

Jelena Zickwolf

Dr. med.

### **Sortierung und Funktion der Acyl-CoA-Synthetase FATP4**

Geboren am 05.10.1973 in Karlsruhe

Examen am 04.12.2000 an der Universität Belgrad.

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Langkettige Fettsäuren sind wichtige Metabolite für die Energieproduktion sowie für die Biosynthese von Lipiden. Die dienen den Zellen ebenfalls als Membranbausteine oder Signalmoleküle. Störungen der Fettsäureaufnahme und des Fettsäurenmetabolismus sind von hoher medizinischer Relevanz, da sie mit Adipositas und assoziierten Stoffwechselstörungen einhergehen. Der molekulare Mechanismus der Fettsäureaufnahme ist bislang nicht ausreichend geklärt. Es wurde beschrieben, dass eine freie Diffusion der Fettsäuren durch die Plasmamembran möglich ist und dass diese auf einem physikalisch-chemischen Modell für die Zellmembranpassage und hydrophoben Substanzen basiert. Einige Autoren halten diese freie Diffusion und erreichbare maximale Transfargeschwindigkeit für nicht ausreichend für den Metabolismus einiger Zelltypen. Nach der Identifikation verschiedener Proteine, die in die Fettsäureaufnahme einer Zellen involviert sind, ist nach wie vor umstritten, welche Rolle Proteine im diesem Prozess spielen. Das FATP4, das einzige Protein der FATP-Familie, das in intestinalen Zellen exprimiert wird, wurde als der Fettsäure-Transporter im Darm vorgeschlagen. Das Protein wurde in der apikalen Plasmamembran von Darmzellen nachgewiesen und wurde auch bei Überexpression dieses Proteins bei erhöhter Fettsäureaufnahme verifiziert. Die Transportfunktion ist fraglich, da inzwischen nachgewiesen wurde, dass FATP4 enzymatische

Aktivität besitzt und als Acyl-CoA-Synthetase die Veresterung von langkettigen Fettsäuren zu Acyl-CoA ermöglicht. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Lokalisation sowie die Korrelation zwischen der Lokalisation und funktionellen Fettsäureaufnahme von FATP4 durch verschiedene molekularbiologische und biochemische Methoden.

Die bisher umstrittene subzelluläre Lokalisation des FATP4 im endoplasmatischen Retikulum wurde durch verschiedene Methoden belegt. Die exogene Überexpression von wt-FATP4 sowie endogenem FATP4 in den verschiedenen Kulturzellen zeigt ein retikuläres, netzförmiges, ER-spezifisches Verteilungsmuster. Die ER-Lokalisation von FATP4 ist auch nach der Inhibition der Proteinsynthese unverändert, was nahelegt, dass FATP4 mit hoher Wahrscheinlichkeit im ER lokalisiert ist. Es handelt sich nicht um eine artifizielle Akkumulation von neu synthetisierten Proteinen im ER-Bereich. Das endogene FATP4 konnte man auch in der Immunfluoreszenz erkennen. Auch das endogene FATP4 ist intrazellulär lokalisiert.

Wt-FATP4 ist ER-Membran-assoziiert, die mutierte sol-Variante (mit depletiertem N-terminalen Bereich) ist partiell zytosolisch verteilt, was vermuten lässt, dass das FATP4 keine zusätzliche Transmembrandomäne besitzt. Das Fusionsprotein LAT-GFP, welches sich in der Plasmamembran befindet, wird durch Einfügen der ERX-Domäne im ER zurückgehalten. Bei FATP4-TMD-GFP wurde teilweise eine Membranassoziation beobachtet. Das lässt vermuten, dass die TMD allein eine Sortierungsinformation erhalten könnte. Für die definitive Stabilisierung und Integration der ER-Membran war die ERX-Domäne notwendig. Unter Detergenzien-Behandlung ist das FATP4 partiell löslich.

Flotationsverfahren bzw. Optiprep-Step-Gradienten in verschiedenen Kulturzellen zeigen, dass endogenes FATP4 nicht mit Lipid-Rafts assoziiert ist, sondern sich in den Detergenzien-löslichen Membranen befindet.

Da die initiale N-Glykosylierung grundsätzlich im Lumen des ER stattfindet, wurde bei erreichter Opsin-F4-Glykosylierung dementsprechend nachgewiesen, dass der N-Terminus des FATP4 ins ER bzw. nach extrazytoplasmatisch gerichtet ist. Beim Verdau mit EndoH ließ sich das N-gekoppelte Mannose-reiche Oligosaccharid abspalten. Daraus könnte geschlossen werden, dass das FATP4 im ER zurückgehalten wurde und nicht den Golgi-Apparat oder die Plasmamembran erreicht hat. Endogenes sowie überexprimiertes FATP4 ist nach der Membranpräparation membranassoziiert und präsentiert sich auch als Doppelbande. Die Doppelbanden sind nicht zellspezifisch, sondern treten allgemein auf. Besonders ausgeprägt sind

sie bei MDCK-II- und HeLa-Zellen. Vermutlich sind die Doppelbanden die reale Form des FATP4. Die untere Bande könnte der löslichen Variante von FATP4 entsprechen.

Die Überexpression von FATP4 in der ER-Membran zeigt eine erhöhte Fettsäureaufnahme im Vergleich zum basalen Zustand, eine Überexpression der mitochondrialen Acyl-CoA-Synthetase führte auch zur gesteigerten Fettsäureaufnahme. FATP2 zeigt eine ER-Sortierung und in Hinblick auf die Fettsäureaufnahme der Zelle gleich starke Potenz.

Die gesteigerte Fettsäureaufnahme nach der Überexpression von Vertretern der FATP- und ACSL-Proteine kann man durch einen indirekten Effekt erklären. Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität-Träger erniedrigen die intrazelluläre Konzentration von Fettsäuren durch die Veresterung zu Acyl-CoAs. Das führt zur Veränderung des Äquilibrium für den Fettsäuretransport in der Plasmamembran. Die Acyl-CoAs werden für die Synthese von Triglyzeriden, Phospholipiden und Cholesterolestern ins ER (FATP4) oder für die Energieproduktion durch  $\beta$ -Oxidation zu den Mitochondrien (ACSL) dirigiert.

Das FATP4 ist nicht, wie einst beschrieben (Stahl et al., 1999), in der Plasmamembran, sondern im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert.

Diese Lokalisation ist für die funktionelle Fettsäureaufnahme suffizient.

Die Korrelation zwischen der Expression von FATP4 und der Fettsäureaufnahme ist von der enzymatischen Aktivität von FATP4 durch Katalysierung der Fettsäurenveresterung abhängig. Die Expression der mitochondrialen Acyl-CoA-Synthetase führt ebenfalls zur gesteigerten Fettsäureaufnahme in die Zelle. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Fettsäuretranslokation durch die Plasmamembran indirekt durch intrazelluläre Enzyme reguliert werden kann.