

**Aus dem Institut für Pathologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink**

**Die Rolle des Signalmoleküls Ca^{2+}
in der Signaltransduktion der SC-1-induzierten Apoptose**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Steffen Geis
aus Alzenau i. Ufr.**

Würzburg, Februar 2005

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. H. P. Vollmers

Korreferent: Prof. Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Februar 2006

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Magenkarzinom	1
1.2 Monoklonale Antikörper in der onkologischen Therapie	4
1.3 Angeborene/ innate Immunität	5
1.4 Der SC-1 Antikörper	7
1.5 Die Apoptose	9
1.6 Zielsetzung der Arbeit	13
2. MATERIAL	14
2.1. Chemikalien und verwendete Verbrauchsmaterialien	14
2.2. Geräte	15
2.3. Häufig benutzte Medien, Lösungen, Puffer	16
3. METHODEN	18
3.1. Zellkulturtechniken	18
3.1.1. Stammerhaltung	18
3.1.2. Zellaussaat für Versuche	18
3.2. Proteinanalyse	18
3.2.1. Proteinisolierung	18
3.2.1.1. Gesamtzellproteinextrakte	18
3.2.1.2. Membranproteinextrakte	19
3.2.2. Proteinase- und Phosphataseinhibitoren	19
3.2.3. Proteinbestimmung	19
3.2.3.1. Bradford-Assay	19
3.2.3.2. BCA-Assay	20
3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gele	20
3.2.5. Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren	21
3.2.6. Färbung mit Ponceau S	21
3.2.7. Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper	22

Inhaltsverzeichnis

3.3.	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration	22
3.4.	Apoptosenachweis	23
3.4.1.	MTT-Assay	23
3.4.2.	Cell Death Elisa ^{PLUS}	24
3.4.3.	Beurteilung der Zellmorphologie	25
3.5.	Immunhistochemie	25
3.5.1.	Präparation von Zytospins	25
3.5.2.	Immunhistochemische Färbung	25
3.6.	Dokumentation	26
4.	ERGEBNISSE	27
4.1.	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration	27
4.2.	Zellmorphologische Studien	28
4.3.	Quantifizierung der Apoptoserate	30
4.4.	Western-Blot-Analyse der SC-1-Expression	32
4.5.	Immunhistochemische Untersuchungen	33
5.	DISKUSSION	36
5.1.	Übersicht	36
5.2.	Zusammenfassung der Ergebnisse	37
5.3.	Ca ²⁺ in der Aktivierung der Apoptose	37
5.4.	CD55/ Decay-accelerating factor	40
6.	ZUSAMMENFASSUNG	44
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	45
8.	LITERATURVERZEICHNIS	46

1. Einleitung

1.1. Das Magenkarzinom

In den westlichen Industrieländern stellen maligne Tumore nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar (CLASSEN, DIEHL & KOCHSIEK, 1998). Ca. 20% einer Durchschnittspopulation erkrankt und stirbt an einem Malignom (GEILER, 1998).

Zu den häufigsten Tumorarten zählt das Magenkarzinom, das trotz der rückläufigen Inzidenz in nahezu allen westlichen Industrienationen weiterhin weltweit die zweihäufigste krebsassoziierte Todesursache (PISANI *et al.*, 1998; WHELAN *et al.*, 1993; CORREA, 1992) darstellt. In Deutschland beträgt die Inzidenz 29,8/100 000 Einwohner für Männer und 13,2/ 100 000 Einwohner für Frauen (BÖTTCHER *et al.*, 1993). Die Mortalitätsrate nahm in den letzten Jahren weltweit und so auch in Deutschland kontinuierlich ab. In Westdeutschland sank sie von 1955 bis 1999 von 43,7 auf 9,9 bei Männern und bei Frauen von 20,8 auf 5,2 ab. Ähnlich verhielten sich auch die Mortalitätsraten in Ostdeutschland. Trotz dieser rückläufigen Inzidenz steht das Magenkarzinom mit 12986 verstorbenen Patienten im Jahre 1992 in Deutschland an vierter Stelle der Krebstodesfälle (BECKER & WAHRENDORF, 1998).

Das Magenkarzinom befällt bevorzugt distale Abschnitte, kann aber grundsätzlich überall entstehen. Makroskopisch werden sie nach Borrmann in vier Typen eingeteilt: polypös, ulzerös mit scharfem Rand, ulzerös mit Wandinfiltration und diffus. Ergänzend gibt es noch die Einteilung der Magenfrühkarzinome nach dem Wachstumsverhalten in vorgewölbt, oberflächlich und ulzeriert und nach der Größe in Mikrokarzinom, kleines und großes Frühkarzinom.

Histologisch lassen sich die Karzinome nach der Klassifikation der WHO (OOTA *et al.*, 1977) und derjenige nach Laurén (LAURÉN, 1965) einteilen. Die prognostische Aussagekraft der WHO-Klassifikation ist unbefriedigend, selbst das Grading der Adenokarzinome (HERMANEK, 1986) gibt hierzu keine Anhaltspunkte. Die histologische Einteilung nach Laurén unterscheidet eine intestinale und diffuse Wachstumsform. Intestinale Karzinome, die intestinalen Drüsen ähneln, wachsen in gut zusammenhängenden Zellgruppen, so dass eine scharfe Grenze zwischen Tumorrand

und Normalgewebe entsteht. Diffuse Karzinome hingegen zeigen eine Infiltration einzelner, nicht-kohäsiver Tumorzellen, weshalb bei Diagnosestellung häufig schon Tumorzellen histologisch mehrere Zentimeter vom makroskopischen erkennbaren Tumor entfernt nachweisbar sind. Diese histologische Einteilung beeinflusst somit das chirurgische Vorgehen hinsichtlich der Wahl des Sicherheitsabstandes und damit auch die Prognose entscheidend, da bei dieser Einteilung hinsichtlich des makroskopischen Tumorrandes folgende Aussage getroffen werden kann (HERMANEK *et al.*, 1986): beim intestinalen Typ ist ein Tumorwachstum über den makroskopisch erkennbaren Tumorrand hinaus nur über wenige Millimeter zu erwarten, beim diffusen Typ eher einige Zentimeter. Prognostisch gesehen ist daher der intestinale Typ günstiger zu bewerten, da in diesen Fällen, wie später bei der Therapie noch erwähnt, häufiger eine R0-Resektion erreicht werden kann.

Die genauen Mechanismen der Entstehung eines Magenkarzinoms sind immer noch unklar. Eine genetische Prädisposition konnte bisher zwar noch nicht eindeutig nachgewiesen werden, sie ist jedoch wahrscheinlich, auch wenn sie nur eine geringe Rolle spielen dürfte (MALTONI *et al.*, 1998). Neben seltenen Manifestationen z.B. im Rahmen des hereditären, nonpolypösen Kolonkarzinoms (Lynch-II-Syndrom), das mit einem erhöhten Magenkrebsrisiko einhergeht (LYNCH *et al.*, 1993), haben Verwandte ersten Grades eines Patienten ein zwei- bis dreifach höheres Risiko, zu erkranken (LA VECCHIA *et al.*, 1992; ZANGHIERI *et al.*, 1990). Für eine genetische Komponente spricht weiterhin, dass ein erhöhtes Risiko bei Personen mit der Blutgruppe A nachgewiesen wurde (HAENZSEL *et al.*, 1976).

Die weit größere Bedeutung wird den Umweltfaktoren und der Ernährung zugeschrieben. Bei der Erforschung der Ursachen für Magenkrebs und auch des Rückganges seiner Häufigkeit erwiesen sich ein niedriger sozioökonomischer Status (BARKER *et al.*, 1990; WIGGINS *et al.*, 1989; HOWSON *et al.*, 1986) und verschiedene Ernährungsgewohnheiten als bedeutende Risikofaktoren. Dabei ist es wahrscheinlich, dass eher die Behandlung und Art der Zubereitung der Nahrungsmittel eine Rolle spielen als die Nahrungsmittel selbst. So werden mehrere früher verwendete Konservierungsverfahren, wie Räuchern, Salzen, Einlegen, mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko assoziiert (CORREA *et al.*, 1975 & 1985). Nitrosamine, die im

Organismus aus Nitriten entstehen, sind aus experimentellen Versuchen bekannte Karzinogene und werden auch mit der Magenkarzinomentstehung in Verbindung gebracht (FORMA, 1987). Einige Studien konnten zeigen, dass der Verzehr von Früchten und Gemüse zu einer Abnahme, salzreiches, geräuchertes und schlecht konserviertes Essen dagegen zu einer Zunahme des Risikos, an Magenkrebs zu erkranken, führt (BUIATTI *et al.*, 1990; GONZALEZ *et al.*, 1991 & 1994; RAMON *et al.*, 1993; HIROHATA *et al.*, 1997). Auch Rauchen und Alkoholkonsum haben möglicherweise einen gewissen Einfluss auf die Magenkrebsentstehung (TREDANIEL *et al.*, 1997; NOMURA *et al.*, 1990; HOSHIYAMA *et al.*, 1992; KABAT *et al.*, 1993; HANSSON *et al.*, 1994; KNELLER *et al.*, 1992).

Daneben ist die Beteiligung einer Infektion mit *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) erwiesen (ASAKA *et al.*, 1997; THE EUROGAST STUDY GROUP, 1993). Die „World Health Organisation“ und die „International Agency for Research on Cancer Consensus Group“ erklärten 1994 *H. pylori* als klares Karzinogen (IARC MONOGRAPHS, 1994), da es eindeutige epidemiologische und histologische Hinweise hierfür gab (CORREA *et al.*, 1990). Eine neuere Metaanalyse hat diesen eindeutigen Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Seropositivität und dem Auftreten eines Magenkarzinoms bekräftigt (HUANG *et al.*, 1998). Auch eine mit 1526 Japanern durchgeführte prospektive Studie konnte diesen Zusammenhang eindeutig bestätigen (UEMURA *et al.*, 2001).

Zu einer Risikoerhöhung kommt es auch im Rahmen bestimmter Vorerkrankungen des Magens. Die chronisch-atrophische Gastritis und die mit ihr einhergehenden intestinale Metaplasie erhöhen das Risiko, v.a. am intestinalen Typ zu erkranken (MORSO, 1955; CORREA, 1992). Der diffusen foveolären Hyperplasie der Magenmukosa - Morbus Ménétrier (MÉNÉTRIER, 1988) - wird auch ein erhöhtes Karzinomrisiko zugeschrieben, ebenso den adenomatösen Polypen (NAKAMURA *et al.*, 1985).

Bisher ist die operative komplette Tumorresektion das einzige kurative Behandlungsverfahren. Besteht allgemeine Operabilität, sollte prinzipiell die Operation angestrebt werden, solange präoperativ keine metastasierte oder lokal weit fortgeschrittene Erkrankung vorliegt. So stellt die Gastrektomie die Regeloperation beim Magenkarzinom dar. Postoperativ und in palliativer Absicht kann, da das Magenkarzinom relativ strahlenresistent ist (HALLISSEY *et al.*, 1994; SINDELAR *et al.*,

1993), eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt werden. Obwohl man diese Neoplasie zu den mäßig bis wenig chemotherapieempfindlichen zählt, zeigen mehrere Chemotherapeutika im metastasierten Stadium eine Wirksamkeit. Die objektive Remissionsrate der verwendeten Einzelsubstanzen (5-Fluorouracil, Adriamycin, Mitomycin, Cisplatin, BCNU, Docetaxel) dürfte kaum über 20% (COMIS *et al.*, 1974) liegen, da die große Variabilität der Ergebnisse in der Literatur wahrscheinlich auf methodischen Gründen und auf der Patientenselektion beruht. Auch Studien mit Kombinationsschemata wie das FAM- (GLIMELIUS *et al.*, 1997), EAP-, FAMTX- (KELSEN *et al.*, 1992; WILS *et al.*, 1991) oder ECF-Schema (WEBB *et al.*, 1996) konnten die anfänglich optimistischen Ergebnisse nur z.T. bestätigen.

Einen anderen Ansatz liefert die präoperative neoadjuvante Therapie, für die folgende Argumente sprechen: durch die intakten Blut- und Lymphwege wird die Zufuhr des Therapeutikums in das Problemareal gewährleistet, ein besserer Allgemeinzustand des Patienten, eine evtl. Verkleinerung des Primärtumors, Verminderung der Verschleppung vitaler Tumorzellen bei einer Operation und eine frühzeitige Wirkung auf okkulte Mikrometastasen. Neben der Verwendung klassischer Chemotherapeutika wird der apoptoseinduzierende humane Antikörper SC-1 in einer klinische Studie zu diesem Zweck bei Magenkarzinompatienten untersucht (VOLLMERS *et al.*, 1998).

1.2. Monoklonale Antikörper in der onkologischen Therapie

Schon 1896 beschrieb Paul Ehrlich (EHRlich, 1956) die Vision von „Zauberkegeln“, die selektiv Tumorzellen zerstören und gesundes Gewebe verschonen. Als durch die Hybridomatechnologie (KÖHLER & MILSTEIN, 1975) erstmals monoklonale Antikörper in nahezu unbegrenzten Mengen in der Zellkulturschale gewonnen werden konnte, setzte eine stürmische Entwicklung auf dem Gebiet der Antikörpertherapie ein.

Heute sind bereits mehrere Antikörper für die Therapie von Krebspatienten zugelassen (HOLLINGER *et al.*, 1998; HOUGHTON & SCHEINBERG, 2000; DREWE & POWELL, 2002). Unter anderem wurden Rituximab (DAVIS *et al.*, 1999; CZUCZMAN *et al.*, 1999) gegen das Antigen CD 20 für die Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen und Trastuzumab (Herceptin®) gegen die überexprimierte Rezeptor-Tyrosinkinase HER-

2/neu für die Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms zugelassen (BASELGA *et al.*, 1996; COBLEIGH *et al.*, 1999). CAMPATH-1H, der spezifisch das CD52-Antigen erkennt, wurde sowohl bei der Primärtherapie der chronisch lymphatischen Leukämie (OSTERBORG *et al.*, 1997), als auch bei Patienten, die bereits vortheraPIert waren und nicht oder ungenügend auf Fludarabin ansprachen (KEATING *et al.*, 1999), mit Erfolg eingesetzt. Bei der akuten myeloischen Leukämie wird der mit dem Zytotoxin Calicheamicin (LEE *et al.*, 1987) gekoppelte Antikörper CMA-676 eingesetzt (APPELBAUM, 1999). Der monoklonale Antikörper 17-1A (RIETHMÜLLER *et al.*, 1994 & 1998) Edrocolomab (Panorex®) wird seit August 2000 in Deutschland nicht mehr vertrieben, da er in der Monotherapie im Vergleich zu 5-Fluoruracil/ Leukovorin in der Wirksamkeit unterlegen war. Trotz solcher Rückschläge sind zahllose weitere Antikörper in Erprobung und zum Teil bereits zugelassen.

Bei der Fülle der zur Zeit verfügbaren Antikörperkonstrukte und der rasanten Entwicklung dieses Gebietes ist die Bedeutung und der klinischen Stellenwert trotz der vielfach ermutigenden Resultate bei malignen Erkrankungen noch nicht für alle Indikationen endgültig abzuschätzen. Absehbar ist allerdings schon heute, dass monoklonale Antikörper einen festen Platz in der TumortheraPIe erobern werden und die Prognose der Tumorpazienten zum Teil deutlich verbessern können.

1.3. Angeborene/ innate Immunität

Die angeborene (natürliche) Immunität ist ein vererbtes, nicht klonales und nicht durch Affinitätsreifung entstandenes Verteidigungssystem, das in allen multizellulären Organismen vorkommt und sofort verfügbar ist. Sie kann jedoch Krankheitserreger nicht spezifisch erkennen und auch keinen gezielten Schutz gegen eine erneute Infektion geben, wozu die adaptive (erworbene) Immunität die klonale Selektion von Lymphozyten benutzt (JANEWAY & TRAVERS, 1996). Zu der innaten Immunität zählen Zellen der myeloischen Reihe, Makrophagen, natürliche Killer (NK)-Zellen und zytotoxische γ -d-T-Lymphozyten. Außerdem zählt man das Komplementsystem und sogenannte CD5+ B-Lymphozyten dazu (BOES, 2000; BOHN, 1999; COLUCCI *et al.*, 2002; FERRARINI *et al.*, 2002; KRONENBERG & GAPIN, 2002; KUPPEN *et al.*, 2001; MORETTA *et*

al., 2002). Dieses System ist im Gegensatz zur erworbenen Immunität unabhängig von einer T-Zell- oder MHC-Antwort (*major histocompatibility complex*), kann somit sofort nach Antigenkontakt reagieren. Dies setzt aber eine ausreichende Anzahl von unterschiedlichen Rezeptoren voraus, die in der Lage sind, möglichst viele unterschiedliche „fremde“ Zellen zu erkennen. Somit bildet die innate Immunität die „first line of defense“, die frühzeitig nicht nur Bakterien, sondern auch entartete Tumorzellen erkennt, wie neuere Arbeiten zeigen konnten (JANEWAY, 1989; VOLLMERS UND BRÄNDLEIN, 2002; BRÄNDLEIN *et al.*, 2003; BRÄNDLEIN UND VOLLMERS, 2004). Hier wurde außerdem die Rolle von natürlich vorkommenden Antikörpern der IgM-Klasse postuliert, den bisher noch wenig Beachtung geschenkt wurde, die aber eine entscheidende Rolle in der Früherkennung und Beseitigung maligner Zellen spielen.

Die angeborene Immunität erkennt „Körperfremdes“ anhand von konservativen, ubiquitär vorhandenen Polysaccharidstrukturen, die einer geringeren Mutationsrate unterliegen als Proteine, die die Zielstruktur der adaptiven Immunantwort darstellen. Diese Strategie ermöglicht durch eine geringe Anzahl von Rezeptoren die Abdeckung eines breiten Spektrums an „fremden“ Strukturen (MEDZHITOV UND JANEWAY, 1997).

Der Mechanismus der Erkennung und Abwehr von entarteten Zellen durch natürliche Antikörper ist bisher relativ unklar. Neu gewonnene Erkenntnisse der letzten Jahre über natürliche IgM-Antikörper (HENSEL *et al.*, 1999; HENSEL *et al.*, 2001; BRÄNDLEIN *et al.*, 2002, 2003, 2004; POHLE *et al.*, 2004) weisen große Parallelen mit der bakteriellen Abwehr (BOES *et al.*, 1998) in Bezug auf Kreuzreaktionen, geringe Affinität und Bindung an Carbohydrate auf, so dass man davon ausgehen kann, dass die gleichen Erkennungsmuster wie bei der Erkennung bakterieller Antigene vorliegen könnten.

