

Berenice Mareen Rudolph

Dr. med.

Struktur und Funktion der Acyl-CoA-Synthetase 3 im Zusammenhang mit der Biogenese von Lipid Droplets

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: PD Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Lipid Droplets (LD) sind intrazelluläre ubiquitär vorkommende Organellen nahezu aller eukaryotischen Zellen, die überschüssige Nährstoffe in Form von neutralen Lipiden speichern können. Sie bestehen aus einem Kern aus Neutralfetten, der von einer Phospholipid-Monomembran mit eingebetteten Oberflächenproteinen umgeben ist. Anders als zunächst angenommen, sind LD nicht nur an der Fettspeicherung beteiligt, sondern haben zudem einen aktiven Anteil an der Lipidhomöostase und spielen damit eine zentrale Rolle im Energiemetabolismus des gesamten Organismus. Trotz der Wichtigkeit dieser Organelle für den Stoffwechsel ist bisher über die beteiligten Zellmechanismen und Enzyme sowie deren Regulationen, die Entstehung und Abbau kontrollieren und die Verbindung von LD zu anderen Zellorganellen regeln, obgleich intensiver Forschungsbemühungen in den letzten Jahren, wenig bekannt. Dabei ist dieses Wissen auch klinisch von hohem Interesse, da eine Reihe von Erkrankungen, vor allem kardiovaskulärer sowie endokrinologischer Genese, wie das metabolische Syndrom mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Bluthochdruck und koronarer Herzkrankheit, mit einer übermäßigen Lipidspeicherung bzw. Störungen in der Funktion von LD und den auf ihrer Oberfläche befindlichen Proteinen assoziiert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde das LD-assoziierte Enzym Acyl-CoA-Synthetase 3 (ACSL3) in Bezug auf Struktur und Funktion charakterisiert, mit anderen LD-assoziierten Proteinen verglichen sowie die Entstehung von LD näher analysiert. Dabei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

1. ACSL3 ist sowohl auf LD als auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert.

Mithilfe von verschiedenen Methoden wie Überexpression von Fusionsproteinen, Immunfluoreszenz sowie Kotransfektionen mit Markerproteinen unterschiedlicher Zellorganellen konnte die subzelluläre Lokalisation von ACSL3 auf dem ER sowie auf LD in mehreren Zelllinien bestätigt werden. Dabei ist das Protein vor allem auf dem ER lokalisiert,

wenn nur wenige LD in der Zelle vorhanden sind, während bei Fettsäure (FS)-Überschuss die Lokalisation auf LD überwiegt.

2. Im Gegensatz zu anderen LD-assoziierten Proteinen ist ACSL3 auf LD unterschiedlichen Reifegrades zu finden.

Für andere LD-assoziierte Proteine, vor allem der PAT- (Perilipin, Adipophilin) und Rab- (Rab7, Rab18) Enzymfamilie, ist bekannt, dass sie entweder nur auf neu entstehenden peripheren, reifen kernnahen oder intermediären LD auf deren Oberfläche vorhanden sind, während für ACSL3 gezeigt werden konnte, dass es auf LD unterschiedlichen Reifegrades lokalisiert ist.

3. LD sind mobile Zellorganellen.

Mittels der Etablierung eines Verfahrens zum Live Cell Imaging konnte gezeigt werden, dass LD mobile Zellorganellen darstellen. Hierbei sind gerade die neu entstehenden LD in der Peripherie der Zelle sehr agil und zeigen saltatorische und gleitende Bewegungsabläufe auf, während die reifen LD in Kernnähe eher träge sind und sich mehr sporadisch als kontinuierlich bewegen.

