

Florian Buchkremer
Dr. med.

Molekulare Klonierung und Charakterisierung des murinen Gens für das fatty acid transport protein 4 (mmFATP4, Slc27a4)

Geboren am 23.11.1974 in Basel (Schweiz)
Reifeprüfung am 16.6.1994 in Lörrach
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1995/96 bis SS 2001
Physikum am 11.09.1997 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Indianapolis und Heidelberg
Staatsexamen am 6.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Prof. Dr. med. W. Stremmel

Langkettige Fettsäuren besitzen eine eminente physiologische Bedeutung. Sie sind Bausteine von Phospholipiden und Triglyceriden. Sie werden an Proteine gebunden, modifizieren deren Eigenschaften und ermöglichen ihren gezielten Einbau in spezifische Membrandomänen. Sie sind außerdem Ausgangspunkt der Synthese von Hormonen und wirken selbst als intrazelluläre Signalmoleküle. Schließlich stellen Fettsäuren eine wichtige Energiequelle dar.

An der Translokation freier Fettsäuren aus dem Interstitium über die Plasmamembran in die Zelle hinein sind neben einfacher Diffusion auch aktive, proteinvermittelte Prozesse beteiligt. Diese scheinen gerade bei den niedrigen physiologischen Konzentrationen langkettiger Fettsäuren eine essentielle Rolle zu spielen.

Eine Proteingruppe, die mit diesen Prozessen in Verbindung gebracht wird, ist die Familie der *fatty acid transport proteins*. Diese evolutionär hochkonservierten integralen Membranproteine finden sich in sechs Isoformen in allen Geweben des Wirbeltierorganismus. Homologe Proteine sind von *Caenorhabditis elegans* über Hefen bis hin zu Mykobakterien beschrieben. Eine Überexpression der FATPs führt zu vermehrter Fettsäureaufnahme, ihre gezielte Hemmung durch Antisense-Oligonukleotide zu einer Verminderung. Eine Regulation durch Insulin und PPAR-Agonisten ist für FATP1 eindeutig belegt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Gen des einzigen im Darm exprimierten murinen FATP (mmFATP4) zu klonieren und zu charakterisieren, um weiterführende Studien unter anderem an genetisch veränderten Mäusen zu ermöglichen.

Durch das Screening einer genomischen Phagenbank des Mausstammes 129/OLA konnten zwei das FATP4-Gen enthaltende Klone isoliert werden. Durch Subklonierung und anschließende Sequenzierung wurde die genomische Sequenz des FATP4-Gens bestimmt. Mit Hilfe zweier Genome Walks wurde zusätzliche Sequenzinformation vom 5'-Ende des Gens gewonnen. Insgesamt wurden 18011 bp genomischer Sequenz bestimmt. Neben dem etwa 13,6 kb umfassenden FATP4-Gen wurden 3,8 kb der putativen Promoterregion und 600 bp der 3'-flankierenden Sequenz identifiziert. Mit mehreren 5'- und 3'-RACE-Reaktionen

sowie einer Primer Extensionsreaktion konnten der genaue Transkriptionsstartpunkt und das exakte 3'-Ende des Gens bestimmt werden. Durch Fluoreszenz-in-Situ-Hybridisierung wurde das Gen auf der Bande B des Chromosom 2 lokalisiert. Dieser Bereich ist syntän zur Region 9q34 des Menschen, wo das humane FATP4-Gen identifiziert wurde.

Durch eine RT-PCR wurde die gesamte kodierende Sequenz der FATP4-cDNA amplifiziert. Nach Klonierung und Sequenzierung konnten die kodierenden Bereiche in der genomischen Sequenz bestimmt werden. Außerdem wurden mit diesem Klon Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität des murinen FATP4-Polypeptids durchgeführt: Membranextrakte aus FATP4 überexprimierenden COS1-Zellen zeigen eine erhöhte Acyl-CoA-Synthetase-Aktivität, mit einer Präferenz für sehr langkettige Fettsäuren.

Die Gewebeexpression des FATP4-Gens wurde mittels Northern Blot untersucht: Die stärkste FATP4-Expression fand sich in Dünndarm, Gehirn, Niere, Leber, Haut und Herz.

Ausgehend von computergestützten Analysen wurden wichtige Bereiche des FATP4-Polypeptids charakterisiert und die Stellung des murinen FATP4-Gens innerhalb der FATP-Familie diskutiert.

Basierend auf den im Rahmen dieses Projekts erarbeiteten Informationen zu Struktur und Sequenz des murinen FATP4-Gens wurde in unserem Labor eine FATP4-Knock-out-Maus hergestellt. Homozygote Tiere zeigen Zeichen einer letalen restriktiven Dermopathie und sind Beleg für die essentielle Bedeutung des FATP4-Gens für den Wirbeltierorganismus.