

Kristin Heerlein

Dr. med.

## **Spirometrie einzelner Zellen: Anpassung von Alveolarepithelzellen an Hypoxie**

Geboren am 02.04.1981 in Suhl

Staatsexamen am 27.04.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Sport- und Leistungsmedizin

Doktorvater: Prof . Dr. phil. Heimo Mairbäurl

Hypoxie kann infolge von Ventilationseinschränkungen, einer Reduktion des funktionellen Hämoglobins, einer Insuffizienz des Herz-Kreislaufsystems sowie durch einen erniedrigten inspiratorischen O<sub>2</sub>-Partialdruck entstehen. Die Lunge ist dabei das zentrale Organ mit der höchsten O<sub>2</sub>-Konzentration, weshalb die Zellen des Alveolarepithels möglicherweise am schlechtesten an hypoxische Bedingungen angepasst sind. Darum ist es sehr interessant, die Alveolarepithelzellen in Hypoxie zu untersuchen. Bisher ist bekannt, dass Hypoxie durch eine Abnahme von Aktivität und Expression der Transportproteine die Na-Resorption am Alveolarepithel hemmt. In dieser Arbeit sollte die Anpassung des Zellstoffwechsels von Alveolarepithelzellen bzw. die Hemmung der Proteinexpression für den Energiehaushalt der Zelle in Hypoxie untersucht werden. Da verschiedene Studien darauf hinweisen, dass Hypoxie auch die mitochondriale Funktion beeinflusst, wurde der Sauerstoffverbrauch ( $JO_2$  [pmol\*s<sup>-1</sup>\*mg Protein<sup>-1</sup>]) auch an Digitonin-permeabilisierten Zellen mittels Substraten und Hemmstoffen der einzelnen Multienzymkomplexe gemessen. In akuter (5 min; 2 % O<sub>2</sub>) und chronischer Hypoxie (24 h; 1,5 % O<sub>2</sub>) wurde mittels hochauflösender Respirometrie der Zell- und Mitochondrienstoffwechsel untersucht. Die akute Hypoxie wurde im Messsystem durch Äquilibrierung erzeugt, während die chronische Hypoxie durch Zellkultivierung unter Sauerstoffmangelbedingungen realisiert wurde. An intakten Zellen wurden die Einflüsse von Hemmstoffen der Na/K-ATPase (Ouabain) und der Proteinsynthese (Cycloheximid) auf den  $JO_2$  untersucht.

Die Ergebnisse an intakten Zellen zeigen, dass der  $JO_2$  <sub>Gesamt</sub> intakter Zellen bereits nach akuter Hypoxie um ca. 30 % und nach 24-stündiger Hypoxie um ca. 50 % abnahm. In der Reoxygenierung wurden normoxische Ausgangswerte nur nach akuter Hypoxie wieder erreicht, nach 24-stündiger Hypoxie erfolgte im Gegensatz dazu nur eine sehr geringe Erholung.

Der  $\text{JO}_2_{\text{Na/K-ATPase}}$  betrug in Normoxie 11 % des  $\text{JO}_2_{\text{Gesamt}}$ . Dieser Anteil veränderte sich in Hypoxie nicht signifikant. Der partielle  $\text{JO}_2_{\text{Proteinsynthese}}$  betrug unter normoxischen Bedingungen 23 % des Gesamtverbrauches. Dabei kam es nach akuter Hypoxie zu keiner signifikanten Reduktion der Proteinsynthese. Nach 24 Stunden Hypoxie war der  $\text{JO}_2_{\text{Proteinsynthese}}$  signifikant um 39 % reduziert.

Die Messungen des mitochondrialen  $\text{JO}_2$  an permeabilisierten Zellen zeigten, dass akute und chronische Hypoxie die Aktivität der Enzymkomplexe 1, 2 und 3 der Atmungskette vermindern. Nach akuter Hypoxie führte Reoxygenierung zu einer partiellen Erholung der Aktivität von Komplex 1, nicht jedoch der Komplexe 2 und 3. Nach 24-stündiger Hypoxieexposition war die Kapazität aller drei Enzymsysteme erniedrigt, Reoxygenierung konnte die hypoxische Hemmung nicht aufheben. Eine mittels Zitratsynthaseaktivität bestimmte Abnahme der Anzahl intakter Mitochondrien trägt zum Teil zu dieser Hemmung bei.

Die Ergebnisse zeigen, dass der zelluläre und mitochondriale  $\text{JO}_2$  in Hypoxie eingeschränkt ist. Dabei nimmt, als Sparmaßnahme, auch der zelluläre ATP-Verbrauch ab, indem zelluläre Verbraucher gehemmt werden. Die signifikante Abnahme des  $\text{JO}_2$  nach Inhibitorenzugabe zeigt die direkte Koppelung zwischen ATP-Nachfrage und  $\text{JO}_2$  an. Den mitochondrialen Messungen zufolge sinkt in Hypoxie auch die Kapazität der Mitochondrien, ATP herzustellen. Die Tatsache, dass nach Reoxygenierung die normoxischen Ausgangswerte nicht wieder erreicht werden, kann auf Anpassungsmechanismen der Genexpression bzw. auf Schädigungen zellulärer Strukturen hinweisen.