Bei den bisher isolierten tumorreaktiven humanen Antikörpern handelt es sich ausschließlich um pentamere IgM Isotypen, die aufgrund der geringen Mutationen in den Keimbahngenen zu den nicht affinitätsgereiften Antikörpern zu zählen sind (BRÄNDLEIN *et al.*, 2003). Sie werden von ganz bestimmten Keimbahngenfamilien kodiert, ausschließlich von den oben erwähnten CD5⁺ B-Lymphozyten produziert, die sich sowohl bei an Tumoren erkrankten als auch gesunden Probanden finden lassen. Ein weiteres Charakteristikum ist die überwiegende Bindung an Carbohydrate, die sich auf posttranskriptional modifizierten Membranmolekülen befinden (HENSEL *et al.*, 1999;

HENSEL *et al.*, 2001; Brändlein *et al.*, 2003). Diese natürlich vorkommenden Antikörper stellen optimale Therapeutika für neue immuntherapeutische Ansätze in der Onkologie dar. Ein Vertreter dieser Klasse, der Antikörper SC-1, soll im folgenden Kapitel exemplarisch beschrieben werden, da er auch das Thema dieser Arbeit darstellt.

1.4. Der SC-1 Antikörper

B-Lymphozyten eines Patienten mit einem Siegelringzellkarzinom des Magens wurden mit der Heteromyelomzelllinie SPM4-0 (Hoffmann La Roche, Basel, Schweiz) zur Herstellung monoklonaler Antikörper fusioniert. Der hierbei isolierte humane IgM (lambda)-Antikörper SC-1 (VOLLMERS *et al.*, 1989) zeigt bei ca. 70% aller diffuser und ca. 25% aller intestinaler Magenkarzinome (VOLLMERS *et al.*, 1995, 1997) eine Färbung der Zellmembran. Diese Bindung von SC-1 mit der Zellmembran ist spezifisch für das Magenkarzinom, die Testung auf anderen Tumoren und nativen Geweben ergab nur die Färbung des Seminoms und einiger embryonaler Gewebe. SC-1 löst sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei Magenkarzinomzellen spezifisch die Apoptose aus (VOLLMERS *et al.*, 1995), wie weitere Tests ergaben. SC-1 wird von einem zu geringem Grade mutierten DP-49 Gen der VH3-Familie codiert. Die Homologie zu diesem Keimbahn-Gen beträgt 97%, die leichte variable lambda Immunglobulinkette ist zu 96,8% homolog zum Keimbahngen DPL-23 (VOLLMERS *et al.*, 1998). Aufgrund dieser wenigen Mutationen dieses nicht affinitätsgereiften Antikörpers handelt es sich aus immunologischer Sicht um einen Antikörper, der von Zellen des natürlichen/ innaten Immunsystems (in diesem Fall um CD5+ B-Lymphozyten) als „first line of defense“ gebildet wird (BRÄNDLEIN *et al.*, 2003).

SC-1 bindet hierzu selektiv an eine neue membranständige Isoform des GPI-Moleküls CD55/ Decay-accelerating Factor, die spezifisch auf Magenkarzinomzellen exprimiert wird (HENSEL *et al.*, 1999), um den unwiderruflichen Selbstzerstörungsmechanismus in Gang zu setzen. Als Zielstruktur für die Antikörperbindung wurden Carbohydratstrukturen durch enzymatische Verdauexperimente mit Endoglykosidasen identifiziert (HENSEL *et al.*, 2001). Allerdings gehört dieser Rezeptor nicht zur klassischen TNFR-Familie („*tumor necrosis factor receptor*“), wie z.B. der bekannteste Vertreter Fas/ CD95, mit einer für diese Rezeptorfamilie charakteristischen „Death

Domain“ (KRAMMER, 2000), vielmehr handelt es sich um eine abgewandelte Form eines Schutzmoleküls gegen autologes Komplement (DAVIS *et al.*, 1988; KURAYA AND FUJITA, 1998), die auf sehr vielen Tumoren überexprimiert wird (NIEHANS *et al.*, 1996; SHINOURA *et al.*, 1994; GORTER *et al.*, 1996).

Der neu beschriebene 82kD-Rezeptor, der auf Magenkarzinomzellen deutlich überexprimiert wird, wird hierzu von der Zelle internalisiert, was einerseits unwiderruflich die Apoptose der Tumorzelle auslöst und andererseits zu einem weiteren Anstieg der Expression desselbigen führt. Nach Bindung von SC-1 findet in der Zelle eine Tyrosin-Phosphorylierung von drei Proteinen (55 kDa, 75 kDa und 110 kDa) statt, ein 35 kDa Protein wird an einem Serinrest dephosphoryliert (HENSEL *et al.*, 1999). Ob es sich hierbei um src-Kinasen, die bereits in der Signalkaskade von CD55/ Decay-accelerating Factor von PAROLINI *et al.* 1996 beschrieben wurden, handelt, konnte bisher noch nicht festgestellt werden. Im weiteren Verlauf wird Caspase 6, die für den Abbau des Zytoskeletts verantwortlich ist, und c-myc hoch reguliert, allerdings findet keine Spaltung von PARP (poly(ADP-ribose)polymerase) oder ein Flip-Flop von Annexin statt, wie sie bei anderen bekannten Apoptose-Signalkaskaden beschrieben wurden (HERMANN *et al.*, 2001; HENSEL *et al.*, 2001). Es kommt zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten und der Bildung von sogenannten ‚apoptotic bodies‘, einer Fragmentierung der DNA (VOLLMERS *et al.*, 1995). Somit stellt diese Signalkaskade einen völlig neuen Weg der Apoptose dar.

In einer ersten klinischen Studie an der Chirurgischen Klinik der Universität Würzburg und der Missionsärztlichen Klinik Würzburg konnte beobachtet werden, dass SC-1 eine Tumorregression und Apoptose bei Patienten mit primären Magenkarzinomen ohne jegliche toxische Kreuzreaktion mit normalem, gesunden Gewebe induziert (VOLLMERS *et al.*, 1998). So kam es zu einer signifikanten Abnahme der Tumormasse bei ca. 60% der behandelten Patienten und zu einer Apoptoseinduktion im histologisch aufgearbeiteten postoperativen Präparat bei ca. 84%. Weitere Analysen zeigten, dass die Expression der neuen membranständigen Isoform CD55^{SC-1} möglicherweise als Prognosefaktoren verwendet werden kann, als Zeichen für einen besonders aggressiven Tumor. Ferner zeigte sich im Vergleich der Behandlungsregime mit und ohne präoperativer SC-1-Gabe, dass die Patienten nach drei Jahren eine deutlich höhere

Überlebensrate im Vergleich zu der 3-Jahresüberlebensrate der Deutschen Magenkarzinomstudie hatten (TIMMERMANN *et al.*, 2004).

1.5. Die Apoptose

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein aktiver und energieverbrauchender physiologischer Prozess, der in jeder Zelle ausgelöst werden kann. Im Verlauf der Ontogenese sowie zur Abwehr schädigender Einflüsse auf den Organismus müssen in bestimmten Situationen körpereigene Zellen entfernt werden. Um die Integrität des Gesamtorganismus nicht zu gefährden, ist die Eliminierung dieser Zellen einer genau geregelten Regulation unterworfen. Dieses physiologische Selbstmordprogramm der Zelle wird als Apoptose bezeichnet, das innerhalb weniger Stunden die Zelle vollständig eliminiert. Durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen und biochemischen Veränderungen dieses Phänomens durch KERR *et al.* im Jahre 1972, ergänzt durch WYLLIE 1980, wurde der physiologische programmierte Zelltod als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose geprägt.

Beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, ein etabliertes Modell in der genetischen Charakterisierung der Apoptose, entdeckte SULSTON *et al.*, 1977 durch Mutationsanalysen die ersten für die Apoptose verantwortlichen Gene. So entsprechen z.B. die Proteine der beiden Apoptose-modulierenden Gene *ced-3* und *ced-4* dieses Wurmes den humanen Proteinen ICE und *bcl-2* (YUAN *et al.*, 1990). Im gleichen Jahr 1990 fanden MCDONNELL *et al.* heraus, dass ein tumorerzeugendes Gen bei Überexpression die Apoptose verhindert. Damit war die Apoptose zu einem der attraktivsten neuen Forschungsgebiete mit ständig ansteigenden Veröffentlichungszahlen geworden.

Zellen können durch Nekrose oder Apoptose sterben. Bei der Nekrose gehen Zellen durch äußere Einflüsse z.B. durch Verbrennungen, Vergiftungen, Strahlung oder mechanischen Verletzungen zugrunde. Diese führen in größeren Bereichen des Gewebes zur Kondensation der Kernsubstanz und zum Anschwellen der Zellorganellen. Die Folge ist das Platzen der Zelle durch Schädigung der Plasmamembran. Dadurch werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die Fresszellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen.

Im Gegensatz dazu läuft bei der Apoptose ein genetisch gesteuertes Programm ab. Es sind in der Regel nur einzelne Zellen betroffen und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden.

Morphologisch (KERR *et al.*, 1972; WYLLIE, 1980) kann man zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens beobachten. Die Organellen schrumpfen, bleiben aber im Gegensatz zur Nekrose intakt und der Stoffwechsel der apoptotischen Zelle läuft normal weiter. Infolge des sinkenden Zellvolumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen, das Chromatin (DNA und assoziierte Strukturproteine) verdichtet sich und wird zerstückelt. Intensives „*membrane blebbing*“ - die Bildung von Ausstülpungen und Bläschen - ist an der Zytoplasmamembran zu beobachten. Schließlich beginnen sich membranumschlossene Vesikel – so genannte „apoptotic bodies“ - von der Zelle abzuschnüren. *In vivo* werden die apoptotischen Körperchen von phagozytierenden Zellen aufgenommen und somit ohne lokale Entzündungsreaktionen eliminiert. Deshalb lassen sie sich in Gewebeschnitten nur sehr selten nachweisen. *In vitro* kann man zum Ende der Apoptose die Lyse der apoptotischen Körperchen beobachten. Die resorbierten Vesikel werden durch Lysozyme biochemisch aufgeschlossen und auf diese Weise werden die Reste der abgestorbenen Zelle vollständig wiederverwertet. Diese Phagozytose der „apoptotic bodies“ läuft ohne Entzündungsreaktion ab, um die Integrität des Gewebes, des Organs, des gesamten Organismus zu erhalten (MORRIS *et al.*, 1984; COHEN, 1993; SAVILL *et al.*, 1993).

Biochemisch kommt es bereits zu Beginn der Apoptose zu charakteristischen Veränderungen. So wird in der Membran Phosphatidylserin, das normalerweise ausschließlich auf der zytoplasmatischen Membranseite lokalisiert ist, auf die extrazelluläre Seite verlagert (ENGELAND *van et al.*, 1998). Es lässt sich eine Aktivierung von Proteinasen und endogenen Nukleasen nachweisen. Der Abbau der DNA mittels spezifischer calcium- und magnesiumabhängiger DNasen führt zunächst zu großen DNA-Fragmenten von 50 bis 300 kb, die in der Folge weiter abgebaut werden und sich elektrophoretisch als charakteristische „Leiter“ darstellen (WILLIAMSON, 1970; WYLLIE, 1980). Hierfür ist ein "DNA fragmentation factor" (LIU *et al.*, 1997) notwendig. Bei dieser Aktivierung der Apoptose-Enzyme spielen Ca^{2+} -

Ionen eine zentrale Rolle (COHEN *et al.*, 1984). Zu diesen charakteristischen Enzymen gehört die Gruppe der Caspasen (NICHOLSON, 1999; WOLF & GREEN, 1999; SHI, 2002). Dies sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat spalten (Cysteiny-Aspartasen). Aktivierte Caspasen triggern die durch extrinsische und intrinsische Signale ausgelöste apoptose-spezifische Signalkaskade. Beim Menschen sind bisher 14 verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind. Extrazelluläre Signale leiten die Aktivierung eines membranständigen zellulären „Death Receptors“ ein, der die ersten Aktivierungen in der Caspasekaskade auszulösen scheint. An einer zweiten Phase der Caspaseaktivierung sind mitochondriale Proteine wie Cytochrom C beteiligt. Die Caspaseaktivierung findet anfangs in einem Komplex mit dem „Death Receptors“ statt und danach im Apoptosom, zu dessen Komponenten Cytochrom C, das Protein Apaf-1, die Procaspase-9 und dATP zählen (LIU *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997). Die Procaspase-9 wird proteolytisch aktiviert und freigesetzt (ZOU *et al.*, 1999). Sie aktiviert wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7, die schließlich Enzyme aktivieren die Reaktionen einleiten, die zwingend zum Absterben der Zelle führen. Hierzu zählt insbesondere der DNA-Abbau in der Zelle. Durch die Hemmung von Caspasen kann das Apoptoseprogramm unterbrochen werden. Einige Viren können durch die Hemmung von Caspasen den Tod der Wirtszelle verhindern und damit ihr eigenes Überleben sichern.

Je nach Zelltyp und Auslöser kann die Apoptose auf verschiedenen Signalwegen eingeleitet werden (OKADA & MAK, 2004), vereinfacht unterscheidet man einen extrinsischen und intrinsischen Signalweg. Das gemeinsame Ziel der unterschiedlichen, Apoptose auslösenden Wege ist die Initiierung der Caspase-Kaskade, die ihrerseits unumkehrbar den Zelltod einleitet. Der extrinsische Weg wird durch Bindung von Liganden wie Apo, FasL oder TNF an Zellmembranrezeptoren aktiviert (NAGATA, 1997; ASHKENAZI & DIXIT, 1998; KRAMMER, 2000; CHEN & GOEDEL, 2002; WAJANT, 2002). Der gebildete Komplex führt zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10 (KISCHKEL *et al.*, 1995; BUDIARDJO *et al.*, 1999). Der intrinsische Weg, wozu die SC-1-induzierte Apoptose zu zählen wäre, wird durch verschiedene intra- und extrazelluläre Stressfaktoren, wie z.B. Wachstumsfaktormangel, DNA-Schäden oder Hypoxie, ausgelöst. Hier spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle (KLUCK *et al.*, 1999).

Cytochrom C, ein Bestandteil der Atmungskette im Mitochondrium, ist der auslösende Faktor (GOLDSTEIN *et al.*, 2000). Hier öffnen sich Membranporen in der äußeren Mitochondrienmembran und setzen z.B. Cytochrom C ins Cytoplasma frei. Im Cytoplasma bilden Cytochrom C, Apaf-1 (apoptotic protease activating factor) und die Pro-Caspase-9 das Apoptosom, wodurch zusammen mit dATP die Caspase-9 aktiviert wird (LIU *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997). Die Freisetzung von Apoptose fördernden Molekülen aus den Mitochondrien ist wichtig für die Weiterleitung des Apoptosesignals in der Zelle. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Liste der Substanzen, die die Mitochondrienmembran durchlässig machen, immer länger wird. Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor p53, von dem man annimmt, dass er Apoptose durch Expression von pro-apoptischen Genen auslöst (FORTIN *et al.*, 2001). p53 wandert ebenfalls zu den Mitochondrien und interagiert dort mit dem Hitzeschockprotein Hsp70. Die Expression von Hitzeschockproteinen dient dem Schutz der Zelle und wird durch eine große Anzahl von Stressfaktoren wie Temperaturerhöhung induziert. Hitzeschockproteine inhibieren die Aggregation von Proteinen oder markieren Proteine für den proteolytischen Abbau. Hitzeschockproteinen können aber auch Apoptose unterdrücken. Hsp27, Hsp70 und Hsp90 binden an Apaf-1 und verhindern dadurch die Aktivierung von Caspase-9 (PANDEY *et al.*, 2000; SALEH *et al.*, 2000; BEERE, 2001). Allerdings geben neuere Arbeiten auch Hinweise auf eine Caspase-unabhängige Apoptose, wie z.B. die Endonuclease G (LI *et al.*, 2001) oder der „*apoptosis-inducing factor*“ AIP (LIPTON & BOSSY-WETZEL, 2002).

Der biochemische Apparat, der das Apoptoseprogramm abwickelt, ist Bestandteil jeder Körperzelle. Dies wird u.a. dadurch belegt, dass zytotoxische T-Zellen Virus-infizierte Zellen durch Apoptose eliminieren. Da Viren grundsätzlich jede Körperzelle befallen können und jede Körperzelle MHC-I-Moleküle zur Präsentation von Peptiden an zytotoxische T-Zellen besitzt, muss auch der biochemische Apparat zur Ausführung der Apoptose in jeder Körperzelle vorhanden sein (JANEWAY & TRAVERS, 1996).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung der Signaltransduktion des neuen apoptosevermittelnden magenkarzinomspezifischen Rezeptors CD55^{SC-1} (HENSEL *et al.*, 1999) durch Induktion mit dem humanen IgM-Antikörper SC-1. Besonders das ubiquitär vorhandene Signalmolekül Ca²⁺ lag im Mittelpunkt des Interesses. So stellte sich die Frage, ob Ca²⁺ in die Signaltransduktion des SC-1-Antikörpers involviert ist, ob es einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion hat und ob die Apoptoseinduktion das Expressionsverhalten des CD55^{SC-1}-Rezeptors in Abhängigkeit von der Signaltransduktion durch Ca²⁺ verändert.

2. Material

2.1. Chemikalien und verwendete Verbrauchsmaterialien

Die Chemikalien und Verbrauchsmittel wurden von den folgenden Firmen bezogen:

BAPTA-AM	Sigma, München
Bradford-Lösung	Biorad, München
Cell Death Elisa ^{PLUS}	Roche, Mannheim
CompleteMini© Protease Inhibitor	Boehringer, Mannheim
ECL-Lösung	Roth, Karlsruhe
Fura-2	Molecular Probes
Glaswaren	Roth, Karlsruhe
Ionomycin	Alexis, Grünberg
Nitrocellulose (Porenweite 0,2 µm)	Schleicher und Schuell, Dassel
Peroxidase gekoppelte Antikörper	DAKO, Hamburg
Pipetten und Pipettenspitzen	Greiner, Frickenhausen
Ponceau S Lösung	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Rotiquant	Roth, Karlsruhe
Zellkulturgefäße	Falcon oder Greiner, Frickenhausen
Zentrifugengefäße	Falcon

Alle weiteren für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen und unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen aufbewahrt.

Für die Zellkultur wurde RPMI-1640 Medium, Fötale Kälber Serum (engl. FCS), L-Glutamin und Penicillin / Streptomycin von PAA (Wien) verwendet. Ca²⁺-freies Medium wurde von Sigma, München bezogen.

Verwendete Antikörper:

Anti-CD55 Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper	DAKO, Hamburg
Chrompure IgM	Dianova
SC-1	Labor AG Vollmers, Würzburg

Verwendete Zelllinie

Alle Experimente wurden mit der Magenkarzinomzelllinie 23132/87 (VOLLMERS *et al.*, 1993), bei der es sich um einen intestinalen Wachstumstypen nach Laurén handelt, durchgeführt.

