

3. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der zellulären Palmitataufnahme

Guthmann F, Hohoff C, Fechner H, Humbert P, Borchers T, Spener F, and Rüstow B. *Eur. J. Biochem.* 1998; 253:430-6.

Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F, and Rüstow B. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:L191-L196

Langkettige Fettsäuren (LCFA), insbesondere Palmitinsäure, sind wichtige Präkursoren der Phospholipidsynthese. Sie können grundsätzlich *de novo* in der Typ II Zelle synthetisiert oder aus dem Plasma aufgenommen werden. Die *de novo* Synthese der LCFA ist möglicherweise in der Foetalzeit von besonderer Bedeutung, da ihre Hemmung trotz Anwesenheit exogener Palmitinsäure zu einer Abnahme der Phosphatidylcholin-Biosynthese führt [100]. Andererseits konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, daß sich in Anwesenheit exogener Palmitinsäure die Synthese von Phosphatidylcholin erhöht [2;11]. Burkhardt und Mitarbeiter beobachteten selbst nach Erhöhung der *de novo* Palmitinsäure-Synthese durch Laktatzusatz eine Steigerung der Phosphatidylcholin-Synthese durch exogene Palmitinsäure [22]. Palmitinsäure, nicht aber Ölsäure im Zellkulturmedium, steigert die Synthese gesättigten Phosphatidylcholins in adulten [25] wie foetalen Typ II Zellen [2]. Wir folgerten aus den publizierten Daten und in Übereinstimmung mit Maniscalco und Mitarbeitern [85], daß für eine maximale Phospholipidsynthese in adulten Typ II Zellen exogenes Palmitat notwendig ist.

Seit es Hinweise auf eine sättigbare, proteinvermittelte Komponente der Fettsäure-Aufnahme gibt, wird diskutiert, wie LCFA die Zellmembran passieren (Übersicht in [1;55]). Maniscalco und Mitarbeiter waren die ersten, die für Typ II Zellen eine sättigbare Fettsäure-Aufnahme zeigen konnten und einen proteinvermittelten Fettsäure-Transport in die Typ II Zellen postulierten [86].

Wir charakterisierten

- den transmembranären Transport von Palmitat hinsichtlich seiner Kinetik und Energieabhängigkeit und zeigten, daß
- die Palmitataufnahme nicht über "coated pits", sondern über Caveolae-ähnliche Strukturen der Typ II Zellmembran vermittelt wird (s. Pkt. 3.2)

und untersuchten die regulatorische Bedeutung

- der Expression verschiedener cytosolischer fettsäurebindender Proteine in Typ II Zellen von Ratte und Maus sowie
- die Bedeutung von FAT/CD36 für den transmembranären Transport von Palmitinsäure für die Phospholipidsynthese in Typ II Zellen

Die Palmitinsäure-Aufnahme von Typ II Zellen ist sättigbar, proteinvermittelt und energieabhängig

Die Palmitinsäure-Aufnahme isolierter Typ II Zellen ist sättigbar und folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die max. Geschwindigkeit der Aufnahme beträgt ca. 60 pmol

pro Minute bei 500.000 Zellen. Dieser Wert entspricht dem publizierten V_{\max} für Typ II Zellen des Kaninchens [86]. Die Michaelis-Menten-Konstante liegt mit ca. 12 nM im physiologischen Bereich der Konzentration ungebundener Fettsäure in humanem Plasma [106].

Bromobiman, das mit Thiolgruppen membranständiger Proteine reagiert und nicht zellpermeabel ist sowie Phloretin, ein potenter unspezifischer Inhibitor membran-gebundener Transportproteine, verringerten die Palmitinsäure-Aufnahme drastisch. Die Verringerung der Temperatur auf 0 °C oder die Verarmung der Zellen an ATP senkten die Palmitinsäure-Aufnahme auf 7 bzw. 38 % des Kontrollansatzes. Zusammen sind dies deutliche Hinweise auf einen energieabhängigen, proteinvermittelten transmembranären Palmitinsäure-Transport in Typ II Zellen.

Die Palmitinsäure-Aufnahme von Typ II Zellen ist von der Bildung von "coated pits" unabhängig

Um die Beteiligung von "coated pits" und endocytotischen Vesikeln bei der Palmitinsäure-Aufnahme zu prüfen, depletierten wir die Zellen an Kalium oder inkubierten sie mit Nigericin oder Valinomycin, zwei potenten Kalium-Ionophoren. Die Palmitinsäure-Aufnahme war unter diesen Bedingungen nicht verändert und ist folglich unabhängig von der Bildung von "coated pits" oder endocytotischen Vesikeln.

