INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Eva-Maria Küch

aus Lüdenscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 28.02.2012

Intrazelluläre Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen

Gutachter: Prof. Dr. Walter Nickel
PD Dr. Joachim Füllekrug

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ich erkläre zudem, dass ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderer Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung 1

1. Summary 3

2. Einleitung 5

2.1 Der zelluläre Fettsäurestoffwechsel 5
2.2 Acyl-CoA-Synthetasen in Säugetierzellen 6
2.2.1 Die katalysierte Reaktion 6
2.2.2 Die Acyl-CoA-Synthetasen der Säugetiere 8
2.2.3 Die Acyl-CoA-Synthetase ACSL4 10
2.2.4 Die Acyl-CoA-Synthetase FATP4 11
2.3 Aufnahme und Kanalisierung von Fettsäuren 13
2.3.1 Die zelluläre Fettsäureaufnahme 13
2.3.2 Die Kanalisierungshypothese 14
2.4 Bedeutung von Phosphatidylinositol für den zellulären Stoffwechsel 17
2.5 Zielsetzung und experimentelles Vorgehen 19

3. Material und Methoden 21

3.1 Materialien 21
3.1.1 Chemikalien und Materialien 21
3.1.1.1 Molekularbiologische Methoden 21
3.1.1.2 Zellbiologische Methoden 21
3.1.1.3 Biochemische Methoden 22
3.1.2 Bakterien und Zelllinien 24
3.1.2.1 Bakterien 24
3.1.2.2 Zelllinien 24
3.1.3 Plasmide 25
3.1.4 Primer 26
3.1.5 Antikörper 26
3.1.6 Kits 27
3.1.7 Geräte 27
3.1.8 Software 27
3.1.9 Puffer und Lösungen 28
3.2 Methoden 29
3.2.1 Molekularbiologische Methoden 29
3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 29
3.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA 29
3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese 30
3.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden 30

3.2.1.5 Photometrische Messung von Nukleinsäuren 31
3.2.1.6 Dephosphorylierung von Vektoren 31
3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten 31
3.2.1.8 Kultivierung von *Escherichia coli* 32
3.2.1.9 Präparation chemisch kompetenter *Escherichia coli* 32
3.2.1.10 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli* 33
3.2.1.11 Klonierungen 33
3.2.2 Zellbiologische Methoden 35
3.2.2.1 Kultivierung von Zellen 35
3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen 36
3.2.2.3 Induktion von Lipidtröpfchen 36
3.2.2.4 Transiente Transfektion mittels Lipofektion 37
3.2.2.5 Stabile Transfektion mittels retroviraler Transduktion 37
3.2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz 40
3.2.2.7 Analyse der Expression und Fettsäureaufnahme per Durchflusszytometrie 41
3.2.3 Biochemische Methoden 42
3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 42
3.2.3.2 Western-Blot 43
3.2.3.3 Subzelluläre Fraktionierung 44
3.2.3.4 Methanol-Präzipitation von Proteinen 45
3.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration 46
3.2.3.6 Acyl-CoA-Synthetase Enzymaktivitätsbestimmung 47
3.2.3.7 Quantitative Aufnahme radioaktiv-markierter Fettsäuren 50
3.2.3.8 Fettsäure- und Acetatmarkierung für die Dünnschichtchromatographie 51
3.2.3.9 *Pulse-Chase* Aufnahme radioaktiv-markierter Fettsäuren 53
3.2.3.10 Lipidextraktion nach Folch 55
3.2.3.11 Dünnschichtchromatographie 55
3.2.3.12 Quantifizierung und Analyse der Dünnschichtchromatographien 59
3.2.3.13 Bestimmung der Fettsäureoxidation durch säurelösliche Metabolite 61

4. Ergebnisse 65

4.1 Durch Überexpression von FATP4 vermehrt aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt 65
4.1.1 FATP4 in stabil exprimierenden C2C12-Zellen 65
4.1.1.1 Charakterisierung der FATP4.C2C12-Zelllinie 66
4.1.1.2 Analyse des initialen Lipidstoffwechsels in FATP4.C2C12-Zellen 67
4.1.1.3 Langfristige Erhöhung des Triacylglycerinanteils in FATP4.C2C12-Zellen 69
4.1.2 FATP4 in stabil exprimierenden HEK293-Zellen 71
4.1.2.1 Charakterisierung der FATP4.HEK293-Zelllinie 71
4.1.2.2 In FATP4.HEK293-Zellen zusätzlich aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt. 72
4.2 Der Einfluss von ACSL4-Überexpression auf den Lipidstoffwechsel 74
4.2.1 Verwendete ACSL4 Konstrukte 74
4.2.2 Charakterisierung der ACSL4.COS-Zellen 75
4.2.2.1 Titration einer einheitlichen Expressionshöhe aller ACSL4-Proteine 75
4.2.2.2 Unterschiedliche Lokalisierung der verwendeten ACSL4-Proteine 76
4.2.2.3 Die ACSL4-Proteine sind gleichermaßen enzymatisch aktiv 81
4.2.2.4 Die ACSL4-Proteine erhöhen die zelluläre Arachidonataufnahme 83

4.2.3 Überexpression der ACSL4-Proteine verändert die initiale Verstoffwechselung exogen zugefügten Arachidonats 85
4.2.3.1 Exogen zugefügtes Arachidonat wird initial zu Phospholipiden umgesetzt 85
4.2.3.2 Nach dreistündiger Arachidonatinkubation werden fast alle ACSL4-bedingten Veränderungen im Fettsäuremetabolismus ausgeglichen 92
4.2.4 Überexpression der ACSL4-Proteine verändert den Metabolismus des in die Zelle aufgenommenen Oleats 96
4.2.5 Die Lipidsynthese aus *de novo* synthetisierten Fettsäuren wird durch Überexpression der ACSL4-Proteine nicht beeinflusst 98
4.2.6 Überexpression von M-ACSL4 und Mito-ACSL4 erhöht die Arachidonatoxidation 100
4.3 Analyse des Lipidstoffwechsels verschiedener Fettsäuren und Acetat 102

5. Diskussion 107

5.1 Durch Überexpression von FATP4 vermehrt aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt 108
5.2 Der N-Terminus beeinflusst die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetase ACSL4, nicht jedoch die Enzymaktivität 110
5.3 Durch Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine aktiviertes Arachidonat wird initial in den Phospholipiden gebunden 112
5.4 Kanalisierungseffekte durch Überexpression von ACSL4 an der Plasmamembran und im Cytosol 115
5.5 Kanalisierungseffekte der Proteine M-ACSL4 und Mito-ACSL4 117
5.6 Schlussfolgerung 119
5.7 Ausblick 121

6. Anhang 123

6.1 Ergänzende Abbildungen 123
6.2 Tabellen 126
6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis 138
6.4 Literaturverzeichnis 140
6.5 Veröffentlichungen 147

Abkürzungsverzeichnis

Neben den gültigen physikalischen SI-Einheiten und chemischen Symbolen werden in der vorliegenden Arbeit folgende Abkürzungen verwendet:

AA	Arachidonat/Arachidonsäure ($20:4^{\Delta 5,8,11,14}$) *(arachidonic acid)*
Ac	Acetat
ACAT	Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase
ACBP	Acyl-CoA-Bindeprotein
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ACSL	Langketten Acyl-CoA-Synthetase
ad	auf ein bestimmtes Volumen auffüllen
ADRP	Adipophilin
AGPAT	Acylglycerinphosphat-Acyltransferase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BA	Behenat/Behensäure (22:0)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSA-fsf	Fettsäurefreies bovines Serumalbumin
CE	Cholesterinester
CH	Cholesterin
$CHCl_3$	Chloroform
CL	Cardiolipin
Clx	Calnexin
CoA	Coenzym A
cpm	Zerfälle pro Minute *(counts per minute)*
DC	Dünnschichtchromatographie
DG	Diacylglycerin
DMEM	*Dulbecco's modified Eagle's medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleic acid*)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ECL	Verstärkte Chemolumineszenz *(enhanced chemiluminescence)*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E. coli	*Escherichia coli*
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ether	Ether-Triacylglycerin
FABP	Fettsäure- Bindeprotein

FACS	Durchflusszytometrie (*fluorescent activated cell sorting*)
FATP	Fettsäuretransportprotein *(fatty acid transport protein)*
FKS	Fetales Kälber Serum
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*)
IF	Immunfluoreszenz
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria Bertani
LD	Lipidtröpfchen
LPA	Lysophosphatidsäure
LPC	Lysophosphatidylcholin
LTR	*Long terminal repeat*
M-ACSL4	Membran-ACSL4 des Endoplasmatischen Retikulums und der Lipidtröpfchen
MBOAT-7	Membrangebundene-O-Acyltransferase 7
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MEM	*Eagle's minimal essential medium*
MG	Monoacylglycerol
Mito-ACSL4	Mitochondrielles ACSL4
MMLV	Moloney Maus Leukämievirus
ms	Maus
NL	Neutrallipid
OA	Oleat/Ölsäure ($18:1^{\Delta 9}$) *(oleic acid)*
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
p.a.	zur Analyse
PA	Phosphatidsäure
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PE	Phosphatidylethanolamin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PG	Phosphatidylglycerol
PI	Phosphatidylinositol
PIPES	Piperazin-1,2-bis(2-ethansulfonsäure)
PL	Phospholipid
PS	Phosphatidylserin
Puro	Puromycin-Resistenzgen

rb	Kaninchen (*rabbit*)
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SG	Saponin-Gelatine Waschlösung
SGB	Saponin-Gelatine-BSA Permeabilisierungs- und Blocklösung
SM	Sphingomyelin
TAE	Tris/Acetat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Triacylglycerin
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat, Polysorbat 20
U	Einheit der Enzymaktivität (u*nit*)
VDAC	Spannungsabhängiger Anionenkanal (*Voltage-dependent anion channel*)
VSV-G	Glykoprotein des *Vesicular stomatitis Virus*
WB	Western-Blot

1. Zusammenfassung

Acyl-CoA-Synthetasen sind essentielle Enzyme des zellulären Lipidstoffwechsels, welche Fettsäuren durch Thioesterifizierung mit Coenzym A aktivieren und sie somit für den nachfolgenden Stoffwechsel verfügbar machen. Säugetiere besitzen 13 Acyl-CoA-Synthetasen mit einer Spezifität für langkettige Fettsäuren, von denen mehrere Enzyme simultan auf unterschiedlichen subzellulären Organellen exprimiert werden. Basierend auf der funktionellen Redundanz aller Acyl-CoA-Synthetasen bei Vorliegen unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierungen wurde die Kanalisierungshypothese formuliert. Diese postuliert, dass die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen auf unterschiedlichen subzellulären Organellen die metabolische Richtung der aktivierten Fettsäure beeinflusst. Auch die unterschiedlichen gewebespezifische Expressionen, Substratspezifitäten und Regulationen lassen spezielle Funktionen der einzelnen Enzyme vermuten.

Durch Überexpression der Acyl-CoA-Synthetasen FATP4 und ACSL4 im Zellkultursystem wurde diese Hypothese unter Anwendung von biochemischen Methoden, insbesondere der Dünnschichtchromatographie, untersucht. Drei verschieden lokalisierte ACSL4-Proteine wurden verwendet, die sich durch unterschiedliche N-Termini auszeichneten, welche die Enzymaktivität nicht beeinflussten. In diesem System wurden die Auswirkungen der *unterschiedlichen* Lokalisierung *desselben* Enzyms auf den Lipidmetabolismus der aktivierten Fettsäure untersucht.

Die Überexpression von FATP4 und ACSL4 steigerte die Fettsäureaufnahme. Für FATP4 wurde in C2C12- und HEK293-Zellen gezeigt, dass markiertes exogenes Oleat bereits innerhalb von Minuten in Triacylglycerin eingebaut und gespeichert wurde. Diese Stoffwechselrichtung zeigte sich auch nach drei Stunden, so dass die Menge markierter Neutrallipide in den FATP4.HEK293 auf das 3,2-fache stieg während die Menge der Phospholipide nur auf das 1,3-fache stieg. Verglichen dazu konnte nach Überexpression der ACSL4-Proteine in COS-Zellen gezeigt werden, dass zusätzlich aufgenommenes Arachidonat in bestimmten Phospholipiden gebunden wurde, so dass die Anteile des Phosphatidylcholins sowie des Phosphatidylinositols um bis zu 50 % anstiegen.

Die unterschiedliche Metabolisierung von durch FATP4 und ACSL4 aktivierten Fettsäuren zeigt, dass die Art der Acyl-CoA-Synthetase die Richtung des Stoffwechsels der aufgenommenen Fettsäure beeinflusst.

Nach Überexpression der ACSL4-Proteine auf unterschiedlichen subzellulären Organellen wurden lokalisierungsspezifische Effekte beobachtet. So wurde die Inkorporierung von aktiviertem Arachidonat in Phosphatidylcholin durch das ACSL4 der Plasmamembran und des Cytosols gegenüber dem ER-ständigen M-ACSL4 und dem Mito-ACSL4 am stärksten erhöht, während ACSL4 die Fettsäureoxidation nicht steigern konnte. M-ACSL4 und Mito-ACSL4 hingegen steigerten die Arachidonatoxidation um 58 % und 40 %. In M-ACSL4 überexprimierenden Zellen war ein um mehr als 30 % erhöhter Phosphatidylinositolanteil gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen auffällig. Folglich scheint das ER-ständige M-ACSL4 gezielt Arachidonat für die Synthese von Phosphatidylinositol zu aktivieren. Zusätzlich wurden in M-ACSL4 überexprimierenden Zellen ein erhöhter Anteil an Diacylglycerin und ein verminderter Anteil an Cholesterinestern gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen nachgewiesen.

Die erhöhten Anteile an Phosphatidylinositol und Phosphatidylcholin deuten auf eine Speicherung von Arachidonat in diesen Lipiden hin. Durch die Aktivität der Phospholipase A2 kann Arachidonat freigesetzt und für die Synthese proinflammatorischer Eicosanoide verwendet werden. Der auffällig höhere Phosphatidylinositolanteil in M-ACSL4 gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen könnte zudem auf eine spezielle Funktion von Phosphatidylinositol in den neuronalen Geweben hindeuten, in welchen M-ACSL4 nativ exprimiert wird. Als ursächlich für die erhöhten Anteile der Cholesterinester in den Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen gegenüber den M-ACSL4 überexprimierenden Zellen wird die Lokalisierung der Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase in der Mitochondrien-assoziierten Membran angenommen. Durch die räumliche Nähe von Mitochondrien und Endoplasmatischem Retikulum kann das durch Mito-ACSL4 aktivierte Arachidonat für die Synthese von Cholesterinestern verwendet werden.

Abschließend wurde die unterschiedliche Inkorporierung verschiedener exogener markierter Fettsäuren, des Acetats und der daraus *de novo* synthetisierten Fettsäuren in die zellulären Lipide gezeigt. So wurden nach Inkubation der Zellen mit markiertem Acetat bis zu 20 % mehr markierte Phospholipide gebildet als nach Markierung der Zellen mit Fettsäuren. Markiertes Oleat wurde gegenüber Arachidonat vermehrt zu Phosphatidylcholin und weniger zu Triacylglycerin umgesetzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Richtung des Fettsäurestoffwechsels von der Art der verwendeten Fettsäure, von der spezifischen Acyl-CoA-Synthetase und deren Lokalisierung beeinflusst wird.

1. Summary

Acyl-CoA synthetases are essential housekeeping enzymes which activate fatty acids by thioesterification with coenzyme A thus making them available to downstream metabolic pathways. 13 mammalian long chain acyl-CoA synthetases have been identified which are expressed simultaneously on different subcellular organelles. Based on the functional redundancy of all acyl-CoA synthetases and their different subcellular localisation the channeling hypothesis was developed. The hypothesis proposes the localisation of acyl-CoA synthetases to distinct subcellular organelles to influence the metabolic fate of activated fatty acids. Additionally, the tissue-specific expression pattern as well as the distinct substrate specificity and enzyme regulation indicate special functions for the various enzymes.

By overexpressing the acyl-CoA synthetases FATP4 and ACSL4 in mammalian cell culture the channeling hypothesis was analysed using biochemical methods, especially thin layer chromatography. The effect of a *differential* localisation of the *same* acyl-CoA synthetase on the metabolism of the activated fatty acid was analysed by use of three differently localised ACSL4 proteins containing distinct N-termini which did not influence the enzymatic activity.

Overexpression of FATP4 and ACSL4 enhanced fatty acids uptake. In C2C12 cells and HEK293 cells that overexpressed FATP4 labelled exogenous oleate was metabolised to triacylglycerol within minutes. This metabolic fate was also shown after three hours of labelling and resulted in a 3.2-fold increase in labelled neutrallipid amounts in contrast to the amounts of phospholipids which increased only 1.3-fold. In comparison overexpression of ACSL4 proteins in COS cells resulted in the incorporation of arachidonate into special phospholipids. As a consequence of this, the intracellular amount of labelled phosphatidylcholine and phosphatidylinositole increased up to 50 %.

The differential metabolism of fatty acids activated by either FATP4 or ACSL4 demonstrates that their metabolic fate is influenced by the type of acyl-CoA synthetase activating the fatty acid.

Following overexpression of ACSL4 proteins on distinct subcellular organelles some localisation specific effects were detected. Thus, the incorporation of activated arachidonate into phosphatidylcholine was more increased by overexpression of plasmamembrane bound and cytosolic ACSL4 than by overexpression of ER-localised M-ACSL4 or Mito-ACSL4, whereas fatty acid oxidation was not changed. M-ACSL4 or Mito-ACSL4 increased oxidation by 58 % and 40 %, respectively. In M-ACSL4 overexpressing cells the relative amount of labelled phosphatidylinositole was increased by more than 30 % compared to Mito-ACSL4 overexpressing cells. Thus, the M-ACSL4 on the endoplasmic reticulum seems to activate arachidonate destined for the synthesis of phosphatidylinositole. In addition, M-ACSL4 overexpressing cells contained an increased relative amount of diacylglycerol and a decreased relative amount of cholesterolester compared to Mito-ACSL4 overexpressing cells.

The increased amounts of phosphatidylcholine and phosphatidylinositole indicate that these lipids store arachidonate. The phospholipase A2 releases arachidonate which can be used for the synthesis of proinflammatory eicosanoids. The higher amount of phosphatidylinositole in M-ACSL4 compared to Mito-ACSL4 overexpressing cells may reveal a specific function of phosphatidylinositole in neuronal tissues, which express M-ACSL4 natively. It is assumed that the increased amounts of cholesterolester in Mito-ACSL4 versus M-ACSL4 overexpressing cells may be caused by acyl-CoA:cholesterol-acyltransferase which is localised to the mitochondrial-associated membrane. Due to the spatial proximity of mitochondria and endoplasmic reticulum the arachidonate activated by Mito-ACSL4 is used for the esterification of cholesterol.

The differential incorporation of exogenous fatty acids, acetate and the *de novo* synthesised fatty acids into cellular lipids was shown. Thus, the incorporation of acetate into labelled phospholipids was increased up to 20 % compared to the incorporation of fatty acids. In comparison to arachidonate, more oleate was incorporated into phosphatidylcholine and less into triacylglycerol.

In conclusion, the results show that the direction of fatty acid metabolism is influenced by the fatty acid analysed, the specific acyl-CoA synthetase and its subcellular localisation.

2. Einleitung

2.1 Der zelluläre Fettsäurestoffwechsel

Neben den Proteinen, den Kohlenhydraten und den Nukleinsäuren stellen die Lipide einen Hauptbestandteil der Zelle dar. Zu den wichtigsten Eigenschaften der Lipide gehört ihr hydrophobes Verhalten, welches auf die enthaltenen Fettsäuren zurückzuführen ist. Fettsäuren sind Carbonsäuren mit einer Carboxylgruppe und einem aliphatischen Kohlenwasserstoffrest unterschiedlicher Länge. Die Lipide der Säugerzellen enthalten unverzweigte Fettsäuren mit einer geradzahligen Anzahl von 2 bis 36 Kohlenstoffatomen, jedoch überwiegend solche mit 14 bis 22 Kohlenstoffatomen. Diese können als gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren mit bis zu sechs cis-konfigurierten Doppelbindungen vorliegen (Christies, 2000). Die häufigsten Fettsäuren enthalten 16 oder 18 Kohlenstoffatome. Dies sind Palmitinsäure (16:0), Palmitoleinsäure (16:1), Stearinsäure (18:0) und Oleinsäure (18:1). Die essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren Linolsäure (18:2) und Linolensäure (18:3) können durch den tierischen Organismus nicht eigenständig synthetisiert werden. Da sie Ausgangspunkte für die Synthese weiterer wichtiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie der Arachidonsäure, sind, müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden (Christies, 2000).

Fettsäuren haben unverzichtbare Bedeutungen in der Struktur und Funktion von Zellen. So sind sie in Form von Phospholipiden Hauptbestandteile der Zellmembranen und ermöglichen somit die Existenz von Zellen und deren Kompartimentierung. Über die Zusammensetzung der Lipide beeinflussen sie zudem die Eigenschaften der Membranen, wie deren Fluidität und Krümmung. Weiterhin stellen Fettsäuren gebunden in Triacylglycerin den bedeutensten Speicher metabolischer Energie dar. Aufgrund seiner gegenüber Kohlenhydraten stärker reduzierten und wasserfreien Form liefert die Oxidation von einem Gramm Fett über sechsmal mehr Energie in Form von ATP als die Oxidation von einem Gramm Zucker (Berg, 2003).

Neben der Synthese komplexer Lipide und der Lieferung von Energie haben Fettsäuren weitere bedeutende Aufgaben in der Zellphysiologie.

So werden aus der mehrfach ungesättigten Arachidonsäure Eicosanoide gebildet, welche als Hormone die Immunreaktion und Entzündungsreaktion, die Tumorentstehung sowie die Blutgerinnung regulieren. Als Liganden für nukleäre Rezeptoren können Fettsäuren die Genregulation beeinflussen (Ducharme und Bickel, 2008). Zudem können Fettsäuren und aktivierte Acyl-CoAs an verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie PPARs, SREBP und NF-κβ, binden und so die Expression zahlreicher Gene regulieren (Grimaldi, 2010; Jump, 2011) sowie über Acylierung die Aktivität von Proteinen beeinflussen. In hohen intrazellulären Konzentrationen wirken freie Fettsäuren, besonders Arachidonsäure, lipotoxisch und können somit Apoptose induzieren (Cao *et al.*, 2000b).

Aus der Beteiligung von Fettsäuren an verschiedenen zellulären Prozessen wird ihre Bedeutung für die Homöostase der Zelle ersichtlich. Somit muss die Aufnahme und Verstoffwechselung von Fettsäuren durch die Zelle sorgfältig reguliert werden. Störungen im Fettstoffwechsel haben weitreichende medizinische Bedeutung für Krankheiten wie Adipositas, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Arteriosklerose. So wurden der Diabetes mellitus und die kardiovaskulären Erkrankungen 2008 in Deutschland, wie in allen westlichen Ländern, für etwa 50 % der Todesfälle verantwortlich gemacht und standen damit an der Spitze der Mortalitätsstatistiken (WHO, 2011). Mittlerweile wurde anerkannt, dass die Enzyme des Fettstoffwechsels wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Therapien sind (Bray und Tartaglia, 2000). Aus diesem Grund ist die sorgfältige Analyse der Enzyme und Mechanismen des Lipidstoffwechsels von hoher Bedeutung.

2.2 Acyl-CoA-Synthetasen in Säugetierzellen

2.2.1 Die katalysierte Reaktion

Fettsäuren sind reaktionsträge Moleküle und müssen daher aktiviert werden, um dem Metabolismus zur Verfügung zu stehen. Erst nach ihrer Aktivierung können sie zur Synthese komplexer Lipide oder zur Lieferung von Energie verwendet werden. Diese Reaktion wird durch die Acyl-CoA-Synthetasen katalysiert, welche die hydrophoben Fettsäuren über eine Thioesterifizierung mit Coenzym A in aktivierte hydrophile Acyl-CoA-Ester umwandeln.

Diese Umsetzung erfolgt in einer ATP-abhängigen, zweistufigen Reaktion. Als Zwischenprodukt entsteht ein enzymgebundenes Acyladenylat (Bar-Tana *et al.*, 1973a; Bar-Tana *et al.*, 1973b). Die Thioesterifizierung wird durch die Hydrolyse des gebildeten Pyrophosphats angetrieben (Kornberg und Pricer, 1953). Der gebildete Thioester ist eine sehr energiereiche und daher hochreaktive Verbindung.

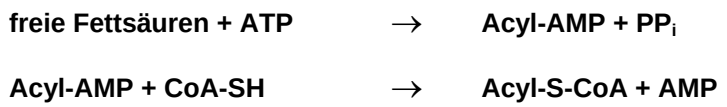

Abbildung 1: Reaktionsgleichung der durch Acyl-CoA-Synthetasen katalysierten Reaktion.
Die durch die Acyl-CoA-Synthetasen katalysierte Veresterung von freien Fettsäuren mit Coenzym A zu Acyl-CoA erfolgt in einer zweistufigen Reaktion. Im ersten Schritt reagiert die Fettsäure mit ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat (PP_i) zu einem Acyladenylat (Acyl-AMP). Im zweiten Schritt wird die Acylgruppe vom Acyladenylat auf das reduzierte Coenzym A (CoA-SH) übertragen und der energiereiche Thioester Acyl-CoA gebildet.

Bisher liegen nur Kristallstrukturen der bakteriellen Acyl-CoA-Synthetase FACS und einer Säugetier Acyl-CoA-Synthetase mit einer Spezifität für mittelkettige Fettsäuren (ACSM2A) vor. In Abbildung 2 ist der Reaktionsmechanismus der bakteriellen Acyl-CoA Synthetase dargestellt (Forneris und Mattevi, 2008). Diese ist ein Homodimer, welches in einer Membran verankert ist.

Die Fettsäure wird direkt aus der Lipiddoppelschicht durch einen hydrophoben Kanal ins katalytische Zentrum zwischen den beiden Monomeren geleitet und dort so ausgerichtet, dass die Carboxylgruppe in den hydrophilen Regionen liegt, wo ATP und Coenzym A gebunden werden. Diese werden sequentiell durch einen hydrophilen Kanal aus dem Cytosol aufgenommen. Die Fettsäure wird zunächst adenyliert und anschließend mit Coenzym A verestert. Durch die Konjugation mit dem hydrophilen Molekül Coenzym A wird die lipophile Fettsäure wasserlöslich und kann somit durch den hydrophoben Kanal ins Cytosol abgegeben, an Acyl-CoA-Bindeproteine gebunden und durch cytosolische beziehungsweise cytoplasmatisch orientierte Enzyme weiter umgesetzt werden.

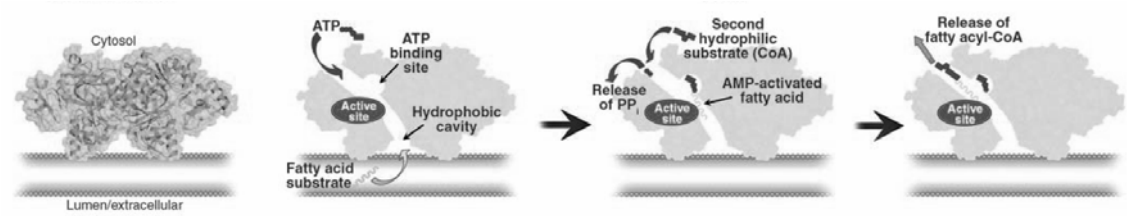

Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der bakteriellen Acyl-CoA-Synthetase FACS.
Die Fettsäure wird aus der Membran in das katalytische Zentrum zwischen den beiden Monomeren der Acyl-CoA-Synthetase transportiert. Die Carboxylgruppe der Fettsäure wird an den ATP- und CoA-bindenden Regionen platziert. Diese hydrophilen Substrate werden sequentiell durch einen hydrophilen Kanal aus dem Cytosol aufgenommen, durch welchen nach erfolgter Reaktion das Pyrophosphat und das Acyl-CoA wieder freigesetzt werden (Forneris und Mattevi, 2008).

Kochan *et al*. zeigten für die mittelketten Acyl-CoA-Synthetase, dass die zweistufige Reaktion durch Konformationsänderungen zwischen den beiden Domänen der einzelnen Monomere hervorgerufen wird. Das Enzym kann in einer adenylatbildenden Konformation und in einer thioesterbildenden Konformation vorliegen, unabhängig von der Bindung der Fettsäure aber abhängig vom gebundenen Cosubstrat (Kochan *et al*., 2009). Die Bindung von ATP führt zur Ausbildung der adenylatbildenden Konformation und der Katalyse des ersten Reaktionsschrittes. Nach der Hydrolyse des ATPs und der Freisetzung des Pyrophosphats erfolgt die Umlagerung zur thioesterbildenden Konformation und somit der zweite Reaktionsschritt, in welchem das Produkt Acyl-CoA gebildet wird.

2.2.2 Die Acyl-CoA-Synthetasen der Säugetiere

Acyl-CoA-Synthetasen werden von den prokaryotischen Bakterien über die eukaryotischen, einzelligen Hefen bis hin zum Säugetier in allen Organismen exprimiert. Säugetiere besitzen 26 Acyl-CoA-Synthetasen mit jeweils mehreren Spleißvarianten, welche mittels ihrer konservierten Aminosäuresequenzen identifiziert und anhand ihrer Substratspezifität klassifiziert werden. Alle diese Enzyme beinhalten zwei hochhomologe Regionen, das ATP-AMP-bindende Motiv und die FACS-Signatur (*Fatty-Acyl-CoA Synthetase signature*), welche wichtige Funktionen bei der Substratbindung besitzen (Watkins *et al.*, 2007).

Die am häufigsten in der Nahrung enthaltenen Fettsäuren besitzen mehr als 12 Kohlenstoffatome und werden durch die 13 Langketten-Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert. Diese können in drei Proteinfamilien eingeteilt werden. Die ACSL-Familie (ACSL1, 3-6) besteht aus fünf Enzymen und besitzt eine Substratspezifität für langkettige Fettsäuren mit 12 bis 20 Kohlenstoffatomen. Die FATP-Familie (FATP1-6), auch ACSVL genannt, aktiviert neben den langkettigen Fettsäuren auch sehr langkettige Fettsäuren mit mehr als 22 Kohlenstoffatomen. Darüber hinaus sind zwei Bubblegum Acyl-CoA-Synthetasen (ACSBG1-2) bekannt, welche ebenfalls sehr langkettige Fettsäuren aktivieren (Steinberg *et al.*, 2000). Die Entdeckung des ersten FATP erfolgte in einer Studie zur Identifikation von Proteinen, welche die Aufnahme von fluoreszierender Fettsäure erhöhten (Schaffer und Lodish, 1994). Daher wurde für die FATPs eine direkte Transportfunktion von exogenen Fettsäuren in die Zelle angenommen, wodurch sie als *Fatty Acid Transport Proteins* bezeichnet wurden. Jedoch wurde in weiteren Studien nach Überexpression der FATPs eine gesteigerte intrazelluläre Acyl-CoA-Synthetasen Aktivität nachgewiesen (Coe *et al.*, 1999; Pei *et al.*, 2004). Messungen der Enzymaktivität von gereinigtem FATP1 und FATP4 bestätigten ebenfalls, dass es sich bei den FATPs um Acyl-CoA-Synthetasen handelt (Hall *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005). Daher wird FATP4 auch als ACSVL (*ACS very long-chain*) bezeichnet.

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben die Expression und die subzelluläre Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen untersucht. Aufgrund der mRNA Expression in verschiedenen Geweben konnte gezeigt werden, dass sich die Acyl-CoA-Synthetasen in ihrer Gewebeverteilung unterscheiden, dass jedoch in einem Gewebe durchaus mehrere Enzyme gleichzeitig exprimiert werden (Heimerl *et al.*, 2006; Gimeno, 2007; Mashek *et al.*, 2007).

Auch bezüglich ihrer subzellulären Lokalisierung unterscheiden sich die verschiedenen Acyl-CoA-Synthetasen (Mashek *et al.*, 2007). Verschiedene Isoformen werden auf demselben Organell exprimiert, aber auch die Expression von einer Isoform auf mehreren Organellen wurde beschrieben (Lewin *et al.*, 2002). Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe lokalisierten alle FATP-Proteine sowie ACSL5 und ACSL6 im Endoplasmatischen Retikulum. ACSL1 wurde auf Mitochondrien detektiert, ACSL3 auf Lipidtröpfchen und ACSL4 im Cytosol und der Plasmamembran sowie im Endoplasmatischen Retikulum (Milger *et al.*, 2006; Becker, 2007; Großmann, 2011).

2.2.3 Die Acyl-CoA-Synthetase ACSL4

In der Natur existieren zwei verschiedene Isoformen von ACSL4, welche durch alternatives Spleißen entstehen (Piccini *et al.*, 1998; Meloni *et al.*, 2009): Eine ACSL4-Isoform mit einer Länge von 670 Aminosäuren, welche in dieser Arbeit ACSL4 genannt wird, und eine weitere Isoform, in dieser Arbeit M-ACSL4 genannt, mit einer Länge von 711 Aminosäuren. ACSL4 wurde erstmals aus der Nebenniere der Ratte kloniert (Kang *et al.*, 1997). Seine Expression ist in den steroidogenen Geweben Nebenniere, Ovar und Testis am höchsten. Es wird jedoch auch in Plazenta, Milz, Leber und dem Gastrointestinaltrakt exprimiert (Kang *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1998; Heimerl *et al.*, 2006). M-ACSL4 wird hingegen ausschließlich in neuronalen Geweben exprimiert (Piccini *et al.*, 1998). Eine Lokalisierung des ACSL4 wurde auf verschiedenen subzellulären Organellen beschrieben. Es besitzt keine Transmembrandomäne und ist folglich kein intrinsisches Membranprotein (Lewin *et al.*, 2002). Dennoch wurden Lokalisierungen auf den Peroxisomen und der Mitochondrien-assoziierten-Membran, den Mitochondrien und den Mikrosomen beschrieben (Lewin *et al.*, 2001; Lewin *et al.*, 2002). Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten eindeutig eine Lokalisierung des hier verwendeten ACSL4 auf der Plasmamembran sowie im Cytosol zeigen (Becker, 2007; Großmann, 2011). Die zusätzlichen Aminosäuren des M-ACSL4 bilden eine putative Transmembrandomäne. Eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum wurde vermutet (Meloni *et al.*, 2009), welche durch die eigene Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurde M-ACSL4 auf Lipidtröpfchen nachgewiesen (Großmann, 2011).

ACSL4 kann Fettsäuren einer Länge von 12 bis 22 Kohlenstoffatomen aktivieren, zeigt aber eine Substratspezifität für mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonat und Eicosapentaenoat (Kang *et al.*, 1997).

Für ACSL4 wurde in verschiedenen biologischen Prozessen eine Funktion nachgewiesen. So wurde beim Kolonkarzinom eine erhöhte Expression von ACSL4 festgestellt (Cao *et al.*, 2000b). Weiterhin wurde beschrieben, dass Überexpression von ACSL4 und COX-2 in EcR293-Zellen zu einer Abnahme der Arachidonsäurekonzentration und einer damit verbundenen verminderten Apoptose führten. Somit wurde vermutet, dass ACSL4 die Karzinogenese fördert (Cao *et al.*, 2000b). Basierend auf der Kodierung des ACSL4 auf dem X-Chromosom wurden Mutationen oder Deletionen dieses Gens für etwa 1 % der X-chromosomalen mentalen Retardierungen verantwortlich gemacht (Meloni *et al.*, 2002; Longo *et al.*, 2003).

Da M-ACSL4 vor allem im Kleinhirn und im Hippocampus exprimiert wird (Cao *et al.*, 2000a), könnte eine eingeschränkte oder fehlende M-ACSL4 Aktivität zu einer Arachidonsäure-induzierten Apoptose der Neuronen während der Gehirnentwicklung führen und so die mentale Retardierung bedingen (Meloni *et al.*, 2002). Reduktion der M-ACSL4 Expression führt zusätzlich zu Veränderungen im Aufbau der Dendriten (Meloni *et al.*, 2009). *In vitro* Versuche an Lipidvesikeln haben erst kürzlich gezeigt, dass ACSL4 und die Synthese von Arachidonyl-CoA eine Fusion von endocytischen Vesikeln erleichtern (Zhang *et al.*, 2011). Fusion von Vesikeln ist zur Übertragung von Neurotransmittern zwischen neuronalen Synapsen von essentieller Bedeutung. Daher kann fehlendes ACSL4 die Signalweiterleitung im Gehirn deutlich beeinträchtigen. Eine weitere Funktion besitzt ACSL4 in der Steroidogenese. Die Expression von ACSL4 wird in steroidogenem Gewebe durch das Stresshormon ACTH (Adrenokortikotropes Hormon) verstärkt (Cho *et al.*, 2000) und die Steroidhormonsynthese in Folge eines ACSL4-Mangels inhibiert (Maloberti *et al.*, 2007).

2.2.4 Die Acyl-CoA-Synthetase FATP4

Die Expression von FATP4 wurde in verschiedenen Geweben nachgewiesen. Neben Leber, Niere, Gehirn, Muskel, Herz und Fettgewebe wird es in der Epidermis und im Darm exprimiert (Fitscher *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1998; Stahl, 2004; Gimeno, 2007).

Die Funktion und die subzelluläre Lokalisierung des FATP4 sind umstritten. Eine Rolle von FATP4 als zentraler intestinaler Fettsäuretransporter wurde angenommen nachdem Stahl *et. al.* das Protein in der apikalen Plasmamembran von Enterozyten nachgewiesen hatten (Stahl *et al.*, 1999). Zusätzlich zur vermuteten Funktion als Transporter wurde eine Enzymfunktion von aufgereinigtem FATP4 als Acyl-CoA-Synthetase nachgewiesen, wobei FATP4 langkettige wie auch sehr langkettige Fettsäuren aktivieren konnte (Hall *et al.*, 2005).

Eine Funktion als direkter Fettsäuretransporter setzt eine Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran voraus. Allerdings wurde eine Lokalisierung des FATP4 auf dem Endoplasmatischen Retikulum in intestinalen Epithelzellen, Adipozyten und Muskelzellen überzeugend beschrieben (Milger *et al.*, 2006; Lobo *et al.*, 2007; Digel *et al.*, 2011).

Trotz der intrazellulären Lokalisierung des FATP4 konnte dessen Überexpression eine Erhöhung der Fettsäureaufnahme in die Zelle hervorrufen, so dass eine Lokalisierung an der Plasmamembran für die Aufnahme von Fettsäuren nicht notwendig erscheint (Milger *et al.*, 2006). Eine 60 Aminosäuren lange Domäne nahe dem N-Terminus des FATP4 wurde identifiziert, welche ausreichend ist um das Protein am Endoplasmatischen Retikulum zu lokalisieren. Entfernung dieser Region führt zu einer Expression im Cytosol sowie zu einem Verlust der Enzymaktivität (Milger *et al.*, 2006).

In Hautfibroblasten besitzt FATP4 eine wichtige Funktion als Acyl-CoA-Synthetase für sehr langkettige Fettsäuren (Jia *et al.*, 2007). Mäuse mit einer homozygoten Deletion des FATP4-Gens verstarben kurz nach der Geburt an einer restriktiven Dermatopathie. Die Haut war sehr dick und steif und so die Körper- und Gesichtsform der Tiere derart verändert, dass diese nicht trinken konnten und schließlich an Lungenversagen starben. Die Lipidzusammensetzung dieser Tiere war verändert und enthielt weniger Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Cholesterol sowie mehr Ceramide. Zudem war die Fettsäurezusammensetzung der Ceramide verändert, so dass diese weniger Cerotinsäure (26:0) und Hydroxy-Cerotinsäure enthielten als Ceramide von Kontrolltieren (Herrmann *et al.*, 2003). Dieser Phänotyp konnte durch Überexpression von FATP4 ausschließlich in der Haut ausgeglichen werden (Moulson *et al.*, 2007). Im Menschen rufen Mutationen des FATP4 eine angeborene Ichthyosis (*Ichthyosis Prematurity Syndrome*) hervor. Diese autosomal-rezessiv vererbbare Erkrankung bedingt ebenfalls Veränderungen des Hautbildes, welche von einem zu geringen Gehalt sehr langkettiger Fettsäuren begleitet werden (Klar *et al.*, 2009; Khnykin *et al.*, 2011).

Neben der Bedeutung von FATP4 in der Homöostase der Haut wurde ein Zusammenhang mit der Fettleibigkeit und der Insulinresistenz festgestellt (Doege und Stahl, 2006). So wurde in fettleibigen Menschen eine erhöhte FATP4 mRNA-Expression nachgewiesen (Gertow *et al.*, 2004b). Weiterhin wurde ein Polymorphismus identifiziert, der bei Heterozygotie mit einem geringeren Gewicht, geringeren Blutfetten sowie geringeren Insulinkonzentrationen assoziiert ist (Gertow *et al.*, 2004a). Aufgrund ihrer Eigenschaft die intestinale Fettsäureaufnahme zu beeinflussen, könnten FATP4-Inhibitoren zur Entwicklung von Strategien für die Behandlung von Fettleibigkeit und den damit verbundenen Erkrankungen genutzt werden (Bray und Tartaglia, 2000; Gimeno, 2007). Ein bereits identifizierter Inhibitor von FATP4 (4-Aryl-3,4-Dihydropyrimidin-2-(1H)-on) konnte die Aufnahme von Bodipy-Fettsäure vermindern, jedoch zeigten sich keine Auswirkungen auf den Lipidgehalt von Dünndarmgewebe (Blackburn *et al.*, 2006).

2.3 Aufnahme und Kanalisierung von Fettsäuren

2.3.1 Die zelluläre Fettsäureaufnahme

Obwohl die Aufnahme exogener Fettsäuren in die Zellen seit über 40 Jahren untersucht wird (Spector *et al.*, 1965), konnte der molekulare Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden und wird weiterhin diskutiert (Bonen *et al.*, 2007; Kampf und Kleinfeld, 2007). Prinzipiell ist die Aufnahme von Fettsäuren durch passive Diffusion über die Plasmamembran möglich, jedoch sind deren Ausmaß und Bedeutung für die Fettsäure-Aufnahme umstritten (Zakim, 2000; Stahl *et al.*, 2001; Hamilton *et al.*, 2002).

Eine Beteiligung von Proteinen an der Fettsäureaufnahme ist dahingegen sehr wahrscheinlich. Für den proteinvermittelten Transport sprechen die Sättigbarkeit und Hemmbarkeit der Fettsäureaufnahme (Abumrad *et al.*, 1984; Stremmel *et al.*, 1986; Abumrad *et al.*, 1998). Als Fettsäuretransporter werden das FABPpm (Stremmel *et al.*, 1985), das FAT/CD36 (Abumrad *et al.*, 1993) und die Familie der FATPs (Schaffer und Lodish, 1994) diskutiert. Allerdings zeigt keines dieser Proteine die Topologie eines klassischen Membrankanals. Als wirklicher Transporter wurde bisher nur das Membranprotein FadL in *E. coli* beschrieben. Dieses katalysiert zusammen mit der bakteriellen Acyl-CoA-Synthetase FadD die Fettsäureaufnahme über die Zellwand der Bakterien mittels vektorieller Acylierung, besitzt jedoch kein eukaryotisches Homolog (Black und DiRusso, 2003; DiRusso und Black, 2004).

Eine Erhöhung der Fettsäureaufnahme durch Überexpression der FATPs wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Schaffer und Lodish, 1994; Hirsch *et al.*, 1998; Mashek *et al.*, 2007). Neben einer Funktion von FATP4 als direkter Fettsäuretransporter (Doege und Stahl, 2006; Glatz *et al.*, 2010) wird ein indirekter Einfluss des Enzyms auf den intrazellulären Metabolismus als Ursache für die erhöhte Fettsäureaufnahme diskutiert (Pei *et al.*, 2004; Milger *et al.*, 2006; Mashek *et al.*, 2006a). Als treibende Kraft der Fettsäureaufnahme wird in diesem Zusammenhang die metabolische Nachfrage vermutet. Durch die FATP4-vermittelte Aktivierung der Fettsäuren wird deren Export aus der Zelle verhindert und die gebildeten Acyl-CoAs werden dem Stoffwechsel zugeführt. Es entsteht ein Fettsäuregradient über die Plasmamembran, welcher einen Influx von Fettsäuren verursacht (Pownall und Hamilton, 2003). Dieser Vorgang wird als *Metabolic trapping* bezeichnet.

2.3.2 Die Kanalisierungshypothese

In Säugetierzellen werden 13 verschiedene Acyl-CoA-Synthetasen exprimiert, welche alle dieselbe Reaktion katalysieren. Dabei werden in derselben Zelle mehrere Acyl-CoA-Synthetasen simultan exprimiert. Trotz ihrer funktionellen Redundanz besitzen die Acyl-CoA-Synthetasen unterschiedliche gewebespezifische Expressionen, subzelluläre Lokalisierungen, Substratspezifitäten und werden unterschiedlich reguliert. Dies deutet auf individuelle Funktionen der einzelnen Proteine hin (Mashek *et al.*, 2007).

Erste Hinweise, welche auf eine individuelle Funktion einzelner Acyl-CoA-Synthetasen schließen lassen, lieferten Untersuchungen unter Verwendung des Fettsäureanalogs Triacsin C. Dieses inhibiert die Acyl-CoA-Synthetasen ACSL1, ACSL3, ACSL4 und FATP4 (Tomoda *et al.*, 1987; Igal *et al.*, 1997; Van Horn *et al.*, 2005). In Folge waren einige Stoffwechselwege inhibiert während andere keine Inhibition zeigten. So wurde in humanen Fibroblasten und in primären Rattenhepatozyten durch Triacsin C die Inkorporation von exogenem Oleat in die Triacylglycerine deutlich vermindert, während die Menge der Phospholipide nahezu unverändert blieb. Gleichzeitig wurde die Umsetzung von Glycerin zu Neutrallipiden und Phospholipiden gleichermaßen verringert (Igal *et al.*, 1997; Muoio *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass die *de novo* Synthese und die Reacylierung von Glycerolipiden durch Triacsin C in unterschiedlicher Weise inhibiert werden und lässt vermuten, dass diese Stoffwechselwege funktionell getrennt sind und separate Acyl-CoA-Pools nutzen. Für die Triacsin C-sensitiven Acyl-CoA-Synthetasen wurde daher eine Rolle in der Fettsäureaktivierung für die *de novo* Lipidsynthese gefolgert, wohingegen Triacsin C-insensitive Enzyme der Reacylierung von Lysophospholipiden dienen könnten (Coleman *et al.*, 2002).

Um die genaue Funktion einzelner Acyl-CoA-Synthetasen zu analysieren, wurden zahlreiche *Gain of function* und *Loss of function* Studien durchgeführt.

In Rattenhepatozyten (McArdle-RH7777) überexprimiertes ACSL5 erhöhte die Oleataufnahme um 30 % und die Triacylglycerinsynthese um 42 %, während die Menge der gebildeten Phospholipide sowie die Fettsäureoxidation unverändert blieben (Mashek *et al.*, 2006b). Ebenso führte die Überexpression von ACSL1 in HepG2-Zellen zu einer vermehrten Umsetzung aufgenommenen Oleats in Triacylglycerin bei unveränderter Fettsäureoxidation (Parkes *et al.*, 2006).

In primären Rattenhepatozyten, welche ACSL1 überexprimierten, wurde exogenes Oleat hingegen, bei verminderter Synthese von Cholesterinestern, gleichbleibender Menger der Triacylglycerine und unveränderter Fettsäureoxidation, vermehrt in Diacylglycerin und Phospholipiden gebunden (Li *et al.*, 2006). Neben den ACSLs führt auch die Überexpression verschiedener FATPs zu Kanalisierungseffekten. So resultierte überexprimiertes FATP1 in HEK293-Zellen in einer vermehrten Umsetzung exogenen Oleats in Triacylglycerin und einer Abnahme der Konzentrationen des Sphingomyelins und des Cholesterins (Hatch *et al.*, 2002), während eine Spleißvariante des FATP2 bevorzugt Omega-3-Fettsäuren in Phosphatidylinositol umsetzte (Melton *et al.*, 2011).