2.2. Geräte

Für die Arbeit wurden Geräte der folgenden Firmen verwendet:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
BioMAXXX-Filme®	Kodak
Blotkammer	Bio-Rad, München
Brutschränke	Heraeus Thermotech, Hanau
ELISA-Reader	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer, Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge J2-HS	Beckmann, München
Minifuge T	Heraeus, Hanau
pH-Meter pH 525	WTW, Weilheim i. OB
Photometer Uvikon 810	Kontron Instrument, Schweiz
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sonifikator Labsonic V	B. Braun, Melsungen
Spannungsgerät Gene Power Supply GPS	Pharmacia, Freiburg
Sterilbank Lamin Air HLB 2448	Heraeus, Hanau
Ultrazentrifuge	Beckmann, München
Vortex, Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Minitherm 2	Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm

Zentrifuge Biofuge 15R	Heraeus Sepatech, Osterode
Zytospin Zentrifugem, Cytospin 2	Shandon, Großbritannien

2.3. Häufig benutzte Medien, Lösungen, Puffer

Medium für Zellkultur:

RPMI 1640, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin, 10 % FCS (fötale Kälberserum), vor Gebrauch auf 37°C vorwärmen
Inkubation bei 37°C mit 7 % CO₂

Lösungen für die Präparation von Zellextrakten:

Hypotoner Puffer:

20 mM HEPES pH 7,5, 3 mM KCl, 3 mM MgCl₂

Membranlysispuffer:

50 mM HEPES pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 10 % Glycerol, 1,5 M NaCl, 1% Triton X-100

Extraktionslösungen:

5 x SDS-Extraktionspuffer:

Tris/HCl 250 mM, pH 6,8, 10 % SDS

SDS-Gelelektrophorese:

5%iges Polyacrylamidsammegel (4ml):

2,7 ml Aqua dest., 0,67 ml Acrylamid-Mix, 0,5 ml 0,1 M Tris/HCl (pH 6,8), 40 µl 10% SDS, 40 µl 10% APS, 4 µl TEMED

10%iges Polyacrylamidtrenngel (10ml):

4,0 ml Aqua dest., 3,3 ml Acrylamid-Mix, 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS, 4 µl TEMED

10 x SDS-Laufpuffer (pH 8,4):

250 mM Tris (pH 8,4), 1,92 M Glyzin, 1% SDS

Lösungen für Western-Blot:

Blotpuffer:

Tris 50 mM, (pH 8,3), 0,1% SDS, 20% Methanol

Lösungen für Immunodetektion:

Blocklösung für SC-1 Inkubation:

1x PBS (pH 7,4), 2% Milchpulver

Blocklösung für anti-CD55-AK Inkubation

1x PBS (pH 7,4), 0,05 % Tween, 3% BSA

Lösungen für Peroxidase-Detektion:

TBS (pH 7,4), 50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl

Lösungen zur Proteinquantifizierung:

BCA (Bicarboninsäure)-Assay:

Reagenz A:

1% BCA, 2% $\text{Na}_2\text{HCO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$, 0,16% $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,4% NaOH, 0,95%
 NaHCO_3

Reagenz B:

4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Standard working solution:

50 Volumen Reagenz A und 1 Volumen Reagenz B

3. Methoden

3.1. Zellkulturtechniken

3.1.1. Stammerhaltung

Die adhärenenten Zellen der Zelllinie 23132/87 (VOLLMERS *et al.*, 1993) wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Brutschrank bei 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Zellkulturmedium diente RPMI 1640, dem 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Streptomycin/ Penicillin zugesetzt wurde.

Bei Erreichen eines subkonfluenten Zellrasens wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einige Minuten mit Trypsin/ EDTA-Lösung (Endopeptidase) bei 37 °C inkubiert, bis sie sich makroskopisch ablösten. Die Trypsinierung wurde durch Zugabe FCS-haltigem Mediums inhibiert. Je nach Zelldichte und Wachstumsgeschwindigkeit wurde die Zellsuspension 1:5 bis 1:20 verdünnt in neuem Medium ausgesät.

3.1.2. Zellaussaat für Versuche

Subkonfluente Zellen wurden wie unter 3.1.1. beschrieben in Lösung gebracht. Die Zellkonzentration der Suspension wurde nach Färbung mit Trypanblau (10% Zellsuspension, 90% Trypanblaulösung) mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je nach benötigter Zellzahl wurden die Zellen in verschieden großen Zellkulturgefäßen ausgesät.

3.2. Proteinanalyse

3.2.1. Proteinisolierung

3.2.1.1. Gesamtzellproteinextrakte

Subkonfluente adhärenente Zellen der Linie 23132/87 wurden nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vorsichtig von der Zellkulturschale unter leichtem Druck gelöst und die Zellsuspension in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet erneut mit PBS gewaschen. Nach zweimaliger Wiederholung dieses

Vorganges wurden die gereinigten Zellen mit einem SDS-Lysispuffer versetzt. Nach dreißigminütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben dreimal für 30 Sekunden ultraschallbehandelt, um die DNA zu scheren. Der so gewonnene Gesamtzellproteinextrakt wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung in kleinen Portionen eingefroren.

3.2.1.2. Membranproteinextrakte

Bei der Membranpräparation wurden die Zellen wie unter 3.2.1.1. gewonnen, in Zentrifugationsröhrchen überführt und gewaschen. Durch zehnmünütige Inkubation mit hypotonem Puffer wurden die Zellen durch den entstehenden osmotischen Druck zum Anschwellen gebracht, um diese mittels eines Glashomogenisators aufzuschließen. Durch Zentrifugation bei $10\,000 \times g$ wurden die Zellkerne aus dem Lysat extrahiert. Die Membranen wurden durch dreißigminütige Zentrifugation bei $100\,000 \times g$ in einer Ultrazentrifuge aus dem Überstand pelletiert. Nach Verwerfen dieses Überstandes wurde das Membranpellet zweimal mit hypotonem Puffer gewaschen, getrocknet und mit Membranlysispuffer für einige Minuten versetzt. Die extrahierten Membranproteine wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2. Proteinase- und Phosphataseinhibitoren

Um den Effekt von Proteinasen und Phosphatasen während der Proteinextraktion zu verringern, wurden die Proben bei 4°C auf Eis gelagert und dem Lysispuffer der Proteinase- und Phosphataseinhibitor CompleteMini© der Firma Boehringer, Mannheim zugesetzt.

3.2.3. Proteinbestimmung

3.2.3.1. Bradford-Assay (BRADFORD, 1976)

Bei dieser Methode wurde der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 verwendet, der mit Proteinen Komplexe bildet, die innerhalb eines linearen Bereiches einen Farbumschlag proportional der vorhandenen Proteinmenge bewirken. Dem kommerziell erhältlichen Färbereagens Rotiquant (Roth, Karlsruhe) wurde nach den Angaben des

Herstellers der zu bestimmende Proteinextrakt zugesetzt und die Extinktion bei 595 nm (Absorptionsmaximum) im Photometer bestimmt. Durch Erstellen einer Eichgerade mit Hilfe von bekannten BSA-Mengen als Eichprotein ließ sich die Konzentration der Proben errechnen.

3.2.3.2. BCA-Assay

Da der oben beschriebene Bradford-Assay bei höheren SDS-Konzentrationen in der zu vermessenden Probe durch Interferenzen zu Ungenauigkeiten führt, verwendet man bei diesen SDS-haltigen Lysispuffern den BCA-Assay. Hierzu wurden 50 µl Proteinextrakt mit 950 µl der Standard Working Solution (50 vol Lösung A und 1 vol Lösung B) für 2h bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 562 nm im Photometer bestimmt. Auch hier diente die Erstellung einer Eichgerade mit BSA der Quantifizierung der Proteinmenge.

3.2.4. SDS-Polyacrylamid-Gele (LAEMMLI, 1970)

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses von Natriumdodecylsulfat (SDS) elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an und hebt so die positive Ladung auf. Zusätzlich enthält der Probenpuffer der Proteinextrakte β -Mercaptoethanol, das die Disulfidbindungen der Proteine reduziert, um so eine bessere Auftrennung des Proteinmusters zu erreichen. Die so denaturierten Proteine werden nun abhängig von ihrem Molekulargewicht, aber unabhängig von ihrem Ladungszustand durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten im SDS-Gel aufgetrennt.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden Trenngele mit 10% Polyacrylamid und einem pH-Wert von 8,8 verwendet. Das 4,5%ige Sammelgel, das der Fokussierung des Proteinextraktes dient, hatte einen pH-Wert von 6,8. Die Gele wurden mit Hilfe einer Minigel-Apparatur zu den von SAMBROOK *et al.*, 1989 beschriebenen Bedingungen gegossen. Die Trenngellösung wurde bis 2 cm unter den oberen Rand der Apparatur aufgefüllt und mit bidest. Wasser aufgefüllt, um eine gleichmäßige Grenze zwischen

den beiden Geltanteilen zu erhalten und um das Gel vor Sauerstoff zu schützen. Nach Auspolymerisierung und Entfernung des Wassers wurde das Sammelgel gegossen und ein Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Die Gelelektrophoresekammer wurde mit SDS-PAGE-Puffer gefüllt, die Proben und ein Größenmarker in die Kammtaschen gefüllt und bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel bei Raumtemperatur durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

3.2.5. Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren (KYHSE-ANDERSEN, 1984)

Durch diese Technik können die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran) übertragen werden. Das elektrophoretisch gewonnene Trennmuster der Proteine und deren Immunreaktivität bleiben hierbei erhalten, weshalb man anschließend durch die Reaktion geeigneter Antikörper die zu untersuchenden Proteine nachweisen kann. Der Semi-Dry-Blot ermöglicht den schnellen Transfer von Proteinen zwischen 30 kD und 80 kD. Hierzu wurden die PVDF-Membranen, Filterpapiere und das Proteingel kurz im Transferpuffer äquilibriert. In die Blotkammer wurden drei Filterpapiere, das Proteingel, die PVDF-Membran und schließlich nochmals drei Filterpapiere zwischen Kathode und Anode eingelegt, vorhandene Luftblasen durch leichtes Bestreichen entfernt und 105 min lang bei 0,8 bis 1 mA pro cm² Membran der Transfer durchgeführt.

3.2.6. Färbung mit Ponceau S (SALINOVICH *et al.*, 1986)

Nach dem Transfer der Proben wurden die Membranen mit Ponceau S angefärbt. Der Nitrozellulosefilter wurde für fünf Minuten mit Ponceau S Lösung inkubiert und anschließend mit bidest. Wasser solange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar wurden. Auf diese Weise ließ sich die Qualität des Transfers überprüfen und die Banden des Größenmarkers kennzeichnen, bevor die Membran mit PBS-Puffer wieder entfärbt wurde. Zusätzlich stabilisiert die in dieser Lösung enthaltene Trichloressigsäure die Proteinbindung an der PVDF-Membran.

3.2.7. **Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper**

(SCHNEPPENHEIM *et al.*, 1991)

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen nach erfolgtem Transfer mindestens eine Stunde in einer Blocklösung inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper für eine weitere Stunde hinzugegeben. Danach wurden die Membranen dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen, danach für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper, ein Peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen den Primärantikörper, inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS konnten die Proteine, die vom Primärantikörper erkannt wurden, durch Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden. Diese Nachweismethode beruht darauf, dass die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase ein zugegebenes Substrat (Luminol) oxidiert und so in einen angeregten Zustand überführt. Kehrt das Luminol wieder in seinen Grundzustand zurück, wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert, das auf einem Röntgenfilm zu einer Schwärzung führt. Die Membranen wurden mit der kommerziell erhältlichen ECL-Lösung der Firma Roth (Karlsruhe) drei Minuten inkubiert. Danach wurde für einige Sekunden bis Minuten ein Röntgenfilm in der Dunkelkammer aufgelegt, der anschließend mit herkömmlichen Fotoentwicklerlösungen entwickelt wurde.

3.3. **Messung der intrazellulären Calciumkonzentration**

(GRYNKIEWICZ *et al.*, 1985; BENESIC *et al.*, 2000)

Die intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} wurde mit Hilfe des Ca^{2+} -sensitiven Fluorochroms Fura-2 (Molecular Probes) gemessen. Die Fluoreszenzintensität von Fura-2 hängt von der Calciumkonzentration ab. Bei der Anregungswellenlänge von 334 nm steigt die Fluoreszenz mit steigendem Ca^{2+} , bei 380 nm sinkt sie dagegen. Über das Verhältnis der beiden Wellenlängen kann so die Calciumkonzentration unabhängig von der Fura-2-Konzentration bestimmt werden.

Die Zelllinie 23132/87 wurde mit Fura-2-AM 30 Minuten bei 37°C vorinkubiert, dreimal gewaschen und auf den Objektisch gelegt. Die Anregungswellenlängen betragen 334 ± 1 nm bzw. 380 ± 1 nm, das emittierte Licht wurde bei 500 nm aufgenommen. Die Messung wurde im Physiologischen Institut der Universität

Würzburg mit einem Attoflor-Videoimaging-System (Zeiss) durchgeführt, das mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400-fache Vergrößerung, Ölimmersion; Zeiss) ausgestattet ist. Die Bilder wurden mit einer Frequenz von einem Bildpaar pro drei Sekunden mit einer ICCD-Videokamera (Zeiss) aufgezeichnet, mit Hilfe der Attoflor Software digitalisiert und berechnet. Am Ende des Experimentes wurden die Zellen noch mit zwei Kalibrationslösungen mit bekannten Calciumkonzentrationen (Ca^{2+} -freie EGTA-Lösung und 3 mmol/l Ca^{2+} -Ringerlösung) und dem Calciumionophor Ionomycin (1 $\mu\text{mol/l}$; Sigma) überströmt. Da Ionomycin die Zellmembran für extrazelluläre Calciumionen durchlässig macht, kam es aufgrund von Diffusion zum Ausgleich zwischen intrazellulärem und bekanntem extrazellulärem Ca^{2+} . Aus dem maximalen Verhältnis 334/380 nm (R_{max}) und dem minimalen Verhältnis 334/380 nm (R_{min}) konnte somit die intrazelluläre Calciumkonzentration im Verlauf des Experiments nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = k_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\text{min}}) / (R - R_{\text{max}}),$$

wobei β den Quotienten der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm in Abwesenheit von Ca^{2+} , dividiert durch die Intensität in Anwesenheit von 3 mmol/l Ca^{2+} , darstellt.

3.4. Apoptosenachweis

3.4.1. MTT-Assay (MOSMANN, 1983; CARMICHAEL *et al.*, 1987)

Zur Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde der MTT-Assay (Mitochondrial Hydroxylase Enzymatic Activity Assay) verwendet, der ähnlich wie andere Proliferations- und Zytotoxizitätstests (wie z.B. der radioaktive ^3H -Thymidin-Einbautest) Unterschiede im Zellproliferationsverhalten sehr empfindlich erfasst. Die Substanz MTT reichert sich selektiv in den Mitochondrien lebender Zellen an, wo mitochondriale Hydroxylasen diese zu einem dunkelvioletten Farbstoff umsetzen. Durch photometrische Bestimmung kann mittels einer Eichgerade bekannter Zellzahlen die Anzahl der lebenden Zellen in der untersuchten Lösung ermittelt werden.

Auf eine 96-well-Platten wurden 5×10^4 Zellen pro well in einem Volumen von 50 μl pipettiert, zur Apoptoseinduktion wurde SC-1-Antikörper auf ein Gesamtvolumen von

100 µl Zellsuspension pro well zugeben. Die Zellkulturplatten wurden für 24h im Brutschrank (37°C, 7% CO₂) inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl MTT-Färbelösung wurde die Zellkulturplatte nach 25 weiteren Minuten im Brutschrank bei 800 x g abzentrifugiert. Das Medium wurde abgesaugt, das Pellet in 150 µl DMSO aufgenommen. Nach mehrmaligem Resuspendieren löste sich der kristalline Farbstoff homogen auf. Die Intensität des Farbumschlags wurde photometrisch bei $\lambda = 690$ nm und $\lambda = 540$ nm bestimmt und die Differenz der beiden Absorption gebildet. Durch Vergleich mit bekannten Mengen lebender Zellen ließ sich eine quantitative Aussage über die Apoptoseinduktion treffen.

3.4.2. Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Firma Roche, Mannheim)

Zur genaueren Quantifizierung apoptotischer Zellen wurde der kommerziell erhältliche Cell Death Detection ELISA^{PLUS} von Roche verwendet. Dieser Sandwich-Enzym-Immunoassay detektiert mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten murinen monoklonalen Antikörpern Histon- und DNA-Komponenten von Mono- und Oligonukleosomen, die im Zuge der Apoptose gebildet werden. Die relative Anzahl apoptotischer Zellen korreliert mit der Menge der vorhandenen Nukleosomen, die nach enzymatischer Umsetzung eines farblosen Substrates durch die Peroxidase anhand der Farbintensität des Reaktionsproduktes abgelesen werden kann.

Hierzu wurden 1×10^5 Zellen pro well in einem Volumen von 100 µl mit 100 µl verdünntem SC-1-Antikörper in einer 96-well-Platte 24 Stunden bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen sowohl mit der gleichen Menge an frischem als auch verbrauchtem Kulturmedium. Zur Fehlerreduktion wurden alle Ansätze in doppelter Ausführung durchgeführt.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen 10 min bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und 200 µl des mitgelieferten Lysispuffers hinzugegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte in den folgenden 30 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem Zentrifugieren wurden 20 µl des Überstandes auf eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte übertragen und 80 µl des Immunoreagenz (1/20 Anti-DNA-POD, 1/20 Anti-histon-biotin, 18/20 Inkubationspuffer) hinzugegeben. Zusätzlich wurden eine im Test-Kit enthaltene Positivkontrolle und ein leerer Ansatz als Negativkontrolle auf

derselben Platte getestet. Der Ansatz wurde zwei Stunden bei ca. 250 rpm durchmischt, dreimal mit Inkubationspuffer (250 μ l/well) gewaschen und danach mit 100 μ l der ABTS-Lösung (1 ABTS-Tablette in 5 ml Substratpuffer) pro well versetzt. Nach erneutem Durchmischen spiegelte sich die Intensität der Antikörper-induzierten Apoptose in einem intensiven grünen Farbniederschlag wider, der mit Hilfe eines ELISA-Readers bei $\lambda = 405$ nm gegen die Referenzwellenlänge von $\lambda = 490$ nm vermessen wurde.

3.4.3. Beurteilung der Zellmorphologie

Hierzu wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf morphologische Kriterien der Apoptose untersucht. Apoptotische Zellen sind im Verhältnis zu den vitalen geschrumpft und weisen eine irreguläre Oberfläche auf (MARTIN *et al.*, 1994; DUKE *et al.*, 1997). Für die Fotodokumentation wurden die Zellen in Methanol fixiert.