Typ II Zellen der Ratte exprimieren E-FABP und H-FABP

Die Typ II Zelle ist durch einen besonders hohen Lipidstoffwechsel charakterisiert, der eine entsprechend hohe intrazelluläre Transportkapazität für LCFA voraussetzt. Wir untersuchten die Expression verschiedener FABPs in Typ II Zellen. Die publizierten Daten zum Vorkommen verschiedener FABP-Typen in Lunge war widersprüchlich [43;63;79;101;141]. Dies kann in den verschiedenen experimentellen Ansätzen und deren unterschiedlicher Nachweisgrenze und/oder den vielen verschiedenen Zelltypen der Lunge begründet sein. Wir versprachen uns mehr Klarheit beim Nachweis der FABP-Typen in isolierten Zellen und konzentrierten unsere Untersuchungen auf Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten [140;151].

Zunächst komplettierten wir die Untersuchungen zum Vorkommen verschiedener FABP-Isotypen in Lungengewebe. Auf der mRNA-Ebene bestätigten wir die Expression von H- und L-FABP; I-FABP wird in Rattenlunge nicht exprimiert. Darüber hinaus wiesen wir erstmals das 1993 identifizierte epidermale FABP in Lunge nach (E-FABP; [128]). Die Expression der verschiedenen FABP-Typen in Typ II Zellen, Alveolarmakrophagen und Lungenfibroblasten ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tab. 1 Expression von E- und H-FABP in Zellen der Lunge

		RT-PCR	Northern	Western	ELISA
E-FABP	Typ II Zelle	+	+	+	+++
	Makrophage	+	+	-	+
	Fibroblast	+	+	+	++
H-FABP	Typ II Zelle	-	-	+	+
	Makrophage	-	-	-	(+)
	Fibroblast	+	+	+	+++

Da wir in den untersuchten Zelltypen keine mRNA für L-FABP nachweisen konnten, müssen andere, hier nicht weiter untersuchte Zellen für die L-FABP-Expression in der Lunge verantwortlich sein.

E-FABP wird in allen untersuchten Zelltypen auf mRNA- und Proteinebene exprimiert. Wir gehen deshalb von einer basalen Funktion des E-FABP in der Lunge aus. Im Gegensatz hierzu wird H-FABP konsistent nur in Lungenfibroblasten exprimiert, in Typ II Zellen finden sich zwar geringe Mengen an Protein, aber keine mRNA für H-FABP. Selbst wenn die Möglichkeit der Kontamination von Typ II Zellen mit Lungenfibroblasten eingeräumt wird, erklärt dies nicht das negative Ergebnis der hochempfindlichen RT-PCR. Möglicherweise gelangt H-FABP (mit LCFA) von den eng benachbarten Fibroblasten in die Typ II Zellen. Dafür spricht der nachgewiesene, im Detail aber nicht verstandene Transfer von markierter Fettsäure vom Fibroblasten in die Typ II Zellen [140] und die Beteiligung von H-FABP bei Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung [17;23].

FAT/CD36 ist ein Palmitinsäure-Transporter in der Membran von Typ II Zellen

FABPs können die Fettsäure-Aufnahme stimulieren [92] und werden mit FAT/CD36 coexprimiert [143]. Wir haben aufgrund des E-FABP-Nachweises in Typ II Zellen FAT/CD36 als einen wahrscheinlichen Kandidaten für einen Fettsäure-Transporter in dieser Zelle angesehen. Mittels RT-PCR wurde die cDNA, die FAT/CD36 kodiert, amplifiziert und sequenziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz stimmt zu ca. 98 % mit der aus Adipozyten von Sprague-Dawley-Ratten erhaltenen Sequenz überein. Da von den neun abweichenden Aminosäuren acht mit der Sequenz der Maus, eine mit der humanen Sequenz von FAT/CD36 übereinstimmen, dürften die Unterschiede durch den unterschiedlichen Tierstamm zu erklären sein und keine strukturellen oder funktionellen Unterschiede verursachen. Die entsprechende mRNA wurde zur Bestätigung der PCR mittels "Northern Blotting" in Typ II Zellen nachgewiesen.

Um die Funktion der FAT/CD36 in der Palmitataufnahme gezielt zu beeinflussen, inkubierten wir Typ II Zellen mit Sulfo-N-succinimidyleat, einem spezifischen FAT/CD36-Inhibitor. Die initiale Palmitinsäure-Aufnahme wurde dosisabhängig bis auf ca. 25 % des Kontrollexperimentes gesenkt, der halbmaximale Effekt wurde bei weniger als 0,5 mM Sulfo-N-succinimidyleat erreicht. Der kombinierte inhibierende Effekt von Sulfo-N-succinimidyleat und Phloretin auf die Palmitinsäure-Aufnahme überstieg deutlich den

jeder Einzelsubstanz. Wir folgern, daß FAT/CD36 der wichtigste Palmitinsäure-Transporter der Typ II Zelle ist, über den bis zu 75 % der Palmitataufnahme realisiert werden. Daneben ist die Beteiligung eines oder mehrerer weiterer membranständiger Proteine an der Palmitinsäure-Aufnahme wahrscheinlich.

