

# **Funktionelle Untersuchungen am Acyl-CoA-Synthetase 5 abhängigen Lipidmetabolismus des humanen Darmepithels**

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Patrick Sven Plum

aus

Eschweiler

Berichter: Herr Universitätsprofessor  
Dr. med. Nikolaus Gaßler

Herr Privatdozent  
Dr. med. Konrad Streetz

Tag der mündlichen Prüfung: 20. August 2012

*Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Lipidkonsum und hiermit assoziierte Erkrankungen in der westlichen Gesellschaft</b>	<b>1</b>
1.2	<b>Grundsätzlicher Aufbau des humanen Darmtraktes</b>	<b>2</b>
1.2.1	Wandaufbau des Darmtraktes	3
1.2.2	Zelltypen innerhalb der Darmschleimhaut	4
1.3	<b>Anatomie und Physiologie der Enterozyten</b>	<b>6</b>
1.3.1	Ultrastrukturelle Besonderheiten der Enterozyten	6
1.3.2	Resorption von Kohlenhydraten und Proteinen in Enterozyten	7
1.3.3	Resorption und Metabolismus von Lipiden in Enterozyten	8
1.4	<b>Fettsäuren – Mehr als bloße Energielieferanten</b>	<b>11</b>
1.4.1	Freie-Fettsäure-Rezeptoren (FFARs)	12
1.4.2	G-Protein gekoppelter Rezeptor 120 (GPR120)	14
1.5	<b>Langkettige Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs)</b>	<b>15</b>
1.5.1	Acyl-CoA-Synthetasen – Ein kurzer Überblick	15
1.5.2	ACSL5 – Vorkommen und Funktionen dieser besonderen Isoform	17
1.6	<b>Optionen der Intervention in den Lipidmetabolismus</b>	<b>19</b>
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>21</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>22</b>
3.1	<b>Materialien</b>	<b>22</b>
3.1.1	Geräte	22
3.1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	23
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	25
3.1.4	Software	26
3.1.5	Puffer und Lösungen	26
3.1.6	Reagenzien für cDNA-Synthese, Real Time PCR und Gelelektrophorese	29

3.1.7	Reagenzien für Proteinbestimmung, SDS-PAA-Gelelektrophorese und Western Blot	30
3.1.8	Verwendete Zelllinien	30
3.1.9	Zellkultur – Medien und Zusatzstoffe	31
3.1.10	Herstellung einer Orlistat-Lösung	32
3.1.11	Herstellung einer Etoxomir-Lösung	32
3.1.12	Antikörper	32
3.1.13	Primer	33
<b>3.2</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>34</b>
3.2.1	Kultivierung und Passage von CaCo-2-Zellen	34
3.2.2	Kryokonservierung und Reaktivierung von Zellen	35
3.2.3	Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Orlistat	35
3.2.4	Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Etomoxir	36
3.2.5	Sequentielle Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Orlistat und Etomoxir	36
<b>3.3</b>	<b>Zytologische Methoden</b>	<b>36</b>
3.3.1	Ölrot O-Färbung der Zellen	36
3.3.2	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	37
<b>3.4</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>38</b>
3.4.1	Acyl-CoA Synthetase Aktivitätsassay	38
<b>3.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>38</b>
3.5.1	RNA-Isolation aus Zellen mittels Tri-Reagenz	38
3.5.2	DNA-Verdau nach RNA-Isolation	39
3.5.3	First-Strand cDNA-Synthese	39
3.5.4	Primerdesign	40
3.5.5	Qualitative PCR	41
3.5.6	Quantitative Real Time PCR	42
3.5.7	Gelelektrophorese	43
<b>3.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>43</b>
3.6.1	Proteinisolation aus Zellen mittels Tri-Reagenz und Proteinbestimmung	43
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	44
<b>3.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>46</b>

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
4.1	<b>Identifikation potentieller ACSL5-assoziiert regulierter Moleküle</b>	<b>47</b>
4.2	<b>Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA</b>	<b>47</b>
4.3	<b>Expression von ACSL5 und möglicher ACSL5-abhängig regulierter Moleküle in unbehandelten Zellen</b>	<b>50</b>
4.4	<b>Inkubation mit Orlistat</b>	<b>52</b>
4.4.1	ACSL5-Alterationen unter Orlistat	53
4.4.2	Alterationen der FFAR-Isoformen unter Orlistat	56
4.4.3	Alterationen proapoptotischer Faktoren unter Orlistat	60
4.4.4	Mortalin-Alterationen unter Orlistat	62
4.5	<b>Inkubation mit Orlistat und Etomoxir</b>	<b>64</b>
4.5.1	ACSL5-Alterationen unter Orlistat und Etomoxir	64
4.5.2	Alterationen der FFAR-Isoformen unter Orlistat und Etomoxir	65
4.5.3	Alterationen proapoptotischer Faktoren unter Orlistat und Etomoxir	67
4.5.4	Mortalin-Alterationen unter Orlistat und Etomoxir	68
4.6.	<b>Morphologische Auffälligkeiten unter Behandlung</b>	<b>69</b>
4.6.1	Lichtmikroskopische Auffälligkeiten	69
4.6.2	TEM-Untersuchungen der mitochondrialen Morphologie	72
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
5.1	<b>Ergebnisse dieser Arbeit im Überblick</b>	<b>76</b>
5.2	<b>Enterozytäre ACSL5 Induktion durch Manipulation des endogenen Lipidmetabolismus</b>	<b>77</b>
5.3	<b>Anabole versus katabole Funktionen der ACSL5 im enterozytären Lipidmetabolismus</b>	<b>81</b>
5.4	<b>Aktivierung apoptotischer Faktoren durch Manipulation des enterozytären Lipidmetabolismus – Möglicher Zusammenhang mit ACSL5 Induktion?</b>	<b>84</b>
5.5	<b>ACSL5 unabhängige ultrastrukturelle Alterationen der mitochondrialen Konfiguration</b>	<b>88</b>
5.6	<b>FFAR2, FFAR3 und Mortalin – potentiell ACSL5 abhängig regulierte Moleküle im Enterozyten</b>	<b>91</b>
5.7	<b>Ausblick</b>	<b>94</b>

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>98</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen</b>	<b>113</b>
	10.1 Kongressbeiträge	113
	10.2 Journalbeiträge	113
	<b>Danksagungen</b>	<b>114</b>
	<b>Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung</b>	<b>116</b>

---

# **1. Einleitung**

## **1.1 Lipidkonsum und hiermit assoziierte Erkrankungen in der westlichen Gesellschaft**

Im Hinblick auf die Auswirkungen der Ernährungsweise innerhalb der westlichen Industrienationen hat die intensive wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der Stoffgruppe der Lipide zunehmende Bedeutung erlangt. So stieg in den vergangenen Jahrzehnten der Anteil der Lipide in der Ernährung in diesen Regionen massiv an, sodass heute dort bereits mehr als 30% des täglichen Energiebedarfs durch diese Nährstoffgruppe gedeckt wird (Langhans et al. 2011). Jedoch ist mittlerweile erkennbar geworden, dass dieser Wandel einen wesentlichen Einfluss auf die steigenden Prävalenzen solcher „Zivilisationskrankheiten“ wie Diabetes mellitus Typ II oder die Gruppe der kardiovaskulären Erkrankungen hat. Noch klarer wird dies bei Betrachtung der gastrointestinalen Pathologien. Bereits früh konnte in epidemiologischen Studien nachgewiesen werden, dass ein entsprechend hoher Anteil nutritiver Fette einen bedeutenden Risikofaktor bei der Ätiologie des kolorektalen Karzinoms darzustellen scheint (Wynder und Shigematsu 1967; Burkitt 1978; Giovannucci und Willett 1994). Diese Erkenntnisse wurden jüngst durch neue Daten aus Tiermodellen nochmalig bestätigt. So etwa demonstrierten Park und Kollegen, dass die Rate der kolorektalen Neoplasien auf dem Boden einer chemisch induzierten Kolitis bei Mäusen, die zuvor eine Diät mit hohem Fettanteil erhielten, etwa das Zweifache gegenüber der Kontrollgruppe mit normaler Diät betrug (Park et al. 2011). Liu und Kollegen konnten zudem nachweisen, dass im Kolon von Mäusen nach solch fettreichen Diäten inflammatorische Prozesse und Signalweg-Alterationen (etwa im Wnt-Signalweg) detektierbar waren, wie sie nach heutigem Verständnis auch an der Entstehung dieser Krebserkrankung beteiligt sind (Liu et al. 2011). Insgesamt ist die sozioökonomische Relevanz dieser Lipid-assoziierten Neoplasien nicht zu unterschätzen: Es handelt sich um das häufigste Malignom des Verdauungsapparates. Allein in den USA wurden im Jahr 2011 ca. 141.210 neue Fälle eines kolorektalen Karzinoms diagnostiziert. Zeitgleich verstarben etwa 49.380 Menschen an der Erkrankung (American Cancer Society. Colorectal Cancer Facts & Figures 2011-2013). Bei beiden Geschlechtern stellt das kolorektale Karzinom dabei die dritthäufigste Krebserkrankung insgesamt dar und wird bei den Männern nur durch das Bronchial- und das Prostatakarzinom bzw. bei den Frauen durch Bronchial- und Mammakarzinom in der Prävalenz übertroffen (American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2012). Aber nicht nur die malignen Erkrankungen

des Gastrointestinaltraktes werden durch Lipide beeinflusst, auch die chronisch-inflammatorischen Darmerkrankungen weisen eine Assoziation mit dieser Stoffgruppe auf. Sowohl beim Morbus Crohn, als auch bei der Colitis ulcerosa lieferten epidemiologische Daten Hinweise darüber, dass hier ebenso das Auftreten der pathologischen Alterationen durch die Aufnahme eines hohen Fettanteils mit der Nahrung begünstigt wird (Geerling et al. 2000; Sakamoto et al. 2005; Amre et al. 2007; Hart et al. 2008). Die Auswirkungen der Lipide auf die Gesundheit, insbesondere hinsichtlich des Darmtraktes, lassen sich demnach nicht mehr von der Hand weisen und stellen eine entsprechende Herausforderung für Forschung und Gesellschaft dar.

Um nun die hieran beteiligten molekularen Zusammenhänge sowie den genauen Mechanismus der durch Lipide induzierten Effekte zu verstehen, gilt es eine Reihe von Sachverhalten eingehender zu betrachten:

1. Wie ist der Darm als Ort der Lipidresorption strukturiert?
2. Wo genau findet dort die eigentliche Resorption statt und welche Mechanismen sind wiederum hieran beteiligt?
3. Wie werden die im Darmepithel internalisierten Lipide anschließend vor Ort metabolisiert?
4. Welche regulatorischen Einflüsse weisen Lipide bzw. deren Derivate hierbei auf?
5. Wie kann dieser Stoffwechsel beeinflusst werden und welche Konsequenzen ergeben sich hieraus als Hinweise auf eine Verknüpfung mit anderen Zellprozessen (wie etwa Apoptose oder Seneszenz)?

Ein Teil der hier aufgeworfenen Fragestellungen sind bereits ausgiebig erforscht worden und werden nachfolgend anhand der vorhandenen Literatur erläutert. Die Bedeutung des zentralen Enzyms Acyl-CoA-Synthetase 5 im Lipidmetabolismus, die potentiellen Effekte durch Manipulationen sowie die mögliche Vernetzung mit anderen intrazellulären Signalwegen hingegen sind die Kernthematik der hier aufgeführten Arbeit.

## **1.2 Grundsätzlicher Aufbau des humanen Darmtraktes**

Innerhalb des menschlichen Organismus stellt der Darmtrakt die größte Fläche dar, über die eine Interaktion mit der Umwelt stattfindet. Es ist dasjenige Organsystem, welches für die Resorption solcher exogener Substanzen von Bedeutung ist, die zur Aufrechterhaltung der körpereigenen Prozesse ständig benötigt werden. Gemäß der



jeweiligen Funktion der verschiedenen Darmabschnitte lassen sich dabei deutliche Unterschiede hinsichtlich des strukturellen Aufbaus erkennen.

So erfolgt zunächst die mechanische Zerkleinerung und Passage der aufgenommenen Nahrung über Pharynx, Ösophagus und Magen. Im Anschluss findet im je nach Kontraktionszustand ca. 3 bis 6 m langen Dünndarm mit seinen Anteilen *Duodenum* (Zwölffingerdarm), *Jejunum* (Leerdarm) und *Ileum* (Krummdarm) die enzymatische Aufspaltung der im Chymus (Speisebrei) enthaltenen Nahrungsbestandteile statt. Erst jetzt kann die eigentliche Internalisation der aufgeschlüsselten Bausteine aus dem Darmlumen in den Organismus ablaufen. Hierzu weist die Schleimhaut in diesem Bereich Krypten und Zotten mit Mikrovilli-Besatz auf.

Der hierauf folgende bis zu etwa 1,5 m lange Dickdarm mit der weiteren Unterteilung in *Caecum* (Blinddarm), *Appendix vermiformis* (Wurmfortsatz), *Colon* und *Rectum* (Mastdarm) dient hingegen vornehmlich der Rückresorption von Wasser und Elektrolyten. In diesem Bereich lassen sich nur noch Krypten, jedoch keine Zotten mehr nachweisen (Lüllmann-Rauch 2003).

### 1.2.1 Wandaufbau des Darmtraktes

Prinzipiell ist die Wandung des Verdauungskanals in allen Abschnitten gleich strukturiert und weist die nachfolgend beschriebene Gliederung auf:

Die innerste Wandschichtung stellt die Darmmukosa (*Tunica mucosa*) dar. Diese wiederum setzt sich weiter aus dem eigentlichen Epithel (*Lamina epithelialis mucosae*) mit seinen Stammzellen und den daraus reifenden vier Zelltypen der Schleimhaut, der *Lamina propria mucosae* und der aus glatten Muskelzellen bestehenden *Lamina muscularis mucosae* zusammen. In der stark vaskularisierten Lamina propria finden sich die finalen Verzweigungen von Nerven und Blutgefäßen, ein dichtes Netz aus Lymphkapillaren sowie eine Vielzahl freier Immunabwehrzellen. Die Muscularis mucosae hingegen ermöglicht der Mucosa eine gewisse Eigenmotilität. Hierauf folgt als Verschiebeschicht gegenüber der darüber gelegenen Muskulatur (*Tunica muscularis*) die aus lockerem Bindegewebe bestehende Submucosa (*Tela submucosa*). Die Muscularis wiederum lässt sich weiter in eine innere Ringmuskel- (*Stratum circulare*) und eine äußere Längsmuskelschicht (*Stratum longitudinale*) differenzieren und dient der gerichteten Peristaltik. Im Bereich des Caecums und des Colons ist besagte Längsmuskelschicht jedoch auf drei Längsbänder, die Tānien, reduziert. Als

äußerste Schicht schließt sich abhängig vom jeweiligen Abschnitt des Darmtraktes und seiner Lage im intra- bzw. retroperitonealen Raum letztlich entweder ein Überzug aus viszeralem Peritoneum (*Tunica serosa*) oder dem umliegenden Bindegewebe (*Tunica adventitia*) an.

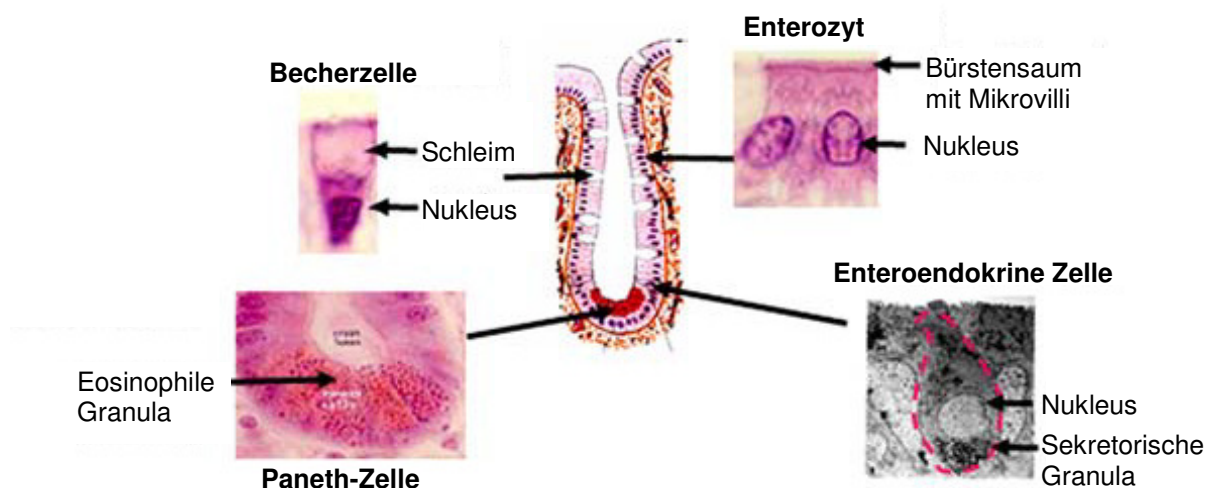
Die bereits oben genannten Zotten (*Villi intestinales*) entstehen durch fingerartige Ausstülpungen des Epithels und der Lamina propria der Mucosa, während die Krypten (*Lieberkühn-Krypten* bzw. *Glandulae intestinales*) Einstülpungen des Epithels in die Lamina propria darstellen und bis zur Muscularis mucosae hineinreichen. Sie münden entweder wie im Dünndarm im Bereich zwischen den Zotten-Basen oder aber wie im Dickdarm frei auf der Oberfläche (Lüllmann-Rauch 2003).

### 1.2.2 Zelltypen innerhalb der Darmschleimhaut

Die dominierende Zellpopulation der Darmmucosa ist der *Enterozyt*, der sowohl im Dünndarm, als auch im Dickdarm die eigentlichen resorptiven Funktionen erfüllt, worauf im weiteren Verlauf ausführlicher eingegangen wird (siehe Kapitel 1.3). Daneben existieren aber noch weitere Zellgattungen, die am Aufbau der Mucosa beteiligt sind: Die *Becherzellen* (auch Goblet-Zellen genannt), *Paneth-Zellen* und die *enteroendokrinen Zellen* (vgl. Abb. 1-1). *Becherzellen* sind muköse Drüsenzellen, die in ihrer Häufigkeit von oral nach rektal hin zunehmen und deren Schleim eine Reihe von Funktionen innehat. Einerseits fungiert er als Gleitmittel, das den Abtransport des Darminhaltes erleichtert. Darüber hinaus werden durch diese Zellen sekretorische Mucin-Glykoproteine wie MUC2, Membran gebundene Muzine, etwa MUC1, MUC3 oder MUC7, sowie weitere Membran ständige Substanzen wie Fc- $\gamma$  bindendes Protein, trefoil factor peptides (TFF) bzw. resistin-like molecule  $\beta$  (RELM $\beta$ ) sezerniert (Kim und Ho 2010). Diese Bestandteile stellen allesamt eine wesentliche Grundlage der angeborenen Immunabwehr des intestinalen Systems dar und hindern Mikroorganismen an der Translokation aus dem Darmlumen. Die Gruppe der *Paneth-Zellen* hingegen findet sich vornehmlich im Abschnitt des Dünndarms und ist dort wiederum im Kryptengrund lokalisiert. Auch diese Zellen sind für die intestinale Immunität von entscheidender Bedeutung, weisen sie doch im apikalen Zytoplasma eosinophile, mit Lysozym gefüllte Granula auf (Erlandsen et al. 1974) Dieses Enzym dient der Spaltung von Muraminsäure, einem Bauteil von bakteriellen Zellwänden. Des Weiteren produzieren und sezernieren Paneth-Zellen noch zusätzliche antibakteriell wirksame Substanzen wie etwa  $\alpha$ -Defensine oder inflammatorische Mediatoren wie tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Auch gibt es

Hinweise darauf, dass diese Zellen solche intrazellulären Signalmoleküle wie NOD2 exprimieren und somit Entzündungsvorgänge der intestinalen Mucosa bis hin zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wesentlich beeinflussen (Keshav 2006). Die letzte große Zellpopulation innerhalb des humanen Darmtraktes stellen die *enteroendokrinen Zellen* (auch „basal gekörnten“ Zellen genannt) dar. Sie kommen in den Zotten und Krypten von Dün- und Dickdarm vor. Enteroendokrine Zellen fungieren als „Sensoren“ innerhalb des Gastrointestinaltraktes und setzen Peptidhormone (z.B. Cholezystokinin, Peptid YY (PYY) oder Gastrin) sowie biogene Amine (etwa Serotonin) frei (Ahlmán und Nilsson 2001). Die Abgabe solcher Signalmoleküle wird chemisch durch Bestandteile des Chymus oder aber durch mechanische Stimuli der Mucosa, beispielsweise Dehnung des Lumens, hervorgerufen. Sie wirken anschließend ihrerseits entweder unmittelbar parakrin auf die benachbarten Zellen oder gelangen endokrin über den Blutweg zu ferner gelegenen Afferenzen. So regulieren sie etwa die Motilität der Darmmotorik, die Dämpfung des Appetits im zentralen Nervensystem oder beeinflussen die pankreatische Freisetzung von Insulin im Rahmen der anabolen Stoffwechselprozesse bei Nahrungsaufnahme. In neueren Studien konnten zunehmend Hinweise darauf gewonnen werden, dass diese sensorisch-regulativen Effekte der enteroendokrinen Zellen entscheidend durch die Anwesenheit von freien Fettsäuren getriggert werden. Wesentlich hierfür ist dabei eine Gruppe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die als *free fatty acid receptors* (FFARs) bezeichnet werden (Hirasawa et al. 2005; Edfalk et al. 2008; Tazoe et al. 2008) (vgl. Kapitel 1.4).

Somit kann man zusammenfassend festhalten, dass der humane Darmtrakt nicht nur den Ort der Resorption lebensnotwendiger Substanzen für den Organismus, sondern zugleich auch die erste Barriere der Immunabwehr darstellt. Zudem wird immer deutlicher, dass er darüber hinaus zusätzlich eine besondere Funktion hinsichtlich der Regulation der weiteren Prozesse zur Energiehomöostase im Körper hat. Hier werden bereits die ersten Schritte der weitergehenden anabolen Vorgänge nach Nahrungsaufnahme geschaltet, noch bevor die absorbierten Nahrungsbestandteile die Leber als zentrales metabolisches Organ erreichen. Fettsäuren als Lipidderivate scheinen in diesem Zusammenhang essentielle Aufgaben als Signalsubstanzen zu erfüllen.



**Abb. 1-1: Schematische Darstellung der vier hauptsächlichen Zelltypen im Darmtrakt.**

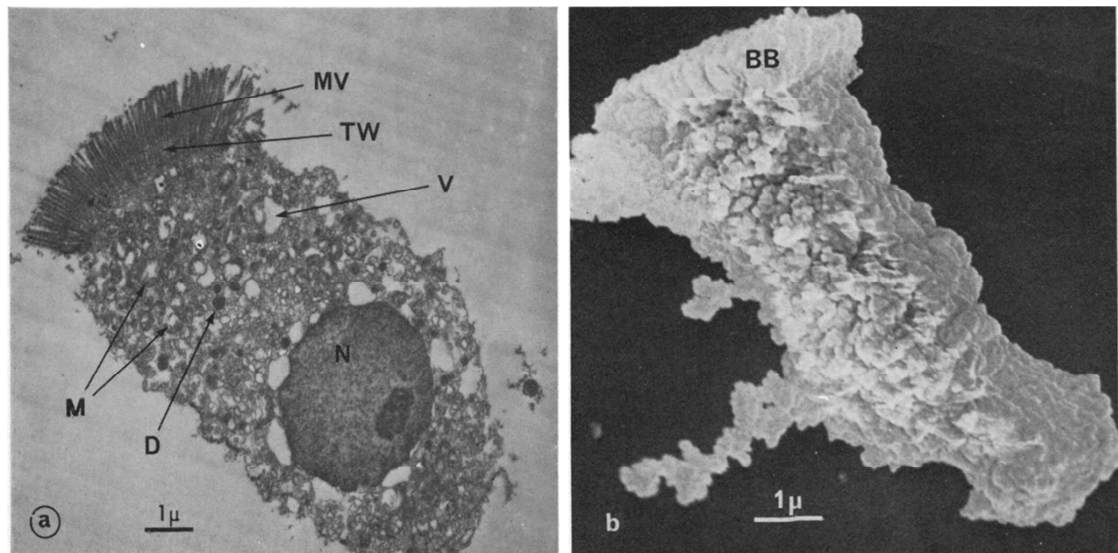
Innerhalb des Gastrointestinaltraktes differenzieren sich die im Bereich der Krypten gelegenen Stammzellen der Mucosa in die vier oben abgebildeten Zellgattungen. Dabei wandern die resultierenden Enterozyten, Becherzellen und enteroendokrinen Zellen im Rahmen ihrer Reifung allmählich entlang der Zotten, während die entstehenden Paneth-Zellen entgegengesetzt in Richtung des Krypten-Grundes migrieren. (modifiziert nach Simon-Assmann et al. 2007)

## 1.3 Anatomie und Physiologie der Enterozyten

### 1.3.1 Ultrastrukturelle Besonderheiten der Enterozyten

Wie bereits zuvor in Kapitel 1.2 angedeutet, wird die eigentliche resorptive Leistung der intestinalen Mucosa durch die Enterozyten erbracht. Sie stellen die kleinste Funktionseinheit dieses transportierenden Epithels dar und sind eines derjenigen Gewebe mit dem höchsten Zellumsatz. So beträgt die Lebensdauer eines ausdifferenzierten Enterozyten ca. 5 Tage bis er auf seiner Migration in Richtung Zottenspitze letztlich aus dem Zellverband gelöst und mit dem Darminhalt ausgeschieden wird. Um seiner Funktion gerecht zu werden, handelt es sich um einen hochprismatischen Zelltypus mit polarem Aufbau (vgl. Abbild. 1-2). Dies gewährleistet einen gerichteten Transport. Die dabei mit dem Darmlumen in Kontakt stehende apikale Membran ist durch ihre Anordnung in Form eines aus Mikrovilli bestehenden Bürstensaums massiv vergrößert. Auf diese Weise bietet sie ausreichend Fläche für die Vielzahl an Ektoenzymen und Transportmolekülen, die spezifisch für die Internalisation der einzelnen Nahrungsbestandteile sind. Zudem ist dieser Bereich der Zellmembran mit einer breiten Glykokalyx ausgestattet. Der Nukleus ist hingegen basolateral angeordnet. Eine Vielzahl an Mitochondrien gewährleistet eine ausreichende Energiebereitstellung. Ferner sind auch das raue

endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat und das Endosom-Lysosom-System ausgeprägt entwickelt. Diese strukturellen Gegebenheiten der Zellorganellen ermöglichen erst, dass die Zellen ihre Aufgaben bei der Resorption und Synthese der aufgenommenen Nährstoffe erfüllen können. Zwischen den Enterozyten selbst verhindern sog. Tight junctions einen unkontrollierten parazellulären Transport und dienen somit als Diffusionsschranke (Lüllmann-Rauch 2003; Drenckhahn und Zenker 1994).



**Abb. 1-2: Darstellung isolierter Enterozyten aus Ratte und Meerschweinchen**

Sowohl in der transmissionselektronenmikroskopischen (a), als auch in der Abtastung der Zelloberfläche mittels Elektronenmikroskopie (b) ist deutlich die polare Ausrichtung der Enterozyten zu erkennen. Dabei bildet der ersichtliche Bürstensaum die apikale Seite der Zellmembran, während die basolaterale Membran ohne solche Oberflächenerweiterungen konfiguriert ist. Innerhalb der TEM-Aufnahme sind dabei zusätzlich die verschiedenen Organellen darstellbar: MV: Mikrovilli, TW: Terminales Netz (Verankerung der Mikrovilli), V: Vakuolen, M: Mitochondrien, N: Nukleus, D: Dense bodies (vermutlich Lysosomen), BB: Bürstensaum (nach Marsh et al. 1971)

### 1.3.2 Resorption von Kohlenhydraten und Proteinen in Enterozyten

Die Aufnahme der Nährstoffe aus der zugeführten Nahrung ist, wie zuvor angeführt, ein aktiver und gerichteter Prozess, welcher von einer Reihe komplexer Komponenten abhängt. Dabei sind wesentliche Unterschiede hinsichtlich der verschiedenen Mechanismen zur Resorption der Kohlenhydrate, Proteine und Lipide aus dem Chymus zu beachten. Innerhalb dieser Ausführungen soll der Schwerpunkt auf dem Lipidmetabolismus und seine etwaigen Verknüpfungen mit anderen intrazellulären Signalwegen liegen. Daher werden die hieran beteiligten Vorgänge ausführlicher abgehandelt, während diejenigen Geschehnisse bei der

Verdauung von Kohlenhydraten und Proteinen nur in verkürzter Darstellung beleuchtet werden. Generell ist aber allen Nährstoffen gemein, dass sie vor der eigentlichen Aufnahme und dem transzellulären Transport durch den Enterozyten zunächst aufgespalten werden müssen.

So werden *Kohlenhydrate* bereits recht früh während der Passage des Gastrointestinaltraktes durch Amylasen aus den Speicheldrüsen und dem Pankreas in Oligosaccharide und Maltose erschlossen. Im Jejunum angelangt, werden diese dann durch die am Bürstensaum der Enterozyten lokalisierten Ektoenzyme Lactase, Sucrase und Maltase zu Monosacchariden (Glucose, Fructose, Maltose und Galactose) zersetzt. Diese können anschließend über spezifische Transportersysteme aktiv durch die Zelle durchgeschleust und in das Blut abgegeben werden. So etwa erfolgt der Transfer von Glucose im Rahmen eines Natrium-abhängigen Transportmechanismus (Drenckhahn und Zenker 1994).

Bei der Aufnahme von *Proteinen* bewirken die im Doudenum sekretierten pankreatischen Peptidasen wie Trypsin oder Chymotrypsin intraluminal eine Hydrolyse zu Oligopeptiden. Auch diese werden nochmals durch weitere Peptidasen des enterozytären Bürstensaums in Aminosäuren, aber auch in Di- bzw. Tripeptide gespalten und daraufhin mittels spezieller Transportmoleküle wie etwa dem Protonen-abhängigen PEPT1 in den Enterozyten geleitet (Daniel 2004). Von dort aus gelangen sie über weitere Carriersysteme auf der basolateralen Membran letztlich ebenso in die Blutbahn.

### **1.3.3 Resorption und Metabolismus von Lipiden in Enterozyten**

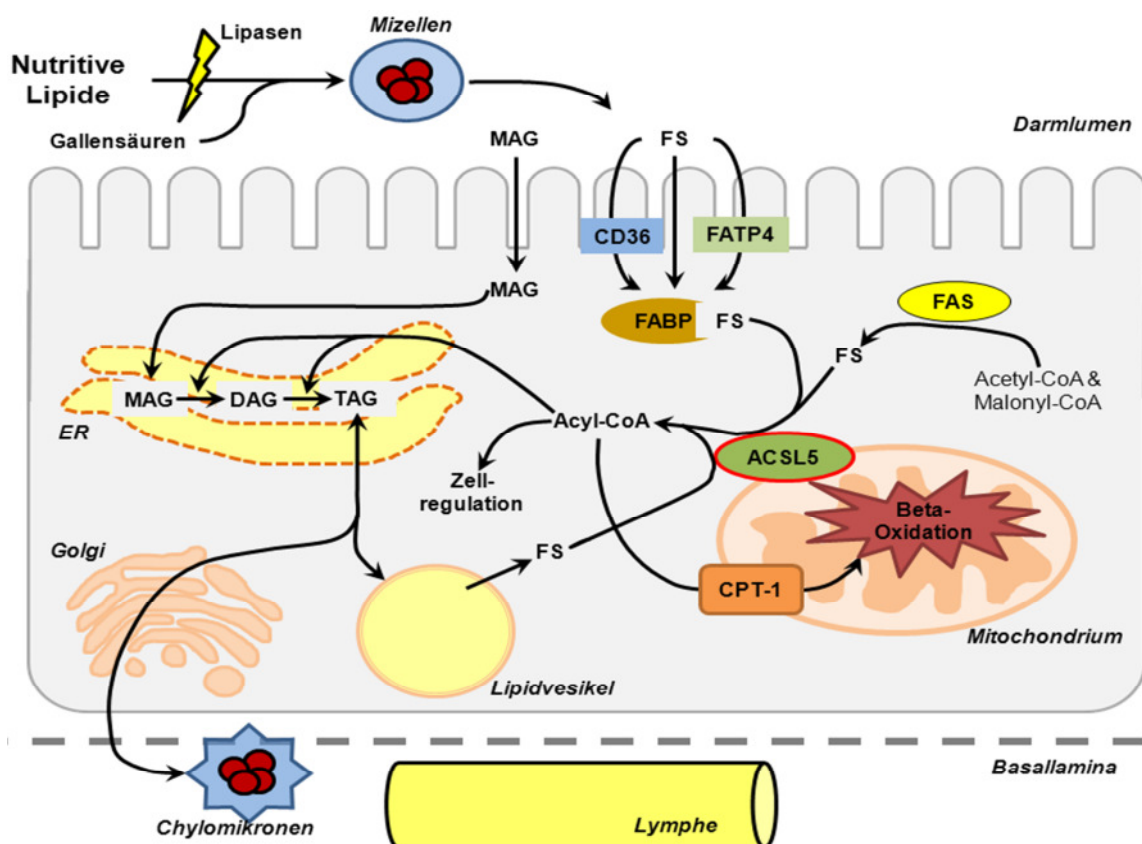
Die mit der Nahrung zugeführten wasserunlöslichen Lipide, vornehmlich Triacylglycerole, werden zunächst durch Lipasen aus Speicheldrüsen und Magen emulgiert (Hamosh und Scow 1973; Gargouri et al. 1989). Es kommt zur Ausbildung kleiner Lipidtröpfchen, wodurch sich die Oberfläche für die weitere enzymatische Aufspaltung nochmals vergrößert. Dies ist eine wesentliche Voraussetzung für die weitere Resorption, die nun im Lumen des Dünndarms stattfindet. Dort bewirkt Pankreaslipase eine erneute Hydrolyse der aufgenommenen Fette zu freien Fettsäuren und Monoacylglycerolen, während die durch die Leber sekretierten Gallensäuren die Ausbildung sog. Mizellen stimuliert. Anschließend erfolgt die Aufnahme in die Enterozyten auf zweierlei Weise: Die Mizellen, aber auch Fettsäuren und Monoacylglycerol sind in der Lage einerseits mittels Diffusion die Lipiddoppelschicht der apikalen Zellmembranen zu passieren (Shiau 1981; Ros 2000). Die intraluminal frei vorkommenden Monomere der Fettsäuren und

Monoacylglycerole können aber gleichzeitig auch über aktive Transportvorgänge mit solchen Proteinen wie etwa CD36 oder Fettsäuretransportprotein-4 (FATP4) in das Zytoplasma der Enterozyten gelangen (Shiau 1981; Mansbach und Gorelick 2007). Dort angekommen, wird Monoacylglycerol unmittelbar in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Die internalisierten Fettsäuren hingegen werden im intrazellulären Raum sofort durch die Gruppe der sog. Fettsäure-bindenden Proteine (FABP) gebunden. Diese Proteinklasse umfasst drei Vertreter, von denen im Darmtrakt die Isoform des intestinalen FABP (I-FABP) überwiegt (Agellon et al. 2002). Damit die Fettsäuren nun den weiteren biochemischen Prozessen innerhalb der Enterozyten zur Verfügung stehen, müssen diese erst initial durch die Enzymgruppe der Acyl-CoA-Synthetasen (ACS bzw. ACSL) aktiviert werden. Diese Reaktion stellt den zentralen Schritt innerhalb des weiteren Lipidmetabolismus dar, wobei man die ACSL5 als vorherrschende enterozytäre Isoform identifizierte (Oikawa et al. 1998) (siehe Kapitel 1.5.1 für weitere Ausführungen).

In ihrer Funktion als transportierendes Epithel werden diese durch Coenzym A (CoA) aktivierten Fettsäuren nun weiter benötigt, um mit ihrer Hilfe die Resynthese der Triacylglycerole voranzutreiben. Zudem sind die dargelegten Vorgänge der Lipidresorption essentiell für die suffiziente Versorgung des Organismus mit solchen lipidlöslichen Verbindungen wie etwa den Vitaminen A, K, D und E. Deren Internalisierung erfolgt im Zuge der enteralen Lipidaufnahme und auch der weitere Transport ist abhängig von den entstehenden Lipidkörpern. So wird nunmehr ein Großteil der Fettsäuren ebenfalls in das endoplasmatische Retikulum geleitet, um dort in einer zweiseitigen Reaktion unter Verbrauch der Monoacylglycerole erneut Triacylglycerol zu synthetisieren (Langerhans et al. 2011). Ist diese Veresterung abgeschlossen, werden die neu entstandenen Triacylglycerole in den Golgi-Apparat exportiert (Mansbach und Nevin 1998). Dort werden die Lipide letztlich zusammen mit sog. Apolipoproteinen und Phospholipiden in Form von Chylomikronen organisiert und über die basolaterale Zellmembran an die Lymphe abgegeben, sodass ein weiterer Transport zur Leber stattfinden kann. Darüber hinaus können die Enterozyten zusätzlich einen Teil der resorbierten Triacylglycerole als zytoplasmatische Lipidvesikel speichern (Robertson et al. 2003). Infolge des sehr schnellen Zellumsatzes dienen diese Reservoirs zwar nicht der Langzeitspeicherung, sie können aber vorübergehend einen Überschuss an Lipiden aufnehmen und somit potentielle lipidtoxische Effekte, etwa nach sehr fettreicher Nahrungsaufnahme, abwenden (Zhu et al. 2009). Bei Bedarf gelangen die zwischengespeicherten Lipide nach Hydrolyse zurück in das endoplasmatische Retikulum, wo hieraus erneut Triacylglycerole synthetisiert und anschließend Chylomikronen formiert werden können.

All diese anabolen zellulären Vorgänge verbrauchen jedoch Energie. Deshalb wird ein Teil der internalisierten Fettsäuren nach Aktivierung unter Beteiligung der Acyl-CoA-Synthetase 5 (ACSL5) der Beta-Oxidation im Mitochondrium zugeführt. Hierzu werden die mit Coenzym A zu Acyl-CoA Thioestern verknüpften langkettigen Fettsäuren mittels eines spezifischen Carriersystems in die mitochondriale Matrix geschleust. Entscheidend dabei ist die sog. Carnitin-Palmityl-Transferase 1 (CPT-1), die innerhalb der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und gemeinsam mit der CPT-2 sowie der Carnitin-/Acyl-Carnitin Translokase diesen Prozess steuert (McGarry und Brown 1997). Erst danach ist die eigentliche Degradation unter Energiefreisetzung möglich.

Neben den bisherigen Ausführungen, die sich auf solche Lipidderivate aus exogenen Quellen beziehen, muss man jedoch zusätzlich berücksichtigen, dass die Enterozyten auch zur *de novo* Synthese von Fettsäuren befähigt sind. Durch das in ihnen enthaltene Enzym Fettsäure-Synthase (FAS) können die Zellen aus den kleineren Molekülen Acetyl-CoA und Malonyl-CoA langkettige Fettsäuren, vornehmlich Palmitinsäure, herstellen (Wakil 1989) und ebenso dem Stoffwechsel zuführen. Anhand der Abbildung 1-3 soll jetzt nochmals ein kurzer Überblick über die Gesamtheit der hier schon vorab erläuterten Mechanismen gegeben werden:



**Abb. 1-3: Schema des Lipidmetabolismus innerhalb des Enterozyten**

In der vereinfachten Darstellung werden lediglich diejenigen metabolischen Signalwege bzw. Enzyme präsentiert, die zum Verständnis der in dieser Arbeit ►



thematisierten Zusammenhänge von Bedeutung sind. Für eingehendere Informationen wird auf den Text verwiesen. ACSL5: Acyl-CoA-Synthetase 5; FABP: Fettsäure-bindendes Protein; FATP4: Fettsäuretransportprotein-4; FAS: Fettsäure-Synthase; CPT-1: Carnitin-Palmityl-Transferase 1; FS: Fettsäure; Acyl-CoA: Acyl-Coenzym A Thioester; MAG: Monoacylglycerol; DAG: Diacylglycerol; TAG: Triacylglycerol; ER: endoplasmatisches Retikulum. (*verändert und erweitert nach Langhans et al. 2011*)

Es wird also deutlich, dass der Lipidmetabolismus innerhalb der Enterozyten eine große Komplexität besitzt und vielfache Verknüpfungen zwischen den ablaufenden anabolen Reaktionen wie etwa der Synthese von Triacylglycerol, Phospholipiden oder anderen intrazellulären Lipidderivaten einerseits und den katabolen Prozessen wie der Beta-Oxidation andererseits existieren. Gemein ist allen hieran beteiligten Vorgängen jedoch, dass sie aktivierte Fettsäuren als ausgängliches Substrat benötigen. Als Quellen hierfür stehen dabei (1) die unmittelbar aus dem Darmlumen resorbierten nutritiven Fettsäuren, (2) die bereits intrazellulär in Lipidvesikeln gespeicherten Fettsäuren oder (3) die erst durch die Zelle selbst mittels FAS neusynthetisierten Fettsäuren zur Wahl.

