# 3 Ergebnisse

Zu Beginn des Ergebnisteils wird der Spezifitätsnachweis der SNARE-Antikörper dargelegt. Es folgen die Untersuchungsergebnisse der immunhistochemischen Expression von Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3) in humanen hepatopankreatischen Geweben, der gastrointestinalen Mukosa sowie in neuroendokrinen Tumoren in organspezifischer Reihenfolge. Einhergehend werden in diesem Zusammenhang die weiterführenden Kolokalisationsexperimente des endokrinen Pankreas, der Leber sowie der enteroendokrinen und mukosaassoziierten Zellen erläutert. Daraufhin werden die Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der SNAREs in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 und neuroendokrinen Pankreaszelllinie BON ausgeführt. Abschließend werden die Daten zur Proteinexpression der drei untersuchten SNAREs Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3) in multiplen transformierten Zelllinen anhand des Western Blot Verfahrens vorgestellt.

# 3.1 Spezifitätsnachweis der SNARE-Antikörper

Eingangs wurde der Spezifitätsnachweis der Antikörper durch die Methode der Pepidverdrängung exemplarisch an der humanen Kolonkarzinomzelllinie HT-29 [Fogh et al. (1977)] erbracht. Wie aus Abb. 12 I) hervorgeht, lagen die spezifischen Banden für die Proteine *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* in Höhe des Molekulargewichts der entsprechenden Peptidsequenzen.



- Abb. 12:Peptidverdrängungsassay zur Darstellung der Spezifität der polyklonalen<br/>Antikörper Syntaxin 3 (Sx, 1. Bahn) und Cellubrevin (Cb, 2. Bahn):
  - I) Die Blockpfeile weisen auf die spezifischen Proteinbanden (ca. 35, 14 kD).
  - *II)* Nach Zufügen des spezifischen Antigens waren für Syntaxin 3 und Cellubrevin diese Banden nicht mehr vorhanden, da die Antikörper mit dem kompetierenden Antigen im Überstand reagierten.

Nach Präinkubation mit einer äquivalenten Menge des löslichen synthetischen Antigens (siehe Abb. 12 II) war das spezifische Bandenmuster für *Syntaxin 3* bei 35 kD und *Cellubrevin* in Höhe von 14 kD nicht mehr nachweisbar, wodurch die Spezifität dieser Antikörper belegt wurde. Für den *SNAP 23*-Antikörper stand kein geeignetes Antigen für den Spezifitätsnachweis zur Verfügung. Es wird deshalb auf entsprechende Publikationen verwiesen, in denen dieser hinreichend beschrieben wurde [Galli et al. (1998), Faigle et al. (2000)].

#### 3.2. Lokalisation der SNARE-Proteine im Pankreas

Die folgenden Ergebnisse der elf immunhistochemisch durch die APAAP-Methode untersuchten *humanen* Pankreasgewebe werden für das endokrine und exokrine Pankreas differenziert betrachtet (siehe Tab. 14). Die duktalen Zellen des Pankreasgangepithels wiesen für die verwandten Antikörper kaum signifikant positiven Signale auf.

# 3.2.1 Endokrines Pankreas: Inselzellen

Wie Tab. 14 und Abb. 13 veranschaulichen, zeigten sowohl *Syntaxin 3* als auch *Cellubrevin* in den Langerhansschen Inseln vorwiegend paninsulinär positive Signale. *Syntaxin 3* wurde in allen, *Cellubrevin* in 9/11 Inselgeweben *paninsulinär* vorgefunden. *SNAP 23* ließ sich hingegen in 9/11 Präparaten in vereinzelten, peripher gelegenen Zellen des Inselapparates und lediglich in 2/11 Geweben paninsulinär in Inselzellen detektieren. In der subzellulären Lokalisation (SZL) zeigte sich für alle drei SNARE-Antigene ein intrazelluläres Färbemuster mit nahe der Plasmamembran konzentrierten Anfärbungen.



Langerhanssche Inselzellen

Pankreasgang

Azinuszellen

Abb. 13:Immunhistochemische Expression der SNARE-Antigene im exokrinen und<br/>endokrinen Pankreasgewebe. APAAP-Methode, Serienschnitttechnik.<br/>Syntaxin 3 und Cellubrevin wurden paninsulinär in Inselzellen exprimiert,<br/>SNAP 23-positive Zellen fanden sich vor allem in der Peripherie der Inseln.<br/>Im exokrinen Gewebe wurden in diesem Präparat lediglich SNAP 23 und<br/>Cellubrevin schwach exprimiert.

Anhand der semiquantitativen Auswertung (siehe Tab. 14) war die Intensität der Signale für *Syntaxin 3* in 8/11 Geweben stark positiv (+++), für *Cellubrevin* in 4/11. *SNAP 23* wurde lediglich in 2/11 Präparaten paninsulinärer in stark positiver Intensität und in 9/11 Präparaten in schwacher Intensität in disseminierten, meist peripher gelegenen Inselzellen vorgefunden.

Zelltyp: **Endokrin: Inselzellen Exokrin: Azinuszellen Auswertung:** Intensität SZL Intensität SZL Antigen: I) Syntaxin 3 + - ++ Ø Nr. 1 paninsulinär, IZ Nr. 2 ++ - +++ paninsulinär, IZ Ø apikal PM, ZP Nr. 3 + - ++ paninsulinär, IZ ++ Nr. 4 + - ++ paninsulinär, IZ + Nr. 5 paninsulinär, IZ Ø ++ - +++ Nr. 6 paninsulinär, IZ Ø +++Nr. 7 paninsulinär, IZ apikal PM, ZP ++++ Nr. 8 paninsulinär, IZ apikal PM, ZP ++++ Nr. 9 paninsulinär, IZ Ø +++Nr. 10 paninsulinär, IZ + +++ Nr. 11 paninsulinär, IZ + apikal PM, ZP +++**II) SNAP 23** panazinär, ZP Nr. 1 + vereinzelt, IZ + panazinär, ZP, PM Nr. 2 + vereinzelt, IZ + Nr. 3 + vereinzelt, IZ ++ panazinär, ZP, PM Nr. 4 + - ++ vereinzelt, IZ ++ panazinär, ZP Nr. 5 vereinzelt, IZ + - ++ panazinär, ZP ++ Nr. 6 panins. +, einz.+++, IZ + panazinär, ZP, PM +++ Nr. 7 vereinzelt, IZ + - ++ panazinär, ZP ++ Nr. 8 + vereinzelt, IZ + - ++ panazinär, ZP panins.+, einz.+++, IZ Nr. 9 +++ panazinär, ZP, PM + Nr. 10 + - ++ vereinzelt, IZ ++ panazinär, ZP vereinzelt, IZ + + - ++ panazinär, ZP Nr. 11 **III)** Cellubrevin paninsulinär, IZ Nr. 1 + - ++ Ø paninsulinär, IZ Nr. 2 ++ Ø vereinzelt, IZ Nr. 3 Ø + Nr. 4 paninsulinär IZ ZP + - ++ + paninsulinär, IZ ZP Nr. 5 ++ + paninsulinär, IZ ZP Nr. 6 ++ - +++ + - ++ Nr. 7 ++ - +++ paninsulinär, IZ Ø vereinzelt, IZ ZP Nr. 8 + + - + +Nr. 9 ++ paninsulinär, IZ + ZP ZP Nr. 10 ++ - +++ paninsulinär, IZ + + - +++ Nr. 11 paninsulinär, IZ + ZP

*Tab. 14:* Proteinexpression von Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin im Pankreasgewebe. Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

Eine nähere Spezifizierung des endokrinen Zelltyps (A-, B-, D-Zellen entsprechend Glukagon-, Insulin-, Somatostatin-sezernierenden Zellen) wurde durch Kolokalisation in der Doppelfluoreszenz vorgenommen, deren Ergebnisse in Kap. 3.3 dargelegt werden. Allerdings ließ sich aufgrund des paninsulinären Vorkommens von *Syntaxin* 3 und *Cellubrevin* vermuten, daß alle Subtypen der Inselzellen (A, B, D-Zellen, siehe Tab. 1 und 2) diese beiden Antigene exprimieren. Nach rein morphologischen Kriterien könnte es sich bei den exzentrisch am Inselrand gelegenen *SNAP 23*-exprimierenden Zellen um Somatostatin-produzierende D-Zellen handeln.

# 3.2.2 Exokrines Pankreas: Azinuszellen

In den exokrinen Azinuszellen wurde jedes der drei SNARE-Proteine in leichter bis mittelstarker Signalintensität nachgewiesen. Wie Abb. 14 zeigt, ließ sich *Syntaxin 3* im exokrinen Anteil der Bauchspeicheldrüse in den immunhistochemischen Untersuchungen nur in geringer Intensität vor allem an der apikalen Plasmamembran und mit dezenter intrazelluläre Signalintensität in 4/11 der Präparate nachweisen. *SNAP 23* zeigte in allen Pankreasgeweben subzellulär ein intrazelluläres Signal, in vier Geweben zudem ein plasmamembranäres Verteilungsmuster in der basolateralen und apikalen Domäne der Azinuszellen. *Cellubrevin* konnte lediglich in 7/11 Pankreasgeweben mit schwacher intrazellulärer Färbeintensität angetroffen werden. Diese subzelluläre Anordnung stimmte mit der in der Immunfluoreszenz an Azinuszellen beobachteten Lokalisation (siehe Abb. 15) weitgehend überein.

a) Syntaxin 3

**b) SNAP 23** 

c) Cellubrevin



apikale Lokalisation



plasmamembranäres und intrazelluläres Expressionsmuster



intrazelluläre Signaldetektion

Abb. 14:Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin am Azinusgewebe des Pankreas.APAAP-Methode. Deutlich wird hier die apikal-plasmamembranäre Detektion des<br/>Antigens Syntaxin 3, die plasmamembranäre und geringe intrazelluläre<br/>Dektektion des Antigens SNAP 23 und die intrazelluläre Lokalisation von<br/>Cellubrevin im exokrinen Gewebe.



#### 3.3 Doppelfluoreszenz mit endokrinen Markern am Pankreasgewebe

Um die in den vorangegangenen APAAP-Färbungen demarkierten, SNARE-positiven Zellen endokrinologisch zu A-, B- und D-Zellen des Inselapparats zuzuordnen, wurden Kolokalisationsversuche der Immunfluoreszenz in angeschlossen. Es konnten Doppelfluoreszenzanalysen sowohl mit den monoklonalen Inselzellmarkern Insulin und Somatostatin sowie mit den neuroendokrinen Antikörpern gegen Chromogranin A und Synaptophysin durchgeführt werden. Es gilt als bekannt, daß Synaptophysin in endokrinen A-, B- und D-Zellen des Pankreas vorkommt [Wiedenmann & Franke (1985), Kalina et al. (1991)]. Für Glukagon stand kein geeigneter monoklonaler Antikörper für die Kolokalisation zur Verfügung, somit wurde ein polyklonaler Glukagon-Antikörper eingesetzt, der zugleich als interne Positivkontrolle diente.