3.5. Immunhistochemie

3.5.1. Präparation von Zytospins

100 μ l einer Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen/ml wurden in Zytospin-Vorrichtungen pipettiert, in die Objektträger eingespannt waren. Durch zweiminütige Zentrifugation bei 500 x g wurden die Zellen auf den eingespannten Objektträger transferiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie für 10 Minuten in Aceton fixiert, bevor sie immunhistochemisch gefärbt wurden.

3.5.2. Immunhistochemische Färbung

Durch immunhistochemische Färbungen lassen sich bestimmte Zielstrukturen mittels spezifischer Antikörper auf vitalen Zellen darstellen. Zuerst wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einem Blockpuffer abgesättigt. Anschließend wurden die Zytospins 30 min mit SC-1-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurde ein Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper gegen humane IgM-Antikörper für 30 min zugesetzt. Wieder folgte dreimaliges Waschen mit TBS. Die Farbreaktion der

Peroxidase wurde durch zehnmünütige Inkubation mit DAB (3,3' Diaminobenzidin-tetrahydrochloridsäure) im Dunkeln ausgelöst. Die Reaktion wurde gestoppt, die Zytospins mit Hämälau für 5 min gegengefärbt, unter fließendem Wasser für 10 min gewaschen und abschließend mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt und ausgewertet.

3.6. Dokumentation

Zellkulturen und der Zytospinpräparate wurden mit einer an einem Mikroskop angebrachten Digitalkamera fotografiert, Westernblots mit einem Scanner mit einer Auflösung von 300 dpi digitalisiert. Statistische Auswertungen und deren graphische Darstellung erfolgte mit Microsoft Excel 97 und Sigma Plot.

4. Ergebnisse

4.1. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Zu Beginn der Arbeit stand eine quantitative Untersuchung der intrazellulären Calciumkonzentration von Magentumorzellen nach Stimulation mit SC-1 im Mittelpunkt des Interesses. Zu diesem Zwecke wurden Zellen der Zelllinie 23132 mit SC-1 (40µg/ ml Ringerlösung) und einem kommerziellen humanen Kontrollantikörper Chrompure IgM (40µg/ ml Ringerlösung) stimuliert. Die Veränderungen der Konzentration wurden mit dem Attoflor-Videoimaging-System der Firma Zeiss über einen Zeitraum von 5 Minuten beobachtet (Abb. 1).

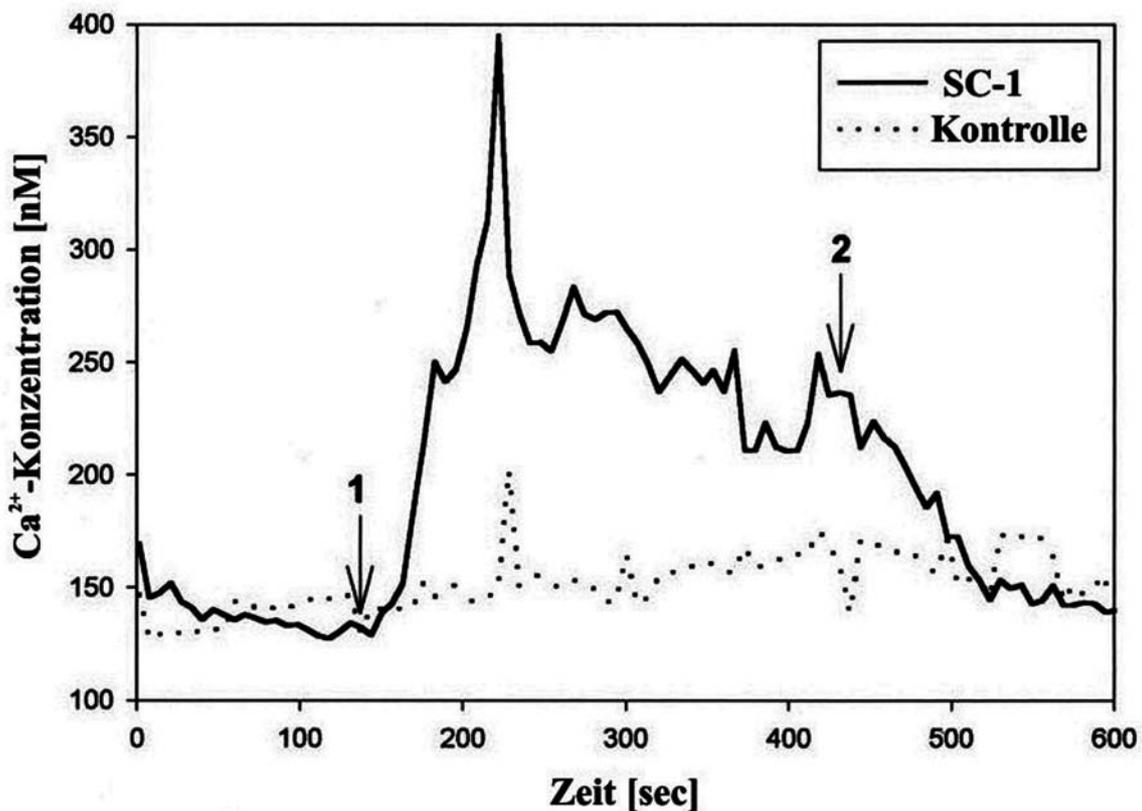


Abb. 1: Messung der intrazellulären Calciumkonzentration

Die Zellen wurden mit Ringerlösung gewaschen, am Punkt 1 mit SC-1 (40µg/ml) oder humanem Kontrollantikörper Chrompure IgM (40µg/ml) stimuliert. An Punkt 2 wurden den Zellen nur noch Ringerlösung zugefügt. Nach ca. 50 Sekunden wurde ein 2,7facher Anstieg der Calciumkonzentration bei Zugabe von SC-1 beobachtet, der durch den humanen Kontrollantikörper Chrompure IgM nicht ausgelöst wurde. Nach 2 Minuten stabilisierte sich die Calciumkonzentration auf dem 1,5fachen Niveau, das erst nach Beendigung der SC-1-Gabe nach weiteren 5 Minuten auf das Ausgangsniveau zurückkehrte.

Bei SC-1-Gabe kam es nach ca. 50 Sekunden zu einem 2,7fachen Anstieg der Calciumkonzentration, die sich nach ca. 2 Minuten bis zum Ende der Messung auf dem 1,5fachen Ausgangsniveau hielt. Nach Ende der Zugabe von SC-1 normalisierte sich die Konzentration wieder innerhalb von ca. 5 Minuten. Diese Veränderungen wurden in der Kontrolluntersuchung durch Zugabe des humanen Antikörpers Chrompure IgM nicht beobachtet, hier zeigte sich keine Veränderung der Calciumkonzentration.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Bindung von SC-1 an seinen Rezeptor CD55/Decay-Accelerating Factor das Signalmolekül Ca^{2+} intrazellulär freigesetzt wird.

4.2. Zellmorphologische Studien

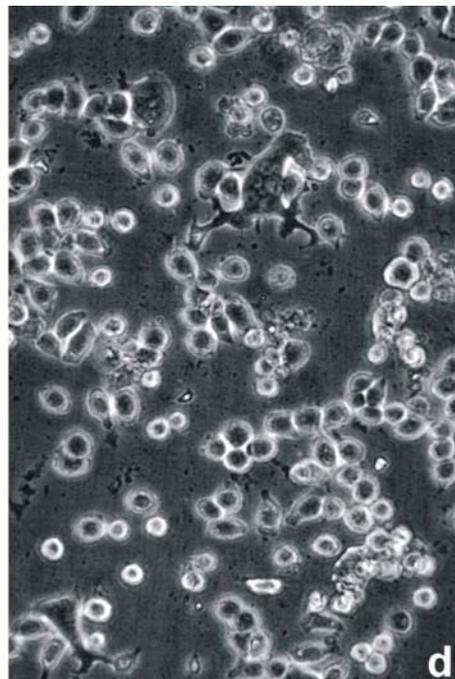
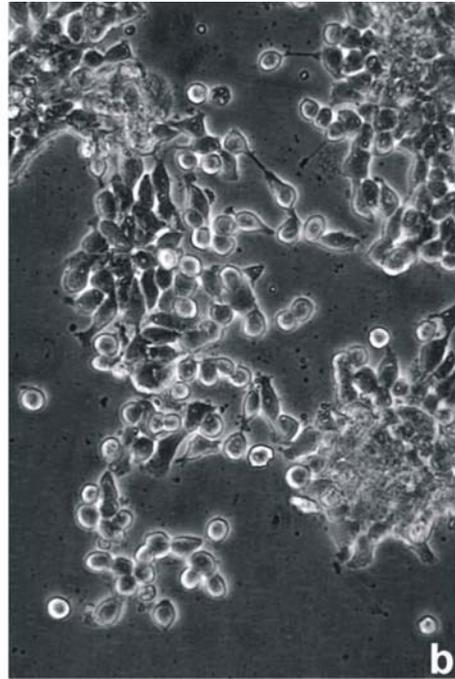
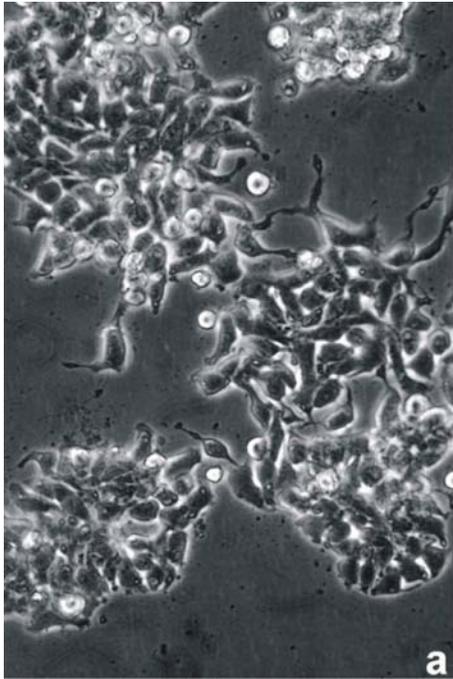
Um den Einfluss von Ca^{2+} auf die Signaltransduktion der SC-1-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden die morphologischen Veränderungen der Zelllinie 23132 durch Inkubation in unterschiedlichen Zellkulturmedien mit und ohne SC-1-Zusatz nach 24h unter dem Mikroskop beurteilt.

In dem Standardmedium RPMI zeigte die Zugabe von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SC-1 (Abb. 2b) vereinzelte ‚apoptotic bodies‘, die sich aus dem kohärenten Zellverband im Vergleich zur Kontrolle ohne SC-1-Zusatz (Abb. 2a) lösten. Dieselben Veränderungen wurden in Ca^{2+} -freien RPMI-Medium gemacht (Abb. 2c/ d), wobei sich hier die Zellen vermehrt durch das Fehlen von Ca^{2+} für die Adhäsionsmoleküle von der Zellkulturschale lösten, ohne den programmierten Zelltod auszulösen. Dies erlaubte die Schlussfolgerung, dass ein von außen kommender Ca^{2+} -Einstrom nicht für die Apoptose benötigt wird.

Um den Einfluss von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem die Zellwand durchdringenden Ca^{2+} -Chelatkomplexbildner 1, 2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) für drei Stunden vorinkubiert, um nach Kumulierung von BAPTA-AM in der Zelle nach SC-1-Bindung freigesetztes Ca^{2+} intrazellulär zu binden und so den Konzentrationsanstieg und den eventuell damit verbundenen Effekt zu inhibieren.

Nur der Zusatz von 50 μM BAPTA-AM (Abb. 2e) zeigte keine erhöhte Apoptoserate, so dass die gewählte BAPTA-AM-Konzentration keinen zytotoxischen Effekt auslöste.

Durch die Gabe von SC-1 nach dreistündiger Inkubation mit BAPTA-AM vollzogen ebenso viele Zellen die Apoptose (Abb. 2f) wie in der Kontrollprobe (Abb. 2a).



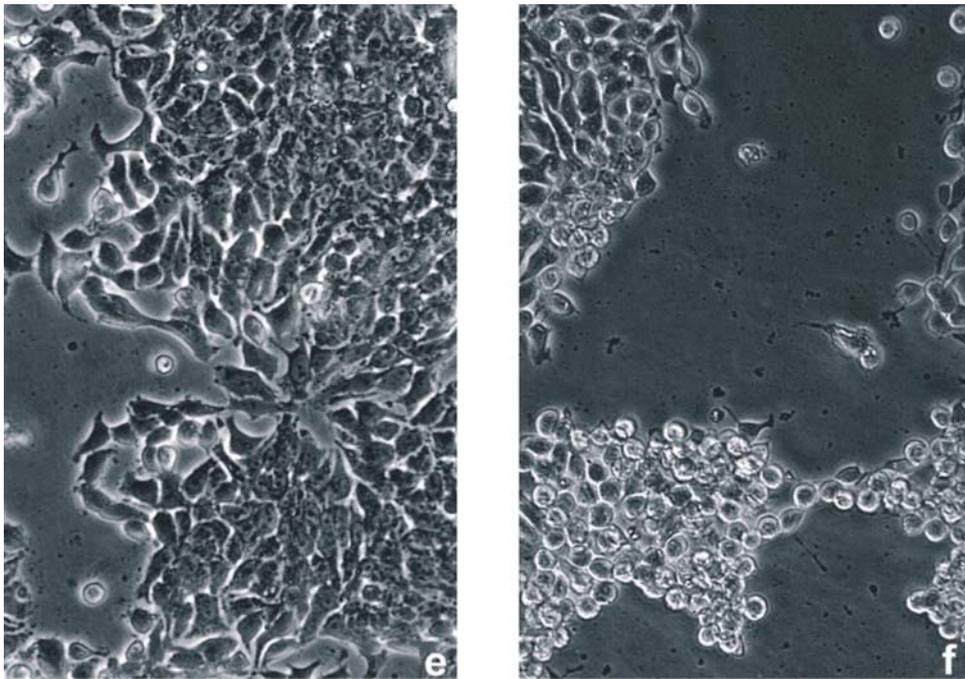


Abb. 2: Morphologische Veränderungen der Zelllinie 23132 nach 24h

a) Kontrolle - Zellen in RPMI-Medium; b) Zellen in RPMI-Medium mit SC-1-Gabe; c) Kontrolle - Zellen in Ca^{2+} -freien RPMI-Medium; d) Zellen in Ca^{2+} -freien RPMI-Medium mit SC-1-Gabe; e) Kontrolle - Zellen in RPMI-Medium nach Inkubation mit BAPTA-AM; f) Zellen in RPMI-Medium nach Inkubation mit BAPTA-AM mit SC-1-Gabe;

Durch SC-1-Gabe kommt es in allen Versuchsansätzen zur Ausbildung von ‚apoptotic bodies‘, die für die Apoptose charakteristisch sind. Es werden keine Unterschiede in der Anzahl der apoptotischen Zellen beobachtet. Der Entzug von extrazellulärem Ca^{2+} führt zur Ablösung der Zellen von der Kulturschale, ohne bei den Zellen Apoptose zu induzieren.

4.3. Quantifizierung der Apoptoserate

Um die morphologischen Beobachtungen zu untermauern, sollte die Zahl der apoptotischen Zellen nach SC-1-Gabe quantifiziert werden.

Zur genauen Analyse der Apoptoserate wurde der kommerziell erhältliche Cell Death Elisa^{PLUS} von Roche verwendet, der zur Quantifizierung der SC-1-induzierten Apoptose im Labor der AG Vollmers als Standardnachweis etabliert wurde.

Magenkarzinomzellen der Zelllinie 23132 wurden 90 Minuten lang mit verschiedenen Konzentrationen von BAPTA-AM (0 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM) vorinkubiert, danach

wurde der SC-1-Antikörper für 24h zugegeben. Die Auswertung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Steigende BAPTA-AM-Konzentrationen in den Kontrollen (Abb.3) ohne SC-1-Zusatz hatten keinen Effekt auf das Überleben der Zellen, so dass diese Konzentrierung keinen zytotoxischen Effekt hatte. Die wenigen apoptotischen Zellen aller Kontrollversuche sind auf die artifiziellen Zellkulturbedingungen zurückzuführen und zeigen in allen vier Versuchsansätzen eine vergleichbare Anzahl an apoptotischen Zellen. Durch den Zusatz von SC-1 zur Kontrolle (0 μ M) kam es zu einem starken Anstieg der Apoptoserate, der auch bei Vorinkubation mit BAPTA-AM in unterschiedlichen Konzentrationen beobachtet wurde.

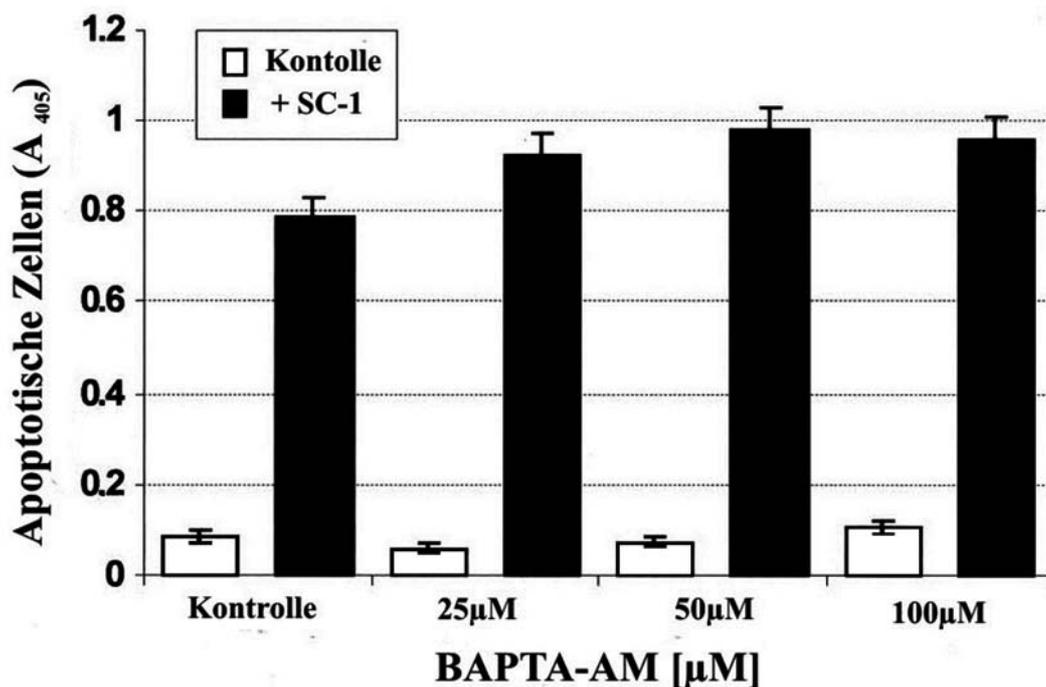


Abb. 3: Cell Death Elisa^{PLUS} zur Quantifizierung der Apoptoserate nach 24h

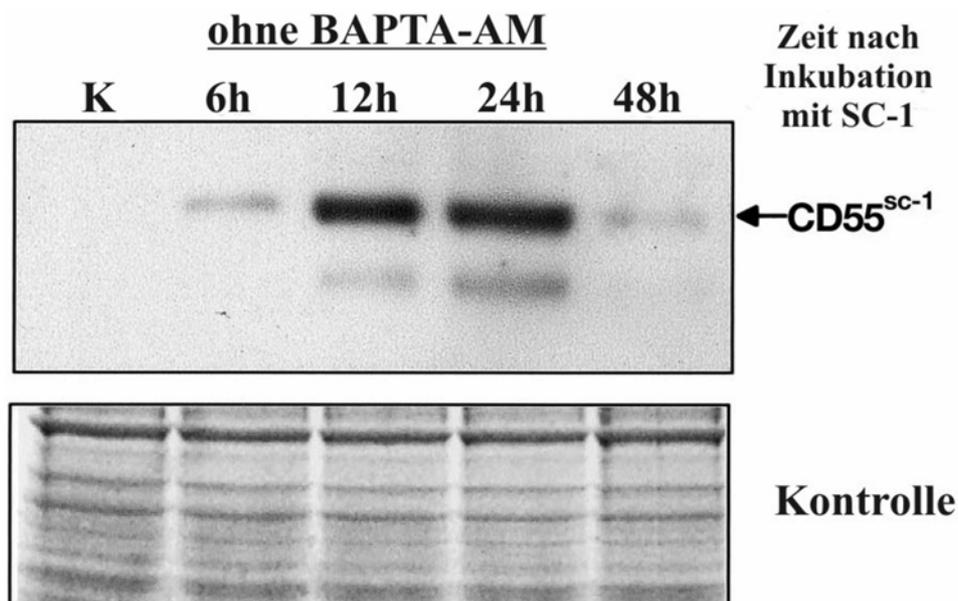
Steigende BAPTA-AM-Konzentration zeigen keinen Effekt auf die Apoptoserate in den Kontrolluntersuchungen ohne SC-1-Gabe. Durch den Zusatz von SC-1 (40 μ g/ml) kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Apoptose, der auch bei verschiedenen BAPTA-AM-Konzentrationen zu beobachten ist.