4. Für die Sortierung ist ein hydrophober N-terminaler Sequenzbereich von etwa 50 AS hinreichend.

Zunächst wurde über eine Co-Expression des full-length ACSL3 gezeigt, dass der N-terminale Bereich von ACSL3, Nt-ACSL3-GFP, für die korrekte Sortierung auf LD ausreichend ist. Zur Bestätigung wurde die Membranassoziation mittels subzellulärer Fraktionierung von Nt-ACSL3-GFP gezeigt. Mithilfe von verkürzten GFP-Fusionsproteinen konnte dann der entscheidende Teil der AS-Sequenz, der für die korrekte Sortierung von ACSL3 auf die ER- sowie auf die LD-Membran verantwortlich ist, eingegrenzt werden. Im Konstrukt mit AS 12-64 war die Sortierung zwar vor allem nach 30-minütiger Inkubation weniger effizient, jedoch weitestgehend erhalten, während das Konstrukt mit AS 12-51 eine korrekte Lokalisation nur noch in eingeschränktem Maße zeigte. Dieser Abschnitt beinhaltet neben der prädiktierten Membranbindedomäne einige vor- und nachgeschaltete AS. Da sich zwischen AS 52-64 vier positiv geladene AS befinden, könnte diese Konfiguration wichtig für eine effiziente Sortierung sein. Das Ende der Sortierungssequenz müsste folglich im Bereich der AS 64 liegen. ACSL3 verfügt demnach über eine konkrete AS-Sequenz, die zur Sortierung nötig ist und unterscheidet sich somit von den PAT-Proteinen, die über mehrere unspezifische hydrophobe Abschnitte als Sortierungsinformation verfügen.

5. ACSL3 ist topologisch ein Hairpinprotein mit amphipathischer Helix.

Die zunächst aufgestellte Hypothese, dass es sich bei ACSL3 um ein integrales Transmembranprotein, ähnlich wie einige seiner verwandten Proteine der ACS-Familie, handele, konnte mithilfe des Fusionsproteins RFP-ACSL3-GFP widerlegt werden, da es sowohl auf der Doppelmembran des ER als auch auf dem Monolayer von LD lokalisiert werden konnte. Wahrscheinlicher ist aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Versuche die Konfiguration eines Hairpinproteins mit amphipathischer Helix, die sich nur in die äußere cytoplasmatische Membran des ER sowie in den LD-Monolayer einlagert. Sowohl das N- als auch das C-terminale Ende sind dabei cytoplasmatisch gelegen und können auf der LD-Oberfläche interagieren. Durch laterale Diffusion könnte ACSL3 vom ER auf neu entstehende LD gelangen, ohne die Membranbindung zu verlieren.

6. ACSL3 kann die intrazelluläre Fettsäure-Aufnahme erhöhen.

Durch Überexpression von ACSL3 in Zellkulturzellen konnte mithilfe von ³H-Oleat- und Bodipy-markierten Fettsäure-Aufnahme-Experimenten gezeigt werden, dass das Enzym die FS-Aufnahme in die Zelle erhöht und somit, wie einige andere seiner Verwandten der ACS-Enzymfamilie, nicht nur FS für den Lipidmetabolismus bereitstellt, sondern gleichzeitig FS in der Zelle hält und sie vor der Diffusion nach extrazellulär schützt.

7. ACSL3 ist wahrscheinlich an der Entstehung von LD beteiligt.

Für das Fusionsprotein Nt-ACSL3-GFP konnte mittels Live Cell Imaging in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Protein von Beginn an auf neu entstehenden LD vorhanden ist. Daher ist ein schneller Lokalisationswechsel von der Oberfläche des ER mit seiner Doppelmembran einerseits hin zu in der Peripherie der Zelle neu entstehenden LD mit Monomembranen andererseits auch aufgrund der beschriebenen Konfiguration als Hairpinprotein anzunehmen, sofern der Zelle ausreichend FS bereitgestellt werden. Die funktionelle Notwendigkeit dieses Lokalisationswechsels für die Entstehung von LD sollte anknüpfend an diese Arbeit Gegenstand weiterer Forschungsansätze sein.

Bei ACSL3 handelt es sich also um ein für den Fettsäurestoffwechsel wichtiges Enzym, dessen N-terminales Ende eine hohe Affinität für LD aufweist und sich, zumindest als enzymatisch inaktives Fusionsprotein, von der ER-Oberfläche auf neu entstehende LD bewegen kann und für deren Biogenese eine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Darüber hinaus kann ACSL3 mit seiner ACS-Aktivität über die Aktivierung von FS indirekt die FS-Aufnahme in die Zelle regulieren.