

Barbara Lorch
Dr. med.

Klonierung und Charakterisierung von FATP1- und FATP4- GFP-Fusionsplasmiden

Geboren am: 26.09.1978 in Basel/Schweiz
Staatsexamen am 03.06.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. Th. Herrmann

Langkettige Fettsäuren stellen eine wichtige Energiequelle für Pro- und Eukaryonten dar. Um ihre Funktion in der Zelle erfüllen zu können, müssen langkettige Fettsäuren zunächst die Plasmamembran passieren. Der genaue Mechanismus dieser Passage wird kontrovers diskutiert. Zum einen wurde beschrieben, dass eine freie Diffusion der Fettsäuren durch die Plasmamembran möglich ist. Zum anderen häuften sich jedoch im Laufe der Jahre die Hinweise, dass die zelluläre Aufnahme langkettiger Fettsäuren eine Kombination aus passiver Diffusion und proteinvermitteltem Transport ist. Es wurden verschiedene Proteine identifiziert, die mit dem Fettsäuretransport in Zusammenhang stehen, wobei den Mitgliedern der FATP-Familie die größte Bedeutung beigemessen wurde. Der genaue molekulare Mechanismus, durch welchen die FATPs die Fettsäureaufnahme vermitteln, ist nach wie vor unbekannt. Ein wichtiger Schritt hin zum besseren Verständnis der Funktion ist das Wissen um die genaue subzelluläre Lokalisation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung von FATP1- bzw. FATP4-Fusionsproteinen mit GFP, um Hinweise auf die subzelluläre Lokalisation von FATP4 zu gewinnen. Dabei sollten die FATP1-Fusionsproteine als Kontrolle dienen, da die subzelluläre Lokalisation von FATP1 bereits bekannt war.

Im ersten Schritt wurde ein FATP1-Plasmid hergestellt, das die komplette kodierende Sequenz von FATP1 enthielt. Für FATP4 lag ein entsprechendes Plasmid bereits in unserer Arbeitsgruppe vor.

Als nächstes erfolgte die Klonierung der Fusionsproteine, wobei GFP sowohl N- als auch C-terminal mit dem jeweiligen FATP-Protein verbunden wurde. Um GFP am C-terminalen Ende der FATP-Proteine anzuhängen, mussten zunächst die Stoppcodons der FATP-cDNA-Sequenzen durch gezielte Mutation umgeändert werden, so dass es im Rahmen der Translation nicht zu einem Kettenabbruch kam.

Im Anschluss an die Klonierung erfolgte die transiente Transfektion der geschaffenen Plasmide in PtK2 Zellen mit nachfolgender fluoreszenzmikroskopischer Auswertung. Dabei

zeigten sowohl die geschaffenen FATP1- als auch die FATP4-Fusionsproteine ein retikuläres Verteilungsmuster. Für FATP1 war dieses Muster nicht mit der bekannten Lokalisation vereinbar, wobei weiterführende Untersuchungen zeigen müssten, ob sich durch geänderte Transfektionsbedingungen evtl. ein Verteilungsmuster zeigt, das die Plasmamembranlokalisation von FATP1 widerspiegelt.

Die gefundene retikuläre Verteilung der FATP4-Fusionsproteine ist vereinbar mit der mittlerweile beschriebenen Lokalisation von FATP4 im endoplasmatischen Retikulum. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass FATP-GFP-Fusionsproteine erste Hinweise geben können bezüglich der subzellulären Lokalisationsbestimmung, dass jedoch zur endgültigen sicheren Bestimmung weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

Durch die nun bekannte subzelluläre Lokalisation von FATP4 rückt die direkte Transporterfunktion in den Hintergrund, wohingegen die Acyl-CoA-Synthetase-Funktion an Bedeutung gewinnt. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, inwieweit dies auch auf die anderen Mitglieder der FATP-Familie zutrifft.