4.4. Western-Blot-Analyse der SC-1-Expression

Um die von BERGER und MEDOF 1987 beschriebenen calciumabhängigen Unterschiede des Expressionsverhaltens von CD55 bezüglich der Expression von CD55^{SC-1} der Zelllinie 23132 zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen mit Membranextrakten von unbehandelten und mit BAPTA-AM vorinkubierten Zellen durchgeführt. Sechs Stunden nach der Apoptoseinduktion durch SC-1 konnte eine gesteigerte Expression von CD55^{SC-1} beobachtet werden, die bis zu 48 Stunden anhielt (Abb. 4). In nicht induzierten Zellen konnte aufgrund der geringen Sensitivität von SC-1 in Western-Blot-Analysen CD55^{SC-1} nicht detektiert werden.

Im Vergleich zu unbehandelten Zellen stieg die Expression von CD55^{SC-1} bei mit BAPTA-AM vorinkubierten Zellen schneller und stärker an. Nach einer maximalen Expression nach 24 Stunden sank diese nach 48 Stunden ab, war aber immer noch im Vergleich zum Ausgangswert deutlich ausgeprägt.

Interessanterweise kam es während des apoptotischen Prozesses ebenfalls zu einem Anstieg eines zytoplasmatischen 70kd-Proteins, das mit SC-1 kreuzreagiert und schon zuvor als das Autoantigen Ku70 (HENSEL *et al.* 1999) identifiziert wurde.



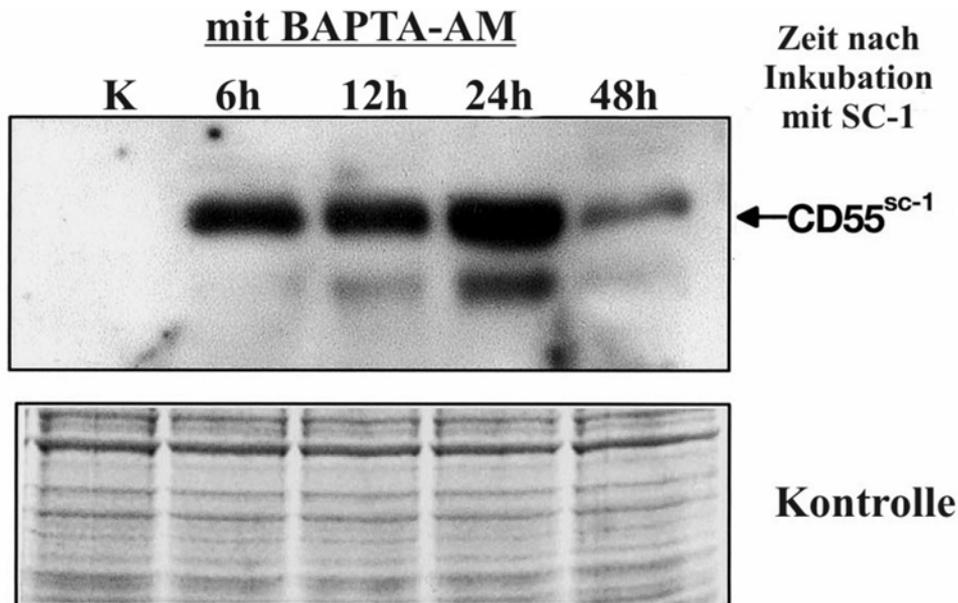


Abb. 4: Western-Blot-Analyse der SC-1-Expression

Die Zelllinie 23132 wurde mit SC-1 (40µg/ml) mit und ohne BAPTA-AM für die Dauer der angegebenen Zeiten inkubiert. Die extrahierten Membranproteine wurden in einer 10% SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet und mit SC-1 als Primärantikörper gefärbt. Mit Coomassie-gefärbte Gele zeigen als Kontrolle dieselbe Proteinkonzentration in jeder Spur.

Beide Experimente zeigen einen deutlichen Anstieg der CD55^{SC-1} Expression mit einer unterschiedlichen Kinetik. Die Färbung zusätzlicher Proteine rührt von einer unspezifischen Kreuzreaktion mit dem Autoantigen Ku70 her.

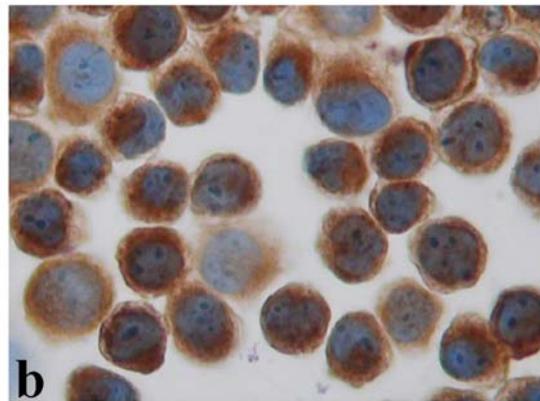
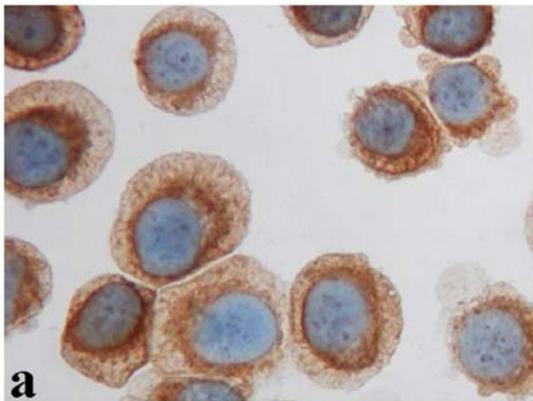
4.5. Immunhistochemische Untersuchungen

Da die quantitative Analyse des Expressionsverhalten des CD55^{SC-1} – Rezeptors keine Rückschlüsse über die qualitative Verteilung des Rezeptors erlaubt, wurden unter denselben Bedingungen wie bei den Western-Blot-Analyse in Abb. 4 die Magenkarzinomzellen der Zelllinie 23132 präpariert, nach 6h und 12h Inkubation mittels einer Zentrifuge auf Objektträger transferiert und schließlich mit immunhistochemischen Methoden die Verteilung des CD55^{SC-1} Rezeptors in der Zelle dargestellt.

Zu Beginn zeigt sich bei unbehandelten Zellen (Abb. 5e) eine gleichmäßige CD55^{SC-1}-Expression, die Zellen weisen eine homogene Membranfärbung auf. Nach 6h ist diese nicht mehr so deutlich ausgeprägt, es kommt zur Anreicherung von CD55^{SC-1}

intrazellulär, was mit der Internalisierung des Rezeptors durch Stimulierung mit dem SC-1-Antikörper zusammenhängen kann. Auch noch nach 12h ist die Membran – aber deutlich schwächer – weiterhin regelmäßig gefärbt, die intrazelluläre Anhäufung nimmt weiter zu.

Die mit 50 μ M BAPTA-AM behandelten Zellen zeigen nach 6h keine signifikanten Unterschiede im Expressionsverhalten zu den unbehandelten Zellen: die Membran ist homogen schwach angefärbt, intrazellulär kommt es zur Kumulierung des CD55^{SC-1}-Antigens. Nach 12h sieht man nun aber, dass sich die Membran nun nicht mehr anfärbt, CD55^{SC-1} ist nun ausschließlich intrazellulär darstellbar. Der deutliche Unterschied in der Expression von CD55^{SC-1}, der in Abb. 4 beobachtet wurde, konnte durch diese Untersuchung qualitativ nicht gesehen werden, was aber mit der geringeren Aussagekraft bezüglich der Quantität des Expression zusammenhängt.



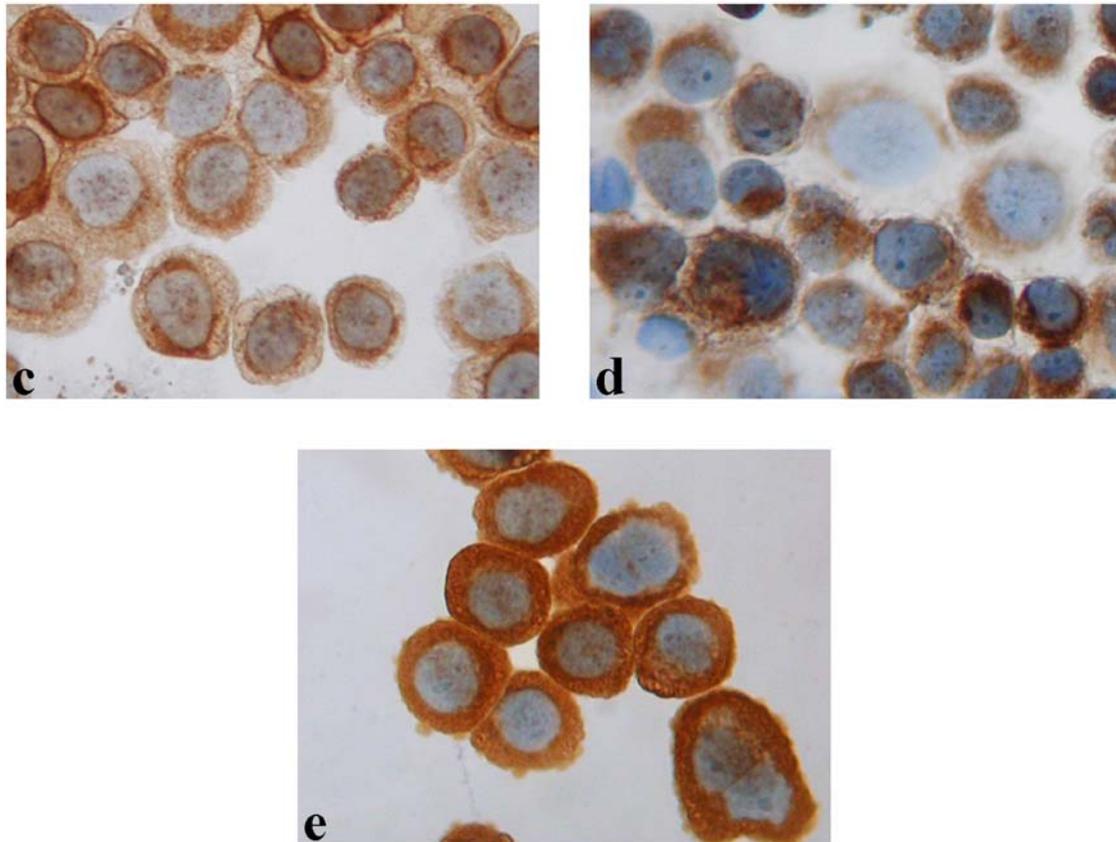


Abb. 5: Immunhistochemische Analyse der SC-1-Expression

Die Zelllinie 23132 wurde mit SC-1 (40µg /ml) mit und ohne BAPTA-AM für 6h bzw. 12h inkubiert, mittels Zentrifuge auf Objektträger transferiert und mit dem SC-1-Antikörper immunhistochemisch angefärbt.

CD55^{SC-1}-Expressionmuster nach SC-1-Gabe: a) 6h in RPMI-Medium ohne BAPTA-AM; b) 12h in RPMI-Medium ohne BAPTA-AM; c) 6h in RPMI-Medium mit 50µM BAPTA-AM; d) 12h in RPMI-Medium mit 50µM BAPTA-AM; e) Kontrolle - Zellen in RPMI-Medium vor SC-1-Gabe;

Zu Beginn zeigt sich bei unbehandelten Zellen (Abb. 5e) eine gleichmäßige CD55^{SC-1}-Expression, die sich nach 6h (Abb. 5a/ 5c) in beiden Versuchsansätzen durch Internalisierung des Rezeptors reduziert. Es kommt zur Kumulierung des Rezeptors intrazellulär. Nach 12h (Abb. 5b) kann man dies in den Zellen ohne BAPTA-AM immer noch beobachten, während die mit BAPTA-AM behandelten Zellen (Abb. 5d) keine Membranfärbung mehr aufweisen und es nur noch zur intrazellulären Ansammlung des Rezeptors kommt.

5. Diskussion

5.1. Übersicht

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist eines der attraktivsten Forschungsgebiete der modernen Biologie und Medizin. Das Interesse daran rührt zum einen daher, dass die Apoptose einen essentiellen Teil des Lebens jedes mehrzelligen Organismus darstellt, zum anderen, dass dieses Programm genetisch von den Würmern bis zu den Säugetieren konserviert wurde. Wie in der Einleitung beschrieben stellt sie das zentrale Element in der Entfernung körpereigener Zellen – täglich werden alleine ca. 10 Milliarden Zellen durch neue Zellen ersetzt – dar. Dieser Prozess unterliegt einer genauen Regulation, um die Gewebshomöostase im Gleichgewicht zu halten, da zu wenige oder zu viele durch den programmierten Zelltod sterbende Zellen pathologische Konsequenzen wie Entwicklungsfehler, Autoimmunkrankheiten, Neurodegeneration oder Krebs nach sich ziehen können. Nachdem KERR *et al.* im Jahre 1972 durch die Beschreibung morphologischer Merkmale sterbender Zellen den Begriff der Apoptose prägte, fokussiert sich die derzeitige Wissenschaft auf die Frage, welche Zellen wann, warum und wie sterben, um so neue spezifische Ansatzpunkte zu finden, die man in der Therapie solcher Erkrankungen verwenden kann.

Wie ASHE & BERRY in ihrem Übersichtsartikel über Signalkaskaden der Apoptose 2003 beschreiben, handelt es sich bei der Apoptose nicht um eine Abfolge von klar definierten Schritten, vielmehr um eine Vielzahl von stark regulierten und verknüpften Signalwegen. Zwischenzeitlich wurden auch neue Formen des Zelltodes wie Anoikis (GROSSMANN, 2002; HERBAY *et al.*, 2000) und Abortosis (RAINA *et al.*, 2001 & 2003) beschrieben, weshalb der programmierte Zelltod wohl eher als Kontinuum des Zelltodes mit der Nekrose und der Apoptose als die beiden Extremformen zu sehen ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand darin, neue Merkmale der Signaltransduktion des SC-1-Antikörpers – insbesondere anhand des ubiquitär vorhandenen „second messengers“ Ca^{2+} - und ihr Vergleich mit bekannten Signaltransduktionswegen darzustellen, um so weitere Rückschlüsse auf diesen wichtigen physiologischen Prozess zu erhalten. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen anhand der in der Literatur beschriebenen

Signaltransduktionskaskaden von CD55/ DAF und etablierter apoptoseinduzierender Moleküle diskutiert werden.

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Rolle des second messengers Ca^{2+} in der Aktivierung von Apoptose wie auch in der Transduktionskaskade CD55/ DAF-vermittelter Signale wurde mehrfach in der Literatur beschrieben. Die Experimente dieser Arbeit konnten zeigen, dass durch die Inkubation der Zelllinie 23132 mit dem SC-1 Antikörper ein kurzer Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration um Faktor 2,7 induziert wird, der sich auf dem 1,5fachen Ausgangsniveau bis zum Ende der Stimulation mit SC-1 hielt und danach zurückbildete. Zellmorphologische Studien und ein direkter Apoptosenachweis mittels Cell Death Elisa^{PLUS} von Roche zeigten keinen Einfluss dieses initialen Calciumanstiegs auf das Apoptoseprogramm, immunhistochemische Untersuchungen und Western-Blot-Analysen legten allerdings den Einfluss dieses Signals auf das Expressionsverhalten des Rezeptors CD55^{SC-1} nach Stimulation durch SC-1 nahe.

5.3. Ca^{2+} in der Aktivierung der Apoptose

Die Überladung der Zelle mit Ca^{2+} wurde schon mehrfach als letzte gemeinsame Endstrecke des Zelltodes diskutiert (SCHANNE *et al.*, 1979; NICOTERA *et al.*, 1998). Intrazellulärer Ca^{2+} - Anstieg ist die Schlüsselfunktion bei der Nekrose (CHOI, 1995), während es vielfältigere Beziehungen zwischen diesem und der Apoptose gibt. Da die extrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration gegenüber der intrazellulären normalerweise über viermal so groß ist, ist ein Anstieg des Ca^{2+} - Einstroms und der Ca^{2+} - Konzentration unausweichlich mit einem Kollaps der Plasmamembran vergesellschaftet, die bei nekrotischen Zellen (LEONARD *et al.*, 1979; CHOI, 1988; HYRC *et al.*, 1997) zu beobachten ist.

