

Daniel Link

Dr. med.

Expression von Schlüsselenzymen des Alkoholmetabolismus und peroxisomaler Membranproteine in Leber- und Herzparenchym ethanolbehandelter Sprague-Dawley-Ratten

Geboren am 24.06.1975 in Heidelberg

(Staats-)Examen am 9.05.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. A. Völkl

Das Ziel dieser Arbeit war die Betrachtung der alkoholmetabolisierenden Stoffwechselforgänge im Herzen durch Katalase und Cytochrom P450 2E1 im Zusammenhang mit einem Enzym der peroxisomalen α -Oxidation, der Acyl-CoA-Oxidase, den bisher weniger erforschten peroxisomalen Membranproteinen PMP70 und PMP22 und dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierten-Rezeptor α als zentralem Schaltelement des Fettsäuremetabolismus.

Der Versuchsaufbau umfasste insgesamt vier Gruppen zu je 5 männlichen Sprague-Dawley-Ratten. In der ersten Gruppe fasteten wir mit herkömmlichem Rattenfutter ad libitum ernährte Tiere zusammen. Um Effekte allein durch die Darreichungsform auszuschließen, bekamen weitere 5 Tiere eine vitaminsubstituierte Flüssigformuladiät. Die beiden letzten Gruppen unterschieden sich durch den durch Alkohol gedeckten Gesamtkaloriengehalt. So bestritten die Tiere in Gruppe 3 18% ihrer Kalorien aus Alkohol, während in der letzten Gruppe 36% des täglichen Brennwertes vom Alkohol stammten. Um einen Hinweis auf die intrazelluläre Lokalisation der Stoffwechselveränderungen zu erhalten, führten wir die Untersuchungen sowohl auf RNA-Ebene mittels DOT-Blots und Northern-Blots als auch auf Proteinebene mittels SDS-PAGE und Western Blotting durch.

Die 28S-rRNA-Konzentration als Marker ribosomaler Aktivität nimmt in Herz und Leber im Falle der Hochdosisalkoholgruppe um etwa 40% ab und veranschaulicht die massiven Veränderungen unter chronischer Ethanolzufuhr mit erheblichem Verlust der Translationsfähigkeit. Der Gesamtproteingehalt nahm in der Alkoholgruppe um jeweils ca. 10% ab. Unter diesem Aspekt sind relative Zunahmen einzelner mRNA- und insbesondere Enzymkonzentrationen zu relativieren.

Die Katalase wird in der Leber auf mRNA-Ebene dosisabhängig induziert. Im Herzen, wo sich die Peroxisomendichte unter Ethanoleinfluß verdoppelt, konnten wir keine Induktion beobachten. Auf Proteinebene kommt es, ebenfalls dosisabhängig, zu einer Reduktion mit Ausnahme des Herzens, wo in der Niedrigdosisgruppe eine relative Zunahme der Katalasemenge auf 132% zu beobachten ist.

Die Isoform 2E1 des Cytochroms P450 wird unter hohen Alkoholdosen im Herzen relativ stärker induziert als in der Leber. Dabei konnte in unseren Versuchen für das Herz überhaupt erstmals eine ethanolbedingte, dosisabhängige Induktion des Enzyms nachgewiesen werden. Dies könnte ein Indiz für eine wichtige Rolle des Cytochroms P450 2E1 in der Pathogenese der Alkohlkardiomyopathie sein. Die relativ stärkere Zunahme im Herzen im Vergleich zur Leber könnte allerdings auch auf einen differenten Alkoholmetabolismus im Herzen hindeuten.

Unsere Ergebnisse zeigen für die Acyl-CoA-Oxidase als Schlüsselenzym der peroxisomalen α -Oxidation unter Alkoholeinfluß eine nichtdosisabhängige Reduktion um ca. 10-20% sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. In der Literatur sind bisher keine Veränderungen im mRNA-Gehalt unter Alkoholgabe beschrieben. Die Werte stützen die These einer leichten, auf Transkriptionsebene befindlichen, nicht dosisabhängigen Downregulation der kardialen wie der hepatischen Acyl-CoA-Oxidase unter chronischer Alkoholgabe.

Das bisher sehr wenig untersuchte peroxisomale Membranprotein PMP22 wird vermutlich post-translational downreguliert, wobei zusätzlich eine Dosisabhängigkeit besteht. Während die mRNA-Konzentrationen in beiden Organsystemen, insbesondere jedoch in der Leber, bis zum 2,3-fachen ansteigen, kommt es auf Proteinebene, vor allem im Herzen, zu einer ausgeprägten Downregulation auf 32%. Über die Funktion dieses Membranproteins ist bisher wenig bekannt, und über eine spezielle Rolle im hepatischen und kardialen Alkoholmetabolismus lässt sich mit unserem Versuchsaufbau keine weitere Klärung erreichen.

Für das peroxisomale Membranprotein PMP70 konnte für beide Organsysteme eine dosisabhängige Zunahme sowohl der mRNA- als auch der Enzymkonzentrationen nachgewiesen werden. Dabei zeigt sich im Herzen in der Hochdosisgruppe der relativ stärkste Anstieg. Aufgrund der Steigerung sowohl der mRNA- als auch der Proteinkonzentrationen gehen wir von einem Steuerungsmechanismus auf Transkriptionsebene aus.

Für den PPAR α bestätigen unsere Beobachtungen die Ergebnissen in der Literatur, wonach chronische Alkoholgabe zu einer deutlichen Downregulation des PPAR α führt. Dieser Effekt konnte sowohl für das Herz- als auch für das Leberparenchym nachgewiesen werden, ist laut unseren Ergebnissen ebenfalls dosisabhängig und liegt in der Hochdosisgruppe bei 40- 50.