kryptenoberfläche befinden, werden bei Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen apoptotische Intestinalzellen in großer Anzahl entlang der Krypten-Zotten-Achse gefunden (Iwamoto et al., 1996; Sträter et al., 1997). Dieses pathologisch gehäufte Auftreten eines verfrühten Zelltodes der sich noch in der Differenzierungsphase befindlichen Enterocyten durch Apoptose in Verbindung mit einer exzessiven Proliferation der Stammzellen führt zu einem quantitativen Überwiegen der unreifen Kryptenepithelzellen. Somit kommt es zu einem funktionellen Verlust der regelrechten Absorptionskapazität der Darmmucosa und einer veränderten Sekretion von Flüssigkeit sowie Elektrolyten (Weaver, 1996). Klinisch manifestiert sich diese Veränderung beim Patienten in Form von Diarrhoe und in Extremfällen auch Malabsorption, verbunden mit abdominellen Krämpfen und Schmerzen.

Als dominierender Pathomechanismus wird eine Immundysregulation diskutiert, welche durch exogene Faktoren getriggert zu einem chronischen, inflammatorischen Prozess im intestinalen Mikrokompartment führt (Bouma und Strober, 2003; Monteleone et al., 2002). Hierbei fällt der kommensalen Darmflora eine Schlüsselrolle zu. Außerdem werden veränderte Ernährungsgewohnheiten oder Hygienebedingungen in der Kindheit, eine persistierende virale Vaskulitis nach einer Masern-Infektion und mykobakterielle Infektionen als hypothetische exogene Trigger einer Immundysregulation angenommen (Fiocchi, 1998). Mit der Entdeckung der Mutationen im CARD15/NOD2-Gen bei einer Subgruppe von Crohn-Patienten eröffnete sich erstmals ein direkter molekularer Hinweis auf eine Prädisposition für eine Erkrankung an Morbus Crohn (Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001).

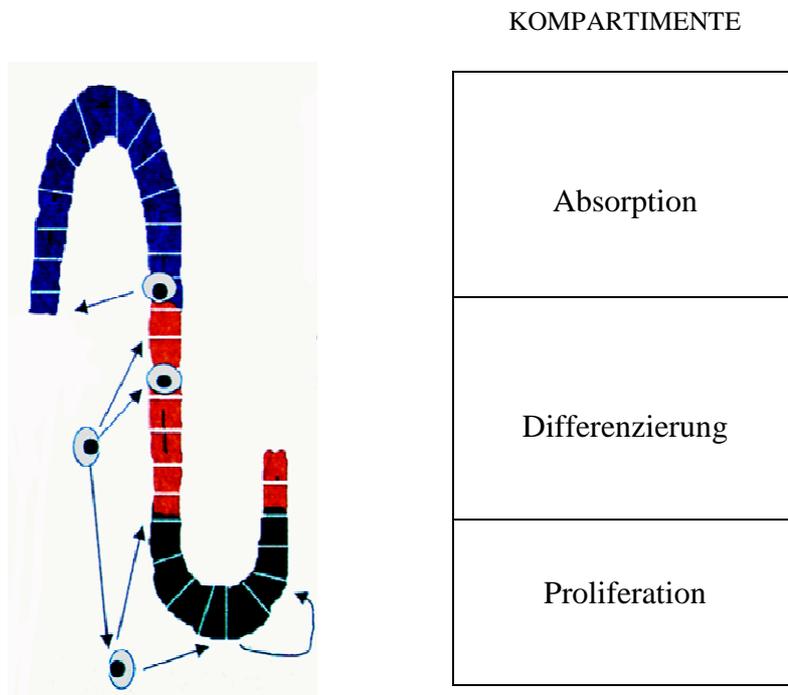
## **1.2. Rolle von Cytokinen und Wachstumsfaktoren bei der Regulation des Enterocytenwachstums**

Der physiologische intestinale Epithelzellumsatz wird von einem sehr empfindlichen Gleichgewicht zwischen wachstumsstimulierenden und -inhibierenden Faktoren wie Hormonen, Wachstumsfaktoren, Cytokinen, luminalen Nährstoffen und mesenchymalen Strukturen bestimmt (Ferreti et al., 1996; Podolsky et al., 1993; Ruemmele und Seidman, 1998). Im Vordergrund stehen hier besonders die den Zellumsatz im Darmepithel regulierenden proinflammatorischen Cytokine.

Als Cytokine wird eine Vielzahl unterschiedlicher von verschiedenen Zellarten gebildete und sezernierte Substanzen, die als interzelluläre Mediatoren zur Aktivierung von Zellen beitragen, bezeichnet. Diese heterogene Gruppe multifunktionaler Botenstoffe steuert immunologische und entzündliche Prozesse wie auch multiple Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Mosmann, 1996). Entsprechend ihrer dominierenden Rolle können Cytokine, welche in erster Linie den immunkompetenten Zellen entstammen, pro- und antiinflammatorischen Cytokinen zugeordnet werden. Eine weitere funktionelle Einteilung der Cytokine unterscheidet drei Fraktionen: Cytokine mit Einfluss auf Proliferation und Differenzierung (Interferone, Interleukine, Wachstumsfaktoren), Cytokine zur Steuerung von Zellbewegungen (Chemokine) und Cytokine mit Kontrollfunktion über Proliferation und Apoptose. In der letzteren Gruppe werden die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Familie und die transforming-growth-factor (TGF)-Familie zusammengefasst.

Im Darm besteht eine enge lokale Beziehung zwischen intestinalen Epithelzellen und ortsständigen immunkompetenten Zellen der Lamina propria und intraepithelialen Lymphocyten. Diese Zellen bilden zusammen mit den in den Peyer-Plaques des Ileums ansässigen Zellen das gut-associated-lymphoid-tissue (GALT). Dieses stellt sowohl unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen eine wichtige Cytokinquelle dar. Offensichtlich produzieren und sezernieren Enterocyten einen beträchtlichen Anteil der Cytokine selbst (Jung et al., 1995; Suemori et al., 1991). Diese gelangen dann über einen autokrinen bzw. parakrinen Mechanismus zur Wirkung und ermöglichen ein weiträumiges, bidirektionales Kommunikationsnetz zwischen Epithelzellen und immunkompetenten Zellen. Die komplexe Interaktion zwischen benachbarten Enterocyten sowie von Lymphocyten mit Enterocyten über Cytokine und Wachstumsfaktoren

wird als essentielle Grundlage für ein physiologisches Gleichgewicht der Enterocytenzahl und ihrer Funktion angesehen (*Abbildung 1*; Ruemmele und Seidman, 1998).



**Abbildung 1:** **physiologische Krypten-Zotten-Architektur:** strenge Regulation des Epithelzellumsatzes durch Präsenz verschiedener Wachstumsfaktoren und Cytokine, welche durch intraepitheliale Lymphocyten, intestinale Epithelzellen und T-Zellen der Lamina propria ausgeschüttet werden

Als ein für die Stammzellen spezifischer Wachstumsfaktor konnte  $TGF\alpha$  bestimmt werden. Als hochpotentes Cytokin, welches in großen Mengen durch die Darmepithelzellen selbst produziert wird, induziert er sowohl auf autokrinem als auch auf parakrinem Weg die Proliferation des Darmepithels (Coffey et al., 1986; Koyama und Podolsky, 1989; Oliver et al., 1995; Podolsky et al., 1993; Suemori et al., 1991).  $TGF\alpha$  bindet an den auf der basalen sowie basolateralen Enterocytenmembran lokalisierten Rezeptor für den epidermal-growth-factor (EGF) (Scheving et al., 1989). Seine strukturelle Homologie zu EGF erklärt seine Funktion als physiologischer Ligand dieses Rezeptortyps und somit auch seine induzierende Wirkung auf die Zellproliferation

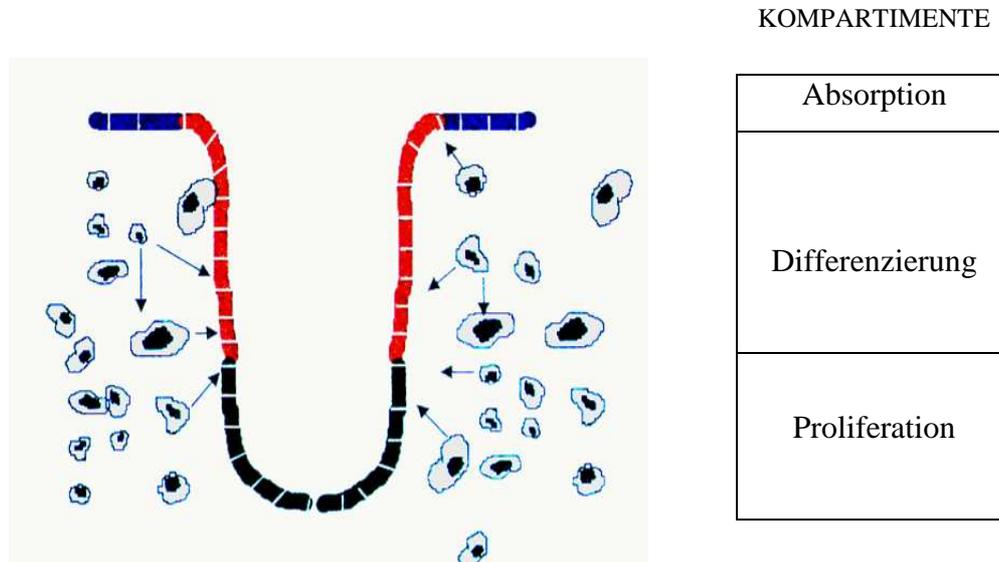
(Winkler et al., 1989). Die Expression von TGF $\alpha$ -mRNA wird durch den strukturverwandten EGF bewirkt (Suemori et al., 1991).

Dagegen stellt der ebenso durch Enterocyten produzierte TGF $\beta$  einen sehr potenten Inhibitor der intestinalen Kryptenzellproliferation dar (Barnard et al., 1989; Kurokawa et al., 1987; Ruemmele et al., 1998). Es besteht ein spezifisches Expressionsmuster für TGF $\beta$  entlang der Krypten-Zotten-Achse, welches von den Kryptenzellen aus stetig bis zu einer maximalen Konzentration in Enterocyten der Zottenspitze verstärkt ausfällt (Barnard et al., 1989). Dieses Verteilungsmuster erklärt die zunehmend verstärkte Hemmung des Enterocytenwachstums über einen Mechanismus mit negativer Rückkoppelung, sobald eine entsprechende Zahl reifer Enterocyten den basalen Schleimhautabschnitt verlässt. TGF $\beta$  induziert in den Kryptenzellen seine eigene Expression und eine Suppression der TGF $\alpha$ -Expression, was den selbstverstärkenden Effekt dieses wachstumshemmenden Faktors verdeutlicht. Auch die Expression von TGF $\beta$  wird durch EGF stimuliert.

Insgesamt lässt sich durch EGF ein selbstverstärkender proliferativer Effekt über TGF $\alpha$  beobachten, der letztendlich durch die simultane Induktion des Gegenspielers TGF $\beta$  herunterreguliert wird (Suemori et al., 1991). TGF $\beta$  spielt darüber hinaus eine bedeutende Rolle bei der Restitution des Darmepithels nach Zellschädigungen. Das Cytokin leitet durch eine gesteigerte Einwanderung vitaler Zellen aus Regionen außerhalb der Verletzung die Erneuerung des Darmepithels ein (Ciacci et al., 1993). In-vivo-Beobachtungen zeigten, dass die Erholung innerhalb von Minuten bis Stunden einsetzt. Dieses verdeutlicht die erstaunliche Reparaturkapazität hinsichtlich des Aufbaus einer intakten epithelialen Barriere, einer essentiellen Eigenschaft zur Erhaltung einer regelrechten Organfunktion. Die Geschwindigkeit dieser Reparaturmechanismen lässt vermuten, dass eine Zellproliferation nicht notwendig ist (Lacy, 1988; Silen, 1987). Wachstumsfaktoren wie TGF $\alpha$ , EGF, Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sowie verschiedene Fibroblasten-Wachstumsfaktoren bewirken ebenso eine Gewebeheilung über diesen TGF $\beta$ -abhängigen Weg (Dignass und Podolsky, 1993; Dignass et al., 1994).

Eine ausgeprägte Abweichung der lokalen Cytokinproduktion bzw. -wirkung, die im Rahmen immunvermittelter pathologischer Bedingungen etwa bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beobachtet wird, wird für eine Induktion morphologischer Veränderungen der Darmmucosa und eine resultierende Dysfunktion mitverantwortlich gemacht (Fais et al., 1991; Fiocchi, 1998; MacDonald et al., 1990; Sartor, 1995). Im Rahmen dieser entzündlichen Darmerkrankungen werden der verstärkte Umsatz der Epithelzellentwicklung und die hohe Apoptoserate durch

Cytokine, welche lokal aus infiltrierenden Entzündungszellen freigesetzt werden, vermittelt (**Abbildung 2**; Baumgart et al., 1998; Fiocchi, 1998; Rummel und Seidman, 1998).



**Abbildung 2:** pathologische Krypten-Zotten-Architektur im Rahmen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen: ausgeprägte Zottenatrophie und kompensatorische Kryptenhyperplasie - die absorbierende Enterocyteneroberfläche ist zugunsten der unreifen Kryptenetage extrem verkümmert

Die physiologische Induktion der Apoptose einer intestinalen Epithelzelle bei Erreichen der Zottenspitze ist weitgehend ungeklärt. Faktoren wie TGF $\beta$ , welche Differenzierungs- und Reifungsprozesse entscheidend beeinflussen, werden als potentielle Auslöser für den ultimativen Zelltod betrachtet (Kurokawa et al., 1987). Die rasante Apoptose von Epithelzellen aus Magen- und Colontumor-Zelllinien (VACO-330) nach Stimulation mit TGF $\beta$  unterstützt diese Hypothese (Wang et al., 1995; Yanagihara und Tsumuraya, 1992). Die zunehmende TGF $\beta$ -Konzentration entlang der Krypten-Zotten-Achse verleitet zu Spekulationen über die physiologische Rolle dieses Cytokins, nämlich ob TGF $\beta$  abgesehen von seinen antiproliferativen Eigenschaften die Apoptose reifer Enterocyten triggert.

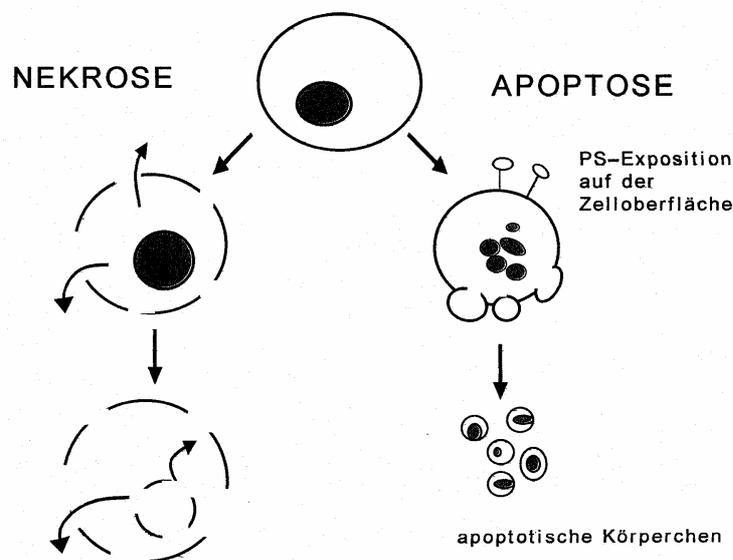
### 1.3. Mechanismus der Apoptose

Die Apoptose, auch als programmierter Zelltod bezeichnet, wird als wichtiges physiologisches Gegenstück der Mitose angesehen (Saikumar et al., 1999). Die empfindlich eng regulierte Balance zwischen beiden Zellvorgängen garantiert die Homöostase in Geweben mit hoher Umsatzrate wie beispielsweise dem Darmepithel. Im Immunsystem ist Apoptose einer der Hauptmechanismen, über den potentiell autoreaktive Zellen gezielt entfernt werden (van Parijs und Abbas, 1998). Die Apoptose kann als „Selbstmordprogramm“ einer Zelle angesehen werden, welches durch äußere Faktoren innerhalb von Minuten bis Stunden in Gang gesetzt werden kann (Green, 1998). Die Existenz eines effizienten Kontrollapparates, der eine vorzeitige Auslösung des Zelltodes verhindert, wird vorausgesetzt.

Die Apoptose wird als Zelltod einzelner Zellen in einem Gewebe angesehen und ist das Resultat eines zelleigenen und energieabhängigen Selbstzerstörungsprozesses. Charakterisiert ist diese Form des Zelltodes durch eine Schrumpfung der Zelleichen, weshalb dieser Zelluntergang auch Schrumpfnekrose genannt wird. Die Apoptose wird im Gegensatz zur klassischen Gewebenekrose nie von einer Entzündung des umgebenden Gewebes begleitet und spielt sich nie an größeren Zellverbänden, sondern immer nur an einzelnen Zellen ab. Dieses Phänomen hat diesem disseminierten Zellprozess auch seinen Namen eingebracht – der Untergang der einzelnen Zellen im Rahmen der Apoptose (gr.: abfallen) gleicht hier dem Abfallen einzelner dürrer Blätter von einem herbstlichen Baum.

Als frühestes morphologisches Merkmal „verklumpt“ das Chromatin entlang der infolge Schrumpfung gefältelten Kernmembran (Karyopyknose). Durch DNA-Spaltung entstehen Fragmente mit einer Länge von 180 Basenpaaren bzw. ganzzahliger Vielfacher: sie ergeben bei der Elektrophorese die für eine Apoptose charakteristische DNA-Leiter. Die Zellkontakte lösen sich auf, Mikrovilli und Zellausläufer verschwinden. Die über lange Zeit intakte Zellmembran verhindert die Leckage von potentiell entzündungsfördernden cytoplasmatischen Enzymen und Proteinen. Dagegen ist die Nekrose durch Schwellung des Zellkörpers bis zur Membranruptur gekennzeichnet, es resultiert dann eine unkontrollierte Entzündungsreaktion des umgebenden Gewebes. Bei der Apoptose wird schließlich Phosphatidylserin (PS), welches normalerweise in der inneren Plasmamembranschicht lokalisiert ist, getriggert durch eine spezifische Flippase an die äußere Oberfläche externalisiert (Fadok et al., 1992). Dieses lockt Makrophagen an, die diese

markierten Zellen durch Phagocytose eliminieren. Es erfolgt außerdem die Ausstülpung von Cytoplasmablasen an der Zelloberfläche, die sich von der Zelle als Apoptosekörper ablösen können (**Abbildung 3**). Später wird das Zisternensystem des endoplasmatischen Retikulums erweitert und fragmentiert. Die strukturell noch weitgehend intakten Mitochondrien weisen flockige Verdichtungen auf. Die Apoptosekörper sowie die schrumpfnekrotischen Zellen werden entweder in ein Drüsenlumen abgestoßen oder werden von umliegenden Zellen phagocytiert (Riede und Schaefer, 1995).



**Abbildung 3:** Nekrose versus Apoptose: im Gegensatz zur Nekrose fehlt bei der Apoptose die reaktive Begleitentzündung mit umliegender Gewebeschädigung

Im Ablauf der Apoptose kann eine Initiationsphase, eine Effektorphase und eine Exekutionsphase unterschieden werden. In jeder dieser Phasen erfolgt die Aktivierung oder Deaktivierung bestimmter Proteine. Das Überschreiten bestimmter Stufen der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle macht die Apoptose zu einem irreversiblen Vorgang. Zumeist liegt diese bis zu einem gewissen Grad auch zelltypische Stufe in der Effektorphase. Die Initiationsphase, auch „private pathway“ genannt, gilt, gefolgt von der Effektorphase, als variabelste Phase. Dagegen ist der Verlauf der Exekutionsphase weitgehend zelltypunabhängig (Kroemer et al., 1997).

Ein wichtiger Mechanismus bei Einleitung der Apoptose stellt die intrazelluläre Caspase-Kaskade dar (Green und Reed, 1998; Nagata, 1997). Sie umfasst bisher eine Gruppe von 14 verschiedenen *Cysteiny-Aspartasen*, einkettige cytoplasmatische Proenzyme, welche einen Cystein-Rest in ihrem aktiven Zentrum enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Die Enzyme sind nach dem Zeitpunkt ihrer Erstbeschreibung durchnummeriert. Die als erste identifizierte Protease (Caspase-1) ist das Interleukin-1 $\beta$ -konvertierende Enzym, das Pro-Interleukin-1 $\beta$  in seine aktive Form spaltet (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Mitglieder der Enzymgruppe werden deswegen auch als ICE (Interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme)-ähnliche Proteasen bezeichnet (Miller et al., 1997). Alle Caspasen haben eine große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität (Cohen, 1997; Salvesen und Dixit, 1997; Villa et al., 1997).

