

Cassian Maximilian Afting

Dr. med.

**Relevanz von Long-chain Acyl-CoA Synthetase 3 und Perilipin-2 / -3 für den Lipidstoffwechsel, Charakterisierung einer neuen humanen Long-chain Acyl-CoA Synthetase 5 Variante**

Fach/Einrichtung: Biochemie

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

Lipidtröpfchen (LD) zeigen ein ubiquitäres Vorkommen in eukaryotischen Zellen und haben eine kritische Rolle in der Genese und Aufrechterhaltung diverser Krankheiten des Menschen, wie zum Beispiel Atherosklerose, Steatosis hepatis, Diabetes mellitus Typ II, Adipositas und dem Lipodystrophiesyndrom. Als dynamische intrazelluläre Speicher-Organellen für Neutrallipide wie Triacylglyceride und Cholesterinester, organisiert sich ein essenzieller Anteil des Fettsäure-Metabolismus der Zelle um sie. Die einzelnen Mitglieder des LD assoziierten Proteoms, wie Long-chain Acyl-CoA Synthetasen und Perilipine, spielen in der Regulierung des Lipidstoffwechsels der Zelle eine elementare, aber bisher nur in Teilen verstandene Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der intrazellulären Lokalisation der Long-chain Acyl-CoA Synthetase 3 (ACSL3) für den Lipidstoffwechsel untersucht. Dafür wurde ein COS7 Zellkulturmodell mit CRISPR/Cas9 induziertem ACSL3-Knockout verwendet. Im Rahmen eines experimentellen Vorgehens, welches die Markierung und Quantifizierung von intrazellulären Lipidklassen mit [<sup>14</sup>C]-Oleat und [<sup>14</sup>C]-Acetat unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen umfasste, konnten ACSL3-bezogene Funktionen beschrieben werden, die die Katalyse der Enzym-spezifischen Reaktion überschreiten.

Zellen ohne ACSL3 zeigten eine präferenzielle Inkorporation von endogen synthetisierten und von exogen aufgenommenen Fettsäuren in vorallem Phosphatidylcholin auf Kosten der Inkorporation in Triacylglyceride. Es wurde zudem gezeigt, dass ACSL3 den Lipidstoffwechsel nicht allein durch seine Gegenwart als Protein auf LD und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) beeinflusst. Ein Vergleich zweier Zelllinien, die auf dem Boden des ACSL3-Knockouts entweder das Wildtyp-ACSL3 oder eine ER-fixierte ACSL3-

Variante exprimierten, legte den Schluss nahe, dass die ER-Lokalisation von ACSL3 die Triacylglycerid-Synthese und die Biosynthese von Cholesterin in ihrer Effizienz steigert. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass ein ER-fixiertes ACSL3 ohne LD Lokalisation die LD Biogenese beeinträchtigt. In dieser Arbeit konnte eine Veränderung des Lipidstoffwechsels als Ursache dafür ausgeschlossen werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Relevanz der nicht-enzymatischen LD Proteine Perilipin-2 und -3 für den Lipidstoffwechsel in U2OS Zellen anhand von Knockout Zelllinien analysiert.

Perilipin-3 konnte mithilfe von [<sup>14</sup>C]-Oleat Markierungsexperimenten, mikroskopischer LD-Quantifizierung, sowie einer Bestimmung der intrazellulären Acyl-CoA Synthetase (ACS) Aktivität als ein Protein identifiziert werden, dass die zelluläre ACS Aktivität, vermutlich über die indirekte oder direkte Regulation von ACSL3, und damit in letzter Instanz auch die intrazelluläre Triacylglycerid-Menge über die Oleat Aufnahme beeinflusst. Unter Verwendung der gleichen Methoden konnte Perilipin-2 auf Basis der Daten dieser Arbeit lediglich eine geringe Einflussnahme auf die intrazelluläre Triacylglycerid-Menge zugesprochen werden.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus eine neue humane Long-chain Acyl-CoA Synthetase 5 (ACSL5) Variante (NM\_203379.1:c.1358C>A:p.Thr453Lys; T453K) funktionell in-vitro charakterisiert, welche 2018 in sechs Patienten der Sultan Qaboos Universitätsklinik im Oman erstmalig durch whole-exome sequencing und autozygoty mapping entdeckt wurde. Bei den Patienten handelt es sich um sechs Individuen im Säuglingsalter einer großen konsanguinen Familie, welche Homozygotie für die oben genannte ACSL5 Variante aufweisen. Diese Missense-Mutation war mit einem Symptomkomplex aus unter anderem Erbrechen, Diarrhöen, rezidivierenden Hypoglykämien und schweren Gedeihstörungen assoziiert. Diagnostischer Ausschluss bekannter Ursachen für schwere Gedeihstörungen im Kindesalter erbrachte keinen Nachweis einer spezifischen Ätiologie für den Symptomkomplex der Patienten.

Die funktionelle in-vitro Charakterisierung dieser neuen ACSL5 Variante mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Bestimmung der intrazellulären ACS Enzymaktivität und quantitativer Western Blot Analyse in dieser Arbeit zeigte einen vollständigen Verlust der ACS Enzymaktivität der Variante, eine unveränderte intrazelluläre Lokalisation auf dem ER und eine Neigung zur Bildung von Natriumdodecylsulfat-resistenten Aggregaten. Die Untersuchung einer bereits beschriebenen, bisher nicht charakterisierten ACSL5 Variante mit Einzelnukleotid-Polymorphismus an der selben Position (c.1358C>T:p.Thr453Ile; T453I) in

gleicher Weise erbrachte die gleichen Ergebnisse und implizierte so die Position 453 der Aminosäuresequenz von ACSL5 als entscheidend für die direkte Enzymfunktion.

Zusammenfassend ließ sich die ACSL5 Thr453Lys Variante als eine Loss-of-Function-Mutation identifizieren und mit den Symptomen der Patienten in Verbindung bringen. Basierend auf den gastroenterologischen Symptomen der Patienten und der Bedeutung von ACSL5 für den Lipidstoffwechsel konnte eine erfolgreiche Therapie für diese neue Stoffwechselerkrankung gefunden werden.