

Sheik Fadil Mohamed Minden
Dr. med.

Quantifizierung von Langketten-Acyl-Coenzym A-Synthetase 3 auf Lipidtröpfchen in A431-Zellen

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Das Lipidtröpfchen (LD) ist ein für den Lipidstoffwechsel der Zelle essentielles Organell. Bestehend aus einem Kern voller Neutrallipide und umgeben von einer einschichtigen Lipidmembran, die gespickt ist mit diversen Proteinen, kommt dieses kugelige Organell ubiquitär in nahezu allen Lebensformen und in nahezu allen Zelltypen vor. Kritisch zum Verständnis des LD gilt die Entschlüsselung seines Proteoms. Bisherige Studien haben nahegelegt, dass das Enzym Langketten-Acyl-Coenzym A Synthetase 3 (ACSL3) eines der häufigsten Membranproteine des LD überhaupt sein könnte, was neben der enzymatischen Funktion auch für eine Relevanz als LD-Gerüstprotein sprechen könnte. Bislang hat es aber noch keine Studie gegeben, welche die Verteilung von ACSL3 auf der LD-Oberfläche in absoluten Werten zu charakterisieren vermag.

Im Herzen dieser Dissertation stand daher die erstmalige absolute ACSL3-Quantifizierung auf LD. Demonstriert wurde dies am Modell der humanen epidermoiden A431-Zellen. Untersucht wurde zusätzlich der Einfluss von Oleat (OA) auf das Wachstumsverhalten der Zelle und die subzelluläre ACSL3-Verteilung³.

Zunächst wurde die Zellmenge in A431-Kulturen bestimmt, indem Zellsuspensionen mittels Neubauer-Zählkammer untersucht wurden. In Suspensionsproben bekannter Zellmenge erfolgten dann über Bicinchoninsäure-Assays Gesamtproteinbestimmungen. Folglich konnte die mittlere Gesamtproteinmasse einer einzelnen A431-Zelle abgeleitet werden. Des Weiteren wurden Zellsuspensionen homogenisiert und zentrifugiert. Der postnukleäre Überstand wurde sodann in einen Sucrosegradienten versetzt. Mittels Ultrazentrifugation wurde anschließend eine subzelluläre Fraktionierung erreicht. LD konnten in der obersten Fraktion isoliert werden. ACSL3 wurde mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blots quantifiziert. Als Standardproben wurde purifizierte rekombinante Glutathion-S-Transferase-gekoppelte ACSL3 eingesetzt. Zusammen mit den Erkenntnissen aus den Zellquantifizierungen in A431-Kulturen konnte ACSL3 in LD-Fractionen und in anderen subzellulären Fraktionen auf der Ebene einer einzelnen A431-Zelle bestimmt werden. Ferner wurden A431-Kulturen unter Anwendung der Oil-Red-O-Färbemethode hinsichtlich ihrer LD-Anzahl und -Morphometrie innerhalb einer A431-Zelle untersucht. Schließlich wurden die Befunde zusammengenommen analysiert. Infolgedessen konnte die ACSL3-Menge auf einem einzelnen LD einer A431-Zelle quantifiziert werden.

Demnach enthält eine A431-Zelle durchschnittlich ca. 15 bis 19 LD. Ein LD in einer A431-Zelle ohne OA-Inkubation hat eine mittlere Oberfläche von ca. $5,3 \mu\text{m}^2$, mit OA-Inkubation sogar ca. $13,4 \mu\text{m}^2$. Ferner hat eine A431-Zelle im Durchschnitt einen Proteingehalt von ca. 530 pg unabhängig einer OA-Inkubation. Davon macht ACSL3 in Zellen ohne OA-Alimentation 0,27 pg (= 2,0 Mio. Moleküle) aus, mit OA-Alimentation 0,20 pg (= 1,5 Mio. Moleküle). Der Großteil aller ACSL3 findet sich in jedem Fall nach der initialen Zentrifugation im Zellkernpellet wieder, vermutlich als Artefakt von anhaftenden ER-Membranpartikel. Der Rest verbleibt im postnukleären Überstand. Nach dessen Fraktionierung konnte ACSL3 in Zellen ohne OA-Behandlung ausschließlich in den unteren beiden Fraktionen der Zytosol- und

Membranpartikel (u. a. ER-Komponente) nachgewiesen werden. Nach OA-Inkubation konnte erstmalig nach der Auftrennung im Gradienten ACSL3 in der obersten Fraktion, das LD enthält, nachgewiesen werden. Der Anteil beträgt hier etwa ein Viertel. Die restlichen drei Viertel werden in den unteren beiden Fraktionen der Zytosol- und Membranpartikel detektiert.

Nach OA-Stimulation konnte also demonstriert werden, dass in einer A431-Zelle insgesamt weniger ACSL3 vorhanden ist, aber dass es zu einer substanziellen Verschiebung von ACSL3 in den postnukleären Überstand kommt und dort offenbar zu einer Verschiebung in LD. Die Gesamtanalyse ergab, dass eine OA-stimulierte A431-Zelle durchschnittlich ca. 6.780 Moleküle ACSL3 pro LD enthält.

Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde auf die kritischen Stellen des experimentellen Modells eingegangen. Abgesehen von der statistischen Problematik des niedrigen Stichprobenumfanges gab es vornehmlich neuralgische Punkte im Versuchsaufbau, u. a. Fehleranfälligkeit bei der Zentrifugation, Probengewinnung und -aufbereitung, überdies hohe Nachweisgrenzen in den biochemischen Tests sowie Artefakte bei Zellfixierungs- und Färbemethoden.

Nichtsdestotrotz ist mit der vorliegenden Arbeit erstmalig ein Protokoll beschrieben worden, das die ACSL3-Verteilung innerhalb von A431-Zellen und insbesondere auf LD näherungsweise quantifiziert. Ein Vergleich mit anderen Proteinen verdeutlicht zudem, dass ACSL3 im LD-Proteom zu den prominentesten Proteinen gehört. Erstmalig ist somit die Hypothese über die Bedeutung der ACSL3 als potentielles LD-Gerüstprotein mit absoluten Werten untermauert worden.

Es wird Aufgabe weiterer Arbeiten sein, das experimentelle Protokoll weiterzuentwickeln, alternative Methoden und Modellzellsysteme zu testen, Störfaktoren zu reduzieren und den Stichprobenumfang zu erweitern, um die Qualität von Quantifizierungsmessungen nicht nur für ACSL3, sondern auch für andere Proteinspezies des LD-Proteoms zu steigern. Insofern ist diese Dissertation im Spannungsfeld der Grundlagenforschung als Beitrag zu sehen, die Entschlüsselung des LD-Proteoms voranzutreiben. Die erhofften Erkenntnisse über Größe, Menge, Konzentration, enzymatische Aktivität und Energiebilanzen von Proteinen wie ACSL3 auf der Ebene der LD-Membran werden den Fundus bilden, aus dem man schöpfen wird, um zukünftig physiologische und pathologische Prozesse im zellulären Fettstoffwechsel besser zu verstehen. Als potentielle molekulare Zielstrukturen nährt das verbesserte Verständnis über LD-Proteine die Hoffnung, neue bahnbrechende diagnostische und therapeutische Wege in der Medizin zu beschreiten.