## 1.4 Fettsäuren – Mehr als bloße Energielieferanten

Nachdem nun in Kapitel 1.3 ausgiebig über die Komponenten und Mechanismen berichtet wurde, welche an Lipidresorption und -metabolismus beteiligt sind, sollen nun vielmehr die Fettsäuren als solche eingehender diskutiert werden. Diese Molekülfamilie stellt nicht nur eine bedeutende Gruppe an Energielieferanten für die Zelle dar, sondern erfüllt zudem noch eine Reihe weiterer Funktionen. Dazu bedarf es aber zunächst der Aktivierung langkettiger Fettsäuren zu sog. Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA) Thioestern. Diese Ligase-Reaktion wird von einer Reihe verschiedener Enzyme bewerkstelligt, wobei die Gruppe der Acyl-CoA-Synthetasen eine zentrale Stellung einnehmen (vgl. Kapitel 1.5). Erst danach können diese Verbindungen in die entsprechenden Signalwege bzw. Prozesse eingeschleust werden, sodass diese Reaktion den essentiellen Schritt innerhalb des Lipidmetabolismus markiert.

Einmal aktiviert, beeinflussen die entstandenden Acyl-CoA Thioester eine ganze Fülle intrazellulärer Regelsysteme, nicht nur die Lipidsynthese oder Beta-Oxidation, sondern vielmehr auch eine Vielzahl an weiteren Enzymen wie Kinasen, Proteasen, Transporterproteinen, Ionenkanälen und -pumpen (Faergeman und Knudsen 1997). Zudem sind sie Baustoffe für die Ausbildung von sog. Phospholipiden als Grundbaustein jeglicher Zellmembranen. Ferner sind Fettsäuren und ihre Derivate

aber anscheinend auch in der Regulation der Genexpression involviert. So konnte bereits früh in *Escherichia coli* der Einfluss solcher Thioester-Verbindungen auf den Transkriptionsfaktor FadR aufgedeckt werden (Black und DiRosso 1994). FadR ist von globaler Bedeutung für die bakterielle Fettsäuresynthese bzw. –degradation im Rahmen der Energiegewinnung. Die langkettigen Acyl-CoA Thioester fungieren dabei als Liganden des Transkriptionsfaktors. Sobald sie an FadR binden, erfährt dieser eine Konformationsänderung und kann nicht mehr an die entsprechenden DNA-Sequenzen interagieren. Die Transkription ist folglich nicht möglich. In Abwesenheit von Acyl-CoA dagegen kann sich der Transkriptionsfaktor ungehindert an die für ihn spezifischen Bereiche des Genoms anlagern (van Aalten et al. 2001). Auf diese Weise hat der intrazelluläre Fettsäuregehalt direkten Einfluss auf die mit ihm verknüpften Mechanismen. Aber nicht nur auf bakterieller Ebene lassen sich solche Auswirkungen von aktivierten Fettsäurederivaten feststellen, auch in höheren Organismen wie Hefen oder gar Säugern existieren mittlerweile Daten, die eine solche Vermutung stützen (Black et al. 2000). So konnten Li und Kollegen im Jahr 1993 nachweisen, dass sich langkettige Acyl-CoA *in vitro* mit hoher Affinität ebenso am nuklearen Thyroidrezeptor T3 anlagern und dadurch diesen inhibieren (Li et al. 1993). Auch die Liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren *hepatic nuclear factor 4alpha* (HNF-4 $\alpha$ ) bzw. *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) mit entscheidender Bedeutung für die Genexpression von Proteinen im Rahmen des Lipidmetabolismus sind in ihrer Funktion scheinbar durch langkettige Fettsäuren reguliert (Hertz et al. 1998; Wolf 1998; Grimaldi 2007).

Mit der Entdeckung der Gruppe der *free fatty acid receptors* (Freie-Fettsäure-Rezeptoren bzw. FFARs) sowie *GPR120* hat sich jüngst die Bedeutung der Fettsäuren als Signalmoleküle nochmals gewandelt. Nunmehr liegen neue Beweise vor, dass freie Fettsäuren auch ohne direkte Vermittlung von weiteren Molekülen im Zytoplasma unmittelbare Einflüsse auf die Zellhomöostase ausüben können. Diese Rezeptoren aus der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPR) nutzen die freien Fettsäuren als Liganden, durch deren Anlagerung wiederum eine Signalkaskade induziert wird.

#### 1.4.1 Freie-Fettsäure-Rezeptoren (FFARs)

Zu dieser Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehören die bisher bekannten drei Vertreter FFAR1, FFAR2 und FFAR3, die unmittelbar dem CD22 Gen auf Chromosom 19q13.1 folgen (Sawzdargo et al. 1997). Trotz ihrer hohen genetischen Homologie divergieren die einzelnen Rezeptoren hinsichtlich ihres

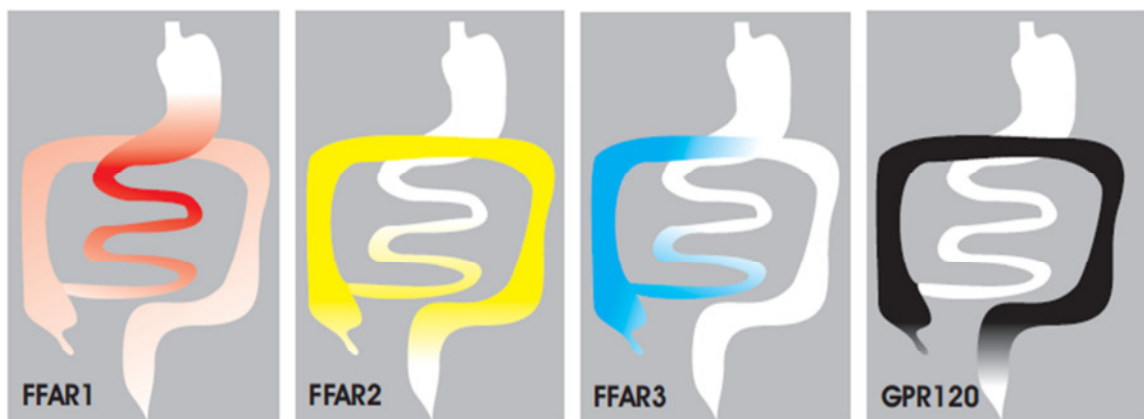
jeweils präferierten Substrates: Während FFAR1 eher mittel- und langkettige Fettsäuren (> 6C) als Liganden nutzt, interagieren FFAR2 und FFAR3 dagegen vornehmlich mit kurzkettigen Fettsäuren (C2 bis C6) (Briscoe et al. 2003; Brown et al. 2003; Kaemmerer et al. 2010). Zusätzlich variiert ihre Verteilung inner- und außerhalb des Gastrointestinaltraktes, genauso wie die letztlich transduzierten Effekte.

So ist *FFAR1*, auch GPR40 genannt, besonders deutlich innerhalb der pankreatischen Beta-Inselzellen zu detektieren, wo er infolge einer intrazellulären Kalziumerhöhung eine Insulinfreisetzung reguliert (Itoh et al. 2003; Morgan und Dhayal 2009). Aber auch in den Glukagon-produzierenden Alpha-Zellen des Pankreas sowie enteroendokrinen Zellen vom Pylorus bis zum Kolon konnte dieser Rezeptortyp identifiziert werden (Edfalk et al. 2008). Da im Rahmen dieser Studien anhand eines Lac-Operon Mausmodells eine FFAR1-abhängige Beeinflussung der Proteine GLP1-(Glucagon-like Peptide 1) und GIP (Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid) nachgewiesen wurde, vermutet man eine Beteiligung von FFAR1 am sog. Inkretin-Effekt. Außerdem wurde jüngst anhand der isolierten Doudenalmukosa transgener Mäuse eine unmittelbare FFAR1-vermittelte und durch langkettige Fettsäuren stimulierte Freisetzung von Cholecystokinin (CKK) gezeigt (Liou et al. 2011).

Demgegenüber kommt *FFAR2*, alternativ als GPR43 bekannt, hauptsächlich innerhalb der Mukosa von Ileum und Kolon vor, wo der Rezeptor bereits enteroendokrinen Zellen, Mastzellen und kolischen Enterozyten zugeordnet werden konnte. Dort kommt es infolge einer Zufuhr kurzkettiger Fettsäuren zur Freisetzung von PYY (Peptid YY) und 5-HT (5-Hydroxytryptamin), was wiederum die Motilität des Dickdarms deutlich steigert. Die gewonnenen Daten ermöglichen daher den Rückschluss darauf, dass FFAR2 demnach ein potentieller Mechanismus ist, über den eine geordnete Darmpassage reguliert wird (Karakı et al. 2006; Tazoe et al. 2008). Ferner scheint FFAR2 (gemeinsam mit FFAR3) möglicherweise ebenso an intestinalen Entzündungsprozessen beteiligt zu sein. So wird ein möglicher Zusammenhang der durch Fermentation über die Darmflora entstandenen freien kurzkettigen Fettsäuren mit einer FFAR2 assoziierten inflammatorischen Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen diskutiert (Vinolo et al. 2011).

*FFAR3*, früher auch als GPR41 bezeichnet, weist eine ähnliche intestinale Verteilung auf wie FFAR2, wobei die höchsten Expressionsraten ebenso im Bereich des distalen Ileums und dem (proximalen) Kolon zu verzeichnen sind. Dort ist zusätzlich auffällig, dass der Rezeptor neben seinem Vorkommen in enteroendokrinen Zellen vor allem in Enterozyten der apikalen Epithelregionen,

weniger jedoch in den Krypten vorzufinden ist. Zudem liegt seine subzelluläre Lokalisation eher im zytoplasmatischen Raum, die Zellmembran selbst scheint frei hiervon zu sein. In den für FFAR3 positiven enteroendokrinen Zellen besteht zudem eine Koexpression von PYY (Tazoe et al. 2009). Außerhalb des Gastrointestinaltraktes lässt sich der Rezeptor (zusammen mit FFAR2) noch in Adipozyten nachweisen. So etwa konnte bei Experimenten mit murinen Adipozyten-Zelllinien und FFAR3-defizienten Mäusen eine von FFAR3 beeinflusste Leptinfreisetzung nach Stimulation durch kurzkettige Fettsäuren gezeigt werden (Zaibi et al. 2010). Dies lässt die Vermutung zu, dass Fettsäuren auf diese Weise direkten Einfluss auf die Nahrungsaufnahme haben und als Energiesensoren fungieren.



**Abb. 1-4: Schematische Darstellung der Verteilung der Rezeptortypen für freie Fettsäuren**

Anhand der abgebildeten Graphiken wird die regionale Distribution der sog. FFARs und GPR120 innerhalb des Gastrointestinaltraktes illustriert. Um eine bessere Übersicht zu erhalten, werden in dem Schema für FFAR1 Magen und Duodenum vor dem Kolonrahmen gezeigt. Für eingehendere Informationen bezüglich der Rezeptortypen sei auf den Text der Kapitel 1.4.1 und 1.4.2 verwiesen.

#### 1.4.2 G-Protein gekoppelter Rezeptor 120 (GPR120)

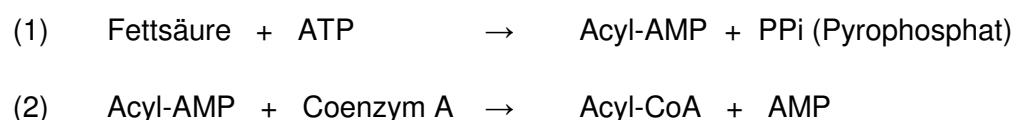
Der zur Rhodopsin Gruppe innerhalb der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehörende *GPR120* ist auf dem Chromosom 10q23.33 lokalisiert (Fredriksson et al. 2003). Ähnlich wie FFAR1 nutzt GPR120 langkettige gesättigte Fettsäuren (C14 bis C18) bzw. einfach- oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren von C16 bis C22 Länge als Liganden (Hirasawa et al. 2005; Morgan und Dhayal 2009). Mittels *in situ* Hybridisierung konnte man den Rezeptor innerhalb enteroendokriner Zellen des Kolons detektieren. Dort scheint GPR120 ähnlich wie FFAR1 an der Freisetzung von GLP-1 beteiligt zu sein, wie *in vitro* Untersuchungen an einer murinen

enteroendokrinen Zelllinie, aber auch *in vivo* Analysen an der Maus demonstrierten (Hirasawa et al. 2005). Des Weiteren findet man GPR120 auch in Adipozyten und Makrophagen (Gotoh et al. 2007; Oh et al. 2010). So bewirkt eine Fettsäurevermittelte Aktivierung in Adipozyten die gesteigerte Aufnahme von Glukose und Induktion der Adipogenese, während die Stimulation in Makrophagen dagegen eher anti-inflammatorische Effekte bewirkt. Letztlich konnte jüngst ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Detektion von freien Fettsäuren durch diesen Rezeptor im Bereich der Geschmacksknospen eine mögliche Beteiligung an der gustativen Perzeption beim Menschen innehat. In Nagern gab es bereits früher Hinweise diesbezüglich (Galindo et al. 2012).

## 1.5 Langkettige Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs)

### 1.5.1 Acyl-CoA-Synthetasen – Ein kurzer Überblick

Die Enzymgruppe der sog. langkettigen Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs) ist, wie zuvor bereits angesprochen, durch ihre Eigenschaft der Aktivierung von langkettigen Fettsäuren essentiell für den zellulären Lipidmetabolismus (vgl. Kapitel 1.3 bzw. 1.4). Dabei katalysieren sie eine zweistufige Reaktion, in Rahmen dessen es zur Ligation von Coenzym A an die hydrophoben Moleküle kommt. Initial erfolgt hierbei zunächst unter ATP-Verbrauch die Ausbildung von Acyladenylat (Acyl-AMP). Im zweiten Schritt verdrängt Coenzym A dann das entstandene AMP und lagert sich stattdessen an den verbleibenden Acyl-Rest an:



Infolge dieser Ausbildung einer äußerst energiereichen Thioesterbindung zwischen der Carboxy-Gruppe der Fettsäure und der Sulfhydryl-Gruppe des Coenzym A wird deren chemische Reaktivität massiv erhöht. Jedoch sind die ACSLs nicht die einzige Enzymgruppe, die zur Katalyse von Acyl-CoA befähigt ist. Anhand der jeweiligen Substratspezifität in Abhängigkeit von der Anzahl der Kohlenstoffatome im Fettsäure-Molekül konnte mittlerweile eine ganze Reihe an Enzymen mit Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität klassifiziert werden: So differenziert man heute in ACSS (short-chain: C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>), ACSM (medium-chain: C<sub>4</sub>-C<sub>12</sub>), ACSL (long-chain: C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>), ACSBG (bubblegum: C<sub>14</sub>-C<sub>24</sub>) und FATP (Fettsäuretransportproteine: C<sub>18</sub>-C<sub>26</sub>), die auch als very long-chain Acyl-CoA-Synthetasen bezeichnet werden (Steinberg et al. 2000; Mashek et al. 2004; Soupene und Kuypers 2008; Watkins 2008).

Betrachtet man nun die Familie der ACSL eingehender, so konnten hier bisher fünf verschiedene Isoformen ACSL1, 3, 4, 5 und 6 identifiziert werden (Mashek et al. 2004), wobei sich diese Vertreter nochmals anhand der homologen Sequenzen der Gene untereinander bzw. der Gen-Organisation in zwei Subgruppen untergliedern: ACSL1/ ACSL5 /ACSL6 und ACSL3/ ACSL4 (Soupene und Kuypers 2006). Hinzu kommt weiterhin, dass für sämtliche Isoformen zusätzliche Splicing-Varianten beschrieben wurden, sodass sich die Zahl der Produkte nach den abweichenden Translationsvorgängen nochmals erhöht (Soupene und Kuypers 2008). Obwohl die genauen Mechanismen hierfür noch nicht eindeutig geklärt werden konnten, existieren zwischen den Mitgliedern dieser Enzymfamilie Unterschiede hinsichtlich der Substratspezifität, der Gewebedistribution sowie der subzellulären Verteilung. So etwa katalysieren zwar alle die Anlagerung von Coenzym A an langkettige Fettsäuren, aber die Präferenzen bezüglich des Sättigungsgrades bzw. der genauen Größe des Kohlenstoffgerüsts divergieren deutlich. Beispielsweise weisen ACSL1 und ACSL5 jeweils eine hohe Spezifität für gesättigte Fettsäuren mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen bzw. für ungesättigte Fettsäuren mit 16 bis 20 Kohlenstoffatomen auf. Im Vergleich hierzu scheinen mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure (C20:4) oder Eicosapentaensäure (C20:5) das hauptsächliche Substrat der ACSL4 darzustellen (Kim et al. 2001). Bezüglich der jeweiligen Verteilungen der einzelnen Isoformen auf Gewebe- bzw. zellulärem Niveau ergibt sich anhand der Studienlage folgendes Bild: Innerhalb der Ratte konnte ACSL1 bereits 1990 durch Suzuki und Kollegen vornehmlich in der Leber, dem Herzen und Fettgewebe, in weitaus geringeren Anteilen auch im Gehirn nachgewiesen werden (Suzuki et al. 1990). Auffällig ist jedoch, dass die subzelluläre Lokalisation deutliche Variationen zeigt. In murinen Leberzellen findet man ACSL1 vorwiegend im Bereich des endoplasmatischen Retikulums, der sog. Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAM) sowie im Zytosol (Lewin et al. 2001, Li et al. 2006). Dagegen gehört ACSL1 in Adipozyten scheinbar eher zu den Enzymen der Zellmembran bzw. spezifischer GLUT4 Vesikel (Sleeman et al. 1998; Gargiulo et al. 1999). Als dominierende ACSL-Isoformen im Intestinaltrakt konnte man ACSL3 und ACSL5 detektieren. Dies belegen sowohl Untersuchungen an der Ratte, als auch an humanen *in vitro* Zellmodellen (Oikawa et al. 1998; Sandoval et al. 2008). Anhand einer humanen Hepatozyten-Zelllinie konnte ACSL3, zumindest im *in vitro* Modell, ebenfalls als Bestandteil intrazellulärer Lipidvesikel identifiziert werden (Fujimoto et al. 2008). ACSL5 nimmt hingegen innerhalb der Gruppe der ACSL insofern eine Sonderstellung ein, dass es als einziger Vertreter dieser Enzymfamilie an der äußeren Mitochondrienmembran nachweisbar ist (Lewin et al. 2001, Gassler et al. 2007). Im Vergleich hierzu synthetisieren die Steroidhormon produzierenden Zellen

der Nebennierenrinde, des Ovars und Testis hohe Level an ACSL4 (Kang et al. 1997), wobei sich das Enzym präferenziell eher in den Peroxisomen bzw. entlang der MAM zu befinden scheint (Soupene und Kuypers 2008). Der letzte bekannte Vertreter der ACSL, die ACSL6, lässt sich vor allem im Gehirn lokalisieren. Dort ist es laut bisheriger Datenlage am Tiermodell Ratte wesentlich an den Prozessen der Proliferation sowie Differenzierung der Neuronen beteiligt (Kee et al. 2003; Setnik und Nobrega 2004; Kim et al. 2009) und eher an der Zellmembran ansässig (Soupene und Kuypers 2008).

Infolge dieser doch teilweise erheblichen Unterschiede im Hinblick auf Verteilung und Substrat der verschiedenen ACSL-Isoformen liegen Vermutungen nahe, dass die hierdurch aktivierten Fettsäuren divergierende Funktionen innerhalb des Lipidmetabolismus erfüllen (Coleman et al 2002; Caviglia et al. 2004). Exemplarisch konnte man so etwa innerhalb einer transgenen Maus mit herzselektiver Überexpression der ACSL1 eine deutliche Zunahme der Triglyceride verzeichnen. Gleichzeitig lieferten die Studien aber keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Beta-Oxidation (Chiu et al. 2001). Daraufhin postulierten die Autoren eine eher anabole Funktion der ACSL1. Letztlich scheint auch ACSL3 ebenso mit den anabolen Prozessen im Lipidstoffwechsel assoziiert zu sein, konnte doch jüngst gezeigt werden, dass die Behandlung einer humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie mit ACSL3-siRNA zur deutlichen Reduktion der intrazellulären Lipidakkumulation unter artifiziell induziertem ER-Stress führt (Chang et al. 2011).

### **1.5.2 ACSL5 – Vorkommen und Funktionen dieser besonderen Isoform**

Das Gen der ACSL5 ist auf Chromosom 10q25.1-q25.2 lokalisiert und umfasst eine Größe von ca. 46kb. Es beinhaltet 21 Exon- sowie 22 Intronsequenzen und kodiert ein Protein bestehend aus 683 Aminosäuren. Infolge differentieller Splicing-Vorgänge ließen sich bis heute drei Transkripte der ACSL5 von etwa 1,7kb, 2,5kb und 3,7kb Ausmaß identifizieren (Yamashita et al. 2000; Mashek et al. 2004). Ursächlich hierfür ist unter anderem das Vorhandensein von zwei Startcodon-Abfolgen (AUG) innerhalb der Genstruktur (Soupene und Kuypers 2008). Die ACSL5 wird vor allem in der Darmschleimhaut exprimiert, lässt sich aber auch deutlich in Leber und braunem Fettgewebe nachweisen (Oikawa et al. 1998; Yu et al. 2002; Mashek et al. 2006b). Das Enzym nutzt für die von ihm katalysierte Reaktion gesättigte Fettsäuren mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen bzw. ungesättigte Fettsäuren mit einem Gerüst aus 16 bis 20 Kohlenstoffatomen. Palmitinsäure (C16:0), Palmitoleinsäure (C16:1), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und

Linolensäure (C18:3) konnten im Rahmen von Enzymaktivitätsassays mit aufgereinigter ACSL5 aus der Ratte als präferenzielle Substrate benannt werden (Oikawa et al. 1998). Einzigartig innerhalb der Enzymfamilie ist die mitochondriale Lokalisation, die bereits mehrfach in verschiedenen *in vitro* Modellen an Nager- und humanen Zellen sowie *in vivo* in der Rattenleber bestätigt wurde (Lewin et al. 2001; Mashek et al. 2006b; Gassler et al. 2007). Aber nicht nur dort konnte ACSL5 identifiziert werden, auch im Bereich des endoplasmatischen Retikulums kann man das Enzym nachweisen. Inwiefern nun diese besondere subzelluläre Lokalisation ggf. von Bedeutung für die Einschleusung von langkettigen Fettsäuren in die verschiedenen anabolen und katabolen Signalwege des Lipidmetabolismus ist, soll unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse dieser Arbeit im weiteren Verlauf diskutiert werden.

Die ACSL5 scheint aber nicht nur eine essentielle Funktion innerhalb des zellulären Energiehaushaltes innezuhaben, vielmehr mehrten sich auch die Hinweise über eine potentielle Beteiligung an anderen funktionellen Prozessen wie der Zellreifung oder Apoptose. In den letzten Jahren konnten in Untersuchungen an einer Reihe von Geweben entsprechende Erkenntnisse gewonnen werden. Die auf diese Weise generierten Daten sind aber teilweise widersprüchlich, sodass die ACSL5-abhängigen Effekte vermutlich gewebe- bzw. organspezifisch betrachtet werden müssen. So etwa vertreten Mashima und Kollegen die Auffassung, dass ACSL5 eine wesentliche Rolle innerhalb der Tumorgenese des Nervengewebes spielt. Eine gesteigerte Expression dieses Enzyms innerhalb solcher Tumorzellen bewirkt nach ihrer Darstellung wesentliche Überlebensvorteile. Ihre Studien an ACSL5-überexprimierenden Gliomazelllinien zeigten einerseits ein verbessertes Zellüberleben unter azidotischem Zellstress und andererseits eine Inhibition der durch Triacsin c induzierten Apoptose (Mashima et al. 2009 a - b). Demgegenüber belegt eine Vielzahl an Analysen in anderen Geweben ein eher kontroverses Bild der ACSL5. In Keratinozyten ist ACSL5 etwa anscheinend an der Zellreaktion auf UV-Exposition beteiligt (Gaisa, Köster et al. 2008) und auch eine Fettsäure-bedingte Induktion der ACSL5 begünstigt die hepatozelluläre Apoptose mittels TRAIL oder TNF-alpha (Reinartz et al. 2010). Neuste Ergebnisse zeigen zudem, dass die gesteigerte Apoptosebereitschaft von Lymphozyten im Rahmen des systemischen Lupus erythematoses ebenso in möglichem Zusammenhang mit diesem Enzym zu bringen ist (Catalá-Rabasa et al. 2011).

Am eingehendsten sind die putativen Effekte der ACSL5 jedoch am Darmtrakt beleuchtet worden. So gelang Gassler und Kollegen der Nachweis, dass sich die Expression der ACSL5 entlang der Krypten-Villus-Achse des Dünndarmepithels



verändert. Im Kryptenbereich ist dabei keine Detektion der ACSL5 möglich, während in Richtung Villusspitze die Expression deutlich ansteigt. Neben den Enterozyten scheinen darüber hinaus auch dort lokalisierte Becherzellen und enteroendokrine Zellen das Enzym zu synthetisieren. Innerhalb der Dickdarmmukosa findet man ACSL5 lediglich im Bereich des apikalen Oberflächenepithels (Gassler et al. 2003). Die physiologische Rolle der ACSL5 liegt hier vermutlich in der Regulation der enterozytären Differenzierung bzw. der Seneszenz dieser Zellentität. Im *in vitro* Experiment an der humanen CaCo-2 Zelllinie als Darmmodell ließ sich beispielsweise demonstrieren, dass eine ACSL5-Überexpression zur gesteigerten TRAIL-induzierten Apoptose bei Enterozyten führt (Gassler et al. 2007). Für diese Hypothese spricht ebenfalls die Tatsache, dass in solchen proliferativen Erkrankungen des Dünndarms wie Adenomen oder Adenokarzinomen ein deutlicher Verlust der ACSL5 zu verzeichnen ist (Gassler et al. 2003). Auch in kolorektalen Adenokarzinomen ließ sich zudem eine Veränderung der ACSL5-Expression identifizieren. Während in einem Teil der sporadisch aufgetretenen Neoplasien eine Abnahme des Enzyms auftrat, kam es wiederum in anderen Fällen zur deutlichen Steigerung der ACSL5-Menge (Gassler et al. 2005).

Insofern ist anhand sämtlicher oben aufgeführten Forschungsdaten eine potentielle Beteiligung dieser ACSL-Isoform an den vielfältigsten zellulären Prozessen, weit über die bloße Bereitstellung verfügbarer Energieträger hinaus, denkbar. Welche Interaktionen bzw. Regelkreise bei diesen scheinbar gewebeabhängigen Vorgängen involviert sind, ist dabei noch weitestgehend ungeklärt.

## 1.6 Optionen der Intervention in den Lipidmetabolismus

Anhand der vorangegangenen Kapitel geht eindeutig die enorme Relevanz des Lipidmetabolismus in der Zelle hervor. Die daran beteiligten Prozesse reichen dabei weit über die Regulation der Energiehomöostase hinaus und scheinen vielmehr weiter in die verschiedensten funktionellen Zusammenhänge involviert zu sein. Dementsprechend ist eine selektive Beeinflussung dieser Vorgänge auch aus wissenschaftlicher Sicht von außerordentlichem Interesse. Als zwei bedeutende Zielstrukturen etablierten sich dabei in den letzten Jahren die beiden Enzymkomplexe der *Fettsäure-Synthase (FAS)* und der *Carnitin-Palmityl-Transferase 1 (CPT-1)* (vgl. Kapitel 1.3.3). Diese befinden sich an wesentlichen Schlüsselpositionen im Stoffwechsel, die nachfolgend nochmals kurz erläutert werden sollen:

Die *FAS* ist ein Multi-Enzym-Komplex. Dies bedeutet, dass die enzymatische Aktivität auf der Interaktion zweier identischer Untereinheiten basiert, die wiederum aus jeweils sieben katalytischen Domänen bestehen:  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase (KS), Malonyl/Acetyltransferase (MAT), Dehydrase (DH), Enoyl-Reduktase (ER),  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase (KR), Acyl-Carrier-Protein (ACP) und Thioesterase (TE). Infolge einer „X-förmigen“ Anordnung der beiden Untereinheiten besitzt das Molekül letztlich zwei Reaktionsorte für die *de novo* Synthese von langkettigen Fettsäuren (Chirala und Wakil 2004; Asturias et al. 2005; Maier et al. 2006). Blockiert man nun die *FAS* pharmakologisch, so ist die Zelle nach dem Wegfall der endogenen Zufuhr vollkommen von den exogenen Fettsäure-Quellen abhängig. Ein solcher Inhibitor ist die Substanz *Orlistat*, auch als Tetrahydrolipstatin bekannt. Durch Bindung an die Thioesterase-Domäne kann das entstehende Endprodukt Palmitinsäure nicht mehr vom Enzym gelöst werden (Pemble et al. 2007). Die ursprüngliche medizinische Indikation von *Orlistat* besteht in der gewichtsreduzierenden Therapie der Adipositas mittels einer Blockade der gastrischen und pankreatischen Lipasen (Drent und van der Veen 1995). Dadurch bedingt kommt es zur gestörten Lipidabsorption im Darmtrakt und zur vermehrten Fettsäureausscheidung mit dem Stuhl, wobei diese Effekte sowohl abhängig von der Dosis des Pharmakons, als auch von der Konzentration der nutritiven Fette sind (Hauptman et al. 1992). Erst 2004 entdeckten Kridel und Kollegen die durch das Pharmakon bedingte irreversible Hemmung der Thioesterase-Aktivität des Enzyms *FAS* (Kridel et al. 2004).

Die *CPT-1* dagegen ist auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert und stellt einen wesentlichen Bestandteil des Transportsystems dar, mit dem die aktivierten Fettsäuren aus dem Zytoplasma in das mitochondriale Kompartiment verlagert werden (Kerner und Hoppel 2000). Bis heute sind drei Isoformen (*CPT-1a*, *CPT-1b* und *CPT-1c*) bekannt, von denen im Zusammenhang mit dieser Arbeit die *CPT-1a* von Bedeutung ist, da sie innerhalb des Darmtraktes nachgewiesen wurde (Washington et al. 2004; Sierra et al. 2008). Daher wird sich in den weiteren Ausführungen auch stets auf besagte *CPT-1a* bezogen, wenn Zusammenhänge mit dem Enzym erläutert werden. Eine Möglichkeit der selektiven Manipulation der *CPT-1* stellt die Substanz *Etomoxir* dar. Durch eine kovalente Anlagerung an die *CPT-1* Struktur auf der zytoplasmatischen Seite kommt es hierbei zur irreversiblen Inhibition (McGarry et al. 1991). Dies wiederum hat eine Störung der Beta-Oxidation zur Folge. Die als hauptsächliches Substrat fungierenden langkettigen Acyl-CoA Thioester werden zwar noch von der Zelle generiert, gelangen so jedoch nicht mehr zum eigentlichen Ort der Degradation.

## **2. Zielsetzung**

Infolge der sich wandelnden Ernährungsgewohnheiten in der Gesellschaft nimmt die Relevanz der Lipid-assoziierten Erkrankungen deutlich zu. Insbesondere die steigenden Erkrankungszahlen hinsichtlich entzündlicher Prozesse und Neoplasien des Darmtraktes, in deren Pathogenese Lipide bzw. Fettsäuren eine zentrale Rolle innezuhaben scheinen, sind hier von großer Bedeutung. Damit Fettsäuren jedoch dem zellulären Metabolismus zur Verfügung stehen, müssen diese erst durch Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs) zu energiereichen Thioestern aktiviert werden. Bisher sind fünf Vertreter der besagten Enzymgruppe beschrieben worden, die sich anhand der Gewebeverteilung sowie der Lokalisation innerhalb der Zelle unterscheiden (vgl. Kapitel 1.5.1). In den letzten Jahren konnten jedoch zunehmend weitere Erkenntnisse gewonnen werden, dass die ACSL-Isoformen nicht nur metabolische Eigenschaften innehaben, sondern auch eine Vielzahl von zellulären Signalmechanismen beeinflussen können.

So gibt es erste Hinweise darüber, dass die im Gastrointestinaltrakt überwiegende ACSL5 entscheidend am Vorgang der enterozytären Zellreifung entlang der Krypten-Villus-Achse involviert ist. Zudem scheint das Enzym ferner ebenso Einflüsse auf das Zellüberleben innerhalb anderer Zelltypen verschiedener Herkunft (Hepatozyten, Keratinozyten, periphere Blutzellen, Gliomzellen) auszuüben. Insgesamt ist die Datenlage hinsichtlich der Bedeutung der ACSL5 für den Lipidmetabolismus des Enterozyten und etwaiger Interaktionen mit anderen funktionellen Zellprozessen gegenwärtig aber eher unvollständig.

Daher bestand das Ziel der hier vorliegenden Arbeit darin, eine weitergehende funktionelle Charakterisierung der ACSL5 im Metabolismus von Enterozyten vorzunehmen und die mögliche regulatorische Einbindung des Enzyms in relevante Signaltransduktionsketten zu charakterisieren. Dazu sollte im Rahmen eines *in vitro* Zellkulturmodells die Rolle der ACSL5 als wesentliches Enzym der mitochondrialen Fettsäure-Aktivierung im Intestinaltrakt untersucht werden. Arbeitshypothese dafür war, dass die pharmakologische Modulation des Metabolismus langkettiger Fettsäuren ein geeigneter Ansatz wäre, um Funktionen des Enzyms in intestinalen Epithelzellen umfassend zu charakterisieren. Bisher existieren in der Literatur diesbezüglich nur präliminare Daten.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1 Materialien**

#### **3.1.1 Geräte**

Autoklav Fedegari AutoklaviSPA	Biomedis, Gießen
Absaugpumpe Vacosafe	IBS Integra Bioscience, Chur (Schweiz)
Blotsystem Mini Protean III	BioRad, München
Brutschrank (20% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> , 37°C)	Hereaus, Düsseldorf
Casy 1	Schärfe System, Reutlingen
DNA-Elektrophorese-Apparatur	Serva, Heidelberg
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluormeter M 200	Tecan, Crailsheim
Flüssigstickstoff-Behälter	Air Liquide, Frankreich
Geldokumentationsgerät	Intas, Göttingen
Gelgießvorrichtung für PAA-Gele	BioRad, München
Heizplatte	IKA Labortechnik, Staufen
Kryokonservierungsgerät Nicool LM 10	Air Liquide, Frankreich
Kryostat	Thermo, Frankfurt
Lichtmikroskop Leitz Dialux 20EB	Leitz, Wetzlar
Lichtmikroskop Nikon 80i mit Kamera	Nikon, Düsseldorf
NanoDrop ND-1000	Spectrophotometer peqlab, Erlangen
Optimax Röntgenfilmentwickler	Protec Medizintechnik, Gronau
Pipettus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
iQ5 RealTimePCR-Gerät	BioRad, München
Reinraumwerkbank Hera Safe	Heraeus, Düsseldorf

Reinstwassergerät QGard2	Millipore, Schwalbach
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
ThermoStat	Eppendorf, Hamburg
Transmissionselektronenmikroskop	Philips, Eindhoven (Niederlande)
Ultraschallhomogenisator Sonoplus	Bandelin Electronic, Berlin
Veriti® Thermal Cycler (96 Well)	Applied Biosystems, Darmstadt
Vortex	Heidolph, Schwabach
Wärmeschrank	Heraeus, Düsseldorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge mit Kühlung (für Eppendorfggefäße)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge ohne Kühlung (für Eppendorfggefäße)	Heraeus, Düsseldorf

### **3.1.2 Chemikalien und Lösungsmittel**

Agarose	Cambrex BioScience, East Rutherford (USA)
6-Aminohexansäure	Roth, Karlsruhe
Amoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Delta Select, Pfullingen
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BioWhittaker® EMEM-Medium	Lonza, Vervies (Belgien)
Borsäure	Roth, Karlsruhe
BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Casyton	Innovatis, Reutlingen
Chloroform, minimum 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim

Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue-R250	Sigma, Steinheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethanol (vergällt)	KMF Optichem, Lohmar
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Etomoxir sodium salt hydrate	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entwickler G153 für Cunix 60 Gerät	AGFA, Köln
Epon (Epoxy-Embedding-Kit)	Fluka, Steinheim
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fixierer G354	AGFA, Köln
Foetal Bovine Serum (FKS)	Invitrogen/Gibco, Darmstadt
Formalin (Formafix, 4%)	Patho Med Logistik, Viersen
Genetecin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glyceringelatine (Kaiser's)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Guanidin-Hydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt
Isopropanol (for molecular biology)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Apotheke Universitätsklinikum Aachen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	Gibco, Paisley
Non-essential Aminosäuren (MEM NEAA 100X)	Gibco, Paisley
Ölrot O	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS-Tablette	Gibco, Paisley

SDS	Serva, Heidelberg
Tri Reagent (Trizol)	Invitrogen, Karlsruhe
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin 2,5%	Invitrogen/Gibco, Darmstadt
Tween 20	Serva, Heidelberg
Urea	Roth, Karlsruhe
Xenical® 120mg Hartkapseln (Orlistat)	Roche, Welwyn Garden City (England)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Blotpapier für PAA-Gele	BioRad, München
Chamber Slides LabTek®	Nalge Nunc TM, Rochester (USA)
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Falconröhrchen (50ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen (T75)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Glocken-Sterilfilter 0,2µm	Sartorius, Göttingen
Handschuhe (Nitril)	Sempermed, Wien (Österreich)
Immobilon-P Transfer Membranen	Millipore GmbH, Schwalbach
Kodak BioMax Light Film	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kryoröhrchen	VWR, Langenfeld
Microseal `B` Film	BioRad, München
Multiwell-Platten, Flachboden (6-Well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Multiwell-Platten, Flachböden (96-Well)	Becton Dickinson, Heidelberg
Multiwell-Platten, Rundboden (96-Well)	PegLab, Erlangen
Pasteurpipetten (Kunststoff)	Sarsted, Nümbrecht
Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim

Pipettenspitzen (10µl, 100µl, 1000µl)	NerbePlus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen, RNase-frei (10µl, 100µl, 1000µl)	NerbePlus, Winsen/Luhe
Probenbecher für Casy1	Schärfe System, Reutlingen
Reaktionsgefäß (1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber	Roth, Karlsruhe

### 3.1.4 Software

BioRad iQ5 Standard Edition	BioRad, München
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda (USA)
Intas GDS	Intas, Göttingen
LightCycler Software	Roche, Mannheim
Nano ND-1000	PegLab, Erlangen
Tecan-I control Fluormeter Software	Tecan, Crailsheim

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

#### Puffer für die Zellkultur:

**Tab. 3-1: PBS**

Komponente	Volumen bzw. Menge
KCl	2,24 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,04 g
NaCl	80,06 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	11,57 g
Aqua bidest.	1000 ml



**Puffer für zytologische Untersuchungen:****Tab. 3-2: 0,2% Ölrot O-Färbelösung**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Ölrot O	0,2 g
60 % (v/v) Isopropanol	100 ml

**Tab. 3-3: Hämalaun Färbelösung nach Mayer**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Hämatoxylin	1 g
Aqua bidest.	1 l
Natriumjodat	0,2 g
Aluminiumkaliumsulfat	50 g
Chloraldehyd	50 g
Zitronensäure	1 g

**Puffer für die Transmissionselektronenmikroskopie:****Tab. 3-4: Glutaraldehyd-B2-Puffer**

Komponente	Volumen bzw. Menge
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	3,59 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	30,97 g
1l Aqua bidest. zufügen	

**Puffer für den ACSL-Enzymaktivitätsassay:****Tab. 3-5: ACSL Homogenisationspuffer, pH 7,5**

Komponente	Volumen bzw. Menge
1 M Tris (150 mM)	1,5 ml
0,5 M EDTA (2 mM)	40 µl
Auf 10 ml mit Aqua bidest. auffüllen	

**Tab. 3-6: ACSL Assaypuffer**

Komponente	Volumen bzw. Menge
0,5 M Tris/HCl pH 7,4	0,3 ml
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	0,2 ml
5% Triton X-100	40 µl
50mM EDTA	40 µl
( <sup>3</sup> H)Palmitat in Triton X-100	20 µl
100 mM Coenzym A	60 µl
20 mM Coenzym A	60 µl
200 mM ATP	0,2 ml
Aqua bidest.	0,12 ml

**Tab. 3-7: Dole's Medium**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Isopropanol	4 ml
n-Heptan	1 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 ml

**Puffer für Agarose-Gelelektrophorese:****Tab. 3-8: 50x TBE**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Tris	108 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH 8)	40 ml
1l Aqua bidest. hinzufügen und autoklavieren	

**Puffer SDS-PAA-Gelelektrophorese und Western Blot****Tab. 3-9: TBST, pH 7,5**

Komponente	Volumen bzw. Menge
1 M NaCl	30 ml
1 M Tris, pH 7,5	20 ml
Tween 20	2500 µl
Auf 1 l Aqua bidest. auffüllen	

**Tab. 3-10: 10x LE-Puffer, pH 8,8**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Tris	30,2 g
Glycin	144 g
Aqua bidest.	1 l

**Tab. 3-11: 10x Anodenpuffer I / II**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Tris	36,5 g bzw. 365 g
Aqua bidest.	1 l

**Tab. 3-12: Kathodenpuffer**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Tris	30,2 g
Aminohexansäure	50,25 g
Aqua bidest.	1 l

**Tab. 3-13: Stripping-Puffer**

Komponente	Volumen bzw. Menge
PBS	30 ml
5% (w/v) SDS	20 ml
$\beta$ -Mercaptoethanol	348 $\mu$ l

**Tab. 3-14: Coomassie Blue Färbe- und Entfärbelösung**

Komponente	Volumen bzw. Menge
Färbelösung	
Coomassie Brilliant Blue	0,2 g
Methanol	40 ml
Essigsäure	2 ml
Aqua bidest.	58 ml
Entfärbelösung	
Methanol	50 ml
Essigsäure	1 ml
Aqua bidest.	49 ml

### 3.1.6 Reagenzien für cDNA-Synthese, Real Time PCR und Gelelektrophorese

DNase I recombinant (RNase-free)	Roche, Mannheim
DNase I recombinant Incubation Buffer 10x	Roche, Mannheim
TaqPCR <sub>x</sub> DNA Polymerase, recombinant	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Mix (10 mM)	Fermentas, St. Leon-Rot

DTT (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
Loading Dye 6x	New England Biolabs, Frankfurt
Low molecular weight DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
5x First-Strand-Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) (50 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Oligo-(dT)20-Primer	Invitrogen/Gibco, Darmstadt
Protector RNase Inhibitor	Roche, Mannheim
SuperScriptIII Reverse Transcriptase	Invitrogen/Gibco, Darmstadt

### **3.1.7 Reagenzien für Proteinbestimmung, SDS-PAA-Gelelektrophorese und Western Blot**

BioRad D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent A	BioRad, München
BioRad D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent B	BioRad, München
BioRad D <sub>c</sub> Protein Assay Reagent S	BioRad, München
ECL Western Blotting Substrate	Pierce / Thermo Fisher, Bonn
Laemmli-Probenpuffer 2x konzentriert	Sigma-Aldrich, Steinheim
PeqGold Prestained Protein Marker V	PeqLab, Erlangen
Protease Inhibitor Complete Mini	Roche, Mannheim

### **3.1.8 Verwendete Zelllinien**

**CaCo-2** (ATCC HTB-37) ist eine immortalisierte, ädhärent wachsende humane Tumorzelllinie, die ursprünglich aus dem colorektalen Adenokarzinom eines 72-jährigen, männlichen Kaukasiers etabliert wurde (Fogh und Trempe, 1975). Die Zellen bilden in Kultur eine konfluierende, polarisierte Zellschicht und weisen eine enterozytäre Differenzierung auf. Trotz ihres Ursprungs aus der Mucosa des Kolons

besitzt ihr Phänotyp ebenso Charakteristika des Dünndarmepithels wie etwa Tight Junctions, Mikrovilli-Besatz oder Transporter-Einrichtungen zur Resorption von Nahrungsbestandteilen (Pinto et al. 1983; Rousset 1986; Hidalgo et al. 1989). Zudem eignet sich die Zelllinie besonders gut als Modell für den intestinalen Lipidmetabolismus (Levin et al. 1992).

