

Friedrich Ehehalt  
Dr. med.

## **Differentielle Expression von ACSLs, FATPs und ACSBGs in humanen A431-Zellen und C2C12-Zellen der Maus**

Fach/Einrichtung: Innere Medizin  
Doktorvater: Prof. Dr. Joachim Füllekrug

Fettsäuretransportproteine stellen einen der Hauptkomponenten des Transportes von energieliefernden Fettsäuren in Zellen dar. Je nach Größe der zu transportierenden Fettsäure gibt es unterschiedliche Proteine und Klassen, die in diversen Zellen unterschiedlich hoch exprimiert werden. Neben dem Transport erfüllen sie noch viele weitere Funktionen, wie als Komponenten in biologischen Membranen oder als Mediatoren bei Signaltransduktion und physiologischen Regulatoren. Sie werden bei Störungen der Fettsäureaufnahme oder des Fettsäurestoffwechsels u.A. mit verschiedenen Krankheiten, wie Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2, Arteriosklerose, Hypertonie oder periphere arterielle Verschlusskrankheit in Verbindung gebracht. Die Fettsäuren haben nach Veresterung und somit Aktivierung durch die Acyl-CoA-Synthetasen wichtige Funktionen im Fettstoffwechsel. Für die Analyse des Fettstoffwechsels ist die Quantifizierung der Proteinmenge wichtig. Einen Anhalt darauf, um welche mögliche Gewichtung der Proteine es sich vor der Translation handeln, bieten die Ergebnisse dieser Arbeit. Der Vergleich der mRNA-Expression ist eine Möglichkeit, die quantitative Exprimierung der Gene bis vor der Regulation und Eintritt in die Translation nachzuvollziehen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Subklassen der Langketten Acyl-CoA-Synthetasen (ACSLs), Fettsäuretransportproteine (FATPs) und Bubblegum Acyl-CoA-Synthetasen umfassen insgesamt dreizehn homologe Proteine die langkettige und sechlangkettige Fettsäuren zu Acyl-CoAs aktivieren. In Gain- und Loss-of-funktion Studien zeigten sich deutliche Unterschiede in der Fähigkeit dieser Enzyme Fettsäuren in verschiedene Wege der Lipidsynthese zu kanalisieren. Die Fähigkeit der Proteine die Aufnahme von Fettsäuren zu verbessern, setzt nicht immer voraus, dass sich diese Proteine an der Plasmamembran befinden müssen. Die Aufnahme der Fettsäuren wird mitunter auch durch Steigerung der Umwandlung von Acyl-CoA und seinem Stoffwechselweg erhöht.

Die Zielsetzung dieser Arbeit beinhaltet das Herausfinden der differentiellen Expression von mRNA dieser Fettsäuretransportproteine der Subklassen ACSL, ACSBG, und FATP anhand ausgewählter humaner A431- und muriner C2C12-Zelltypen und deren Vergleich zueinander. Ebenso wurde in beiden Zelltypen CD36 untersucht, welchem eine ähnliche Funktion zugeschrieben wird. Dabei ging es auch darum, die Methode der mRNA-Messung in C2C12- und A431-Zellpopulationen als Grundstock zu etablieren um einen Ausgangspunkt für weitere Arbeiten zu liefern.

Zur Durchführung der Arbeit bedurfte es zunächst zellbiologischer Methodik zur Kultivierung der Zelllinien und deren RNA-Isolierung. Die mRNA wurde im Verlauf zu cDNA mittels einer reversen Transkription umgeschrieben. Die cDNA dann durch eine Kontroll-PCR mit Gelelektrophorese kontrolliert und die Expression mittels Sybr-Green in einer qPCR (LightCycler) gemessen. Aktin diente hierbei zu Relativierung der Ergebnisse untereinander als Housekeeping-Gen und wurde in jedem Versuchsansatz der qPCR mitgeführt. Jeder Lauf (96-Well-Platte) der qPCR wurde zur Validierung 3x durchgeführt, bei jeweils Dreifachbestimmung sämtlicher Messungen in jedem Lauf. Zur Kalibrierung unterschiedlicher Effizienz der PCR wurden DNA-Plasmide für die Etablierung von Verdünnungsreihen der jeweiligen Gene erstellt. Hieraus konnten die für in einer rtPCR durchgeführten Messungen und Einordnungen derer essentiellen Standardkurven generiert werden.