Proapoptotische Stimuli aktivieren schrittweise die spezifischen Caspasen durch proteolytische Spaltung, die entstehenden Untereinheiten formen daraufhin Tetramere. Man unterscheidet Initiatorcaspasen, welche ihre eigene Spaltung bewirken können und somit autokatalytisch sowie als eigenes Substrat fungieren, von Effektorcaspasen. Die insbesondere nach Stimulation des Apoptose-auslösenden FAS (*f*ibroblast-*a*ssociated)-Rezeptors aktivierte Procaspase-8 besitzt eine niedrige Protease-Aktivität. Nach Oligomerisierung des aktivierten FAS-Rezeptors erfolgt die Rekrutierung mehrerer Procaspase-8-Moleküle, so dass lokal eine hohe Konzentration entsteht, die für die gegenseitige Spaltung der Moleküle ausreichend ist. Die Überexpression der einzeln nur schwach aktiven Procaspase-8 ist damit ausreichend, eine Apoptose auszulösen (Hengartner, 1998). Die autokatalytisch aktivierten Caspasen spalten im weiteren Verlauf des apoptotischen Prozesses die Effektorcaspasen in ihre aktive Form. Neben einer Effektverstärkung erlaubt eine derartige mehrstufige Signalkaskade eine engmaschige Kontrolle und Regulation der Apoptose. Die Enzymkaskade bewirkt letztendlich die proteolytische Spaltung verschiedener essentieller Schlüsselsubstrate, was den definitiven apoptotischen Zelltod bewirkt (Thornberry und Lazebnik, 1998).

Eine Schlüsselstellung bei der Regulation der Apoptose nehmen die Mitochondrien ein. Als frühes Merkmal der Apoptose, das bei Induktion durch UV- oder Gammastrahlung sowie durch Dexamethason bei Thymocyten und Lymphocyten beobachtet werden kann (Green und Reed, 1998), wird die Unterbrechung des mitochondrialen Transmembranpotentials durch Öffnung von Megaporen eingeordnet (Marchetti et al., 1996). Dabei wird mitochondriales Cytochrom c ins

Cytoplasma freigesetzt, welches daraufhin durch Interaktion mit dem Apoptose-Protease-aktivierenden Faktor (Apaf)-1, Procaspase-9 (Apaf-3) und ATP einen Komplex ausbildet, der als Apoptosom bezeichnet wird. Aus diesem geht die aktivierte Caspase-9 als Initiator der Caspase-Kaskade hervor (Kroemer et al., 1997; Li et al., 1997; Zou et al., 1997). Der Elektronencarrier der Atmungskette Cytochrom c trägt in diesem Zusammenhang auch die Bezeichnung Apaf-2. Nach der folgenden Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus dem mitochondrialen Intermembranraum schließt sich seine Translokation in den Nucleus an, was die Kondensation des Chromatins und schließlich den DNA-Abbau einleitet (Susin et al., 1999).

Wichtige Regulatoren der Apoptose-Induktion sind verschiedene Proteine der bcl-2-Familie, wobei pro- und antiapoptotische Mitglieder unterschieden werden. Sie sind hauptsächlich in der äußeren Mitochondrienmembran, aber auch in der Kernmembran und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (Green, 1998). Diese Proteine bilden Heterodimere aus je einem pro- und einem antiapoptotischen Mitglied aus, wobei eine gegenseitige Beeinflussung ihrer Funktion resultiert. Bcl-2 und bcl-xl blockieren als antiapoptotische Faktoren die Freisetzung von Cytochrom c und AIF, dagegen sind bax, bak sowie bcl-xs wichtige proapoptotische Moleküle (Adams und Cory, 1998). Durch Homodimerisierung werden Ionenkanäle ausgebildet, die über eine Leckage der äußeren Membran eine Funktionseinschränkung der Mitochondrien verursachen und außerdem die Freisetzung von Cytochrom c und AIF erlauben (Antonsson et al., 1997; Jurgensmeier et al., 1998; Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997).

#### **1.4. Apoptose-auslösende Rezeptoren und ihre Liganden**

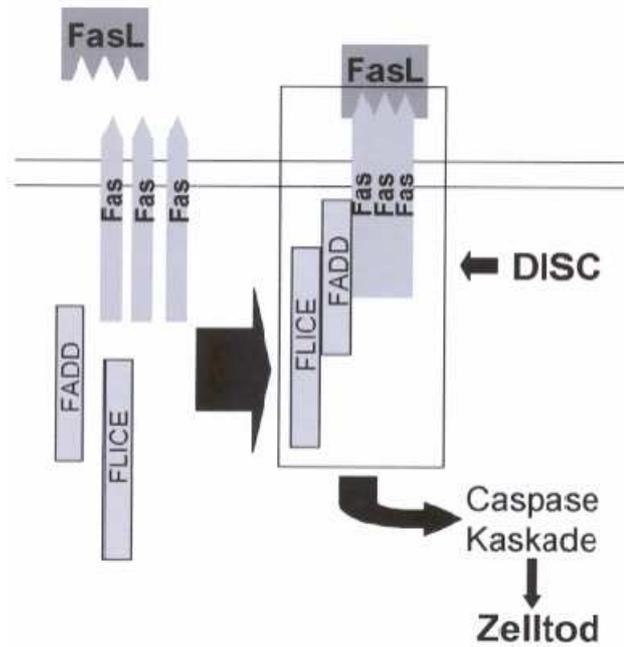
Ein Mechanismus zur schnellen und selektiven Entfernung von Zellen durch Apoptose verläuft über die Aktivierung von speziellen Zelloberflächenrezeptoren, die das apoptotische Signal nach Kontakt mit spezifischen Liganden in das Zellinnere leiten. Diese strukturell verwandten Rezeptoren können auf der Oberfläche nahezu aller Körperzellen nachgewiesen werden und gehören zur Familie der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptoren. Sie sind Typ-I-Membranproteine und neben einer Transmembrandomäne durch eine zwei- bis sechsfache Wiederholung einer cysteinreichen Subdomäne im Extrazellularraum charakterisiert (Ashkenazi und Dixit, 1998; Nagata, 1997). Die sogenannten Todesrezeptoren (death receptors, DR) der TNF-Rezeptor-

Familie sind durch eine identische intracytoplasmatische Todesdomäne (death domain, DD) aus etwa 80 Aminosäuren gekennzeichnet. Typische Vertreter dieser Gruppe sind der TNF-Rezeptor p55-TNF-R1, der FAS-Rezeptor sowie die TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*)-Rezeptoren R1-4 (Itoh et al., 1991; Nagata und Golstein, 1995).

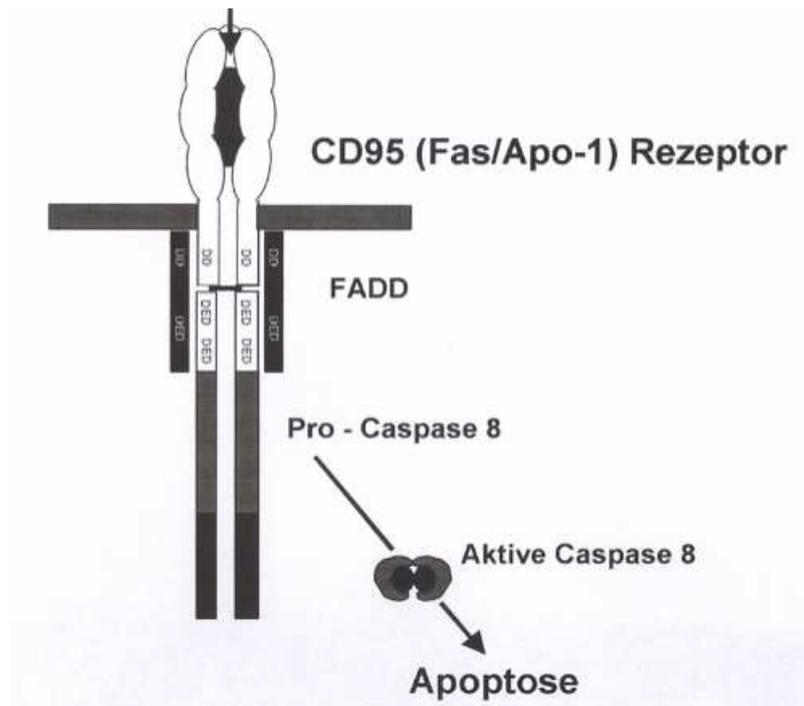
Die spezifischen Liganden für diese Rezeptoren sind Typ-II-Transmembranproteine mit einem C-terminalen Homologiebereich aus etwa 150 Aminosäuren und werden in die Gruppe der Cytokine eingeordnet: TNF, überwiegend von aktivierten Makrophagen und lymphoiden Zellen produziert, bindet an die entsprechenden TNF-Rezeptoren, der durch aktivierte T-Lymphocyten und natürliche Killerzellen synthetisierte FAS-Ligand reagiert mit dem FAS-Rezeptor, und die TRAIL-Rezeptoren gehen eine Bindung mit dem TNF-related-apoptosis-inducing-ligand (TRAIL) ein.

Die Bindung des natürlichen Liganden oder eines agonistischen Antikörpers induziert eine Trimerisierung der Rezeptorstrukturen (**Abbildung 4**; Gruss und Dower, 1995, Smith et al., 1994). Daraufhin wird ein cytoplasmatisches Effektor- bzw. Adaptermolekül mit einer korrespondierenden Todesdomäne an die intrazelluläre DD des Rezeptors angelagert (Hsu et al., 1995). Ein solches DD-enhaltendes Adapterprotein ist das FAS-associated-death-domain (FADD)-Protein (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1995). Es enthält eine C-terminale DD und N-terminal eine death-effector-domain (DED). Diese bindet wiederum an die analoge Domäne einer inaktiven Interleukin-1 $\beta$ -konvertierenden-Enzym (ICE)-ähnlichen Protease, die auch FADD-like ICE (FLICE) genannt wird und der Caspase-8 entspricht (Alnemri et al., 1996; Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Srinivasula et al., 1996). Zusammen mit dem Rezeptor bildet diese Proteingruppierung einen death-inducing-signaling-complex (DISC), in dem Caspase-8 eine Konformationsänderung erfährt, die ihre Autokatalyse und Freisetzung aus dem Komplex zur Folge hat (Medema et al., 1997). Schließlich wird durch die kaskadenartige Aktivierung der verschiedenen Caspasen die Spaltung spezifischer Substrate eingeleitet, die zu den typischen morphologischen Veränderungen apoptotisch sterbender Zellen führt (Nicholson und Thornberry, 1997; Villa et al., 1997).

a)

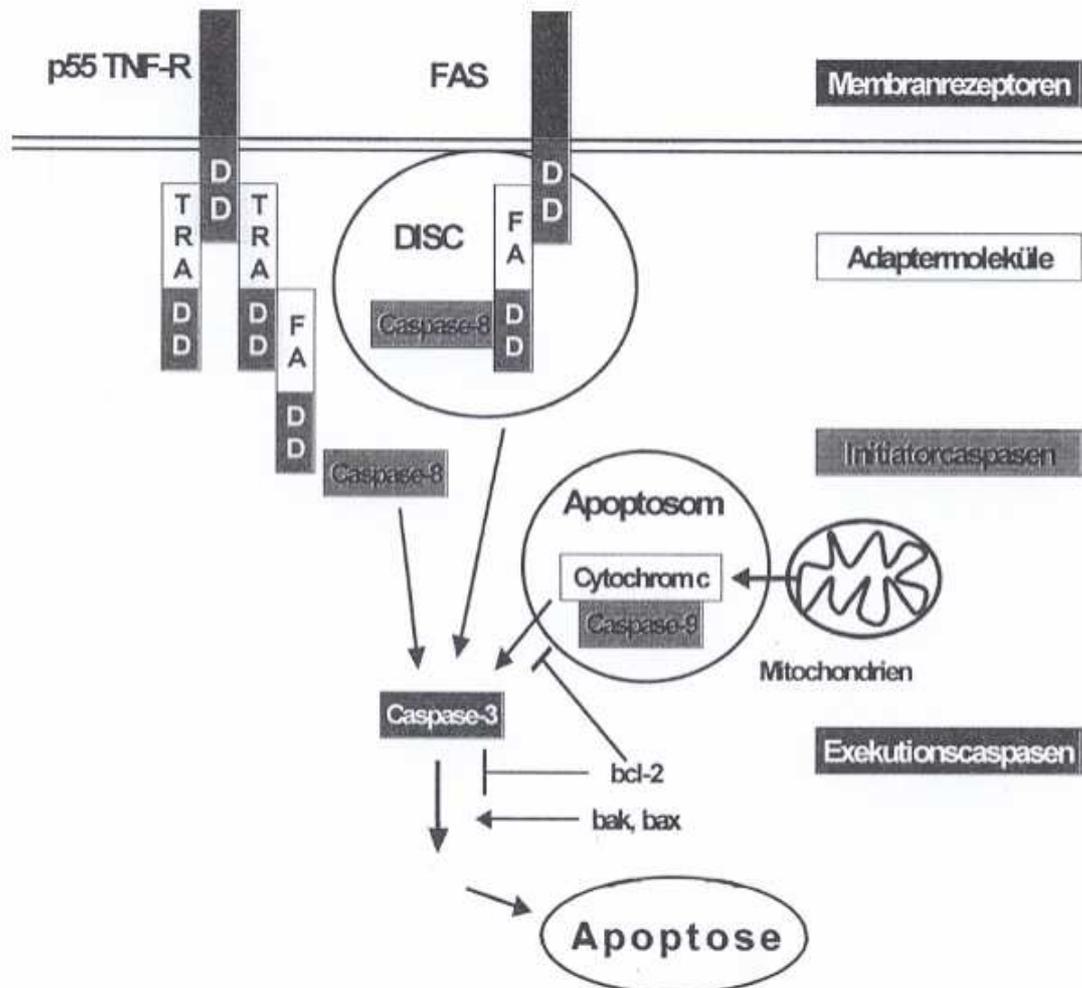


b)



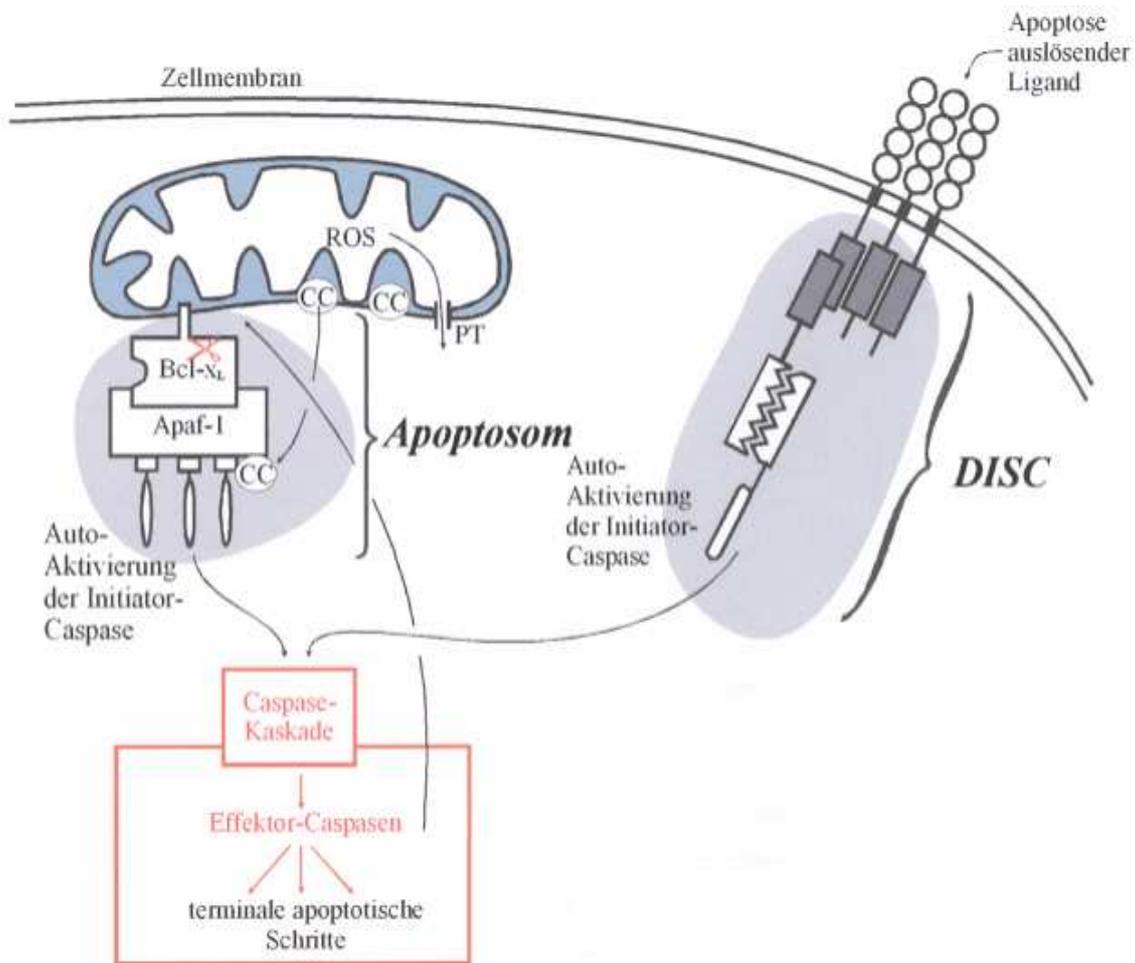
**Abbildung 4:** schematische Darstellung der FAS-Rezeptor / FAS-Ligand-Reaktionskaskade (a) modifiziert nach Arscott et al., 1998; b) modifiziert nach Rasper et al., 1998)

Der TNF-Rezeptor p55-TNF-R1 und der FAS-Rezeptor nutzen den selben Apoptose-vermittelnden Signalweg, allerdings ist als zusätzliches Adaptermolekül das TNF-R1-assoziierte DD-Protein (TRADD) notwendig, um die Verbindung zu FADD herzustellen, während der FAS-Rezeptor direkt mit FADD interagieren kann (**Abbildung 5**; Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1995; Hsu et al., 1995).



**Abbildung 5:** TNF-Rezeptor versus FAS-Rezeptor: Apoptose-Einleitung durch Aktivierung des Todesrezeptors sowie über mitochondriale Signaltransduktion

Die folgende **Abbildung 6** fasst die skizzierten Apoptose-Schritte nochmals zusammen.



**Abbildung 6: Signalwege der Apoptose:** Einleitung der Apoptose über Aktivierung des Todesrezeptors sowie durch mitochondrialen Signaltransduktionsweg

Die Induktion von Apoptose über Todesrezeptoren kann auf verschiedenen Ebenen des Signalweges moduliert werden. Bereits auf Rezeptorebene sind Regulationsmechanismen bekannt. So existieren im TRAIL-System sogenannte Köder- oder Decoy-Rezeptoren mit der Bezeichnung DcR1 (= TRAIL-R3) und DcR2 (= TRAIL-R4), die keine funktionsfähige DD besitzen, TRAIL aber mit der gleichen Affinität wie TRAIL-R1 und TRAIL-R2 binden, ohne jedoch das apoptotische Signal weiterzuleiten (Schneider et al., 1997). Eine Überexpression von TRAIL-R3 kann TRAIL-sensitive Zellen vor Apoptose schützen, indem der Köder-Rezeptor mit den funktionellen Todesrezeptoren um den Liganden konkurriert und somit eine Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose ermöglicht.

Die Mitglieder der Todesrezeptor-Familie scheinen bei einer Vielzahl von Krankheiten fehlreguliert zu sein. Beispielsweise findet man bei AIDS und anderen degenerativen Erkrankungen eine überhöhte Rate einer FAS-induzierten Apoptose, dagegen eine verminderte Apoptoserate bei Tumorerkrankungen, so dass die Eliminierung maligner Zellen verpasst wird. Interessant für diese Studie sind nun die physiologische Expression der Rezeptoren bei Enterocyten sowie der Einfluss inflammatorischer Bedingungen auf die Rezeptorausprägung und -funktion.