3.2 Regulation der FAT/CD36-vermittelten Palmitataufnahme und deren Einfluß auf die Surfactantlipid-Biosynthese

Guthmann F, Maehl P, Preiss J, Kollect I, and Rüstow B.

Cell. Mol. Life Sci. 2002; 59:1999-2003.

Kollect I, **Guthmann F**, Ladhoff AM, Tandon NN, Schlame M, and Rüstow B.

Biochemistry 2002; 41:6369-75.

Guthmann F, Schachtrup C, Tölle A, Spener F, and Rüstow B.

Biochim. Biophys. Acta 2004; *in press*.

Mindestens drei Möglichkeiten der Regulation einer proteinvermittelten Fettsäure-Aufnahme sind denkbar:

- veränderte subzelluläre Lokalisation des Fettsäure-Transporters (siehe 3.2.1)
- veränderte Expression des Fettsäure-Transporters (siehe 3.2.2)
- veränderte Aktivität des Proteins (siehe 3.2.3)

3.2.1 Die Umverteilung von FAT/CD36 in die Zellmembran erhöht die Palmitataufnahme in Typ II Zellen

Berger und Mitarbeiter beschrieben erstmals eine unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation von FAT/CD36 in humanen Thrombozyten [14]. Sie schätzten den α -Granula-assoziierten Anteil des FAT/CD36 in ruhenden Thrombozyten auf ca. 25 %, nach Aktivierung verteilte sich FAT/CD36 in das offene kanalikuläre System und in die Pseudopodien der Plasmamembran [14;90]. Auch an Lymphozyten wurde eine Veränderung der subzellulären Verteilung von FAT/CD36 gezeigt. Nach Stimulation der Lymphozyten mit Phytohämagglutinin fand sich eine rascher, transients Anstieg der FAT/CD36-Expression auf der Zelloberfläche ohne eine Zunahme der Proteinsynthese [137]. Ein Zusammenhang zwischen subzellulärer Lokalisation von FAT/CD36 und Geschwindigkeit der Fettsäure-Aufnahme wurde kürzlich von Bonen und Mitarbeitern hergestellt. In "giant vesicles", die aus Skelettmuskel-Membranen hergestellt wurden, steigerte Insulin den membranständigen Anteil des FAT/CD36 und beschleunigte die Fettsäure-Aufnahme in die Vesikel [16].

FAT/CD36 ist ein Caveolae-spezifisches Protein. Typ II Zellen exprimieren Caveolin-1, ultrastrukturelle Untersuchungen erbrachten jedoch keinen Hinweis auf die Existenz typischer Caveolae [95]. Strukturen, die als „detergent-insoluble glycolipid-enriched domains" (DIGs) isoliert werden, repräsentieren sehr wahrscheinlich Caveolae-ähnliche Membranstrukturen, ohne die für Caveolae typische Invagination der Plasmamembran aufzuweisen [58]. DIGs oder "rafts" sind, wie Caveolae, Cholesterin/Sphingomyelin angereicherte Membranstrukturen, die auf Grund ihrer physikochemischen Eigenschaften durch ein spezifisches Proteinemuster gekennzeichnet sind. Die Manipulation des zellulä-

ren Cholesterin- und/oder Sphingomyelin-Gehaltes verändert die Konzentration Caveolae-ähnlicher Membranstrukturen [52].

Durch die Erhöhung der Cholesterin-Konzentration in adhärenen Typ II Zellen (durch Inkubation mit Methyl- β -Cyclodextrin-Cholesterin-Komplexen [29]) um den Faktor 3, ließ sich die aus DIGs isolierte Cholesterinmenge verdoppeln. Mit anderen Worten, die Konzentration Caveolae-ähnlicher Strukturen hat sich in Typ II Zellen verdoppelt. Dadurch stieg die initiale Palmitataufnahme um den Faktor 5 (Tabelle 2) verbunden mit einer Erhöhung der Palmitatveresterung in Phospholipide.

Tab. 2: Effekt von Cyclodextrin auf die zelluläre Cholesterin-Konzentration und Palmitataufnahme von Typ II Zellen

	Cholesterin $\mu\text{g}/\text{mg}$ Protein		Palmitataufnahme pmol/mg Protein in 30 s
	Zelle	DIG	
Kontrolle	$32,4 \pm 4,7$	1468 ± 93	$10,0 \pm 0,2$
Cyclodextrin 5 mM	$101 \pm 15,4$	2901 ± 198	$48,0 \pm 3,6$

