

Julia Nadina Föhr

Dr. med.

Fettsäurestoffwechsel: Klonierung und Charakterisierung relevanter humaner Proteine aus der Fatty acid-binding Protein- und Acyl-CoA Thioesterase-Familie

Fach: Innere Medizin

Doktorvater: apl. Prof. Dr. rer. nat. Joachim Füllekrug

Fatty acid-binding Proteine und Acyl-CoA Thioesterasen spielen im komplexen Netz des Fettstoffwechsels im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle. Fatty acid-binding Proteine transportieren nicht nur Fettsäuren innerhalb von Zellen. Sie wirken auch auf den Gesamtmetabolismus ein: Beispielsweise durch deren Sekretion, aber auch durch Modulation der Transkription. Dadurch beeinflussen sie nicht nur zahlreiche metabolische Erkrankungen, sondern auch die Zellproliferation. Sie tragen damit zur Begünstigung verschiedener Tumorentitäten bei. Dies ermöglicht ihre Nutzung als mögliche Biomarker oder auch als denkbare therapeutische Zielstrukturen.

Acyl-CoA Thioesterasen modulieren die Verfügbarkeit und das Gleichgewicht zwischen Acyl-CoA und freien Fettsäuren. Zudem wirken auch sie auf verschiedene Signalwege in der Zelle ein. So sind sie ebenfalls bei metabolischen und entzündlichen Erkrankungen involviert. Des Weiteren finden sie sich in der Tumorgenese als treibende Kraft.

Eine gemeinsame Schnittstelle im Stoffwechsel stellen Peroxisom-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren dar. Hier zeigt sich sowohl eine direkte Interaktion mit den Rezeptoren als auch eine Veränderung der Expression von Fatty acid-binding Proteinen und Acyl-CoA Thioesterasen durch diese Rezeptoren.

In dieser Arbeit wurden relevante Vertreter der Fatty acid-binding Proteine und Acyl-CoA Thioesterasen kloniert und charakterisiert. Dazu diente das Modellsystem der COS-7 Zellen. Die gebrauchte cDNA wurde aus Proben humaner Zelllinien synthetisiert und einkloniert. Es wurden Expressionplasmide mit den ausgewählten Vertretern der Proteinfamilien mit GFP, FLAG oder mCherry kloniert. Dies erfolgte im größten Ausmaß für die Fatty acid-binding Proteine 4 und 5. Hier wurden auch Plasmide für die stabile Expression in einer eigenen Zelllinie kloniert.

Weitere Plasmide dienten der Verankerung von Fatty acid-binding Proteine 5 und 7 an Membranen über den N-Terminus der Long-chain Acyl-CoA Synthetase 3 und Adipophilin. Dies wurde durch Inkubation mit Ölsäure ergänzt. Die Fusionsproteine der Acyl-CoA Thioesterasen 1 und 7 wurden ebenfalls mit Ölsäure inkubiert.

Alle Fusionsproteine konnten über das FLAG-Epitop in der Immunfluoreszenz dargestellt werden. Für Fatty acid-binding Proteine 5 und 7 gelang dies zusätzlich über spezifische Antikörper.

Über Western Blot konnten Molekulargewicht der Fusionsproteine verifiziert werden. Durch Densitometrie konnte die relative Expression im Verhältnis zu β -Aktin bestimmt werden. Dies wurde ergänzt durch die Analyse der Expression über Real-time PCR im Verhältnis der mRNA der untersuchten Fatty acid-binding Proteine zu β -Aktin.

Bei der Klonierung der Fatty acid-binding Proteine und Acyl-CoA Thioesterasen zeigten sich unerwartete Ergebnisse. Besonders hervorzuheben ist hier die einklonierte Sequenz von Pseudogen 8 von FABP5.

Die Lokalisation der Fusionsproteine bestätigte sich stets der Erwartung nach zytosolisch. Bei den untersuchten Fatty acid-binding Proteine und der Acyl-CoA Thioesterase 1 zeigte sich in dieser Arbeit zusätzlich eine deutliche nukleäre Lokalisation. Über die Immunfluoreszenz konnte die zytosolische und teils nukleäre Lokalisation der Fusionsproteine genauer verglichen und beschrieben werden.

Bei der Membranverankerung wurde ebenfalls eine gleichmäßige Bildung von Lipidtröpfchen, hier durch Kotransfektion mit dem grünfluoreszierenden N-Terminus der Long-chain Acyl-CoA Synthetase 3, sichtbar. In der Koexpression zeigte sich eine gleichmäßige Darstellung von Lipidtröpfchen ohne Koloakalisation im Zytosol.

Die Analyse von Lipidtröpfchen über Oil red O nach Ölsäureinkubation und die Lipidaufnahme über Bodipy C16 mit den stabil Fatty acid-binding Proteine 5 und 4 exprimierenden Zelllinien zeigte eine gleichmäßige Fluoreszenz mit größeren Lipidtröpfchen bei Fatty acid-binding Proteine 4 in der Baseline.

Über Quantifizierung mittels Real-time PCR ergaben sich Hinweise, dass sich durch die stabile Expression von Fatty acid-binding Proteine 4 und 5, die Expression anderer Fatty acid-binding Proteine zu ändern scheint.

Das Ziel dieser Arbeit wurde erreicht, da die Fatty acid-binding Proteine 3, 4, 5 und 7 sowie die Acyl-CoA Thioesterasen 1 und 7, insbesondere Isoform 4, erfolgreich in Zellen exprimiert und näher charakterisiert werden konnten.

Generell wäre es einfacher, wenn sich international die numerische Bezeichnung der Fatty acid-binding Proteine durchsetzen würde.

Die Thematik des Fettsäurestoffwechsels und damit einbegriffen die Familien der Fatty acid-binding Proteine und der Acyl-CoA Thioesterasen gewinnt weiterhin an Relevanz. Der Forschungsbedarf erstreckt sich über physiologische, metabolisch-endokrinologische und onkologische Fragestellungen. In Zukunft könnten sie sich als Biomarker und therapeutische Zielstrukturen etablieren.