

Susanne Karolin Sabine Domschke
Dr. med.

Knockout von langkettigen und sehr langkettigen Acyl-CoA-Synthetasen und der Fettsäure-Synthase in Endothelzellen mittels der CRISPR/Cas9-Technologie

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Herr apl. Prof. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Fettsäuren und ihre Derivate spielen unter anderem als Bestandteil zellulärer Membranen, wichtiger Energielieferant und Ausgangssubstanz diverser Botenstoffe eine bedeutende und vielseitige Rolle im menschlichen Organismus.

Acyl-CoA-Synthetasen können Fettsäuren zu ihren aktiven Metaboliten, den CoA-Thioestern, verstoffwechseln. Erst diese aktivierten Fettsäure-Derivate können so spezifisch in verschiedene Stoffwechselwege – zur Energiegewinnung oder für Biosynthesen – eingeschleust werden.

Durch diese Funktion der Fettsäure-Aktivierung spielen Acyl-CoA-Synthetasen eine weichenstellende, zentrale Rolle im Fettsäurestoffwechsel, welcher nicht zuletzt wegen Assoziation mit Krankheiten wie Diabetes mellitus und der koronaren Herzkrankheit von großer klinischer Relevanz ist.

Endothelzellen bilden eine natürliche Barriere zwischen dem Blutstrom und dem angrenzenden Gewebe, welches auf die Versorgung unter anderem mit verschiedenen Nährstoffen, darunter auch Fettsäuren, aus dem Blut angewiesen ist. Die genauen Mechanismen, wie die Fettsäuren letztlich aus dem Blutstrom durch die Endothelzellschicht hin zum Zielgewebe transportiert werden und welche Rolle insbesondere die Acyl-CoA-Synthetasen dabei spielen, ist hierbei noch nicht genau bekannt.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit Endothelzelllinien erzeugt werden, welche einen Knockout für bestimmte langkettige und sehr langkettige Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs und ACSVLs/FATPs) aufweisen, wodurch die Bedeutung dieser Proteine für den endothelialen Fettsäuretransport sich untersuchen ließe. Es wurde hierfür die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie HMEC-1 verwendet.

Zur Depletion von Acyl-CoA-Synthetasen in den HMEC-1 Zellen sollte die CRISPR/Cas9-Technologie Anwendung finden, wobei die Methode zunächst mit Hilfe der humanen epidermoiden Karzinomzelllinie A431 in der Arbeitsgruppe etabliert wurde. Hierbei wurden zunächst A431-Knockout-Zelllinien für ACSL3 und FATP4/ACSVL4 erzeugt.

Mittels CRISPR/Cas9 wurden schließlich auch HMEC-1-Knockout-Zelllinien für die in HMEC-1 am häufigsten bzw. zweithäufigsten exprimierten ACSL-Enzyme ACSL4 und ACSL3 für die in HMEC-1 am stärksten exprimierte sehr langkettige Acyl-CoA-Synthetase FATP4/ACSVL4 und für die auch am Fettsäure-Metabolismus beteiligte Fettsäure-Synthase FASN etabliert. Der Knockout des jeweiligen Zielproteins wurde mittels Western Blot bestätigt.

Die CRISPR/Cas9-Technologie konnte so erfolgreich zur Erzeugung humaner Knockout-Zelllinien Anwendung finden. Die intensive Beschäftigung mit der CRISPR Methode führte zu Beobachtungen bzw. Überlegungen hinsichtlich verschiedener Möglichkeiten eines Screening-Verfahrens auf einen Knockout, einer variierenden Effizienz verschiedener Guides, möglicher Off-target-Aktivität des CRISPR Verfahrens, der Problematik der Expansion einer Einzelzelle zu einer neuen Zelllinie und einer genomischen Charakterisierung von Knockout-Zelllinien.

Der Knockout der Acyl-CoA-Synthetasen in Endothelzellen eröffnet eine Vielzahl an Möglichkeiten, die Relevanz dieser Proteine für den Fettsäure-Transport und -Metabolismus in diesem Zelltyp zu ergründen.

Zur Untersuchung von Lipidtropfen in Endothelzellen wurde unter anderem die Zelllinie A3Nt-GFP-HMEC-1 mittels retroviraler Partikel erzeugt, da der so stabil exprimierte N-Terminus der langkettigen Acyl-CoA-Synthetase ACSL3, fusioniert mit GFP, auf das Endoplasmatische Retikulum und sich neu bildenden Lipidtropfen lokalisiert und so diese Zellkompartimente sichtbar macht. Die endothelialen HMEC-1 Zelllinien zeigten unter normalen Wachstumsbedingungen nur sehr vereinzelte Lipidtropfen, welche allerdings bei Inkubation der Zellen mit Ölsäure für bis zu 24 Stunden deutlich an Anzahl und Größe zunahmten, was darauf hindeutet, dass Endothelzellen durchaus in der Lage sind Lipidtropfen in deutlichem Umfang zu bilden, wobei die Frage ist, wie und wofür.

Die sehr langkettige Acyl-CoA-Synthetase ACSVL3, auch Fettsäure transportierendes Protein FATP3 genannt, welche zwar eine niedrige Expression in HMEC-1 zu zeigen scheint, aber nach Literaturlage durchaus eine Rolle beim Fettsäure-Transport von Endothelzellen spielen soll, wurde genauer hinsichtlich ihrer intrazellulären Lokalisation und ihrer Fähigkeit zur Steigerung der Fettsäure-Aufnahme untersucht. Transiente und mittels retroviraler Transduktion stabile Überexpression von FATP3-FLAG in verschiedenen Zelltypen erbrachten dabei stets eine netzartige, für das Endoplasmatische Retikulum typische Verteilung dieses Proteins, während eine Lokalisation auf der Plasmamembran nicht nachgewiesen werden konnte, was gegen eine Funktion des FATP3 als aktiv am Translokalisationsprozess von Fettsäuren über die Plasmamembran beteiligtes echtes Transportprotein spricht. Untersuchungen zur zellulären Aufnahme der fluoreszierenden Fettsäuren C1-Bodipy-C12 und -C16 ergaben, dass eine Überexpression von FATP3 nicht zu einer Steigerung der Aufnahme dieser Fettsäuren führt.

Der Knockout der langkettigen Acyl-CoA-Synthetase ACSL3 in A431 Zellen führte zu einer deutlichen Reduktion von Lipidtropfen in diesen Knockout-Zellen gegenüber Kontrollzellen unter normalen Wachstumsbedingungen. Mittels Inkubation mit Ölsäure bis zu 24 Stunden konnten zwar durchaus Lipidtropfen in den Knockout-Zellen induziert werden, allerdings in etwas geringerem Umfang als in den Kontrollzellen. Diese Beobachtungen legen eine bedeutsame Rolle des ACSL3 für die Bildung von Lipidtropfen nahe.