Es wurden mehrere Studien durchgeführt, in denen ACSL1 in verschiedenen Organen der Maus spezifisch depletiert wurde. ACSL1-Defizienz im Herz führte zu einer verringerten Fettsäureoxidation und induzierte eine Hypertrophie des Herzens (Ellis *et al.*, 2011). Eine Kardiomyopathie wurde schon zuvor mit einer ACSL1-Defizienz und der damit verbundenen Akkumulation von Triacylglcerinen in Verbindung gebracht (Chiu *et al.*, 2001). Die verminderte Fettsäureoxidation wurde zudem für die adipozytenspezische ACSL1-Defizienz beschrieben, einhergehend mit einer Kälteintoleranz der entsprechenden Mäuse (Ellis *et al.*, 2010). ACSL1-Mangel in der Leber bedingte neben einer verminderten Fettsäureoxidation eine geringere Umsetzung exogener Fettsäure zu Triacylglycerin und eine veränderte Fettsäurezusammensetzung der Phospholipide (Li *et al.*, 2009).

Bezüglich der unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen zeigten Versuche der eigenen Arbeitsgruppe, dass transfizierte COS-Zellen, welche kurzzeitig mit fluoreszierender Fettsäure inkubiert wurden, diese aufnahmen und verstoffwechselten. Die Fluoreszenz war anschließend auf denselben Organellen zu detektieren, auf denen die jeweils überexprimierte Acyl-CoA-Synthetase lokalisiert war. Folglich wird vermutet, dass die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetase den Ort der initialen Metabolisierung bestimmt (Füllekrug, nicht veröffentlicht).

Die unterschiedlichen Effekte einzelner Acyl-CoA-Synthetasen sprechen für eine durch sie hervorgerufene Kanalisierung der Fettsäuren in bestimmte metabolische Richtungen. Diese Kanalisierung scheint gewebespezifisch zu sein und durch die subzelluläre Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen beeinflusst zu werden.

Aus den zuvor beschriebenen Ergebnissen wurde die in Abbildung 3 dargestellt Hypothese der Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen abgeleitet. Es wird postuliert, dass über die Plasmamembran aufgenommene und an Fettsäure-Bindeproteine gebundene Fettsäuren innerhalb der Zelle zu den einzelnen Organellen transportiert werden. Anschließend aktivieren auf den Mitochondrien lokalisierte Acyl-CoA-Synthetasen (ACSL1) die Fettsäuren für die nachfolgende Veresterung mit Carnitin, um sie für die Fettsäureoxidation verfügbar zu machen. Acyl-CoA-Synthetasen des Endoplasmatischen Retikulums (z.B. FATP4) aktivieren die Fettsäuren für die Synthese von Phospho- und Neutrallipiden. Auf den Lipidtröpfchen lokalisierte Enzyme bilden Acyl-CoA für die lokale Reacylierung lipolysierter Triacylglycerine sowie zur Synthese von Phospholipiden, welche den hydrophoben Kern der Lipidtröpfchen in Form einer Lipideinzelschicht umgeben (Abbildung 3A) (Digel *et al.*, 2009).

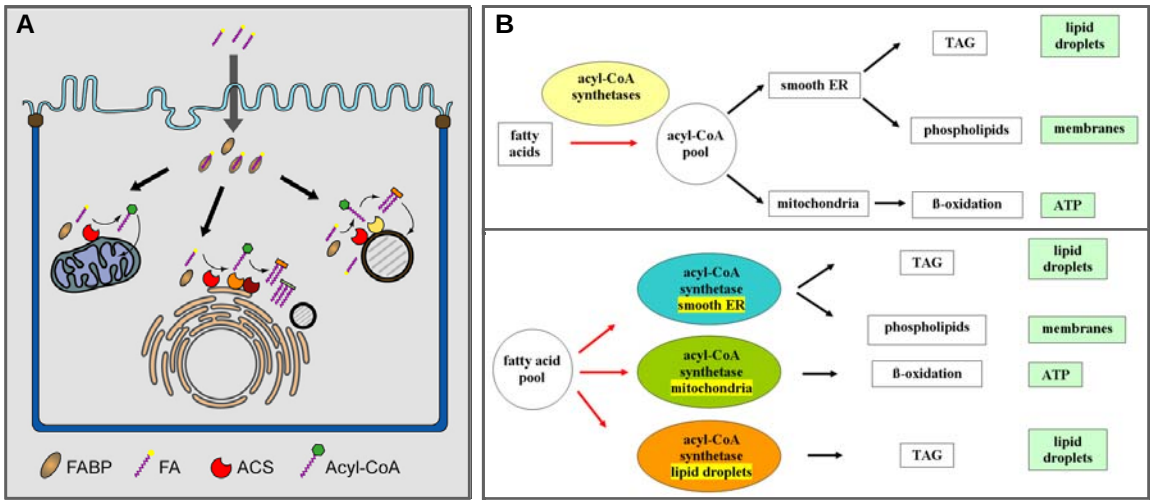

Abbildung 3: Hypothese über die Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen.

A: Die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen bestimmt den nachfolgenden Stoffwechsel der Fettsäuren. Die Fettsäuren (FA) werden über die Plasmamembran aufgenommen und an Fettsäure-Bindeproteine (FABP) gebunden. Die Acyl-CoA-Synthetasen (ACS) sind auf verschiedenen Organellen lokalisiert und aktivieren die Fettsäuren zu Acyl-CoAs. Diese werden durch Enzyme, welche auf denselben Membransystemen lokalisiert sind, weiter verstoffwechselt (Digel *et al.*, 2009).

B: Das klassische Modell der Fettsäureaktivierung (oben) und das hypothetische Modell der mit der Aktivierung verbundenen Kanalisierung der Fettsäuren (unten). Im klassischen Modell werden die Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert und die Acyl-CoAs in einem gemeinsamen Pool gespeichert. Die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen ist ohne Bedeutung. Alle weiteren Enzyme haben gleichermaßen Zugang zum Acyl-CoA-Pool. Bei der Kanalisierungshypothese bedingt die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen auf den verschiedenen Organellen eine Bildung von mehreren Acyl-CoA-Pools, welche am selben Membransystem lokalisiert sind wie die Acyl-CoA verbrauchenden Enzyme, z.B. Acyltransferasen. Der Mechanismus der Kanalisierung könnte folglich auf der räumlichen Nähe zwischen Acyl-CoA Synthese und Verbrauch basieren (Füllekrug, nicht veröffentlicht).

Als Mechanismus wird die räumliche Nähe zwischen Fettsäureaktivierung und Acyl-CoA-verbrauch angenommen (Abbildung 3B). Die klassische Lehrmeinung besagt, dass alle Acyl-CoA-Synthetasen unabhängig von ihrer Lokalisierung einen intrazellulären Acyl-CoA-Pool bilden, welcher allen Acyl-CoA-verstoffwechselnden Enzymen gleichermaßen zur Verfügung steht. Im Gegensatz dazu postuliert die Kanalisierungshypothese mehrere unabhängige Acyl-CoA-Pools. Diese werden von Acyl-CoA-Synthetasen am Ort ihrer Lokalisierung gebildet und bevorzugt durch die lipidmetabolisierenden Enzyme in räumlicher Nähe genutzt (Coleman *et al.*, 2002; Mashek *et al.*, 2007; Digel *et al.*, 2009). Alternativ könnten Multienzymkomplexe von Acyl-CoA-Synthetasen mit Acyltransferasen oder anderen Enzymen des Lipidstoffwechsels vorliegen. So konnte in 3T3L1-Adipozyten endogenes FATP1 mit der mitochondrialen 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase, einem Schlüsselenzym des Citratzyklus, koimmunopräzipitiert werden (Wiczer und Bernlohr, 2009). In L6E9-Myotuben und im Skelettmuskel der Ratte konnte eine Coimmuno-präzipitation von FATP1 mit der Carnitin-Palmitoyltransferase 1, welche für den Import der Fettsäuren in die Mitochondrien benötigt wird, gezeigt werden (Sebastian *et al.*, 2009).

2.4 Bedeutung von Phosphatidylinositol für den zellulären Stoffwechsel

Der Lipidpool tierischer Gewebe enthält mit 40 % bis 50 % Phosphatidylcholin als Hauptbestandteil, gefolgt von Phosphatidylethanolamin (20 % bis 30 %). Das dritthäufigste Lipid in Leber und Herz ist mit etwa 4 % das Phosphatidylinositol (Christies, 2000). In den Membranen des Gehirns ist zu ca. 10 % Phosphatidylinositol enthalten (Christies, 2011). 80 % der Phosphatidylinositole enthalten Stearinsäure an der sn-1-Position und Arachidonsäure an der sn-2-Position (Holub *et al.*, 1970; Christies, 2000). In der *de novo* Lipidsynthese wird durch die Phosphatidylinositol-Synthase im Endoplasmatischen Retikulum die Synthese von Phosphatidylinositol aus CDP-Diacylglycerin und Inositol katalysiert (Paulus und Kennedy, 1960). Dabei werden zunächst nur einfach und zweifach ungesättigte Fettsäuren verestert. Erst während der Reacylierung im Lands-Zyklus kann durch die Aktivitäten der Phospholipase A2 und der Lysophosphatidylinositol-Acyltransferase die Fettsäure an der sn-2-Position des Glycerins ausgetauscht und so Arachidonat gebunden werden (Yamashita *et al.*, 1997; Shindou *et al.*, 2009).

Phosphatidylinositol und die daraus gebildeten Moleküle haben vielfältige Bedeutungen für den zellulären Stoffwechsel, besonders im Hinblick auf die Signalübertragung (Piomelli *et al.*, 2007; Wymann und Schneiter, 2008).

Phosphatidylinositol kann durch die cytosolische Phospholipase A2 in Arachidonsäure und Lysophosphatidylinositol gespalten werden. Arachidonsäure wird durch die Aktivitäten der Prostaglandin-Synthase und der Cyclooxigenasen in Eicosanoide umgesetzt. Diese Familie, bestehend aus Prostaglandinen, Leukotrienen, Prostacyclinen und Thromboxanen, reguliert durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder an nukleäre Rezeptoren die Gewebehomöostase, Entzündungs- und Immunreaktionen sowie die Blutgerinnung (Wymann und Schneiter, 2008). Ebenso kann Lysophosphatidylinositol durch Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die Phosphorylierung spezifischer Enzyme wie der Proteinkinasen hervorrufen und so weiterführende Signalkaskaden auslösen (Christies, 2011).

Aufgrund seiner negativen Ladung kann Phosphatidylinositol über elektrostatische Wechselwirkungen Proteine, welche eine PH-Domäne besitzen, an der Membran binden, wodurch ebenfalls Signalkaskaden ausgelöst werden. Diese Proteine sind zum Beispiel Tyrosinkinasen, Phospholipasen oder Cytoskelettproteine (Wymann und Schneiter, 2008).

Durch die Phosphorylierung der Positionen 3, 4 und 5 des Inositols werden viele verschiedene Phosphatidylinositol-Phosphate gebildet. Aufgrund eines Anteil von nur 0,5 % bis 1 % an den Lipiden der inneren Lipidschicht der Plasmamembran wird ihnen jedoch keine Strukturfunktion zugeschrieben (Christies, 2011). Ein wichtiges Molekül ist das Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, welches durch die Phospholipase C zu Diacylglycerin und 1,4,5-Inositoltriphosphat umgesetzt wird und somit gleich zwei sekundäre Botenstoffe freisetzt. Das membrangebundene Diacylglycerin bindet die Proteinkinase C, welche wiederum über 100 verschiedene Zielproteine phosphorylieren und somit regulieren kann. Das wasserlösliche 1,4,5-Inositoltriphosphat stimuliert die Freisetzung von Calciumionen aus einem Speicher im Endoplasmatischen Retikulum. Als weitere sekundäre Botenstoffe regulieren diese, direkt oder indirekt vermittelt durch den Calciumsensor Calmodulin, eine Vielzahl von Enzymen, Pumpen und anderen Proteinen (Berg, 2003). So bewirkt der Anstieg der Calciumkonzentration zum Beispiel die Muskelkontraktion, den Glykogenabbau sowie die Membranfusion und somit die Ausschüttung von Neurotransmittern aus den synaptischen Vesikeln (Chung *et al.*, 1998).

2.5 Zielsetzung und experimentelles Vorgehen

Basierend auf der funktionellen Redundanz der Acyl-CoA-Synthetasen bei Vorliegen unterschiedlicher gewebespezifischer Expressionen, Substratspezifitäten und Regulationen, wurde die Kanalisierungshypothese formuliert (Coleman *et al.*, 2002). Diese postuliert, dass die räumliche Organisation der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität die metabolische Richtung der aktivierten Fettsäure beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung dieser Hypothese. Kann eine intrazelluläre Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen stattfinden?

In der Literatur sind viele Beispiele beschrieben, in denen die Überexpression oder die Depletion einer Acyl-CoA-Synthetase den zellulären Stoffwechsel beeinflusste, jedoch wurde die subzelluläre Lokalisierung der Enzyme bisher nicht ausreichend berücksichtigt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der metabolische Einfluss der Acyl-CoA-Synthetase FATP4 untersucht, die im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert wurde (Milger *et al.*, 2006). Hierzu wurden C2C12 und HEK293-Zellen verwendet, welche FATP4 stabil überexprimierten. Im zweiten Teil wurde der Einfluss von drei verschiedenen ACSL4-Proteinen auf den Lipidmetabolismus von transient überexprimierenden COS-Zellen untersucht. Es wurden die zwei nativen Varianten ACSL4, welches auf der Plasmamembran und im Cytosol lokalisierte, sowie M-ACSL4, welches im Endoplasmatischen Retikulum und auf den Lipidtröpfchen lokalisierte, analysiert. Zusätzlich wurde eine mitochondriell lokalisierte ACSL4-Mutante verwendet, so dass der Einfluss *derselben* Acyl-CoA-Synthetase auf *verschiedenen* Membransystemen analysiert werden konnte.

Zunächst wurden die einzelnen Zelllinien bezüglich ihrer Expression, Lokalisierung, Enzymaktivität und Fähigkeit die Fettsäureaufnahme zu steigern charakterisiert. Im Anschluss wurde der Lipidmetabolismus der Zellen mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Um die Umsetzung exogen zugefügter Fettsäuren in intrazelluläre Lipide zu untersuchen, wurden die Zellen für 15 min oder 3 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von ^{14}C-Fettsäuren inkubiert. Die Umsetzung der *de novo* synthetisierten Fettsäuren erfolgte durch Inkubation mit ^{14}C-Acetat. Abschließend wurde die Fettsäureoxidation anhand von säurelöslichen Metaboliten quantifiziert.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien und Materialien

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden aus dem Chemikalienlager, Zentralbereich Neuenheimer Feld, oder von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Steinheim).

3.1.1.1 Molekularbiologische Methoden

Chemikalie	Bezugsquelle
Ampli Taq-DNA-Polymerase	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
dNTP-Mix jeweils 10 mM	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler 1 kb / 50 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Quick T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot New England Biolabs, Frankfurt am Main
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

3.1.1.2 Zellbiologische Methoden

Chemikalie	Bezugsquelle
DMSO Hybri-Max	Sigma, Steinheim
Fetales Kälber Serum	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Fugene HD-Transfektionsreagenz	Roche Applied Science, Mannheim
Gelatine (Teleostan gelatin)	Sigma (G-7765), Steinheim
Glasplättchen 10 mm Durchmesser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Glutamax I 200 mM (100 x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hoechst 33342	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kulturmedium (DMEM, MEM)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Mowiol	Calbiochem, La Jolla, USA
Opti-MEM	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd	Riedel-de Haen, Seelze
Penicillin (10 U/µl) / Streptomycin (10 g/l)	Sigma, Steinheim

Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma, Steinheim
Puromycin	Clontech, Mountain View, USA
Saponin Quillaja Bark	Sigma, Steinheim
Sterilfilter 0,45 µm nitrozellulosefrei	Millipore, Schwalbach/Ts
Trypsin/EDTA (0,05%)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Zellkulturflaschen Cellstar (verschiedene Größen)	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturplatten Cellstar (verschiedene Größen)	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen 60 cm^2 Cellstar	Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschalen 25 cm^2 Nunclon surface	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen 10 cm^2 Falcon Easy Grip	BD Falcon, Franklin Lakes, USA
Zellsieb 40 µm	BD Falcon, Franklin Lakes, USA

3.1.1.3 Biochemische Methoden

Allgemeines

Chemikalie	Bezugsquelle
30 % Acrylamid/Bis Solution	Bio-Rad, München
ATP Dinatriumsalz	Sigma, Steinheim
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
BSA fettsäurefrei	Sigma (A-6003, A-4503), Steinheim
L-Carnitin	Sigma, Steinheim
Coenzym A Dinatriumsalz	Sigma, Steinheim
DC-Alufolie 20 x 20 cm Kieselgel 60 mit Konzentrierungszone 20 x 2,5 cm	Merck (1.05582.0001), Darmstadt
Milchpulver Non-Fat Dry Milk Blotting Grade Blocker	Bio-Rad, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Protran, Whatman, Dassel
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Ponceau-Rot	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml/2 ml (*Safe-Lock Tubes*)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme (WB) Hyperfilm ECL	Amershan Biosciences, Little Chalfont, UK
Röntgenfilme (DC) Kodak BioMax MS Film	Kodak, Rochester, USA
Ultima Gold	PerkinElmer, Waltham, USA
Ultrazentrifugen Reaktionsgefäße Microfuge Tube Polyallomer 1,5 ml	Beckman Coulter, Krefeld
Western Lightning Plus ECL Reagenz	PerkinElmer, Waltham, USA
Zählfläschchen für Flüssigszintillation Minis 2000	Zinsser Analytic, Frankfurt am Main
Zentrifugenröhrchen Polyallomer 11x60 mm (UZ)	Science Services GmbH, München

Lipide und radioaktive Substanzen

Lipid / Radioaktive Substanz	Bezugsquelle
[1-^{14}C]-Acetat	PerkinElmer (NEC084H001MC), Waltham, USA
Arachidonsäure	Sigma (A-9673), Steinheim
[1-^{14}C]-Arachidonsäure	PerkinElmer (NEC661050UC), Waltham, USA
Behensäure	Fluka/Sigma (11909), Steinheim
[1-^{14}C]-Behensäure	Hartmann Analytic (MC-2202), Braunschweig
Bodipy-Fettsäure 500/510	Invitrogen (D3823), Carlsbad, USA
Cardiolipin	Sigma (C-1649), Steinheim
Cholesterin	Sigma (C-8667), Steinheim
Cholesteryloleat	Sigma (C-9253), Steinheim
1,2 - und 1,3-Dioleoylglycerol	Sigma (D-8894), Steinheim
1,3-Diolein	Sigma (D-3627), Steinheim
Lysophosphatidylcholin	Sigma (L-5254), Steinheim
Lysophosphatidsäure	Sigma (L-7260), Steinheim
Monoolein	Sigma (M-7765), Steinheim
Oleoyl Coenzyme A	Sigma (O-1012), Steinheim
Ölsäure	Sigma (O-1383), Steinheim
[1-^{14}C]-Ölsäure	PerkinElmer (NEC317250UC), Waltham, USA
[^{3}H]-Ölsäure	Biotrend (ART0198), Köln
Phosphatidylcholin	Sigma (P-3017), Steinheim
Phosphatidylethanolamin	Sigma (P-9137), Steinheim
Phosphatidylglycerol	Sigma (P-8318), Steinheim
Phosphatidylinositol	Sigma (P-2517), Steinheim
Phosphatidsäure	Fluka (42491), Steinheim
Phosphatidylserin	Fluka (79-405), Steinheim
Triolein	Sigma (T-7140), Steinheim
Sphingomyelin	Sigma (S-0756), Steinheim

Lösungsmittel für die Dünnschichtchromatographie

Lösungsmittel	Bezugsquelle
1-Butanol 99,5 %	Grüssig (10211), Filsum
Choloroform Chromasolv Plus > 99,9 %	Sigma (650471), Steinheim
Diethylether p.a.	Merck (1.00921.1000), Darmstadt
Ethanol Rotipuran > 99,8 % p.a.	Roth (9065.2), Karlsruhe
Essigsäure Rotipuran 100 % p.a.	Roth (3738.1), Karlsruhe
n-Hexan Rotipuran > 99 % p.a.	Roth (4723.1), Karlsruhe
n-Heptan p.a.	Merck (1.04379.2500), Darmstadt
Methanol Rotipuran > 99,9 % p.a.	Roth (4627.2), Karlsruhe
Triethylamin > 99,5 % p.a.	Roth (X875.3), Karlsruhe

3.1.2 Bakterien und Zelllinien

3.1.2.1 Bakterien

Escherichia coli DH5α (Invitrogen, Frankfurt am Main)

Für Standardklonierungen wurde *E. coli* DH5α verwendet. Dieser Stamm ist positiv für Dam-Methylierung und Dcm-Methylierung und zeichnet sich durch einen großen Ertrag und eine hohe Reinheit der präparierten Plasmid-DNA aus.

Genotyp: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Escherichia coli K12 ER2925 (New England Biolabs, Frankfurt am Main)

E. coli K12 ist negativ für Dam-Methylierung und Dcm-Methylierung und kann somit mit Dam/Dcm-sensitiven Restriktionsenzymen geschnitten werden.

Genotyp: *ara-14 leuB6 fhuA31 lacY1 tsx78 glnV44 galK2 galT22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 R(zgb210::Tn10)TetS endA1 rpsL136 dam13::Tn9 xylA-5 mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR2*

3.1.2.2 Zelllinien

Zelllinie	Gewebe / Organismus	ATCC #	Herkunft
A431	Humanes epidermoid Karzinom	CRL-1555	C. Thiele, MPI-CBG, Dresden
COS-7	Nierenepithel der Grünen Meerkatze	CRL-1651	J. White, EMBL, Heidelberg
C2C12	Maus Myoblasten	CRL-1772	K. Neugebauer, MPI-CBG, Dresden
HEK293	Humanes embryonales Nierenepithel	CRL-1573	MPI-CBG, Dresden
HeLa	Humanes Zervixcarcinom	CCL-2	G. Warren, ICRF, London
MDCK	Hunde Nierenepithel	CCL-34	MPI-CBG, Dresden
Phoenix-gp	gag-pol exprimierende HEK293	SD-3514	A. Manninen, MPI-CBG, Dresden

3.1.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft	interne Nr.
ACSL4	hACSL4-Flag.pcDNA3, humanes ACSL4 (Lokalisierung: Plasmamembran und Cytosol)	R. Grossmann, Uniklinikum Heidelberg (Großmann, 2011)	JF629
ADRP-RFP	Humanes Adiphophilin, Lipidtröpfchen-Marker	C. Thiele, MPI-CBG, Dresden	JF397
GFP-FATP4	N-terminal GFP-markiertes FATP4	T. Herrmann, Uniklinikum Heidelberg	JF428
GFP-FATP4.pQ	Retrovirales Expressionsplasmid von GFP-FATP4	Diese Arbeit, Uniklinikum Heidelberg	JF739
HA2-FATP4.pcDNA3	N-terminal HA2-markiertes FATP4	J. Füllekrug, Uniklinikum Heidelberg	JF554
HA2-FATP4.pQ	Retrovirales Expressionsplasmid von HA2-FATP4.pcDNA3	Diese Arbeit, Uniklinikum Heidelberg	JF648
M-ACSL4	TMD-ACSL4.pcDNA3, humanes ACSL4 mit N-terminaler TMD (Lokalisierung: Endoplasmatisches Retikulum)	R. Grossmann, Uniklinikum Heidelberg (Großmann, 2011)	JF663
Mito-ACSL4	Tom20-ACSL4-Flag, humanes ACSL4 mit Sortierungssequenz von Tom20 (Lokalisierung: Mitochondrien)	D. Lehnen, Uniklinikum Heidelberg (Lehnen, 2009)	JF715
OCT-GFP	N-Terminus der Ornithin Carbamyl-Transferase (Protein der mitochondriellen Matrix)	H. McBride, Universität Ottawa, Kanada	JF489
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor	Stratagene, Santa Clara, USA	JF001
pPuro-Shuttle	Zwischenvektor für IRES-Puro Retroviren	J. Füllekrug, Uniklinikum Heidelberg	JF595
pQCXIP-J (pQ)	Retroviraler Expressionsvektor, modifiziertes pQCXIP-Plasmid (BD Biosciences Clontech, Heidelberg)	J. Füllekrug, Uniklinikum Heidelberg	JF596
VSV-G	Retrovirales Hüllprotein	MPI-CBG, Dresden	JF380

3.1.4 Primer

Primer und Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma, Steinheim bezogen.

Klonierprimer	**Sequenz (5' → 3')**
aFATP4_NotI	CTGAGCGGCCGCTCACAGCTTCTCCTCGCCTGC
sPacI_GFP	TCAGTTAATTAAACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
Sequenzierprimer	**Sequenz (5' → 3')**
CMV	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
EGFP-C	ATGGTCCTGCTGGAGTTCGT
EGFP-N	CGCCGTCCAGCTCGACCA
EGFP-N496	AGTTCACCTTGATGCCGTTC
sqF4_550	GCCTCAGCTATCTGTGAGATCC
sqF4_1250	GTTTGGTACGTGTCAATGAGGA

3.1.5 Antikörper

Antikörper	**Konz. (IF)**	**Konz. (WB)**	**Beschreibung**	**Referenz, Hersteller**
rbαACSL3 II	-	1/50.000	Polyklonaler AK, affinitätsgereinigt	C. Thiele, MPI-CBG, Dresden
msαADRP	-	1/200	Monoklonaler AK	Progen (610102), Heidelberg
msαβ-Aktin	-	1/100.000 bis 1/400.000	Monoklonaler AK	Sigma (A5441), USA
rbαCalnexin	-	1/40.000	Polyklonaler AK	Thermo Scientific (PA1-30197), Rockford, USA
rbαFATP4 (C3/5)	1/2.000	1/20.000	Polyklonaler AK, affinitätsgereinigt	J. Füllekrug, Uniklinikum Heidelberg (Milger *et al.*, 2006)
rbαFATP4 (Serum)	-	1/5.000	Polyklonaler AK, Serum	
msαFLAG BioM2	1/2.000	1/5.000 bis 1/40.000	Monoklonaler AK	Sigma (F-9291), Saint Louis, USA
rbαVDAC	-	1/10.000	Polyklonaler AK	Abcam (ab15895), Cambridge, UK
αms-Cy2	1/250	-	Cy2-konjugierter anti-Maus IgG	Dianova (715-225-151), Hamburg
αms-Cy3	1/1.000	-	Cy3-konjugierter anti-Maus IgG	Dianova (715-165-151), Hamburg
αms-HRP	-	1/20.000 bis 1/40.000	Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG	Dianova (711-035-003), Hamburg
αrb-HRP	-	1/20.000 bis 1/40.000	Peroxidase-konjugierter anti-Kanninchen IgG	Dianova (711-035-152), Hamburg

3.1.6 Kits

Kit	Hersteller
High Purity Plasmid Maxiprep	Marligen Biosciences, Ijamsville, USA
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren

3.1.7 Geräte

Gerät	Hersteller
Eraser	Raytest, Straubenhardt
Flüssigszintillationszähler LS 6500	Beckman, Fullerton, USA
Fluoreszenzmikroskop Olympus BX41, IX50	Olympus, Hamburg
Imaging Plate Typ BAS-IIIs	Fuji, Japan
Konfokales Laser-Scanning Mikroskop TCS SP2	Leica, Wetzlar
PCR Gerät GeneAmp 2400	PerkinElmer, Wellesley, USA
Phosphorimager: BAS-1500	FujiFilm, Düsseldorf
Photometer für Küvetten: Bio-Photometer	Eppendorf, Hamburg
Photometer für Mikrotiterplatten: PHOMO	Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld
Vakuumzentrifuge	Univapo UVC 150 H, Uniequip, Martinsried
Verstärkerfolie: Kodak BioMax TransScreen LE	Kodak, Rochester, USA
Zentrifugen: Kühlzentrifuge 5804 R, Rotoren: F 34-6-38, A-4-44 Tischzentrifuge 5415 R, Rotor: F 45-24-11 Ultrazentrifuge Optima™ Max, Rotor: TLA 55 Ultrazentrifuge XL-90, Rotor: SW41Ti Biofuge fresco, Rotor: 3325 Universal 16R, Rotor:1617	 Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Beckman Coulter, Krefeld Beckman Coulter, Krefeld Heraeus, Buckinghamshire, England Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

3.1.8 Software

Software	Hersteller
AIDA Image Analyzer V.4.27	Raytest, Straubenhardt
BASReader 3.14	Raytest, Straubenhardt
BioEdit: http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html	T. Hall, Ibis Biosciences, USA
Clone Manager 5	Scientific and Educational Software, USA
ClustalW2 http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html	European Bioinformatics Institute, England
ImageJ 1.44p: http://imagej.nih.gov.ij	National Institute of Health, Bethesda, USA

3.1.9 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden falls nicht anders angegeben mit Millipore-Wasser hergestellt und auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Die Angabe des pH-Wertes bezieht sich bei allen Lösungen auf Raumtemperatur. Soweit nicht anders vermerkt, sind Prozentangaben bei Feststoffen in der Einheit Gewicht pro Volumen (w/v) und bei Flüssigkeiten als Volumen pro Volumen (v/v) angegeben. Medien für die Kultivierung von Bakterien oder Zellen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

Lösungen für biochemische Methoden	
Dole's	Isopropanol : n-Heptane : konzentrierte Schwefelsäure (40:10:1)
FACS-Puffer	0,5 % BSA, 5 mM EDTA in PBS
2x HBS pH 6,95	280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 12 mM Glucose; 10 mM KCl; 1,5 mM Na_2HPO_4
Hepes-Sucrose 1	10 mM HEPES pH 7,4; 250 mM Sucrose
Hepes-Sucrose 2	20 mM HEPES pH 7,4; 250 mM Sucrose
ITB	250 mM KCl; 55 mM $MnCl_2$; 15 mM $CaCl_2$; 10mM PIPES/KOH pH 6,7
KTx	130 mM KCl; 25 mM Tris/HCl pH 7,4 ; 1 % Triton X-100
6x DNA Ladepuffer	38 % (w/v) Glycerol; 0,08 % Bromphenolblau; 0,08 % Xylen-Cyanol
4x Laemmli	250 mM Tris/HCl pH 6,8; 50 % (w/v) Glycerol; 8 % SDS; 0,02 % Bromphenolblau; 5 % β-Mercaptoethanol
Laufpuffer (WB)	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS
LB pH 7,0	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; für Platten 30 g Select Agar
Mowiol pH 8,5	4,8 g Mowiol; 12 g Glycerol; 12 ml H_2O; einige Stunden bei RT gelöst; 24 ml 0,2 M Tris/HCl pH 8,5; bei < 50 °C unter Rühren gelöst; 15 min 5.000 g zentrifugiert; Überstand aliquotiert
PBS pH 7,4	137 mM NaCl; 10mM Na_2HPO_4; 2,7 mM KCl; 2 mM KH_2PO_4
PBS (+Mg^{2+} +Ca^{2+})	0,5 mM $MgCl_2$; 0,9 mM $CaCl_2$ in PBS pH 7,4
4 % PFA	4 % PFA in PBS pH 7,4 bei < 70 °C unter Rühren gelöst; 100 µM $CaCl_2$; 100 µM $MgCl_2$
SG	0,01 % Saponin; 0,2 % Gelatine (w/v); 0,02 %Natriumazid; ad 1l PBS
SGB	0,1 % Saponin; 0,5 % Gelatine (w/v); 5 mg/ml BSA; 0,02 % Natriumazid; ad 1l PBS
Stopp-Mix	0,5 % BSA in PBS
TAE	40 mM Tris/Acetat pH 8,0; 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0
TBS_{TC} (ACS)	20 mM Tris/HCl pH 7,4; 130 mM NaCl
TBS Tween (WB)	10 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween-20
Transferpuffer (WB)	25 mM Tris; 190 mM Glycin; 0,1 % SDS; 20 % Methanol

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde 1986 erstmalig von Mullis *et al.* (Mullis *et al.*, 1986) beschrieben und in dieser Arbeit zur Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente angewendet, welche für Klonierungszwecke genutzt wurden. Durch die Auswahl spezifischer Primer wurden neue Schnittstellen für Restriktionsenzyme an den Fragmentenden generiert, um diese in die jeweiligen Vektoren einfügen zu können.

Der in der präparativen PCR eingesetzte Reaktionsansatz und das Protokoll waren wie folgt:

PCR-Ansatz	
0,2 µl	DNA (1 µg/µl)
1,0 µl	vorwärts Primer (10 µM)
1,0 µl	rückwärts Primer (10 µM)
1,0 µl	dNTPs (je 10 mM)
5,0 µl	10x Puffer
0,5 µl	AmpliTaq
41,3µl	Braun H_2O

PCR-Programm		
94 °C	5 min	
94 °C	30 s	25 Zyklen
62 °C	30 s	
72 °C	2,5 min	
72 °C	5 min	
Die Temperatur wurde auf 4 °C gehalten.		

3.2.1.2 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme (Meselson und Yuan, 1968) sind bakterielle Endonukleasen, welche nicht-eigene DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Der analytische Verdau im kleinen Volumen diente der Überprüfung von neu klonierten Plasmiden. Der präparative Verdau wurde durchgeführt, um spezifische DNA-Fragmente für eine spätere Verwendung zu erhalten.

Ein Verdau mit zwei Enzymen wurde wenn möglich als Doppelverdau durchgeführt. Die Wahl des Puffers und die Verwendung von BSA richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Waren zwei empfohlene Puffer nicht kompatibel, wurden die Verdaus sequentiell durchgeführt und die Umpufferung erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II Systems.

Für analytische Zwecke wurden 0,5-1 µg DNA und ein 5-facher Überschuss an Enzymen eingesetzt. Bei einem präparativen Verdau wurden 2-5 µg DNA und ein 5-10-facher Enzymüberschuss verwendet. Für die Berechnung der benötigten Enzymaktivität wurde zu Grunde gelegt, dass 1 U Enzym in einer Stunde 1 µg DNA verdaut. Der Restriktionsverdau erfolgte für 2 h bei 37 °C. Wurde der Ansatz nicht direkt auf ein Agarosegel aufgetragen, mussten die Enzyme bei 65 °C für 20 min inaktiviert werden.

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. In Abhängigkeit von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 1 % oder 2 % Agarose in 50 ml TAE-Puffer unter Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Zur Anfärbung der DNA wurden der Agaroselösung 3 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugesetzt bevor diese in eine Gelkammer gegossen wurde. Zur Beladung des Gels wurden die Proben mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V in TAE-Puffer. Die Fluoreszenz der Banden wurde unter UV-Licht analysiert. Bei präparativen Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell für eine weitere Verwendung ausgeschnitten.

3.2.1.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmiden

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit nach Angaben des Herstellers.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde als Mini- und als Maxipräparation durchgeführt. Für die Überprüfung frisch transformierter Klone wurden 3 ml Bakterienkultur verwendet und die Plasmid-DNA unter Verwendung des NucleoSpin Plasmid Kits präpariert. Plasmid-DNA zur Klonierung und Transfektion wurde mit Hilfe des High Purity Plasmid Maxiprep Systems aus 100 ml Bakterienkultur gewonnen. Die Aufreinigungen entsprachen dem jeweiligen Herstellerprotokoll.

3.2.1.5 Photometrische Messung von Nukleinsäuren

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch. Die Messungen wurden in UV-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm und in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die zu messenden Proben wurden 1/25 in Wasser verdünnt. Eine Extinktion von $E_{260} = 1$ entspricht 50 ng/µl dsDNA bzw. 40 ng/µl ssRNA. Durch die gleichzeitige Bestimmung der Extinktion bei 280 nm bzw. 230 nm und die Berechnung der $E_{260/280}$ bzw. $E_{260/230}$-Quotienten konnte eine Verunreinigung der Proben mit Proteinen ($E_{260/280} < 1{,}8$ für DNA, $< 2{,}0$ für RNA) bzw. Kohlenhydraten, Salzen oder Lösungsmitteln ($E_{260/230} < 2{,}0$) erkannt werden.

3.2.1.6 Dephosphorylierung von Vektoren

Um bei Klonierungen eine Religation des leeren Vektors nach dem Verdau mit nur einem Enzym zu verhindern, wurde der Vektor dephosphoryliert. Dabei wurde das am 5`-Ende stehende Phosphat abgespalten. Die verdaute und aufgereinigte DNA wurde mit 10x Phosphatase Puffer und 1 µl Antarctic Phosphatase (5 U/ml) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C für 10 min inaktiviert.

3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation mit der Quick T4 DNA Ligase wurden ca. 50 ng Vektor-DNA und die dreifache Masse an Insert-DNA eingesetzt. Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

$$Masse_{Insert}\,[\mathrm{ng}] = \frac{3\ x\ Masse_{Vektor}\,[\mathrm{ng}]\ x\ Größe_{Insert}\,[\mathrm{kb}]}{Größe_{Vektor}\,[\mathrm{kb}]}$$

Das Volumen aus Insert- und Vektor-DNA wurde mit H_2O auf 10 µl aufgefüllt und dem Ansatz 10 µl 2x Quick Ligation Buffer sowie 1 µl Quick T4 DNA Ligase zugesetzt.

Bei schwierigen Ligationen wurden verschiedene Verhältnisse von Vektor- und Insert-DNA in einem Volumen von 2 µl angesetzt, bevor 2,5 µl 2x Puffer und 0,5 µl Quick T4 DNA Ligase zugefügt wurden.

Um durch Religation des linearisierten Vektors bedingte negative Ligationsprodukte zu evaluieren, wurde eine Vektorkontrolle mitgeführt, in welcher die Insert-DNA durch H_2O ersetzt wurde. Die Ansätze wurden 10 min bei RT inkubiert und bis zur Transformation auf Eis gestellt.

3.2.1.8 Kultivierung von *Escherichia coli*

E. coli wurden auf festem oder in flüssigem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden bei 230 rpm geschüttelt. Zur Selektion plasmidhaltiger Kolonien wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Endkonzentration lag bei 100 µg/ml für Ampicillin und 50 µg/ml für Kanamycin.

3.2.1.9 Präparation chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Kompetenz ist die Fähigkeit von Bakterien fremde DNA aufzunehmen.

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien (Inoue *et al.*, 1990) wurden diese aus einem Glycerolstock auf eine LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur in LB-Medium inokuliert und 8 h bei 37 °C und 230 rpm inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Bakterienkultur (1/500, 1/1.000, 1/5.000) angesetzt und über Nacht bei RT und 230 rpm inkubiert. Sobald die Bakterienkultur eine OD_{600} von 0,55 bis 0,6 erreicht hatte, wurde diese für 10 min auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Bakterien wurden für 10 min bei 2.500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80 ml eiskaltem ITP-Puffer resuspendiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation bei 2.500 g für 10 min wurde das Bakterienpellet in 20 ml ITP-Puffer resuspendiert und 1,5 ml DMSO (Endkonzentration 7,5 %) zugegeben. Die Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Evaluation der Kompetenz wurden 50 pg und 5 pg des Plasmids pBluescript (JF007) in jeweils 50 µl Bakterien mittels Hitzeschock transformiert (3.2.1.10). Die Bakterien galten als ausreichend kompetent wenn 10^6 bis 10^8 Kolonien pro µg Plasmid-DNA gewachsen waren.

3.2.1.10 Hitzeschock-Transformation von *Escherichia coli*

50 µl kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und mit 5 µl Ligationsansatz bzw. 0,5 µl Plasmid-DNA für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock von 1 min bei 42 °C und eine Inkubation für 1 min auf Eis. Bei Vorliegen einer Amp-Resistenz konnten die Bakterien direkt auf vorgewärmte LB-Platten ausgestrichen werden. Nach Transformation eines Plasmids mit Kan-Resistenzgen wurden die Bakterien vor dem Ausstreichen für 40 min bei 37 °C in 800 µl LB-Medium schüttelnd inkubiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.11 Klonierungen

In dem folgenden Abschnitt werden die im Rahmen dieser Arbeit klonierten Plasmide aufgeführt und die Klonierungsstrategien dargelegt. Die verwendeten Primer sind unter 3.1.4, die Plasmide unter 3.1.3 aufgeführt. Die Klone wurden mittels Restriktionsverdau auf den korrekten Einbau des Inserts geprüft. PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung an die Sequencing Unit des MPI-CBG Dresden gesendet.

Klonierung von GFP-FATP4.pQ

In dieser Arbeit wurde die Kanalisierung von Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Synthetase FATP4 untersucht. Um die Lokalisierung leichter untersuchen zu können und um die Option zu ermöglichen in eventuell folgenden Versuchen die Expressionen des ER-lokalisierten GFP-FATP4 mit weiteren GFP-ACS mittels Zellsortierung auf ein vergleichbares Niveau einzustellen, wurden GFP-FATP4-Fusionsproteine verwendet.

Zur Herstellung stabiler Zelllinien wurde das Gen des GFP-FATP4 in den retroviralen Expressionsvektor pQCXIP-J (pQ) umkloniert. Mittels Polymerasekettenreaktion (3.2.1.1) wurde das Insert aus dem vorhandenen Plasmid GFP-FATP4 (JF428) unter Verwendung der Primer sPacI_GFP und aFATP4_NotI amplifiziert. Das entsprechende PCR-Produkt und der retrovirale Expressionsvektor pQCXIP-J (pQ) (JF596) wurden mit den Restriktionsenzymen PacI und NotI verdaut, mittels Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und anschließend ligiert.

Klonierung von HA2-FATP4.pQ

Das Plasmid für die transiente Transfektion von Zellen existierte vor Beginn der Arbeit. Für die Herstellung stabiler Zelllinien wurde das HA2-FATP4-Gen unter Verwendung des Zwischenvektors pPuro-Shuttle in den retroviralen Expressionsvekor pQCXIP-J (pQ) umkloniert. Das Plasmid HA2-pcDNA3 (JF554) sowie der Zwischenvektor pPuro.Shuttle (JF595) wurden mit den Enzymen HindIII und XhoI verdaut und die entsprechenden Insert- und Vektorfragmente miteinander ligiert. Das Produkt wurde mit den Enzymen PacI und EcoRI geschnitten. Die neu isolierten Inserts wurden in den zuvor gleichermaßen verdauten Vektor pQCXIP-J (pQ) (JF596) ligiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung aller hier angegebenen Zellen erfolgte falls nicht anders vermerkt in einem auf 37 °C temperierten Brutschrank bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit sowie 5 % CO_2. Die Kulturmedien und Rhythmen der Subkultivierung sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Zelllinie	Kulturmedium	Subkultivierung
A431	DMEM 4,5 g/l Glucose, GlutaMAX 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep	Bei Konfluenz (3 Tage) Verhältnis 1/8
COS-7	DMEM 4,5 g/l Glucose, GlutaMAX 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep	Bei Konfluenz (2-4 Tage) Verhältnis 1/6 bis 1/10
C2C12	DMEM 4,5 g/l Glucose, GlutaMAX 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep	Bei Subkonfluenz (2 Tage) Verhältnis 1/8
HEK293	DMEM 4,5 g/l Glucose, GlutaMAX 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep	Bei Subkonfluenz (2-3 Tage) Verhältnis 1/6 bis 1/8
HeLa	DMEM 1 g/l Glucose 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep 1 % Glutamax	Bei Konfluenz (3-4 Tage) Verhältnis 1/8
MDCK	MEM 4,5 g/l Glucose 5 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep 1 % Glutamax	Bei Postkonfluenz (3-4 Tage) Verhältnis 1/8 bis 1/10
Phoenix-gp	DMEM 4,5 g/l Glucose, GlutaMAX 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) PenStrep	Bei Subkonfluenz (2 Tage) Verhältnis 1/6

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zellen wachsen adhärent. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bis zur Ablösung mit Trypsin/EDTA bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von FKS-haltigem Kulturmedium inhibiert, die Zellen vereinzelt und im oben angegebenen Verhältnis ausgesät.

3.2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen auf einer T175 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Die subkonfluenten Zellen wurden abtrypsinisiert und in 20 ml kaltem Kulturmedium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 200 g wurde das Zellpellet in kaltem Kulturmedium, welchem 10 % (v/v) DMSO zugesetzt wurde, resuspendiert und auf vier Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden sofort in einem Gefäß mit Isopropanol bei –80 °C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung kryokonservierter Zellen wurden diese schnell bei 37 °C aufgetaut und in 20 ml frischem Kulturmedium aufgenommen. Nach dem Anheften der Zellen wurde das Kulturmedium gewechselt und die Zellen unter Standardbedingungen kultiviert.

3.2.2.3 Induktion von Lipidtröpfchen

Um die Biogenese von Lipidtröpfchen zu induzieren, wurden die Zellen über Nacht mit 50 µg/ml (177 µM) Ölsäure inkubiert. Diese wurde zuvor im Verhältnis 4:1 (Fettsäure:BSA) an BSA gebunden.

Für die Herstellung von 7 ml Induktionsmedium wurden 17,5 µl Ölsäure-Lösung (20 mg/ml bzw. 71 mM in Chloroform) unter einem Stickstoffstrom evaporiert. Der Ölsäurefilm wurde in 60 µl 25 mM NaOH aufgenommen und 387 µl 800 µM auf 37 °C vorgewärmtes, fettsäurefreies BSA in PBS zugegeben. Durch Schütteln bei 37 °C für 10 min wurden letzte Ölsäurepräzipitate gelöst und im Folgenden 6,6 ml Kulturmedium hinzugefügt. Bei transfizierten Zellen wurde im Rahmen des Mediumwechsels nach der Transfektion das Induktionsmedium auf die Zellen gegeben und diese über Nacht kultiviert. Bei untransfizierten Zellen erfolgte der Mediumwechsel am Abend vor dem Versuch.

3.2.2.4 Transiente Transfektion mittels Lipofektion

Unter transienter Transfektion wird das zeitweilige Einbringen genetischen Materials in eukaryotische Zellen verstanden. In dieser Arbeit wurden die Zellen mittels Lipofektion transfiziert, welche auf der Fusion von Liposomen-DNA-Komplexen mit der Plasmamembran basiert. Als Transfektionsreagenz wurde Fugene HD verwendet.

Die zu transfizierenden Zellen wurden einen Tag zuvor so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 60-80 % konfluent waren. Eine Stunde vor der Transfektion wurde antibiotikafreies Medium auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz richtete sich nach der zu transfizierenden Fläche und war, falls nicht anders angegeben, wie folgt:

	10 cm2	**4 cm2**
OptiMEM	100 µl	40 µl
DNA	2 µg	0,8 µg
Fugene HD	10 µl	4 µl

Der für die Transfektion der verschiedenen ACSL4-Proteine verwendete Transfektionsansatz ist in 4.2.2.1 aufgeführt.

Der Transfektionsansatz wurde gut gemischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer in der Regel vierstündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel zu antibiotikafreiem Medium. Der Versuch erfolgte 24 h nach der Transfektion.

3.2.2.5 Stabile Transfektion mittels retroviraler Transduktion

Prinzip des MMLV retroviralen Systems

Das MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) retrovirale System basiert auf der Phoenix-gp Zelllinie, welche die retroviralen gag/pol Gene exprimiert und mit verschiedenen viralen Hüllproteinen pseudotypisiert werden kann (Swift *et al.*, 2001).

Für die Generierung von Retroviren wurden die Phoenix-gp-Zellen mit retroviralen Plasmiden transfiziert. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass die MCS und ein Resistenzgen von 5' und 3' LTRs flankiert werden, welche die stabile Integration der dazwischen liegenden Gene in das Genom der Zielzellen ermöglichen. Der 5' LTR folgt das Signal Psi, welches für die Verpackung des Transkripts in die retroviralen Partikel verantwortlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der retrovirale Expressionsvektor pQCXIP-J verwendet. Dieser wurde mit einem Plasmid cotransfiziert, welches für das Glykoprotein des *Vesicular stomatitis* Virus (VSV-G) kodiert. VSV-G dient als Hüllprotein und fördert die Fusion der retroviralen und zellulären Membranen, indem es mit Phospholipiden der Plasmamembran der Zielzellen interagiert. VSV-G ist bei längerer Exposition toxisch für die Phoenix-gp Zellen und muss daher transient exprimiert werden. Die von den Phoenix-gp-Zellen nach Transfektion produzierten Retroviren enthielten neben dem Puromycinresistenzgen das jeweilige Expressionsgen sowie die gag/pol/env-Proteine, jedoch nicht deren Gene. Auf diese Weise waren die erzeugten Retroviren für humane Zellen infektiös aber reproduktionsinkompetent. Nach Infektion der Zielzellen integrierten die Retroviren ihre Gene stabil in das Genom sich teilender Zielzellen, welche dann über ihre Puromycinresistenz selektiert wurden.