**CaCo 3/25 (CaCo-2 ACSL5fl)** ist eine CaCo-2 Zelllinie, die stabil mit pcDNAdest\_ACSL5fl transfiziert wurde (Volltransfektante) und nun übermäßig die ACSL5-full length Variante (d.h. diejenige Enzymform mit dem darin enthaltenen Exon 20) exprimiert (Gassler et al. 2007).

**CaCo P14 (CaCo-2 pcDNAdest40)** ist eine CaCo-2 Zelllinie, die stabil mit pcDNAdest40 transfiziert wurde (Leertransfektante) (Gassler et al. 2007) und als Kontrollgruppe verwendet wurde, um sicherzustellen, dass die im Experiment feststellbaren Effekte nicht durch den Vorgang der Transfektion als solche begründbar sind.

Die beiden hier eingesetzten Transfektanten wurden im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Heidelberg erzeugt.

### 3.1.9 Zellkultur - Medien und Zusatzstoffe

**Tab. 3-15: Kulturmedium für CaCo-2-Zelllinien**

Komponente	Menge/Volumen	Hersteller
BioWhittaker ® EMEM	500 ml	Lonza, Vervies
FKS	75 ml	Gibco, Paisley
LG/PS	4 ml	PPA, Pasching
Non-essential Aminosäuren	4 ml	Gibco Paisley
Natrium-Pyruvat	4 ml	Gibco, Paisley

**Tab. 3-16: Inkubationsmedium für CaCo-2-Zelllinien**

Komponente	Menge/Volumen	Hersteller
BioWhittaker ® EMEM	500 ml	Lonza, Vervies
LG/PS	4 ml	PPA, Pasching
Non-essential Aminosäuren	4 ml	Gibco Paisley
Natrium-Pyruvat	4 ml	Gibco, Paisley

Zur Erzeugung eines Selektionsdrucks für die verwendeten Transfektanten wurden immer 200µl Genetecin (G418, 100µg/ml) pro 10ml Medium frisch hinzugegeben.

**Tab. 3-17: 0,25% Trypsin/EDTA-Lösung**

Komponente	Menge/Volumen
2,5% Trypsin	20 ml
EDTA	20 ml
Aqua ad injectabilia	160 ml

### 3.1.10 Herstellung einer Orlistat-Lösung

Orlistat wurde gemäß der Methode von *Knowles* und Kollegen aus Xenical® 120mg Hartkapseln (Roche) isoliert (*Knowles et al. 2004*): Dazu löst man den Inhalt einer Kapsel in 1ml Ethanol. Unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation mit 14.000 rpm über 5min entfernt. Der verbleibende Überstand ist eine Orlistat-Lösung (250mM), die nun aliquotiert und bei -80°C gelagert werden kann.

### 3.1.11 Herstellung einer Etomoxir-Lösung

Etomoxir ist über Sigma-Aldrich kommerziell als kristalline Salzverbindung erhältlich. Diese wird in Aqua bidest. soweit verdünnt, bis die gewünschte Konzentration erreicht ist. Anschließend können auch hier Aliquots erstellt und bei 4°C gelagert werden.

### 3.1.12 Antikörper

**Tab. 3-18: Primäre und Sekundäre Antikörper für Western Blot**

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
β-Aktin pAb (Maus)	Sigma-Aldrich, Steinheim	1 : 1000
KD7 (Ratte)	(Gassler et al. 2003)	Unverdünnt
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG HRP	Santa Cruz Biotech, Heidelberg	1 : 10000
Ziege anti-Ratte IgG HRP	Santa Cruz Biotech, Heidelberg	1 : 10000

### 3.1.13 Primer

Die Synthese der verwendeten Primer-Oligonukleotide erfolgte durch die Firma Eurofins MWG (Ebersberg):

Gen	Primer	Nukleotid-Sequenz		Produktlänge
hACSL5	H52 for/rev	forward	5'TTTTTGTACACGGG GAGAGC'3	321 bp
		reverse	3'ACAGGCTGTCAATT TGGGTC'5	
hBID	BID for/rev	forward	5'CCTCCAAAGCTGTT CTGACA'3	151 bp
		reverse	3'TGCCTCTATTCTTC CCAAGC'5	
hCaspase 8	Casp8 for/rev	forward	5'GGATGAGGCTGAC TTTCTGC'3	157 bp
		reverse	3'CACTTCAGTCAGGA TGGTGAGA'5	
hCyclophilin	Cyclophilin for/rev	forward	5'CATTTGCCATGGAC AAGATG'3	300 bp
		reverse	3'ACCCACCGTGTTT TTCGAC'5	
hFFAR2	FFAR2 for/rev	forward	5'GCCTGGTGCTCTTC TTCATC'3	178 bp
		reverse	3'AGGTGGGACACGT TGTAAGG'5	
hFFAR3	FFAR3 for/rev	forward	5'TCTTTGTGCCACTG CTCAAC'3	150 bp
		reverse	3'GGCCACTGCTTCTT TGAGAC'5	
hGAPDH	hGAPDH for/rev	forward	5'GAAGGTGAAGGTC GGAGTCA'3	289 bp
		reverse	3'TGGACTCCACGAC GTAACA'5	
hGAPDH- Promotor	hGAPDH-Pro for/rev	forward	5'GTGCCAGTTGAAC CAG'3	222 bp
		reverse	3'AACAGGAGGAGCA GAGAGCGAAGC'5	
hGPR120	GPR120 for/rev	forward	5'GAAATTTTCGATTTG CACACT'3	384 bp
		reverse	3'GTTTAGGGCTGAAT TAGCAA'5	
hMortalin	HSPA9 for/rev	forward	5'CTTCAGCAGGCATC ATTGAA'3	100 bp
		reverse	3'CTTCCTTTTGTTC CCAGTG'5	

## 3.2 Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Kultivierung und Passage von CaCo-2-Zellen

Sämtliche Arbeiten innerhalb der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Strömung durchgeführt. Die hierbei verwendeten Materialien wurden vorher sterilisiert und die entsprechenden Medien im Wasserbad auf ca. 37°C vorgewärmt. Die Kultivierung der CaCo-2 und ihrer Transfektanten erfolgte im Inkubator bei konstanten 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Zufuhr. Die Zellen wuchsen überwiegend als Monolayer in T75-Zellkulturflaschen. Als Kulturmedium diente EMEM mit entsprechenden Zusätzen (vgl. Kapitel 3.1.7, Tab. 3-15). Das Inkubationsmedium für die eigentlichen Versuche hingegen enthielt kein FKS (vgl. Kapitel 3.1.7, Tab. 3-16), um die intrinsischen Effekte nicht durch von außen zugeführte Fettsäuren zu beeinflussen. Bei Konfluenz der Zellen wurden diese zweimalig mit PBS (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-1) gewaschen und dann durch Inkubation mit 4ml 0,25%iger Trypsin/EDTA-Lösung (vgl. Kapitel 3.1.7, Tab. 3-17) für ca. 3min bei 37°C vom Untergrund abgelöst. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle wurde der proteolytische Verdau durch Zugabe von 6ml Medium gestoppt und die Zellen für 5min mit 1200rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde nach Verwerfung des Überstandes erneut resuspendiert und in 2 bis 4 neue Kulturflaschen ausgesät. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt, um eine Anreicherung von Stoffwechselprodukten zu vermeiden.

Zusätzlich wurden den Zelllinien CaCo P14 und CaCo 3/25 jeweils pro 10ml Medium noch 200µl Genetecin als Selektionsfaktor zugeführt.

Bei der Aussaat für die nachfolgenden Experimente wurden ferner abhängig vom Verwendungszweck unterschiedliche Zelldichten gewählt (vgl. Tab.3-19):

**Tab.3-19: Zelldichten bei Aussaat:**

Zelldichte der CaCo-2	Behältnis	Verwendungszweck
1 x 10 <sup>5</sup> Zellen pro Kavität	6-Well-Platte	RNA-Extraktion; Proteinisolation; ACSL-Aktivitätsassay
4-5 x 10 <sup>4</sup> Zellen pro Kavität	Chamber Slides LabTek®	Ölrot O-Färbung
Analog zur Passage ( 1/4 bis 1/2 des Pellets)	T75-Zellkulturflasche	Transmissions- elektronenmikroskopie



### **3.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung von Zellen**

Zur Sicherung der Reserven an verfügbaren Zellen wurden die verwendeten Zelllinien in regelmäßigen Abständen kryokonserviert.

Dazu erfolgte zunächst analog zum regulären Passagieren die Trypsinierung und Zentrifugation (1200rpm, 5min). Anschließend wurde das Pellet in Kulturmedium mit 10% FKS und 8% DMSO überführt. Das DMSO veränderte hierbei die Membranpermeabilität der Zellen und verhinderte somit eine Schädigung durch entstehende Eiskristalle. Die Suspension wurde zu je 1ml in Kryoröhrchen aufgeteilt und unmittelbar im Kryokonservierungsgerät mittels eines stetigen durch Flüssigstickstoff gekühlten Luftstroms heruntergekühlt. Letztlich erfolgte die dauerhafte Lagerung bei -120°C im Stickstoff-Behälter.

Zur Rekultivierung der Zellen wurde das Kryoröhrchen im Wasserbad (37°C) kurz aufgetaut und sofort in 10ml PBS gegeben. Nach Sedimentierung (1200rpm, 5min) verwarf man den Überstand, resuspendierte das Pellet in 10ml Kulturmedium und säte es in eine neue T75-Zellkulturflasche aus. Am nächsten Tag erfolgte ein weiterer Mediumwechsel zur Entfernung letzter DMSO-Reste.

### **3.2.3 Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Orlistat**

Zur Beeinflussung des intrazellulären Lipidmetabolismus der CaCo-2, CaCo P14 und CaCo 3/25 erfolgte im Hauptexperiment deren Inkubation mit dem Fettsäure-Synthase-Inhibitor Orlistat.

Hierzu wurden die Zellen nach Aussaat (vgl. Kapitel 3.2.1, Tab. 3-19) unter Verwendung des Inkubationsmediums (vgl. Kapitel 3.1.7, Tab. 3-16) zunächst für 48h im Brutschrank inkubiert, sodass durchschnittlich eine ca. 90%ige Konfluenz vorlag. Anschließend behandelte man die Zellen mit einer Orlistat-Inkubationsmedium-Lösung, die 20µM, 100µM oder 200µM Orlistat enthielt und bebrütete sie für weitere 24h bzw. 48h. Als Kontrolle verwendete man ein Gemisch aus Inkubationsmedium und Ethanol (in 1000facher Verdünnung), um auszuschließen, dass Ethanol als Lösungsmittel für das hydrophobe Orlistat etwaige Effekte allein bedingt.

Nach abgeschlossener Inkubation standen die behandelten Zellen für die weitere Aufarbeitung (Ölrot O-Färbung, TEM, Enzymaktivitätsassays, RNA-Extraktion oder Proteinisolation) zur Verfügung.

### **3.2.4 Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Etomoxir**

Zur Behandlung der Zellen mit dem Carnitin-Palmityl-Transferase 1-Inhibitor Etomoxir wurden die ausgesäten Zellen analog zu Kapitel 3.2.3 für 48h im Inkubationsmedium bebrütet. Das Medium wurde entfernt und es erfolgte eine über 24h dauernde Inkubation mit einem Etomoxir-Inkubationsmedium-Gemisch, welches 200µM Etomoxir (gelöst in sterilem Aqua bidest.) aufwies.

Anschließend wurden die Zellen für eine Ölrot O-Färbung oder für die TEM aufbereitet bzw. für die RNA-Extraktion geerntet.

### **3.2.5 Sequenzielle Manipulation des Lipidmetabolismus mittels Orlistat und Etomoxir**

Durch diese sequenzielle Blockade verschiedener Ebenen innerhalb der Reaktionsschritte im Fettstoffwechsel der Zellen sollen potentielle synergistische Effekte nochmalig genauer analysiert und weiter aufgeschlüsselt werden.

Dementsprechend erfolgte nach der Aussaat (wie oben beschrieben) die Behandlung der Zellen mit 200µM Orlistat bzw. 200µM Etomoxir im Inkubationsmedium für 24h. Anschließend wurde das Medium nochmals entfernt und für einen Zeitraum von weiteren 24h durch Inkubationsmedium mit der jeweils anderen Substanz ersetzt.

Nach Abschluss der Behandlung fand eine Ölrot O-Färbung bzw. eine Ernte der Zellen zur RNA-Extraktion statt.

## **2.3 Zytologische Methoden**

### **2.3.1 Ölrot O-Färbung der Zellen**

Die hier verwendete Ölrot O-Färbung diente dem Nachweis von intrazellulären Lipidvesikeln.

Dazu wurden die CaCo-2-Zellen zunächst auf Chamber Slides LabTek® (4-5 x 10<sup>4</sup> Zellen pro Kavität) angezogen. Zum Zeitpunkt der Färbung wurden die Zellen dann kurz mit kaltem PBS gewaschen und für 10min in 4%igem Formalin fixiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit kaltem PBS und eine zweiminütige Inkubation in 60%igem Isopropanol. Nach anschließender Überschichtung mit 0,2%iger Ölrot O-Färbung (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-2) für 20min wurden die Zellen

kurz zum Entfernen der überschüssigen Lösung in Aqua dest. geschwenkt. Zur Anfärbung der Kerne erfolgte alsdann eine Hämalaun-Färbung nach Mayer (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-3) über eine Inkubationszeit von 5min. Durch nochmaliges Inkubieren über 10min in warmem Leitungswasser kam es letztlich zum Bläuen der Zellkerne. Letztlich wurden die Zellen auf den Chamber Slides LabTek® leicht angetrocknet, mit Glyceringelatine unter Deckgläsern eingedeckelt und lichtmikroskopisch betrachtet.

### **3.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der zellulären Ultrastruktur fanden in Kooperation mit Dr. rer. nat. Jörg Bornemann der elektronenmikroskopischen Einrichtung des Universitätsklinikums Aachen statt. Ziel war es, mögliche morphologische Alterationen, insbesondere der Mitochondrien als Ort der Fettsäure-Aktivierung durch ACSL5, zu erfassen.

Hierbei wurden aus jeweils konfluent bewachsenen T75-Zellkulturflaschen, die mit den verschiedenen Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt wurden, zunächst Zellpellets der einzelnen Zelllinien hergestellt. Daraufhin folgte eine mehrstündige Fixierung in einem 3%igen Glutaraldehyd-B2-Puffer (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-4). Es schlossen sich Spülschritte von 15min in 0,1M B2-Puffer und einer Stunde in einem 1:1 Gemisch aus 17%igem Sucrose-B2-Puffer und 1%igem Osmintetraoxid an. Nach zweimaliger Waschung der Zellpellets für je 10min in einer 1:1 Mischung aus Aqua dest. und 17%igem Sucrose-B2-Puffer sowie Aqua dest. wurden die Proben vollkommen entwässert. Dabei verwendete man eine aufsteigende Alkoholreihe (jeweils 10min in 30, 50, 70, 90 und 100% Ethanol) und anschließende Propylenoxid-Übergießung. Nach 30min Rotation bei Raumtemperatur erfolgten weitere Rotationsschritte von einer Stunde in einer 1:1 Mischung aus Epon und Propylenoxid und einer weiteren Stunde in reinem Epon. Nach Aushärtung des Harzes (8h bei 37°C und 48-56h bei 60°C) konnten die Zellproben mittels Diamantmesser ultradünn geschnitten werden. Zur Kontrastierung verwendete man Uranylacetat und Bleiacetat, bevor die angefertigten Präparate durch das Transmissionselektronenmikroskop EM 400T (Philips) betrachtet wurden.

## 3.4 Biochemische Methoden

### 3.4.1 Acyl-CoA Synthetase Aktivitätsassay

Die Analyse der gesamten zellulären ACSL Aktivität wurde in Zusammenarbeit mit Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kopitz aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt. Diese Methode beruht auf der ACSL-abhängigen Ligation von CoA an ein radioaktiv markiertes Substrat ( $^3\text{H}$ -Palmitat) und der resultierenden Bildung von  $^3\text{H}$ -Palmitoyl-CoA.

Nach Aussaat von jeweils  $1 \times 10^5$  Zellen wurden diese wie in Kapitel 3.2.3 geschildert mit Orlistat behandelt. Zur Aufarbeitung spülte man die Zellen zweimal mit PBS. Anschließend erfolgte die mechanische Homogenisierung der Zellen mittels Zellschaber in 300 $\mu\text{l}$  ACSL Homogenisationspuffer (Kapitel 3.1.5, Tab. 3-5). Im Dreifachansatz versetzte man daraufhin je 100 $\mu\text{l}$  Probe mit weiteren 100 $\mu\text{l}$  ACSL-Assaypuffer (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-6) und inkubierte das Gemisch für 10min bei 37°C. Dabei wurde das im ACSL-Assaypuffer enthaltene radioaktive  $^3\text{H}$ -Palmitat durch enzymatische Aktivität der zellulären ACSL zu  $^3\text{H}$ -Palmitoyl-CoA umgesetzt. Die Zugabe von Dole's Medium (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-7) stoppte die Enzymaktivität. Eine Zentrifugation über 5min bei 4000rpm und 4°C bewirkte eine Phasentrennung, wobei das entstandene radioaktive und lipophile Acyl-CoA eine höhere Dichte als die nicht umgesetzten Fettsäuren hatte. Es verblieb in der Unterphase, während die Oberphase als radioaktiver Abfall entsorgt wurde. Nach weiteren sechs Waschschritten mit je 1ml n-Heptan wurde die Unterphase letztlich mit 10ml UltimaGold-Cocktail versetzt und die Radioaktivität erfasst. Dabei wurde die ermittelte ACSL-Enzymaktivität auf die zuvor erfasste Proteinmenge bezogen und als pmol/min/mg Protein angegeben.

## 3.5 Molekularbiologische Methoden

### 3.5.1 RNA-Isolation aus Zellen mittels Tri-Reagenz

Durch die Behandlung der Zellen mit Tri-Reagenz nach *Chomczynski* und *Sacchi* (1987) können gleichzeitig aus einer Probe RNA, DNA und Protein isoliert werden.

Für die Extraktion wurden dabei die auf 6-Well-Platten ausgesäten Zellen nach zweimaligem Waschen mit kaltem PBS in jeweils 1ml Tri-Reagenz homogenisiert. Es folgte eine Inkubation von 10min bei Raumtemperatur, bevor man die Proben mit 200 $\mu\text{l}$  Chloroform ( $\text{ChCl}_3$ ) versetzte, 15sek vortexte und erneut 10min bei

Raumtemperatur inkubierte. Durch Zentrifugation mit 12000rpm bei 4°C trennten sich die einzelnen Phasen folgendermaßen: Oberphase mit RNA, Mittelphase mit DNA und Unterphase mit gelösten Proteinen. Der Überstand wurde erneut mit 750µl Tri-Reagenz versetzt. (Die Unterphase wurde in Flüssigstickstoff konserviert und bei -80°C asserviert). Erneut wurde kurz gevortext, abzentrifugiert und für 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Weitere 300µl Chloroform fügte man hinzu und vortexte 15sek. Es folgte eine Inkubation von 5min bei Raumtemperatur mit anschließender Zentrifugation mit 12000rpm bei 4°C. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, 15sek gevortext und bei Raumtemperatur für weitere 10min inkubiert. Ein weiterer Zentrifugationsschritt (12000rpm, 4°C) führte zur Bildung eines Pellets, welches nach Verwerfen des Überstandes in 500µl 80%igem Ethanol gewaschen und über 5min mit 10000rpm bei 4°C zentrifugiert wurde. Nach Trocknung des Pellets (ca. 10min) wurde dieses letztlich in mit RNase-Inhibitor versetztem DEPC-Wasser gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der extrahierten RNA photometrisch mithilfe des NanoDrops ND-1000 von PeqLab ermittelt.

### **3.5.2 DNA-Verdau nach RNA-Isolation**

Durch spezifischen Verdau der DNA innerhalb der Proben stellt man sicher, dass nachfolgend keine Fehlamplifikationen in den PCRs durch DNA-Verunreinigungen und konsekutive Fehlaussagen auftreten.

Hierzu wurde nach photometrischer Bestimmung der RNA-Konzentration jeder Probe pro 30µg RNA immer 1µl DNase hinzugefügt und der Mix für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Lagerung der Proben auf Eis kam die enzymatische Reaktion zum Erliegen.

Die Bedeutung dieses Schrittes für die nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen wird noch von besonderem Interesse sein, da das Primerpaar des FFAR2 besonders anfällig hinsichtlich DNA-Verunreinigungen ist (vgl. Kapitel 3.5.4).

### **3.5.3 Erststrang-cDNA-Synthese**

Durch Verwendung des SuperScriptIII Reverse Transkriptase-Kits der Firma Invitrogen gemäß den Herstellerangaben erfolgte die reverse Transkription der RNA in entsprechende Erststrang-cDNA.

Es wurden pro Probenansatz jeweils 2 µg RNA umgeschrieben. Dabei benutzte man einen Oligo(dT)-Primer, der sich an den PolyA-Schwanz der mRNA anlegte und spezifisch diese (nicht aber andere RNA-Arten) amplifizierte.

So wurde zunächst ein entsprechender Mix aus RNA, Oligo(dT)-Primer, dNTP-Mix und destilliertem Wasser hergestellt. Nach 5min Inkubation bei 65°C zur Denaturierung erfolgte eine Lagerung der Proben auf Eis für mindestens eine Minute zum Stoppen des Vorgangs. Es wurde ein zweiter Mix aus 5x First-Strand-Buffer, 0,1M DTT, SuperScriptIII Reverse Transkriptase (200U/µl) und RNase Inhibitor (20U/µl) hinzugefügt und für weitere 60min bei 50°C inkubiert. Dabei erfolgte die Primeranlagerung an die RNA und Polymerisierung der entstehenden komplementären DNA. Letztlich wurde diese Reaktion durch 15min bei 70°C terminiert und die Konzentration der cDNA photometrisch mittels des NanoDrops ND-1000 erfasst.

### 3.5.4 Primerdesign

Die Sequenzen der hier zu analysierenden Gene wurden zunächst mittels der Software Ensembl Genome Browser ermittelt. Danach wurden unter Verwendung von Primer3 Input (version 0.4.0) geeignete Bereiche innerhalb der Basenabfolge bestimmt. Dabei achtete man auf Kriterien wie ausreichende Größe der Primersequenzen und möglichst annähernde Annealing-Temperaturen innerhalb eines Primerpaars. Letztlich wurden die designten Primer über die Firma Eurofins MWG synthetisiert.

Bei den hier gewählten Zielgenen (vgl. Kapitel 3.1.11) ist dabei eine Besonderheit im *FFAR2*-Gen zu beachten. Während sämtliche andere Gene innerhalb ihrer Struktur eine Abfolge von Intron- und Exon-Sequenzen aufweisen, besteht besagtes Gen aus lediglich einem Exon. Dies erschwert das Design insofern, dass man zur Analyse von aus RNA transkribierter cDNA möglichst Intron-überbrückende Primer wählen sollte. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass genomische DNA nicht in den angeschlossenen PCR-Analysen ebenfalls amplifiziert wird. Beim *FFAR2*-Gen ist diese Maßnahme aber aus genannten Gründen nicht möglich, sodass eine etwaige Verunreinigung mit genomischer DNA im vorherigen RNA-Extraktionsschritt explizit ausgeschlossen werden musste.

### 3.5.5 Qualitative PCR

Die konventionelle PCR diente im Rahmen dieser Arbeit zur qualitativen Überprüfung einer möglichen Verunreinigung der revers transkribierten cDNA mit aus den Zellen stammender genomischer DNA und erfolgte anhand einer Stichprobe aus allen durchgeführten Versuchsansätzen. Als Positivkontrollen verwendete man genomische DNA aus humanem Gewebe, die aus der Probensammlung unserer Arbeitsgemeinschaft stammten.

Dabei werden als Referenzgene humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und humaner GAPDH-Promotor eingesetzt. Pro isolierter Probe in diesem Versuch wurden 3µl cDNA eingesetzt. Es wurde jeweils ein Ansatz der Probe mit und ohne DNA-Verdau nach RNA-Extraktion miteinander verglichen. Der eingesetzte Reaktionsansatz und das genutzte PCR-Programm sahen nach der Etablierung dabei folgendermaßen aus:

**Tab. 3-20: Mastermix für die konventionelle PCR**

Komponente	Volumen
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	3 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
10x PCR Puffer	5 µl
Primer forward/reverse (10 µM)	Je 2,5 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Aqua bidest.	32,8 µl

**Tab. 3-21: PCR-Programm**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	5 min	94,0 °C	1 x
Denaturierung	45 sek	94,0 °C	30 x
Annealing	30 sek	A*	
Elongation	75 sek	72,0 °C	
Elongation	10 min	72,0 °C	1 x

A\* bezieht sich dabei auf die Annealing Temperatur der verwendeten Primer (vgl. Tab. 3-22)

**Tab. 3-22: Annealing Temperatur der verwendeten Primer**

Gen	Annealing Temperatur
hGAPH	56,0 °C
hGAPDH-Promotor	62,0 °C

Nach erfolgtem PCR-Lauf wurden die Produkte mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entstandenen Laufbanden verglichen.

### 3.5.6 Quantitative Real Time PCR

Im Rahmen der durchgeführten RT-PCR ist eine quantitative Aussage über die Menge der jeweils resultierenden PCR-Produkte möglich. Dazu wird SYBR Green verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die bei Amplifikation entstehende doppelsträngige DNA eingelagert wird und somit eine Echtzeit-Analyse der entstehenden Produktmenge bei jedem Zyklus der PCR ermöglicht.

Zur Durchführung wurden jeweils 1µl cDNA in den Mastermix eingesetzt und als interner Standard wurde das *Housekeeping gene* Cyclophilin genutzt. Nach Etablierung der Primer wurden die Modalitäten für das PCR-Programm folgendermaßen gewählt:

**Tab. 3-23: Mastermix für die RT-PCR** (Gesamtvolumen 20 µl)

Komponente	Volumen
SYBR Green Supermix	10 µl
Primer forward/reverse (10 µM)	Je 1 µl
Aqua bidest.	7 µl

**Tab. 3-24: Annealing Temperaturen und Zyklenzahl der verwendeten Primer**

Gen	Annealing Temperatur	Zyklenzahl
ACSL5	63,0 °C	33 x
Cyclophilin	63,0 °C	33 x
BID	62,0 °C	33 x
Caspase 8	63,0 °C	33 x
Mortalin	63,0 °C	35 x
FFAR2	58,0 °C	38 x
FFAR3	56,6 °C	40 x
GPR120	61,0 °C	38 x



**Tab. 3-25: RT-PCR Programm**

Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	10 min	95 °C	1 x
Denaturierung	15 sek	95,0 °C	Z*
Annealing	15 sek	A*	
Elongation	20 sek	72,0 °C	
Schmelzkurve	1 min	55,0 °C	1 x
	15 sek	55 °C → 95 °C	89 x

A\* entspricht der Annealingtemperatur und Z\* der Zyklenzahl, wie sie jeweils für die einzelnen Primer in Tab. 3-24 aufgeführt ist.

Auch hier folgte dieser Amplifikation eine elektrophoretische Auftrennung der resultierenden PCR-Produkte.

### 3.5.7 Gelelektrophorese

Mittels der Gelelektrophorese können die erzeugten PCR-Produkte nochmals anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Sequenzen infolge ihrer unterschiedlichen Größen mit verschiedenen Geschwindigkeiten durch das elektrische Feld.

Hierzu wurde eine horizontale Elektrophorese durchgeführt, bei der jeweils 20µl der Proben mit den PCR-Produkten in einem 2%igem Agarose/TBE-Gel aufgetrennt wurden. Sowohl im Gel, als auch im Laufpuffer befand sich dabei zusätzlich Ethidiumbromid, welches in die doppelsträngige DNA interkalierte. Durch Fluoreszenz dieses Ethidiumbromids bei Anregung mit UV-Licht (320nm) erfolgte letztlich der Nachweis.

## 3.6 Proteinchemische Methoden

### 3.6.1 Proteinisolation aus Zellen mittels Tri-Reagenz und Proteinbestimmung

Bis zum Vorgang der Phasentrennung wurde die Proteinisolation mittels Tri-Reagenz identisch mit der RNA-Isolation aus den gleichen Proben durchgeführt (vgl. Kapitel 3.5.1). Für das weitere Vorgehen wurde nun aber die organische Unterphase verwendet.

Die Präzipitation der darin enthaltenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 1,5ml Isopropanol, kurzer Mischung und zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur. Es schloss sich eine Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für weitere 15min an, wodurch sich ein Proteinpellet ausbildete. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet gewaschen. Dazu wurde dieses mit 2ml 0,3mM GuanidinHCl/Ethanol-Lösung versetzt, 20min bei Raumtemperatur inkubiert und für weitere 5 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimalig wiederholt, bevor das Pellet in 2ml 100% Ethanol aufgenommen und nach 20min Inkubation letztmalig in identischer Weise gewaschen wurde. Daraufhin trocknete man das Proteinpellet für 5-15min bei Raumtemperatur und fügte 250µl 7,5M Urea/1,8M DTT (versetzt mit Protease-Inhibitor) hinzu. Durch erneute Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur löste sich das Pellet, bevor das Lysat bei 95°C für 5min zuerst erhitzt und dann mittels des Sonoplus-Ultraschallgerätes letztmalig mechanisch homogenisiert wurde.

Mit diesen Proteinhomogenisaten als Ausgangsproben führte man letztlich eine Proteinbestimmung im Dreifachansatz mittels des D<sub>c</sub>-Protein-Assays von BioRad gemäß den Herstellerangaben durch. Dabei wurden jeweils 5µl der einzelnen Proben mit den Assay Reagenzien A, B und S versetzt, wodurch eine zweistufige Reaktion einsetzte. Zunächst reagierten hierbei die Probenproteine mit dem in den Reagenzien enthaltenem Kupfer, was wiederum im zweiten Schritt eine Reduktion von Folin-Reagenz zur Folge hatte. Es kam zum charakteristischen blauen Farbumschlag mit maximaler Absorption bei 750nm und minimaler Absorption bei 405nm. Dieser wurde kolorimetrisch erfasst und unter Zuhilfenahme einer Standardreihe mit definierten Verdünnungen von BSA konnten die Proteinkonzentrationen in den Proben ermittelt werden.

### **3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot**

Zunächst wurden die Proteinproben entsprechend den zuvor gemessenen Konzentrationen mit Laemmli-Puffer (2x konzentriert) versetzt, sodass man eine Menge von 25µg Protein pro Tasche der 10%igen Gele erreichte.

Nachfolgend erfolgte die eigentliche Auftrennung der Proteinproben mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 120mV über 1h hinweg. Dabei wurden die Proteinstrukturen denaturiert, sodass letztlich eine Auftrennung der Proben anhand der Molekulargewichte stattfand. Der *PeqGold Prestained Protein Marker V* wurde dabei als Standard verwendet. Anschließend führte man den Blot-Vorgang in der Semi-Dry-Technik durch und transferierte bei

einer Stromstärke von 210mA über 45min die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran. Zur Überprüfung etwaiger Proteinreste auf dem Gel und eines dementsprechend unvollständigen Transferierungsvorgangs wurden die Gele nach dem Blot für jeweils 10 min nacheinander in Coomassie-Blue Färbe- und Entfärbelösung (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-14) geschwenkt und damit potentiell verbliebene Proteine sichtbar gemacht. Durch eine einstündige Inkubation der PVDF-Membran wiederum mit einer 5% Milchpulver/TBST-Lösung wurden die unspezifischen Bindungsstellen geblockt, sodass im weiteren Verlauf die selektive Detektion der immobilisierten Proteine möglich war. Dazu führte man sequenzielle Inkubationen mit entsprechenden Antikörpern (vgl. Kapitel 3.1.12, Tab. 3-18) durch. Nach einer Behandlung über Nacht bei 4°C mit einem für das jeweilige Zielprotein spezifischen Primärantikörper folgten mehrere Waschschriffe mit TBST-Puffer (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-9). Anschließend fand die Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper statt (über 1h bei Raumtemperatur). Die resultierenden HRP-gekoppelten Immunkomplexe mit den an der Membran haftenden Proteinen wurden durch Chemilumineszenz unter Verwendung des *ECL Western Blotting Substrate Kits* und nachfolgender Belichtung bzw. Entwicklung eines Films sichtbar gemacht. Da mehrere Zielproteine mittels Antikörper auf einer Membran detektiert werden sollten, wurde diese entsprechend vor der erneuten Inkubation mit einem weiteren Primärantikörper zunächst für 30min bei 50°C mit Stripping Puffer (vgl. Kapitel 3.1.5, Tab. 3-13) behandelt. Da nun auch wieder die unspezifischen Bindungsstellen frei lagen, war eine nochmalige Inkubation mit 5% Milchpulver/TBST-Lösung über 1–2h bei Raumtemperatur notwendig. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Proben und als interner Standard wurde beim Western Blot das *housekeeping protein*  $\beta$ -Aktin verwendet. Dazu inkubierte man die Membranen bei Raumtemperatur für ca. 45min mit dem entsprechenden Primärantikörper.

Mittels *ImageJ* wurde letztlich die Auswertung der Blots durchgeführt, wobei die Software die Schwärzung des Films innerhalb der einzelnen Laufbanden mittels Densitometrie erfasste und somit objektiv vergleichbar machte.

### **3.7 Statistik**

Zur Erfassung, Verwaltung und Aufbereitung der gewonnenen Daten wurde Microsoft Excel 2010 verwendet. Die Daten werden als Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen angegeben, wobei die statistische Auswertung mithilfe des ungepaarten T-Tests erfolgte. Ein p-Wert von  $p < 0,05$  wurde dabei als statistisch signifikant festgelegt.

---

## **4. Ergebnisse**

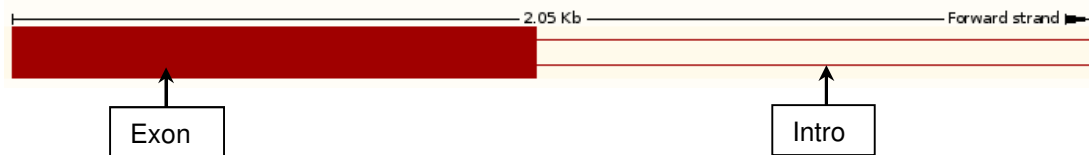
### **4.1. Identifikation potentieller ACSL5-assoziiert regulierter Moleküle**

Eine konkrete Fragestellung innerhalb der hier ausgeführten Untersuchungen bestand darin, mögliche, bisher unbekannte regulative Effekte der ACSL5 auf weitere zelluläre Moleküle aufzudecken und eingehender zu beschreiben. Dabei ergaben sich zum damaligen Zeitpunkt in Studien der Arbeitsgruppe mittels 2D-Gelen aus den hier beschriebenen Zelllinien bereits erste Hinweise hinsichtlich eines „Kandidaten-Moleküls“, das möglicherweise einer ACSL5-Regulation unterlag. Es handelt sich dabei um das im Mitochondrium lokalisierte Mortalin (HSPA9) (*Manuskript in Vorbereitung*). Um diese Erkenntnisse weiter funktionell zu untersuchen, wurde das besagte Protein ebenfalls in diese Analysen aufgenommen.

### **4.2 Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA**

Der Ausschluss einer Kontamination der isolierten RNA war essentiell für die weiteren Analysen, sodass hier nochmals explizit nach Generierung der Proben in der Zellkultur eine erstmalig vorbereitende Untersuchung stattfand.

So bestand vor allem hinsichtlich des für das Zielgen FFAR2 gewählten Primerpaars eine besondere Anfälligkeit für falsch-positive Amplifikationsergebnisse in Anwesenheit von genomischer DNA (vgl. Kapitel 3.5.2 und 3.5.4). Die besondere Architektur dieses Gens mit seiner einzelnen Exon-Sequenz verhinderte die Generierung von Intron-übergreifenden Primersequenzen (vgl. Abb. 4-1). Somit könnte in den geplanten molekularbiologischen Untersuchungen nicht mehr sicher zwischen der aus mRNA synthetisierten cDNA oder potentieller Verunreinigung mit genomischer DNA differenziert werden. Aus diesem Grunde wurde der Schritt des eigentlichen DNase-Verdaus nach RNA-Extraktion vorgeschaltet.



**Abbild. 4-1: Schematische Darstellung der Gensequenzen des FFAR2-Gens.**

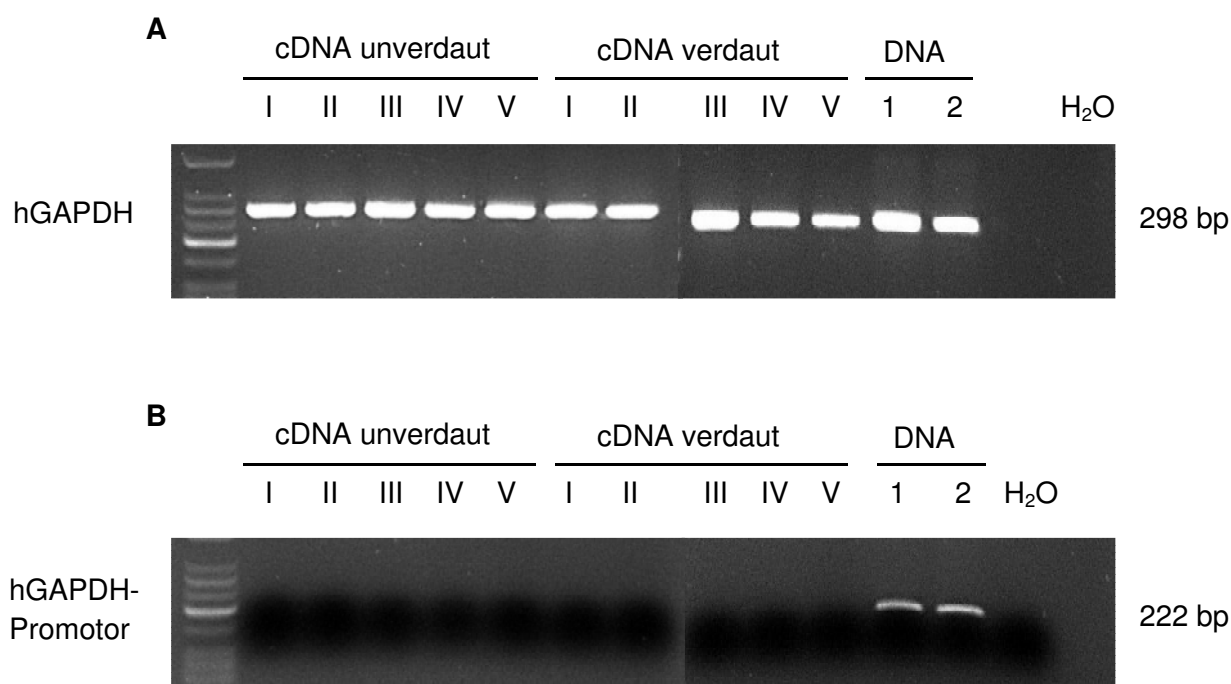
Das Gen des FFAR2 hat eine Gesamtgröße von 2051 Basenpaarungen und kodiert damit eine Abfolge von 330 Aminosäuren nach Translation. Es ist auf dem Chromosom 19 lokalisiert und weist lediglich ein singuläres Exon innerhalb seiner Sequenz auf. Dementsprechend ist ein Intron-übergreifendes Primerdesign nicht möglich, was die resultierenden Primer anfällig für Verunreinigungen mit genomischer DNA macht. (*modifiziert nach Ensemble Genome Browser*)

Generell wurde aber bis dorthin die Notwendigkeit einer solch zeitaufwändigen und auch durch die benötigten Reagenzien kostenintensiven Prozedur nicht explizit untersucht. Es wurde daher aus der Gesamtheit der im Rahmen dieser Analysen gewonnenen Proben eine Stichprobe aus 5 Ansätzen zufällig ausgewählt (vgl. Tab. 4-1), um einen direkten Vergleich zwischen solchen mit und ohne DNA-Verdau durchzuführen. Anschließend wurden die resultierenden cDNAs mittels PCR auf etwaige Kontaminationen durch Genom-DNA geprüft. Als Positivkontrollen wurde humane (genomische) DNA aus Leber und Niere verwendet.

