

Julia Krammer
Dr. med.

Einfluss der Acyl-CoA-Synthetasen FATP2, FATP4 und ACSL1 sowie der Fettsäuretranslokase CD36 auf die Fettsäureaufnahme in den humanen Hepatomzelllinien HuH7 und HepG2

Geboren am 13.12.1983 in Rostock
Staatsexamen am 12.04.2010 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Robert Eehalt

Der molekulare Mechanismus der Fettsäureaufnahme in die Zelle wird heute mehr und mehr diskutiert. Um Behandlungsmöglichkeiten für Fettstoffwechselstörungen wie die Steatosis hepatis zu finden, scheint es essentiell diesen Mechanismus zu verstehen. Das Krankheitsbild der Steatosis hepatis ist häufig assoziiert mit Adipositas (v. a. ein erhöhter Anteil an viszeralem Fett) und metabolischen Störungen wie Diabetes mellitus. Ihnen gemein sind erhöhte Plasmaspiegel an freien Fettsäuren. Sie werden zur Leber transportiert, von der Leberzelle aufgenommen, in Triglyceride umgewandelt und in Form von Lipid Droplets gespeichert. Die Prävalenz der Steatosis hepatis wird mittlerweile auf 14-24% geschätzt. In den Aufnahmemechanismus der Fettsäuren einzugreifen ist folglich eine mögliche Grundlage zur Prävention und Behandlung der Fettleber.

Langkettige Fettsäuren dienen im Organismus als Energiequelle, Membranbaustein und erfüllen wichtige Funktionen in der Signaltransduktion. Im Laufe zahlreicher Untersuchungen wurden zwei verwandte Proteinfamilien identifiziert, die die Fettsäureaufnahme beeinflussen: FATPs (Fatty Acid Transport Proteins) und ACSLs (Long-Chain Acyl-CoA-Synthetasen). Bei diesen Proteinfamilien handelt es sich um Acyl-CoA-Synthetasen, die die Aktivierung von freien Fettsäuren in energiereiches Acyl-CoA katalysieren. Sie unterscheiden sich in ihrer gewebsspezifischen Expression sowie ihrer intrazellulären Lokalisation. Da FATPs als mögliche Kandidaten für einen proteinvermittelten Fettsäuretransport gelten, wäre eine Lokalisation in der Plasmamembran naheliegend. Bisher konnte jedoch an mehreren Zellsystemen gezeigt werden, dass bestimmte FATP-Isoformen intrazellulär lokalisiert sind und eher durch ihre Enzymfunktion als in Form von Transportern Einfluss auf die Fettsäureaufnahme und -verarbeitung nehmen. Auch spielen sie möglicherweise eine wichtige Rolle im „Channeling“ der aufgenommenen Fettsäuren für spezifische intrazelluläre Stoffwechselwege. Für die meisten dieser Proteine konnte eine Erhöhung der Fettsäureaufnahme bei Überexpression gezeigt werden. Damit sind diese Enzyme potentielle pharmakologische Angriffspunkte für die Behandlung von Fettstoffwechselstörungen.

Ein weiteres Protein, dessen Rolle in der Fettsäureaufnahme diskutiert wird, ist CD36. Es ist in Lipid Rafts, aber auch in Nicht-Raft-Domänen der Plasmamembran zu finden und sorgt dort für die Anreicherung freier Fettsäuren an der Außenseite der Plasmamembran. Einzig für CD36 konnte bisher gezeigt werden, dass es in der Plasmamembran lokalisiert ist und bei Überexpression die Fettsäureaufnahme erhöht.

Für die vorliegende Arbeit wurden bewusst Kandidatenproteine gewählt, für die eine Expression im menschlichen Lebergewebe bereits gezeigt werden konnte: FATP2, FATP4, ACSL1 und CD36. Als Zellmodell dienten die humanen Hepatomzelllinien HuH7 und HepG2. Es wurde der Einfluss dieser Proteine auf die Fettsäureaufnahme sowie ihre subzelluläre Lokalisation untersucht, mit dem Ziel ein potentes Protein für mögliche pharmakologische Angriffspunkte in der Behandlung der Steatosis hepatis zu finden.

Mittels Doppelimmunfluoreszenz konnten FATP2 und FATP4 in beiden Zelllinien eindeutig dem ER zugeordnet werden. ACSL1 wurde jeweils in Mitochondrien lokalisiert. Es wird vermutet, dass es dort Fettsäuren für die mitochondriale β -Oxidation aktiviert. Beide Proteinfamilien scheinen also keine Transporterfunktion zu erfüllen, da dafür eine Lokalisation in der Plasmamembran notwendig wäre. Sie beeinflussen vielmehr die Aufnahme von extrazellulären Fettsäuren durch enzymatische Aktivierung von Fettsäuren im Zytosol. CD36 zeigte sich ausschließlich in der Plasmamembran beider Zelllinien.

Der Steigerung der Fettsäureaufnahme bei transienter Überexpression wurde mit tritiummarkiertem Oleat und fluoreszenter Bodipy-C12 Fettsäure untersucht. Dies ermöglichte zusätzlich eine Analyse der Fettsäureaufnahme auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie (FACS). Es konnte gezeigt werden, dass CD36, FATP4, FATP2 und ACSL1 bei Überexpression die Aufnahme von Fettsäuren in die Hepatomzellen steigern. Durch die Wahl bestimmter statistischer Programme konnte die exakte Korrelation zwischen Expressionslevel und Fettsäureaufnahme berechnet und graphisch dargestellt werden.

CD36 zeigte im Gegensatz zu den restlichen Proteinen eine gesteigerte Aufnahme von Oleat, nicht jedoch von Bodipy-Fettsäure. Das lässt sich am ehesten durch eine unterschiedliche Substratspezifität von CD36 erklären.

Mit Hilfe der fluoreszierenden Bodipy-Fettsäure konnte auch das metabolische Channeling der Fettsäuren näher untersucht werden. FATP2-überexprimierende HuH7 Zellen scheinen die aufgenommenen Fettsäuren zunächst im Endoplasmatischen Retikulum anzureichern, FATP4-überexprimierende Zellen eher in Lipid Droplets. Die unterschiedliche Sortierung der Fettsäuren spricht für eine unterschiedliche Verwendung der gebildeten Acyl-CoA-Ester im Stoffwechsel, z. B. für die β -Oxidation oder Lipidsynthese.

Als vielversprechendes therapeutisches Target stellte sich FATP2 heraus. Es ist das dominanteste der FATPs in Leberzellen und zeigte in dieser Arbeit den größten Effekt auf die Fettsäureaufnahme. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre somit die Hemmung der zellulären Fettsäureaufnahme über eine medikamentöse Blockade von FATP2.

Weitere funktionelle Untersuchungen der Kandidatenproteine mittels stabiler Transfektion sowie das Erweitern der Versuchsreihen auf Primärhepatozyten sollten diese Hypothese vorher verifizieren.