Die Produktion von Retroviren und die Transduktion von Zellen unterliegen den S2-Richtlinien.

Calciumphosphat Präzipitation

Die Calciumphosphat Präzipitation beruht auf der Bildung von DNA-Calciumphosphat-Mischpräzipitaten, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden. Sie wurde zur transienten Transfektion von Phoenix-gp-Zellen angewendet.

Zwei Tage vor der Transfektion wurden $1{,}2*10^6$ Phoenix-gp-Zellen in Standard-Kulturmedium auf 60 cm^2-Schalen ausgesät, so dass diese am Tag der Transfektion zu 80 % konfluent waren. Kurz vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel zu Standard-Kulturmedium.

Für eine 60 cm² Zellkulturschale mit 10 ml Medium wurden 4,5 µg pVSV-G, 13,5 µg des retroviralen Expressionsplasmids, 132 µl 1 M $CaCl_2$ und H_2O gemischt, so dass das Endvolumen 540 µl betrug. Dazu wurde das H_2O vorgelegt bevor die DNA und das $CaCl_2$ zugefügt wurden. Unter starkem Vortexen wurden 540 µl 2x HBS tropfenweise hinzugegeben.

Der Transfektionsansatz wurde 5 min bei RT inkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Diese wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. 16 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel zu Standard-Kulturmedium. Nach weiteren 8 h erfolgte ein Mediumwechsel zu 5 ml Medium für die Virusproduktion (DMEM 1 g/l Glucose, 10 % FKS, 1 % Glutamax). Die Zellen wurden daraufhin bei 32 °C inkubiert.

Ernte der Retroviren

Beginnend 24 h nach der Inkubation der transfizierten Phoenix-gp-Zellen bei 32 °C wurden die von den Zellen in das Medium abgegebenen Retroviren bis zu sechs Tage nach der Transfektion geerntet. Zu diesem Zweck wurde jeweils das Medium abgenommen und 5 ml frisches Medium für die Virusproduktion auf die Zellen gegeben. Das Medium wurde durch einen nitrocellulosefreien 0,45 µm Sterilfilter in Kryoröhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80 °C.

Transduktion der Zielzellen

Die zu transduzierenden Zellen wurden 24 h vor der Infektion im Verhältnis 1/20 von einer konfluenten Kultur auf 4 cm^2-Schalen ausgesät. Zur Transduktion wurde das Medium abgesaugt und 500 µl retroviraler Überstand mit 4 µg/ml Polybrene (Stock: 4 mg/ml in PBS) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 32 °C. Nach einem Wechsel zu normalem Kulturmedium 24 h nach der Infektion wurden die Zellen für weitere 24 h bei 37 °C inkubiert und hatten nun eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Neben den zu transduzierenden Zellen wurden untransduzierte Wildtyp-Zellen als Kontrolle mitgeführt.

Für die Selektion wurden die Zellen abtrypsinisiert und in Kulturmedium mit 4 µg/ml Puromycin (Stock: 400 µg/ml in PBS) auf 10 cm^2-Schalen ausgesät. Das Selektionsmedium wurde täglich gewechselt bis die Kontrollzellen vollständig abgestorben waren. Anschließend wurden die verbliebenen, erfolgreich transduzierten Zellen in normalem Medium kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden sie auf die jeweils nächst größeren Zellkulturflaschen umgesetzt und anschließend kryokonserviert (3.2.2.2).

3.2.2.6 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät, so dass sie zum Zeitpunkt der Immunfluoreszenz subkonfluent waren. Gegebenenfalls wurden die Zellen einen Tag nach der Aussaat mit dem gewünschten Plasmid transfiziert (3.2.2.4).

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS und einmaligem Waschen mit SG wurden die Zellen 10 min mit SGB permeabilisiert und geblockt. Die Glasplättchen wurden auf einen 20 µl Tropfen des Primärantikörpers in SGB gelegt und in feuchter Atmosphäre 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Glasplättchen auf eine 24-Well-Platte transferiert und dreimal mit SG gewaschen. 250 µl des in SGB verdünnten Sekundärantikörpers wurden pro Well hinzugegeben und 1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Dem Sekundärantikörper wurde der Hoechst-Farbstoff (1 mg/ml in H_2O) zur Kernfärbung in einer Verdünnung von 1/1.000 zugesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde zweimal mit SG und zweimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden die Glasplättchen in Mowiol auf Objektträger eingebettet. Die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind unter 3.1.4 zusammengefasst.

3.2.2.7 Analyse der Expression und Fettsäureaufnahme per Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur schnellen Analyse großer Zellzahlen. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt und dabei auf Größe, Granularität und Fluoreszenz untersucht. Zudem besteht die Möglichkeit Zellen nach ihren Fluoreszenzeigenschaften zu sortieren. Dazu wird der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen, die jeweils eine Zelle enthalten, aufgebrochen. Tröpfchen, welche eine Zelle mit den ausgewählten Fluoreszenzeigenschaften enthalten, werden elektrisch aufgeladen und in einem elektrostatischen Feld abgelenkt und aufgefangen.

Im Rahmen der in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurde die Durchflusszytometrie zum Nachweis der Expression von GFP-FATP4 und zur Messung der Aufnahme von fluoreszierender Bodipy-Fettsäure durchgeführt. Die Durchführung der Analysen erfolgte durch D. Stefan vom Immunologischen Institut der Universität Heidelberg. Es wurde das FACSscan Durchflusszytometer von BD Bioscience verwendet.

Die Analyse der Expression wurde mit stabil transfizierten GFP-FATP4.HEK293, die Aufnahme fluoreszierender Bodipy-Fettsäure mit stabil transfizierten FATP4.C2C12 durchgeführt. Für die reine Analyse dieser Zellen wurde eine Zellzahl von $1*10^6$ Zellen eingesetzt. Entsprechend wurden die Zellen einen Tag vor der Messung auf zwei 10 cm^2-Schalen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die FATP4.C2C12 für 1 h in FKS-freiem DMEM ausgehungert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS ($+Mg^{2+}$ $+Ca^{2+}$) gewaschen. Es folgte eine Inkubation der adhärenten Zellen mit 2 µM Bodipy-Fettsäure für 2 min. Diese war im Verhältnis 1:1 an fettsäurefreies BSA gekoppelt und wurde in PBS ($+Mg^{2+}$ $+Ca^{2+}$) gelöst. Die Zellen wurden erneut in PBS ($+Mg^{2+}$ $+Ca^{2+}$) gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Schale gelöst. Das Trypsin wurde durch Resuspension der Zellen in FKS-haltigem DMEM inhibiert und die Zellen anschließend zweimal in PBS ($+Mg^{2+}$ $+Ca^{2+}$) gewaschen. Es folgte eine Fixierung der Zellen für 20 min in 4 % PFA. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 0,5 ml FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung dunkel und auf Eis gelagert. Die GFP-FATP4.HEK293 konnten direkt fixiert, gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen werden.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes. In dieser Arbeit wurde ein diskontinuierliches System verwendet. Zunächst wurde das Trenngel, welches 8 % Acrylamid enthielt, zwischen zwei Glasplatten mit einer Schichtdicke von 1 mm gegossen. Nach dessen Polymerisierung wurde das fünfprozentige Sammelgel gegossen und die Kämme zur Bildung der Auftragstaschen eingefügt.

Trenngel (8 %)		Sammelgel (5 %)	
2,6 ml	H_2O	1,4 ml	H_2O
1,0 ml	2 M Tris pH 8,8	0,6 ml	0,5 M Tris pH 6,8
1,3 ml	Acrylamid 30 %	425,0 µl	Acrylamid 30 %
50,0 µl	10 % SDS	25,0 µl	10 % SDS
50,0 µl	10 % APS	25,0 µl	10 % APS
5,0 µl	TEMED	2,5 µl	TEMED

Zellpellets wurden mit 2x Laemmli-Puffer versetzt, Lysate mit dem gleichem Volumen 4x Laemmli-Puffer. Die Proben wurden für 5 min unter Schütteln auf 95 °C erhitzt, gegebenenfalls mit 2x Laemmli-Puffer verdünnt und jeweils gleiche Endvolumina aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 V bis die Lauffront aus Bromphenolblau unten aus dem Gel heraus gelaufen war.

3.2.3.2 Western-Blot

Transfer der Proteine

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im *Semidry*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurden Filterpapier und die Membran in Transferpuffer äquilibriert. Drei Lagen Filterpapier, das Trenngel, die Membran und weitere drei Lagen Filterpapier wurden luftblasenfrei in die Transferapparatur geschichtet. Der Transfer der Proteine von dem Gel auf die Membran erfolgte in 1 h bei 100 mA pro Gel. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde eine Proteinfärbung mit Ponceau-Rot durchgeführt. Die Membran wurde hierfür 5 min in dem Farbstoff bei RT schwenkend inkubiert und anschließend mit H_2O entfärbt und eingescannt.

Immunnachweis

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde die Membran für 40 min in 2 % fettfreiem Milchpulver in TBS-Tween geschwenkt. Die Primärantikörper wurden entsprechend der in Kapitel 3.1.4 angegebenen Verdünnungen in 2 % Milchpulver in TBS-Tween angesetzt. Einzige Ausnahme bildete der msαADRP Antikörper, welcher in 2 % fettsäurefreiem BSA angesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte schwenkend für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde die Membran innerhalb von 15 min viermal mit TBS-Tween gewaschen. Die peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper wurden in 2 % Milchpulver (bei msαADRP in 2 % BSA) in TBS-Tween angesetzt und schwenkend für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf der Membran inkubiert bevor diese erneut viermal mit TBS-Tween gewaschen wurde.

Für die Chemolumineszenz-Reaktion wurden gleiche Volumina des Luminol-Reagenz und der Wasserstoffperoxid-Lösung gemischt und für 1 min auf der Membran inkubiert bevor die Membran auf Röntgenfilmen entwickelt wurde. Die Quantifizierung der Signale wurde mit ImageJ durchgeführt.

3.2.3.3 Subzelluläre Fraktionierung

Alle Fraktionierungen wurden unter Verwendung gekühlter Lösungen auf Eis durchgeführt.

Fraktionierung in Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum

COS-Zellen wurden auf 25 cm^2-Schalen ausgesät und transient transfiziert (3.2.2.4), so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Fraktionierung subkonfluent waren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in 2 ml frischem PBS mit einem Gummiwischer geerntet. Nach Zentrifugation bei 400 g und 4 °C für 5 min wurde das Pellet in 500 µl HEPES-Sucrose 1-Puffer aufgenommen und durch 10-maliges Pipettieren mit einer 1 ml-Spitze resuspendiert.

Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch ca. zehnmaliges Aufziehen und Herauspressen der Zellsuspension mit einer 1 ml Spritze durch eine Kanüle mit einem Durchmesser von 0,7 mm (G22). Der Aufschluss wurde lichtmikroskopisch überprüft und so oft wiederholt bis nur noch 10 % intakte Zellen zu erkennen waren. Das Homogenat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf 1 ml mit HEPES-Sucrose1-Puffer aufgefüllt.

Durch Zentrifugation bei 500 g und 4 °C für 5 min wurde der postnukleäre Überstand gewonnen. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. 900 µl des zweiten postnukleären Überstandes wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert, so dass die Mitochondrien als ein gelbliches Pellet gewonnen wurden. 800 µl des postmitochondriellen Überstandes wurden in ein 1,5 ml Ultrazentrifugen-Reaktionsgefäß überführt. Ultrazentrifugation bei 112.000 g und 4 °C über 1 h in einem TLA55-Rotor lieferte das Endoplasmatische Retikulum im Pellet und das Cytosol im Überstand.

Fraktionierung in Lipidtröpfchen und Endoplasmatisches Retikulum

Die Fraktionierung in Endoplasmatisches Retikulum und Lipidtröpfchen wurde mit COS-Zellen, welche die membrangebundene Acyl-CoA-Synthetase M-ACSL4 (JF663) überexprimieren, durchgeführt. Es erfolgten parallel eine Fraktionierung nach Induktion von Lipidtröpfchen (3.2.2.3) und eine Fraktionierung ohne Induktion von Lipidtröpfchen.

Insgesamt wurden für jeden Fraktionierungsansatz zweimal $1{,}2*10^6$ Zellen auf 60 cm^2-Schalen und jeweils zweimal $0{,}5*10^6$ Zellen auf 25 cm^2-Schalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden jeweils eine 25 cm^2-Schale mit M-ACSL4 (10 µg JF663, 0,5 ml OptiMEM, 50 µl Fugene HD) und eine weitere 25 cm^2-Schale mit dem Lipidtröpfchen-Protein ADRP (5 µg JF397, 0,25 ml OptiMEM, 25 µl Fugene HD) transfiziert (3.2.2.4). 8 h nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel. Auf die Schalen eines Fraktionierungsansatzes wurde Induktionsmedium für Lipidtröpfchen gegeben, die Zellen des zweiten Ansatzes wurden in normalem Medium weiter kultiviert.

Nach Kultivierung der Zellen über Nacht hatten die Zellen Postkonfluenz erreicht. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und in frischem PBS geerntet. Die jeweiligen Zellen ohne und mit Induktion von Lipidtröpfchen wurden in einen gemeinsamen Ansatz überführt (2x 60 cm^2 WT, 1x 25 cm^2 M-ACSL4 und 1x 25 cm^2 ADRP) und bei 200 g und 4 °C für 5 min pelletiert. Nach Resuspension in 1 ml HEPES-Sucrose 2-Puffer erfolgte der Aufschluss der Zellen wie oben beschrieben.

Durch Zentrifugation bei 1.000 g und 4 °C für 5 min wurde der postnukleäre Überstand gewonnen. 800 µl des postnukleären Überstandes wurden auf 1,1 M Sucrose eingestellt und in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt. Die Probe wurde mit 2,8 ml HEPES-Sucrose 2-Puffer überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einem SW 41Ti-Rotor bei 100.000 g und 4 °C für 18 h bei voller Beschleunigung und ohne Bremse.

Anschließend wurden von dem Gradienten von oben 4 Fraktionen abgenommen. In der obersten Fraktion (LD: 0,6 ml) waren die Lipidtröpfchen enthalten, die als ein milchiger Schleier auf dem Gradienten zu erkennen waren. Es folgte eine Zwischenfraktion (Z: 1 ml) vor den flotierenden Membranen, welche die Phasengrenze enthielten (FM: 1,5 ml) und den schweren Membranen inklusive ER (SM: 0,9 ml).

3.2.3.4 Methanol-Präzipitation von Proteinen

Die Methanol-Präzipitation diente der Aufreinigung von Proteinen aus der subzellulären Fraktionierung, um diese anschließend mittels Western-Blot analysieren zu können. Für Arbeiten mit Lösungsmitteln wurden ausschließlich Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (*Safe-Lock Tubes*) verwendet.

Zu 400 µl wässriger Probe wurden 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gegeben und stark geschüttelt. Bei Probenvolumen von weniger als 400 µl wurden diese mit H_2O auf 400 µl aufgefüllt. Mittels Zentrifugation für 5 min bei 13.000 g und RT wurden die wässrige und die organische Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen ohne die proteinhaltige Interphase zu zerstören. 300 µl Methanol wurden zugefügt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die präzipitierten Proteine an der Luft getrocknet bevor sie mit Laemmli-Puffer versetzt wurden. Sehr kleine Proteinmengen konnten nicht mit dem Auge erkannt werden, waren aber dennoch mittels Western-Blot nachweisbar.

3.2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure

Die Proteinbestimmung der Zelllysate aus Enzymaktivitätsversuchen (3.2.3.6) wurde mit Bicinchoninsäure durchgeführt, welche mit der zur Lyse verwendeten Konzentration an Triton X-100 kompatibel ist. Diese Methode beruht darauf, dass Proteine zweiwertiges Kupfer zu einwertigem Kupfer reduzieren, welches mit Bicinchoninsäure violette Komplexe bildet, deren Absorption äquivalent zur Proteinmenge ist.

Zur Erstellung einer Eichgerade wurden verschiedene BSA-Konzentrationen von 0 µg bis 12 µg in 25 µl des entsprechenden Puffers als Standards eingesetzt. Die Proben wurden für die Messung 1:4 verdünnt, so dass die gemessene Extinktion der Proben durch die Eichgerade abgedeckt wurde.

Von den Standards und den entsprechend verdünnten Proben wurden jeweils 25 µl in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Platte vorgelegt. Die Bicinchoninsäure wurde 40:1 mit einer 4 % Kupfersulfat-Lösung versetzt und 200 µl zu jeder Probe gegeben. Die Mikrotiterplatte wurde 30 min bei 60 °C auf einem Heizblock inkubiert und anschließend 30 min bei RT abgekühlt. Der Farbumschlag von grün nach violett wurde bei 562 nm photometrisch gemessen.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten, die durch Lyse mit NaOH gewonnen wurden, erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Diese Methode beruht darauf, dass das im Bradfordreagenz enthaltene Coomassie Blue G-250 im sauren Milieu mit den basischen und aromatischen Seitenketten von Proteinen Komplexe bildet. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum äquivalent zur enthaltenen Proteinkonzentration von rötlich-braun zu blau.

Zur Erstellung einer Eichgerade wurden verschiedene BSA-Konzentrationen in 1 N NaOH als Standards eingesetzt. Die Proben wurden gegebenenfalls verdünnt, so dass die gemessene Extinktion der Proben durch die Eichgerade abgedeckt wurde. Von den Standards und den verdünnten Proben wurden jeweils 25 µl in Dreifachbestimmung auf eine 96-Well-Platte vorgelegt. Zu jeder Probe wurden 200 µl des mit H_2O 1/5 verdünnten Bradfordreagenz gegeben und die Miktotiterplatten sofort bei 595 nm ausgelesen.

3.2.3.6 Acyl-CoA-Synthetase Enzymaktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivität der Acyl-CoA-Synthetasen wurde in einem *in vitro* Experiment untersucht (Hall *et al.*, 2003). Den Enzymen wurde als Substrat ein definiertes Gemisch aus radioaktiv-markierter und kalter Fettsäure angeboten. Die ACS setzten das markierte Substrat proportional zur Gesamtmenge um. Die nicht umgesetzten lipophilen Fettsäuren wurden mit Heptan extrahiert. Die gebildeten hydrophilen Acyl-CoAs verblieben in der wässrigen Phase und wurden als Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen.

Die Zellen wurden auf 10 cm^2-Schalen ausgesät und gegebenenfalls transfiziert (3.2.2.4). Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und durch Pipettieren (COS, HEK293) oder Trypsinisierung (A431, HeLa, MDCK, C2C12) von der Schale gelöst und bei 200 g für 5 min sedimentiert. Die Pellets wurden erneut mit PBS gewaschen und konnten dann direkt verwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellpellets in 200 µl KTx- Puffer für 30 min auf Eis solubilisiert. Eine Solubilisierung der Zellen in KT-Puffer wurde nur wenn explizit angegeben durchgeführt. Aufgrund des fehlenden Triton X-100 mussten die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in Flüssigstickstoff und langsames Auftauen bei 8 °C aufgeschlossen werden. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 10.000 g wurde der Überstand (Zelllysat) abgenommen.

Für radioaktive Arbeiten wurden ausschließlich Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (*Safe-Lock Tubes*) verwendet. Zunächst wurde ein Fettsäure-BSA-Mix im Verhältnis 4:1 (100 µM Fettsäure:25 µM BSA) mit einer spezifischen Aktivität von 10 Ci/mol hergestellt. Die Lösungsmittel der Fettsäuren wurden unter Stickstoff verdampft und die Ölsäure sowie die Behensäure in NaOH verseift. Um die Behensäure zu lösen, wurde diese unter Schütteln auf 80 °C erwärmt. Anschließend wurde das auf 37 °C erwärmte fettsäurefreie BSA hinzugefügt und die Fettsäure durch Mischen an das BSA gekoppelt. Das TBS_{TC} wurde dazu gegeben und der Mix erneut gemischt. Bei der Herstellung des Arachidonsäure-Mix war zu beachten, dass Arachidonsäure oxidationsempfindlich ist und daher nur gerührt werden durfte. Zudem wurden entgaste Lösungen verwendet.

Die Mixe der verwendeten Fettsäuren sind in der folgenden Tabellen aufgeführt.

verwendete Fettsäure-BSA-Mixe (10 Proben + 2 Negativkontrollen)	
^{14}C-Arachidonsäure-Mix	
5,0 µl	5 mM Arachidonsäure in Ethanol
3,1 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA
38,8 µl	200 µM BSA-fsf in TBS_{TC} (entgast)
274,0 µl	TBS_{TC} (entgast)
^{14}C-Ölsäure-Mix (^{3}H-Ölsäure-Mix)	
3,5 µl (4,3 µl)	7,1 mM Ölsäure in Chloroform
3,1 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA oder ^{3}H-Ölsäure 0,1 µCi/µl, 25 µM OA
3,7 µl	10 mM NaOH
38,8 µl	200 µM BSA-fsf in TBS_{TC}
270,3 µl	TBS_{TC}
^{14}C-Behensäure-Mix	
4,3 µl	5,9 mM Behensäure in $CHCl_3$:Methanol 2:1
3,1 µl	^{14}C-Behensäure 0,1 µCi/µl; 1,85 mM BA
37,2 µl	1 mM NaOH
38,8 µl	200 µM BSA-fsf in TBS_{TC}
236,8 µl	TBS_{TC}

Aus dem radioaktiven Fettsäure-Mix wurde der jeweilige Mastermix entsprechend der folgenden Tabelle angesetzt. Dieser enthielt alle von den Acyl-CoA-Synthetasen für die Umsetzung der Fettsäuren zu Acyl-CoAs benötigten Reagenzien.

Mastermix		**Endkonzentration in 100 µl**
672,0 µl	H_2O	
140,0 µl	1 M Tris/HCl pH 7,4	100 mM
7,0 µl	1 M $MgCl_2$	5 mM
2,8 µl	0,1 M DTT	200 µM
140,0 µl	0,1 M ATP	10 mM
4,2 µl	10 % Triton X-100	0,03 %
280,0 µl	^{14}C-Fettsäure-Mix	20 µM 10 Ci/mol
Mischen und 2x 89 µl abnehmen		
12,0 µl	20 mM CoA	200 µM

Vor Zugabe des Coenzyms A wurden zweimal 89 µl des Mastermixes entnommen, welche als Negativkontrollen zur Bestimmung der Hintergrundradioaktivität dienten. Diese sollte weniger als 50 % der Radioaktivität in den Proben betragen. Die Reaktionsansätze wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. Zu 10 µl des Zelllysates wurden 90 µl des Mastermixes gegeben und exakt 10 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 600 µl Dole's Lösung gestoppt. Zur Erzeugung einer Phasentrennung wurden dem Reaktionsansatz 250 µl H_2O und 400 µl n-Heptan zugesetzt. Nach Vermischen und einer Zentrifugation für 1 min bei 13.000 g und RT wurde die obere Heptanphase abgenommen ohne die Interphase zu zerstören. Anschließend folgten vier Extraktionsschritte mit 600 µl n-Heptan. Zuletzt wurden 200 µl der unteren wässrigen Phase zu 4 ml Ultima Gold gegeben und die cpm im Flüssigszintillationszähler über 5 min gemessen. Zusätzlich wurden zweimal 20 µl des Mastermixes gemessen.

Über die gemessenen cpm in 20 µl Mastermix wurde die Gesamtaktivität pro Inkubation [cpm] berechnet. Unter Berücksichtigung der Gesamtmenge an Fettsäure pro Inkubation [nmol] und der Inkubationszeit [min] konnte die Menge an Fettsäure pro Aktivität, Zeit und Volumen [nmol / cpm / min] bestimmt werden. Aus den gemessenen cpm der Proben wurde nach Abzug der Hintergrundradioaktivität die Gesamtaktivität der wässrigen Phase berechnet. Daraus wurde unter Einbeziehung der Proteinkonzentration im KTx-Lysat die Enzymaktivität [pmol Acyl-CoA / min / µg Protein] bestimmt.

3.2.3.7 Quantitative Aufnahme radioaktiv-markierter Fettsäuren

Zur Messung der Fettsäureaufnahme von Zellen wurden diese für eine definierte Zeit mit radioaktiv-markierten Fettsäuren inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit NaOH lysiert und die cpm sowie die Proteinkonzentration im Lysat gemessen.

Jeweils 50.000 COS-Zellen wurden auf 4 cm^2-Schalen ausgesät und transient transfiziert (3.2.2.4). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h in FKS-freiem DMEM 4,5 g/l Glucose inkubiert. Anschließend wurden 800 µl eines Markierungsmixes auf die Zellen gegeben und diese für 15 min oder 3 h bei 37 °C inkubiert.

Arachidonsäure-Markierungsmixe (10 ml)		
15 min		**Endkonzentration**
39,20 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	200 µM; 1 Ci/mol
20,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,75 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3h		**Endkonzentration**
39,80 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	200 µM; 0,25 Ci/mol
5,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,75 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	

Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml eiskaltem Stopp-Mix und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 1 N NaOH lysiert. Das Lysat wurde im Flüssigszintillationszähler gezählt und zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet (3.2.3.5).

Die Berechnung der Aufnahme erfolgte ausgehend von den cpm in 20 µl Markierungsmix, wodurch sich die Gesamtaktivität in 0,8 ml Markierungsmix pro Inkubation [cpm] errechnete. Unter Berücksichtigung der Gesamtstoffmenge an Fettsäure pro Inkubation [nmol] wurde die Stoffmenge an Fettsäure pro gemessenem Zerfall [nmol/cpm] bestimmt. Die im gesamten Probenvolumen enthaltenen cpm wurden berechnet und schließlich durch die Proteinkonzentration im Lysat auf die Menge an nicht oxidierter bzw. oxidierter Fettsäure pro Proteinkonzentration [pmol/µg Protein] geschlossen.

3.2.3.8 Fettsäure- und Acetatmarkierung für die Dünnschichtchromatographie

Um die *de novo* Synthese sowie die Metabolisierung von Fettsäuren zu analysieren, wurden die Zellen mit ^{14}C-Acetat oder ^{14}C-Fettsäure markiert, anschließend die Gesamtlipide mittels Folch extrahiert (3.2.3.10) und über Dünnschichtchromatographie in die einzelnen Lipide aufgetrennt (3.2.3.11).

Die verwendeten Markierungsmixe sind nachfolgend aufgeführt.

Acetat Markierungsmixe	
15 min Markierung	50 µCi/ml in DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS, Endkonzentration: 1 mM Acetat
3 h Markierung	5 µCi/ml in DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS Endkonzentration: 0,1 mM Acetat

Arachidonsäure Markierungsmixe (10 ml)		
15 min / 10 µM AA		**Endkonzentration**
0,00 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	10 µM; 50 Ci/mol
50,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
63,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	5 µM
9,94 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3 h / 10 µM AA		**Endkonzentration**
1,20 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	10 µM; 20 Ci/mol
20,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
63,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	5 µM
9,94 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
15 min / 200 µM AA		**Endkonzentration**
28,00 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	200 µM; 15 Ci/mol
300,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,75 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3 h / 200 µM AA		**Endkonzentration**
37,60 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	200 µM; 3 Ci/mol
60,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,75 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	

Behensäure Markierungsmixe (10 ml)		
3 h / 10 µM BA		**Endkonzentration**
0,00 µl	59 mM Behensäure in $CHCl_3$:Methanol 2:1	10 µM; 55 Ci/mol
55,00 µl	^{14}C-Behensäure 0,1 µCi/µl; 1,85 mM BA	
12,00 µl	10 mM NaOH	12 µM
63,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	5 µM
9,93 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3 h / 200 µM BA		**Endkonzentration**
15,10 µl	59 mM Behensäure in $CHCl_3$:Methanol 2:1	200 µM; 30 Ci/mol
0,60 ml	^{14}C-Behensäure 0,1 µCi/µl; 1,85 mM BA	
0,24 ml	10 mM NaOH	240 µM
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,51 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	

Ölsäure Markierungsmixe (10 ml)		
15 min / 10 µM OA		**Endkonzentration**
0,00 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	10 µM; 50 Ci/mol
50,00 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA	
4,80 µl	25 mM NaOH	12 µM
63,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	5 µM
9,93 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3 h / 10 µM OA		**Endkonzentration**
16,90 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	10 µM; 20 Ci/mol
0,40 ml	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA	
96,00 µl	25 mM NaOH	12 µM
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	5 µM
8,65 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
15 min / 200 µM OA		**Endkonzentration**
1,00 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	200 µM; 15 Ci/mol
15,00 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA	
4,80 µl	25 mM NaOH	240 µM
63,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
9,93 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
3 h / 200 µM OA		**Endkonzentration**
26,50 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	200 µM; 3 Ci/mol
60,00 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA	
96,00 µl	25 mM NaOH	240 µM
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,65 ml	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	

Die Lösungsmittel wurden unter einem Stickstoffstrom evaporiert. Das hydrophile Acetat wurde direkt in Medium aufgenommen. Getrocknete Arachidonsäure wurde an auf 37 °C erwärmtes fettsäurefreies BSA gekoppelt und anschließend Medium hinzugefügt. Arachidonsäure ist oxidationsempfindlich, daher wurden ausschließlich im Ultraschallbad entgaste und mit Stickstoff überschichtete Lösungen verwendet und der Mix nur gerührt. Behensäure und Ölsäure wurden vor der Kopplung an BSA in NaOH verseift. Die Behensäure wurde dabei auf 80 °C erhitzt und geschüttelt bis sich vorhandene Präzipitate gelöst hatten.

Jeweils 125.000 COS-Zellen wurden auf einzelne 10 cm^2-Schalen ausgesät und transient transfiziert (3.2.2.4). 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h in FKS-freiem DMEM 4,5 g/l Glucose ausgehungert. Anschließend wurde 1 ml Markierungsmix auf die Zellen gegeben und für 15 min oder 3 h bei 37 °C inkubiert. Da die Markierungsmixe für 15-minütige Markierungen sehr hohe Aktivitäten an ^{14}C-Fettsäure enthielten, wurden die Proben nacheinander behandelt und der Markierungsmix mehrfach genutzt. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde der Markierungsmix abgenommen. Mit ^{14}C-Acetat markierte Zellen wurden direkt in 500 µl Methanol geerntet. Mit ^{14}C-Fettsäuren markierte Zellen wurden zweimal mit eiskaltem Stopp-Mix und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen bevor die Zellen in 500 µl Methanol geerntet wurden.

3.2.3.9 *Pulse-Chase* Aufnahme radioaktiv-markierter Fettsäuren

Um den Metabolismus der verwendeten Ölsäuren in den stabil transfizierten FATP4.C2C12 zeitlich verfolgen zu können, wurden *Pulse-Chase* Versuche durchgeführt. Dazu wurden die Zellen kurzzeitig mit ^{14}C-markierter Ölsäure inkubiert (*Pulse*), gefolgt von einer Inkubation mit nicht markierter Fettsäure (*Chase*). Es folgten die Extraktion der Lipide nach Folch (3.2.3.10) und deren Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (3.2.3.11).

Folgende Fettsäuremixe wurden verwendet:

2x *Pulse*-Mix (1 ml)		**Endkonzentration**
5,00 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	680 µM 24 Ci/mol
163,20 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM OA	
32,60 µl	25 mM NaOH	816 µM
425,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	340 µM
542,00 µl	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	
1,1x *Chase*-Mix (1 ml)		**Endkonzentration**
5,30 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	374 µM; 0 Ci/mol
18,00 µl	25 mM NaOH	449 µM
234,00 µl	800 µM BSA-fsf in PBS	187 µM
748,00 µl	DMEM 4,5 g/l Glucose ohne FKS	

Für den *Pulse-Chase* wurden 120 cm^2 der stabil transfizierter Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1 h in FKS-freiem Medium ausgehungert bevor sie über Trypsinisierung geerntet und die Pellets in PBS gewaschen wurden. Das Zellpellet wurde in 300 µl PBS resuspendiert und 2 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 300 µl 2x *Pulse*-Mix zugesetzt und 60 s bei 37 °C und 450 rpm inkubiert (*Pulse*). Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Zum Abstoppen der Fettsäureaufnahme und zur Unterbrechung des Zellstoffwechsels wurde die Zellsuspension in 24 ml eiskalten Stopp-Mix überführt. Die Zellen wurden 10 min bei 1.000 g abzentrifugiert, der Überstand bis auf ca. 1 ml abgenommen, die Zellen darin resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen überführt. 10 ml eiskalter Stopp-Mix wurden zugefügt und die Zellen erneut pelletiert. Es folgten zwei Waschschritte in 5 ml eiskaltem PBS. Die Zellpellets wurden in insgesamt 450 µl eiskaltem PBS resuspendiert. Für den folgenden *Chase* wurden jeweils 100 µl Zellsuspension in vier Reaktionsgefäße (*Safe-Lock Tubes*, Eppendorf) überführt. 1 ml 1,1x *Chase*-Mix wurde hinzugefügt und drei Reaktionsgefäße für unterschiedliche Zeiten (6 min, 12 min, 18 min) bei 37°C inkubiert. Die vierte Probe wurde weiterhin auf Eis inkubiert und diente als Kontrolle zum Zeitpunkt 0 min *Chase*. Das Abstoppen dieser Probe erfolgte zusammen mit der ersten Probe des *Chases* durch Pipettieren in 14 ml eiskalten Stopp-Mix. Die Proben wurden ein weiteres Mal in eiskaltem Stopp-Mix sowie zweimal in PBS gewaschen und die Zellpellets in 1 ml PBS resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden im Flüssigszintillationszähler gemessen und weitere 50 µl wurden in 50 µl 2 N NaOH lysiert und zur Proteinbestimmung eingesetzt (3.2.3.5). Die restliche Zellsuspension wurde zentrifugiert und die Zellpellets bis zur weitere Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.3.10 Lipidextraktion nach Folch

Die Extraktion von Lipiden aus Zellen erfolgte nach Folch (Folch *et al.*, 1957). Für die Arbeit mit organischen Lösungsmitteln wurden ausschließlich Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf (*Safe-Lock Tubes*) verwendet. Die Extraktion erfolgte stets bei Raumtemperatur.

Ausgangsmaterial für die Lipidextraktion waren die in 500 µl Methanol aufgenommenen Zellen aus den Markierungsversuchen (3.2.3.8). Die Zellen wurden bei 14.000 rpm für 10 min geschüttelt. Danach wurde 1 ml Chloroform zugesetzt und die Proben erneut für 10 min geschüttelt. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 13.000 *g* wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, 300 µl 50 mM Zitronensäure hinzugegeben und die Proben wieder für 10 min geschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde der Ansatz 5 min bei 13.000 *g* zentrifugiert. Anschließend wurde die untere organische Phase, welche die Lipide enthielt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Lipide wurden für 2 h in der Vakuumzentrifuge getrocknet und bei -20 °C gelagert.

3.2.3.11 Dünnschichtchromatographie

Das Prinzip der Dünnschichtchromatographie basiert auf der unterschiedlichen Polarität des Materials der stationären Phase (DC-Platte), der mobilen Phase (Laufmittel) und der aufzutrennenden Substanzen. Häufig wird polares Kieselgel als stationäre Phase verwendet. Ist das Laufmittel weniger polar als das Kieselgel der DC-Platte, so gehen unpolare Stoffe von der stationären Phase in die mobile Phase über und wandern aufgrund von Kapillarkräften mit dem Laufmittel über die DC-Platte. Je unpolarer die Substanz, desto weiter wandert sie über die DC. Die zurückgelegte Distanz ist dabei unter Verwendung der gleichen Bedingungen charakteristisch für eine bestimmte Substanz. Sie wird durch den R_f-Wert angegeben, der sich aus der Wanderungsstrecke der Substanz bezogen auf die Wanderungsstrecke des Laufmittels errechnet.

Lipide besitzen aufgrund ihrer diversen Kopfgruppen und der unterschiedlichen Anzahl und Länge der veresterten Fettsäuren sehr verschiedene Polaritäten und eignen sich daher besonders gut für die Analytik mittels Dünnschichtchromatographie. Die DC wurde in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet radioaktiv-markierte Lipidgemische in die einzelnen Lipide aufzutrennen, um so die Metabolisierung der aufgenommenen Fettsäuren analysieren zu können.

Die beschrifteten DC-Platten wurden vor Auftragung der Proben in Methanol gereinigt und 2 h bei 110 °C getrocknet. Wurden die DC-Platten nicht am Tag der Chromatographie gewaschen, so wurden sie vor Beginn des Versuches durch Erhitzen auf 110 °C aktiviert.

Die in der Folch extrahierten Lipide wurden in bis zu 20 µl Chloroform:Methanol 1:2 aufgenommen und in 0,5 µl Schritten punktförmig auf DC-Platten aufgetropft. Um die Signale identifizieren zu können, wurden verschiedene nicht-radioaktive Lipidstandards auf jede DC aufgetragen wie in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Lipid	Vol.	Konz.	Lösungsmittel	Exakte Bezeichnung / ggf. Herkunft
AA	2,0 µl	50 mM	Chloroform	Arachidonsäure
CE	2,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	Ölsäure-Cholesterinester
CH	2,0 µl	100 µg/µl	Chloroform	Cholesterin
CL	3,0 µl	5 µg/µl	Ethanol	Cardiolipin / Herzlipide
DG	2,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	1,3-Diolein
DG2	2,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	1,2- und 1,3-Diolein
LPA	1,0 µl	10 µg/µl	Chloroform:Methanol: Essigsäure 95:5:5	1-Oleoyl-sn-Glycerin-3-Phosphat
LPC	1,0 µl	5 µg/µl	Methanol	1-Palmitoyl-sn-Glycerin-3-Phosphocholin
MG	2,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	Monoolein, 1-Oleoyl-rac-Glycerin
OA	2,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	Ölsäure, Oleinsäure
PA	1,0 µl	10 µg/µl	Chloroform	1,2-Dioleoyl-sn-Glycerin-3-Phosphat
PC	2,0 µl	5 µg/µl	Chloroform	2-Oleoyl-1-Palmitoyl-sn-Glycerin-3-Phosphocholin
PE	1,5 µl	10 µg/µl	unverdünnt	1,2-Diacyl-sn-Glycerin-3-Phosphoethanolamin / Hirnlipide
PG	3,0 µl	20 µg/µl	Chloroform	1,2-Diacyl-sn-Glycerin-3-Phospho-(1-*rac*-Glycerol) / Eigelblipide
PI	2,0 µl	10 µg/µl	unverdünnt	1,2-Diacyl-sn-Glycerin-3-Phospho-(1-D-*myo*-inositol) / Leberlipide
PS	2,0 µl	5 µg/µl	Chloroform:Methanol 1:2	1,2-Diacyl-sn-Glycerin-3-Phosphoserin / Hirnlipide
SM	1,0 µl	20 µg/µl	Chloroform:Methanol 1:1	N-Acyl-D-Sphingosin-1-Phosphocholin / Eigelblipide
TG	1,5 µl	20 µg/µl	Chloroform	Triolein

Für die Dünnschichtchromatographie wurden vier verschiedene Laufmittel verwendet. Der N-Mix (Kasurinen, 1992) diente der Auftrennung von Neutrallipiden, der O-Mix (Kuerschner *et al.*, 2005), der A-Mix (Allan und Cockcroft, 1982) und der PL-Mix (Schuck et al., 2003) trennten Phospholipide unterschiedlich auf.

Laufmittel	Zusammensetzung
A-Mix	Chloroform : Methanol : Essigsäure : H_2O 75:43:3:1
N-Mix	n-Hexan : Diethylether : Essigsäure 80:30:5
O-Mix	Chloroform : Ethanol : H_2O : Triethylamin 35:40:9:35
PL-Mix	Chloroform : Methanol : Essigsäure : H_2O 60:50:1:4

Das Laufmittel wurde mindestens eine Stunde vor Beginn des Laufes in eine Kammer mit zwei Filterpapieren gefüllt, um eine gesättigte Atmosphäre zu gewährleisten. Die DC-Platten wurden senkrecht in die Laufkammer gestellt und die Wanderung des Laufmittels über die Laufstrecke von 10 cm abgewartet. Anschließend wurden die Platten an der Luft angetrocknet bevor sie bei 110 °C vollständig getrocknet wurden.

Zur Visualisierung der radioaktiven Signale wurde die DC auf eine *Phosphorimaging IP* gelegt und in einer Kassette für 1 Tag bis 3 Tage bei RT entwickelt. Das Auslesen erfolgte am *Phosphorimager* BAS-1500 unter Verwendung der Software BASReader. Mittels Phosphorimaging konnten die Signale sehr sensitiv detektiert werden, jedoch war der Kontrast eher gering. Ergänzend konnte die DC unter Verwendung einer Verstärkerfolie mittels Röntgenfilm entwickelt werden. Diese sind weniger sensitiv, zeigen aber einen höheren Kontrast der Signale. Die entsprechende Kassette wurde während der Belichtung für 8 h bis 3 d bei -80 °C gelagert.

Nach Abschluss der Entwicklungen wurden die aufgetragenen Standards mittels Jod angefärbt. Dazu wurde die DC-Platte für einige Minuten in eine Laufkammer mit einigen Jodkristallen gestellt. Nach Sublimation bildete das Jod reversible gelb-braune Komplexe mit den Lipiden. Die gefärbte DC-Platte wurde anschließend in einer Klarsichtfolie eingescannt und die Bilder der Lipidstandards in Adobe Photoshop mit den Bildern der radioaktiven Proben kombiniert und die R_f-Werte ermittelt, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

Lipid	A-Mix	N-Mix	O-Mix	PL-Mix
AA	0,84	0,35	0,55	0,86
CE	0,94	0,69	0,83	0,94
CH	-	0,20	0,58	0,74
CL	-	-	0,51	0,68
1,3-DG	0,94	0,25	0,83	0,95
1,2-DG		0,21		
LPA	0,15	-	0,18	0,31
LPC	0,02	-	0,04	0,05
MG	0,82	0,03	0,68	0,84
OA	0,84	0,37	0,55	0,83
PA	0,49	-	0,27	0,58
PC	0,07	-	0,10	0,16
PE	0,46	-	0,32	0,61
PG	-	-	0,46	0,61
PI	0,17	-	0,26	0,41
PS	0,12	-	0,21	0,32
SM	0,04	-	0,06	0,09
TG	0,95	0,56	0,86	0,96

Aufgrund desselben Laufverhaltens von PI und PA (R_f: 0,26 und 0,27) konnten diese Lipide nicht durch Auftrennung im O-Mix unterschieden werden. Um die entsprechenden Signale des O-Mixes genau identifizieren zu können, wurde, exemplarisch für eine Dünnschichtchromatographie nach 3 h Inkubation der Zellen mit Arachidonat beziehungsweise Oleat, das Silicagel der stationären Phase abgenommen, dessen Lipide mittels Folch extrahiert (3.2.3.10) und erneut durch Dünnschichtchromatographie im A-Mix aufgetrennt. In diesem Mix lief der Lipidstandard von PA (R_f: 0,49) schneller als der Standard von PI (R_f: 0,17), so dass das zuvor extrahierte Lipid als PI identifiziert werden konnte (Abbildung 4). In allen im Folgenden beschriebenen Experimenten wurde folglich davon ausgegangen, dass es sich bei dem entsprechenden Signal mit einem R_f-Wert für PI und PA um Phosphatidylinositol handelte.

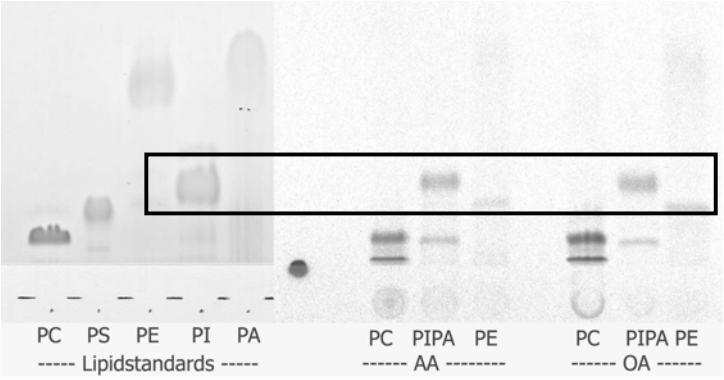

Abbildung 4: Identifizierung des Phosphatidylinositols im A-Mix.
COS-Zellen wurden mit Arachidonat und Oleat markiert, die Lipide extrahiert und im O-Mix aufgetrennt. Das Silicagel um das Signal mit einem R_f-Wert von 0,26 wurde abgenommen, die Lipide mittels Folch extrahiert und erneut über Dünnschichtchromatographie im A-Mix aufgetrennt. In diesem Mix lief das Signal auf Höhe des Lipidstandards von Phosphatidylinositol (R_f: 0,17) und wurde somit als Phosphatidylinositol identifiziert.

3.2.3.12 Quantifizierung und Analyse der Dünnschichtchromatographien

Für die Quantifizierung der mittels Phosphorimaging oder Röntgenfilm entwickelten Dünnschichtchromatographien wurde eine densitometrische Analyse der Signale durchgeführt, welche die Grauwerte zuvor festgelegter Bereiche als ein Profil darstellt. Die Peaks im Profil werden definiert und deren Integrale berechnet. Es besteht jeweils eine Linearität zwischen den Flächen der Integrale und den µCi (cpm) der die Signale bildenden Lipide. Somit kann die Quantifizierung der Grauwerte verwendet werden, um daraus die Menge der gebildeten Lipide zu bestimmen.

Die Quantifizierung der Dünnschichtchromatographien der FATP4-transfizierten C2C12 und HEK293 Zellen wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Dazu wurden die durch den Phosphorimager eingelesenen Dateien als Bilddatei gespeichert und diese mit ImageJ densitometrisch ausgewertet. Sämtliche Dünnschichtchromatographien der ACSL4-transfizierten COS-Zellen wurden über das Programm AIDA Imaging Analyser densitometrisch ausgewertet.

Die weitere Analyse der Daten erfolgte in MS Excel. Die einzelnen Lipide wurden anhand der nicht-radioaktiven Lipidstandards identifiziert. Bei der Identifizierung der einzelnen Lipide war das teilweise unterschiedliche Laufverhalten der Lipide aufgrund der Eigenschaften der enthaltenen Fettsäuren zu beachten. Die verwendeten Lipidstandards enthielten Oleat als Fettsäure. Lipide, welche zum Beispiel das gegenüber Oleat polarere Arachidonat enthalten, wandern folglich im neutralen N-Mix langsamer. Andererseits wandern Lipide, welche das neutralere Behenat enthalten, im polaren O-Mix langsamer.

Die Lipide wurden als prozentualer Anteil an der Summe aller Lipide innerhalb einer Spur angegeben, da die aus der Summe der Signale einer Spur berechnete theoretische Fettsäureaufnahme nicht der tatsächlich gemessenen Fettsäureaufnahme entsprach. Die Signale der freien, intrazellulären Fettsäure wurden nicht mit quantifiziert, da nicht eindeutig zwischen intrazellulär freier und extrazellulär an der Zelloberfläche gebundener Fettsäure unterschieden werden konnte. Die Signale der Lipide Lysophosphatidsäure und Lysophosphytidylserin überlagerten sich teilweise, so dass beide Lipide als PS zusammengefasst wurden. Nicht anhand der Lipidstandards identifizierbare Lipide, sowie identifizierte Lipide mit einem prozentualen Anteil von unter 1 % wurden unter den sonstigen Lipiden zusammengefasst.

Alle in dieser Arbeit gezeigten Quantifizierungen wurden anhand des O-Mixes und des N-Mixes berechnet. Die Berechnung der gesamten Neutral- und Phospholipide der Zelle wurde anhand des O-Mixes durchgeführt und entsprechend die einzelnen Lipide, wie in den jeweiligen Abbildungen markiert, summiert. Neutrallipide liefen auf der DC oberhalb der freien Fettsäure, Phospholipide unterhalb. Die einzelnen Phospholipide wurden im O-Mix gut voneinander getrennt, so dass für deren Quantifizierung ausschließlich im O-Mix aufgetrennte DCs verwendet wurden. Neutrallipide wurden im O-Mix nicht ausreichend gut getrennt, so dass zusätzlich der N-Mix verwendet wurde. Die DC des N-Mixes trennte ausschließlich Neutrallipide auf, Phospholipide blieben im Auftragspunkt. Für die Berechnung der prozentualen Anteile der Neutrallipide an allen intrazellulären Lipiden wurden zunächst anhand der im N-Mix aufgetrennten DCs die Anteile der einzelnen Neutrallipide an der Summe aller Neutrallipide berechnet. Anschließend wurden diese Werte auf den Anteil der Summe aller Neutrallipide an den Gesamtlipiden umgerechnet, welcher aus der DC des O-Mix quantifiziert wurde.

