

Name: Yuling Zhang

Titel der Arbeit: *In vitro* Untersuchung von der Schutzfunktion des Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4) - Defektes in Makrophagen durch die Modulierung der Polarisationsantwort und die ER-Stress verursachte Zellschädigung

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktormutter: Prof. (apl.) Dr. med Uta Merle

Zusammenfassung

HINTERGRUND & ZIELE: Makrophagen sind wichtige immunologische Zellen für die Gewebeentwicklung, das angeborene Immunität und die Regeneration von Gewebe. Es ist bekannt, dass das Fettsäuretransportprotein 4 (FATP4), was die Aktivierung von langkettigen Fettsäuren und sehr langkettigen Fettsäuren katalysiert, eine Rolle in den Metabolismus von Ceramide in die Haut und Phospholipide in Fettgewebe spielt. Studien haben gezeigt, dass FATP1 den Fettsäuretransport und ihren Stoffwechsel regelt, um Entzündungen zu beschränken. FATP4 und FATP1 sind in Knochenmarkmakrophagen (BMDM) stark exprimiert und werden auch in menschlichen Monozyten exprimiert. Die Rolle von FATP4 in dem Fettstoffwechsel von Makrophagen wurde jedoch nicht erforscht. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass FATP4 an der Makrophagenpolarisationsreaktion und an der Stressverletzung von dem ER beteiligt sein kann, indem es die Lipidzusammensetzung ändert. Wir haben zwei In-vitro-Untersuchungen durchgeführt; I) Auswirkungen des FATP4-Knockdowns auf die Makrophagenpolarisation in THP-1 des humanen Monozyten und II) Auswirkungen des FATP4 Mangels im BMDM der Maus auf Tunicamycin (TM) induzierten ER Stress.

METHODEN: I) FATP4-Knockdown wurde unter Verwendung von Kontroll- und FATP4-siRNA in PMA-differenzierten THP-1 Zellen (M0), LPS+IFN- γ -behandelten M0 (M1) und IL-4-behandelten M0 (M2) für 24 Stunden durchgeführt. Die Expression von FATP4 und zelluläre Acyl-CoA Synthase Aktivitäten wurden in M0, M1 und M2 siCon und siFATP4 Zellen bestimmt. Die Freisetzung von Zytokinen sowie die Expression von entzündungsfördernden Gene und M2 Markern wurden bestimmt. Zelluläre Phospholipide und Sphingolipide gemessen mittels Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (LC/MSMS) gemessen.

II) Die aus WT- und LysM-FATP4 KO Mäusen isolierte BMDM wurden für 10 Tage mit M-CSF differenziert. TM wurde verwendet um ER-Stress hervorzurufen, die durch die Messung von ER-Stress-Markern, JNK/AP1-Signalweg und Apoptose bestimmt wurde. Die Freisetzung von

Zytokinen wurde durch ELISA gemessen. Triglyceride (TG) sowie Phospholipide und Sphingolipide wurden durch enzymatische Assays und LC/MSMS bestimmt.

ERGEBNIS: I) FATP4-Knockdown führt zu einer Abschwächung der durch LPS+IFN- γ induzierten Produktion von inflammatorischen Cytokinen, NF- κ B- und MYD88-Expression sowie eine Abschwächung der inflammatorischen pc-Jun-Expression und IL-8-Freisetzung nach M2-Induktion durch IL-4. FATP4-Knockdown steigert den antiinflammatorischen M2 Phänotyp unter basalen (CD206) und proinflammatorischen (PPAR- γ) Bedingungen und führt zu einer weiteren Erhöhung des M2-Phänotyps CD206 und PPAR- γ nach der M2-Induktion. **II)** Die FATP4 Deletion in BMDM aus Mäusen mit LysM-FATP4 Mangel verursachte eine Abschwächung der TM-induzierten ER Stressmarker BiP, IRE1 α , CHOP, p-eIf2 α , p-JNK, pc-Jun und auch die Freisetzung von proinflammatorischem TNF- α , IL-6, IL-12 und IFN- γ . Diese Deletion führt zu einer Abschwächung der Apoptosemarker Bax und gespaltenes PARP1, erhöhte jedoch die Expression von BCL2, BCLXL und PCNA und modulierte auch den PI3K-Signalweg für das Überleben der Zellen, einschließlich p-Akt, p-GSK3 α/β und p-FOXO1. Während der TM Behandlung erfolgte durch FATP4 Mangel eine Verschiebung von BMDM-Phospholipiden, Sphingomyelin und Ceramiden zu TG.

DISKUSSION: FATP4 Mangel in THP-1 Zellen führt zu einer Verstärkung der M2 Gewebe-Reparatur Phänotypen unter basaler und M2-Induktion, was darauf hindeutet, dass FATP4 eine schädliche Rolle spielen kann. Diese Verstärkung war mit einer Zunahme der Phospholipide, und gleichzeitig die Abnahme der Ceramide verbunden, was auf ihre schädigende Rolle hinweist. FATP4 Mangel sowohl bei THP-1 als auch bei BMDM zeigte während Zellschädigung einen Schutz gegen M1 Entzündungsreaktion und TM-induzierten ER-Stress. Der Schutz in BMDM war mit einer Verschiebung zu TG aber eine Abnahme der Ceramide verbunden, was wieder auf die schädigende Rolle von FATP4 hindeutet. Zusammenfassend hat FATP4-Mangel die Ceramide in Makrophagen unter antiinflammatorischer M2-Induktion und TM-induziertem ER-Stress reduziert, wodurch Entzündungen und Apoptose abgeschwächt werden. Unsere Ergebnisse liefern neue Einblicke in die Rolle von FATP4 in der Ceramidsynthese, die mit der Polarisationsreaktion von Makrophagen und der durch ER-Stress verursachten Zellschädigung einhergeht.