

Chen Du
Dr. med.

Depletion der Acyl-CoA Synthetase ACSL3 durch RNA Interferenz

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Die Langketten Acyl-CoA Synthetase 3 (ACSL3) gehört zur Proteinfamilie der Acyl-CoA Synthetasen (ACS), welche höherkettige Fettsäuren mit Coenzym A verestern und auf diese Weise für den nachfolgenden Stoffwechsel aktivieren. Die Familie besteht aus 13 Proteinen, von denen mehrere gleichzeitig zelltypspezifisch exprimiert werden. Hierbei weisen sie eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation sowie eine unterschiedliche Substratspezifität auf. ACSL3 ist als einziges Protein auf Lipidtröpfchen (LD) lokalisiert, welche die intrazellulären Lipidspeicher der Zelle darstellen. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern aus Neutrallipiden und werden von einer Monoschicht aus Phospholipiden und assoziierten Proteinen umgeben. Es wird angenommen, dass ACSL3 eine spezifische Bedeutung für den Fettsäurestoffwechsel der Zelle sowie für die Homöostase von Lipidtröpfchen aufweist.

Um ein Modellsystem zur Analyse der Funktion des ACSL3 zu erhalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit stabile ACSL3-defiziente und GFP-ACSL3-HA-überexprimierende Zelllinien über retrovirale Transduktion hergestellt. Als Ursprungszellen dienten verschiedene humane Zelllinien (epidermoidale A431, hepatische Huh7, neuronale SY5Y Zellen). Die Depletion des ACSL3 gelang über die stabile Expression einer shRNA, die zu der Degradation der ACSL3 mRNA durch RNA Interferenz führte. Die Effizienz des Knockdowns bzw. der Überexpression wurde mit quantitativer real time PCR sowie der Quantifizierung von Western Blots evaluiert. Hierbei zeigte sich in den verschiedenen Zelllinien auf mRNA- sowie auf Proteinebene ein Knockdown des ACSL3 von 70-90%. In der A431 Zelllinie zeigte sich eine etwa vierfache Überexpression im Vergleich zur endogenen ACSL3 Konzentration. Messungen des Expressionsniveaus anderer ACS zeigten keine maßgeblichen Veränderungen, was dafür spricht, dass das verminderte Expressionsniveau des ACSL3 nicht durch andere gleichzeitig exprimierte Proteine der ACS Familie kompensiert wurde.

Mit indirekter Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation des ACSL3 auf LD in den verwendeten Zelllinien durch Nachweis von endogenem ACSL3 bzw. durch die transiente Expression eines N-terminalen-ACSL3-GFP-Fusionsproteins bestätigt. Darüber hinaus konnte eine deutliche Verminderung des ACSL3 in den A431-Knockdown Zellen dargestellt werden. Gleichzeitig war jedoch nach Inkubation mit Ölsäure die Menge der vorhandenen LD wenig beeinträchtigt. Inwiefern ACSL3 für die Bildung von Neutrallipiden und die Entstehung und Aufrechterhaltung von LD notwendig ist, müssen zukünftige Projekte zeigen.

Messungen der Enzymaktivität mit radioaktiv markierter Ölsäure und Arachidonsäure zeigten für die transduzierten Zelllinien eine Verminderung bzw. eine Erhöhung der gesamten ACS Aktivität der Zelle. Weitere funktionelle Untersuchungen zeigten in den A431 Zellen einen Einfluss des ACSL3 auf die Aufnahme von Fettsäuren aus dem Extrazellulärraum. Nach einer dreistündigen Inkubation mit radioaktiv markierten Fettsäuren zeigten die Knockdown Zellen eine signifikante Verminderung der Oleataufnahme um 10% bzw. der Arachidonataufnahme um 19%. Die Ergebnisse sind konsistent mit der Vorstellung, dass das intrazellulär lokalisierte ACSL3 durch seine enzymatische Aktivität die Aufnahme von Fettsäuren über die Plasmamembran fördert, was im Allgemeinen unter dem Konzept des „metabolic trapping“ postuliert wurde. Allerdings wiesen die ACSL3-überexprimierenden A431 Zellen trotz der deutlichen Steigerung der ACS Aktivität keine bzw. nur eine geringe Erhöhung der

Fettsäureaufnahme auf. Daher wird angenommen, dass in der Zelle weitere Kontrollmechanismen zur Regulation der Fettsäureaufnahme vorhanden sind und dass das Expressionsniveau von ACS nicht allein ausschlaggebend ist.

Über die Aufnahme von Fettsäuren hinaus wurde die Verstoffwechslung des radioaktiven Oleats zu verschiedenen Lipidklassen mittels Dünnschichtchromatografie untersucht. Es zeigte sich, dass in den A431 Zellen das aufgenommene Oleat vor allem für die Synthese von Triacylglyceriden und Phosphatidylcholin verwendet wurde. Daneben war es in verschiedenen Intermediaten des Lipidstoffwechsels sowie einigen Phospholipiden zu finden. Die ACSL3-defizienten und ACSL3-überexprimierenden A431 Zelllinien unterschieden sich in der Verstoffwechslung des Oleats nicht. Im Gegensatz zu Literaturdaten konnte im Rahmen dieser Arbeit für ACSL3 keine Kanalisierung der aufgenommenen Fettsäuren für einen bestimmten Stoffwechselweg nachgewiesen werden. Jedoch konnte auf Grund des verwendeten Versuchsdesigns eine Kanalisierung von Fettsäuren durch ACS nicht generell ausgeschlossen werden.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit ACSL3-defiziente und ACSL3-überexprimierende Zelllinien etabliert und gezeigt, dass die Aufnahme von Fettsäuren in den ACSL3-defizienten Zellen vermindert war. Zukünftige Experimente mit den stabil transfizierten Zelllinien sollten vermehrt auf die direkte Funktion des ACSL3 auf LD eingehen. Als intrazelluläre Speicherorganellen für Neutrallipide haben LD eine wichtige Bedeutung für die Lipidhomöostase der Zelle; Veränderungen spielen eine zentrale Rolle in den Pathogenese von vielen medizinisch bedeutsamen Stoffwechselerkrankungen.