Dargestellt sind dabei nun in Abb. 4-2 A und B die entsprechenden Gelelektrophorese-Bilder der bei der PCR entstandenen Produkte. In allen Proben ließen sich eindeutig Amplifikationen derjenigen Primersequenzen der ubiquitär vorkommenden humanen GAPDH nachweisen, die komplementär zu den im Gen enthaltenen Exon-Abschnitten generiert wurden (Abb. 4-2 A). Untersuchte man hingegen explizite Bereiche des Gens, die nur in genomischer DNA anwesend sein können, so ergab sich Folgendes (Abb. 4-2 B): Beim PCR-Durchlauf mit einem spezifischen Primerpaar für die nicht in der mRNA wiedergegebenen Promotor-Sequenzen von hGAPDH konnten nur für die Kontrollen aus genomischer DNA entsprechende Banden detektiert werden. Lediglich hier entstand also ein Produkt. Im Umkehrschluss waren also sowohl in den Proben mit, als auch ohne vorherigen DNA-Verdau keine Genabschnitte außerhalb der Exone ermittelbar und dienten als Matrize für die Amplifikation.

Anhand dieses Experimentes konnte also demonstriert werden, dass zumindest im Rahmen dieses Zellkulturmodells der DNase-Verdau nicht notwendig ist. Auch ohne ihn ließen sich innerhalb der Stichprobe keine Spuren von genomischer DNA

nachweisen. Dementsprechend wurde nachfolgend davon ausgegangen, dass keine relevante DNA-Kontamination mehr bestand.



**Abb. 4-2: Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA.** (A) Nach PCR-Lauf mit Primern zum Nachweis von Gensequenzen aus dem Bereich der Exone des hGAPDH fanden sich überall entsprechende PCR-Produkte wieder. (B) Bei Verwendung eines spezifischen Primers für eine Basenabfolge im hGAPDH-Promotor hingegen konnten lediglich in den Kontrollen mit genomischer DNA die zugehörigen Banden nachgewiesen werden. Low molecular weight DNA Ladder diente als Laufmarker.

**Tab.4-1: Genaue Bezeichnung der verwendeten Proben**

Zufällig gewählte Stichproben	
Probe I	CaCo P14 Kontrolle Orlistat (Ansatz 1)
Probe II	CaCo-2 20µM Orlistat (Ansatz 2)
Probe III	CaCo P14 20µM Orlistat (Ansatz 3)
Probe IV	CaCo P14 200µM Etomoxir (Ansatz 3)
Probe V	CaCo 3/25 Kontrolle Etomoxir (Ansatz 3)

Kontrollen aus genomischer DNA	
Positivkontrolle 1	NG 221 (humane Niere)
Positivkontrolle 2	NG 236 (humane Leber)

### 4.3 Expression von ACSL5 und möglicher ACSL5-abhängig regulierter Moleküle in unbehandelten Zellen

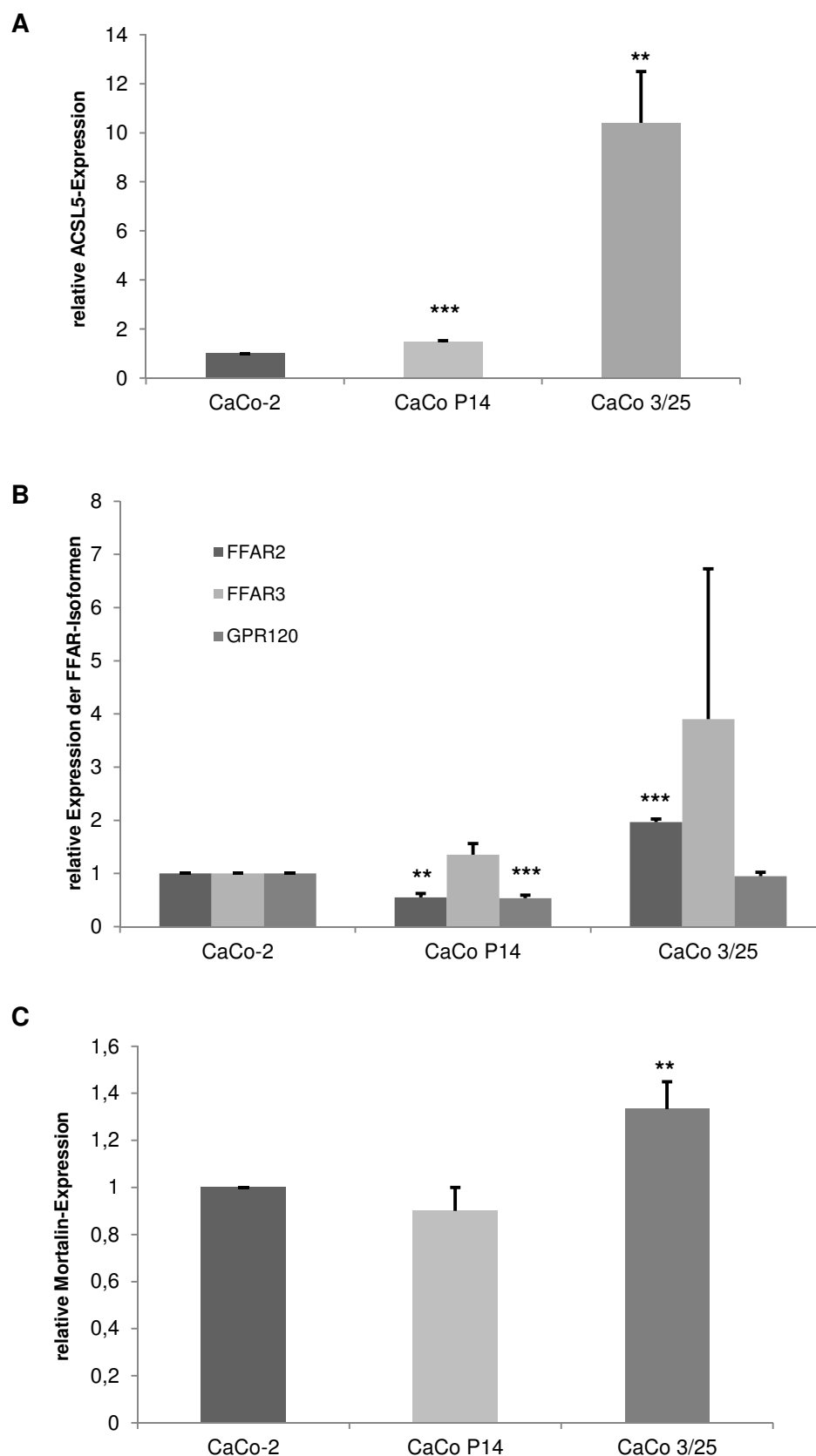
Nach der Abklärung der Reinheit der verwendeten Proben als Ausgangspunkt für die gesamten hierauf aufbauenden Expressionsanalysen wurde zunächst der anfängliche Status der unbehandelten Zellen betrachtet. Dazu erfolgte die Untersuchung der eingesetzten Zelllinien hinsichtlich ihrer mRNA-Expressionsraten der zu examinierenden Zielproteine. Um mögliche ACSL5 bedingte Auswirkungen besser erfassen zu können, wurde dabei neben der Wildtyp-Variante der Zelle auch ein Zellkulturmodell mit artifizierter Überexpression des Enzyms verwendet.

Hinsichtlich des zu erwartenden ACSL5-Levels wurde nochmals der Erfolg der Transfektion bestätigt. Im Vergleich zum Wildtyp CaCo-2 des Zellkulturmodells exprimierte die Leertransfektante CaCo P14 die ca. anderthalbfache Menge an ACSL5. Die ACSL5-transfizierte Zelllinie CaCo 3/25 hingegen erreichte gar eine annähernd zehnfache relative mRNA-Expression dieses Enzyms (Abb. 4-3 A).

Bezüglich der Ausgangsbefunde der FFAR-Subtypen (vgl. Abb. 4-3 B) war dabei festzustellen, dass die FFAR2-Level bei den CaCo P14 hochsignifikant vermindert waren ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zum Wildtyp, während die ACSL5 überexprimierenden CaCo 3/25 höchstsignifikant vermehrte Mengen an mRNA dieses G-Protein gekoppelten Rezeptor aufwiesen ( $p < 0,001$ ). Hier war das relative FFAR2-mRNA-Level beinahe doppelt so hoch. Auch beim FFAR3 zeigten sich auf die CaCo-2 bezogen deutlich höhere Mengen an spezifischer mRNA innerhalb der CaCo 3/25 (ca. das 3,9fache). Die Werte innerhalb der Leertransfektanten CaCo P14 waren dagegen nur geringgradig gesteigert. Bei Betrachtung des ebenfalls hier untersuchten GPR120 fiel auf, dass sich die CaCo-2 und die ACSL5-überexprimierenden CaCo 3/25 innerhalb der entsprechenden mRNA-Expressionslevel fast nicht unterschieden. Lediglich die CaCo P14 wiesen höchstsignifikant reduzierte Level auf.

Letztlich wiesen die Volltransfektanten ebenfalls hochsignifikant gesteigerte mRNA-Level für Mortalin auf ( $p < 0,01$ ). So war die relative Expression im Vergleich zum Wildtyp um etwa 33% gesteigert (vgl. Abb. 4-3 C).



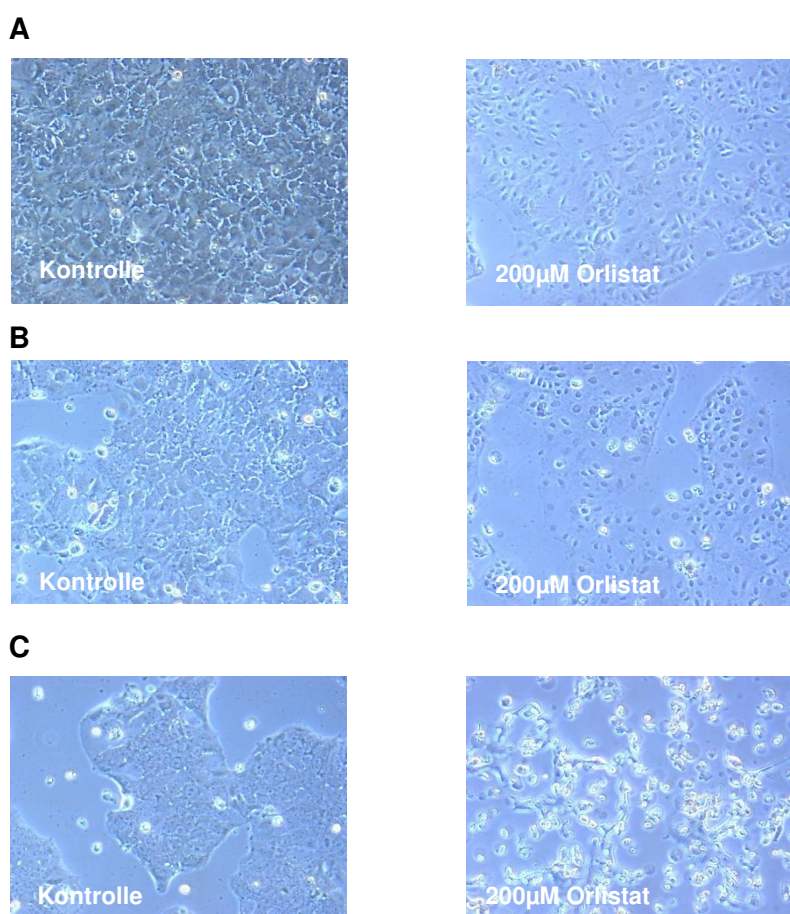


**Abb. 4-3: mRNA-Expressionslevel im unbehandelten Zellkulturmodell.** Nach Kultivierung der Zellen über 4 Tagen im Inkubationsmedium erfolgte die RNA-Isolation und Messung der Expression von ACSL5 (A), den verschiedenen FFAR-Isoformen (B) bzw. Mortalin (C) mittels qRT-PCR. (n=3, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus CaCo-2)

## 4.4 Inkubation mit Orlistat

Die Kernanalysen dieser Untersuchungen beschäftigten sich mit den Auswirkungen innerhalb dieses Zellkulturmodells, die durch eine Behandlung mit Orlistat herbeigeführt wurden. Als veränderliche Variablen wurden die Parameter „Konzentration“ und „Inkubationsdauer“ gewählt.

Bereits in der Kultur im Serum-defizienten Medium zeigten sich dabei deutliche morphologische Unterschiede bei allen Zelllinien in Anwesenheit von Orlistat. In Abhängigkeit von der Konzentration dieser Substanz kam es bei der Durchlichtmikroskopie zur Abnahme der scholligen Struktur des Zellrasens unter Behandlung (vgl. Abb. 4-3 A - C). Zudem fiel auf, dass bei den ACSL5-transfizierten CaCo 3/25 eine erhöhte Anzahl toter Zellen unter Inkubation mit hohen Konzentrationen des Orlistats auftraten, wohingegen die Leervektor-transfizierten und Wildtyp-Zellen diesbezüglich nicht so gravierende Veränderungen aufwiesen.



**Abb. 4-4: Durchlichtmikroskopie der Zellen in Kultur unter Orlistatbehandlung.** Dargestellt ist exemplarisch die Morphologie der Zellen CaCo-2 (A), CaCo P14 (B) und CaCo 3/25 (C) zum Abschluss einer 48h Inkubation mit Orlistat im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Vergrößerung x 200

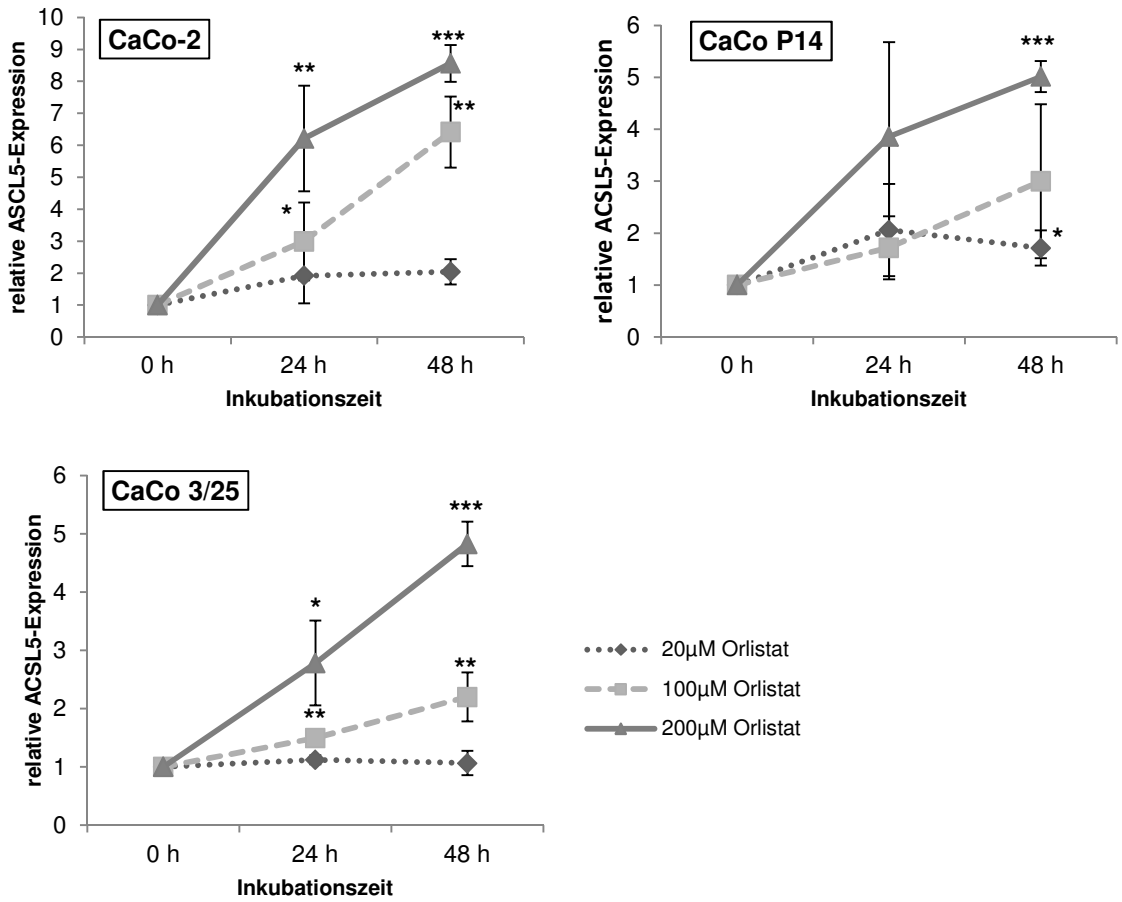
Aber auch unter normalen Kulturbedingungen im Medium mit bovinem Serum außerhalb der Experimente unterschieden sich die ACSL5-Transfektanten im Wachstumsverhalten von den übrigen Zelllinien. So wuchsen die CaCo 3/25 im Vergleich langsamer und auch die entstehenden Monolayer wiesen immer noch größere Lücken innerhalb des Zellrasens auf, als es beim Wildtyp oder der Leervektor-Transfektante der Fall war. Dies schienen schon erste Hinweise darauf zu sein, dass eine gesteigerte ACSL5-Expression und Synthese innerhalb dieser enterozytären Zelllinie einen putativen Einfluss auf das Zellüberleben haben könnten.

#### 4.4.1 ACSL5-Alterationen unter Orlistat

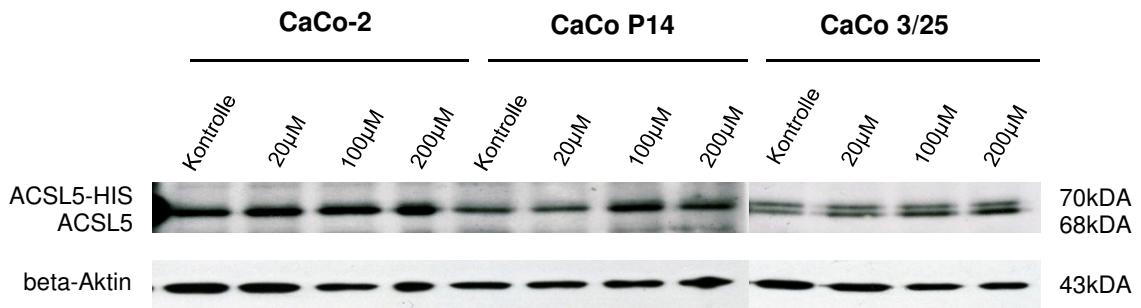
In diesem *in vitro* Modell für das humane Darmepithel wurde mittels der Zugabe von Orlistat zunächst die *de novo* Synthese von Fettsäuren durch die Blockade der Fettsäure-Synthase inhibiert. Parallel dazu verhinderte die Inkubation im Serum-freien Inkubationsmedium die Aufnahme extrazellulärer Fettsäuren in die Zellen. Unter diesen Bedingungen als Ausgangspunkt erfolgte eine Expressionsanalyse der ACSL5 mittels qRT-PCR und Western Blot. Es ließ sich hierbei beobachten, dass die Blockade des Lipidmetabolismus durch Orlistat eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion der ACSL5 innerhalb der Enterozyten zur Folge hatte.

Die Menge der mittels qRT-PCR detektierbaren mRNA innerhalb der Proben stieg progressiv mit der entsprechenden Konzentration und der Inkubationszeit des Orlistats an. Nach Inkubation mit 200µM Orlistat war der Anstieg der Expressionslevel von ACSL5 in allen drei Zelllinien wesentlich höher als bei Inkubation mit 20µM oder 100µM. Auch im Vergleich zwischen 24h und 48h Inkubationsdauer bei den jeweils gleichen Konzentrationen verhält es sich ähnlich, stets waren die ACSL5-Induktionen größer bei längerer Inkubationszeit (vgl. Abb. 4-5 A). So wurde die ACSL5-Expression in CaCo-2 Zellen über 48h durch 100µM Orlistat hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) bis 6,4-fach und durch 200µM gar höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) bis zu 8,5-fach hochreguliert. Bei den Transfektanten hingegen waren analoge Induktionen ebenfalls zu ermitteln, jedoch nicht so ausgeprägt wie im Wildtyp. Bei den CaCo P14 Zellen etwa fand sich nach 48h Inkubation eine höchstsignifikante Heraufregulation der ACSL5 um ca. den Faktor 5, während bei den ACSL5-überexprimierenden CaCo 3/25 Volltransfektanten ebenfalls ein höchstsignifikanter Anstieg auf das max. 4,8-fache der Expressionslevel im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar war.

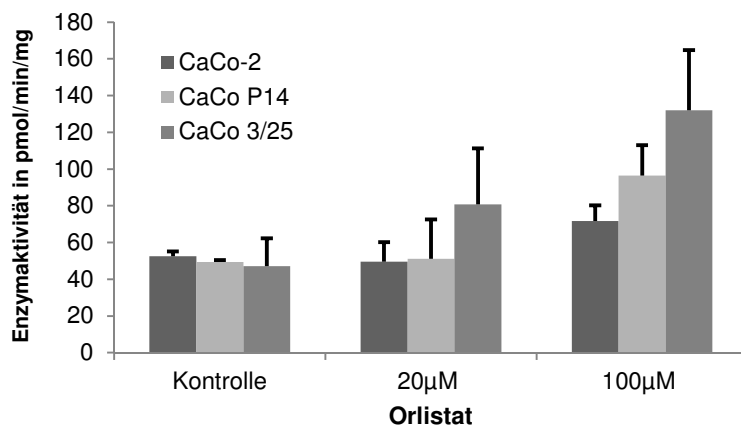
**A**



**B**



**C**



**Abb. 4-5: Induktion der ACSL-Expression in CaCo-2 Zellen unter Orlistat.** CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektant) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektant) wurden für 24h oder 48h mit Orlistat-haltigem EMEM (Konzentrationen: 0 $\mu$ M – 200 $\mu$ M) kultiviert. Nach der Kultivierung wurden die Expression der ACSL5 mittels qRT-PCR (A) und Western Blot (B) (n=1) untersucht. Die in (B) dargestellten Doppelbanden der CaCo 3/25 Zellen stammten dabei von dem bei der Transfektion eingebrachten ACSL5, das noch einen His-Tail aufwies. Es wurde hier folglich ACSL5 partiell als Fusionsprotein synthetisiert (obere Bande). Zu erkennen ist die Zunahme der unteren Bande, die von der ursprünglichen intrinsischen ACSL5 herrührt. Lediglich sie wurde durch die Behandlung beeinflusst. Zusätzlich erfolgte eine Analyse der ACSL-Enzymaktivität bei den über 48h behandelten Zellen (C). (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

Um eine weitere Charakterisierung der Orlistat-bedingten ACSL5-Stimulation zu erzielen, wurde die Hochregulation des Enzyms weitergehend mittels Western Blot untersucht (vgl. Abb. 4-5 B). Hier konnten die zuvor auf Nukleinsäure-Ebene detektierte signifikante Induktion der ACSL5-mRNA-Expression auf Proteinebene sowohl im CaCo-2 Wildtyp (Hochregulation bis zu 1,8-fach), als auch bei Leertransfektanten CaCo P14 (Zunahme auf das 1,4-fache) und den Volltransfektanten CaCo 3/25 (bis zu 2-fache Steigerung) nochmalig verifiziert werden. Die ersichtliche Doppelbande bei CaCo 3/25 war dabei durch die Transfektion bedingt. Das eingeschleuste ACSL5 wurde als Fusionsprotein mit einem His-Tail am C-terminalen Ende synthetisiert und führte zur Bildung der oberen Bande, während die zelleigene ACSL5 die untere Bande hervorrief. Eben diese intrinsische ACSL5 zeigte dabei den besagten regulativen Effekt. Generell hatte die Markierung des Enzyms mit His jedoch keinerlei Auswirkung auf die eigentliche enzymatische Aktivität der ACSL5, was bereits aus früheren Untersuchungen bekannt war (Gassler et al. 2007).

Im nächsten Schritt galt es zu überprüfen, ob neben der quantitativen Zunahme der ACSL5 auch eine gesteigerte Enzymfunktion nachweisbar war. Dazu wurden über 48h hinweg entsprechend behandelte Zellen dem Acyl-CoA Synthetase Aktivitätsassay unterzogen. Auch bei dieser funktionellen Analyse ließ sich eine Induktion der Gesamtaktivität der ACSL proportional zur Orlistat-Konzentration detektieren (vgl. Abb. 4-5 C). Am stärksten war die Zunahme dabei innerhalb der CaCo 3/25 Zellen. Hier verdreifachte sich die Enzymaktivität bei 100 $\mu$ M Orlistat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Aber auch in den beiden verbleibenden Zelllinien, den CaCo P14 und CaCo-2, konnten analoge Effekte anhand des vermehrt entstandenen radioaktiven Produkts  $^3$ H-Palmitoyl-CoA bestimmt werden.

Im Rahmen der Gesamtheit dieser Daten konnte somit sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene eine vermehrte ACSL5-Expression in Verbindung mit einer gesteigerten ACSL-Aktivität bestätigt werden.

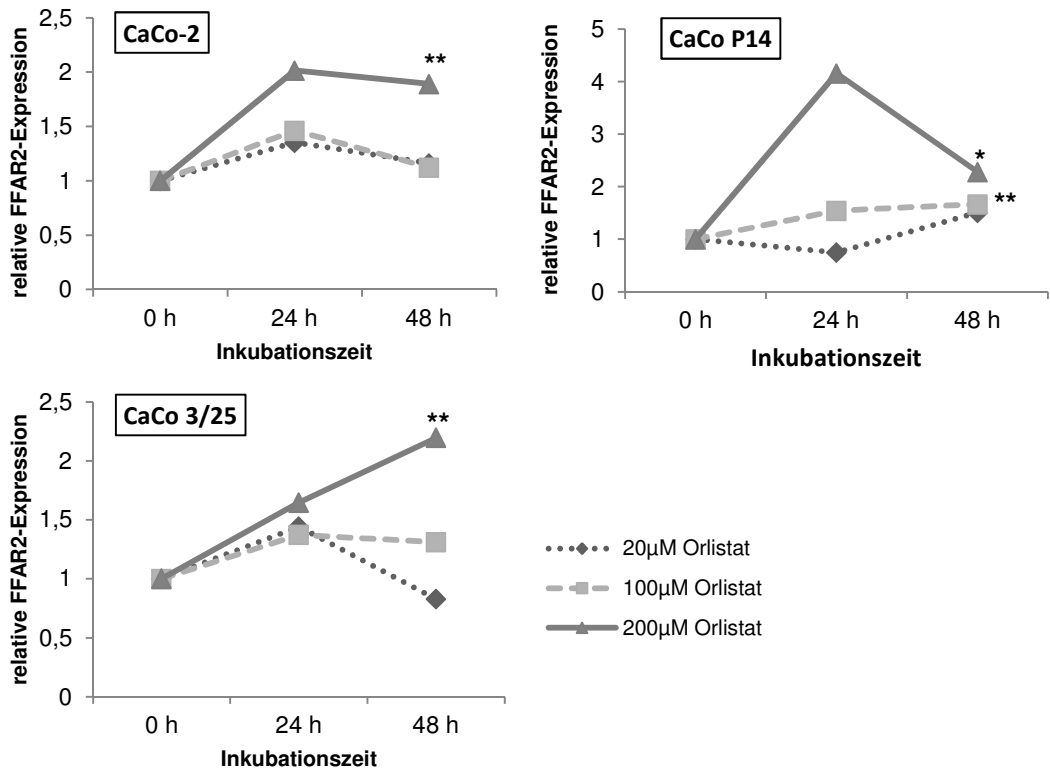
#### 4.4.2 Alterationen der FFAR-Isoformen unter Orlistat

Im nächsten Schritt sollte nach der Bestätigung einer ACSL5-Induktion unter *in vitro* Bedingungen die Frage geklärt werden, inwiefern sich hierdurch Auswirkungen auf die metabolischen Eigenschaften validieren lassen.

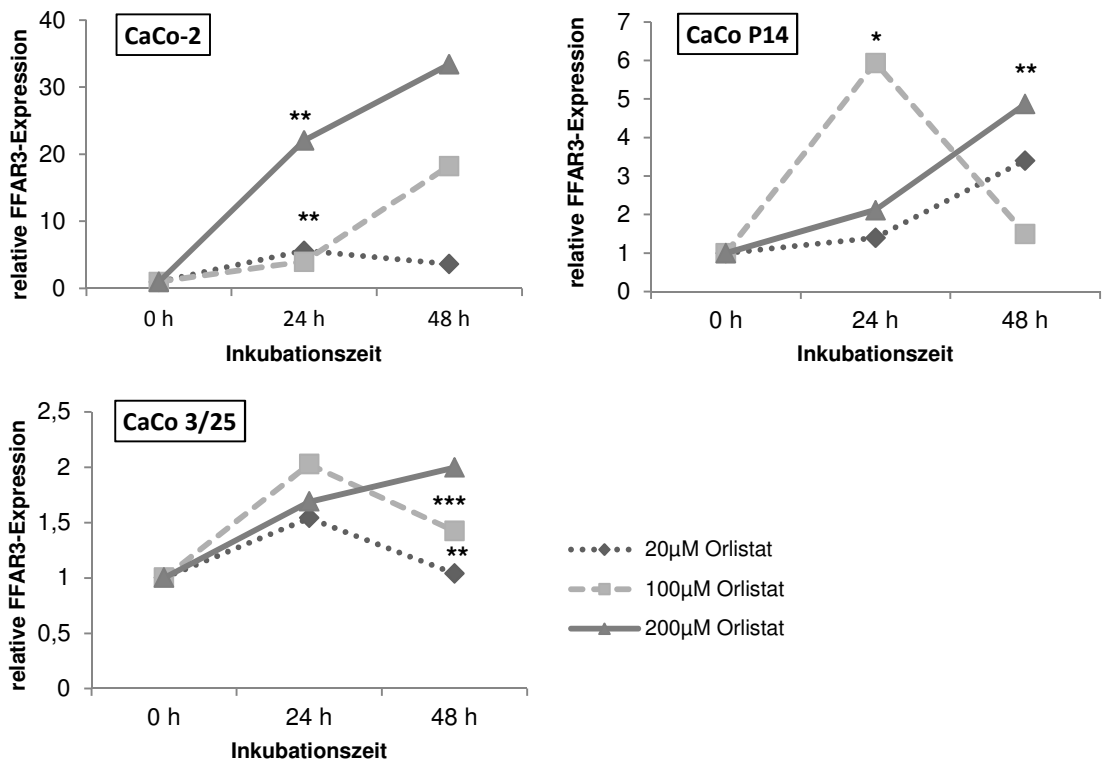
Dazu wurden die Expressionslevel der vor allem im Dünn- und Dickdarm vorkommenden FFAR-Isoformen FFAR2, FFAR3 und GPR120 eingehender untersucht. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und nutzen freie Fettsäuren als Signalmoleküle, um die zelluläre Homöostase über Modifikationen von Enzymaktivitäten oder Genregulation zu steuern.

Abb. 4-6 zeigen die relativen Expressionslevel der drei verschiedenen Mitglieder der FFAR in den mit Orlistat behandelten Zelllinien. Dabei wies FFAR2 in CaCo-2 und CaCo 3/25 Zellen ein hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) und in CaCo P14 ein signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigertes Vorkommen der entsprechenden mRNA nach 48h Inkubation auf (vgl. Abb. 4-6 A). In CaCo-2 war FFAR2 auf das 1,8-fache, in CaCo P14 auf das 2,3-fache und in CaCo 3/25 auf das 2,1-fache nach 48h Bebrütung mit  $200\mu\text{M}$  Orlistat im Vergleich zur jeweils unbehandelten Kontrollgruppe erhöht. Auch hier schien ein proportionaler Zusammenhang zwischen der gewählten Orlistat-Konzentration und den detektierbaren FFAR2-Leveln zu bestehen. Auffällig war jedoch, dass die maximalen regulativen Effekte größtenteils nach 24h Inkubationsdauer auftraten und nach 48h bereits wieder rückläufige Werte gemessen wurden. So sanken etwa die ermittelten Expressionswerte beim Wildtyp (CaCo-2) und den kontroll-transfizierten Zellen (CaCo P14) bei Behandlung über 24h hinweg erneut ab. Nur bei denjenigen Zellen mit artifiziiell erhöhter ACSL5-Expression (CaCo 3/25) blieb zumindest in Anwesenheit hoher Konzentrationen von Orlistat ( $200\mu\text{M}$ ) dieser Effekt aus.

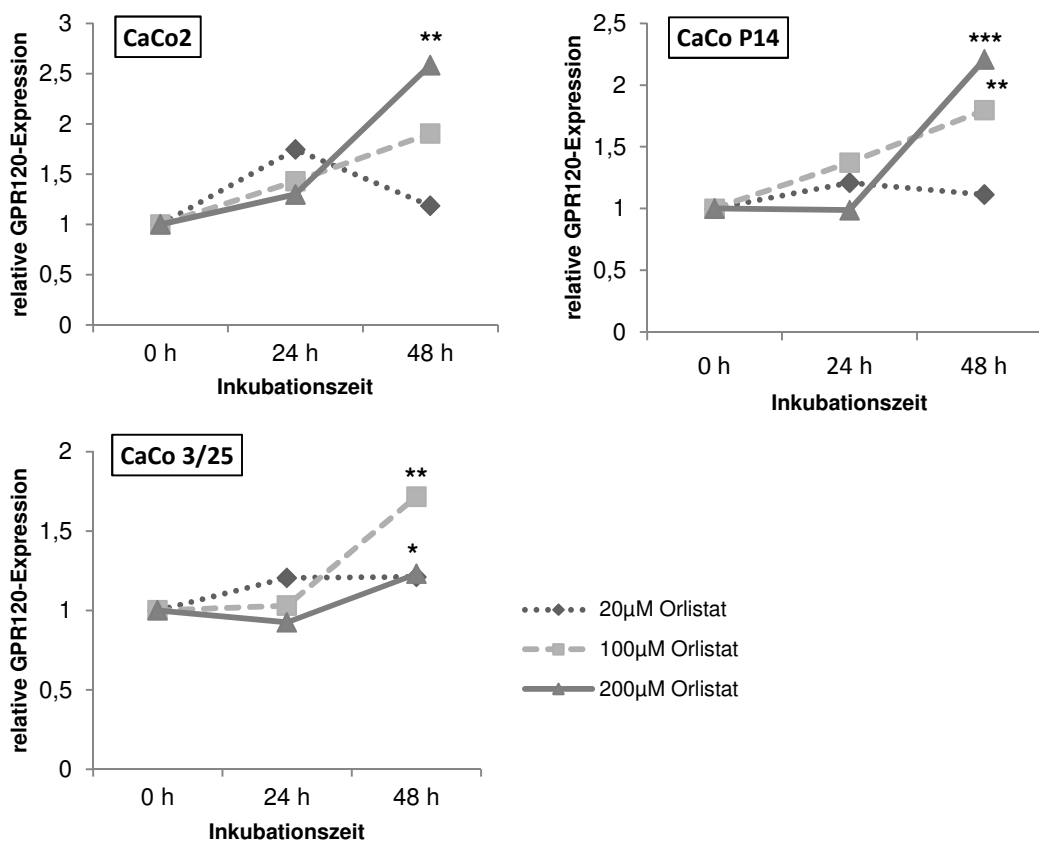
**A**



**B**



C



**Abb. 4-6: Regulative Effekte auf die mRNA-Expression verschiedener FFAR-Isoformen in CaCo-2 Zellen unter Orlistat.** CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektant) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektant) wurden für 24h bzw. 48h mit Orlistat-haltigem EMEM (Konzentrationen: 0µM – 200µM) kultiviert. Daraufhin erfolgte die Bestimmung der mRNA-Level für FFAR2 (A), FFAR3 (B) und GPR120 (C) mittels qRT-PCR. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

Auch bei FFAR3 konnten Änderungen hinsichtlich der mRNA-Level verzeichnet werden. Auffällig war, dass bei beiden transfizierten Zelllinien nach 24h Inkubation die Änderung der FFAR3-Expression am stärksten bei 100µM Orlistat war (bei den CaCo P14 war der entsprechende Anstieg gar signifikant erhöht ( $p < 0,05$ )), bevor sie nach 48h in Kultur mit 100µM Orlistat wieder rückläufig wurden (vgl. Abb. 4-6 B). In Anwesenheit von 200µM Orlistat hingegen waren die entsprechenden 24h-Werte vergleichsweise kleiner. Es war aber bei dieser Orlistat-Konzentration über den Gesamtzeitraum bei CaCo P14 und CaCo 3/25 eine durchgehende Zunahme der FFAR3-Expression zu detektieren. Bei CaCo P14 kam es zur hochsignifikanten Steigerung auf das 4,8-fache ( $p < 0,001$ ) und bei CaCo 3/25 auf das ca. 2-fache nach 48h. Innerhalb des CaCo-2 Wildtyps wiederum waren die maximalen Expressionsanstiege nach 24h und 48h immer assoziiert mit der



Höchstkonzentration des Orlistats. Auch waren die messbaren FFAR3-Level mit letztlich ca. 33,5-facher Erhöhung deutlich größer als bei den Leervektor- und ACSL5-transfizierten Zellen.

Auffällig war ebenfalls, dass bei genauerer Analyse der erhobenen Daten bezüglich der GPR120-Level Folgendes hervorstach (vgl. Abb 4-7 C): Nach 24-stündiger Behandlung mit dem Fettsäure-Synthase-Inhibitor Orlistat ließ sich beobachten, dass die jeweilig erfassten Maximalanstiege der Expression innerhalb der CaCo-2 und der ACSL5-überexprimierenden CaCo 3/25 durch die geringste Konzentration im Experiment induziert war. Demnach kam es bei den CaCo-2 Zellen binnen 24h unter 20µM Orlistat zur 1,7-fachen und bei den CaCo 3/25 Zellen zur etwa 1,2-fachen Steigerung der GPR120-Expression. Bei den Leervektor-transfizierten CaCo P14 wurden nach gleicher Inkubationszeit die höchsten Expressionswerte unter 100µM Orlistat ermittelt. Hier waren die mRNA-Level ca. 1,3-fach erhöht. Nach 48-stündiger Inkubation dagegen verhielt es sich beim CaCo-2 Wildtyp und der Leertransfektante CaCo P14 wiederum so, dass die final detektierbaren Expressionsanstiege wieder mit der jeweiligen Orlistat-Konzentration korrelierten, d.h. mit zunehmender Konzentration stieg auch das letzte GPR120-Level nach 48h an. Die stärksten Veränderungen wurden vom Wildtyp CaCo-2 erreicht, hier kam es zu einem hochsignifikanten Anstieg um beinahe dem Faktor 2,6 ( $p < 0,01$ ), während bei den CaCo P14 die gar höchstsignifikante Erhöhung etwa den Faktor 2,2 erreichte ( $p < 0,001$ ). Die ACSL5-Transfektante CaCo 3/25 erzielte im Vergleich nach 48h Inkubation eine hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) Steigerung der GPR120-Expression um das 1,7-fache und dies unter Behandlung mit der mittleren Orlistat-Konzentration von 100µM.

