

Julia Wunsch

Dr. med.

Intrazelluläre Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen

Geboren am 28.09.1982 in Baden-Baden

Staatsexamen am 03.12.2008 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv-Doz. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Die langkettigen Fettsäuren (LCFAs) werden als Energiequelle, strukturelle Komponenten und zur Gentranskription benötigt und haben außerdem Signalfunktion. Eine Störung der Aufnahme und des Metabolismus dieser LCFAs sind medizinisch bedeutsam, da sie mit Diabetes, Arteriosklerose und dem metabolischen Syndrom assoziiert sind.

Der molekulare Mechanismus sowie die Regulation der Fettsäureaufnahme sind bislang nicht ausreichend geklärt. Nach Identifikation verschiedener Proteine, die die Fettsäureaufnahme einer Zelle beeinflussen, ist nach wie vor umstritten, welche Rolle Proteine in diesem Prozess spielen. Die Familie der Fatty Acid Transport Proteins (FATPs) soll dabei die entscheidende Funktion des Transporters innehaben. Jedoch besitzen die FATPs Enzymaktivität (Acyl-CoA-Synthetase) und beeinflussen den Transport der extrazellulären Fettsäuren in die Zelle hinein indirekt durch die Aktivierung der Fettsäuren im Cytosol. Durch die gezeigte Lokalisation des FATP4 und der N-terminalen Anteile der anderen FATPs im Endoplasmatischen Retikulum (ER) fehlt eine wesentliche Voraussetzung für eine direkte Transportfunktion der FATPs.

Aus früheren Experimenten zur Lokalisation von FATP-Acyl-CoA-Synthetasen wurde die Hypothese abgeleitet, dass die räumliche Verteilung der Enzymaktivität ein Schlüsselfaktor für die Kanalisierung von Fettsäuren in eine bestimmte metabolische Richtung sein könnte. Die Lokalisation von FATP4 an der ER-Membran könnte mit einer Verwendung der hergestellten Acyl-CoA für die Synthese von Phospholipiden und Triacylglyceriden einhergehen, denn die notwendigen Reaktionen werden von anderen ER-Enzymen katalysiert. Es stellt sich die Frage, ob der Ort der Aktivierung der Fettsäuren ihre weitere Verwendung bestimmt. Dies könnte bedeuten, dass am ER entstehende Acyl-CoA zum Aufbau von Membranlipiden oder Triglyceriden dienen, während an Mitochondrien aktivierte Fettsäuren zur Energiegewinnung mittels β -Oxidation prädestinieren.

Der wesentliche Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der biochemischen Korrelation einer vorher im Labor gemachten mikroskopischen Beobachtung. Eine fluoreszierende Fettsäure (Bodipy-Fettsäure) wird initial offensichtlich unterschiedlich verstoffwechselt, je nachdem welche Acyl-CoA-Synthetase in den verwendeten Zellen dominierend exprimiert wird. Nach Überexpression der Acyl-CoA-Synthetase FATP2 ist das Signal der Fettsäure im ER, nach Expression des Enzyms FATP4 in Lipidtropfen (LDs) zu beobachten. Aufgrund dessen wurden der Stoffwechsel und die räumliche Verteilung von physiologischen und fluoreszierenden Fettsäuren nach Überexpression von FATP2 und FATP4 mit verschiedenen Methoden untersucht.

Alle erhobenen Daten zeigten eine Lokalisation der Gesamtproteine FATP1, FATP2 und FATP4 im ER. Dies wurde durch Konstruktion verschiedener Epitop markierter Plasmide oder durch angehängte fluoreszierende Proteine erreicht. Es zeigten sich auch bei Kofunktion keinerlei Unterschiede.