Aus Tab. 15 geht hervor, daß in den experimentellen Durchführungen die beiden SNARE-Antigene *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* mit Insulin, Somatostatin, Cg A und Sy 38 kolokalisierten (siehe Abb. 16 - 20). Demnach sind sie diesen Untersuchungen zufolge in B- und D-Zellen des Inselapparats anzutreffen. Da eine Kolokalisation von Glukagon (A-Zelle) mit dem neuroendokrinen Marker Cg A vorlag (ca. 30% der Glukagon-positiven Zellen), konnte indirekt durch die einhergehend positive Doppelfluoreszenz von *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* mit Chromogranin A auch auf eine mögliche Präsenz dieser SNAREs in A-Zellen geschlossen werden.

SNAP 23 kolokalisierte mit keinem der eingesetzten Antigene (siehe Tab. 15), was darin begründet war, daß es in der Immunfluoreszenz keine signifikante Signalintensität im endokrinen Pankreas, aber ein dominierendes Fluoreszenzmuster im exokrinen Pankreas aufwies (siehe Abb. 21). Dieser Befund stellte einen Widerspruch zu den APAAP-Befunden dar, wonach SNAP 23 in - wenn auch in disseminierten Zellen - der Inseln vorgefunden werden konnte.

Zur internen Positivkontrolle wurde Glukagon, welches die A-Zellen der Pankreasinseln repräsentiert, mit Somatostatin (D-Zellen) und Insulin (B-Zellen) kolokalisiert. Wie Abb. 22 und 23 darstellen, ergab sich hierbei der Ausschluss einer Doppellokalisation dieser Antigene, wodurch die hohe Spezifität der eingesetzten Antikörper belegt wurde.

| 1. Antigen<br>(SNARE-Antigen) | 2. Antigen<br>(Inselzell-Antigen) | Doppellokalisation |
|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
|                               | Insulin                           | +                  |
| Syntaxin 3                    | Somatostatin                      | +                  |
| Syntaxin 5                    | Chromogranin A                    | +                  |
|                               | Synaptophysin                     | +                  |
|                               | Insulin                           | Ø                  |
| SNAP 23                       | Somatostatin                      | Ø                  |
|                               | Chromogranin A                    | Ø                  |
|                               | Synaptophysin                     | Ø                  |
|                               | Insulin                           | +                  |
| Collubravin                   | Somatostatin                      | +                  |
| Cenubrevin                    | Chromogranin A                    | +                  |
|                               | Synaptophysin                     | +                  |
|                               | Insulin                           | Ø                  |
| Clukegon                      | Somatostatin                      | Ø                  |
| Glukagoli                     | Synaptophysin 38                  | Ø                  |
|                               | Chromogranin A                    | +                  |

Tab. 15: Übersicht der Kolokalisation am endokrinen Pankreas. Doppelfluoreszenzmethode.



Abb. 16: Kolokalisation von Syntaxin 3 und Insulin. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Die Antigene Syntaxin 3 (grüne EF) und Insulin (rote EF) kolokalisieren (Pfeile) in denselben Inselzellen, welche in der Doppelfluoreszenz gelb-orange markiert sind.



Abb. 17: Kolokalisation von Syntaxin 3 und Somatostatin. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Die Antigene Syntaxin 3 (grüne EF) und Somatostatin (rote EF) sind in denselben Inselzellen präsent, welches die Doppelfluoreszenz (gelb, Pfeile) zeigt.



Abb. 18: Kolokalisation von Syntaxin 3 und Chromogranin A. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Das Antigen Syntaxin 3 (grüne EF) kolokalisierte (gelb-orange, Pfeile) in einem Anteil der Inselzellen mit Chormogranin A (rote EF).



*Abb. 19:* Kolokalisation von Cellubrevin und Insulin. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Die Antigene Cellubrevin (grüne EF) und Insulin (rote EF) sind in identischen Inselzellen präsent, welches die Doppelfluoreszenz (gelb-orange, Pfeil) zeigt.



Abb. 20: Kolokalisation von Cellubrevin und Synaptophysin. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Die Antigene Cellubrevin (grüne EF) und Sy 38 (rote EF) sind in denselben Inselzellen vorhanden, welches die Doppelfluoreszenz (gelb) zeigt. Cellubrevin findet sich darüber hinaus in Azinuszellen.



Abb. 21: Kolokalisation von SNAP 23 und Insulin. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Das Antigen SNAP 23 (grüne EF) war in der IF nicht signifikant in Inselzellen expirimiert (Pfeil) und kolokalisierte demzufolge **nicht** mit Insulin (rote EF). Dementgegen ist SNAP 23 im exokrinen Pankreas mit starker Intensität zu erkennen.



*Abb. 22:* Kolokalisation von Glukagon und Insulin als interne Positivkontrolle. DF-Technik. Die Antigene Glukagon (grüne EF, dicker Pfeil) und Insulin (rote EF, dünner Pfeil) sind **nicht** in denselben Inselzellen präsent (keine gelben Doppelfluoreszenzareale).



Abb. 23: Kolokalisation von Glukagon und Somatostatin als interne Positivkontrolle. Doppelfluoreszenztechnik (DF). Glukagon (grüne EF, dicker Pfeil) und Somatostatin (rote EF, dünner Pfeil) sind **nicht** in denselben Inselzellen präsent (keine gelbe DF). Somit ist die Kolokalisation beider Antigene ausgeschlossen.

#### 3.4 Lokalisation der SNARE-Proteine im Lebergewebe

Die in Tab. 16 aufgeführten fünf morphologisch unauffälligen Lebergewebe wurden anhand der APAAP-Methode untersucht. In den immunhistologischen Studien konnte für Syntaxin 3 in den Hepatozyten keine Antigenexpression beobachtet werden. Demgegenüber war für die Antigene Cellubrevin und SNAP 23 jeweils in 3/5 untersuchten Lebergeweben eine schwach positive intrazelluläre bzw. intrazellulär-plasmamembranäre Reaktivität in den Hepatozyten zu verzeichnen (siehe Abb. 24). Das Gallengangepithel wies lediglich für Cellubrevin in 2/5 Präparaten eine leicht positive Reaktivität auf. Darüber hinaus stellten sich für SNAP 23 in einer spezifischen Zellpopulation außerhalb der Leberparenchymzellen hervorragende Signalintensitäten dar (siehe Abb. 25). Nach rein histomorphologischen Kriterien handelte es sich um die in der Leber gewebsständig lokalisierten Makrophagen, die sog. Kupfferschen Sternzellen [Schiebler & Schmidt (1999)]. Um diese Annahme näher zu ergründen, wurden Kolokalisationsexperimente angeschlossen, die im anschließenden Kapitel 3.5 ausgeführt werden.

| Zelltyp:                | Hepat        | HepatozytenKupffersche<br>SternzellenGallengangep |            | Kupffersche<br>Sternzellen |            | ngepithel |
|-------------------------|--------------|---|------------|----------------------------|------------|-----------|
| Auswertung:<br>Antigen: | Intensität   | SZL   | Intensität | SZL                        | Intensität | SZL       |
| I) Syntaxin 3           |              |   |            |                            |            |           |
| Nr. 1                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 2                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 3                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 4                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 5                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| II) SNAP 23             |              |   |            |                            |            |           |
| Nr. 1                   | +            | IZ, PM  | ++         | IZ                         | Ø          |           |
| Nr. 2                   | +            | IZ, PM  | + - ++     | IZ                         | Ø          |           |
| Nr. 3                   | +            | IZ, PM  | ++         | IZ                         | Ø          | _         |
| Nr. 4                   | Ø            |   | + - +++    | IZ                         | Ø          | _         |
| Nr. 5                   | Ø            | _   | +++        | IZ                         | Ø          |           |
| III) Cellubrevin (VAM   | <b>P 3</b> ) |   |            |                            | -          |           |
| Nr. 1                   | +            | IZ  | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 2                   | +            | IZ  | Ø          |                            | +          | IZ        |
| Nr. 3                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 4                   | Ø            |   | Ø          |                            | Ø          |           |
| Nr. 5                   | +            | IZ  | Ø          |                            | +          | IZ        |

*Tab. 16:* Proteinexpression von Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin im Lebergewebe. Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.



Lebervene Hepatozyten

Abb. 24: SNARE-Proteine im humanen Leberparenchym. Portales Feld mit zentraler Lebervene. APAAP-Methode, Serienschnitttechnik. SNAP 23 und Cellubrevin zeigen eine leichte Expression in Hepatozyten. SNAP 23 wird darüber hinaus in interstitiellen sinusoidalen Zellen, den Kupfferschen Sternzellen, nachgewiesen. Syntaxin 3 konnte in Hepatozyten nicht detektiert werden.



Kupffersche Sternzellen

Abb. 25:

Lebergewebe, APAAP-Methode. Markierung der sinusoidal gelegenen Kupfferschen Sternzellen mit dem SNARE-Antigen SNAP 23. Die Hepatozyten dieses Präparats zeigen keine Antigenexpression für SNAP 23.

#### 3.5 Kolokalisation von SNAP 23 in Kupfferschen Sternzellen der Leber

Um der Fragestellung nachzugehen, ob die Kupfferschen Sternzellen als residente Makrophagen der Leber möglicherweise über das SNARE-Protein *SNAP 23* verfügen, wurde die sog. *Kolokalisation in Serienschnitttechnik* angewandt. Anhand der Kolokalisation kann das Vorkommen zweier unterschiedlicher Antigene in derselben Zelle verifiziert werden. Zur immunhistochemischen Markierung der Makrophagenpopulation wurde hier der Antikörper gegen das makrophageneigene Oberflächenantigen CD 68 [Pulford et al. (1989)] eingesetzt.

Wie Abb. 26 veranschaulicht, wiesen innerhalb der Lebersinusoide dieselben *SNAP 23*markierten Zellen ebenfalls positive Signale für CD 68 auf. Dementsprechend konnte erstmalig durch die Doppellokalisation dieser Antigene das Vorkommen von *SNAP 23* in Kupfferschen Sternzellen, den Makrophagen der Leber, bewiesen werden (siehe Tab. 17).

| Lebergewebe: | 1. Antigen | 2. Antigen | Doppellokalisation |
|--------------|------------|------------|--------------------|
| Nr. 1        | SNAP 23    | CD 68      | +                  |
| Nr. 2        | SNAP 23    | CD 68      | +                  |

| <b><i>uot</i> i</b> <i>t</i> <b>i</b> <i>t</i> <b>t t t t t t t t t t</b> | Tab. | 17: | <i>Kolokalisation</i> | von SNAP | 23 ir | n Kupfferschen | Sternzellen der Leber | • |
|---|------|-----|-----------------------|----------|-------|----------------|-----------------------|---|
|---|------|-----|-----------------------|----------|-------|----------------|-----------------------|---|



Abb. 26: Die Pfeile markieren kolokalisierende Kupffer-Zellen. Darüber hinaus wird der dezente plasmamembranäre Nachweis von SNAP 23 in Hepatozyten sichtbar. APAAP, Serienschnitttechnik.

