

Katrin Milger
Dr. med.

Die Acyl-CoA-Synthetasen FATP4 und ACSL1: Intrazelluläre Lokalisation, Topologie und funktionelle Bedeutung für die Fettsäureaufnahme.

Geboren am 13.10.1981 in Göttingen
Staatsexamen am 21.06.2007 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Langkettige Fettsäuren besitzen eine zentrale Bedeutung im Stoffwechsel: ihre Aufnahme ist einerseits notwendig, da sie der Zelle als Energiequelle, Membranbausteine oder Signalmoleküle dienen. Andererseits sind Störungen der Fettsäureaufnahme und des Fettsäuremetabolismus medizinisch bedeutsam, da sie mit dem Insulinresistenzsyndrom, dem Altersdiabetes und der Arteriosklerose assoziiert sind.

Der molekulare Mechanismus sowie die Regulation der Fettsäureaufnahme sind jedoch bislang nicht ausreichend geklärt. Zwar wird generell anerkannt, dass eine Diffusion der Fettsäuren über die Plasmamembran möglich ist, jedoch wurde bezweifelt, dass dies der physiologisch vorherrschende Mechanismus sei. Nach Identifikation verschiedener Proteine, die die Fettsäureaufnahme einer Zelle beeinflussen, ist nach wie vor umstritten, welche Rolle Proteine in diesem Prozess genau spielen.

Nach dem derzeit vorherrschenden Modell soll ein echter, Protein-vermittelter Transport über die Plasmamembran analog zu dem anderer Metabolite und Ionen stattfinden. Die Familie der *Fatty Acid Transport Proteins* (FATPs) soll dabei die entscheidende Funktion des Transporters innehaben, während das Enzym ACSL1 auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran durch Veresterung mit Coenzym A den Rücktransport verhindern soll. FATP4, das einzige Protein der FATP Familie, das in intestinalen Zellen exprimiert wird, wurde als der Fettsäuretransporter im Darm postuliert. Dies beruhte auf folgenden Beobachtungen:

1. Erhöhung der Fettsäureaufnahme bei Überexpression des Proteins.
2. Lokalisation des Proteins in der apikalen Plasmamembran von Darmzellen.

Die Transporterfunktion ist umstritten, da inzwischen nachgewiesen wurde, dass FATP4 Enzymaktivität besitzt und als Acyl-CoA-Synthetase langkettige Fettsäuren aktiviert. Auch bezüglich der subzellulären Lokalisation herrscht Uneinigkeit, weshalb letztere in der vorliegenden Arbeit eingehend untersucht wurde. Mit Hilfe verschiedener Methoden wurde gezeigt, dass sich FATP4 im endoplasmatischen Retikulum und nicht in der Plasmamembran befindet:

1. Fluoreszenzmikroskopische Studien diverser Zelllinien zeigten die retikuläre Verteilung von überexprimiertem FATP4. Mit Hilfe verschiedener Marker-Proteine wurde das Kompartiment als ER identifiziert.
2. Es lag keine Überlappung mit Plasmamembran-Markern vor.
3. Die Analyse der Zuckerstruktur wies die Retention einer glykosylierten Proteinvariante im ER nach.
4. Endogenes FATP4 war in Zelllinien sowie Gewebeschnitten (Mausdarm) intrazellulär lokalisiert.
5. Es wurde eine Domäne im FATP4-Molekül identifiziert, die für die Lokalisation in der ER-Membran bedeutend ist: Das Reporterprotein LAT-GFP, welches sich in der Plasmamembran befindet, wird durch Einfügen dieser „ERx“-Domäne im ER zurückgehalten.

Des Weiteren wurde die Membrantopologie von FATP4 charakterisiert: Es handelt sich um ein TypIII-Signal-Anker-Transmembranprotein, d.h. die Signalsequenz ist im Membrananker enthalten und der N-Terminus des Proteins liegt im Lumen des ER.

Die Lokalisation von ACSL1 wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie in verschiedenen Zelllinien untersucht: ACSL1 befand sich in einem intrazellulären Kompartiment welches durch Koloalisationsstudien als mitochondriale Membranen identifiziert wurde. Mit Hilfe eines Fusionsproteins, das die gleiche Lokalisation aufwies, wurde gezeigt, dass der N-Terminus des ACSL1 für die mitochondriale Sortierung ausreichend ist.

Außerdem wurde eine Methodik etabliert, die eine gleichzeitige qualitative Analyse von Expression, Lokalisation und Fettsäureaufnahme erlaubt. Diese Studien auf Ebene der einzelnen Zellen ergaben, dass im endoplasmatischen Retikulum lokalisiertes FATP4 funktionell aktiv ist und die Fettsäureaufnahme steigert. Es bedarf also nicht der Plasmamembran-Lokalisation wie dies von einem echten Transporter zu erwarten wäre. FACS-Analysen ermöglichten die Quantifizierung großer Zellzahlen auf Einzelzellebene. Durch Einsatz eines bisher wenig bekannten Excel-Programms konnte eine sehr exakte Auswertung vorgenommen werden, welche die enge Korrelation der Expression von FATP4 mit der Fettsäureaufnahme belegte.

Es wurde gezeigt, dass die Enzymaktivität des FATP4 Ursache dieser Korrelation ist: Die Punktmutation S247A-F4 hat mit dem Verlust der Enzymaktivität auch die Fähigkeit zur Steigerung der Fettsäureaufnahme verloren. Dagegen steigern Mutationen mit verminderter ACS-Aktivität wie z.B. G209S-F4 weiterhin die Fettsäureaufnahme, jedoch zu einem geringeren Grad als das Wildtyp-FATP4.

Eine weitere Bestätigung für diesen Mechanismus lieferte das intrazelluläre Enzym ACSL1, welches prinzipiell das gleiche Verhalten aufwies: Überexpression führte zu einer Steigerung der Fettsäureaufnahme, wobei eine Korrelation zwischen Höhe der Expression und Fettsäureaufnahme vorlag. Eine Transportfunktion ist für diesen Zusammenhang also nicht erforderlich.

Aufgrund der im Rahmen dieses Projektes erarbeiteten Informationen erscheint ein anderes Modell der Regulation der Fettsäureaufnahme sinnvoll: maßgeblich ist nicht der Transport über die Membran, sondern die intrazelluläre Acyl-CoA-Synthetaseaktivität, welche den Stoffwechselzustand der Zelle reflektiert. Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung der subzellulären Verteilung dieser Acyl-CoA-Synthetaseaktivität nachzugehen: Bestimmt der Ort der Aktivierung der Fettsäuren gleichzeitig ihre weitere Verwendung? Ein solches „metabolic channeling“ könnte bedeuten, dass am endoplasmatischen Retikulum entstehende Acyl-CoA zum Aufbau von Membranlipiden oder Triglyzeriden dienen, während an Mitochondrien aktivierte Fettsäuren zur Energiegewinnung mittels β -Oxidation prädestiniert sind.