## **1.5. Hypothesen und Ziele**

Die konkreten Ziele dieser Arbeit sind

- eine morphologische Analyse der physiologischen Expression der TNF- Rezeptoren p55 und p75, des FAS-Rezeptors sowie der TRAIL-Rezeptoren R1, R2, R3 und R4 (Familie der Todesrezeptoren) einschließlich ihrer spezifischen Liganden FAS-Ligand und TRAIL im intestinalen Epithel. Dabei liegt ein Schwerpunkt auf dem Expressionsmuster entlang der Krypten-Zotten-Achse.
- eine quantitative Analyse des Einflusses der proinflammatorischen Cytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche während einer Entzündungsreaktion der intestinalen Mucosa deutlich erhöht sind, auf die Expression dieser Rezeptoren.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Modelle**

#### **2.1.1. Gewebe**

Für diese Studie wurden einerseits normale Dünndarmbiopsien (n=5) verwendet, die bei pädiatrischen Patienten mit dem Verdacht auf eine Darmerkrankung durch die durchgeführte diagnostische Endoskopie gewonnen wurden. Die Untersuchung ergab bei diesen Kindern einen makroskopisch völlig unauffälligen Darm mit normaler Histologie. Andererseits konnten normale Dünndarmresektate (n=3: Duodenum, Jejunum) zur immunhistochemischen Analyse verwendet werden.

Das Gewebe wurde umgehend durch Formalin bzw. Aceton fixiert oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Analyse der Gewebe mittels Immunhistochemie wurden 1 bzw. 5 µm dünne Schnitte der Proben im Kryostat hergestellt.

#### **2.1.2. HIEC-Zellkultur**

Die HIEC (human intestinal epithelial cell)-Zellkultur entstammt einer Zelllinie mit Ursprung aus humanem fetalem Ileum. Sie wurde durch J.-F. Beaulieu von der Abteilung für Anatomie und Zellbiologie der Universität Sherbrooke, Kanada, aus unreifen Kryptenzellen entwickelt (Perrault und Beaulieu, 1996). Diese nicht-transformierten humanen Zellen sind ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Regulation und Modulation spezifischer Signalprozesse im Rahmen der Entwicklung unreifer Kryptenzellen des originären humanen Dünndarmepithels.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Becton Dickinson, Heidelberg) unter standardisierten Bedingungen bei 37°C in einer gesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Anteil. Das Kulturmedium enthielt 5%-iges hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) mit Aminosäuren- und Antibiotika-Zusatz (DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium).

## **2.2. Untersuchungsmethoden**

### **2.2.1. Immunhistochemie**

#### **2.2.1.1. Gewebefixierung**

Ein wichtiger Aspekt immunhistochemischer Techniken ist die Konservierung von Zellen und Geweben mit Hilfe eines möglichst reproduzierbaren Verfahrens, da die Ergebnisse dieser Nachweismethoden bedeutend von der Güte des untersuchten Gewebematerials abhängen. Die morphologischen Strukturen sollten dabei soweit als möglich ihren ursprünglichen Charakter behalten. Dazu werden Gewebeblöcke oder –schnitte mit Fixierungslösungen behandelt, die einerseits durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme eine Autolyse des Gewebes verhindern sollen. Andererseits wird das Wachstum von Bakterien und Pilzen, die ebenfalls Abbauprozesse verursachen können, unterbunden. Zugleich werden Zellen und Gewebe in ihrer Struktur stabilisiert, damit diese vor mechanischen Verletzungen während des Färbeprozesses geschützt sind.

Fixative denaturieren Proteine durch Koagulation und chemische Quervernetzung, so dass es zu Strukturveränderungen der Proteine und einer Inaktivierung von Enzymen kommt. Die so entstehenden Komplexe unterscheiden sich von den aktiven Proteinen sowohl im chemischen als auch im antigenen Profil, so dass die protektive Wirkung für das Gewebe durchaus ein Hindernis für die immunhistochemischen Nachweismethoden darstellen kann.

Eine zu geringe Fixation erschwert durch die resultierende schlechte Gewebemorphologie die korrekte Interpretation. Auf der anderen Seite ruft eine Überfixation durch quervernetzende Fixative wie Aldehyde eine Antigenmaskierung hervor, die den Zugang des Antikörpers verhindert. Ein weiteres Problem entsteht, wenn das Fixativ die Struktur des Antigens ändert, so dass es für den Antikörper unerkennbar wird. Je größer und komplexer das Antigen strukturell aufgebaut ist, desto schonender muss die erforderliche Fixation sein, um seine Maskierung oder eine Strukturveränderung zu verhindern und es für den Antikörper zugänglich zu erhalten. Optimal ist es daher, das zu untersuchende Präparat hinsichtlich eines jeden Antigens mehreren Fixativen über unterschiedliche Zeitspannen zu unterwerfen, um die besten Bedingungen für die Konservierung dieses speziellen Antigens zu erfahren.

Bei den ersten Versuchsreihen wurde das Dünndarmgewebe durch allgemein gebräuchliches 8%iges gepuffertes Formalin konserviert. Aufgrund seiner Quervernetzungseigenschaften gilt diese Chemikalie als ein besonders gutes Fixativ für kleine Antigene, zumal Darmgewebe hinsichtlich einer Autolyse sehr anfällig ist. Bei sehr guten morphologischen Ergebnissen konnten allerdings keine zuverlässig positiven Nachweise der untersuchten Apoptose-Rezeptoren, dessen Existenz durch Paralleluntersuchungen in unserem Labor mittels RT-PCR sowie Immuno-Western-Blot nachgewiesen wurde, erreicht werden. Auch eine Verkürzung der Fixationszeit bei dem Verdacht einer Antigenmaskierung konnte die Ergebnisse nicht beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Demaskierung des Antigens durch eine proteolytische Vorbehandlung oder eine Mikrowellenbehandlung, die aber auch keinen Erfolg verzeichnen ließen.

Nach wochenlangen vergeblichen Versuchen wurde für unsere Studie eine andere Strategie verfolgt: das Biopsiematerial und kleinere Proben aus Intestinalresektaten wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren. Diese Methode ermöglicht eine Erhaltung des Gewebes einschließlich der antigenen Strukturen und verhindert die Bildung von Eiskristallen, die ebenso Zellstrukturen zerstören können. Das Gewebe kann so bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über längere Zeiträume aufbewahrt werden. Von dem Gewebe wurden dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in einem Kryostat Gefrierschnitte mit einer Dicke von etwa  $1\text{-}5\ \mu\text{m}$  hergestellt. Dieses ist eine etablierte Methode, um einerseits die nachteiligen Effekte einer Fixation zu umgehen, andererseits können viele Oberflächenantigene wegen ihrer Zerstörung durch das Fixativ nur in Gefrierschnitten lokalisiert werden, auch die Identifizierung intrazellulärer Antigene gelingt so zuverlässiger.

Vor der Immunmarkierung wurden die Gefrierschnitte in Aceton-Lösung bei  $+4^{\circ}\text{C}$  über zehn Minuten fixiert.

### **2.2.1.2. Kryostatschnitte**

Der Kryostat ist ein Kühlgehäuse, in dem ein Rotationsmikrotom untergebracht ist und eine Innentemperatur bis  $-40^{\circ}\text{C}$  erreicht werden kann. Das Mikrotom ist so eingerichtet, dass das gekühlte Messer im Messerhalter feststeht, und der angefrorene Gewebeblock mit Hilfe einer außen am Gefrierschrank angebrachten Kurbel senkrecht gegen das Messer bewegt wird. So

lassen sich unfixierte Gewebe z. B. im Rahmen der Schnellschnittdiagnostik von Operationsmaterial zügig schonend und unverfälscht schneiden.

Vor dem Einfrieren des Gewebes in flüssigem Stickstoff erfolgt eine Inkubation mit 2,3 M-Sucrose. Die Sucrose vermeidet einerseits die Bildung von intra- sowie extrazellulären Eiskristallen, die das Präparat schädigen, und steigert andererseits die Plastizität, die den Schneidevorgang optimiert. Nach dem Herstellen der Gefrierschnitte wird der belegte Objektträger in eine mit Pufferlösung gefüllte Küvette eingetaucht, um die Sucrose zu herauszulösen.

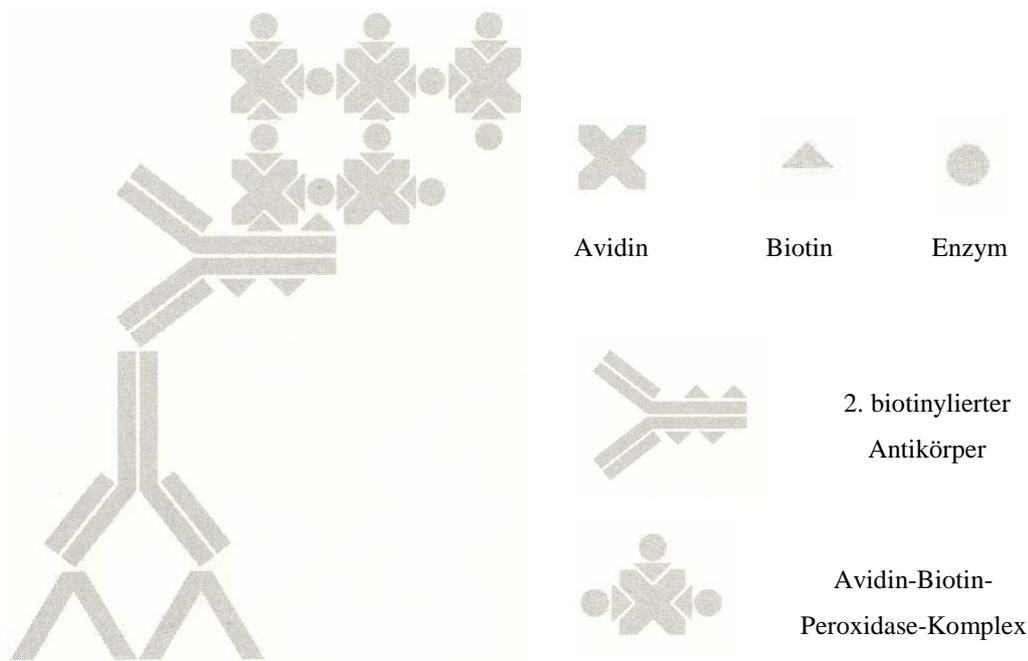
### **2.2.1.3. Immunperoxidase-Färbemethode (Avidin-Biotin-Technik)**

Als Immunperoxidase-Färbemethode zur Darstellung zellulärer Antigene wurde für diese Studie die Avidin-Biotin-Technik verwendet. Sie nutzt die Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden.

Bei diesem indirekten Nachweisverfahren wird ein unkonjugierter Primärantikörper, der gegen ein bestimmtes Epitop des gesuchten Antigens im Gewebe gerichtet ist, eingesetzt. Ein zweiter Antikörper, der sogenannte Sekundärantikörper, Brückenantikörper oder auch Link-Antikörper genannt, ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. Der Sekundärantikörper ist biotinyliert, das heißt er ist an einem Bindungsende mit Biotinmolekülen verbunden. Im dritten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem peroxidasekonjugierten Streptavidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen durch dessen hohe Affinität zu Biotin die Bindung an das Biotinmolekül des Sekundärantikörpers. Durch Einsatz eines entsprechenden Chromogens macht das Enzym Peroxidase durch das gebildete Farbprodukt das nun im Gewebe aufgebaute Antigen-Antikörper-Gerüst für die Lichtmikroskopie sichtbar (*Abbildung 7*).

Um eine unspezifische Hintergrundfärbung durch Anlagerung von Antikörpermolekülen an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate zu unterbinden, wird vor Zugabe des Primärantikörpers eine neutrale Proteinlösung aufgetragen. Dieses Eiweiß lagert sich an die elektrisch geladenen Stellen und verhindert auf diese Weise eine Adsorption des Primärantikörpers, der dann spezifisch an das zu identifizierende Antigen binden kann. Meist wird als Proteinlösung Normalserum derselben Tierspezies verwendet, von der der Brückenantikörper stammt. Dieses verhindert wiederum eine falsch-positive Anfärbung, bedingt durch die Bindung

des Sekundärantikörpers an Komponenten der Proteinlösung. Bei diesen Versuchsreihen wurde eine zehnmünütige Inkubation mit Schweineserum, 1:5 mit Tris-Puffer-Lösung verdünnt, vorgenommen.



**Abbildung 7: Prinzip der Avidin-Biotin-Methode** (Handbuch der Immunperoxidase-Färbemethoden von Janice A. Bourne)

Im Anschluss daran wurde das Gewebe in verschiedenen Verdünnungsreihen mit dem Primärantikörper versetzt, wobei jeweils Inkubationszeiten und Umgebungstemperatur variiert wurden. Nach ausreichender Spülung mit Tris-Puffer erfolgte der Zusatz des spezifischen biotinkonjugierten Sekundärantikörpers, 1:400 verdünnt, über dreißig Minuten bei Raumtemperatur.

Vor Einsatz eines Chromogens muss die bereits im Gewebe vorhandene endogene Peroxidaseaktivität irreversibel gehemmt werden, indem eine 3%ige Wasserstoffperoxidlösung über einen Zeitraum von zehn Minuten zugesetzt wird. Sofern diese Aktivität nicht vor Zugabe des markierenden Enzyms blockiert wird, ist eine positive Anfärbung nicht nur auf das spezifische Antigen, sondern auch auf die im Präparat bereits bestehende, vorrangig in Erythrocyten und Leucocyten vorkommende Peroxidaseaktivität zurückzuführen.

Nach sorgfältiger Spülung mit Tris-Puffer wurde schließlich für dreißig Minuten der peroxidase-konjugierte Streptavidin-Biotin-Komplex zugesetzt.

Unter mikroskopischer Beobachtung wurde die Anfärbung durch den Zusatz des Chromogens durchgeführt. Bei Immunperoxidase-Verfahren kommt als Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, horse radish peroxidase), die mit dem Substrat Wasserstoffperoxid einen Komplex bildet, zum Einsatz. Die Reaktion dieses Komplexes mit einem Elektronendonator ergibt als Endprodukte ein Farbmolekül und Wasser. Dabei geht das Enzym unverändert aus der Reaktion hervor, um mit einem weiteren Substratmolekül zu reagieren. Somit kann ein einziges Enzymmolekül viele Substratmoleküle zum Produkt umsetzen.

Es gibt eine Vielzahl verschiedener Chromogene, die als Elektronendonator bei der Enzymreaktion ein Farbprodukt bilden, das an der Stelle des zu lokalisierenden Antigens präzipitiert. Die folgenden Untersuchungen wurden mit dem elektronenspendenden Chromogen AEC (3-Amino-9-ethyl-carbazol) durchgeführt, welches ein in Alkohol lösliches rotes Endprodukt bildet. Deshalb dürfen die Präparate nicht dehydriert werden und sind mit einem wässrigen Eindeckmedium einzudecken. Des Weiteren stehen als gebräuchliche Präparate DAB (3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid) mit einem braunen Endprodukt, 4-Chlor-1-naphthol, das als blaues Produkt präzipitiert, sowie das Hanks-Yates-Reagenz (Paraphenyldiamindihydrochlorid / Pyrocatechol), welches ein blau-schwarzes Reaktionsprodukt hervorbringt, zur Verfügung. Zur Optimierung der Intensität des Reaktionsproduktes können die Chromogen-Konzentrationen und die Inkubationszeiten mit dem Substrat individuell angepasst werden.

Zum Schluss erfolgte zur Darstellung der Gewebemorphologie die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin.

Die größere Empfindlichkeit der Immunperoxidase-Techniken gegenüber der im Folgenden beschriebenen Immunfluoreszenz-Methode liegt an diesem Verstärkungsfaktor der Enzymtechnik. Ein Fluoreszenzmolekül kann nur einen geringen Teil sichtbares Licht abgeben, ein Peroxidaseenzym kann jedoch viele Farbmoleküle produzieren. Ein zu lokalisierendes Antigenmolekül wird durch die Repräsentation durch jeweils mehrere Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexe und dementsprechend vielen Farbprodukten um ein Vielfaches verstärkt dargestellt. Die Menge des präzipitierten Chromogens und damit die Intensität der Reaktion sind somit überproportional zur Menge des vorhandenen Antigens.

#### **2.2.1.4. Immunfluoreszenz-Markierung**

Auch die hier praktizierte Immunfluoreszenz-Markierung der zu identifizierenden Antigene ist ein indirektes Nachweisverfahren. Ein unkonjugierter spezifischer Primärantikörper bindet zunächst an das Antigen im Präparat. Um diese Anlagerung im Gewebe bzw. auf der Zelloberfläche zu lokalisieren, wird ein spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichteter, an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelter Sekundärantikörper eingesetzt. Diese Untersuchungen wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Sekundärantikörpern durchgeführt.

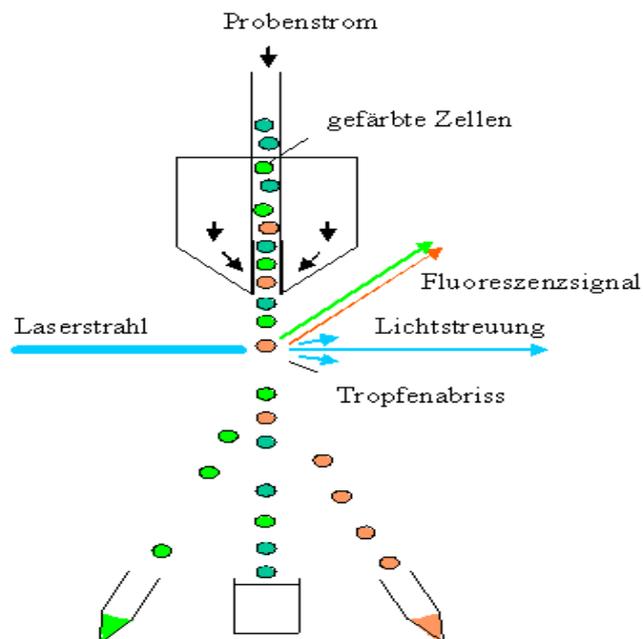
Die Antigenexistenz und die fluoreszenzmarkierte Lokalisation des Antigens in der Zelle können dann einerseits lichtmikroskopisch analysiert werden. Andererseits ist über diese Technik auch eine quantitative Analyse der Antigenpräsenz durch Flowcytometrie (FACS-Analyse) von Einzelzellen möglich.

#### **2.2.2. FACS-Analyse**

Die FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting, fluoreszenzaktivierte Zellanalyse), auch Durchfluss- oder Flowcytometrie genannt, ermöglicht die Isolierung und Zählung von Zellen sowie eine Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von durch einen Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Es ist mit diesem Verfahren möglich, die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen quantitativ zu bestimmen. Mittels FACS-Analyse wurden am HIEC-Zellmodell die Induktion und Expression der Todesrezeptoren FAS-Rezeptor sowie TRAIL-Rezeptoren R1-4 quantifiziert.

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen zu untersuchender Zelle und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper. Zur Analyse werden diese Zellen dann als Einzelzellsuspension wie an einer „Perlenkette“ durch eine Flüssigkeitskapillare an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonen-

konzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge der an die zu bestimmende Zelle gebundenen Antikörper. Zusätzlich werden durch die erzeugte Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur der Zellen wie die Granularität des Cytoplasma oder die Größe des Zellkerns gewonnen (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8: Prinzip der Flowcytometrie und Zellsortierung**

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Häufig verwendete Fluorochrome sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin. In unseren Untersuchungen wurde FITC als Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 495 nm und einem Emissionsmaximum bei 519 nm eingesetzt.

Im Versuchsverlauf wurden HIEC-Zellen mit dem im entsprechenden Zellmedium angesetzten Primärantikörper inkubiert. Nach mehrfachen Waschvorgängen mit dem Zellmedium erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dabei wurden jeweils neben einer Veränderung der Antikörperkonzentrationen sowohl die Inkubationszeiten als auch die äußeren Bedingungen wie

Temperatur und Lichteinfluss zur Erzielung optimaler Ergebnisse in den Versuchsreihen variiert. Eine Fixierung der Zellen durch den initialen Zusatz einer 1%igen Formalinlösung erbrachte in Verbindung mit einer Permeabilisierung der Zellen durch Saponin eine Optimierung der Versuchsergebnisse. Nach einer abschließenden Waschung wurde die FACS-Analyse durchgeführt.