#### 3.6 Lokalisation der SNARE-Proteine in der gastrointestinalen Mukosa

In den folgenden Kapiteln wird die histologisch anhand der APAAP-Technik betrachtete SNARE-Expression in den gastrointestinalen Epithelzellen differenziert für Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum erörtert.

#### 3.6.1 Magenmukosa

An der Magenmukosa wurde die Identifizierung der SNAREs *Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin (VAMP 3)* an zehn Präparaten aus unterschiedlichen Regionen des Magens vorgenommen. Im Einzelnen wurden vier Fundusgewebe und je drei Magenantrum- und Corpusgewebe ausgewertet. In der Durchlichtmikroskopie konnten diverse Zellpopulationen mit unterschiedlicher Färbeintensität für jedes SNARE-Antigen identifiziert werden. Von vordergründigem Interesse war die signalintense Zellpopulation in den basalen und mittleren Drüsenabschnitten (siehe Abb. 27 a-c, 29 a-c), die nach histomorphologischen Gesichtspunkten neuroendokrinen Zellen entsprachen. Auf subzellulärer Ebene zeigten die untersuchten SNARE-Antigene in den stark positiv markierten gastralen Epithelzellen einheitlich ein intrazellulär, basolateral lokalisiertes Expressionsmuster (siehe Abb. 28 a-c) - wie es für neuroendokrine Zellen typisch ist. Die Beweisführung, daß es sich hier tatsächlich um neuroendokrine Zellen handelte, wurde durch zahlreiche Kolokalisationsexperimente erbracht, die in Kap. 3.7 erläutert werden. Die Zusammenstellung der Tab. 18 gibt die semiquantitative Auswertung dieser

Zellpopulation wieder. Auf eine konkrete Angabe der Zellzahl wurde verzichtet, da es sich teilweise um Biopsien handelte, nur wenige Blickfelder zur Verfügung standen und sich das Vorkommen antigenpositiver Zellen im Magen lokoregionär sehr inkonstant darstellte.

Das Antigen *Syntaxin 3* war in 3/3 Corpuspräparaten, in 2/4 Fundus- und in 2/3 Antrumpräparaten anzutreffen. Insbesondere im Magencorpus wurden die *Syntaxin 3*- enthaltenden Zellen mit starker Signalintensität und hoher Anzahl (> 10 Zellen/ BF) detektiert. *SNAP 23* war lediglich in einem Magenantrumgewebe, in 1/3 Corpus- und 2/4 Fundusgeweben enthalten und von schwacher Signalintensität. *Cellubrevin* konnte in 2/4 Magenfundus-, 2/4 Corpus- und 1/3 Magenantrumpräparaten in mäßig positiver Intensität und geringer Anzahl (ca. 5 Zellen/ BF) vorgefunden werden.

Darüber hinaus wiesen jedoch - wie beispielsweise in Abb. 30 zu sehen - alle drei SNARE-Antigene schwach positive APAAP-Signale in einer Vielzahl epithelialer Zellen in allen Drüsenabschnitten der Foveolae gastricae auf, die schwer zu diskriminieren waren. Hier lag die Annahme nahe, daß es sich, neben neuroendokrinen Zellen im Magencorpus- und Fundusbereich, um Belegzellen handeln könnte. Aus diesem Grund wurde die Kolokalisation mit dem Belegzellmarker H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase [Smolka et al. (1991)] durchgeführt. Es konnte in der seriellen Schnitttechnik jedoch in redundanten Versuchsdurchführungen keine Kolokalisation der SNAREs mit dem Antigen H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase erbracht und demnach ihr Vorkommen in den Belegzellen der humanen Mukosa nicht bewiesen werden.

| Lokalisation:           | М   | agenfund       | us  | Magencorpus |                | Magenantrum |     |                |     |
|-------------------------|-----|----------------|-----|-------------|----------------|-------------|-----|----------------|-----|
| Auswertung:<br>Antigen: | Ι   | Anzahl<br>/ BF | SZL | Ι           | Anzahl<br>/ BF | SZL         | Ι   | Anzahl<br>/ BF | SZL |
| I) Syntaxin 3           |     |                |     |             |                |             |     |                |     |
| Nr. 1                   | ++  | < 5            | IZ  | +++         | >10            | IZ          | Ø   | Ø              |     |
| Nr. 2                   | Ø   | Ø              |     | ++          | 5 - 10         | IZ          | +++ | < 5            | IZ  |
| Nr. 3                   | Ø   | Ø              |     | +++         | > 10           | IZ          | ++  | < 5            | IZ  |
| Nr. 4                   | +++ | 5 - 10         | IZ  |             |                |             |     |                |     |
| II) SNAP 23             | -   |                |     |             |                |             |     |                |     |
| Nr. 1                   | +   | < 5            |     | Ø           | Ø              |             | Ø   | Ø              |     |
| Nr. 2                   | Ø   | Ø              |     | +           | < 5            | IZ          | Ø   | Ø              |     |
| Nr. 3                   | ++  | 5 - 10         | IZ  | Ø           | Ø              |             | ++  | 5 -10          | IZ  |
| Nr. 4                   | Ø   | Ø              |     |             |                |             |     |                |     |
| III) Cellubrevin        |     |                |     |             |                |             |     |                |     |
| Nr. 1                   | ++  | < 5            | IZ  | +++         | >10            | IZ          | Ø   | Ø              |     |
| Nr. 2                   | Ø   | Ø              |     | ++          | 5 - 10         | IZ          | Ø   | Ø              |     |
| Nr. 3                   | Ø   | Ø              |     | Ø           | Ø              |             | ++  | < 5            | IZ  |
| Nr. 4                   | ++  | 5 - 10         | IZ  |             |                |             |     |                |     |

 Tab. 18: Proteinexpression von Syntaxin 3, SNAP 23, Cellubrevin in neuroendokrinen Zellen der Magenmukosa. Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.



Abb. 27 a: Syntaxin 3 an der Magenfundusmukosa. Drüsenquerschnitt, APAAP-Methode. Anreicherung von Syntaxin 3 im basalen Anteil der antigenpositiven Zellen.



SNAP 23 an der Magenfundusmukosa. Drüsenquerschnitt, APAAP-Methode. Anreicherung von SNAP 23 im basalen Anteil der antigenpositiven Zellen.

*Abb.* 27 *b*:



Abb. 27 c: Cellubrevin an der Magenfundusmukosa. Drüsenquerschnitt, APAAP-Methode. Anreicherung von Cellubrevin im basalen Anteil der antigenpositiven Zellen. a) Syntaxin 3

*b)* SNAP 23



Abb. 28 a: Intrazellulär vesikuläres Färbemuster von Syntaxin 3. Vergrösserung aus Abb. 27 a)

a) Syntaxin 3





Färbemuster von SNAP 23. Vergrösserung aus Abb. 27 b) c) Cellubrevin



Abb. 28 c: Intrazellulär vesikuläres Färbemuster von Cellubrevin. Vergrösserung aus Abb. 27 c)



c) Cellubrevin



Abb. 29 a, b, c: Expression von Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in der Magenmukosa des Antrums. APAAP-Methode.



Weitere signalpositive Zellen in der gastralen Mukosa mit ballonierter Struktur, bei denen es sich möglicherweise um Belegzellen handeln könnte.

*Abb. 30:* Syntaxin 3-Expression am Querschnitt der Glandulae gastricae propriae des Magenfundus. APAAP-Methode.

#### 3.6.2 Dünndarmmukosa

Es wurden insgesamt vierzehn Gewebe aus verschiedenen Dünndarmabschnitten auf die Präsenz der SNARE-Antigene Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin hin untersucht: jeweils vier Gewebe entstammten dem Duodenum und Jejunum, sechs dem Ileum. Die mit der APAAP-Methode markierten Zellen lagen gehäuft in den basalen und mittleren Drüsensegmenten der Dünndarmkrypten, seltener in den oberen Drüsenabschnitten oder auf den Drüsenvilli des Duodenums und Jejunums. Dieses Expressionsmuster erschien analog zu dem der vergleichend an der Dünndarmmukosa betrachteten neuronalen SNARE-Proteine Syntaxin 1 und SNAP 25 (siehe Abb. 32), deren Vorkommen in neuroendokrinen Zellen bereits beschrieben wurde [Chilcote et al. (1995), Nemoz-Gaillard et al (1998)]. Die subzelluläre Lokalisation (SZL) in diesen vermutlich neuroendokrinen Zellen war für alle drei Antigene intrazellulär mit Betonung der basolateralen Domäne und teilweise zu erkennendem granulärem Färbemuster (siehe Abb. 31). Demnach kann ihre Verteilung zytoplasmatisch oder im endomembranären Kompartiment angenommen werden. Aus der tabellarischen Aufstellung Tab. 19 - 21 ist die Quantität (Zellen/ BF) und Färbeintensität (semiquantitativ) ersichtlich. Das Antigen Syntaxin 3 wurde in der Mukosa des Dünndarms mit der höchsten Quantität angetroffen. In der Schleimhaut des Duodenums, Jejunums und Ileums wurden durchschnittlich 10 - 14 positive Zellen pro Blickfeld (BF) markiert, wobei die Intensität der Signale stark positiv (+++) war. Die Färbeintensität der Antigene Cellubrevin und SNAP 23 belief sich in den untersuchten Dünndarmabschnitten zwischen mäßig (++) bis stark positiv (+++). Die Antigenpräsenz für SNAP 23 variierte zwischen 5 - 8 antigenpositiven Zellen/ BF innerhalb der untersuchten Dünndarmabschnitte, die des Cellubrevins zwischen 6 - 9 Zellen/ BF.

