

Svenja Sliwinski
Dr. med.

Lokalisationsspezifika der humanen Long-Chain-Acyl-CoA-Synthetasen 5 und 6 im Vergleich mit homologen Proteinfamilien von *Drosophila melanogaster*

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

Doktorvater: Herr apl. Prof. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Gerade in der westlichen Welt, aber zunehmend auch global, haben Erkrankungen mit pathologischem Fettstoffwechsel eine hohe Prävalenz. Diabetes mellitus Typ 2, Adipositas und Krebs gehören zu diesen multifaktoriellen Pathologien. Besonders der Fettsäuretransport sowie das Channeling von Fetten in unterschiedliche metabolische Pathways werden dabei als pharmakologisch vielversprechende Ansatzpunkte für Therapeutika angesehen. In dieser Arbeit wurden spezifische Long-chain Acyl-CoA-Synthetasen (ACSL-Enzyme) mit einigen ihrer Isoformen untersucht. Sie kommen gewebespezifisch vor und sind substratspezifisch für langkettige Fettsäuren. Funktionell aktivieren sie nicht veresterte Fettsäuren über eine ATP-abhängige Veresterung an Acyl-CoA. Es wurde die Frage nach ihrer subzellulären Lokalisation, den dazu führenden Spezifika und ihrer resultierenden möglichen Funktion bearbeitet.

Zunächst erfolgte dazu die theoretische Analyse mit multiplen Sequenzvergleichen. Die dazu verwendeten Klonierungen wurden mit vollständigen cDNAs aus selbst erstellten DNA-Bibliotheken vorgenommen. Es wurden vergleichende Untersuchungen der Aminosäuresequenzen und der potentiellen TMDs sowie der phylogenetischen Unterschiede durchgeführt. Diese ergaben hoch konservierte Bereiche sowie Prädiktoren für bestimmte subzelluläre Lokalisationen. (1). Daraufhin wurden Fusionsproteine mit Fluoreszenzmarkern erstellt (2). Diese wurden wiederum mikroskopisch im Vergleich zu kotransfizierten Markerproteinen ausgewertet (3). Abschließend wurden Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den humanen Proteinen und den Proteinen von *Drosophila melanogaster* diskutiert (4). Durch diese Herangehensweise konnten Unterschiede auf DNA-Ebene im späteren Zellmodell auf molekularer Ebene verglichen werden.

Die Ergebnisse zur subzellulären Lokalisation von ACSL5, ACSL6, DmACSL und DmFATP konnten die Hypothese einer direkten Transportfunktion dieser nicht bestätigen. Es konnte hier gezeigt werden, dass sich keine einzige Isoform in der Plasmamembran befindet. Des Weiteren wird angenommen, dass ACSL-Enzyme vielmehr eine wichtige Rolle für das Channeling von aktivierten Fettsäuren in bestimmte Stoffwechselwege spielen. Mit dieser Arbeit konnte weitere Evidenz für diese Annahme gefunden werden. Für die Isoform 1 von

ACSL6 wurde eine Lokalisation auf dem endoplasmatischen Retikulum bestätigt. Die Isoform 4 hingegen befand sich auf Mitochondrien. Eine dritte von ACSL6 untersuchte Isoform, die Isoform 7, zeigte eine zytoplasmatische Lokalisierung. Für die beiden Isoformen a und b von ACSL5 ergab sich eine Lokalisation auf dem ER. Daraus lässt sich schließen, dass diese Isoformen am *metabolic channeling* von FS in spezifische Stoffwechselwege, wie der Speicherung von TAGs für die Lokalisation auf dem ER oder der β -Oxidation im Falle von Mitochondrien, beteiligt sind. Die hier gezeigten Ergebnisse können zukünftig die Grundlage für weitere Arbeiten zur Relevanz der Lokalisation bilden.

Da Acyl-CoA-Synthetasen unter den verschiedenen Spezies in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert sind, lag der Vergleich mit den phylogenetisch verwandten FATP- und ACSL-Enzymen aus einer anderen Art nahe. Die hier untersuchten Drosophilaproteine DmACSL und DmFATP wurden dafür zunächst in Säugetierplasmide umkloniert, um sie analog zu den humanen Enzymen untersuchen zu können. Dabei ergab sich für DmACSL eine Lokalisierung auf Mitochondrien. Für DmFATP hingegen konnten je nach Position des Fluoreszenztags unterschiedliche Ergebnisse gefunden werden. So war das Genprodukt einmal auf dem ER und ein andermal auf LDs zu finden.

Daher stellte sich die Frage, ob der Fluoreszenztag die subzelluläre Lokalisation veränderte. Diese Frage konnte für die humanen ACSL-Enzyme und für die Proteine von *Drosophila melanogaster* nicht eindeutig beantwortet werden. Je nach Signalpeptid scheint der Fluoreszenztag jedoch durchaus die subzelluläre Lokalisation verändern zu können.

Das Ziel dieser Dissertation, die subzellulären Lokalisationen bestimmter Isoformen von ACSL-Enzymen zu bestimmen, konnte erreicht werden. Zu den hier untersuchten Enzymen gab es bis jetzt keine abschließenden Lokalisierungsstudien, die isoformspezifisch durchgeführt wurden. Zudem wurden auch viele bisher publizierte Ergebnisse auf der Basis von Daten bei *Mus Musculus* oder *Rattus Norvegicus* publiziert, was eine Vergleichbarkeit mit den humanen Formen nicht sicher zulässt. Demnach bilden die hier gezeigten Ergebnisse die bis jetzt fundierteste Grundlage, um reliable Aussagen über die Verhältnisse bei *Homo sapiens* zu machen und schließen eine Forschungslücke.

Die hier dargestellten Resultate bilden auch eine gute Grundlage für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet, um somit Fettstoffwechselerkrankungen auf molekularer Ebene besser zu verstehen. Jetzt, wo die subzellulären Lokalisationen bekannt sind und somit Annahmen über die Funktionen der einzelnen Isoformen gemacht werden können, wird in weiteren Studien eine Aussage über die Ursächlichkeit in Bezug auf Erkrankungen möglich sein. Es gilt weiter, die Auswirkungen von Funktionsausfall oder Überexpression der untersuchten Enzyme für

die genannten Krankheiten zu evaluieren. Ob ACSL-Enzyme ein Ansatzpunkt für die Therapie von pathologischen Fettstoffwechselerkrankungen wie es bei Adipositas und DM2 z.B. über eine pathologische Insulinsensitivität der Fall ist, oder für Krebserkrankungen sein können, wird sich in den nächsten Jahren zeigen.