

Regina Sindu Vellaramkalayil

Dr. med.

Lokalisation und Sortierung der Acyl-CoA Synthetasen ACSL3 und ACSL4

Promotionsfach: Innere Medizin

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

Langkettige Fettsäuren (FS) dienen als Energiespeicher und -lieferanten, tragen zum Aufbau der Zellmembranen bei und agieren als Signalproteine. Die Speicherung erfolgt in der Form von Neutrallipiden in Lipidtröpfchen. Die zelluläre Aufnahme der FS erfolgt mithilfe der Acyl-CoA-Synthetasen (ACS). Eine der fünf Subfamilien der ACS bilden die long-chain ACS (ACSL), wozu auch die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme gehören. ACS aktivieren FS durch Veresterung mit Coenzym A und schaffen somit ein Konzentrationsgefälle von unveresterten FS zwischen Extra- und Intrazellularraum, sodass weitere unveresterte FS in die Zelle einströmen. Man spricht von vektorieller Acylierung. Die FS werden nach ihrer Aktivierung den verschiedenen intrazellulären Stoffwechselwegen zugeführt. Die einzelnen Isoformen der ACSL-Proteine unterscheiden sich bezüglich ihrer intrazellulären Lokalisation und Gewebeverteilung. Die Hypothese der metabolischen Kanalisierung geht davon aus, dass die intrazelluläre Lokalisation der Acyl-CoA-Synthetasen den weiteren Weg der von ihr veresterten FS beeinflusst, sodass beispielsweise auf Mitochondrien lokalisierte ACSLs FS bevorzugt für die β -Oxidation aktivieren. In diesem Sinne ist die genaue Kenntnis der Lokalisation der ACSL-Proteine von großem Interesse. Sie könnten z.B. als Angriffspunkt für Pharmaka dienen, sodass man durch Regulation ihrer Expression gezielt einen bestimmten Stoffwechselweg, z.B. den der Speicherung der FS, unterbinden könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurden Lokalisation, Topologie und zum Teil auch die Funktion der Acyl-CoA-Synthetasen ACSL3 und ACSL4 untersucht.

ACSL3 befand sich, wie schon in früheren Untersuchungen dargestellt, im ER und auf Lipidtröpfchen (LD). Die Lokalisation war dynamisch, bei erhöhtem Angebot an FS wurde das Protein bevorzugt auf LD sortiert. Dabei wurde es nicht neu gebildet, sondern wanderte vom ER auf frühe Formen der LD. Dies ist ein weiterer Hinweis für die wichtige Rolle, welche ACSL3 bei der Biogenese und dem Wachstum von LD zu spielen scheint. Es aktiviert auf den LD vermutlich FS, welche direkt der Synthese von Neutral- und Membranlipiden zugeführt werden. LD sind folglich eigenständige subzelluläre Organellen, welche durch eigene Synthese von Speicher- und Membranlipiden wachsen. ACSL3 enthält eine putative

Transmembrandomäne, welche sich am N-Terminus befindet. Die Analyse von GFP-Fusionsproteinen, welche den verkürzten N-Terminus des ACSL3 in unterschiedlicher Länge enthielten, ergab, dass für die effiziente Sortierung von ACSL3 auf LD und ER nur die Aminosäuren 12-64, das heißt 53 Aminosäuren, notwendig waren. Somit ist die Sortierung der zweiten Isoform des ACSL3, welche durch einen alternativen Translationsbeginn erst an Aminosäure 12 beginnt, identisch zu der der ersten Isoform. Essentiell für die Sortierung waren die Aminosäuren 15-51, das heißt 37 Aminosäuren. Eine wichtige Rolle spielten vermutlich der putativen Transmembrandomäne benachbarte geladene, vor allem basische Aminosäuren. Es war unerheblich, ob sich GFP im N- oder C-Terminus der Fusionsproteine befand. Eine weitere Beobachtung war, dass endogenes ACSL3 durch die überexprimierten Fusionsproteine verdrängt wurde, dies ist ein Beweis dafür, dass die Fusionsproteine die gleiche Lokalisation wie endogenes ACSL3 einnehmen. Hinsichtlich der Membrantopologie ergab die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung eines enzymatisch aktiven Fusionsproteins von ACSL3 nach selektiver Permeabilisierung der Plasmamembran, dass beide Termini zytosolisch orientiert waren. Die Verankerung in der ER- bzw. LD-Membran erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit durch eine amphipathische Helix, weniger wahrscheinlich ist eine Hairpin-Struktur. Somit scheint sich die Membrandomäne nur im zytosolischen Blatt der ER-Membran zu befinden, womit eine freie Diffusion zwischen dem Monolayer der LD und dem Bilayer der ER-Membran möglich wäre.

Von ACSL4 existieren 2 Isoformen, welche durch alternatives Spleißen gebildet werden. Die neuronale Form ACSL4.long besitzt eine putative Transmembrandomäne, diese fehlt der ubiquitär vorkommenden Form ACSL4.short.

Es konnte mithilfe zwei voneinander unabhängigen Methoden, der Fluoreszenzmikroskopie und der subzellulären Fraktionierung, gezeigt werden, dass die beiden Isoformen eine vollkommen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisation besitzen. ACSL4.short befand sich im Zytosol und auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran. Die Lokalisation war vermutlich unabhängig vom FS-Angebot. ACSL4.long war hingegen wie ACSL3 im ER und auf LD zu finden. Bei erhöhtem FS-Angebot war es vor allem auf LD. Es könnte eventuell auch an der Entstehung und Aufrechterhaltung der LD beteiligt sein. Diese Ergebnisse besitzen dadurch eine besonders hohe Relevanz, dass funktionell aktive Proteine untersucht wurden. Des Weiteren wurde die Existenz von posttranslationalen Modifikationen aufgezeigt; sie könnten eine Rolle bei der Sortierung spielen. Es ist äußerst interessant, dass die beiden Isoformen eines Proteins verschiedene intrazelluläre Lokalisationen einnehmen und somit nach der Hypothese der metabolischen Kanalisierung auch einen funktionellen Unterschied

besitzen. In weiteren Untersuchungen sollte mit mehreren unabhängigen Methoden, wie Fluoreszenzmikroskopie, subzelluläre Fraktionierung und Methoden der Proteomik, vor allem endogenes ACSL4 im Hinblick auf Lokalisation und Funktion betrachtet werden. Darüber hinaus sollte der funktionelle Unterschied zwischen ACSL3, ACSL4.long und ACSL4.short näher beleuchtet werden.