Welche Rolle FAT/CD36 bei der gesteigerten Palmitataufnahme spielt, wird mittels zweier weitere Experimente deutlich: Die Präinkubation der Typ II Zellen mit Sulfo-N-succinimidyloleat, einem spezifischen Inhibitor der FAT/CD36-vermittelten Fettsäure-Aufnahme, hemmt die Palmitataufnahme sowohl in Kontrollzellen als auch in mit Cholesterin angereicherten Zellen auf dasselbe Niveau. Die durch Cholesterin-anreicherung der Zellen gesteigerte Palmitataufnahme ist folglich ganz überwiegend FAT/CD36-vermittelt. Wir überprüften unsere Arbeitshypothese einer Translokation von FAT/CD36 mittels Immunoblot. Die Expression von FAT/CD36 und Caveolin-1 wurde in verschiedenen Kompartimenten der Typ II Zelle analysiert. Die Anreicherung der Zellen mit Cholesterin führt zu einer deutlichen Verschiebung von FAT/CD36 vom Cytosol in die Plasmamembran und hier insbesondere in die DIGs. Caveolin-1 war nur in DIGs nachweisbar, in mit Cholesterin angereicherten Zellen ebenfalls deutlicher als in den Kontrollzellen.

3.2.2 Pioglitazon steigert die Palmitataufnahme und Phospholipidsynthese in Typ II Zellen von knock out-Mäusen

Wir haben gezeigt, daß Typ II Zellen von Ratten und Mäusen verhältnismäßig viel E- und sehr wenig H-FABP enthalten. Im Unterschied zur Ratte konnte in Typ II Zellen der Maus auch die mRNA des H-FABP – wenn auch in sehr geringer Konzentration – reproduzierbar nachgewiesen werden. E- und H-FABP gehören zu der Familie der phylogenetisch verwandten intrazellulären lipidbindenden Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 15 kD. Bestimmte FABPs fördern die Aufnahme von LCFA in die Zelle [150]

und interagieren mit plasmamembrangebundenen Proteinen wie FAT/CD36 [41;131] oder löslichen Proteinen wie den verschiedenen Peroxisomen Proliferator aktivierenden Rezeptoren (PPARs) im Zellkern [148;149]. Fettsäuren gehören als FABP-Liganden und Agonisten der PPARs zu den Signalmolekülen und beeinflussen die Transkription von Genen [134;149]. Da FABPs also eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport der LCFA und bei der Signaltransduktion spielen, lag es nahe zu postulieren, daß E- und H-FABP für Regulation der Phospholipidsynthese in Typ II Zellen von Bedeutung sind.

Seit einiger Zeit existieren E-FABP- und H-FABP-knock out-Mäuse [15;99]. Im Institut für Biochemie der Friedrich-Wilhelm-Universität Münster wurden beide Stämme gekreuzt und Doppel-knock out-Mäuse (E-FABP $-/-$; H-FABP $-/-$) generiert. Wir nutzten dieses Modell, um die Bedeutung der FABPs für die Phospholipidsynthese und die Palmitataufnahme in Typ II Zellen abzuschätzen und suchten nach funktionellen Kompensationsmechanismen, die den Verlust beider FABPs im Lipidstoffwechsel ausgleichen könnten.

Phänotyp der E-/H-Doppel-knock out-Maus

Typ II Zellen der E-/H-Doppel-knock out-Maus zeigen eine signifikante Verringerung der initialen Palmitataufnahme. Die einmal aufgenommene Palmitinsäure kann für die β -Oxidation, den Einbau in Speicherlipide oder – von besonderer Bedeutung in der Typ II Zelle – zur Biosynthese von Surfactantlipiden genutzt werden. In Typ II Zellen von E/H-FABP-ko-Tieren fanden wir gegenüber Wildtyp einen drastisch verringerten Abbau der Palmitinsäure durch β -Oxidation und einen verminderten Einbau in Diacylglycerol, Triacylglycerol und Phospholipide. Im Gegensatz dazu war der Einbau markierter Palmitinsäure in DPPC nahezu unverändert. DPPC kann *de novo* (repräsentiert durch Einbau von Palmitinsäure in sn-1 Position am Glycerol) und durch Reacylierung (Einbau in sn-2 Position) synthetisiert werden. Eine detaillierte Analyse des DPPC ergab einen ungefähr um die Hälfte verminderten Palmitinsäure-Einbau in *de novo* synthetisiertes DPPC. In Übereinstimmung mit unserer Hypothese vermindert das Fehlen der beiden FABPs die *de novo* Synthese von DPPC.

Expression von Proteinen, die an Fettsäure-Transport und -Signaltransduktion beteiligt sind

Häufig sind Veränderungen des Phänotypes von knock out-Mäusen diskret. Dies mag an der veränderten Expression anderer Gene liegen, die die herbeigeführten Defekte teilweise oder ganz kompensieren. Wir haben hier ein Konzept geprüft, nach dem Fettsäuren von einem membrangebundenen Translokator (z. B. FAT/CD36, FABPpm) auf Caveolin-1 übertragen werden, das sich dann als Vesikel von der Plasmamembran löst und die Fettsäure durch das Cytosol transportiert [132]. Wir prüften, ob FAT/CD36 und/oder Caveolin-1 als Kompensationsmechanismen infrage kommen könnten. Tatsächlich wird in knock out-Mäusen deutlich mehr mRNA für FAT/CD36, das ca. 75 % der Palmitataufnahme in Typ II Zellen vermittelt, transkribiert. Die Expression von Caveolin-1, dem zweiten Glied in der von Stremmel et al. [132] vorgeschlagenen Kette des exogenen Fettsäure-Transportes steigt ebenfalls deutlich an. Im Gegensatz hierzu bleibt die Expression von FABPpm unverändert.

