

## **To understand the molecular mechanism of tocopherol action and on this basis to be able to plan better clinical intervention studies and Tissue and cellular distribution of 3 human tocopherol associated proteins (hTAPs)**

**Projekt 317 / 317 b: Exekutiv-Zusammenfassung**

**Dr. Jean-Marc Zingg and Prof. Angelo Azzi, Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Bühlstrasse 28, 3012 Bern**

### **Einleitung/Hintergrund:**

$\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) hat neben anti-oxidativen Eigenschaften auch nicht anti-oxidative Wirkungen, welche beispielsweise die Gen-Expression und die zellulären Signalkaskaden beeinflussen. In den letzten Jahren wurde die Aufnahme von Vitamin E von der Nahrung charakterisiert und die daran beteiligten Proteine bestimmt. Für die Regulierung der Plasmakonzentration von Vitamin E durch die Leber wurde das  $\alpha$ -Tocopherol Transfer Protein,  $\alpha$ -TTP, identifiziert. Die Mechanismen der intrazellulären Vitamin E Verteilung sind jedoch immer noch unbekannt. Im Menschen haben wir drei Tocopherol Assoziierte Proteine (TAP 1, 2, 3) als potentielle Kandidaten identifiziert, welche für den intrazellulären Transport und für die nicht anti-oxidative Funktionen von Vitamin E in Frage kommen.

### **Ergebnisse und Diskussion:**

Aus menschlichem Lungengewebe wurden drei Gene kloniert, welche für die drei humanen SEC14-like Proteine (TAP 1, 2, 3) kodieren. Diese Proteine sind nahe verwandt sowohl mit SEC14p aus *Saccharomyces cerevisiae*, als auch dem Tocopherol Transfer Protein ( $\alpha$ -TTP) und dem zellulären Retinaldehyd-Binding-Protein (CRALBP). Aminoterminal besitzen diese Proteine eine SEC14 ähnliche Domäne, an welche hydrophobe Liganden binden können. Am Carboxyterminus besitzen die TAP Proteine zusätzlich eine GOLD Domäne, welche in anderen Proteinen (GCP60, PAP7) als Adapter-Domäne dient. Die GOLD Domäne ist für die Bindung an Golgi Giantin bzw. an den peripheren Benzodiazepin Rezeptor der Mitochondrien zuständig.

Zunächst wurden die drei TAP-Proteine zusammen mit einem carboxyterminalen Hemagglutinin-Tag kloniert und nach Transfektion von Zelllinien wurden die TAP Proteine in den Zellen lokalisiert. In der Zelle sind die TAP Proteine vor allem in Vesikeln vorhanden, welche vor allem im Golgi und im endoplasmatischen Retikulum konzentriert sind. Teilweise ist auch eine Lokalisation an der Plasma Membrane zu erkennen. Deletiert man die GOLD Domäne, verändert sich die Verteilung der TAP Proteine in der Zelle.

Die drei rekombinanten TAP Proteine binden *in vitro* verschiedene Tocopherole und auch spezifische Phospholipide (Phosphatidylcholine, Phosphatidylinositol und Phosphatidylglycerol). Die Tocopherole modulieren die Aktivität der Phosphatidylinositol-abhängigen Kinase in Abhängigkeit der TAP Proteine.

Drei neue polyklonale Antikörper gegen Peptide der drei TAP Proteine wurden generiert und zunächst in Western Blots getestet. Dabei zeigt sich, dass die Proteine, je nach Gewebe unterschiedlich exprimiert werden. Zusätzlich wurde an Gewebeschnitten 30 verschiedener

Gewebe das Expressions-Muster der drei TAP-Proteine überprüft. In den getesteten Geweben ist bei allen die Lokalisation der TAP Proteine im Golgi und im endoplasmatischen Retikulum zu sehen. Diese Resultate suggerieren, dass die TAP Proteine vermutlich bei der intra-zellulären Verteilung von Tocopherolen und Phospholipiden involviert sind. Eine korrekte Verteilung ist möglicherweise wichtig für die weiter metabolische Umwandlung dieser Liganden, oder für die Bildung von Speicher- und sekretorischen Vesikeln.

### **Schlussfolgerung:**

Die humanen TAP Proteine werden in fast allen Geweben exprimiert, wobei die Intensität der Expression verschieden ist. Die drei TAP Proteine regulieren vermutlich die Menge und Verteilung von zellulärem Tocopherol und auch von Phospholipiden. Durch den spezifischen Transport von Tocopherolen und Phospholipiden zu bestimmten Enzymen und Organellen beeinflussen die TAP Proteine vermutlich die Aktivität von Lipid-abhängigen zellulären Vorgängen. Eine konstante und adäquate Verteilung von Tocopherol innerhalb der Zellen ist wichtig, um kardiovaskuläre Krankheiten wie Atherosklerose, oder neurodegenerative Krankheiten wie Alzheimer's, Parkinson's oder Ataxie vorzubeugen. Vitamin E Mangel führt vor allem zu neuro-degenerativen Symptomen, und die Funktion von TAP im Gehirn könnte in der Vermittlung eines effizienten Vitamin E Transportes liegen. Die TAP Proteine könnten auch in Abhängigkeit der gebundenen hydrophoben Liganden bei Signal Transduktionsprozessen involviert sein. Weitere Experimente sind allerdings nötig, um die genauen zellulären Funktionen von TAP zu bestimmen.