Beispiel: Die im O-Mix entwickelte DC enthielt 70 % Neutrallipide und 30 % Phospholipide. Der Anteil des PC auf der DC des O-Mixes betrug 20 %. Dieser Wert bleibt bestehen, da der O-Mix bereits 100 % aller intrazellulär gebildeten Lipide berücksichtigt. Der Anteil des TG auf der DC des N-Mixes betrug 80 %. Der N-Mix trennt nur Neutrallipide auf, so dass dieser Anteil des TG zusätzlich auf die 70 % aller Neutrallipide an den Gesamtlipiden bezogen werden musste. Also waren in der Zelle 56 % TG enthalten.

Für die statistische Analyse wurde der ‚Zweistichproben t-Test bei unterschiedlichen Varianzen' des Programms MS Excel verwendet.

3.2.3.13 Bestimmung der Fettsäureoxidation durch säurelösliche Metabolite

Als säurelösliche Metabolite (ASM) werden Zwischenprodukte des Citratzyklus, Ketonkörper und Acetyl-Ester bezeichnet. ASM entstehen in der unvollständigen Fettsäureoxidation, so dass deren Quantifizierung als relatives Maß der Fettsäureoxidation innerhalb von Zellen dient. Die Messung der ASM ist der direkten Messung des Endproduktes CO_2 überlegen (Veerkamp *et al.*, 1986), da letzteres nur ca. 10 % der absoluten Oxidationsprodukte darstellt (Skrede *et al.*, 1994). In der hier angewendeten Methode wurden die Zellen mit ^{14}C-Fettsäure markiert und gaben die oxidierten Fettsäuren als ^{14}C-ASM ins Medium ab. Die im Medium enthaltenen ^{14}C-Fettsäuren wurden an fettsäurefreies BSA gekoppelt und über Säurepräzipitation aus dem Medium gefällt, so dass die ^{14}C-ASM im Flüssigszintillationszähler gemessen werden konnten (Li *et al.*, 2006).

Jeweils 60.000 COS-Zellen wurden auf 4 cm^2-Schalen ausgesät und am folgenden Tag transient transfiziert (3.2.2.4). Die Messung der ASM wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h in FKS-freiem DMEM 1 g/l Glucose ausgehungert. Anschließend wurden 900 µl eines Markierungsmixes auf die Zellen gegeben und für 6 h bei 37 °C inkubiert.

Folgende Markierungsmixe wurden verwendet:

verwendete Fettsäure-Markierungsmixe (10 ml)		
Ölsäure-Mix		**Endkonzentration**
27,60 µl	71 mM Ölsäure in Chloroform	200 µM 1,1 Ci/mol
22,00 µl	^{14}C-Ölsäure 0,1 µCi/µl, 2 mM OA	
	unter Stickstoff trocknen	
96,00 µl	25 mM NaOH	240 µM
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,63 ml	DMEM 1 g/l Glucose ohne FKS	
20,00 µl	500 mM L-Carnitin	1 mM
Arachidonsäure-Mix		**Endkonzentration**
39,10 µl	50 mM Arachidonsäure in Ethanol	200 µM 1,1 Ci/mol
22,00 µl	^{14}C-Arachidonsäure 0,1 µCi/µl; 2 mM AA	
	unter Stickstoff trocknen	
1,25 ml	800 µM BSA-fsf in PBS	100 µM
8,73 ml	DMEM 1 g/l Glucose ohne FKS	
20,00 µl	500 mM L-Carnitin	1 mM
Der Arachidonsäuremix wurde gerührt. Die Lösungen waren entgast.		

Nach sechsstündiger Inkubation wurde das Medium mit den darin enthaltenen ASM auf Eis abgenommen. Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem Stopp-Mix und dann zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 N NaOH lysiert. Das Lysat wurde im Flüssigszintillationszähler gezählt und zur Proteinbestimmung nach Bradford verwendet (3.2.3.5).

Für die Säurepräzipitation wurde das abgenommene Medium bei 13.000 g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert und 750 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß (*Safe-Lock Tube*, Eppendorf) überführt. Als Negativkontrollen für nicht-präzipitierte ^{14}C-Fettsäure wurden zweimal 750 µl des entsprechenden Markierungsmixes mitgeführt. Dem Überstand wurden 60 µl 20 % fettsäurefreies BSA in PBS zugefügt und der Ansatz stark geschüttelt bevor 120 µl 70 % Perchlorsäure auf den Boden des Reaktionsgefäßes pipettiert wurden. Die Proben wurden erneut stark geschüttelt und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die ausgefallenen Fettsäure-BSA-Präzipitate bei 13.000 g und 4 °C über 5 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das zuvor 60 µl 20 % fettsäurefreies BSA vorgelegt wurden. Die Proben wurden stark geschüttelt und 1 h bei RT inkubiert bevor die Präzipitate pelletiert wurden. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und 200 µl von diesem Überstand im Flüssigszintillationszähler gemessen.

Die cpm der Zellysate stellten die nicht oxidierten Fettsäuren innerhalb der Zelle dar. Die cpm der Säurepräzipitation waren zu ASM unvollständig oxidierte Fettsäuren. Die Berechnung erfolgte wie in 3.2.3.7. Bei den ASM wurde der Hintergrund der Negativkontrollen abgezogen. Dieser lag für Oleat bei 50-60 % und für Arachidonat bei 60-70 %. Die Fettsäureaufnahme entsprach hier der Summe der zellulären Lipide und der ASM.

4. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die Kanalisierung von Fettsäuren in Abhängigkeit von der Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen FATP4 und ACSL4 nach Überexpression im Zellkulturmodell zu untersuchen.

4.1 Durch Überexpression von FATP4 vermehrt aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt

Die in dieser Arbeit verwendeten FATP4-Proteine zeigten in den untersuchten Zelllinien eine Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum. Dies entspricht den publizierten Lokalisierungen (Milger *et al.*, 2006; Digel *et al.*, 2011).

4.1.1 FATP4 in stabil exprimierenden C2C12-Zellen

Um ein möglichst physiologisches System zu erhalten, wurde die C2C12-Zelllinie zur Herstellung stabiler FATP4-Zellen verwendet. Diese entstammt dem Muskelgewebe der Maus, ein Gewebetyp, der aufgrund seines endogenen Triacylglycerinspeichers und seiner Fähigkeit zur Fettsäureoxidation relevant für die Untersuchung des Lipidmetabolismus ist. Weiterhin exprimieren C2C12-Zellen endogenes FATP4 als vorherrschendes FATP (F. Ehehalt, nicht veröffentlicht). Das in diesen Zellen überexprimierte FATP4 enthält ein N-terminales HA-Epitop, welches die Eigenschaften des Proteins nicht beeinflusst.

4.1.1.1 Charakterisierung der FATP4.C2C12-Zelllinie

C2C12-Zellen wurden unter Verwendung des MMLV retroviralen Systems transduziert (Schuck *et al.*, 2004), so dass das Gen für FATP4 stabil in das Genom der Zellen integriert wurde und somit eine kontinuierliche Überexpression des FATP4 erlaubte. Kontrollzellen wurden mit dem retroviralen Leervektor pQCXIP-J (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) transduziert.

In der FATP4.C2C12-Zelllinie wurde die Überexpression des FATP4 mittels Real-Time-PCR auf mRNA-Ebene und mittels Western-Blot auf Proteinebene überprüft. Die mRNA-Expression der FATP4 überexprimierenden Zellen war gegenüber der endogenen Expression der Kontrollzellen auf das 127-fache gesteigert (nicht gezeigt). Weiterhin zeigt Abbildung 5A die starke Überexpression des FATP4 (72 kDa) in FATP4.C2C12 gegenüber Kontrollzellen bezogen auf das ubiquitär vorkommende β-Aktin (41 kDa) auf Proteinebene.

Im Anschluss wurde der Einfluss der Überexpression des FATP4 auf die gesamte Acyl-CoA-Synthetase Aktivität der Zelle untersucht. Die Zelllysate wurden mit Oleat, welches anteilig ^{3}H-Oleat enthielt, inkubiert. Anschließend wurden die hydrophoben Fettsäuren mit Heptan extrahiert und die durch die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetasen gebildeten hydrophilen Acyl-CoAs im Flüssigszintillationszähler gezählt. Die Proteinkonzentration im Zelllysat wurde bestimmt und die spezifische Enzymaktivität bezogen auf das Gesamtprotein innerhalb der Zelle berechnet. In Abbildung 5B ist die Erhöhung der Enzymaktivität in FATP4 überexprimierenden Zellen um das 9,5-fache dargestellt.

Wie von Digel *et al.* beschrieben erhöht die Überexpression von FATP4 in C2C12-Zellen die Aufnahme von Fettsäuren in die Zelle (Digel *et al.*, 2011). Dies konnte auch für die hier eingesetzte Zelllinie bestätigt werden (Abbildung 5C). Nach Inkubation adhärenter Zellen mit fluoreszierender Bodipy-Fettsäure und anschließender Analyse im Durchflusszytometer verschob sich der Peak der Fluoreszenz um das 7-fache (C2C12: GeoMean 21, FATP4.C2C12: GeoMean 153), wodurch die erhöhte Aufnahme der fluoreszierenden Fettsäure erkennbar wird.

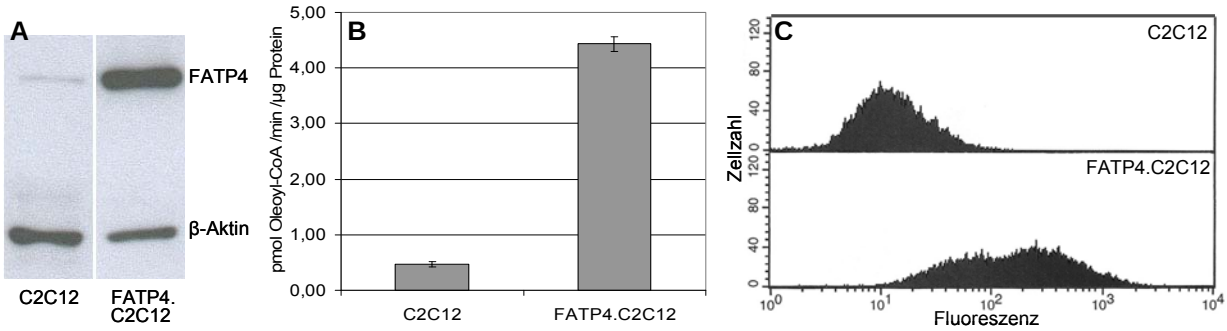

Abbildung 5: Charakterisierung der stabilen FATP4.C2C12-Zelllinie.

A: Das Protein FATP4 wird in der C2C12-Zelllinie gegenüber den Kontrollzellen hoch überexprimiert. Als Ladekontrolle dient β-Aktin. FATP4: 72 kDa, β-Aktin: 41 kDa.

B: Die FATP4.C2C12-Zelllinie zeigt eine um das 9,5-fache erhöhte Enzymaktivität gegenüber mit dem Leervektor transfizierten C2C12-Zellen. Die Zellen wurden in KT-Puffer durch Einfrieren in Flüssigstickstoff und Auftauen bei 8 °C lysiert. Die Lysate wurden für 10 min bei 30 °C mit 20 µM Oleat, welchem anteilig ^{3}H-Oleat zugefügt war, inkubiert und anschließend die nicht verbrauchte freie Fettsäure extrahiert und die synthetisierten Acyl-CoAs im Flüssigszintillationszähler gezählt. Nach Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen wurde die spezifische Enzymaktivität (pmol Oleoyl-CoA/min/µg Protein) berechnet. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit jeweils 3 Proben und deren Standardabweichungen.

C: Die Aufnahme fluoreszierender Bodipy-Fettsäure ist in der FATP4.C2C12-Zelllinie stark erhöht. Die Zellen wurden für 2 min mit 2 µM Bodipy-Fettsäure inkubiert und in der Durchflusszytometrie eingesetzt.

Die FATP4.C2C12-Zelllinie zeichnete sich folglich durch eine hohe Überexpression an FATP4, eine deutlich gesteigerte Enzymaktivität und die Befähigung die Fettsäure-Aufnahme in die Zelle zu steigern aus.

4.1.1.2 Analyse des initialen Lipidstoffwechsels in FATP4.C2C12-Zellen

Aufbauend auf die Charakterisierung der Zelllinie wurde der Einfluss der Acyl-CoA-Synthetase FATP4 auf den frühen Lipidstoffwechsel der Zellen mittels einer *Pulse-Chase*-Markierung untersucht. Die Zellen wurden für 60 s mit ^{14}C-Oleat markiert (*Pulse*), gefolgt von einer bis zu 18-minütigen Inkubation mit nicht radioaktivem Oleat (*Chase*). Während dieser Zeit konnte die Verstoffwechselung des initial zugefügten ^{14}C-Oleats verfolgt werden ohne durch im *Chase* aufgenommene Markierung überlagert zu werden. Die Lipide wurden extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Die Signale wurden anhand des Laufverhaltens nicht radioaktiver Lipidstandards zugeordnet.

Die FATP4.C2C12-Zellen nahmen gegenüber den Kontrollzellen während des kurzen radioaktiven *Pulses* die 3,2-fache Menge an Oleat auf (Abbildung 6A). Die aufgenommene Oleatmenge blieb wie erwartet während des folgenden *Chases* konstant. Mit Hilfe des O-Mixes wurden die Phospho- und Neutrallipide aufgetrennt und mittels Röntgenfilm visualisiert. Der zeitliche Verlauf der Oleatumsetzung ist aus der dünnschicht-chromatographischen Darstellung ersichtlich (Abbildung 6B). So nahm die Signalstärke des intermediären Lipids Diacylglycerin ab sowie die Signalstärke der Endprodukte Triacylglycerin und Phosphatidylcholin zu. Das vierte Signal (PIPA) konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Bezüglich des Laufverhaltens im O-Mix kommt Phosphatidylinositol oder Phosphatidsäure in Frage.

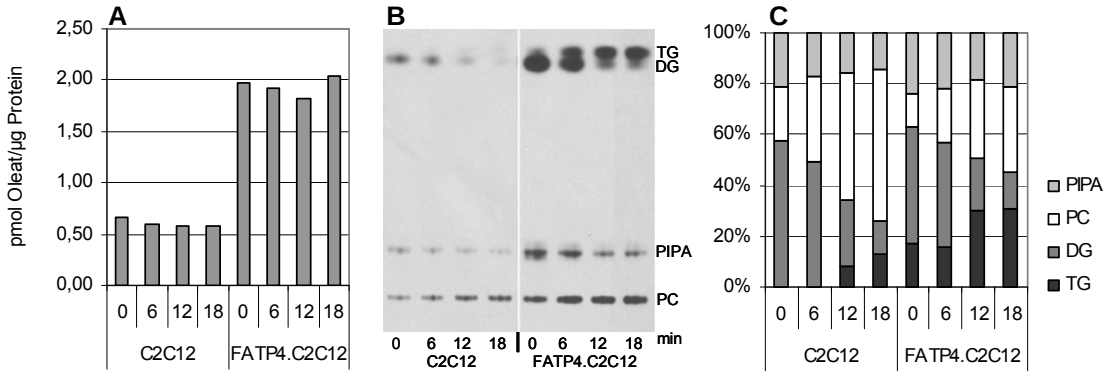

Abbildung 6: Schnelle Metabolisierung von ^{14}C-Oleat zu Phosphatidylcholin und Triaclyglycerin.
A: Die FATP4.C2C12-Zelllinie zeigt während des *Pulses* eine um das 3,2-fache erhöhte Oleataufnahme gegenüber mit dem Leervektor transduzierten C2C12-Zellen. Die Markierung der Zellen bleibt während des *Chases* konstant.
B und C: Metabolisierung des aufgenommenen ^{14}C-Oleats zu Phosphatidylcholin und Triacylglycerin. B zeigt eine mittels Röntgenfilm visualisierte Dünnschichtchromatographie. C stellt deren Quantifizierung über ImageJ dar.
Die Zellen wurden für 60 s mit ^{14}C-Oleat markiert (*Pulse,* 0 min) und anschließend für bis zu 18 min mit kaltem Oleat inkubiert (*Chase*). Die Lipide wurden extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie im O-Mix aufgetrennt.

Die Quantifizierung der Signale erfolgte über die Grauwerte des Röntgenfilms in ImageJ und bestätigte die Umsetzung des nach dem *Pulse* im Diacylglycerin gebundenen Oleats zu Triacylglycerin und Phosphatidylcholin (Abbildung 6C). Während die Kontrollzellen das im Diacylglycerin gebundene, markierte Oleat hauptsächlich zu Phospholipiden umsetzten, führte FATP4 Überexpression zu einer Umsetzung des Oleats zu Triacylglycerin. So enthielten FATP4 überexprimierende Zellen im gesamten Versuchsverlauf einen um ca. 20 % höheren Anteil an Triacylglycerin als Kontrollzellen.

4.1.1.3 Langfristige Erhöhung des Triacylglycerinanteils in FATP4.C2C12-Zellen

Nachdem bereits während des frühen Lipidstoffwechsels eine Inkorporierung des aufgenommenen Oleats in Triacylglycerin nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend der langfristige Lipidstoffwechsel untersucht. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 h mit 200 µM Oleat, welchem anteilig ^{14}C-Oleat zugefügt war, inkubiert und die gebildeten radioaktiv-markierten Lipide analysiert.

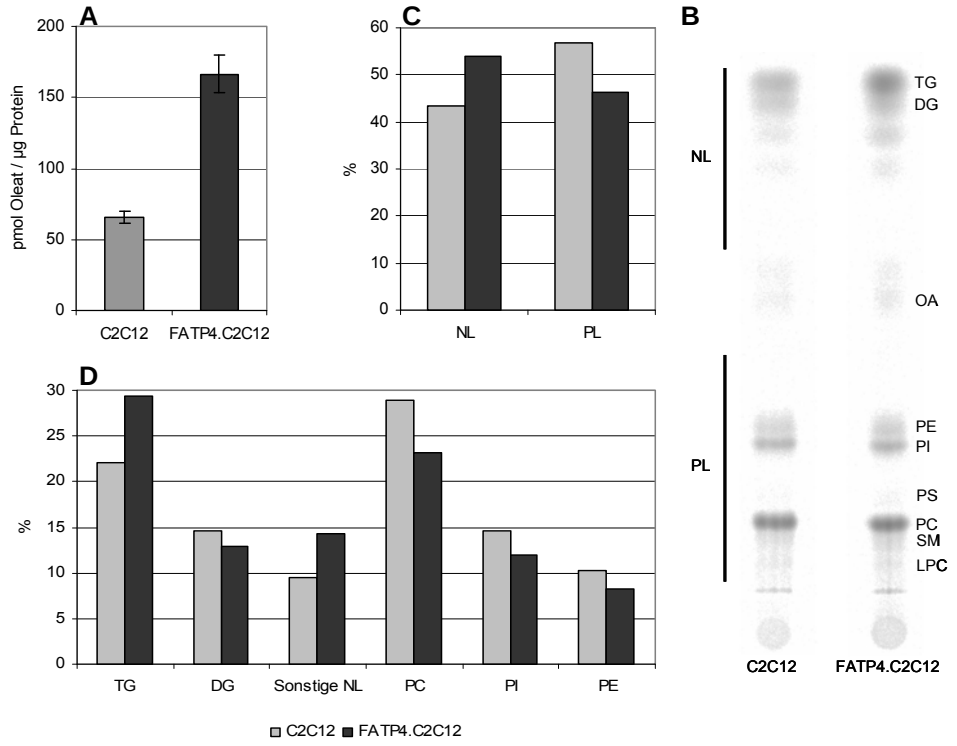

Abbildung 7: Bei langfristiger Oleatinkubation wird dieses vermehrt zu Triacylglycerin umgesetzt.

A: Die FATP4.C2C12-Zelllinie zeigt eine um das 2,6-fache erhöhte Oleataufnahme gegenüber mit dem Leervektor transduzierten C2C12-Zellen. Die Zellen wurden für 3 h mit 200 µM Oleat inkubiert, die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie im O-Mix aufgetrennt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit jeweils 3 Proben sowie deren Standardabweichungen.

B: FATP4.C2C12-Zellen setzen das aufgenommene Oleat vermehrt in Triacylglycerine um. Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen nach Auftrennung der Lipide im O-Mix und Visualisierung mittels *Phosphorimaging*.

C und D: Quantifizierung von B mittels ImageJ. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Lipide an den Gesamtlipiden, ohne freies Oleat, innerhalb einer Spur. C zeigt eine Zunahme der Neutrallipidanteile und eine Abnahme der Phospholipidanteile nach FATP4 Überexpression. D zeigt eine prozentuale Zunahme an Triacylglycerin sowie nicht identifizierter Neutrallipide aufgrund von FATP4 Überexpression und eine prozentuale Abnahme aller übrigen Lipide.

Die Oleataufnahme wurde aufgrund der FATP4 Überexpression gegenüber den Kontrollzellen auf das 2,6-fache gesteigert (Abbildung 7A). In der dünnschicht-chromatographischen Darstellung (Abbildung 7B) ist eine Zunahme der Signalstärke des Triacylglycerins nach FATP4 Überexpression zu erkennen, während die Signale aller gebildeten Phospholipide apparent gleich bleiben. Die Quantifizierung der Neutral- und Phospholipide, wie in B dargestellt, ergab einen um 11 % höheren Anteil an synthetisierten Neutrallipiden sowie einen entsprechend geringeren Phospholipidanteil in FATP4.C2C12-Zellen im Vergleich zu mit dem Leervektor transduzierten C2C12-Zellen (Abbildung 7C).

Dieser gesteigerte Anteil an Neutrallipiden wurde durch eine erhöhte Synthese von Triacylglycerin und nicht-identifizierten Neutrallipiden hervorgerufen, während die relativen Anteile des Diacylglycerins und der Phospholipide durch die FATP4 Überexpression vermindert wurden (Abbildung 7D).

Für die FATP4.C2C12-Zelllinie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des FATP4, verbunden mit einer erhöhten zellulären Enzymaktivität, die Aufnahme exogen zugeführten Oleats erhöhte und dieses bereits innerhalb weniger Minuten zu Triacylglycerin umgesetzt wurde. Bei längerer Inkubation der Zellen mit Oleat manifestierte sich dieser Effekt.

4.1.2 FATP4 in stabil exprimierenden HEK293-Zellen

Die durch FATP4 Überexpression hervorgerufene Umsetzung der Fettsäure Oleat zu Triacylglycerin sollte anhand einer weiteren Zelllinie bestätigt werden. Es wurde ein FATP4 verwendet, welchem N-terminal ein GFP angefügt war, und damit verschiedene stabile Zelllinien generiert. Diese wurden zunächst bezüglich ihrer Enzymaktivität untersucht. Die FATP4.HEK293 zeigten verglichen mit den anderen Zelllinien die höchste Aktivitätssteigerung gegenüber ihren Kontrollzellen (nicht gezeigt) und wurden im Folgenden verwendet.

4.1.2.1 Charakterisierung der FATP4.HEK293-Zelllinie

Die Analyse der GFP-Expression am Durchflusszytometer zeigte eine starke Expression des GFP-markierten FATP4 in HEK293-Zellen (Abbildung 8A). Diese Überexpression resultierte in einer verdoppelten Aktivität der Acyl-CoA-Synthetasen in den stabil transduzierten Zellen (Abbildung 8B).

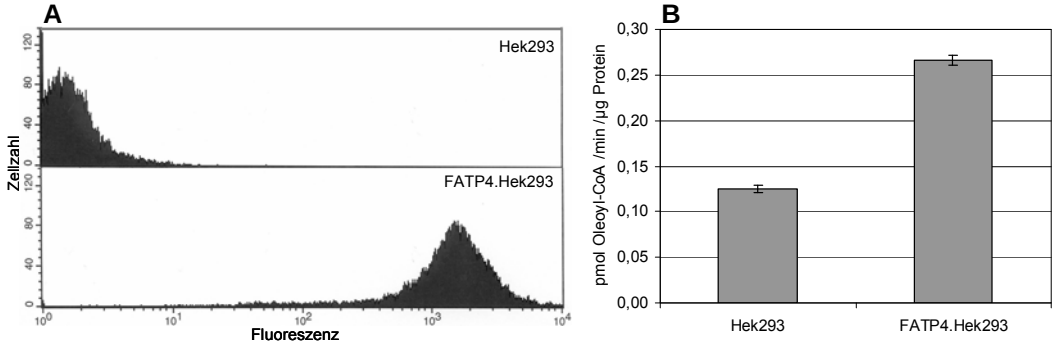

Abbildung 8: Charakterisierung der stabilen FATP4.HEK293-Zelllinie.
A: FATP4-Expression in HEK293-Zellen. FATP4 wurde als GFP-FATP4 Fusionsprotein stabil in HEK293-Zellen exprimiert und die Expression mittels Durchflusszytometrie untersucht.
B: FATP4.HEK293-Zellen zeigen eine um das 2,1-fache erhöhte Enzymaktivität gegenüber mit dem Leervektor transduzierten Zellen. Die Zellen wurden in KTx-Puffer lysiert und die Lysate für 10 min bei 30 °C mit 20 µM Oleat, welchem anteilig ^{14}C-Oleat zugefügt war, inkubiert und anschließend die nicht verbrauchte freie Fettsäure extrahiert und die synthetisierten Acyl-CoAs im Flüssigszintillationszähler gezählt. Nach Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen wurde die spezifische Enzymaktivität (pmol Oleoyl-CoA/min/µg Protein) berechnet. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit jeweils 3 Proben und deren Standardabweichungen.

4.1.2.2 In FATP4.HEK293-Zellen zusätzlich aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt.

Die zuvor charakterisierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 3 h mit 200 µM Oleat, welchem anteilig ^{14}C-Oleat zugefügt war, inkubiert und die gebildeten radioaktiv-markierten Lipide analysiert.

Die Oleataufnahme in den FATP4 überexprimierenden Zellen war nach dreistündiger Inkubation gegenüber den Kontrollzellen verdoppelt (Abbildung 9A). Die Dünnschichtchromatographie zeigt, dass das Signal des Triacylglycerins stärker wurde, während die Signale aller anderen Phospholipide augenscheinlich gleich blieben (Abbildung 9B). Dies wurde durch die Quantifizierung bestätigt. So nahm die absolute Menge der markierten Neutrallipide auf das 3,2-fache zu, während die Menge der markierten Phospholipide nur auf das 1,3-fache stieg (Abbildung 9C). Dies resultierte in einem um 21 % erhöhten Neutrallipidanteil in den FATP4 überexprimierenden HEK293-Zellen gegenüber den Kontrollzellen und einem entsprechend geringeren Phospholipidanteil (Abbildung 9D). Die Betrachtung der absoluten Mengen der einzelnen Lipide zeigt, dass die Steigerung der Neutrallipidmenge hauptsächlich auf einer gegenüber den Kontrollzellen um 274 % gesteigerten Triacylglycerinmenge beruht. Auch alle anderen markierten Lipide zeigten eine absolute Zunahme, jedoch betrug diese nur zwischen 15 % und 73 % gegenüber den Kontrollzellen und war somit um das 4-fache bis 18-fache geringer als die Zunahme des Triacylglycerins (Abbildung 9E). Bezüglich der prozentualen Lipidanteile konnte folglich nur der Anteil des Triacylglycerins durch Überexpression von FATP4 vergrößert werden (Abbildung 9F).

Überexpression von FATP4 erhöhte in C2C12-Zellen und HEK293-Zellen die Aufnahme von Oleat. Dieses wurde hauptsächlich zu Triacylglycerin umgesetzt, wobei der Effekt für die FATP4.HEK293-Zellen deutlich größer war als für die FATP4.C2C12-Zellen.

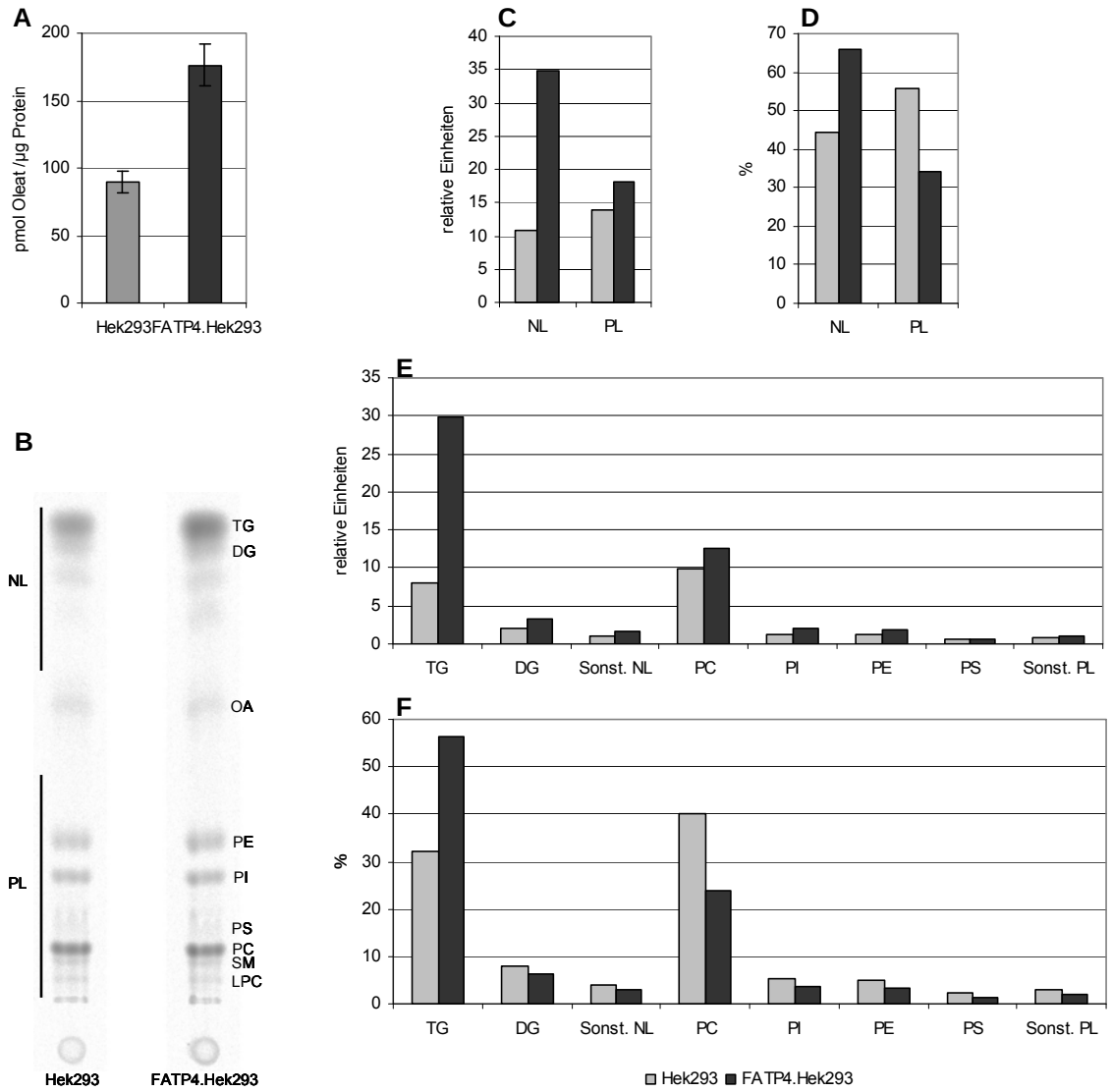

Abbildung 9: Zusätzlich aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt.

A: Die FATP4.HEK293-Zelllinie zeigt eine verdoppelte Oleataufnahme gegenüber mit dem Leervektor transduzierten HEK293-Zellen nach dreistündiger Inkubation der Zellen mit 200 µM Oleat, welchem anteilig ^{14}C-Oleat zugefügt war.

B: FATP4.HEK293-Zellen setzen das aufgenommene Oleat vermehrt in Triacylglycerin um. Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen nach Auftrennung der Lipide im O-Mix und Visualisierung mittels *Phosphorimaging*.

C bis F: Quantifizierung von B mittels AIDA. In C und E sind die absoluten Werte der gebildeten Lipide gezeigt, welche sich aus der densitometrischen Auswertung der Grauwerte der Signale ergeben. D und E zeigen die prozentualen Anteile der jeweiligen Lipide an den Gesamtlipiden, ohne freies Oleat, innerhalb einer Spur. Die absolute Menge der Neutrallipide steigt auf das 3,2-fache während die Menge der Phospholipide auf das 1,3-fache steigt (C). Dies resultiert in einem um 21 % höherem Neutrallipidanteil in FATP4.HEK293-Zellen (D). Die absolute und relative Zusammensetzung der synthetisierten Lipide ist in E und F dargestellt.

4.2 Der Einfluss von ACSL4-Überexpression auf den Lipidstoffwechsel

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt dass sich die Überexpression von FATP4 in C2C12-Zellen und HEK293-Zellen hauptsächlich in einer vermehrten Synthese von Triacylglycerin äußerte. Durch Überexpression von ACSL4 in COS-Zellen wurde untersucht, ob diese Acyl-CoA-Synthetase Fettsäuren in eine andere metabolische Richtung lenken kann. Zusätzlich sollte für dieses Protein untersucht werden, ob die *unterschiedliche* Lokalisierung *derselben* Acyl-CoA-Synthetase einen Einfluss auf die Kanalisierung der Fettsäure in eine bestimmte metabolische Richtung hat.

4.2.1 Verwendete ACSL4 Konstrukte

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene ACSL4 Konstrukte verwendet. Die natürlichen Isoformen ACSL4, welches im Cytosol und auf der Plasmamembran lokalisiert, und M-ACSL4, welches im Endoplasmatischen Retikulum und auf den Lipidtröpfchen lokalisiert. Um den Einfluss der subzellulären Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen auf die intrazelluläre Kanalisierung von Fettsäuren analysieren zu können, wurde in der eigenen Arbeitsgruppe ein weiteres membrangebundenes ACSL4 kloniert, welches auf Mitochondrien lokalisiert (Lehnen, 2009). Dieses Konstrukt, Mito-ACSL4, besteht aus dem kurzen ACSL4, welchem N-terminal die Sortierungssequenz des Proteins Tom20 der äußeren Mitochondrienmembran angefügt wurde (Kanaji *et al.*, 2000). Alle eingesetzten ACSL4-Proteine enthalten ein C-terminal angefügtes FLAG-Epitop. Abbildung 10 zeigt den schematischen Aufbau der verwendeten ACSL4-Konstrukte.

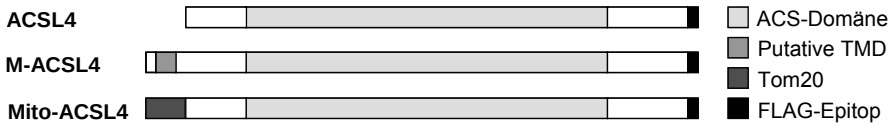

Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten ACSL4-Konstrukte.
ACSL4 und M-ACSL4 sind zwei nativ vorkommende Isoformen. ACSL4 lokalisiert in der Plasmamembran und im Cytosol, während M-ACSL4 eine putative Transmembrandomäne besitzt, die es im Endoplasmatischen Retikulum und auf den Lipidtröpfchen lokalisiert. Mito-ACSL4 ist eine über Fusion mit der mitochondriellen Sortierungssequenz von Tom20 erzeugte mitochondriell lokalisierte Mutante.

4.2.2 Charakterisierung der ACSL4.COS-Zellen

In Vorarbeiten konnten nur für Mito-ACSL4 stabile Zelllinien erzeugt werden. Während der Herstellung der Retroviren exprimierten die virusproduzierenden Phoenix-gp-Zellen nachweislich das ACSL4 und das M-ACSL4, jedoch starben verschiedene mit diesen Konstrukten transduzierte Zielzelllinien aufgrund mangelnder Expression während der Selektion ab. Folglich wurden die verschiedenen ACSL4-Proteine transient in COS-Zellen überexprimiert.

4.2.2.1 Titration einer einheitlichen Expressionshöhe aller ACSL4-Proteine

Nach transienter Transfektion der verschiedenen ACSL4-Plasmide wurde eine sehr unterschiedliche Expressionshöhe der Proteine im Western-Blot beobachtet (nicht gezeigt). So wurde das Mito-ACSL4 mehr als 10-fach so stark exprimiert wie das M-ACSL4 sowie deutlich stärker als das kurze ACSL4. Titration der in der Transfektion eingesetzen DNA-Konzentrationen und Optimierung der Inkubationszeiten während der Transfektion ergaben schließlich ein vergleichbares Expressionsniveau (Abbildung 11, Tabelle 1).

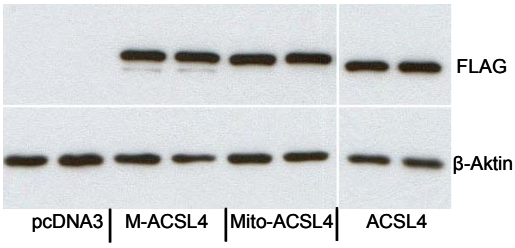

Tabelle 1: Verwendete Ansätze und Zeiten zur Transfektion einer 10 cm^2-Schale von COS-Zellen.

	DNA [µg]		OptiMEM [µl]	Fugene [µl]	Zeit [h]
	A4	pcDNA3			
pcDNA3		2	200	10	4
M-ACSL4	4		400	20	8
Mito-ACSL4	0,2	1,8	200	10	4
ACSL4	1	1	200	10	4

Abbildung 11: Gleiche Expressionshöhe der verschiedenen ACSL4-Proteine in COS-Zellen.
Transfektion von COS-Zellen anhand der in Tabelle 1 angegebenen Ansätze führt zu einer einheitlichen Expressionshöhe aller ACSL4-Proteine. Alle überexprimierten ACSL4-Proteine besitzen ein FLAG-Epitop. ACSL4-FLAG:76 kDa, M-ACSL4: 81 kDa, Mito-ACSL4: 81 kDa, β-Aktin: 41 kDa.

4.2.2.2 Unterschiedliche Lokalisierung der verwendeten ACSL4-Proteine

Zunächst wurde die Lokalisierung der verwendeten ACSL4-Proteine mittels Immunfluoreszenz sowie subzellulärer Fraktionierung untersucht. Für die mikroskopische Analyse wurden COS-Zellen auf Glasplättchen ausgesät und mit den ACSL4-Plasmiden sowie verschiedenen Markerproteinen kotransfiziert. Der Nachweis der Proteine erfolgte über indirekte Immunfluoreszenz gegen das C-terminale FLAG-Epitop der ACSL4-Proteine oder durch Verwendung von GFP- oder RFP-Fusionsproteinen.

Die Lokalisierung des ACSL4 wurde durch Expression von ACSL4-FLAG beziehungsweise ACSL4-GFP untersucht. Die Immunfluoreszenz zeigte wurmförmige Strukturen in der gesamten Zelle (Abbildung 12). Diese Strukturen sind typische Merkmale für eine Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran. Koexpression des Plasmamembranmarkers Membran-GFP (Ehehalt *et al.*, 2008) zeigte eine deutliche Gelbfärbung als Beweis einer Kolokalisierung von ACSL4-FLAG und Membran-GFP auf der Plasmamembran (Abbildung 12A1). Die detektierten Strukturen sind in der Vergrößerung deutlich zu erkennen (Abbildung 12A2). Es handelt sich um die Mikrovilli der Plasmamembran, wie eine Kolokalisierung von ACSL4-FLAG mit Prominin, einem Markerprotein für Mikrovilli, bestätigt hatte (Großmann, 2011). Da Membran-GFP ein sekretorisches Protein ist, zeigte dieses eine Grünfärbung des Golgi-Apparates, welche bei ACSL4-FLAG nicht vorhanden war. Subzelluläre Fraktionierung in Membranen und Cytosol zeigte zudem eine Expression von ACSL4 im Cytosol (Großmann, 2011).

Um eine Lokalisierung von ACSL4 im Endoplasmatischen Retikulum auszuschließen, wurde eine Koexpression von ACSL4-GFP mit dem ER-Marker ER-RFP durchgeführt. Es konnte keine Kolokalisierung beider Proteine nachgewiesen werden. Während für ACSL4-GFP die wurmförmigen Strukturen der Plasmamembran detektiert wurden, zeigten sich für ER-RFP die feinen, netzwerkartigen Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums (Abbildung 12B). Auch eine Lokalisierung des ACSL4 auf den Mitochondrien konnte ausgeschlossen werden. Der Mitochondrienmarker OCT-GFP zeigte intrazelluläre schlauchförmige Strukturen, welche mit den wurmförmigen Strukturen des ACSL4-FLAG nicht kolokalisierten (Abbildung 12C). Weiterhin bestand keine signifikante Lokalisierung des kurzen ACSL4 auf den Peroxisomen und den Lipidtröpfchen (Großmann, 2011).

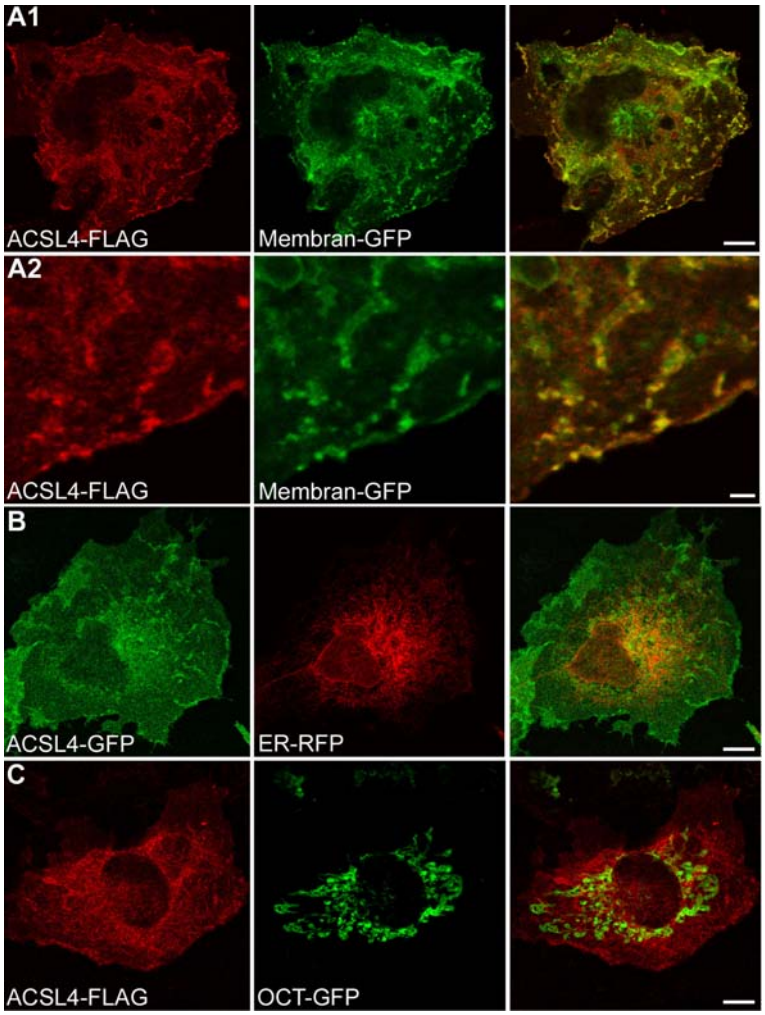

Abbildung 12: ACSL4 lokalisiert in der Plasmamembran.
Das verwendete ACSL4 enthielt ein FLAG-Epitop oder lag als GFP-Fusionsprotein vor. Das ACSL4-FLAG wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in transfizierten COS-Zellen nachgewiesen. Zum Vergleich wurden GFP-/RFP-markierte Markerproteine mitgeführt.

A1: Kolokalisierung des Membranmarkers Membran-GFP (Ehehalt *et al.*, 2008) mit ACSL4-FLAG (Balken: 10 µm).

A2: Vergrößerter Bildausschnitt aus A1. Die Mikrovilli der Plasmamembran sind zu erkennen (Balken: 2 µm).

B: ACSL4-GFP und der ER-Marker zeigen verschiedene intrazelluläre Muster (Balken: 10 µm).

C: ACSL4-GFP zeigt keine Kolokalisierung mit dem mitochondriellen Markerprotein OCT-GFP (Balken: 10 µm).

Die gezeigten Präparate sowie die Aufnahmen wurden durch Regina Großmann angefertigt.

Überexpression von M-ACSL4 zeigte die feinen, netzwerkartigen Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums sowie globuläre Ansammlungen innerhalb der Zelle (Abbildung 13). GFP-FATP4 wurde als Marker für das Endoplasmatische Retikulum verwendet, da dessen ER-Lokalisierung eindeutig nachgewiesen wurde (Milger *et al.*, 2006). Eine Kolokalisierung beider Proteine ist besonders in der Vergrößerung (Abbildung 13A2) eindeutig zu erkennen. Die globulären Strukturen wurden als Lipidtröpfchen identifiziert, auf deren Oberfläche M-ACSL4 aber kein FATP4 exprimiert wird (Großmann, 2011). Eine Koexpression mit dem Mitochondrienmarker OCT-GFP zeigte keine Kolokalisierung zwischen den feinen Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums und den schlauchförmigen Mitochondrien (Abbildung 13B).

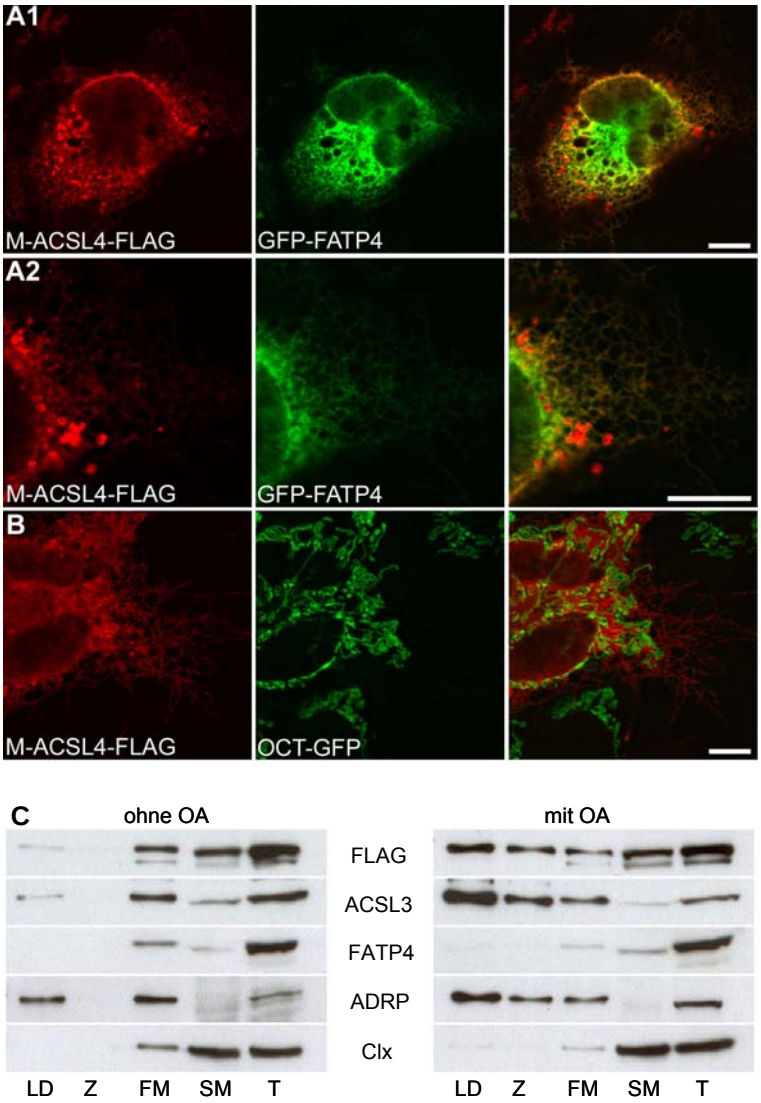

Abbildung 13: M-ACSL4 lokalisiert im ER und auf Lipidtröpfchen.