Weit weniger starke Anstiege können schon das Apoptoseprogramm einer Zelle initiieren. Dies kann z.B. bei Synovialzellen, Lymphozyten, Zellen der Prostata, Hepatozyten, Adenokarzinomzellen und Neuronen beobachtet werden (NICOTERA *et al.*, 1998; DOWD, 1995; BANASIAK *et al.*, 2000), sowohl in der Frühphase (Minuten bis Stunden nach dem Stimulus) als auch in der Spätphase („point of no return“) des

Signalweges. In manchen Fällen verursacht ein früher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} - Konzentration einen Zellschaden, der die Apoptose auslöst. MARTIKAINEN *et al.* beschrieben dieses Phänomen 1991 in Prostatakarzinomzellen. Andererseits muss dieser nicht per se dadurch einen Zellschaden verursachen, sondern könnte eher Teil einer Signalkaskade sein, die zur Exekution des Selbstmordprogrammes der Zelle führt. Ob der beobachtete Ca^{2+} - Einstrom bei der SC-1 induzierten Apoptose ebenfalls Teil dieser Signaltransduktion sei, war die initiale Fragestellung dieser Arbeit.

Immortalisierte Granulosazellen, die in der Zellkultur Serum als Stimulus zur Apoptose ausgesetzt wurden, zeigen ebenfalls wie die Tumorzelllinie 23132 nach SC-1-Gabe einen sofortigen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} auf den vierfachen Ausgangswert, der sich weiterhin ungefähr auf diesem Niveau hält. Diese vollziehen daraufhin in den nächsten Stunden die Apoptose. Dieser Zelltod lässt sich allerdings durch den intrazellulären Ca^{2+} - Chelator BAPTA-AM verhindern (LYNCH *et al.*, 2000), was bei den Magenkarzinomzellen nach SC-1-Gabe nicht beobachtet werden konnte, was den Schluss zulässt, dass der second messenger Ca^{2+} keinen direkten Einfluss auf die Apoptose hat. Dies konnte durch zellmorphologische Studien und Proliferations-/ Apoptoseassays untermauert werden. Ein ähnlicher Effekt des Ca^{2+} in diesem Zusammenhang wurde auch bei PC 12 Zellen (KRUMAN *et al.*, 1998) und Neuronen der Cochlea (ZIRPEL *et al.*, 1998) beobachtet, die jeweils Stauroporine, einem Breitspektrum – Kinase - Inhibitor, ausgesetzt waren.

Auch der späte Anstieg der Ca^{2+} - Konzentration kann der Durchführung des Apoptoseprogrammes dienen. Nach Exposition von Prostatakarzinomzellen mit Thapsigargin verfolgten TOMBAL *et al.*, 1999, durch eine neue entwickelte Technik mittels Fura-Dextran-Mikroinjektion den longitudinalen Verlauf der Ca^{2+} - Konzentration über mehrere Tage, einen frühen Anstieg in den ersten 12 Stunden und einen späten Anstieg zwischen 12 und 96 Stunden. Stimulation von Jurkat Zellen mit anti-Fas-Antikörper resultierte in einem etwas protrahierten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} , der aber bis zur Membran-desintegration persistierte. Die Zugabe von BAPTA und die Entfernung des extrazellulären Ca^{2+} inhibierte den intrazellulären Anstieg ebenso wie die Fragmentierung der DNA, die Schrumpfung der Zelle und weitere apoptotische Ereignisse blieben aber unberührt (SCOLTOCK *et al.*, 2000). SHEN *et al.*,

2001, beobachteten dies auch bei Thymozyten. Mögliche Ziele dieses späten Signals könnten durch Ca^{2+} - aktivierte Schlüsselproteasen (VANAGS *et al.*, 1996), Endonukleasen (GAIDO *et al.*, 1991; ROBERTSON *et al.*, 2000) wie NUC18 oder Caspase-3 (JUN *et al.*, 1998) sein. Bei der SC-1 induzierten Apoptose wurde der späte Calciumanstieg nicht qualitativ gemessen, durch die Zugabe des Chelators BAPTA-AM wurde dieser Anstieg aber verhindert, was allerdings keine Konsequenzen auf die Apoptose zeigte.

Diese Beobachtungen werfen die Frage auf, ob der intrazelluläre Calciumanstieg zur Apoptose oder Nekrose führt. Dies hängt aber schlussendlich von der Höhe der Calciumkonzentration ab. Apoptose wird als langsamer, altruistischer Sterbevorgang angesehen, der als eine Möglichkeit nach einem Zellschaden resultieren kann. Die Nekrose tritt in diesem Kontext nur dann auf, wenn die Zeit zu knapp, beziehungsweise, wenn die Schwere des Schadens zu groß ist, um noch einen geordneten Tod der Zelle herbeizuführen (RAFF *et al.*, 1993). Neurone des Kortex, die nach NMDA-Rezeptor induziertem Calciumanstieg sowohl apoptotisch als auch nekrotisch werden können, führen leichtere Schäden und die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Energieproduktion zur Apoptose (BONFOCO *et al.*, 1995). Diese Zellen haben vermutlich eine intrinsische zelluläre Neigung hierzu, die auch von Faktoren wie der Zellreife beeinflusst werden können (MCDONALD *et al.*, 1997). Zusätzlich dürfte die Quelle oder subzelluläre Lokalisation des Calciumanstieges den Effekt auf die Apoptose beeinflussen.

Mehrere Studien deuten darauf hin, dass die Calciumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum durch Calciumkanäle die Apoptose fördern (WERTZ *et al.*, 2000; JIANG *et al.*, 1994). Freisetzung aus zellulären Speichern in der Nähe von Mitochondrien bewirken eine Aufnahme des Moleküls in diese, was durch die daraus folgende Überladung in vorübergehender Öffnung von Membranporen und Cytochrom C Freisetzung (HAJNOCZKY *et al.*, 2000) endet. Zusätzlich führt die Entleerung der Calciumspeicher im endoplasmatischen Retikulum zu einer Beeinträchtigung der Proteinsynthese (ASHBY *et al.*, 2001). Das anti-apoptotisch wirkende Protein bcl-2 inhibiert in dieser Beziehung die Calciumfreisetzung (HE *et al.*, 1997), während die für bcl-xL nicht der Fall sein dürfte (PAN *et al.*, 2000).

Allerdings ist der Zusammenhang zwischen einer erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration und der Apoptose nicht eindeutig in Einklang zu bringen. Erstens weisen nicht alle apoptotischen Zellen diesen Anstieg (LEMASTERS *et al.*, 1987) vor dem endgültigen Membrankollaps auf (CONNOR *et al.*, 1999), es wurde sogar ein Abfall bei myeloischen Zellen (BAFFY *et al.*, 1993) und Neuronen (EICHLER *et al.*, 1994; BABCOCK *et al.*, 1999) während des programmierten Zelltodes beobachtet. Zweitens kann die Reduktion des extrazellulären Calciums oder die Blockierung der Calciumkanäle auf der Membran selbst *in vitro* Apoptose auslösen (GALLO *et al.*, 1987), aber auch *in vivo* verstärkt dies die Apoptose von Neuronen unter pathologischen Umständen (IKONOMIDOU *et al.*, 2000). Und drittens kann ein mäßiger Anstieg zu einem optimalen „set-point“, wie es JOHNSON *et al.*, 1992, nennt, sogar die Apoptose verhindern. Dass ein Calciumeinstrom diesen Zelltod unterdrücken kann, wurde auch bei Neuronen (BALAZS *et al.*, 1989; BABCOCK *et al.*, 1999; GALLO *et al.*, 1987) und myeloischen Leukämiezellen (LOTEM *et al.*, 1998; FANELLI *et al.*, 1999) beschrieben.

Um die Frage, warum auch ein Anstieg der Calciumkonzentration die Apoptose verhindern kann, zu klären, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. GOSH und GREENBERG beschrieben in diesem Kontext 1995 in ihrem Übersichtsartikel einige Signalkaskaden des *second messengers* Ca^{2+} , die eine entscheidende Rolle beim Überleben der Zellen spielen, wie z.B. die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Protein-Kinase-Kinase, Protein-Kinase B und die Phosphorylierung von BAD (YANO *et al.*, 1998).

5.4. CD55/ DAF (Decay-accelerating factor)

Die durch den SC-1-Antikörper induzierte Apoptose stellt einen neuen, einzigartigen Weg des programmierten Zelltodes dar. Zwar endet dieser ebenso wie z.B. bei Fas, der am besten charakterisierte Rezeptor der TNFR-Familie („*tumor necrosis factor receptor*“), in der gemeinsamen Endstrecke der Caspasen, allerdings konnte das Eingangssignal über CD55/ Decay-accelerating factor experimentell bislang erst von HENSEL *et al.*, 1999 mit der Apoptose in Verbindung gebracht werden, wobei schon öfter der Verdacht geäußert wurde, dass es hier einen Zusammenhang gäbe (SHAPIRO *et al.*, 1994; DEVITT *et al.*, 1998).

Dadurch, dass SC-1 ausschließlich in Tumorzellen das Selbstmordprogramm der Zelle aktiviert, eignet sich dieser Antikörper hervorragend in der Krebstherapie. In der Literatur findet man auch verschiedene Hinweise darauf, CD55/ DAF als Angriffspunkt in der Tumorthherapie zu verwenden. So findet man z.B. in Mama-, Kolon- und Magenkarzinomen eine Überexpression dieses Moleküls (HOFMAN *et al.*, 1994; KORETZ *et al.*, 1992; NIEHANS *et al.*, 1996; LI *et al.*, 2001; MÄENPÄÄ *et al.*, 1996), die im Falle des kolorektalen Karzinoms mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht (BUCKLEY *et al.*, 1996). Diese Überexpression auf Tumorzellen wurde von SPENDLOVE *et al.*, 1999, als möglichen Angriffspunkt einer Vakzination beschrieben, indem der humane anti-idiotypische Antikörper 105AD7, der CD55/ DAF erkennt, als Vakzin verabreicht wurde. Dies wurde auch in der adjuvanten Therapie des Kolonkarzinoms eingesetzt, was dort zu einer zellulären Immunantwort gegen den Tumor führte (DURRANT *et al.*, 1995 & 2000).

Bei CD55/ DAF handelt es sich um ein Regulatorprotein des Komplementsystems, das zuerst von HOFMANN 1969 beschrieben wurde. Anschließend isolierten und charakterisierten NICHOLSON-WELLER *et al.* dieses Molekül im Jahre 1982 aus Erythrozyten. Die physiologische Funktion dieses Rezeptors ist der Schutz der dieses Molekül exprimierenden Zellen vor einer autologen Komplementaktivierung. Das Komplementsystem ist einer der wichtigsten Mechanismen, durch die eine Antigenerkennung in eine wirkungsvolle Verteidigung gegen Infektionen umgesetzt wird. Seine Bedeutung liegt besonders im Schutz vor extrazellulären Bakterien (LISZEWSKI *et al.*, 1996). Komplement wird somit eine wichtige Rolle als Vermittler von Entzündungsreaktion zugeschrieben und trägt zur Regulation der Immunantwort bei. Komplement ist ein System von Plasmaproteinen, die nach Aktivierung eine kaskadenförmige Reaktion nach sich zieht, die auf der Oberfläche von Krankheitserregern abläuft und aktive Komponenten mit verschiedenen Effektorfunktion generiert. Um eine Gewebeschädigung infolge einer unbeabsichtigten Bindung von aktivierten Komplementkomponenten an Wirtszellen sowie die spontane Aktivierung dieser im Plasma zu verhindern, wird die Aktivität dieser Komponenten durch ein System von regulatorischen Proteinen, die sowohl im Plasma zirkulieren als auch auf der Zelloberfläche exprimiert werden, kontrolliert (MORGAN, 1989).

CD55/ DAF, eines dieser Schutzmoleküle, ist ein 70 kD Glykoproteine, das durch einen GPI-Anker an der Zellmembran befestigt ist (KINOSHITA *et al.*, 1985; MEDOF *et al.*, 1987). CD55/ DAF schützt die Wirtszellen vor autologer Komplementaktivierung, indem es den Abbau der C3/C5 - Konvertase erhöht (FUJITA *et al.*, 1987; NICHOLSON-WELLER&WANG, 1994) und somit die Ablagerung von C3 auf der Zelloberfläche verhindert (LUBLIN&ATKINSON, 1989). Es wird auf der Zellmembran von allen Zellen exprimiert, einschließlich periphere Blutzellen und Endothelzellen (KOOYMAN *et al.*, 1995; KINOSHITA *et al.*, 1985; MORGAN, 1995). Zusätzlich findet man CD55/ DAF noch auf Epithelzellen (MEDOF *et al.*, 1987; LE BIVIC *et al.*, 1990). Da diese Komplementkomponenten in das Lumen sezernieren (STRUNK *et al.*, 1988; ROTHMAN *et al.*, 1990; BROOIMANS *et al.*, 1991), dürfte CD55/ DAF eine wichtige Rolle beim Schutz dieser Epithelzellen vor autologem Komplement auf der luminalen Seite zukommen, zumal CD55/ DAF auf der apikalen Oberfläche dieser polarisierten Epithelzellen exprimiert wird (MEDOF *et al.*, 1987; LE BIVIC *et al.*, 1990; KORETZ *et al.*, 1992).

Neben diesen gut charakterisierten Funktionen von CD55/ DAF bezüglich des Komplementsystems besitzt CD55/ DAF als integrales Membranprotein die Fähigkeit, eine Signaltransduktion zu initiieren. Mittels CD55/ DAF kann eine Signaltransduktion über Tyrosinkinase der src-Familie wie p56^{lck} und p59^{fyn} (SHENOY-SCARIA *et al.*, 1992; PAROLINI *et al.*, 1996) ausgelöst werden. Humane Monozyten können mit gegen dieses Molekül gerichteten monoklonalen Antikörpern *in vitro* aktiviert werden (SHIBUYA *et al.*, 1992), was mittels eines Anstiegs der Inositoltriphosphat-Konzentration zu einem gesteigerten Glukoseverbrauch und gesteigerten Phagozytoseaktivität führte. Einen Anstieg der Calciumkonzentration konnte diese Arbeitsgruppe nicht beobachten. Bei den Experimenten von LUND-JOHANSEN *et al.*, 1993, konnte dagegen durch Cross-link von CD55/ DAF auf Monocyten ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration bei der SC-1 induzierten Apoptose – bei SC-1 handelt es sich um ein pentamerer Immunglobulin M – beobachten.

Auch BERGER UND MEDOF, 1987, konnten diesen Anstieg indirekt beobachten. Weitere Experimente, die das Expressionsverhalten der Zellen untersuchte, zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen Calciumanstieg und Anstieg der Expression von CD55/ DAF, der innerhalb von Minuten eine Verdopplung von CD55/ DAF auf der

Zellmembran führte. Daher dürften diese Proteine nicht erst neu synthetisiert worden sein, vielmehr müssten diese aus einem intrazellulären Speicher bereitgestellt worden sein. Der Transport zur Membran, so stellten BERGER UND MEDOF fest, benötigt hierzu intrazelluläres Calcium. Diese Beobachtung deckt sich auch mit den Experimenten dieser Arbeit. Verhindert man bei SC-1-Induktion den initialen Calciumanstieg durch den Chelator BAPTA-AM, steigt die Expression von CD55^{SC-1} schneller und stärker an. Dies könnte damit zusammenhängen, dass nach Stimulation der Tumorzelle mit SC-1 der Rezeptor CD55^{SC-1} internalisiert wird, danach unter Einfluss von Ca²⁺ zum Schutz der Zelle vor autologem Komplement wieder reexprimiert werden soll, aber die Tumorzelle durch das Fehlen des Signal- oder Transportmoleküls Ca²⁺ dies nicht mehr bewerkstelligen kann und es so zu einer Akkumulation innerhalb der Zelle kommt. Durch das Fehlen des Rezeptors auf der Zellmembran wird aber gleichzeitig die Proteinsynthese forciert, um das Fehlen des Rezeptors auf der Oberfläche zu kompensieren, was die Unterschiede in der Western-Blot-Analyse erklären könnte. Da unter Zellkulturbedingungen kein Schutz vor autologem Komplement benötigt wird, könnte dies auch ein Erklärungsansatz sein, dass durch das Fehlen der initialen Calciumfreisetzung keine Unterschiede bezüglich des Überlebens der Tumorzelle gesehen werden können, dies aber *in vivo* durch die fehlende Reexpression des SC-1-Rezeptors nach Internalisierung desselbigen durchaus eine Rolle spielen könnte.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Thema "Die Rolle des Signalmoleküls Ca^{2+} in der Signaltransduktion der SC-1-induzierten Apoptose" anhand von immunhistochemischen, proteinbiochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Methoden erarbeitet.

Die SC-1-induzierte Apoptose stellt einen neuen intrinsischen, „*death domain*“-unabhängigen Signalweg in der Vermittlung des programmierten Zelltodes dar, der über die Bindung dieses Antikörpers an $\text{CD55}^{\text{SC-1}}$ ausgelöst wird. Dem Signalmolekül Ca^{2+} galt besonderes Interesse bei der Charakterisierung der durch SC-1 ausgelösten Signaltransduktion.

Nach Aktivierung von $\text{CD55}^{\text{SC-1}}$ durch SC-1 steigt das intrazelluläre Ca^{2+} um Faktor 2,7 an, stabilisiert sich danach auf dem 1,5fachen Ausgangsniveau. Dies hat keinerlei Einfluss auf die Ausführung des Apoptoseprogramms, ist aber maßgeblich in das Expressionsverhalten involviert. Der Ca^{2+} - Einstrom ist somit nicht direkt in die Ausführung der Apoptose beteiligt, durch die Hochregulation der Expression des Apoptoserezeptors verstärkt es jedoch die Wahrscheinlichkeit der Tumorzelle, den programmierten Zelltod zu vollziehen, da durch die verstärkte Expression dieses Apoptose-induzierenden Rezeptors auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass mehrere SC-1-Antikörper binden können. Da die Quervernetzung mehrerer Rezeptoren mittels des SC-1-Antikörpers in der Apoptoseinduktion von Nöten ist, stellt diese durch Ca^{2+} getriggerte Überexpression von $\text{CD55}^{\text{SC-1}}$ einen essentiellen Bestandteil in der Exekution dieses Selbstmordprogrammes dar.

Dieses Ergebnis gibt einen interessanten Einblick in den Signalweg der durch SC-1 induzierten Apoptose. Weiterführende Experimente sind notwendig, um genauere Erkenntnisse dieser einzigartigen Form einer gewebespezifischen Apoptose zu erlangen.