# a) Syntaxin 3



#### b) SNAP 23



#### c) Cellubrevin



*Abb. 31:* Intrazellulär granuläres Verteilungsmuster der SNARE-Antigene mit basaler Lokalisation innerhalb der Zelle. Dünndarmmukosa, APAAP-Technik. Abb. 31 c): antigenpositive Epithelzellen auf der Villusspitze.

| Tab. 19: | SNARE-Pro  | oteinexpres | ssion in n | euroendo  | krinen          | Zellen d | es Duod | enums. |
|----------|------------|-------------|------------|-----------|-----------------|----------|---------|--------|
|          | Zur Auswer | tung siehe  | auch Leg   | gende Kap | <i>p. 2.2.6</i> | •        |         |        |

| Antigen:        | I) Syntaxin 3 |            | II) SN     | II) SNAP 23 |            | III) Cellubrevin |  |
|-----------------|---------------|------------|------------|-------------|------------|------------------|--|
| Auswertung:     | Intensität    | Anzahl/ BF | Intensität | Anzahl/ BF  | Intensität | Anzahl/ BF       |  |
| Nr. 1           | ++            | 6          | ++         | 2           | ++         | 4                |  |
| Nr. 2           | +++           | 13         | +++        | 7           | ++         | 8                |  |
| Nr. 3           | +++           | 11         | ++         | 5           | ++         | 6                |  |
| Nr. 4           | +++           | 11         | ++         | 5           | ++         | 5                |  |
| Mittlere Anzahl | 10            |            | 5          |             | 6          |                  |  |

Tab. 20: SNARE-Proteinexpression in neuroendokrinen Zellen des Jejunums.Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

| Antigen:        | I) Syntaxin 3 |            | II) SN     | AP 23      | III) Cellubrevin |            |
|-----------------|---------------|------------|------------|------------|------------------|------------|
| Auswertung:     | Intensität    | Anzahl/ BF | Intensität | Anzahl/ BF | Intensität       | Anzahl/ BF |
| Nr. 1           | +++           | 11         | ++         | 3          | ++               | 2          |
| Nr. 2           | +++           | 12         | +++        | 9          | ++               | 7          |
| Nr. 3           | +++           | 16         | +++        | 8          | +++              | 12         |
| Nr. 4           | +++           | 18         | ++         | 7          | +++              | 11         |
| Mittlere Anzahl | 14            |            | 7          |            | 8                |            |

Tab. 21: SNARE-Proteinexpression in neuroendokrinen Zellen des Ileums.Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

| Antigen:        | I) Syntaxin 3 |            | II) SN     | AP 23      | III) Cellubrevin |            |
|-----------------|---------------|------------|------------|------------|------------------|------------|
| Auswertung:     | Intensität    | Anzahl/ BF | Intensität | Anzahl/ BF | Intensität       | Anzahl/ BF |
| Nr. 1           | +++           | 13         | +++        | 12         | +++              | 13         |
| Nr. 2           | +++           | 10         | +++        | 6          | ++               | 11         |
| Nr. 3           | +++           | 13         | ++         | 6          | +++              | 12         |
| Nr. 4           | ++            | 9          | ++         | 5          | ++               | 6          |
| Nr. 5           | ++            | 8          | ++         | 10         | ++               | 8          |
| Nr. 6           | ++            | 7          | +++        | 7          | ++               | 6          |
| Mittlere Anzahl | 1             | 0          | 8          | 8          |                  | 9          |



Zellen neuroendokriner Morphologie

Abb. 32:SNARE-Proteine an der Ileummukosa. APAAP-Methode.<br/>Vergleichende immunhistochemische Betrachtung der untersuchten<br/>nonneuronalen SNAREs mit den neuronalen SNARE-Proteinen Syntaxin 1 und<br/>SNAP 25, die bekanntermaßen in NEZ vorhanden sind. Sie zeigen ein ähnliches<br/>Expressionsmuster. Einhergehende Darstellung der Negativkontrolle (re. unten).

Neben dem Antigennachweis für *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* in isoliert markierten Zellen des intestinalen Epithels zeigten sich inkonstant Areale, in denen sich ein schwächeres *panepitheliales* Signal der SNAREs darstellte (siehe Abb. 33 a - c). Hier war für Syntaxin 3 eine apikale Signalintensitätsanreicherung in Enterozyten vorzufinden, die vor allem im Ileum und Rektum vermehrt auftrat und anhand histomorphologischer Aspekte Ähnlichkeit mit der Anordnung des sog. *Schlussleistennetzes* aufwies. Für *SNAP 23* war ein kombiniert plasmamembranär-intrazelluläres und für *Cellubrevin* ein vorwiegend intrazelluläres Expressionsmuster zu beobachten. Zudem war für die zwei SNAREs *Cellubrevin* und *SNAP 23* eine mittelgradige Expression in den die Krypten umgebenden mukosalen Fibroblasten zu beobachten.

```
a) Syntaxin 3
```



Abb. 33 a: Apikal in Enterozyten polarisierte Signalintensität für Syntaxin 3, wie sie vor allem im Ileum und Rektum anzutreffen ist.



Abb. 33 b: Plasmamembranäre und zytoplasmatische Lokalisation von SNAP 23 in den Epithelzellen des Ileums.

c) Cellubrevin



Abb. 33 c: Panepitheliale Antigendarstellung für Cellubrevin in einigen Bereichen der gastrointestinalen Mukosa, hier des Ileums.

Des weiteren imponierten nebenbefundlich in allen untersuchten Abschnitten der gastralen und auch in denen der intestinalen Mukosa Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin über ihre epitheliale Expression hinaus in zahlreichen zwischen den Glandulae gastricae und intestinales sowie in der Tela submukosa befindlichen interstitiellen Zellen (siehe Abb. 34 a, b). Nach lichtmikroskopisch-histologischen Kriterien konnte nicht definiert werden, um welchen Zelltyp es sich handelte. Wie eingangs in Kap. 1.12 erläutert, könnte es sich hier um gewebsständige Makrophagen, Mastzellen oder andere immunologisch aktive Zellen wie Lymphozyten oder Plasmazellen handeln. Um diese Zellen näher charakterisieren. zu wurden Kolokalisationsexperimente angeschlossen, die in Kap. 3.8 dargelegt werden.







Syntaxin 3-positive Zellen

submukosales Bindegewebe

Intrazellulär ganuläre Antigenexpression

Abb. 34 a:Syntaxin 3 in submukosalen Zellen des Ileums. APAAP-Methode.Abb. 34 b:Vergrößerung der Abb. 34 a).

#### 3.6.3. Dickdarmmukosa

Zur Befundung der Dickdarmmukosa wurden sechs Kolon- und fünf Rektumgewebe herangezogen. Antigenpositive Zellen für *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* fanden sich in allen Präparaten. Wie Abb. 35 exemplarisch veranschaulicht, waren diese gehäuft in den basalen Kryptenabschnitten lokalisiert, wie es für neuroendokrine Zellen typisch ist. Das intrazelluläre Verteilungsmuster der SNARE-Antigene war einheitlich intrazellulär mit Polarisation in der basolateralen Domäne der markierten Zellen anzutreffen. Die im Einzelnen bezüglich der quantitativen Verteilung sowie der Signalintensität erhobenen Daten gehen aus Tab. 22 und 23 hervor.



*Abb. 35:* SNARE-Expression an der Kolonmukosa, APAAP-Technik. Die Pfeile markieren antigenpositive Zellen, die sich vorwiegend im unteren Drüsenabschnitt befinden.

*Syntaxin 3* zeigte sich in der Kolon- und Rektummukosa mit durchgehend stark positiver Färbeintensität (+++). Die Anzahl der *Syntaxin 3*-repräsentierenden Zellen lag in der Kolonmukosa durchschnittlich um 7 Zellen/ BF und schien damit quantitativ gegenüber der Dünndarmmukosa mit > 10 Zellen /BF reduziert. Im Rektum zeigte sich gegenüber dem Kolon bei einem errechneten Mittelwert von 17 Zellen/ BF nahezu eine Verdreifachung der *Syntaxin 3*exprimierenden Enterozyten. Im Vergleich zur Dünndarmmukosa war die Signalintensität des Antigens *SNAP 23* in der Kolon- und Rektummukosa schwächer spezifisch positiv (+ - ++).

| Antigen:        | I) Syn     | taxin 3    | II) SN     | AP 23      | III) Cellubrevin |            |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|------------------|------------|
| Auswertung:     | Intensität | Anzahl/ BF | Intensität | Anzahl/ BF | Intensität       | Anzahl/ BF |
| Nr. 1           | +++        | 6          | ++         | 3          | +++              | 9          |
| Nr. 2           | +++        | 6          | +          | 2          | +                | 4          |
| Nr. 3           | +++        | 5          | +          | 3          | +                | 2          |
| Nr. 4           | +++        | 10         | ++         | 6          | ++               | 6          |
| Nr. 5           | +++        | 5          | +          | 4          | +++              | 7          |
| Nr. 6           | +++        | 7          | ++         | 7          | +++              | 12         |
| Mittlere Anzahl |            | 7          | 4          |            | 7                |            |

Tab. 22: SNARE-Proteinexpression in neuroendokrinen Zellen des Kolons.Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

Tab. 23: SNARE-Proteinexpression in neuroendokrinen Zellen des Rektums.Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

| Antigen:        | I) Syntaxin 3 |            | II) SN     | II) SNAP 23 |            | III) Cellubrevin |  |
|-----------------|---------------|------------|------------|-------------|------------|------------------|--|
| Auswertung:     | Intensität    | Anzahl/ BF | Intensität | Anzahl/ BF  | Intensität | Anzahl/ BF       |  |
| Nr. 1           | +++           | 18         | ++         | 6           | +++        | 20               |  |
| Nr. 2           | +++           | 20         | ++         | 7           | ++         | 11               |  |
| Nr. 3           | +++           | 24         | +++        | 19          | +++        | 22               |  |
| Nr. 4           | ++            | 7          | +          | 4           | ++         | 6                |  |
| Nr. 5           | +++           | 18         | +          | 6           | ++         | 6                |  |
| Mittlere Anzahl | 1             | 7          |            | 8           | 1          | 3                |  |

Quantitativ wies *SNAP 23* als Mittelwert 4 pos. Zellen/ BF im Kolon und 8 Zellen/ BF im Rektum auf, womit sich deren Anzahl zum Enddarm hin verdoppelte. Das SNARE *Cellubrevin* war im intestinalen Dickdarmepithel vorwiegend in mäßig bis stark positiver Intensität (++ - +++) vorhanden. Im Durchschnitt wurden 6 positive Zellen/ BF im Kolon und 13 Zellen/ BF im Rektum ermittelt, womit sich auch die Anzahl signalintenser Zellen für dieses Antigen zum Rektum hin verdoppelte.

Damit wiesen alle SNARE-Proteine gemeinsam eine vom Dünndarm zum Kolon hin abnehmende und vom Kolon zum Rektum hin wieder deutlich zunehmende Antigenpräsenz auf, wie es für neuroendokrine Zellen typisch ist (siehe Kap. 1.8.2).

Wie aus der Zusammenstellung Abb. 36 ersichtlich wird, weisen sie zudem gegenüber den vergleichend eingesetzten Antigenen Chromogranin und Synaptophysin, die Marker neuroendokriner Zellen darstellen, ein sehr ähnliches Expressionsmuster auf. Hierdurch wurde das Vorkommen der SNARE-Antigene in enteroendokrinen Zellen unterstrichen.