A1: M-ACSL4 kolokalisiert mit dem als ER-Marker verwendeten GFP-FATP4. Zusätzlich lokalisiert M-ACSL4 auf Lipidtröpfchen.

A2: Vergrößerter Bildausschnitt aus A1. Eine Kolokalisierung in den netzwerkartigen Strukturen des ER ist deutlich zu erkennen.

B: M-ACSL4 zeigt keine Kolokalisierung mit dem mitochondriellen Markerprotein OCT-GFP.

Das verwendete M-ACSL4 enthält ein FLAG-Epitop und wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in transfizierten COS-Zellen nachgewiesen (Balken: 10 µm).

C: Der Hauptanteil des M-ACSL4-FLAG lokalisiert im ER. Induktion von Lipidtröpfchen verursacht eine Wanderung von M-ACSL4-FLAG und ACSL3 auf die Lipidtröpfchen.

Die transfizierten COS-Zellen wurden über Nacht in normalem Medium oder in Medium, welchem 177 µM Oleat zugefügt wurde, inkubiert. Es folgte eine subzelluläre Fraktionierung in ER und Lipidtröpfchen. Folgende Fraktionen wurden abgenommen, deren Proteine präzipitiert und mittels Western-Blot untersucht: LD: Lipidtröpfchen, Z: Zwischenfraktion, FM: flotierende Membranen, SM: schwere Membranen. T: Totallysat, ADRP: Adipophilin (LD-Marker, hier ADRP-RFP), Clx: Calnexin (ER-Marker).
ACSL3: 80 kDa, ADRP-RFP: 77 kDa, Clx: 100 kDa, FATP4: 72 kDa, M-ACSL4-FLAG: 81 kDa.

Da das M-ACSL4 in COS-Zellen neben einer Lokalisierung im Endoplasmatischen Retikulum zusätzlich und deutlich erkennbar auf den Lipidtröpfchen exprimiert wurde, wurde eine subzelluläre Fraktionierung dieser Organellen durchgeführt. Die eingesetzten Zellen wurden zuvor anteilig mit M-ACSL4 und dem Lipidtröpfchenmarker ADRP-RFP transfiziert. Ein Ansatz, in welchem durch Inkubation mit Oleat über Nacht die Synthese von Lipidtröpfchen induziert wurde, wurde mit einem nicht-induzierten Ansatz verglichen. Es wurde ein zweistufiger Sucrosegradient verwendet und nach erfolgter Ultrazentrifugation vier Fraktionen gesammelt, deren Proteine präzipitiert und mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 13C).

Die Verteilung des M-ACSL4-FLAG wurde mit den klassischen Organellmarkern Calnexin (ER-Marker) und Adipophilin (LD-Marker) verglichen. Zusätzlich wurden Antikörper gegen zwei weitere Acyl-CoA-Synthetasen eingesetzt. Das ER-ständige endogene FATP4 (Milger *et al.*, 2006) sowie das endogene ACSL3, welches im Endoplasmatischen Retikulum und auf Lipidtröpfchen lokalisiert (Fujimoto *et al.*, 2004; Rudolph, 2011) und dessen Konzentration auf den Lipidtröpfchen nach deren Induktion stark zunimmt (Fujimoto *et al.*, 2007).

Abbildung 13C zeigt COS-Zellen, in denen M-ACSL4-FLAG überexprimiert wurde. Ohne Induktion von Lipidtröpfchen über Nacht konnte M-ACSL4-FLAG überwiegend in den schweren und den flotierenden Membranen detektiert werden, jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil in der LD-haltigen Fraktion. Die Verteilung des M-ACSL4-FLAG stimmte mit der Verteilung des ER-Markers Calnexin, sowie des FATP4 und des ACSL3 überein. Ausschließlich der LD-Marker Adipophilin zeigte ein Signal in der LD-Fraktion. Infolge einer induzierten LD-Synthese nahm die Zahl und Größe der Lipidtröpfchen zu, was anhand des stärkeren Signals des Adipophilin zu erkennen ist. ACSL3 wurde wie zuvor beschrieben verstärkt auf den Lipidtröpfchen gebildet und war hauptsächlich in der LD-Fraktion nachweisbar. Das überexprimierte M-ACSL4-FLAG konnte in der LD-Fraktion sowie in den Membranfraktionen in etwa gleicher Stärke nachgewiesen werden. Ausschließlich die reinen ER-Proteine Calnexin und FATP4 waren nach wie vor in den Membranfraktionen vorhanden. Die Fraktionierung zeigte somit, dass das M-ACSL4 unter den in den folgenden Versuchen verwendeten Bedingungen, in denen die Fettsäureinkubation deutlich kürzer war als für die Induktion von Lipidtröpfchen, überwiegend im ER lokalisiert war.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung derselben Acyl-CoA-Synthetasen auf die intrazelluläre Kanalisierung von Fettsäuren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine ACSL4-Mutante, Mito-ACSL4, kloniert, welche sich durch eine mitochondrielle Lokalisierung auszeichnet (Lehnen, 2009).

In COS-Zellen überexprimiertes Mito-ACSL4 zeigte in der Immunfluoreszenz dieselben schlauchförmigen Strukturen wie der koexprimierte Mitochondrienmarker OCT-GFP (Abbildung 14B). Eine Kolokalisierung mit dem als ER-Marker verwendeten GFP-FATP4 lag jedoch nicht vor (Abbildung 14A).

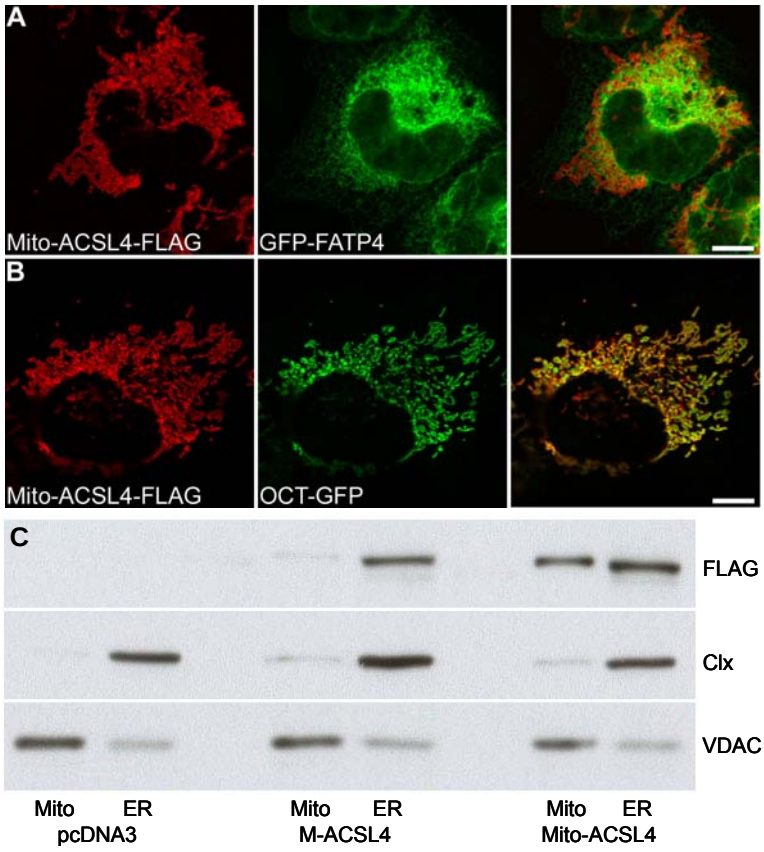

Abbildung 14: Mito-ACSL4 lokalisiert auf Mitochondrien.

A: Mito-ACSL4 zeigt keine Kolokalisierung mit dem als ER-Markerprotein verwendeten GFP-FATP4.

B: Mito-ACSL4 kolokalisiert mit dem mitochondriellen Markerprotein OCT-GFP.

Das verwendete Mito-ACSL4 enthält ein FLAG-Epitop und wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in COS-Zellen nachgewiesen (Balken: 10 µm).

C: Mito-ACSL4-FLAG zeigt eine zusätzliche Bande in der mitochondriellen Fraktion.

Die transfizierten COS-Zellen wurden in Mitochondrien und ER fraktioniert und die Proteine mittels Western-Blot analysiert. Clx: Calnexin (ER-Marker), VDAC: Spannungsabhängiger Anionenkanal (Mitochondrien-Marker). Clx: 100 kDa, M-ACSL4: 81 kDa, Mito-ACSL4: 81 kDa, VDAC: 32 kDa.

Die mitochondrielle Lokalisierung wurde mithilfe der subzellulären Fraktionierung in Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum bestätigt. Im Western-Blot wurden als Referenz Antikörper gegen die endogenen Proteine Calnexin (ER-Marker) und den spannungsabhängigen Anionenkanal (Mitochondrien-Marker) eingesetzt. Das Mito-ACSL4 zeigte ein deutliches Signal in der mitochondriell angereicherten Fraktion. Die für das Mito-ACSL4 vorhandene Bande in der ER-Fraktion lässt sich auf eine nicht optimale Fraktionierung zurückführen, was durch die Markersignale bestätigt wird.

4.2.2.3 Die ACSL4-Proteine sind gleichermaßen enzymatisch aktiv

Die drei verschieden lokalisierten ACSL4-Proteine wurden im nächsten Schritt auf ihre Enzymaktivität hin untersucht. Da für das kurze ACSL4 eine Substratspezifität für Arachidonat beschrieben ist (Kang *et al.*, 1997; Cao *et al.*, 1998), wurde zunächst in einem Vorversuch die Aktivität aller ACSL4-Proteine mit Oleat und Arachidonat untersucht.

Die publizierte Substratspezifität für Arachidonat gegenüber Oleat konnte für alle verwendeten ACSL4-Proteine bestätigt werden. Während mit Oleat als Substrat unter den verwendeten Bedingungen keine Steigerung der Acyl-CoA-Synthetasen Aktivität gegenüber mit pcDNA3 transfizierten Kontrollzellen vorlag, war die Arachidonyl-CoA-Synthetasen Aktivität in ACSL4 überexprimierenden COS-Zellen deutlich erhöht (Abbildung 15).

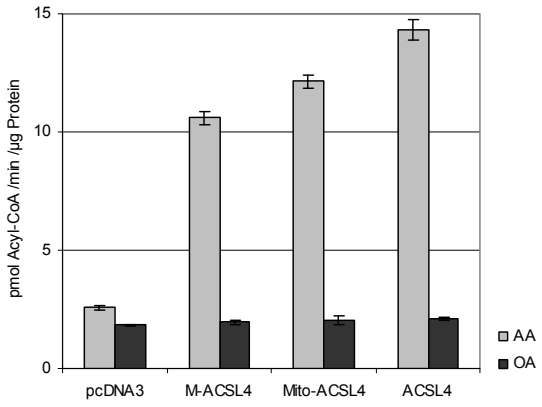

Abbildung 15: Alle ACSL4-Proteine zeigen eine erhöhte Enzymaktivität mit Arachidonat.
Die Enzymaktivität der verschiedenen ACSL4-Proteine ist mit Arachidonat deutlich gesteigert, während mit Oleat keine erhöhte Aktivität gemessen werden kann. Die Zellen wurden mit KTx-Puffer lysiert, die Lysate für 10 min bei 30 °C mit 20 µM Fettsäure, welcher anteilig ^{14}C-Fettsäure zugefügt war, inkubiert, die nicht verstoffwechselte Fettsäure extrahiert und die gebildeten Acyl-CoAs im Flüssigszintillationszähler gezählt. Nach Ermittlung der eingesetzten Proteinmenge wurde die spezifische Enzymaktivität (pmol Acyl-CoA/min/µg Protein) berechnet. Gezeigt ist ein Experiment mit jeweils drei Proben sowie deren Standardabweichungen. AA: Arachidonat, OA: Oleat.

Aufgrund der Substratspezifität aller ACSL4-Proteine für das mehrfach ungesättigte Arachidonat wurde der Schwerpunkt in den folgenden Experimenten auf diese Fettsäure gelegt und nur teilweise durch Experimente unter Verwendung von Oleat ergänzt.

Die Arachidonyl-CoA-Synthetasen Aktivität ACSL4-transfizierter Zellen wurde bestimmt und ist in Abbildung 16 dargestellt. Die Aktivität des ER-ständigen M-ACSL4 war gegenüber den Kontrollzellen um etwa das 13-fache gesteigert (p: 0,038). Die Steigerung des mitochondriellen Mito-ACSL4 betrug ca. das 8-fache (p: 0,0001) und die des Plasmamembran-lokalisierten ACSL4 ca. das 9-fache (p: nicht möglich, da n=2) der endogenen ACS-Aktivität (Abbildung 16A).

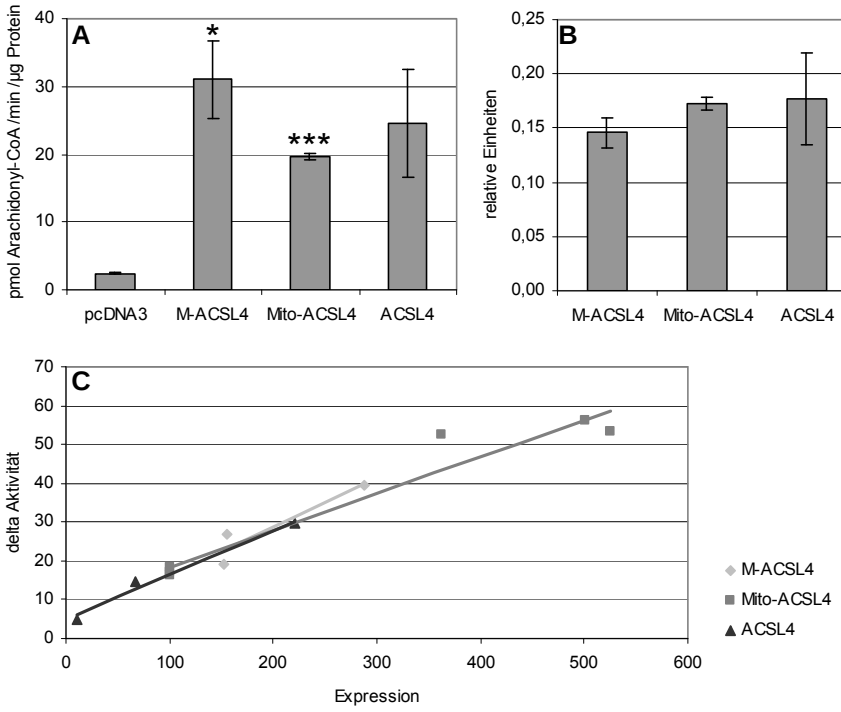

Abbildung 16: Die Arachidonyl-CoA-Synthetase Aktivität der verschiedenen ACSL4-Proteine ist gleich hoch und steigt proportional zu deren Expression.

A: ACSL4-Überexpression erhöht die Arachidonyl-CoA-Synthetasen Aktivität. Die Zellen wurden in KTx-Puffer lysiert, die Lysate für 10 min bei 30 °C mit 20 µM Arachidonat, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt war, inkubiert, die nicht verstoffwechselte Fettsäure extrahiert und die gebildeten Acyl-CoAs im Flüssigszintillationszähler gezählt. Nach Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen wurden die spezifischen Enzymaktivitäten (pmol Arachidonyl-CoA/min/µg Protein) berechnet. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. *: $p<0,05$ und ***: $p<0,001$ bezogen auf pcDNA3.

B: Enzymaktivität bezogen auf exprimiertes Protein. (Aktivität($A4_x$)–Aktivität(pcDNA3))/(Expression($A4_x$). pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM.

C: Die Enzymaktivität steigt proportional zur Expression. Aufgetragen sind die Aktivitäten nach Subtraktion der endogenen Aktivität von pcDNA3 (delta Aktivität, pmol Arachidonyl-CoA/min/µg Protein) gegen die im Western-Blot bestimmten relativen Expressionen. Für Mito-ACSL4 wurde neben der in A und B verwendeten DNA-Menge auch die 10-fache DNA-Menge transfiziert.

Die absoluten Enzymaktivitäten, welche anhand der Konzentration der Gesamtproteine der Zelle bestimmt wurden, ließen unterschiedliche Aktivitäten für die verschiedenen ACSL4-Proteine vermuten (Abbildung 16A). Diese waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Da die Expression der einzelnen ACSL4-Proteine für die in Abbildung 16A gezeigten Versuche nur ähnlich war, wurden die Enzymaktivitäten auf die mittels Western-Blot bestimmten ACSL4-Mengen bezogen. Die durch ACSL4-Überexpression hervorgerufenen Aktivitätssteigerungen (Aktivität (ACSL4)-Aktivität (pcDNA3)) wurden durch das relative Maß der Proteinexpression dividiert. Diese relativen Enzymaktivitäten aller drei ACSL4-Proteine waren gleich (Abbildung 16B). Die Enzymaktivität ist folglich unabhängig vom N-Terminus und der Lokalisierung der ACSL4-Proteine. In Abbildung 16C wurden die Aktivitätssteigerungen der ACSL4-Proteine gegen deren Expression aufgetragen. Aktivität und Expression stehen in einer linearen Beziehung zueinander, so dass die Höhe der Enzymaktivität folglich durch die Höhe der Enzymexpression beeinflusst wurde (M-ACSL4 R^2: 0,8699; Mito-ACSL4 R^2: 0,9823; ACSL4 R^2: 0,9402).

4.2.2.4 Die ACSL4-Proteine erhöhen die zelluläre Arachidonataufnahme

Nachdem die Funktionalität der Enzyme *in vitro* bestätigt worden war, folgte die funktionelle Überprüfung der Proteine *in vivo*. Zunächst wurde die quantitative Aufnahme von Arachidonat bestimmt.

Die Steigerung der Arachidonataufnahme gegenüber der Aufnahme in Kontrollzellen innerhalb von 15 min betrug in überexprimierenden Zellen für M-ACSL4 64 %, für Mito-ACSL4 81 % und für ACSL4 70 % (Abbildung 17A). Nach 3 h waren die Aufnahmen für M-ACSL4 um 53 %, für Mito-ACSL4 um 56 % und für ACSL4 um 86 % gesteigert (Abbildung 17C). Normierung auf die relative Expression der verschiedenen ACSL4-Proteine zeigte, dass alle drei Arachidonyl-CoA-Synthetasen die Arachidonataufnahme gleichermaßen steigerten (Abbildung 17B und D). Die Basisaufnahmen der Kontrollzellen in den einzelnen Versuchen waren sehr unterschiedlich, daher wird hier nur ein repräsentatives Experiment aus drei Experimenten gezeigt. Wie Abbildung 17E zu entnehmen ist, bestand jedoch keine beziehungsweise nur eine schlechte Korrelation zwischen der Steigerung der Arachidonataufnahme und der Steigerung der Enzymaktivität (M-ACSL4 R^2: 0,0013; Mito-ACSL4 R^2: 0,4817; ACSL4 R^2: 0,2565). Die Fettsäure-aufnahme wird folglich neben der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität durch weitere Enzyme reguliert.

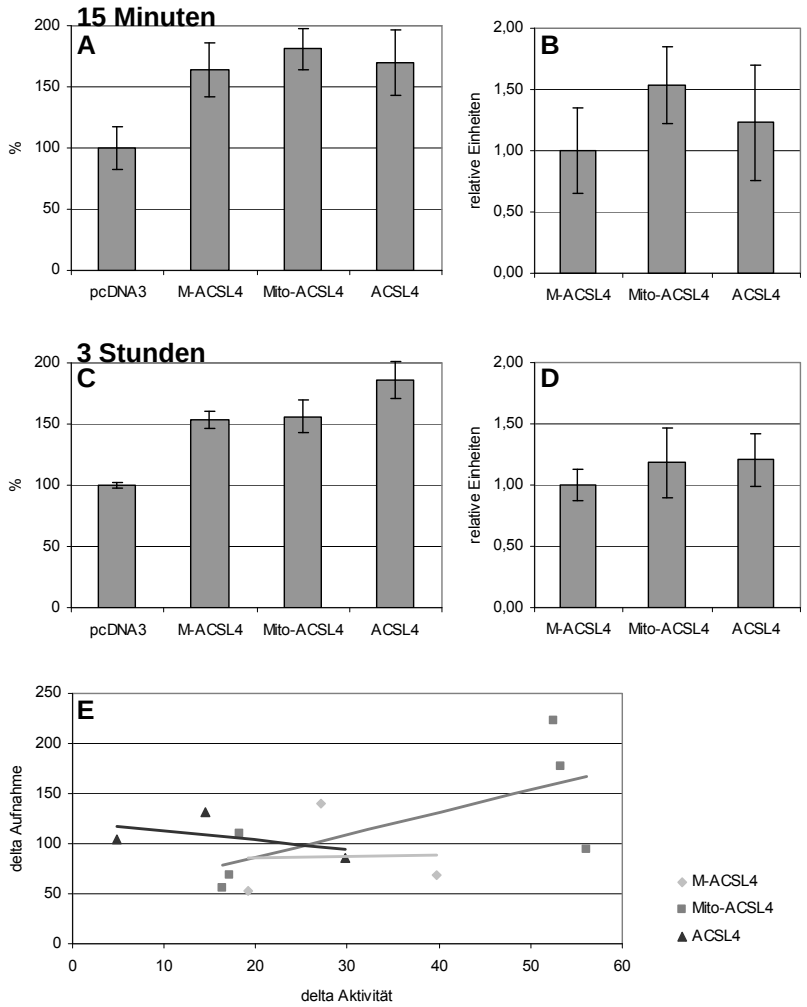

Abbildung 17: Die Arachidonataufnahme der verschiedenen ACSL4-Proteine ist gleichermaßen erhöht und korreliert nicht mit der entsprechenden Enzymaktivität.

A und C: Die Arachidonataufnahmen nach 15 min (A) und 3 h (C) sind in ACSL4 überexprimierenden Zellen deutlich erhöht. Die Zellen wurden für 15 min bzw. 3 h mit 200 µM Arachidonat, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt war, inkubiert und die Menge an aufgenommenem Arachidonat im Flüssigszintillationszähler gemessen. Nach Ermittlung der eingesetzten Proteinmengen wurden die Aufnahmen pro Gesamtprotein berechnet und auf pcDNA3 bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Proben eines repräsentativen Experiments.

B und D: Bei gleicher Expressionshöhe der ACSL4-Proteine ist die Arachidonataufnahme vergleichbar hoch. (Aufnahme($A4_x$)–Aufnahme(pcDNA3))/(Expression($A4_x$). Der Wert von M-ACSL4 wurde auf 1 gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Proben eines repräsentativen Experiments.

E: Die Arachidonataufnahme nach 3 h und die Enzymaktivität (aus Abbildung 16) zeigen keine gute Korrelation. Aufgetragen sind die Aufnahme und die Aktivität nach Subtraktion der endogenen Aufnahme bzw. Aktivität von pcDNA3. delta Aktivität: pmol Arachidonyl-CoA/min/µg Protein, delta Aufnahme: pmol Arachidonat/µg Protein.

Trotz der unterschiedlichen Lokalisierungen in Plasmamembran/Cytosol (ACSL4), in Endoplasmatischem Retikulum/Lipidtröpfchen (M-ACSL4) und auf Mitochondrien (Mito-ACSL4) besaßen die ACSL4-Proteine bei gleicher Expression dieselbe Arachidonyl-CoA-Synthetase Aktivität und steigerten die Arachidonataufnahme gleichermaßen.

4.2.3 Überexpression der ACSL4-Proteine verändert die initiale Verstoffwechselung exogen zugefügten Arachidonats

4.2.3.1 Exogen zugefügtes Arachidonat wird initial zu Phospholipiden umgesetzt

Nachdem die Charakterisierung der drei ACSL4-Proteine gezeigt hatte, dass diese sich durch eine gleich hohe Enzymaktivität sowie die Fähigkeit die Arachidonataufnahme vergleichbar zu steigern auszeichneten, wurde im nächsten Schritt der Einfluss der einzelnen ACSL4-Proteine auf den Lipidstoffwechsel radioaktiv-markierter Fettsäuren in transfizierten COS-Zellen untersucht.

Abbildung 18 zeigt die Analyse der innerhalb von 15 min aus 10 µM exogen zugefügtem ^{14}C-Arachidonat gebildeten Lipide, welche im O-Mix (A) und im N-Mix (B) dünnschichtchromatographisch aufgetrennt wurden. Die Quantifizierung der gebildeten Neutral- und Phospholipide zeigte eine Abnahme der prozentualen Anteile der Neutrallipide in allen überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen, sowie die entsprechende Zunahme der Phospholipidanteile (C). Überexpression von M-ACSL4 verschob 4,1 % aller aus markiertem Arachidonat gebildeten intrazellulären Lipide aus den Neutral- in die Phospholipide (p: 0,0734). Für Mito-ACSL4 betrug dieser Wert 5,2 % (p: 0,0001) sowie für ACSL4 11,9 % (p: 0,0062). Dies entsprach einer prozentualen Abnahme innerhalb der Neutrallipide um 17,2 % und einer Zunahme innerhalb der Phospholipide von 37,3 % in ACSL4-überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen (M-ACSL4: NL -6,0 %, PL +12,9 %, Mito-ACSL4: NL -7,6 %, PL +16,2 %). Der Effekt war demnach für ACSL4 überexprimierende Zellen größer als für M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen (M-ACSL4 gegen ACSL4 p: 0,0279; Mito-ACSL4 gegen ACSL4 p: 0,0540).

Die prozentualen Anteile der einzelnen Neutrallipide an den Gesamtlipiden (Abbildung 18D) zeigen, dass die Abnahme der markierten Gesamtneutrallipide hauptsächlich durch eine prozentuale Abnahme des markierten Triacylglycerins hervorgerufen wurde. Die Anteile innerhalb des Triacylglycerins nahmen für M-ACSL4 um 6,2 %, für Mito-ACSL4 um 8,5 % und für ACSL4 um 19,0 % gegenüber Kontrollzellen ab (Abbildung 18D1).

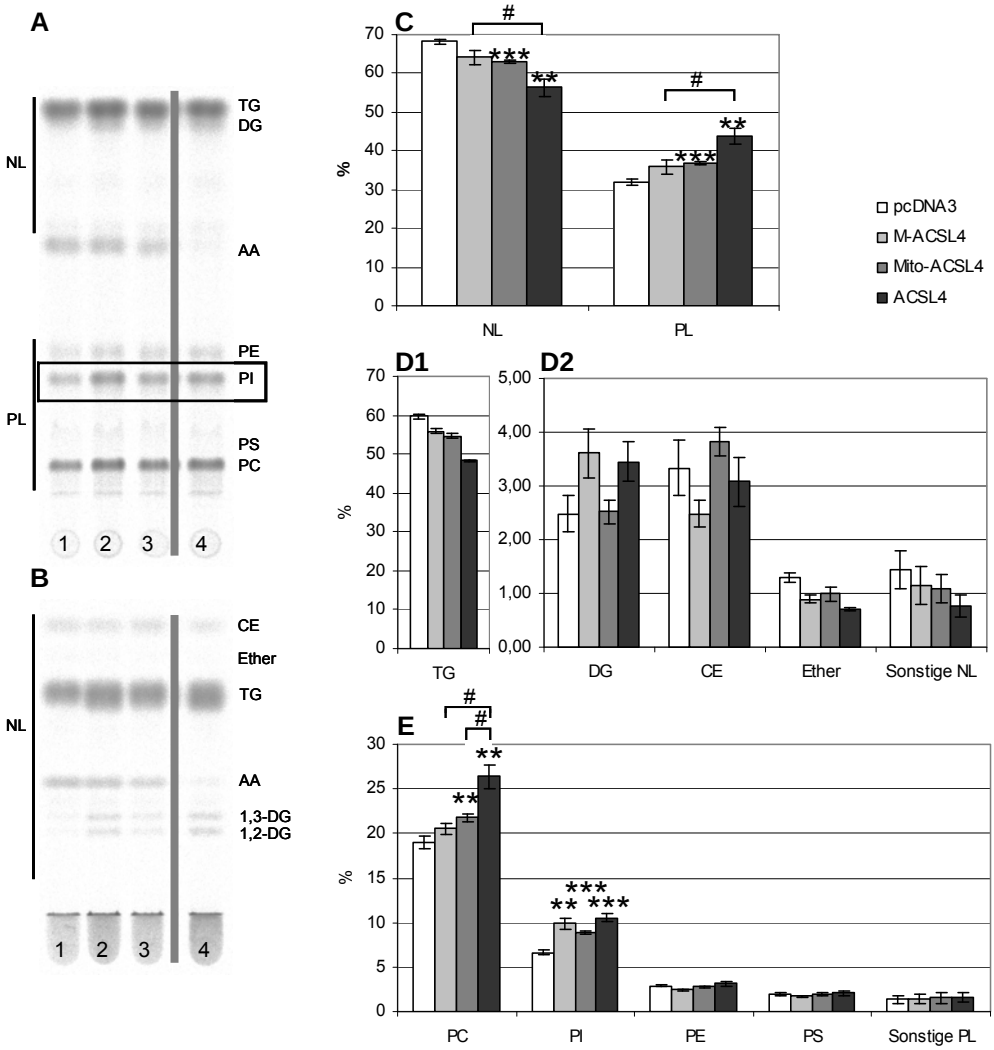

Abbildung 18: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der Triacylglycerinanteile und einer Zunahme der Anteile an Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol.

A und B: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen eines repräsentativen Experiments nach Auftrennung der Lipide im O-Mix (A) und N-Mix (B). 1: pcDNA3, 2: M-ACSL4, 3: Mito-ACSL4, 4: ACSL4.

C: ACSL4 Überexpression führt zu einer Abnahme der prozentualen Anteile der markierten Neutrallipide und einer Zunahme der markierten Phospholipide. Neutral- und Phospholipide wurden anhand der DC des O-Mixes bestimmt, wie in A gezeigt.

D: Die Abnahme des Anteils der Neutrallipide an den Gesamtlipiden wird durch eine ACSL4-bedingte Abnahme des Triacylglycerinanteils hervorgerufen. Für die Berechnung der prozentualen Anteile wurden die Werte der DC des N-Mixes auf die Gesamtanteile der NL (C) bezogen. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen in D1 und D2.

E: ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Bildung von Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol. Die prozentualen Anteile wurden anhand der DC des O-Mixes bestimmt.

Die Zellen wurden für 15 min mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat inkubiert, anschließend die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels *Phosphorimaging*, die Quantifizierung mittels AIDA. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Lipide an den Gesamtlipiden, ohne freies Arachidonat, innerhalb einer Spur. C und E: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=7, ACSL4: n=4. D: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=5, ACSL4: n=4. Gezeigt ist der SEM. **: $p<0,01$ und ***: $p<0,001$ bezogen auf pcDNA3; #: $p<0,05$ bezogen auf die verschiedenen ACSL4-Proteine. Die entsprechenden Zahlenwerte sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Die prozentualen Anteile der anderen markierten Neutrallipide bezogen auf alle markierten Lipide der Zelle (NL + PL = 100 %) zeigten nach Überexpression der ACSL4-Proteine weitere Veränderungen (Abbildung 18D2). In Abbildung 27 (Anhang) werden deren Anteile bezogen auf die Summe der Neutrallipide (NL = 100 %) dargestellt. So war die prozentuale Abnahme des Ether-Triacylglycerins gegenüber pcDNA3 signifikant für M-ACSL4 (p: 0,0215) und ACSL4 (p: 0,0044), jedoch nicht für Mito-ACSL4 (p: 0,2363) überexprimierende Zellen. Die Anteile des Diacylglycerins und der Cholesterinester zeigten ebenfalls Abweichungen gegenüber pcDNA3. Bezüglich dieser Proteine konnte ein erhöhter Anteil an Diacylglycerin (p: 0,0561) sowie ein verminderter Anteil an Cholesterinestern (p: 0,0039) in M-ACSL4 gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen nachgewiesen werden.

Die Zunahme der markierten Phospholipide in überexprimierenden Zellen wurde durch einen höheren Anteil der zwei häufigsten Phospholipide in arachidonatinkubierten COS-Zellen, Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol, hervorgerufen (Abbildung 18E). Die Zunahme an intrazellulärem Phosphatidylcholin betrug 8,1 % für M-ACSL4 (p: 0,1444), für Mito-ACSL4 14,9 % (p: 0,0087) und war für ACSL4 überexprimierende Zellen mit 39 % (p: 0,0051) besonders hoch. Somit war die Steigerung durch ACSL4 Überexpression gegenüber den Steigerungen in M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen signifikant erhöht (M-ACSL4 gegen ACSL4 p: 0,0186, Mito-ACSL4 gegen ACSL4 p: 0,0349). Besonders auffällig war die durch Überexpression jedes ACSL4-Proteins bedingte Zunahme des Phosphatidylinositolanteils. Die jeweiligen Steigerungen gegenüber Kontrollzellen von 48,6 % (p: 0,0011) für M-ACSL4, 33,6 % (p: 0,0001) für Mito-ACSL4 und 57,6 % (p: 0,0004) für ACSL4 waren hochsignifikant.

Das durch M-ACSL4 und Mito-ACSL4 Überexpression vermehrt gebildete Phosphatidylinositol wurde für jedes einzelne Experiment auf die durch Western-Blot ermittelten relativen Proteinmengen an exprimiertem ACSL4 bezogen (Abbildung 19). Dazu wurde das durch endogene ACS-Aktivität gebildetete Phosphatidylinositol der Kontrollzellen zuvor vom Phosphatidylinositolanteil der überexprimierenden Zellen subtrahiert.

Abbildung 19A zeigt einen signifikant erhöhten Phosphatidylinositolanteil in M-ACSL4 gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen (Differenz: 31%, p: 0,0372). Dies ließ eine lokalisierungsbedingte Kanalisierung des Arachidonats in Phosphatidylinositol vermuten, bei der ER-ständiges M-ACSL4 mehr Phosphatidylinositol bildet als mitochondriell lokalisiertes Mito-ACSL4.

Neben der Expression wurden die vermehrt synthetisierten Phosphatidylinositolanteile auch auf die durch Überexpression hervorgerufenen Aktivitätssteigerungen beider Acyl-CoA-Synthetasen bezogen (Abbildung 19B). Sowohl für M-ACSL4 als auch für Mito-ACSL4 konnte eine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Phosphatidylinositolanteil hergestellt werden (M-ACSL4 R^2: 0,9835, Mito-ACSL4 R^2: 0,9714). Eine erhöhte Acyl-CoA-Synthetasen Aktivität vermittelte somit eine verstärkte Inkorporierung von Arachidonat in Phosphatidylinositol, dessen Anteil an den Gesamtlipiden der Zelle somit anstieg. Der Anteil des Phosphatidylinositols, welches aufgrund der gesteigerten Aktivität von M-ACSL4 synthetisiert wurde (delta PI), war stets höher als der für Mito-ACSL4 gleicher Aktivität. Dies bestätigte einen Einfluss der Lokalisierung auf den Phosphatidylinositolanteil in der Zelle.

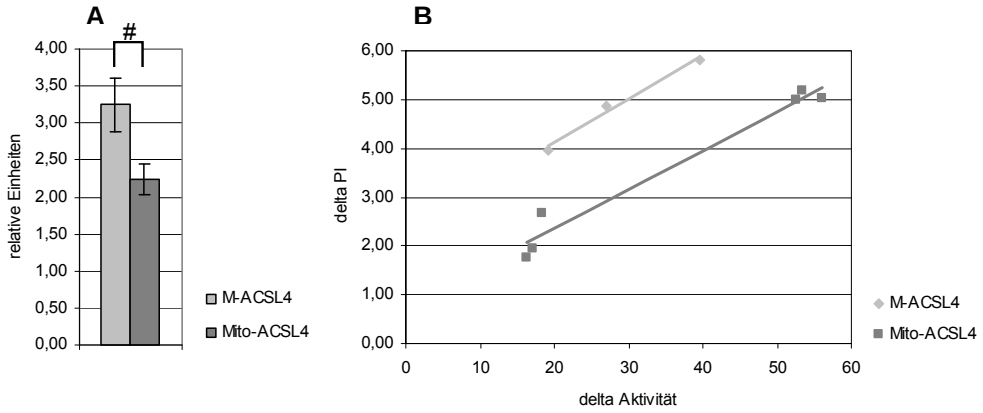

Abbildung 19: Die Kanalisierung von Arachidonat zu Phosphatidylinositol in ACSL4 überexprimierenden Zellen ist abhängig von der Expression und der Lokalisierung der ACSL4-Proteine.

A: M-ACSL4 überexprimierende Zellen kanalisieren das Arachidonat gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen vermehrt in die Synthese von Phosphatidylinositol. Das durch Überexpression vermehrt synthetisierte Phosphatidylinositol wurde auf die mittels Western-Blot bestimmten relativen Proteinexpressionen der jeweiligen Proben bezogen. $(PI(A4_x)-PI(pcDNA3))/Expression(A4_x)$. Die prozentualen Phosphatidylinositolanteile entstammen Abbildung 18. n=7. Gezeigt ist der SEM. #: $p<0,05$ M-ACSL4 gegen Mito-ACSL4.

B: Der Phosphatidylinositolanteil der Zellen steigt mit der Enzymaktivität des überexprimierten ACSL4-Proteins und wird durch dessen Lokalisierung beeinflusst. Aufgetragen sind die Steigerungen der Enzymaktivitäten durch M-ACSL4 und Mito-ACSL4 Überexpression (delta Aktivität, pmol Arachidonyl-CoA/min/µg Protein) gegen die prozentualen Anteile an Phosphatidylinositol in den entsprechenden Versuchen nach Subtraktion der entsprechenden Werte von pcDNA3 (delta PI, %). Für Mito-ACSL4 wurde neben der in A verwendeten DNA-Menge auch die 10-fache DNA-Menge transfiziert.

Nach Inkubation von COS-Zellen, welche die verschiedenen ACSL4-Proteine überexprimieren, mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat für 15 min konnten folgende Veränderungen im Lipidstoffwechsel nachgewiesen werden:

Erstens: Durch Überexpression aller ACSL4-Proteine wurde Arachidonat bevorzugt in Phospholipide umgesetzt. Zweitens: Die Abnahme des prozentualen Anteils der Gesamtneutrallipide wurde hauptsächlich durch eine Abnahme des Triacylglycerinanteils hervorgerufen. Drittens: Die Zunahme des Anteils der Gesamtphospholipide wurde zum Teil durch eine ACSL4-bedingte Zunahme des Phosphatidylcholinanteils bedingt. Dessen Konzentration innerhalb der Zelle war abhängig von der Enzymaktivität der Acyl-CoA-Synthetasen (nicht gezeigt). Viertens: Die Zunahme des Gesamtphospholipidanteils wurde zusätzlich durch eine vermehrte Phosphatidylinositol-Synthese herbeigeführt. Diese stieg mit zunehmender Enzymaktivität. Fünftens: Für Phosphatidylinositol wurde ein Lokalisierungseffekt gezeigt, welcher sich durch dessen erhöhte Synthese nach Überexpression des ER-lokalisierten M-ACSL4 gegenüber dem Mito-ACSL4 auszeichnete. Sechstens: Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen inkorporierten Arachidonat gegenüber M-ACSL4 überexprimierenden Zellen vermehrt in Cholesterinestern und weniger in Diacylglycerin.

Durch Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine in COS-Zellen kann der Lipidmetabolismus beeinflusst werden, wenn den Zellen geringe Konzentrationen exogenen Arachidonats angeboten werden. Im weiteren Verlauf sollte untersucht werden, ob überexprimierende Zellen weiterhin in der Lage sind die Metabolisierung des Arachidonats zu beeinflussen, wenn die Zellen mit diesem im Überschuss inkubiert werden. Es wurden dieselben Bedingungen gewählt, unter denen Überexpression der ACSL4-Proteine zu einer erhöhten Arachidonataufnahme gegenüber Kontrollzellen geführt hatte (4.2.2.4).

Dazu wurden die Zellen für 15 min mit 200 µM Arachidonat inkubiert, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt war, und wie zuvor beschrieben behandelt und die Versuche entsprechend ausgewertet. Die Dünnschichtchromatographien entsprachen den in Abbildung 18A und B abgebildeten Darstellungen und werden hier nicht gezeigt.

Mit Ausnahme des Lokalisierungseffektes für Phosphatidylinositol konnten bei Verwendung der höheren Arachidonatkonzentration alle Effekte reproduziert werden (Abbildung 20).

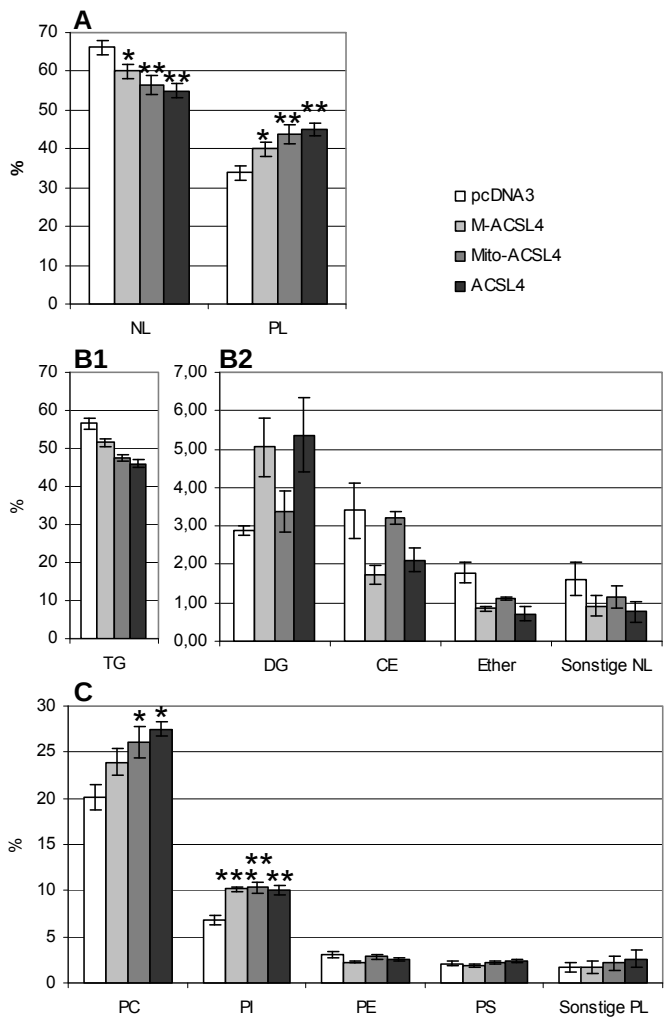

Abbildung 20: Aufgrund von Überexpression der ACSL4-Proteine vermehrt aufgenommenes Arachidonat wird zu Phospholipiden umgesetzt.

A: Überexpression aller ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der Neutrallipidanteile und einer Zunahme der Phospholipidanteile.

B: Der verminderte Anteil an Neutrallipiden in überexprimierenden Zellen wird durch eine Abnahme des Anteils an Triacylglycerin an den Gesamtlipiden verursacht. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalier-ungen in B1 und B2

C: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer vermehrten Bildung von Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol..

Die Zellen wurden für 15 min mit 200 µM Arachidonat, welches anteilig ^{14}C-Arachidonat enthielt, inkubiert. Die anschließenden Schritte sowie die Berechnungen erfolgten wie für Abbildung 18 beschrieben. A und C: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=6, ACSL4: n=3. B: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=4, ACSL4: n=3. Gezeigt ist der SEM. *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$ bezogen auf pcDNA3. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Die Abnahme des Neutrallipidanteils und die damit verbundene Zunahme des Phospholipidanteils war für ACSL4 überexprimierende Zellen gegenüber pcDNA3 überexprimierenden Zellen mit 11,2 % aller intrazellulär gebildeten markierten Lipide erneut am größten (p: 0,0066). In M-ACSL4 überexprimierenden Zellen wurden 6,2 % (p: 0,0398) und in Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen 9,2 % (p: 0,0096) der markierten Fettsäure in die Phospholipide verschoben. Dies entsprach folgenden Anteilen innerhalb der Neutral- und Phospholipide: M-ACSL4: NL -9,4 %, PL + 18,3 %; Mito-ACSL4: NL -15,0 % PL +29,3 %; ACSL4: NL -17,0 %, PL +33,2 %. Die Unterschiede zwischen den einzelnen ACSL4-Proteinen waren nicht signifikant (Abbildung 20A).

Die prozentuale Abnahme der markierten Neutrallipide war wiederum hauptsächlich durch eine Abnahme der Triacylglycerinanteile begründet. Diese nahmen aufgrund der Überexpression der ACSL4-Proteine um 8,9 % für M-ACSL4, 16,0 % für Mito-ACSL4 und 18,6 % für ACSL4 ab (Abbildung 20B1). Bezogen auf die Gesamtneutrallipide (NL = 100 %) konnte die zuvor beschriebene Abnahme des Anteils des Ether-Triacylglycerins infolge von Überexpression der ACSL4-Proteine gegenüber Kontrollzellen ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 28, Anhang). Hier war in Mito-ACSL4 gegenüber M-ACSL4 überexprimierenden Zellen ein signifikant erhöhter Anteil auffällig (p: 0,0046). Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen bildeten zusätzlich mehr Cholesterinester (p: 0,0014) und weniger Diacylglycerin (p: 0,1713) als M-ACSL4 überexprimierende Zellen (Abbildung 28, Anhang). Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine resultierte in einer verstärkten Synthese von Phosphatidylcholin sowie Phosphatidylinositol, wodurch der hohe Phospholipidanteil der transfizierten Zellen verursacht wurde. ACSL4 Überexpression beeinflusste den Phosphatidylcholinanteil der Zellen in besonderem Ausmaß und rief eine Steigerung um 36,8 % hervor (p: 0,0113). M-ACSL4 erhöhte dessen Anteil um 18,9 % (p: 0,0866) und Mito-ACSL4 um 29,8 % (p: 0,0236). Auffällig war ebenfalls der sehr stark gesteigerte Phosphatidylinositolanteil der überexprimierenden Zellen. Jedoch war die Größenordnung der Steigerung durch alle drei ACSL4-Proteine unter diesen Bedingungen annähernd gleich (M-ACSL4 48,2 %, p: 0,0008; Mito-ACSL4 51,4 %, p: 0,0015; ACSL4 46,1 %, p: 0,0066). Es war somit kein Lokalisierungseffekt bezüglich der Phosphatidylinositolanteile zwischen dem ER-Protein M-ACSL4 und dem Mito-ACSL4 nachweisbar (Abbildung 20C).

Das durch Überexpression der ACSL4-Proteine zusätzlich aufgenommene markierte Arachidonat wurde vermehrt zu Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol anstelle des Triacylglycerins umgesetzt, wodurch der prozentuale Anteil der markierten Phospholipide stieg und der Anteil der markierten Neutrallipide sank.

4.2.3.2 Nach dreistündiger Arachidonatinkubation werden fast alle ACSL4-bedingten Veränderungen im Fettsäuremetabolismus ausgeglichen

Durch eine Verlängerung der Inkubationszeiten der transfizierten COS-Zellen mit beiden Arachidonatkonzentrationen wurde untersucht, ob es sich bei den zuvor beschriebenen Effekten um initial durch die verschiedenen ACSL4-Proteine hervorgerufene Effekte handelte oder ob sich diese während einer andauernden Inkubation mit Arachidonat weiter manifestierten. Die Zellen wurden unter denselben Bedingungen wie oben beschrieben für 3 h inkubiert, die Lipide extrahiert und analysiert.

Die Ergebnisse der Inkubation mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat sind in Abbildung 21, die der Inkubation mit 200 µM Arachidonat, welches anteilig ^{14}C-Arachidonat enthielt, in Abbildung 22 dargestellt. Die Dünnschichtchromatographien entsprachen augenscheinlich den in Abbildung 18A und B gezeigten Darstellungen und werden daher hier nicht gezeigt.

Sowohl bei dreistündiger Inkubation der Zellen mit 10 µM Arachidonat als auch mit 200 µM Arachidonat wurden die durch Überexpression der ACSL4-Proteine induzierten und beschriebenen Effekte infolge einer 15 min Inkubation aufgehoben, mit Ausnahme des Lokalisierungseffektes für Phosphatidylinositol.

