

Laura Knüppel
Dr. med.

Die Relevanz von Sirtuinen für den Lipidstoffwechsel

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Langkettige Fettsäuren besitzen eine zentrale Bedeutung im Stoffwechsel. Sie fungieren als Energiequelle, Membranbausteine oder Signalmoleküle. Störungen des Fettsäuremetabolismus sowie eine übermäßige Aufnahme von Nahrungsfetten sind ursächlich für eine Vielzahl schwerwiegender Erkrankungen, die mit einer hohen Mortalität und beträchtlichen Kosten für das Gesundheitssystem assoziiert sind. Beeinflussungen des Lipidstoffwechsels stellen daher einen grundlegenden Ansatzpunkt der Prävention und Therapie von Adipositas und deren Folgeerkrankungen dar.

Das FATP4 stellt eine im ER lokalisierte Acyl-CoA-Synthetase dar, die bei Überexpression die Fettsäureaufnahme steigert. Es wird davon ausgegangen, dass das FATP4 indirekt die Transportrate der Fettsäuren über deren Verstoffwechslung zu Acyl-CoA beeinflusst. Der molekulare Mechanismus der Regulation des FATP4 ist bislang ungeklärt. In einer kürzlich veröffentlichten Proteomanalyse wurden in dem Protein FATP2 zwei Lysinacetylierungen identifiziert. Einer dieser Lysinreste ist in allen Mitgliedern der FATP-Familie konserviert, so dass auch FATP4 diese posttranslationale Modifikation tragen könnte. Acetyl-CoA-Synthetasen werden in ihrer Aktivität durch Acetylierung bzw. Deacetylierung durch Sirtuine reguliert. Die hierauf aufbauende Arbeitshypothese war somit, dass FATP4 durch Sirtuine in seiner Aktivität reguliert wird.

Sirtuine sind Deacetylasen der Klasse III, die mit einer Verlängerung der Lebensspanne, sowie einer Verminderung altersbedingter Erkrankungen, wie Diabetes, Krebs und Neurodegeneration assoziiert sind. SIRT1 und SIRT2, als wahrscheinlichste Deacetylasen des FATP4, wurden untersucht, um die regulatorische Rolle der Sirtuine auf den Lipidstoffwechsel zu evaluieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht mit Hilfe von verschiedenen Methoden eine posttranslationale Modifikation des FATP4 nachzuweisen:

1. Direkte Untersuchung von stabil FATP4 exprimierenden eukaryontischen Zellen unter Verwendung eines Acetyl-Lysin-Antikörpers im Western Blot.
2. Untersuchung mittels Massenspektrometrie. Dazu wurde rekombinantes FATP4 aus

eukaryontischen Zellen aufgereinigt und massenspektrometrischen Analysen zugeführt.

Um den Grad der Acetylierungen zu erhöhen, wurden die Ansätze zusätzlich mit Deacetylase-Inhibitoren inkubiert. Dennoch wurde eine Acetylierung in keinem der Ansätze nachgewiesen. Hierbei wurde im 1. Ansatz von einer zu geringen Empfindlichkeit der Methodik ausgegangen. In der Massenspektrometrie wurde eine Sequenzabdeckung von 73 % erreicht. Jedoch konnte das Peptid mit dem in allen Mitgliedern der FATP-Familie konservierten Lysinrestes nicht gefunden werden. Dies lässt darauf schließen, dass das Peptid nicht in ausreichender Menge gebildet wurde. Möglicherweise befindet sich allerdings auch in dieser Region eine weitere kovalente Modifikation, die die Erkennung einer Acetylierung verhindert. Zukünftig könnten hier eine Verwendung anderer Enzyme bei massenspektrometrischen Analysen oder eine isoelektrische Fokussierung mittels 2D-Gelelektrophorese zum Nachweis posttranslationaler Modifikationen von Nutzen sein. Desweiteren erfolgte eine funktionelle Untersuchung des FATP4 über die Bestimmung der Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität. Hierfür wurden Mutationsvarianten des FATP4 analysiert, die sowohl eine konstitutive Deacetylierung als auch Acetylierung imitierten. Die Messung der Enzymaktivitäten zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied (Zweistichproben t-Test von 11,1 %) zwischen beiden Varianten. Daraus wurde geschlossen, dass eine mögliche Deacetylierung des FATP4 modulierend auf dessen Aktivität wirkt.

Die Coexpression von FATP4 und SIRT1 bzw. SIRT2 führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Funktionalität von FATP4. Es zeigte sich keine Veränderung der Enzymaktivität, so dass eine Regulation des FATP4 durch SIRT1 bzw. SIRT2 nicht belegt werden konnte.

Quantitative Alterationen der Fettsäureaufnahme durch die Überexpression von SIRT1 bzw. SIRT2 wurden mithilfe von Aufnahmeversuchen mit radioaktiv markiertem Oleat untersucht. In den dreistündigen Versuchen war eine deutliche Zunahme der Fettsäureaufnahme zu verzeichnen. Allerdings war hierbei keine Veränderung der ACS-Aktivität festzustellen, so dass anzunehmen ist, dass die Erhöhung der Fettsäureaufnahme auf einen anderen, noch unbekannten Mechanismus zurückzuführen ist.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden für das SIRT1 eine nukleäre und eine cytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen. Das SIRT2 zeigte sich in fluoreszenzmikroskopischen Färbungen von COS-Zellen sowohl im Cytosol als auch plasmamembranassoziiert. Die Trennung von Cytosol und Membranen (subzelluläre Fraktionierung) zeigte allerdings eine ausschließlich cytosolische Lokalisation. Ursächlich hierfür könnte eine mögliche Aufhebung vermeintlicher Assoziationen bei der

Homogenisierung der Zellen sein. Anhand der Polarisierung von stabil SIRT2 exprimierenden MDCK-Zellen wurde eine apikale Lokalisation des Proteins nachgewiesen. Dies führt zu der Spekulation, dass das SIRT2 möglicherweise eine Modifikation apikaler Transportproteine hervorruft, die für die erhöhte Fettsäureaufnahme verantwortlich sind.

Schlussfolgernd ist festzustellen, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht der Nachweis einer Acetylierung des FATP4 erbracht werden konnte. Allerdings wurde gezeigt, dass eine mögliche Acetylierung modulierend auf die Aktivität des FATP4 wirkt. Insbesondere gelang es nicht die Hypothese einer Interaktion von SIRT1 bzw. SIRT2 mit FATP4 zu bestätigen. Dennoch wurde nachgewiesen, dass die Überexpression von SIRT1 und SIRT2 zu einer deutlich erhöhten Fettsäureaufnahme führt. In Anbetracht des in dieser Arbeit erbrachten Nachweises einer apikalen Lokalisation des SIRT2 in polarisierten Zellen ist eine SIRT-getriggerte Modifikation apikaler Transportproteine als hierfür ursächlich zu vermuten und stellt einen Gegenstand künftiger Forschungen dar.