

Analysis of Gene Regulatory Functions of the Human Acyl-CoA-Binding-Protein in Lipid Metabolism

Dipl. troph. Christina Vock

1. Berichtersteller: Prof. Dr. F. Döring

Das humane Acyl-CoA-Bindungsprotein (ACBP) ist ein ubiquitär exprimiertes und multifunktionelles Protein. ACBP ist im Cytosol, im Zellkern, am endoplasmatischen Retikulum sowie am Golgi-Apparat lokalisiert. ACBP dient zur Speicherung von zellulären Acyl-CoAs und ist mit dieser Funktion maßgeblich am Fettstoffwechsel beteiligt. ACBP transportiert Acyl-CoAs in den Zellkern und interagiert mit dem Transkriptionsfaktor Hepatozyten Nukleärer Faktor 4 alpha (HNF-4 α). Durch Glukose und lipogene Faktoren wird das ACBP-Gen in seiner Transkription gesteigert, sowie unter Fasten reprimiert. Diese physiologischen Bedingungen sollen in der vorliegenden Arbeit in Zellkulturexperimenten nachgestellt werden, um die mögliche Funktion des ACBPs in der Genexpression zu untersuchen.

Zur Identifizierung von ACBP-Zielgenen wurden genomweit die Transkriptprofile, nach RNAi-vermittelter ACBP-Depletion in humanen HepG2-Zellen, mittels DNA-Array erfasst. Auf der Basis eines einseitigen Permutations T-Testes ($p < 0.05$) konnten 256 herunter-regulierte und 198 hoch-regulierte Transkripte, bei einer minimalen Veränderung des 1.32-fachen, erfaßt werden. 10 ausgesuchte Transkripte wurden durch quantitative RT-PCR nach dem TaqMan-Prinzip verifiziert. Die Ergebnisse bestätigen die hohe Genauigkeit der Array-Daten. Eine Gen-Annotations-Anreicherungs-Analyse sowie eine funktionelle Allokation der ACBP-sensitiven Gene führten zur Identifizierung von 18 reprimierten Genen. Diese kodieren Schlüsselenzyme der Glyzerolipid- (z.B. mitochondrielle Glycerol -3-Phosphat Acyltransferase), der Cholesterol- (z.B. HMG-CoA Synthase 1, HMG-CoA Reduktase) und Fettsäure- (z.B. Fettsäure-Synthase)-Synthese. Auf Metabolitebene führte die ACBP-Depletion in HepG2-Zellen zu einer signifikanten Erniedrigung der gesättigten C16:0 und der einfach ungesättigten C16:1 und C18:1 Fettsäure um 25%.

Zur weiteren Untersuchung der genregulatorischen Funktion des ACBPs wurden Reporter-Gen-Analysen in HepG2-Zellen und HeLa-Zellen, die kein HNF-4 α exprimieren, durchgeführt. In beiden Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die ACBP-Überexpression die HNF-4 α induzierte Aktivität eines 617bp HMGCS1 Promotorfragments um 75% vermindert. Interessanterweise ist diese Unterdrückung nicht von der Überexpression des HNF-4 α abhängig. Die Aktivität von zwei kürzeren HMGCS1 Promotorfragmenten wird durch ACBP-Expression ebenfalls um das 2-4 fache reduziert. Darüber hinaus führt die ACBP-Überexpression in HeLa-Zellen zur Erniedrigung der HMGCS1 mRNA- bzw. Protein-Spiegel um 40% bzw. 30%. Die HMGCR wird ebenfalls auf Promotor- und mRNA Ebene unter ACBP-Überexpression reprimiert.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass ACBP zentrale Gene des Lipid- und Cholesterinstoffwechsels auf der Ebene der Genexpression reguliert und dass dieser Effekt teilweise auf Metabolitebene abbildbar ist. Durch ACBP-Überexpression konnte die wesentliche Bedeutung des humanen ACBPs als transkriptioneller Regulator der HMG-CoA synthase 1 und der HMG-CoA Reduktase zusätzlich bestätigt werden. Mit der Identifizierung von 454 ACBP-sensitiven Genen ist es schließlich gelungen eine erste Version des humanen ACBP-Regulons zu erstellen.