Die Präsentation der Messergebnisse erfolgt einerseits als Dot-Plot-Diagramm, in dem häufig von einander unabhängige Parameter wie z.B. Zellgröße und Granularität in punktförmiger Darstellung eingehen. So ist es möglich, eine bestimmte Zellpopulation nach ihren Eigenschaften gegenüber anderen Zellen aus dem Serum oder einem anderen Zellgemisch zu identifizieren. Im Streulicht-Dot-Plot werden die Zellen nach ihrem Vorwärtstreulicht (forward light scatter, FSC), abhängig von der Zellgröße, und ihrem Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC), stellvertretend für die Granularität der Zelle, im Diagramm dargestellt. Die Ergebnisse einer Fluoreszenzmessung lassen sich durch das Schleusen einer so identifizierten Zellpopulation gesondert in einer entsprechenden Graphik abbilden. Andererseits werden die Ergebnisse der Analyse in Form eines Histogramms bzw. als Kurve demonstriert. Hierbei wird beispielsweise die Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Je stärker der Rechts-Shift der gemessenen Fluoreszenzintensität gegenüber der Autofluoreszenz- bzw. Isotypenprobe ausfällt, desto häufiger kommt das nachgewiesene Antigen vor oder umso stärker ist das Antigen ausgeprägt.

## 2.3. Material

### 2.3.1. Antikörper

Als **Primärantikörper** kommen in den Versuchsreihen folgende Präparate zur Anwendung:

FAS-Antikörper

- mouse-IgG-anti-human-Fas: Pharmingen, Mississauga, ON, Canada; 1 µg/ml

FAS-Ligand-Antikörper

- mouse-IgG-anti-human-Fas-Ligand: Pharmingen, Mississauga, ON, Canada; 1-4 µg/ml

### TRAIL-Rezeptor-Antikörper

- goat-anti-TRAIL-R1 (N-19): sc-6824, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 200 µg/ml
- rabbit-anti-TRAIL-R1 (C-terminal): 66901N, Pharmingen; 50 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R2 (N-19): sc-7192, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 200 µg/ml
- rabbit-anti-TRAIL-R2: AB16942, Chemicon International Inc.; 500 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R2: AB1687, Chemicon International Inc.; 100 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R2: 210-73-R100, Alexis Biochemicals; 100 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R3 (N-19): sc-7193, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 200 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R3: AB1688, Chemicon International Inc.; 100 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R3: AF630, R&D Systems Inc.; 100 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R4 (N-19): sc-7552, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 200 µg/ml
- goat-anti-TRAIL-R4: AF633, R&D Systems Inc.; 100 µg/ml

### TRAIL-Antikörper

- rabbit-anti-TRAIL (C-terminal): AB16957, Chemicon International Inc.; 1 mg/ml

### TNF-Rezeptor-Antikörper

- goat-anti-p55-TNF-RI: AB-225-PB, R&D Systems Inc.; 1 mg/ml
- goat-anti-p75-TNF-II: AB-226-PB, R&D Systems Inc.; 1 mg/ml

### TNF $\alpha$ -Antikörper

- mouse-anti- TNF $\alpha$ : AB-410-NA, R&D Systems Inc.; 1 mg/ml

Als **Sekundärantikörper** kommen folgende Präparate zum Einsatz:

- donkey-anti-goat-IgG-FITC: sc-2024, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 400 µg/ml
- goat-anti-rabbit-IgG-FITC: sc-2012, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 400 µg/ml
- goat-anti-mouse-IgG-FITC: sc-2010, Santa Cruz Biotechnology, Inc.; 400 µg/ml
- donkey-anti-goat-Cy2: 705/225-147, Dianova/Jackson
- biotinylierter Sekundärantikörper, DAKO Corporation USA

### 2.3.2. Chemikalien

#### Zellmedium

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

#### Fixative

PFA 8%-PBS

10% phosphatgepuffertes Formalin pH 7,0

Aceton

N<sub>2</sub>

#### Pufferlösungen

Tris-Puffer Stammlösung 60,57g Tris (Merck 9382) in 500 ml Aqua dest. + 430 ml 1N-HCl  
pH 7,4-7,6

Gebrauchslösung 100 ml Stammlösung + 900 ml 0,9% NaCl

PBS phosphor buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)  
0,01M, pH 7,2

1,48 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0,43 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 7,2 g NaCl in 1 l Aqua dest. lösen

CMF-PBS (calcium-magnesium-free PBS)

#### sonstige Reagenzien

Saponin (nach Jung) zur Permeabilisierung der Zellmembran

Grundlösung 0,1% Saponin / PBS als Medium

BSA (bovine serum albumin)

Schweineserum

Antibody Diluent, DAKO Corporation, USA

Blocking Reagenz, DAKO Corporation, USA

ABCComplex, DAKO Corporation, USA

AEC-Substrat: K 3464, DAKO Corporation, USA

TX-100 (Triton X-100): H514, Promega Corporation, USA

TNF $\alpha$ : Genzyme Corporation

Interleukin-1 $\beta$ : R&D Systems Inc.

### 2.3.3. Rezepturen

#### **Poly-L-Lysin-Beschichtung der Objektträger**

Poly-L-Lysin-Lösung: 0,5 mg/ml (Aqua dest.)  
 frisch herstellen / durch 0,45 µm -Filter geben  
 bei längerer Lagerung mit 0,02% Acid versetzen

Objektträger (OT) in Aqua dest. 100°C tauchen

OT mit sauberem Baumwolltuch entölen, in 100% Ethanol tauchen, nochmals trocknen

Vorgang wiederholen

waschen in Aqua dest., in Poly-L-Lysin-Lösung tauchen, abtropfen lassen

Vorgang wiederholen

Küvetten bei 37°C in Brutschrank lagern

#### **PVP (Poly-Vinyl-Pyrrolidon)-Sucrose**

Herstellung von 100 ml 2,3M-Sucrose-Lösung

Zusatz von 20 ml 3% NaHCO<sub>3</sub>-Lösung + 20 mg Natriumacid + 10 ml Phosphatpuffer-Lösung  
 (pH 7,4)

Zusatz von 100g PVP-10 (Lot 28H0110, Sigma) in 60°C warme Lösung (Wasserbad)

nach 60 min portionieren

#### **Herstellung des Eindeckmedium für fluoreszenzmarkierte Präparate (Mowiol-Dabco)**

5g Mowiol 4.88 (Hoechst), alternativ Elvanol (Dupont), in 20 ml 100mM-Tris pH 8,0 lösen

16 h rühren

10 ml 100% Glycerin zugeben

16 h rühren

nicht gelöstes Mowiol durch Zentrifugation abtrennen

abgefüllte Proben einfrieren

vor Gebrauch wahlweise Antibleichmittel hinzufügen

- Dabco (1,4-Diazobicyclooctan)

20-50 mg Dabco /ml Mowiol

Mikroskopie 1983; 40: 237 / J Immunol Methods 1982; 55: 231

- p-Phenylendiamin

1 mg p-Phenylendiamin /ml Mowiol, Zugabe von Mercaptoethanol bis Lösung wieder klar, pH-Einstellung auf 8,2 J Immunol Methods 1981; 43: 349-350

- n-Propylgallat

10 mg n-Propylgallat /ml Mowiol Science 1982; 217: 1252

### 2.3.3.1. Immunperoxidase-Markierung (Avidin-Biotin-Technik)

10 min Inkubation mit Schweineserum, 1:5 in Tris-Puffer-Lösung verdünnt, danach ablaufen lassen

60 min / Inkubation mit Primärantikörper bei RT (bei 4°C über 12h)

(>12h) Verdünnung in Antibody Diluent

anti-TRAIL-R1 1:2 / 1:5 / 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-TRAIL-R2 1:2 / 1:5 / 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-TRAIL-R3 1:5 / 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-TRAIL-R4 1:5 / 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-TRAIL 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-FAS-R 1:5 / 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-FAS-Ligand 1:10 / 1:50 / 1:100

anti-p55-TNF-R1 1:5 / 1:10 / 1:20 / 1:40 / 1:50 / 1:80 / 1:100

anti-p75-TNF-R2 1:5 / 1:10 / 1:20 / 1:40 / 1:50 / 1:80 / 1:100

anti-TNF $\alpha$  1:10 / 1:100

danach spülen mit Tris-Puffer

30 min Inkubation mit spezifischem Sekundärantikörper bei RT

Verdünnung 1:400 mit Antibody Diluent

danach spülen mit Tris-Puffer

10 min Blocking-Reagenz = Perhydrol

danach spülen mit Tris-Puffer

30 min frisch hergestellte ABComplex-Lösung auftragen

danach spülen mit Tris-Puffer

Anfärbung mit AEC-Substrat unter mikroskopischer Kontrolle

(Ansatz der Substrat-Lösung wegen Präzipitaten unmittelbar vor Gebrauch)

Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun

Eindecken mit Aquatex

### 2.3.3.2. Immunfluoreszenz-Markierung der Gefrierschnitte

2x5 min	PBS bei RT
60 min	3% BSA/CMF-PBS bei 37°C
3x5 min	0,1% BSA/CMF-PBS
60 min /	Primärantikörper bei (4°C) / 37°C (feuchte Kammer)
(>12h)	Verdünnung in 0,1% BSA/CMF-PBS:
	anti-TRAIL-R1 (1:1 / 1:2 / 1:5) / 1:10 / 1:100 / 1:1000
	anti-TRAIL-R2 (1:1 / 1:2 / 1:5) / 1:10 / 1:100 / 1:1000
	anti-TRAIL-R3 1:10 / 1:100
	anti-TRAIL-R4 1:10
	anti-TRAIL 1:5 / 1:10 / 1:100
	anti-FAS-R (1:2 / 1:5) / 1:10 / 1:100
	anti-p55-TNF-R1 (1:2 / 1:5) / 1:10 / 1:100
	anti-p75-TNF-R2 (1:2 / 1:5) / 1:10 / 1:100
3x5 min	0,1% BSA/CMF-PBS
60 min /	Sekundärantikörper bei (4°C) / 37°C (feuchte Kammer)
(>12h)	Verdünnung in 0,1% BSA/CMF-PBS
	anti-goat / rabbit / mouse-FITC 1:50 / 1:200 / 1:250
	anti-goat-Cy2 1:50 / 1:200 / 1:250
3x5 min	CMF-PBS
1x	Aqua dest.
	Eindecken mit Mowiol-Dabco

Inkubation mit Primärantikörper / Sekundärantikörper über Nacht (>12h) bei 4°C mit höheren Konzentrationen

### 2.3.3.3. Immunfluoreszenz-Markierung der HIEC-Zellen

#### Mikroskopie:

Medium abnehmen

2x	mit PBS waschen
45 min	Fixierung mit 1% / 4% PFA/PBS bei RT
5x5 min	mit PBS waschen
5 min	mit 0,2% TX-100/PBS permeabilisieren
5x5 min	mit PBS waschen
15-30 min	mit 3% BSA/PBS bei 37°C abblocken
3x3 min	mit 0,3% BSA/PBS waschen
60 min	Inkubation mit Primärantikörper bei 37°C (feuchte Kammer)
	Verdünnung in 0,3% BSA/PBS:
	anti-TRAIL-R1                      1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R2                      1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R3                      1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R4                      1:5 / 1:10
	anti-TRAIL                          1:10 / 1:20 / 1:50
5x5 min	mit 0,3% BSA/PBS waschen
60 min	Inkubation mit Sekundärantikörper bei 37°C (feuchte Kammer)
	Verdünnung in 0,3% BSA/PBS:
	anti-goat / rabbit-FITC              1:250
3x5 min	mit PBS waschen
1x	mit Aqua dest. waschen
	Eindecken mit Mowiol-Dabco

#### FACS-Analyse:

Medium (DMEM + 5% FCS) durch Zentrifugation von Zellen trennen

Zellen in 300 µl Medium suspendieren

30 / 60 /

90 / 120 min                      Inkubation mit Primärantikörper bei RT / 37°C

Verdünnung in Zellmedium:

	anti-TRAIL-R1	1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R2	1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R3	1:5 / 1:10
	anti-TRAIL-R4	1:5 / 1:10
	anti-TRAIL	1:10
	anti-FAS-R	1:10 / 1:100
	anti-p55-TNF-R1	1:5
	anti-p75-TNF-R2	1:5
3x	waschen	
30 / 60 min	Inkubation mit Sekundärantikörper bei RT / 4°C	
	Verdünnung in Zellmedium:	
	anti-goat / rabbit / mouse-FITC	1:50 / 1:100 / 1:200 / 1:250
3x	waschen	
FACS-Analyse		

#### 2.3.4. Geräte

Dewar

Kryostat 2800 Frigocut-E mit Rotationsmikrotom 2040-C, Reichert-Jung

Leica-Immunfluoreszenz-Mikroskop (Leica, Bernstein, Deutschland)

FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

### **3. ERGEBNISSE**

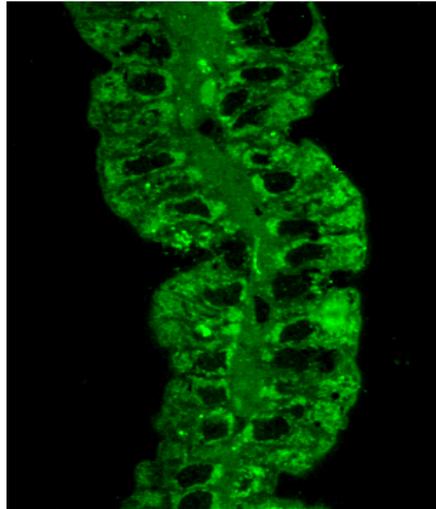
Zur Analyse der Rezeptoren der TNF-Familie - FAS-Rezeptor, TRAIL-Rezeptoren 1-4 sowie p55-bzw. p75-TNF-Rezeptor - wählten wir eine kombinierte *ex-vivo-in-vitro*-Untersuchung von normalem Dünndarmgewebe wie auch einer humanen, nicht-transformierten intestinalen Epithelzelllinie (HIEC). Dieses Experimentaldesign erlaubt eine präzise Bestimmung der Rezeptor-Expression an Enterocyten *ex vivo* sowie eine morphologische Analyse der Expression entlang der Krypten-Zotten-Achse. Parallel hierzu können mittels des *in-vitro*-Modells die membranäre Rezeptor-Expression und deren Modulation durch proinflammatorische Cytokine quantifiziert werden.

#### **3.1. Konstitutive Expression der Todesrezeptoren und ihrer Liganden unter physiologischen, nicht-entzündlichen Bedingungen**

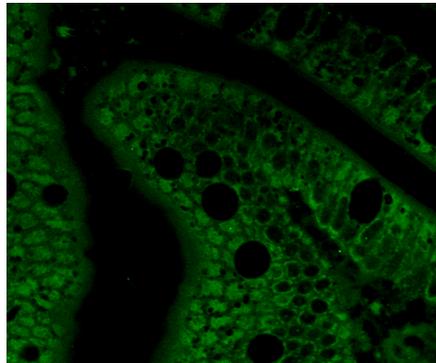
##### **3.1.1. FAS-Rezeptor und FAS-Ligand**

Die Untersuchungen an nicht-entzündlichem Duodenum- und Jejunum-Gewebe zeigen eine intensive Expression des FAS-Rezeptors vor allem am basolateralen Enterocytenpol. Ein positives Fluoreszenzsignal kann ebenfalls im Cytoplasma der Enterocyten beobachtet werden. Es besteht eine homogene Expression des FAS-Rezeptors auf der Enterocytenoberfläche entlang der gesamten Krypten-Zotten-Achse mit einer deutlichen Rezeptor-Expression sowohl bei immaturren Kryptenzellen als auch bei differenzierenden und maturaen Enterocyten an der Zottenspitze. Ein Gradient in der Dichte der Rezeptoren kann nicht beobachtet werden. Das Verteilungsmuster der FAS-Rezeptor-Expression ist bei Enterocyten duodenalen und jejunalen Ursprungs identisch. Im Vergleich der beiden gewählten immunhistochemischen Untersuchungsmethoden zeigt sich die Immunfluoreszenz-Markierung an tiefgefrorenem Gewebe deutlich sensibler bei der Darstellung des FAS-Rezeptors als die Immunperoxidase-Markierung an Paraformaldehyd-fixiertem Gewebe (**Abbildung 9**).

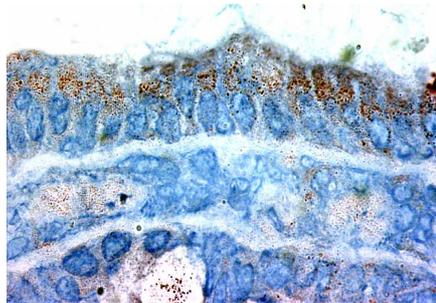
a)



b)



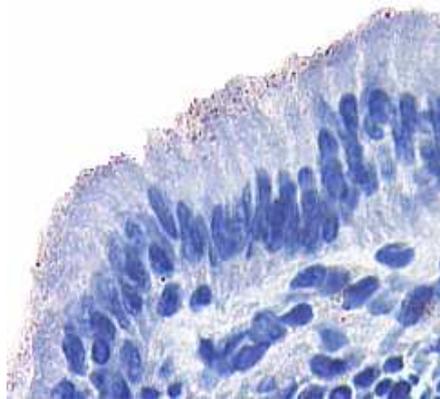
c)



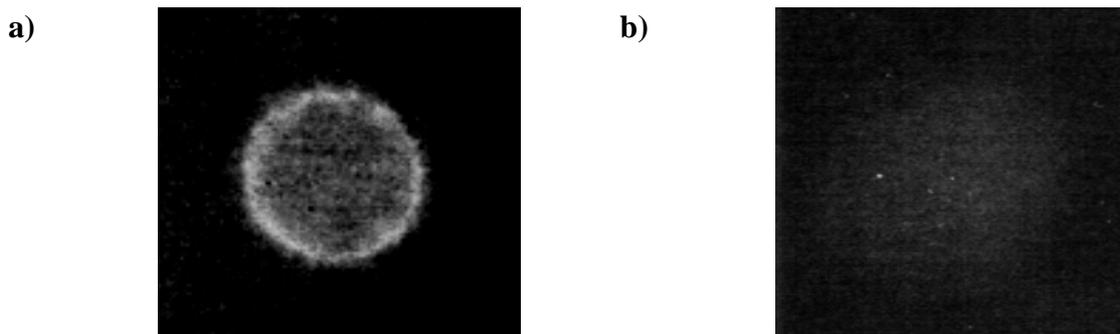
**Abbildung 9: immunohistochemischer Nachweis des FAS-Rezeptors**

- a) indirekte Immunfluoreszenz (Duodenum)  
anti-FAS 1:5, FITC-Sekundärantikörper 1:50
- b) indirekte Immunfluoreszenz (Jejunum)  
anti-FAS 1:5, FITC-Sekundärantikörper 1:50
- c) Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
anti-FAS 1:100

Im Gegensatz zum FAS-Rezeptor wird der FAS-Ligand nicht von Enterocyten exprimiert. Weder mittels Immunfluoreszenz- noch durch Immunperoxidase-Markierung gelingt der Nachweis einer FAS-Ligand-Expression bei Enterocyten duodener oder jejunaler Herkunft (**Abbildung 10**). Kontrolluntersuchungen an aktivierten Lymphocyten bestätigen, dass die verwendeten Primärantikörper zum immunhistochemischen Nachweis des FAS-Liganden geeignet sind. Die parallel durchgeführten *in-vitro*-Analysen an HIEC bestätigen, dass nicht-transformierte Enterocyten den FAS-Liganden nicht bilden, während ein deutliches Fluoreszenzsignal für den FAS-Rezeptor an der Oberfläche nicht fixierter HIEC beobachtet werden kann (**Abbildung 11**).



