

Inga Buchholz
Dr. med.

Expression und Lokalisation von Flotillin-2 in *vitro* und in *vivo* bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr.med. R. Ehehalt

Es gibt zwei chronisch entzündliche Darmerkrankungen die klinisch, endoskopisch und histologisch unterschieden werden: Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Bei der Ätiopathogenese geht man heutzutage von einer überschießenden Immunreaktion aus, die bei prädispositionierten Personen bei möglicherweise vorhandenem Barrieredefekt der Mukosa durch luminale Antigene getriggert wird. Es wird angenommen, dass Lipid rafts bei Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle spielen könnten. Lipid rafts sind cholesterin- und spingolipidreiche Mikrodomänen innerhalb von zellulären Membranen, die in verschiedene zelluläre Prozesse involviert sind. Drei dieser Funktionen, die bei entzündlichen Prozessen von Bedeutung sein können sind: Membrantransport, Organisation des Zytoskeletts und Signaltransduktion. Rafts spielen nachweislich eine Rolle bei Pathogeninvasion und bei Migrationsregulation mit dem Ziel des Wundverschlusses. Viele Entzündungsmediatoren wie Interleukine und TNF α wirken raftabhängig und eine Änderung der Raftzusammensetzung z.B. durch Cholesterindepletion, Cortison oder Omega-3-Fettsäuren bewirkt eine verminderte Signaltransduktion und somit Entzündungshemmung. Flotillin-1 und -2 sind hochkonservierte, ubiquitär vorkommende Proteine die eine hohe Assoziation zu Lipid rafts aufweisen und deshalb auch als Raftmarkerproteine verwendet werden. Flotilline kommen in Membranen als größenstabile Cluster von 50-100nm Durchmesser, wahrscheinlich als Homo- und Heterooligomere vor. Sie sind aber auch intrazellulär in vesikulären Strukturen, bevorzugt der Endo- und Phagozytose zu finden. Ihre genauere Lokalisation und auch ihre Kolokalisation sind zelltyp- bzw. gewebeabhängig, außerdem spielen Zell-Zell-Kontakte und Differenzierungsprozesse dabei manchmal eine Rolle. Entsprechend verhält es sich auch mit der Expression dieser Proteine. Entscheidend für die Initiierung diese Arbeit war, dass Flotillin-1 überexprimiert in entzündlichem Gewebe nachgewiesen wurde und ein Microarrayscreening unserer Arbeitsgruppe ergab, dass Flotillin-2 bei Colitis ulcerosa Patienten verändert exprimiert zu sein schien. Auch wenn man folgende Funktionen, die Flotillinen zugeschrieben werden betrachtet: Beteiligung an Signaltransduktion, Endo- bzw. Phagozytose und Zytoskelttorganisation; liegt es nahe eine Veränderung der Expression bzw. der Lokalisation von Flotillinen bei entzündlichen Prozessen zu erwarten.

Wir haben zunächst die Lokalisation von Flotillin-2 in Zellkulturzellen (nicht polarisierte und polarisierte CaCo2-, COS-, HeLa-, MDCK-, PtK2-, Vero-, nicht differenzierte 3T3-L1- und adipozytenähnliche, differenzierte 3T3-L1-Zellen) mit Hilfe der Immunfluoreszenz, Lichtmikroskopie und Konfokalmikroskopie untersucht. Dabei haben wir festgestellt, dass auch Flotillin-2, im Gegensatz zur von Langhorst et al. 2005 aufgestellten Hypothese (Flotillin-2 wird im Vergleich zu Flotillin-1 eher in der Plasmamembran als intrazellulär exprimiert), in allen von uns untersuchten Zelllinien intrazelluläre Vesikel aufweist, wohingegen nur zwei Zelllinien (differenzierte, un- und polarisierte CaCo2- und differenzierte 3T3-L1-Zellen) eine deutliche Plasmamembranfärbung zeigen. Anhand dieser Untersuchungen konnten wir bestätigen, dass bei Zell-Zell-Kontakten Flotillin-2 vermehrt in der Plasmamembran und vermindert in Vesikeln exprimiert wird. Während der Differenzierung verhält es sich allerdings genau umgekehrt. Wie Liu et. al. schon für Flotillin-

1 an 3T3-L1-Zellen gezeigt haben, verschiebt sich auch für Flotillin-2 in diesen Zellen die Lokalisation während der Differenzierung in Richtung der Plasmamembran. Auch in CaCo2- und MDCK-Zellen kurz nach der Zellteilung war der Schwerpunkt der Flotillin-2-Vesikellokalisierung perinukleär. In einer polarisierten CaCo2-Zelle, wie auch in Ileum- und Kolonenterozyten fanden wir, mittels Immunohistochemie, dass beide Flotilline in subapikalen Vesikeln und in der basolateralen, jedoch nicht in der apikalen Membran vorkommen. Außerdem ließen sich Flotillin-1 und -2 im Enterozyten optimal kolokalisieren. Diese Ergebnisse stellen die Verwendung von Flotillinen als generellen Marker für Lipid rafts in Frage, weil Flotilline nicht in der apikalen Membran von Enterozyten, die besonders viele Rafts enthält, vorkommen. Vielmehr erscheint eine differenzielle Regulation ihrer Lokalisation wahrscheinlich. Die basolaterale Lokalisation lässt die Vermutung zu, dass dort die Flotilline an Signaltransduktion und Zytoskeletorganisation beteiligt sein könnten. Doch diese Mutmaßung und die Frage ob die subapikalen Vesikel zu Endo- bzw. Phagozytosevesikeln gehören bedürfen weiterer Überprüfung. Die gute Kolokalisation von Flotillin-1 und Flotillin-2 legt weitere Spekulation nahe, die ebenfalls weitere Forschung und präziserer Methoden bedarf, nämlich, dass Flotilline in Enterozyten ausschließlich als Heterooligomere vorkommen und sich deshalb die Kolokalisation so optimal darstellt.

Die Expression von Flotillin-2 in Ileum- und Kolonbiopsien der CED-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen haben wir zunächst semiquantitativ auf der Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Da wir jedoch keine Unterschiede feststellen konnten und dies im Widerspruch zum Microarrayscreening stand, haben wir eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Dazu mussten wir allerdings erst ein Referenzplasmid mit einer menschlichen RNA-Sequenz herstellen. Auch bei der Untersuchung der RNA-Expression haben wir weder in Ileum- noch in Kolonbiopsien Unterschiede zwischen der CED- und der Kontrollgruppe gefunden, so dass wir jetzt davon ausgehen, dass das Microarrayscreening aufgrund von interindividueller Variation fälschlicherweise eine veränderte Expression bei Colitis ulcerosa anzeigte. Für einen Sammlungsfehler liegt kein Hinweis vor. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keine Auswirkung der Entzündung auf die Expression und die Lokalisation von Flotillin-2 im Intestinum gefunden werden konnte und es somit nicht als Marker für das Vorliegen einer CED geeignet ist.