7. Abkürzungsverzeichnis

λ	Wellenlänge
APS	Ammoniumpersulfat
BAPTA-AM	1, 2-bis(2-aminophenoxy)Ethane-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
BCA	Biciconinsäure
bidest.	entionisiert und destilliert
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CD55/ DAF	Decay-Accelerating Factor
CO ₂	Kohlendioxid
DAF	Decay-Accelerating Factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Deoxyribonucleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunnachweis)
FCS	Fötale Kälberserum
kD	Kilodalton
MTT-Assay	Mitochondrialer Hydroxylase Aktivitätstest
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
TBS	Tris Buffered Saline (Tris gepufferte Salzlösung)

8. Literaturverzeichnis

- Appelbaum FR.** Antibody-targeted therapy for myeloid leukemia. *Semin Hematol* 36, 2-8 (1999)
- Asaka M, Takeda H, Sugiyama T, Kato M.** What role does *Helicobacter pylori* play in gastric cancer? *Gastroenterology* 113 Suppl, S56-S60 (1997)
- Ashby MC, Tepikin AV.** ER calcium and the functions of intracellular organelles. *Semin Cell Dev Biol* 12, 11-17 (2001)
- Ashe PC, Berry MD.** Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 199-214 (2003)
- Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308 (1998)
- Babcock DJ, Gottron FJ, Choi DW.** Raising intracellular calcium attenuates ischemic apoptosis *in vitro*. *Soc Neurosci Abstr* 25, 2103 (1999)
- Baffy G, Miyashita T, Williamson JR, Reed JC.** Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J Biol Chem* 268, 6511-6519 (1993)
- Balazs R, Hack N, Jorgensen OS, Cotman CW.** N-methyl-D-aspartate promotes the survival of cerebellar granule cells: pharmacological characterization. *Neurosci Lett* 101, 241-246 (1989)
- Banasiak KJ, Xiab Y, Haddad GG.** Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 3, 215-249 (2000)
- Barker DJ, Coggon D, Osmond C, Wickham C.** Poor housing in childhood and high rates of stomach cancer in England and Wales. *Br J Cancer* 61, 575-578 (1990)
- Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, Sklarin NT, Seidman AD, Hudis CA, Moore J, Rosen PP, Twaddell T, Henderson IC, Norton L.** Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744 (1996)
- Becker N, Wahrendorf J. (Herausgeber)** Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 3., völlig neu bearb. Aufl. 1998, Berlin; Heidelberg; New York: Springer
- Beere HM.** Stressed to death: regulation of apoptotic signalling pathways by the heat shock proteins. *Sci STKE* 93, RE1 (2001)
- Benesic A, Mildenerger S, Gekle M.** Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 439, 278-287 (2000)
- Berger M, Medof ME.** Increased Expression of Complement Decay-accelerating Factor during Activation of Human Neutrophils. *J Clin Invest* 79, 214-20 (1987)
- Boes M, Prodeus AP, Schmidt T, Carroll MC, Chen J.** A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection. *J Exp Med* 188, 2381-2386 (1998)
- Boes M.** Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol Immunol* 37, 1141-1149 (2000)
- Bohn J.** Are natural antibodies involved in tumour defence? *Immunol Lett* 69, 317-320 (1999)
- Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA.** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7162-7166 (1995)
- Böttcher K, Roder JD, Busch R, Fink U, Siewert JR, Hermanek P, Meyer HJ für die Deutsche Magencarcinom-Studiengruppe.** Epidemiologie des Magenkarzinoms aus chirurgischer Sicht. *Dtsch Med Wschr* 118, 729-736 (1993)

- Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)
- Brändlein S, Beyer I, Eck M, Bernhardt W, Hensel F, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1. *Cancer Res* 63, 2052-2061 (2003)
- Brändlein S, Pohle T, Ruoff N, Wozniak E, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** Natural IgM antibodies and immunosurveillance mechanisms against epithelial cancer cells in humans. *Cancer Res* 63, 7995-8005 (2003)
- Brändlein S, Pohle T, Vollmers C, Wozniak E, Ruoff N, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by natural human monoclonal antibody PAM-1. *Oncol Rep* 11, 777-784 (2004)
- Brändlein S, Vollmers HP.** Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumour immunity. *Histol Histopathol*, 19 897-905 (2004)
- Brändlein, S., Lorenz, J., Ruoff, N., Hensel, F., Beyer, I., Müller, J., Neukam, K., Eck, M., Müller-Hermelink, H.K., Vollmers, H.P.** Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. *Hum Antibodies* 11 (4), 107-119 (2002)
- Broomans RA, Stegmann AP, van Dorp WT, van der Ark AAJ, van der Woude FJ, van Es LA, Daha MR.** Interleukin 2 mediates stimulation of complement C3 biosynthesis in human proximal tubular epithelial cells. *J Clin Invest* 88, 379-384 (1991)
- Buckley DJ, Chapman M A, Durrant LG, Robins RA, Armitage NC.** Increased expression of 791t-Gp72 predicts a poor prognosis in colorectal cancer. *Gastroenterology* 110, A497-A497 (1996.)
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 269-290 (1999).
- Buiatti E, Palli D, Decarli A, Amadori D, Avellini C, Bianchi S, Bonaguri C, Cipriani F, Cocco P, Giacosa A, et al.** A case-control study of gastric cancer and diet in Italy: II. Association with nutrients. *Int J Cancer* 45, 896-901 (1990)
- Carmichael J, DeGraff WD, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB.** Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47, 936-942 (1987)
- Chen G, Goeddel DV.** TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296, 1634-1635 (2002)
- Choi DW.** Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18, 58-60 (1995)
- Choi DW.** Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634 (1988)
- Classen M, Diehl V, Kochsiek K. (Herausgeber)** Innere Medizin, 4., neu bearbeitete Auflage 1998, München; Wien; Baltimore: *Urban und Schwarzenberg*
- Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ.** Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-2648 (1999)
- Cohen JJ, Duke RC.** Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J Immunol* 132, 38-42 (1984)
- Cohen JJ.** Apoptosis. *Immunol Today* 14, 126-30 (1993)
- Colucci F, Di Santo JP, Leibson PJ.** Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3, 807-813 (2002)

- Comis RL, Carter SK.** A review of chemotherapy in gastric cancer. *Cancer* 34, 1576-1586 (1974)
- Connor JA, Razani-Boroujerdi S, Greenwood AC, Cormier RJ, Petrozzino JJ, Lin RC.** Reduced voltage-dependent Ca^{2+} signalling in CA1 neurons after brief ischemia in gerbils. *J Neurophysiol* 81, 299-306 (1999)
- Correa P, Fontham E, Pickle LW, Chen V, Lin YP, Haenszel W.** Dietary determinants of gastric cancer in south Louisiana inhabitants. *J Natl Cancer Inst* 75,645-654 (1985)
- Correa P, Fox J, Fontham E, Ruiz B, Lin YP, Zavala D, Taylor N, Mackinley D, de Lima E, Portilla H, et al.** Helicobacter pylori and gastric carcinoma: serum antibody prevalence in populations with contrasting cancer risks. *Cancer* 66, 2569-74 (1990)
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M.** A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* 2, 58-60 (1975)
- Correa P.** Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 52, 6735-6740 (1992)
- Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF, Jonas C, Klippenstein D, Dallaire B, Varns C.** Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 17, 268-76 (1999)
- Davis LS, Patel SS, Atkinson JP, Lipsky PE.** (1988). Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human T cells. *J Immunol* 141, 2246-2252 (1988)
- Davis TA, White CA, Grillo-Lopez AJ, Velasquez WS, Link B, Maloney DG, Dillman RO, Williams ME, Mohrbacher A, Weaver R, Dowden S, Levy R.** Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 17, 1851-7 (1999)
- Devitt A, Moffat OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, and Gregory CD.** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature* 392, 505-509 (1998)
- Dowd DR.** Calcium regulation of apoptosis. *Adv Sec Mess Phosph Res* 30, 255-280 (1995)
- Drewe E and Powell RJ.** Clinically useful monoclonal antibodies in treatment. *J Clin Pathol* 55, 81-85 (2002)
- Duke RC, Ojcius DM, Young JDE.** Die Apoptose – Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft* 15, 26-35 (1997)
- Durrant LG, Buckley DJ, Robins RA, Spendlove I.** 105Ad7 cancer vaccine stimulates anti-tumor helper and cytotoxic T cell responses in colorectal cancer patients but repeated immunisations are required to maintain these responses. *Int J Cancer* 85, 87-92 (2000)
- Durrant LG, Doran M, Austin EB, Robins RA.** Induction of cellular immune responses by a murine monoclonal anti- idiotypic antibody recognizing the 791Tgp72 antigen expressed on colorectal, gastric and ovarian human tumors. *Int J Cancer* 61, 62-66 (1995)
- Ehrlich P.** The relations existing between chemical constitution, distribution, and pharmacological action. In: Himmelweite F, Marquardt M, Sir Henry Dale (Herausgeber). The collected papers of Paul Ehrlich. Vol. I. Oxford, London, New York: *Pergamon Press*: 596 (1956)
- Eichler ME, Dubinsky JM, Tong J, Rich KM.** The ability of diphenylpiperazines to prevent neuronal death in dorsal root ganglion neurons *in vitro* after nerve growth factor deprivation and *in vivo* after axotomy. *J Neurochem* 62, 2148-2157 (1994)
- Engeland van M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP.** Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9 (1998)

- Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, Ghibelli.** Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca^{2+} influx. *FASEB J* 13, 95-102 (1999)
- Ferrarini M, Ferrero E, Dagna L, Poggi A, Zocchi MR.** Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer. *Trends Immunol* 23, 14-18 (2002)
- Forma D.** Gastric cancer, diet, and nitrate exposure. *BMJ* 294, 528-9 (1987)
- Fortin A, Cregan SP, MacLaurin JG, Kushwaha N, Hickman ES, Thompson CS, Hakim A, Albert PR, Ceconi F, Helin K, Park DS, Slack RS.** APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 155, 207-216 (2001)
- Fujita T, Inoue T, Ogawa K, Iida K, Tamura N.** The mechanism of action of decay-accelerating factor (DAF). DAF inhibits the assembly of C3 convertases by dissociating C2a and Bb. *J Exp Med* 166, 1221-1228 (1987)
- Gaido ML, Cidlowski JA.** Identification, purification, and characterization of a calcium-dependent endonuclease (NUC18) from apoptotic rat thymocytes. NUC18 is not histone H2B. *J Biol Chem* 266, 18580-18585 (1991)
- Gallo V, Kingsbury A, Balazs R, Jorgensen OS.** The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture. *J Neurosci* 7, 2203-2213 (1987)
- Geiler G. (Herausgeber)** Onkologie 2000 – Schnittpunkte zwischen Grundlagen-forschung und Klinik; Leopoldina-Meeting vom 13. bis 14. Juni 1997 in Halle (Saale). *Nova Acta Leopoldina NF Band 78*, Nr. 305, 7 (1998)
- Ghosh A, Greenberg ME.** Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268, 239-247 (1995)
- Glimelius B, Ekstrom K, Hoffman K, Graf W, Sjoden PO, Haglund U, Svensson C, Enander LK, Linne T, Sellstrom H, Heuman R.** Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 8, 163-8 (1997)
- Goldstein JC, Waterhouse NJ, Juin P, Evan GI, Green DR.** The coordinate release of cytochrome *c* during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biol* 2, 156-162 (2000)
- Gonzalez CA, Riboli E, Badosa J, Batiste E, Cardona T, Pita S, Sanz JM, Torrent M, Agudo A.** Nutritional factors and gastric cancer in Spain. *Am J Epidemiol* 139, 466-473 (1994)
- Gonzalez CA, Sanz JM, Marcos G, Pita S, Brullet E, Saigi E, Badia A, Riboli E.** Dietary factors and stomach cancer in Spain: a multi-center case-control study. *Int J Cancer* 49, 513-519 (1991)
- Gorter A, Blok VT, Haasnoot WH, Ensink NG, Daha MR, Fleuren GJ.** Expression of CD46, CD55, and CD59 on renal tumor cell lines and their role in preventing complement-mediated tumor cell lysis. *Lab. Invest* 74, 1039-1049 (1996)
- Grossmann J.** Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis – Anoikis”. *Apoptosis* 7, 247-260 (2002)
- Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY.** A new generation of Ca indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* 260, 3440-2450 (1985)
- Haenszel W, Kurihara M, Locke F, Shimuzu K, Segi M.** Stomach cancer in Japan. *J Natl Cancer Inst* 56, 265-274 (1976)
- Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, Pacher P.** Control of apoptosis by IP3 and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell Calcium* 28, 349-363 (2000)
- Hallissey MT, Dunn JA, Ward LC, Allum WH.** The second British Stomach Cancer Group trial of adjuvant radiotherapy or chemotherapy in resectable gastric cancer: five-year follow-up. *Lancet* 343, 1309-1312 (1994)

- Hansson LE, Baron J, Nyren O, Bergstrom R, Wolk A, Adami HO.** Tobacco, alcohol and the risk of gastric cancer: a population-based case-control study in Sweden. *Int J Cancer* 1994;57, 26-31 (1994)
- He H, Lam M, McCormick TS, Distelhorst CW.** Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2. *J Cell Biol* 138, 1219-1228 (1997)
- Hensel F, Brandlein S, Eck M, Schmidt K, Krenn V, Kloetzer A, Bachi A, Mann M, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP.** A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody. *Lab Invest* 81, 1097-1108 (2001)
- Hensel F, Hermann R, Brändlein S, Krenn V, Schmausser B, Geis S, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** Regulation of the new coexpressed CD55 (decay-accelerating factor) receptor on stomach carcinoma cells involved in antibody SC-1-induced apoptosis. *Lab Invest* 81, 1553-1563 (2001)
- Hensel F, Hermann R, Schubert C, Abé N, Schmidt K, Franke A, Shevchenko A, Mann M, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** Characterisation of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 5299-5306 (1999)
- Hensel F, Knörr C, Hermann R, Krenn V, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** Mitogenic autoantibodies in Helicobacter pylori-associated stomach cancerogenesis. *Int J Cancer* 81, 229-235 (1999)
- Herbay A von, Rudi J.** Role of apoptosis in gastric epithelial turnover. *Microsc Res Tech* 48, 303-311 (2000)
- Hermanek P, Gall FP.** Intestinal and diffuse type of gastric carcinoma. Two clinical entities. *J Cancer Res Clin Oncol* 111 (Suppl.), 82 (1986)
- Hermanek P.** Magenkarzinom – Typing, Grading, Staging. In Gall FP, Hermanek P, Hornig D: Magenkarzinom: Epidemiologie, Pathologie, Therapie, Nachsorge. Zuckerschwerdt, München (1986)
- Hermann R, Hensel F, Muller EC, Keppler M, Souto-Carneiro M, Brandlein S, Muller-Hermelink, HK, Vollmers HP.** Deactivation of regulatory proteins hnRNP A1 and A2 during SC-1 induced apoptosis. *Hum Antibodies* 10, 83-90 (2001)
- Hirohata T, Kono S.** Diet/ nutrition and stomach cancer in Japan. *Int J Cancer Suppl* 10, S34-S36 (1997)
- Hoffmann EM.** Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. I. Extraction from-human erythrocyte stromata. *Immunochemistry* 6, 391-403 (1969)
- Hoffmann EM.** Inhibition of complement by a substance isolated from human erythrocytes. II. Studies on the site and mechanism of action. *Immunochemistry* 6, 405-419 (1969)
- Hofman P, Hsi BL, Manie S, Fenichel P, Thyss A, Rossi B.** High expression of the antigen recognized by the monoclonal antibody GB24 on human breast carcinomas: a preventive mechanism of malignant tumor cells against complement attack? *Breast Cancer Res Treat* 32, 213–219 (1994)
- Hollinger P, Hoogenboom H.** Antibodies come back from the brink. *Nature Biotech* 16, 1015-1016 (1998)
- Hoshiyama Y, Sasaba T.** A case-control study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption in Saitama Prefecture, Japan. *Cancer Causes Control* 3, 441-448 (1992)
- Houghton AN and Scheinberg DA.** Monoclonal antibody therapies – a 'constant threat' to cancer. *Nat Med* 6, 373-374 (2000)
- Howson C, Hirayama T, Wynder E.** The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 8, 1-27 (1986)

- Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH.** Meta-analysis of the relationship between *Helicobacter pylori* seropositivity and gastric cancer. *Gastroenterology* 114, 1169-79 (1998)
- Hyrc K, Handran SD, Rothman SM, Goldberg MP.** Ionized intracellular calcium concentration predicts excitotoxic neuronal death: observations with low-affinity fluorescent calcium indicators. *J Neurosci* 17, 6669-6677 (1997)
- IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans.** Vol. 61. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*: Infection with *Helicobacter pylori*. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer*, 177-241 (1994)
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskaja V, Horster F, Tenkova T et al.** Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287, 1056-1060 (2000)
- Janeway CA Jr, Travers P.** Immunobiology. London, San Francisco and Philadelphia: Current Biology Ltd, Second Edition. (1996)
- Janeway CA Jr.** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13 (1989)
- Jiang S, Chow SC, Nicotera P, Orrenius S.** Intracellular Ca^{2+} signals activate apoptosis in thymocytes: studies using the Ca^{2+} -ATPase inhibitor thapsigargin. *Exp Cell Res* 212, 84-92 (1994)
- Johnson EM Jr, Koike T, Franklin J.** A 'calcium set-point hypothesis' of neuronal dependence on neurotrophic factor. *Exp Neurol* 115, 163-166 (1992)
- Juin P, Pelletier M, Oliver L, Tremblais K, Gregoire M, Meflah K, Vallette FM.** Induction of a caspase-3-like activity by calcium in normal cytosolic extracts triggers nuclear apoptosis in a cell-free system. *J Biol Chem* 273, 17559-17564 (1998)
- Kabat G, Ng S, Wynder E.** Tobacco, alcohol intake, and diet in relation to adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Cancer Causes Control* 4, 123-132 (1993)
- Keating MJ.** Chronic lymphocytic leukemia *Semin Oncol* 5, Suppl 14, 107-14 (1999)
- Kelsen D, Atiq OT, Saltz L, Niedzwiecki D, Ginn D, Chapman D, Heelan R, Lightdale C, Vinciguerra V, Brennan M.** FAMTX versus etoposide, doxorubicin, and cisplatin: a random assignment trial in gastric cancer. *J Clin Oncol* 10, 541-8 (1992)
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239 (1972)
- Kinoshita T, Medof ME, Silber R, Nussenzweig V.** Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 162, 75-92 (1985)
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Kramer PH, Peter ME.** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/ CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588 (1995)
- Kluck RM, Esposti MD, Perkins G, Renken C, Kuwana T, Bossy-Wetzel E, Goldberg M, Allen T, Barber MJ, Green DR, Newmeyer DD.** The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J Cell Biol* 147, 809-822 (1999)
- Kneller R, You W, Chang Y, Liu WD, Zhang L, Zhao L, Xu GW, Fraumeni JF Jr, Blot WJ.** Cigarette smoking and other risk factors for progression of precancerous stomach lesions. *J Natl Cancer Inst* 84, 1261-1266 (1992)
- Köhler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975)