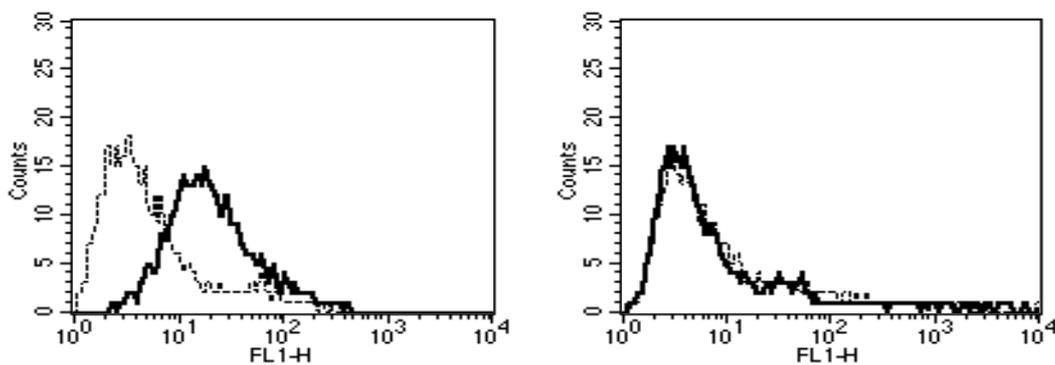
**Abbildung 10:** immunhistochemisch negativer Nachweis des FAS-Liganden  
Immunperoxidase-Methode (Duodenum), anti-FAS-Ligand 1:50



**Abbildung 11:** FAS-Rezeptor / Ligand-Expression bei HIEC  
(indirekte Immunfluoreszenz)

- a) anti-FAS 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:50
- b) anti-FAS-Ligand 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:50

Die membranäre FAS-Rezeptor- bzw. FAS-Ligand-Expression durch HIEC kann mittels Flowcytometrie quantifiziert werden. Bei der durchfluscytometrischen Analyse der hinsichtlich der FAS-Rezeptor-Expression immunhistochemisch markierten Zellen zeigt die Auswertung im Histogramm einen deutlichen Rechts-Shift der Fluoreszenzintensität proportional der Dichte des FAS-Rezeptors (**Abbildung 12, linkes Histogramm**). Analog zur Voruntersuchung gelingt auch hier kein Nachweis einer FAS-Ligand-Expression, verdeutlicht durch den ausbleibenden Shift der Fluoreszenzintensität (**Abbildung 12, rechtes Histogramm**).



**Abbildung 12: FAS-Rezeptor / Ligand-Expression bei HIEC (FACS-Analyse)**

Histogramm links: anti-FAS 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:50

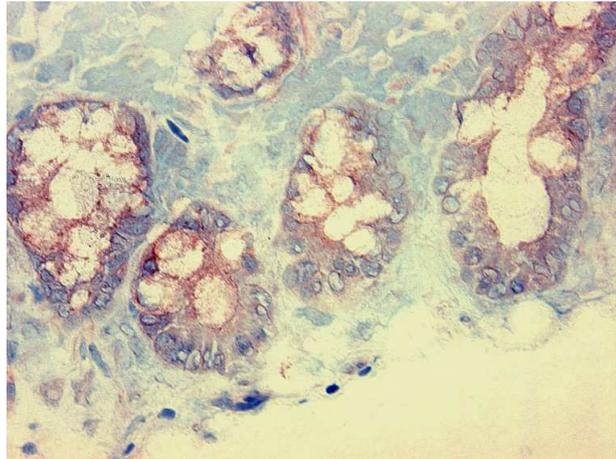
deutlicher Rechts-Shift der Fluoreszenzintensität nach FAS-Rezeptor-Markierung (—) gegenüber der Isotypen-Untersuchung (----) zeigt eine entsprechend hohe Dichte des FAS-Rezeptors an

Histogramm rechts: anti-FAS-Ligand 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:50

fehlender Shift der Fluoreszenzintensität nach Inkubation der Zellen mit FAS-Ligand-Antikörper zeigt fehlende Expression dieses Proteins durch HIEC an

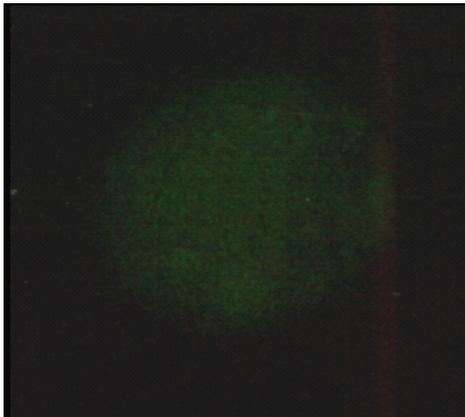
### 3.1.2. TRAIL-Rezeptoren 1-4

Die konstitutive Expression des **TRAIL-Rezeptors 1** durch Enterocyten kann sowohl im Gewebe duodenalen als auch jejunalen Ursprungs beobachtet werden, wobei TRAIL-R1 gleichermaßen in Kryptenzellen wie auch in reifen Enterocyten exprimiert wird. Die Rezeptor-Expression ist allerdings relativ schwach ausgeprägt und nur mittels der Immunperoxidase-Färbemethode gelungen. Die analogen Immunfluoreszenz-Analysen am untersuchten Gewebe sind leider nicht erfolgreich ausgefallen. Hingegen erlaubt derselbe gegen TRAIL-R1 gerichtete Primärantikörper ein membranäres Darstellungsmuster der Rezeptor-Expression im Zellmodell mit HIEC durch indirekte Immunfluoreszenz (*Abbildungen 13 und 14*). Ähnliche Ergebnisse können für **TRAIL-Rezeptor 2** mit dem Unterschied konstatiert werden, dass HIEC diesen Rezeptor-Subtyp deutlich stärker exprimieren. TRAIL-R2 ist im Gewebe mit einem diffusen Verteilungsmuster im Cytoplasma der Enterocyten mittels des Immunperoxidase-Verfahrens nachweisbar (*Abbildungen 15 und 16*). Im Gegensatz zu TRAIL-R1 und -R2 wird **TRAIL-Rezeptor 3** nicht durch Enterocyten ausgebildet, weder im Dünndarmgewebe noch bei HIEC gelingt der Nachweis dieses Rezeptor-Subtyps (*Abbildungen 17 und 18*). Vergleichbar mit dem Expressionsmuster von TRAIL-R1 zeigt sich ein schwaches cytoplasmatisches Signal für **TRAIL-Rezeptor 4** in duodenalen und jejunalen Enterocyten. Native HIEC weisen nach Rezeptormarkierung ein positives membranäres Immunfluoreszenzsignal für TRAIL-R4 auf (*Abbildungen 19 und 20*).

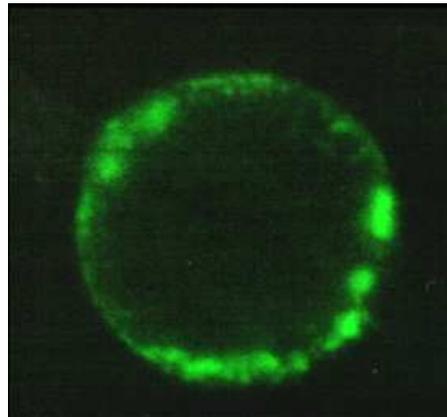


**Abbildung 13:** immunhistochemischer TRAIL-R1-Nachweis  
 Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
 anti-TRAIL-R1 1:10

a)



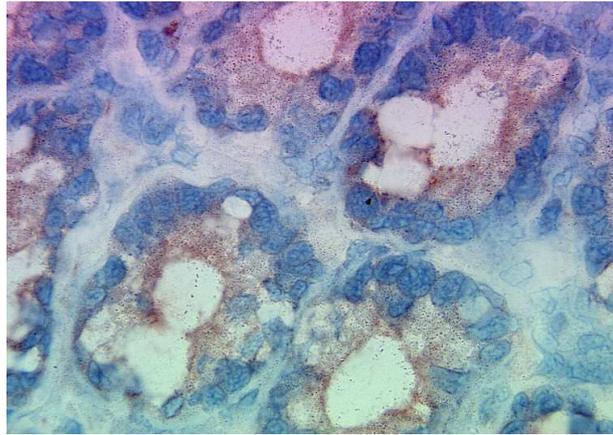
b)



**Abbildung 14:** immuncytochemischer TRAIL-R1-Nachweis durch indirekte Immun-  
 fluoreszenz (HIEC)

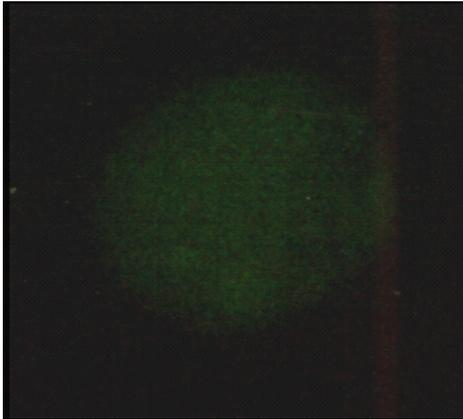
a) Isotyp-Kontrolle

b) anti-TRAIL-R1 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:250

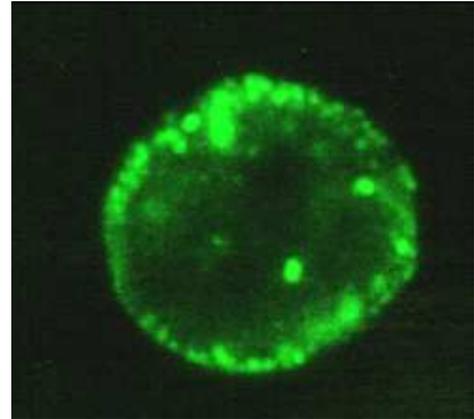


**Abbildung 15:** immunhistochemischer TRAIL-R2-Nachweis  
Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
anti-TRAIL-R2 1:10

**a)**



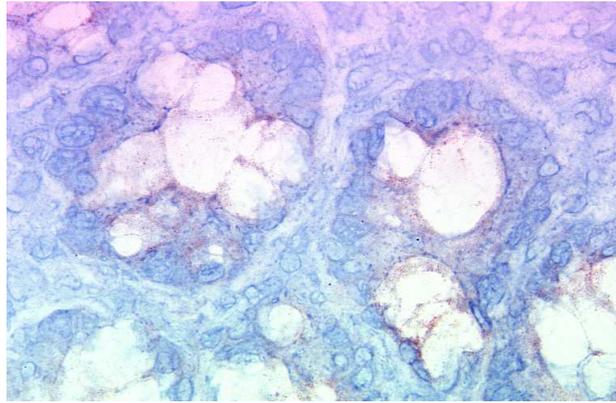
**b)**



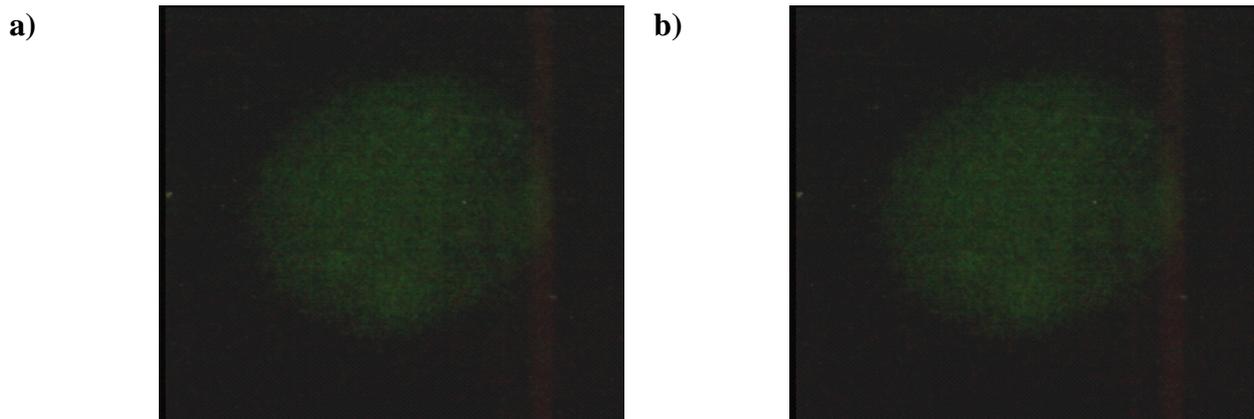
**Abbildung 16:** immuncytochemischer TRAIL-R2-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC)

**a)** Isotyp-Kontrolle

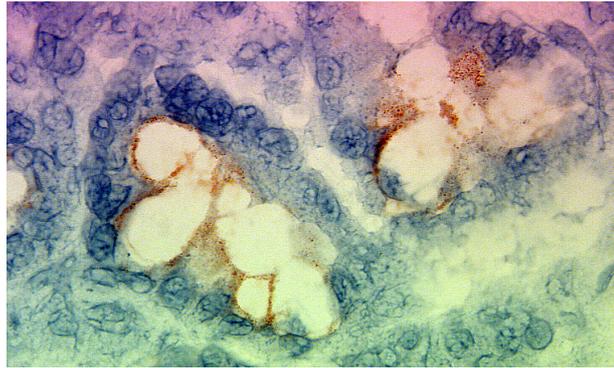
**b)** anti-TRAIL-R2 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:250



**Abbildung 17:** immunhistochemisch negativer TRAIL-R3-Nachweis  
Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
anti-TRAIL-R3 1:10

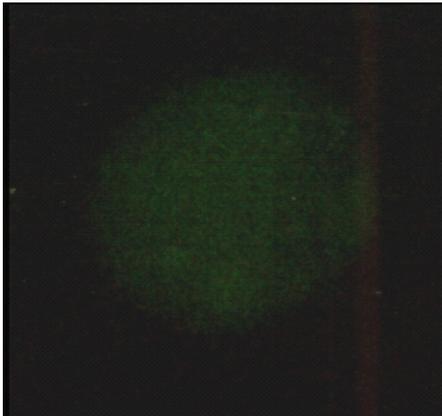


**Abbildung 18:** immuncytochemisch negativer TRAIL-R3-Nachweis durch indirekte  
Immunfluoreszenz (HIEC)  
a) Isotyp-Kontrolle  
b) anti-TRAIL-R3 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:250

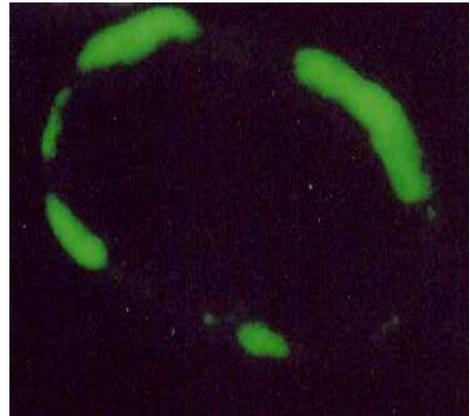


**Abbildung 19:** immunhistochemischer TRAIL-R4-Nachweis  
 Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
 anti-TRAIL-R4 1:10

a)



b)



**Abbildung 20:** immuncytochemischer TRAIL-R4-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC)

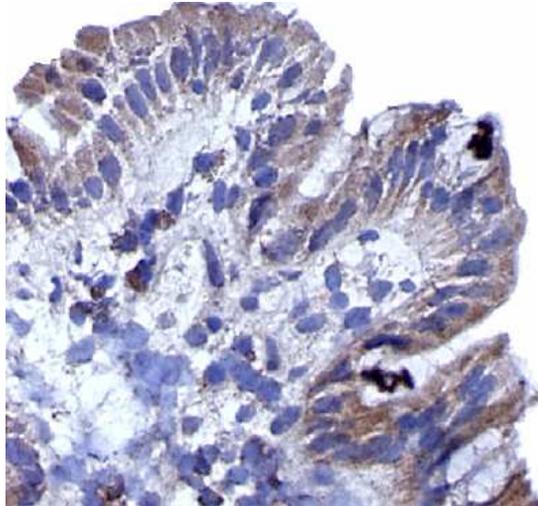
a) Isotyp-Kontrolle

b) anti-TRAIL-R4 1:10, FITC-Sekundärantikörper 1:250

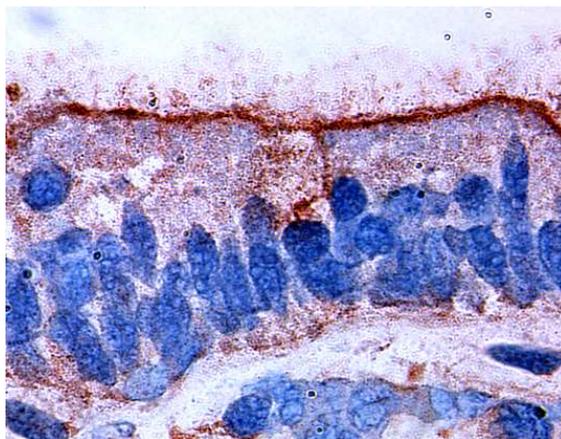
### 3.1.3. TRAIL

Intestinale Epithelzellen zeigen eine konstitutive Expression des Liganden TRAIL mit einem deutlichen cytoplasmatischen Signal, bevorzugt an der basolateralen Seite. Immunhistochemische Untersuchungen duodenalen sowie jejunalen Gewebes bestätigen die TRAIL-Expression durch reife Enterocyten. Ein deutlicher Gradient der TRAIL-Konzentration besteht entlang der Krypten-Zotten-Achse mit einer stärkeren Expression an der Zottenspitze und nur einem sehr schwachen Signal in Kryptenzellen. Lamina-propria-Zellen hingegen zeigen keine oder nur eine minimale TRAIL-Signalstärke (*Abbildung 21*).

a)



b)

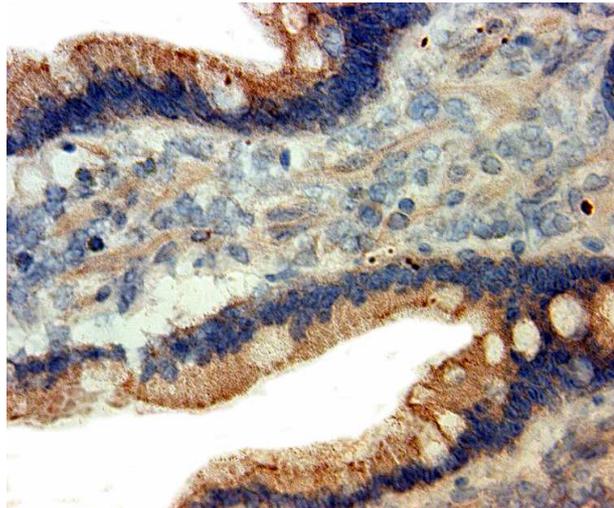


**Abbildung 21:** immunhistochemischer TRAIL-Nachweis (a) und b))  
Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
anti-TRAIL 1:10

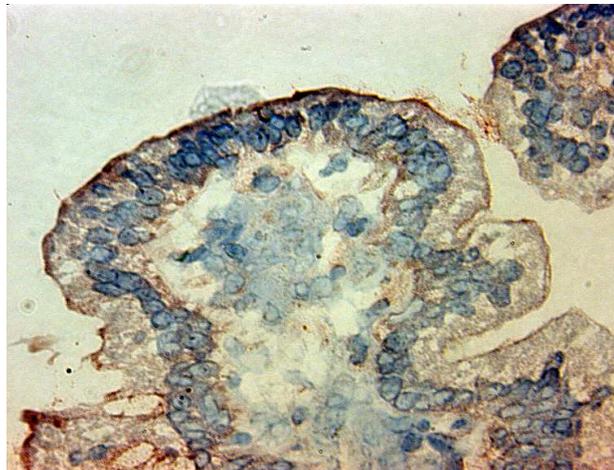
### 3.1.4. TNF-Rezeptoren p55-TNF-R1 und p75-TNF-R2

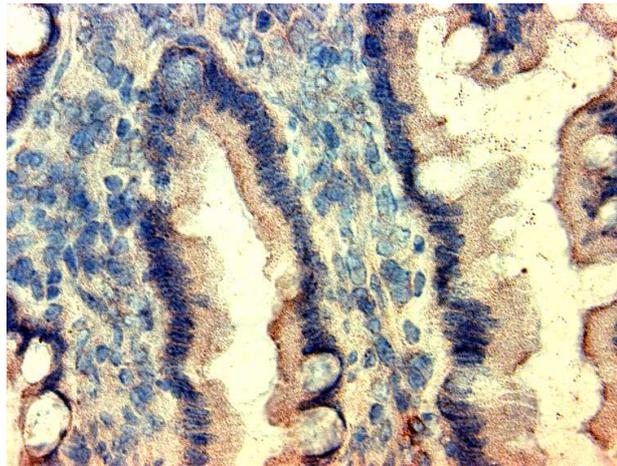
Die immunhistochemischen Untersuchungen von Duodenum und Jejunum zeigen eine deutliche Expression des p55-TNF-Rezeptors durch Enterocyten, während für den verwandten p75-TNF-Rezeptor kein positives spezifisches Signal verzeichnet werden kann. Die p55-TNF-Rezeptor-Expression ist deutlich an der basolateralen Seite zu erkennen, allerdings kann ebenfalls eine intensive intracytoplasmatische Markierung beobachtet werden. Im Gegensatz zu den *ex-vivo*-Gewebeuntersuchungen zeigen die *in-vitro*-Analysen an HIEC eine minimale membranäre Expression des p75-TNF-Rezeptors mit einer deutlich stärkeren Ausbildung des p55-TNF-Rezeptors. Die membranäre Expression beider Rezeptoren kann anhand flowcytometrischer Analysen nicht-fixierter, oberflächenmarkierter HIEC quantifiziert werden (**Abbildungen 22 und 23**).

a)



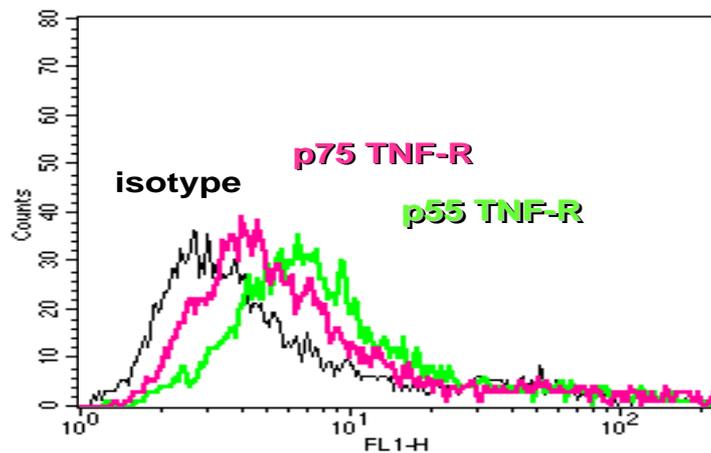
b)





**Abbildung 22:** immunohistochemischer TNF-Rezeptor-Nachweis

- a) **p55-TNF-Rezeptor-Nachweis**  
 Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
 anti-p55-TNF-R1 1:40
- b) **p75-TNF-Rezeptor-Nachweis**  
 Immunperoxidase-Methode (Duodenum)  
 anti-p75-TNF-R2 1:40



**Abbildung 23:** TNF-Rezeptor-Expression bei HIEC (FACS-Analyse)

quantitativer Vergleich der physiologischen Expressionsintensität der TNF-Rezeptoren: der ausgeprägtere Rechts-Shift der Fluoreszenzintensität p55-TNF-R1-markierter HIEC gegenüber p75-TNF-R2-markierter Zellen zeigt die höhere basale Dichte des p55-TNF-Rezeptors an

## **3.2. Expressionsmuster der TRAIL-Rezeptoren nach Stimulation durch proinflammatorische Cytokine**

In einem zweiten Schritt wird der Effekt der proinflammatorischen Cytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1-4 analysiert. Die Zielsetzung besteht darin, erste Informationen über den Einfluss eines entzündlichen Infiltrates, wie beispielsweise bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen bestehend, auf die Expression dieser Rezeptoren zu erhalten.