Zusammenfassend können somit die hier gewonnenen Erkenntnisse folgendermaßen konkretisiert werden: Unter Behandlung mit Orlistat und damit verbundener Induktion der ACSL5 ließ sich für FFAR2 feststellen, dass es auch hier einen scheinbar proportionalen Zusammenhang zwischen der eingesetzten Orlistat-Konzentration und der Hochregulation der FFAR2-Level gibt. Dabei verhielten sich alle drei Zelllinien annähernd analog. Bezüglich der experimentellen Ergebnisse hinsichtlich des FFAR3 konnte man erkennen, dass auch hier nach 48h Inkubation mit den jeweiligen Konzentrationen letztlich ebenfalls die höchste Dosis Orlistat die maximalen FFAR3-Level Anstiege induzierte. Interessanterweise jedoch war diese Induktion der mRNA-Level beim Wildtyp CaCo-2 wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den beiden transfizierten Zelllinien. Und auch bei der Betrachtung von GPR120 waren es wieder die nicht-transfizierten CaCo-2 Zellen, welche die maximalen Erhöhungen innerhalb der GPR120-Level nach 48h Behandlung mit

Orlistat zu verzeichnen hatten. Die ACSL5-überexprimierenden CaCo 3/25 zeigten nach dem gleichen Zeitintervall zwar ebenfalls einen Anstieg der GPR120-Level, aber war dieser im Vergleich hierzu geringer und mit der Inkubation mit 100µM Orlistat assoziiert.

#### 4.4.3 Alterationen proapoptotischer Faktoren unter Orlistat

Eine wesentliche Fragestellung neben der Regulation der zellulären Homöostase und den möglichen ACSL5-bedingten Auswirkungen auf den Lipidmetabolismus bestand darin, zusätzlich etwaige Effekte auf das Zellüberleben eingehender zu analysieren. Dabei wurden gezielt die beiden proapoptotischen Proteine Caspase 8 und Bid ausgewählt, da sie entscheidene Schlüsselpositionen innerhalb der Apoptose-Kaskade markieren. So fungiert Caspase 8 etwa als Initiator-Caspase und leitet den Vorgang des programmierten Zelltodes durch äußere Stimuli ein, während Bid wiederum von entscheidender Bedeutung bei der Mitochondrien-abhängigen Amplifikation dieser Signale ist.

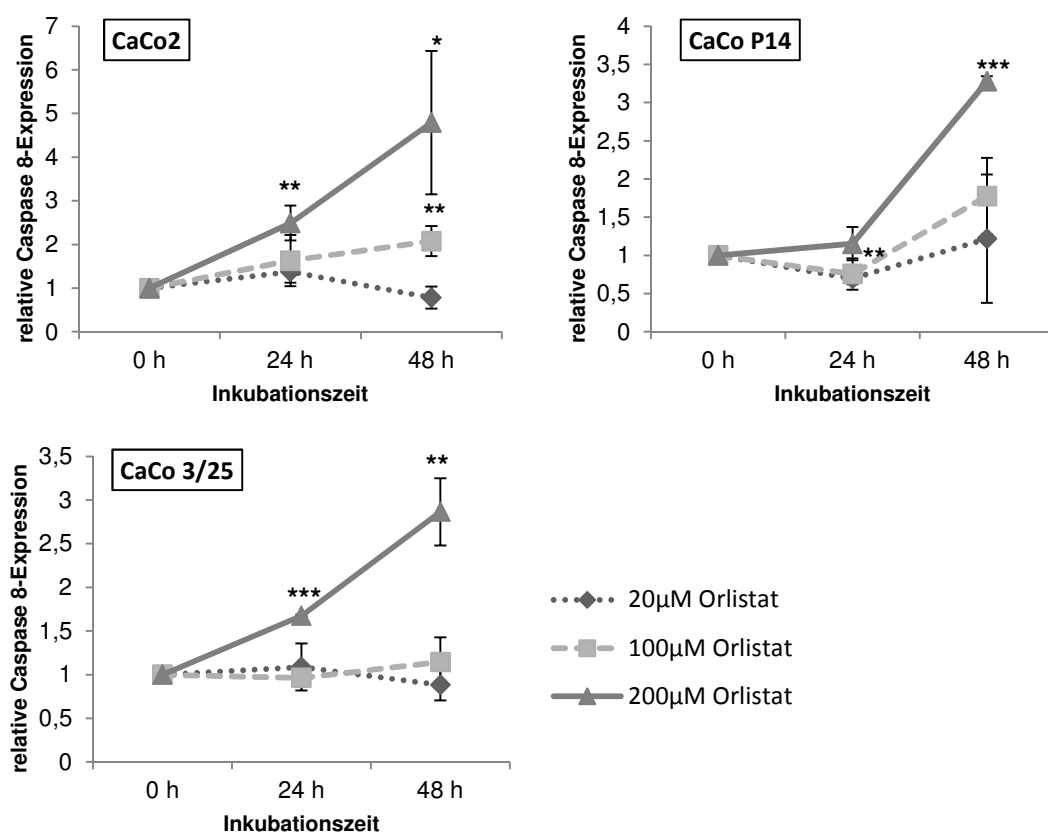
In Abb. 4-7 sind die bei den Arbeiten mit Orlistat aufgetretenen Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Veränderungen von Caspase 8 und Bid illustriert. Begonnen wurde zunächst mit den Analysen bezüglich Caspase 8, da dieses Protein eine Schnittstelle für die Initiierung einer möglicherweise nachfolgenden Apoptosereaktion darstellt. Deutlich ist dabei in Abb. 4-7 A zu erkennen, dass in allen drei zu untersuchenden Zelllinien eine positive Korrelation zwischen der verwendeten Orlistat-Konzentration und den jeweilig detektierbaren regulativen Effekten auf die Caspase 8 Expression bestand. Nach 48h und unter Einfluss der Höchstkonzentration von 200µM wurden die maximalen Werte erreicht, wobei auch hier erneut die CaCo-2 mit der stärksten Regulation auf mRNA-Niveau reagieren und ein ca. 4,7-faches signifikant erhöhtes ( $p < 0,05$ ) Level im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erreicht wurde. Die beiden Transfektanten hingegen zeigten ähnliche, aber geringere Anstiege. Bei der Leertransfektante CaCo P14 ließ sich eine höchstsignifikante ( $p < 0,001$ ) ca. 3,3-fache und bei den ACSL5-transfizierten CaCo 3/25 eine hochsignifikante ( $p < 0,01$ ) etwa 2,9-fache Erhöhung bestätigen.

Im nächsten Schritt analysierte man die putativen Veränderungen hinsichtlich Bid, um eine mögliche Involvierung bzw. Beeinflussung des mitochondrialen Signalweges der Apoptose unter Behandlung zu erfassen. Auch hierbei fanden sich in allen drei Zelllinien Expressionsanstiege auf mRNA-Ebene (vgl. Abb 4-7 C), wobei sich letztlich nach 48-stündiger Inkubation die resultierenden Unterschiede

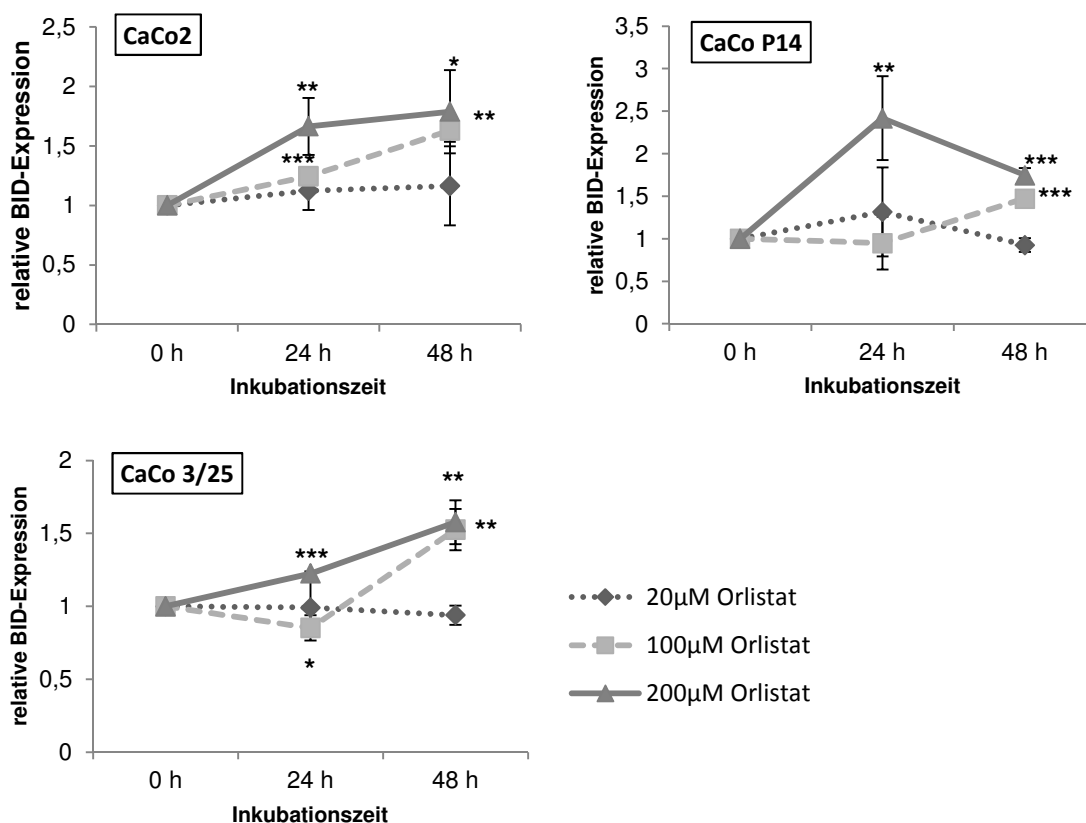
der Bid-Expressionslevel in Kultur mit 100 $\mu$ M und 200 $\mu$ M Orlistat allmählich wieder angingen. Die maximal detektierten mRNA-Level unterschieden sich bei den verwendeten Zellen auch nur unwesentlich. So konnte man bei den CaCo-2 nach Abschluss der 48h eine max. Zunahme auf das 1,78-fache ( $p < 0,05$ ), bei den CaCo P14 auf das 1,74-fache ( $p < 0,001$ ) und bei den CaCo 3/25 auf das max. 1,57-fache ( $p < 0,01$ ) bestimmen.

Es ergaben sich demnach unter dem Einfluss von Orlistat also durchweg im Zellkulturmodell eine deutliche Anhebung der mRNA-Level für Caspase 8, wobei die größten Effekte auf Seiten der nicht transfizierten CaCo-2 lagen. Auch bei Bid konnten Zunahmen der entsprechenden mRNA mittels qRT-PCR erfasst werden, wobei diese bei Wildtyp, Leer- und ACSL5-Transfektante anscheinend jedoch unwesentlich voneinander abwichen. Insgesamt lässt dies folglich eine Orlistat-induzierte Apoptosesensibilisierung vermuten.

A



B



**Abb. 4-7: Anstieg der mRNA-Level proapoptotischer Faktoren in CaCo-2 Zellen unter Orlistat.** CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektant) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektant) wurden für 24h bzw. 48h mit Orlistat (Konzentrationen: 0μM – 200μM) behandelt. Anschließend erfolgte die Analyse von Caspase 8 (A) und Bid (B) mittels qRT-PCR. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrollgruppe der jeweiligen Zelllinie)

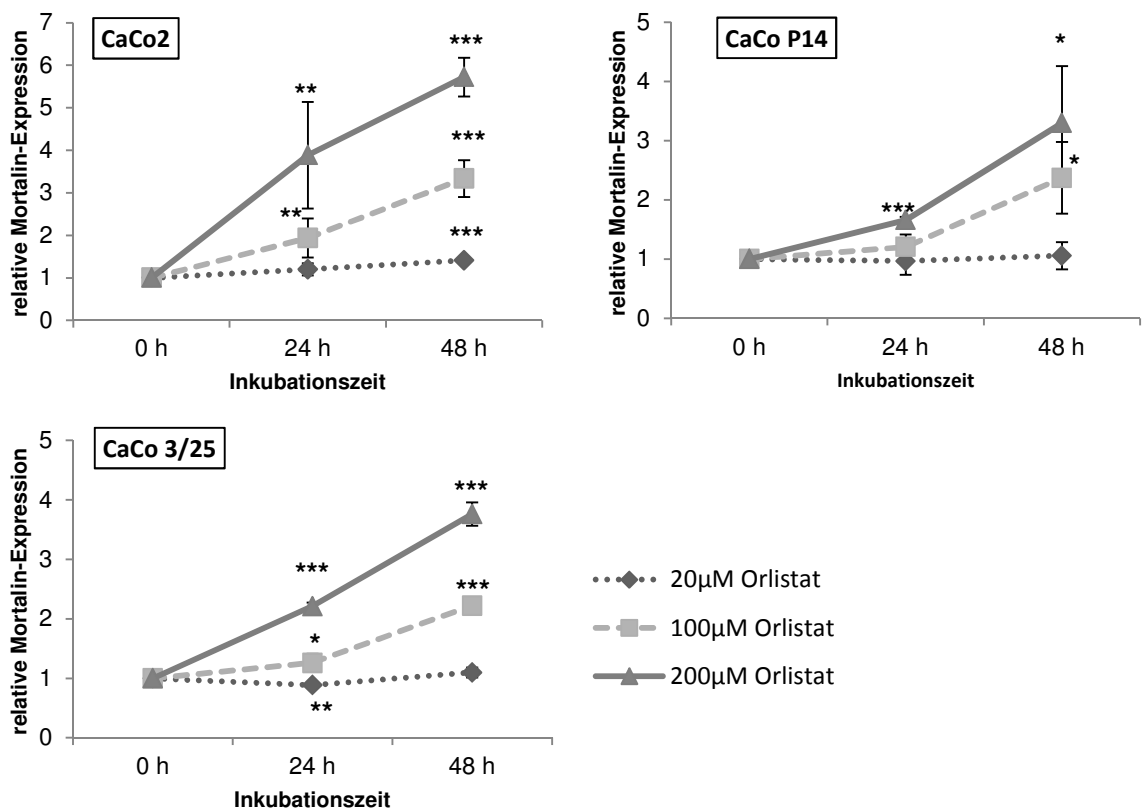
#### 4.4.4 Mortalin-Alterationen unter Orlistat

Im letzten Schritt der Untersuchungen beim *in vitro* Modell in Anwesenheit von Orlistat galt es nun zu klären, inwieweit die hier nachgewiesene ACSL5-Induktion konsekutiv zu möglichen Veränderungen beim Mortalin führt. Bereits in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe lag eine ACSL5-assoziierte Regulation dieses Proteins nahe (*Manuskript in Vorbereitung*), allerdings wurden dabei die Effekte innerhalb des Zellkultursystems ohne äußere Stimulation untersucht. Innerhalb dieser Arbeiten sollte nun geprüft werden, ob sich der oben genannte Zusammenhang auch bei gezielter Induktion der ACSL5 bestätigen lässt. Dazu wurden nach der Kultivierung der Zellen abermals die mRNA-Level von Mortalin mittels qRT-PCR bestimmt.

Anhand von Abb. 4-8 ist dabei durchweg, ähnlich wie bei ACSL5 selbst, ein konzentrations- und zeitabhängiger Zusammenhang zwischen der Orlistat-Wirkung und den detektierbaren Anstiegen der Mortalin-Level ersichtlich. In allen Zelllinien

verhielt es sich dabei analog. Je höher Orlistat dosiert war und je länger die Zellen in Anwesenheit der Substanz kultiviert wurden, umso stärker waren die Effekte auf das Mortalin. Innerhalb der CaCo-2 Zellen verzeichneten sich die höchsten regulativen Effekte nach 48h unter Einfluss von 200 $\mu$ M Orlistat mit einer höchstsignifikanten Zunahme der mRNA-Level auf das 5,7-fache ( $p < 0,001$ ). Hiernach folgten die ACSL5-überexprimierenden CaCo 3/25 Zellklone mit einer ebenfalls höchstsignifikanten Steigerung der Mortalin-Level um den Faktor 3,9 ( $p < 0,001$ ). Bei der Leervektor-Transfektante CaCo P14 waren nach gleich langer Inkubation Erhöhungen der Mortalin-mRNA mit einem signifikanten Anstieg auf das 3,2-fache zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ).

Insgesamt schien sich folglich anhand dieser Daten eine ACSL5-abhängige Zunahme der Mortalin-Level belegen zu lassen.



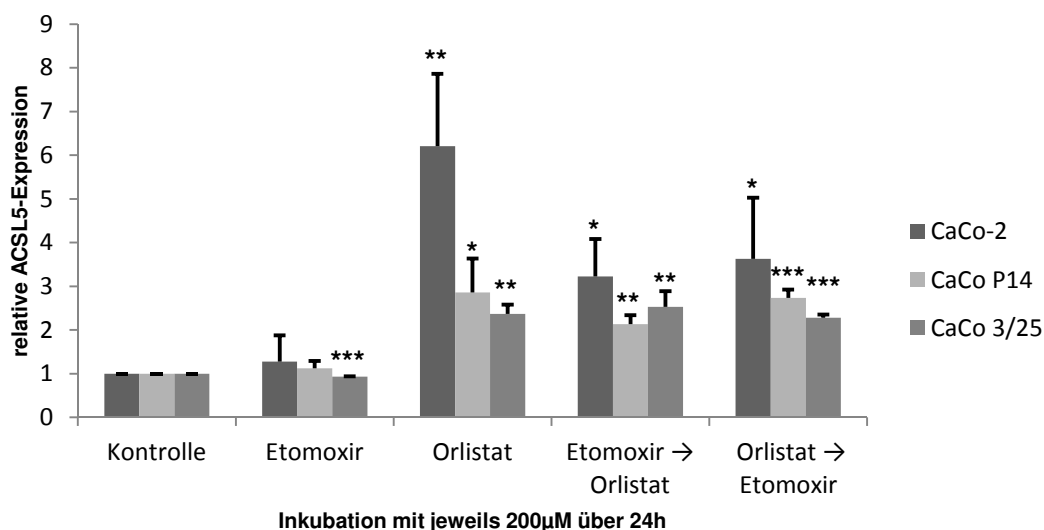
**Abb. 4-8: Hochregulation der mRNA-Level von Mortalin in CaCo-2 Zellen durch Behandlung mit Orlistat.** CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektant) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektant) wurden für 24h bzw. 48h mit Orlistat (Konzentrationen: 0 $\mu$ M – 200 $\mu$ M) behandelt. Daraufhin erfolgte mittels qRT-PCR die Analyse der entsprechenden mRNA-Expression von Mortalin. (n=3, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  und \*\*\* $P < 0,001$  versus unbehandelte Kontrollgruppe der jeweiligen Zelllinie)

## 4.5 Inkubation mit Orlistat und Etomoxir

Nach Abschluss der Studien hinsichtlich der Wirkungen von Orlistat auf das enterozytäre Zellkulturmodell galt es zu klären, ob solche Auswirkungen eine Abhängigkeit vom Ort der Intervention in den Lipidmetabolismus aufweisen. Daher wurde im nächsten Schritt die Aufnahme von Lipiden in das Mitochondrium als Ort der Fettsäure-Aktivierung blockiert. Dazu kam die Substanz Etomoxir zum Einsatz, die zur irreversiblen Blockade der Carnitin-Palmityl-Transferase 1 (CPT-1) führt, einem Transportkomplex zur Internalisierung von Fettsäuren auf der äußeren Mitochondrienmembran. Zur Erfassung putativer synergistischer Effekte beider Substanzen (Orlistat und Etomoxir) wurde ferner noch eine sequenzielle Behandlung der in Kultur befindlichen Zellen durchgeführt.

### 4.5.1 ACSL5-Alterationen unter Orlistat und Etomoxir

Wie aus Abb. 4-9 eindeutig erkennbar, war die alleinige Blockade der Fettsäure-Synthase mittels Orlistat sowohl in den CaCo-2 als auch in den CaCo P14 Zellen der effektivste Mechanismus, um einen möglichst hohen Anstieg der ACSL5 auf mRNA-Ebene herbeizuführen. Hier fanden sich Expressionszunahmen um den Faktor 6,2 bei CaCo-2 ( $p < 0,01$ ) bzw. den Faktor 2,8 bei CaCo P14 ( $p < 0,05$ ). Eine isolierte Inkubation mit Etomoxir zur Blockade der mitochondrialen Fettsäure-Aufnahme hingegen hatte bezogen auf die ACSL5-Level keine relevanten Effekte. Auch die sequenzielle Inkubation mit beiden Substanzen führte nicht zu solch starken Erhöhungen der ACSL5-Expression wie Orlistat allein. Auffällig war dabei jedoch, dass die Reihenfolge der Substanzen im Zellkulturmodell einen Einfluss auf die letztlich detektierbaren mRNA-Level zu haben schien. So zeigten die CaCo-2 und CaCo P14 stärkere Effekte hinsichtlich der ACSL5 bei der Abfolge von 24h Orlistat gefolgt von 24h Etomoxir. Bei den CaCo 3/25 hingegen kam es unabhängig von der Reihenfolge der sequenziellen Inkubation zu unwesentlichen Deviationen der final messbaren mRNA-Level. Sie glichen denjenigen bei isolierter Behandlung mit Orlistat und waren ca. 2,4-fach gegenüber der Kontrolle gesteigert.



**Abb. 4-9: ACSL5-Hochregulation auf mRNA-Ebene bei CaCo-2 Zellen unter Behandlung mit Orlistat und Etomoxir.** Es wurden CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektante) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektante) über 24h mit jeweils 200 $\mu$ M Etomoxir, Orlistat oder sequenziell beiden Substanzen kultiviert und anschließend die mRNA-Expression von ACSL5 mittels qRT-PCR detektiert. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

Folglich scheint die Lokalisation der Intervention im Lipidmetabolismus einen Einfluss auf die resultierenden ACSL5-Level zu haben. So ergab sich auch, dass die Kombination multipler Angriffspunkte einer pharmakologischen Manipulation in die zelluläre Homöostase ähnlich wie die alleinige Blockade des Fettsäure-Transports in das Mitochondrium (mittels Etomoxir) einer isolierten Unterbrechung der *de novo* Synthese von Fettsäuren (durch Orlistat) zur Induktion der ACSL5 unterlegen ist.

#### 4.5.2 Alterationen der FFAR-Isoformen unter Orlistat und Etomoxir

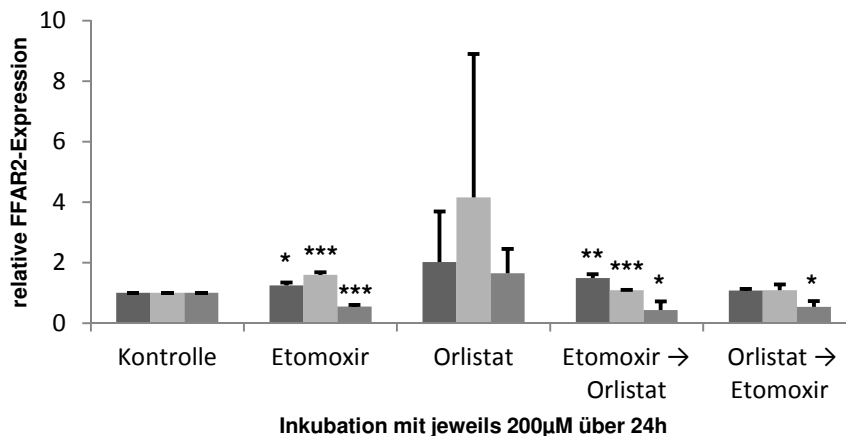
Es zeigte sich, dass bezüglich der verschiedenen hier eingehender studierten Mitglieder der FFAR-Familie deutliche Diskrepanzen innerhalb der jeweiligen regulativen Effekte in Abhängigkeit davon bestanden, mit welcher Substanz bzw. in welcher zeitlichen Abfolge die Zellen behandelt wurden.

Wie aus Abb. 4-10 A erkennbar, waren bei Betrachtung der Expression von FFAR2 die größten Regulationen innerhalb aller hier gewählten Zelllinien unter alleiniger Behandlung mit Orlistat erkennbar. Hervorzuheben ist zudem, dass es in den ACSL5 überexprimierenden CaCo 3/25 bei Inkubation mit Etomoxir stets zur Reduktion der relativen Expression der FFAR2 auf mRNA-Ebene kam. So waren die jeweiligen

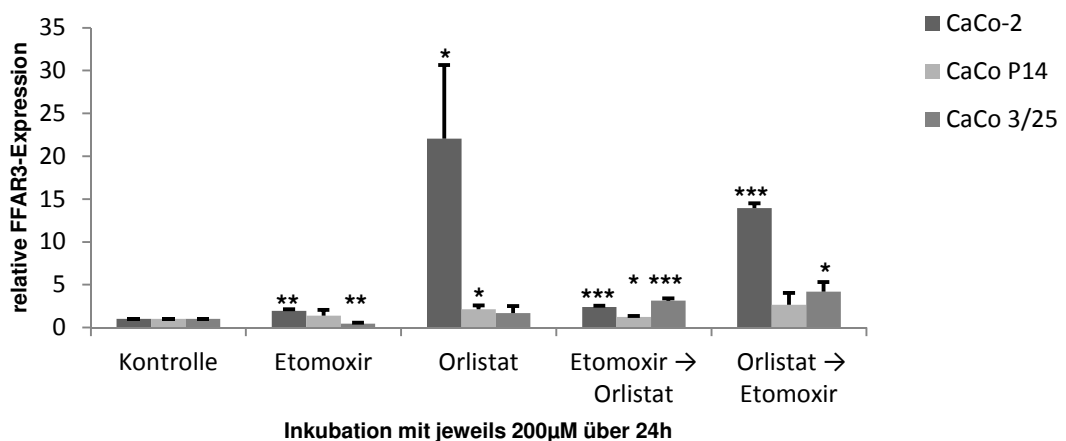
FFAR2-Level bei alleiniger Anwesenheit von Etomoxir höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) und bei den beiden jeweils sequenziellen Inkubationen mit Etomoxir und Orlistat signifikant ( $p < 0,05$ ) um ca. die Hälfte reduziert.

Die Analyse der mRNA-Level von FFAR3 (vgl. Abb. 4-10 B) innerhalb dieser Versuchsanordnung ergab des Weiteren, dass die Leervektor-transfizierten CaCo P14 in Kultur unter isoliertem Orlistat, aber insbesondere unter der zeitlichen Abfolge Orlistat und dann Etomoxir ebenso mit einer Hochregulation der entsprechenden mRNA reagierten. Beim Wildtyp CaCo-2 bewirkte erneut die alleinige Gabe von Orlistat eine massive Zunahme der FFAR3-Level auf den ca. 22-fachen Ausgangswert ( $p < 0,05$ ). Die isolierte Gabe von Etomoxir hingegen führte nur zur annähernden Verdopplung dieses Wertes, während bei den ACSL5-Transfektanten CaCo 3/25 scheinbar synergistische Effekte bei Kombinationsbehandlung mit beiden Pharmaka auftraten. So führte hier die sequenzielle Applikation von Orlistat vor Etomoxir-Inkubation gegenüber der jeweiligen isolierten Gabe zur Vervierfachung der FFAR3-Level im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Die Reihenfolge Etomoxir gefolgt von Orlistat erbrachte im Unterschied dazu nur eine Verdreifachung des Wertes für FFAR3 ( $p < 0,001$ ).

A



B





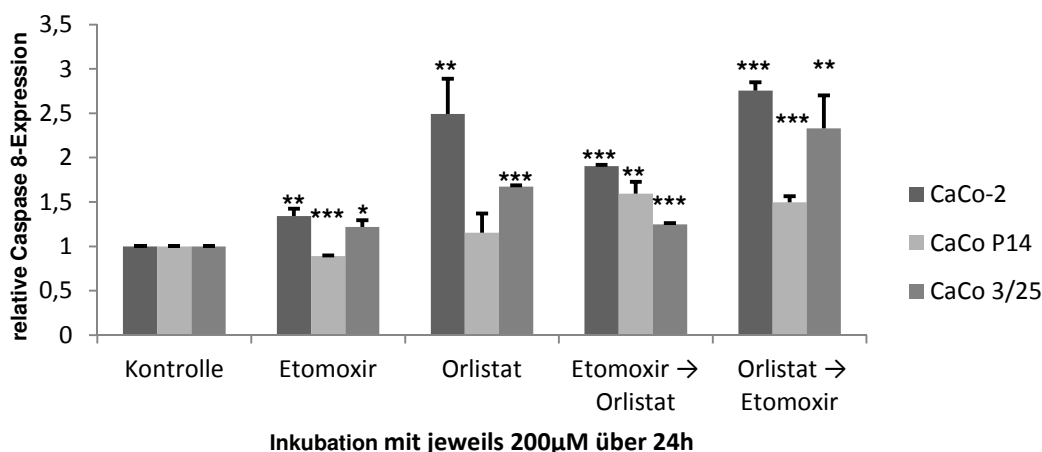
**Abb. 4-10: Regulative Effekte auf die mRNA-Expression verschiedener FFAR-Isoformen in CaCo-2 Zellen unter Orlistat und Etomoxir.** Es wurden CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektante) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektante) über 24h mit jeweils 200µM Etomoxir, Orlistat oder sequenziell beiden Substanzen kultiviert und anschließend die mRNA-Expression von FFAR2 (A) und FFAR3 (B) mittels quantitativer RT-PCR erfasst. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

Bei Betrachtung des ebenfalls innerhalb dieser Studien untersuchten GPR120 konnte lediglich in den CaCo 3/25 Zellen eine hochsignifikante Herunterregulation um ca. 50% unter Behandlung mit Orlistat gefolgt von Etomoxir festgestellt werden. Ansonsten waren keine wesentlichen regulativen Unterschiede in Abhängigkeit von der Substanz im Kulturmedium eruierbar (Daten daher nicht expliziert aufgeführt).

#### **4.5.3 Alterationen proapoptotischer Faktoren unter Orlistat und Etomoxir**

Im direkten Vergleich konnten hier scheinbar potentiell synergistische Effekte durch die pharmakologische Manipulation auf verschiedenen Ebenen des Metabolismus der Fettsäuren detektiert werden.

Wie Abb. 4-11 demonstriert, traten hinsichtlich der Caspase 8 als Initiator-molekül innerhalb der Apoptosekaskade wesentliche regulative Effekte in Abhängigkeit von der Behandlung ein. Generell führte die Inkubation mit einer der hier verwendeten Substanzen zur mehr oder minder starken Erhöhung der jeweiligen mRNA-Expression von Caspase 8. Insbesondere bei den nicht transfizierten CaCo-2 und den ACSL5-transfizierten CaCo 3/25 kam es allerdings unter einer Behandlung von zunächst Orlistat mit anschließender Inkubation mit Etomoxir zu nochmals deutlich erhöhten Caspase 8-Leveln im Experiment. Die dabei ermittelbaren Steigerungen waren innerhalb der CaCo-2 gar höchstsignifikant ( $p < 0,001$ ) und in den CaCo 3/25 hochsignifikant ( $p < 0,01$ ). Bei der mit dem Leervektor transfizierten Zelllinie CaCo P14 waren ähnliche Effekte durch kombinierte Behandlung eruierbar. Die detektierbaren Zunahmen waren jedoch vergleichsweise geringer ausgeprägt und vor allem nach der primären Blockade der mitochondrialen Fettsäure-Aufnahme mittels Etomoxir, gefolgt von der Blockade der zellulären Fettsäure-Synthase mittels Orlistat ersichtlich.

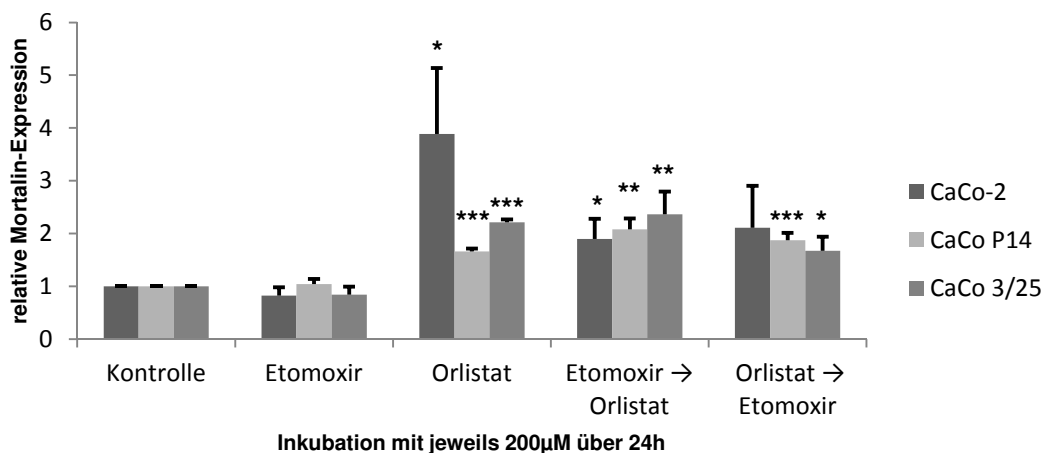


**Abb. 4-11: mRNA-Expression von Caspase 8 in CaCo-2 Zellen unter Orlistat und Etomoxir.** Es wurden CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektante) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektante) über 24h mit jeweils 200µM Etomoxir, Orlistat oder sequenziell beiden Substanzen behandelt und anschließend die mRNA-Expression von Caspase 8 mittels qRT-PCR erfasst. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

Die explizite Analyse der regulativen Unterschiede hinsichtlich des Moleküls Bid als Ausgangspunkt für die mitochondriale Amplifikation eines Apoptosesignals ergab zwar in allen Behandlungsansätzen auch eine Zunahme der mRNA-Level, jedoch waren die resultierenden Deviationen in Abhängigkeit von der gewählten Substanz nur geringgradig ausgeprägt (Daten nicht näher expliziert dargestellt).

#### 4.5.4 Mortalin-Alterationen unter Orlistat und Etomoxir

Abb. 4-12 präsentiert die Veränderungen der entsprechenden Mortalin-Level auf mRNA-Ebene innerhalb dieser Versuchsreihe. Dabei fällt auf, dass die Inkubation mit Etomoxir allein nur unwesentliche regulative Effekte auf die Mortalin-Expression hatte. Die deutliche Induktion unter Orlistat wurde ja bereits in den vorherigen Studien nachgewiesen (vgl. Kapitel 4.4.4). Demgegenüber führte die aufeinander folgende Behandlung mit beiden Substanzen bei den CaCo-2 zwar auch zu teilweise signifikanten Steigerungen der mRNA-Level von Mortalin, aber die hierbei detektierbaren Anstiege waren denen durch isoliertem Orlistat unterlegen. Bei den Transfektanten hingegen waren diese Auswirkungen auf die Mortalin-Level annähernd gleich und wiesen nur geringe Abweichungen auf.



**Abb. 4-12: Regulative Effekte auf die mRNA-Expression von Mortalin in CaCo-2 Zellen unter Orlistat und Etomoxir.** Es wurden CaCo-2 (Wildtyp), CaCo P14 (Leertransfektante) und CaCo 3/25 (ACSL5-Transfektante) über 24h mit jeweils 200µM Etomoxir, Orlistat oder sequenziell beiden Substanzen behandelt und anschließend mittels qRT-PCR die Mortalin-Level auf mRNA-Ebene erfasst. (n=3, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus unbehandelte Kontrolle der jeweiligen Zelllinie)

## 4.6 Morphologische Auffälligkeiten unter Behandlung

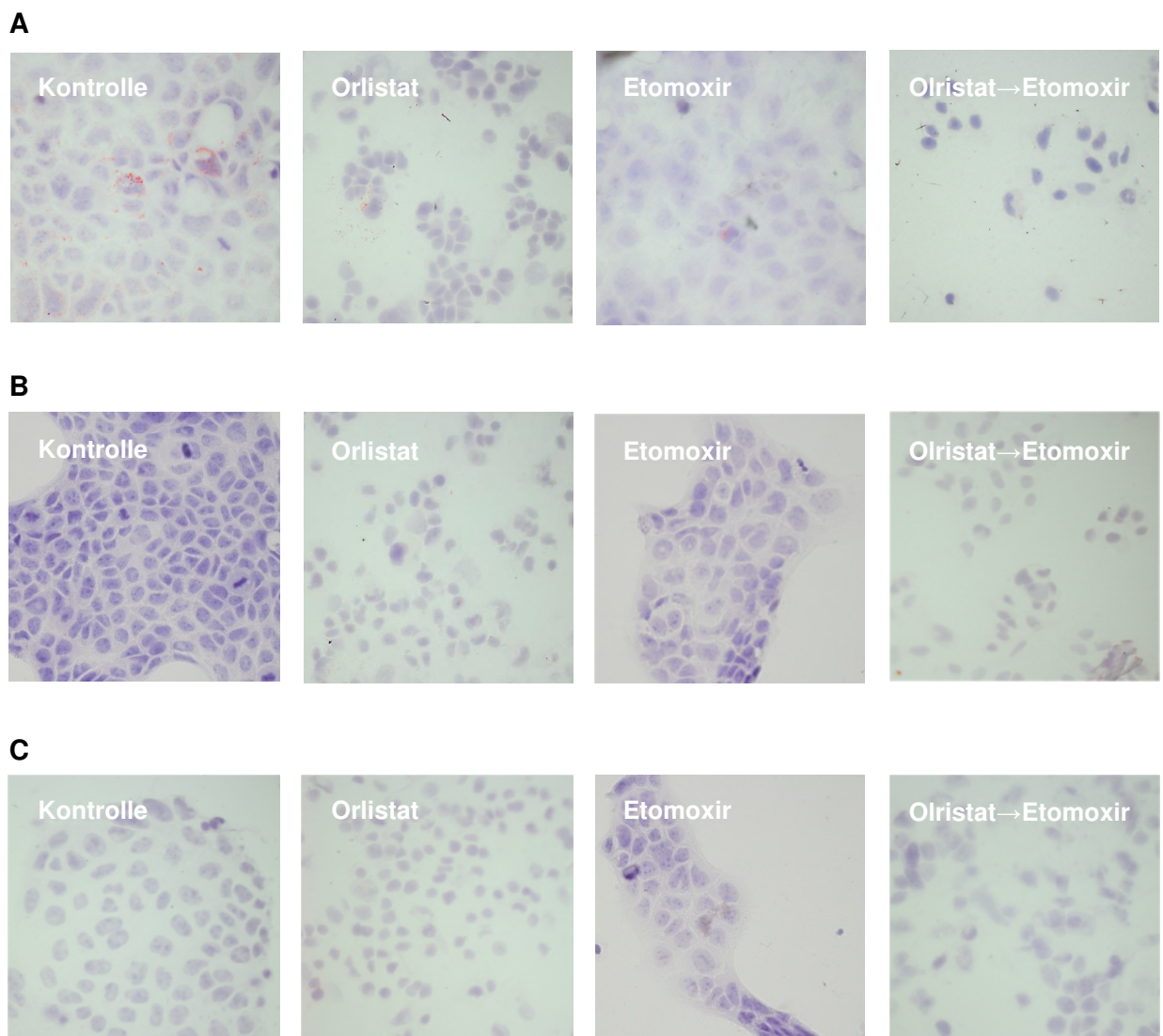
Nach der Durchführung der bisher beschriebenen Studien sollte im letzten Schritt die Fragestellung geklärt werden, welche putativen Auffälligkeiten sich hinsichtlich der zellulären Morphologie detektieren lassen.

### 4.6.1 Lichtmikroskopische Auffälligkeiten

Bereits zu Beginn der Untersuchungen fielen erste Veränderungen hinsichtlich der Zellgestalt unter Inkubation mit Orlistat auf (vgl. Abb 4-4). Diese Alterationen sollten nun eingehender Betrachtungen unterzogen werden. Dazu wurden Zellen aller drei Zelllinien mittels Ölrot O/ Hämalaun angefärbt, wobei man anhand der Ergebnisse der Expressionsanalysen die Inkubationen mit 200µM Orlistat, 200µM Etomoxir sowie die nacheinander folgende Gabe von 200µM Orlistat und 200µM Etomoxir als Behandlungsparameter wählte. Anschließend erfolgte eine lichtmikroskopische Betrachtung der zytologischen Präparate.

Die dabei verwendete Färbung mittels Ölrot O und Hämalaun Gegenfärbung sollte dabei einerseits potentielle intrazelluläre Lipidansammlungen durch Einlagerung des

Ölrot O nachweisen, andererseits zur besseren Orientierung im Zellverband die Kerne mittels Hämalaun-bedingte Blaufärbung darstellen.



**Abb. 4-13: Einflüsse von Orlistat und Etomoxir auf die Zellmorphologie von CaCo-2 Zellen.** CaCo-2 (A), CaCo P14 (B) und CaCo 3/25 (C) wurden entweder über 48h mit jeweils 200 $\mu$ M Orlistat bzw. Etomoxir oder sequenziell für je 24h mit 200 $\mu$ M Orlistat gefolgt von 200 $\mu$ M Etomoxir kultiviert. Nach der Kultivierung erfolgte die Fixierung und Färbung mittels Ölrot O/ Hämalaun. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der entsprechend behandelten Zellen bei einer Vergrößerung von x 400.