- Kooyman DL, Byrne GW, McClellan S, Nielsen D, Tone M, Waldmann H, Coffman TM, McCurry KR, Platt JL, Logan JS.** In vivo transfer of GPI-linked complement restriction factors from erythrocytes to the endothelium. *Science* 269, 89-92 (1995)
- Koretz K, Bruderlein S, Henne C, Moller P.** Decay-accelerating factor (DAF, CD55) in normal colorectal mucosa, adenomas and carcinomas. *Br J Cancer* 66, 810-814 (1992)
- Krammer PH.** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795 (2000)
- Kronenberg M, Gapin L.** The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2, 557-568 (2002)
- Kruman I, Guo Q, Mattson MP.** Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res* 51, 293-308 (1998)
- Kuppen PJ, Gorter A, Hagenaars M, Jonges LE, Giezeman-Smits KM, Nagelkerke JF, Fleuren G, van de Velde, CJ.** Role of NK cells in adoptive immunotherapy of metastatic colorectal cancer in a syngeneic rat model. *Immunol Rev* 184, 236-243 (2001)
- Kuraya M, Fujita T.** Signal transduction via a protein associated with a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, decay-accelerating factor (DAF/CD55). *Int Immunol* 10, 473-480 (1998)
- Kyhse-Andersen J.** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209 (1984)
- La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, Gentile A.** Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. *Cancer* 70, 50-55 (1992)
- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Laurén P.** The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64, 31 (1965)
- Le Bivic A, Quaroni A, Nichols B, Rodriguez-Boulan E.** Biogenetic pathways of plasma membrane proteins in Caco-2, a human intestinal epithelial cell line. *J Cell Biol* 111, 1351-1361 (1990)
- Lee MD, Dunne TS, Siegel MM, Chang CC, Morton GO, Donald B.** Calicheamicins, a novel family of antitumor antibiotics. *J Amer Chem Soc* 109, 3464-3466 (1987)
- Lemasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B.** Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature* 325, 78-81 (1987)
- Leonard JP, Salpeter MM.** Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *J Cell Biol* 82, 811-819 (1979)
- Li L, Spendlove I, Morgan J, and Durrant LG.** CD55 is over-expressed in the tumor environment. *Br J Cancer* 84, 80-86 (2001)
- Li LY, Luo X, Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99 (2001)
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X.** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489 (1997)
- Lipton SA, Bossy-Wetzel E.** Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity. *Cell* 111, 147-150 (2002)
- Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP.** Control of the complement system. *Adv Immunol* 61, 201-283 (1996)

- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157 (1996)
- Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X.** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184 (1997)
- Lotem J, Sachs L.** Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4601-4606 (1998)
- Lublin DM, Atkinson JP.** Decay-accelerating factor : biochemistry, molecular biology, and function. *Annual Review of Immunology* 7, 35-58 (1989)
- Lund-Johansen F, Olweus J, Symington FW, Arli A, Thompson JS, Vilella R, Skubitz K, Horejsi V.** Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. *Eur J Immunol* 23, 2782-2791 (1993)
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR.** Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104, 1535-1549 (1993)
- Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, Peluso JJ.** Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. *Endocrinology* 11, 4209-4217 (2000)
- Mäenpää A, Junnikkala S, Hakulinen J, Timonen T, and Meri S.** Expression of complement membrane regulators membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59) in human malignant gliomas. *Am J Pathol* 148, 1139-1152 (1996)
- Maltoni M, Volpi A, Nanni O, Bajorko P, Belletti E, Vecchi AM, Liverani M, Danesi S, Calistri D, Ricotti L, Amadori D.** Gastric cancer: epidemiologic and biological aspects. *Forum (Genova)* 8, 199-207 (1998)
- Martikainen P, Kyprianou N, Tucker RW, Isaacs JT.** Programmed death of nonproliferating androgen-independent prostatic cancer cells. *Cancer Res* 51, 4693-4700 (1991)
- Martin SJ, Green DR, Cotter GC.** Dicing with death: Dissecting the components of the apoptosis machinery. *TIBS* 19, 26-30 (1994)
- McDonald JW, Behrens MI, Chung C, Bhattacharyya T, Choi DW.** Susceptibility to apoptosis is enhanced in immature cortical neurons. *Brain Res* 759, 228-232 (1997)
- McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM, Hockenberry D, London L, McKearn JP, Korsmeyer SJ.** Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 10, 1901-1907 (1990)
- Medof ME, Walter EI, Rutgers JL, Knowles DM, Nussenzweig V.** Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and body fluids. *J Exp Med* 165, 848-64 (1987)
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.** Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9 (1997)
- Ménétrier P.** Des polyadénomas gastriques et de leurs rapports avec le cancer de l'estomac. *Arch Physiol Norm Pathol* 1, 322-36 (1988)
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A.** Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 32, 1205-1211 (2002)
- Morgan BP.** Complement membrane attack on nucleated cells: Resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J* 264, 1-14 (1989)
- Morgan BP.** Complement regulatory molecules: application to therapy and transplantation. *Immunol Today* 16, 257-259 (1995)

- Morris RG, Hargreaves AD, Duvall E, Wyllie AH.** Hormone-induced cell death. 2. Surface changes in thymocytes undergoing apoptosis. *Am J Pathol* 115, 426-36 (1984)
- Morso BC.** Carcinoma arising from areas of intestinal metaplasia in the gastric mucosa. *Br J Cancer* 9, 377-85 (1955)
- Mosmann T.** Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63 (1983)
- Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365 (1997)
- Nakamura T, Nakano G.** Histopathological classification and malignant change in gastric polyps. *J Clin Pathol* 38, 754-64 (1985)
- Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042 (1999)
- Nicholson-Weller A, Burge J, Fearon DT, Weller PF, Austen KF.** Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J Immunol* 129, 184-189 (1982)
- Nicholson-Weller A, Wang CE.** Structure and function of decay accelerating factor CD55. *J Lab Clin Med* 123, 485-491 (1994)
- Nicotera P, Orrenius S.** The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 23, 173-180 (1998)
- Niehans GA, Cherwitz DL, Staley NA, Knapp DJ, Dalmasso AP.** Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am J Pathol* 149, 129-142 (1996)
- Nomura A, Grove J, Stemmermann G, Severson R.** A prospective study of stomach cancer and its relation to diet, cigarettes, and alcohol consumption. *Cancer Res* 50, 627-631 (1990)
- Okada H, Mak T.** Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nature Reviews Cancer* 4, 592-603 (2004)
- Oota K, Sobin LH.** Histological typing of gastric and oesophageal tumours. In *WHO: International Histological Classification of Tumours, No. 18. WHO, Geneva* (1977)
- Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, Pangalis GA, Bastion Y, Catovsky D, Mellstedt H.** Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 15, 1567-74 (1997)
- Pan Z, Damron D, Nieminen AL, Bhat MB, Ma J.** Depletion of intracellular Ca^{2+} by caffeine and ryanodine induces apoptosis of Chinese hamster ovary cells transfected with ryanodine receptor. *J Biol Chem* 275, 19978-19984 (2000)
- Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, Kumar V, Weichselbaum R, Nalin C, Alnemri ES, Kufe D, Kharbanda S.** Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19, 4310-4322 (2000)
- Parolini I, Sargiacomo M, Lisanti MP, Peschle C.** Signal transduction and glycosphosphatidylinositol-linked proteins (lyn, lck, CD4, CD45, G proteins, and CD55) selectively localize in Triton-insoluble plasma membrane domains of human leukemic cell lines and normal granulocytes. *Blood* 87, 3783-3794 (1996)
- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J.** Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985: implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 85, 1038-49 (1998)
- Pohle T, Brändlein S, Ruoff N, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP.** Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res* 64, 3900-3906 (2004)

- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD.** Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700 (1993)
- Raina AK, Hochman A, Ickes H, Zhu X, Ogawa O, Cash AD, Shimohama S, Perry G, Smith MA.** Apoptotic promoters and inhibitors in Alzheimer's disease: Who wins out? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27, 251-254 (2003)
- Raina AK, Hochman A, Zhu X, Rottkamp CA, Nunomura A, Siedlak SL, Boux H, Castellani RJ, Perry G, Smith MA.** Abortive apoptosis in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol (Berl)* 101, 305-310 (2001)
- Ramon J, Serra L, Cerdo C, Oromi J.** Dietary factors and gastric cancer risk: a case-control study in Spain. *Cancer* 71, 1731-1735 (1993)
- Riethmüller G, Holz E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Funke I, Pichlmaier H, Hirche H, Buggisch P, Witte J, Pichlmayr R.** Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer: seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 16, 1788-1794 (1998)
- Riethmüller G, Schneider-Gadicke E, Schlimok G, Schmiegel W, Raab R, Hoffken K, Gruber R, Pichlmaier H, Hirche H, Pichlmayr R, et al.** Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes' C colorectal carcinoma. German Cancer Aid 17-1A Study Group. *Lancet* 343, 1177-1183 (1994)
- Robertson JD, Orrenius S, Zhivotovsky B.** Review: nuclear events in apoptosis. *J Struct Biol* 129, 346-358 (2000)
- Rothman BL, Despins AW, Kreutzer DL.** Cytokine regulation of C3 and C5 production by the human type II pneumocyte cell line. *J Immunol* 145, 592-598 (1990)
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES.** Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2, 476-483 (2000)
- Salinovich O, Montelaro RC.** Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156, 341-347 (1986)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York (1989)
- Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C.** Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14, 131 (1993)
- Schanne FAX, Kane AB, Young EE, Farber JL.** Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206, 700-702 (1979)
- Schneppenheim R, Budde U, Dahlmann N, Rautenberg P.** Luminography – a new, highly sensitive visualisation method for electrophoresis. *Electrophoresis* 12, 367-372 (1991)
- Scoltock AB, Bortner CD, St J Bird G, Putney JW Jr, Cidlowski JA.** A selective requirement for elevated calcium in DNA degradation, but not early events in anti-Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275, 30586-30596 (2000)
- Shapiro DN, Jones BG, Shapiro LH, Dias P, Houghton PJ.** Antisense-mediated reduction in insulin-like growth factor-I receptor expression suppresses the malignant phenotype of a human alveolar rhabdomyosarcoma. *J Clin Invest* 94, 1235-1242 (1994)
- Shen HM, Dong SY, Ong CN.** Critical role of calcium overloading in cadmium induced apoptosis in mouse thymocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 171, 12-19 (2001)
- Shenoy-Scaria AM, Kwong J, Fujita T, Olszowy MW, Shaw AS, Lublin DM.** Signal transduction through decay-accelerating factor. Interaction of glycosylphosphatidylinositol anchor and protein tyrosine kinases p56^{lck} and p59^{lyn}. *J Immunol* 149, 3535-3541 (1992)

- Shi Y.** Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459–470 (2002)
- Shibuya K, Abe T, Fujita T.** Decay-accelerating factor functions as a signal transducing molecule for human monocytes. *J Immunol* 149, 1758–1762 (1992)
- Shinoura N, Heffelfinger SC, Miller M, Shamraj OI, Miura NH, Larson JJ, DeTribolet N, Warnick RE, Tew JJ, Menon AG.** RNA expression of complement regulatory proteins in human brain tumors. *Cancer Lett* 86, 143–149 (1994)
- Sindelar WF, Kinsella JT, Tepper JE, DeLaney TF, Maher MM, Smith R, Rosenberg SA, Glatstein E.** Randomized trial of intraoperative radiotherapy in carcinoma of the stomach. *Am J Surg* 165, 178–186 (1993)
- Spendlove I, Li L, Carmichael J, Durrant LG.** Decay accelerating factor (CD55): A target for cancer vaccines? *Cancer Res* 59, 2282–2286 (1999)
- Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ.** Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. *J Clin Invest* 81, 1419–1426 (1988)
- Sulston J, Horvitz HR.** Postembryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 56, 110–156 (1977)
- The EUROGAST Study Group.** An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet* 341, 1359–62 [Erratum: *Lancet* 341, 1668] (1993)
- Timmermann W, Illert B, Reindl H, Rückle-Lanz H, Wilhelm M, Hensel F, Vollmers HP, Müller-Hermelink HK, Coquoz D, Thiede A.** Prognostic effect of CD55 SC-1 in gastric carcinoma (GC) and survival after treatment with the monoclonal antibody SC-1. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology (ASCO)*, 40th Annual Meeting, Jun. 2004
- Tombal B, Denmeade SR, Isaacs JT.** Assessment and validation of a microinjection method for kinetic analysis of $[Ca^{2+}]_i$ in individual cells undergoing apoptosis. *Cell Calcium* 25, 19–28 (1999)
- Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A.** Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 72, 565–573 (1997)
- Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ.** *Helicobacter pylori* Infection and the Development of Gastric Cancer. *N Engl J Med* 345, 784–789 (2001)
- Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S.** Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 271, 31075–31085 (1996)
- Vollmers HP, Brändlein S.** Nature's best weapons to fight cancer: Reloading human monoclonal IgM antibodies. *Hum Antibodies* 11(4), 131–142 (2002)
- Vollmers HP, Dämmrich J, Hensel F, Ribbert H, Meyer-Bahlburg A, Ufken-Gaul T, v.Korff M, Müller-Hermelink HK.** Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma. *Cancer* 79, 433–440 (1997)
- Vollmers HP, Dämmrich J, Ribbert H, Wozniak E, Müller-Hermelink HK.** Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody. *Cancer* 76, 550–558 (1995)
- Vollmers HP, Hensel F, Hermann R, Dämmrich J, Wozniak E, Gessner P, Herrmann B, Zimmermann U, Müller-Hermelink HK.** Tumor-specific apoptosis by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer. *Oncology Reports* 5, 35–40 (1998)
- Vollmers HP, O'Connor R, Müller J, Kirchner T, Müller-Hermelink HK.** SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells. *Cancer Res.* 49, 2471–2476 (1989)
- Vollmers HP, Stulle K, Dämmrich J, Pfaff M, Papadopoulos T, Betz C, Saal K, Müller-Hermelink HK.** Characterization of four new gastric cancer cell lines. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63, 335–343 (1993)

- Vollmers HP, Zimmermann U, Krenn V, Timmermann W, Illert B, Hensel F, Hermann R, Thiede A, Wilhelm M, Rückle-Lanz H, Reindl L, Müller-Hermelink HK.** Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results. *Oncology Reports* 5, 549-552 (1998)
- Wajant H.** The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635– 1636 (2002)
- Webb A, Cunningham D.** Curing gastric cancer—hone the scalpel with magic? *Br J Cancer* 73, 418-9 (1996)
- Wertz IE, Dixit VM.** Characterization of calcium release-activated apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *J Biol Chem* 275, 11470-11477 (2000)
- Whelan SL, Parkin DM, Masuyer E. (Herausgeber)** Trends in cancer incidence and mortality. Lyon, France: *IARC Scientific Publications no. 102* (1993)
- Wiggins CL, Becker TM, Key CR, Samet JM.** Stomach cancer among New Mexico's American Indians, Hispanic whites, and non-Hispanic whites. *Cancer Res* 49, 1595-1599 (1989)
- Williamson R.** Properties of rapidly labelled deoxyribonucleic acid fragments isolated from the cytoplasm of primary cultures of embryonic mouse liver cells. *J Mol Biol* 51, 157-68 (1970)
- Wils JA, Klein HO, Wagener DJ, Bleiberg H, Reis H, Korsten F, Conroy T, Fickers M, Leyvraz S, Buyse M, et al.** Sequential high-dose methotrexate and fluorouracil combined with doxorubicin — a step ahead in the treatment of advanced gastric cancer: a trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Tract Cooperative Group. *J Clin Oncol* 9, 827-31 (1991)
- Wolf BB, Green DR.** Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049–20052 (1999)
- Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-56 (1980)
- Yano S, Tokumitsu H, Soderling TR.** Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 396, 584-587 (1998)
- Yuan J, Horvitz HR.** The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138, 33-41 (1990)
- Zanghieri G, Di Gregorio C, Sacchetti C, Fante R, Sassatelli R, Cannizzo G, Carriero A, Ponz de Leon M.** Familial occurrence of gastric cancer in the 2-year experience of a population-based registry. *Cancer* 66, 2047-2051 (1990)
- Zirpel L, Lippe WR, Rubel EW.** Activity-dependent regulation of $[Ca^{2+}]_i$ in avian cochlear nucleus neurons: roles of protein kinases A and C and relation to cell death. *J Neurophysiol* 79, 2288-2302 (1998)
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X.** An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549–11556 (1999)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. rer.nat. Dr. med. habil. Heinz Peter Vollmers für die Überlassung des interessanten Themas, für die Betreuung der Arbeit über die vergangenen Jahre und sein stetes Interesse am Verlauf dieser Arbeit.

Prof. Dr. med. Hans Konrad Müller-Hermelink, Direktor des Pathologischen Instituts, Würzburg, für die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Dr. rer. nat. Frank Hensel und Dr. rer. nat. Ralph Hermann für die Einarbeitung in die Labormethodik, die zahlreichen Hilfestellungen auf technischer und fachlicher Seite.

Dr. rer. nat. Stephanie Brändlein für die Hilfe bei der Anfertigung dieses Manuskripts, die zahllosen gewinnbringenden Diskussionen und die aufbauenden, motivierenden Worte in schwierigen Phasen.

Ewa Wozniak und Tina Pohle für die technische Hilfe und die angenehme Atmosphäre im Labor.

Dr. rer. nat. Magarida Maria Souto-Caneiro für die unzähligen technischen Hilfen und die einzigartige Atmosphäre in ihrem Labor.

Prof. Dr. med. Michael Gekle und Dr. med. Andreas Benesic, Physiologisches Institut, Würzburg, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes zur Calciummessung und die vielen Anregungen für den Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts, insbesondere der AG Vollmers, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Steffen Geis
geboren in Alzenau i. Ufr.

30. August 1975

SCHULAUSBILDUNG

Erich-Kästner-Grundschule in Alzenau

09/1981 – 08/1985

Spessart Gymnasium Alzenau

09/1985 – 07/1994

Abschluss: Abitur

01. Juli 1994

ZIVILDIENTST

Pflegedienst im BRK-Seniorenheim Alzenau

08/1994 – 10/1995

HOCHSCHULAUSBILDUNG

Studium der Humanmedizin
an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

11/1995 – 11/2002

Abschluss: Staatsexamen

28. November 2002

**Teilzeitstudium: Master of Science Programme
in International Health**
an der Humboldt Universität zu Berlin

seit 03/2003

Teilnahme am Core Course am Tropeninstitut Berlin

03/2003 – 06/2003

Abschluss: Diploma in Tropical Medicine and Public Health

17. Juni 2003

BERUFLICHER WERDEGANG

Anstellung als Arzt im Praktikum am Tropeninstitut
der Ludwig-Maximilians-Universität München

seit 07/2003

Im Rahmen dieser Anstellung: wissenschaftliche Tätigkeit im
Mbeya Medical Research Programme (Tansania)

08/2003 – 12/2004

Anstellung als Arzt in der Ambulanz des Tropeninstituts
der Ludwig-Maximilians-Universität München

seit 01/2005

Alzenau, den 04. Februar 2005