### **3.2.1. Stimulation mit TNF $\alpha$**

#### **3.2.1.1. TRAIL-Rezeptor 1**

Flowcytometrische Analysen von HIEC zeigen nach Immunmarkierung einen deutlichen Rechts-Shift der Fluoreszenzintensität für die membranäre Expression des TRAIL-Rezeptors 1. Nach Stimulation mit TNF $\alpha$  über einen Zeitraum von 24 Stunden kann bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml eine Erhöhung der TRAIL-R1-Expression um 22%  $\pm$  2% gegenüber dem Nullwert gemessen werden - eine weitere Steigerung durch höhere TNF $\alpha$ -Konzentrationen innerhalb eines 24-Stunden-Zeitfensters kann dagegen nicht beobachtet werden. Bei Verlängerung der Einwirkdauer über weitere 24 Stunden wird die TRAIL-R1-Expression allerdings deutlich erhöht: nach einer 48-stündigen Inkubation mit einer geringen TNF $\alpha$ -Dosis (0,1 ng/ml) steigt die gemessene Expression gegenüber dem Nullwert um 26%  $\pm$  3%, bei Konzentrationen von 1,0 ng/ml noch weiter um 37%  $\pm$  2%, mit höheren Konzentrationen (10,0 ng/ml oder mehr) wird ein Plateau-effekt beobachtet und die TRAIL-R1-Expression nicht weiter erhöht (*Abbildungen 24 und 25*).

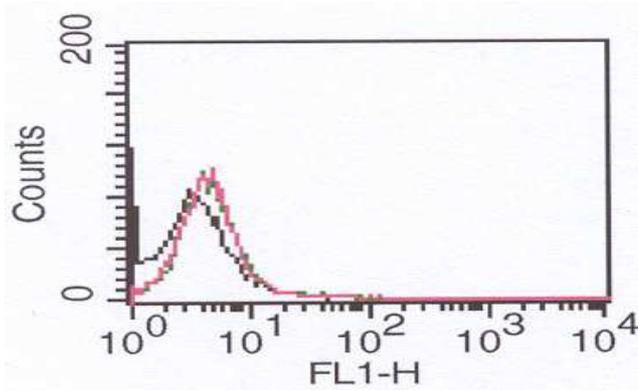
<b>TNF<math>\alpha</math></b>		<b>0,0 ng/ml</b>	<b>0,1 ng/ml</b>	<b>1,0 ng/ml</b>	<b>10,0 ng/ml</b>
24 h - Inkubation	<b>Isotyp- Kontrolle</b>	1,58 (100%)	1,63	1,52	1,68
	<b>TRAIL-R1</b>	2,25 (142%)	2,74 (+22%)	2,57 (+14%)	2,59 (+15%)
48 h - Inkubation	<b>Isotyp- Kontrolle</b>	1,49 (100%)	1,54	1,46	1,55
	<b>TRAIL-R1</b>	2,52 (169%)	3,18 (+26%)	3,45 (+37%)	3,07 (+22%)

**Abbildung 24: Einfluss von TNF $\alpha$  auf die TRAIL-R1-Expression in HIEC**

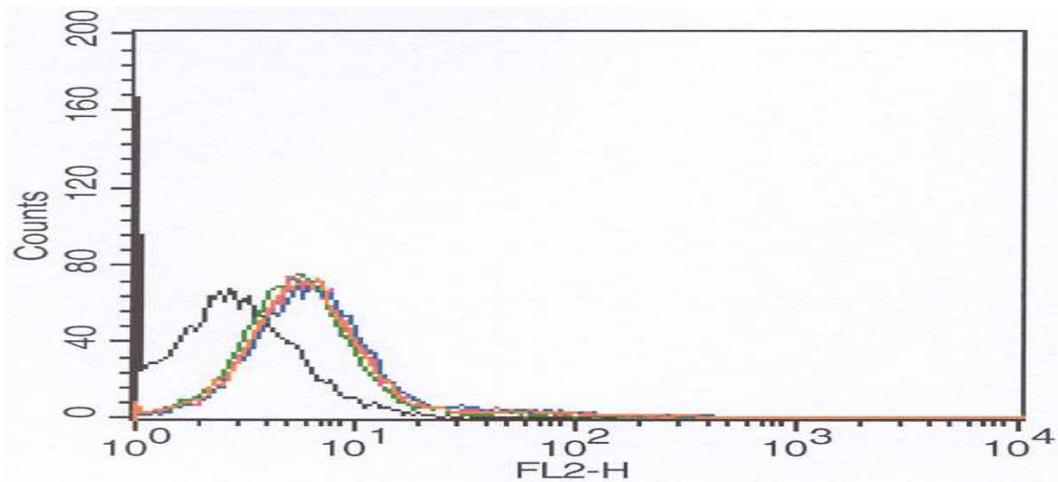
**(FACS-Analyse)**

Die Messwerte geben gemittelte Maxima der relativen Fluoreszenzintensität nach Rezeptor-Markierung wieder (die Messreihen erfolgen unter identischen Versuchsbedingungen).

a)



b)



**Abbildung 25: TRAIL-R1-Expression in HIEC nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (FACS-Analyse)**

- a)** ( — ) Isotyp ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) nach Stimulation mit 1,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 24h  
 ( — ) nach Stimulation mit 10,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 24h
- b)** ( — ) Isotyp ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) TRAIL-R1 ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) nach Stimulation mit 0,1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 1,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 10,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h

### 3.2.1.2. TRAIL-Rezeptor 2

FACS-Analysen immunmarkierter HIEC zeigen eine deutliche membranäre Expression des TRAIL-Rezeptors 2. Nach Stimulation durch TNF $\alpha$  über einen Zeitraum von 24 Stunden kann bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml eine Verstärkung der TRAIL-R2-Expression um 57%  $\pm$  4% gegenüber dem Nullwert gemessen werden. Ein Zuwachs der Expressionsstärke um 76%  $\pm$  3% lässt sich bei Stimulation mit 1,0 ng/ml TNF $\alpha$  messen, der durch höhere TNF $\alpha$ -Konzentrationen innerhalb eines 24-Stunden-Zeitfensters nicht mehr nennenswert (82%  $\pm$  2% bei 10,0 ng/ml TNF $\alpha$ ) gesteigert werden kann. Bei Verlängerung der Stimulationsdauer auf 48 Stunden kann die TRAIL-R2-Expression allerdings noch weiter erhöht werden: bei 1,0 ng/ml TNF $\alpha$  vermehrt sich die gemessene Fluoreszenzintensität gegenüber dem Nullwert um 92%  $\pm$  4%, bei Konzentrationen von 10,0 ng/ml über 48 Stunden sogar noch weiter um 108%  $\pm$  5%.

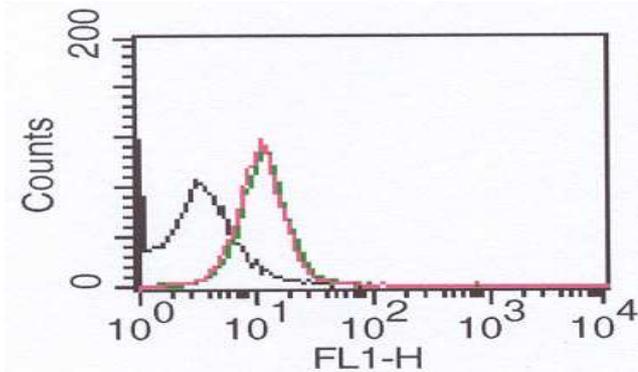
TNF $\alpha$		0,0 ng/ml	0,1 ng/ml	1,0 ng/ml	10,0 ng/ml
24 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,58 (100%)	1,63	1,52	1,68
	TRAIL-R2	6,22 (394%)	9,78 (+57%)	10,95 (+76%)	11,32 (+82%)
48 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,49 (100%)	1,54	1,46	1,55
	TRAIL-R2	12,49 (838%)	17,89 (+43%)	24,04 (+92%)	25,98 (+108%)

**Abbildung 26: Einfluss von TNF $\alpha$  auf die TRAIL-R2-Expression in HIEC (FACS-Analyse)**

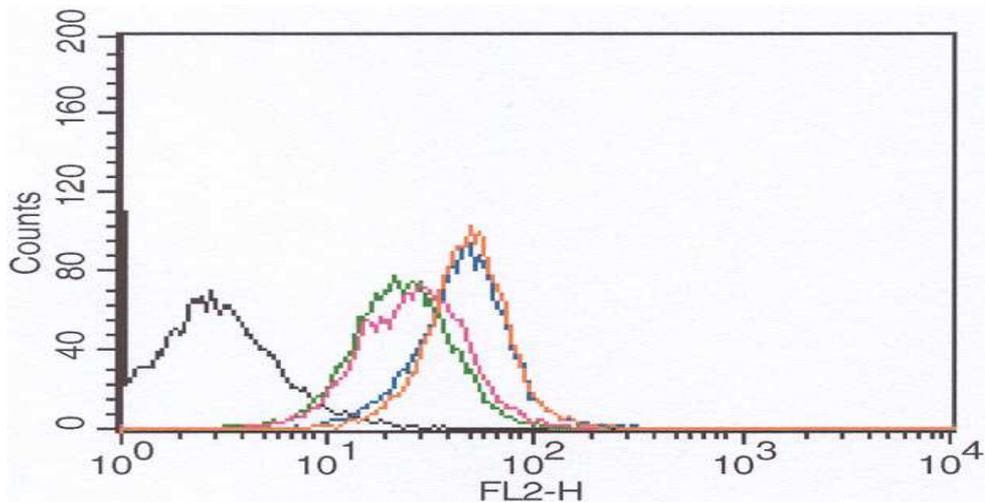
Die Messwerte geben gemittelte Maxima der relativen Fluoreszenzintensität nach Rezeptor-Markierung wieder (die Messreihen erfolgen unter identischen Versuchsbedingungen).

Somit lässt sich durch den stimulierenden  $\text{TNF}\alpha$ -Einfluss eine maximal zweifach gesteigerte TRAIL-R2-Expression erreichen (*Abbildungen 26 und 27*).

a)



b)



**Abbildung 27:** TRAIL-R2-Expression in HIEC nach Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  (FACS-Analyse)

- a) ( — ) Isotyp ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) unter Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  1,0 ng/ml über 24h  
 ( — ) unter Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  10,0 ng/ml über 24h
- b) ( — ) Isotyp ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) TRAIL-R2 ohne  $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) nach Stimulation mit 0,1 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 1,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 10,0 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  über 48h

### 3.2.1.3. TRAIL-Rezeptor 3

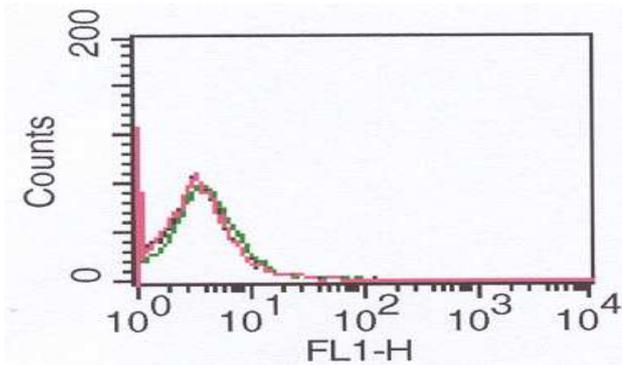
Unter basalen Bedingungen wird in HIEC keine Expression des TRAIL-Rezeptors 3 beobachtet. Auch eine Stimulation mit TNF $\alpha$  (maximal 10,0 ng/ml) bis zu einer maximalen Dauer von 48 Stunden zeigt keine Induktion dieses Rezeptor-Subtyps (*Abbildungen 28 und 29*).

TNF $\alpha$		0,0 ng/ml	0,1 ng/ml	1,0 ng/ml	10,0 ng/ml
24 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,58 (=100%)	1,63	1,52	1,68
	TRAIL-R3	1,62 (=103%)	1,70 (+5%)	1,73 (+7%)	1,67 (+3%)
48 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,49 (=100%)	1,54	1,46	1,55
	TRAIL-R3	1,58 (=106%)	1,64 (+4%)	1,69 (+7%)	1,68 (+6%)

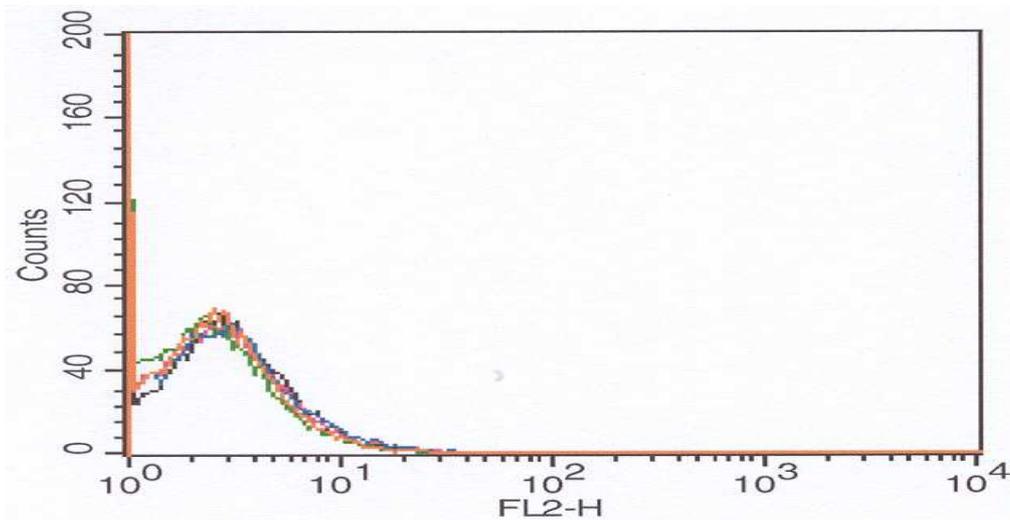
**Abbildung 28: Einfluss von TNF $\alpha$  auf die TRAIL-R3-Expression in HIEC (FACS-Analyse)**

Die Messwerte geben gemittelte Maxima der relativen Fluoreszenzintensität nach Rezeptor-Markierung wieder (die Messreihen erfolgen unter identischen Versuchsbedingungen).

a)



b)



**Abbildung 29: TRAIL-R3-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (FACS-Analyse)**

- a)** ( — ) Isotyp ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) unter Stimulation mit TNF $\alpha$  1 ng/ml über 24h  
 ( — ) unter Stimulation mit TNF $\alpha$  10 ng/ml über 24h
- b)** ( — ) Isotyp ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) TRAIL-R3 ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) nach Stimulation mit 0,1 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 1,0 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 10,0 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h

### 3.2.1.4. TRAIL-Rezeptor 4

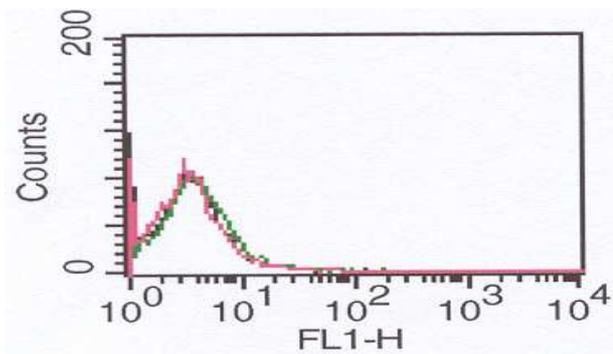
Unter basalen Bedingungen wird eine geringe Expressionsintensität des TRAIL-Rezeptors 4 auf der Cytoplasmamembran von HIEC beobachtet. Nach Stimulation mit 0,1 ng/ml TNF $\alpha$  über einen 24-Stunden-Zeitraum zeigt sich eine minimale Steigerung der TRAIL-R4-Expression um  $16\% \pm 3\%$  gegenüber nicht-stimulierten HIEC. Mit höheren TNF $\alpha$ -Konzentrationen (1,0 ng/ml) kann eine maximale Expressionsvermehrung um  $20\% \pm 4\%$  erzielt werden. Eine verlängerte TNF $\alpha$ -Stimulation über 48 Stunden zeigt keine noch steigerbare Induktion der TRAIL-R4-Expression (*Abbildungen 30 und 31*).