Im Vergleich zu einer 15 min dauernden Inkubation erhöhten sich die Anteile der markierten Neutrallipide innerhalb von 3 h auf ca. 75 % in allen Zellen. Die Anteile der markierten Neutral- und Phospholipide der überexprimierenden und der Kontrollzellen stimmten miteinander überein (Abbildung 21A und Abbildung 22A). Dementsprechend wurde die Zusammensetzung der Neutrallipide und der Phospholipide nur wenig verändert (Abbildung 21B und C und Abbildung 22B und C). Betrachtung der einzelnen markierten Neutrallipidanteile bezogen auf die Anteile der gesamten markierten Neutrallipide (NL = 100 %, Abbildung **29**, Abbildung 30) zeigt, dass die ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen geringere Anteile an Cholesterinestern und Ether-Triacylglycerin enthielten (teilweise signifikant). M-ACSL4 überexprimierende Zellen besaßen unter diesen Bedingungen tendenziell einen höheren Diacylglycerinanteil als Mito-ACSL4 und ACSL4 überexprimierende Zellen sowie Kontrollzellen.

Der Lokalisierungseffekt im Phosphatidylinositolanteil, ohne dass dieser jedoch gegenüber Kontrollzellen erhöht wurde, blieb bei beiden Arachidonatkonzentrationen bestehen. Abbildung 21C zeigt einen um 35,9 % erhöhten Phosphatidylinositolanteil in M-ACSL4 überexprimierenden Zellen gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen nach Inkubation mit 10 µM Arachidonat für 3 h (p: 0,1660). Für 200 µM Arachidonat betrug dieser Unterschied beider ACSL4-Proteine nach 3 h 34,6 % und war statistisch signifikant (p: 0,0137) (Abbildung 22C).

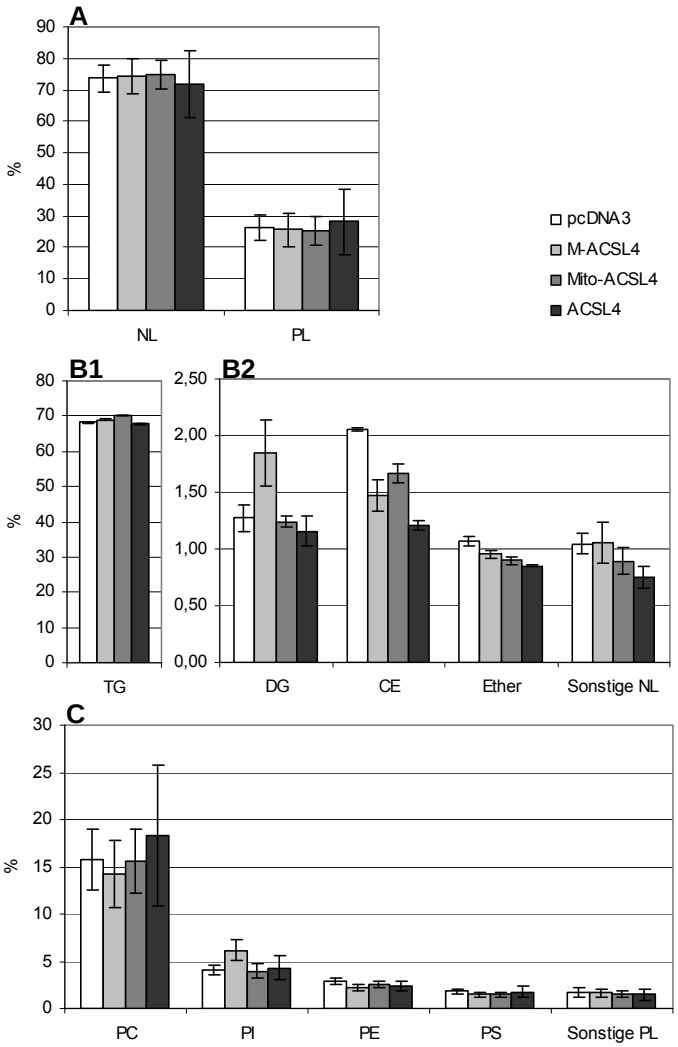

Abbildung 21: Bei längerer Inkubation wird die ACSL4-bedingte Umsetzung von Arachidonat in die Phospholipide aufgehoben.

A: Kontrollzellen und ACSL4 überexprimierende Zellen bilden vergleichbare Anteile an markierten Neutral- und Phospholipiden.

B: M-ACSL4 überexprimierende Zellen bilden tendenziell mehr Diacylglycerin und weniger Cholesterinester als Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen.

C: Die Zusammensetzung der Phospholipide in ACSL4 überexprimierenden Zellen ist gegenüber den Kontrollzellen nicht signifikant verändert. M-ACSL4 überexprimierende Zellen bilden tendenziell mehr Phosphatidylinositol als Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen.

Die Zellen wurden für 3 h mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat inkubiert. Die anschliessenden Schritte sowie die Berechnungen erfolgten wie für Abbildung 18 beschrieben. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

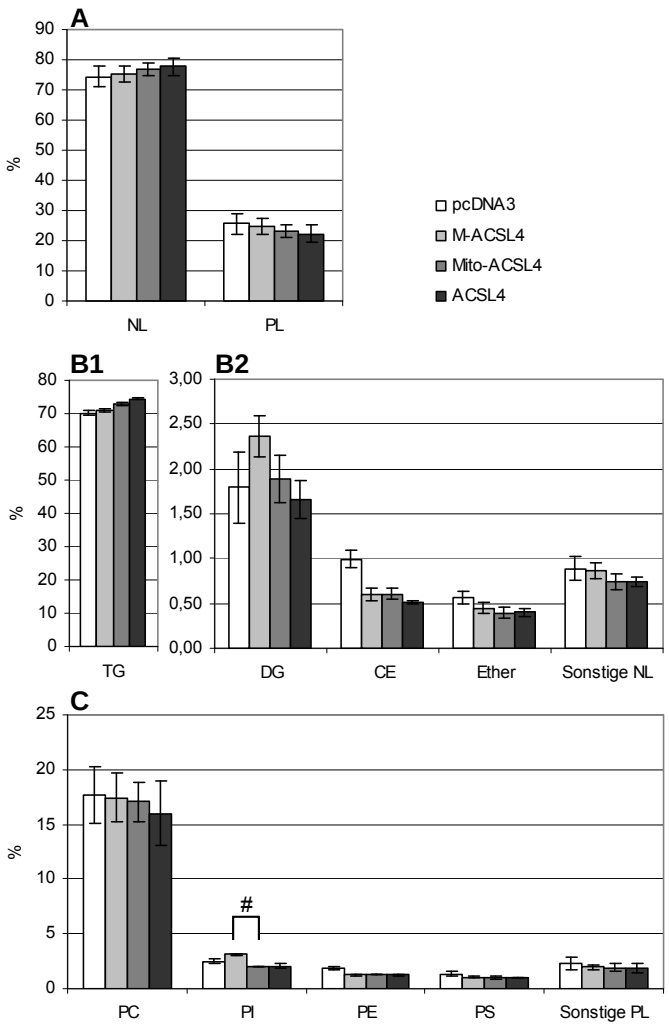

Abbildung 22: Bei längerer Inkubation mit Arachidonat bleibt der Lokalisierungseffekt für Phosphatidylinositol erhalten.

A: Kontrollzellen und ACSL4 überexprimierende Zellen bilden gleich hohe, markierte Neutral- und Phospholipidanteile.

B: Der Triacylglycerinanteil der die ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen bleibt konstant, während diese Zellen weniger Cholesterinester bilden.

C: M-ACSL4 überexprimierende Zellen bilden mehr Phosphatidylinositol als Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen, obwohl die Zusammensetzung der Phospholipide in ACSL4 überexprimierenden Zellen gegenüber den Kontrollzellen nicht signifikant verändert ist.

Die Zellen wurden für 3 h mit 200 µM Arachidonat, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt wurde, inkubiert. Die anschließenden Schritte sowie die Berechnungen erfolgten wie für Abbildung 18 beschrieben. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. #: $p<0,05$ von M-ACSL4 bezogen auf Mito-ACSL4. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Bezüglich der durch die Überexpression der ACSL4-Proteine in COS-Zellen hervorgerufenen Veränderungen des Lipidstoffwechsels von Arachidonat kann Folgendes zusammengefasst werden: Die beschriebenen Effekte waren weniger von der Konzentration als von der Dauer der Arachidonatinkubation abhängig. So zeigte eine kurze Inkubationszeit von 15 min sowohl mit 10 µM als auch mit 200 µM Arachidonat eine Abnahme der Triacylglycerinanteile und ging einher mit einer entsprechenden Zunahme der markierten Phosphatidylcholin- und Phosphatidylinositolanteile innerhalb der die verschiedenen ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen. Das an der Plasmamembran und im Cytosol lokalisierte ACSL4 zeigte hierbei die größten Veränderungen.

Nach einer Inkubation mit Arachidonat über 3 h waren diese Effekte aufgehoben. Die ACSL4-bedingte Umsetzung von Arachidonat zu Phospholipiden fand somit nur initial statt und wurde mit der Zeit innerhalb der Zelle ausgeglichen. Ebenso konnten die weiteren Effekte einer 15 min Inkubation nicht über 3 h hinweg aufrechterhalten werden. Bei kurzer Inkubation der Zellen mit 10 µM und 200 µM Arachidonat wurde ein gegenüber dem endogenen Anteil an markiertem Phosphatidylcholin erhöhter Wert in den die ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen nachgewiesen. Wiederum zeigte das kurze ACSL4 den stärksten Effekt. Besonders auffällig in den Lipidprofilen der 15 min Inkubation beider Konzentrationen war jedoch der um fast 50 % gesteigerte Anteil an markiertem Phosphatidylinositol in allen Zellen, welche eines der drei ACSL4-Proteine überexprimierten. Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Anteil an markiertem arachidonathaltigem Phosphatidylinositol mit der Expression der ACSL4-Proteine stieg. Für dieses Lipid wurde für drei von vier untersuchten Versuchsbedingungen ein Lokalisierungseffekt für die beiden membrangebundenen ACSL4-Proteine gezeigt. Dieser Effekt zeichnete sich durch einen um mehr als 30 % höheren Phosphatidylinositolanteil in M-ACSL4 überexprimierenden gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen aus. Weiterhin wurde gezeigt, dass bei 15 min Inkubation der Zellen mit Arachidonat in den Zellen, welche das M-ACSL4 überexprimierten, höhere Anteile an Diacylglycerin und geringere Anteile an Cholesterinester gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen vorlagen.

4.2.4 Überexpression der ACSL4-Proteine verändert den Metabolismus des in die Zelle aufgenommenen Oleats

Die meisten Veränderungen des zellulären Lipidstoffwechsels exogenen Arachidonats zeigten sich bei Inkubation der Zellen für 15 min und einer verwendeten Fettsäurekonzentration von 10 µM. Um die Spezifität dieser Effekte bezüglich der angebotenen Fettsäure zu untersuchen, wurde dieser Versuch unter Verwendung von Oleat unter denselben Bedingungen wiederholt (Abbildung 23).

Die Quantifizierung der Dünnschichtchromatographien zeigte, dass mit ^{14}C-Oleat inkubierte Zellen schon ohne Überexpression eines ACSL4-Proteins einen um 25 % erhöhten Anteil an markierten Phospholipiden und einen entsprechend niedrigeren Anteil an markierten Neutrallipiden enthielten als mit Arachidonat inkubierte Zellen (vgl. Abbildung 18C und Abbildung 23C). Diese hohen Phospholipidanteile konnten jedoch aufgrund einer durch Überexpression der ACSL4-Proteine hervorgerufenen, vermehrten Umsetzung des Oleats in die Phospholipide weiter erhöht werden (Abbildung 23C). Diese Steigerung war mit 16,6 % aller intrazellulär aus ^{14}C-Oleat gebildeten Lipide erneut für Zellen die ACSL4 überexprimierten am höchsten (p: 0,0069). In M-ACSL4 überexprimierenden Zellen wurden entsprechend 8,4 % (p: 0,0370) und in Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen 10,6 % (p: 0,0182) der markierten Fettsäure aus den Neutrallipide in die Phospholipide verschoben. Dies entsprach einer prozentualen Abnahme innerhalb der Neutrallipide von 19,8 % für M-ACSL4, von 25,0 % für Mito-ACSL4 und von 38,0 % für ACSL4 und einer Zunahme innerhalb der Phospholipide von 14,6 % für M-ACSL4, von 18,5 % für Mito-ACSL4 und von 28,1 % für ACSL4. Die Abnahme der Neutrallipidanteile ließ sich erneut durch eine Abnahme der Triacylglycerinanteile erklären (M-ACSL4: -25,1 %, Mito-ACSL4: -35,6 %, ACSL4: -53,5 %) (Abbildung 23E). Bezüglich der Phospholipide waren auch nach Oleatinkubation stark erhöhte Anteile des Phosphatidylinositols in allen Zellen, welche eines der ACSL4-Proteine überexprimierten, deutlich zu erkennen. Die Steigerungen waren mit Oleat deutlich höher als unter Verwendung von Arachidonat (vgl. Abbildung 18E und Abbildung 23D) und lagen für M-ACSL4 bei 70,0 % (p: 0,0049), für Mito-ACSL4 bei 80,0 % (p: 0,0271) und für ACSL4 bei 125,1 % (p: 0,0110). Es konnte kein Lokalisierungseffekt bezüglich der intrazellulären Phosphatidylinositolanteile zwischen M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen festgestellt werden. Das exogene Oleat wurde somit in Phosphatidylinositol anstelle von Triacylglycerin gebunden.

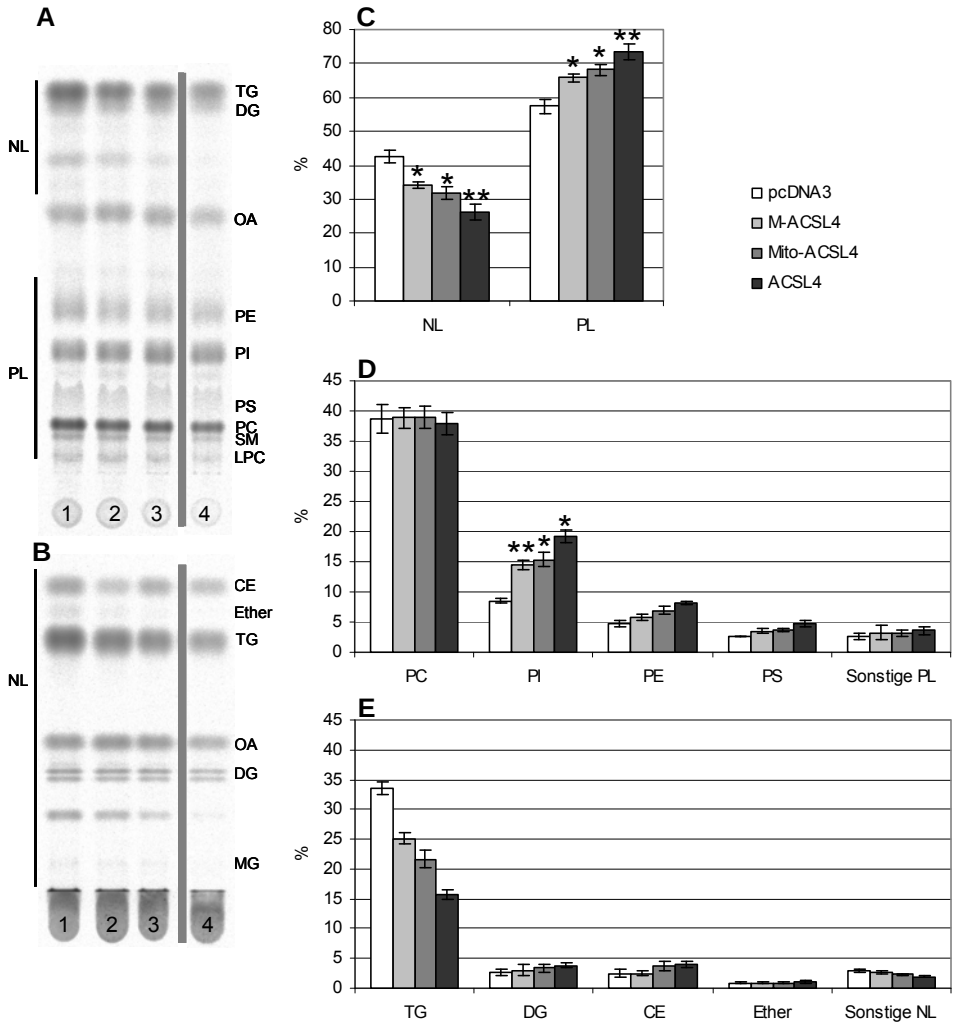

Abbildung 23: Durch die ACSL4-Proteine aktiviertes Oleat wird in Phosphatidylinositol anstelle von Triacylglycerin umgesetzt.

A und B: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen eines repräsentativen Experiments nach Auftrennung der Lipide im O-Mix (A) und N-Mix (B) und Visualisierung mittels *Phosphorimaging*. 1: pcDNA3, 2: M-ACSL4, 3: Mito-ACSL4, 4: ACSL4.

C: ACSL4 Überexpression führt zu einer Abnahme der markierten Neutrallipidanteile und einer Zunahme der markierten Phospholipidanteile.

D: ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Bildung von Phosphatidylinositol bezogen auf die Gesamtlipide der Zelle, bei unveränderten Anteilen der anderen Phospholipide.

E: Die verminderten Neutrallipidanteile werden durch eine ACSL4-bedingte prozentuale Abnahme des Triacylglycerins verursacht.

Die Zellen wurden für 15 min mit 10 µM ^{14}C-Oleat inkubiert. Die anschließenden Schritte sowie die Berechnungen erfolgten wie für Abbildung 18 beschrieben. n=3. Gezeigt ist der SEM. *: $p<0,05$ und **: $p<0,01$ bezogen auf pcDNA3. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für ^{14}C-Oleat die ACSL4-bedingte Umsetzung der markierten Fettsäuren in die Phospholipide nachgewiesen werden konnte, welche überwiegend durch eine vermehrte Synthese von Phosphatidylinositol und eine verminderte Synthese von Triacylglycerin hervorgerufen wurde.

4.2.5 Die Lipidsynthese aus *de novo* synthetisierten Fettsäuren wird durch Überexpression der ACSL4-Proteine nicht beeinflusst

Nachdem der Einfluss der verschieden lokalisierten ACSL4-Proteine auf den Lipidmetabolismus exogen zugeführter Fettsäuren untersucht wurde, folgte die Analyse der Lipidsynthese aus *de novo* synthetisierten Fettsäuren. Dazu wurden die Zellen entsprechend der Fettsäureinkubation mit ^{14}C-Acetat inkubiert, behandelt und analysiert. Die vollständige Analyse der endogenen Lipidsynthese wurde für einen Zeitraum von 3 h vorgenommen (Abbildung 24, außer C1).

Die Dünnschichtchromatographien in Abbildung 24A und B zeigen, dass zusätzlich zu den in den vorherigen Versuchen gebildeten Lipiden große Mengen an Cholesterin aus Acetat gebildet wurden. Cholesterin wurde hier mit den Neutrallipiden verrechnet.

Nach 15-minütiger Acetatmarkierung wurden hauptsächlich Phospholipide aus den neu synthetisierten Fettsäuren gebildet. Auch in diesen Versuchen wurde deren Synthese durch Überexpression aller ACSL4-Proteine, jedoch insbesondere durch das kurze ACSL4, tendenziell erhöht (Abbildung 24C1). Bezogen auf alle gebildeten, markierten Lipide setzten M-ACSL4 überexprimierende Zellen 7,6 %, Mito-ACSL4 und ACSL4 überexprimierende Zellen 11,8 % beziehungsweise 16,9 % des Acetats in die Phospholipide anstelle der Neutrallipide um. Dadurch enthielten die Zellen nach 15 min Acetatmarkierung mit einem Anteil von bis zu 95 % Phospholipiden (ACSL4) etwa 20 % mehr markierte Phospholipide als nach 15 min Markierung mit 10 µM Oleat (Abbildung 23C) und sogar 50 % mehr markierte Phospholipide als nach 15 min Markierung mit 10 µM Arachidonat (Abbildung 18C). Während einer dreistündigen Acetatmarkierung bildeten die Zellen vermehrt markierte Neutrallipide, so dass der intrazelluläre Lipidpool, unabhängig von der Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine, etwa 50 % bis 57 % markierte Neutrallipide und entsprechend 50 % bis 43 % markierte Phospholipide enthielt (Abbildung 24C2). Verglichen mit dem Phospholipidanteil nach Inkubation mit 10 µM Arachidonat war dieser somit um etwa 25 % erhöht (vgl. Abbildung 21A). Die Quantifizierung der einzelnen Neutral- und Phospholipide zeigte, dass deren Anteile durch Überexpression der ACSL4-Proteine nicht signifikant beeinflusst wurden (Abbildung 24D und E).

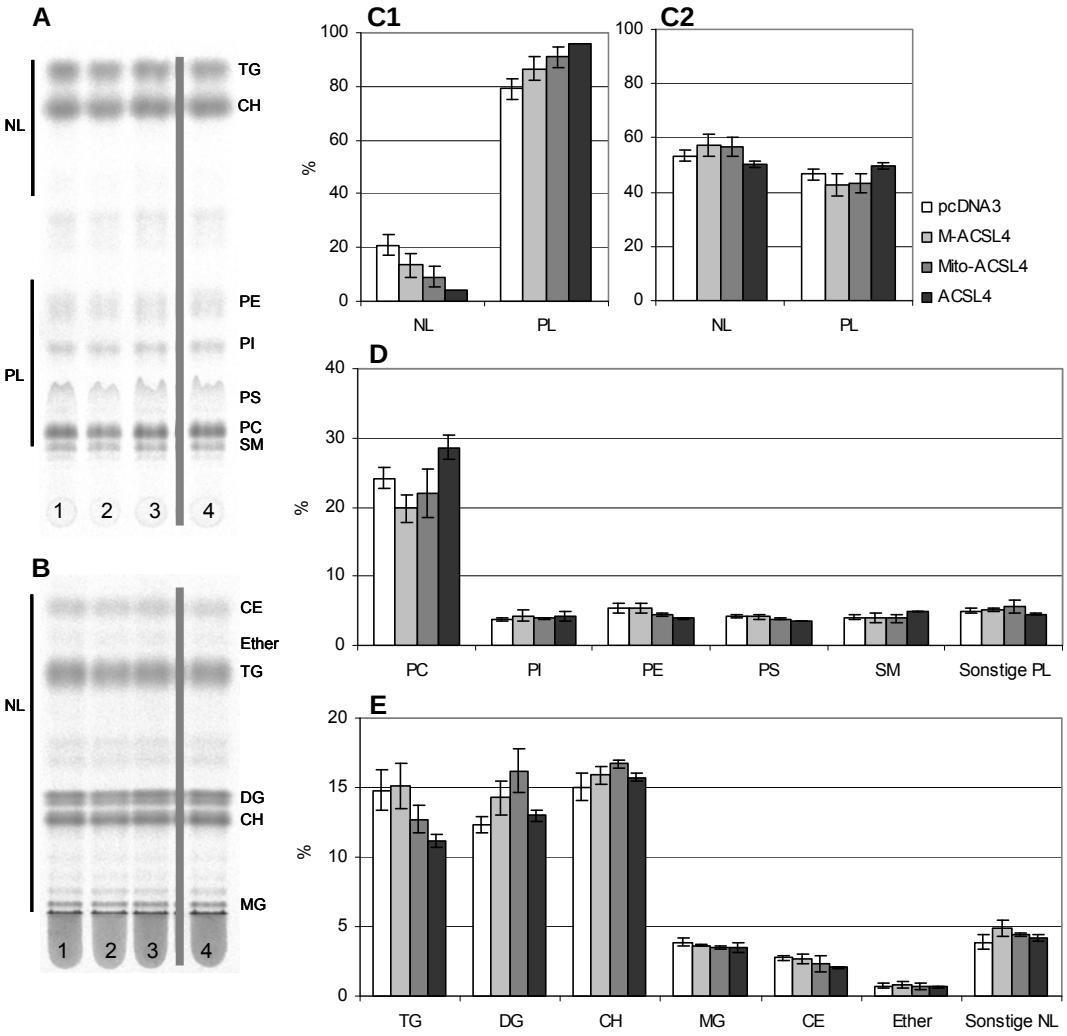

Abbildung 24: ACSL4-Überexpression beeinflusst den Metabolismus von Acetat und *de novo* synthetisierten Fettsäuren nicht langfristig.

A und B: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen eines repräsentativen Experiments nach Inkubation mit ^{14}C-Acetat für 3 h. Die Auftrennung der Lipide erfolgte im O-Mix (A) und N-Mix (B), die Visualisierung mittels *Phosphorimaging*. 1: pcDNA3, 2: M-ACSL4, 3: Mito-ACSL4, 4: ACSL4.

C: Bei Markierung der Zellen mit ^{14}C-Acetat für 15 min (C1) werden überwiegend markierte Phospholipide gebildet. Zu diesem Zeitpunkt verschiebt die Überexpression von ACSL4 die Lipidsynthese zusätzlich zugunsten der Phospholipide. Nach dreistündiger Acetat-Markierung (C2) entsprechen die Anteile der Neutrallipide und der Phospholipide in ACSL4 überexprimierenden Zellen denen der Kontrollzellen.

D und E: Die Zusammensetzungen der Phospholipide (D) und der Neutrallipide (E) in ACSL4 überexprimierenden Zellen entsprechen denen der Kontrollzellen.

Die Zellen wurden für 15 min mit 1 mM ^{14}C-Acetat bzw. 3 h mit 100 µM ^{14}C-Acetat inkubiert. Die anschließenden Schritte sowie die Berechnungen erfolgten wie für Abbildung 18 beschrieben. 15 min: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=2, ACSL4: n=1. 3 h: pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Durch Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine wurden neben exogenem Arachidonat und Oleat auch *de novo* synthetisierte Fettsäuren initial zu Phospholipiden umgesetzt. Während einer längeren Inkubation wurden die ACSL4-bedingten Veränderungen durch die Zelle ausgeglichen.

4.2.6 Überexpression von M-ACSL4 und Mito-ACSL4 erhöht die Arachidonatoxidation

Die bisherige Lipidanalytik untersuchte ausschließlich den anabolen Lipidstoffwechsel. Zur Vervollständigung wurde der katabole Lipidstoffwechsel anhand der Fettsäureoxidation untersucht. Als Maß für die Oxidation dienten die säurelöslichen Metabolite, welche in der unvollständigen β-Oxidation entstehen und deren Messung gegenüber der Messung des Endproduktes CO_2 zu favorisieren ist (Veerkamp *et al.*, 1986). Nach eigener Erfahrung betreiben COS-Zellen deutlich weniger β-Oxidation als Leberzellen. Daher war der Hintergrund in den einzelnen Experimente und somit die Schwankungsbreite der Ergebnisse vergleichsweise hoch. Somit kann hier nur eine tendenzielle Entwicklung aufgezeigt werden.

Die transfizierten Zellen wurden für 6 h mit 200 µM Arachidonat beziehungsweise Oleat inkubiert. Das Medium wurde auf die Bildung von säurelöslichen Metaboliten sowie die Zellen bezüglich der quantitativen Aufnahme der Fettsäuren untersucht.

Wie Abbildung 25A zu entnehmen ist, wurde die Aufnahme sowohl von Arachidonat als auch von Oleat unter diesen Bedingungen durch die Überexpression eines ACSL4-Proteins kaum beeinflusst. Die absoluten Aufnahmen beider Fettsäuren waren vergleichbar hoch.

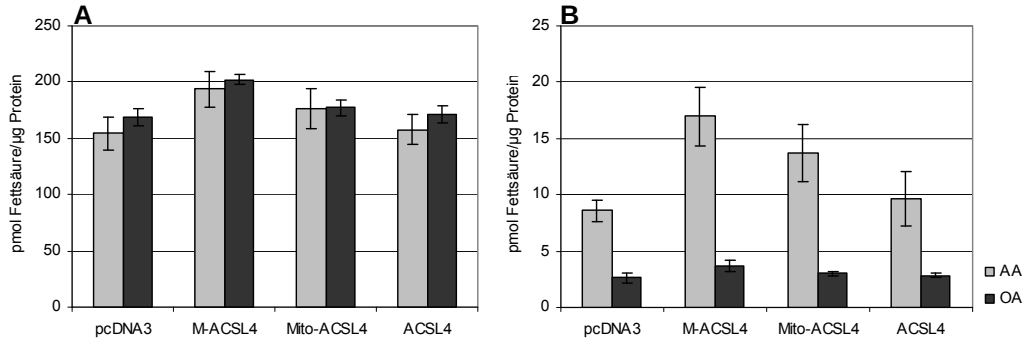

Abbildung 25: M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen oxidieren vermehrt Arachidonat während ACSL4 keine erhöhte Fettsäureoxidation zeigt.

A: Die Fettsäureaufnahme wird durch die Überexpression der ACSL4-Proteine nicht signifikant gesteigert und ist für Arachidonat und Oleat gleich hoch.

B: Es wird mehr Arachidonat als Oleat zu säurelöslichen Metaboliten oxidiert. M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen oxidieren tendenziell mehr Arachidonat als Kontrollzellen und ACSL4 überexprimierende Zellen.

Die Zellen wurden für 6 h mit 200 µM Fettsäure, welche anteilig ^{14}C-Fettsäure enthielt, inkubiert. Aus dem Medium wurde die Fettsäureoxidation anhand von säurelöslichen Metaboliten bestimmt. Die Fettsäureaufnahme ist hier gleich der Menge der nach 6 h innerhalb der Zelle enthaltenen Fettsäuren zuzüglich der säurelöslichen Metabolite. Jeweils n=3. Gezeigt ist der SEM. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Trotz der vergleichbar hohen Fettsäureaufnahme war die Menge der gebildeten säurelöslichen Metabolite und somit die Fettsäureoxidation für Arachidonat mit 8,6 pmol/µg Protein deutlich höher als für Oleat (2,6 pmol/µg Protein). Dies entsprach 5,7 % des aufgenommenen Arachidonats beziehungsweise 1,5 % des aufgenommenen Oleats (Abbildung 25B, Tabelle 8). Das kurze ACSL4 schien die Fettsäureoxidation nicht zu beeinflussen (AA: 9,6 pmol/µg Protein, 6 %; OA: 2,8 pmol/µg Protein, 1,7 %). Eine Überexpression der membrangebundenen Proteine M-ACSL4 und Mito-ACSL4 erhöhte die Oxidation des Arachidonats tendenziell (M-ACSL4 p: 0,0555; Mito-ACSL4 p: 0,1568). Der Anteil des oxidierten Arachidonats pro aufgenommenem Arachidonat stieg für M-ACSL4 überexprimierende Zellen auf 9,1 % und für Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen auf 8,0 %. Dies entsprach einer Steigerung um 58,6 % für M-ACSL4 und 40,4 % für Mito-ACSL4 gegenüber der Fettsäureoxidation in Kontrollzellen. Die Erhöhung der Oleatoxidation pro Oleataufnahme durch Überexpression der ACSL4-Proteine war deutlich geringer (M-ACSL4: 18,4 %, p: 0,1819; Mito-ACSL4: 10,5 %, p: 0,4985).

In COS-Zellen, welche die ACSL4-Proteine überexprimieren, wurde mehr aktiviertes Arachidonat als Oleat der Fettsäureoxidation zugeführt. Die Arachidonatoxidation wurde durch Überexpression der membrangebundenen Proteine M-ACSL4 und Mito-ACSL4, nicht jedoch durch die des Plasmamembran/Cytosol-lokalisierten ACSL4, tendenziell erhöht.

4.3 Analyse des Lipidstoffwechsels verschiedener Fettsäuren und Acetat

Die Lipidzusammensetzung der neu synthetisierten Lipide wird von der Wahl der zur Markierung verwendeten Fettsäure beziehungsweise des Acetats beeinflusst, unabhängig von der Überexpression von Acyl-CoA-Synthetasen. Um dies zu untersuchen, wurden die Zellen für 3 h mit 200 µM Fettsäure, welche anteilig ^{14}C-Fettsäure enthielt, beziehungsweise mit 100 µM ^{14}C-Acetat inkubiert. Anschließend wurden die Lipide extrahiert, über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und mittels die markierten Lipide *Phosphorimaging* visualisiert. Die Quantifizierung erfolgte unter Verwendung des Programms AIDA. Nicht identifizierte Lipide sowie Lipide mit einem Anteil von unter 1 % wurden unter den sonstigen Lipiden der Neutrallipide oder Phospholipide zusammengefasst. Gezeigt sind ausschließlich Profile von pcDNA3 transfizierten COS-Zellen.

Unterschiede, welche in der Inkubation der Zellen mit verschiedenen Fettsäuren begründet sind, können schon anhand der in Abbildung 26A und B dargestellten Dünnschichtchromatographien erkannt werden. So sind nur in den Spuren von Behenat und Acetat markierten Zellen neben den üblichen Neutral- und Phospholipiden auch Signale für Monoacylglycerin zu erkennen. Acetatmarkierung bedingt erwartungsgemäß ein starkes Signal des Sterols Cholesterin.

In Abbildung 26C sind die Lipidprofile der nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C-Arachidonat, ^{14}C-Oleat, ^{14}C-Behenat und ^{14}C-Acetat umgesetzten markierten Fettsäuren dargestellt. Auf durch Überexpression der ACSL4-Proteine hervorgerufene Veränderungen wurde für Arachidonat (Abbildung 22) und Acetat (Abbildung 24) bereits eingegangen. Im Anhang sind die Zahlenwerte der verschiedenen Lipidprofile aufgeführt (Tabelle 9).

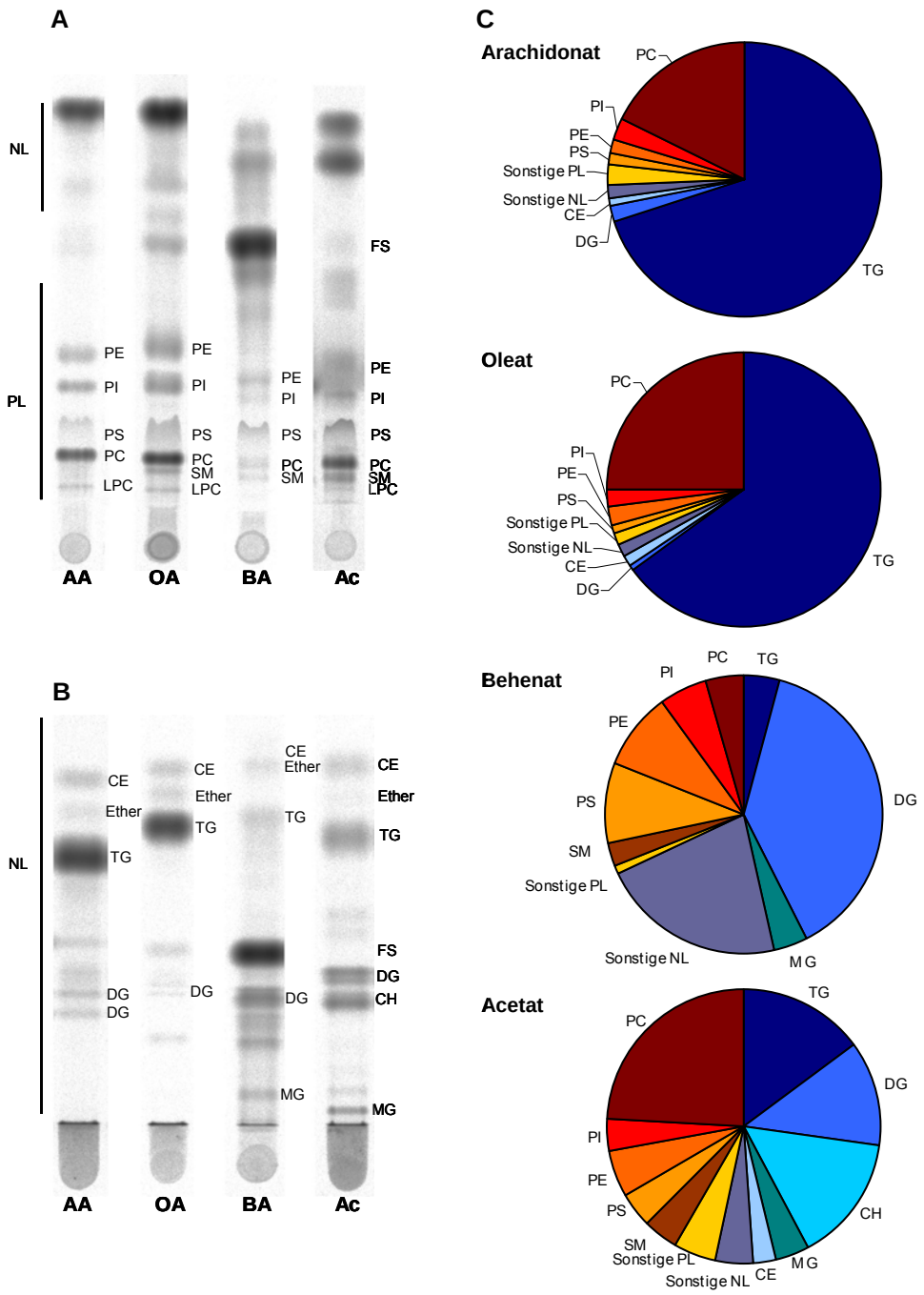

Abbildung 26: Die zugefügten Fettsäuren sowie das Acetat werden unterschiedlich verstoffwechselt.

A und B: Dünnschichtchromatographische Darstellung der Lipidklassen nach Auftrennung der Lipide im O-Mix (A) und N-Mix (B). Die Spuren von pcDNA3 transfizierten COS-Zellen verschiedener Experimente werden hier gemeinsam dargestellt. AA: Arachidonat, OA: Oleat, BA: Behenat, Ac: Acetat.

C: Lipidprofile der markierten Lipide nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen ^{14}C-markierten Fettsäuren/Acetat. Arachidonat und Oleat Markierung von pcDNA3 transfizierten COS-Zellen ergibt vergleichbare Lipidprofile mit sehr hohem Triacylglycerin- und hohem Phosphatidylcholinanteil. Behenat und Acetat-Inkubation erzeugen andere Lipidprofile mit weniger Triacylglycerin.

Die Zellen wurden für 3 h mit 200 µM Fettsäure bzw. mit 100 µM Acetat inkubiert, die Lipide extrahiert, mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt, durch *Phosphorimaging* visualisiert und mittels AIDA quantifiziert. Gezeigt sind die prozentualen Anteile der jeweiligen Lipide an den Gesamtlipiden, ohne freie Fettsäure, innerhalb einer Spur. Dargestellt sind Profile von mit pcDNA3 transfizierten COS-Zellen. Arachidonat und Acetat n=3, Oleat und Behenat n=1. Die Zahlenwerte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Die Profile von aus Arachidonat und Oleat gebildeten Lipiden sind einander ähnlich. Nach dreistündiger Inkubation zeigten beide Profile vergleichbare Anteile an markierten Neutrallipiden und Phospholipiden. Der Anteil markierter Neutrallipide war nach Inkubation mit Arachidonat mit 74,3 % etwa um 5 % höher als nach Inkubation mit Oleat (68,3 %). Dieser hohe Anteil wurde überwiegend durch Umsetzung beider Fettsäuren zu Triacylglycerin, dem jeweils weitaus häufigsten Lipid, bedingt (OA-TG: 70,1 %, AA-TG: 65,1 %). Nur etwa 4 % des Arachidonats und Oleats wurden in weitere Neutrallipide umgesetzt. Das zweithäufigste markierte Lipid der Zelle war in beiden Fällen das Phosphatidylcholin, dessen Anteil mit 25,0 % für oleathaltiges Phosphatidylcholin mehr als 7 % höher war als für arachidonathaltiges Phosphatidylcholin (17,7 %). Mit bis zu 2,5 % wurden Arachidonat und Oleat nur geringfügig in die anderen Phospholipide umgesetzt. Wider Erwarten repräsentierte das markierte Phosphatidylinositol in mit Arachidonat inkubierten Zellen die zweithäufigste Phospholipidklasse (2,5 %) und wurde damit gegenüber Phosphatidylethanolamin vermehrt gebildet.

Das Lipidprofil nach Inkubation mit der dritten verwendeten Fettsäure, Behenat, entsprach in keinster Weise den Profilen nach Arachidonat- und Oleatinkubation. Zwar waren die Anteile der behenathaltigen, markierten Neutrallipide (68,0 %) und Phospholipide (32,0 %) gleich hoch wie nach der Arachidonatinkubation, allerdings enthielten die Zellen mit nur 4,2 % genauso wenig markiertes Triacylglycerin wie markiertes Monoacylglycerin (4,0 %). Der Anteil nicht identifizierter Neutrallipide war mit 21,6 % sehr hoch. Zudem war der intrazelluläre Anteil an markiertem Diacylglycerin mit 38 % extrem groß, was bereits auf der Dünnschichtchromatographie auffällig war. Auch die Verteilung der einzelnen Phospholipide war nach Behenatinkubation gegenüber der Arachidonat- und Oleatinkubation verändert. Als zweithäufigstes markiertes Lipid innerhalb der Zelle wurde aus Behenat Phosphatidylserin gebildet (9,5 %), gefolgt von Phosphatidylethanolamin (8,9 %) und Phosphatidylinositol (5,6 %). Zusätzlich bildeten diese Zellen zu 2,8 % markiertes Sphingomyelin, welches nach Inkubation mit Arachidonat und Oleat nur in Spuren zu detektieren war. Somit wurden diese Lipide vermehrt gebildet, wohingegen markiertes Phosphatidylcholin mit 4,1 % nur einen sehr geringen Anteil stellte.

Das Profil der aus Acetat und aus *de novo* synthetisierten Fettsäuren gebildeten Lipide entsprach weder dem ungewöhnlichen Lipidprofil nach Behenatinkubation noch den Profilen nach Inkubation mit Arachidonat und Oleat. Mit 46,6 % wurden innerhalb von drei Stunden annähernd so viele markierte Phospholipide wie Neutrallipide (53,4 %) gebildet. Damit war der Neutrallipidanteil der aus *de novo* Fettsäuren gebildeten Neutrallipide etwa 15 % und 21 % geringer als der Anteil an oleat-/behenathaltigen und arachidonathaltigen Neutrallipiden. Mit 24,1 % enthielten die Zellen einen Anteil an markiertem Phosphatidylcholin, welcher dem nach Oleatinkubation (25,0 %) entspricht. Somit war Phosphatidylcholin das häufigste aus Acetat synthetisierte, markierte Lipid. Die übrigen markierten Phospholipide Phosphatidylethanolamin (5,4 %), Phosphatidylserin (4,2 %), Sphingomyelin (4,0 %) und Phosphatidylinositol (3,8 %) wurden in etwa gleichen Anteilen gebildet. Bezüglich der Neutrallipide bildeten die Zellen gleich viel Triacylglycerin (14,8 %) wie das ausschließlich nach Acetatinkubation gebildete Cholesterin (15,1 %). Der Anteil an markiertem Triacylglycerin war, wie auch anhand der Signalstärke auf der Dünnschichtchromatographie erkennbar, vergleichbar gering. Der markierte Diacylglycerinanteil war jedoch mit 12,3 % nach Acetatinkubation 7-mal höher als nach Arachidonatinkubation und 26-mal höher als nach Oleatinkubation. Mit 3,9 % Monoacylglycerin und 2,8 % Cholesterinester wurden ebenfalls erhöhte Anteile dieser Neutrallipide synthetisiert.

Die Lipidprofile der neu gebildeten, markierten Lipide nach Inkubation der Zellen mit Arachidonat und Oleat waren miteinander vergleichbar und unterschieden sich deutlich von den Lipidprofilen nach Inkubation mit Behenat oder Acetat. Arachidonat und Oleat wurden mit knapp 70 % überwiegend in Form von Triacylglycerin gebunden, gefolgt von Phosphatidylcholin und geringen Anteilen der anderen Phospho- und Neutrallipide. Behenat staute sich mit 38 % in Diacylglycerin an und wurde in nur geringem Ausmaß zu Triacylglycerin umgesetzt. Die Anteile an markiertem Phosphatidylserin und Sphingomyelin waren hier besonders hoch, dafür wurde kaum markiertes Phosphatidylcholin gebildet. Der Anteil an markiertem Phosphatidylcholin nach Acetatinkubation entsprach dem nach Archidonat- und Oleatinkubation. Aufgrund des hohen Anteils gebildeten Diacylglycerins und dem zusätzlich gebildeten Cholesterin war der Anteil an markiertem Triacylglycerin nach Acetatinkubation sehr gering.

5. Diskussion

Acyl-CoA-Synthetasen sind essentiell für den zellulären Stoffwechsel, da sie über eine Thioesterifizierung mit Coenzym A freie Fettsäuren aktivieren und somit für folgende Stoffwechselwege verfügbar machen: Synthese von Membranlipiden und Speicherlipiden sowie Lieferung von Energie. Zusätzlich besitzen Fettsäuren und Acyl-CoAs weitere wichtige Funktionen in der zellulären Signaltransduktion sowie in der Regulation des Stoffwechsels.

In Säugetierzellen wurden 13 Acyl-CoA-Synthetasen mit einer Substratspezifität für langkettige Fettsäuren identifiziert, welche simultan in einer Zelle auf verschiedenen subzellulären Organellen exprimiert werden können. Die enzymatisch aktive Domäne aller Acyl-CoA-Synthetasen befindet sich jedoch immer im Cytosol. Es stellt sich die Frage, ob sich diese Vielfalt während der Evolution zufällig entwickelt hat oder ob die einzelnen Isoformen spezifische Funktionen innerhalb des Lipidstoffwechsels erfüllen. Für die individuelle Funktion der einzelnen Enzyme spricht, dass diese trotz ihrer funktionellen Redundanz gewebespezifisch exprimiert werden (Heimerl *et al.*, 2006; Gimeno, 2007; Mashek *et al.*, 2007), unterschiedliche subzelluläre Lokalisierungen zeigen (Mashek *et al.*, 2007) und unterschiedlich reguliert beziehungsweise durch Inhibitoren wie Triacsin C gehemmt werden (Kim *et al.*, 2001). Zudem zeigten Versuche der eigenen Arbeitsgruppe, dass die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetase den Ort der initialen Metabolisierung einer fluoreszierenden Fettsäure bestimmt (Füllekrug, nicht veröffentlicht).

Aus diesen Vorkenntnissen wurde die in dieser Arbeit untersuchte Hypothese abgeleitet: Die subzelluläre Lokalisation der Acyl-CoA-Synthetase Aktivität bestimmt die metabolische Richtung der durch sie aktivierten Fettsäure (Coleman *et al.*, 2002; Digel *et al.*, 2009) (Abbildung 3).

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden die Acyl-CoA-Synthetasen FATP4 und ACSL4 im Zellkultursystem überexprimiert und deren Einfluss auf den Stoffwechsel von exogenen Fettsäuren und *de novo* synthetisierten Fettsäuren untersucht. Für ACSL4 wurde weiterhin analysiert, inwieweit die *unterschiedliche* Lokalisierung *derselben* Acyl-CoA-Synthetase den Lipidmetabolismus beeinflusst.

5.1 Durch Überexpression von FATP4 vermehrt aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Zelllinien untersucht, welche FATP4 stabil überexprimierten: die FATP4.C2C12-Zelllinie und die FATP4.HEK293-Zelllinie. Beide zeichneten sich durch eine gesteigerte zelluläre Acyl-CoA-Synthetasen Aktivität und eine erhöhte Fettsäureaufnahme aus. Während die Enzymaktivität in FATP4.C2C12 Zellen gegenüber den Kontrollzellen auf das 9,5-fache erhöht war (Abbildung 5), wurde die Aufnahme des physiologischen Substrates Oleat in diesen Zellen auf das 2,6-fache gesteigert (Abbildung 7). Folglich wurde in Kontrollzellen innerhalb einer Minute *in vitro* 1,3-mal mehr Fettsäuren aktiviert (0,47 pmol OA-CoA/µg Protein/min) als *in vivo* aufgenommen wurden (0,37 pmol OA/µg Protein/min). Dahingegen führte die Überexpression von FATP4 in C2C12-Zellen zu einer 4,7-mal erhöhten Aktivität (4,4 pmol OA-CoA/µg Protein/min) gegenüber der Aufnahme (0,93 pmol OA/µg Protein/min). Dies zeigt, dass nicht ausschließlich die Enzymaktivität ausschlaggebend für die erhöhte Fettsäureaufnahme ist, sondern lässt vermuten, dass diese durch weitere Proteine des Lipidstoffwechsels reguliert wird. Neben radioaktiv-markiertem Oleat wurde auch die Aufnahme einer fluoreszierenden Bodipy-Fettsäure untersucht. Diese enthielt eine Kette von 22 Kohlenstoffatomen und entsprach daher einer sehr langkettigen Fettsäure. FATP4 überexprimierende C2C12-Zellen nahmen 7-mal mehr Bodipy-Fettsäure auf als Kontrollzellen (Abbildung 5). Die Aufnahme von Bodipy-Fettsäure war somit stärker erhöht als die Aufnahme von Oleat, wodurch die Bedeutung von FATP4 als Acyl-CoA-Synthetase mit einer Spezifität für sehr langkettige Fettsäuren bestätigt wurde (Hall *et al.*, 2005). Die Enzymaktivität unter Verwendung der Bodipy-Fettsäure wurde nicht bestimmt, ist jedoch vermutlich auch gegenüber der Aktivität mit Oleat gesteigert.

