

Tim-Robin Pyter
Dr. med.

Membrantopologie der Diacylglycerol O-Acyltransferase 2

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

Langkettige Fettsäuren erfüllen vielfältige Funktionen im Körper. Sie dienen als Energiespeicher, als Strukturgeber in Zellmembranen und als Signalmoleküle. Durch Oxidation der Fettsäuren kann Energie gewonnen werden. In ihrer Speicherform werden sie als Cholesterinester oder Triacylglyceride (TGs) in zellulären Lipidtröpfchen (LDs) gelagert. Maßgeblich an der TG-Biosynthese und der Bereitstellung von TGs für Lipidtröpfchen ist das Enzym Diacylglycerol-O-Acyltransferase 2 (DGAT2). Es katalysiert den finalen Schritt der TG-Biosynthese. Es wird angenommen, dass DGAT2 durch die Synthese von TG am endoplasmatischen Reticulum (ER) die Biogenese von LDs unter gewissen Umständen initiieren kann.

Um ein Modellsystem für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von DGAT2 zu entwickeln wurde mit COS-7-Zellen gearbeitet. Zunächst wurde über Transfektion die Lokalisation von DGAT2 untersucht. Hierfür wurde indirekte Immunfluoreszenz bei der Transfektion von Epitop-markiertem hDGAT2-HA3 und Fluoreszenzmikroskopie bei der Transfektion von GFP-DGAT2 verwendet. Beide Protein-Konstrukte waren ausschließlich im ER lokalisiert. Da andere Arbeitsgruppen DGAT2 auch auf LDs zeigten, wurde ein DGAT2-Konstrukt kloniert, das statt dem dreifachen HA-Epitop ein FLAG-Epitop beinhaltet. Hiermit sollte überprüft werden, ob das dreifache HA-Epitop einen Einfluss auf die fehlende LD-Lokalisation haben könnte. Dieses FLAG-DGAT2 wurde über indirekte Immunfluoreszenz detektiert und konnte nach Oleat-Inkubation in einigen Zellen auf LDs nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der beiden Transmembrandomänen (TMDs) von DGAT2 wurde im Folgenden durch eine Deletion der TMDs untersucht. Hierbei zeigte sich im fluoreszenzmikroskopischen Ansatz eine distinkte zytosolische Lokalisation in Standardmedium und eine klare LD-Lokalisation nach Oleat-Inkubation der transfizierten Zellen. Dies zeigt, dass für die Membranassoziation des Proteins nicht ausschließlich die TMDs verantwortlich sind.

Ein Teilziel des Projektes war zu untersuchen, ob die Akkumulation von Triglyceriden in einer doppelschichtigen Membran den entscheidenden Schritt der LD-Biogenese darstellt oder inwiefern sich die Ansammlung von Triglyceriden auf die LD-Biogenese auswirkt. Hierfür wurde über Fusionsproteine oder eine Verlängerung der TMDs von DGAT2 versucht, DGAT2 von ER in die Plasmamembran zu translozieren. Hier sollte im nächsten Schritt die potentielle Biogenese von LDs untersucht werden. Die Verlängerung der TMDs zeigte keine Veränderung in der Lokalisation von DGAT2. Ein Fusionsprotein von LAT (linker for

activation of T-cells), GFP und DGAT2 ohne TMDs wurde im ER und auf LDs gefunden. Lediglich ein Fusionsprotein von ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule 1), GFP und DGAT2 ohne TMDs wurde in einigen Zellen in der Plasmamembran detektiert. Für eine Überprüfung der Hypothese waren die Zellen, die DGAT2 in der Plasmamembran vorwies, allerdings auch in diesem Ansatz nicht ausreichend. Es ist demnach grundsätzlich möglich DGAT2 in die Plasmamembran zu translozieren. Es sind aber offensichtlich weitere Modifikationen des Proteins notwendig, um die Translokation in ausreichender Quantität zu gewährleisten.

Im letzten Teil der Arbeit wurden verschiedene zuvor klonierte DGAT2-Konstrukte hinsichtlich ihrer Enzymaktivität untersucht und verglichen. Hierfür wurde ein Fluoreszenz-Enzymaktivitätsassay in der Arbeitsgruppe etabliert. Hierbei zeigte sich, dass jegliche Modifikation des Proteins zu einer Abnahme der Enzymaktivität führte. Ein Fusionsprotein aus GFP und DGAT2 zeigte eine Restaktivität von 20% verglichen mit WT DGAT2. Die Deletion der TMDs führte allerdings zu keiner weiteren Verminderung der Enzymaktivität. Dies steht im Kontrast zu Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die eine Neutrallipidbindungsdomäne der TMDs identifizierten, welche wichtig für die Enzymaktivität ist. Des Weiteren zeigte sich für das Konstrukt GFP- Δ 66-115DGAT2 H163A, das schon von anderen Arbeitsgruppen als nahezu inaktiv beschrieben wurde, eine minimale Restaktivität von 7%. Diese Untersuchung zeigt, dass DGAT2 in puncto Enzymaktivität sehr sensibel auf Proteinmodifikationen reagiert. Allerdings zeigte sich im experimentellen Ansatz ein großer Unterschied in der Menge an DGAT2-Protein, die für den Assay verwendet wurden. Es muss diesbezüglich noch gezeigt werden, ob sich die Enzymaktivität proportional zur verwendeten Proteinmenge verhält.

Die vorliegende Arbeit gibt einen Einblick in Membrantopologie und die Bedeutung verschiedener Proteinabschnitte von DGAT2 für Lokalisation und Enzymaktivität. Die Forschung an diesem für Lebewesen so wichtigen Enzym ist noch recht jung, hat aber viel Potential. Vor allem im Hinblick auf Pathophysiologie, aber auch Therapie von Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ II und Adipositas stellt DGAT2 ein potentielles Ziel dar. Hierfür werden allerdings noch mehr Untersuchungen von Nöten sein, die sich mit dem Enzym und mit der therapeutischen Beeinflussung der Enzymaktivität beschäftigen.