Kürzlich wurde gezeigt, daß bestimmte FABP-Typen mit spezifischen PPARs durch Protein-Protein-Kontakt interagieren [134;149]. Wir vermuteten deshalb, daß Caveolin-1 als ein Fettsäure-Transporter mit PPAR γ , dem wichtigsten Subtyp in Zellen mit anabolem Lipidmetabolismus [64], interagieren könnte. Mittels Immunopräzipitation konnten wir erstmals zeigen, daß Caveolin-1 mit PPAR γ wechselwirkt.

Von den von uns untersuchten Transkriptionsfaktoren waren PPAR α und RXR γ nicht nachweisbar, PPAR β war nur in Wildtyp-Mäusen vorhanden und RXR β zeigte praktisch keine Veränderung durch E-/H-FABP Genablation. Dagegen fanden wir für RXR α und PPAR γ_1 , aber nicht für PPAR γ_2 , eine deutliche Zunahme der Expression auf mRNA-Ebene bei knock out-Tieren.

Forcierte Kompensation des Palmitinsäure-Stoffwechsels durch Pioglitazon

Obwohl wir eine gesteigerte Expression der Gene, die an Fettsäure-Transport und Signaltransduktion beteiligt sind, nachweisen konnten, ist der Fettsäure-Stoffwechsel der Typ II Zelle offensichtlich nur teilweise kompensiert. Wir versuchten, die Kompensationsmechanismen durch Fütterung des PPAR γ -selektiven Pioglitazones zu forcieren. Anschließend überprüften wir wieder den Phänotyp der Typ II Zellen, die wir aus den Pioglitazon-gefütterten knock out-Mäusen isolierten.

In Übereinstimmung mit diesem Konzept beobachteten wir eine weiter gesteigerte Expression der mRNA für FAT/CD36 und PPAR γ , und für Caveolin-1 eine weitere Zunahme der Expression auf mRNA- und Proteinebene. Das bedeutet: Pioglitazon-stimulierte Aktivierung von PPAR verstärkt die endogen aktivierten Kompensationsmechanismen der durch knock out beider FABPs in Typ II Zellen eingetretenen Einschränkungen der Palmitinsäure-Verwertung; der Palmitinsäure-Metabolismus in Typ II Zellen der Pioglitazon-gefütterten H/E-FABP-ko-Mäuse gleicht sich dem der Wildtyp Mäusen nahezu vollständig an.

3.2.3 Die Ektoproteinkinase-vermittelte Phosphorylierung von FAT/CD36 hemmt die Palmitataufnahme in humanen Thrombozyten

Die Palmitataufnahme in Typ II Zellen wird zu etwa 70 % durch FAT/CD36 vermittelt. Wir haben gezeigt, daß sowohl die Translokation von FAT/CD36 zwischen Cytosol und DIGs als auch die PPAR γ -gesteuerte Expression von FAT/CD36 die Palmitataufnahme und Surfactantlipidsynthese regulieren können. Diese Mechanismen sind sehr wahrscheinlich Teil einer Langzeitregulation der Surfactantlipidsynthese. Auf der Suche nach einem physiologisch relevanten akuten Regulationsmechanismus der Palmitataufnahme hielten wir es für möglich, daß die Phosphorylierung von FAT/CD36 die Fettsäure-Aufnahme beeinflusst.

Die Phosphorylierung von FAT/CD36 und deren Einfluß auf die Thrombospondin- und Kollagenbindung von Thrombozyten wurde erstmals von Asch et al. beschrieben [5]. Später wurde von Hatmi et al. Ektoprotein Kinase A-Aktivität humaner Thrombozyten beschrieben. Als hauptsächliches Substrat der Ektophosphorylierung wurde FAT/CD36 identifiziert, ohne diesem Phänomen eine Funktion zuordnen zu können [61]. Extrazelluläres ATP und cAMP wurden von einer Reihe von Autoren nachgewiesen [61;105]. Man

geht heute davon aus, daß die extrazelluläre Nukleotidkonzentration durch ATP Diphosphohydrolasen (Apyrasen) reguliert wird, welche dadurch eine wichtige Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen einschließlich der Plättchenaggregation spielen [37;78;87].

