

Promoter variants and transcriptional regulation of the intestinal fatty acid binding protein gene (*FABP2*)

Dipl. oec. troph. Maja Klapper

Dr.-Vater: Prof. Dr. S. Wolffram

Das humane intestinale Fettsäure-bindende Protein (*FABP2*) ist ein cytosolisches 15 kDa Protein. Es ist an der Resorption von langkettigen Fettsäuren beteiligt. Die Phänotypisierung von *FABP2* knock-out Mäusen und Assoziationsstudien mit beschriebenen Promotorhaplotypen zeigten, dass *FABP2* ein Kandidatengen für Insulinresistenz und verwandte Krankheitsmerkmale ist. Die relevanten *FABP2* Promotorpolymorphismen -80Del>T, -136AGTAG>Del, -168AAG>T, -260G>A, -471G>A und -778G>T resultieren in zwei Haplotypen A und B. Haplotyp B weist eine zwei- bis dreifach niedrigere transkriptionelle Aktivität als A auf. In dieser Arbeit wurde die generelle und Haplotyp-spezifische transkriptionelle Regulation des humanen *FABP2* Promotors untersucht. Hierzu wurden Reportergerneanalysen in humanen Kolonkarzinomzellen Caco-2, Cervixkarzinomzellen Hela und Hepatomzellen Huh7, zielgerichtete Mutagenese und Gel-Retardations-Analysen angewendet. Desweiteren wurde die spezifische Bindung von Hepatozyten Nukleärem Faktor 1 alpha (HNF-1 α), HNF-4 α und GATA Faktoren an die *FABP2* Promotor Haplotypen analysiert. Außerdem wurde die Aktivierung des Promotors durch diese Transkriptionsfaktoren untersucht. Die Faktoren werden im Dünndarm exprimiert und sind an der differenzierungs- und nahrungsabhängigen Genregulation beteiligt.

In Gel-Retardations-Analysen wurden zwei überlappende HNF-1 Bindungsstellen innerhalb der *FABP2* Promotor Regionen -185/-165 und -169/-149 nachgewiesen. Reportergerneanalysen in Caco-2 und Hela Zellen zeigten, dass HNF-1 α ein 836 bp *FABP2* Promotor-Reporter-Konstrukt 3.5- bzw. 20-fach aktiviert. Diese Aktivierung ist unabhängig von dem *FABP2* Promotor Haplotyp. Eine Mutationsanalyse des HNF-1 Elements -185/-165 führte zu einer Erniedrigung der Basalaktivität des *FABP2* Promotorkonstruktes in Caco-2 Zellen um etwa 50 %. Die Mutation des -169/-149 Elements hatte keine relevante Auswirkung auf die Promotoraktivität. Co-Transfektions-Experimente in Hela Zellen mit HNF-1 α zeigten ähnliche Effekte auf die Aktivität der *FABP2* Promotor Mutanten. Weitere Gel-Retardations-Analysen belegen, dass HNF-4 α an Position -336/-324 des *FABP2* Promotors bindet. Die Mutation dieser HNF-4 α Bindungsstelle führte zu einer vollständigen Inaktivierung der *FABP2* Promotor-Reporter Aktivität in postkonfluenten Caco-2 Zellen. In Hela Zellen führte diese Mutation zur Erniedrigung der HNF-4 α -induzierten Aktivierung des *FABP2* Promotors um etwa 50 %. Somit wird die transkriptionelle Aktivität des *FABP2* Promotors durch das identifizierte HNF-4 Bindungselement -336/-324 erheblich beeinflusst. Die Daten zeigen insgesamt, dass der *FABP2* Promotor maßgeblich durch die identifizierten funktionellen HNF1 und HNF4 Erkennungssequenzen reguliert wird.

Um die ursächlichen Polymorphismen für die unterschiedlichen Aktivitäten der *FABP2* Promotor Haplotypen zu identifizieren, wurden Analysen mit einer Vielzahl von chimären *FABP2* Promoter-Reporter-Konstrukten in Caco-2 Zellen durchgeführt. Die Daten zeigen, dass hauptsächlich der Polymorphismus -80Del>T, in Kombination mit -136AGTAG>Del und -168AAG>T, die unterschiedlichen Aktivitäten der *FABP2* Promotor-Haplotypen verursacht. In Übereinstimmung mit diesen Befunden zeigten Gel-Retardationsanalysen, dass die Transkriptionsfaktoren GATA-5 und -6 mit höheren Affinitäten an diejenige *FABP2* Promotorregion binden, die das -80A Allel enthält. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurde in Huh7 Zellen aufgezeigt, dass die GATA Faktoren den *FABP2* Promoter Haplotyp A doppelt so stark aktivieren wie Haplotyp B. Weiterhin wurde eine *FABP2* Promotormutante vom Haplotyp A hergestellt, die das -80B Allel enthält. Die GATA-5 induzierte Aktivität dieser Mutante ist nahezu identisch mit der Aktivität des Haplotyps B. Somit wird die GATA vermittelte differentielle Aktivierung der *FABP2* Haplotypen vom Polymorphismus -80Del>T verursacht.

Insgesamt zeigt die Untersuchung, dass die Transkriptionsfaktoren HNF-1 α und HNF-4 α maßgeblich die Aktivität des *FABP2* Promotors bestimmen. Dieser Effekt wird durch zwei funktionelle Bindungsstellen vermittelt, die sich im *FABP2* Promoter in Position -185/-165 und -336/-324 befinden. Dieser Befund ist vermutlich für die Kontrolle der *FABP2* Expression durch Differenzierung und Nährstoffe, wie zum Beispiel Nahrungsfette, bedeutsam. Die unterschiedlichen Aktivitäten der *FABP2* Promotor Haplotypen werden im Wesentlichen durch GATA Faktoren und den *FABP2* Promotor Polymorphismus 80Del>T bestimmt. Somit liefert diese Arbeit insgesamt Erkenntnisse zur molekularen Basis der generellen und Varianten-spezifischen transkriptionellen Regulation des Diabetes Typ 2 assoziierten humanen *FABP2* Gens.