

Sarah Maria Staudacher
Dr. med. dent.

Quantifizierung endogener Proteinexpression der Acyl-CoA-Synthetasen ACSL3 und FATP4 in humanen und murinen Zellen

Fach/Einrichtung: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Fettsäuren haben eine zentrale Rolle im Stoffwechsel: Nach ihrer Aufnahme dienen sie der Zelle als Energiequelle, Signalmolekül und Membranbaustein. Störungen der Fettsäureaufnahme und des Fettsäurestoffwechsels werden mit vielen verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, dazu zählen u.a. Adipositas, Insulinresistenzsyndrom, Altersdiabetes, Arteriosklerose, Hypertonie und die periphere arterielle Verschlusskrankheit. Daraus geht hervor, dass die Fettsäureaufnahme strengstens reguliert werden muss, um Krankheiten zu vermeiden und die Untersuchung der an der Fettsäureaufnahme beteiligten Proteine hohe medizinische Relevanz besitzt.

Bevor Fettsäuren dem Stoffwechsel zugänglich sind, müssen sie durch Acyl-CoA-Synthetasen aktiviert werden. Die Langketten Acyl-CoA Synthetase 3 (ACSL3) verestert höherkettige Fettsäuren mit Coenzym A und ist als einziges ACS Enzym auf Lipidtröpfchen lokalisiert. Das *Fatty Acid Transport Protein 4* (FATP4) verestert lang- und sehr langkettige Fettsäuren. Beide Acyl-CoA-Synthetasen haben durch die Aktivierung der Fettsäuren eine wichtige Funktion im Fettsäurestoffwechsel. Für die Analyse des Fettsäurestoffwechsels ist die absolute Quantifizierung der Proteinmenge wichtig. Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erlaubt Rückschlüsse auf die Stöchiometrie innerhalb des Fettsäuretransportes, verschiedener Proteinkomplexe und auf das Zusammenwirken der Proteine innerhalb eines metabolischen und regulatorischen Systems.

In dieser Arbeit wurde eine Methode etabliert, mit der es möglich ist, die absolute Proteinmenge der beiden ACS, ACSL3 und FATP4, in zwei verschiedenen Zellkultursystemen zu ermitteln. Um physiologische Modelle zu erhalten, wurden A431 und C2C12 Zellen ausgewählt, da beide Zelllinien relevante Modellsystem im Fettsäurestoffwechsel sind.

Für die Quantifizierung absoluter Proteinmengen wurden in mehreren Schritten rec. Proteinstandards für ACSL3 und FATP4 präpariert, die im Western-Bot als Referenzstandards eingesetzt wurden und mit denen sich die absolute Proteinmenge densitometrische mit Image J ermitteln ließ.

Zur Herstellung des rec. Proteinstandards für FATP4 wurde eine verkürzte Variante von FATP4 kloniert, bei dem der Membrananker weggelassen wurde. Durch die Lokalisierung im Cytosol erhoffte man sich später eine vereinfachte Aufreinigung der Proteine. Mittels retroviraler Transduktion wurden stabile MDCK-Zellen hergestellt, die FATP4 überexprimierten. Für den rec. Proteinstandard für ACSL3 wurde das Fusionsprotein GST-ACSL3 verwendet, welches mit Hilfe des *E.coli*-Bakterienstammes BL21 gewonnen wurde. Anschließend folgte die Aufreinigung der beiden rekombinanten Proteine zur Herstellung des Proteinstandards. Die jeweiligen Proteinmengen an ACSL3 und FATP4 in A431 und C2C12 Zellen wurden mittels Western Blot analysiert und die absoluten Proteinmengen durch Korrelation mit dem hergestellten Proteinstandard berechnet. Es wurde jeweils die Proteinmenge in 10^5 A431 und C2C12 Zellen ermittelt. Die Quantifizierung ergab, dass sich in 10^5

A431-Zellen 21,57 ng ACSL3 und 1,75 ng FATP4 befinden. 10^5 C2C12 Zellen enthalten 5,97 ng ACSL3 und 0,83 ng FATP4. Frühere Versuche der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass die mRNA-Expression von ACSL3 in A431 und C2C12 Zellen signifikant (100-2000-fach) höher ist als die mRNA-Expression von FATP4. Obwohl die Proteinexpression von ACSL3 und FATP4 in den Zelllinien A431 und C2C12 variiert, konnte ebenfalls auf Proteinebene ein Expressionsunterschied gezeigt werden. Dieser ist jedoch geringer als auf mRNA-Ebene: die Proteinexpression von ACSL3 ist 10-30-fach höher als die des FATP4. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass zwischen Transkription und Translation ein weiterer Regulationsmechanismus besteht, und dass durch unterschiedliche Expressionsmengen in verschiedenen Zelllinien, die aus verschiedenen Geweben stammen, die ACS gewebespezifische Funktionen besitzen. Die in dieser Arbeit etablierte Methode soll in aufbauenden Studien eingesetzt werden, um weiter absolute Proteinquantifizierungen zu erhalten, den Fettsäurestoffwechsel zu analysieren und neue physiologische Zusammenhänge zu erkennen. So kann nun die Stöchiometrie des Fettsäuretransportes und das Zusammenspiel verschiedener Proteine in einem metabolischen und regulatorischen Netzwerks in weiteren Studien untersucht und analysiert werden.