TNF $\alpha$		0,0 ng/ml	0,1 ng/ml	1,0 ng/ml	10,0 ng/ml
24 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,58 (=100%)	1,63	1,52	1,68
	TRAIL-R4	1,77 (=112%)	2,05 (+16%)	2,12 (+20%)	1,98 (+12%)
48 h - Inkubation	Isotyp- Kontrolle	1,49 (=100%)	1,54	1,46	1,55
	TRAIL-R4	1,64 (=110%)	1,97 (+20%)	2,01 (+22%)	1,80 (+10%)

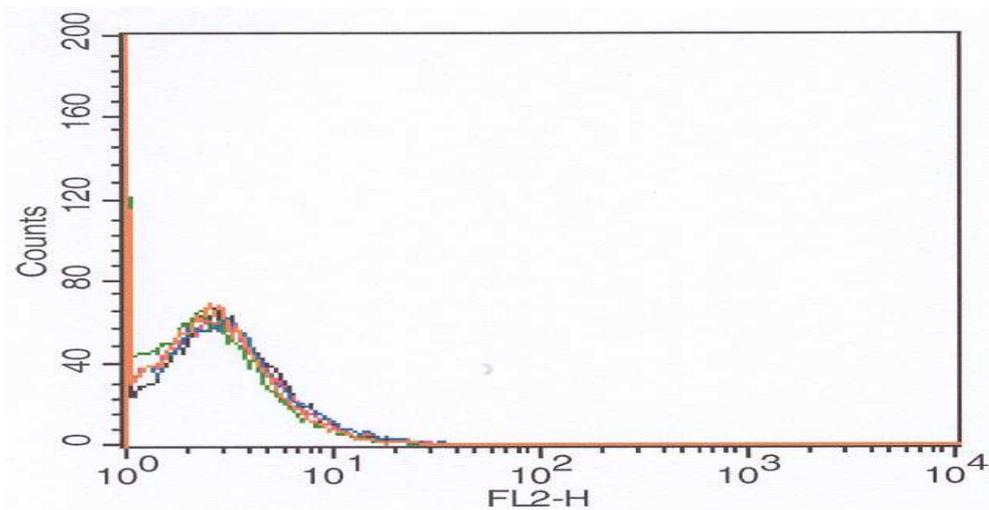
**Abbildung 30: Einfluss von TNF $\alpha$  auf die TRAIL-R4-Expression in HIEC (FACS-Analyse)**

Die Messwerte geben gemittelte Maxima der relativen Fluoreszenzintensität nach Rezeptor-Markierung wieder (die Messreihen erfolgen unter identischen Versuchsbedingungen).

a)



b)



**Abbildung 31: TRAIL-R4-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$  (FACS-Analyse)**

- a)** ( — ) Isotyp ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) unter Stimulation mit TNF $\alpha$  1 ng/ml über 24h  
 ( — ) unter Stimulation mit TNF $\alpha$  10 ng/ml über 24h
- b)** ( — ) Isotyp ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) TRAIL-R4 ohne TNF $\alpha$ -Stimulation  
 ( — ) nach Stimulation mit 0,1 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 1,0 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h  
 ( — ) nach Stimulation mit 10,0 ng/ml TNF $\alpha$  über 48h

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen den deutlichen Einfluss des proinflammatorischen Cytokins TNF $\alpha$  mit einer selektiven Upregulation der TRAIL-R2-Expression und einer minimalen Steigerung der Expressionsintensität von TRAIL-R1 und -R4. Im Gegensatz hierzu kann eine Induktion von TRAIL-R3 - selbst nach einem verlängerten Stimulationsintervall von 48 Stunden – nicht beobachtet werden.

### **3.2.2. Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$**

Parallel zu den Untersuchungen mit TNF $\alpha$  wird der Effekt des proinflammatorischen Cytokins Interleukin-1 $\beta$  auf die Expression bzw. Induktion der TRAIL-Rezeptoren 1-4 in HIEC flowcytometrisch analysiert. IL-1 $\beta$  wird in einer Konzentrationsspanne von 0,001 bis 1,0 ng/ml über 24 bis maximal 48 Stunden eingesetzt.

Die Versuchsreihen zeigen eine deutliche Upregulation der TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  unter Ausschluss einer Induktion von TRAIL-R3. Der Effekt von IL-1 $\beta$  auf die Expression von TRAIL-R1, -R2 und -R4 ist im Vergleich zu TNF $\alpha$  sehr viel stärker ausgeprägt: bereits minimale Konzentrationen von IL-1 $\beta$  (0,01 ng/ml) erhöhen die Expression dieser TRAIL-Rezeptor-Subtypen. Ebenso wie unter dem Einfluss von TNF $\alpha$  ist die Steigerbarkeit der TRAIL-Rezeptor-Expression am intensivsten möglich bei TRAIL-R2 (*Abbildung 32*).

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>0,0 ng/ml</b>	<b>0,001 ng/ml</b>	<b>0,01 ng/ml</b>	<b>0,1 ng/ml</b>	<b>1,0 ng/ml</b>
<b>Isotyp-Kontrolle</b>	1,62 (= 100%)	1,61	1,57	1,69	1,72
<b>TRAIL-R1</b>	2,35 (= 145%)	3,01 (+28%)	3,24 (+38%)	4,14 (+76%)	3,22 (+37%)
<b>TRAIL-R2</b>	6,50 (=401 %)	19,76 (+204%)	25,29 (+289%)	28,54 (+339%)	25,81 (+297%)
<b>TRAIL-R3</b>	1,65 (=102 %)	1,72 (+4%)	1,75 (+6%)	1,77 (+7%)	1,67 (+1%)
<b>TRAIL-R4</b>	1,91 (=118%)	2,14 (+12%)	2,23 (+17%)	2,64 (+38%)	2,22 (+16%)

**Abbildung 32: Einfluss von IL-1 $\beta$  auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1-4 in HIEC (FACS-Analyse)**

Die Messwerte geben gemittelte Maxima der relativen Fluoreszenzintensität nach Rezeptor-Markierung wieder (die Messreihen erfolgen unter identischen Versuchsbedingungen).

## 4. DISKUSSION

Mit Erreichen der Zottenspitze werden reife und hochdifferenzierte Enterocyten durch einen aktiven und physiologischen, als Apoptose bezeichneten Prozess eliminiert (Sträter et al., 1995). Die einzelnen molekularen Schritte der Apoptose-Induktion im Rahmen des normalen Lebenslaufes dieser Zellen unter physiologischen wie auch pathologischen, inflammatorischen Bedingungen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Apoptose scheinen die Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie zu spielen. Unklar bleibt bislang allerdings, ob diese Rezeptoren nur unter pathologischen, inflammatorischen Bedingungen eine Bedeutung haben oder auch in die physiologische Regulation der Apoptose impliziert sind.

Ein Ziel dieser Forschungsarbeit ist es, das physiologische Expressionsprofil der Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie in Enterocyten zu identifizieren. Außerdem wird die Expression der entsprechenden Liganden, FAS-Ligand und TRAIL, untersucht. Die Expression bzw. Induktion von TNF $\alpha$  hingegen wurde hier nicht analysiert, da diese auf Enterocyten-Ebene bereits umfassend behandelt wurde: unter physiologischen Bedingungen exprimieren weder unreife noch reife Enterocyten dieses Cytokin, allerdings können hohe Konzentrationen dieses Cytokins unter inflammatorischen Bedingungen in der intestinalen Mucosa gemessen werden. TNF $\alpha$  wird dann vor allem von aktivierten Lymphocyten und Monocyten, aber auch von Enterocyten produziert (Braegger et al., 1992; Breese et al., 1994; Murch et al., 1991; Murch et al., 1993).

Der morphologische Ansatz der vorliegenden Arbeit bietet die Gelegenheit, der physiologischen Situation im Dünndarmgewebe so nahe wie möglich zu kommen. Die durchgeführten Analysen an humanem, nicht-entzündlichem Dünndarmgewebe sowie auch an einer nicht-transformierten Enterocyten-Zelllinie zeigen eine ausgeprägte Expression des p55-TNF-Rezeptors durch Enterocyten duodenalen sowie jejunalen Ursprungs mit Betonung der basolateralen Zellseite. Die membranäre Expression des p75-TNF-Rezeptors hingegen fällt bei der quantitativen Analyse unfixierter, oberflächenmarkierter HIEC mittels Flowcytometrie sehr schwach aus und lässt sich morphologisch in reiferen Enterocyten durch Immunhistochemie nicht darstellen. Beide Rezeptoren werden also durch unreife Enterocyten gebildet, darüber hinaus wird der p55-TNF-

Rezeptor gegenüber dem p75-Rezeptor sehr viel stärker exprimiert und besteht auch in ausdifferenzierten, reifen Enterocyten.

Der andere klassische, bereits ausführlich am Colon voruntersuchte FAS-Rezeptor liefert analoge Ergebnisse: humane Enterocyten duodенaler und jejunaler Herkunft exprimieren diesen Todesrezeptor sehr intensiv an der Zelloberfläche sowie intracytoplasmatisch mit Betonung der basolateralen Seite. Dieses kann vergleichbar mit dem Expressionsmuster des p55-TNF-Rezeptors sowohl für unreife Kryptenzellen am HIEC-Zellmodell als auch für differenzierte Enterocyten mittels Immunhistochemie gezeigt werden. Der Nachweis des FAS-Liganden dagegen gelingt weder qualitativ noch quantitativ am HIEC-Zellmodell oder konstitutiv im Gewebe. So scheint der für den FAS-Rezeptor spezifische Ligand unter physiologischen Bedingungen wie TNF $\alpha$ , dem spezifischen Ligand des p55- bzw. p75-TNF-Rezeptors, nicht direkt in die homöostatische Regulation des intestinalen Epithelzellumsatzes involviert zu sein, zumindest wird hierdurch eine autokrine oder parakrine Apoptose-Induktion unwahrscheinlich. Darüber hinaus zeigt die Literatur, dass die einzigen FAS-Ligand-positiven Zellen im gesunden Darmepithel die Paneth-Körnerzellen des unteren Ileums sind (Moller et al., 1996). Die Apoptose eines Enterocyten über Aktivierung des p55-TNF- oder FAS-Rezeptors scheint demnach unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zelle absolut von der Präsenz der entsprechenden Liganden abzuhängen, so dass die Funktion dieser Rezeptoren unter inflammatorischen Bedingungen bedeutsam wird, wenn es zur Infiltration des Gewebes mit TNF $\alpha$  bzw. dem FAS-Liganden kommt. Die alleinige Expression des p75-TNF-Rezeptors in unreifen Enterocyten kann diesem Rezeptorsubtyp wie im TRAIL-Rezeptor-System die Funktion eines Decoy-Rezeptors geben, also die eines Rezeptors mit der gleichen Affinität zu seinem Liganden, aber ohne proapoptischen Effekt in der Zielzelle. So kann bei Überexpression des p75-TNF-Rezeptors die undifferenzierte Schleimhautzelle vor einer vorzeitigen Apoptose geschützt werden, indem er als Köder-Rezeptor mit den funktionellen Todesrezeptoren um den Liganden konkurriert.

Das besondere Interesse dieser Studie liegt vor allem in der Analyse des TRAIL-/ TRAIL-Rezeptor-Systems. Unsere Untersuchungen zeigen eine konstitutive und konstante Expression des Cytokins TRAIL in differenzierenden bzw. reifen Enterocyten mit einem deutlich steigenden Gradient entlang der Krypten-Zotten-Achse. Immature Darmepithelzellen hingegen exprimieren dieses Cytokin nicht, was die hohe Proliferationsrate der Kryptenzellen unterstützt. Es lässt sich so über eine spezifische Funktion von TRAIL als Apoptose-induzierender Ligand im Umfeld reifer Enterocyten spekulieren. Er hätte somit eine physiologische Bedeutung für die

Regeneration des intestinalen Epithels, indem überalterte Enterocyten durch Apoptose-Induktion abgeräumt werden, und ein Nachrücken differenzierender und reifer Epithelzellen ermöglicht wird. Des Weiteren könnte TRAIL als ein von Lymphocyten gebildetes Cytokin als Mediator des Immunsystems fungieren: die Eliminierung defekter, infizierter oder entarteter Zellen durch Apoptose bei ständigem lumenseitigen Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen oder schädlichen Noxen ist für eine regelrechte Darmfunktion und zur Aufrechterhaltung der physiologischen Schleimhautbarriere notwendig.

Die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1, 2 und 4 ist sowohl in duodenalem als auch jejunalem Gewebe nachweisbar, wobei diese für TRAIL-R2 besonders intensiv ausfällt. Ein Gradient zwischen Krypten- und Zottenenterocyten besteht nicht, die Expression der Rezeptoren ist diffus im Cytoplasma und an der basolateralen Zelloberfläche markiert. Eine TRAIL-R3-Expression ist dagegen über die gewählten Verfahren nicht nachzuweisen. Eine elementare Bedeutung für die physiologische Apoptose-Induktion von Enterocyten besitzt hier also der agonistische TRAIL-Rezeptor 2, dessen verstärkte Aktivierung entlang des TRAIL-abhängigen Krypten-Zotten-Gradienten für den normalen Lebenslauf der Schleimhautzelle wie oben abgeleitet seinen Sinn erhalten könnte. Die mit antagonistischer Funktion als Decoy-Rezeptoren bekannten TRAIL-Rezeptoren 3 und 4 werden im Vergleich, im Fall von TRAIL-R3 gar nicht, bei TRAIL-R4 nur sehr schwach exprimiert, so dass deren Bedeutung im Sinne einer Resistenz gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose bei Enterocyten zurücksteht. Basierend auf diesen Daten könnte vermutet werden, dass der TRAIL-/ TRAIL-Rezeptor-Mechanismus ein potentes System zur Induktion von Enterocytenapoptose darstellt. Jüngste Daten von Sträter (2002) und auch unseres Labors zeigten aber, dass Enterocyten unter physiologischen Bedingungen resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose sind.

Neben der Analyse der basalen physiologischen Expression der TNF-Rezeptor-Familie und deren korrespondierenden Liganden wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Effekt proinflammatorischer Mediatoren auf dieses System untersucht. Signifikante Änderungen der lokalen Cytokinproduktion und -freisetzung im Bereich der Darmschleimhaut sind unter entzündlichen Bedingungen wie Morbus Crohn, Colitis ulcerosa oder Cöliakie beschrieben worden (Braegger et al., 1992; Dionne et al., 1998; MacDonald et al., 1990). Es resultiert unter diesen entzündlichen Veränderungen eine beträchtliche Störung der Epithelzellentwicklung entlang der Krypten-Zotten-Achse. Diese manifestiert sich in einem gesteigerten Epithelzellverlust durch Apoptose, verbunden mit einer erhöhten Proliferationsrate immaturer Epithelzellen

in Form einer Kryptenhyperplasie (MacDonald und Spencer, 1988). Als morphologische und funktionelle Konsequenz resultiert eine Atrophie der Schleimhautzotten, wodurch es zu Zeichen einer Malabsorption und Diarrhoe kommen kann (Leichtner et al., 1996). Das Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren spielt eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (Sartor, 1995). So wurde eine gesteigerte Expression und Produktion der proinflammatorischen Cytokine  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$  und  $\text{IL-6}$  innerhalb der intestinalen Schleimhaut im Rahmen von Morbus Crohn und Colitis ulcerosa beobachtet (Braegger et al., 1992; MacDermott, 1998; Reinecker et al., 1995). Auch eine Korrelation zwischen der Stärke der  $\text{TNF}\alpha$ - bzw.  $\text{IL-1}\beta$ -Expression im entzündlich infiltrierten Gewebe und der Erkrankungsschwere wurde festgestellt (Brandtzaeg et al., 1997; Dionne et al., 1997; Sartor, 1995). Unter einer Stimulation mit  $\text{TNF}\alpha$  sezernieren intestinale Epithelzellen selbst eine bedeutende Interleukinmenge, so dass ein Entzündungsprozess durch einen positiven Feedback-Mechanismus noch potenziert werden kann (Jung et al., 1995; McGee et al., 1995). Damit lässt sich schlussfolgern, dass die Epithelzellen der Darmschleimhaut nicht nur passiv durch immunkompetente Zellen und deren Mediatoren beeinflusst werden, sondern auch intensive Interaktionen zwischen Epithel- und Immunzellen den Entzündungsprozess initiieren und unterhalten (Ruemmele und Seidman, 1998).  $\text{TNF}\alpha$  scheint eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese immunvermittelter Darmerkrankungen zu haben. In den letzten Jahren wurden verschiedene neue Therapiestrategien für Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen entwickelt. Eine sehr erfolgreiche, inzwischen fest etablierte Therapieform basiert auf einer Behandlung mit anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpern (Targan et al., 1997; van Dullemen et al., 1995). Die Rolle des FAS-Liganden-/ FAS-Rezeptor-Systems in der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist weniger gut etabliert und bleibt derzeit noch relativ unklar. Sträter et al. berichteten, dass bei Patienten mit Colitis ulcerosa eine Epithelzellschädigung durch die Interaktion zwischen FAS-Ligand und FAS-Rezeptor verursacht wird: dabei setzen cytotoxische T-Lymphocyten hohe Mengen des synthetisierten FAS-Liganden frei, welcher über den von den Enterocyten konstitutiv exprimierten FAS-Rezeptor die Apoptose der Zielzelle induziert (Sträter et al., 1997). Darüber hinaus scheint das entzündliche Infiltrat Enterocyten über eine FAS-Rezeptor-Upregulation sowie auch eine Downregulation antiapoptotischer Moleküle der IAP-Familie weiter zu sensibilisieren (Ruemmele et al., 1999). Somit scheint eine erhöhte Empfindlichkeit für eine FAS-System-induzierte Apoptose zu bestehen, wenn eine zusätzliche entzündliche Reaktion im entsprechenden Schleimhaut-Mikrokompartiment vorliegt.

Basierend auf diesen Beobachtungen ist es natürlich interessant, zu analysieren, ob das TRAIL-/TRAIL-Rezeptor-System nicht ebenfalls in die Kontrolle und Regulation der Enterocytenapoptose unter physiologischen bzw. auch pathologischen Bedingungen involviert ist. Wir können in der vorliegenden Arbeit deutlich nachweisen, dass reife Enterocyten nicht nur die agonistischen TRAIL-Rezeptoren 1 und 2, sondern auch das Cytokin TRAIL unter physiologischen Bedingungen exprimieren. Die Simulation einer Entzündungsreaktion am Zellmodell durch den Zusatz von TNF $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  zeigt die vermutete Upregulation der konstitutiv exprimierten TRAIL-Rezeptoren mit deutlicher Dominanz von TRAIL-R2. Die schon unter basalen Bedingungen herausragende Expressionsdichte dieses Rezeptorsubtyps lässt sich nach Stimulation mit TNF $\alpha$  um nahezu 100% bzw. unter IL-1 $\beta$ -Einfluss um etwa das Vier- bis Fünffache steigern. Eine Expression von TRAIL-R3 ist selbst nach dieser Provokation nicht zu verzeichnen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die proinflammatorischen Faktoren TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  potentiell die Apoptoserate intestinaler Epithelzellen über eine intensivierete Expression der Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren der TRAIL-Familie antreiben könnten. Hervorstechend sind hierbei vor allem die Präsenz und das Potential des TRAIL-Rezeptors 2. Die erhöhte Apoptoserate von Enterocyten innerhalb akut entzündlich-infiltrierten Darmgewebes könnte somit durch den direkten Effekt von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  am TRAIL-Rezeptor 2 vermittelt sein. Der TRAIL-Rezeptor 3 spielt nach diesen Untersuchungen weder für den Zellumsatz duodenaler bzw. jejunaler Enterocyten unter physiologischen Umständen noch im Rahmen eines entzündlichen Prozesses eine Rolle.