Wir testeten die Hypothese, daß die cAMP-abhängige Ektophosphorylierung von FAT/CD36 die Palmitataufnahme beeinflusst wird. Für die Bearbeitung dieser Fragestellung entschieden wir uns für humane Thrombozyten, um zu zeigen, daß prinzipiell die in der Literatur beschriebene FAT/CD36 Phosphorylierung die FA-Aufnahme steuert, und weil wir annahmen, daß die bei der Isolierung von Typ II Zellen obligat eingesetzte Elastase membranständige, nach außen gerichtete Proteine ganz oder teilweise zerstören könnte.

Wir konnten die Phosphorylierung von FAT/CD36 in Anwesenheit von extrazellulärem γ -[32 P]ATP und cAMP nachweisen. Die Palmitataufnahme war unter Bedingungen der Ektophosphorylierung auf ca. 70 % der Kontrollzellen vermindert. Die gleichzeitige Inkubation mit dem extrazellulären Proteinkinase Inhibitor Peptid (PKI) verhinderte die Hemmung des Palmitat-Transportes. Der Effekt auf die Palmitataufnahme war nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase vollständig reversibel. Die alleinige Inkubation jeweils mit ATP, cAMP oder alkalischer Phosphatase hatte keine Wirkung auf die Palmitataufnahme. Interessanterweise war der hemmende Effekt auf die thrombozytäre Palmitataufnahme am deutlichsten bei einer extrazellulären ATP-Konzentration von 0,5 nM. Bei Erhöhung oder Erniedrigung der ATP-Konzentration außerhalb eines Bereiches von 10 pM bis 15 nM war die Wirkung auf die Palmitataufnahme nicht mehr signifikant. Wir vermuteten die Beteiligung des an Thrombozyten nachgewiesenen purinergen Rezeptors P2X1, dessen natürlicher Agonist ATP mit einer EC₅₀ von 0,6 μ M ist [83]. Es lag nahe, diese der Ektophosphorylierung offensichtlich entgegengesetzte Wirkung mittels Antagonisten des P2X1-Rezeptors aufzuheben. Die infrage kommenden Rezeptorantagonisten Suramin und NF279 weisen allerdings eine sehr starke Albuminbindung auf, die die für die Bestimmung der Palmitataufnahme benötigte Fettsäure verdrängte und die Messung erheblich verfälschte. Der Zusatz von β,γ -ATP (5 μ M), einem schwer abbaubaren ATP-Analog, hob die Hemmung der Palmitataufnahme im Phosphorylierungsexperiment vollständig auf, ohne selbst eine Wirkung auf die Palmitataufnahme zu haben. Darüber hinaus schließt dieses Experiment ein Artefakt durch ATP-Abbauprodukte aus.

3.3 Vitamin E-Depletion hemmt die Surfactantlipidsynthese

Guthmann F, Kolleck I, Schachtrup C, Schlame M, Spener F, and Rüstow B. *Free Radic. Biol. Med.* 2003; 34:663-73.

Vitamin E ist das wichtigste lipophile Antioxidanz des Säugtierorganismus. Es schützt vor oxidativem Stress, der durch extrazelluläre und intrazelluläre Sauerstoffradikale (ROS) verursacht wird [20]. ROS wiederum spielen eine wichtige Rolle bei der akuten und chronischen Schädigung der Lunge, die bei Frühgeborenen beobachtet wird [68;94]. Der protektive Effekt von Vitamin E bei oxidativem Stress und Entzündung ist gut dokumentiert [27;89]. Gegenwärtig ist nicht bekannt, ob ein vorübergehender Mangel an

Vitamin E für eine Schädigung der Lunge prädisponiert oder ob andere Antioxidantien genügend Schutz vor intrazellulären ROS bieten.

Verglichen mit Erwachsenen weisen Plasma und verschiedene Gewebe des Neugeborenen niedrigere Konzentrationen an Vitamin E auf. Im Plasma Frühgeborener wurden zum Zeitpunkt der Geburt sogar nur 15 % der Vitamin E-Konzentration von reifgeborenen Kindern gefunden. Innerhalb der ersten Lebenswoche wird der Unterschied noch größer, weil – im Gegensatz zu Reifgeborenen – die Vitamin E-Konzentration im Plasma Frühgeborener kaum zunimmt [24;38].

Die Korrelation von niedriger Vitamin E Konzentration im Gewebe Frühgeborener und dem bei diesen Kindern häufig beobachteten Surfactantmangel suggeriert einen kausalen Zusammenhang zwischen Vitamin E Mangel und verminderter Surfactant-Synthese. Nach Sichtung der Literatur scheinen drei Wirkmechanismen von Vitamin E - oder deren Fehlen bei Vitamin E Mangel - für eine Schädigung der Lunge zu prädisponieren:

Vitamin E

- ist an der Aufrechterhaltung des antioxidativen Potentials der Zelle beteiligt. Unphysiologisch hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies hemmen die Proteinsynthese,
- beeinflusst die zelluläre Signaltransduktion, indem es die Protein Kinase C hemmt [136],
- moduliert das Immunsystem [121] und beeinflusst die Apoptose [129].

