

## Zusammenfassung

Tarik Exner

Dr. med.

**Dual topology of a novel member of the lipid droplet proteome, functional characterization of perilipin 2 and perilipin 3 and development of a lipid droplet quantification algorithm.**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

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

Das Proteom der Lipidtröpfchen ist im Bereich der Lipidtröpfchen-Forschung und der Charakterisierung von metabolischen Erkrankungen von großem Interesse. In der vorliegenden Arbeit wurde das Lipidtröpfchen Proteom um ein weiteres Mitglied erweitert, die Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase 1. Des Weiteren wurden zwei der am häufigsten vorkommenden Lipidtröpfchen-Proteine, Perilipine 2 und 3, funktionell charakterisiert. Abschließend wurde ein Mikroskopie-basiertes Verfahren entwickelt, um Veränderungen der Lipidtröpfchen-Biologie anhand der intrazellulären Quantität und Größe der Lipidtröpfchen akkurat und sensitiv zu detektieren.

Die Fettsäure-Acyl-CoA-Reduktase 1 (Far1) ist ein peroxisomales Protein welches für die Erzeugung von Fettsäure-Alkoholen essentiell ist, die wiederum für die Ether-Lipid-Synthese benötigt werden. In dieser Arbeit wurden Fluoreszenz-Mikroskopie, Elektronen-Mikroskopie und Lipidtröpfchen-Isolierung verwendet um übereinstimmend die Lokalisation von überexprimierten und endogenem Far1 auf Lipidtröpfchen nach Triglyzerid-Synthese durch die Zugabe von Ölsäure zu zeigen. Mithilfe selektiver Permeabilisierung, Protease-Schutz-Assay und N-Glykosylierung wurden hier für Far1 zwei Membran-Topologien beschrieben. Die Daten legen nahe, dass der hydrophile C-terminus von Far1 auf Peroxisomen zum Lumen orientiert ist während auf Lipidtröpfchen der C-terminus innerhalb des Cytosols liegt. Der C-terminus von Far1 besteht aus zwei separaten hydrophoben Domänen, die gesondert charakterisiert wurden. Es zeigte sich, dass die erste hydrophobe Domäne eine Transmembran-Domäne darstellt und nicht in der Lage ist auf Lipidtröpfchen zu translozieren. Die zweite hydrophobe Domäne hingegen konnte auf Lipidtröpfchen translozieren und stellt am wahrscheinlichsten eine amphipathische Helix dar. Ein CRISPR-vermittelter Knockout von Pex19, dem für die peroxisomale Lokalisation von Far1 verantwortliche Chaperon, wie auch von TRC40/ASNA1, ein wichtiger Faktor für die Sortierung von C-terminal verankerten ER-Proteinen, hatten keinen Einfluss auf die Lipidtröpfchen-Lokalisation von Far1. Die verantwortliche Sortierungsmaschinerie konnte nicht abschließend geklärt werden. Zusammenfassend zeigte Far1 die Charakteristika der Klasse der Proteine mit dualer Topologie und ist in der Lage auf Lipidtröpfchen zu translozieren.

Im zweiten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurde ein einfach einzustellender Algorithmus zur Quantifizierung von Lipidtröpfchen aus Widefield-Mikroskop-Bildern entwickelt. Die Anzahl und die Größe von intrazellulären Lipidtröpfchen ist ein wichtiger Marker für viele metabolische Erkrankungen wie auch für Veränderungen des Lipidtröpfchen-Stoffwechsels. Zur Kontrolle der Genauigkeit des Algorithmus wurden Lipidtröpfchen aus mehr als 3700 Bildern gezählt. Der Algorithmus wurde damit gründlich validiert und erwies sich als ausgesprochen akkurat hinsichtlich der Quantifizierung der Lipidtröpfchen-Anzahl. Die Volumen-Bestimmung durch den Algorithmus wurde verglichen mit einer 3D-Rekonstruktions-Volumenbestimmung sowie einer biochemischen Triglycerid-Quantifizierung und zeigte auch hier zuverlässige Messungen des intrazellulären Lipidtröpfchen-Volumens. Es zeigte sich mithilfe der entwickelten Methode, dass die Überexpression von FATP4/ACSVL5 den Durchmesser der Lipidtröpfchen, nicht aber deren Anzahl, nach Ölsäure-Gabe in COS7 vergrößert.

Der dritte Teil der Dissertation befasst sich mit den Perilipinen, einer der am häufigsten vorkommenden Protein-Klasse auf Lipidtröpfchen. Trotz der Abundanz der Perilipine 2 und 3 sind diese Proteine erstaunlich wenig charakterisiert. Ein Knock-Out von Perilipin 3 in U2OS Zellen resultierte in einer verminderten Fähigkeit der Zelle, neue Lipidtröpfchen zu bilden wie auch in einer deutlichen Reduktion von prä-existenten Lipidtröpfchen. Während die Lipolyse-Rate der Zellen nicht merklich vermindert war, zeigten die Experimente eine verminderte Acyl-CoA-Synthetase Aktivität die, zumindest zum Teil, die beobachteten Effekte eines Perilipin 3 Knock-Outs im Bezug auf die Anzahl der Lipidtröpfchen und die verminderte Neubildung erklären könnte. Ein Knock-Out von Perilipin 2 hingegen erbrachte keinen Effekt auf die Anzahl von Lipidtröpfchen unter normalen Kulturbedingungen und nur einen nachrangigen negativen Effekt auf die Neubildung von Lipidtröpfchen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen. In Perilipin 2 defizienten Zellen zeigte sich jedoch eine deutliche Sensibilisierung der Zellen gegenüber lipotoxischen Effekten durch die Fettsäure Palmitat. Lipid-Analysen zeigten, dass die Menge an Diazylglyzerolen in Perilipin 2-Knock-Out Zellen anstieg, was die beobachtete Toxizität erklären könnte