Detaillierte Kenntnisse hinsichtlich der Molekularmechanismen, die die Rezeptor-Upregulation sowie die Enterocytenapoptose kontrollieren, könnten potentiell bei der Entwicklung immunmodulierender Pharmaka zur Behandlung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen helfen. Momentan existiert aufgrund der ungeklärten Ätiopathogenese keine kurative Therapie - es gibt nur die Möglichkeit einer symptomatischen Behandlungsstrategie mit einem breiten Spektrum antiinflammatorischer Medikamente. Neben Corticosteroiden spielen 5-Aminosalicylsäure (5-ASA) und ihre Derivate eine große Rolle. Eine attraktive Option wäre die Beeinflussung der unmittelbaren und ursächlichen pathogenetischen Faktoren immunvermittelter Darmerkrankungen in Form potenter antiapoptotischer Medikamente. Ein Ansatzpunkt bestünde in der Neutralisation bzw. Hemmung der Cytokinwirkung durch spezifische Antikörper, die entweder gegen die Mediatoren selbst gerichtet sind oder direkt am Rezeptor wirken. Über die

erfolgreiche Remission der Erkrankungsschwere durch den Einsatz von anti-TNF $\alpha$ -Antikörpern bei an Morbus Crohn erkrankten Patienten wurde bereits berichtet. Außerdem sind spezifische Inhibitoren der intrazellulären Mediatoren denkbar wie beispielsweise Caspase-Inhibitoren. Solche Therapieansätze sind aber sicherlich nicht ungefährlich, da es sich hierbei um generelle Mechanismen handelt, und diese „biological drugs“ somit im gesamten Körper potent sein könnten. Die unerwünschte Apoptose sollte optimalerweise gezielt antagonisiert werden können, denn sie sorgt als schützender Mechanismus für eine physiologische Homöostase und schützt vor der Entwicklung von Malignomen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Enterocyten werden im Verlauf ihrer zunehmenden Differenzierung entlang der Krypten-Zotten-Achse lumenwärts geschoben und als reife, absorbierende Schleimhautzellen schließlich an der Zottenspitze nach einem programmierten, physiologischen Zelltod, der Apoptose, in das Darmlumen abgeschilfert. Eine exakte Balance unter den präsenten Entwicklungsstufen der Enterocyten durch ein ausgewogenes Ausmaß der Sequenz Proliferation-Differenzierung-Apoptose ist für eine funktionelle Darmschleimhaut essentiell, da eine ausreichende Enterocytenzahl mit absorbierender Fähigkeit für die Organfunktion unabdingbar ist, der rasche Austausch reifer, aber potentiell defekter, infizierter oder entarteter Zellen allerdings auch eine Garantie für die Funktionalität des Darms bedeutet. Unter pathologischen Bedingungen einer chronisch-entzündlichen Darmerkrankung wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa ist die Morphologie der Darmschleimhaut in Form einer Zottenatrophie mit der Ausbildung von kompensatorischen Kryptenhyperplasien verändert. Des Weiteren erscheint eine überhöhte Fraktion apoptotischer Zellen an der Oberfläche der Darmschleimhaut, so dass von einem übereilten Zelltod der noch in der Differenzierungsphase befindlichen Enterocyten ausgegangen wird. Die Induktion der Apoptose wird unter anderem über Aktivierung spezifischer Rezeptoren aus der TNF-Rezeptor-Familie durch Bindung des spezifischen Liganden in der Enterocytenmembran eingeleitet: besondere Aufmerksamkeit liegt hier auf den Todesrezeptoren, zu denen die TNF-Rezeptoren, der FAS-Rezeptor und die TRAIL-Rezeptoren zählen, mit ihren spezifischen Liganden FAS-Ligand und TRAIL. Es lässt sich festhalten, dass Enterocyten aller Differenzierungsgrade sowohl den klassischen p55-TNF-Rezeptor als auch in sehr hohem Ausmaß den FAS-Rezeptor exprimieren, der FAS-Ligand allerdings analog zu TNF $\alpha$  im intestinalen Gewebe nicht nachgewiesen werden kann, so dass eine autokrine oder parakrine Apoptose-Induktion durch diesen spezifischen Agonisten ausgeschlossen werden kann. Diese Rezeptoren sind demnach erst unter inflammatorischen Bedingungen bei Infiltration des Gewebes mit diesen Liganden von Bedeutung, um Apoptose zu induzieren. Die nur sehr schwache, auf unreife Kryptenzellen beschränkte Ausstattung der Enterocyten mit p75-TNF-Rezeptoren lässt für diesen Rezeptor-subtyp die Funktion eines Köder-Rezeptors zu, bei dessen Überexpression die undifferenzierte Schleimhautzelle - durch die gleiche Affinität des Rezeptors zum spezifischen Ligand ohne

Effekt in der Zielzelle - vor einer vorzeitigen Apoptose geschützt wird. Der Ligand TRAIL wird in differenzierenden und reifen Enterocyten mit einem ausgeprägten Gradient entlang der Krypten-Zotten-Achse gebildet, so dass die physiologische Regeneration des intestinalen Epithels durch dieses Apoptose-induzierende Cytokin unter Aussparung immaturer Kryptenzellen eingeleitet werden kann. Im TRAIL-Rezeptor-System dominiert der agonistische TRAIL-R2 durch sein ausgeprägtes Expressionsprofil, ohne dass ein mit seinem Liganden vergleichbarer Gradient in der Schleimhaut verzeichnet werden kann – die Apoptoserate ist deshalb abhängig von der mit der Reife der Zellen wachsenden Konzentration des Liganden TRAIL. Der weitere agonistische TRAIL-R1 wird in Enterocyten relativ schwach exprimiert, ebenso fällt das Profil für den antagonistischen Köder-Rezeptor TRAIL-R4 aus, TRAIL-R3 dagegen kann überhaupt nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der Korrelation zwischen der Schwere der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung und dem Expressionsgrad der proinflammatorischen Cytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in entzündlich infiltriertem Gewebe wird der Einfluss speziell dieser beiden Mediatoren auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren mittels immunocytochemischer Untersuchungsmethoden analysiert: hier zeigt sich eine Upregulation der Apoptose-induzierenden Todesrezeptoren der TRAIL-Familie durch die proinflammatorischen Faktoren TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$  mit deutlicher Dominanz von TRAIL-R2, so dass die erhöhte Apoptoserate intestinaler Epithelzellen innerhalb akut-entzündlichen Darmgewebes durch den direkten Cytokineffekt an TRAIL-R2 vermittelt sein könnte. TRAIL-R3 spielt nach diesen Untersuchungen weder für den Zellumsatz duodenaler bzw. jejunaler Enterocyten unter physiologischen noch im Rahmen eines entzündlichen Prozesses eine Rolle, da dessen Expression selbst nach Cytokin-Provokation nicht zu verzeichnen ist. Weiterreichende Kenntnisse hinsichtlich der die Rezeptor-Upregulation sowie die Enterocytenapoptose kontrollierenden Molekularmechanismen eröffnen damit zukünftig Möglichkeiten zur Entwicklung neuer Therapieoptionen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Adams JM, Cory S. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICD/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta A et al. Inhibition of bax channel-forming activity by bcl-2. *Science* 1997; 277: 370-372.

Arscott P, Baker J jr. Short analytical review – apoptosis and thyreoiditis. *Immunol Clin Immunopathol* 1998; 87: 207-217.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-1308.

Barnard JA, Beauchamp RD, Coffey RJ, Moses HL. Regulation of intestinal epithelial cell growth by transforming growth factor type  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1578-1582.

Baumgart DC, McVay LD, Carding SR. Mechanisms of immune cell-mediated tissue injury in inflammatory bowel disease. *Int J Mol Med* 1998; 1: 315-332.

Bjerknes M, Cheng H. The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. IV. Effects of resecting 30% of the small intestine. *Am J Anat* 1981; 160: 105-112.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in FAS/APO-1 and TNF-receptor induced cell death. *Cell* 1996; 85: 803-815.

Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533.

Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339: 89-91.

Brandtzaeg P, Haraldsen G, Rugtveit J. Immunopathology of human inflammatory bowel disease. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 18: 555-589.

Breese EJ, Michie CA, Nicholls SW, Murch SH, Williams CB, Domizio P, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994; 106: 1455-1466.

Ciacci C, Lind SE, Podolski DK. Transforming growth factor  $\beta$  regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 1993; 105: 93-101.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of FAS and initiates apoptosis. *Cell* 1995; 81: 505-512.

Coffey RJ, Shipley GD, Moses HL. Production of transforming growth factors by human colon cancer lines. *Cancer Research* 1986; 46: 1164-1169.

Cohen G. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326:1-16.

Crohn BB. Granulomatous disease of the large and small bowel: a historic survey. *Gastroenterology* 1967; 52: 767.

Cross M, Dexter TM. Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64: 271-280.

Dignass A, Podolsky DK. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor  $\beta$ . *Gastroenterology* 1993; 105: 1323-1332.

Dignass A, Tsunekawa S, Podolsky DK. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 1994; 106: 1254-1262.

Dionne S, Hiscott J, D'Agata ID, Duhaime A, Seidman EG. Quantitative PCR analysis of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  RNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1557-1566.

Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG. Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 435-442.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-2216.

Fais S, Capobianchi MR, Pallone F et al. Spontaneous release of interferon-gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon-gamma inducers. *Gut* 1991; 32: 403-407.

Ferreti E, Li S, Wang J, Post M, Moore A. Mesenchymal regulation of differentiation of intestinal epithelial cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1996; 23: 65-73.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115: 182-205.

Gordon JI. Intestinal epithelial differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J Cell Biol* 1989; 108: 1187-1194.

Green DR. Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell* 1998; 94: 695-698.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.

Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995; 85: 3378-3404.

Hall PA, Coates PJ, Ansari A, Hopwood D. Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 1994; 107: 3569-3577.

Hengartner M. Death by crowd control. *Science* 1998; 281: 1298-1299.

Hsu H, Xiong J, Goeddel DV. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 1995; 81: 495-504.

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucin-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 599-603.

Inoue M, Imada M, Fukushima Y et al. Macroscopic intestinal colonies of mice as a tool for studying differentiation of multipotential intestinal stem cells. *Am J Pathol* 1988; 132: 49-58.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S-I, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-243.

Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, Kobayashi N, Nakane PK. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 1996; 180: 152-159.

Iwanaga T, Han H, Adachi K, Fujita T. A novel mechanism for the disposing of effete epithelial cells in the small intestine of guinea pigs. *Gastroenterology* 1993; 105: 1089-1097.

Jung HC, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995; 95: 55-65.

Junqueira LC, Carneiro J. Verdauungsorgane. In: Histologie 4. Auflage. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1996: 498.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredensen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 4997-5002.

Koyama S, Podolsky DK. Differential expression of transforming growth factors  $\alpha$  and  $\beta$  in rat intestinal epithelial cells. J Clin Invest 1989; 83: 1768-1773.

Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. Immunol Today 1997; 18: 44-51.

Kurokawa M, Lynch K, Podolsky DK. Effects of growth factors on an intestinal epithelial cell line: transforming growth factor  $\beta$  inhibits proliferation and stimulates differentiation. Biochem Biophys Res Commun 1987; 142: 775-782.

Lacy ER. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. J Clin Gastroenterol 1988; 10 (Suppl 1): 72-77.

Leichtner AM, Jackson WD, Grand RJ. Crohn's disease. In: Walker WA et al., eds.. Pediatric Gastrointestinal Diseases 2<sup>nd</sup> edition. St. Louis, MI: Mosby, 1996: 692-711.

Leichtner AM, Jackson WD, Grand RJ. Ulcerative colitis. In: Walker WA et al., eds. Pediatric Gastrointestinal Diseases 2<sup>nd</sup> edition. St. Louis, MI: Mosby, 1996: 712-726.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell 1997; 91: 479-489.

MacDermott RP, Sanderson IR, Reinecker HC. The central role of chemokines (chemotactic cytokines) in the immunopathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Inflamm Bowel Dis 1998; 4: 54-67.

MacDonald TT, Spencer J. Evidence that activated mucosal T cells play a role in the pathogenesis of enteropathy in human small intestine. *J Exp Med* 1988; 167: 1341-1349.

MacDonald TT, Huchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single-cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 301-305.

Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho H, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 1996; 184: 1155-1160.

McCullen MA, Williams EJ, Sarsfield P, Steer HW, Fine D. Enterocyte apoptosis is significantly increased in ulcerative colitis. *Gut* 1997; 41: A 114.

McGee DW, Bamberg T, Vitkus JD, McGhee JR. A synergistic relationship between TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ 1 on IL-6 secretion by the IEC-6 intestinal epithelial cell line. *Immunology* 1995; 86: 6-11.

Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997; 16: 2794-2804.

Miller DK, Myerson J, Becker JW. The interleukin-1 $\beta$ -converting-enzyme family of cysteine proteases. *J Cell Biochem* 1997; 64: 2-10.

Minn AJ, Velez P, Schendel SL et al. Bcl-x1 forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; 385: 353-357.

Moller P, Walczak H, Riedl S, Sträter J, Krammer PH. Paneth cells express high levels of CD95 ligand transcripts. A unique property among gastrointestinal epithelia. *Am J Pathol* 1996; 149: 9-13.

Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 2002; 50 (Suppl 3): III 60-64.

Mosmann T. Cytokines and immune regulation. In: Rich RR et al., eds. *Clinical Immunology – Principles and Practice*. St. Louis, MI: Mosby, 1996: 217-230.

Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewski S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 223: 199-203.

Murch SH, Lamkin VA, Savage MO, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Serum concentrations of tumor necrosis factor alpha in childhood chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32: 913-917.

Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Location of tumor necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 1993; 34: 1705-1709.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (FAS/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996; 85: 817-827.

Nagata S, Golstein P. The FAS death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.

Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.

Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *TIBS* 1997; 22: 299-306.

Ogura Y, Bonen D, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-606.

Oliver BL, Sha'afi RI, Hajjar JJ. Transforming growth factor- $\alpha$  and epidermal growth factor activate mitogen-activated protein kinase and its substrates in intestinal epithelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 210: 162-170.

Perrault N, Beaulieu JF. Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* 1996; 224: 254-264.

Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL et al. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* 1993; 268: 6694-6702.

Potten CS, Nellet M, Roberts SA, Revi DA, Wilson GD. Measurement of in vivo proliferation in human colorectal mucosa using bromodeoxyuridine. *Gut* 1992; 33: 71-78.

Rasper D, Vaillancourt J, Hadano S, Houtzager V, Seiden I, Keen S, Tawa P, Xanthoudakis S, Nasir J, Martindale D, Koop B, Peterson E, Thornberry N, Huang J, MacPherson D, Black S, Hornung F, Lenardo M, Hayden M, Roy S, Nicholson D. Cell death attenuation by ursupin, a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (FAS, APO-1) receptor complex. *Cell Death Diff* 1998; 5: 271-288.

Reich K, Williams RM, Lingnau F, Seitzer M, Becker HD, Deusch K. The expression of FASS (CD95) on intestinal epithelial cells correlates with the immunohistochemical degree of inflammation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1996; 110: A 999.

Reinecker HC, Podolsky DK. Human intestinal epithelial cells express functional cytokine receptors sharing the common  $\gamma$  chain of the interleukin 2 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8353-8357.

Riede UN, Schaefer HE. Letale Zellschädigung. In: *Allgemeine und spezielle Pathologie 4. aktualisierte Auflage*. Stuttgart - New York: Thieme, 1995: 142-143.

Ruemmele FM, Beaulieu JF, Dionne S, Levy E, Seidman EG. Growth-regulation of a new human fetal enterocyte cell-line by cytokines. *Can J Gastroenterol* 1998; 12: A127.

Ruemmele FM, Seidman EG. Cytokine-intestinal epithelial cell interaction – Implications for immune-mediated bowel disorders. *Acta Paed Sinica* 1998; 39: 1-8.

Ruemmele FM, Russo P, Beaulieu JF, Dionne S, Levy E, Lentze MJ, Seidman EG. Susceptibility to FAS-induced apoptosis in human nontumoral enterocytes: role of costimulatory factors. *J Cell Physiol* 1999; 181: 45-54.

Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease. *Am J Med* 1999; 107: 489-506.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: Intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997; 91: 443-446.

Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995; 24: 475-507.

Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein bcl-2. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 5113-5118.

Scheving LA, Shiurba RA, Nguyen TD, Gray GM. Epidermal growth factor receptor of the intestinal enterocyte. Localisation to basolateral but not brush border membrane. *J Biol Chem* 1989; 264: 1735-1741.

Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Holler N, Hofmann K, Tschopp J. Characterization of two receptors binding TRAIL. *FEBS Letters* 1997; 416: 329-334.

Silen W. Gastric mucosal defense and repair. In: Johnson LR, ed. *Physiology of the gastrointestinal tract* 2<sup>nd</sup> edition. New York: Raven, 1987: 1044-1069.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell* 1994; 76: 959-962.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the FAS-apoptotic pathway: the FAS/APO-1 protease Mch5 is a CrmH-inhibitable protease that activates multiple CED-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14486-14491.

Sträter J, Koretz K, Guenther AR, Möller P. In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and familial adenomatous polyposis. *Gut* 1995; 37: 819-823.

Sträter J, Wellisch I, Riedl S, Walczak H, Koretz K, Tandara A, Krammer PH, Möller P. CD95 (APO-1/FAS)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 113: 160-167.

Sträter J, Walczak H, Pukrop T, von Müller L, Hasel C, Kornmann M, Mertens T, Möller P. TRAIL and its receptors in the colonic epithelium: a putative role in the defense of viral infections. *Gastroenterology* 2002; 122: 659-666.

Suemori S, Ciacci C, Podolsky DK. Regulation of transforming growth factor expression in rat intestinal epithelial cell lines. *J Clin Invest* 1991; 87: 2216-2221.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Constantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siederovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-446.

Targan SRR. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 1029-1035.

Thornberry AN, Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.

van Dullemen H, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tutgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995; 109: 129-135.

van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280: 243-248.

Villa P, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Caspases and caspase inhibitors. *TIBS* 1997; 22: 388-393.

Wang CY, Eshleman JR, Willson JKV, Markowitz S. Both transforming growth factor- $\beta$  and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res* 1995; 55: 5101-5105.

Weaver LT. Anatomy and embryology. In: Walker WA et al., eds. *Pediatric Gastrointestinal Diseases* 2<sup>nd</sup> edition. St. Louis, MI: Mosby, 1996: 9-30.

Winkler ME, O'Connor L, Winget M, Frensky B. Epidermal growth factor and transforming growth factor  $\alpha$  bind differently to the epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 1989; 28: 6373-6378.

Yanagihara K, Tsumuraya M. Transforming growth factor-b1 induces apoptotic cell death in cultured human gastric carcinoma cells. *Cancer Res* 1992; 52: 4042-4045.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang A. Apaf-1, a human protein homologue to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997; 90: 405-413.

## 7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	physiologische Krypten-Zotten-Architektur.....	11
2	pathologische Krypten-Zotten-Architektur bei chronisch-entzündlichen-Darmerkrankungen.....	13
3	Nekrose versus Apoptose.....	15
4	schematische Darstellung der FAS-Rezeptor / Fas-Ligand-Reaktionskaskade.....	19
5	TNF-Rezeptor versus FAS-Rezeptor.....	20
6	Signalwege der Apoptose.....	21
7	Prinzip der Avidin-Biotin-Methode.....	27
8	Prinzip der Flowcytometrie und Zellsortierung.....	30
9	immunhistochemischer Nachweis des FAS-Rezeptors.....	40
10	immunhistochemisch negativer Nachweis des FAS-Liganden.....	41
11	FAS-Rezeptor / Ligand-Expression bei HIEC (indirekte Immunfluoreszenz).....	41
12	FAS-Rezeptor / Ligand-Expression bei HIEC (FACS-Analyse).....	42
13	immunhistochemischer TRAIL-R1-Nachweis.....	44
14	immuncytochemischer TRAIL-R1-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC).....	44
15	immunhistochemischer TRAIL-R2-Nachweis.....	45
16	immuncytochemischer TRAIL-R2-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC).....	45
17	immunhistochemisch negativer TRAIL-R3-Nachweis.....	46
18	immuncytochemisch negativer TRAIL-R3-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC).....	46
19	immunhistochemischer TRAIL-R4-Nachweis.....	47
20	immuncytochemischer TRAIL-R4-Nachweis durch indirekte Immunfluoreszenz (HIEC).....	47
21	immunhistochemischer TRAIL-Nachweis.....	48
22	immunhistochemischer TNF-Rezeptor-Nachweis.....	49f
23	TNF-Rezeptor-Expression bei HIEC (FACS-Analyse).....	50

24	Einfluss von TNF $\alpha$ auf die TRAIL-R1-Expression in HIEC (FACS-Analyse).....	<b>52</b>
25	TRAIL-R1-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$ (FACS-Analyse).....	<b>53</b>
26	Einfluss von TNF $\alpha$ auf die TRAIL-R2-Expression in HIEC (FACS-Analyse).....	<b>54</b>
27	TRAIL-R2-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$ (FACS-Analyse).....	<b>55</b>
28	Einfluss von TNF $\alpha$ auf die TRAIL-R3-Expression in HIEC (FACS-Analyse).....	<b>56</b>
29	TRAIL-R3-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$ (FACS-Analyse).....	<b>57</b>
30	Einfluss von TNF $\alpha$ auf die TRAIL-R4-Expression in HIEC (FACS-Analyse).....	<b>58</b>
31	TRAIL-R4-Expression in HIEC nach Stimulation mit TNF $\alpha$ (FACS-Analyse).....	<b>59</b>
32	Einfluss von IL-1 $\beta$ auf die Expression der TRAIL-Rezeptoren 1-4 in HIEC (FACS-Analyse).....	<b>61</b>

## **8. DANKSAGUNG**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Ruemmele für die freundliche Überlassung dieses Themas, für seine sorgfältige und umsichtige Unterstützung bei der Einarbeitung und dem Erlernen der Untersuchungsmethoden sowie für seine Anleitung und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Korrektur dieser Arbeit. Außerdem möchte ich mich für die Geduld und unermüdliche Unterstützung bei der konstruktiven Überarbeitung und Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern des gastroenterologischen Labors des Zentrums für Kinderheilkunde der Universitätsklinik Bonn für die gute und lange Zusammenarbeit danken, außerdem den Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie der Universität Bonn für die ausgiebige Anleitung und Unterstützung bei Durchführung der ersten Untersuchungen und natürlich dem Team um Herrn Prof. Dr. Fischer, insbesondere Frau Christiane Esch, Frau Barbara Reddemann sowie Frau Susanne Steiner aus dem Labor für Immunhistochemie, für die engagierte Hilfe und liebevolle Unterstützung bei meiner Arbeit.

Meiner lieben kleinen Familie möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank aussprechen, denn durch ihre Kraft und Unterstützung war mir ein Abschluss dieser Arbeit erst möglich geworden.