Die Analyse des Stoffwechsels von durch FATP4 Überexpression vermehrt aufgenommenem ^{14}C-Oleat erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Mithilfe eines *Pulse-Chase*-Experiments wurde der Metabolismus des innerhalb von 60 s aufgenommenen ^{14}C-Oleats über 18 min verfolgt (Abbildung 6). Die Fettsäure war unmittelbar nach dem einminütigen *Pulse* in zellulären Lipiden zu detektieren und wurde zu etwa 50 % in Diacylglycerin eingebaut. Diacylglycerin ist ein wichtiger Verzweigungspunkt des Lipidstoffwechsels und kann sowohl zu Phospholipiden als auch zu Triacylglycerin umgesetzt werden (Abbildung 31).

Innerhalb der folgenden 18 min wurde in den Kontrollzellen kaum oleathaltiges Triacylglycerin gebildet, während ein Großteil des markierten Oleats aus dem Diacylglycerin auf Phosphatidylcholin transferiert wurde. Überexpression von FATP4 erhöhte, wie in der Literatur beschrieben, die Oleataufnahme (Milger *et al.*, 2006; Digel *et al.*, 2011). Das so zusätzlich aufgenommene Oleat wurde ebenfalls zu Phosphatidylcholin umgesetzt, jedoch wurde das Oleat gegenüber Kontrollzellen vermehrt in Triacylglycerin eingebaut.

Für das dargestellte *Pulse-Chase*-Experiment (Abbildung 6B) konnte nicht eindeutig festgelegt werden, ob es sich bei dem mit PIPA bezeichneten Lipid um das Zwischenprodukt Phosphatidsäure oder um das Endprodukt Phosphatidylinositol handelte, da im verwendeten Laufmittelgemisch beide Lipide auf gleicher Höhe liefen. Es deuten jedoch die große Menge an aus Phosphatidsäure gebildetem, noch nicht verstoffwechseltem Diacylglycerin, die im zeitlichen Verlauf leicht abnehmende Intensität des Signals und das Fehlen anderer Phospholipide auf die Existenz von Phosphatidsäure hin. Für Inkubationen über einen längeren Zeitraum konnte das Lipid durch zusätzliche Verwendung eines anderen Laufmittelgemischs, eindeutig als Phosphatidylinositol identifiziert werden (Abbildung 4).

Die vermehrte Synthese von Triacylglycerin manifestierte sich über einen Zeitraum von 3 h in den C2C12-Zellen (Abbildung 7) und den HEK293-Zellen (Abbildung 9). So stieg in den FATP4.HEK293-Zellen gegenüber den Kontrollzellen die absolute Menge der Neutrallipide auf das 3,2-fache, während die Menge der Phospholipide auf das 1,3-fache gesteigert wurde. Die Zunahme der Neutrallipide beruhte hauptsächlich auf der um 274 % gesteigerten Synthese von Triacylglycerin, während sowohl die anderen Neutrallipide als auch die einzelnen Phospholipide Steigerungen von lediglich 15 % bis 73 % erfuhren (Abbildung 9).

Es lässt sich schlussfolgern, dass das zusätzlich aufgenommene Oleat zu Triacylglycerin umgesetzt und in Lipidtröpfchen gespeichert wurde. Die vermehrt gebildeten Phospholipide wurden vermutlich benötigt, um die Membraneinzelschicht der Lipidtröpfchen zu bilden, welche sich mit zunehmender Menge an gespeichertem Triacylglycerin ebenfalls vergrößern musste. FATP4 ist im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, welches die für die Synthese von Neutrallipiden und Phospholipiden notwendigen Enzyme enthält. Folglich widerspricht die Speicherung von zusätzlich aufgenommenem Oleat nicht der Kanalisierungshypothese. Allerdings scheint eine Speicherung überschüssiger Fettsäuren in Triacylglycerin naheliegend.

In der Literatur sind weitere Acyl-CoA-Synthetasen beschrieben, deren Überexpression in einer Akkumulation von Triacylglycerin resultiert. So führte ACSL5 Überexpression in Rattenhepatocyten zu einer erhöhten Oleataufnahme und einer erhöhten Synthese von Triacylglycerin bei gleicher Phospholipidsynthese und unveränderter Fettsäureoxidation (Mashek *et al.*, 2006b). Auch ACSL1 Überexpression in HepG2-Zellen und FATP1-Überexpression in HEK293-Zellen erhöhte die Synthese von Triacylglycerin (Hatch *et al.*, 2002; Parkes *et al.*, 2006). Jedoch ist die Überexpression von Acyl-CoA-Synthetasen nicht zwangsläufig mit einer vermehrten Triacylglycerinsynthese verbunden. So erhöhte die Überexpression von ACSL1 in primären Rattenhepatocyten die Synthese von Triacylglycerin nicht (Li *et al.*, 2006) und Überexpression von FATP2 in 293T-REx-Zellen erhöhte die Synthese von Phosphatidylinositol nicht aber von Triacylglycerin (Melton *et al.*, 2011).

5.2 Der N-Terminus beeinflusst die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetase ACSL4, nicht jedoch die Enzymaktivität

Für die Acyl-CoA-Synthetase FATP4 wurde gezeigt, dass zusätzlich aufgenommenes Oleat zu Triacylglycerin umgesetzt und gespeichert wird. Die metabolische Richtung von Fettsäuren wurde in einem weiteren System anhand der Acyl-CoA-Synthetase ACSL4 untersucht. Zu diesem Zweck wurden drei verschieden lokalisierte ACSL4-Proteine in COS-Zellen überexprimiert und hinsichtlich ihrer Lokalisierung, Enzymaktivität und Fähigkeit die Fettsäureaufnahme zu steigern charakterisiert.

Das natürlich vorkommende ACSL4 lokalisiert in der Plasmamembran und im Cytosol (Abbildung 12) (Becker, 2007; Großmann, 2011). Eine weitere nativ vorkommende Isoform, M-ACSL4, besitzt eine zusätzliche N-terminale Transmembrandomäne und lokalisiert im Endoplasmatischen Retikulum und auf den Lipidtröpfchen (Abbildung 13) (Meloni *et al.*, 2009; Großmann, 2011). Die auf den Mitochondrien lokalisierende Mutante Mito-ACSL4 wurde durch Anfügen der Sortierungssequenz des Proteins Tom20 an den N-Terminus von ACSL4 erzeugt (Abbildung 14) (Lehnen, 2009). Die Lokalisierungen der Proteine wurden über indirekte Immunfluoreszenz und mittels subzellulärer Fraktionierung untersucht.

In der Immunfluoreszenz für M-ACSL4 waren neben den Signalen im Endoplasmatischen Retikulum die deutlichen Signale des Proteins auf den Lipidtröpfchen auffällig. Das M-ACSL4 auf den kleinen, kompakten Lipidtröpfchen erschien unter dem Mikroskop deutlich heller als die feinen, verzweigten Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums. Aufgrund des großen Kontrasts erschienen überwiegend Lipidtröpfchen, wodurch eine korrekte Interpretation erschwert wurde. Die subzelluläre Fraktionierung zeigte unter den verwendeten Bedingungen jedoch eine vergleichbare Verteilung von M-ACSL4 mit dem ER-Marker Calnexin und dem ER-ständigen FATP4 in den Membranfraktionen, während der LD-Marker Adipophilin in der Lipidtröpfchenfraktion nachgewiesen werden konnte. Erst nach Inkubation der Zellen mit Oleat über Nacht wurde die Synthese von Lipidtröpfchen induziert und M-ACSL4 war vermehrt auf den Lipidtröpfchen detektierbar. Damit verhielt sich überexprimiertes M-ACSL4 wie endogenes ACSL3 (Fujimoto *et al.*, 2004). Eine überwiegende Lokalisierung des M-ACSL4 auf Lipidtröpfchen wäre physiologisch vermutlich nicht relevant, da M-ACSL4 in neuronalen Geweben exprimiert wird, welche keine Lipidtröpfchen besitzen.

Die Charakterisierung der verschiedenen ACSL4-Proteine in COS-Zellen zeigte, dass alle Proteine eine erhöhte Enzymaktivität mit Arachidonat gegenüber Oleat besaßen, welches der bekannten Substratspezifität von ACSL4 für mehrfach ungesättigte Fettsäuren entspricht (Kang *et al.*, 1997) (Abbildung 15). Alle überexprimierten ACSL4-Proteine wiesen eine vergleichbare Arachidonyl-CoA-Synthetasen Aktivität auf, welche gegenüber den Kontrollzellen etwa 10-fach erhöht war (Abbildung 16). Durch Überexpression aller ACSL4-Proteine wurde die Aufnahme von Arachidonat in einem Zeitraum von 15 min sowie 3 h um etwa 60 % bis 70 % gesteigert (Abbildung 17). Obwohl gezeigt werden konnte, dass die *in vitro* gemessene Enzymaktivität mit der Proteinexpression korrelierte (Abbildung 16), konnte nur eine schlechte Korrelation der Enzymaktivität mit der Arachidonataufnahme *in vivo* hergestellt werden (Abbildung 17). Dies entspricht Ergebnissen, in denen gezeigt wurde, dass die Expressionshöhe von FATP4 in HEK293-Zellen die Acyl-CoA-Synthetasen Aktivität mit Lignocerat (24:0) proportional beeinflusste, während die Aufnahme von Oleat nicht beeinflusst wurde (Lobo *et al.*, 2007). Die Fettsäureaufnahme wurde folglich nicht ausschließlich durch die Aktivierung der Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen sondern auch durch deren metabolischen Verbrauch und somit durch die Aktivität weiterer Enzyme bestimmt.

Die Charakterisierung der in COS-Zellen überexprimierten ACSL4-Proteine zeigte, dass die einzelnen ACSL4-Proteine trotz ihrer unterschiedlichen N-Termini und der dadurch hervorgerufenen unterschiedlichen subzellulären Lokalisierung vergleichbare Arachidonyl-CoA-Synthetasen Aktivität besaßen und die Arachidonataufnahme gleichermaßen steigerten.

5.3 Durch Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine aktiviertes Arachidonat wird initial in den Phospholipiden gebunden

Während die Überexpression von FATP4 zu einer vermehrten Synthese von Triacylglycerin führte, zeigte sich nach Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine ein anderes Bild. So wurde das durch die ACSL4-Proteine gegenüber Kontrollzellen zusätzlich aktivierte Arachidonat nicht in Form von Triacylglycerin gespeichert, sondern zur vermehrten Synthese von Phospholipiden verwendet. Dieser Prozess war mehr von der Dauer der Fettsäureinkubation abhängig und weniger von der Konzentration der verwendeten Fettsäure. Eine Inkubation der Zellen mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat über einen Zeitraum von 15 min resultierte in einem Anteil von 68 % markierten Neutrallipiden und 32 % markierten Phospholipiden in Kontrollzellen. Durch die Überexpression aller ACSL4-Proteine wurde der Anteil an Neutrallipiden zusätzlich verringert und der Anteil an Phospholipiden erhöht. Dabei zeigte das Plasmamembran/Cytosol-lokalisierte ACSL4 die größten Veränderungen mit relativen Anteilen an den Gesamtlipiden von 56 % Neutrallipiden und 44 % Phospholipiden (Abbildung 18). Inkubation mit 200 µM Arachidonat über einen Zeitraum von 15 min zeigte dieselbe Verschiebung zugunsten einer vermehrten Synthese von Phospholipiden nach Überexpression der verschiedenen ACSL4-Proteine (Abbildung 20). Die Fettsäure Arachidonat bildet in der Regel nur einen Anteil von etwa 2 % der in Neutrallipiden veresterten Fettsäuren. Dahingegen stellt sie mit 20 % bis 25 % in den Phospholipiden Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin sowie mit 40 % der in Phosphatidylinositol gebundenen Fettsäuren einen deutlich größeren Anteil dar (Christies, 2000). Die bevorzugte Veresterung des aktivierten ^{14}C-Arachidonats in den Phospholipiden entspricht somit den Erwartungen, während ein Anteil von über 50 % markierten Neutrallipiden jedoch ungewöhnlich hoch erscheint.

Die Analyse der einzelnen Lipide zeigte, dass die Abnahme der Neutrallipidanteile durch eine verminderte Synthese von Triacylglycerin hervorgerufen wurde. Eine Veresterung der freien intrazellulären Arachidonsäure war jedoch notwendig, da diese in ungebundener Form Apoptose ausgelöst hätte (Cao *et al.*, 2000b). Das aktivierte Arachidonat wurde daher vermehrt in Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol gebunden. So nahmen die Anteile an arachidonathaltigem Phosphatidylcholin um bis zu 40 % und die Anteile an arachidonathaltigem Phosphatidylinositol um bis zu 50 % zu.

Beide Phospholipide dienten somit als intrazellulärer Speicher von Arachidonat. Der Arachidonatspeicher wird im Lands-Zyklus durch die Aktivitäten der Phospholipase A2 und der Lysophospholipid-Acyltransferasen reguliert. Die Phospholipase A2 setzt bevorzugt Arachidonat von der sn-2-Position des Glycerins frei, während die Lysophospholipid-Acyltransferase aktiviertes Arachidonat wiederum an diese Position transferieren kann (Yamashita *et al.*, 1997; Shindou *et al.*, 2009). Somit haben alle drei Enzyme eine wichtige Bedeutung für die Regulation der intrazellulären Arachidonatkonzentration und somit in der Aufrechterhaltung der Zelllhomöostase oder bei der Regulation der Eicosanoidsynthese aus Arachidonat und der durch sie vermittelten Entzündungs- und Immunreaktionen sowie der Blutgerinnung.

Im Gegensatz zu Arachidonat ist Oleat eine Fettsäure, welche überwiegend in Triacylglycerin gebunden wird. So stellt Oleat an der sn-1-Position des Glycerins 22 % und an den sn-2- und sn-3-Positionen 58 % beziehungsweise 61 % der veresterten Fettsäuren (Christies, 2000). Daher wurde nicht erwartet, dass nach Inkubation der Zellen mit 10 µM ^{14}C-Oleat schon die Kontrollzellen mit 58 % einen um etwa 25 % höheren Anteil an markierten Phospholipiden gegenüber mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat inkubierten Zellen enthielten und nur 42 % markierte Neutrallipide beinhalteten. Aufgrund der Überexpression der ACSL4-Proteine nahm auch für Oleat der Anteil der gebildeten oleathaltigen Phospholipide zu (Abbildung 23). Dies beruhte überwiegend auf einem gesteigerten Einbau von Oleat in Phosphatidylinositol, nicht jedoch in Phosphatidylcholin. Obwohl für die Reacylierung von Phosphatidylinositol im Lands-Zyklus bisher nur eine Acyltransferase (MBOAT-7) identifiziert wurde, welche zudem eine Substratspezifität für Arachidonat besitzt (Shindou *et al.*, 2009), wurde die Synthese von oleathaltigem Phosphatidylinositol gegenüber arachidonathaltigem Phosphatidylinositol mit zusätzlichen 70 % bis 125 % deutlich mehr gesteigert.

Es stellt sich die Frage, ob die Acyl-CoA verbrauchenden Enzyme des Lipidstoffwechsels, wie die MBOAT-7, die zusätzlich aktivierten Arachidonyl-CoAs und Oleoyl-CoAs entsprechend ihrer normalen Aktivität metabolisierten oder ob schon bei einer Inkubation der Zellen mit 10 µM Fettsäure über 15 min die intrazelluläre Maschinerie die zusätzlich gebildeten Acyl-CoAs nicht mehr naturgemäß umsetzte. Allerdings wäre bei einer ungerichteten Umsetzung damit zu rechnen, dass die Acyl-CoAs anteilig in alle Phospholipide eingebaut würden. Dies konnte nicht bestätigt werden, da die Anteile der übrigen Phospholipide bei 15 min Inkubation mit 10 µM und auch mit 200 µM Fettsäure nicht zunahmen. Eine weitere Begründung für die vermehrte Synthese von oleathaltigem, markiertem Phosphatidylinositol gegenüber arachidonathaltigem, markiertem Phosphatidylinositol nach Überexpression der ACSL4-Proteine könnte der direkte Einbau des Oleats in die Phosphatidsäure sein, aus welcher durch Addition von CTP CDP-Diacylglycerin gebildet wird. Dieses wird durch die Phosphatidylinositol-Synthase mit Inositol zu Phosphatidylinositol umgesetzt (Paulus und Kennedy, 1960).

Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurden die Zellen für einen Zeitraum von 3 h mit 10 µM und 200 µM Arachidonat inkubiert. Jedoch konnte die ACSL4-vermittelte Synthese zusätzlicher markierter Phospholipide über diesen Zeitraum nicht aufrechterhalten werden, so dass die Kontrollzellen und die ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen gleiche Anteile an markierten Neutral- beziehungsweise Phospholipiden enthielten. Vermutet wird, dass aufgrund der hohen Mengen an zusätzlich aufgenommener Fettsäure diese ungerichtet in alle Stoffwechselwege gelenkt wurde, obwohl Arachidonat keine klassische Fettsäure der Neutrallipidspeicher ist (Christies, 2000). Somit wurde der durch Überexpression der ACSL4-Proteine vermittelte Einbau zusätzlichen Arachidonats in die Phospholipide gegenüber den Kontrollzellen überlagert. Weiterhin könnte das Arachidonat innerhalb der drei Stunden zu anderen Fettsäuren umgesetzt oder oxidiert worden sein, so dass dies den Effekt einer vermehrten Phospholipidsynthese unterbunden hätte.

Neben dem Einbau von exogenem Arachidonat und Oleat in die zellulären Lipide wurde auch der Stoffwechsel *de novo* synthetisierter Fettsäuren sowie von Acetat, durch Inkubation der Zellen mit ^{14}C-Acetat untersucht (Abbildung 24). Während der ersten 15 min bildeten die Zellen aus den aus ^{14}C-Acetat synthetisierten Fettsäuren zu 95 % Phospholipide. Eine Untersuchung der einzelnen Phospholipide zu diesem Zeitpunkt lieferte keine reproduzierbaren Ergebnisse. Die Etablierung erscheint jedoch sinnvoll, um festzustellen, ob *de novo* synthetisierte Fettsäuren auch durch die Aktivität der ACSL4-Proteine vermehrt zu Phosphatidylinositol umgesetzt werden können.

Neben den aus ^{14}C-Arachidonat und ^{14}C-Oleat gebildeten Lipiden wurde das ^{14}C-Acetat auch für die Synthese von Cholesterin verwendet, welches einen Anteil von etwa 15 % der markierten Lipide darstellte (Abbildung 24). Durch Überexpression der ACSL4-Proteine wurden die Anteile an markiertem Cholesterin sowie markiertem Cholesterinester nicht verändert. Somit konnten für die Überexpression der ACSL4-Proteine, entsprechend der Fettsäuremarkierung, nach der Acetatmarkierung über 3 h keine Unterschiede im Lipidstoffwechsel festgestellt werden. Potentielle Effekte nach Markierung über 15 min, wie diese bei Inkubation mit Arachidonat oder Oleat nachgewiesen wurden, konnten in diesem Zeitraum vermutlich durch die Zelle ausgeglichen werden. Im Gegensatz dazu wurde für die Acyl-CoA-Synthetase FATP1 gezeigt, dass nach Inkubation der Zellen mit ^{14}C-Acetat vermehrt Triacylglycerin gebildet wurde, während die Anteile an Cholesterin und Sphingomyelin abnahmen (Hatch *et al.*, 2002).

5.4 Kanalisierungseffekte durch Überexpression von ACSL4 an der Plasmamembran und im Cytosol

Bezüglich der zuvor beschriebenen Erhöhungen der Phospholipidanteile innerhalb der Zellen war auffällig, dass das ACSL4 der Plasmamembran und des Cytosols sowohl ^{14}C-Arachidonat als auch ^{14}C-Oleat gegenüber dem ER-ständigen M-ACSL4 und dem mitochondriellen Mito-ACSL4 vermehrt in den markierten Phospholipiden gebunden hat (Abbildung 18, Abbildung 20, Abbildung 23). Dies war für die Inkubation mit 10 µM Arachidonat signifikant für ACSL4 gegenüber M-ACSL4 und ließ sich für die anderen Experimente als Trend bestätigen. Ausschlaggebend für diesen Effekt war bei Inkubation mit Arachidonat vor allem die erhöhte Synthese von Phosphatidylcholin nach ACSL4 Überexpression und weniger die Reacylierung von Arachidonat in Phosphatidylinositol.

Entsprechend der Kanalisierungshypothese wäre erwartet worden, dass besonders das ER-ständige M-ACSL4 das Arachidonat für eine Synthese von Phospholipiden auf dem Endoplasmatischen Retikulum aktiviert. Für das ACSL4 der Plasmamembran und des Cytosols wurde hingegen erwartet, dass dieses nicht aktiv an der Kanalisierung innerhalb der Zelle teilnimmt, da es für die Acyl-CoA verbrauchenden Enzyme aller Membransysteme Acyl-CoA bereitstellen kann.

Allerdings aktivierte ACSL4 Arachidonat für eine erhöhte Phospholipidreacylierung ohne dass die durch ACSL4 aktivierte Fettsäure der Fettsäureoxidation zugeführt wurde, so dass diese gegenüber den Kontrollzellen unverändert blieb (Abbildung 25). Folglich wurde das Arachidonat trotz der cytosolischen Aktivierung nicht für alle Wege gleichermaßen zur Verfügung gestellt. Warum gerade die Arachidonataktivierung an der Plasmamembran und im Cytosol die Synthese von Phosphatidylcholin stärker erhöht als die Aktivität der Proteine M-ACSL4 und Mito-ACSL4 (Abbildung 18), obwohl es sich bei den Lysophosphatidylcholin-Acyltransferasen um ER-ständige Proteine handelt (www.uniprot.org), konnte nicht geklärt werden.

Für Mito-ACSL4 wurde vermutet, dass die auf den Mitochondrien aktivierte Fettsäure bevorzugt in die Fettsäureoxidation kanalisiert wird. Diese Vermutung konnte nicht bestätigt werden, da die Überexpression des ER-ständigen M-ACSL4 die Arachidonat-oxidation mit 58,6 % gegenüber den Kontrollzellen mehr erhöhte als die Überexpression des Mito-ACSL4 mit 40,4 % (Abbildung 25). Bei den Versuchen zur Fettsäureoxidation bleibt zu beachten, dass mit den COS-Zellen eine Zelllinie untersucht wurde, welche, wie sich erst während der Versuche herausstellte, gegenüber Leberzellen nur wenig Fettsäureoxidation betreibt. Obwohl in HepG2-Zellen und Huh7-Zellen die Hintergrundaktivität der zur Markierung der Zellen verwendeten radioaktiven Fettsäure unter Verwendung derselben Methode sehr gering war, blieb die Hintergrundaktivität in COS-Zellen mit etwa 60 % zu hoch um optimale Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin war unter den verwendeten Bedingungen die Fettsäureaufnahme der die ACSL4-Proteine überexprimierenden Zellen nicht deutlich gegenüber den Kontrollzellen erhöht, wie dies für die zuvor gezeigten Arachidonataufnahmen der Fall war. Ursächlich könnte die geringere Glucosekonzentration im verwendeten Kulturmedium gewesen sein, die ursprünglich verwendet wurde, um eine überwiegende Glykolyse zu vermeiden und die Fettsäureoxidation zu stimulieren. Allerdings könnte die Glykolyse auch zu sehr unterbunden worden sein, so dass weniger Glycerinaldehyd-3-Phosphat gebildet wurde. Ohne diesen Acyl-CoA Akzeptor hätte sich die aktivierte Fettsäure in der Zelle angestaut und die weitere Fettsäureaufnahme inhibiert. Alternativ würde die Fettsäure wieder aus der Zelle heraus diffundieren.

5.5 Kanalisierungseffekte der Proteine M-ACSL4 und Mito-ACSL4

Die Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen M-ACSL4 des Endoplasmatischen Retikulums und Mito-ACSL4 der Mitochondrien wirkte sich auf den intrazellulären Gehalt an markiertem Phosphatidylinositol aus. So bildeten COS-Zellen, welche M-ACSL4 überexprimierten, über 30 % mehr arachidonathaltiges Phosphatidylinositol (Abbildung 19), nicht jedoch oleathaltiges Phosphatidylinositol, gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen. Arachidonat wird überwiegend durch die Reacylierung im Lands-Zyklus in Phosphatidylinositol verestert (Yamashita *et al.*, 1997). Die einzige bisher identifizierte Acyltransferase für die Reacylierung von Phosphatidylinositol (MBOAT-7) besitzt eine Substratspezifität für Arachidonat und wurde auf Mikrosomen humaner neutrophiler Zellen sowie auf Mikrosomen von *C. elegans* nachgewiesen (Gijon *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). Dies könnte erklären, warum ein lokalisierungsbedingter Unterschied für Arachidonat aber nicht für Oleat nachgewiesen werden konnte. Die Lokalisierung der MBOAT-7 auf dem Endoplasmatischen Retikulum könnte ursächlich für die erhöhten Phosphatidylinositolanteile in Zellen sein, welche das ER-ständige M-ACSL4 überexprimieren, wodurch die Kanalisierungshypothese unterstützt wird. So wird vermutet, dass M-ACSL4 das Arachidonat aktiviert, welches dann durch die Acyltransferase MBOAT-7 in räumlicher Nähe zur Reacylierung von Phosphatidylinositol verwendet werden kann.

Der Effekt der erhöhten Phosphatidylinositolanteile in M-ACSL4 überexprimierenden Zellen gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit für drei von vier getesteten Bedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 18, Abbildung 21, Abbildung 22). Bei Inkubation der Zellen mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat für 15 min war der Lokalisierungseffekt verbunden mit einem erhöhten Anteil an markiertem Phosphatidylinositol innerhalb der Zellen (Abbildung 18). Normierung der intrazellulären Phosphatidylinositolanteile auf das relative Maß der Expression von M-ACSL4 und Mito-ACSL4 zeigte eindeutig die in M-ACSL4 überexprimierenden Zellen um mehr als 30 % erhöhten Phosphatidylinositolanteile gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen (Abbildung 19).

Für diese Bedingungen wurde zusätzlich nachgewiesen, dass der Phosphatidylinositolanteil der Zellen sowohl von der Lokalisierung als auch von der Aktivität und somit der Expressionshöhe der Acyl-CoA-Synthetasen abhängig war. Die Steigerungen der Phosphatidylinositolanteile nach Überexpression beider membrangebundenen ACSL4-Proteine gegenüber Kontrollzellen verhielten sich proportional zu den hervorgerufenen Aktivitätssteigerungen. Weiterhin bildeten die M-ACSL4 überexprimierenden Zellen bei gleicher Aktivitätssteigerung einen größeren Anteil an zusätzlichem Phosphatidylinositol (Abbildung 19). Der erhöhte Anteil an Phosphatidylinositol nach M-ACSL4 Expression kann somit durch eine höhere Expression des Mito-ACSL4 ausgeglichen werden (Abbildung 32).

Obwohl nach einer Inkubation der Zellen über 3 h mit 10 µM und 200 µM Arachidonat keine vermehrte Synthese von markiertem Phosphatidylinositol gegenüber den Kontrollzellen nachgewiesen werden konnte, blieb der Unterschied in den relativen Anteilen an Phosphatidylinositol zwischen M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen bestehen (Abbildung 21, Abbildung 22). Dies lässt vermuten, dass das gebildete Phosphatidylinositol neben der Speicherung zusätzlich aktivierten Arachidonats, welche sich durch einen um ca. 50 % erhöhten Anteil an markiertem Phosphatidylinositol auszeichnete, eine weitere Bedeutung haben könnte.

Unter Berücksichtigung der gewebespezifischen Verteilung fällt auf, dass das M-ACSL4, welches in neuronalem Gewebe exprimiert wird (Piccini *et al.*, 1998), gegenüber der Mutante Mito-ACSL4 vermehrt Phosphatidylinositol bildet. Im Gehirn stellt Phosphatidylinositol einen Anteil von etwa 10 % der Membranlipide (Christies, 2011) und wird für wichtige Prozesse wie die Membranfusion und somit die Freisetzung von Neurotransmittern benötigt ohne die keine Gehirntätigkeit denkbar wäre. Phosphatidylinositol und dessen Phosphate werden in diesem Zusammenhang für die Bindung von Proteinen an die Membran benötigt, welche die Exozytose von synaptischen Vesikeln vermitteln (Chung *et al.*, 1998; Bai und Chapman, 2004). Ebenso wurde eine Bedeutung für Arachidonat, welches durch die Aktivität der Phospholipase A2 aus Phosphatidylinositol freigesetzt werden kann, sowie von ACSL4 in der Fusion von Membranvesikeln erst kürzlich beschrieben (Zhang *et al.*, 2011). So wird vermutet, dass Arachidonat für die Assemblierung des SNARE-Komplexes und für die Acylierung von Phosphatidsäure benötigt wird, welche beide die Fusion biologischer Membranen induzieren und vermitteln, falls Arachidonat durch ACSL4 aktiviert werden kann (Zhang *et al.*, 2011).

Zusätzlich zu dem Lokalisierungseffekt des Phosphatidylinositols konnte bei Inkubation der Zellen mit 10 µM und 200 µM Arachidonat über 15 min ein Effekt in den zellulären, markierten Anteilen des Diacylglycerins und der Cholesterinester gezeigt werden. So enthielten die Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen einen signifikant höheren Anteil an Cholesterinestern und einen verminderten Anteil an Diacylglycerin gegenüber den M-ACSL4 überexprimierenden Zellen. Acylglycerinphosphat-Acyltransferasen (AGPAT) acylieren die Lysophosphatidsäure zu Phosphatidsäure, welche dann zu Diacylglycerin umgesetzt wird. Die humane AGPAT-2 besitzt eine Substratspezifität für Arachidonat und wird auf dem Endoplasmatischen Retikulum exprimiert (Coleman und Lee, 2004), wodurch eine vermehrte Diacylglycerinsynthese nach Überexpression des M-ACSL4 begründet werden könnte. Die Synthese von Cholesterinestern, also die Acylierung von Cholesterin, wird durch die Acyl-CoA:Cholesterin-Acyltransferase (ACAT) katalysiert. Die erhöhte Aktivität der ACAT in der Mitochondrien-assoziierten Membran (Rusinol *et al.*, 1994) könnte die in Mito-ACSL4 gegenüber M-ACSL4 überexprimierenden Zellen erhöhte Synthese von Cholesterinestern erklären. Mitochondrien-assoziierte Membranen sind Domänen des Endoplasmatischen Retikulums, welche mit den Mitochondrien in direkter Verbindung stehen und mit diesen kosedimentieren (Rusinol *et al.*, 1994). Ihre Funktion ist der Austausch von Ionen oder Lipiden zwischen dem Endoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien. Somit könnte die Überexpression von Mito-ACSL4 Arachidonat aktivieren und dieses für die Acylierung des Cholesterins zu Cholesterinestern durch die ACAT in räumlicher Nähe auf den Mitochondrien-assoziierten Membranen zur Verfügung stellen.

5.6 Schlussfolgerung

Durch die Überexpression der Acyl-CoA-Synthetasen konnten Unterschiede im Lipidmetabolimus nachgewiesen werden, welche von der untersuchten Fettsäure, von der Art der sie aktivierenden Acyl-CoA-Synthetase sowie von der subzellulären Lokalisierung der aktivierenden Acyl-CoA-Synthetase abhängig waren. So bedingte die Überexpression von FATP4 eine vermehrte Bildung von Triacylglycerin aus Oleat, während alle überexprimierten ACSL4-Proteine eine vermehrte Umsetzung von Arachidonat zu Phospholipiden, besonders Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol, verursachten.

Aus diesen Ergebnissen einen Zusammenhang mit der Lokalisierung der Acyl-CoA-Synthetasen herzustellen scheint nicht nahe liegend, da sowohl die Synthese von Neutrallipiden als auch die Synthese von Phospholipiden im Endoplasmatischen Retikulum stattfindet. Denkbar wäre die Synthese beider Lipidklassen in unterschiedlichen Subdomänen des Endoplasmatischen Retikulums, wie dem rauen und dem glatten ER oder der Mitochondrien-assoziierten Membran. Da die Überexpression der Acyl-CoA-Synthetasen nicht alle Stoffwechselwege gleichermaßen beeinflusste wird vermutet, dass auch für diese Subdomänen getrennte Acyl-CoA-Pools vorliegen könnten.

Die Annahme, dass hauptsächlich auf den Mitochondrien aktivierte Fettsäuren in die Fettsäureoxidation kanalisiert werden, konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da neben Zellen, welche Mito-ACSL4 überexprimierten, auch solche, die M-ACSL4 überexprimierten, die Arachidonatoxidation steigern konnten. Dennoch hatte die Lokalisierung dieser membrangebundenen Acyl-CoA-Synthetasen einen Einfluss auf den Metabolismus der ^{14}C-Fettsäuren. Dies war anhand der unterschiedlichen markierten Phosphatidylinositolanteile, wie auch der markierten Diacylglycerin- und Cholesterinesteranteile in M-ACSL4 überexprimierenden Zellen gegenüber Mito-ACSL4 überexprimierenden Zellen zu erkennen. In der Literatur werden unterschiedliche Effekte derselben Acyl-CoA-Synthetase in verschiedenen Geweben und in Abhängigkeit von deren Überexpression oder Depletion beschrieben (Li *et al.*, 2006; Parkes *et al.*, 2006; Ellis *et al.*, 2010; Ellis *et al.*, 2011). Jedoch betrachten diese Studien jeweils nur die Auswirkungen der Überexpression oder Depletion einer Acyl-CoA-Synthetase auf den Lipidstoffwechsel im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. In dieser Arbeit wurde neben den metabolischen Veränderungen nach Überexpression der Acyl-CoA-Synthetasen FATP4 und ACSL4 zusätzlich ein Einfluss der *unterschiedlichen* Lokalisierung *derselben* Acyl-CoA-Synthetase, ACSL4, auf den Lipidstoffwechsel gezeigt.

Somit scheint die Kanalisierung der Fettsäuren gewebespezifisch zu sein und von mehreren Faktoren beeinflusst zu werden. Neben der Fettsäure sind dies die Art der sie aktivierenden Acyl-CoA-Synthetase sowie deren Lokalisierung.

Generell muss verdeutlicht werden, dass die anhand von Dünnschichtchromatographie gezeigten Effekten sich nur auf den Stoffwechsel der verwendeten radioaktiven Fettsäuren und des Acetats beziehen. Die nicht markierten Lipide innerhalb der Zelle wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Außerdem wurden die Zellen ausschließlich mit einer Fettsäure inkubiert, welches nicht der natürlichen Lipidzusammensetzung der Nahrung entspricht.

5.7 Ausblick

Ein Einfluss der Lokalisierung der verschiedenen ACSL4-Proteine auf den zellulären Lipidstoffwechsel der ^{14}C-Fettsäuren wurde in dieser Arbeit gezeigt. Um die Existenz von Lokalisierungseffekten zusätzlich zu bestätigen, sollten in Zukunft weitere Acyl-CoA-Synthetasen untersucht werden, bei denen *dasselbe* Enzym auf *verschiedenen* Membransystemen exprimiert wird. Für die Untersuchung von FATP4 wurde diesbezüglich bereits eine mitochondrielle Mutante kloniert und stabile Zelllinien erzeugt, in denen FATP4 auf den Mitochondrien beziehungsweise auf dem Endoplasmatischen Retikulum exprimiert wird. Da beide FATP4-Proteine als GFP-Fusionsproteine vorliegen, kann die Expression der beiden Zelllinien am Durchflusszytometer angeglichen werden, da die erzeugten stabilen Zellen zunächst beide Proteine unterschiedlich stark exprimieren. Zudem ist das GFP-Protein hilfreich bei mikroskopiebasierten Methoden. Neben mitochondriellen Mutanten von Acyl-CoA-Synthetasen ist auch die Untersuchung der Acyl-CoA-Synthetase ACSL1 sinnvoll, welche nativ auf den Mitochondrien exprimiert wird (Milger *et al.*, 2006). Für dieses Protein wurde in der Arbeitsgruppe eine ACSL1-Mutante erzeugt, welche eine Lokalisierung auf dem Endoplasmatischen Retikulum zeigt, so dass ACSL1-Plasmide für die Expression auf beiden Membransystemen, Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum, vorliegen.

Um die Fettsäureoxidation genauer untersuchen zu können, sollten Zelllinien gewählt werden, die mehr Fettsäureoxidation betreiben als COS-Zellen, wie beispielsweise Leberzellen. Versuche die Fettsäureoxidation nach Überexpression der ACSL4-Proteine in HepG2 oder Huh7 zu messen scheiterten, da durch eine transiente Transfektion keine für biochemische Versuche ausreichend hohe Transfektionsrate erzielt werden konnte, so dass stabile Zelllinien generiert werden sollten. Ergänzend zur Quantifizierung der säurelöslichen Metabolite könnten die Acyl-Carnitine innerhalb der Zelle durch Massenspektrometrie bestimmt werden, welche sich eignen um die Fettsäureoxidation zu messen und mittlerweile routinemäßig zur Diagnose von Fettstoffwechselerkrankungen bestimmt werden. Aufgrund der einzusetzenden Zellmenge sind für diese Methodik ebenfalls stabile Zelllinien zu bevorzugen.

In der Kanalisierungshypothese wird davon ausgegangen, dass getrennte Acyl-CoA Pools an den verschiedenen Organellen vorliegen, welche den Acyl-CoA verbrauchenden Enzymen auf dem jeweiligen Membransystem aktivierte Fettsäuren zur Verfügung stellen. Vorraussetzung für eine erfolgreiche Kanalisierung der aktivierten Fettsäuren ist somit, dass die Acyl-CoAs nach ihrer Aktivierung an den Membranen assoziiert werden und nicht frei im Cytosol diffundieren können. Diese Acyl-CoA-Pools könnten im Anschluss an eine subzelluläre Fraktionierung und der Extraktion von Acyl-CoA mittels Dünnschicht-chromatographie oder Massenspektrometrie untersucht werden um zu überprüfen, ob sich eine erhöhte Acyl-CoA-Synthetase Aktivität in Form von erhöhten Acyl-CoA Konzentrationen an den entsprechenden Organellen auswirkt. Für die Durchführung der Dünnschichtchromatographie müssten die Zellen zuvor mit ^{14}C-Fettsäuren, wie in dieser Arbeit beschrieben, markiert werden. Für die Massenspekrometrie empfiehlt sich die Verwendung von stabilen Kohlenstoffisotopen (Melton *et al.*, 2011).

Nachdem die Kanalisierung von Fettsäuren durch unterschiedlich lokalisierte Acyl-CoA-Synthetasen für verschiedene Proteine nachgewiesen worden ist, folgt die Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus. Bezüglich des Endoplasmatischen Retikulums wird die Existenz von spezialisierten Subdomänen für die Synthese verschiedener Lipide vermutet. Zunächst könnte durch Immunoelektronenmikoskopie überprüft werden, ob ACSL4, welches die Synthese von Phospholipiden fördert, und FATP4, welches Fettsäuren für die Synthese von Triacylglycerin aktiviert, in unterschiedlichen Mikrodomänen des Endoplasmatischen Retikulums exprimiert werden. Neben unterschiedlichen Subdomänen wird die Beteiligung von Protein-Protein-Interaktionen oder Multienzymkomplexen an der Fettsäurekanalisierung vermutet (Digel *et al.*, 2009). Diese könnten über Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden, wie dies für FATP1 und die mitochondriale 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in Adipocyten und für FATP1 und die Carnitin-Palmitoyltransferase 1 in Myotuben bereits gezeigt werden konnte (Sebastian *et al.*, 2009; Wiczer und Bernlohr, 2009). Sollten keine direkten Kontakte zwischen zwei Proteinen bestehen, jedoch einen räumliche Nähe vorliegen, könnte dieses mittels Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (FRET) nachgewiesen werden.

Die Erforschung der Acyl-CoA-Synthetasen sowie aller weiteren Enzyme des Lipidmetabolismus ist die Grundvoraussetzung um Wege zu finden, Erkrankungen des Lipidstoffwechels in Zukunft erfolgreich therapieren zu können.

6. Anhang

6.1 Ergänzende Abbildungen

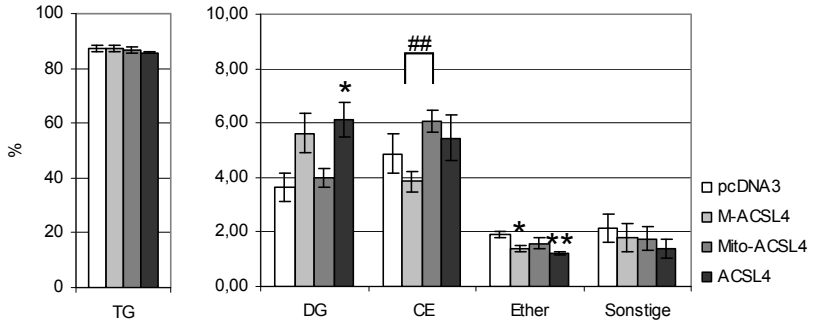

Abbildung 27: Mito-ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Synthese von Cholesterinestern gegenüber Überexpression von M-ACSL4.
Die Zellen wurden für 15 min mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte ausschließlich anhand der Dünnschichtchromatographie des N-Mixes. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Summe der Neutrallipide gleich 100 %. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=5, ACSL4: n=4. Gezeigt ist der SEM. *: p<0,05 und **: p<0,01 gegen pcDNA3; ##: p<0,01 M-ACSL4 gegen Mito-ACSL4. Ergänzung zu Abbildung 18.

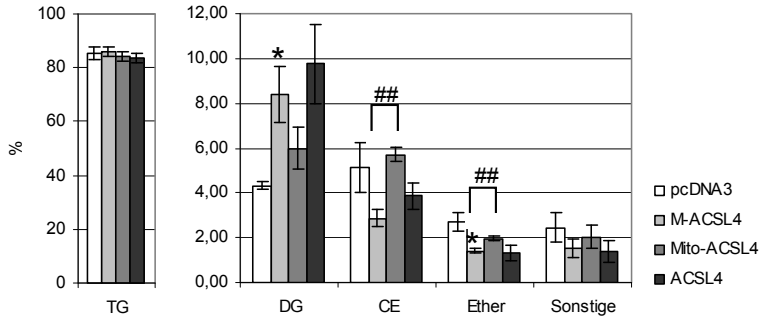

Abbildung 28: Mito-ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Synthese von Cholesterinestern gegenüber Überexpression von M-ACSL4.
Die Zellen wurden für 15 min mit 200 µM Arachidonat, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt war, inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte ausschließlich anhand der Dünnschichtchromatographie des N-Mixes. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Summe der Neutrallipide gleich 100 %. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=4, ACSL4: n=3. Gezeigt ist der SEM. *: p<0,05 gegen pcDNA3; #: p<0,05 und ##: p<0,01 von M-ACSL4 gegen Mito-ACSL4. Ergänzung zu Abbildung 20.

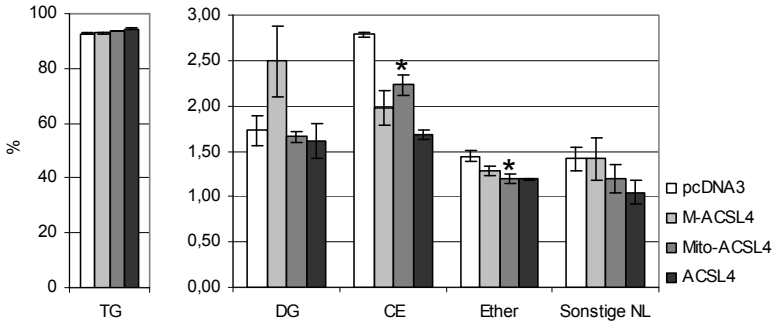

Abbildung 29: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der relativen Anteile der Cholesterinester.

Die Zellen wurden für 3 h mit 10 µM ^{14}C-Arachidonat inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte ausschließlich anhand der Dünnschichtchromatographie des N-Mixes. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Summe der Neutrallipide gleich 100 %. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. *: p<0,05 gegen pcDNA3. Ergänzung zu Abbildung 21.

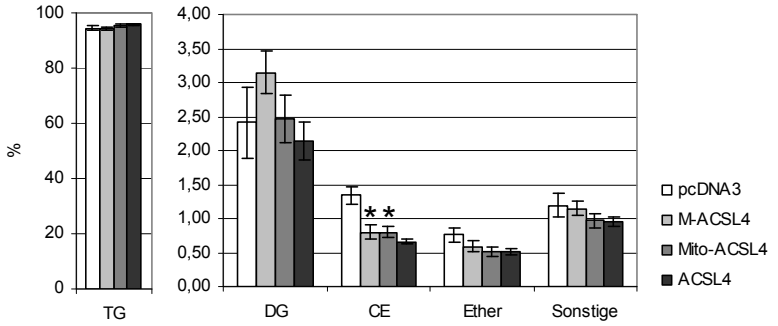

Abbildung 30: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der relativen Anteile der Cholesterinester.

Die Zellen wurden für 3 h mit 200 µM Arachidonat, welchem anteilig ^{14}C-Arachidonat zugefügt war, inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte ausschließlich anhand der Dünnschichtchromatographie des N-Mixes. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Summe der Neutrallipide gleich 100 %. pcDNA3, M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=3, ACSL4: n=2. Gezeigt ist der SEM. *: p<0,05 gegen pcDNA3. Ergänzung zu Abbildung 22.

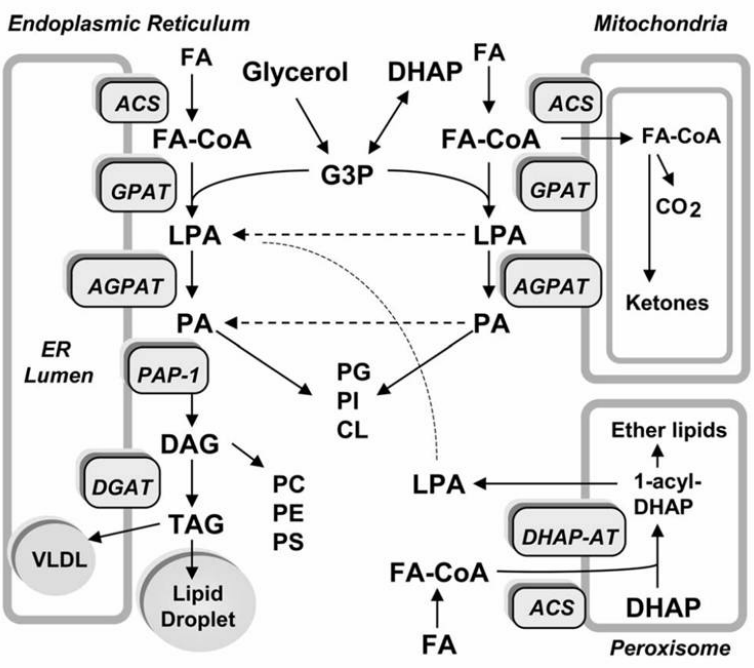

Abbildung 31: Übersicht über die Glycerolipidbiosynthese unter Berücksichtigung der verschiedenen Membransysteme.