Bei Verstoffwechslung der aufgenommenen fluoreszierenden Bodipy-Fettsäure zeigte sich mikroskopisch eine eindeutige Diskrepanz zwischen FATP2 und 4. Bei FATP4-transfizierten Zellen nach Bodipy-Aufnahme mit zuvoriger Oleatinkubation war die Fettsäure nicht mehr im ER zu finden, sondern in LDs. Bei Bodipy-Aufnahme FATP2-transfizierter Zellen nach Oleatinkubation war das Signal im ER und erst nach ca. 30 min in LDs zu finden. Es wurde eine Methode etabliert, mit der mittels Dünnschichtchromatographie (DC) die Aufnahme der Bodipy-Fettsäure qualitativ und quantitativ analysiert werden konnte. Die DC ergab einen Unterschied zwischen FATP2- und FATP4-transfizierten Zellen. Mit Oleatinkubation über Nacht stiegen die neutralen Lipide an, da diese den Hauptbestandteil von Lipidtropfen ausmachen. Erstaunlich war jedoch, dass bei den FATP4-transfizierten Zellen nach Oleatinkubation nicht nur neutrale Lipide anstiegen, sondern auch Phospholipide, allen voran das Phosphatidylcholin. Die FATP2-transfizierten Zellen mit und ohne Oleatinkubation zeigten in der Lipidverstoffwechslung Unterschiede, obwohl sie unter dem Mikroskop das gleiche Bild lieferten. Auch hier stieg der Triglyceridanteil mit Oleatinkubation über Nacht, aber nicht so stark wie bei den FATP4-transfizierten Zellen. Dabei stieg vor allem der Phosphatidsäure-Anteil deutlich an. FATP2 kann ungefähr dreimal so schnell wie FATP4 die Bodipy-Fettsäure aktivieren.

Ob FATP2 und FATP4 in unterschiedlichen Subregionen des ER lokalisiert sind und somit FATP4 dort lokalisiert ist, wo LDs entstehen und FATP2 dort, wo Phospholipide synthetisiert werden, war Anlass für weitere Studien. Dies sollte durch die Herstellung von Plasmiden, die jeweils den Enzymanteil von FATP2 und dem N-terminalen Abschnitt von FATP4 und

umgekehrt haben, verwirklicht werden. Diese zeigten allerdings keine Funktion und konnten somit nicht zum Ergebnis beitragen.

Mittels Western-Blot konnten die Proteinanteile der transfizierten Zellen nach subzellulärer Fraktionierung in den verschiedenen Fraktionen dargestellt werden. Die Lipidtropfen befanden sich in den oberen Fraktionen niedriger Dichte. In FATP4wt-transfizierten Zellen war das FATP4-Protein mit Oleatinkubation über Nacht auch in die oberen Fraktionen gewandert, wo es ohne Oleatinkubation nicht zu finden war. Außerdem war das FATP4wt-Protein in den gleichen Fraktionen vertreten wie der LD-Marker ACSL3-GFP. FATP2-HA blieb in den unteren Fraktionen.

Aufgrund der im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Informationen lässt sich sagen, dass FATP1, FATP2 und FATP4 ER-Proteine sind. Es wurden Unterschiede zwischen den FATP2- und FATP4-transfizierten Zellen gefunden. Dies spricht eindeutig dafür, dass die unterschiedlichen Acyl-CoA-Synthetasen FATP2 und FATP4, die beide bei Überexpression im ER lokalisiert sind, in verschiedenen Subregionen des ERs vorkommen und somit an unterschiedlicher Verstoffwechslung der Fettsäuren beteiligt sind.

Mit weiteren Experimenten sollen deutlichere Aussagen zur subzellulären Lokalisation und weiteren Metabolisierung gewonnen werden. Dafür stehen stabil transfizierte FATP2- bzw. FATP4-Zellen zur Verfügung. Weitere funktionelle Untersuchungen der FATPs könnten einen Einblick in ihre Funktion im Fettsäurestoffwechsel in den Zellen liefern. Proteine, die in der Fettsäureaufnahme und im Stoffwechsel eine Rolle spielen, sind wichtige pharmazeutische Zielsubstanzen für die Behandlung von Adipositas und assoziierter Erkrankungen. Nur Grundlagenforschung über diese Proteine wird neue therapeutische Strategien ermöglichen und so möglicherweise als Ziele für zukünftige Medikamente dienen, z.B. bei der Behandlung von Fettstoffwechselerkrankungen und dem Diabetes mellitus II.