Zellen neuroendokriner Morphologie

Abb. 36:SNARE-Proteine an der Rektummukosa. APAAP-Methode.<br/>Die Zusammenstellung zeigt die Ähnlichkeit des Expressionsmusters der<br/>drei SNAREs mit dem der neuroendokrinen Marker Chromogranin A (Cg A)<br/>und Synaptophysin (Sy 38). Zudem wird die Negativkontrolle dargestellt.

In der graphischen Darstellung Abb. 37 ist die durchschnittliche Anzahl antigenpositiver Zellen pro Blickfeld in den jeweils untersuchten Mukosaabschnitten veranschaulicht. Die Quantität des Vorkommens der Antigene ließ sich untereinander nicht korrelieren. Dies bedeutet, daß beispielsweise in einem Gewebe mit hoher Häufigkeitsverteilung des Antigens *Syntaxin 3* oder *Cellubrevin* das Antigen *SNAP 23* nicht zwingend auch in hoher Häufigkeit angetroffen wurde. Wenn man die dargestellte Auswahl an Darmgeweben als annähernd repräsentativ betrachtet, war die Antigenpräsenz für *Syntaxin 3* am höchsten, nächstfolgend die des *Cellubrevins*, danach die des *SNAP 23*. Daraus könnte man schlussfolgern, daß Syntaxin 3 das Antigen mit der ausgeprägtesten neuroendokrinen Affinität im intestinalen Gewebe ist. Die zur Kolonmukosa hin abnehmende und zum Rektum wieder zunehmende Quantität antigenexprimierender Zellen entspricht der Häufigkeitsverteilung neuroendokriner Zellen - wie etwa die der EC-Zellen oder

der Somatostatin-produzierenden intestinalen D-Zellen - die typischerweise kraniokaudal vom Dünndarm zum Kolon hin abnimmt und zum Rektum hin wieder zunimmt.

Besonders hervorgehoben werden sollte die anhand dieser graphischen Darstellung offensichtliche Ähnlichkeit der Häufigkeitsverteilung SNARE-positiver Zellen mit der diverser neuroendokriner Zellen, wie sie in Abb. 7 dargestellt ist [Sjölund et al. (1983)].



Abb. 37: Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung SNARE-positiver Zellen (durchschnittliche Anzahl Zellen/ Blickfeld) in kraniokaudaler Abfolge der untersuchten Mukosaabschnitte. Vergleiche die Analogie zu der Häufigkeitsverteilung neuroendokriner Zellen in Abb. 7, Kap. 1.8.2.

# 3.7 Kolokalisation gastrointestinaler NEZ mit neuroendokrinen Markerproteinen

Aufgrund der typischen Histomorphologie und Lokalisation der SNARE-positiven Zellen in den basalen Drüsenabschnitten der gastrointestinalen Mukosa stellte sich - wie bereits in den vorausgehenden Kapiteln erörtert - die Frage, ob diese tatsächlich als neuroendokrine Zellen identifiziert werden konnten. Darüber hinaus galt es zu klären, ob *sämtliche NEZ* die untersuchten Antigene *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* enthielten oder ob es wesentliche Unterschiede bezüglich des Expressionsverhaltens dieser Vesikelfusionsproteine in endokrinen mukosalen Zellen gab. Methodisch wurde erneut die Kolokalisation in serieller Schnitttechnik angewandt. Die Doppellokalisation erfolgte mit den zwei in Kap. 1.11 vorgestellten neuroendokrinen Markerproteinen Chromogranin A (Cg A) [Moorghen & Carpenter (1991)] und Synaptophysin 38 (Sy 38) [Wiedenmann & Franke (1985)]. Für die immunhistologischen Untersuchungen wurde exemplarisch jeweils Paraffingewebe des Magenfundus, Duodenums und Kolons verwandt.

Wie Abb. 38, 39 und Tab. 24 veranschaulichen, konnte für Syntaxin 3 die Kolokalisation mit dem neuroendokrinen Markern Chromogranin A und Synaptophysin 38 sowohl in der gastroduodenalen Mukosa als auch in der Kolonschleimhaut bewiesen werden. Syntaxin 3 ist demnach in neuroendokrinen Zellen entlang des gesamten gastrointestinalen Epithels lokalisiert. Eine Kolokalisation für SNAP 23 konnte lediglich mit Cg A im Duodenum immunhistologisch dargestellt werden. Trotz wiederholter Versuchsdurchführung gelang der Nachweis einer Doppellokalisation mit Sy 38 im Duodenum sowie mit beiden neuroendokrinen Antigenen im Magen- und Kolonepithel nicht. Cellubrevin ließ sich im Magen mit Cg A und Sy 38 kolokalisieren, im Duodenum lediglich mit Chromogranin A. Trotz redundanter Experimente konnte für Cellubrevin im Kolon keine Doppellokalisation mit den ausgewählten neuroendokrinen Antigenen ausgemacht werden. Demnach lassen sich auch für SNAP 23 und Cellubrevin Belege für die Expression in enteroendokrinen Zellen finden. Deren endokrine Affinität scheint jedoch nicht so ausgeprägt zu sein, wie die des Antigens Syntaxin 3. Für Syntaxin 3 zeigten sich quantitativ häufiger Doppellokalisationen mit beiden endokrinen Antigenen. Erwähnenswert ist jedoch, daß die Kolokalisation auch mit methodischen Schwierigkeiten behaftet ist (inhomogene Zellanfärbung, Schnittdicke, etc.) und dementsprechend nur einen ungefähren Anhaltspunkt für die tatsächliche Kolokalisation im Gewebe bietet.

Weiterhin war bemerkenswert, daß es einerseits für jedes SNARE-Antigen markierte Zellen gab, die *nicht* mit Synaptophysin und Chromogranin doppellokalisierten und andererseits wiederum neuroendokrin-markierte Zellen zur Darstellung kamen, die nicht mit den SNAREs kolokalisierten. Folglich wies nur eine gewisse Schnittmenge neuroendokrin-differenzierter Zellen die untersuchten SNARE-Proteine auf. Darüber hinaus kommen diese ubiquitären SNARE-Membranproteine offenbar noch in einer Anzahl an Epithelzellen nicht-neuroendokriner Differenzierung vor.

|            |                  | Loka           | lisation des Cowa | has•  |
|------------|------------------|----------------|-------------------|-------|
| untersuc   | hte Antigene:    | Magenfundus    | Duodenum          | Kolon |
| 1. Antigen | 2. Antigen       | Kolokalisation |                   |       |
|            | Synaptophysin 38 | +              | +                 | +     |

+

Ø

Ø

+

+

+

Ø

+

Ø

+

+

Ø

Ø

Ø

Ø

Chromogranin A

Synaptophysin 38

Chromogranin A

Synaptophysin 38

Chromogranin A

I) Syntaxin 3

II) SNAP 23

**III)** Cellubrevin

Tab. 24: Kolokalisation der SNAREs mit neuroendokrinen Markern in Serienschnitttechnik.



- Abb. 38:Doppellokalisation von Chromogranin A und Syntaxin 3 am Duodenum.<br/>APAAP, Serienschnitttechnik. Die ausgefüllten Pfeile markieren kolokalisierende<br/>Zellen in den Krypten, die dünnen Pfeile deuten auf Cg A-positive Zellen hin,<br/>die mit Syntaxin 3 nicht doppellokalisieren. Der graue Pfeil deutet auf eine<br/>Syntaxin 3-haltige Zelle, die mit Cg A nicht kolokalisiert.
  - I) Synaptophysin 38

#### II) Syntaxin 3



Abb. 39:Kolokalisation (Pfeile) von Syntaxin 3 und Synaptophysin 38<br/>an der Kolonmukosa. APAAP-Methode, Serienschnitttechnik. Hier tritt<br/>zudem die apikale Lokalisation von Syntaxin 3 in Enterozyten hervor,<br/>die einer Assoziation mit dem sog. Schlussleistennetz entsprechen könnte.

#### 3.8 Doppellokalisation zur Charakterisierung mukosaassoziierter Zellen

Um die Spezifität der interglandulär in der Mukosa sowie der in der Submukosa gelegenen SNARE-positiven Zellen zu charakterisieren, wurden weitere Doppelfluoreszenzuntersuchungen an nativen Gefrierpräparaten aus Magen- und Dünndarmgeweben anhand diverser Antikörper zur Markierung immunologisch aktiver mukosaler Zellen (siehe Kap. 1.12) vorgenommen. Im Einzelnen handelte es sich um:

- 1. *Tryptase* und *Chymase* als Mastzellmarker
- 2. CD 45 als Panleukozytenmarker (alle kernhaltigen Zellen hämatologischen Ursprungs)
- 3. CD 3 als T-Lymphozytenmarker
- 4. CD 138 als Plasmazellmarker (differenzierte B-Zelle) und
- 5. CD 54 zur Kennzeichnung ICAM-1 aktivierter Leukozyten sowie
- 6. CD 68 als Makrophagenmarker, der auch bereits am Lebergewebe Verwendung fand.

Tab. 25: Kolokalisation von SNARE-Antigenen mit Mastzell-, Leukozyten-, Lymphozyten- und<br/>Makrophagenmarkern an der Magen- und Dünndarmmukosa. Doppelfluoreszenz.

|             | 2. Antigen/ Antigenspezifität |                       |                    |                   |                     |   |   |  |  |  |
|-------------|-------------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|---------------------|---|---|--|--|--|
| 1. Antigen  | Tryptase/<br>Mastzelle        | Chymase/<br>Mastzelle | CD 68/<br>Makroph. | CD 3/<br>T-Zellen | CD 138/<br>B-Zellen |   |   |  |  |  |
| Syntaxin 3  | +                             | +                     | +                  | Ø                 | Ø                   | Ø | Ø |  |  |  |
| SNAP 23     | Ø                             | Ø                     | +                  | +                 | +                   | Ø | Ø |  |  |  |
| Cellubrevin | Ø                             | Ø                     | +                  | Ø                 | Ø                   | Ø | + |  |  |  |

Wie Tab. 25 zusammenfassend darstellt, wurde eine spezifische Kolokalisation von Syntaxin 3 mit den Mastzellproteasen Tryptase und Chymase [Schwartz et al. (1987)] im Magenfundusgewebe erzielt (siehe Abb. 40, 41). Hierbei war zu beobachten, daß nahezu alle (80 - 90%) Tryptase-positiven Mastzellen mit Syntaxin 3 kolokalisierten, aber nur 30% der Chymase-markierten Zellen mit Syntaxin 3 doppelfluoreszierten. Es gab somit Syntaxin 3signalpositive interstitielle Zellen, die keine Doppellokalisation mit diesen Mastzellmarkern erbrachten. Hier war also anzunehmen, daß es sich um eine weitere Zellpopulation handelte. Für die **SNARE-Antigene** SNAP 23 und Cellubrevin konnte -trotz mehrfacher Versuchsdurchführung- in situ keine Doppellokalisation mit Tryptase oder mit Chymase beobachtet werden (siehe Abb. 42). Dies könnte allerdings auf die aus methodischen Gründen bedingten schwachen Fluoreszenzsignale der mukosaassoziierten interglandulär gelegenen Zellen zurückzuführen sein.