Im Rahmen dieser Beobachtungen fielen zunächst die bereits unter Durchlichtmikroskopie während der Kultur der Zellen festgestellten Unterschiede zwischen dem ACSL5-Transfektanten CaCo 3/25 und den verbleibenden zwei anderen Zelllinien unter Normalbedingungen auf (vgl. Kapitel 4.4). Die Gesamtzelldichte schien bei diesem Klon vergleichsweise geringer zu sein und auch

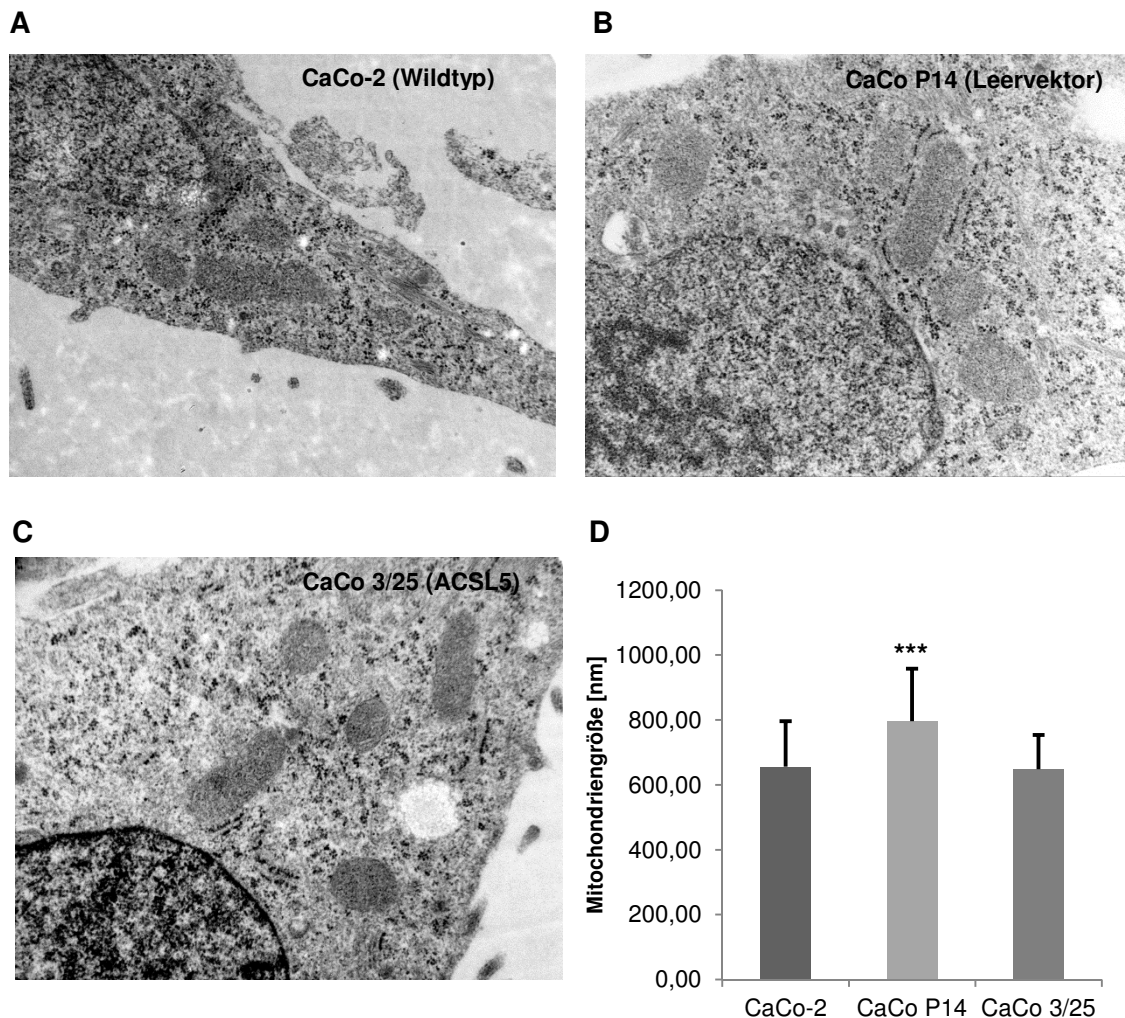
das Wachstum führte eher zu inselartigen Zellansammlungen mit relativ großer Lückenbildung innerhalb des Monolayers.

Bei genauerer Betrachtung der entsprechenden Kontrollgruppen fiel zudem auf, dass hauptsächlich innerhalb der CaCo-2 Zellen des Wildtyps mittels Ölrot O-Färbung der Nachweis intrazellulärer Lipidvakuolen gelang (siehe Abb. 4-13 A mit innerhalb des Zellverbundes hervortretenden rötlichen Einlagerungen des Farbstoffs). Die Transfektanten wiesen zwar auch solche Lipidansammlungen innerhalb des Zellraums auf, jedoch nicht in derartigem Ausmaß. Generell nahm zudem die Menge der sichtbaren Lipidvakuolen unter Behandlung mit Orlistat deutlichst ab. Unter Einfluss von Etomoxir konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Nicht nur die intrazellulären Lipidspeicher zeigten Veränderungen bei entsprechender Kultivierung mit den jeweiligen Substanzen, auch die Gesamtmorphologie der Zellen wies eindeutige Alterationen auf. Während der Inkubation mit Orlistat stach in allen verwendeten Zelllinien hervor, dass es zur Reduktion der Zelldichte kam. Des Weiteren wirkten die Zellkerne kondensiert. Bei Kultivierung der Zellen mit Etomoxir hingegen schienen keine wesentlichen morphologischen Veränderungen hinsichtlich der Zellgestalt aufzutreten. Behandelte man jedoch die Zellen nacheinander zuerst mit Orlistat und anschließend mit Etomoxir, kam es interessanterweise zur deutlichen Verstärkung derjenigen Veränderungen, die bereits oben unter alleiniger Inkubation mit Orlistat beschrieben wurden. Neben einer wesentlichen Reduktion der Zellzahl im zytologischen Präparat wirkten die Zellkerne abermals kondensiert.

Zusammenfassend ist es letztlich auffällig, dass die bei der lichtmikroskopischen Auswertung gesammelten Beobachtungen bezüglich der strukturellen Zellveränderungen in gewisser Weise Analogien zu den zuvor durchgeführten Expressionsanalysen hinsichtlich der Apoptosefaktoren aufweisen. In beiden Studienansätzen fielen jeweils größere Effekte bei Orlistat-Einwirkung im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Etomoxir auf: Bei den Expressionsanalysen waren die gemessenen mRNA-Level für Caspase 8 deutlich erhöht und auch in der visuellen Untersuchung schien das Zellüberleben negativ durch die Substanz beeinflusst zu werden. Diese Beobachtungen und die Feststellung, dass die ACSL5-transfizierten CaCo 3/25 Zellen bereits unter normalen Bedingungen ein verändertes Wachstum aufweisen, scheinen weitere Hinweise darauf zu sein, dass vermehrte ACSL5 Aktivität (induziert durch Transfektion oder Orlistat) möglicherweise merkliche Einflüsse auf das Zellüberleben bzw. den Zelltod hat.

#### 4.6.2 TEM-Untersuchungen der mitochondrialen Morphologie

Nachdem nun bereits auf Ebene der Lichtmikroskopie deutliche Alterationen bezüglich Organisation im Zellverband, Zellkerngröße und die Abnahme bzw. das gänzliche Verschwinden intrazellulärer Lipidvakuolen nachgewiesen wurden, ging es im abschließenden Teil dieser Studien um etwaige ultrastrukturelle Veränderungen.



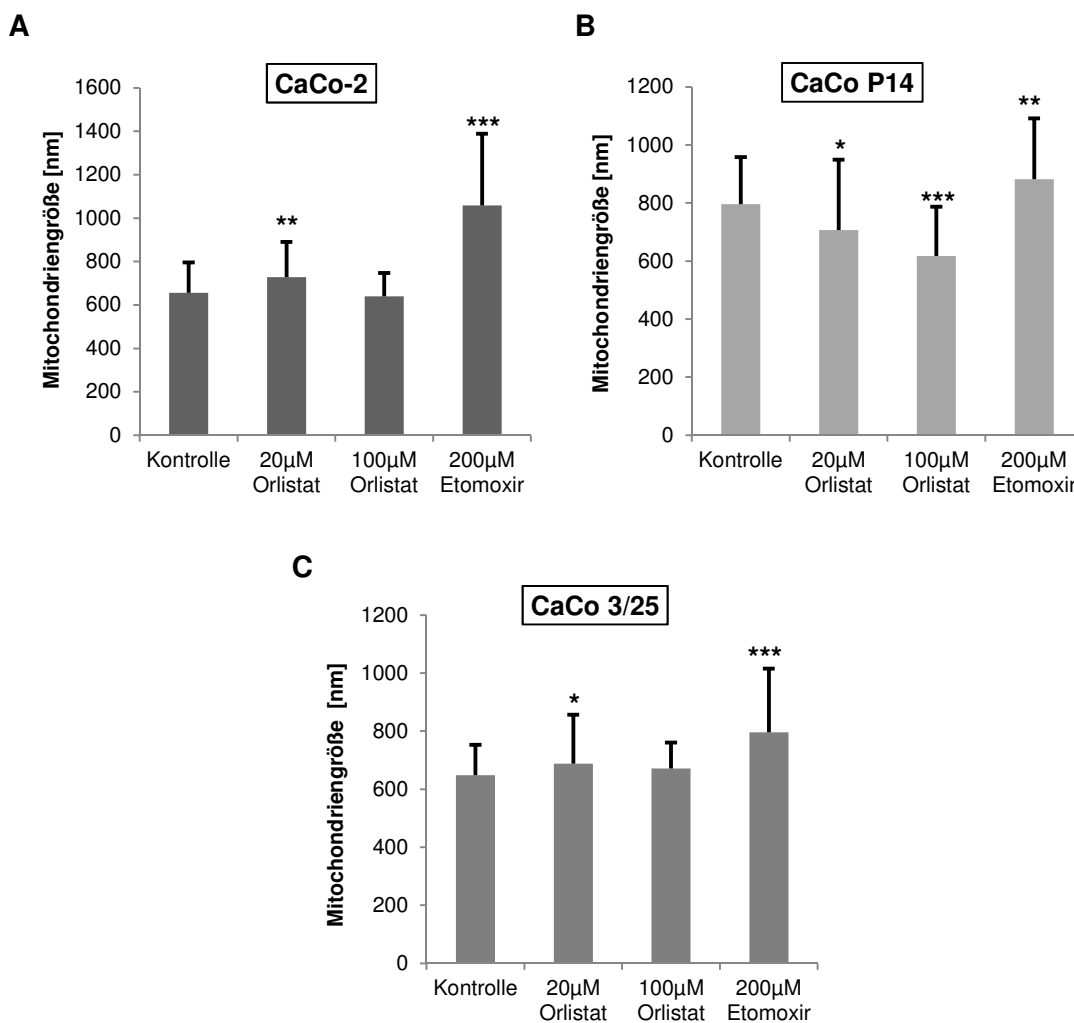
**Abb. 4-14: ACSL5-Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien.** Ultrastrukturelle Untersuchung der CaCo-2 (A), CaCo P14 (B) und CaCo 3/25 (C) mittels Transmissionselektronenmikroskopie bei einer Vergrößerung von x 28000. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppe. (D) Vergleich der durchschnittlichen Längsdurchmesser der Mitochondrien in unbehandelten Wildtyp, Leervektor-transfizierten und ACSL5-transfizierten CaCo-2 Zellen (n=100, \*\*\*P<0,001 versus Wildtyp)

Dazu sollte nunmehr nochmals die Konfiguration der Mitochondrien als Lokalisationsort der ACSL5 innerhalb der Zelle einer eingehenden Untersuchung unterzogen werden. So wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der hier

verwendeten Zelllinien angefertigt und die Struktur bzw. Größe der Mitochondrien in der jeweiligen Kontrollgruppe sowie nach 48h Behandlung mit 20 $\mu$ M bzw. 100 $\mu$ M Orlistat oder 200 $\mu$ M Etomoxir analysiert. In Abb. 4-14 A–C sind repräsentative Abbildungen der entsprechenden Zellen aus den Kontrollgruppen in einheitlicher Vergrößerung dargestellt.

Zunächst wurde hierdurch deutlich, dass eine ACSL5-Überexpression infolge einer Transfektion zu keinen merklichen Auswirkungen auf die Integrität bzw. Struktur der Mitochondrien führte (vgl. Abb. 4-14 C). Auch bei der Analyse der durchschnittlichen Mitochondriengröße (Bestimmung mittels der Erfassung der Längsdurchmesser) gab es keine wesentlichen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp der Zelllinie. Erstaunlicherweise zeigte sich aber eine höchstsignifikante, offenbar nicht ACSL5-abhängige Veränderung bei den Leervektor tragenden CaCo P14 ( $p < 0,001$ ). Diese Zellen wiesen im Durchschnitt Mitochondrien auf, die ca. 21% größer waren als beim Wildtyp oder den ACSL5-Transfektanten. (vgl. Abb. 4-14 D).

Vergleicht man stattdessen die Größenunterschiede innerhalb der jeweiligen Zelllinie in Hinblick auf die möglichen Auswirkungen durch die in diesen Studien verwendeten Substanzen, so ergaben sich ebenso deutliche Befunde (vgl. Abb. 4-15 A–C). Bei allen CaCo-2 Zellen konnte unabhängig vom Transfektionszustand eine wesentliche Größenzunahme der Mitochondrien verzeichnet werden, sobald man eine Inkubation mit Etomoxir durchführte. Beim CaCo-2 Wildtyp kam es infolge dessen zu einer durchschnittlichen höchstsignifikanten mitochondrialen Vergrößerung um 60% ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei CaCo 3/25 und CaCo P14 waren die detektierbaren Effekte zwar geringer ausgeprägt, aber mit Größenzunahmen um ca. 22% bzw. 10% immer noch höchstsignifikante ( $p < 0,001$ ) bzw. hochsignifikante ( $p > 0,01$ ) Veränderungen. Ferner fiel auf, dass eine Inkubation mit geringen Konzentrationen Orlistat bei den Wildtyp- und den ACSL5-überexprimierenden Zellen ebenso zur hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) bzw. signifikanten ( $p < 0,05$ ) Vergrößerung der Mitochondrien um etwa 10% bzw. 6% führte. Höhere Orlistat-Konzentrationen dagegen führten bei diesen Zelllinien zu keinen auffälligen Veränderungen der mitochondrialen Morphologie. Anders verhielt es sich bei denen mit dem Leervektor transfizierten CaCo P14. Hier nahm die Mitochondriengröße mit zunehmender Orlistat-Konzentration deutlich ab. Unter 20 $\mu$ M Orlistat waren die Mitochondrien so etwa bereits signifikant um 11% ( $p < 0,05$ ) und unter 100 $\mu$ M Orlistat gar höchstsignifikant um 22% ( $p < 0,001$ ) verkleinert.



**Abb. 4-15: Auswirkungen der Behandlung mit Orlistat und Etomoxir auf die mitochondriale Morphologie.** CaCo-2 Wildtyp (A) und transfizierten Zellen (B + C) wurden unter Behandlung mit 20µM bzw. 100µM Orlistat oder 200µM Etomoxir über 48h kultiviert. Anschließend erfolgt die ultrastrukturelle Analyse mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Vergleich der durchschnittlichen Längsdurchmesser der Mitochondrien (n=100, \*P<0,05, \*\*P<0,01 und \*\*\*P<0,001 versus jeweilige Kontrollgruppe)

Trägt man die vorliegenden Daten der transmissionselektronischen Untersuchungen dieses enterozytären Zellkulturmodells nun in ihrer Gesamtheit zusammen, so kann man zunächst davon ausgehen, dass es infolge einer ACSL5-Induktion allein nicht zu strukturellen Veränderungen hinsichtlich der Größe der Mitochondrien zu kommen scheint. Dennoch beeinflusst die Behandlung mit den beiden Substanzen Orlistat und Etomoxir eben diese Morphologie der Zellorganellen. Die Größenabnahme unter Orlistat könnte dabei dadurch bedingt sein, dass es infolge einer Blockade der Fettsäuresynthese zur Unterbrechung der *de novo*



Fettsäuresynthese kommt. In diesem Fall würde trotz gesteigerter ACSL5-Funktion das entsprechende Substrat des Enzyms fehlen und es käme zur verminderten ACSL5-abhängigen Aktivierung von Fettsäuren. Es resultierte letztlich ein relativer Mangel an Bausubstanz für die mitochondriale Membran. Dagegen könnte die Vergrößerung der Mitochondrien unter Etomoxir folgendermaßen mit der CPT1-Inhibition in Verbindung stehen: Durch Blockade dieses Fettsäure-Transporters der äußeren Mitochondrienmembran könnte es zur mitochondrialen Schädigung bzw. Schwellung bei gestörtem Zellstoffwechsel kommen, was wiederum die Ursache der hier messbaren Vergrößerung des Zellorganells wäre. Zwar katalysiert die ACSL5 so immer noch die Bildung von langkettigen Acyl-CoA Thioestern aus vornehmlich endogenen Quellen, allerdings gelangen diese nicht mehr zum eigentlichen Ort der Beta-Oxidation im mitochondrialen Kompartiment. Das Resultat wäre ein wesentlicher Energiemangel in der Zelle. Ein alternatives Erklärungskonzept zur Etomoxir-assoziierten Ausbildung hoch-/höchstsignifikant vergrößerter Mitochondrien wäre die Tatsache, dass durch die Abnahme des Acyl-CoA Einstroms ins Mitochondrium vermehrte Mengen der Substanz im zytoplasmatischen Raum zur Verfügung stehen. Dort könnte der vergrößerte Pool an verfügbaren Fettsäurederivaten nunmehr für die gesteigerte Synthese mitochondrialer Membran genutzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Studien konnten diese Theorien jedoch nicht ausreichend geklärt werden. Dazu wären weitere eingehendere Analysen notwendig.

## 5. Diskussion

### 5.1 Ergebnisse dieser Arbeit im Überblick

Die ACSL5 wurde nunmehr vor über einer Dekade erstmalig als wesentliches Enzym zur Aktivierung langkettiger Fettsäuren im Enterozyten identifiziert (Oikawa et al. 1998). Seither konnten erste Erkenntnisse hinsichtlich einer möglichen Beteiligung der ACSL5 an der Seneszenz dieses Zelltypus gewonnen werden. Demnach scheint das Enzym einen nicht unerheblichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der korrekten Architektur der Darmmukosa zu leisten (Gassler et al. 2007). Dennoch ist die Datenlage bezüglich der ACSL5 und ihrer Funktion im Darmepithel bis heute eher als spärlich anzusehen.

Daher wurden in dieser Arbeit anhand eines *in vitro* Modells mit CaCo-2 Zellen weitergehende Analysen zur Untersuchung der ACSL5 im intestinalen Lipidstoffwechsel durchgeführt. Um dabei mögliche Effekte des Enzyms auf funktionelle Zellprozesse nochmals deutlicher zu erfassen, wurde ebenso eine ACSL5 überexprimierende Transfektante der Zelllinie miteinbezogen. Bereits unbehandelt ließen sich in diesem Zusammenhang mittels qRT-PCR teils höchstsignifikante Steigerungen der Expression der Freien-Fettsäure-Rezeptoren in Anwesenheit einer vermehrten ACSL5 belegen. Auch das Hitzeschockprotein Mortalin wies ähnlich hierzu bei besagter Transfektante eine hochsignifikante Zunahme auf mRNA-Ebene auf. Lichtmikroskopisch zeichneten sich die ACSL5-überexprimierenden Zellen zudem durch ein verzögertes Wachstum im Vergleich zur un- bzw. leertransfizierten Kontrolle aus. Zur weiteren Differenzierung der Funktion der ACSL5 innerhalb des Lipidmetabolismus wurde dieser anschließend an verschiedenen Schlüsselpositionen inhibiert: Die Blockade der endogenen *de novo* Synthese langkettiger Fettsäuren induzierte etwa die ACSL5 auf Ebene der Transkription und Translation (Nachweismethoden: qRT-PCR, Western Blot), darüber hinaus stieg die ACSL-Enzymaktivität im entsprechenden Assay deutlich an. Es resultierte ebenso eine Zunahme der RNA Level der verschiedenen FFAR-Isoformen. Im Hinblick auf diese Ergebnisse ist ein Zusammenhang der ACSL5 mit den katabolen Vorgängen in der Zelle zu postulieren. Ferner konnte molekulargenetisch mithilfe der qRT-PCR ein wesentlicher Expressionsanstieg solcher proapoptotischer Proteine wie Caspase 8 und Bid detektiert werden. Diese Befunde wurden bekräftigt durch die Resultate der zytologischen Präparate, in denen, abhängig vom steigenden Ausmaß einer Inhibition der endogenen

Fettsäuresynthese, auch das Zellüberleben stetig abnahm. Dies bestätigt möglicherweise eine ACSL5-abhängige Seneszenz bzw. Apoptose innerhalb der Koloadenokarzinomzellen des Enterozyten-Modells. Letztlich konnte auch demonstriert werden, dass mit einer durch Fettsäure-Entzug hochregulierten ACSL5 ebenso eine Expressionssteigerung von Mortalin einherging. In Zusammenschau mit der Tatsache, dass auch die ACSL5-Transfektante unbehandelt erhöhte Level an Mortalin aufwies, erscheint somit eine potentiell ACSL5-gesteuerte Zunahme dieses Hitzeschockproteins als wahrscheinlich. Ähnliche Ergebnisse, wie die hier bisher geschilderten, gingen auch bei der Blockade des Fettsäuretransportes ins Mitochondrium als Ort der Beta-Oxidation hervor. Die Ausprägung der Effekte war jedoch insgesamt deutlich geringer, sodass man wiederum von einer differentiellen Regulation der ACSL5 abhängig vom Interventionsort ausgehen kann. Wie bereits vorab angenommen, liegt somit die Vermutung nahe, dass das Enzym neben seiner Funktion in der zellulären Energieversorgung an weiteren Regelkreisen beteiligt zu sein scheint. Unterschiedliche Auswirkungen auf diese Prozesse beeinflussen dann ihrerseits dementsprechend die Expression und Aktivität der ACSL5 auf multiple Weise.

Nachdem nun die zentralen Beobachtungen innerhalb der hier durchgeführten Untersuchungen kurz erörtert wurden, sollen diese samt der hieraus abgeleiteten Hypothesen im weiteren Verlauf gesondert aufgegriffen und anhand der bestehenden Literatur eingehender diskutiert werden.

## **5.2 Enterozytäre ACSL5 Induktion durch Manipulation des endogenen Lipidmetabolismus**

In der zum Thema existierenden Literatur gibt es bisher eine Vielzahl an Untersuchungen hinsichtlich der Regulation der ACSL5 infolge nutritiver Stimulation. Im Rahmen dessen wurden sowohl in verschiedenen *in vitro*, wie auch im *in vivo* Modell die möglichen Einflüsse einer gesteigerten Zufuhr exogener Fettsäuren, kohlenhydratreicher Diäten, aber auch des Nahrungsentzuges auf die Ausprägung des Enzyms analysiert. Dominierend sind dabei die Studien zur ACSL5 innerhalb der Leber (Achouri et al. 2005; Mashek et al. 2006a; Reinartz et al. 2010). So etwa konnte in HepG-2 Zellen (abstammend von einem hepatozellulären Karzinom) und primären humanen Hepatozyten eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der ACSL5 bei Inkubation mit deren Substraten Öl- bzw. Linolsäure demonstriert werden (Reinartz et al. 2010). Die Datenlage hinsichtlich solcher Effekte in Zellen des Gastrointestinaltraktes ist dagegen eher eingeschränkt. Lediglich in den

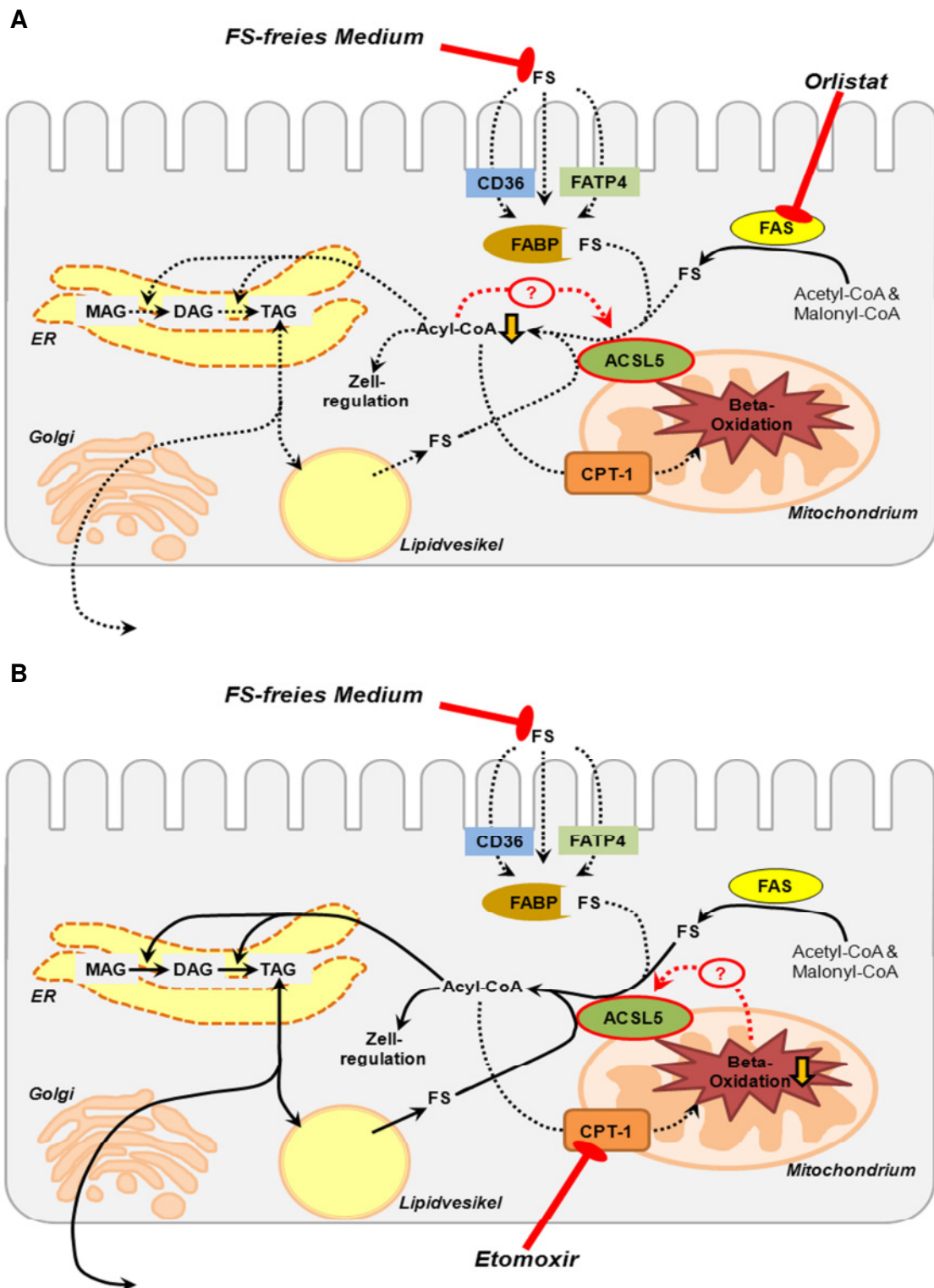
Analysen von Oikawa und Kollegen wurden ähnliche Zusammenhänge beleuchtet (Oikawa et al. 1998). Jedoch wurde dort nicht die unmittelbare Wirkung von Fettsäuren auf die ACSL5 des Enterozyten analysiert. Vielmehr betrachtete man die Expressionsveränderungen des Enzyms im Rattendünndarm nach vorherigem Fasten bzw. lipid-/cholesterolreicher Diät. Eigene Beobachtungen im intestinalen Zellkulturexperiment (Daten nicht explizit dargestellt) resultierten wiederum ebenso in einer von den Parametern „Zeit“ und „Konzentration“ abhängigen ACSL5-Zunahme unter Anwesenheit von Ölsäure. So konnte auch für das Darmepithel ein direkter Effekt eines favorisierten Substrates auf die Expression des Enzyms gezeigt werden.

Eine potentielle Verbindung zwischen einer Beeinflussung des endogenen Lipidmetabolismus und seiner etwaigen regulativen Auswirkungen auf die ACSL5 ist dagegen bis heute in keinem Organsystem eingehender untersucht worden. Somit konnte innerhalb dieser Studien erstmalig eine durch die Inhibition der Fettsäure-Synthase (FAS) bzw. der Carnitin-Palmityl-Transferase 1 (CPT-1) hervorgerufene ACSL5-Induktion nachgewiesen werden. Zwar existiert eine aus dem Jahr 2010 stammende Untersuchung von Bu und Mashek, in der die Fettsäureaufnahme in das Mitochondrium bei Untersuchungen hinsichtlich der hepatischen ACSL5 blockiert wurde, jedoch wich hierbei der wissenschaftliche Blickwinkel insofern ab, dass potentielle Auswirkungen auf die Beta-Oxidation anhand eines durch siRNA-Behandlung ACSL5-defizienten Zellsystems erfasst werden sollten (Bu und Mashek 2010). Mögliche Effekte in umgekehrter Weise bzw. für das Enzym selbst wurden nicht beachtet.

Interessanterweise scheint zusätzlich der Ort der Intervention entscheidend für die letztlich resultierende Induktion der ACSL5 zu sein. So postulierten Mashek und Kollegen etwa anhand ihrer Ergebnisse in einer murinen Hepatomzelllinie noch, dass ACSL5 eher die exogenen, nicht aber diejenigen aus *de novo* Synthese entstandenen Fettsäuren, für die weiteren Prozesse aktiviert (Mashek et al 2006b). Dies muss nun möglicherweise differenzierter bewertet werden. In den durchgeführten Experimenten waren die messbaren Expressionssteigerungen der ACSL5 stets mit der Inhibition der FAS assoziiert, während eine Blockade der CPT-1 hingegen zwar analoge, aber dennoch abgeschwächte Resultate erzielte (vgl. insbesondere Kapitel 4.5.1). Anhand dieser gewonnenen Daten gibt es daher Anlass zur Vermutung, dass die ACSL5 sehr wohl auch endogen synthetisierte Fettsäuren als Substrat zu verwenden scheint. Die Hochregulation des Enzyms im hier beschriebenen Versuchsansatz wäre somit als Kompensationsversuch infolge eines kompletten Substratmangels zu werten. Unter Verwendung von Medium, das

keine nutritiven Fettsäuren aufweist, kommt es durch Inkubation mit Orlistat zusätzlich zum Entzug der endogenen Substrate. Ähnlich verhält es sich vermutlich auch bei der Behandlung mit Etomoxir. Hierdurch resultiert eine Störung der von Acyl-CoA Thioestern abhängigen Beta-Oxidation mit wahrscheinlich konsekutiver Gegenregulation der ACSL5. Ferner scheint sich die stärkere Induktion der ACSL5 bei FAS-Blockade dadurch begründen zu lassen, dass durch den Wegfall aller zellulären Fettsäurequellen und entsprechendem Mangel an Acyl-CoA eine Vielzahl weiterer funktioneller Prozesse auf die Regulation der ACSL5 in bisher ungeklärter Weise einwirkt. Der Lipidmetabolismus ist an einer zentralen Stelle gestört, wo das benötigte Substrat für sämtliche weiteren anabolen und katabolen Vorgänge erzeugt wird. Eine Inhibition der Fettsäureaufnahme in das Mitochondrium dagegen scheint lediglich zur Störung der katabolen Beta-Oxidation zu führen, andere Prozesse könnten dennoch mit Acyl-CoA Thioestern versorgt werden (vgl. Abb. 5-1 A - B). In diesem Sinne wäre die ACSL5 weitaus vielfältiger in die zellulären Funktionsabläufe involviert als man bisher annahm. Die genauen Regelmechanismen hierbei erscheinen unbekannt, sodass noch ein deutlicher Forschungsbedarf besteht. Jedoch fiel 2006 bei Analysen hinsichtlich diätetisch bedingter ACSL-Veränderungen in verschiedenen Geweben eine Diskrepanz zwischen der mRNA-Expression und den resultierenden Proteinmengen der Isoformen ACSL1 und 4 auf, was auf die Beteiligung weiterer translationaler bzw. posttranslationaler Mechanismen an der ACSL Genregulation schließen lässt (Mashek et al. 2006a). Ähnliches konnte auch bei der Behandlung mit Orlistat beobachtet werden (vgl. Kapitel 4.4.1): Es kam zwar sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene zur Induktion des Enzyms, jedoch waren die detektierbaren Nukleinsäure-Alterationen stets stärker ausgeprägt.

Erste Hinweise auf die zentrale Bedeutung des Enzyms lieferte letztlich bereits eine von Caviglia und Arbeitsgruppe veröffentlichte Untersuchung: Innerhalb des Bakteriums *Escherichia coli* wurde das zelleigene FadD mit Acyl-CoA Synthetase-Aktivität entfernt. Stattdessen induzierte man Plasmid-vermittelt die Expression jeweils einer der ACSL-Isoformen aus der Ratte. Bei anschließender Kultur der behandelten Bakterien auf Nährmedium, welches als einzige Energiequelle die Fettsäure Ölsäure bot, wiesen nur die ACSL5-exprimierenden *E. coli* ein Wachstum auf (Caviglia et al. 2004). Damit konnte einzig diese Isoform den Ausfall des bakterieneigenen FadD kompensieren und ausreichend Acyl-CoA Thioester für die verschiedenen Vorgänge wie Fettsäuretransport, Beta-Oxidation oder Phospholipid-Synthese bereitstellen.



**Abb. 5-1: Schema der mutmaßlichen Effekte zur Hochregulation der ACSL5 im Enterozyten-Modell.** Durch Inkubation im Fettsäure-freiem (FS-freiem) Medium wird den Zellen die exogene Fettsäurequelle entzogen und auch die intrazellulären Lipidspeicher entleeren sich. Die gleichzeitige Behandlung mit (A) Orlistat bzw. (B) Etomoxir blockiert den Lipidmetabolismus an wesentlichen Schlüsselpositionen. Die unterbrochenen Pfeile (schwarz) sollen die potentiell hiervon betroffenen metabolischen Abläufe darstellen: Es wird deutlich, dass Orlistat beinahe sämtliche Acyl-CoA Thioester (Acyl-CoA) abhängigen Signalwege zu stören scheint, Etomoxir dagegen beeinflusst vermutlich nur die Beta-Oxidation. Im Experiment resultiert letztlich eine Induktion der ACSL5. Die genauen Regelmechanismen sind jedoch nicht geklärt (vgl. rote unterbrochene Pfeile). (modifiziert nach Langhans et al. 2011)

### 5.3 Anabole versus katabole Funktionen der ACSL5 im enterozytären Lipidmetabolismus

Seitdem die Koexistenz verschiedener Isoformen der ACSL im humanen bzw. murinen Organismus bekannt ist, gibt es auch die Annahmen, dass die durch sie gebildeten Thioesterverbindungen abhängig vom jeweiligen ACSL-Protein divergierenden Prozessen innerhalb des zellulären Lipidmetabolismus zugeführt werden (Caviglia et al. 2004). Im Rahmen dessen wurde der ACSL5 infolge ihrer einzigartigen Lokalisation an der äußeren Mitochondrienmembran eine wesentliche topographische Nähe zur Beta-Oxidation und somit zum katabolen Geschehen in der Zelle zugeschrieben (Coleman et al. 2002). Im Laufe der Zeit konnten jedoch Belege dafür gewonnen werden, dass die ACSL5 die von ihr aktivierten Fettsäuren sowohl in die anabolen Zellvorgänge des Lipidmetabolismus (etwa die *de novo* Synthese von Lipiden), als auch in die katabolen Prozesse (bspw. die Beta-Oxidation) einschleust. Am intensivsten wurden solche Zusammenhänge in hepatischen Zellen analysiert.

So ordnet eine Reihe von Autoren die Funktion der ACSL5 dort eher anabol ein. Bereits Oikawa und Kollegen stellten 1998 bei der erstmaligen Beschreibung des Enzyms Folgendes fest: Hier löste bei Ratten eine zuckerreiche Diät eine wesentliche Steigerung der hepatischen ACSL5 aus. Hohe Dosen exogen zugeführten Cholesterols in der Nahrung hingegen verminderten die hepatozelluläre mRNA-Menge des Enzyms (Oikawa et al. 1998). Ebenso konnte mittels Analysen an einer Hepatozyten-Zelllinie der Ratte gezeigt werden, dass bei Überexpression der ACSL5 die von dem Enzym stammenden Acyl-CoA Thioester vornehmlich der *de novo* Synthese zellulärer Lipide zugeführt werden (Mashek et al. 2006b). Entsprechend hierzu demonstrierten Bu und Mashek, dass ein Funktionsverlust der ACSL5-Aktivität infolge einer Behandlung mit geeigneten siRNA in primären murinen Hepatozyten zur beachtlichen Reduktion der anabolen Vorgänge wie etwa der Fettsäureinternalisierung, der Ausbildung von Lipidvesikeln und der Triglyceridsynthese führte. Zeitgleich war aber die Beta-Oxidation deutlich gesteigert (Bu und Mashek 2010). Eine Inkubation primärer humaner Hepatozyten mit als favorisierte Substrate der ACSL5 bekannten Fettsäuren wies zudem eine deutliche Induktion der ACSL5 auf und auch lichtmikroskopisch konnte mittels Ölrot O-Färbung die massive Ausbildung intrazellulärer Lipidvakuolen belegt werden (Reinartz et al. 2010). Die anabole Rolle der ACSL5 untermauernd, beschrieben letztlich auch Achouri und Kollegen in primären Hepatozyten der Ratte einen durch Glukose und Insulin stimulierten, vom Transkriptionsfaktor SREBP-1c induzierten Expressionsanstieg dieser ACSL-Isoform (Achouri et al. 2005).

Demgegenüber existieren aber auch experimentelle Daten, welche die Funktion der ACSL5 im System „Leber“ als eher katabol bewerten: Lewin und Kollegen wiesen in der Rattenleber etwa eine fastenabhängige Zunahme der ACSL5 nach (Lewin et al. 2001). Kohlenhydratreiche Diät der Tiere dagegen führte zur deutlichen Reduktion des Enzyms. ACSL5 war nach der Auffassung der Autoren somit eher mit der Beta-Oxidation assoziiert. Vergleichbare Ergebnisse konnten auch Zhou und Kollegen in einer 2007 veröffentlichten Arbeit vorweisen. Hier kam es durch eine Onkostatine M Behandlung von humanen HepG2-Zellen zu einer Expressionssteigerung der ACSL5 mit konsekutiver massiver Zunahme der Beta-Oxidation unter gleichzeitiger Reduktion des intrazellulären Triglyceridgehaltes (Zhou et al. 2007).

Jedoch ist nochmals zu wiederholen, dass sich die hier bisher geschilderten Sachverhalte auf die hepatische ACSL5 beziehen. Etwaige Unterschiede hinsichtlich der Enzymfunktion oder Regulationsmechanismen könnten auch gewebespezifisch sein und daher zwischen verschiedenen Zelltypen divergieren. So ist die Informationslage für die funktionelle Einordnung der ACSL5 innerhalb des enterozytären Lipidmetabolismus heute noch recht eingeschränkt. Lediglich in der bereits oben genannten Analyse von Oikawa wurde dieser Zusammenhang beleuchtet. Die Resultate sind insofern als besonders interessant zu erachten, dass sowohl das Fasten der Versuchstiere, wie auch die übermäßige Zufuhr an nutritiven Lipiden bzw. Cholesterol messbare (jedoch nicht signifikante) mRNA-Anstiege der ACSL5 im Dünndarm zur Folge hatten (Oikawa et al. 1998). Zudem waren die erzielten mRNA-Alterationen nach Nahrungsentzug im Durchschnitt geringgradig stärker als bei gesteigerter Zufuhr. Auf diese Weise scheint die ACSL5 im Enterozyten gleichermaßen funktionell in die katabolen und anabolen Prozesse eingebunden zu sein, wobei die katabolen Aufgaben möglicherweise geringfügig überwiegen. Die eigenen Daten unterstützen diese Hypothese der ambivalenten Funktion der ACSL5 innerhalb des Darmepithels. Durch Verfettungsversuche an CaCo-2 Zellen mit Ölsäure (Daten nicht explizit aufgeführt) konnte im Vorfeld eine Induktion der ACSL5 erzielt werden und auch bei mikroskopischer Untersuchung wurde eine deutliche Ausbildung von intrazellulären Lipidvesikeln nachgewiesen. Diese Feststellungen können als Belege für die anabolen Aufgaben des Enzyms gewertet werden. Demgegenüber sind die im Rahmen dieser Arbeit erörterten Ergebnisse einer Hochregulation der ACSL5 und einer Abnahme solcher Lipidvakuolen infolge einer Behandlung der gleichen Zelllinie mit einem FAS-Inhibitor zu sehen (vgl. Kapitel 4.4.1 bzw. 4.6.1). Vergleichbar mit den Befunden Oikawas löst hier eine Stoffwechselsituation mit Substratmangel ebenfalls eine starke ACSL5-Induktion aus, was wiederum auf eine katabole Funktion des Enzyms hinweist. Auffällig ist zudem, dass diese mRNA-Alterationen im Sinne einer ACSL5-



Induktion stets stärker ausfielen, als es bei den Verfettungen der Fall war. Interessanterweise lagen ferner bereits in unbehandelten Zellen mit ACSL5 Überexpression deutlich erhöhte Level an FFAR2 und FFAR3 vor, wobei die mRNA-Menge des FFAR2 im Vergleich zur unbehandelten Wildtypzelle gar höchstsignifikant vermehrt war (vgl. Kapitel 4.3). Scheinbar erfolgt die Genregulation dieser Freien-Fettsäure-Rezeptoren demnach ACSL5-abhängig, denn auch unter Orlistat-Behandlung und damit verbundener Zunahme der ACSL5 stiegen die FFAR2 und FFAR3 Expression nochmals (vgl. Kapitel 4.4.2). Eine Zusammenschau all dieser Daten bestätigt nochmals die Hypothese, dass die enterozytäre ACSL5 zwar anabole und katabole Funktionen erfüllt, jedoch die katabolen Eigenschaften zu überwiegen scheinen. So kann das Enzym aktivierte Fettsäuren in die synthetisierenden Prozesse und die Energiegewinnung schleusen. Jedoch spricht die gleichzeitig vermutlich ACSL5-bedingte Hochregulation der mRNA-Level der FFAR2 und 3 eher dafür, dass die degradativen Eigenschaften der ACSL5 im Metabolismus zu dominieren scheinen. In stärkerer Ausprägung könnten die als „Energiesensoren“ fungierenden Rezeptoren unmittelbar exogene Fettsäuren erfassen und solche anabolen Signalwege schalten, wie sie während der postprandialen Phase vermehrt ablaufen (vgl. Kapitel 1.4.1). Im Umkehrschluss befände sich der Enterozyt selbst dabei bis dahin eher in einem katabolen Zustand, d.h. die durch die ACSL5 aktivierten Fettsäuren dienten somit höchstwahrscheinlich vornehmlich der Energieversorgung. Der hier ebenfalls ermittelte Befund, dass auch in Anwesenheit von Etomoxir als Inhibitor Fettsäure-Transfers in das Mitochondrium eine Expressionsteigerung der ACSL5 zu verzeichnen ist, lässt sich gleichermaßen damit in Einklang bringen (vgl. Kapitel 4.5). Auch hier würde möglicherweise versucht ein relatives zelluläres Energiedefizit durch die vermehrte Generierung von ACSL5-vermittelten Acyl-CoA Thioestern zu decken.

