

ABSTRACT

Excessive consumption of energy-dense, lipid-rich foods promotes the development of obesity, diabetes, and atherosclerosis. Moreover, a high-fat diet increases the incidence of inflammatory bowel disease (IBD) and constitutes a significant risk factor for the development of colorectal cancer. Intestinal lipid absorption is a complex, multistep process initiated by the micellization of dietary fats by bile acids, followed by their digestion in the intestinal lumen, primarily by pancreatic lipase, the uptake of fatty acids (FA) and glycerol by enterocytes, and the subsequent resynthesis of triglycerides (TG) in the endoplasmic reticulum (ER). Following resynthesis, TGs may either be directed for secretion into the systemic circulation in specialized particles known as chylomicrons or stored in lipid droplets (LD) within intestinal epithelial cells. Aberrant activation of signalling cascades and hormonal imbalances are triggered by dietary fat overconsumption, and members of the Protein Kinase D (PKD) family have been found to be involved in several mechanisms mediating metabolic homeostasis. In our previous study, we identified that inhibition of protein kinase D2 in the intestine protects against the development of obesity due to reduced output of chylomicrons from the intestine. In the presented work, we aimed to identify additional mechanisms involved in lipid processing by intestinal epithelial cells, and we focused on pathways regulating lipid storage in lipid droplets (LD) and dependent on PKD2. We found that LDs in enterocytes forming in response to acute lipid challenge are bigger in size in the absence of PKD2 compared to wild-type mice, and their clearance is impaired. That is in line with aberrant trafficking of LD-associated lipases, which do not associate with LDs. We show that Golgi-resident PKD2 together with Golgi apparatus-resident proteins co-localize with LDs in PKD2-intact enterocytes, while kinase depletion results in Golgi apparatus disruption. Moreover, we identified that ingestion of dietary lipids physiologically triggers proteolysis of a rate-limiting lipase, ATGL, both *in vivo* and in mouse intestinal organoids, but it is prevented in enterocytes depleted of PKD2. We identify PKD2 as a novel regulator of LD metabolism, which indirectly controls lipolysis via enabling ATGL trafficking from the Golgi apparatus to LDs in enterocytes of the small intestine. Identification of the physiological event of ATGL degradation induced by dietary fat ingestion brings a novel insight into the metabolic adaptation capacity of intestinal epithelium. We hope that the data presented in this work not only contribute to a better understanding of mechanisms that govern intestinal lipid metabolism, but in a long term-perspective also lead to the discovery of novel

therapeutic targets for pharmacological intervention in the treatment of obesity, diabetes, atherosclerosis, and IBD.

STRESZCZENIE

Nadmierne spożycie wysokoenergetycznej żywności bogatej w lipidy sprzyja rozwojowi otyłości, cukrzycy i miażdżycy. Ponadto dieta wysokotłuszczowa zwiększa częstość występowania nieswoistych chorób zapalnych jelit (IBD; z ang. *inflammatory bowel diseases*) oraz stanowi istotny czynnik ryzyka rozwoju raka jelita grubego. Wchłanianie lipidów w jelicie jest złożonym, wieloetapowym procesem, zapoczątkowanym przez micelizację tłuszczów pokarmowych przez kwasy żółciowe, a następnie ich trawienie w świetle jelita, głównie przez lipazę trzustkową, wychwyt kwasów tłuszczowych (FA; z ang. *fatty acids*) i glicerolu przez enterocyty oraz wtórną syntezę triglicerydów (TG; z ang. *triglycerides*) w retikulum endoplazmatycznym (ER; z ang. *endoplasmic reticulum*). Po resyntezie TG mogą być kierowane do wydzielania do krążenia ogólnego w wyspecjalizowanych cząstkach zwanych chylomikronami lub magazynowane w kroplach lipidowych (LD; z ang. *lipid droplets*) w komórkach nabłonka jelitowego. Nadmierne spożycie tłuszczów pokarmowych prowadzi do nieprawidłowej aktywacji kaskad sygnałowych oraz zaburzeń hormonalnych, a wykazano, że przedstawiciele rodziny kinaz białkowych D (PKD; z ang. *Protein Kinase D*) uczestniczą w wielu mechanizmach pośredniczących w utrzymaniu homeostazy metabolicznej. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy, że hamowanie kinazy białkowej D2 (PKD2) w jelicie chroni przed rozwojem otyłości na skutek ograniczenia wydzielania chylomikronów z jelita. W niniejszej pracy skupiono się na dodatkowych mechanizmach zaangażowanych w metabolizm lipidów przez komórki nabłonka jelitowego, koncentrując się na zależnych od PKD2 szlakach regulujących magazynowanie lipidów w LD. Wykazano, że LD powstające w enterocytach w odpowiedzi na posiłek wysokotłuszczowy są większe u myszy pozbawionych PKD2 niż u myszy dzikiego typu, a ich usuwanie jest upośledzone. Zjawisku temu towarzyszy nieprawidłowy transport lipaz związanych z LD, które nie ulegają prawidłowej rekrutacji do kropli lipidowych. Wykazano również, że w enterocytach z zachowaną ekspresją PKD2 kinaza ta, zlokalizowana w aparacie Golgiego, wraz z innymi białkami rezydującymi w tym organellum, kolokalizuje z LD, podczas gdy delecja kinazy prowadzi do dezorganizacji aparatu Golgiego. Ponadto stwierdzono, że spożycie lipidów pokarmowych fizjologicznie indukuje proteolizę ATGL, kluczowej lipazy LD, zarówno *in vivo*, jak i w mysich organoidach jelitowych, jednak proces ten nie zachodzi w enterocytach pozbawionych PKD2. Uzyskane wyniki pozwalają zidentyfikować PKD2 jako nowy regulator metabolizmu LD, który pośrednio kontroluje lipolizę poprzez umożliwienie transportu ATGL z aparatu Golgiego do LD w enterocytach jelita cienkiego. Identyfikacja fizjologicznego zjawiska degradacji ATGL

indukowanej spożyciem tłuszczów pokarmowych dostarcza nowych informacji na temat zdolności nabłonka jelitowego do adaptacji metabolicznej. Przedstawione w tej pracy dane nie tylko przyczyniają się do lepszego zrozumienia mechanizmów regulujących metabolizm lipidów w jelicie, lecz także mogą w dłuższej perspektywie umożliwić identyfikację nowych celów terapeutycznych dla interwencji farmakologicznych w leczeniu otyłości, cukrzycy, miażdżycy oraz IBD.