Über seine Präsenz in Mastzellen hinaus konnte Syntaxin 3 in CD 45-markierten Leukozyten in den untersuchten Präparaten der Dünndarmmukosa in situ kolokalisiert werden. Weder in T-Lymphozyten, noch in Plasmazellen oder Makrophagen wurde das SNARE-Antigen Syntaxin 3 immunologisch nachgewiesen. Für SNAP 23 konnte der Doppelfluoreszenznachweis mit dem CD 45 Antigen in Leukozyten geführt werden. Darüber hinaus wurde es ebenfalls in einigen CD 54-positiven Zellen, d.h. im Rahmen inflammatorischer Prozesse aktivierter, ICAM (human intercellular adhesion molecule-1)-positiver Leukozyten nachgewiesen (siehe Abb. 43), die z. B. durch die Stimulation mit IL-1, TNF oder IFN-y entstehen können. Schließlich war SNAP 23 in mukosalen und submukosalen CD 68-markierten Makrophagen anzutreffen, wodurch gewissermaßen die Vorbefunde seines Nachweises in Lebermakrophagen bekräftigt wurden (siehe Kap. 3.5). Darüber hinaus konnte weder in T- noch in B-Lymphozyten ein Hinweis auf sein Vorkommen immunhistologisch gesichert werden. Cellubrevin schließlich konnte lediglich mit dem Panleukozytenantigen CD 45 (siehe Abb. 44) und mit dem Plasmazellen spezifisch kennzeichnenden Oberflächenantigen CD 138 doppellokalisiert werden (siehe Abb. 45). Sein Nachweis in Makrophagen, B- oder T-Lymphozyten blieb im Darmgewebe aus. Durch die schwächere Antigendarstellung der SNAREs SNAP 23 und Cellubrevin war die Sensitivität der Untersuchungen teilweise beeinträchtigt.



Abb. 40:Kolokalisation von Syntaxin 3 mit dem Mastzellmarker Tryptase<br/>am Magenfundusgewebe in situ. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF).<br/>Syntaxin 3 kolokalisiert in 80 – 90 % der Zellen mit Tryptase.



Abb. 41:Kolokalisation von Syntaxin 3 mit dem Mastzellmarker Chymase<br/>am Magenfundusgewebe in situ. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF).<br/>Die chymasemarkierten Zellen kolokalisieren mit Syntaxin 3. Syntaxin 3 hingegen<br/>ist zudem in Zellen nachweisbar, die nicht Chymase-positiv sind.



Abb. 42:Kolokalisation von Cellubrevin mit dem Mastzellmarker Chymase am<br/>Magenfundusgewebe in situ. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF).<br/>Die chymasemarkierten Zellen (rot, Pfeil) kolokalisieren nicht mit<br/>Cellubrevin (grün).



Abb. 43:Kolokalisation von SNAP 23 mit dem Leukozytenmarker CD 54 an der<br/>Dünndarmmukosa. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF).<br/>SNAP 23-positiven Zellen kolokalisieren vereinzelt mit CD 54 (weiße Pfeile).



Abb. 44:Kolokalisation von Cellubrevin mit dem Leukozytenmarker CD 45 an der<br/>Dünndarmmukosa. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF).<br/>Einige Cellubrevin-positive Zellen kolokalisieren mit CD 45 (weiße Pfeile).



Abb. 45:Kolokalisation von Cellubrevin mit dem Plasmazellmarker CD 138 an der<br/>Dünndarmmukosa. Einzel- (EF) und Doppelfluoreszenztechnik (DF). Einige der<br/>Cellubrevin-haltigen Zellen kolokalisieren schwach mit CD 138 (weißer Pfeil).

# 3.9 Präsenz der SNAREs in neuroendokrinen Tumoren (NET)

Zur Klärung der Fragestellung, wie sich das Expressionsverhalten der SNARE-Vesikelproteine in neuroendokrin differenzierten Tumoren (NET) gestaltet, wurden neunzehn dieser Tumore immunhistochemisch untersucht. Im Einzelnen handelte es sich um acht NET des Pankreas, neun NET der Magen- und Darmmukosa sowie zwei Insulinome. Aufgrund der geringen Quantität der Tumore und der heterogenen histopathologischen Befunde wurde in dieser experimentellen Arbeit lediglich eine *Unterteilung nach der Primärlokalisation* des Ausgangsgewebes vorgenommen.

Da vorausgehende Daten existierten, in denen die Expression neuronal restringierter SNARE-Proteine wie Syntaxin 1, SNAP 25 und VAMP 2 in neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen wurden [Ahnert-Hilger et al. (1993), Höcker et al. (1999)], fokussierten wir in den vorliegenden Experimenten auf das Expressionsverhalten der *nonneuronalen* SNAREs *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin (VAMP 3)*, zu denen bislang keine Daten in dieser Tumorentität vorlagen.

In sämtlichen neunzehn anhand der APAAP-Methode untersuchten NET waren *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* nachweisbar. Um eine Korrelation mit den neuroendokrinen Eigenschaften der Tumore herzustellen, wurde zudem das Expressionsverhalten der neuroendokrinen Marker Neuronspezifische Enolase (NSE) [Shimizu et al. (1983)], des

granulaassoziierten Markers Chromogranin A (Cg A) [Moorghen & Carpenter (1991)] und des Vesikelproteins Synaptophysin 38 (Sy 38) [Wiedenmann & Franke (1985)] vergleichend hinzugezogen. Die Färbeintensitäten dieser Markerproteine sowie die der SNARE-Fusionsproteine wurden semiquantitativ bestimmt und die Ergebnisse in unten aufgeführter Tab. 26 festgehalten.

# Tab. 26:SNARE-Proteine in neuroendokrin differenzierten epithelialen Tumoren.<br/>Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

|                  |                        | Antigen: |          |            |            |           |               |                        |
|------------------|------------------------|----------|----------|------------|------------|-----------|---------------|------------------------|
| Nr.              | Tumor-<br>lokalisation | NSE      | Cg A     | Sy 38      | Syntaxin 3 | SNAP 23   | Cellubrevin   | SNAREs &<br>NE-Marker: |
| 1)<br>16067/93   | Pankreas               | pos.     | ++       | ++         | ++         | + • ++    | + - +++       | •                      |
| 2)<br>15594/95   | Pankreas               | pos.     | +++      | ++ - +++   | + - ++     | +         | +             | Ø                      |
| 3)<br>06713/96   | Pankreas               | pos.     | +++      | +++ - ++++ | +          | +         | + - ++        | Ø                      |
| 4)<br>02044/95   | Pankreas               | pos.     | +++      | ++         | +          | +         | +             | Ø                      |
| 5)<br>11691/94   | Pankreas               | pos.     | + - ++   | +          | +          | ++        | ++            | •                      |
| 6)<br>13360/96   | Pankreas               | pos.     | +++      | +++        | ++         | ++ • +++  | ++            | •                      |
| 7)<br>16098/94   | Pankreas               | pos.     | +++      | +++        | +++        | +++       | +++ •<br>++++ | •                      |
| 8)<br>2895/97    | Pankreas               | pos.     | ++ - +++ | + - +++    | + - ++++   | ++++      | + - +++       | •                      |
| 9)<br>19175/95   | Magen                  | pos.     | ++ • +++ | ++ - +++   | +++        | + - ++    | +++           | •                      |
| 10)<br>07567/94  | Magen                  | pos.     | +++      | +++ - ++++ | ++ - +++   | ++ - ++++ | +++ - ++++    | •                      |
| 11)<br>20898/96  | Magen                  | pos.     | +++      | ++         | ++         | +         | ++            | Ø                      |
| 12)<br>22823/ 96 | Duodenum               | pos.     | +++      | ++         | +++        | +++       | ++            | •                      |
| 13)<br>07572/95  | Jejunum                | pos.     | +++      | +++ • ++++ | +++ - ++++ | +++       | ++++          | •                      |
| 14)<br>16026/94  | Ileum                  | pos.     | +++      | +++        | +++ • ++++ | +++       | +++ • ++++    | •                      |
| 15)<br>05879/94  | Ileum                  | pos.     | +++      | +++ • ++++ | +++        | +++       | +++ • ++++    | •                      |
| 16)<br>UKBF      | Ileum                  | pos.     | +        | +          | +          | + - ++    | +++           | Ø                      |
| 17)<br>02125/96  | Kolon                  | pos.     | +        | +          | +          | +         | +             | •                      |
| 18)<br>16719/96  | Pankreas,<br>Insulinom | pos.     | +++      | ++ - +++   | +          | +         | +             | Ø                      |
| 19)<br>21147/96  | Pankreas,<br>Insulinom | pos.     | ++       | ++         | ++         | ++        | ++            | •                      |

 $\emptyset = un$ -/ gleiche Färbeintensität zwischen Cg A, Sy 38 und SNAREs.

Die Färbeintensität für NSE wurde nicht differenziert, da es sich um keinen Marker mit ausschließlich neuroendokriner Spezifität handelte. Die Expression der verwendeten SNARE- Antigene zeigte in den Tumorgeweben von Magen, Dünndarm und Kolon in 7 von 10 Geweben eine weitgehende Übereinstimmung mit den auch klinisch-diagnostisch eingesetzten neuroendokrinen Proteinen Sy 38 und Cg A (siehe Kap. 1.10 und 1.11), so wie es in Abb. 46 beispielsweise ersichtlich wird. In neuroendokrinen Pankreaskarzinomen korrelierte die SNARE-Expression nur in 4 von 7 Präparaten mit der der endokrinen Marker. Analog zur subzellulären Verteilung in neuroendokrinen Zellen wiesen die SNAREs in NET ebenfalls ein durchgehend intrazelluläres, perinukleär und nahe der Plasmamembran betontes Expressionsmuster auf. Auffällig erschien die starke bis übermäßig starke Antigenexpression (++++) in NET Nr. 13 – 15

des Dünndarms und des Magenpräparats Nr. 10, wie Tab. 25 zu entnehmen ist und durch Abb. 46 veranschaulicht wird. Bei näherer Betrachtung ging überraschenderweise aus der pathologischen Begutachtung genau dieser vier Tumore übereinstimmend ein positives Expressionsverhalten für das biogene Amin *Serotonin* hervor, welches in sekretorischen Vesikeln enteroendokrinen EC-Zellen und Karzinoidtumoren vorgefunden wird.





*Abb. 46:* Neuroendokriner, serotoninpositiver Tumor des Ileums (Nr. 14), APAAP-Methode. Die Kolokalisation per Serienschnitttechnik macht den Vergleich des überaus starken Expressionsnivaus der SNAREs mit dem der neuroendokrinen Marker NSE, Cg A und Sy 38 möglich.

