

Stefanie Zügel
Dr. sc. hum.

Entwicklung und Charakterisierung eines Co-Kultur Systems als in vitro Modell der alveolären Barriere

Geboren am 16.07.1974 in Gaildorf

Diplom der Fachrichtung Ernährungswissenschaft am 07.10.2005 an der Universität Hohenheim

Promotionsfach: Sportmedizin

Doktorvater: Prof. Dr. phil. H. Mairbäurl

Über die Wand der Alveole findet der Gasaustausch zwischen Atemluft und Blut statt. Diese alveoläre Barriere wird von Alveolarepithelzellen und dem mikrovaskulären Endothel der Lungenkapillaren gebildet. Der Alveolarraum ist aber experimentell vor allem für zellphysiologische Untersuchungen nur schwer zugänglich. Monokulturen der beiden Zelltypen ermöglichen zwar molekular- und zellphysiologische Untersuchungen, erlauben aber keine Aussagen darüber, ob die Funktion der beiden Zelltypen durch gegenseitige Interaktion oder durch Zell-Zell-Kommunikation beeinflusst wird.

Es war daher das Ziel dieser Arbeit ein Co-Kultur System aus alveolären Typ 2 (AT2) Zellen und mikrovaskulären Endothelzellen (RLMVEC) der Rattenlunge auf einem Filtersystem zu etablieren, um eine Zell-Zell-Kommunikation zu ermöglichen. Durch Charakterisierung des Systems in Bezug auf Permeabilität, Ionentransport und Genexpression sollte festgestellt werden, ob sich die Zellen gegenseitig beeinflussen. Durch Überprüfung des Systems in Hypoxie sollte eine mögliche schützende Wirkung des Endothels auf die beeinträchtigte Barriereigenschaften des Alveolarepithels untersucht werden.

AT2 Zellen und RLMVEC wurden auf den gegenüberliegenden Seiten von Fibronectin-beschichteten Transwell® Filtern kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden Untersuchungen der Barrierefunktion durchgeführt und ein Einfluss von Hypoxie (1.5% O₂, 24h) untersucht. Die Permeabilität wurde als elektrischer Widerstand bzw. als Durchlässigkeit für Na-Fluorescein und FITC-Albumin gemessen. Die Aktivität des Ionentransports wurde elektrophysiologisch als Kurzschlussstrom in Ussing Kammern bestimmt. Die Genexpression wurde mittels RT-PCR gemessen.

Unter dem Einfluss der Co-Kultivierung mit RLMVEC erhöhte sich der elektrische Widerstand (ER) von AT2 Zellen. Nach 1 Woche in Kultur war der ER der Co-Kultur in Normoxie um etwa 24% (P=0,005) höher als in AT2 Monokulturen. Außerdem betrug die Permeabilität für Na-Fluorescein in der Co-Kultur nur etwa 1/3 des Wertes der AT2 Monokultur (P=0,004). In AT2 Zellen der Co-Kultur war die Expression der Tight Junction Proteine [(JAM-1; +51%), (ZO-1; +66%), Occludin (+72%) und Claudin-5 (+2800%)] signifikant erhöht (P<0,001). Die Co-Kultivierung der AT2 Zellen mit RLMVEC führte zu einer Erhöhung der Aktivität des Ionentransports. In normoxischen Co-Kulturen war der Ionentransport gemessen als Kurzschlussstrom (ISC_{tot}) um 24% (P=0,001) höher als in AT2 Zellen alleine, die Kapazität der Na/K-ATPase (ISC_{Na/K-ATPase}) war um 54% erhöht (P<0,001). Die Expression der α_1 - (+141%; P<0,001) und β_1 -Untereinheiten (+156%; P<0,001) der Na/K-ATPase war in AT2 Zellen der Co-Kulturen signifikant gesteigert.

Eine bekannte Dysfunktion des Alveolarepithels in Hypoxie konnte durch die Co-Kultivierung mit RLMVEC verbessert werden. Der ER lag in der Co-Kultur um 18% höher (P=0,003) als in der AT2 Monokultur. Die AT2 Zellen der Monokulturen zeigten in Hypoxie eine 8-fach höhere Permeabilität für FITC-Albumin (P<0,001). In den Co-Kulturen wurde die

Permeabilität für FITC-Albumin in Hypoxie nicht beeinflusst. Auch die Expression der Tight Junction Proteine JAM-1 (+87%; (P<0,001), ZO-1 (+51%; P<0,001), Occludin (+35%; P=0,031) und Claudin-5 (+933%; P<0,001) war in den hypoxischen AT2 Zellen der Co-Kultur im Vergleich mit der AT2 Monokultur deutlich gesteigert. In AT2 Monokulturen hemmt Hypoxie den Ionentransport [(ISC_{tot}; -44%; P<0,001); (ISC_{ENaC}; -29%; P=0,003); (ISC_{Na/K-ATPase}; -35%; P=0,003)]. Diese Hemmung konnte durch Co-Kultivierung mit RLMVEC teilweise verhindert werden. In den Co-Kulturen wurde die Kapazität der Na/K-ATPase zwar gehemmt (ISC_{Na/K-ATPase}; -22%; P=0,045), sie lag aber um 62% höher (P<0,001) als in AT2 Monokulturen. In den Co-Kulturen in Hypoxie wurden ISC_{tot} und ISC_{ENaC} nicht gehemmt und waren gegenüber den AT2 Monokulturen signifikant erhöht [(ISC_{tot}; +54%; P<0,001) (ISC_{ENaC}; +37%; P=0,002)].

In dieser Arbeit haben wir erfolgreich ein Co-Kultur System aus alveolären Epithel- und Endothelzellen der Rattenlunge, getrennt durch eine permeable Filtermembran, etabliert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese Co-Kultur eine niedrigere Permeabilität und eine höhere Aktivität des Ionentransports aufweist als AT2 Zellen in Monokultur. Auch die RNA Expression wurde durch die Co-Kultur gegenüber der Monokultur gesteigert. Diese Befunde waren in der Literatur bisher nicht beschrieben. Diese Daten lassen darauf schließen, dass sich die in der Co-Kultur in nächster Nähe wachsenden Zellen gegenseitig beeinflussen, wobei der Haupteffekt ein Effekt des Endothels auf das Epithel zu sein scheint. Diese Verbesserung der Barrierefunktion hat zur Folge, dass auch die typischen Störungen der Barrierefunktion durch Hypoxie in der Co-Kultur deutlich schwächer ausgeprägt sind als in der jeweiligen Monokultur. Unsere Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass die Kommunikation zwischen alveolären Epithelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen zu einer Verbesserung der Barrierefunktion führt. Daher könnte dieses Co-Kultursystem zellphysiologische und molekularbiologische Untersuchungen an den bisher verwendeten Monokulturen ersetzen, weil es der in vivo Situation sehr viel näher kommt. In weiterführenden Arbeiten müssen die Mechanismen der Zell-Zell-Kommunikation abgeklärt werden, welche die Änderungen in der Funktion der Barriere hervorrufen.