Um jetzt jedoch eine weitere funktionelle Einordnung der ACSL5 innerhalb des Lipidmetabolismus des Enterozyten zu erreichen, sind weiterführende Untersuchungen unabdingbar. So sollten als eine Maßnahme unmittelbare Effekte auf die Beta-Oxidation bei Behandlung mit Orlistat betrachtet werden. Konkret wäre dazu eine Erfassung etwaiger Veränderungen hinsichtlich des zellulären ATP-Levels, des oxidativen Stress (durch Bestimmung von entstehenden Radikalen) oder des mitochondrialen Membranpotentials sinnvoll (vgl. Methodik: Merrill et al. 2002; Peyot et al. 2009). Zusätzlich wären auch Verteilungsstudien von zuvor markierten Fettsäuren geeignet die weitere zelluläre Distribution dieser Substrate der ACSL5 nach enzymatischer Aktivierung zu verfolgen (vgl. Methodik: Bu und Mashek 2010). Dadurch ließe sich etwa klären, ob ACSL5 nun tatsächlich, wie vermutet, die durch sie gebildeten Acyl-CoA Thioester präferenziell eher in die

katabolischen Wege des Metabolismus leitet oder ob das Enzym diese doch eher in anabole und katabole Prozesse gleichermaßen einschleust.

#### **5.4 Aktivierung apoptotischer Faktoren durch Manipulation des enterozytären Lipidmetabolismus – Möglicher Zusammenhang mit ACSL5 Induktion?**

Bei der Durchführung der Zellkulturexperimente im Rahmen dieser Arbeit stach immer wieder vor, dass unabhängig von der verwendeten Zelllinie steigende Dosierungen des Orlistats mutmaßlich negative Effekte auf die Zellvitalität zu haben schienen. Der Zellverband wirkte aufgelockert, die Zellkerne selbst eher kondensiert und die Zahl derjenigen Zellen, die ihre Adhäsion zum Untergrund verloren, vergrößerte sich unter Behandlung mit der Substanz (vgl. Kapitel 4.4 und 4.6.1). Obwohl dies lediglich erste Beobachtungen waren, galt es doch im weiteren Verlauf diese Schlussfolgerung genauer zu validieren. Hierzu sollten putative Auswirkungen auf das Zellüberleben anhand von Veränderungen im Expressionsprofil von Strukturen der Apoptosekaskade objektivierbar erfasst werden. Man wählte im Zuge dieses ersten Screenings die Faktoren *Caspase 8* und *Bid* aus, da sie wesentliche Eckpunkte im Ablauf des programmierten Zelltodes markieren. Somit ist gleichzeitig noch eine erste, wenngleich grobe, Einordnung in die involvierten Signalwege möglich.

Zum weiteren Verständnis werden daher die in dieser Betrachtung notwendigen Zusammenhänge nochmals kurz rekapituliert: Generell kann die Apoptose entweder durch äußere Stimuli (wie *TRAIL*, *Fas-Ligand* usw.) im Sinne einer Ligand-Rezeptor-Signaltransduktion über sog. Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche oder über intrazelluläre Signale wie etwa Zellschaden initiiert werden. Zusätzlich differenziert man in Bezug auf die extrinsische Apoptose weiterhin zwischen Typ I Zellen (direkte Apoptose) und Typ II Zellen (indirekte Apoptose), die sich hinsichtlich der folgenden Signalkaskaden unterscheiden. In beiden Signalwegen ist *Caspase 8* die sog. Initiatorcaspase. In Typ I Zellen ist ihre Aktivierung durch die Todesrezeptoren ausreichend für den weiteren Ablauf des Zelltodes und die Rekrutierung der sog. *Effektorcaspasen*, deren Proteasefunktion die überlebenswichtigen Strukturen der Zelle abbauen. Bei Typ II Zellen dagegen erfolgt nach Aktivierung der *Caspase 8* eine weitere, vom Mitochondrium abhängige Amplifikation des extrazellulären Signals. Durch proteolytische Spaltung unter anderem von *Bid* kommt es infolge einer gesteigerten mitochondrialen Membranpermeabilität zur Freisetzung von

*Cytochrom c* aus dem Zellorganell. Erst dies ist dann das suffiziente Signal für die weitere Transduktion und die finale Aktivierung der Effektorcaspasen (van Loo et al. 2002; Kantari und Walczak 2011).

Unter Berücksichtigung dieser hier soeben geschilderten Signalwege enthüllten die molekulargenetischen Analysen im Anschluss eine hoch- bis höchstsignifikante Expressionssteigerung sowohl der Caspase 8, wie auch von Bid in Anwesenheit der hier zum Einsatz kommenden Orlistat Höchstdosis (200µM) (vgl. Kapitel 4.4.3). In Anbetracht dessen ließe sich demnach eine durch die Versuchsanordnung bedingte Beeinflussung der Apoptosekaskade unter Beteiligung des Mitochondriums vermuten (gemäß einer Typ II Zelle). Zumindest auf Nukleinsäureebene würde so eine positive Regulation proapoptotischer Schlüsselstrukturen erfolgen. Jedoch ermöglichen die hier gewonnenen Daten keine unmittelbaren bzw. eindeutigen Rückschlüsse auf eine tatsächliche ACSL5-Beteiligung an diesen Effekten. Die Resultate waren in allen verwendeten Zelllinien recht analog und auch eine nachgewiesene Überexpression der ACSL5 innerhalb der Transfektante GaCo 3/25 führte lediglich zu marginalen Veränderungen im Vergleich zur Leertransfektante oder dem Wildtyp (vgl. Kapitel 4.4.3). So muss als weitere mögliche Ursache der hier beobachteten Expressionsänderungen ebenso eine von ACSL5 unabhängige Wirkung des Orlistats selbst berücksichtigt werden. Für beide Moleküle, ACSL5 und Orlistat, existieren in der Literatur entsprechende Ausführungen hinsichtlich einer potentiellen Assoziation mit dem Apoptoseprozess, weshalb dieser Sachverhalt nochmals eingehender diskutiert werden soll:

Eine vermehrte ACSL5 Expression bzw. Enzymaktivität konnte bereits in der Vergangenheit durch Gassler und Kollegen einer gesteigerten Apoptosesensibilität im Enterozytenmodell zugeordnet werden. So waren die auf der Oberfläche ausgebildeten TRAIL-R1 Todesrezeptoren deutlich vermehrt und eine Stimulation mit dem zugehörigen Liganden erhöhte die Zellsterblichkeit massiv. Zudem wurde auch *in vivo* entlang der Krypten-Villus-Achse eine Veränderung der ACSL5-Regulation demonstriert. Ausgehend von den kryptennahen Stammzellen nahm die ACSL5-Ausprägung zur Zottenspitze mit steigender Zelldifferenzierung gleichermaßen zu (Gassler et al 2007). An der hepatischen Zelllinie HepG2 wurde ebenso ein Zusammenhang zwischen einer Überexpression der ACSL5 und dem hepatozellulären Zellüberleben festgestellt. Dort kam es zwar nicht zur Hochregulation der Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche, aber dennoch zeigte sich experimentell eine gesteigerte Suszeptibilität hinsichtlich einer Behandlung mit entsprechenden Liganden wie TRAIL oder TNF-alpha (Reinartz et al. 2010). Aber nicht nur an Geweben bzw. Zellen des Verdauungsapparates wurden solche

Beobachtungen gemacht. Ähnliche Effekte ergaben sich jüngst auch bei Untersuchungen der humanen Epidermis (gesteigerte Apoptosesuszeptibilität nach ACSL5-Transfektion) bzw. peripheren monoklonalen Blutzellen bei SLE-Patienten (Gaisa, Köster et al. 2008; Catalá-Rabasa et al. 2011). In zuletzt besagter Studie wiesen die Autoren in den Abwehrzellen erkrankter Patienten einerseits einen gesteigerten mRNA-Gehalt der ACSL5 nach und zeigten andererseits, dass eine Stimulation in einer Zunahme der Fas-, TRAIL- sowie TNF-Expression resultierte. Bis heute ist der genaue Mechanismus dieser ACSL5 Beteiligung am Vorgang der Apoptose noch nicht eindeutig geklärt worden. Erste Vermutungen legen jedoch eine Assoziation mit der Ceramid-Synthese nahe. Zumindest im Darmmodell konnte so die zuvor beschriebene Steigerung des TRAIL-R1 auf eine Herabregulation des Proteins *FLIP* zurückgeführt werden. Die Abnahme dieses Inhibitors der Caspase 8 wiederum ließ sich als Folge einer vermutlich ACSL5-abhängigen, gesteigerten Ceramid-Bildung identifizieren, wie die Behandlung mit einem entsprechenden Ceramidsynthase-Inhibitor bestätigte (Gassler et al. 2007). Ferner scheint diese Lipidgruppe dabei insbesondere mit den mitochondrialen Vorgängen der Apoptose verknüpft zu sein. Dies belegt sowohl die Tatsache, dass Ceramide in der Lage sind, Kanäle durch die äußere Mitochondrienmembran zu bilden, als auch das Faktum, dass eben dort die ACSL5 lokalisiert ist (Lewin et al. 2001; Siskind et al. 2006). Insofern würde dies den Ergebnissen der hier erfolgten molekulargenetischen Analysen entsprechen. Auch hier konnte eine Induktion von Bid als Bestandteil der am Mitochondrium wirkenden, apoptotischen Faktoren nachgewiesen werden. Somit wären die hier betrachteten Koloadenokarzinomzellen im Enterozyten-Modell als sog. Typ II Zellen einzustufen (s.o.). Man muss jedoch berücksichtigen, dass trotz der Mehrheit der Literaturdaten mit ACSL5 im proapoptotischen Kontext auch solche Studien existieren, die ACSL5 eine eher anti-apoptotische Funktion zuschreiben. Mashima und Kollegen stellten bei Experimenten an Zellen mit neuronaler Herkunft (Ursprung war hier ein Gliom) beispielsweise fest, dass die vermehrte Expression des Enzyms dort zu verbessertem Zellüberleben unter Azidose bzw. Triacsin c Behandlung führte (Mashima et al. 2009a & b). Sie konnten anhand von Microarray-Verfahren zeigen, dass ACSL5 die Expression solcher Gene regulierte, die entscheidend für das Tumorüberleben unter Zellstress sind (Mashima et al 2009b). Zudem gelang ihnen der Nachweis, dass Triacsin c zur Senkung der gesamten ACSL-Aktivität in den Gliomzellen führte, was letztlich in einer mitochondrial vermittelten Apoptose mit Cytochrom c Freisetzung gipfelte (Mashima et al. 2009a). Im Umkehrschluss postulierten sie, dass das verbesserte Zellüberleben in Zellen mit überexprimierender ACSL5 auf einer Kompensation dieses Mechanismus beruht.

Grundlage hierfür war die Annahme, dass die humane ACSL5 ähnlich wie die ACSL5 der Ratte nicht durch die Substanz Triacsin c inhibiert werden kann (Kim et al. 2001). Demgegenüber scheint eine neueste Studie aber zu belegen, dass die humane ACSL5 eben doch sensibel bezüglich der Wirkung von Triacsin c ist (Kaemmerer et al. 2011). Unter diesem Gesichtspunkt müsste das zuletzt geschilderte Ergebnis der Arbeitsgruppe um Mashima nochmals überdacht werden. Gegebenenfalls wurde die größere Resistenz der Zellen gegenüber der Behandlung in diesem Fall durch andere, nicht ACSL5 assoziierte Effekte bedingt und bedürfen einer anderen Beurteilung. Alternativ ist jedoch auch anzumerken, dass die ACSL5 Beteiligung an der Apoptose möglicherweise jeweiligen gewebespezifischen Unterschieden unterliegt und demnach eben sowohl pro-, als auch anti-apoptotische Auswirkungen auftreten könnten.

Wie aber bereits zuvor angeklungen, müssen auch etwaige eigenständige Effekte infolge der eigentlichen Behandlung der Zellen mit Orlistat bzw. Etomoxir beachtet werden, um die hier ermittelten Ergebnisse korrekt einzuordnen. Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Daten könnten auch eine ACSL5-unabhängige Konsequenz dieser Substanzwirkungen sein. Im Jahre 2008 etwa präsentierten Knowles und Kollegen anhand von Zelllinien aus Mamma- sowie Prostatakarzinomen eine Orlistat bedingte Herabregulation von FLIP. Konsekutiv war die Bereitschaft der betroffenen Zellen zur TRAIL-vermittelten Apoptose über gesteigerte Caspase 8 Aktivität deutlich erhöht (Knowles et al. 2008). Eine andere Studie an humanen Mammakarzinomzellen demonstrierte zudem, dass eine Inaktivierung der FAS (diesmal mittels siRNA) ebenfalls die Ceramidsynthese induzieren kann, woraufhin abermals eine vermehrte mRNA-Expression von TRAIL und anderen proapoptotischen Gene detektiert wurde (Bandyopadhyay et al. 2006). Gleichfalls ist auch Etomoxir als CPT-1 Inhibitor in der Lage, eine solche Ceramidinduktion zu bewirken (Paumen et al. 1997b). Bei eingehender Betrachtung erscheinen diese Mechanismen denjenigen, die oben bereits im Zusammenhang mit der ACSL5 genannt wurden, recht analog zu sein. Es kommt daher die Frage auf, ob nicht gar auch hier eine eventuelle Beteiligung des Enzyms bestehen könnte und diese bloß in den bisherigen Analysen nicht berücksichtigt worden ist. Zum heutigen Zeitpunkt sind dies jedoch rein hypothetische Überlegungen, die einer weiteren Klärung bedürfen. Zumindest die Lokalisation dieser Interaktionen entspräche auch der Mitochondrium-assoziierten Apoptose wie sie bei ACSL5 vermutet wird. Neueste Daten belegen eine Freisetzung von Cytochrom c durch Orlistat (Zecchin et al. 2011). Von der CPT-1 ist bekannt, dass diese mit an der Apoptose beteiligten Proteinen, nämlich *Bcl-2* und Bid, auf der mitochondrialen Außenmembran interagiert (Paumen et al. 1997a; Giordano et al. 2005).

Im nächsten Schritt wäre nun eine nochmalige Bestätigung der hier erhobenen Befunde einer Genregulation mit einer weiteren unabhängigen Methode indiziert, etwa durch Bestimmung möglicher Proteinalterationen mithilfe des sog. Western Blots. Dadurch wäre eine direkte Kontrolle insofern möglich, dass eine putative Zunahme des resultierenden Produktes unmittelbar erfasst würde. Auch sollte eine Inkubation mit verschiedenen Todesrezeptor-Liganden (wie TRAIL, FAS-Ligand, TNF-alpha usw.) nach Behandlung angestrebt werden, denn auf diese Weise ließen sich akute funktionelle Konsequenzen auf die Apoptosesuszeptibilität untersuchen. Ferner wäre ein gezieltes Ausschalten der ACSL5 mittels spezifischer siRNA notwendig, um die detektierten Expressionsveränderungen der Gene Caspase 8 und Bid eindeutig als Resultat der stattgefundenen ACSL5 Induktion zu verifizieren. Ließen sich in solch einem Experiment die zuvor geschilderten Effekte nicht mehr reproduzieren, wäre dieser Zusammenhang belegt. Wären jedoch keine Alterationen hinsichtlich der Apoptose-Regulation zu den jetzigen Ergebnissen eruierbar, müsste man alternativ von ACSL5 unabhängigen Auswirkungen einer Behandlung mit den Substanzen Orlistat bzw. Etomoxir ausgehen. Sollte dies wiederum der Fall sein, so ergäbe sich im Anschluss hieran die Frage, ob ein Zusammenhang mit einer insuffizienten Energieversorgung der Zelle als zellulärer Stressor bestünde (zum Nachweis einer potentiellen Verbindung sei dabei auf die im Kapitel 5.3 erörterten ATP- bzw. freie Radikale-Messungen verwiesen). Um ferner die mögliche Verbindung mit einer gesteigerten Synthese der Ceramide aufzudecken, erscheint dann ebenso die Analyse eines „*knockdown*“-Versuches der Ceramid-Synthase vor der Inkubation als sinnvoll. Zudem wäre ein darüber hinaus interessanter Ansatz, ob die Möglichkeit existiert, dass eine nachfolgende Substitution exogener Lipide bzw. Fettsäuren besagten Vorgängen entgegenwirken könnte. Damit wären die putativen Prozesse nämlich ihrerseits (möglicherweise nur innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls) umkehrbar. Ähnliches postulierten Dowling und Kollegen bei Untersuchungen der Apoptosesensibilität bei einer Magenkarzinom-Zelllinie nach Inkubation mit Orlistat in serumfreiem Medium (Dowling et al. 2009).

## **5.5 ACSL5 unabhängige ultrastrukturelle Alterationen der mitochondrialen Konfiguration**

Das Mitochondrium ist, wie aus den obigen Ausführungen schon vorab hervorgeht, zentral in die Geschehnisse des enterozytären Lipidmetabolismus eingebunden. Es ist dasjenige Zellorganell, an dessen äußerer Membran der essentiell-katalytische

Reaktionsschritt der Fettsäure-Aktivierung durch die ACSL5 stattfindet und Lokalisationsort der innerhalb dieser Experimente manipulierten CPT-1. Zudem bildet es das Kompartiment der Beta-Oxidation, d.h. des wesentlichen Prozesses der zellulären Energieerzeugung unter Verwendung von Acyl-CoA Thioestern, und hat gleichermaßen eine wichtige Funktion im Hinblick auf die Apoptosekaskade inne. All diese Zusammenhänge erklären, warum die Ultrastruktur des Mitochondriums sowie deren potentiellen Veränderungen im Rahmen dieser Arbeit von wesentlichem Interesse waren. Insbesondere nachdem bereits lichtmikroskopische Auffälligkeiten der entsprechend behandelten Zellen hervortraten (vgl. Kapitel 5.4), galt es auch mithilfe der TEM-Methodik gezielt nach dortigen Alterationen zu fahnden.

Da bisher keinerlei Daten hierzu in der Literatur existieren, wurde zunächst anhand unbehandelter Koloadenkarzinomzellen überprüft, welche Konsequenz eine bloße ACSL5 Überexpression im Enterozyten-Modell auf die Struktur des Mitochondriums hat (vgl. Kapitel 4.6.2). Zur Objektivierung wurden die jeweiligen Längstdurchmesser der in der Bildebene angeschnittenen Zellorganellen verglichen. Interessanterweise ließen sich jedoch keine Größenunterschiede zwischen Wildtyp und ACSL5-Transfektante eruieren. Somit scheint ACSL5 keine mit dieser Methode erfassbaren morphologischen Einflüsse auszuüben. Jedoch waren die Mitochondrien der ebenfalls untersuchten Leertransfektanten im Vergleich hierzu höchstsignifikant größer. Dies wiederum könnte eventuell das Resultat etwaiger „*off-target*“-Effekte infolge der Transfektion mit dem Leervektor-Plasmid sein.

Ausgehend von dieser Beobachtung erfolgte anschließend die strukturelle Analyse der Mitochondrien unter Einwirkung der in den Lipidmetabolismus eingreifenden Pharmaka Orlistat und Etomoxir. Auch jetzt konnten mittels TEM-Technik eindeutige ultrastrukturelle Alterationen detektiert werden, jedoch verhielten sich diese innerhalb aller verwendeten Zellreihen unabhängig vom Transfektionszustand annähernd analog (vgl. Kapitel 4.6.2). So kam es unter Etomoxir-Einwirkung bei allen Zelllinien zur hoch- bis höchstsignifikanten Größenzunahme der Mitochondrien, während dagegen innerhalb der mit dem Leervektor transfizierten Zellen bei steigenden Dosierungen des Orlistats eine Größenreduktion zu verzeichnen war. Auch das unterstützt die Hypothese einer ACSL5 unabhängigen Ursache. Vielmehr könnten diese Auffälligkeiten Folgen sich verändernder Substratströme sein. Beispielsweise bewirkt die Inhibition der FAS mittels Orlistat im hier verwendeten Modell den Entzug der endogenen Fettsäuren als letzte der Zelle verbleibende Lipidquelle. Es resultiert vermutlich ein genereller Mangel an Acyl-CoA Thioestern. Diese sind jedoch unter anderem Ausgangsmaterial für

Lipidmembranen wie etwa die Doppelmembran der Mitochondrien. Es würde demnach zu einer Abnahme der Zellorganellgröße infolge einer Minderversorgung mit Baustoffen kommen. Demgegenüber ließe sich die Ausbildung von deutlich vergrößerten Mitochondrien in Anwesenheit von Etomoxir folgendermaßen begründen: Die Etomoxir abhängige Inhibition der CPT-1 verhindert die Aufnahme von Acyl-CoA Thioestern in den intramitochondrialen Raum. Stattdessen würden diese aktivierten Fettsäuren möglicherweise vermehrt anderen Prozessen des Lipidmetabolismus zugeführt werden und könnten so auch gesteigert in die Mitochondrienmembran eingebaut werden. Zumindest für den Größenzuwachs unter Etomoxir wäre alternativ als weiteres Erklärungskonzept ebenso denkbar, dass es infolge eines Energiemangels und konsekutiver Schädigung des Zellstoffwechsels zur Schwellung des Zellorganells kommt. Dabei wäre die Glykolyse nicht ausreichend, um das Energiedefizit durch Unterbrechung der Beta-Oxidation zu überwinden.

Wechselseitige Beeinflussungen der Manipulationen innerhalb des enterozytären Lipidmetabolismus sind letztlich ebenso zu berücksichtigen und können eine mögliche Ursache für die beobachteten Effekte bei sequenzieller Behandlung mit den beiden hier verwendeten Substanzen sein (vgl. Kapitel 4.5). So führt die Inhibition der FAS durch Orlistat dazu, dass es zur Akkumulation deren Substrates Malonyl-CoA kommt. Malonyl-CoA kann nicht zur endogenen Synthese von Fettsäuren herangezogen werden und wirkt stattdessen wiederum seinerseits bei entsprechend hohen Dosen hemmend auf die Aktivität der CPT-1, mit entsprechenden Auswirkungen auf die Beta-Oxidation. Zusätzlich wird vermutet, dass große Mengen von Malonyl-CoA proapoptische bzw. cytotoxische Wirkungen haben könnten (Thupari et al. 2001).

Da die hier nun aufgeworfenen, scheinbar ACSL5 unabhängigen Konsequenzen auf die mitochondriale Größe nicht hinreichend geklärt werden konnten, sind weiterführende Analysen in Erwägung zu ziehen. Um putative Veränderungen der zellulären Distribution einmal aktivierter Thioester unter den hier abgelaufenen Versuchsbedingungen zu ermitteln, wären die bereits in Kapitel 5.3 angesprochenen Verteilungsstudien mit radioaktiv markierten Fettsäuren ratsam. Somit wäre ein vermehrter Einbau in die Mitochondrienmembran direkt nachweisbar. Ferner ließe sich der Verdacht einer eventuellen Schädigung des Organells (etwa durch einen gestörten Energiehaushalt) indirekt durch Messung potentieller Änderungen des mitochondrialen Membranpotentials bzw. der Freisetzung von Cytochrom c bestätigen (vgl. Methodik: Lin et al. 2012). Die Erhöhung der zytosolischen Konzentration dieses Proteins spräche in der Tat für eine gesteigerte Permeabilität



der Mitochondrienmembran. Eine andere Möglichkeit des direkten Schädigungsnachweises wäre die photometrische Prüfung eines mitochondrialen Anschwellens (vgl. Methodik: Lofrumento et al. 2011).

## **5.6 FFAR2, FFAR3 und Mortalin – potentiell ACSL5 abhängig regulierte Moleküle im Enterozyten**

Ein grundlegendes Ziel dieser Studien war die Einordnung der ACSL5 innerhalb der funktionellen Zusammenhänge des enterozytären Lipidmetabolismus sowie die Aufdeckung putativer morphologischer Effekte hierbei. Darüber hinaus galt es zu klären, ob sich möglicherweise ACSL5 abhängig gesteuerte Moleküle identifizieren lassen. Als potentielle Zielstrukturen wurde dabei unter anderem die Gruppe der sog. Freie-Fettsäure-Rezeptoren (samt GPR120) in Betracht gezogen, da sie ebenso wie die ACSL5 Bestandteil der Lipid-assoziierten Signalwege ist. Zudem weist sie gleichermaßen eine Beteiligung an der zellulären Energiehomöostase auf. Aber auch die mitochondrial lokalisierten Proteine waren hier von besonderem Interesse. Ihre topographische Nähe zur ebenfalls an diesem Zellorganell vorkommenden ACSL5 gab Grund zur Spekulation, dass dort eventuell ebenso eine regulative Verbindung besteht. Im Vorfeld enthüllten bereits erste arbeitsgruppeninterne Analysen eine Reihe möglicher Kandidatenstrukturen, von denen letztlich *Mortalin* am vielversprechendsten erschien.

Zunächst sollen die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 sowie 4.4.2 weiterführend erläutert werden: Wie aus den dortigen Daten hervorgeht, liegt zumindest bezüglich der beiden Rezeptoren FFAR2 und 3 eine ACSL5 bedingte Regulation nahe. Im direkten Vergleich zum Wildtyp bzw. der mit dem Leervektor versehenen Zelle wies die unbehandelte ACSL5 Transfektante deutlich gesteigerte Expressionsraten der besagten Gene auf. Hinsichtlich des FFAR2 war diese Zunahme gar höchstsignifikant. Zudem bewirkte die Inkubation mit Orlistat neben der nachweislichen ACSL5 Induktion eine Steigerung der mRNA-Level von FFAR2 und 3. Insgesamt bestätigen diese Daten die Vermutung einer ACSL5 gekoppelten Genregulation der beiden Rezeptortypen. Auch hinsichtlich der hieraus resultierenden funktionellen Aspekte wäre eine solche Assoziation durchaus erklärbar. Geht man von einer vornehmlich katabolen Funktion der ACSL5 im Enterozyten aus (vgl. Kapitel 5.3), würden die von ihr katalysierten langkettigen Fettsäure-Thioester vermehrt der energieliefernden Beta-Oxidation zugeführt. Gleichzeitig bedeutete eine ACSL5 abhängige Zunahme der Freien-Fettsäure-Rezeptoren auf der Zelloberfläche jedoch auch eine größere Suszeptibilität des

Enterozyten gegenüber nutritiver Fettsäuren. Auf diese Weise könnten die als „Energiesensoren“ fungierenden FFAR2 und 3 bei nachfolgender Zufuhr exogener Lipide wesentlich stärker stimuliert werden. Als Konsequenz wäre auch die Aktivierung der hierdurch transduzierten anabolen Prozesse gesteigert, eine essentielle Voraussetzung, um in der postprandialen Phase umgehend die aufgenommenen Fette zu internalisieren bzw. die Verdauungsvorgänge einzuleiten.

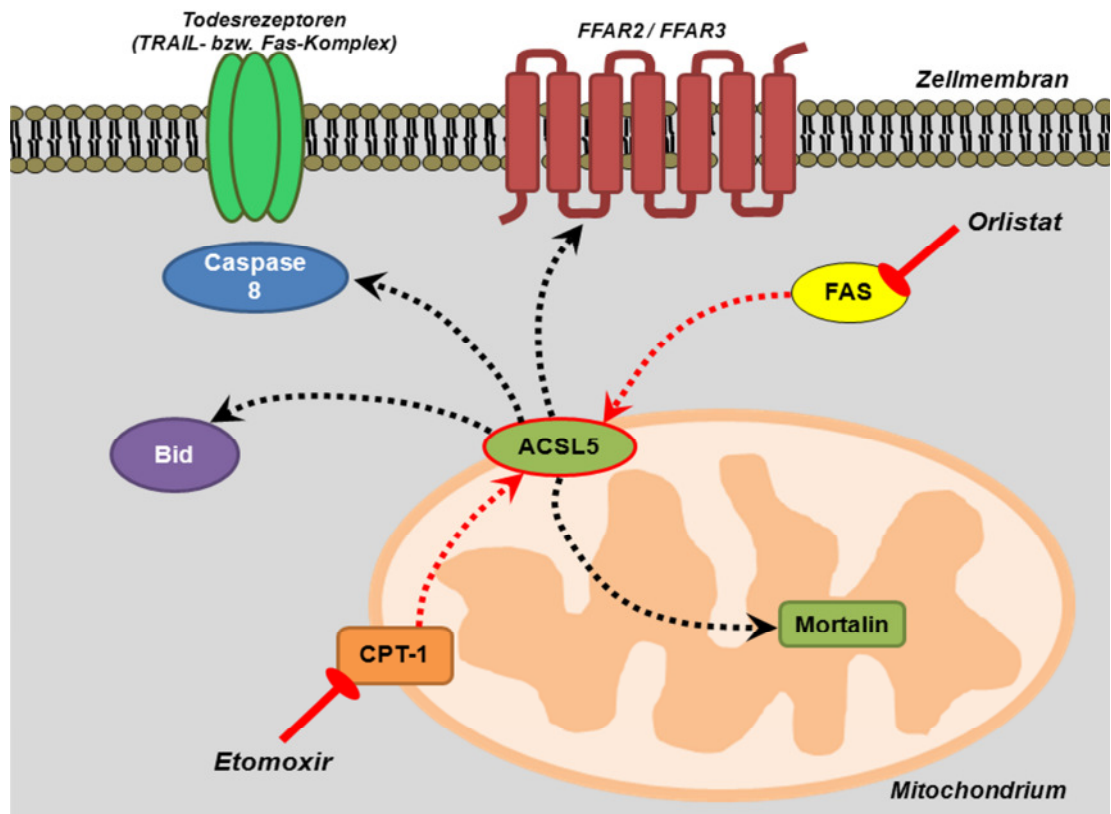
Aber nicht nur Gene mit Funktionen innerhalb des Lipidmetabolismus scheinen ACSL5 assoziiert gesteuert zu werden. So gelang es eine Reihe mitochondrialer Proteine zu identifizieren, die mutmaßlich ACSL5 abhängig reguliert werden. Dazu wurden isolierte Mitochondrien der hier verwendeten Zelllinien mittels 2D-Gelaufreinigung und anschließender MALDI-TOF analysiert (bisher nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Unter den hervorgetretenen Strukturen fiel insbesondere das sog. Mortalin auf, weshalb dies nun eingehender in den hier vorliegenden Ausführungen untersucht wurde.

*Mortalin (HSPA9)*, auch unter den Bezeichnungen Grp75, MtHsp70, mot-2, MOT oder PBP74 bekannt, besitzt eine Größe von etwa 70 kDa und ist auf Chromosom 5q31.1.1 lokalisiert (Czarnecka et al. 2006). Es gilt als ein Vertreter der sog. Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) Familie. Diese Proteingruppe ist in vielen Spezies vorzufinden und wesentlich an den Vorgängen der korrekten Proteinfaltung beteiligt (*Chaperone*). Ferner wirken die Hsp70 Vertreter auftretendem zellulärem Stress entgegen und verbessern so das Zellüberleben unter solchen Bedingungen (Kaul et al. 2007). Mortalin selbst scheint in diesem Zusammenhang multiple subzelluläre Lokalisationen aufzuweisen: Es konnte bisher im endoplasmatischen Retikulum, zytoplasmatischen Vesikeln und dem Zytosol detektiert werden. Sein präferentielles Vorkommen wird aber innerhalb der Mitochondrien (genauer: mitochondriale Matrix) vermutet (Wadhwa et al. 1993; Domanico et al. 1993; Ran et al. 2000; Wadhwa et al. 2002). Die eigentliche Funktion des Mortalins innerhalb des Enterozyten ist bis heute noch weitestgehend unbekannt, da noch nicht ausgiebig auf diesem Gebiet geforscht wurde. Jedoch ergaben sich bereits erste Hinweise darauf, dass es möglicherweise an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt ist. So wurden etwa in humanen Adenokarzinomen des Kolons deutlich erhöhte Proteinlevel von Mortalin erfasst. Ferner korrelierte bei der Analyse der etwaigen prognostischen Relevanz dieser Daten eine steigende Mortalin Expression signifikant mit der Abnahme der Überlebenszeit (Dundas et al. 2005). Mittlerweile wurde das Tumorsuppressor-Protein *p53*, ein wesentliches Schlüssel-molekül der Apoptose, als Interaktionspartner des Mortalins identifiziert. Infolge einer Wechselwirkung mit Mortalin findet dabei dessen Inaktivierung statt (Wadhwa et al. 1998). Dadurch

ergibt sich ein möglicher Überlebensvorteil der betroffenen Zellen, was wiederum auch die zuvor beschriebenen hohen Mortalinwerte in der kolorektalen Neoplasie erklären würde. Betrachtet man nun den putativen Zusammenhang zwischen Mortalin und der ACSL5, so stach bei den hier durchgeführten Untersuchungen am Enterozyten-Modell Folgendes hervor: Zunächst war bemerkenswert, dass schon vor der eigentlichen Behandlung erhöhte ACSL5 Level (der Transfektanten) mit einer ebenfalls hochsignifikant gesteigerten Mortalin Expression korrelierten (vgl. Kapitel 4.3). Des Weiteren erfolgte parallel zur Orlistat bzw. Etomoxir bedingten ACSL5 Induktion eine zeit- sowie konzentrationsabhängige Hochregulation des Mortalin-Gens in allen betrachteten Zelllinien unabhängig vom Transfektionszustand (vgl. Kapitel 4.4.4 und 4.5.4). Diese Datenlage lässt auf eine entsprechende ACSL5 abhängige Regulation des Mortalins schließen. Auf den ersten Blick ergibt sich hieraus ein scheinbarer Widerspruch: Einerseits befindet sich ACSL5 mit seinen nach heutigem Kenntnisstand proapoptotischen Einflüssen auf die enterozytäre Vitalität. Andererseits scheint gerade dieses Enzym die Genregulation des eher anti-apoptotisch wirksamen Mortalins in bisher ungeklärter Weise zu beeinflussen. Auf zellulärer Ebene findet sich dennoch eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen beiden Molekülen. So resultiert die gesteigerte Aktivität der ACSL5 potentiell in zellulärem Stress, egal ob durch putative Auswirkungen auf die Energiehomöostase der Zelle (vgl. Kapitel 5.2 und 5.3: Effekte auf die Beta-Oxidation) oder infolge Alterationen der intrazellulären Lipidverbindungen (vgl. Kapitel 5.4: Ceramidinduktion). Um diesen schädlichen Auswirkungen möglicherweise jedoch entgegenzuwirken, kommt es zur vermehrten Ausbildung des Mortalins. Das Protein ist nachweislich an der molekularen Antwort auf Zellstress beteiligt (Deocaris et al. 2006). Bis zu einem gewissen Grad könnten demnach durch diese Interaktion die negativen Einflüsse der ACSL5 auf das Zellüberleben kompensiert werden.

Diese ersten interessanten Beobachtungen bedürfen aber noch einer fortgeführten Analytik. So sollten die auf Nukleinsäureebene gewonnenen Erkenntnisse nochmalig mithilfe des Western Blots oder der Immunzytochemie auch hinsichtlich der resultierenden Proteinveränderungen validiert werden. Letztere Methode ermöglicht gleichzeitig auch Rückschlüsse bezüglich einer etwaigen Koexpression von ACSL5 und den potentiell hiervon regulierten Strukturen. Auch eine Gegenprobe der Ergebnisse durch Wiederholung der Experimente nach gezieltem ACSL5 „knockdown“ mittels siRNA wäre sinnvoll. Letztlich könnte man diese *in vitro* Daten noch mit solchen aus *in vivo* Ansätzen vergleichen. Besonders gut wären etwa Analysen entlang der Krypten-Villus-Achse bei Biopsaten geeignet. So wäre man in der Lage, ähnlich wie bei ACSL5 bereits geschehen (Gassler et al. 2007),

putative Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von der Lokalisation des Enterozyten im Gewebeverbund zu ermitteln.



**Abb. 5-2: Gemeinsame Darstellung derjenigen Gene, die potentiell ACSL5 abhängig im Enterozyten reguliert werden.** Die ACSL5 scheint nicht nur das zentrale Schlüsselenzym innerhalb des enterozytären Lipidmetabolismus zu sein, sondern ist möglicherweise wesentlich komplexer mit den verschiedensten funktionellen Prozessen verknüpft. Nach ACSL5 Induktion infolge einer Manipulation des Fettsäure-Stoffwechsels (rote unterbrochene Pfeile) ließen sich so auch Alterationen verschiedener anderer Gene detektieren. Dies deutet ggf. auf eine potentielle ACSL5 beeinflusste Regulation hin (schwarze unterbrochene Pfeile). Betroffen sind dabei gleichermaßen proapoptotische (Caspase 8 und Bid), metabolische (FFAR2 und 3) sowie anti-apoptotische (Mortalin) Strukturen.

## 5.7 Ausblick

Eine systematische Analyse der ACSL5 im humanen Darmtrakt fand in der Vergangenheit nur sehr vereinzelt statt. Dementsprechend lückenhaft sind die Erkenntnisse hinsichtlich der genauen Funktionen des Enzyms innerhalb der dortigen zellulären Homöostase. Vor diesem Hintergrund sind auch die im Rahmen dieser experimentellen Arbeit errungenen Daten lediglich als erste Anhaltspunkte einer umfassenden funktionellen Charakterisierung der enterozytären ACSL5 zu werten. Basierend auf den gewonnenen Hinweisen über mögliche Interaktionen (vgl. Abb. 5.2) könnten die bisher hier vornehmlich anhand der Literatur abgeleiteten

hypothetischen Überlegungen eingehender erforscht werden. Die sich dabei anbietenden Möglichkeiten des verwendeten *in vitro* Enterozyten-Modells wurden bereits im Zusammenhang mit den jeweiligen Befunden ausführlich diskutiert.

Des Weiteren sollte im nächsten Schritt eine Überprüfung der erhobenen Zusammenhänge *in vivo* angeschlossen werden, um potentielle Effekte im Gewebeverband zu beurteilen. Dazu würde sich als eine Option die Untersuchung von humanen Darmbiopsaten anbieten. Diese könnten umgehend nach der Probengewinnung mit den hier verwendeten Pharmaka im Sinne einer primären Zellkultur inkubiert werden, bevor auch sie den dargelegten Methoden zur weiteren Untersuchung zugeführt werden. Um darüber hinaus die komplexeren Vorgänge innerhalb des Organismus abzubilden, wären alternativ auch Betrachtungen am Modelltier geeignet. Unter Verwendung eines Maus-Modells mit spontaner gastrointestinaler Tumorgenese ließen sich etwa unmittelbare Konsequenzen einer oralen Applikation von Orlistat (ähnlich Dowling et al. 2009) auf die ACSL5 beobachten. Zudem könnten in solch einem Fall die bestehenden Verhältnisse in Bereichen normaler Darmmukosa mit dysplastisch bzw. neoplastisch veränderten Arealen verglichen werden, um weitere Rückschlüsse auf die funktionelle Einbettung von ACSL5 im Darmtrakt ziehen zu können.

Erst allmählich wird die elementare Bedeutung der enterozytären ACSL5 in diesem Zusammenhang deutlich, aber die hier aufgeführten anfänglichen Ausarbeitungen demonstrieren bereits jetzt das Potential dieses Enzyms und seiner Effekte. Eine Intensivierung dieser Erkenntnisse könnte irgendwann ggf. die Möglichkeit bieten, Lipid-assoziierte Erkrankungen des gastrointestinalen Systems effektiver therapieren zu können. Bis es aber soweit ist, müssen zunächst noch viele offene Fragen beantwortet werden.