#### 3.10 Immunfluoreszenz an Zelllinien

Die Definition der subzellulären Lokalisation der SNARE-Proteine ist essenziell, um deren physiologische Funktion bei der Exozytose und Sekretion zu ergründen. In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Verteilung der Membranfusionsproteine *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* exemplarisch anhand der neuroendokrinen Zelllinie BON [Evers et al. (1991)] und der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 [Fogh et al. (1977)] untersucht. Die Pankreaszelllinie BON weist zellbiologisch funktionelle neuroendokrine Eigenschaften auf und enthält die charakteristischen Granula (LDCV) und Analoga der neuronalen SSV (SLMV) (siehe Kap. 1.8.1). Methodisch wurde zunächst die subzelluläre Proteinexpression mittels der Immunfluoreszenztechnik in BON und HT-29 Zellen visualisiert. Durch anschließende Kolokalisation mit den bekannten neuroendokrinen Markern Synaptophysin 38 und Chromogranin A konnte anhand der Doppelfluoreszenztechnik die Assoziation mit sekretorischen Vesikeln (SLMV) und Granula (LDCV) näher ergründet werden.

# 3.10.1 Einzelfluoreszenz an BON- und HT-29 Zellen

In der Einzelfluoreszenz (EF) wurde in BON Zellen ein stark positives Fluoreszenzmuster für *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* beobachtet, wohingegen sie in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine deutlich schwächere Signalintensität aufwiesen (siehe Tab. 27).

Die subzelluläre Lokalisation (SZL) war in BON-Zellen für *Syntaxin 3* und *SNAP 23* intrazellulär und plasmamembranär gelegen. Hingegen war sie für *Cellubrevin* vordergründig intrazellulär nachzuweisen, lediglich ein geringer Anteil erschien plasamembranär. In HT-29 Zellen zeigte sich die SZL für *Syntaxin 3* und *Cellubrevin* intrazellulär und für *SNAP 23* plasmamembranär sowie von deutlich geringerer Intensität als in BON-Zellen.

# Tab. 27:Einzelfluoreszenz der SNARE-Antigene an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29<br/>und der neuroendokrinen Zelllinie BON.<br/>Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

|                           | Zelllinie      |          |            |                 |  |  |  |
|---------------------------|----------------|----------|------------|-----------------|--|--|--|
|                           | ВС             | ON       | НТ-29      |                 |  |  |  |
| Auswertung:<br>Antigen:   | Intensität SZL |          | Intensität | SZL             |  |  |  |
| I) Syntaxin 3             | +++            | IZ = PM  | +          | IZ, granulär    |  |  |  |
| II) SNAP 23               | +++            | PM > IZ  | +          | PM              |  |  |  |
| III) Cellubrevin (VAMP 3) | +++            | IZ >> PM | +          | IZ, perinukleär |  |  |  |



*Abb.* 47: Subzelluläre Verteilung von Syntaxin 3, SNAP 23 und Cellubrevin in BON-Zellen. Einzelfluoreszenzmethode.

# 3.10.2 Doppelfluoreszenz an BON-Zellen

Aus der angeführten Übersicht in Tab. 28 und den fotografischen Abbildungen 48 - 53 der Doppelfluoreszenz (DF) an BON-Zellen geht hervor, daß *Syntaxin 3* sowie auch *Cellubrevin* intrazellulär sowohl mit dem LDCV-Marker Chromogranin A als auch mit dem perinukleär lokalisierten SLMV-Marker Synaptophysin 38 kolokalisierten. Der intrazelluläre Anteil von *SNAP 23* wies mit dem Vesikel-assoziierten Synaptophysin (SLMV) eine Doppelfluoreszenz auf, nicht jedoch mit dem granulär lokalisierten Chromogranin A (LDCV).



Abb. 48:Einzelfluoreszenz (EF) von Syntaxin 3 (grün) und Chromogranin A (rot) in<br/>BON-Zellen. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Bereiche in<br/>der Doppelfluoreszenz (DF, gelb) an.



Abb. 49:Einzelfluoreszenz (EF) von Syntaxin 3 (grün) und Synaptophysin 38 (rot) in<br/>BON-Zellen. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Bereiche in dem für<br/>SLMV typischen perinukleären Fluoreszenzmuster in der<br/>Doppelfluoreszenz (DF, gelb) an.







Abb. 51:Einzelfluoreszenz (EF) von SNAP 23 (grün) und Synaptophysin 38 (rot) in<br/>BON-Zellen. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Bereiche<br/>in der Doppelfluoreszenz (DF, gelb) an.



Abb. 52: Einzelfluoreszenz (EF) von Cellubrevin (grün) und Chromogranin A (rot) in BON-Zellen. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Bereiche in der Doppelfluoreszenz (DF, gelb) an.



Abb. 53: Einzelfluoreszenz (EF) von Cellubrevin (grün) und Synaptophysin 38 (rot) in BON-Zellen. Die weißen Pfeile zeigen kolokalisierende Bereiche in der Doppelfluoreszenz (DF, gelb) an.

Tab. 28:Doppelfluoreszenz (DF) der SNARE-Antigene mit den neuroendokrinen Markern<br/>an der enteroendokrinen Pankreaszellinie BON.<br/>Zur Auswertung siehe auch Legende Kap. 2.2.6.

|                         | Zelllinie: BON |          |             |              |  |  |  |
|-------------------------|----------------|----------|-------------|--------------|--|--|--|
| Auswertung:<br>Antigen: | Intensität     | SZL      | DF mit Cg A | DF mit Sy 38 |  |  |  |
| I) Syntaxin 3           | +++            | IZ >PM   | +           | +            |  |  |  |
| II) SNAP 23             | +++            | PM > IZ  | Ø           | +            |  |  |  |
| III) Cellubrevin        | +++            | IZ >> PM | +           | +            |  |  |  |

# 3.11 SNARE-Proteinnachweis an Zelllinien im Western Blot

SNARE-Proteine bilden in zahlreichen gastrointestinalen Epithelzellen und in vielen assoziierten Zelltypen wie z. B. Fibroblasten und Mastzellen die Grundlage mukosaler Membranfusions- und Transportvorgänge (siehe Referenzen Tab. 2). Ein weiterer Aspekt unserer experimentellen Betrachtungen war deshalb die quantitative Proteinexpression von *Syntaxin 3, SNAP 23* und *Cellubrevin* in diversen gastrointestinalen und hepatopankreatischen Zellen überwiegend humanen Ursprungs vergleichend zu eruieren. Hierfür wurden insgesamt sechzehn permanente Zelllinien kultiviert (siehe Tab. 11) und im Western Blot Verfahren untersucht, darunter dreizehn transformierte Zelllinien *humanen* Ursprungs.

Im Detail handelte es sich um drei Zelllinien des Pankreas (*Panc, Capan*) und der Leber (*PLC*), vier Adenokarzinomzelllinien des Magens (*MKN-28, -45, AGS, KATO-3*) und zwei des Kolons (*CaCo-2, HT-29*). Darüber hinaus wurden zwei Mastzelläquivalente (*RBL-2H3, KU-812*), drei neuroendokrine Zelllinien (*BON, QGP-1, PC-12*), kultivierte Fibroblasten (*HeLa*) und schließlich die *nicht-transformierte* Dünndarmzelllinie (*IEC-6*) zur Untersuchung herangezogen. Die Ergebnisse des Western Blots fasst unten stehende Tab. 29 qualitativ zusammen. *Cellubrevin* konnte lediglich in den *humanen* Zelllinien detektiert werden. In den Zelllinien der Spezies Ratte (IEC-6, PC-12, RBL2-H3) konnte aufgrund der Spezifität des *Cellubrevin*-Antikörpers für die humane Peptidsequenz kein Signal erzielt werden [siehe Markierung: #].

Die Blotanalyse für *Cellubrevin* erbrachte - bis auf die Proteinbande von KU-812 - eine Doppelbandenstruktur.

Der  $\beta$ -Aktinnachweis galt als Referenz der im elektrophoretischen Proteintransfer geblotteten, tatsächlich vorhandenen Proteinmenge (siehe Kap. 2.2.12., 2.2.14).

| N            | Dagaiahaana | Sportion | Vuuna Chanalitaniaiamuu a                                   | Antigen    |         |             |  |
|--------------|-------------|----------|---|------------|---------|-------------|--|
| IN <b>F.</b> | Bezeichnung | Spezies  | Kurze Charakterisierung                                     | Syntaxin 3 | SNAP 23 | Cellubrevin |  |
| 1.           | RBL-2H3     | Ratte    | Basophile Leukämiezelllinie                                 | +          | +       | #           |  |
| 2.           | KU-812      | Human    | Basophile Leukämiezelllinie                                 | +          | +       | +           |  |
| 3.           | BON         | Human    | Neuroendokrines<br>Pankreaskarzinom                         | +          | +       | +           |  |
| 4.           | QGP-1       | Human    | Pankreas, Inselzelltumor                                    | +          | +       | +           |  |
| 5.           | PC-12       | Ratte    | Phäochromozytom   | +          | +       | #           |  |
| 6.           | Panc-1      | Human    | Adenokarzinom des Pankreas                                  | +          | +       | +           |  |
| 7.           | Capan-1     | Human    | Adenokarzinom des Pankreas                                  | +          | +       | +           |  |
| 8.           | PLC         | Human    | Hepatom   | +          | +       | +           |  |
| 9.           | CaCo-2      | Human    | Adenokarzinom des Kolons                                    | +          | +       | +           |  |
| 10.          | НТ-29       | Human    | Adenokarzinom des Kolons                                    | +          | +       | +           |  |
| 11.          | IEC-6       | Ratte    | nicht transformiertes<br>Dünndarmepithel                    | +          | +       | #           |  |
| 12.          | MKN-28      | Human    | gut differenziertes tubuläres<br>Adenokarzinom des Magens   | +          | +       | +           |  |
| 13.          | MKN-45      | Human    | wenig differenziertes tubuläres<br>Adenokarzinom des Magens | +          | +       | +           |  |
| 14.          | AGS         | Human    | Adenokarzinom des Magens                                    | +          | +       | +           |  |
| 15.          | КАТО-З      | Human    | Adenokarzinom des Magens<br>vom Siegelringzelltyp           | +          | +       | +           |  |
| 16.          | HeLa        | Human    | Zervixepithelkarzinom                                       | +          | +       | +           |  |

Tab. 29: Tabellarische Übersichtsauswertung der Ergebnisse des Western Blots an Zelllinien.

Aus den in Abb. 54 - 56 dargestellten Western Blots ist ersichtlich, daß die drei SNARE-Antigene in allen untersuchten gastrointestinalen Adenokarzinomzelllinien *humaner und nichthumaner* Herkunft aus Magen, Kolon, Pankreas und Leber mit unterschiedlichem Antigengehalt exprimiert wurden. Darüber hinaus konnten *Syntaxin 3* und *SNAP 23* in der *nichttransformierten* Dünndarmzelllinie IEC-6 ebenfalls vorgefunden werden, nicht aber das humanspezifische SNARE *Cellubrevin*. Des Weiteren zeigten die neuroendokrinen Zellen BONund QGP-1 eine Expression der drei SNAREs. In den transformierten Phäochromozytomzellen PC-12 der Ratte waren aufgrund der humanen Antikörperspezifität des *Cellubrevins* lediglich *Syntaxin 3* und *SNAP 23* proteinbiochemisch nachweisbar.



# I) Proteinexpression von Syntaxin 3 im Western Blot

Abb. 54:a) Western Blot Analyse für das Antigen Syntaxin 3.

# **b**) Gleicher Western Blot wie in Abb. 54 a), Entwicklung mit $\beta$ -Aktin-Antikörper.



#### II) Proteinexpression von SNAP 23 im Western Blot

*Abb. 55:* a) Western Blot Analyse für das Antigen SNAP 23.
b) Gleicher Western Blot wie in Abb. 55 a), Entwicklung mit β-Aktin-Antikörper.



III) Proteinexpression von Cellubrevin (VAMP 3) im Western Blot

*Abb. 56:* a) Western Blot Analyse für das Antigen Cellubrevin. # = Zelllinie der Ratte.
b) Gleicher Western Blot wie in Abb. 56 a), Entwicklung mit β-Aktin-Antikörper.

In den Mastzelläquivalenten RBL-2H3 und KU-812 wurden *Syntaxin 3* und *SNAP 23* mit geringer Signalintensität detektiert, *Cellubrevin* dagegen lediglich in *humanen* KU-812. In den darüber hinaus untersuchten HeLa Zellen, welche fibroblastenähnliche Charakteristika in der Zellkultur ausbilden, war für *SNAP 23* sowie *Cellubrevin* eine deutliche Proteinexpression sichtbar, wogegen ein kaum detektierbares Signal für *Syntaxin 3* erzielt wurde.

Als Positivkontrolle wurde das Antigen Synaptophysin eingesetzt, welches selektiv in vesikelreichen, neuroendokrinen PC-12 Zellen vorgefunden wurde und somit die methodische Genauigkeit des Western Blot Verfahrens belegte (siehe Abb. 57).



Abb. 57:Western Blot Analyse für das Antigen Synaptophysin.Diese diente als interne Positivkontrolle.

#### 3.11 Bestimmung der Nettointensität und β-Aktin Ratio

Die densitometrische Bestimmung der *mittleren Nettointensitäten* der SNARE-Proteinbanden sowie der korrelierenden Bande des  $\beta$ -Aktins als sog. *housekeeping gene* [Yamada et al. (1997)] führte zur Bestimmung der sog. *relativen Proteinexpression* der einzelnen SNAREs. Wie bereits in Kap. 2.2.12 und 2.2.14 beschrieben, wurde durch die einhergehende Bestimmung des entsprechenden  $\beta$ -Aktingehalts die Genauigkeit der Interpretation des endgültigen SNARE-Proteingehalts der einzelnen Zelllinien erhöht. In der aufgeführten Tab. 30 finden sich die anhand der Densitometrie erfassten mittleren Nettointensitäten und die daraus rechnerisch ermittelte relative Proteinexpression der ausgewählten Zelllinien in *willkürlichen Einheiten*.

**Tab. 30:** Zusammenstellung der mittleren Nettointensitäten und β-Aktin-Ratio des Western Blots in willkürlichen Einheiten.

| Nr.   | 1.      | 2.     | 3.            | 4.            | 5.           | 6.      | 7.   | 8.     |  |  |
|---|---------|--------|---------------|---------------|--------------|---------|------|--------|--|--|
| Zelllinie                                     | RBL-2H3 | KU-815 | BON           | QGP-1         | PANC-1       | Capan-1 | PLC  | CaCo-2 |  |  |
| A) mittlere Nettointensität der Zelllinie     |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 248     | 127    | 1710          | 259           | 79,9         | 175     | 240  | 387    |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 126     | 103    | 87,5          | 536           | 45,2         | 336     | 320  | 197    |  |  |
| III) Cellubrevin                              | #       | 23,7   | 403           | 449           | 155          | 339     | 401  | 223    |  |  |
| B) mittlere Nettointensität der β-Aktinbande  |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 316     | 197    | 155           | 272           | 131          | 169     | 199  | 187    |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 363     | 304    | 258           | 281           | 258          | 239     | 224  | 277    |  |  |
| III) Cellubrevin                              | 711     | 463    | 341           | 581           | 376          | 585     | 515  | 593    |  |  |
| C) relative Proteinexpression (β-Aktin-Ratio) |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 0,78    | 0,64   | 11,0          | 0,95          | 0,60         | 1,04    | 1,20 | 2,01   |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 0,35    | 0,34   | 0,34          | 1,91          | 0,18         | 1,40    | 1,42 | 0,71   |  |  |
| III) Cellubrevin                              | #       | 0,05   | 1,18          | 0,77          | 0,41         | 0,58    | 0,78 | 0,38   |  |  |
|   |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| Nr.:  | 9.      | 10.    | 11.           | 12.           | 13.          | 14.     | 15.  | 16.    |  |  |
| Zelllinie:                                    | HT-29   | IEC-6  | <b>MKN-28</b> | MKN-45        | AGS          | КАТО-З  | HeLa | PC-12  |  |  |
|   | -       | A) mi  | ttlere Netto  | ointensität o | ler Zelllini | e       |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 248     | 159    | 137           | 37,0          | 329          | 271     | 33,5 | 739    |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 199     | 28,3   | 8,16          | 4,42          | 361          | 136     | 64,2 | 31,2   |  |  |
| III) Cellubrevin                              | 138     | #      | 45,0          | 76,1          | 69,4         | 94,0    | 497  | #      |  |  |
| B) mittlere Nettointensität der β-Aktinbande  |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 90,9    | 160    | 108           | 20,0          | 229          | 212     | 118  | 11,4   |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 286     | 277    | 243           | 221           | 268          | 345     | 311  | 249    |  |  |
| III) Cellubrevin                              | 473     | 594    | 459           | 439           | 451          | 540     | 492  | 171    |  |  |
| C) relative Proteinexpression (β-Aktin-Ratio) |         |        |               |               |              |         |      |        |  |  |
| I) Syntaxin 3                                 | 1,06    | 0,25   | 0,36          | 0,23          | 0,45         | 0,44    | 0,28 | 64,7   |  |  |
| II) SNAP 23                                   | 0,70    | 0,10   | 0,03          | 0,02          | 1,35         | 0,39    | 0,21 | 0,13   |  |  |
| III) Cellubrevin                              | 0,29    | #      | 0,10          | 0,17          | 0,15         | 0,17    | 1,01 | #      |  |  |

# 3.12 Graphische Darstellung der relativen Proteinexpression

Um die SNARE-Proteinverteilung übersichtlich aufzuführen und zu interpretieren, wurde die jeweils ermittelte relative Proteinexpression mit Hilfe des Softwareprogramms *Powerpoint* der Fa. Microsoft in Balkendiagrammen (siehe Abb. 58 - 60) dargestellt. In jeder der dreizehn untersuchten Zelllinien gastrointestinaler und neuroendokriner Abstammung sowie der Fibroblastenzelllinie HeLa und der Mastzelllinien RBL-2H3 und KU-812 fand sich nachweislich *Syntaxin 3* und *SNAP 23*. Der Proteinnachweis für *Cellubrevin* gelang nur in den humanen Zelllinien.



*Abb.* 58: Graphische Darstellung der relativen Expression des Antigens Syntaxin 3.

Für *Syntaxin 3* lag eine überaus deutliche Prävalenz in den SLMV-haltigen neuroendokrinen Zelllinien BON und PC-12 vor (β-Aktinratio: 11 bzw. 64). Darüber hinaus war *Syntaxin 3* - bei der gewählten Skalierung - ubiquitär sowohl in den untersuchten transformierten Zelllinien als auch in der nicht-transformierten Dünndarmzelllinie IEC-6 und den Mastzelllinien RBL2-H3 und KU-812 vorhanden. Innerhalb der gastrointestinalen Zellen wiesen die Kolonkarzinomzellen HT-29 und CaCo-2 die höchste Expression dieses Antigens auf. In HeLa-Zellen, MKN-45 und IEC-6 zeigte sich hingegen der quantitativ geringste Proteinnachweis.



Abb. 59: Graphische Darstellung der relativen Expression des Antigens SNAP 23.

Das Antigen SNAP 23 wurde in allen transformierten Zelllinien inklusive der basophilen Leukämiezellen RBL-2H3 und KU-812 sowie der nicht-transformierten IEC-6 Dünndarmepithelzelllinie proteinbiochemisch nachgewiesen. Sein höchstes Expressionsniveau lag in der endokrinen Inselzelllinie QGP-1 vor (β-Aktinratio 1,91), wogegen in den neuroendokrinen Zellen BON und PC-12 ein vergleichsweise niedriger Gehalt dieses Antigens detektiert wurde ( $\beta$ -Aktinratio < 1). Das geringste relative *SNAP 23*-Expressionsniveau lag in den Magenkarzinomzellen MKN-28 und MKN-45 sowie den nicht-transformierten Enterozyten des Dünndarms IEC-6 ( $\beta$ -Aktinratio < 0,3) vor.



Abb. 60: Graphische Darstellung der relativen Expression des Antigens Cellubrevin.

Wie aus Abb. 60 anschaulich hervorgeht, wiesen alle humanen transformierten Zelllinien das Vesikelprotein *Cellubrevin* auf. Aufgrund der zuvor beschriebenen Antikörperspezifität fand sich in den drei Rattenzelllinien RBL2-H3, IEC-6 und PC-12 (Markierung: #) keine *Cellubrevin*expression. Die relative Expression des Antigens *Cellubrevin* war - im Vergleich aller eingesetzten Zelllinien - in den beiden neuroendokrinen Zelllinien BON und QGP-1 auf hohem Niveau ( $\beta$ -Aktinratio 1,18 bzw. 0,77). Darüber hinaus wurde sowohl für die Fibroblastenzelllinie HeLa als auch für die Hepatomzelllinie PLC ein hohes Maß an relativer Proteinexpression dieses SNARE-Antigens ( $\beta$ -Aktinratio 1,01 bzw. 0,78) verzeichnet. Demgegenüber konnte in dem Mastzelläquivalent KU-812 und den gesamten maligne-transformierten Magenepithelzellen (MKN-28, MKN-45, AGS und KATO-3) lediglich ein geringer Gehalt an *Cellubrevin* detektiert werden ( $\beta$ -Aktinratio < 0,2).