Wir untersuchten den Einfluß von diätetischem Vitamin E-Mangel bei Ratten auf die *de novo* Synthese von Phosphatidylcholin und die Reacylierung von Lyso-Phosphatidylcholin. Wistar-Ratten erhielten über einen Zeitraum von 5 Wochen eine nahezu Vitamin E-freie Diät (<2 mg α -Tocopherol/kg Futter).

Die Vitamin E-Konzentration in Typ II Zellen sank drastisch, ohne die Konzentration typischer Parameter des Redox-Status wie Glutathion, oxidiertes Glutathion, Glutathion-Reduktase oder Malondialdehyd signifikant zu beeinflussen. Möglicherweise sind diese Parameter nicht geeignet, Veränderungen des Redox-Status in Membranen – hier findet sich Vitamin E in hoher Konzentration – widerzuspiegeln. Im Gegensatz zu den hydrophilen Parametern des Redoxstatus war das Verhältnis von Vitamin E zu Vitamin E-Quinon in Typ II Zellen von Vitamin E-depletierten Tieren erniedrigt. Das Verhältnis von Vitamin E zu Vitamin E-Quinon wurde als ein Indikator für oxidativen Stress in Erythrozyten und im Plasma Neugeborener beschrieben [69]. Wir vermuteten deshalb eine auf die Membran beschränkte Veränderung des Redox-Status nach Vitamin E Depletion. Die Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase ist in mikrosomalen Membranen lokalisiert und weist funktionelle SH-Gruppen auf. Gleichzeitig ist ihre Aktivität, neben der Aktivierung von Cholin, geschwindigkeitsbestimmend für die Phosphatidylcholin-Synthese. In Typ II Zellen Vitamin E-depletierter Tiere war sowohl ihre Aktivität als auch die Phosphatidylcholin-Synthese signifikant vermindert. Die Inkubation des Zelllysates mit Dithiothreitol oder die Fütterung der Tiere mit Vitamin E-angereicherter Nahrung erhöhte die Aktivität

der Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase und die Phosphatidylcholin-Synthese in etwa auf das Niveau der Kontrolltiere. Diese Experimente suggerieren, daß eine ausreichend hohe Vitamin E-Konzentration in Typ II Zellen die funktionalen SH-Gruppen der Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase vor Oxidation schützt. Vitamin E-Depletion vermindert die Phosphatidylcholin-Synthese in Typ II Zellen bevor die hydrophilen Parameter des Redoxstatus eine oxidative Belastung anzeigen.

Neben seinen antioxidativen Eigenschaften beeinflußt Vitamin E die Aktivität der Proteinkinase C. Tasinato und Mitarbeitern wiesen nach, daß Vitamin E unabhängig von seinen antioxidativen Eigenschaften die Proteinkinase C-Aktivität hemmen kann [136], und umgekehrt konnte in unserer Arbeitsgruppe erstmalig ein Anstieg der Proteinkinase C-Aktivität in Typ II Zellen durch Vitamin E-Depletion gezeigt werden [121]. Wir untersuchten den Einfluß der Proteinkinase C auf die Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase-Aktivität und auf den Einbau von Palmitinsäure in Phospholipide und Lezithin. Wie erwartet, verringerte sich der Anteil der aktivierten, membranständigen Proteinkinase C nach 16stündiger Inkubation der Typ II Zellen mit Phorbol ester etwa um den Faktor 30. Interessanterweise waren weder die Aktivität der Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase noch der Einbau von Palmitinsäure in Gesamtphospholipid oder Lezithin signifikant verändert. In einem anderen Ansatz inkubierten wir Typ II Zellen mit Chelerythrin, einem zellpermeablen Inhibitor der Proteinkinase C [62]. Chelerythrin verminderte die *de novo* Synthese von Lezithin, gemessen als Einbau von Glycerol-3-phosphat in Lezithin, drastisch. Dieses Ergebnis scheint im Widerspruch zu den mit Phorbol ester gewonnenen Daten zu stehen. Möglicherweise ist der deutliche Effekt von Chelerythrin nicht Proteinkinase C-vermittelt, sondern beruht auf seinen anderen Eigenschaften [80;81;133;153;154]. Unabhängig von dieser Detailfrage sprechen beide experimentellen Ansätze, Hemmung der Proteinkinase C durch Phorbol ester oder durch Chelerythrin, gegen eine Rolle der Proteinkinase C bei der Hemmung der Phospholipidsynthese durch Vitamin E-Depletion. Da Vitamin E-Depletion zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und zu einer Hemmung der *de novo* Synthese der Surfactant-Phospholipide führt, müßte die Hemmung der Proteinkinase C, wenn überhaupt, zu einer Steigerung der Phospholipidsynthese führen. Wir folgern deshalb, daß der hemmende Einfluß der Vitamin E-Depletion auf die Phospholipidsynthese durch eine Veränderung des Redox-Status in Membranen der Typ II Zelle und oxidativer Schädigung der Glycerol-3-phosphat O-acyltransferase vermittelt wird.