Bei der Herstellung der Plasmide wurde durch Wahl eines geeigneten Template und Design von Primern zunächst der Bereich der zu untersuchenden Gene mittels PCR vervielfältigt. Nach Aufreinigen der DNA folgte eine Ligation mittels eines pGEMT-Vektorplasmids und Transformation mit komp. E. coli. Nach Selektion und erneuter Kultivierung der Kolonien konnte darauf eine Plasmid-DNA-Präparation stattfinden und diese mittels einer PCR des Inserts sowie eines Restriktionsverdau und jeweiliger Agarosegelelektrophorese kontrolliert werden. Handelte es sich beim Insert um ein PCR-Produkt (positive Präparation), so wurde eine Sequenzierung des Plasmids vorgenommen. Durch biophotometrische Messung der vervielfältigten gewünschten DNA konnte hieraus die Verdünnungsreihe etabliert werden. Alle Endprodukte der rtPCR wurden zum Ende zur Validierung erneut in einer Agarosegel-Elektrophorese validiert.

Die Analysen der mRNA Expression der ACS-Familie zeigten eine erfolgreiche reliable Etablierung der Gene. Es konnte gezeigt werden, dass in den verwendeten Zelllinien, mehrere ACS gleichzeitig auf unterschiedlichem Niveau exprimiert wurden. So ergab sich in der Auswertung der Ergebnisse eine (mit Ausnahme von ACSBG2) insgesamt höhere relative Expression sämtlicher untersuchter Gene in C2C12-Zellen als in A431-Zellen (um physiologische Modelle zu erhalten, wurden diese Zelllinien ausgewählt, da sie relevante Modellsysteme im Fettsäurestoffwechsel bieten). Die Relationen zwischen den murinen und humanen Genen sind insbesondere bei niedrig gemessener Expression eines Gens z.T. sehr unterschiedlich und können wesentlich höher exprimiert sein. FATP2 konnte in beiden Zelltypen in keinem Lauf nachgewiesen werden. Humane als auch murine ACSLs zeigten im Vergleich zu den anderen untersuchten Subklassen eine jeweils deutlich höhere relative Expression. In A431-Zellen zeigte sich zur Einordnung beispielsweise hACSL3 als in dieser Subklasse höchstexprimiertes Gen ca. 230fach höher als das in der FATP-Subklasse höchstexprimierte hFATP3. In C2C12-Zellen stellte sich das höchstexprimierte mACSL4 mit seiner relativen Expression 240fach höher dar als das in der FATP-Subklasse am höchsten exprimierte mFATP4. In der Subklasse der ACSBG zeigte sich einzig bei in dieser Arbeit untersuchten Gene das hACSBG2 in A431-Zellen höher exprimiert als sein Pendant in C2C12-Zellen und ist im Mittelfeld der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zu finden. Murines ACSBG2 ist in C2C12-Zellen nur sehr gering exprimiert – bis auf die nicht zu detektierbaren FATP2 wurde es insgesamt am niedrigsten gemessen. hACSBG1 zeigte eine fast 430fach niedrigere Expression als sein Pendant mACSBG1 auf und liegt somit in etwa im Bereich Range der Expression der hFATPs. Die relative Expression von murinen CD36 in C2C12-Zellen ist mit einer ca. 2,5fach höheren Expression gegenüber dem in seiner Subklasse am höchstexprimierten mFATP4 am ehesten mit der Subklasse der mFATP vergleichbar. Humanes CD36 in A431-Zellen ist ca. 150fach geringer exprimiert und zeigt im Vergleich mit der FATP-Subklasse eine mittlere Expression (ähnlich hFATP5) auf.

Insgesamt wurde darauf geachtet, die Populationen keinen zellulären Stress auszusetzen, da dies mit einer ggf. Modifikation der Exprimierung einhergehen könnte. Aufbauend auf dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass in Vergleichen mit Proteinexpressionen die mRNA-Expression signifikant höher ist. Es lässt sich somit schlussfolgern, dass zwischen der Transkription und Translation weitere Regulationsmechanismen bestehen müssen. Ebenso bestehen unterschiedliche Expressionsmengen in verschiedenen Zelllinien (verschiedener Gewebe).

Insgesamt konnte im Rahmen dieser Arbeit die Subklassen der ACS in den Zelllinien etabliert werden. Wie beschrieben ist die Beteiligung von Fettsäuren an verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen ein hoher Stellenwert beigemessen, da sie eine wichtige Rolle für die Homöostase der Zellen spielen. Die Messung der Expression der mRNA der Subklassen legt daher eine Ausgangssituation für weitere zukünftige Überlegungen im Bereich des Stoffwechsels der Zellen und dessen Regulationen dar.

Gegenüber anderer Messverfahren (Enzymaktivitäten/WesternBlot) zeigt die Untersuchung des Zwischenproduktes der Proteinbiosynthese in Form der Expression der mRNA einen

Ausgangswert vor der darauffolgenden Translationsmodifikation zum Proteinendprodukt auf. Es kann in aufbauenden Studien eingesetzt werden, um den Fettsäurestoffwechsel weiter zu analysieren und neue physiologische Zusammenhänge zu erkennen und für klinische Fragestellungen zu verstehen.