

Ingrid Wei Zhang
Dr. med.

Lokalisation und funktionelle Rolle der Acyl-CoA-Synthetase 4 (ACSL4)

Fach: Biochemie
Doktorvater: apl. Prof. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

ACSL4 ist eine von 13 Acyl-CoA-Synthetasen, die langkettige Fettsäuren mit Coenzym A verestern und sie für nachfolgende metabolische Wege aktivieren. Die Acyl-CoA-Synthetasen zeichnen sich durch zwei hochkonservierte Motive auf, weisen jedoch Unterschiede bezüglich der gewebespezifischen Expression, subzellulären Lokalisierung, Enzymkinetik und Substratpräferenz auf. ACSL4 zeichnet sich durch seine Präferenz gegenüber Arachidonsäure aus und ist in mehreren malignen Erkrankungen wie dem hepatozellulären Karzinom, dem Kolonkarzinom und dem Mammakarzinom dysreguliert.

Durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von ACSL4-Proteinen mit verschiedenen Epitopvarianten konnte in drei verschiedenen Zellsystemen (COS-7-, A431- und Huh7-Zellen) gezeigt werden, dass ACSL4 im Cytosol lokalisiert ist und an der Plasmamembran mit Aktinfilamenten kolokalisiert. Dieses Ergebnis unterstützt Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe und steht im Widerspruch zu der in der Literatur berichteten Lokalisation von ACSL4 in Peroxisomen und Mitochondrien-assoziierten ER-Membranen.

Der Mechanismus der Plasmamembranassoziation und die Bedeutung der Kolokalisation von ACSL4 mit Aktin müssen in zukünftigen Projekten erleuchtet werden. Eine Kopräzipitation von ACSL4 und Aktin konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Denkbar wäre eine durch Arachidonsäure vermittelte Lokalisation von ACSL4 in aktinreichen Bereichen der Plasmamembran.

Durch die Klonierung und Expression von ACSL4- bzw. M-ACSL4-Domänenmutanten in COS-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus (in Analogie zu dem zu 70% homologen Enzym ACSL3) ausreichend für eine korrekte Lokalisation von M-ACSL4 auf ER-Membranen ist. Im Gegensatz zu M-ACSL4 werden für die korrekte Lokalisation von ACSL4 an der Plasmamembran sowohl der N-Terminus als auch die AMP-bindende Domäne benötigt.

Als Modellsystem zur funktionellen Analyse wurden in dieser Arbeit ACSL4-überexprimierende und ACSL4-depletierte Zelllinien sowie Zelllinien, die ACSL3- und ACSL4-defizient sind, erfolgreich etabliert. Überexprimiertes ACSL4 war sowohl im cytosolischen als auch im membranassoziierten Kompartiment enzymatisch aktiv. Der Knockdown von ACSL4 führte zu einer Abnahme der zellulären Arachidonyl-CoA Aktivität, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Oleoyl-CoA Aktivität. In A431- und

Huh7-Zellen trägt neben ACSL4 auch ACSL3 wesentlich zur zellulären Arachidonyl-CoA Aktivität bei. Der simultane Knockdown beider ACSL-Isoformen beeinträchtigt die Viabilität der Zellen nicht. Der doppelte Knockdown resultierte in einer höheren Reduktion der Arachidonyl-CoA Aktivität als es für den Knockdown einer einzelnen ACSL-Isoform der Fall war. Der Effekt war jedoch nur unteradditiv und lässt auf eine minimale Arachidonyl-CoA Aktivität zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase schließen. Die beobachtete Variation zwischen den verwendeten Zelllinien bezüglich der mRNA-Expression und Aktivität einzelner ACSL-Isoformen ist ein weiteres Beispiel differentieller Regulation von Fettsäuren.

Die Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie ließen einen zelltypspezifischen Effekt von ACSL4 erkennen. In Einklang mit anderen Literaturdaten führte der Knockdown von ACSL4 in A431-Zellen zu einer attenuierten Inkorporation von Arachidonsäure in Triacylglyceride, während die Überexpression von ACSL4 in A431-Zellen die Inkorporation in Triacylglyceride erleichterte. In COS-Zellen dagegen wurde durch die Expression von tom20-ACSL4, einer auf Mitochondrien lokalisierten ACSL4-Variante, die Inkorporation von Arachidonsäure in Phosphatidylinositol erleichtert. Dieser Effekt war spezifisch für ACSL4 und konnte nicht für ACSL1, welches physiologischerweise auf Mitochondrien lokalisiert ist, gezeigt werden.

Trotz Konsistenz der Ergebnisse zur Lokalisation von ACSL4 und Partitionierung von Arachidonsäure in bestimmte Lipidkompartimente werfen diese Daten im Hinblick auf die Kanalisierungshypothese Fragen auf. Es bleibt zu klären, über welchen Mechanismus ACSL4 an der Plasmamembran zu einer erleichterten Inkorporation von Arachidonsäure in Triacylglyceride, die im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert werden, führt.

Zusammenfassend zeigt ACSL4 zwischen den verschiedenen Zelllinien eine individuelle Variation bezüglich der Genexpression, der Enzymaktivität und der Kanalisierung von Fettsäuren in bestimmte Lipidklassen. Allein die subzelluläre Lokalisation von ACSL4 an der Plasmamembran und im Cytosol scheint über die hier untersuchten Zelltypen hinweg konstant zu sein. Weitere Projekte zur Erforschung der funktionellen Unterschiede zwischen den Acyl-CoA-Synthetasen werden zum Verständnis einer Vielzahl von ökonomisch relevanten Erkrankungen beitragen.