## 6. Zusammenfassung

Innerhalb der letzten Jahrzehnte stieg der Anteil der Lipide in der westlichen Ernährung deutlich an. Im Hinblick darauf wird auch eine zunehmende Auseinandersetzung mit solchen Erkrankungen, die nachweislich mit diesem Phänomen in Zusammenhang stehen, immer bedeutender. Insbesondere die steigenden Inzidenzen der gastrointestinalen Pathologien wie das kolorektale Karzinom oder die inflammatorischen Darmerkrankungen scheinen hierbei funktionell wesentlich mit den Veränderungen hinsichtlich der Fettsäureaufnahme verknüpft zu sein. Der Darm ist das zentrale Organ innerhalb der Lipidresorption und dementsprechend wichtig ist das Verständnis der am Metabolismus dieser Nährstoffe beteiligten Prozesse. Damit die aufgenommenen langkettigen Fettsäuren für die Zelle zugänglich werden, müssen diese zunächst zu Acyl-CoA Thioestern aktiviert werden. Diese Reaktion wiederum wird von einer Gruppe Enzyme katalysiert, die als sog. langkettige Acyl-CoA Synthetasen (ACSLs) bezeichnet werden. Bis heute sind bei Mensch und Nagetier fünf verschiedene Isoformen der ACSL beschrieben worden, von denen wiederum die ACSL5 die intestinale Mukosa dominiert und eine einzigartige Lokalisation im Bereich der äußeren Mitochondrienmembran aufweist. Innerhalb des Enterozyten existieren zudem Hinweise darüber, dass das Enzym an Vorgängen der Zellreifung ebenso wie am Zellüberleben beteiligt ist, indem es die Apoptosesuszeptibilität zu erhöhen scheint. Dennoch ist die Datenlage bezüglich der intestinalen ACSL5 immer noch äußerst spärlich.

Deshalb war das wesentliche Ziel der hier vorliegenden Untersuchungen die Charakterisierung der ACSL5 im menschlichen Verdauungstrakt. Mithilfe eines *in vitro* Zellkulturmodells sollten dabei weitere Informationen über die Rolle der ACSL5 im enterozytären Lipidmetabolismus und mögliche Interaktionen mit anderen funktionellen Signalwegen gewonnen werden. Dazu wurde der Lipidmetabolismus an verschiedenen Positionen inhibiert: Orlistat blockierte die endogene Fettsäure-Synthese während Etomoxir den Fettsäure-Transport in das Mitochondrium als Ort der Beta-Oxidation verhinderte. Nach der Behandlung wurde die zelluläre ACSL5 anhand verschiedener Methoden wie qRT-PCR, Western blot und ACSL Enzymaktivitätsassay analysiert. ACSL5 war sowohl auf mRNA-, wie auch auf Proteinebene hochreguliert. Zudem war auch eine Zunahme der enzymatischen Aktivität zu verzeichnen. Ferner enthüllten molekulargenetische Untersuchungen mögliche ACSL5 abhängig regulierte Gene, etwa die Freie-Fettsäure-Rezeptoren 2 und 3 (FFAR2 und 3) oder Mortalin (HSPA9), einem Vertreter der sog. Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) Familie. Diese Daten ließen einerseits eine

vornehmlich katabole Funktion der ACSL5 innerhalb des Enterozyten vermuten. Andererseits verwies die Assoziation mit dem mitochondrialen Mortalin auf eventuellen Zellstress, hervorgerufen durch ACSL5-Aktivität. Betrachtet man eine mögliche funktionelle Verbindung zwischen ACSL5 und der Apoptose, so ging eine Hochregulation proapoptotischer Gene wie Caspase 8 oder Bid nach Zellbehandlung hervor. Diese Ergebnisse zeigten, dass eine ACSL5 Induktion möglicherweise die Zellreaktion in Richtung Apoptose stimuliert. Mikroskopische Beobachtungen unterstützten diese Annahme insofern, dass hohe Dosen von Orlistat zu einer Störung des Zellwachstums führten. Die Transmissionselektronenmikroskopie konnte jedoch keine ACSL5 bedingten Alterationen nachweisen.

Zusammenfassend legen diese experimentellen Daten eine wesentlich komplexere Rolle der enterozytären ACSL5 nahe, als man bisher vermutete. Die ACSL5 ist mutmaßlich nicht bloß das zentrale Enzym innerhalb des Lipidmetabolismus, sondern scheint vielmehr in einer Vielzahl anderer funktioneller Signalwege eingebettet zu sein, die wiederum die Zellhomöostase beeinflussen. Erste Hinweise belegen dabei einen putativen Einfluss auf die Apoptosekaskade und andere ACSL5 abhängig regulierte Moleküle.

## **7. Summary**

The amounts of lipids within the western style diet have increased massively within the last decades. Considering this fact, it has become more and more relevant to deal with such diseases that are demonstrably associated with the phenomenon. In particular, the increasing incidences of gastrointestinal pathogeneses such as colorectal cancer or the chronic inflammatory bowel diseases seem to be functionally linked to the altered fatty acid uptake. The intestine is the central organ of the lipid resorption and therefore it is essential to understand the mechanisms involved within the metabolism of these nutrients. Here, the initial step is the activation of the long chain fatty acids to acyl-CoA thioester. This reaction is catalyzed by a group of enzymes called the long chain acyl-CoA synthetases (ACSLs). Today there are five different isoforms of ACSL described within the human and rodent organism of which the ACSL5 dominates the intestinal mucosa and has unique localization on the outer mitochondrial membrane. Within the enterocyte, there also exists some evidence that this enzyme is involved in the regulation of the cell's maturation as well as survival by sensitizing it to apoptosis. But after all, the available information about the intestinal ACSL5 is still meager.

Thus, the principle goal of the current studies was the characterization of the ACSL5 within the human digestive tract. By using an *in vitro* model based on cell culture experiments it was supposed to gain further information about the ACSL5's position in the enterocytic lipid metabolism and the putative interactions with other functional signal pathways. The lipid metabolism was inhibited at different positions: Orlistat blocked the endogenous fatty acid synthesis while Etomoxir stopped the fatty acid transport into the mitochondrion as compartment of the beta-oxidation. After treatment the cells' ACSL5 was examined by several methods including qRT-PCR, Western blotting and enzyme activity assay. ACSL5 was up regulated on the mRNA- as well as the proteomic level. Furthermore the enzymatic activity increases, too. Beyond this, molecular genetic examinations reveal possible ACSL5 dependent regulated genes like the free-fatty acid-receptors 2 and 3 (FFAR2 and 3) or Mortalin (HSPA9), a member of the so-called heat shock protein 70 (Hsp70) family. This supposes on the one hand a predominant catabolic function of ACSL5 within the enterocyte. On the other hand the association with the mitochondrial Mortalin demonstrates a potential clue to cellular stress caused by ACSL5 activity. Regarding putative functional connections between ACSL5 and apoptosis, it came out that proapoptotic genes such as Caspase 8 and Bid were also increased under treatment. These results show that ACSL5's induction might stimulates the cell towards apoptosis. Microscopical observation supported this presumption: High



levels of Orlistat led to a disruption in cell growth. Transmission electron microscopy however could not show an ACSL5 associated alteration.

In summary, these experimental data evidence a much more complex role of the enterocytic ACSL5 than expected. It is not just the key player within the lipid metabolism, but also seems to be involved in other functional pathways which regulate the cell's homeostasis. First hints show a putative influence on the apoptosis and other ACSL5-related regulated molecules.

## **8. Literaturverzeichnis**

Achouri Y, Hegarty BD, Allanic D, Bécard D, Hainault I, Ferré P, Fougère F (2005) Long chain fatty acyl-CoA synthetase 5 expression is induced by insulin and glucose: involvement of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Biochimie*. 87: 1149-1155.

Agellon LB, Toth MJ, Thomson AB (2002) Intracellular lipid binding proteins of the small intestine. *Mol Cell Biochem*. 239: 79-82.

Ahlman H, Nilsson O (2001) The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol* 12: S63-68.

Amre DK, D'Souza S, Morgan K, Seidman G, Lambrette P, Grimard G, Israel D, Mack D, Ghadirian P, Deslandres C, Chotard V, Budai B, Law L, Levy E, Seidman EG (2007) Imbalances in dietary consumption of fatty acids, vegetables, and fruits are associated with risk for Crohn's disease in children. *Am J Gastroenterol*. 102: 2016-2025.

Asturias FJ, Chadick JZ, Cheung IK, Stark H, Witkowski A, Joshi AK, Smith S (2005) Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase. *Nat Struct Mol Biol*. 12: 225-232.

Bandyopadhyay S, Zhan R, Wang Y, Pai SK, Hirota S, Hosobe S, Takano Y, Saito K, Furuta E, Iizumi M, Mohanta S, Watabe M, Chalfant C, Watabe K (2006) Mechanism of apoptosis induced by the inhibition of fatty acid synthase in breast cancer cells. *Cancer Res*. 66: 5934-5940.

Black PN, DiRusso CC (1994) Molecular and biochemical analyses of fatty acid transport, metabolism, and gene regulation in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1210: 123-145.

Black PN, Faergeman NJ, DiRusso CC (2000) Long-chain acyl-CoA-dependent regulation of gene expression in bacteria, yeast and mammals. *J Nutr*. 130: 305S-309S.

Briscoe CP, Tadayon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR Jr, Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem*. 278: 11303-11311.

Brown AJ, Goldsworthy SM, Barnes AA, Eilert MM, Tcheang L, Daniels D, Muir AI, Wigglesworth MJ, Kinghorn I, Fraser NJ, Pike NB, Strum JC, Steplewski KM, Murdock PR, Holder JC, Marshall FH, Szekeres PG, Wilson S, Ignar DM, Foord SM, Wise A, Dowell SJ (2003) The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J Biol Chem*. 2003 278: 11312-11319.

Bu SY and Mashek DG (2010) Hepatic long-chain acyl-CoA synthetase 5 mediates fatty acid channeling between anabolic and catabolic pathways. *J Lipid Res*. 51: 3270-3280.

Burkitt DP (1978) Colonic-rectal cancer: fiber and other dietary factors. *Am J Clin Nutr*. 31: S58-S64.

Catalá-Rabasa A, Ndagire D, Sabio JM, Fedetz M, Matesanz F, Alcina A (2011) High ACSL5 transcript levels associate with systemic lupus erythematosus and apoptosis in Jurkat T lymphocytes and peripheral blood cells. *PLoS One*. 6: e28591.

Caviglia JM, Li LO, Wang S, DiRusso CC, Coleman RA, Lewin TM (2004) Rat long chain acyl-CoA synthetase 5, but not 1, 2, 3, or 4, complements *Escherichia coli* fadD. *J Biol Chem*. 279: 11163-1169.

Chang YS, Tsai CT, Huangfu CA, Huang WY, Lei HY, Lin CF, Su IJ, Chang WT, Wu PH, Chen YT, Hung JH, Young KC, Lai MD (2011) ACSL3 and GSK-3 $\beta$  are essential for lipid upregulation induced by endoplasmic reticulum stress in liver cells. *J Cell Biochem*. 112: 881-893.

Chirala SS and Wakil SJ (2004) Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. 39:1045-1053.

Chiu HC, Kovacs A, Ford DA, Hsu FF, Garcia R, Herrero P, Saffitz JE, Schaffer JE (2001) A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 107: 813-822.

Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.

Coleman RA, Lewin TM, Van Horn CG, Gonzalez-Baró MR (2002) Do long-chain acyl-CoA synthetases regulate fatty acid entry into synthetic versus degradative pathways? *J Nutr*. 132: 2123-2126.

Czarnecka AM, Campanella C, Zummo G, Cappello F (2006) Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics. *Cancer Biol Ther*. 5: 714-720.

Daniel H (2004) Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66:361-384.

Deocaris CC, Kaul SC, Wadhwa R (2006) On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones*. 11: 116-128.

Domanico SZ, DeNagel DC, Dahlseid JN, Green JM, Pierce SK (1993) Cloning of the gene encoding peptide-binding protein 74 shows that it is a new member of the heat shock protein 70 family. *Mol Cell Biol*. 13: 3598-3610.

Dowling S, Cox J, Cenedella RJ (2009) Inhibition of fatty acid synthase by Orlistat accelerates gastric tumor cell apoptosis in culture and increases survival rates in gastric tumor bearing mice in vivo. *Lipids*. 44: 489-498.

Dreckhahn D und Zenker W: "Benninghoff Anatomie – Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen". Band 1. 15. Auflage. Urban & Schwarzenberg Verlag, München, 1994

Drent ML, van der Veen EA (1995) First clinical studies with orlistat: a short review. *Obes Res*.3: 623S-625S

Dundas SR, Lawrie LC, Rooney PH, Murray GI (2005) Mortalin is over-expressed by colorectal adenocarcinomas and correlates with poor survival. *J Pathol*. 205: 74-81.

- Edfalk S, Steneberg P, Edlund H (2008) Gpr40 is expressed in enteroendocrine cells and mediates free fatty acid stimulation of incretin secretion. *Diabetes* 57: 2280-2287.
- Erlandsen SL, Parsons JA, Taylor TD (1974) Ultrastructural immunocytochemical localization of lysozyme in the Paneth cells of man. *J Histochem Cytochem.* 22: 401-413.
- Faergeman NJ, Knudsen J (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem J.* 323:1-12.
- Fogh J and Trempe G (1975) New human tumor cell lines. In: Fogh J (ed.) *Human Tumor Cells in Vitro.* New York (Plenum Publishing Corp.): 115-141.
- Fredriksson R, Höglund PJ, Gloriam DE, Lagerström MC, Schiöth HB. (2003) Seven evolutionarily conserved human rhodopsin G protein-coupled receptors lacking close relatives. *FEBS Lett.* 554: 381-388.
- Fujimoto Y, Itabe H, Kinoshita T, Homma KJ, Onoduka J, Mori M, Yamaguchi S, Makita M, Higashi Y, Yamashita A, Takano T (2008) Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *J Lipid Res.* 48: 1280-1292.
- Gaisa NT, Köster J, Reinartz A, Ertmer K, Ehling J, Raupach K, Perez-Bouza A, Knüchel R, Gassler N (2008) Expression of acyl-CoA synthetase 5 in human epidermis. *Histol Histopathol.* 23: 451-458.
- Galindo MM, Voigt N, Stein J, van Lengerich J, Raguse JD, Hofmann T, Meyerhof W, Behrens M (2012) G protein-coupled receptors in human fat taste perception. *Chem Senses.* 37: 123-139.
- Gargiulo CE, Stuhlsatz-Krouper SM, Schaffer JE (1999) Localization of adipocyte long-chain fatty acyl-CoA synthetase at the plasma membrane. *J Lipid Res.* 40: 881-892.
- Gargouri Y, Moreau H, Verger R (1989) Gastric lipases: biochemical and physiological studies. *Biochim Biophys Acta* 1006: 255-271.
- Gassler N, Herr I, Schneider A, Penzel R, Langbein L, Schirmacher P, Kopitz J (2005) Impaired expression of acyl-CoA synthetase 5 in sporadic colorectal adenocarcinomas. *J Pathol.* 207: 295-300.
- Gassler N, Roth W, Funke B, Schneider A, Herzog F, Tischendorf JJ, Grund K, Penzel R, Bravo IG, Mariadason J, Ehemann V, Sykora J, Haas TL, Walczak H, Ganten T, Zentgraf H, Erb P, Alonso A, Autschbach F, Schirmacher P, Knüchel R, Kopitz J (2007) Regulation of enterocyte apoptosis by acyl-CoA synthetase 5 splicing. *Gastroenterology* 133: 587-598.
- Gassler N, Schneider A, Kopitz J, Schnölzer M, Obermüller N, Kartenbeck J, Otto HF, Autschbach F (2003) Impaired expression of acyl-CoA-synthetase 5 in epithelial tumors of the small intestine. *Hum Pathol* 34:1048-1052.
- Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrügger RW, Brummer RJ. (2000) Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 95: 1008-1013.
- Giordano A, Calvani M, Petillo O, Grippo P, Tuccillo F, Melone MA, Bonelli P, Calarco A, Peluso G (2005) tBid induces alterations of mitochondrial fatty acid oxidation flux by malonyl-CoA-independent inhibition of carnitine palmitoyltransferase-1. *Cell Death Differ.* 12: 603-613.

- Giovannucci E, Willett WC (1994) Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med.* 26: 443-452.
- Gotoh C, Hong YH, Iga T, Hishikawa D, Suzuki Y, Song SH, Choi KC, Adachi T, Hirasawa A, Tsujimoto G, Sasaki S, Roh SG (2007) The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun.* 354: 591-597.
- Grimaldi PA (2007) Peroxisome proliferator-activated receptors as sensors of fatty acids and derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 64: 2459-2464.
- Hamosh M, Scow RO (1973) Lingual lipase and its role in the digestion of dietary lipid. *J Clin Invest.* 52: 88-95.
- Hart AR, Luben R, Olsen A, Tjønneland A, Linseisen J, Nagel G, Berglund G, Lindgren S, Grip O, Key T, Appleby P, Bergmann MM, Boeing H, Hallmans G, Danielsson A, Palmqvist R, Sjödin H, Hagglund G, Overvad K, Palli D, Masala G, Riboli E, Kennedy H, Welch A, Khaw KT, Day N, Bingham S. (2008) Diet in the aetiology of ulcerative colitis: a European prospective cohort study. *Digestion* 77: 57-64.
- Hauptman JB, Jeunet FS, Hartmann D (1992) Initial studies in humans with the novel gastrointestinal lipase inhibitor Ro 18-0647 (tetrahydrolipstatin). *Am J Clin Nutr.* 55: 309S-313S.
- Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96: 736-749
- Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med.* 11: 90-94
- Itoh Y, Kawamata Y, Harada M, Kobayashi M, Fujii R, Fukusumi S, Ogi K, Hosoya M, Tanaka Y, Uejima H, Tanaka H, Maruyama M, Satoh R, Okubo S, Kizawa H, Komatsu H, Matsumura F, Noguchi Y, Shinohara T, Hinuma S, Fujisawa Y, Fujino M (2003) Free fatty acids regulate insulin secretion from pancreatic beta cells through GPR40. *Nature.* 422: 173-176.
- Kaemmerer E, Peuscher A, Reinartz A, Liedtke C, Weiskirchen R, Kopitz J, Gassler N (2011) Human intestinal acyl-CoA synthetase 5 is sensitive to the inhibitor triacsin C. *World J Gastroenterol.* 17: 4883-4889.
- Kaemmerer E, Plum P, Klaus C, Weiskirchen R, Liedtke C, Adolf M, Schippers A, Wagner N, Reinartz A, Gassler N (2010) Fatty acid binding receptors in intestinal physiology and pathophysiology. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 15: 147-153.
- Kang MJ, Fujino T, Sasano H, Minekura H, Yabuki N, Nagura H, Iijima H, Yamamoto TT (1997) A novel arachidonate-preferring acyl-CoA synthetase is present in steroidogenic cells of the rat adrenal, ovary, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 2880-2884.
- Kantari C and Walczak H (2011) Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1813: 558-563.
- Karaki S, Mitsui R, Hayashi H, Kato I, Sugiyama H, Iwanaga T, Furness JB, Kuwahara A (2006) Short-chain fatty acid receptor, GPR43, is expressed by enteroendocrine cells and mucosal mast cells in rat intestine. *Cell Tissue Res.* 324:353-360.
- Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R (2007) Three faces of mortalin: a housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol.* 42: 263-274.

- Kee HJ, Koh JT, Yang SY, Lee ZH, Baik YH, Kim KK (2003) A novel murine long-chain acyl-CoA synthetase expressed in brain participates in neuronal cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* 305: 925-933.
- Kerner J and Hoppel C. (2000) Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1486: 1-17.
- Keshav S. (2006) Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukoc Biol.* 80: 500-508
- Kim HC, Lee SW, Cho YY, Lim JM, Ryoo ZY, Lee EJ (2009) RNA interference of long-chain acyl-CoA synthetase 6 suppresses the neurite outgrowth of mouse neuroblastoma NB41A3 cells. *Mol Med Report.* 2: 669-674.
- Kim JH, Lewin TM, Coleman RA (2001) Expression and characterization of recombinant rat Acyl-CoA synthetases 1, 4, and 5. Selective inhibition by triacsin C and thiazolidinediones. *J Biol Chem.* 276:24667-24673.
- Kim YS, Ho SB (2010) Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 319–330
- Knowles LM, Yang C, Osterman A, Smith JW (2008) Inhibition of fatty-acid synthase induces caspase-8-mediated tumor cell apoptosis by up-regulating DDIT4. *J Biol Chem.* 283: 31378-31384.
- Knowles LM, Axelrod F, Browne CD, Smith JW (2004) A fatty acid synthase blockade induces tumor cell-cycle arrest by down-regulating Skp2. *J Biol Chem* 279: 30540-30545.
- Kridel SJ, Axelrod F, Rozenkrantz N, Smith JW (2004) Orlistat is a novel inhibitor of fatty acid synthase with antitumor activity. *Cancer Res.* 64: 2070-2075.
- Langhans W, Leitner C, Arnold M (2011) Dietary fat sensing via fatty acid oxidation in enterocytes: possible role in the control of eating. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R554-565.
- Levin MS, Talkad VD, Gordon JI, Stenson WF (1992) Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells. *J Lipid Res.* 33: 9-19.
- Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA (2001) Acyl-CoA synthetase isoforms 1, 4, and 5 are present in different subcellular membranes in rat liver and can be inhibited independently. *J Biol Chem.* 276: 24674-24679.
- Li LO, Mashek DG, An J, Doughman SD, Newgard CB, Coleman RA (2006) Overexpression of rat long chain acyl-coa synthetase 1 alters fatty acid metabolism in rat primary hepatocytes. *J Biol Chem.* 281: 37246-37255.
- Li Q, Yamamoto N, Morisawa S, Inoue A (1993) Fatty acyl-CoA binding activity of the nuclear thyroid hormone receptor. *J Cell Biochem.* 51: 458-464.
- Lin HC, Lee TK, Tsai CC, Lai IR, Lu KS (2012) Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation.* 93: 265-271.
- Liou AP, Lu X, Sei Y, Zhao X, Pechhold S, Carrero RJ, Raybould HE, Wank S (2011) The G-protein-coupled receptor GPR40 directly mediates long-chain fatty acid-induced secretion of cholecystokinin. *Gastroenterology.* 140: 903-912.
- Liu Z, Brooks RS, Ciappio ED, Kim SJ, Crott JW, Bennett G, Greenberg AS, Mason JB (2011) Diet-induced obesity elevates colonic TNF- $\alpha$  in mice and is accompanied

- by an activation of Wnt signaling: a mechanism for obesity-associated colorectal cancer. *J Nutr Biochem*. 2011 Dec 29. [Epub ahead of print]
- Lofrumento DD, La Piana G, Abbrescia DI, Palmitessa V, La Pesa V, Marzulli D, Lofrumento NE (2011) Valinomycin induced energy-dependent mitochondrial swelling, cytochrome c release, cytosolic NADH/cytochrome c oxidation and apoptosis. *Apoptosis*. 16: 1004-1013.
- Lüllmann-Rauch R.: "Histologie. Verstehen – Lernen – Nachschlagen". 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
- Maier T, Jenni S, Ban N. (2006) Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution. *Science*. 311: 1258-1262.
- Mansbach CM and Gorelick F (2007) Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. II. Dietary lipid absorption, complex lipid synthesis, and the intracellular packaging and secretion of chylomicrons. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 293: G645-G650.
- Mansbach CM and Nevin P (1998) Intracellular movement of triacylglycerols in the intestine. *J Lipid Res*. 39: 963-968.
- Marsh MN, Peters TJ, Brown AC (1971) Observations of isolated enterocytes and of their subcellular components using transmission and scanning electron microscopy. *Gut* 12: 499-508.
- Mashek DG, Bornfeldt KE, Coleman RA, Berger J, Bernlohr DA, Black P, DiRusso CC, Farber SA, Guo W, Hashimoto N, Khodiyar V, Kuypers FA, Maltais LJ, Nebert DW, Renieri A, Schaffer JE, Stahl A, Watkins PA, Vasiliou V, Yamamoto TT (2004) Revised nomenclature for the mammalian long-chain acyl-CoA synthetase gene family. *J Lipid Res*. 45: 1958-1961.
- Mashek DG, Li LO, Coleman RA (2006a) Rat long-chain acyl-CoA synthetase mRNA, protein, and activity vary in tissue distribution and in response to diet. *J Lipid Res*. 47: 2004-2010.
- Mashek DG, McKenzie MA, Van Horn CG, Coleman RA (2006b) Rat long chain acyl-CoA synthetase 5 increases fatty acid uptake and partitioning to cellular triacylglycerol in McArdle-RH7777 cells. *J Biol Chem*. 281: 945-950.
- Mashima T, Sato S, Okabe S, Miyata S, Matsuura M, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H (2009a) Acyl-CoA synthetase as a cancer survival factor: its inhibition enhances the efficacy of etoposide. *Cancer Sci* 100: 1556-1562
- Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya H (2009b) Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*. 28:9-19.
- McGarry JD and Brown NF (1997) The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem*. 244: 1-14.
- McGarry JD, Sen A, Esser V, Woeltje KF, Weis B, Foster DW (1991) New insights into the mitochondrial carnitine palmitoyltransferase enzyme system. *Biochimie*. 73: 77-84.
- Merrill CL, Ni H, Yoon LW, Tirmenstein MA, Narayanan P, Benavides GR, Easton MJ, Creech DR, Hu CX, McFarland DC, Hahn LM, Thomas HC, Morgan KT (2002) Etomoxir-induced oxidative stress in HepG2 cells detected by differential gene expression is confirmed biochemically. *Toxicol Sci*. 68: 93-101.

- Morgan NG, Dhayal S (2009) G-protein coupled receptors mediating long chain fatty acid signalling in the pancreatic beta-cell. *Biochem Pharmacol.* 78: 1419-1427.
- Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan W, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM (2010) GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell.* 142: 687-698.
- Oikawa E, Iijima H, Suzuki T, Sasano H, Sato H, Kamataki A, Nagura H, Kang MJ, Fujino T, Suzuki H, Yamamoto TT (1998) A novel acyl-CoA synthetase, ACS5, expressed in intestinal epithelial cells and proliferating preadipocytes. *J Biochem.* 124: 679-685.
- Park SY, Kim JS, Seo YR, Sung MK (2011) Effects of diet-induced obesity on colitis-associated colon tumor formation in A/J mice. *Int J Obes (Lond).* 2011 Apr 19.
- Paumen MB, Ishida Y, Han H, Muramatsu M, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Honjo T (1997a) Direct interaction of the mitochondrial membrane protein carnitine palmitoyltransferase I with Bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 231: 523-525.
- Paumen MB, Ishida Y, Muramatsu M, Yamamoto M, Honjo T (1997b) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 272: 3324-3329.
- Pemble CW 4th, Johnson LC, Kridel SJ, Lowther WT (2007) Crystal structure of the thioesterase domain of human fatty acid synthase inhibited by Orlistat. *Nat Struct Mol Biol.* 14:704-709.
- Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Ruderman NB, Haemmerle G, Zechner R, Joly E, Madiraju SR, Poitout V, Prentki M (2009) Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 284: 16848-16859.
- Pinto M, Robineleon S, Appay MD, Kendinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simonassmann P, Haffen K, Gogh J, Zweibaum A (1985) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47: 323–330
- Ran Q, Wadhwa R, Kawai R, Kaul SC, Sifers RN, Bick RJ, Smith JR, Pereira-Smith OM (2000) Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem Biophys Res Commun.* 275: 174-179.
- Reinartz A, Ehling J, Leue A, Liedtke C, Schneider U, Kopitz J, Weiss T, Hellerbrand C, Weiskirchen R, Knüchel R, Gassler N (2010) Lipid-induced up-regulation of human acyl-CoA synthetase 5 promotes hepatocellular apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1801: 1025-1035
- Robertson MD, Parkes M, Warren BF, Ferguson DJ, Jackson KG, Jewell DP, Frayn KN (2003) Mobilisation of enterocyte fat stores by oral glucose in humans. *Gut.* 52: 834-839.
- Ros E (2000) Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis.* 151: 357-379.
- Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 68: 1035-1040.



- Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H; Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in Japan. (2005) Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm Bowel Dis.* 11: 154-163.
- Sandoval A, Fraisl P, Arias-Barrau E, Dirusso CC, Singer D, Sealls W, Black PN (2008) Fatty acid transport and activation and the expression patterns of genes involved in fatty acid trafficking. *Arch Biochem Biophys.* 477: 363-371.
- Setnik B and Nobrega JN (2004) Long-chain acyl-CoenzymeA synthetase-2 mRNA: increased cerebral cortex expression in an animal model of depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 28: 577-582.
- Shiau YF (1981) Mechanisms of intestinal fat absorption. *Am J Physiol.* 240: G1-G9.
- Sierra AY, Gratacós E, Carrasco P, Clotet J, Ureña J, Serra D, Asins G, Hegardt FG, Casals N (2008) CPT1c is localized in endoplasmic reticulum of neurons and has carnitine palmitoyltransferase activity. *J Biol Chem.* 283: 6878-6885.
- Simon-Assmann P, Turck N, Sidhoum-Jenny M, Gradwohl G, Kedinger M (2007) In vitro models of intestinal epithelial cell differentiation. *Cell Biol Toxicol* 23: 241-256
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M (2006) Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion.* 6: 118-125.
- Sleeman MW, Donegan NP, Heller-Harrison R, Lane WS, Czech MP (1998) Association of acyl-CoA synthetase-1 with GLUT4-containing vesicles. *J Biol Chem.* 273: 3132-3135.
- Soupene E and Kuypers FA (2006) Multiple erythroid isoforms of human long-chain acyl-CoA synthetases are produced by switch of the fatty acid gate domains. *BMC Molecular Biology* 2006, 7:21.
- Soupene E and Kuypers FA (2008) Mammalian long-chain acyl-CoA synthetases. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 507-521.
- Steinberg SJ, Morgenthaler J, Heinzer AK, Smith KD, Watkins PA (2000) Very long-chain acyl-CoA synthetases. Human "bubblegum" represents a new family of proteins capable of activating very long-chain fatty acids. *J Biol Chem.* 275: 35162-35169.
- Suzuki H, Kawarabayasi Y, Kondo J, Abe T, Nishikawa K, Kimura S, Hashimoto T, Yamamoto T (1990) Structure and regulation of rat long-chain acyl-CoA synthetase. *J Biol Chem.* 265: 8681-8685.
- Sawzdargo M, George SR, Nguyen T, Xu S, Kolakowski LF, O'Dowd BF (1997) A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1. *Biochem Biophys Res Commun.* 239: 543-547.

- Tazoe H, Otomo Y, Kaji I, Tanaka R, Karaki SI, Kuwahara A (2008) Roles of short-chain fatty acids receptors, GPR41 and GPR43 on colonic functions. *J Physiol Pharmacol* 59: 251-262
- Tazoe H, Otomo Y, Karaki S, Kato I, Fukami Y, Terasaki M, Kuwahara A (2009) Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomed Res.* 30: 149-156.
- Thupari JN, Pinn ML, Kuhajda FP (2001) Fatty acid synthase inhibition in human breast cancer cells leads to malonyl-CoA-induced inhibition of fatty acid oxidation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 285: 217-223.
- van Aalten DM, DiRusso CC, Knudsen J (2001) The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J.* 20: 2041-50.
- van Loo G, Saelens X, van Gorp M, MacFarlane M, Martin SJ, Vandenabeele P (2002) The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ.* 9: 1031-1042.
- Vinolo MA, Rodrigues HG, Nachbar RT, Curi R (2011) Regulation of inflammation by short chain Fatty acids. *Nutrients.* 3:858-876.
- Wadhwa R, Kaul SC, Mitsui Y, Sugimoto Y (1993) Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. *Exp Cell Res.* 207: 442-448.
- Wadhwa R, Taira K, Kaul SC (2002) An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where? *Cell Stress Chaperones.* 7: 309-316.
- Wadhwa R, Takano S, Robert M, Yoshida A, Nomura H, Reddel RR, Mitsui Y, Kaul SC (1998) Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem.* 273: 29586-29591.
- Wakil SJ (1989) Fatty acid synthase, a proficient multifunctional enzyme. *Biochemistry* 28: 4523-4530.
- Washington L, Cook GA, Mansbach CM 2<sup>nd</sup> (2004) Inhibition of carnitine palmitoyltransferase in the rat small intestine reduces export of triacylglycerol into the lymph. *J Lipid Res.* 44: 1395-1403.
- Watkins PA (2008) Very-long-chain acyl-CoA synthetases. *J Biol Chem.* 283: 1773-1777.
- Wolf G (1998) Fatty acids bind directly to and activate peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Nutr Rev.* 56: 61-63.
- Wynder EL, Shigematsu T (1967) Environmental factors of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 20: 1520-1561.
- Yamashita Y, Kumabe T, Cho YY, Watanabe M, Kawagishi J, Yoshimoto T, Fujino T, Kang MJ, Yamamoto TT (2000) Fatty acid induced glioma cell growth is mediated

by the acyl-CoA synthetase 5 gene located on chromosome 10q25.1-q25.2, a region frequently deleted in malignant gliomas. *Oncogene*. 19: 5919-5925.

Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH (2002) Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J*. 16: 155-168.

Zaibi MS, Stocker CJ, O'Dowd J, Davies A, Bellahcene M, Cawthorne MA, Brown AJ, Smith DM, Arch JR (2010) Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS Lett*. 584:2381-2386.

Zecchin KG, Rossato FA, Raposo HF, Melo DR, Alberici LC, Oliveira HC, Castilho RF, Coletta RD, Vercesi AE, Graner E (2011) Inhibition of fatty acid synthase in melanoma cells activates the intrinsic pathway of apoptosis. *Lab Invest*. 91: 232-40.

Zhou Y, Abidi P, Kim A, Chen W, Huang TT, Kraemer FB, Liu J (2007) Transcriptional activation of hepatic ACSL3 and ACSL5 by oncostatin m reduces hypertriglyceridemia through enhanced beta-oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 27: 2198-2205.

Zhu J, Lee B, Buhman KK, Cheng JX (2009) A dynamic, cytoplasmic triacylglycerol pool in enterocytes revealed by ex vivo and in vivo coherent anti-Stokes Raman scattering imaging. *J Lipid Res*. 50:1080-1089.

## **9. Abkürzungsverzeichnis**

Aqua (bi)dest.	Aqua (bi-)destilliert
Abb.	Abbildung
ACS	Acyl-CoA-Synthetase
ACSL	long-chain Acyl-CoA-Synthetase
BID	BH3 interacting domain death agonist
bp	Basenpaare
BSA	Kalbsserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
Casp. 8	Caspase 8
cDNA	Kopierte DNA
CPT1	Carnitin-Palmityl-Transferase 1
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMEM	Eagle's minimal essentielles Medium
et al.	und andere
FABP	Fettsäure-bindendes Protein
FATP4	Fettsäuretransportprotein-4
FAS	Fettsäure-Synthase

FFAR	Freie-Fettsäure-Rezeptor
FKS	fötales Kälberserum
FLIP	FLICE-ähnliches inhibitorisches Protein
GIP	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid
GLP1	Glucagon-like Peptide 1
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunden
hGAPDH	Humane Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
5-HT	5-Hydroxytryptamin
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation und Massenspektrometrie mit Flugzeitanalysator
max	maximal
min	Minuten
(m)l	(Mili-)Liter
(m)M	(mili)Molar
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
μ	Micro (entspricht 10 <sup>-6</sup> )
n	Nano (entspricht 10 <sup>-9</sup> )
nm	Nanometer
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PAA	Polyacrylamid
PYY	Peptit YY
qRT-PCR	quantitative RealTime PCR
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure

s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek.	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SREBP-1c	Sterol regulatory element-binding protein-1c
Tab.	Tabelle
TEM	Transemmissionselektronenmikroskopie
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TRAIL	Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand
TFF	trefoil factor Peptide
U	Units (Einheiten)
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

---

## **10. Publikationen**

### **10.1 Kongressbeiträge**

**Plum P**, Schneider U, Klaus C, Reinartz A, Gassler N.

Das Zellüberleben von Enterozyten nach substratabhängiger Induktion der Acyl-CoA-Synthetase 5 (ACSL5) (2010) 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie; Berlin, Deutschland

Gassler N, Ehling J, Simon V, Schneider U, Klaus C, Adolf M, Kaemmerer E, **Plum P**, Reinartz A

Expression des Chaperons fls485 in der Dünndarmschleimhaut (2010) 94. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie; Berlin, Deutschland

### **10.2 Journalbeiträge**

Reinartz A, **Plum P**, Kaemmerer E, Schneider U, Klaus C, Henkel C, Schnölzer M, Fiedler S, Wagner N, Kopitz J, Gassler N (2012) ACSL5-related increase of mortalin (HSPA9) levels in mitochondria of intestinal epithelia  
*(Manuskript in Vorbereitung)*

Kaemmerer E, Schneider U, Klaus C, **Plum P**, Reinartz A, Adolf M, Renner M, Wolfs TG, Kramer BW, Wagner N, Mollenhauer J, Gassler N (2012) Increased levels of deleted in malignant brain tumours 1 (DMBT1) in active bacteria-related appendicitis. Histopathology doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04159.x  
*(bisher nur online erschienen, noch kein Druck)*

Kaemmerer E, **Plum P**, Klaus C, Weiskirchen R, Liedtke C, Adolf M, Schippers A, Wagner N, Reinartz A, Gassler N (2010) Fatty acid binding receptors in intestinal physiology and pathophysiology. World J Gastrointest Pathophysiol. 1:147-153.

## Danksagungen

Zum Schluss dieser Ausführungen möchte ich mich noch ganz herzlich bei all denjenigen Personen bedanken, deren vielfältige Unterstützung maßgeblichen zum Erfolg dieser Dissertation beigetragen hat.

So gilt zunächst mein besonderer Dank *Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaus Gaßler* für seine außerordentlich engagierte Betreuung. Ich danke Ihnen für den Freiraum bei der Ausarbeitung der Ideen zu diesen Thema und der trotz der großen Hektik des Institutalltags immer bestehende Möglichkeit zur Diskussion der Sachverhalte. Ebenso dankbar bin ich für die konstruktive Kritik Ihrerseits sowie für die Unterstützung meiner Anfänge innerhalb der wissenschaftlichen Arbeitsweise.

Vielen Dank auch an *Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke* für diese Möglichkeit der Promotion in Ihrem Institut und den immer wieder erbaulichen Worten. Stets habe ich mich in der Pathologie des Universitätsklinikums Aachen sehr wohl gefühlt.

Ebenso ein herzliches Dankeschön an meine Kollegen *Ursula Schneider, Christina Klaus, Andrea Reinartz, Maximilian Adolf, und Kerstin Raupach* aus der Arbeitsgruppe „Gaßler“. Die durchweg angenehme Arbeitsatmosphäre und auch die gemeinsamen Aktivitäten außerhalb des Labors waren immer wieder sehr unterhaltsam. Ganz besonders muss ich an dieser Stelle nochmals *Christina Klaus* und *Ursula Schneider* danken: Eure zahlreichen Tipps und Kniffe hinsichtlich der praktischen Ausführungen der Labormethoden haben mir mehr als einmal weitergeholfen. Danke ebenso für die immerwährende Geduld bei meinen zahlreichen Fragen. Aber auch für die netten Gespräche abseits der Methodik und über die Zeit meiner praktischen Arbeiten hinaus gilt euch mein Dank.

Auch *Petra Akens* bin ich zum Dank verpflichtet für die organisatorische Hilfe bei der Beschaffung von Literatur über die Hochschulbibliothek der RWTH Aachen sowie für ihre Mühen beim Korrekturlesen der Arbeit.

Bei *Herrn Dr. rer. nat. J. Bornemann* möchte ich mich gleichfalls bedanken für die Aufbereitung der Proben, die gemeinsame Durchführung der TEM und die dabei zahlreich verstrichenen Stunden, genauso wie bei *Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Kopitz samt Mitarbeitern* aus dem pathologischen Institut der Universitätsklinik Heidelberg für die Durchführung des Enzymaktivitätsassay.



Ein generelles Dankeschön auch an alle verbleibenden Mitarbeiter aus Forschung und Routine der Pathologie des UK Aachens für die immer hilfsbereite und freundliche Unterstützung, die ich erfahren durfte.

Meinen Freunden, vor allem *Maria, Dirk, Marc* und *Michael* möchte ich ebenfalls danken dafür, dass sie mir immer wieder den Rücken gestärkt und mich so manches Mal auf andere Gedanken gebracht haben.

Zum Ende, aber nicht minder wichtig, möchte ich ein grundlegendes Wort *meinen Eltern* sowie meiner Schwester *Carina* widmen: Euch verdanke ich überhaupt erst die Möglichkeit meines Studiums und damit verbunden die Ausarbeitung dieser Dissertationsschrift. Ich danke euch von ganzem Herzen für die fortdauernde und bedingungslose Unterstützung. Vielen Dank für die Ermunterungen, wenn es Rückschläge gab und dafür, dass ihr immer für mich da ward.

*Herzlichen Dank für alles!*

---

## **Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten im **Institut für Pathologie** des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.