Die Fettsäuren (FA) werden durch die Aktivität der Acyl-CoA-Synthetasen (ACS) zu Acyl-CoA (FA-CoA) aktiviert. Die Glycerinphosphat-Acyltransferasen (GPAT) transferieren die aktivierte Fettsäure auf Glycerin-3-Phosphat (G3P), welches aus Glycerin und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gebildet wird, unter Synthese von Lysophosphatidsäure (LPA). Diese wird durch die Acylglycerinphosphat-Acyltransferasen (AGPAT) zu Phosphatidsäure (PA) acyliert. Bis zu diesem Zeitpunkt findet die Lipidsynthese auf den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum statt. Aus Phosphatidsäure kann direkt Phosphatidylglycerin (PG), Phosphatidylinositol (PI) und Cardiolipin (CL) gebildet werden. Für die weitere Synthese von Triacylglycerin und bestimmten Phospholipiden muss die Phosphatidsäure der Mitochondrien zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert werden. Die Phopshatidsäure-Phosphatase (PAP-1) spaltet anschließend unter Bildung von Diacylglycerin (DAG) die Phosphatgruppe der Phosphatidsäure ab. Diacylglycerin kann für die Synthese von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS) verwendet werden oder durch die Aktivität der Diacylglycerin-Acyltransferasen (DGAT) zu Triacylglycerin (TAG) acyliert werden. (Coleman und Lee, 2004).

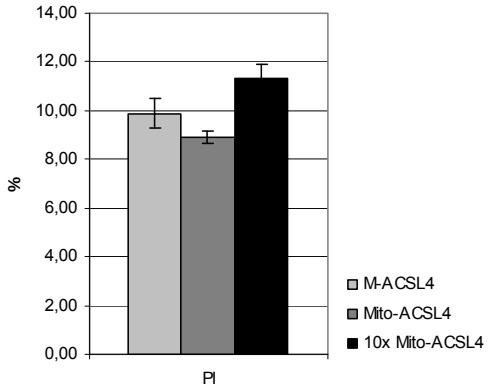

Abbildung 32: Eine höhere Expression von Mito-ACSL4 erhöht den Einbau von Arachidonat in Phosphatidylinositol.

Neben den in Tabelle 1 angegebenen DNA-Mengen wurde für Mito-ACSL4 zusätzlich die 10-fache DNA-Menge (2 µg) transfiziert. Die Zellen wurden für 15 min mit 10 µM Arachidonat inkubiert, anschließend die Lipide extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mittels *Phosphorimaging*, die Quantifizierung mittels AIDA. Gezeigt ist der prozentuale Anteil des Phosphatidylinositols an den Gesamtlipiden, ohne freies Arachidonat, innerhalb einer Spur. M-ACSL4 und Mito-ACSL4: n=7, 10x Mito-ACSL4: n=3. Gezeigt ist der SEM.

6.2 Tabellen

Tabellen zu gezeigten Abbildungen

Tabelle 2: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der Triacylglycerinanteile und einer Zunahme der Anteile an Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol.
Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 µM Arachidonat inkubiert. Werte zu Abbildung 18.

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=7)		(n=7)		(n=7)		(n=4)	
NL	68,18	0,74	64,08	1,84	63,01	0,47	56,30	2,13
PL	31,82	0,74	35,92	1,84	36,99	0,47	43,70	2,13
Phospholipide	(n=7)		(n=7)		(n=7)		(n=4)	
PC	18,97	0,73	20,51	0,66	21,80	0,47	26,38	1,38
PI	6,65	0,31	9,89	0,62	8,89	0,25	10,49	0,45
PE	2,91	0,11	2,40	0,13	2,78	0,12	3,11	0,18
PS	1,94	0,12	1,69	0,13	1,98	0,18	2,08	0,23
Sonstige PL	1,35	0,49	1,42	0,56	1,53	0,60	1,65	0,53
Neutrallipide	(n=5)		(n=5)		(n=5)		(n=4)	
TG	59,63	0,76	55,96	0,64	54,57	0,62	48,30	0,29
DG	2,48	0,34	3,60	0,45	2,53	0,22	3,45	0,37
CE	3,33	0,51	2,48	0,24	3,83	0,25	3,07	0,46
Ether	1,29	0,08	0,89	0,08	0,99	0,13	0,69	0,03
Sonstige NL	1,45	0,36	1,15	0,34	1,10	0,27	0,78	0,20

Tabelle 3: Aufgrund von Überexpression der ACSL4-Proteine vermehrt aufgenommenes Arachidonat wird zu Phospholipiden umgesetzt.
Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 200 µM Arachidonat inkubiert. Werte zu Abbildung 20.

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=6)		(n=6)		(n=6)		(n=3)	
NL	66,21	1,73	60,01	1,97	56,31	2,47	54,97	1,82
PL	33,79	1,73	39,99	1,97	43,69	2,47	45,03	1,82
Phospholipide	(n=6)		(n=6)		(n=6)		(n=3)	
PC	20,11	1,40	23,90	1,42	26,09	1,75	27,51	0,75
PI	6,85	0,56	10,16	0,30	10,38	0,59	10,02	0,54
PE	3,05	0,33	2,30	0,13	2,82	0,26	2,54	0,20
PS	2,10	0,26	1,91	0,15	2,27	0,20	2,35	0,19
Sonstige PL	1,68	0,56	1,72	0,63	2,13	0,77	2,61	0,95
Neutrallipide	(n=4)		(n=4)		(n=4)		(n=3)	
TG	56,52	1,40	51,47	1,02	47,47	0,91	46,01	0,97
DG	2,87	0,12	5,04	0,74	3,38	0,53	5,36	0,97
CE	3,41	0,73	1,73	0,24	3,21	0,17	2,12	0,32
Ether	1,79	0,26	0,85	0,05	1,11	0,05	0,72	0,19
Sonstige NL	1,62	0,42	0,93	0,26	1,15	0,30	0,76	0,26

Tabelle 4: Bei längerer Inkubation wird die ACSL4-bedingte Umsetzung von Arachidonat in die Phospholipide aufgehoben.
Die Zellen wurden für 3 Stunden mit 10 µM Arachidonat inkubiert. Werte zu Abbildung 21.

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
NL	73,74	4,22	74,31	5,39	74,87	4,49	71,76	10,40
PL	26,26	4,22	25,69	5,39	25,13	4,49	28,24	10,40
Phospholipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
PC	15,82	3,20	14,24	3,59	15,61	3,38	18,30	7,51
PI	4,04	0,53	6,14	1,07	3,94	0,73	4,29	1,24
PE	2,87	0,34	2,17	0,32	2,50	0,31	2,42	0,48
PS	1,83	0,27	1,48	0,26	1,50	0,24	1,75	0,62
Sonstige PL	1,71	0,50	1,66	0,42	1,58	0,35	1,47	0,56
Neutrallipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
TG	68,30	0,16	68,99	0,34	70,17	0,17	67,80	0,28
DG	1,27	0,12	1,85	0,29	1,24	0,05	1,16	0,13
CE	2,06	0,02	1,47	0,14	1,67	0,09	1,20	0,04
Ether	1,07	0,04	0,95	0,04	0,90	0,04	0,85	0,01
Sonstige NL	1,04	0,09	1,05	0,18	0,90	0,12	0,75	0,09

Tabelle 5: Bei längerer Inkubation mit Arachidonat bleibt der Lokalisierungseffekt für Phosphatidylinositol erhalten.
Die Zellen wurden für 3 Stunden mit 200 µM Arachidonat inkubiert. Werte zu Abbildung 22.

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
NL	74,33	3,35	75,21	2,58	76,62	2,12	77,75	2,86
PL	25,67	3,35	24,79	2,58	23,38	2,12	22,25	2,86
Phospholipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
PC	17,67	2,59	17,45	2,26	17,09	1,80	16,02	2,94
PI	2,47	0,24	3,11	0,12	2,03	0,03	2,06	0,18
PE	1,90	0,14	1,22	0,02	1,33	0,02	1,27	0,09
PS	1,35	0,23	1,07	0,06	1,00	0,14	1,01	0,05
Sonstige PL	2,27	0,62	1,94	0,25	1,93	0,36	1,90	0,40
Neutrallipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
TG	70,09	0,64	70,94	0,27	72,99	0,46	74,44	0,33
DG	1,79	0,39	2,36	0,23	1,89	0,27	1,66	0,22
CE	1,00	0,09	0,60	0,07	0,61	0,06	0,51	0,03
Ether	0,56	0,07	0,44	0,06	0,40	0,05	0,40	0,04
Sonstige NL	0,89	0,13	0,86	0,08	0,74	0,08	0,74	0,05

Tabelle 6: Durch die ACSL4-Proteine aktiviertes Oleat wird in Phosphatidylinositol anstelle von Triacylglycerin umgesetzt.
Die Zellen wurden für 15 Minuten mit 10 µM Oleat inkubiert. Werte zu Abbildung 23.

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=3)	
NL	42,54	2,07	34,13	1,10	31,92	1,82	26,38	2,39
PL	57,46	2,07	65,87	1,10	68,08	1,82	73,62	2,39
Phospholipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=3)	
PC	38,63	2,34	38,82	1,66	38,91	1,82	37,91	1,88
PI	8,55	0,33	14,53	0,73	15,35	1,10	19,25	1,08
PE	4,82	0,51	5,81	0,52	6,93	0,68	8,20	0,30
PS	2,72	0,01	3,49	0,33	3,65	0,35	4,70	0,52
Sonstige PL	2,75	0,53	3,22	1,14	3,23	0,55	3,56	0,69
Neutrallipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=3)	
TG	33,55	1,12	25,11	0,92	21,62	1,42	15,61	0,80
DG	2,73	0,57	2,95	0,93	3,41	0,67	3,78	0,40
CE	2,52	0,65	2,52	0,28	3,72	0,69	4,01	0,46
Ether	0,90	0,15	0,84	0,11	0,90	0,11	1,07	0,26
Sonstige NL	2,84	0,25	2,71	0,30	2,27	0,21	1,92	0,14

Tabelle 7: ACSL4-Überexpression beeinflusst den Metabolismus von Acetat und *de novo* synthetisierten Fettsäuren nicht langfristig.
Die Zellen wurden für 3 Stunden mit 100 µM Acetat inkubiert. Werte zu Abbildung 24**.**

Anteil pro Spur (%)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
NL	53,42	2,24	57,28	3,83	56,56	3,40	50,30	1,36
PL	46,58	2,24	42,72	3,83	43,44	3,40	49,70	1,36
Phospholipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
PC	24,13	1,52	19,78	2,05	21,91	3,54	28,58	1,72
PI	3,79	0,28	4,32	0,76	3,93	0,10	4,24	0,62
PE	5,40	0,80	5,33	0,76	4,36	0,25	3,96	0,13
PS	4,22	0,23	4,12	0,28	3,81	0,12	3,51	0,09
SM	4,03	0,37	3,93	0,64	3,89	0,54	4,91	0,02
Sonstige PL	5,02	0,41	5,24	0,21	5,55	0,94	4,50	0,07
Neutrallipide	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=2)	
TG	14,82	1,50	15,10	1,60	12,73	1,02	11,19	0,47
DG	12,31	0,56	14,29	1,23	16,19	1,57	12,97	0,36
CH	15,05	0,99	15,91	0,64	16,70	0,33	15,75	0,34
MG	3,88	0,28	3,65	0,09	3,49	0,09	3,51	0,34
CE	2,76	0,15	2,66	0,33	2,34	0,55	2,06	0,05
Ether	0,72	0,15	0,83	0,21	0,70	0,19	0,68	0,07
Sonstige NL	3,88	0,56	4,84	0,59	4,41	0,12	4,15	0,23

Tabelle 8: M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen oxidieren vermehrt Arachidonat während ACSL4 keine erhöhte Fettsäureoxidation zeigt.
Die Zellen wurden für 6 Stunden mit 200 µM Fettsäure inkubiert Werte zu Abbildung 25.

Arachidonat-Oxidation (n=3)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
Aufnahme (pmol AA / µg Protein)	154,62	14,43	193,60	16,03	176,41	17,40	157,45	13,37
Oxidation (pmol AA / µg Protein)	8,58	0,93	16,97	2,59	13,69	2,55	9,62	2,40
Anteil oxidiertes AA (%)	5,73	1,03	9,08	1,93	8,04	1,81	6,03	1,14
Anteil oxidiertes AA normiert (%)	100,00	17,92	158,63	33,76	140,39	31,67	105,28	19,98
Oleat-Oxidation (n=3)	**pcDNA3**		**M-ACSL4**		**Mito-ACSL4**		**ACSL4**	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
Aufnahme (pmol OA / µg Protein)	168,65	7,68	202,26	4,44	177,24	7,07	171,00	7,84
Oxidation (pmol OA / µg Protein)	2,61	0,47	3,71	0,49	3,01	0,19	2,84	0,15
Anteil oxidiertes OA (%)	1,54	0,24	1,82	0,20	1,70	0,13	1,66	0,01
Anteil oxidiertes OA normiert (%)	100,00	15,53	118,43	13,04	110,46	8,51	107,82	0,89

Tabelle 9: Die zugefügten Fettsäuren sowie das Acetat werden unterschiedlich verstoffwechselt.
Die Zellen wurden für 3 h mit 200 µM Fettsäure bzw. 100 µM Acetat inkubiert. Werte zu Abbildung 26.

Anteil pro Spur (%)	Arachidonat	Oleat	Behenat	Acetat
	Abbildung 22 Tabelle 5	Tabelle 12	Tabelle 13	Abbildung 5 Tabelle 7
	(n=3)	(n=1)	(n=1)	(n=3)
NL	74,33	68,29	68,02	53,42
PL	25,67	31,71	31,98	46,58
Phospholipide				
PC	17,67	25,03	4,41	24,13
PI	2,47	1,97	5,56	3,79
PE	1,90	2,17	8,87	5,40
PS	1,35	1,16	9,52	4,22
SM			2,82	4,03
Sonstige PL	2,27	1,38	0,79	5,02
Neutrallipide				
TG	70,09	65,11	4,14	14,82
DG	1,79	0,42	38,33	12,31
MG			3,99	3,88
CH				15,05
CE	1,00	1,36		2,76
Sonstige NL	1,45	1,39	21,56	4,61

Tabellen ohne Abbildungen

Tabelle 10: Markierung mit 10 µM Oleat für 3 Stunden.

Anteil pro Spur (%)	pcDNA3		M-ACSL4		Mito-ACSL4		ACSL4	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
NL	63,09		61,88		60,41		62,26	
PL	36,91		38,12		39,59		37,74	
Phospholipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
PC	25,93		26,68		27,61		27,10	
PI	2,21		3,60		2,69		2,32	
PE	3,81		3,65		4,19		4,03	
PS	2,20		2,28		2,24		2,07	
Sonstige PL	2,75		1,90		2,86		2,21	
Neutrallipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
TG	57,45		55,80		54,86		57,29	
DG	1,24		2,15		1,41		1,52	
CE	2,45		1,97		2,25		1,80	
Ether	1,54		1,61		1,53		1,24	
Sonstige NL	0,41		0,35		0,37		0,42	

Tabelle 11: Markierung mit 200 µM Oleat für 15 Minuten.

Anteil pro Spur (%)	pcDNA3		M-ACSL4		Mito-ACSL4		ACSL4	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=2)		(n=2)		(n=2)		(n=2)	
NL	57,50	6,32	50,33	5,58	44,14	8,19	36,94	7,02
PL	42,50	6,32	49,67	5,58	55,86	8,19	63,06	7,02
Phospholipide	(n=2)		(n=2)		(n=2)		(n=2)	
PC	27,82	4,58	29,16	3,94	32,45	4,65	32,85	3,81
PI	6,26	0,19	10,28	0,03	11,50	1,94	15,73	2,37
PE	3,98	0,11	4,96	0,12	5,78	0,45	7,22	0,55
PS	1,93	0,24	2,56	0,47	2,96	0,45	4,02	0,29
Sonstige PL	2,52	1,19	2,70	1,26	3,17	1,60	3,24	1,09
Neutrallipide	(n=2)		(n=2)		(n=2)		(n=2)	
TG	42,42	0,57	32,71	1,78	25,63	1,30	19,82	2,95
DG	3,81	0,74	3,05	0,02	3,06	0,36	2,79	0,64
CE	2,55	0,37	3,54	0,77	4,38	0,37	5,32	0,34
Ether	1,32	0,22	1,19	0,21	1,23	0,23	1,34	0,39
Sonstige NL	7,40	1,16	9,84	1,24	9,84	0,80	7,67	2,35

Tabelle 12: Markierung mit 200 µM Oleat für 3 Stunden.

Anteil pro Spur (%)	pcDNA3		M-ACSL4		Mito-ACSL4		ACSL4	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
NL	68,29		70,91		65,98		65,63	
PL	31,71		29,09		34,02		34,37	
Phospholipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
PC	25,03		22,94		27,43		27,78	
PI	1,97		2,54		2,08		1,92	
PE	2,17		1,63		2,02		2,07	
PS	1,16		1,06		1,15		1,27	
Sonstige PL	1,38		0,92		1,33		1,32	
Neutrallipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
TG	65,11		67,83		63,15		63,11	
DG	0,42		0,94		0,56		0,59	
CE	1,36		0,89		1,12		0,89	
Ether	1,01		0,92		0,83		0,75	
Sonstige NL	0,38		0,32		0,32		0,28	

Tabelle 13: Markierung mit 200 µM Behenat für 3 Stunden.

Anteil pro Spur (%)	pcDNA3		M-ACSL4		Mito-ACSL4		ACSL4	
	MW	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**	**MW**	**SEM**
	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
NL	68,02		69,02		67,14		66,23	68,02
PL	31,98		30,98		32,86		33,77	31,98
Phospholipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
PC	4,41		3,66		4,48		4,38	
PI	5,56		5,92		5,73		6,48	
PE	8,87		9,98		9,58		11,40	
PS	9,52		8,22		9,17		7,71	
SM	2,82		2,45		3,08		2,95	
Sonstige PL	0,79		0,75		0,82		0,86	
Neutrallipide	(n=1)		(n=1)		(n=1)		(n=1)	
TG	4,14		3,52		3,40		2,13	
DG	38,33		39,50		37,71		36,89	
MG	3,99		3,73		4,09		3,87	
Ether	1,88		1,54		1,41		1,40	
Sonstige NL	19,69		20,73		20,54		21,94	

6.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsgleichung der durch Acyl-CoA-Synthetasen katalysierten Reaktion. 7

Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der bakteriellen Acyl-CoA-Synthetase FACS. 8

Abbildung 3: Hypothese über die Kanalisierung von Fettsäuren durch Acyl-CoA-Synthetasen. 16

Abbildung 4: Identifizierung des Phosphatidylinositols im A-Mix. 59

Abbildung 5: Charakterisierung der stabilen FATP4.C2C12-Zelllinie. 67

Abbildung 6: Schnelle Metabolisierung von ^{14}C-Oleat zu Phosphatidylcholin und Triacylglycerin. 68

Abbildung 7: Bei langfristiger Oleatinkubation wird dieses vermehrt zu Triacylglycerin umgesetzt. 69

Abbildung 8: Charakterisierung der stabilen FATP4.HEK293-Zelllinie. 71

Abbildung 9: Zusätzlich aufgenommenes Oleat wird zu Triacylglycerin umgesetzt. 73

Abbildung 10: Schematische Darstellung der verwendeten ACSL4-Konstrukte. 74

Abbildung 11: Gleiche Expressionshöhe der verschiedenen ACSL4-Proteine in COS-Zellen. 75

Abbildung 12: ACSL4 lokalisiert in der Plasmamembran. 77

Abbildung 13: M-ACSL4 lokalisiert im ER und auf Lipidtröpfchen. 78

Abbildung 14: Mito-ACSL4 lokalisiert auf Mitochondrien. 80

Abbildung 15: Alle ACSL4-Proteine zeigen eine erhöhte Enzymaktivität mit Arachidonat. 81

Abbildung 16: Die Arachidonyl-CoA-Synthetase Aktivität der verschiedenen ACSL4-Proteine ist gleich hoch und steigt proportional zu deren Expression. 82

Abbildung 17: Die Arachidonataufnahme der verschiedenen ACSL4-Proteine ist gleichermaßen erhöht und korreliert nicht mit der entsprechenden Enzymaktivität. 84

Abbildung 18: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der Triacylglycerin-anteile und einer Zunahme der Anteile an Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol. 86

Abbildung 19: Die Kanalisierung von Arachidonat zu Phosphatidylinositol in ACSL4 überexprimierenden Zellen ist abhängig von der Expression und der Lokalisierung der ACSL4-Proteine. 88

Abbildung 20: Aufgrund von Überexpression der ACSL4-Proteine vermehrt aufgenommenes Arachidonat wird zu Phospholipidenumgesetzt. 90

Abbildung 21: Bei längerer Inkubation wird die ACSL4-bedingte Umsetzung von Arachidonat in die Phospholipide aufgehoben. 93

Abbildung 22: Bei längerer Inkubation mit Arachidonat bleibt der Lokalisierungseffekt für Phosphatidylinositol erhalten. 94

Abbildung 23: Durch die ACSL4-Proteine aktiviertes Oleat wird in Phosphatidylinositol anstelle von Triacylglycerin umgesetzt. 97

Abbildung 24: ACSL4-Überexpression beeinflusst den Metabolismus *de novo* synthetisierter Fettsäuren nicht langfristig. 99

Abbildung 25: M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen oxidieren vermehrt Arachidonat während ACSL4 keine erhöhte Fettsäureoxidation zeigt. 100

Abbildung 26: Die zugefügten Fettsäuren sowie das Acetat werden unterschiedlich verstoffwechselt. 103

Abbildung 27: Mito-ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Synthese von Cholesterinestern gegenüber Überexpression von M-ACSL4. 123

Abbildung 28: Mito-ACSL4 Überexpression führt zu einer vermehrten Synthese von Cholesterinestern gegenüber Überexpression von M-ACSL4. 123

Abbildung 29: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der relativen Anteile der Cholesterinester. 124

Abbildung 30: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der relativen Anteile der Cholesterinester. 124

Abbildung 31: Übersicht über die Glycerolipidbiosynthese unter Berücksichtigung der verschiedenen Membransysteme. 125

Abbildung 32: Eine höhere Expression von Mito-ACSL4 erhöht den Einbau von Arachidonat in Phosphatidylinositol. 125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Ansätze und Zeiten zur Transfektion einer 10 cm^2-Schale von COS-Zellen. 75

Tabelle 2: Überexpression der ACSL4-Proteine führt zu einer Abnahme der Triacylglycerinanteile und einer Zunahme der Anteile an Phosphatidylcholin und Phosphatidylinositol. 126

Tabelle 3: Aufgrund von Überexpression der ACSL4-Proteine vermehrt aufgenommenes Arachidonat wird zu Phospholipiden umgesetzt. 127

Tabelle 4: Bei längerer Inkubation wird die ACSL4-bedingte Umsetzung von Arachidonat in die Phospholipide aufgehoben. 128

Tabelle 5: Bei längerer Inkubation mit Arachidonat bleibt der Lokalisierungseffekt für Phosphatidylinositol erhalten. 129

Tabelle 6: Durch die ACSL4-Proteine aktiviertes Oleat wird in Phosphatidylinositol anstelle von Triacylglycerin umgesetzt. 130

Tabelle 7: ACSL4-Überexpression beeinflusst den Metabolismus von Acetat und *de novo* synthetisierten Fettsäuren nicht langfristig. 131

Tabelle 8: M-ACSL4 und Mito-ACSL4 überexprimierende Zellen oxidieren vermehrt Arachidonat während ACSL4 keine erhöhte Fettsäureoxidation zeigt. 132

Tabelle 9: Die zugefügten Fettsäuren sowie das Acetat werden unterschiedlich verstoffwechselt. 133

Tabelle 10: Markierung mit 10 µM Oleat für 3 Stunden. 134

Tabelle 11: Markierung mit 200 µM Oleat für 15 Minuten. 135

Tabelle 12: Markierung mit 200 µM Oleat für 3 Stunden. 136

Tabelle 13: Markierung mit 200 µM Behenat für 3 Stunden. 137

6.4 Literaturverzeichnis

Abumrad N, el-Maghrabi M, Amri E, Lopez E, Grimaldi P (1993) Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36. J Biol Chem **268:** 17665-17668

Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A (1998) Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process. J Lipid Res **39:** 2309-2318

Abumrad NA, Park JH, Park CR (1984) Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. J Biol Chem **259:** 8945-8953

Allan D, Cockcroft S (1982) A modified procedure for thin-layer chromatography of phospholipids. J Lipid Res **23:** 1373-1374

Bai J, Chapman ER (2004) The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. Trends Biochem Sci **29:** 143-151

Bar-Tana J, Rose G, Brandes R, Shapiro B (1973a) Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Mechanism of reaction. Biochem J **131:** 199-209

Bar-Tana J, Rose G, Shapiro B (1973b) Palmitoyl-coenzyme A synthetase. Isolation of an enzyme-bound intermediate. Biochem J **135:** 411-416

Becker M (2007) Sortierung und subzelluläre Lokalisation der fatty acid transport proteins (FATP) und long-chain Acyl-CoA synthetases (ACSL4) Medizinische Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Berg JM, Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003) Biochemie, Ed 5. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin

Black PN, DiRusso CC (2003) Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: proteins, enzymes, and vectorial esterification. Microbiol Mol Biol Rev **67:** 454-472

Blackburn C, Guan B, Brown J, Cullis C, Condon SM, Jenkins TJ, Peluso S, Ye Y, Gimeno RE, Punreddy S, Sun Y, Wu H, Hubbard B, Kaushik V, Tummino P, Sanchetti P, Yu Sun D, Daniels T, Tozzo E, Balani SK, Raman P (2006) Identification and characterization of 4-aryl-3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones as inhibitors of the fatty acid transporter FATP4. Bioorg Med Chem Lett **16:** 3504-3509

Bonen A, Chabowski A, Luiken JJ, Glatz JF (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? Mechanisms and regulation of protein-mediated cellular fatty acid uptake: molecular, biochemical, and physiological evidence. Physiology (Bethesda) **22:** 15-29

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry **72:** 248-254

Bray GA, Tartaglia LA (2000) Medicinal strategies in the treatment of obesity. Nature **404:** 672-677

Cao Y, Murphy KJ, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000a) Expression of fatty acid-CoA ligase 4 during development and in brain. FEBS letters **467:** 263-267

Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (2000b) Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **97:** 11280-11285

Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM (1998) Cloning, Expression, and Chromosomal Localization of Human Long-Chain Fatty Acid-CoA Ligase 4 (FACL4). Genomics **49:** 327-330

Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Saffitz JE, Schaffer JE (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. J Clin Invest **107:** 813-822

Cho YY, Kang MJ, Ogawa S, Yamashita Y, Fujino T, Yamamoto TT (2000) Regulation by adrenocorticotropic hormone and arachidonate of the expression of acyl-CoA synthetase 4, an arachidonate-preferring enzyme expressed in steroidogenic tissues. Biochem Biophys Res Commun **274:** 741-745

Christies WW (2000) Lipid Analysis. Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids, Ed 3. Oily Press Lipid Library

Christies WW (2011) The Lipid Library. The American Oil Chemists' Society. http://lipidlibrary.aocs.org/

Chung SH, Song WJ, Kim K, Bednarski JJ, Chen J, Prestwich GD, Holz RW (1998) The C2 domains of Rabphilin3A specifically bind phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate containing vesicles in a Ca2+-dependent manner. In vitro characteristics and possible significance. J Biol Chem **273:** 10240-10248

Coe NR, Smith AJ, Frohnert BI, Watkins PA, Bernlohr DA (1999) The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase. J Biol Chem **274:** 36300-36304

Coleman RA, Lee DP (2004) Enzymes of triacylglycerol synthesis and their regulation. Prog Lipid Res **43:** 134-176

Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baro MR (2002) Do Long-Chain Acyl-CoA Synthetases Regulate Fatty Acid Entry into Synthetic Versus Degradative Pathways? . J. Nutr. **132:** 2123-2126

Digel M, Ehehalt R, Stremmel W, Fullekrug J (2009) Acyl-CoA synthetases: fatty acid uptake and metabolic channeling. Mol Cell Biochem **326:** 23-28

Digel M, Staffer S, Ehehalt F, Stremmel W, Ehehalt R, Fullekrug J (2011) FATP4 contributes as an enzyme to the basal and insulin-mediated fatty acid uptake of CC muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab **301:** E785-796

DiRusso CC, Black PN (2004) Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. J Biol Chem **279:** 49563-49566

Doege H, Stahl A (2006) Protein-Mediated Fatty Acid Uptake: Novel Insights from In Vivo Models. Physiology **21:** 259-268

Ducharme NA, Bickel PE (2008) Minireview: lipid droplets in lipogenesis and lipolysis. Endocrinology **149:** 942-949

Ehehalt R, Sparla R, Kulaksiz H, Herrmann T, Fullekrug J, Stremmel W (2008) Uptake of long chain fatty acids is regulated by dynamic interaction of FAT/CD36 with cholesterol/sphingolipid enriched microdomains (lipid rafts). BMC Cell Biol **9:** 45

Ellis JM, Li LO, Wu PC, Koves TR, Ilkayeva O, Stevens RD, Watkins SM, Muoio DM, Coleman RA (2010) Adipose acyl-CoA synthetase-1 directs fatty acids toward beta-oxidation and is required for cold thermogenesis. Cell Metab **12:** 53-64

Ellis JM, Mentock SM, Depetrillo MA, Koves TR, Sen S, Watkins SM, Muoio DM, Cline GW, Taegtmeyer H, Shulman GI, Willis MS, Coleman RA (2011) Mouse cardiac acyl coenzyme a synthetase 1 deficiency impairs Fatty Acid oxidation and induces cardiac hypertrophy. Mol Cell Biol **31:** 1252-1262

Fitscher BA, Riedel H-D, Young KC, Stremmel W (1998) Tissue distribution and cDNA cloning of a human fatty acid transport protein (hsFATP4). Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1443:** 381-385

Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. J Biol Chem **226:** 497-509

Forneris F, Mattevi A (2008) Enzymes without borders: mobilizing substrates, delivering products. Science **321:** 213-216

Fujimoto Y, Itabe H, Kinoshita T, Homma KJ, Onoduka J, Mori M, Yamaguchi S, Makita M, Higashi Y, Yamashita A, Takano T (2007) Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. J Lipid Res **48:** 1280-1292

Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, Higashi Y, Kojima S, Takano T (2004) Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. Biochim Biophys Acta **1644:** 47-59

Gertow K, Bellanda M, Eriksson P, Boquist S, Hamsten A, Sunnerhagen M, Fisher RM (2004a) Genetic and structural evaluation of fatty acid transport protein-4 in relation to markers of the insulin resistance syndrome. J Clin Endocrinol Metab **89:** 392-399

Gertow K, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H, Kaprio J, Rissanen A, Eriksson P, Hamsten A, Fisher RM (2004b) Expression of fatty-acid-handling proteins in human adipose tissue in relation to obesity and insulin resistance. Diabetologia **47:** 1118-1125

Gijon MA, Riekhof WR, Zarini S, Murphy RC, Voelker DR (2008) Lysophospholipid acyltransferases and arachidonate recycling in human neutrophils. J Biol Chem **283:** 30235-30245

Gimeno RE (2007) Fatty acid transport proteins. Curr Opin Lipidol **18:** 271-276

Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A (2010) Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease. Physiol Rev **90:** 367-417

Grimaldi PA (2010) Metabolic and nonmetabolic regulatory functions of peroxisome proliferator-activated receptor beta. Curr Opin Lipidol **21:** 186-191

Großmann R (2011) Lokalisation und Sortierung der Acyl-CoA Synthetasen ACSL3 und ACSL4. Medizinische Dissertation. Ruprecht-Karls Universität, Heidelberg

Hall AM, Smith AJ, Bernlohr DA (2003) Characterization of the Acyl-CoA synthetase activity of purified murine fatty acid transport protein 1. J Biol Chem **278:** 43008-43013

Hall AM, Wiczer BM, Herrmann T, Stremmel W, Bernlohr DA (2005) Enzymatic properties of purified murine fatty acid transport protein 4 and analysis of Acyl CoA synthetase activities in tissues from FATP4 null mice. J. Biol. Chem.**:** M412629200

Hamilton JA, Guo W, Kamp F (2002) Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? Mol Cell Biochem **239:** 17-23

Hatch GM, Smith AJ, Xu FY, Hall AM, Bernlohr DA (2002) FATP1 channels exogenous FA into 1,2,3-triacyl-sn-glycerol and down-regulates sphingomyelin and cholesterol metabolism in growing 293 cells. J Lipid Res **43:** 1380-1389

Heimerl S, Moehle C, Zahn A, Boettcher A, Stremmel W, Langmann T, Schmitz G (2006) Alterations in intestinal fatty acid metabolism in inflammatory bowel disease. Biochim Biophys Acta **1762:** 341-350

Herrmann T, van der Hoeven F, Grone HJ, Stewart AF, Langbein L, Kaiser I, Liebisch G, Gosch I, Buchkremer F, Drobnik W, Schmitz G, Stremmel W (2003) Mice with targeted disruption of the fatty acid transport protein 4 (Fatp 4, Slc27a4) gene show features of lethal restrictive dermopathy. J Cell Biol **161:** 1105-1115

Hirsch D, Stahl A, Lodish HF (1998) A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man. Proc Natl Acad Sci U S A **95:** 8625-8629

Holub BJ, Kuksis A, Thompson W (1970) Molecular species of mono-, di-, and triphosphoinositides of bovine brain. J Lipid Res **11:** 558-564

Igal RA, Wang P, Coleman RA (1997) Triacsin C blocks de novo synthesis of glycerolipids and cholesterol esters but not recycling of fatty acid into phospholipid: evidence for functionally separate pools of acyl-CoA. Biochem J **324 (Pt 2):** 529-534

Inoue H, Nojima H, Okayama H (1990) High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene **96:** 23-28

Jia Z, Moulson CL, Pei Z, Miner JH, Watkins PA (2007) Fatty Acid Transport Protein 4 Is the Principal Very Long Chain Fatty Acyl-CoA Synthetase in Skin Fibroblasts. J Biol Chem **282:** 20573-20583

Jump DB (2011) Fatty acid regulation of hepatic lipid metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care **14:** 115-120

Kampf JP, Kleinfeld AM (2007) Is membrane transport of FFA mediated by lipid, protein, or both? An unknown protein mediates free fatty acid transport across the adipocyte plasma membrane. Physiology (Bethesda) **22:** 7-14

Kanaji S, Iwahashi J, Kida Y, Sakaguchi M, Mihara K (2000) Characterization of the Signal that Directs Tom20 to the Mitochondrial Outer Membrane. J Cell Biol **151:** 277-288

Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto TT (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. Proc Natl Acad Sci U S A **94:** 2880-2884

Kasurinen J (1992) A novel fluorescent fatty acid, 5-methyl-BDY-3-dodecanoic acid, is a potential probe in lipid transport studies by incorporating selectively to lipid classes of BHK cells. Biochem Biophys Res Commun **187:** 1594-1601

Khnykin D, Miner JH, Jahnsen F (2011) Role of fatty acid transporters in epidermis: Implications for health and disease. Dermatoendocrinol **3:** 53-61

Kim J-H, Lewin TM, Coleman RA (2001) Expression and Characterization of Recombinant Rat Acyl-CoA Synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and Thiazolidinediones. J Biol Chem **276:** 24667-24673

Klar J, Schweiger M, Zimmerman R, Zechner R, Li H, Torma H, Vahlquist A, Bouadjar B, Dahl N, Fischer J (2009) Mutations in the fatty acid transport protein 4 gene cause the ichthyosis prematurity syndrome. Am J Hum Genet **85:** 248-253

Kochan G, Pilka ES, von Delft F, Oppermann U, Yue WW (2009) Structural snapshots for the conformation-dependent catalysis by human medium-chain acyl-coenzyme A synthetase ACSM2A. J Mol Biol **388:** 997-1008

Kornberg A, Pricer WE, Jr. (1953) Enzymatic synthesis of the coenzyme A derivatives of long chain fatty acids. J Biol Chem **204:** 329-343

Kuerschner L, Ejsing CS, Ekroos K, Shevchenko A, Anderson KI, Thiele C (2005) Polyene-lipids: a new tool to image lipids. Nat Methods **2:** 39-45

Lee HC, Inoue T, Imae R, Kono N, Shirae S, Matsuda S, Gengyo-Ando K, Mitani S, Arai H (2008) Caenorhabditis elegans mboa-7, a member of the MBOAT family, is required for selective incorporation of polyunsaturated fatty acids into phosphatidylinositol. Mol Biol Cell **19:** 1174-1184

Lehnen D (2009) Gezielte Veränderung der subzellulären Lokalisation verschiedener Acyl-CoA Synthetasen und deren Charakterisierung. Diplomarbeit. Ruprecht-Karls Universität, Heidelberg

Lewin TM, Kim J-H, Granger DA, Vance JE, Coleman RA (2001) Acyl-CoA Synthetase Isoforms 1, 4, and 5 Are Present in Different Subcellular Membranes in Rat Liver and Can Be Inhibited Independently. J Biol Chem **276:** 24674-24679

Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK, Coleman RA (2002) Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. Arch Biochem Biophys **404:** 263-270

Li LO, Ellis JM, Paich HA, Wang S, Gong N, Altshuller G, Thresher RJ, Koves TR, Watkins SM, Muoio DM, Cline GW, Shulman GI, Coleman RA (2009) Liver-specific loss of long chain acyl-CoA synthetase-1 decreases triacylglycerol synthesis and beta-oxidation and alters phospholipid fatty acid composition. J Biol Chem **284:** 27816-27826

Li LO, Mashek DG, An J, Doughman SD, Newgard CB, Coleman RA (2006) Overexpression of rat long chain acyl-CoA synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. J Biol Chem

Lobo S, Wiczer BM, Smith AJ, Hall AM, Bernlohr DA (2007) Fatty acid metabolism in adipocytes: functional analysis of fatty acid transport proteins 1 and 4. J. Lipid Res. **48:** 609-620

Longo I, Frints SG, Fryns JP, Meloni I, Pescucci C, Ariani F, Borghgraef M, Raynaud M, Marynen P, Schwartz C, Renieri A, Froyen G (2003) A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients. J Med Genet **40:** 11-17

Maloberti P, Maciel FC, Castillo AF, Castilla R, Duarte A, Toledo MF, Meuli F, Mele P, Paz C, Podesta EJ (2007) Enzymes involved in arachidonic acid release in adrenal and Leydig cells. Mol Cell Endocrinol **265-266:** 113-120

Mashek DG, Li LO, Coleman RA (2006a) Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. J Lipid Res **47:** 2004-2010

Mashek DG, Li LO, Coleman RA (2007) Long-chain acyl-CoA synthetases and fatty acid channeling. Future Lipidology **2:** 465-476

Mashek DG, McKenzie MA, Van Horn CG, Coleman RA (2006b) Rat Long Chain Acyl-CoA Synthetase 5 Increases Fatty Acid Uptake and Partitioning to Cellular Triacylglycerol in McArdle-RH7777 Cells. J Biol Chem **281:** 945-950

Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard M-P, Gomot M, Chelly J, des Portes V, Fryns J-P, Ropers H-H, Magi B, Bellan C, Volpi N, Yntema HG, Lewis SE, Schaffer JE, Renieri A (2002) FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. **30:** 436-440

Meloni I, Parri V, De Filippis R, Ariani F, Artuso R, Bruttini M, Katzaki E, Longo I, Mari F, Bellan C, Dotti CG, Renieri A (2009) The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. Neuroscience **159:** 657-669

Melton EM, Cerny RL, Watkins PA, Dirusso CC, Black PN (2011) Human Fatty Acid Transport Protein 2a/Very Long Chain Acyl-CoA Synthetase 1 (FATP2a/Acsvl1) Has a Preference in Mediating the Channeling of Exogenous n-3 Fatty Acids into Phosphatidylinositol. J Biol Chem **286:** 30670-30679

Meselson M, Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from E. coli. Nature **217:** 1110-1114

Milger K, Herrmann T, Becker C, Gotthardt D, Zickwolf J, Ehehalt R, Watkins PA, Stremmel W, Fullekrug J (2006) Cellular uptake of fatty acids driven by the ER-localized acyl-CoA synthetase FATP4. J Cell Sci **119:** 4678-4688

Moulson CL, Lin MH, White JM, Newberry EP, Davidson NO, Miner JH (2007) Keratinocyte-specific expression of fatty acid transport protein 4 rescues the wrinkle free phenotype in Slc27a4/Fatp4 mutant mice. J Biol Chem **282:** 15912-15920

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **51 Pt 1:** 263-273

Muoio DM, Lewin TM, Wiedmer P, Coleman RA (2000) Acyl-CoAs are functionally channeled in liver: potential role of acyl-CoA synthetase. Am J Physiol Endocrinol Metab **279:** E1366-1373

Parkes HA, Preston E, Wilks D, Ballesteros M, Carpenter L, Wood L, Kraegen EW, Furler SM, Cooney GJ (2006) Overexpression of acyl-CoA synthetase-1 increases lipid deposition in hepatic (HepG2) cells and rodent liver in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab **291:** E737-744

Paulus H, Kennedy EP (1960) The enzymatic synthesis of inositol monophosphatide. J Biol Chem **235:** 1303-1311

Pei Z, Fraisl P, Berger J, Jia Z, Forss-Petter S, Watkins PA (2004) Mouse very long-chain Acyl-CoA synthetase 3/fatty acid transport protein 3 catalyzes fatty acid activation but not fatty acid transport in MA-10 cells. J Biol Chem **279:** 54454-54462

Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, Zollo M, Borsani G, Ballabio A, Renieri A (1998) FACL4, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. Genomics **47:** 350-358

Piomelli D, Astarita G, Rapaka R (2007) A neuroscientist's guide to lipidomics. Nat Rev Neurosci **8:** 743-754

Pownall HJ, Hamilton JA (2003) Energy translocation across cell membranes and membrane models. Acta Physiologica Scandinavica **178:** 357-365

Rudolph B (2011) Struktur und Funktion der Acyl-CoA-Synthetase 3 im Zusammenhang mit der Biogenese von Lipid Droplets. Medizinische Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Rusinol AE, Cui Z, Chen MH, Vance JE (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. J Biol Chem **269:** 27494-27502

Schaffer JE, Lodish HF (1994) Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. Cell **79:** 427-436

Schuck S, Honsho M, Ekroos K, Shevchenko A, Simons K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. Proc Natl Acad Sci U S A **100:** 5795-5800

Schuck S, Manninen A, Honsho M, Fullekrug J, Simons K (2004) Generation of single and double knockdowns in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference. Proc Natl Acad Sci U S A **101:** 4912-4917

Sebastian D, Guitart M, Garcia-Martinez C, Mauvezin C, Orellana-Gavalda JM, Serra D, Gomez-Foix AM, Hegardt FG, Asins G (2009) Novel role of FATP1 in mitochondrial fatty acid oxidation in skeletal muscle cells. J Lipid Res **50:** 1789-1799

Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T (2009) Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. J Lipid Res **50 Suppl:** S46-51

Skrede S, Bremer J, Berge RK, Rustan AC (1994) Stimulation of fatty acid oxidation by a 3-thia fatty acid reduces triacylglycerol secretion in cultured rat hepatocytes. J Lipid Res **35:** 1395-1404

Spector AA, Steinberg D, Tanaka A (1965) Uptake of Free Fatty Acids by Ehrlich Ascites Tumor Cells. J Biol Chem **240:** 1032-1041

Stahl A (2004) A current review of fatty acid transport proteins (SLC27). Pflugers Arch **447:** 722-727

Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF (2001) Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. Trends Endocrinol Metab **12:** 266-273

Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, Punreddy S, Ge P, Watson N, Patel S, Kotler M, Raimondi A, Tartaglia LA, Lodish HF (1999) Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. Mol Cell **4:** 299-308

Steinberg SJ, Morgenthaler J, Heinzer AK, Smith KD, Watkins PA (2000) Very Long-chain Acyl-CoA Synthetases. Human "Bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. J Biol Chem **275:** 35162-35169

Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD (1985) Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes. J Clin Invest **75:** 1068-1076

Stremmel W, Strohmeyer G, Berk PD (1986) Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. Proc Natl Acad Sci U S A **83:** 3584-3588

Swift S, Lorens J, Achacoso P, Nolan GP (2001) Rapid production of retroviruses for efficient gene delivery to mammalian cells using 293T cell-based systems. Curr Protoc Immunol **Chapter 10:** Unit 10 17C

Tomoda H, Igarashi K, Omura S (1987) Inhibition of acyl-CoA synthetase by triacsins. Biochim Biophys Acta **921:** 595-598

Van Horn CG, Caviglia JM, Li LO, Wang S, Granger DA, Coleman RA (2005) Characterization of recombinant long-chain rat acyl-CoA synthetase isoforms 3 and 6: identification of a novel variant of isoform 6. Biochemistry **44:** 1635-1642

Veerkamp JH, van Moerkerk TB, Glatz JF, Zuurveld JG, Jacobs AE, Wagenmakers AJ (1986) 14CO2 production is no adequate measure of [14C]fatty acid oxidation. Biochem Med Metab Biol **35:** 248-259

Watkins PA, Maiguel D, Jia Z, Pevsner J (2007) Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. J. Lipid Res. **48:** 2736-2750

WHO (2011) Non communicable Diseases Country Report 2011. *In*. World Health Organization, Geneva

Wiczer BM, Bernlohr DA (2009) A novel role for fatty acid transport protein 1 in the regulation of tricarboxylic acid cycle and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. J Lipid Res **50:** 2502-2513

Wymann MP, Schneiter R (2008) Lipid signalling in disease. Nat Rev Mol Cell Biol **9:** 162-176

Yamashita A, Sugiura T, Waku K (1997) Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. J Biochem **122:** 1-16

Zakim D (2000) Thermodynamics of fatty acid transfer. J Membr Biol **176:** 101-109

Zhang C, Li A, Gao S, Zhang X, Xiao H (2011) The TIP30 protein complex, arachidonic acid and coenzyme A are required for vesicle membrane fusion. PLoS One **6:** e21233

6.5 Veröffentlichungen

Paper

Tianzuo Zhan, Margarete Digel, Eva-Maria Küch, Wolfgang Stremmel, Joachim Füllekrug Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins. J Cell Biochem. 2011 Mar; 112(3):849-59

Poster

Eva-Maria Küch, Daniela Lehnen, Margarete Digel, Robert Ehehalt, Joachim Füllekrug Intracellular channeling of fatty acids by acyl-CoA synthetases. 51st International Conference on the Bioscience of Lipids, Bilbao, Spanien, 2010

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. Joachim Füllekrug für die gemeinsame Entwicklung eines spannenden Themas danken. Auch wenn wir einiges an Geduld aufbringen mussten, so ist doch am Ende alles gut geworden. Ohne deine intensive Betreuung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Vielen Dank.

Herrn Prof. Dr. W. Stremmel, dem ärztlichen Direktor der Inneren Medizin IV am Universitätsklinikum Heidelberg, möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeit in seiner Abteilung unter besten Bedingungen durchführen zu können.

Mein Dank gilt Prof. Dr. W. Nickel für die Übernahme des Erstgutachtens. Ihm und Prof. Dr. R. Bartenschlager danke ich für hilfreiche Diskussionen und Vorschläge zur weiteren Ausrichtung meines Projektes während der TAC-Meetings. Prof. Dr. R. Bartenschlager und PD Dr. M. Seedorf danke ich für ihre Teilnahme an meiner Prüfung.

Dr. Margarete Poppelreuther möchte ich für ihre kontinuierliche Hilfsbereitschaft danken. Simone Staffer und Sabine Tuma-Kellner danke ich für die vielen kleinen Hilfestellungen, die den Laboralltag deutlich erleichterten. Simone, sollte ich einmal eine feste Stelle für eine TA haben, melde ich mich bei dir.

Mein Dank gilt Daniela Lehnen und Regina Großmann für die Klonierung der verwendeten ACSL4-Plasmide, sowie Dieter Stefan für seine Unterstützung am FACS-Gerät. Hannah Schneider und Joachim Füllekrug danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Den Doktoranden aus dem Jahr 2008, Chen, Laura, Julia, Regina und Tianzuo, danke ich für die beste Zeit meiner Doktorarbeit. Sie, wie auch Hannah, Daniela, Friedrich, Sarah und „die Söllners“, haben der Arbeitsatmosphäre und somit mir gut getan.

Herzlichen Dank an Hannah Schneider und Chen Du. Ihr seid nicht nur die besten Arbeitskollegen, die es gibt, sondern mir auch echte Freunde geworden. Danke Hannah, dass du mich immer wieder aufgebaut hast, wenn ich dachte, es ginge nicht mehr und auch für deine Ausdauer während des Korrektur-Endspurts mitten in der Nacht.

Zu guter Letzt gilt mein herzlichster Dank meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir in jeglicher Hinsicht Rückhalt geben und mich auf meinem bisherigen Weg immer unterstützt haben. Ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen.