

Javiera Billian
Dr. med.

Untersuchung einer möglichen Internalisierung von Membranproteinen in Alveolarepithelzellen Typ II

Geboren am 17.12.1974 in Santiago de Chile
Reifeprüfung am 23.6.1994 in Reutlingen
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis SS 2002
Physikum am 4.4. 1997 an der Universität Leipzig
Klinisches Studium in der Universität Heidelberg, Klinikum Heidelberg
Praktisches Jahr in St. Josef's Krankenhaus, Heidelberg und Kantonspital Luzern, Schweiz
Staatsexamen am 7.11. 2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Sport- und Leistungsmedizin
Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. phil. Heimo Mairbäurl

Hypoxie kann zu alveolären Ödemen führen. Mögliche Ursachen sind hypoxiebedingte Vasokonstriktion, erhöhte Gefäßpermeabilität, sowie Hemmung der Flüssigkeitsresorption aus dem Alveolarraum. Die Flüssigkeitsresorption wird vom transalveolären Na^+ -Transport getrieben. In vitro Untersuchungen an kultivierten Alveolarepithelzellen zeigten, dass in Hypoxie die Aktivität des Ionentransportes gehemmt wird. Die Transporthemmung geht mit einer Abnahme der Menge membranständiger Ionenporter einher.

Ziel dieser Studie war es nachzuweisen, ob Hypoxie eine Internalisierung membranständiger Ionenportproteine verursacht und ob etwaige Veränderungen mit Änderungen im Cytoskelett zusammen hängen.

Es wurden humane A549-Zellen (Lungencarcinomzellen, die größtenteils die selben Eigenschaften wie Alveolar Typ II Zellen aufweisen) und primäre ATII-Zellen der Ratte für die Zellkulturen verwendet. Die Na/K-ATPase (α_1 - und β_1 -Untereinheit) und der Na/K/Cl-Cotransporter wurden untersucht. Zur Bestimmung der Dichte an Transportproteinen in der Plasmamembran wurden Westernblots durchgeführt. Zum Nachweis möglicher Internalisierung von Transportproteinen wurden die A549-Zellen und ATII-Zellen fixiert und mit Antikörpern markiert. Nach Anfärben dieser mit fluoreszierenden, sekundären Antikörpern wurden die Transportproteine und Aktin als Marker des Cytoskeletts im konfokalen Mikroskop dargestellt.

Die Westernblots zeigen eine deutliche Reduktion der α_1 -Na/K-ATPase und der β_1 -Na/K-ATPase um 36% bzw. 15%. Die Bandendichte des NKCC nahm nach kurzzeitiger Hypoxieexposition leicht zu und fiel um etwa 30% nach 24h Hypoxie. Dichtemessungen an

gefärbten Transportproteinen im konfokalen Mikroskop zeigen für die α_1 -Na/K-ATPase und den Na/K/Cl-Cotransporter ein den Westernblots entsprechendes Ergebnis.

Da die Westernblots an Proteinen der Plasmamembran (isoliert durch differentielle Zentrifugation) durchgeführt wurden, könnte die Abnahme der Proteindichte durch verminderte Synthese, oder aber durch Internalisierung verursacht worden sein. Internalisierung von membranständigen Ionttransportern sollte durch ein vermehrtes Auftreten markierter Transporter im Zellinneren erkannt werden. In dieser Studie konnten wir keine Umverteilung von Transportproteinen aus der Plasmamembran in das Zellinnere nachweisen.

Die immunhistochemische Darstellung des Aktins zeigt keinerlei Änderung im Sinne von Retraktion, Depolymerisation oder einer andersartigen Umstrukturierung des Cytoskeletts. Diese wäre zu erwarten gewesen, falls die Internalisierung mit einer Umverteilung des Aktin-Cytoskeletts einhergegangen wäre. Insgesamt sprechen diese Befunde also gegen eine Internalisierung.

Da eine Internalisierung aber auch auf einen submembranösen Bereich beschränkt sein könnte, der mit dem Lichtmikroskop nicht aufgelöst werden kann, müssen zum endgültigen Nachweis oder Ausschluss elektronenmikroskopische oder biochemische Nachweismethoden angewandt werden.