3.4 Bedeutung der Ergebnisse für die Induktion der Surfactant-Synthese

Wir haben mit unseren Untersuchungen zum besseren Verständnis der Regulation der Surfactantlipidsynthese beigetragen. Die Charakterisierung dieser Vorgänge ist die Grundlage weiterer Untersuchungen, die es ermöglichen sollen, unreifebedingten Surfactantmangel gezielter als bisher zu beeinflussen.

PPAR γ -Agonisten

Wir fanden, daß Pioglitazon in Typ II Zellen adulter H-/E-FABP-ablatierter Mäuse die Expression von FAT/CD36, PPAR γ und Caveolin-1 steigert. Unsere Daten zur Palmitinsäure-Aufnahme und Phosphatidylcholin-Synthese in Typ II Zellen und Daten aus der Literatur [132] lassen vermuten, daß diesen drei Proteinen eine wichtige Rolle bei der Aufnahme langkettiger Fettsäuren und deren Regulation zukommt. Wir prüfen, ob Pioglitazon diese Effekte auch an Wildtyp-Mäusen hat.

Erste Versuche zeigen, daß mittels PPAR γ -Agonisten die Expression von Caveolin, Leber-FABP und Surfactantproteinen und die Synthese von DPPC in adulten Typ II Zellen gesteigert werden kann. Wir untersuchen gegenwärtig, ob auch die foetale Surfactant-Synthese, gemessen an der Expression von Surfactantproteinen und Phospholipiden, durch PPAR γ -Agonisten stimuliert wird. Da Pioglitazon in Deutschland für Erwachsene zugelassen ist, eröffnet sich hier möglicherweise ein Weg, die antenatale, steroidinduzierte Lungenreifung zu verbessern oder auf Steroide ganz oder teilweise zu verzichten. Auch wenn unsere Ergebnisse zur antenatalen Lungenreifeinduktion mit PPAR γ -Agonisten noch vorläufig sind, hoffen wir, durch gezielte Beeinflussung der Surfactantlipidsynthese die mit dem Atemnotsyndrom assoziierte Morbidität senken zu können.

Vitamin E

Seit den 1970er Jahren wurden Ergebnisse aus der Grundlagenforschung und auch kleinere klinische Studien publiziert, die nahelegen, die Vitamin E-Supplementation sehr untergewichtiger Frühgeborener könne die Inzidenz der Retinopathia praematurorum, der intrakraniellen Hirnblutung, der hämolytischen Anämie und der chronischen Lungen-erkrankung senken. Die Hoffnung, mit der "Normalisierung" der im Vergleich zu reifgeborenen niedrigeren Vitamin E-Serumkonzentration Frühgeborener könnte die Morbidität dieser Kinder gesenkt werden, hat sich allenfalls für die Retinopathie bestätigt. Vielmehr hat sich in den folgenden Jahren gezeigt, daß die unkritische Gabe von Vitamin E zu unerwünschten Wirkungen führen kann. Das "E-Ferol[®]-Syndrom" ist als eine iatrogene Katastrophe in die Geschichte der Neonatologie eingegangen: der Tod von 38 Kindern wurde mit dieser Tocopherolacetat-Formulierung in Zusammenhang gebracht. Bis heute ist nicht mit Sicherheit geklärt, ob die Toxizität des E-Ferols eine Eigenschaft des Vitamin Es oder der Hilfsstoffe ist [7;12]. Andere Vitamin E-Formulierungen wurden in zahlreichen klinischen Studien geprüft. Von diesen Studien wurden 26 in einer umfangreichen Metaanalyse zusammengefaßt [21]. Die Vitamin E-Supplementation Frühgeborener reduziert das Risiko der intrakraniellen Blutung, aber erhöht das Risiko einer Sepsis. Bei sehr untergewichtigen Frühgeborenen ist das Risiko für eine schwere

Retinopathie und Blindheit vermindert. Mortalität und Morbidität lassen sich aber durch Vitamin E-Supplementation nicht signifikant beeinflussen, auch nicht die Inzidenz der Bronchopulmonalen Dysplasie. Gegenwärtig wird die protektive Wirkung von Vitamin E nicht nur in der Neonatologie kontrovers diskutiert.

Nach unserer Kenntnis ist der Effekt von (antenatalem) Vitamin E auf die Inzidenz oder den Schweregrad des Atemnotsyndroms nicht untersucht. Ob unsere tierexperimentell gewonnenen Daten zur Phosphatidylcholin-Synthese bei Vitamin E-Mangel von klinischer Relevanz sind, läßt sich daher gegenwärtig nicht abschätzen.