

Amelie Irmgard Ursula Maria Gräfin Finck von Finckenstein

Dr. med.

Lipidtröpfchenhomöostase im U2-OS Modell: Eine Charakterisierung von Perilipin 1, 2, 3 und 5

Fach/Einrichtung: Innere Medizin

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

Lipidtröpfchen sind dynamische Zellorganellen. Sie bestehen aus einem hydrophoben Kern aus Neutrallipiden, der von einem Phospholipidmonolayer umgeben ist. Eine Dysregulation des Lipidtröpfchenmetabolismus kann beim Menschen zu einer Reihe von Erkrankungen führen.

Vor der Erstellung der Arbeit stand die Frage, inwieweit Perilipin 3 den Phänotyp der U2-OS Zellen beeinflusst. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, die Bedeutung der strukturellen Domänen von Perilipin 2 und Perilipin 3 bei der Lokalisation auf Lipidtröpfchen zu untersuchen. Zudem beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Charakterisierung von Perilipin 1, 2, 3 und 5 und deren Einfluss auf die Lipidtröpfchenhomöostase. Dabei wurde insbesondere der Phänotyp der *Perilipin2/Perilipin3-double-knockout* U2-OS Zelllinie untersucht. Dieser Phänotyp ist durch viele kleine, sogenannte Mikrolipidtröpfchen, geprägt und sollte in dieser Arbeit nochmals verifiziert werden. Weiterhin sollte herausgefunden werden, inwieweit die Bildung von besonders großen Lipidtröpfchen, sogenannten *supersized* Lipidtröpfchen, Perilipin-abhängig ist.

Methodisch wurden neben Standardverfahren der Zellkultur die transiente und stabile retrovirale Transfektion sowie die Restriktionsklonierung genutzt. Zur Identifizierung von Lipidtröpfchen wurden der Lipidtröpfchen Marker A3_{Nt} sowie die Neutrallipidfarbstoff LD540 und MDH verwendet. Die Fluoreszenzmikroskopie diente der Darstellung von Lipidtröpfchen und wurde für die Aufnahme von Bildern genutzt. Die Bilder wurden anschließend mit ALDQ und ImageJ ausgewertet.

Im Ergebnis konnte der Phänotyp der *Perilipin2/Perilipin3-double-knockout* Zellen bestätigt werden: Die Zellen weisen eine große Anzahl an Mikrolipidtröpfchen auf. Es hat sich außerdem erneut gezeigt, dass sich die Mikrolipidtröpfchen nur mit dem A3_{Nt}-Lipotracker, nicht aber mit dem Neutrallipidfarbstoff LD540 anfärben ließen. Zur umfassenden Darstellung der gesamten Lipidtröpfchenpopulation einer Zelle sollte daher A3_{Nt}-Lipotracker genutzt werden.

Allerdings konnte in dieser Arbeit nicht herausgestellt werden, ob eine strukturelle Domäne von Perilipin 3 für den Phänotyp der Perilipin2/Perilipin3-*double-knockout* Zellen verantwortlich ist. Die hier verwendeten Deletionsmutationen von Perilipin 3 zeigten mikroskopisch keine Änderung des Phänotyps. Es konnte aber gezeigt werden, dass sowohl der N- als auch der C-Terminus von Perilipin 3 auf Lipidtröpfchen lokalisieren können. Dabei hat sich herausgestellt, dass die vollständige 11-mer Region von Perilipin 3 und für Perilipin 2 nicht für die Lipidtröpfchenassoziation notwendig ist. Nach einer N-terminalen Deletationsmutation von Perilipin 2 konnte der C-Terminus des Proteins allein auf Lipidtröpfchen detektiert werden.

Bei einer weiteren Untersuchung von Perilipin 3 wurde deutlich, dass das GFP-*Tag* mit der Lokalisation des Proteins auf Lipidtröpfchen interferiert. Dies gilt insbesondere für das N-terminal deletierte Konstrukt, welches die Aminosäuren 87-434 enthält. Auch bei dem vollständigen mit GFP markierten Perilipin 3 konnte bei transienter Transfektion in einigen Zellen eine vermehrte zytoplasmatische Expression festgestellt werden. Damit wird deutlich, dass GFP nur bedingt für die Markierung von Perilipin 3 auf Lipidtröpfchen geeignet ist. Eine HA-Markierung scheint für Deletationsmutanten besser geeignet.

Aus den Experimenten geht erstmals hervor, dass die Expression von *supersized* Lipidtröpfchen Perilipin abhängig ist. Die Überexpression von Perilipin 1 und Perilipin 5 in den Perilipin2/Perilipin3-*double-knockout* Zellen führte zu einer signifikant gesteigerten Ausbildung von *supersized* Lipidtröpfchen. Da die Perilipin2/Perilipin3-*double-knockout* Zelllinie als Perilipin- defizientes Zellmodell angesehen werden kann, ist hier von einer spezifischen Beobachtung ohne Interferenz mit anderen Perilipinen auszugehen. Eine Überexpression von Perilipin 5 in Wildtyp U2-OS Zellen zeigte ebenfalls eine signifikante Zunahme der *supersized* Lipidtröpfchen. Mit Perilipin 1 und Perilipin 5 konnte ein neuer beeinflussender Parameter auf die Ausbildung von *supersized* Lipidtröpfchen identifiziert werden.

Mit dieser Arbeit konnte die Rolle von Perilipin 1, 3 und 5 genauer beschrieben werden. Zukünftig gilt es, den verantwortlichen Parameter für den Phänotyp von Perilipin2/Perilipin3-*double-knockout* Zellen zu definieren. Außerdem sollte der neu ermittelte Effekt von Perilipin 1 und 5 auf die Bildung von *supersized* Lipidtröpfchen in anderen Modellen verifiziert und der therapeutische Nutzen herausgestellt werden.