

Tianzuo Zhan
Dr. med.

Analyse des Glukose- und Fettsäuretransports in 3T3-L1 Adipozyten

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Adipozyten spielen eine zentrale Rolle in der Homöostase des systemischen Energiestoffwechsels und sind an der Entwicklung vieler Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 2 beteiligt. Der Transport von Fettsäuren und Glukose in die Fettzellen ist dabei von herausragender Bedeutung und wird durch zahlreiche Faktoren reguliert. Der Einfluss von pflanzlichen Arzneistoffen auf den Glukosetransport und die Bedeutung der Acyl-CoA-Synthetasen FATP1, FATP4 und ACSL1 für die Fettsäureaufnahme wurden im Rahmen der Dissertation untersucht. Hierfür wurde vorrangig die 3T3-L1 Zelllinie als etabliertes Adipozyten-Modell verwendet.

Vielen Arzneipflanzen werden antidiabetische Effekte zugesprochen, jedoch sind ihre pharmakologischen Wirkmechanismen oft unzureichend untersucht. Im Rahmen eines Screenings wurde die Wirkung von sieben Arzneipflanzenextrakten und der Flavonoide Silybin (SIL) und Dehydrosilybin (DHS) auf den Glukose- und Fettsäureaufnahme an Vero-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass DHS die Glukoseaufnahme sehr stark reduziert. Die Wirkung von DHS und SIL wurde daher näher an 3T3-L1 Adipozyten charakterisiert. Sowohl die basale als auch die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme von 3T3-L1 Adipozyten wurden durch SIL und DHS konzentrationsabhängig gehemmt. Kinetische Analysen zeigten, dass SIL und DHS die GLUT4-vermittelte Glukoseaufnahme in einer kompetitiven Weise hemmen. Der K_i -Wert lag dabei für SIL bei 60 μM und für DHS bei 116 μM . Eine Hemmung der Insulin-abhängigen Phosphorylierung von PKB/Akt und AS160, zwei zentrale Schritte der Insulinsignalkaskade, wurde als relevanter Mechanismus ausgeschlossen. Immunfluoreszenzmikroskopie und subzelluläre Fraktionierung zeigten außerdem, dass die GLUT4 Translokation nicht beeinflusst wird. Eine Reduktion der Hexokinaseaktivität konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Um zu bestätigen, dass der Transport von Glukose über die Plasmamembran direkt beeinflusst wird, wurde GLUT4 in CHO-Zellen exprimiert, die kein endogenes GLUT4 haben. Die Expression von GLUT4 reduzierte dabei signifikant die Wirkung von SIL und DHS auf die Glukoseaufnahme. Es ist bekannt, dass SIL und DHS auf zahlreiche Tumorzelllinien zytotoxisch wirken. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch durch Energiedepriuation vermittelt wird, wurden GLUT4 exprimierende CHO-Zellen mit ansteigenden Flavonoidkonzentrationen behandelt. Es zeigte sich dabei, dass GLUT4 exprimierende Zellen eine wesentlich höhere Überlebensrate haben als die Kontrollzellen. Diese Beobachtung wurde an den Tumorzelllinien HuH7 und CaCo2 validiert. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass SIL, ein Flavonoid mit langjähriger klinischer Anwendung, und dessen Derivat DHS die Glukoseaufnahme in 3T3-L1 Adipozyten und verschiedenen Tumorzelllinien über eine direkte Hemmung von GLUT4 reduzieren kann. DHS ist dabei ein wesentlich potenterer Inhibitor mit stärkerer zytotoxischer Wirkung. Energiedepriuation durch Glukoserestriktion ist somit ein neuer Erklärungsansatz für die bekannte antitumorale Wirkung von SIL und DHS.

Im zweiten Teilprojekt wurde die Rolle der Acyl-CoA-Synthetasen FATP4, FATP1 und ACSL1 in 3T3-L1 Zellen charakterisiert. Der bisherige Stand der Forschung sieht für FATP4

eine wesentliche Rolle in der basalen Fettsäureaufnahme vor, während FATP1 durch Translokation die Wirkung von Insulin auf die Fettsäureaufnahme vermittelt. Aktuelle Publikationen stellen diese These jedoch in Frage, insbesondere, weil hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von FATP1/4 und der Änderung dieser unter Insulin die Ergebnisse uneinheitlich sind. Um die Funktion der Proteine zu untersuchen, wurden stabil exprimierende 3T3-L1 Zelllinien hergestellt. Die überexprimierten Proteine waren funktionell intakt, was sich durch eine Erhöhung der ACS-Aktivität und Steigerung der basalen Fettsäureaufnahme zeigt. Immunfluoreszenz-mikroskopische Studien und subzelluläre Fraktionierungen zeigen, dass FATP1 und FATP4 eine ähnliche subzelluläre Lokalisation aufweisen, die am ehesten mit dem ER korreliert. Hingegen konnten beide Proteine weder auf der Plasmamembran noch auf Mitochondrien lokalisiert werden. Insulin erhöhte die Aufnahme von fluoreszierenden Fettsäuren in beiden Zelllinien stärker als in den Kontrollzellen. Hingegen wurde eine Erhöhung der Oleat-Aufnahme durch Insulin erst nach längeren Inkubationsperioden beobachtet. Eine Lokalisationsänderung von FATP1 und FATP4 durch Insulin war weder mittels Immunfluoreszenzmikroskopie noch durch subzelluläre Fraktionierung feststellbar. Ebenfalls zeigten FATP1 und FATP4 überexprimierende Adipozyten einen signifikant höheren Anstieg der Glukoseaufnahme auf Insulinstimulation hin. Im Gegensatz zu FATP1 und FATP4 wurde ASCL1 in der Immunfluoreszenzmikroskopie spezifisch auf Mitochondrien lokalisiert. Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass sowohl FATP1 als auch FATP4 als im ER lokalisierte Acyl-CoA-Synthetasen für die Insulin-vermittelte Fettsäureaufnahme verantwortlich sind. Eine Änderung der Lokalisation im Sinne einer Translokation findet dabei nicht statt.